

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

**PERİODONTAL HASTALIKLARIN TEDAVİSİ AMACIYLA  
STATİN İÇEREN BİR TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Ecz. Ayben Işıl ÖZDOĞAN**

**Farmasötik Teknoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2017**



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

**PERİODONTAL HASTALIKLARIN TEDAVİSİ AMACIYLA  
STATİN İÇEREN BİR TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Ecz. Ayben Işıl ÖZDOĞAN**

**Farmasötik Teknoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sevda ŞENEL**






**ANKARA**

**2017**

**Periodontal Hastalıkların Tedavisi Amacıyla Statin İçeren Bir Taşıyıcı Sistem  
Geliştirilmesi**

**Ecz. Ayben Işıl ÖZDOĞAN**

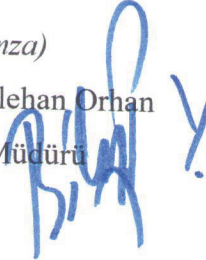
Bu çalışma 29/06/2017 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Teknoloji Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Selma ŞAHİN*  
(Hacettepe Üniversitesi) 
- Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Sevdâ ŞENEL*  
(Hacettepe Üniversitesi) 
- Üye:** *Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL*  
(Ankara Üniversitesi) 
- Üye:** *Doç. Dr. Gülçin AKCA*  
(Gazi Üniversitesi) 
- Üye:** *Yrd. Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU*  
(Hacettepe Üniversitesi) 

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

Tarih 26 Temmuz 2017

(imza)  
Prof. Dr. Diclehan Orhan  
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.

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenikle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

- **Tezimin/Raporumun 01.08.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

*Ecz. Ayben Işılay ÖZDOĞAN*

## 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, Prof. Dr. Sevda ŞENEL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*Ecz. Ayben Işılay ÖZDOĞAN*



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda destek olan, karşılaştığım zorluklarda ilgisi ve desteği ile yol gösteren, yardımını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevda ŞENEL'e,

Doktora eğitimime başlama kararı almamda büyük desteği olan değerli hocam Prof. Dr. R. Neslihan GÜRSOY'a,

In vivo çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Yağmur Deniz İLARSLAN, öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. H. Burak KUTLU ve öğrencisi Elnur COMERDOV, Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU, Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Alper B. İSKİT'e ve değerli arkadaşım Oytun TUNÇEL'e,

Hem in vitro hem de in vivo çalışmalarım sırasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gülçin AKCA'ya, in vitro FT-IR çalışmalarımındaki destekleri için Farmasötik Kimya Anabilim Dalı eski araştırma görevlisi Dr. Peri AYTAÇ'a,

Çalışmalarımda bana yardım ve destek sağlayan arkadaşlarım Ecz. Naile ÖZTÜRK, Ecz. Sedenay AKBAŞ, Ecz. Dilara AYDIN'a ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki tüm diğer arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma,

Duydukları güven ve sevgi ile her zaman yanımda olan, hayatımın her aşamasında gösterdikleri sabır ve özveri için annem Aysel ÖZDOĞAN, babam Nadir ÖZDOĞAN, ablam Aysu Özlem ÖZDOĞAN ve kardeşim Günsu ÖZDOĞAN başta olmak üzere değerli aileme,

Tez çalışmalarım için proje (114S758) desteği sağlayan TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'na teşekkür ederim.

## ÖZET

**Özdoğan, A.I., Periodontal Hastalıkların Tedavisi Amacıyla Statin İçeren Bir Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017.** Periodontal hastalık gingiva, periodontal ligamentler ve alveolar kemiğin inflamasyon ve dejenerasyonu ile karakterize edilir. Lokal olarak uygulanacak ilaç taşıyıcı sistemlerle daha düşük dozda daha yüksek etki elde edilebilmektedir. Son yıllarda antiinflamatuvar etkileri nedeniyle statin grubu ilaçlar da kullanılmaktadır ve uygun bir taşıyıcı sistemle lokal olarak uygulanması ile etkilerinin artırılması mümkündür. Ancak ağız hareketleri ve tükürük salgısı nedeniyle ilaç uygulama bölgesinden uzaklaşmaktadır. Uygulama bölgesinde istenen süre boyunca kalabilmesi için bioadeziv polimerlerden yararlanılmaktadır. Bu polimerler arasında olan kitosan antiinflamatuvar, antimikrobiyal, yara iyileştirici gibi biyoaktif özellikleriyle diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada periodontitis tedavisinde lokal atorvastatin uygulaması için kitosan bazlı jel formülasyonu geliştirilmiştir. Atorvastatinin farklı polimerlerle (PEG 6000, pluronik F-68, kitosan) katı dispersiyonu hazırlanarak çözünürlüğü artırılmış ve farklı kitosan tipleriyle jel formülasyonları geliştirilmiştir. Formülasyonların antiinflamatuvar etkileri, in vitro olarak gingival fibroblast hücrelerinde (hGF) ve in vivo olarak sıçanlarda ligatürle indüklenmiş periodontitis modelinde incelenmiştir. Bu amaçla proinflamasyon belirteçlerinden IL-1beta, IL-6, IL-8 ve antiinflamatuvar belirteçler olan IL-10, TGF-beta1, TGF-beta2 ve TGF-beta3 sitokinlerinin seviyeleri ölçülmüş ve histolojik olarak osteoklastik aktivite değerlendirilmiştir. Uygulama sonrasında in vitro çalışmalarda sitokin düzeylerinin azaldığı ve kitosan varlığı ile inhibisyonun arttığı gözlenmiştir. In vivo çalışmalarda ilk haftalarda sitokin düzeylerinde azalma ve bununla uyumlu olarak osteoklastik aktivitede de azalma saptanmıştır. Kitosan ile birlikte uygulandığında atorvastatinin antiinflamatuvar etkisinin arttığı görülmüştür. In vitro ve in vivo çalışmalar birbirini desteklemiştir. Atorvastatin içeren kitosan bazlı jel formülasyonlarının periodontitis tedavisinde gerek etkinlik gerekse hasta uyuncu yönüyle ümit verici olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: atorvastatin, kitosan, antiinflamatuvar, periodontitis.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK-SBAG-1001 programı (114S758) tarafından desteklenmiştir.



## ABSTRACT

**Ozdogan, A.I., Development of a Delivery System for Statin in the Treatment of Periodontal Disease, Hacettepe University Faculty of Pharmacy Department of Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017.** Periodontal disease is characterized by inflammation and degeneration in gingiva, periodontal ligaments and alveolar bone. It is possible to deliver the drug at low dose with high efficacy by means of local delivery into the periodontal pocket. Recently statin group drugs which exert inflammatory activity are also used for this purpose. The efficacy of statins can be enhanced by local administration in an appropriate delivery system. However, the delivery system may be removed from the application site due to the mouth movements and saliva secretion. Bioadhesive polymers are used to provide the retention of the system at the application site for desired period of time. Amongst them is chitosan which is widely used in dental therapy for its anti-inflammatory, antimicrobial, wound healing effects as well. In this study, chitosan based gel formulations for a statin group drug, atorvastatin was developed for local delivery. In order to enhance the solubility of atorvastatin, solid dispersions were prepared using different polymers (PEG 6000, Pluronic F-68, chitosan) and incorporated into gels prepared using chitosans with different properties. The antiinflammatory effect of the formulations were investigated in vitro on gingival fibroblast cells (hGF) and in vivo in rats with ligature induced periodontitis. The levels of proinflammatory cytokines including IL-1beta, IL-6, IL-8 and antiinflammatory cytokines which are IL-10, TGF-beta1, TGF-beta2 ve TGF-beta3 were and osteoclastic activity was evaluated histologically. Following the application of formulations, decrease in cytokine levels was observed and this was to be profound in presence of chitosan. In correlation with this result, osteoclastic activity was found to decrease. In general evaluation, the antiinflammatory effect of atorvastatin was found to increase in presence of chitosan. Hence, it is concluded that the developed formulations are promising for the treatment of periodontal disease.

**Key Words:** atorvastatin, chitosan, antiinflammatory, periodontitis.

This study was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758).

## İÇİNDEKİLER

<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>iii</b>
<b>YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI</b>	<b>iv</b>
<b>ETİK BEYAN</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>xii</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xiv</b>
<b>TABLolar</b>	<b>xviii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Periodontal Hastalık	3
2.1.1. Periodontal Hastalığın Sebepleri ve Oluşum Mekanizması	4
2.1.2. Periodontal Hastalıkta Tedavi Yaklaşımları	7
2.1.3. Periodontal Hastalıkta Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler	8
2.1.4. Periodontal Hastalıkta Statin Grubu Etkin Maddelerin Kullanımı	10
2.2. Lokal Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonu	11
2.3. Kitosan	13
2.3.1. Kitosanın Diş Hekimliğinde Uygulamaları	15
2.4. Katı Dispersiyonlar	17
2.4.1. Katı Dispersiyon Hazırlama Yöntemleri	18
2.4.2. Katı Dispersiyonlarda Kullanılan Polimerler	24
2.5. Atorvastatin Kalsiyum	25
2.5.1. Fiziksel Özellikleri	26
2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri	26
2.5.3. Atorvastatinin Periodontal Hastalıklarda Uygulamaları	27

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>29</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler	29
3.2. Etkin Maddeye Ait Çalışmalar	31
3.2.1. UV Spektrumu	31
3.2.2. Atorvastatinin UV Spektrofotometre ile Miktar Tayini	32
3.2.3. Analitik Yöntem Validasyonu	32
3.3. Formülasyon Geliştirme	34
3.3.1. Jel Formülasyonu Hazırlanması	34
3.3.2. Katı Dispersiyonların Hazırlanması	34
3.3.3. Katı Dispersiyonların Karakterizasyonu	38
3.3.4. Katı Dispersiyon-Kitosan Jel Karışımı Hazırlanması	40
3.4. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan İn Vitro Çalışmalar	42
3.4.1. Viskozite Ölçümü	42
3.4.2. Biyoadezyon Çalışmaları	42
3.4.3. Şırınga Edilebilirlik Testi	44
3.4.4. Salım çalışmaları	45
3.4.5. Hücre Kültüründe Antiinflamatuvar Etkinin İncelenmesi	46
3.5. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan İn Vivo Çalışmalar	47
3.5.1. Sıçanlarda İplikle Bağlayarak (Ligatürle) İndüklenmiş Periodontitis Geliştirme Modeli	47
3.5.2. İn Vivo Deney Protokolü	48
3.5.3. Doku Örneklerinde Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	50
3.5.4. Histolojik ve Histometrik Analizler	50
3.5.5. İstatistiksel Analizler	52
<b>4. BULGULAR</b>	<b>53</b>
4.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini ve Validasyonu	53
4.2. Formülasyon Geliştirme	57
4.2.1. Katı Dispersiyon Hazırlanması	57
4.2.2. Jel formülasyonları	71

4.3. İn Vivo Çalışmalar	100
4.3.1. Doku Örneklerinde Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	101
4.3.2. Histolojik ve Histometrik Analiz Sonuçları	115
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>132</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>151</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>152</b>
<b>8. EKLER</b>	
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
<b>EK-2:</b> Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>AT</b>	Atorvastatin
<b>CE</b>	Birlikte Buharlaştırma
<b>CG</b>	Birlikte Öğütme
<b>CRP</b>	C- reaktif protein
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Media
<b>DSC</b>	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FT-IR</b>	Fourier Transform İnfrared Spektroskopi
<b>HBSS</b>	Hanks balance solution
<b>hGF</b>	İnsan Gingival Fibroblast
<b>HMG-KoA</b>	3-hidroksi-3- metilglutaril-koenzim a
<b>HPMC</b>	Hidroksipropil metilselüloz
<b>ICAM</b>	hücrelerarası adezyon molekülü
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>K</b>	Kitosan
<b>KN</b>	Yoğurma
<b>ML</b>	Eritme
<b>P</b>	Protasan
<b>PDGF</b>	platelet türevi büyüme faktörü
<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>PL</b>	Pluronik
<b>PVA</b>	Polivinil Alkol

<b>PVP</b>	Povidon
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TGF</b>	Transforme Edici Büyüme Faktörü
<b>TNF</b>	Tümör Nekrozu Faktörü

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Periodontal hastalığın gelişimi	4
2.2. Periodontal dokudaki inflamasyonun oluşum mekanizması	7
2.3. Kitosanın kimyasal yapısı	14
2.4. Atorvastatin kalsiyumun molekül formülü ([[(3R,5R)-7-[3-(fenilkarbamoil) 5-(4-florofenil) -2- izopropil- 4-fenil-1H-pirol-1-il] -3,5-dihidroksiheptaoik asit, kalsiyum tuzu	26
3.1. Biyoadezyon çalışmalarında elde edilen kuvvet-zaman eğrisi	43
3.2. Tekstür analiz cihazının kamera ve aydınlatma sistemi	43
3.3. Biyoadezyon ölçümlerinde elde edilen kuvvet-zaman eğrisi. 1) prob jelle temas etmeden önce; 2) probun 0.2 N kuvvet ile probun jelle teması (180 san); 3) probun yukarıya doğru hareketi; 4) probun jelden kopma anı	44
3.4. Tekstür analiz cihazında şırınga edilebilirlik testi düzeneği	45
3.5. Franz difüzyon hücresinin şematik görünümü	46
3.6. Sıçan diş etinde ligatürle indüksiyon	49
3.7. Sıçan diş etine formülasyon uygulanması	49
3.8. Hayvan çalışmalarında takip edilen protokol	50
3.9. Sağlıklı ve periodontitis oluşmuş dokuların şematik ve histolojik görüntüleri (a) Mine-sement sınırının atasmana olan uzaklığı; (b) Mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığı; (c) Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (üst); (d) Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (mid); (e) Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (alt); (f) Alveolar kemiğin alanı	51
4.1. pH 6.8 tamponunda atorvastatin'in UV spektrumu	53
4.2. Atorvastatinin kalibrasyon doğrusu ( $r^2=0,999$ )	54
4.3. Baz kitosan (a) ve baz kitosan+atorvastatin (b) katı dispersiyonuna ait spektrumlar (pH 6.8 fosfat tamponu içinde)	56
4.4. PEG (a) ve PEG+atorvastatin (b) katı dispersiyonuna ait spektrumlar (pH 6.8 fosfat tamponu içinde)	56
4.5. Pluronik (a) ve Pluronik+atorvastatin (b) katı dispersiyonuna ait spektrumlar (pH 6.8 fosfat tamponu içinde)	57
4.6. Saf atorvastatinin ve atorvastatin katı dispersiyonlarının su içindeki ve pH 6.8 fosfat tamponu içindeki çözünürlükleri	58

4.7.	Farklı polimerler: a) PEG 6000; b) Pluronik F-68; c) baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait DSC termogramları	61
4.8.	Farklı polimerler: a) PEG 6000; b) Pluronik F-68; c) baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait FT-IR Spektrumları	64
4.9.	Atorvastatine ait X-ışını difraksiyon deseni	66
4.10.	Farklı polimerler: a) PEG 6000; b) Pluronik F-68; c) baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait X-ışını kırınımı	68
4.11.	Atorvastatine ait SEM mikrografları (x25.000)	69
4.12.	PEG 6000 ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait SEM mikrografları (x25.000)	69
4.13.	Pluronik F-68 ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait SEM mikrografları (x25.000)	70
4.14.	Baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait SEM mikrografları (x25.000)	71
4.15.	AT içeren jel formülasyonlarına ait viskozite eğrileri (n=3)	73
4.16.	AT katı dispersiyonları içeren jel formülasyonların viskozite eğrileri (n=3)	74
4.17.	Jel formülasyonlarının biyoadezyon özellikleri $\pm$ SS (n=3)	77
4.18.	AT katı dispersiyonları içeren formülasyonların biyoadezyon özellikleri $\pm$ SS (n=3)	78
4.19.	AT katı dispersiyonları içeren formülasyonların şırınga edilebilirliğini gösteren iş eğrileri (n=3)	82
4.20.	AT içeren jel formülasyonlardan etkin madde salım profilleri $\pm$ SS (n=6)	84
4.21.	AT katı dispersiyonları içeren jel formülasyonlardan etkin madde salım profilleri $\pm$ SS (n=6)	86
4.22.	Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-1beta seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra	89
4.23.	Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-6 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra	90
4.24.	Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-8 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra	92
4.25.	Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-10 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra	93



- 4.26. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta1 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra 95
- 4.27. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta2 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra 97
- 4.28. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta3 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra 99
- 4.29. Sağlıklı (- kontrol) (a) ve periodontitis (+ kontrol) (b) geliştirilmiş sıçanlarda periodontal dokuların görünümü 100
- 4.30. Çalışma boyunca sıçan ağırlıkları (g) 100
- 4.31. Sıçan diş eti dokularında IL-1beta seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). ## gP-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 102
- 4.32. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-1beta seviyeleri (4 saat sonra) 102
- 4.33. Sıçan diş eti dokularında IL-6 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). ## gP-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 104
- 4.34. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-6 seviyeleri (4 saat sonra) 104
- 4.35. Sıçan diş eti dokularında IL-8 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 106
- 4.36. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-8 seviyeleri (4 saat sonra) 106
- 4.37. Sıçan diş eti dokularında IL-10 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 108
- 4.38. Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-10 seviyeleri (4 saat sonra) 108
- 4.39. Sıçan diş eti dokularında TGF-beta1 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \* gK ve

- (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). # gP ve (+)kontrol grubu arasında anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 110
- 4.40.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta1 seviyeleri (4 saat sonra) 110
- 4.41.** Sıçan diş eti dokularında TGF-beta2 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 112
- 4.42.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta2 seviyeleri (4 saat sonra) 112
- 4.43.** Sıçan diş eti dokularında TGF-beta3 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). # gP ve (+)kontrol grubu arasında anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ). 114
- 4.44.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta3 seviyeleri (4 saat sonra) 114
- 4.45.** İnflamasyon değerlendirmesine ait skorlama (gP-AT) 125
- 4.46.** Osteoklastik aktivite değerlendirmesine ait skorlama (gK-AT) 126
- 4.47.** a) Alveolar kemiğin alanı; b) Mine-sement sınırının ataçmana olan uzaklığı 129

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
3.1. Jel formülasyonlarında kullanılan polimerler	34
3.2. Katı dispersiyonların hazırlanması	35
3.3. Hazırlanan katı dispersiyonlar	38
3.4. Geliştirilen jel formülasyonları	41
3.5. İn vivo deney grupları	49
4.1. Doğruluk çalışmasına ait sonuçlar (n=6)	54
4.2. Kesinlik çalışmasına ait sonuçlar	55
4.3. Atorvastatinin fosfat tampon içinde stabilitesine ait sonuçlar	55
4.4. Sudaki ve pH 6.8 fosfat tamponu içindeki çözünürlük sonuçları	58
4.5. Fiziksel karışım ve katı dispersiyonların erime noktalarının karşılaştırılması	62
4.6. PEG ile hazırlanan katı dispersiyonlarının FT-IR spektrumlarında elde edilen karakteristik bantlar	64
4.7. Pluronik F-68 ile hazırlanan katı dispersiyonlarının FT-IR spektrumlarında elde edilen karakteristik bantlar	65
4.8. Baz kitosan ile hazırlanan katı dispersiyonlarının FT-IR spektrumlarında elde edilen karakteristik bantlar	65
4.9. Formülasyonların viskozite değerleri ( $25 \pm 0.1$ °C) (n=3)	72
4.10. Jel formülasyonlarının biyoadezyon özellikleri (n=3)	76
4.11. Jel formülasyonlarının şırınga edilebilirlik özellikleri (n=3)	83
4.12. Çıkarılan sıçan çenelerinde mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığının mikroskopik olarak değerlendirmesi	116
4.13. Çıkarılan sıçan çenelerinde mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığının mikroskopik olarak değerlendirmesi	117
4.14. Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemiğin dişe olan uzaklığının (üst) mikroskopik olarak değerlendirmesi	118
4.15. Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemiğin dişe olan uzaklığının (mid) mikroskopik olarak değerlendirmesi	119
4.16. Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemiğin dişe olan uzaklığının (alt) mikroskopik olarak değerlendirmesi	120

- 4.17. Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemik alanının mikroskopik olarak değerlendirilmesi 121
- 4.18. Çıkarılan sıçan çenelerinde osteoklastik aktivitenin mikroskopik olarak değerlendirilmesi 122
- 4.19. Çıkarılan sıçan çenelerinde inflamasyonun mikroskopik olarak değerlendirilmesi 123

## 1. GİRİŞ

Periodontal hastalık (diş eti hastalığı) dişeti ve dişleri destekleyen diğer dokuları etkileyen inflamatuvar bir hastalıktır. Dişeti kenarındaki veya altında yer alan biyofilm halindeki mikroorganizmaların neden olduğu yaygın görülen mikrobiyal enfeksiyondur. Alveolar kemiğin erimesi, kollajen liflerin dejenerasyonu, periodontal ligament kaybı ve ataşman kaybı ile karakterize olan patolojik bir durumdur. Kırmızı, şiş ve kanayan dişetleri periodontal hastalığın bulgularındandır. Hastalığın tedavi edilmemesi durumunda, inflamasyonun devam etmesi sonucu dişleri destekleyen dokuların yıkımıyla beraber dişin kaybedilmesine kadar ilerlemesine kadar gidebilmektedir.

Periodontal hastalıkta ilk başta yapılan tedavi hastalığın ilerlemesine sebep olan bakteri plağı ve diş taşlarının temizlenmesidir. Bu amaçla diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi gibi mekanik uygulamalar yapılmaktadır. Ancak bu uygulamalar periodontal hastalıkta sadece başlangıç tedavisi olmakla sınırlı kalmakta, periodontal dokulara tutunması sebebiyle uzaklaştırılamayan ve ulaşılamayan bakteriler sebebiyle hastalık ilerleyerek ataşman kaybı, alveolar kemiğin ve periodontal ligamentin yıkımı gerçekleşmektedir.

Periodontal hastalıkta, mekanik tedaviye ek bir tedavi yaklaşımı olarak sistemik antibakteriyal ajan kullanımı benimsenmiştir. Ancak oral ilaç kullanılmasının; ilacın hepatik ilk geçiş etkisine uğraması, gastrointestinal kanalda enzimatik veya hidrolitik olarak parçalanması ve bunun sonucunda etki yerine ulaşacak etkin madde miktarının daha az olması, ve bu doğrultuda daha yüksek dozda uygulama zorunluluğu gibi sakıncaları vardır. Ayrıca antibiyotik kullanımı çok ciddi bakteri direnci oluşumuna neden olmakta ve patojenlerin dirençli olduğu antibiyotiklerin kullanılması hastalık ilerleyişinin durdurulmasında başarısızlığa sebep olmaktadır.

Plak kontrolü ve oluşumunun engellenmesi için yapılan mekanik temizlemeye ek olarak topikal ilaç uygulamaları da mevcuttur. Bu amaçla ağız yıkama çözeltileri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu solüsyonların, günde birkaç kez kullanmayı gerektirmesi ve

periodontal hastalıkta oluşan periodontal cebe tutunmaması ve tükürkle hemen uzaklaştırılması gibi sebeplerle etki bölgesinde uzun süre kalmaması gibi dezavantajları vardır.

Statinler ateroskleroz ve kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarında hiperkolesterolemiyi tedavi etmek amacıyla kullanılan etkin maddelerdir. Yapılan son çalışmalarda statinlerin lipid düşürücü etkilerinin dışında pleiotropik etki olarak antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Statin grubu etkin maddeler antiinflamatuvar etkisinden dolayı periodontal hastalıkların tedavisinde denenmektedir.

Lokal ilaç tedavisi ile uygulama bölgesinde yüksek etkin madde konsantrasyonu, düşük yan etkisi, gibi üstünlükleri nedeniyle sistemik ilaç tedavisine tercih edilmektedir. Ancak lokal olarak uygulanan ilacın uygulama bölgesinden tükürük salgısı ve ağız/dil hareketiyle uzaklaşmasını engellemek için uygun formülasyonlar gereklidir. Bu amaçla biyoadeziv polimerlerden yararlanır. Bu polimerlerden bir tanesi olan kitosanın hem biyouyumlu, biyoparçalanabilir olması hem de antimikrobiyal, antiinflamatuvar, yara iyileştirici, doku rejenerasyonu sağlayıcı gibi biyolojik aktivitelere sahip olması nedeniyle diş hekimliği tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, antiinflamatuvar etkiye sahip statin grubu ilaçlar için lokal olarak periodontal cebe uygulanacak ve etki bölgesinde uzun süre kalacak bir formülasyon geliştirilmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

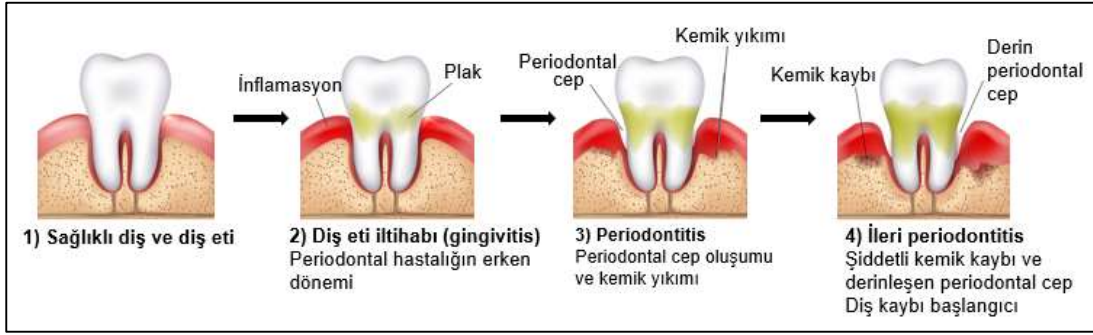
### 2.1. Periodontal Hastalık

Periodonsiyum; diş eti (gingiva), alveolar kemik, periodontal ligament ve sementten oluşan ve diş destekleyen yapıların bütünüdür. Periodontitis ise dişin destek dokuları olan alveolar kemik, sement ve periodontal ligamentin kaybı ile karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır (1). Mikrobiyal dental plak periodontal hastalığın başlama ve ilerlemesinde ana etyolojik ajan olarak kabul edilmektedir (2). Dental plak tek bir yapı içinde birbirleriyle kompleks ilişkili, çok sayıda farklı bakteriyel tür içeren biyofilm tabakasıdır (3). Periodontal hastalık primer olarak gram (-) bakteri kaynaklıdır (4).

İnflamasyon sadece gingivayı etkilediği zaman gingivitis; daha derin periodontal dokulara ilerlediği zaman periodontitis adını alır (5). Gingivitis, dişetlerinde kanama, kızarıklık, ödematöz bir klinik görüntü ile karakterizedir ve dişeti oluşu sıvısında artış ve sondlamada kanama mevcuttur (6). Page ve ark. hastalığın ilerlemesiyle ilgili aşamaları rapor etmiştir (7). Gingivitis tedavi edildiği takdirde geri dönüşümü olabilen bir hastalıktır (8).

Periodontitis ise ataçman ve kemik kaybı ile ilerleyen iltihabi bir periodontal hastalıktır (9). Diş etlerinde çekilme ya da büyümeler, kök furkasyon bölgesinde açıklık, diş mobilitesinde artış, yer değiştirme ve sonunda diş kaybı diğer bulgulardandır (10). Genellikle yavaş ilerleyen, ağrısız bir hastalıktır ancak ilerleme hızı, konak yanıtını etkileyen diyabet, sigara tüketimi gibi çevresel ve sistemik faktörlerden etkilenmektedir (11).

Alveoler kemik rezorpsiyonu ve periodontal ataşman kaybı, periodontitis öncesinde gözlenen gingivitis tablosundan ayıran en önemli bulgulardır (1). Periodontal hastalığın gelişim evreleri Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Periodontal hastalığın gelişimi (12)

### 2.1.1. Periodontal Hastalığın Sebepleri ve Oluşum Mekanizması

Periodontal hastalık, periodontal ataşman kaybı, alveoler kemik kaybı, periodontal cebin oluşumu gibi lezyonların oluşumuna ve diş etiyle diş kökü arasında derinleşen çatlaklar ve bunun sonucunda ağrı ve huzursuzluk oluşumu, çiğneme bozukluğu ile birlikte dişlerin geri dönüşümsüz kaybına kadar ilerleyen olaylar dizisidir (13). Periodontitis çok sayıda etkeni olan bir hastalıktır. Değişik türdeki periodontal hastalıklar klinik bulgular, ilerleyiş hızı ve tedaviye verdikleri yanıtlar açısından farklılıklar gösterir (9, 14). Sigara, hormonal değişiklik, diyabet, ilaç, hastalık, genetik faktörler gibi risk faktörleri periodontal hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynar (11). Periodontitis, aterosklerozis, kardiyovasküler hastalık, romatoid artrit, diyabetes mellitus gibi kronik inflamasyon durumlarıyla bağlantılıdır. Sistemik durumlar ve periodontal hastalık arasındaki ilişki tam olarak açıklanamasa bile klinik belirtiler, periodontitisin konakçı cevabı ve inflamatuvar belirteçlerin serum seviyelerinin artmasıyla değerlendirilen bir durum olduğunu göstermektedir (15).

Bukkal boşlukta çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır ancak hepsi patojenik değildir. Periodontitisten gram negatif bakteriler genel olarak sorumludur. Hastalığın şiddetine göre mikroorganizmaların çeşitlerinde gram-pozitif aerobik türlerden gram-negatif anaerobik türlere doğru değişim olur. Gram-negatif bakteriler arasında *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Wolinella recta*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* vardır (16).



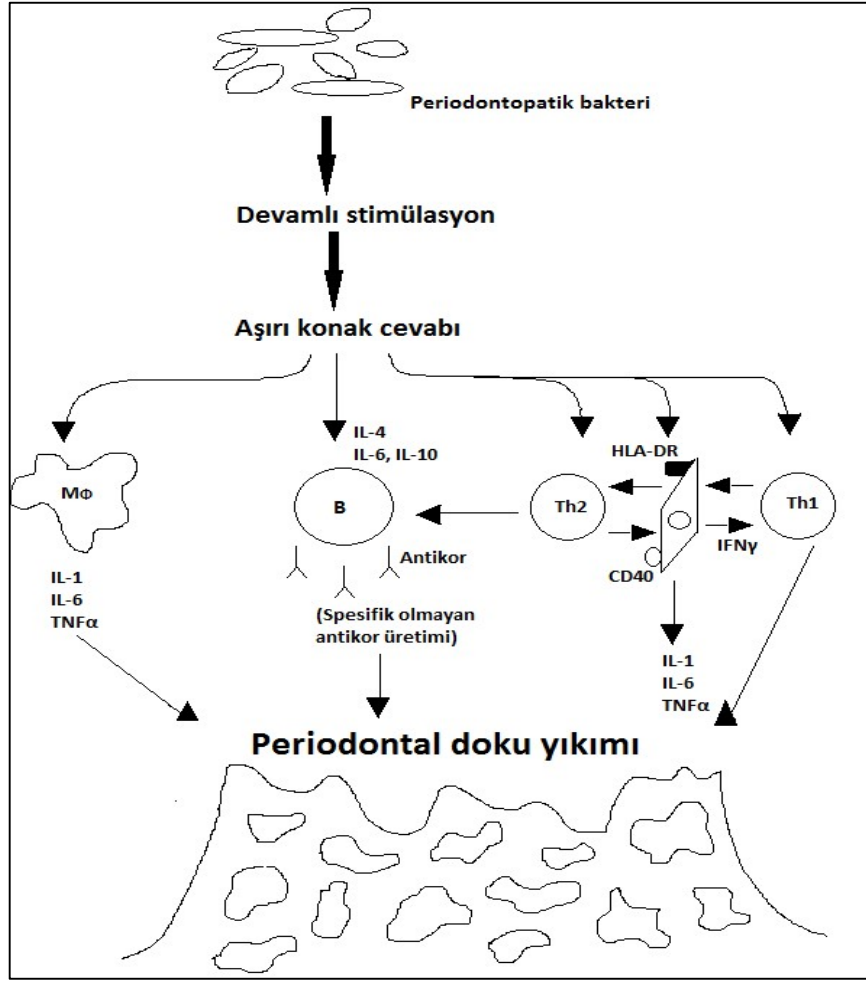
Enfeksiyöz karakter sergileyen periodontitisin gelişmesi için patojen varlığı gerekli olmakla beraber, tek başına yeterli değildir. Periodontopatojen olarak kabul edilen mikroorganizmaların başlattığı konak cevapları da periodontitisin oluşumunda önemli bir etkindir (17).

1970'lerde konak cevabı ve mediyatörlerin rolleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Ivanyi ve ark. (18) periodontitisli hastaların periferik lenfositlerinin, bakteri plağına karşı, sağlıklı bireylerin lenfositlerinden daha fazla reaksiyon verdiğini rapor etmişlerdir. Aynı yıl, Klein ve ark. (19) doku kültüründe prostaglandinlerin kemik rezorpsiyonunun potent stimulatörleri olduğunu bildirmişlerdir. Goodson (20), prostaglandinlerin periodontal dokularda bulunduğunu ve hastalıkta alveoler kemik rezorpsiyonunda önemli rolü olduğunu rapor etmiştir. Horton ve ark. (21) periodontitis'li hastaların periferik kanlarındaki lökositler stimüle edildiğinde, kemik rezorpsiyonuna neden olacak bir madde salgıladıklarını bulmuş ve o dönemde bu maddeye osteoklast aktive edici faktör adı verilmiştir.

1990'lı yıllarda, periodontitisin ilerlemesinde sitokinler ve inflamatuvar mediyatörlerin rol oynadığı üzerinde durulmuştur. Patojenik bakterilerle karşılaşılınca lökositler ve inflamasyon mediyatörleri damar geçirgenliğinin artması ile periodontal yumuşak dokulardan periodontal boşluğa doğru hareket etmektedir. Vücudun inflamatuvar cevabı olarak T-lenfositler, nötrofiller, plazma hücreleri, antikor salımı, sitokin (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) (22), kemokin ve C-reaktif protein ve lipopolisakkarit seviyeleri artmaktadır (15). Bu mediyatörler (belirteç), doku tahribi yapan bir ya da daha fazla faktörü aktive ederek, başta matriks metalloproteinaz, plazminojen ve polimorfonükleer serin proteaz olmak üzere bu faktörler kemik rezorpsiyonuna yol açmaktadır (23, 24). Bunlar proteolitik enzimlerden olan metalloproteinaz gibi kollajenaz enzimlerin serbest bırakılmasına neden olan inflamasyon belirteçlerinin hareketine sebep olarak bağ dokusunun ekstraselüler matriksinin degradasyonuna yol açmaktadır. Bu inflamasyon belirteçlerinin kademeli artışıyla (22) gingiva ve periodontal dokuların inflamasyonu gerçekleşmektedir (14). Ayrıca diş etinde prostaglandinlerin, PGE<sub>2</sub>, artışı

ile hastalığın ilerlemesine sebep olarak inflamasyon oluşumu sonucu alveolar kemik erimesi görülmektedir (22).

Bakteriye karşı konak immün cevabı, inflamatuvar medyatörlerin çok miktarda salınımına yol açarak doku yıkımını başlatmaktadır. Periodontopatik bakterilerin periodontal cepte devamlı stimülasyonu sonucu aşırı konak cevabı meydana gelmekte, gingival epitelyal hücre ve fibroblast yanıtları oluşmakta ve lokal olarak makrofaj, T hücre ve B hücre infiltrasyonları meydana gelmektedir. Bunların sonucunda inflame olan periodontal dokularda aşırı sitokin üretimiyle beraber dokularda hasar meydana gelmektedir. Th1 hücreleri proinflamatuvar özellikte olup, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interlekin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) kaynağıdır. İlerleyen periodontitis lezyonlarında Th2 hücreleri B hücrelerini uyaran sitokinleri serbest bırakmaktadır. B hücreleri antikor üretebilirse patojenik bakteriler elimine edilir, ancak B hücreleri Th2 hücreleri tarafından aşırı uyarılarak aktive edilirse IL-1 serbest bırakılır ve bağ dokusu harabiyete uğrar. Th1 ve Th2 hücre tip sitokinler inflame periodontal lezyonlarda bulunmaktadır ve immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. İnflamasyonu tetikleyici genel mekanizma Şekil 2.2’de verilmiştir.



**Şekil 2.2.** Periodontal dokudaki inflamasyonun oluşum mekanizması (25)

### 2.1.2. Periodontal Hastalıkta Tedavi Yaklaşımları

Hastalığın şiddetine göre cerrahi müdahale, mekanik tedavi ve farmakolojik ajanların kullanımı gibi tedaviler uygulanabilir. Diş taşını kazıma (scaling) ve kök yüzeyini düzleştirme (root planning) cerrahi olmayan mekanik tedavide altın standarttır ve başlangıç tedavisi olarak kullanılabilir. Bu tedaviler, klinik semptomların ortadan kalkmasını ve periodontal patojenlerin uzaklaştırılmasını sağlar ancak bütün hastalar bu konvansiyonel tedaviye (26) istenilen cevabı vermez (27). Subgingival biyofilm ve tartar da mekanik yollarla uzaklaştırılır ancak derin ceplere ulaşamayabilir (28). Ayrıca diş ile diş eti arasındaki bağ dokuların yıkımı hızlı olabilmektedir. Bu durumda mekanik tedavi yöntemlerine ek olacak tedavi yöntemleri tercih edilmektedir.

Bu amaçla oral hijyen sağlayan antiseptikler sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu kullanım sınırlıdır, plak kontrolünde ve diş eti inflamasyonunda, bu antiseptiklerde kullanılan kimyasal ajanların ağız boşluğundaki yerleşik mikroflorayı bozmaması gerekmektedir; ayrıca ağız yıkama çözeltileri diş etine tutunmadığı için etki bölgesinde uzun süre kalamadığından sık kullanım gerektirmektedir. Ancak akut durumlarda, cerrahi tedavi sonrası inflamasyonun kontrol altına alınmasında kullanılabilir. Bu ilaçlara örnek fenolik bileşikler içeren Listerine®, sanguinarin içerkli Viadent®, kuaterner amonyum bileşikleri içeren Cepacol® örnek verilebilir (29).

Periodontal bağ dokunun ve alveolar kemiğın yıkımı konağın bakteri plağına ya da bakteriyel ürünlere cevabı şeklinde oluşur. Bu konak cevabını değıştirmek için matriks metalloproteinaz (MMP) gibi enzim inhibitörleri, prostaglandin, sitokin gibi pro-inflamatuvar mediyatör inhibitörleri ve osteoklast inhibitörleri tedavide umut verici yaklaşımlardır (29, 30). Bu amaçla osteoklast inhibitörü olup kemik yıkımını azaltan alendronat gibi bifosfanatlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır ancak, bu grup etkin maddeler yan etkilerinden dolayı tercih edilmemektedir (30, 31). Non-steroidal antiinflamatuvar etkin maddeler siklooksijenaz enzim sistemini (COX-1) ve prostaglandin (PGE2) sentezini inhibe ederek konak cevabını değıştirmektedir. Ancak prostaglandin sentezini inhibe eden ibuprofen ve flurbiprofenle yapılan çalışmada beklenenin aksine etkileri minimum bulunmuştur (30). Konak, bakteri ve bakteriyel ürünlere karşı cevap olarak tetrasiklinlerle ilgili, doku yıkımına neden olan matriks metalloproteinaz enzimini inhibe ettiği gösterilen bir çalışma mevcuttur (30). Ayrıca lazer tedavisi uygulandığı bildirilmiştir (32)

Kolesterol düşürücü etkilerinin yanısıra antiinflamatuvar etkileri bilinen statinler üzerine periodontal alanda çalışmalar mevcuttur (33-39).

### **2.1.3. Periodontal Hastalıkta Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Periodontal hastalık tedavisinde lokal uygulanan lif, film, jel, strip, mikropartikül, nanopartikül, veziküler sistemlerle ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (13, 40).

## **Sistemik Tedavi**

Diş eti çizgisinde ya da bu çizginin altında mikroorganizmaların birikmesi sonucu oluşan enfeksiyon sonucu oluşan periodontal hastalıkta, patolojik durumun ana etkeni bakteri olduğu için sistemik uygulanan antibiyotik tedavileri geliştirilmiştir (41). Subjivada biriken ve yumuşak dokuya tutunan organizmaların uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Ancak patojenik mikroorganizmaların büyümesini engelleyen ya da bu organizmaları öldüren uygun etkin madde dozunun ayarlanması gerekmektedir (27). Ayrıca kolonize haldeki bu organizmalar, tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı, kendilerine kısmi koruma sağlayan biyofilm içinde bulunmaktadırlar. Literatürde periodontal hastalığın tedavisinde sistemik yolla antibiyotik kullanımı hakkında çok sayıda çalışma vardır ancak sonuçlar, kullanılan antibiyotik, dozaj, etki süresi, tedavinin takip edildiği süre, tedavi edilen populasyon gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (41).

Ayrıca antimikrobiyal etkin maddelerin sistemik yan etkileri olabilir: periodontal cebe ulaşan etkin madde konsantrasyonu yeterli olmayabilir, sık uygulama dozu gerektirir, hasta uyuncu gerektirir ve mikrobiyal direnç gelişebilir (28). Ayrıca hepatik ve renal yolların hastalığı ya da bozulması durumunda antibiyotik kullanımı kısıtlıdır, ayrıca penisilin türevi antibiyotiklere karşı alerji olması durumunda bu etkin madde kullanılmamalıdır (27).

Sistemik antibiyotik tedavisinde amoksisilin, amoksisilin + potasyum klavulanat kombinasyonu, penisilin, ampisilin, doksisiklin, tetrasiklin, minosiklin, metronidazol, klindamisin, azitromisin, eritromisin, kanamisin, rifampin, rifampisin, kloramfenikol, siprofloksasin kullanımları mevcuttur (29, 30, 41).

Sistemik statin kullanımının periodontal hastalıkta koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (31, 36, 42, 43). Statinler kemik metabolizmasını değiştirir ve T-hücre aktivasyonunu azaltır. Kemik morfogenetik protein-2'nin açığa çıkmasını sağlar, osteoblast farklılaşmasını artırır ve ayrıca osteoklastik aktiviteyi düşürmesiyle ilgili

çalışmalar vardır (44, 45). Osteoblastik aktiviteye bağlı kemik yapımı üzerine etkisi gösterilmiştir (31, 44). Statinler osteoklastik aktivite düşürmesi RANK-ROS yolağını inhibe etmesiyle olur (44). Atorvastatinin sistemik kullanımında alveolar kemik kaybı ve dişin sallanması üzerine olumlu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (43, 46).

### **Lokal Tedavi**

Sistemik ilaç tedavisinde etki edecek etkin madde dozunun hedef bölgeye erişmemesi gibi problemlerle karşılaşılması sonucu lokal tedavi yaklaşımları benimsenmiştir. Antimikrobiyal olarak metronidazol, klorhekzidin, minosiklin, doksisisiklin ve tetrasiklin etkin maddeleri kullanılmıştır. Bu amaçla jel, film, lif, merhem sistemleri kullanılmıştır (47) ve periodontal hastalığın tedavisinde piyasaya ilk çıkan antibiyotik içerikli ilaç Actisite®'tir. Tetrasiklin içeren bir lif sistemidir, bu ilacı zaman içinde doksisisiklin içeren şırıngayla uygulanan jel Atridox®, şırıngayla uygulanan metronidazol içerikli jel sistemi Elyzol® , şırıngayla uygulanan minosiklin mikroküreleri içeren ve şırıngayla uygulanan Arestin® izlemiştir (29). Lokal ilaç tedavisi, yüksek etkin madde konsantrasyonu, düşük yan etkisi, her gün uygulama zorunluluğu olmaması gibi avantajlarıyla sistemik ilaç tedavisine göre üstünlük sağlamaktadır (48). Lokal ilaç taşıma sistemleriyle, ilacın sistemik dolaşıma maruz kalmadan direk uygulanan bölgeye etki etmesi sağlanır (28).

Antiinflamatuvar etkisi bilinen statinlerin peridontal hastalıkta lokal kullanımıyla ilgili statin çalışmaları yapılmıştır (39, 49-52).

#### **2.1.4. Periodontal Hastalıkta Statin Grubu Etkin Maddelerin Kullanımı**

Son yıllarda ise statinlerin pleiotropik, kolesterole bağımlı olmayan etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Karaciğerdeki kolesterol üretimini yapan enzimi engelleyerek kandaki kolesterol seviyesini düşürücü etkilerinin dışında antiinflamatuvar etki gösterdikleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur (34, 37, 53).

Periodontal hastalık tedavisinde inflamasyonu tetikleyen sitokinlerin inhibe edilmesi ve yıkılan dokuların yenilenmesi hedeflenmiştir. Statinlerin antiinflamatuvar ve kemik oluşumunu artırıcı (kemik morfogenetik protein-2'nin açığa çıkmasını artırır) özelliği periodontitiste kullanımını teşvik etmektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörünün salınımını stimüle ederek kemik dokusunda kemik oluşumunu artırır. Ayrıca statinler osteoblastik aktiviteyi artırarak osteoklastik aktiviteyi azaltırlar (44). TNF'nin baskılayıcı etkilerini tersine çevirir, inflamasyon belirteci olan C-reaktif proteinin plazma seviyesini düşürür, interlökin üretimlerini azaltır (54).

## 2.2. Lokal Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonu

Periodontal cepte yeterli olmayan antibiyotik konsantrasyonu, plazma antibiyotik seviyesinin tedavi edici dozun altına düşmesi, mikrobiyal direnç gelişimi, yan etkiye sebep olacak yüksek pik-plazma konsantrasyonu gibi dezavantajlar sebebiyle periodontal hastalığın tedavisinde periodontal cebe ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir.

Cep içine ilaç taşıma sistemleri olarak daha önce lif (16, 55-57), jel (16, 56, 58-61), mikropartikül (16, 62), film (16, 63-65), strip (66), nanopartikül (16, 67), veziküler sistemler (68) ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Periodontal cebe ilaç taşınımı ile ilgili biyoadezif formülasyonlar üzerinde çok sayıda çalışma vardır. Biyoadezif sistemlerde ilaç, etki bölgesinde daha uzun süre kalmakta olduğu için tercih edilmektedir.

Bu amaçla biyoadezif özelliği yüksek olan jel (60), film (60, 64, 69), nanopartikül sistemler geliştirilmiştir. Periodontal cep içine uygulanacak ilaç taşıma sistemleri biyoyumlu ve biyobozunur polimerlerle geliştirilmiştir.

Jel sistemleri hasta tarafından daha kolay uygulanabilmesi, uygulama bölgesinde biyoadezif özelliğinden dolayı uzun süre kalabilmesi ve istenen süre boyunca istenen hızda etkin madde salımını sağlaması ve dayanıklılığının iyi olması gibi avantajlardan dolayı tercih edilmiştir.

Lif sistemleri ipliksi periodontal cep içine aplikatörlerle uygulanabilen taşıyıcı sistemlerdir. Bu şekilde cep içine kontrollü salım sağlanabilir (40). Ancak bazı çalışmalarda bu sistem, biyoparçalanır olmayan sistemler ve her seferinde lifin yenisiyle değiştirilme gerekliliği sebebiyle zaman alıcı olarak değerlendirilmiştir ve hasta uyuncu olmaması ve uygulama sonrası kırmızı diş etlerinin gözlenmesi gibi dezavantajları olduğu belirtilmiştir (70).

Film sistemleri yaygın olarak cep içine uygulanan sistemlerdir ve ilacın salımı difüzyon ve/veya matriks dissolüsyonu ya da erozyon ile gerçekleşir (71). İnce ve biyoadezif filmler günlük hijyen uygulamalarında kolayca uzaklaşmaz ve periodontal cebe uygun olacak büyüklükte kesilebilir ve hasta uyuncu artırılır (72). Biyoparçalanır olmayan polimerlerde filmin yenisiyle değiştirilmesi gerektiğinden, biyoparçalanır polimerlere yönelme olmuştur. İkinci ve ark. (60) biyoparçalanır doğal bir polimer olan kitosan ile film sistemi geliştirip *Porphyromonas gingivalis*'e karşı antimikrobiyal etkinliği incelemiştir. Yüksek molekül ağırlıklı kitosanla ve klorheksidinin kitosanla kombinasyonu ile daha yüksek antimikrobiyal etkinlik bulunmuştur.

Jel sistemlerinin hazırlanması ve uygulaması kolaydır (73), biyoyumlu ve biyoadezif sistemler olarak hazırlanabilir ve periodontal cebe kolayca tutunur. Jellere karşı alerjik reaksiyon görülme olasılığı diğer sistemlere göre daha düşüktür (74).

Nanopartiküller sulu ortamda çabuk dağılır, diğer sistemlerin ulaşamadığı yerlere ulaşabilir, uygulama sıklığını azaltacak şekilde kontrollü salım yapacak nanopartikül sistemleri geliştirilir. Nanopartiküllerin mikrokapsül, mikroküre, emülsiyon bazlı taşıyıcı sistemlere göre üstün oldukları bildirilmiştir (75).

Veziküler sistemler, geniş unilamellar, küçük unilamellar, multilamellar olmasına göre boyutları değişmektedir. Biyoyumlu, biyoparçalanabilir, toksik olmayan, immunojenik olmayan özellikleri ve yüksek stabilite, enkapsüle edilen ilacı dış ortamdan koruma gibi üstünlükleri vardır. Liu ve ark. (76) kronik periodontitisli hayvan modelinde



minosiklin nanolipozomlarının TNF-alfa seviyesi üzerine etkisini incelemiş ve nanolipozomların TNF-alfa mRNA ekspresyonunu inhibe ederek yüksek antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca kontrollü salım sağlayan nanolipozomlarla tek dozla uzun süre etki görülmüştür.

Biyoadazyon, biyolojik ve sentetik moleküllerin biyolojik dokulara tutunmasını ifade eden bir terimdir (77) ve dozaj formlarının uygulama bölgesinde tutulması yoluyla ilaç taşıma sistemlerinin optimize edilmesinde kullanılır. Biyoadazyon hücre-hücre tutunması, bakterinin yüzeye tutunması, mukozal membranlarla etkileşim, adeziv maddelerin medikal tedavilerde kullanılmasını (yara iyileştirici olarak, ilaç taşıma sistemi olarak) içerir.

Biyoadezif polimerler elde edildiği kaynağa, sudaki çözünürlüklerine, sahip oldukları yüke ve ayrıca biyoadezif bağ oluşum mekanizmasına göre sınıflandırılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız kitosan katyonik doğal bir polimerdir. Biyouyumlu, biyoparçalanabilir, biyoadezif ve biyoaktif özelliklerinden dolayı çalışmamıza dahil edilmiştir.

### **2.3. Kitosan**

Kitosan, yengeç, karides, istakoz gibi eklembacaklıların dış iskeletinde, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan polimer olan kitinin alkali ortamda deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Selülozda C-2 karbonundaki hidroksil grubu yerine kitosanda amin grubu bulunmaktadır ve selülozun aksine pozitif iyon yükü taşımaktadır.

Deasetilasyonun derecesi, N-asetil-D-glukozamin ünitelerinin molar fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Deasetilasyon derecesi, deasetilasyona uğramış N-asetil-D-glukozamin ünitelerinin sayısının toplam ünite sayısına göre miktarını gösterir. % 65-70 veya üzerinde deasetilasyon derecesine sahip kitin kitosan olarak bilinmektedir. Deasetilasyon derecesi kitosanın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini, bunun sonucu

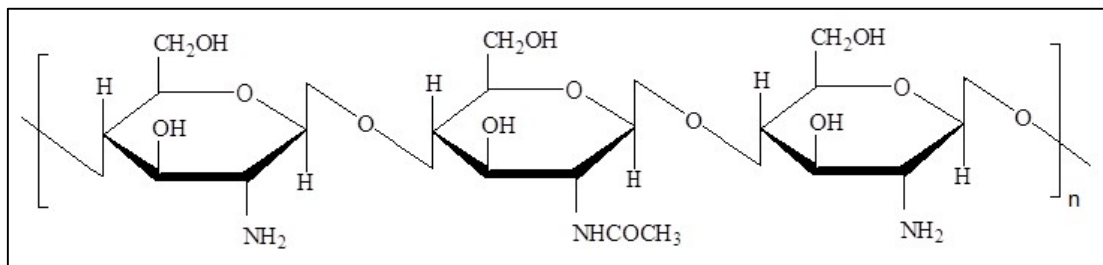
olarak da hazırlanan farmasötik formülasyonların özelliklerini etkiler. Kitin organik çözücülerde çözünmezken, kitosan pH'sı 6.0'dan düşük olan dilüe asidik çözeltilerde çözünebilmektedir (78).

Kitosan biyoyumlu, biyoparçalanabilir ve biyoaktif özellikler göstermesi sebebiyle farmasötik ve medikal alanda tercih edilen bir polimerdir. Ayrıca toksik ve allerjenik olmayan biyoadeziv özelliğe bir polimer olup mukozal ilaç taşıyıcı sistemlerde ve aşılarda, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, hemostatik, antiviral, doku rejenere edici, yara iyileştirici ve immunojenik aktivite gibi biyoaktif özellikleri sebebiyle çalışılmaktadır (78-80). Ayrıca bukal, nazal, intestinal, vajinal mukozalarda penetrasyonu artırıcı özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (81-83)

Kitosanın molekül ağırlığı, ham materyalin kaynağına ve hazırlama yöntemine göre değişiklik gösterir. Ticari olarak farklı saflık, molekül ağırlığı, deasetilasyon dereceleri vardır.

Kitosanın farmasötik uygulamalarda kullanılmasının ana faydası, C-2 pozisyonuna çeşitli kimyasal gruplar ekleyerek ek fonksiyonlara sahip yeni konjugatlar oluşturulabilmesidir. Bu modifikasyonlarla kitosanın özellikleri spesifik farmasötik teknolojik gereksinimlere uygun hale gelecek şekilde değiştirilebilir.

Kitosanın yüzeyindeki pozitif yük sayesinde ekzojen nükleik asit gibi makromoleküllerle, negatif yüklü mukozal yüzeylerle ve plazma membranıyla kolayca etkileşir (78). Kitosanın kimyasal yapısı Şekil 2.3.'te verilmiştir.



**Şekil 2.3.** Kitosanın kimyasal yapısı

### 2.3.1. Kitosanın Diş Hekimliğinde Uygulamaları

Biyogeçimli, düşük toksisiteli, biyoadezif, biyoparçalanabilir özelliklere sahip olması nedeniyle farmasötik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosan bazlı formülasyonlar konvansiyonel granülasyon ya da tablet üretme teknikleriyle üretilebilir. Ayrıca sulu asidik ortamlarda kolayca jelleşir. Jelleşme özelliği sebebiyle kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılır.

Jellerde ilaç taşıyıcı olarak, tabletlerde salımı geciktiren hidrofilik materyal, granüller, mikropartiküller ve nanopartiküller olarak kullanımı vardır. Kitosanın hidrofilik yapısı tabletlerde dağıtıcı olarak hemen salım sağlayan formülasyonlarda kullanılır. Ayrıca çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmada kullanılmaktadır.

Kitosan, oftalmik (84), nazal (85), bukal (81, 86), periodontal (87), intestinal (88, 89), vajinal (82, 90) ve transdermal (91) gibi mukozal yollarla ilaç taşıyıcı sistemlerde de kullanılmaktadır. Bukkal taşınımında kitosanın, formülasyonların ağız boşluğunda kalma süresini artırmak üzere tablet ve film olarak kullanımı vardır.

Akıncıbay ve ark. (61) boş kitosan jelin ve bu jelin metronidazol ile kombinasyonunun periodontitis üzerine etkisini inceleyip kitosan jel ve metronidazol içeren kitosan jel arasında antimikrobiyal etki yönünden fark bulunmazken bu durum kitosanın kendisinin de antimikrobiyal özelliğe sahip olmasıyla açıklanmıştır. Needleman ve ark. (92) kitosanın da aralarında olduğu 3 farklı polimer ile periodontal cebe uygulanacak jel formülasyonları geliştirmiştir. Geliştirilen bu jel formülasyonlarının biyoadezif özellikleri, akış ve hidrasyon özellikleri ile uygulama bölgesinde kalma süreleri arasındaki ilişki incelenmiş ve aralarında doğrudan bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. Ji ve ark. (93) periodontal hastalığın tedavisine yönelik kitosan, kuaternize kitosan,  $\alpha$ ,  $\beta$  –gliserofosfat ve %0.1 klorhekzidin içeren ısıya duyarlı jel formülasyonu geliştirmiştir. Bu karışımı içeren sulu çözelti 37 °C’de 6 dk’da hidrojele dönüşmektedir ve bu ısıya duyarlı hidrojelden klorhekzidin pH 6.8 fosfat tamponuna 18 saatte tamamen

salınmaktadır. Geliştirilen formülasyonun in vitro çalışmalarla periodontal patojenlere karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Yar ve ark. (94) periodontal hastalıkta inflamasyonun tedavisi için electrospinning yöntemiyle meloksikam, kitosan, PVA ve hidroksiapatit bazlı bir film geliştirmiştir. Geliştirilen formülasyondan ilk birkaç saat içinde hızlı salım olsa da daha sonraki 5 saat boyunca salım yavaşlayarak devam etmiştir. Bu biyobozunur filmlere farklı konsantrasyonlarda meloksikam yüklenerek etkin madde salımı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Dental alanda umut vaat edici bir çalışma olduğu düşünülmektedir. İkinci ve ark. (60) doğal polimer olan kitosanın *Porphyromonas gingivalis*'e karşı antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Hazırladıkları kitosan filmlerin antimikrobiyal etkisinin olduğunu ve bu etkinin kitosanın molekül ağırlığındaki artış ve klorheksidin kombinasyonu ile arttığını bulmuşlardır. Chinta ve ark. (95) periodontitisin lokal tedavisinde kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda sodyum sitrat kullanarak moksifloksasin içeren çapraz bağlı kitosan filmleri elde etmişlerdir. Hazırlanan formülasyonları arasında %4 sodyum sitratla hazırlanan kitosan filmlerinin 15 gün boyunca ilacı en fazla salarak antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Khan ve ark. (87) periodontal hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere metronidazol ve levofloksazin içeren glutraldehitte çapraz bağlanmış kitosan filmleri hazırlamıştır. Filmlerin ilk gün ani salım yaptığı daha sonra 7 gün boyunca sürekli salım yaptığı ve *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Pichayakorn ve ark. (62) emülsiyon çapraz bağlama yöntemi ile elde edilen metronidazol yüklü kitosan mikropartiküllerinin optimizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Ayrıca geliştirilen mikropartikül formülasyonlarını jel ve film içerisine hapsederek uzatılmış salımlı bir dozaj formu elde etmişlerdir. Govender ve ark. (96) periodontal hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere iyonotropik jelasyon yöntemi ile elde edilen tetrasiklin yüklü kitosan mikropartiküllerinin pH değişimine bağlı olarak etkin madde yükleme etkinliğini incelemiştir ve pH 9'dan pH 6'ya doğru azalan pH'da etkin madde yükleme etkinliğinin arttığı bulunmuştur. Lee ve ark. (97) periodontitiste lokal enfeksiyonu kontrol altına almak ve kemik rejenerasyonunu tetiklemek üzere lovastatin, tetrasiklin, PLGA ve kitosan içeren nanopartikül formülasyonu geliştirmiştir. Kontrollü salım sağlayan bu sistemin biyoyumlu, antibakteriyel özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Dung ve ark.

(98) antisens oligonükleotit yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlamış ve oligonükleotitlerin nanopartiküllerden salımı incelenmiştir. Salınımın ilacı yükleme yöntemine ve pH koşullarına bağlı olduğu gösterilmiştir. Bazik pH'da oligonükleotitin salınımı asidik pH'ya göre daha yüksek bulunmuştur. Yavaş salımlı bir sistem olduğundan periodontal cep içine uygulanarak periodontal hastalığın lokal tedavisinde kullanılabilir bir sistem olduğu düşünülmektedir. Shen ve ark. (99) periodontal hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere kontrollü salım için tetrasiklin içeren kitosan bazlı bir sünger formülasyonu geliştirmiş ve tripolifosfat ile çapraz bağlama yapılan süngerlerden ilacın beklenildiği gibi yavaş ve kontrollü salım yaptığı tespit edilerek hastalıkta umut vaat edici olduğundan bahsetmiştir.

#### **2.4. Katı Dispersiyonlar**

Katı dispersiyonlar suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin partikül büyüklüğünü küçülterek, ıslanabilirliğini artırarak çözünürlüğünün artırılma stratejisidir. Katı dispersiyonlara ait ilk çalışma Sekiguchi ve Obi tarafından 1961'de yapılmıştır (100). İlk jenerasyon katı dispersiyonlar üre, şeker gibi kristal taşıyıcılar kullanılarak elde edilmiştir. Bu katı dispersiyonlar kristal yapıda olup termodinamik olarak stabildir. İkinci jenerasyon katı dispersiyonlarda etkin madde amorf yapıda olan polimerler içerisinde düzensiz yapıda moleküler dispersiyona uğramaktadır. Kullanılan polimerler sentetik ya da doğal yollardan elde edilen polimerler olabilir. Sentetik polimerler povidon (PVP) (101-108), polietilenglikoller (PEG) (101-103, 105-111), pluronikler (107, 110, 112, 113) polimetakrilatlar (114) arasından seçilebilir. Doğal polimerlere örnek ise selüloz türevleri verilebilir. Hidroksipropil metilselüloz (HPMC) (104, 115), mikrokristalin selüloz (106), hidroksipropil selüloz, siklodekstrinler (110, 116), kitosan (114, 117-126) verilebilir. Üçüncü jenerasyon katı dispersiyonlar, kendiliğinden emülsifiye olabilen ve yüzey aktif özelliğe sahip taşıyıcı sistemler kullanılarak ortaya çıkmıştır (127). Suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin biyoyararlanımını artırmak (128) ve katı dispersiyonları stabilize ederek tekrar kristal hale dönüşümünü engellemek amacıyla üçüncü jenerasyon katı dispersiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Taşıyıcı sistemlerde inulin, gelucire,

poloksamerler gibi surfaktanların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca amorf polimer ve surfaktanın beraber taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin suda çözünürlüğü az olan lab687'nin PEG ve polisorbitat 80 taşıyıcıları ile katı dispersiyon formülasyonu elde edilmiştir (127).

İlaçların suda çözünürlüğünün artırılması kimyasal ve formülasyon yaklaşımlarıyla mümkün olmaktadır. Kimyasal yaklaşımlar: tuz oluşumu veya polar ya da iyonize olabilen grupların etkin maddelerle birleştirilmesi sonucu prodrug oluşturulması. Örneğin tuz oluşumu zayıf asit ve zayıf baz yapıda etkin maddelere uygulanabilir, nötr yapıda etkin maddelere uygulanamaz. Formülasyon yaklaşımı ise çözme ve partikül büyüklüğünü küçültme yöntemlerine dayanır. Ancak çözme yöntemi surfaktanlar ya da yardımcı çözücüler ile sulu ortamlarda ve organik solvanlarda çözülmesi ile sıvı formülasyonlar elde edilir ve hastanın kullanımı için uygun olmayabilir. Katı dispersiyon oluşturma yöntemi daha kolay ve uygulanabilirliği daha fazladır (129)

#### **2.4.1. Katı Dispersiyon Hazırlama Yöntemleri**

Suda çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak için kullanılan bir yöntemdir. Çözünürlüğü artan etkin maddelerin biyoyararlanımları da artar. Çözünürlüğün artması, ıslanabilirliğin artması, partikül boyutunun küçülmesi, partiküllerin porozitesinin artması ve kristal özelliğin kaybedilerek amorf özellik kazanılmasıyla mümkün olmaktadır.

Partikül boyutunun küçültülmesi: Taşıyıcı bir solvan içinde disperse edildikten sonra etkin madde da çözünme ortamında moleküler olarak dağıtılır. Suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerle, çözünürlüğü yüksek olan taşıyıcıların karışımı elde edilir. Yüzey alanı artar ve sonuç olarak çözünürlük artar (130).

Islanabilirliğin artması: İlacın çözünürlüğünün artması ilacın katı dispersiyon oluşturma yöntemiyle ıslanabilirliğinin artmasıyla doğru orantılıdır. Üre gibi yüzey aktif özelliği olmayan ve kolik asit, safra tuzları gibi yüzey aktif özelliğe sahip olan taşıyıcılar

etkin maddelerin ıslanabilirlik özelliklerini artırır. Ayrıca yardımcı çözücü olarak kullanılan surfaktanların kullanımı ile de ıslanabilirlik özelliğinin arttığı gösterilmiştir (131).

Partiküllerin porozitesinin artırılması: Poröz yapıda etkin maddelerde çözünürlük daha yüksektir, hazırlanan katı dispersiyonların poröz özellikte olduğu bildirilmiştir (132). Porözitedeki artış kullanılan taşıyıcının özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Lineer yapıdaki polimerler, ağısı yapıya sahip polimerlere göre daha geniş ve daha poröz yapıda partiküller meydana getirir (132, 133).

Amorf yapı kazanması: Suda çözünürlüğü düşük olan kristal yapıdaki etkin maddeler amorf hale dönüşünce çözünürlükleri artmaktadır, çünkü çözünme sırasında kristal örgüyü kırmak için bir enerji gerekmeyecektir. Düşük kristal enerjisine sahip etkin maddelerde (düşük erime sıcaklığı) oluşacak olan amorf yapı, taşıyıcı ve ilacın erime sıcaklıkları arasındaki farka bağlıdır. Yüksek kristal enerjili etkin maddelerde ise amorf özelliği yüksek olan bir karışım eldesi, taşıyıcı ve etkin madde arasındaki etkileşime bağlıdır (132, 134).

#### Katı dispersiyonlarda karşılaşılabilecek problemler:

Katı dispersiyonlar mekanik işlemler sırasında ve saklama koşullarında (sıcaklık ve nem) amorf halden kristal hale dönebilir. Camsı geçiş sıcaklığının altında amorf bileşenlerin moleküler hareketi ile tekrar kristal duruma dönüş olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (135, 136). Ayrıca polimerlerin çoğu higroskopik yapıdadır bu nedenle saklama sırasında faz ayrışması kristal büyümesi, amorf formdan kristal forma dönüşüm ya da yarı kararlı kristal formdan kararlı forma dönüşüm gerçekleşebilir. Bu durum çözünürlüğün azalmasına sebep olabilir (131).

Yeniden kristalize olma, katı dispersiyonların en büyük dezavantajlarından. Amorf sistemler termodinamik olarak stabil değildir ve yeniden kristalize olarak kristal hale geçme eğilimindedir. Polimerler katı dispersiyon karışımının camsı geçiş sıcaklığını

artırarak, katı dispersiyon içindeki amorf etkin maddelerin fiziksel stabilitesini artırır. Bu durumun sonucu olarak ya da etkin maddedeki fonksiyonel gruplarla etkileşim sonucu, belirli saklama koşulları altında moleküllerin hareketi azaltılmış olur (135). Polimerin yeniden kristalize olmayı engelleyebilmesi için etkin maddeyle moleküler düzeyde bir karışım sağlaması gerekmektedir. Bu karışımın sağlanabilmesi, etkin madde ve polimer arasındaki etkileşime bağlıdır (137). İlaçların çoğu hidrojen bağlayıcı bölgelere sahiptir. Bu konuyla ilgili çalışmalar, etkin madde ve polimer arasında iyon-dipol etkileşimi ve moleküller arası hidrojen bağının olduğunu göstermiştir. Etkileşim sonucu katı dispersiyonların karışabilirliği ve fiziksel stabilitesinin arttığı gösterilmiştir (138, 139).

Katı dispersiyon hazırlama yöntemleri ilacın ve polimerin özelliklerine göre belirlenir. Yüksek sıcaklıklarda hazırlanan katı dispersiyon yöntemlerinde ısıya dayanıksız etkin maddeler kullanılmamaktadır. Çözücü gerektirip gerektirmemesi, hazırlanmalarının farklı sürelerde olması, büyük veya küçük ölçekli üretiminin hangisinin yapılacağı gibi konular katı dispersiyon hazırlama yöntemlerinin seçiminde belirleyici rol oynamaktadır.

Eritme yöntemi: İlaç, daha önceden ötektik noktanın altında eritilen taşıyıcı içerisinde süspande edilir. Karışım soğutulur ve katılaştırılır. Katılaştırma oda sıcaklığında, buz banyosunda (140), desikatörde (105) yapılabilir. Daha sonra bu katı karışım partikül büyüklüğünü küçültmek için toz haline getirilir. Yöntemin avantajı, yapılan işlemler için çözücü gerektirmemesidir. PEG ve Pluronik eritme yönteminde en çok kullanılan polimerlerdir. Ancak yüksek sıcaklıkta yapılan çalışmalarda etkin madde bozunabilir (129), etkin madde ve taşıyıcı, eriyik haldeki taşıyıcının viskozitesinin çok yüksek olması sonucu tam olarak karışamayabilir ve faz ayrışması olabilir (129).

Sıcak eriyik (hot melt) ekstrüzyonu: Bu yöntemde etkin madde ve taşıyıcı aynı anda karıştırılır, ısıtılır, eritilir, homojen hale getirilir, daha sonra tablet, çubuk, pellet form oluşturacak şekilde ekstrüde edilir. Karıştırma sırasında dönme gücünün etkisiyle eriyik haldeki polimer içinde ilacın çökmesi önlenir ve homojen bir karışım elde edilir. Hot melt



ekstrüzyon sistemleri etkin madde; bir ya da daha fazla sayıda eriyebilen polimer; pH ayarlayıcı ya da plastizer benzeri yardımcı maddelerden meydana gelebilir. Erime hızı, polimerin fiziksel ve reolojik özelliklerine bağlı olarak gerçekleşir. Düşük viskozitede ve amorf yapıdaki polimerlerde erime hızı yüksektir. Hot melt ekstrüzyon yönteminin diğer eritme yöntemlerine göre avantajı ekstrüder içinde etkin madde ve polimerin yüksek sıcaklığa kısa bir süreliğine maruz kalmalarıdır ve böylece ısıya dayanıksız etkin maddelerin degradasyonunu engellenmiş olur. Bu yöntemle termodinamik olarak stabil ürünler üretilir, büyük ölçekte üretim yapmak mümkün olur (141).

Çözücü uçurma metodu: İlaç ve taşıyıcıyı içeren çözeltiden çözücü uzaklaştırılarak elde edilen katı dispersiyondur. Yüksek sıcaklıkta bozulan etkin madde ve taşıyıcıların dekompozisyon problemine çözüm olabilir, dondurarak kurutma yöntemiyle sıcaklık olmadan çözücüyü uçurmak mümkündür. Erime noktaları nedeniyle eritme yönteminde kullanılamayan bazı polimerler için çözücü uçurma yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemde kullanılan çözücülere örnek metanol, etanol, etil asetat, aseton, metilen klorür, su ve bunların karışımı verilebilir. Sodyum lauril sülfat, tween 80 gibi surfaktanlar çözücü içindeki etkin madde ve polimerlerin çözünürlüğünü artırmak için kullanılabilir. Bu yöntemin dezavantajı çözücü uçurma yönteminden sonra ortamdaki tam olarak uzaklaştırılmayan çözücünün toksisiteye sebep olabilmesidir. Ayrıca, su benzeri tam uçurulamayan çözücüler camsı geçiş sıcaklığını düşürerek bileşenlerin hareketini artırarak faz ayrışmasına sebep olabilir. Katı dispersiyonlarda katılma hızı, ilacın fiziksel halini belirler. Katılmanın hızlı olması ilacın amorf yapı kazanmasını sağlar. Bu nedenle çözücüyü uçurmak amacıyla farklı yöntemlerle çalışılmıştır. Isıtıcı tabla ile uçurulması (heating on hot plate), vakumda kurutma, püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma, püskürtmeli dondurarak kurutucu (SFD), döner evaporator yöntemleri bunlara örnektir (142).

Döner evaporatör: Çözücü uçurma işlemleri sırasında faz ayrışması görülebilir. Isıtma işlemi moleküler hareketi artırabilir ve faz ayrışmasına sebep olabilir. Bu nedenle vakum altında döner evaporatör kullanılarak düşük sıcaklıkta çözücü uçurulabilir. Ancak

uzun zaman alan bir işlemdir, kurutma işlemi sırasında faz ayrışması ve yeniden kristallenme gerçekleşebilir (129).

Püskürterek kurutma: Hızlı bir çözücü uçurma yöntemidir. Bu yöntemde ilacı içeren çözelti ya da süspansiyon bir kaptan pompa sistemiyle nozülün girişine aktarılır ve püskürtülerek geniş yüzey alanına sahip küçük damlacıklara dönüştürülür. Bu damlacıklardan çözücüler hızlıca uzaklaşır ve katı dispersiyon oluşur. Püskürtmeli kurutucu ile hazırlanan katı dispersiyonlar içindeki etkin madde amorf haldedir ve çözünürlüğü artmıştır (141, 143).

Dondurarak kurutma: Bu yöntemle ilaç stabil bir ağısı yapının içinde olur. Bu yöntem 2 adımdan oluşur: dondurma ve liyofilizasyon. Dondurma hızı faz ayrışmasını kontrol edebilmek için önemlidir. Temel işlem etkin madde-taşıyıcı çözeltisini sıvı nitrojen içinde tamamen dondurulması ve dondurulan çözeltinin liyofilize edilmesidir. Bu yöntemin avantajı faz ayrışmasının minimum olmasıdır; dezavantajı ise çoğu organik çözücünün düşük donma derecelerine sahip olmalarından dolayı süblimasyon sırasında donmuş durumda kalamamasıdır. Örneğin dondurarak kurutulması için düşük sıcaklık gerekiyorsa bu işlem uzun sürecektir. Ayrıca liyofilizasyon işlemi için çözücünün yüksek buhar basıncına sahip olması istenir (144).

Püskürtmeli dondurarak kurutma (SFD): Bu yöntemde etkin madde ve polimer çözeltisi sıvı nitrojen ya da soğuk kuru havaya püskürtülür ve donan damlacıklar hemen liyofilize edilir. Soğutma ajanları ile direk temas ve geniş yüzey alanı hızlı bir şekilde camlaşma ile sonuçlanır ve faz ayrışması riski azaltılmış olur. Hızlı dondurma işlemi amorf formun oluşumunu sağlar ve moleküllerin hareket ederek kristal hale dönmelerini engellemiş olur (145).

Süperkritik antisolvan yöntemi (SAS): Süperkritik sıvılar, antisolvan ya da çözücü olarak kullanılabilir. Süperkritik sıvı olarak karbondioksit kullanımı, kritik sıcaklığı ve basıncı düşük olması sebebiyle fazladır. Ayrıca kimyasal olarak inerttir ve düşük kritik

sıcaklığa sahip olması nedeniyle termal duyarlılığa sahip etkin maddelerin kullanımında tercih edilir. Süperkritik sıvıların sıcaklık ve basınçları kritik noktanın üzerindedir. Karbondioksit çözücü olarak kullanılırsa etkin madde ve taşıyıcı süperkritik karbondioksit içinde çözündürülür ve düşük basınç altında bir nozülde genişleme kabı içerisine püskürtülür. Genleşme sonrası katı dispersiyon partikülleri kısa sürede oluşur. Süperkritik karbondioksit anti-solvan olarak kullanılırsa, organik çözücü içindeki etkin madde ve taşıyıcıyı içeren çözelti ve süperkritik karbondioksit aynı anda nozülden püskürtülür. Çözelti püskürtüldüğünde, çözücü süperkritik karbondioksit tarafından ekstre edilir ve bu sayede katı dispersiyon partikülleri çöker. Süperkritik sıvı kritik sıcaklık ve basıncın üzerinde tek bir fazda bulunur. Süperkritik sıvılar, sıvıların yoğunluğu; gazların sıkıştırılabilme özelliği, viskozite, yüksek difüzyon özelliklerine sahiptir (141, 146).

Birlikte çöktürme yöntemi: Organik solvanlar içindeki çözünürlüğü düşük olan ve yüksek erime noktaları olan etkin maddeler için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemde etkin madde ve taşıyıcı tamamen bir organik çözücü içinde çözündürülür ve anti-solvan içerisine eklenir, böylece etkin madde ve taşıyıcı çöker. Elde edilen süspansiyon filtre edilir ve kalan çözücünün uzaklaştırılabilmesi için yıkanır. Elde edilen çökelti filtre edildikten ve kurutulduktan sonra katı dispersiyon partikülleri elde edilir. Bu yöntemde kullanılan polimerler pH bağımlı çözünürlüğe sahiptir. Polimetakrilat, polivinil ftalat, selüloz asetat ftalat ve çözücü olarak dimetilasertamit, dimetilformamit, N-metil pirolidon kullanılabilir. Yüksek bir sıcaklığa ihtiyaç duymayan bu yöntemle etkin madde ve polimerlerin degradasyonları önlenmiş olur. Kullanılacak olan çözücü ve anti-solvan karışımı plastizer görevi görerek moleküllerin hareketine ve böylece kristalizasyona sebep olabilir. Bu nedenle polimer, çözücü ve anti-solvan seçimleri dikkatli yapılmalıdır (147).

Elektrostatik savurma: Bu yöntem katı dispersiyon teknolojisi ve nanoteknolojinin kombinasyonu olarak düşünülebilir. İlaç ve polimer çözeltisi spinneret içine yerleştirilir, mikroşırınga pompası ve yüksek voltaj (5-30 kV) ile bağlantılıdır. İğne ucu çözelti yüzeyine elektrik yükler. Elektrik gerilimi ayrıca spinneret ve toplama kısmı arasında da uygulanır. Elektrik kuvveti su-hava ara yüzeyindeki besleme çözeltisinin yüzey gerilimini

aşarsa püskürtme yapılır ve elektrik yüküyle bir süre düze gider ve sonra spiral bir yol izler. Çözücü uzaklaşır ve mikron ve submikron boyutlarında lifler elde edilir. Toplanan lifler oral dozaj formlarında materyalin direk kapsül içine konulmasında ya da daha sonra öğütmede kullanılabilir. Liflerin boyutları çözeltilinin yüzey gerilimi, polimer çözeltilisinin dielektrik sabiti, besleme hızı, elektrik alan gücü, iğne ucu-toplama kısmı arasındaki mesafe, sıcaklık, nem gibi çevresel etmenlere bağlıdır. Bu yöntemin avantajı liflerin geniş yüzey alanına sahip olması ve çözücünün buharlaşması sonucu amorf dispersiyonların oluşmasıdır (142).

Eritme ve çözücü yöntemi: İlaç, uygun bir çözücüde çözündürülür, eritilen taşıyıcı ile bu çözeltili karıştırılır ve daha sonra çözücü uçurularak katı dispersiyon elde edilmiş olur. Bu yöntemin avantajı sıcaklık ve karıştırma zamanının eritme yönteminden düşük olmasıdır. Ayrıca eritilen polimer çözücüde daha kolay disperse olur (129).

Birlikte öğütme yöntemi: Bu yöntemde etkin madde ve taşıyıcı öğütücü içinde, genelde bilyalı değirmen, karıştırılır ve saatler sonra ürün elde edilir. Birlikte öğütme yöntemi ilacın partikül büyüklüğünün küçültür ve ilacın kristal formdan amorf forma dönüşümü sağlayabilir. Bu yöntemde beklenen amorf formda dönüşüm mekanizması, etkin madde ve taşıyıcı arasında etkileşim ya da kristal yapıdaki bozulmaların birikimi sonucu Gibbs serbest enerjisinin uyarılması olabilir. Birlikte öğütme yöntemi ve eritme, püskürtmeli kurutma yöntemleri karşılaştırılmış ve kimi çalışmalarda birlikte öğütme yöntemiyle çözünürlüğün diğer yöntemlere göre daha fazla arttığı gösterilirken, diğer çalışmalarda tam tersi durum söz konusudur (147).

#### **2.4.2. Katı Dispersiyonlarda Kullanılan Polimerler**

Katı dispersiyon teknolojisi ilacın kristal özelliğini kaybederek amorf yapı kazanması ve çözünürlüğü düşük olan ilacın hidrofilik taşıyıcı içinde moleküler dispersiyonu olarak bilinmektedir (148). Çalışmalarda en çok hidroksipropilmetil selüloz (HPMC) (104, 112, 115, 149-155), polivinilpirolidon (PVP) (104, 126, 130, 152, 156, 157), Eudragit (158, 159), polietilen glikol (PEG) (126, 160-171), kitosan (112, 118, 126,

152), Gelucire (172-174), pluronik (112, 161, 175), jelatin (176), hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin (126, 177), sodyum karboksimetil selüloz (NaCMC) (178) kullanılmaktadır. Ayrıca Kollidon® (158) , Avicel 200, Synperonic® (175), Plasdone™ S-630 kullanımı da mevcuttur.

Çalışmamızda hazırlanan katı dispersiyonlarda kullanılmak üzere PEG 6000, pluronik F-68 ve baz kitosan seçilmiştir.

Etkin madde olarak kullandığımız atorvastatinle ilgili katı dispersiyon çalışmalarında, hazırlanan katı dispersiyonlarla ilacın çözünürlüğü (179), dissolüsyonu (155, 159) ve biyoyararlanımının (104, 180-182) artırıldığı raporlanmıştır.

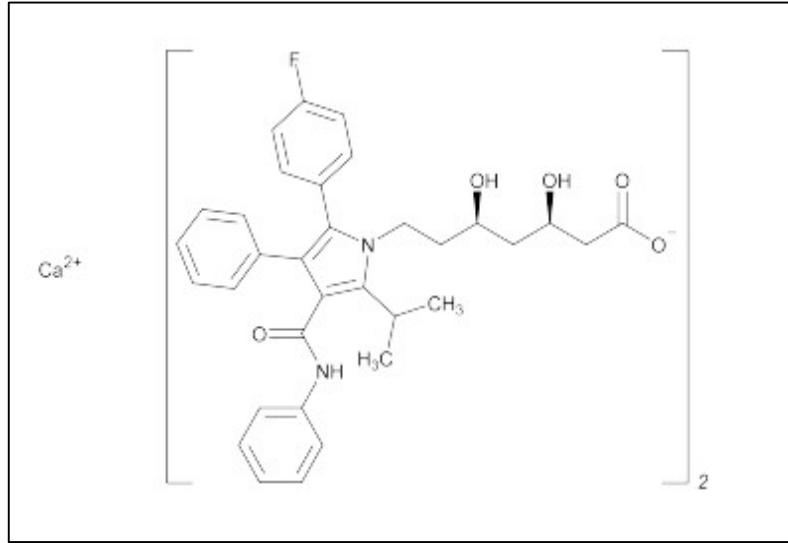
## **2.5. Atorvastatin Kalsiyum**

Atorvastatin Kalsiyum, atorvastatin'in bir tuzudur ve statin grubu bir etkin maddedir. Lipit düşürücü etkin madde grubu olan statinler (veya HMGKoA redüktaz inhibitörleri) yüksek kan kolesterol düzeylerinden dolayı kardiyovasküler hastalık riski taşıyan kişilerde kolesterolü düşürmek için kullanılırlar. Atorvastatin, statin grubu bir antihiperlipidemik etkin maddeler olup, 3-hidroksi-3- metilglutaril-koenzim a (HMG-KoA) redüktaz enziminin selektif kompetitif inhibitörüdür. Bu gruptaki etkin maddelerden farklı olarak hiperkolesterolemisi olan hastalarda yükselmiş LDL kolestrolü ve trigliserit düzeylerinin her ikisini birden düşürme endikasyonuna sahip tek etkin maddedir.

Son yıllarda atorvastatin kalsiyumun kolesterol düşürücü etkisinin dışında pleiotropik etki gösterdiklerine dair çalışmalar bulunmaktadır. Antiinflamatuvar etkileri gösterdikleri pleiotropik etkilerden bir tanesidir ve çeşitli mekanizmalarla antiinflamatuvar etkinin olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmalar arasında; endotelin-1, interlökin-6, hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve platelet türevi büyüme faktörü (PDGF) düzeylerinde azalma; nüklear faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aktivasyonunda azalma, nitrik oksit düzeyinde artma, endotelial hücre aktivasyonunda, C- reaktif protein (CRP)

düzeyinde ve proinflamatuvar sitokinlerde (IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ ) azalma, LDL oksidasyonunun inhibisyonu ve bazofillerden histamin üretiminin inhibisyonu bulunmaktadır (183, 184).

Atorvastatin kalsiyumun kimyasal yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.** Atorvastatin kalsiyumun molekül formülü (185) ([[(3R,5R)-7-[3-(fenilkarbamoyl)-5-(4-florofenil)-2-izopropil-4-fenil-1H-pirol-1-il]-3,5-dihidroksiheptanoik asit, kalsiyum tuzu)

Kapalı formülü  $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$  olup, molekül ağırlığı 1155.34'tür.

### 2.5.1. Fiziksel Özellikleri

Atorvastatin kalsiyum beyaz veya kirli beyaz renkte kristalize bir tozdur. pH 4 ve altındaki sulu çözeltilerde çözünmez. Distile suda, pH 7.4 fosfat tamponunda ve asetonitrilde çok az çözünür; etanolde az çözünür ve metanolde kolaylıkla çözünür. Atorvastatin kalsiyum iyi kapatılmış kaplarda ve oda sıcaklığında saklanmalıdır (186).

### 2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri

Atorvastatin, gastrointestinal yoldan hızla absorbe olur. Gastrointestinal mukozada presistemik klerens ve/veya karaciğerdeki ilk geçiş metabolizması nedeniyle

mutlak biyoyararlanımı düşüktür (%12). Sitokrom P450 izoenzim CYP3A4 tarafından çok sayıda aktif metabolitlerine metabolize olur. %98'i plazma proteinlerine bağlanır. Atorvastatinin ortalama plazma eliminasyon yarı ömrü insanda yaklaşık 14 saattir. HMC-KoA redüktaz için, inhibitör aktivitenin yarı ömrü, aktif metabolitleri etkisi nedeniyle 20-30 saattir. Atorvastatin metabolitleri öncelikle safradan atılır.

### **2.5.3. Atorvastatinin Periodontal Hastalıklarda Uygulamaları**

Kronik periodontitisi olan hastalarda subgingival olarak (187) ve periodontitisle beraber tip 2 diyabet hastalarında subgingival (188), sınıf II furkasyon defekti olan hastalarda lokal (50) ve kemik içi defekti olan hastalarda (189) %1.2 atorvastatinin jel uygulaması sonrası ataşman seviyesinin düzeldiği raporlanmıştır. Kronik periodontitisli hastalarda sistemik atorvastatin kullanımının, sallanan diş ve alveolar kemik kaybı üzerine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir.

Bir çalışmada günde 2 defa 0,5 mL, %2 atorvastatin içeren diş macunu kullanımı ile inflame periodontal alanın küçüldüğünü bildirmiştir (190).

Periodontitis hastalarında sistemik olarak yüksek doz verilen atorvastatin tabletlerinin periodontal ve arteriyel inflamasyonu azalttığını raporlanmıştır (53). Hiperlipidemili ve periodontitisi olan hastalarda atorvastatinle tedavi sonrası diş eti oluğu sıvısından alınan örneklerde, proinflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı belirlenmiş ve bu tedavinin inflamasyonla beraber hiperlipidemi tedavisinde olumlu sonuç verdiği (191) ve periodontal hastalıkla hiperlipidemi arasında ilişki olduğu (192) bildirilmiştir.

Hayvan çalışmalarında periodontitis geliştirilen sıçanlarda sistemik ve lokal yoldan verilen atorvastatin ile vasküler endotelial büyüme faktörünün aktive olduğu, alveolar kemikte ve ataşman seviyesinde artış gözlenmiş (193), gavajla verilen atorvastatin tedavisinde ise alveolar kemikte (194) iyileşme görüldüğü raporlanmıştır. Glukortikoid ile indüklenmiş osteoporozlu sıçanlarda osteoporozun periodontal hastalığı kötüleştirdiği ve kas içine verilen atorvastatin uygulaması ile inflamasyon belirteçlerinin,

oksidatif stresin, kemik kaybının azaldığı raporlanmıştır. Bu çalışmayla atorvastatinin pleiotropik etkisi gösterilmiştir (195).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

Atorvastatin kalsiyum	Nobel İlaç, Turkey
Kitosan	Koyo Chemicals, Japonya
Kitosan (Protasan UP CL 213)	Novamatrix, Norveç
PEG 6000	Merck, Almanya
Pluronik F-68	Merck, Almanya
Laktik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Franz Difüzyon Hücreleri	İldam Cam, Türkiye
Evaporatör	IKA® RV 10 Basic
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert
Etüv	Memmert
Formaldehit %10	Sigma-Aldrich, Almanya
Ketamin	Ketalar®, Pfizer
Ksilazin	Rompun®, Bayer
Purified anti-human TNF- $\alpha$ Antibody	BioLegend, ABD
Human IL-1 beta ELISA kit	Ebioscience Affymetrix, ABD
Human IL-6 beta ELISA kit	Ebioscience Affymetrix, ABD
Huma IL-8 beta ELISA kit	Ebioscience Affymetrix, ABD

Human IL-10 beta ELISA kit	Ebioscience Affymetrix, ABD
Human TGF-beta 1 ELISA Kit	Ebioscience Affymetrix, ABD
Human TGF-beta 2 ELISA Kit	Ebioscience Affymetrix, ABD
Human TGF-beta 3 ELISA Kit	Ebioscience Affymetrix, ABD
Rat IL-1 beta ELISA kit	Cusabio, China
Rat IL-6 beta ELISA kit	Cusabio, China
Rat IL-8 beta ELISA kit	Cusabio, China
Rat IL-10 beta ELISA kit	Cusabio, China
Rat TGF-beta 1 ELISA kit	Cusabio, USA
Rat TGF-beta 2 ELISA kit	Cusabio, USA
Rat TGF-beta 3 ELISA kit	Cusabio, USA
Proteaz İnhibitor Kokteyli	Cell Signalling Tech., ABD
Tripsin EDTA 10X, 100 mL	Sigma-Aldrich, Almanya
Amfoterisin B çözültisi 20 mL	Sigma-Aldrich, Almanya
HBSS, Ca;Mg;Na ve Fenol Kırmızısı 500ml	Biowest, ABD
HEPES Buffer 1 M 100 mL	Biowest, ABD
DMEM, 4.5 g/L Glukoz;L-Glutamin	Biowest, ABD
L-Glutamin 100X, 200mM -100ml	Biowest, ABD
Fetal Calf Serum 500 mL	Sigma-Aldrich, Almanya

Penisilin-Streptomisin, 10,000unite/ml	Sigma-Aldrich, Almanya
Kanamisin 20 mL	Sigma-Aldrich, Almanya
Tekstür Analiz Cihazı	TA-XT2, Stable Micro Systems
Tekstür Analiz Cihazı- Video Capture System	TA-XT2, Cihaz Donanımları
Tekstür Analiz Cihazı-Universal Syringe Rig	TA-XT2, Cihaz Donanımları
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	Q100, TA Instruments, ABD
Fourier Transform İnfrared Spektroskopu	Perkin Elmer Corporation, ABD
Taramalı Elektron Mikroskopu	Fei Quanta 400F, ABD
X-ışını Kırınımı Cihazı (D/max-2200/PC)	Rigaku Corporation, Japonya
İpek Ligatür (3.0)	Ethicon, Inc., ABD
Hematoksilin & Eozin	Diapath, İtalya
Mikrotom Bıçağı	A35, Feather®
Görüntü Analiz Sistemi (Spot Software: 4.1)	Diagnostic Instruments Inc, ABD
Mikroskop (Histomorfometrik Ölçümler)	Olympus BX51 Microscope

### **3.2. Etkin Maddeye Ait Çalışmalar**

#### **3.2.1. UV Spektrumu**

Atorvastatin kalsiyumun pH 6.8 fosfat tamponu içinde hazırlanan  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve çözeltinin gösterdiği  $\lambda_{\text{maks}}$  değeri tespit edilmiştir.

### 3.2.2. Atorvastatinin UV Spektrofotometre ile Miktar Tayini

Atorvastatinin salım ortamından tayini için spektrofotometrik yöntem tanımlanmıştır. PH 6.8 fosfat tamponu içinde 200-400 nm dalga boyu aralığında alınan UV spektrumunda maksimum dalga boyu 240.4 nm'dir.

Atorvastatinin kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için, etkin maddenin pH 6.8 fosfat tamponu içinde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve 0.2, 2, 5, 8, 10 ve  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonlarda olacak şekilde seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir ve kalibrasyon doğrusu denklemi saptanmıştır. Her deney öncesi 4 konsantrasyonla (0.2, 2, 8 ve  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) taze kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

### 3.2.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, ICH kılavuzuna (196) göre yapılmıştır. Analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Metot validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır.

#### Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, deneyin bulgularının doğrudan veya transformasyon sonucu örnek içindeki madde konsantrasyonu ile belirli bir aralıkta orantılı olmasıdır. Bu amaçla etkin maddenin pH 6.8 fosfat tamponu içinde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve her birinde 0.2, 2, 5, 8, 10 ve  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda atorvastatin olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı absorban değerleri okunarak elde edilen kalibrasyon doğrusunun denkleminde doğrusallık hesaplanmıştır.

### **Doğruluk**

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığıdır. Doğruluk, eklenen madde miktarları ile bulunan madde miktarları karşılaştırılarak BH (bağıl hata) değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,2, 8, 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### **Kesinlik**

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik derecesinin ölçülmesidir. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimde örnek ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, standart sapma (SS), bağıl standart sapma (BSS) veya varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilir. 0,2, 8 ve 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonlardan her birinden 1 adet olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır ve 6 ayrı kez ölçüm yapılmıştır.

### **Stabilite**

Deney şartlarında (37°C) etkin maddenin stabilitesini incelemek amacıyla 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda çözeltiler hazırlandıktan 8 saat ve 24 saat sonra 240.4 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş ve saatler arasında değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

### 3.3. Formülasyon Geliştirme

#### 3.3.1. Jel Formülasyonu Hazırlanması

Jel formülasyonlarında suda çözünen ve baz halde kitosan kullanılmıştır (Tablo 3.1). Baz kitosan ile %2 (a/h) konsantrasyonda dilue (%1 h/h) laktik asit içerisinde; suda çözünen kitosan (Protasan UP CL 213) ile distile su içerisinde formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonlara % 2 a/h konsantrasyonda etkin madde (atorvastatin) eklenmiştir.

**Tablo 3.1.** Jel formülasyonlarında kullanılan polimerler

Polimer	Kaynağı	Molekül Ağırlığı (kDa)	Deasetilasyon Derecesi (%)
Baz kitosan	Koyo (Japonya)	-	85
Suda çözünen kitosan (Protasan UP CL 213)	Novamatrix (Norveç)	150-400	86

Hazırlanan jel formülasyonlarında atorvastatin çözünmeyip süspande olduğu için, atorvastatinin çözünürlüğünü artırmak amacıyla katı dispersiyonlar hazırlanmıştır.

#### 3.3.2. Katı Dispersiyonların Hazırlanması

Katı dispersiyonlar, farklı yöntemler (eritme, birlikte buharlaştırma, birlikte öğütme ve yoğurma) ve farklı polimerlerin (PEG 6000, Pluronik F-68 ve baz kitosan) 1:9 ve 1:12 (etkin madde:polimer) oranlarında kullanılmasıyla hazırlanmıştır (Tablo 3.2).

##### - Eritme Yöntemi:

İlaç ve polimer bir beherde karıştırılır ve homojen bir karışım elde edilebilmesi için bileşenlerin erime sıcaklığında ya da erime sıcaklığının üstündeki bir değerde eritilir. Daha sonra karışım soğutulur ve toz haline getirilir [8].

### - Birlikte Buharlaştırma (Co-evaporation) Yöntemi

İlaç ve polimer, organik bir çözücüde çözüldürülür. Daha sonra çözücü uçurulur ve elde edilen katı karışım toz haline getirilir [9].

### - Birlikte Öğütme (Co-grinding) Yöntemi

İlaç ve polimerin fiziksel karışımı bir süreliğine belirli bir hızda bir karıştırılır. Daha sonra bu karışım bilyalı karıştırıcıya alınarak bilyalar yardımıyla karıştırılır ve toz haline getirilir [10].

### - Yoğurma (kneading) Yöntemi

İlaç ve polimer karışımı bir çözücü ile ıslatılır ve cam havanda bir süre karıştırılır, daha sonra kurutma içinde etüvde belli bir sıcaklıkta bir süre bekletilir [11].

**Tablo 3.2.** Katı dispersiyonların hazırlanması

Kullanılan polimerler	Polimer: Etkin madde oranı	Hazırlama yöntemi
PEG 6000 (Merck, Almanya)	1:9 1:12	- Eritme yöntemi - Birlikte buharlaştırma yöntemi
Pluronik F-68 (Merck, Almanya)	1:9 1:12	- Eritme yöntemi - Birlikte buharlaştırma yöntemi
Baz kitosan (Koyo, Japonya)	1:9 1:12	- Birlikte öğütme yöntemi - Yoğurma yöntemi

### **Pluronik F-68-Atorvastatin Katı Dispersiyonlarının Hazırlanması**

Eritme yöntemiyle Pluronik F-68-atorvastatin katı dispersiyonlarının hazırlanması için önce, polimer su banyosunda 58°C’de eriyene kadar ısıtılmış, daha sonra bu eriyik üzerine atorvastatin eklenerek homojen bir dispersiyon elde edene kadar devamlı karıştırılmıştır. Dispersiyonlar, buzdolabında +4°C’de katılaşıncaya kadar bekletilmiştir. Daha sonra porselen havanda toz haline getirilmiştir.

Birlikte buharlaştırma yöntemiyle Pluronik F-68-atorvastatin katı dispersiyonlarının hazırlanması için, atorvastatin ve polimer, metanolde çözündürülmüş, rotavaporda (IKA RV 10), 40°C’de çözücü uçurulmuştur. Elde edilen toz karışımı, nem kalmadığına emin olmak için 1 gün süreyle desikatörde bekletilmiştir ve sonra porselen havanda toz haline getirilmiştir.

Ayrıca aynı yöntemler etkin madde içermeyecek şekilde sadece polimerlerle uygulanmıştır.

### **PEG 6000- Atorvastatin Katı Dispersiyonlarının Hazırlanması**

Eritme yöntemiyle PEG 6000-atorvastatin katı dispersiyonlarının hazırlanması için önce, polimer su banyosunda 58°C’de eriyene kadar ısıtılmış, daha sonra bu eriyik üzerine atorvastatin eklenerek homojen bir dispersiyon elde edene kadar devamlı karıştırılmıştır. Dispersiyonlar oda sıcaklığında katılaşıncaya kadar bekletilmiştir. Daha sonra porselen havanda toz haline getirilmiştir.

Birlikte buharlaştırma yöntemiyle PEG 6000-atorvastatin katı dispersiyonlarının hazırlanması için, atorvastatin ve polimer, metanolde çözündürülmüş, çözücü rotavaporda 40°C’de uçurulmuştur. Elde edilen toz karışımı, nem kalmadığına emin olmak için 1 gün süreyle desikatörde bekletilmiştir ve sonra porselen havanda toz haline getirilmiştir.

Ayrıca aynı yöntemler etkin maddesiz sadece polimer için uygulanmıştır.

### **Baz kitosan- Atorvastatin Katı Dispersiyonlarının Hazırlanması**

Çözücü uçurma yöntemiyle atorvastatin:baz kitosan katı dispersiyonu hazırlamak için, atorvastatin metanolde çözündürülmüş ve dilue laktik asit içinde disperse edilen (%0,4 a/h) baz kitosan üzerine karıştırılarak eklenmiştir. Çözücü rotavaporda 50°C’de uçurulmuştur. Daha sonra porselen havana aktarılmış ve toz haline getirilmiştir.



Birlikte öğütme yöntemiyle atorvastatin:kitosan katı dispersiyonu hazırlamak için farklı oranlarda atorvastatin ve polimer fiziksel karışımları 1 saat 300 rpm'de bilyalı karıştırıcıda (Retsch PM 100) karıştırılarak toz haline getirilmiştir.

Yoğurma yöntemiyle atorvastatin:kitosan katı dispersiyonu hazırlamak için farklı oranlarda atorvastatin ve polimer fiziksel karışımları porselen havana alınmış, tartılan toz miktarının 1,5 katı olacak şekilde metanol:su (6:1) karışımı ile ıslatılarak karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 50 °C'de 48 saat etüvde bekletilmiştir.

Ayrıca aynı yöntemler etkin maddesiz sadece polimer için uygulanmıştır. Tablo 3.3'te yukarıda hazırlanışı anlatılan katı dispersiyonlar toplu olarak sunulmuştur.

**Tablo 3.3.** Hazırlanan katı dispersiyonlar

<b>Formülasyon kodu</b>	<b>Formülasyon içeriği</b>
CG-dK9-AT	AT:Baz kitosan (1:9) (birlikte öğütme)
CG-dK12-AT	AT:Baz kitosan (1:12) (birlikte öğütme)
KN-dK9-AT	AT:Baz kitosan (1:9) (yoğurma)
KN-dK12-AT	AT:Baz kitosan (1:12) (yoğurma)
ML-dPEG9-AT	AT:PEG 6000 (1:9) (eritme)
ML-dPEG12-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (eritme)
ML-dPL9-AT	AT:Pluronik F-68 (1:9) (eritme)
ML-dPL12-AT	AT:Pluronik F-68 (1:12) (eritme)
CE-dPEG9-AT	AT:PEG 6000 (1:9) (birlikte buharlaştırma)
CE-dPEG12-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (birlikte buharlaştırma)
CE-dPL9-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (birlikte buharlaştırma)
CE-dPL12-AT	AT:Pluronik F-68 (1:9) (birlikte buharlaştırma)

### 3.3.3. Katı Dispersiyonların Karakterizasyonu

Atorvastatinin çözünürlüğünü artırmak amacıyla hazırlanan katı dispersiyonların (Tablo 2.3) karakterizasyonu diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR), X-ışını kırınım (XRD) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizleriyle gerçekleştirilmiştir.

#### **Katı Dispersiyonların Çözünürlüğünün İncelenmesi**

Etkin maddenin çözünürlüğünün hazırlanan katı dispersiyonlarla artırılıp artırılmadığını belirlemek için, tek başına ve katı dispersiyon halindeki etkin maddenin su ve pH6.8 tamponunda çözünürlüğü tayin edilmiştir. Bu amaçla farklı zaman aralıklarında (4, 8, 12 ve 24 saat) yatay çalkalayıcıda karıştırılan su veya tampon içindeki çözeltilerde etkin madde tayini yapılmış ve çözünen madde miktarı tayin edilmiştir.

### **Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi**

Atorvastatin, PEG 6000, Pluronik F-68, baz kitosan ve bunlara ait etkin madde-polimer fiziksel karışım ve katı dispersiyonlarının DSC analizi yapılmıştır. 5 mg ağırlıkta örnek alüminyum kaba konulmuştur ve 10°C/dak sıcaklık artışıyla, azot akışı altında, 20°C ve 260°C arasında olacak şekilde analiz gerçekleştirilmiştir (DSC Q100, TA Instruments).

### **Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi**

Katı dispersiyonların 400-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında infrared spektrumları (Perkin Elmer 1720XFT-IR spektrofotometresi) doğrudan örnekleme ile alınmış, spektrumlar dalga sayısı (cm<sup>-1</sup>) cinsinden değerlendirilmiştir.

### **X-ışını Kırınım (XRD) Analizi**

Hazırlanan örneklerin yapıları X-ışını kırınım (XRD, D/max-2200/PC, Rigaku, 40 kV, 20 mA, Cu K $\alpha$  radyasyon) ile karakterize edilmiştir. X-ışını toz difraksiyon taramaları (XRPD) 2-50° 2 $\theta$  açısız aralığında yapılarak difraksiyon (kırınım) desenleri elde edilmiştir.

### **Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi**

Atorvastatin, PEG 6000, Pluronik F-68, baz kitosan ve bunlara ait etkin madde-polimer fiziksel karışım ve katı dispersiyonlarının yüzey morfolojisi taramalı electron mikroskopu altında analiz edilmiştir (SEM, Fei Quanta 400F, ABD). Toz örnekler alüminyum taşıyıcılara çift taraflı yapışkanlı bantlar ile tutturulmuştur. Daha sonra bu tozlar yüzeyde iletkenliği sağlamak için vakum altında altın/paladyum (Au/Pd) ile kaplanmıştır. Elde edilen SEM mikrografları 25.000 büyütme altında incelenmiştir.

### **3.3.4. Katı Dispersiyon-Kitosan Jel Karışımı Hazırlanması**

Etkin maddenin çözünürlüğünü artırmak amacıyla hazırlanan katı dispersiyonlar ayrıca kitosan jel ile karıştırılmıştır. Tablo 3.4'te etkin maddeyi tek başına ve katı dispersiyon halinde içeren kitosan jel formülasyonlarının listesi sunulmuştur. Katı dispersiyon formda hazırlanan atorvastatin içeren kitosan bazlı jel formülasyonları hazırlanmıştır (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** Geliştirilen jel formülasyonları

Formülasyon kodu	Formülasyon içeriği
<b>Etkin madde içermeyen</b>	
gK	Baz kitosan jel
gP	Suda çözünen kitosan jel
gK-ML-dPEG9	PEG 6000 (1:9) (eritme) + baz kitosan jel
gK-ML-dPL9	Pluronik F-68 (1:9) (eritme) + baz kitosan jel
gK-CE-dPEG9	PEG 6000 (1:9) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gK-CE-dPL9	Pluronik F-68 (1:9) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gKN-dK9	Baz kitosan (1:9) (yoğurma) + %1 laktik asit çözeltisi
gCG-dK9	Baz kitosan (1:9) (birlikte öğütme) + %1 laktik asit çözeltisi
gK-ML-dPEG12	PEG 6000 (1:12) (eritme) + baz kitosan jel
gK-ML-dPL12	Pluronik F-68 (1:12) (eritme) + baz kitosan jel
gK-CE-dPEG12	PEG 6000 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gK-CE-dPL12	Pluronik F-68 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gKN-dK12	Baz kitosan (1:12) (yoğurma) + %1 laktik asit çözeltisi
gCG-dK12	Baz kitosan (1:12) (birlikte öğütme) + %1 laktik asit çözeltisi
gP-CE-dPL12	PEG 6000 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + suda çözünen kitosan jel
gP-CE-dPEG12	Pluronik F-68 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + suda çözünen kitosan jel
gP-ML-dPL12	PEG 6000 (1:12) (eritme) + suda çözünen kitosan jel
gP-ML-dPEG12	Pluronik F-68 (1:12) (eritme) + suda çözünen kitosan jel
<b>İlaç Yüklü</b>	
gK-AT	Atorvastatin+Baz kitosan jel
gP-AT	Atorvastatin+Suda çözünen kitosan jel
gK-ML-dPEG9-AT	AT:PEG 6000 (1:9) (eritme) + baz kitosan jel
gK-ML-dPL9-AT	AT:Pluronik F-68 (1:9) (eritme) + baz kitosan jel
gK-CE-dPEG9-AT	AT:PEG 6000 (1:9) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gK-CE-dPL9-AT	AT:Pluronik F-68 (1:9) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gKN-dK9-AT	AT:Baz kitosan (1:9) (yoğurma) + %1 laktik asit çözeltisi
gCG-dK9-AT	AT:Baz kitosan (1:9) (birlikte öğütme) + %1 laktik asit çözeltisi
gK-ML-dPEG12-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (eritme yöntemi) + baz kitosan jel
gK-ML-dPL12-AT	AT:Pluronik F-68 (1:12) (eritme yöntemi) + baz kitosan jel
gK-CE-dPEG12-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gK-CE-dPL12-AT	AT:Pluronik F-68 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + baz kitosan jel
gKN-dK12-AT	AT:Baz kitosan (1:12) (yoğurma) + %1 laktik asit çözeltisi
gCG-dK12-AT	AT:Baz kitosan (1:12) (birlikte öğütme) + %1 laktik asit çözeltisi
gK-CG-dK12-AT	AT:Baz kitosan (1:12) (birlikte öğütme) + %0,1 baz kitosan
gP-CE-dPL12-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (birlikte) + suda çözünen kitosan jel
gP-CE-dPEG12-AT	AT:Pluronik F-68 (1:12) (birlikte buharlaştırma) + suda çözünen kitosan jel
gP-ML-dPL12-AT	AT:PEG 6000 (1:12) (eritme) + suda çözünen kitosan jel
gP-ML-dPEG12-AT	AT:Pluronik F-68 (1:12) (eritme) + suda çözünen kitosan jel

\* CG: Birlikte öğütme, ML: Eritme, KN: Yoğurma, CE: Birlikte buharlaştırma

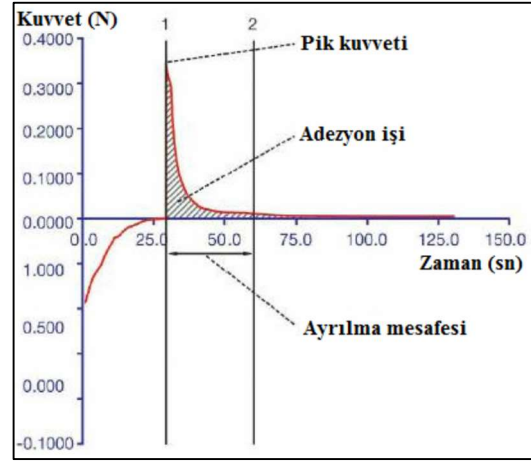
### 3.4. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan İn Vitro Çalışmalar

#### 3.4.1. Viskozite Ölçümü

Hazırlanan jel formülasyonlarının akış özellikleri Brookfield koni plak viskozimetresinde  $25\pm 0.1$  °C’de, 0.5-25 rpm ( $10 \text{ sn}^{-1}$ ) arasında ölçülmüştür. Her bir formülasyon için test 3 kez tekrarlanmıştır.

#### 3.4.2. Biyoadezyon Çalışmaları

Formülasyonlarda biyoadezyon ölçümleri TA-XT Plus model tekstür analiz cihazında (Stable Micro Systems) yapılmıştır. Selüloz membran ile probun temas ettiği yüzey alanı  $0.635 \text{ cm}^2$ ; kullanılan jel miktarı ise  $0.15 \text{ mL}$ ’dir. Aletin probu  $0.1 \text{ mm/sn}$  hızla jel yüzeyine değdirilmiş ve jel ile membran  $180 \text{ sn}$   $0.2 \text{ N}$  kuvvet uygulanarak temas halinde bekletilmiştir. Daha sonra probun  $0.1 \text{ mm/sn}$  hızla jel yüzeyinden uzaklaşması sağlanarak iki yüzeyi birbirinden ayırmak için gereken kuvvet ölçülmüştür. Burada jeli ayırmak için gereken kuvvet, kuvvet-zaman grafiğinde eğrisinden (Şekil 3.1) hesaplanmaktadır. Her bir formülasyon için test 3 kez tekrarlanmıştır. Veri toplama ve hesaplamalar cihazın Texture Exponent 4.0.4.0. software programı ile yapılmıştır. TA-XT Plus model tekstür analiz cihazı kullanılarak elde edilen kuvvete karşı zaman eğrilerinin altında kalan alandan biyoadezyon işi ( $\text{mJ/cm}^2$ ) hesaplanmaktadır (Eşitlik 1). Biyoadezyon çalışmalarında elde edilen kuvvet-zaman eğrilerinin senkronize olarak görsel olarak da takibi için “video capture” sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.2) ve video çekimleri kaydedilmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.1.** Biyoadezyon çalışmalarında elde edilen kuvvet-zaman eğrisi

$$\text{Biyoadezyon işi} = \text{AUC} / \pi r^2 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

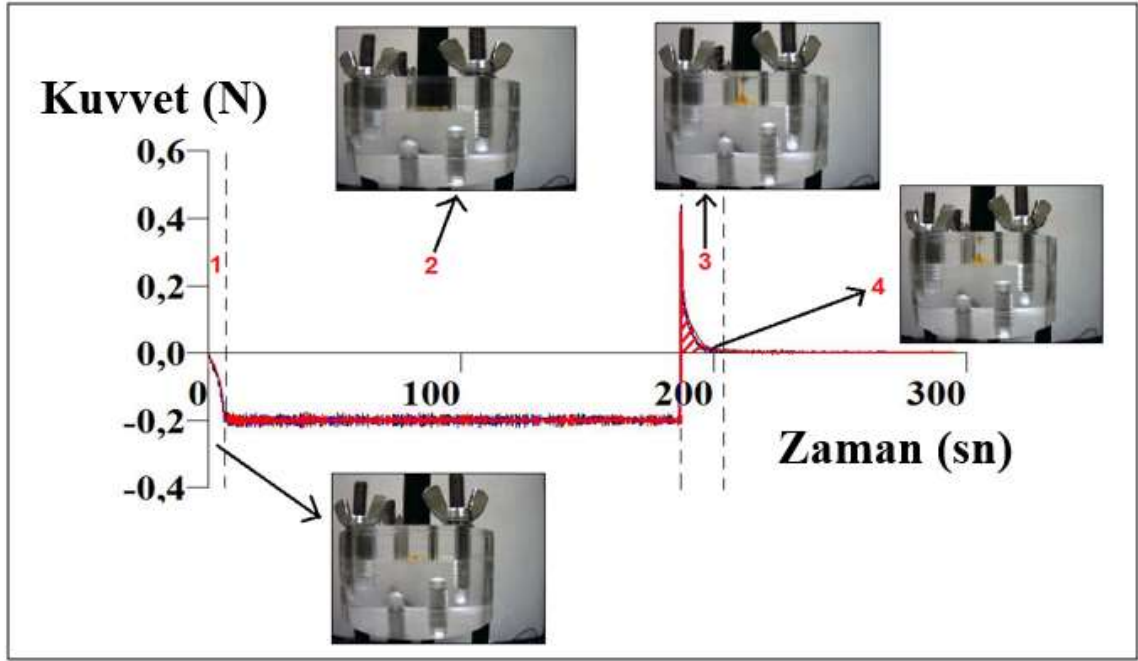
$\pi r^2$ , membranla temas eden yüzeyi alanı

$r$ , yarıçap (cm)

AUC, eğri altında kalan alan (adezyon işi)



**Şekil 3.2.** Tekstür analiz cihazının kamera ve aydınlatma sistemi



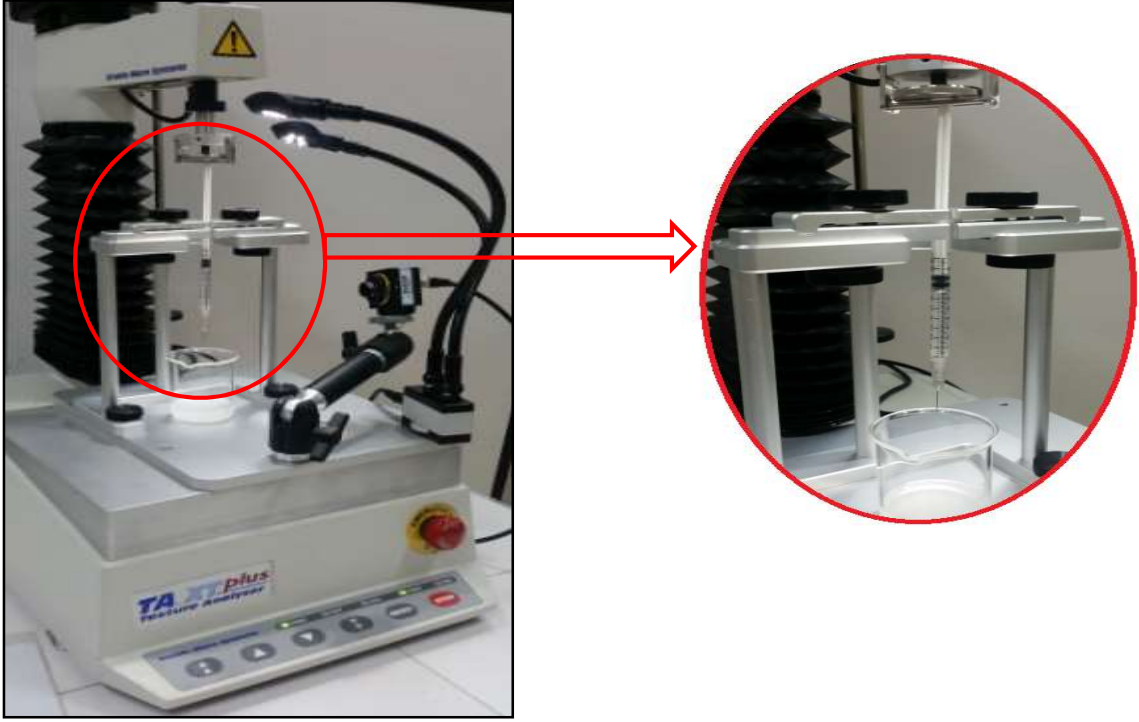
**Şekil 3.3.** Biyoadezyon ölçümlerinde elde edilen kuvvet-zaman eğrisi

1) prob jelle temas etmeden önce; 2) probun 0.2 N kuvvet ile probun jelle teması (180 sn); 3) probun yukarıya doğru hareketi; 4) probun jelden kopma anı

### 3.4.3. Şırınga Edilebilirlik Testi

Şırınga edilebilirlik testi, geliştirilen jel formülasyonlarının periodontal cebe uygulama kolaylığının saptanması amacıyla yapılmıştır (Tablo 3.4). Şırınga edilebilirlik işi tekstür analiz cihazı (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) ile ölçülmüştür (Şekil 3.4). Jel formülasyonu 1 mL'lik plastik şırıngaya hava kabarcığı kalmayacak şekilde çekilmiş, şırıngalar dik bir şekilde cihaza kelepçelenmiş ve prob 2 mm/sn hızla 3 cm'lik mesafeden sıkıştırma (compression) modunda indirilerek jelin şırıngadan dışarı itilmesi sağlanmıştır. Şırınga edilebilirlik işi, elde edilen kuvvet-zaman eğrisinde, eğri altında kalan alan hesaplanarak elde edilmiştir (197-199). Şırınga edilebilirliğin düşük olduğu durumlarda, kuvvet-zaman eğrisi altında kalan alanı daha büyük olmaktadır.

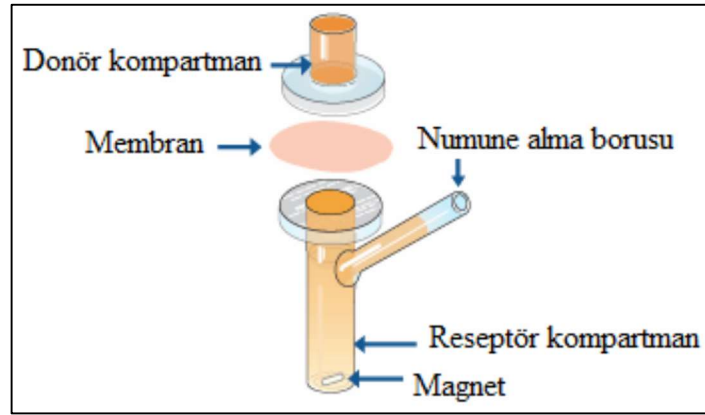




Şekil 3.4. Tekstür analiz cihazında şırınga edilebilirlik testi düzeneği

#### 3.4.4. Salım çalışmaları

Jellerden etkin madde salım çalışmaları  $2.01 \text{ cm}^2$  difüzyon alanına ve 20 mL reseptör hacmine sahip Franz difüzyon hücreleri (Şekil 3.5) kullanılarak  $37^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Difüzyon ortamı olarak pH 6.8 fosfat tamponu kullanılmıştır. Önceden distile su ile hidrate edilmiş selüloz membran hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde reseptör ile donör bölme arasına yerleştirilmiştir. Donör bölmeye 0,5 mL hacimde formülasyon konulmuştur ve formülasyonların buharlaşmasını önlemek için üst kısmı parafilm ile kapatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında 1'er mL örnek alınmış ve yerine aynı hacimde tampon eklenmiştir. Alınan numunelerdeki etkin madde miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Her bir deney için 6 tekrar yapılmıştır.



**Şekil 3.5.** Franz difüzyon hücresinin şematik görünümü

### 3.4.5. Hücre Kültüründe Antiinflamatuvar Etkinin İncelenmesi

Çalışmalarda, inflamasyonda önemli rol oynayan IL-6, IL-10 ve proinflamatuvar belirteç olarak bilinen IL-1beta, IL-8 sitokinleri antiinflamatuvar cevabın değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Ayrıca immün yanıtta farklı yollarda periodontal hastalık gelişiminde önemli olan TGF-beta ailesinin alt birimleri olan TGF-beta1, TGF-beta2 ve TGF-beta3 üzerinde, geliştirilen formülasyonların etkileri incelenmiştir.

Çalışmalarda insan gingival fibroblast (hGF) hücreleri kullanılmıştır. Başlangıçta bu hücreler, hücre pasajlama işleminin yapılacağı 25'lik flaslara konulmuştur. İçerisine 20-25 mL DMEM, %10 Fetal bovine serum (FBS), 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  penisilin-streptomisin antibiyotik, %1 Hanks balance solution (HBSS) eklenmiştir ve %5  $\text{CO}_2$  etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler yüzeyi tamamen kaplayınca 75 mL'lik flaslara alınmıştır. Vasat eklenerek hücrelerin tabanda çoğalması sağlanmıştır. Hücreler 75'lik flaslarda yüzeyi tamamen kaplayınca vasat uzaklaştırılıp, 15 mL tripsin-EDTA ile 3-4 dak etüvde bekletilmiş, hücreler toplanmıştır ve etekli tüpe konulup 1200-1300 rpm'de (3-5 dak) santrifüjlenmiştir. Vasat atıldıktan ve alttaki hücreler alındıktan sonra içinden 10  $\mu\text{L}$  alıp Thoma lamında mikroskopta sayılmıştır.

Çoğaltılmış olan insan gingival fibroblast (hGF) hücreleri 24'lük kuyucuklara eşit oranda bölünmüştür. Üzerlerine 1 mL DMEM+ FBS+ antibiyotik konulmuştur. %5  $\text{CO}_2$

etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Her gün mikroskopta hücrelerin yüzeyi tamamen kaplayıp kaplamadığı kontrol edilmiştir.

Hücreler yüzeyi tamamen kaplayınca TNF- $\alpha$  ile uyarılmıştır. Hücrelerin üzerine Tablo 3.4’te verilen formülasyonlar uygulanmıştır. 4 ve 8 saat sonundaki sonuçlar incelenmiştir. Human IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, TGF-beta1, TGF-beta2 ve TGF-beta3 elisa analiz kitleriyle (Affymetrix, eBioscience) hücrelerden serbest bırakılan sitokin miktarları ölçülmüş ve sitokinlerin inhibe edilip edilmediğine bakılmıştır. HGF TNF- $\alpha$ (+), LA TNF- $\alpha$ (+) ve su TNF- $\alpha$ (+) pozitif kontroller; HGF TNF- $\alpha$ (-), LA TNF- $\alpha$ (-) ve su TNF- $\alpha$ (-) ise negatif kontrollerdir.

### **3.5. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan İn Vivo Çalışmalar**

Geliştirilen formülasyonların antiinflamatuvar etkilerini incelemek amacıyla yapılan in vivo çalışmalarda 250-300 gram ağırlığında erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. İn vivo deneyler için yürütülen çalışma protokolü, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2014/16 sayılı kararla onaylanmış olup, deneyler Hacettepe Üniversitesi’nde Deney Hayvanları için ayrılan Tıbbi-Cerrahi Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.5.1. Sıçanlarda İplikle Bağlayarak (Ligatürle) İndüklenmiş Periodontitis Geliştirme Modeli**

72 adet erkek albino Wistar sıçan (250-300 g ağırlığında) çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada kullanılacak tüm ratlar aynı bakım, beslenme ve barındırma koşullarında 12 saat gece ve 12 saat gündüz siklusunda oda sıcaklığında ve standart kafeslerde tutulmuştur. Operasyon öncesi sıçanlara anestezi için intraperitoneal yoldan ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) enjeksiyonu yapılmıştır.

1. gün sıçanlara anestezi yapıldıktan sonra sıçanların sağ ve sol üst 2. molar dişlerinin mine-sement sınırına denk gelecek şekilde 4-0 ipek sütün bağlanarak palatal

pozisyonda düğümlenmiştir. 11 gün boyunca gün aşırı sıçanların ağızlarındaki sütür kontrol edilmiş, gevşeyen süturlar çıkartılarak yeniden sütür bağlanmış ve böylece deneysel periodontitis modeli oluşturulmuştur. 11. günün sonunda periodontitis geliştirilmiş olan sıçan ve sağlıklı sıçan kıyaslandığında belirgin alveolar kemik kaybıyla beraber kanamalı ve kırmızı diş etlerinin varlığı izlenmiştir.

### 3.5.2. İn Vivo Deney Protokolü

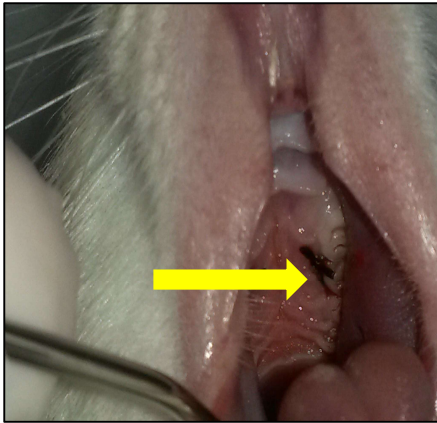
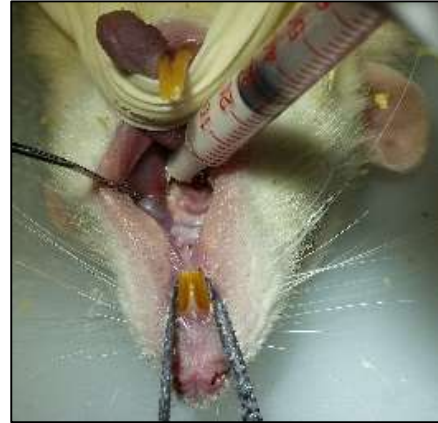
11 gün sonra süturlar uzaklaştırılarak sıçanlar 9 ayrı deney grubuna ayrılmıştır. Sağlıklı kontrol grubu (1. Grup) dışındaki diğer gruplarda periodontitis oluşturulmuştur. 0.1 mL jel, gün aşırı olacak şekilde çalışmaların son gününe kadar sıçanların diş etlerine lokal olarak uygulanmıştır. Deneye başlamadan önce çalışmalar boyunca gün aşırı olarak sıçanları ağırlıkları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Sıçanların değişen ağırlıklarına göre anestezi uygulamadan önce doz ayarlaması yapılmıştır.

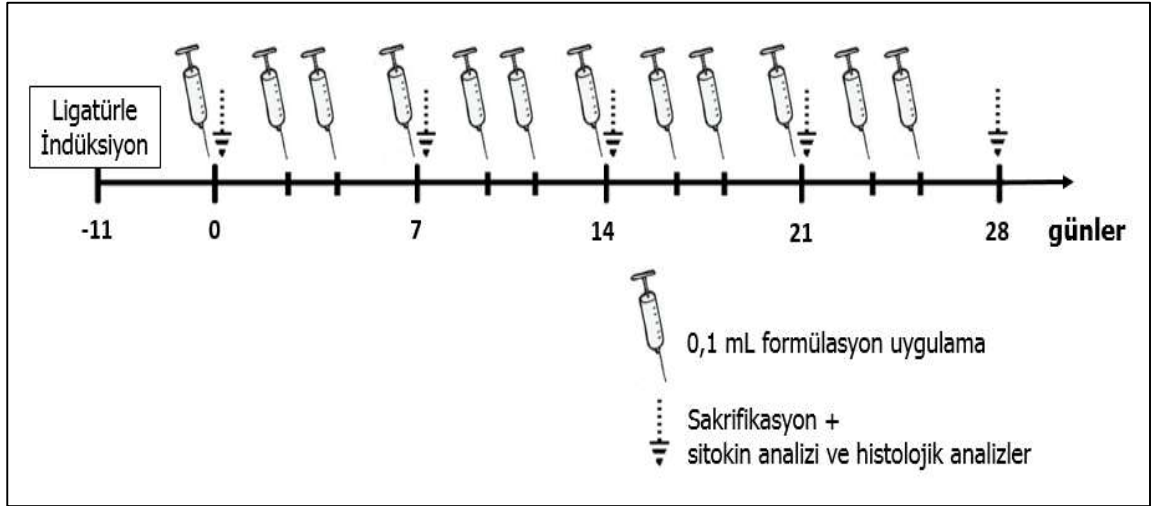
Her gruptan 2 adet sıçan 7., 14., 21., ve 28. günlerin sonunda letal doz üretan (2,5 mL %25 üretan, i.p.) ile sakrifiye edilmiştir. Sıçanların sol üst çeneleri alveolar kemik kaybını belirlemek ve ölçmek üzere formaldehite (%10) konulmuştur. Histopatolojik değişiklikleri incelemek üzere kullanılacak olan çeneler 2 gün formaldehitte bekletildikten sonra dekalsifiye edilmek üzere kesit alınacak uygun sertliğe gelene kadar formik asitte bekletilmiş ve parafine gömülmüştür. Daha sonra 4 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır. Alınan her bir kesit mikroskop altında incelenmiş ve mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığı, mine-sement sınırının kemiğe olan uzaklığı, kemiğin dişe olan uzaklığı ve kemiğin alanı ölçülmüştür. Ayrıca osteoklastik aktivite ve inflamasyon yönünden skorlama yapılmıştır.

Sıçan ELISA kiti ile (Cusabio Biotech Co., EIA, PRC) yapılacak sitokin seviyeleri tayini için sağ çeneler de çıkartılarak her bir çeneye ait diş eti dikkatli bir şekilde kesilerek, proteaz inhibitor kokteyli (Cell Signalling Tech., ABD) 0.2 mL'lik distile su konulmuş ve -80 °C'de saklanmıştır. Sağ çeneler, diş etleri alındıktan sonra histopatolojik çalışmada incelenmek üzere formaldehite konulmuştur.

**Tablo 3. 5.** İn vivo deney grupları

Grup	Sayı	Protokol	Veriliş sıklığı (haftada)	Doz (mg)	Uygulama hacmi (mL)
1	8	(-) Kontrol (Sağlıklı)			
2	8	(+) Kontrol (Periodontitis)			
3	8	Periodontitis + PEG400	Birer gün arayla 3 uygulama		0,1
4	8	Periodontitis+ AT	Birer gün arayla 3 uygulama	2	0,1
5	8	Periodontitis + gK	Birer gün arayla 3 uygulama		0,1
6	8	Periodontitis + gK-AT	Birer gün arayla 3 uygulama	2	0,1
7	8	Periodontitis + gP	Birer gün arayla 3 uygulama		0,1
8	8	Periodontitis + gP-AT	Birer gün arayla 3 uygulama	2	0,1
9	8	Periodontitis + gK-ML-dPEG12-AT	Birer gün arayla 3 uygulama	2	0,1

**Şekil 3.6.** Sıçan diş etinde ligatürle induksiyon**Şekil 3.7.** Sıçan diş etine formülasyon uygulanması



**Şekil 3.8.** Hayvan çalışmalarında takip edilen protokol

### 3.5.3. Doku Örneklerinde Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

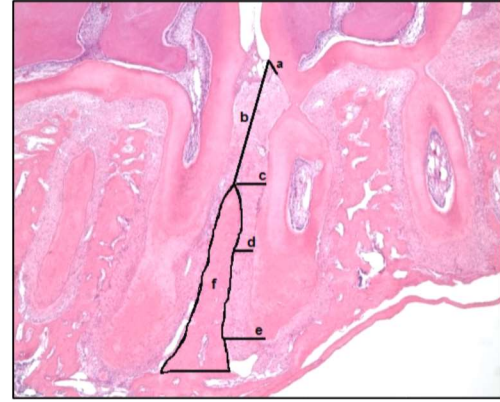
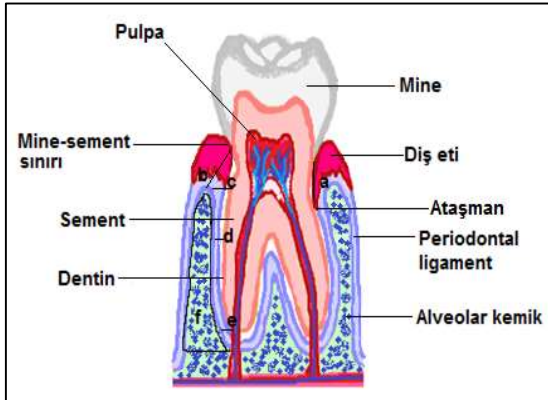
Her bir gruptaki sıçanların sağ üst çenelerinin etrafını saran diş etleri bistüri ile alınarak 0.2 mL'lik proteaz inhibitör kokteyli içeren distile su içerisine konulmuş ve -80 °C dolaplarda saklanmıştır. Dokular çözülerek homojenize edilmiş ve serbest bırakılan IL-1beta, IL-6- IL-8, IL-10, TGF-beta1, TGF-beta2 ve TGF-beta3 konsantrasyonlarını sıçan ELISA kitleriyle ölçmek üzere supernatanlar kullanılmıştır.

### 3.5.4. Histolojik ve Histometrik Analizler

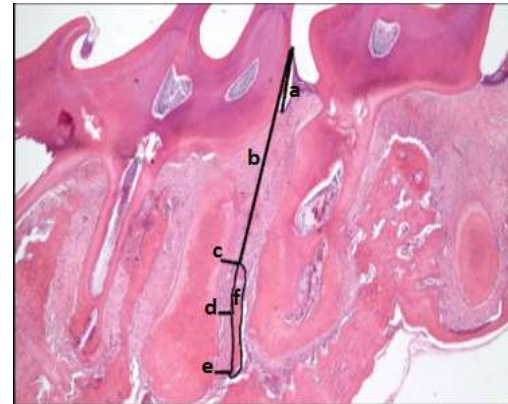
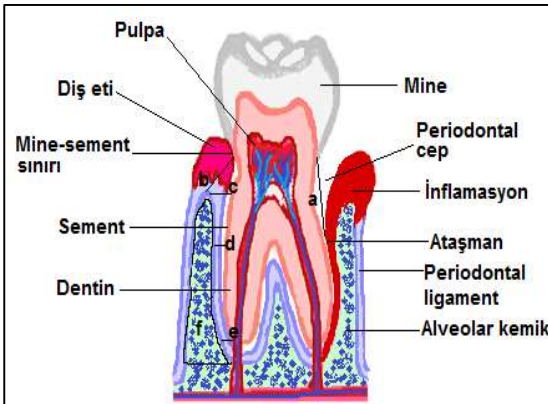
Alınan çene kemikleri %10 formaldehit çözeltisinde en az 1 gün bekletilmiştir ve daha sonra %10 formik asitte, kolayca kesit alınacak şekilde dekalsifiye edilmiştir (yaklaşık 1 ya da 2 gün). Rutin işlemlerden sonra, örnekler parafine gömülmüştür. Mesiodistal yönden 5 µm'lik seri kesitler alınmış ve bu kesitler rutin hematoksilin ve eozin boyalarla boyanmıştır. Bütün örnekler Olympus BX51 mikroskop altında kör araştırmacı tarafından (KK) incelenmiştir. Alveolar kemik değişimine bakılmış, alveolar kemik ve diş arasındaki (alt, orta, üst) uzaklıklar ölçülmüş, mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığına bakılmış ve alveolar kemiğin ataşmana olan uzaklıkları görüntü analiz sistemi (Spot Software: 4.1; Diagnostic Instruments Inc, Sterling Heights, MI, USA) ile elde

edilmiştir (Şekil 3.9). Osteoklastik ve inflamatuvar aktiviteler semi kantitatif olarak osteoklastik ve inflamatuvar aktivitenin şiddetine göre skorlanmıştır.

### Sağlıklı



### Periodontitisli



**Şekil 3.9.** Sağlıklı ve periodontitis oluşmuş dokuların şematik ve histolojik görüntüleri (a) Mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığı; (b) Mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığı; (c) Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (üst); (d) Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (mid); (e) Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (alt); (f) Alveolar kemiğin alanı

**Ataşman:** diş ile diş eti arasındaki dokudur.

**Mine-sement sınırı:** dişin taç kısmını saran mine ile dişin kök kısmını saran sementin karşılaştığı yerdir.

**Alveolar kemik:** dişlerin etrafındaki kemik dokudur.

Periodontal hastalıkta alveolar kemik rezorbe olur. Mine-sement sınırı ile alveolar kemik arasındaki mesafe kemik kaybına bağlı olarak artar ve ataşman kaybı gerçekleşir.

### **3.5.5. İstatistiksel Analizler**

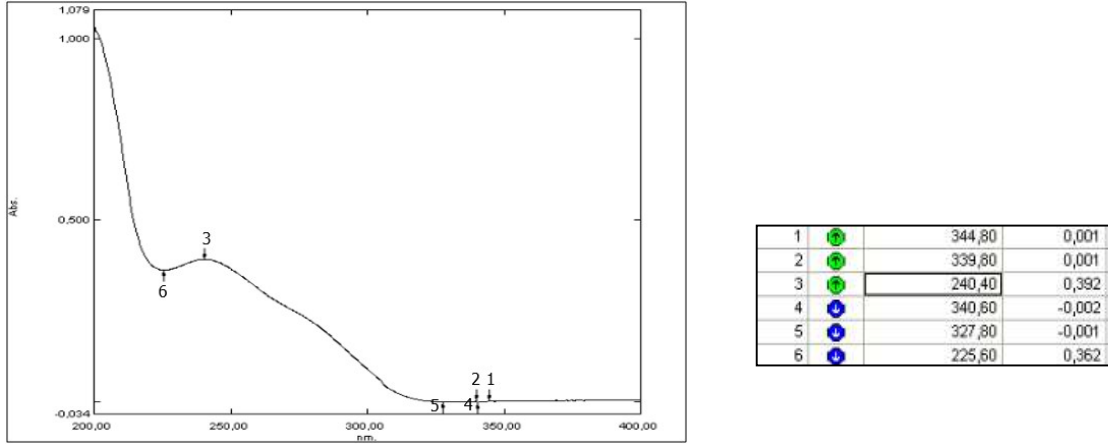
İstatistiksel analizler SPSS programı ile yapılmıştır. Deney gruplarının (2'den fazla) histolojik ölçümlerine ait ortanca değerlerin karşılaştırılması için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arası anlamlı fark bulunan parametreler grafiğe dökülerek, 2'li birbirinden bağımsız grupların karşılaştırılması ve ayrıca grup içinde haftalar arası fark olup olmadığına bakmak için Mann-Whitney U testi ve independent samples t test kullanılmıştır.  $P < 0.05$  bulunduğunda fark istatistiksel olarak anlamlıdır denilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini ve Validasyonu

Atorvastatinin pH 6.8 fosfat tamponu içinde  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanmış çözeltisinin 200-400 nm arasındaki UV spektrumu Şekil 4.1’de verilmiştir.

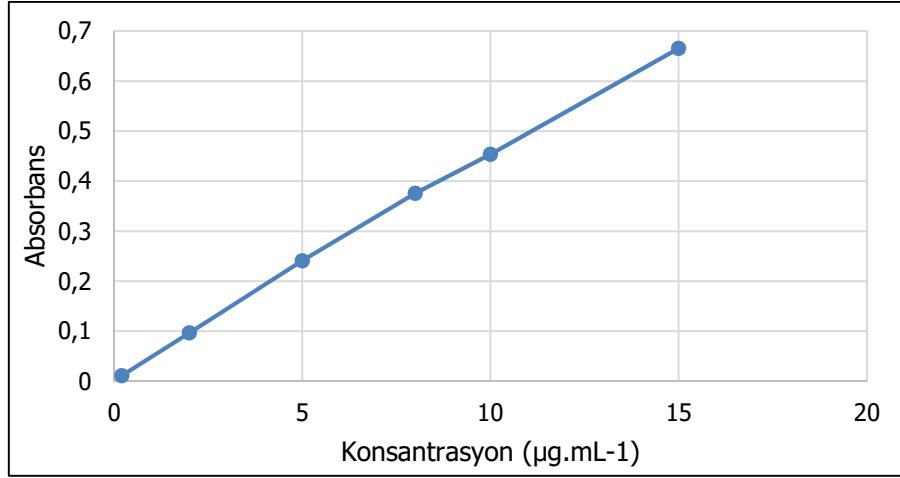


Şekil 4.1. pH 6.8 tamponunda atorvastatin’in UV spektrumu

Analitik yöntemin validasyon çalışmasına ait sonuçlar aşağıda sunulmuştur:

#### Doğrusallık

Atorvastatinin pH 6.8 fosfat tamponunda hazırlanan  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle hazırlanan örneklerin absorbansları ölçülmüş ve kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.2). Tanımlayıcılık katsayısı  $r^2 = 0.99903$  olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir. Regresyon katsayısı değerinin 1’e çok yakın çıkması, atorvastatin kalibrasyon doğrusunun doğrusallığının göstergesidir.



**Şekil 4.2.** Atorvastatinin kalibrasyon doğrusu ( $r^2=0,999$ )

### **Doğruluk**

Doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin ölçüm sonuçları aşağıda verilmiştir. % bağıl hata değerleri 2'den düşük bulunmuştur (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Doğruluk çalışmasına ait sonuçlar (n=6)

Hazırlanan konsantrasyon (µg.mL <sup>-1</sup> )	Ölçülen konsantrasyon (µg.mL <sup>-1</sup> )	% Bağıl hata
0,2	0,199	0,08
8	7,92	0,9
15	14,87	0,8

### **Kesinlik**

3 farklı konsantrasyonda her birinden 1 adet olacak şekilde hazırlanan ve 6 ayrı kez ölçülen çözeltilerin sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Varyasyon katsayısı 1'in altında bulunmuştur.

**Tablo 4.2.** Kesinlik çalışmasına ait sonuçlar

Hazırlanan konsantrasyon ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Ölçülen konsantrasyon $\pm$ SS ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (n=6)	Bağıl standart sapma	Varyasyon katsayısı
0,2	0,201 $\pm$ 0,001	0,007	0,66
8	8,022 $\pm$ 0,037	0,005	0,49
15	15,032 $\pm$ 0,025	0,002	0,17

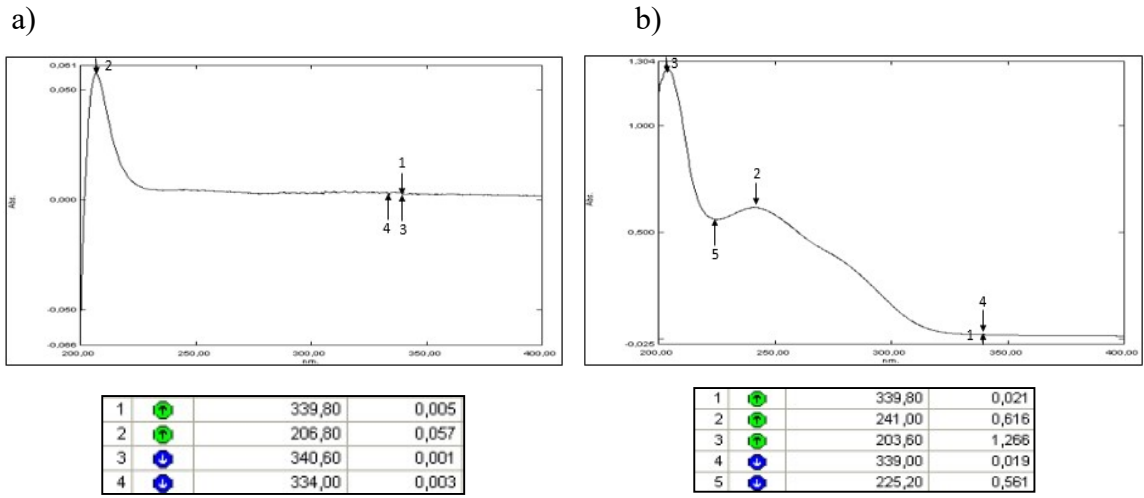
**Stabilite**

Atorvastatinin stabilitesini incelemek amacıyla 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda fosfat tamponu içinde hazırlanan çözeltilerin 24 saatte alınan ölçümlere ait sonuçlar Tablo 4.3.'te verilmiştir. Varyasyon katsayısı 1'in altında bulunmuştur.

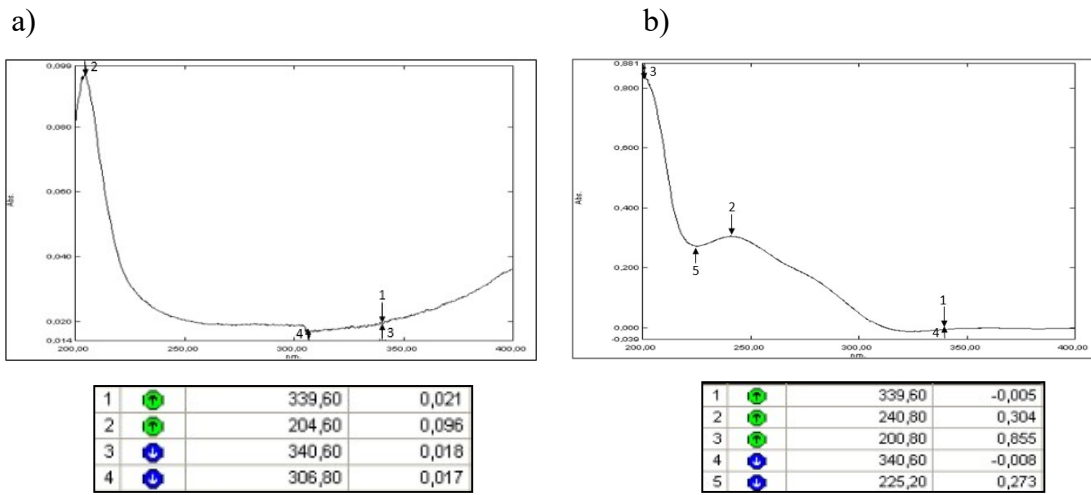
**Tablo 4.3.** Atorvastatinin fosfat tampon içinde stabilitesine ait sonuçlar

Zaman	Ölçülen konsantrasyon $\pm$ SS ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (n=6)	Varyasyon katsayısı
0	10,09 $\pm$ 0,07	0,7
8	10,08 $\pm$ 0,06	0,56
24	9,986 $\pm$ 0,01	0,09

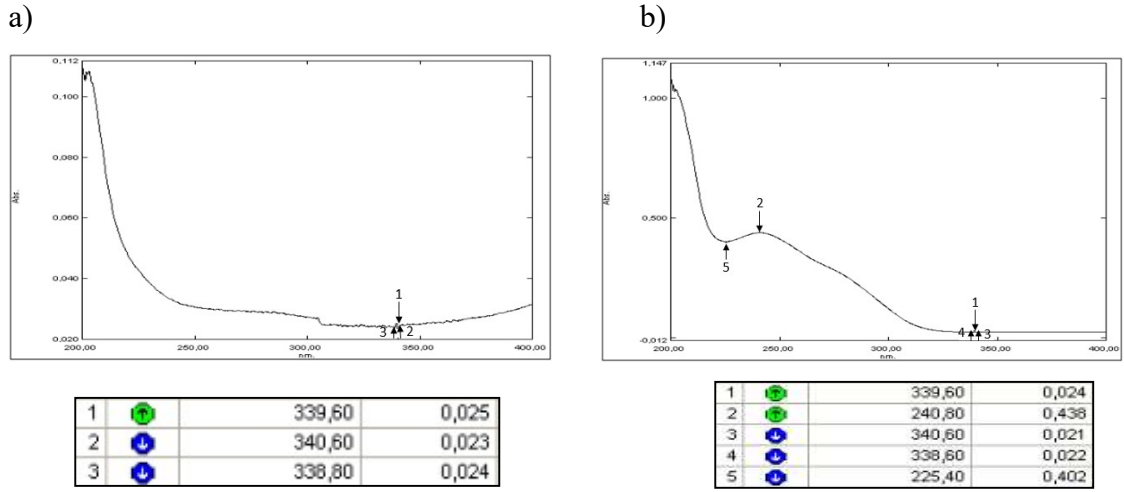
Ayrıca, etkin maddenin kitosan jellerin ve katı dispersiyonların pH 6.8 fosfat tamponu içinde hazırlanan 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınmıştır. Polimer varlığında, atorvastatinin maksimum dalga boyunda ölçülen absorbansında önemli değişiklik olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Baz kitosan (a) ve baz kitosan+atorvastatin (b) katı dispersiyonuna ait spektrumlar (pH 6.8 fosfat tamponu içinde)



Şekil 4.4. PEG (a) ve PEG+atorvastatin (b) katı dispersiyonuna ait spektrumlar (pH 6.8 fosfat tamponu içinde)



Şekil 4.5. Pluronic (a) ve Pluronic+atorvastatin (b) katı dispersiyonuna ait spektrumlar (pH 6.8 fosfat tamponu içinde)

Validasyon çalışmalarının sonucunda, incelenen parametrelerin sonuçlarına göre kullanılan analitik yöntemin uygun olduğuna karar verilmiştir.

## 4.2. Formülasyon Geliştirme

### 4.2.1. Katı Dispersiyon Hazırlanması

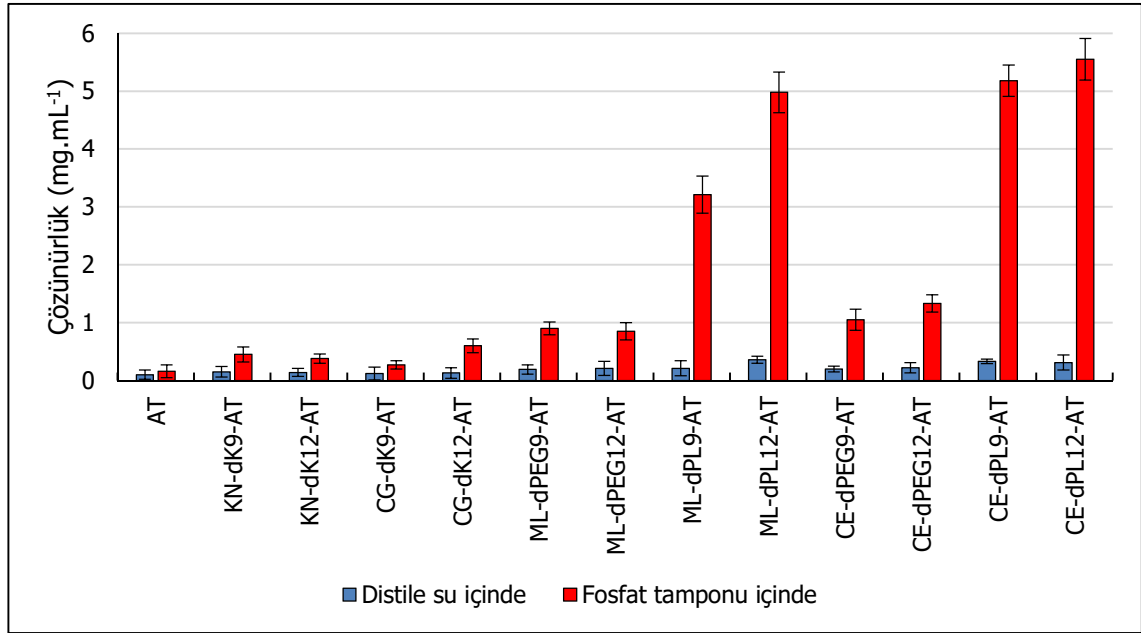
#### Katı Dispersiyonların Karakterizasyonu:

#### Etkin Madde Çözünürlüğü

Etkin maddenin 24 saat sonunda tek başına ve katı dispersiyon halinde su ve tampon içerisinde hesaplanan çözünürlük değerleri Tablo 4.4.'te ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Sudaki ve pH 6.8 fosfat tamponu içindeki çözünürlük sonuçları

Kodlar	Distile su içinde±SS (mg.mL <sup>-1</sup> )	pH 6.8 fosfat tamponu içinde±SS (mg.mL <sup>-1</sup> )
AT	0,1±0,08	0,16±0,11
KN-dK9-AT	0,15±0,09	0,45±0,13
KN-dK12-AT	0,14±0,06	0,38±0,08
CG-dK9-AT	0,12±0,11	0,27±0,07
CG-dK12-AT	0,13±0,09	0,60±0,12
ML-dPEG9-AT	0,19±0,08	0,90±0,11
ML-dPEG12-AT	0,21±0,12	0,85±0,15
ML-dPL9-AT	0,21±0,13	3,21±0,32
ML-dPL12-AT	0,36±0,06	4,98±0,35
CE-dPEG9-AT	0,20±0,05	1,05±0,18
CE-dPEG12-AT	0,22±0,09	1,33±0,15
CE-dPL9-AT	0,33±0,04	5,18±0,27
CE-dPL12-AT	0,31±0,13	5,55±0,36

**Şekil 4.6.** Saf atorvastatinin ve atorvastatin katı dispersiyonlarının su içindeki ve pH 6.8 fosfat tamponu içindeki çözünürlükleri

Atorvastatinin sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>). Fosfat tamponunda çözünürlüğü suya göre biraz daha yüksektir (0,16 mg.mL<sup>-1</sup>). Atorvastatinin katı dispersiyon halinde çözünürlüğü su ve tampona göre belirgin olarak artmıştır. Katı

dispersiyonlarda da atorvastatinin çözünürlüğü tampondaki çözünürlüğü suya göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Katı dispersiyonlarda polimer oranı artıkça çözünürlük artmıştır (Tablo 4.4.). Örneğin, eritme yöntemiyle hazırlanan Pluronik F-68:atorvastatin katı dispersiyonunun tampon içindeki çözünürlüğü, etkin madde:polimer oranı= 1:9 için  $3,21 \text{ mg.mL}^{-1}$  olarak bulunmuş, etkin madde:polimer oranı=1:12 olduğunda ise çözünürlük  $4,978 \text{ mg.mL}^{-1}$  olacak şekilde artmıştır.

Polimerler karşılaştırıldığında, etkin madde için sağlanan en yüksek çözünürlük Pluronik F-68 ile hazırlanan katı dispersiyonlarla sağlanmıştır. Birlikte buharlaştırma yöntemiyle, etkin madde:polimer oranı 1:12 olacak şekilde hazırlanan Pluronik F-68: atorvastatin katı dispersiyonunda atorvastatinin çözünürlüğü  $5,55 \text{ mg.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

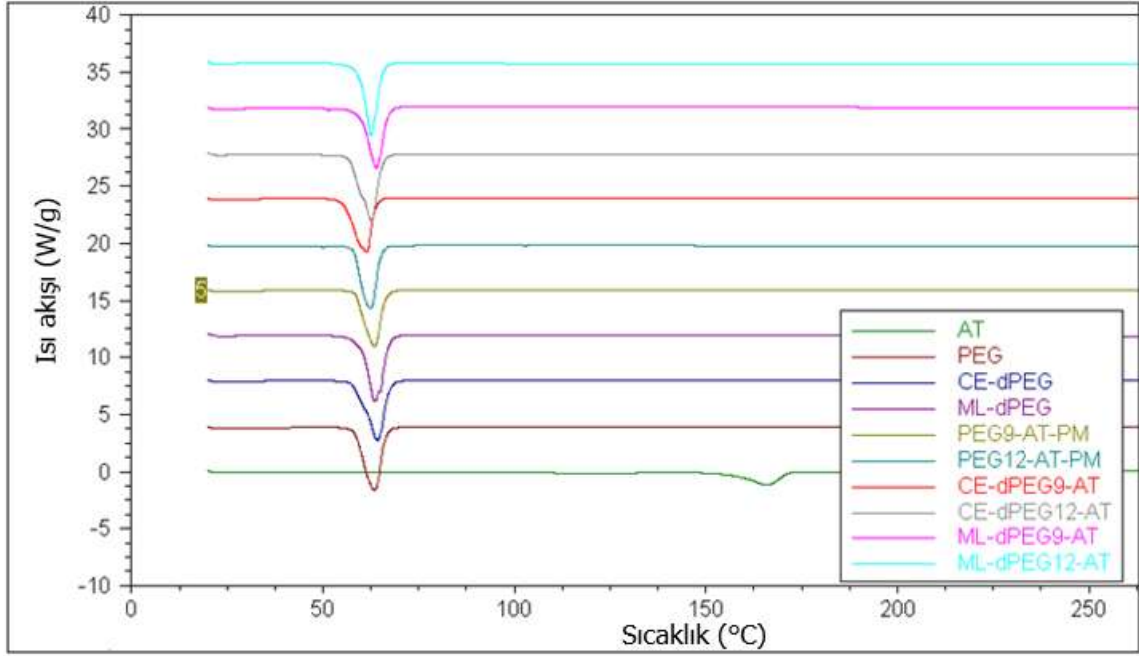
Hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında, etkin madde çözünürlüğü, en fazla birlikte buharlaştırma yöntemiyle elde edilen katı dispersiyonlarla artırılmıştır. Öğütme ve yoğurma yöntemleriyle hazırlanan katı dispersiyonların etkin maddenin çözünürlüğünü diğer yöntemlere göre çok daha az arttırdığı görülmüştür.

### **Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Ölçümleri**

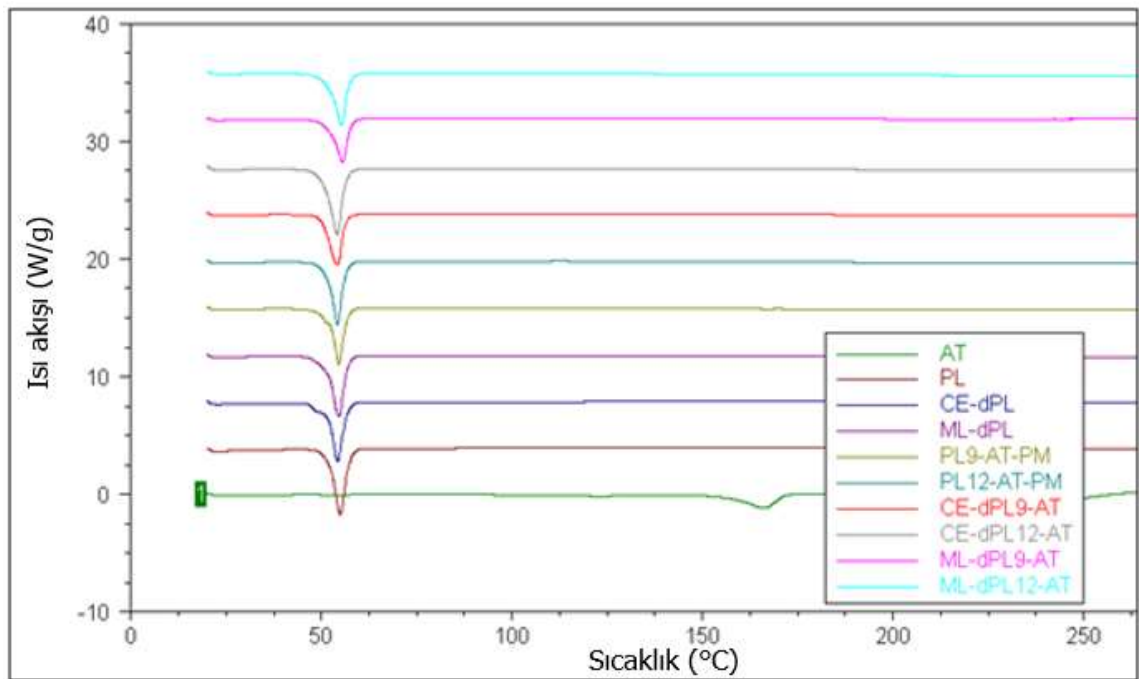
DSC analizi ile geliştirilen katı dispersiyonların kristal yapıları incelenmiştir. DSC ile elde edilen termogramlarda, erime noktasına karşılık gelen endotermik piklerdeki değişikliklere bakılarak katı dispersiyonun özelliği incelenmiştir [6]. Atorvastatin için  $165^{\circ}\text{C}$ 'de bir endotermik pik elde edilmiştir. Kullanılan polimerlerin de tek başına termogramları çekilmiştir (Tablo 4.5.). Fiziksel karışımlarda ve katı dispersiyonlarda ise atorvastatine ait endotermik pikin kaybolduğu görülmüştür (Şekil 4.7). Bu durum, ilacın kristal özelliğinin amorf yapıya döndüğünü göstermektedir. Bunlarda erime noktaları arasında çok büyük fark gözlenmemiştir (Tablo 4.5.). Bu sonuçlar mikroskopi görüntüleriyle de uyumludur.

Hazırlama yöntemi ve polimer oranının endotermik pik üzerinde belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.

a)

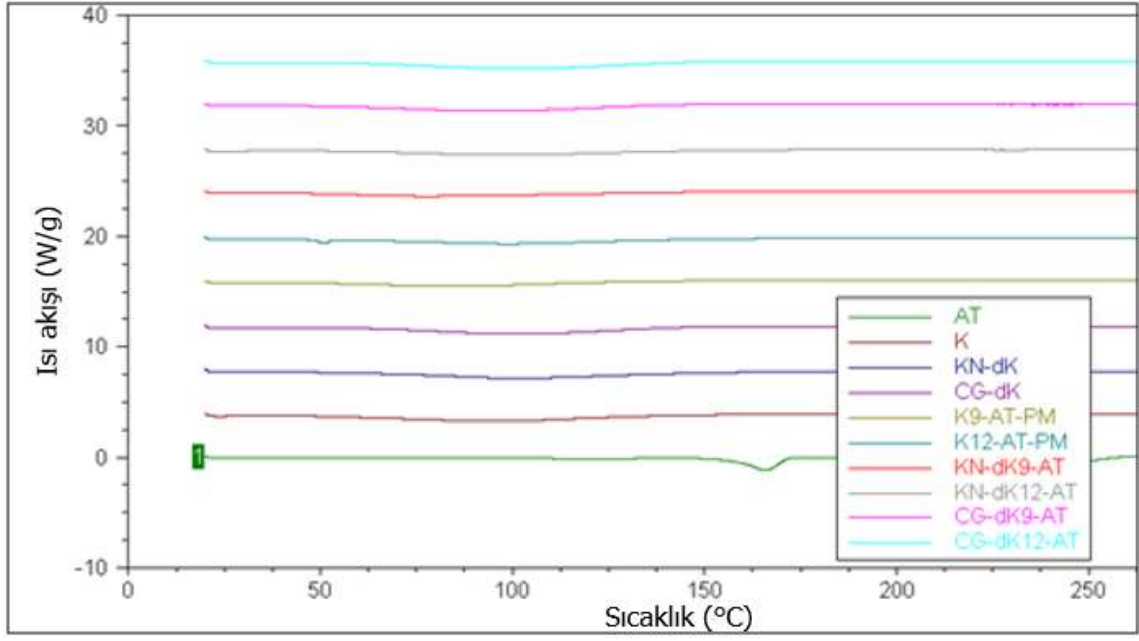


b)





c)



Şekil 4.7. Farklı polimerler: a) PEG 6000; b) Pluronik F-68; c) baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait DSC termogramları

**Tablo 4.5.** Fiziksel karışım ve katı dispersiyonların erime noktalarının karşılaştırılması

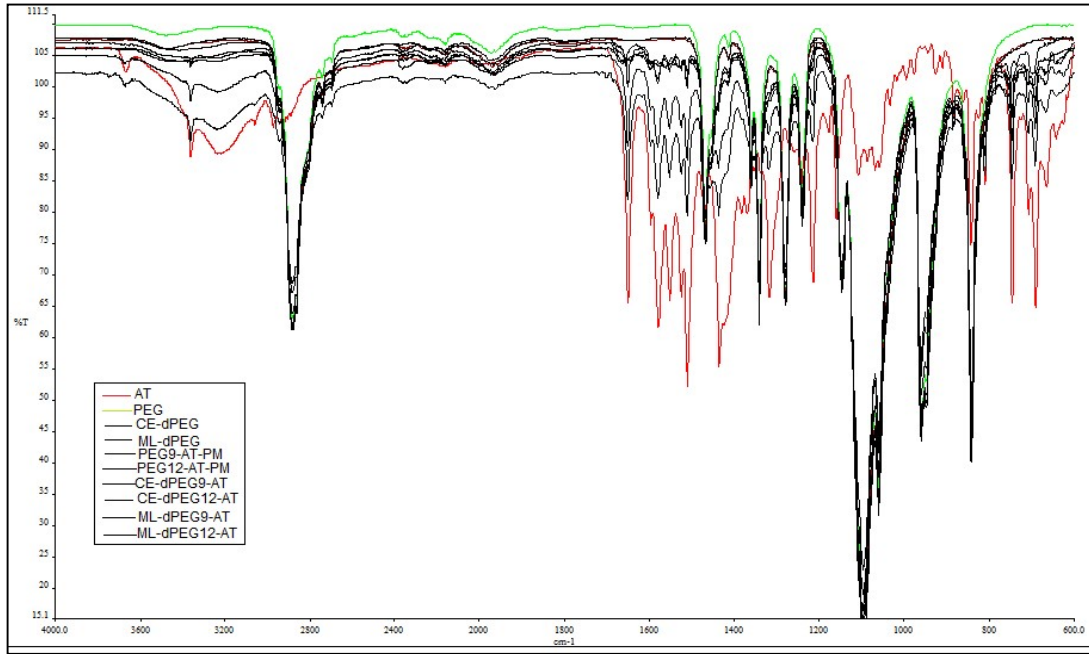
Kod	Sıcaklık (°C)
AT	165
PEG	62
CE-dPEG	62,5
ML-dPEG	62,5
PEG9-AT-PM	62,5
PEG12-AT-PM	62
CE-dPEG9-AT	61
ML-dPEG9-AT	63
CE-dPEG12-AT	61
ML-dPEG12-AT	63
PL	56
CE-dPL	55
ML-dPL	55
PL9-AT-PM	55
PL12-AT-PM	55
CE-dPL9-AT	53
ML-dPL9-AT	55
CE-dPL12-AT	53
ML-dPL12-AT	55
K	100
KN-dK	100
CG-dK	100
K9-AT-PM	80
K12-AT-PM	100
KN-dK9-AT	80
CG-dK9-AT	100
KN-dK12-AT	100
CG-dK12-AT	100

### **Fourier Transform İnfrared Spektroskopi (FT-IR) Ölçümleri**

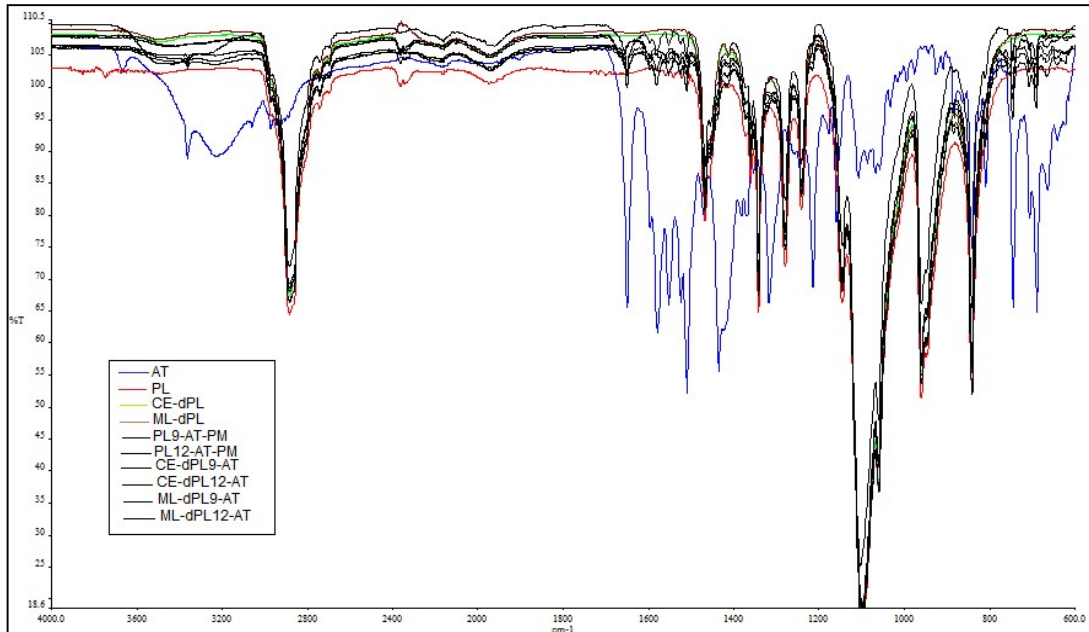
FT-IR çalışmaları ile katı dispersiyonlarda etkin madde ve polimer arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Atorvastatine ait IR spektrumunda, 3670.7 cm<sup>-1</sup>'de O-H gerilme bandı, 3361.8 cm<sup>-1</sup>'de N-H gerilme bantları, 3220.4 cm<sup>-1</sup>'de asimetrik O-H gerilme bandı, 1649.7 cm<sup>-1</sup>'de karboksilli asit yapısında yer alan C=O bağına ait gerilme bandı, 1578.9 cm<sup>-1</sup>'de amit yapısında yer alan C=O bağına ait gerilme bandı, 1242.1 cm<sup>-1</sup>'de C-N gerilme bantları elde edilmiştir. Şekil 4.8.'de atorvastatin, PEG 6000, Pluronik

F-68, baz kitosan ile birlikte fiziksel karışım ve katı dispersiyonlara ait FT-IR spektrumları verilmiştir. Fiziksel karışımlarda ve katı dispersiyonlarda atorvastatine ait karakteristik bantların kaybolduğu görülmüştür (Tablo 4.6-4.8).

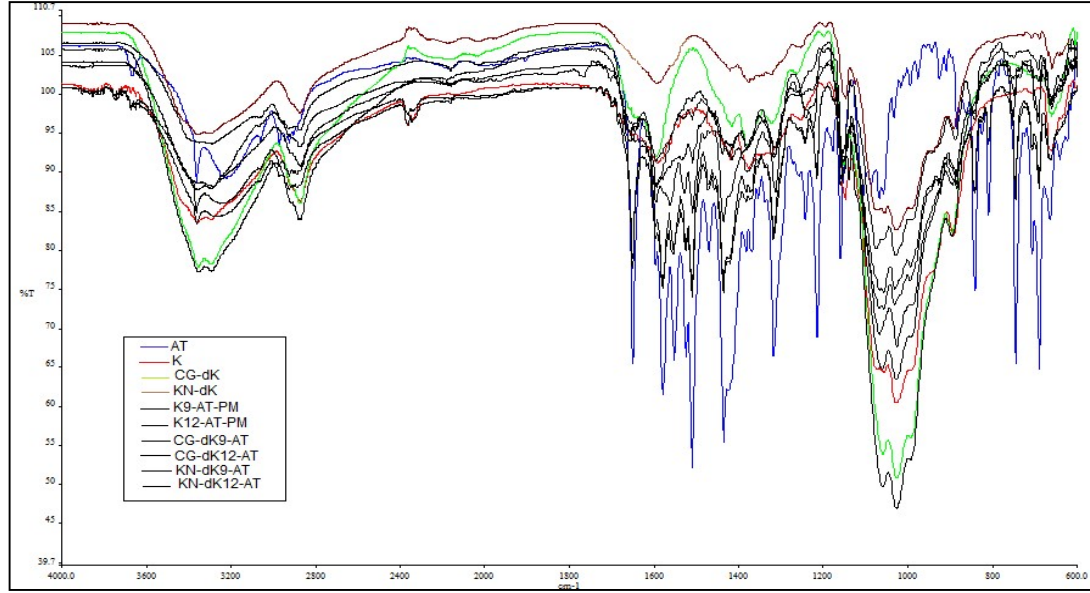
a)



b)



c)



**Şekil 4.8.** Farklı polimerler: a) PEG 6000; b) Pluronic F-68; c) baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait FT-IR Spektrumları

**Tablo 4.6.** PEG ile hazırlanan katı dispersiyonlarının FT-IR spektrumlarında elde edilen karakteristik bantlar

Kodlar	O-H (3670.7 cm <sup>-1</sup> )	N-H (3361.8 cm <sup>-1</sup> )	Asim. O-H (3220.4cm <sup>-1</sup> )	C=O (asim.) (1649.7 cm <sup>-1</sup> )	C=O (simetrik) (1578.9 cm <sup>-1</sup> )	C-N (1242.1 cm <sup>-1</sup> )	C-H (2882.7 cm <sup>-1</sup> )	C-O (1094.8 cm <sup>-1</sup> )
AT	+	+	+	+	+	+	-	-
PEG	-	-	-	-	-	+	+	+
CE-dPEG	-	-	-	-	-	+	+	+
ML-dPEG	-	-	-	-	-	+	+	+
PEG9-AT-PM	-	+	-	+	+	+	+	+
PEG12-AT-PM	-	+	-	+	+	+	+	+
CE-dPEG9-AT	-	-	-	-	-	+	+	+
ML-dPEG9-AT	-	-	-	+	+	+	+	+
CE-dPEG12-AT	-	-	-	-	-	+	+	+
ML-dPEG12-AT	-	-	-	+	+	+	+	+

**Tablo 4.7.** Pluronik F-68 ile hazırlanan katı dispersiyonlarının FT-IR spektrumlarında elde edilen karakteristik bantlar

Kodlar	O-H (3670.7 cm <sup>-1</sup> )	N-H (3361.8 cm <sup>-1</sup> )	Asim. O-H (3220.4 cm <sup>-1</sup> )	C=O (asim.) (1649.7 cm <sup>-1</sup> )	C=O (simetrik) (1578.9 cm <sup>-1</sup> )	C-N (1242.1 cm <sup>-1</sup> )	C-H (2881.9 cm <sup>-1</sup> )	C-O (1098.2 cm <sup>-1</sup> )
AT	+	+	+	+	+	+	-	-
PL	-	-	-	-	-	+	+	+
CE-dPL	-	-	-	-	-	+	+	+
ML-dPL	-	-	-	-	-	+	+	+
PL9-AT-PM	-	+	-	+	+	+	+	+
PL12-AT-PM	-	+	-	+	+	+	+	+
CE-dPL9-AT	-	-	-	-	-	+	+	+
ML-dPL9-AT	-	-	-	+	+	+	+	+
CE-dPL12-AT	-	-	-	-	-	+	+	+
ML-dPL12-AT	-	-	-	+	+	+	+	+

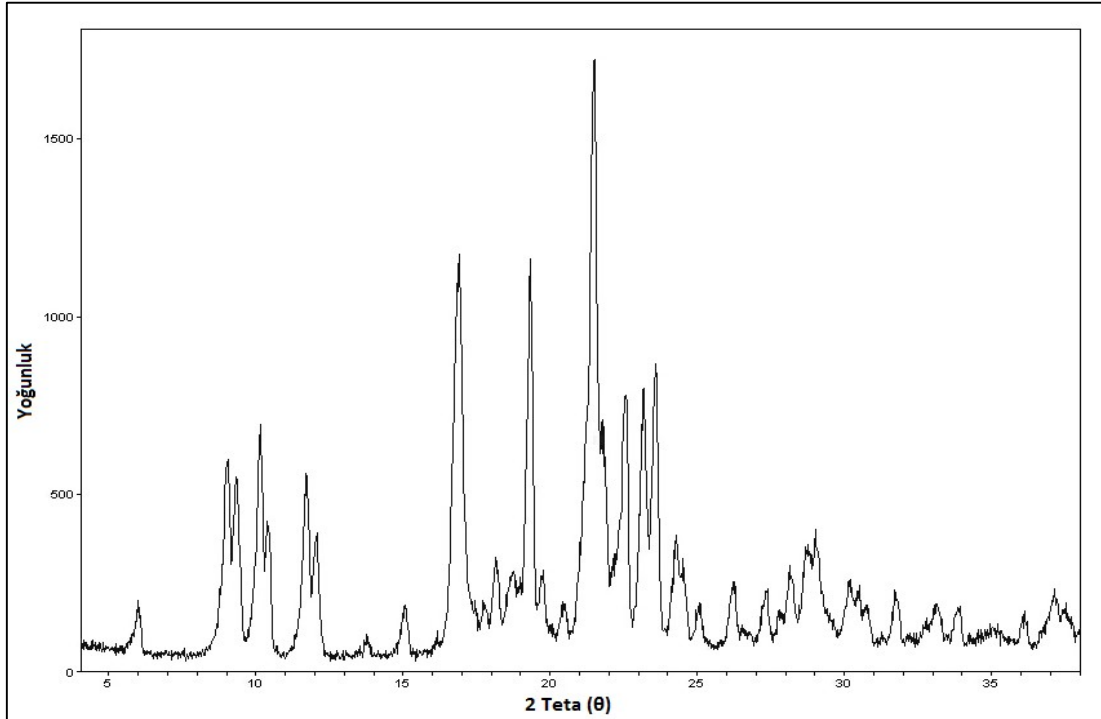
**Tablo 4.8.** Baz kitosan ile hazırlanan katı dispersiyonlarının FT-IR spektrumlarında elde edilen karakteristik bantlar

Kodlar	O-H (3670.7 cm <sup>-1</sup> )	N-H (3361.8 cm <sup>-1</sup> )	Asim. O-H (3220.4 cm <sup>-1</sup> )	C=O (asim.) (1649.7 cm <sup>-1</sup> )	C=O (simetrik) (1578.9 cm <sup>-1</sup> )	C-N (1242.1 cm <sup>-1</sup> )	O-H (3356.6 cm <sup>-1</sup> ) (gerilme titreşimi)	N-H (1591.5 cm <sup>-1</sup> ) (bükülme titreşimi)
AT	+	+	+	+	+	+	-	-
K	-	-	-	-	-	-	+	+
KN-dK	-	-	-	-	-	-	+	+
CG-dK	-	-	-	-	-	-	+	+
K9-AT-PM	-	+	-	+	+	+	-	-
K12-AT-PM	-	+	-	+	+	+	-	-
KN-dK9-AT	-	-	+	-	-	-	-	+
CG-dK9-AT	-	-	-	-	-	-	+	+
KN-dK12-AT	-	-	+	-	-	-	-	+
CG-dK12-AT	-	-	-	-	-	-	+	+

Polimer oranında artışın FT-IR üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında, PEG ve Pluronik için, birlikte buharlaştırma yönteminde atorvastatine ait tüm karakteristik pikler kaybolurken, eritme yönteminde ise karbonil (C=O) bağına ait bandın kaldığı gözlenmiştir. Baz kitosan içinse atorvastatine ait tüm karakteristik pikler kaybolduğu gözlenmiştir. Yoğurma yönteminde asimetrik hidroksil (O-H) bağına ait bandın kaldığı gözlenmiştir. Fiziksel karışımlarda ise asimetrik hidroksil bandı dışında atorvastatine ait tüm karakteristik bantlar gözlenmiştir.

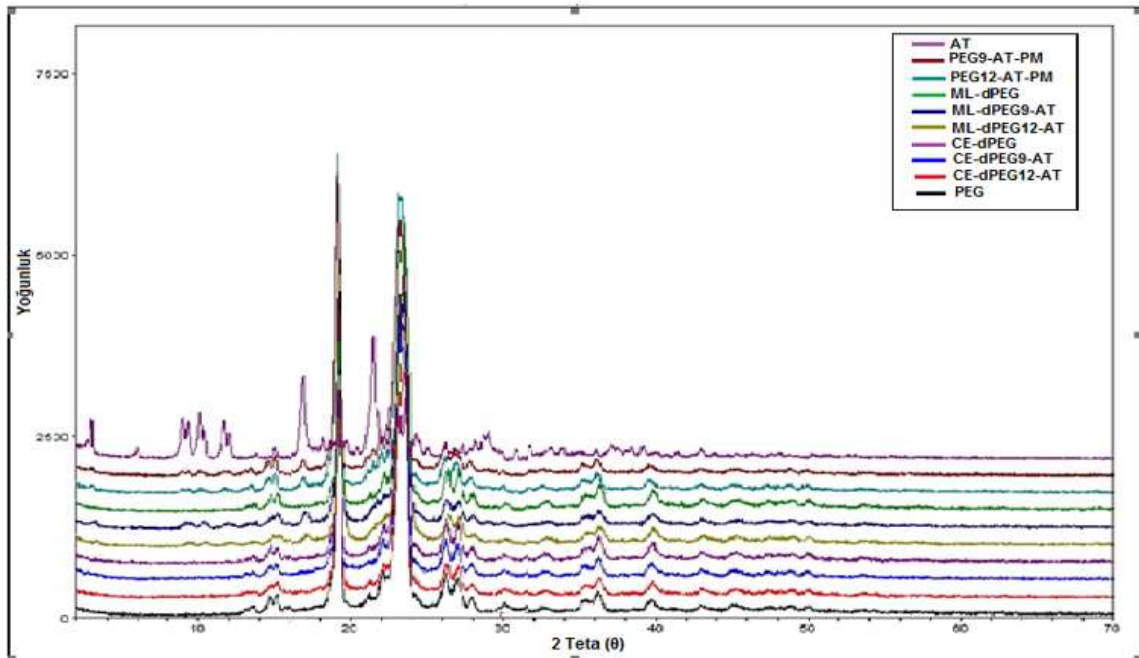
### X-ışını Kırınım (XRD) Ölçümleri

X-ışını kırınım çalışmaları, katı dispersiyonların kristal yapısını incelemek amacıyla yapılmıştır. Atorvastatin için, literatürle uyumlu şekilde [7],  $2\theta$ 'da  $3.00^\circ$ ,  $9.08^\circ$ ,  $9.36^\circ$ ,  $10.18^\circ$ ,  $10.42^\circ$ ,  $11.74^\circ$ ,  $12.11^\circ$ ,  $16.94^\circ$ ,  $19.36^\circ$ ,  $21.54^\circ$ ,  $22.62^\circ$ ,  $23.22^\circ$ ,  $23.60^\circ$  açılarında yüksek kristal özelliğini yansıtan dar ve yoğun miktarda karakteristik difraksiyon pikleri elde edilmiştir (Şekil 4.9). Fiziksel karışımlarda ve katı dispersiyonlarda atorvastatine ait yoğun piklerin kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10). Bu durum atorvastatinin kristal formdan amorf forma geçtiğini göstermektedir. Bu sonuçlar DSC çalışmaları ile uyum sağlamaktadır.

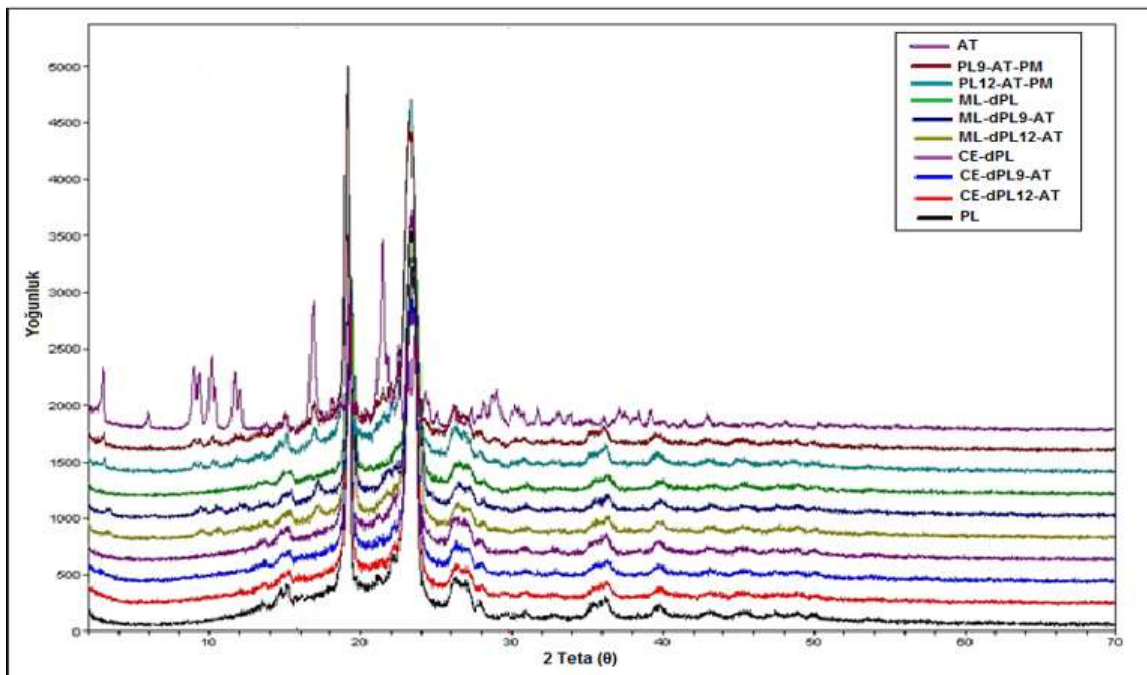


**Şekil 4.9.** Atorvastatine ait X-ışını difraksiyon deseni

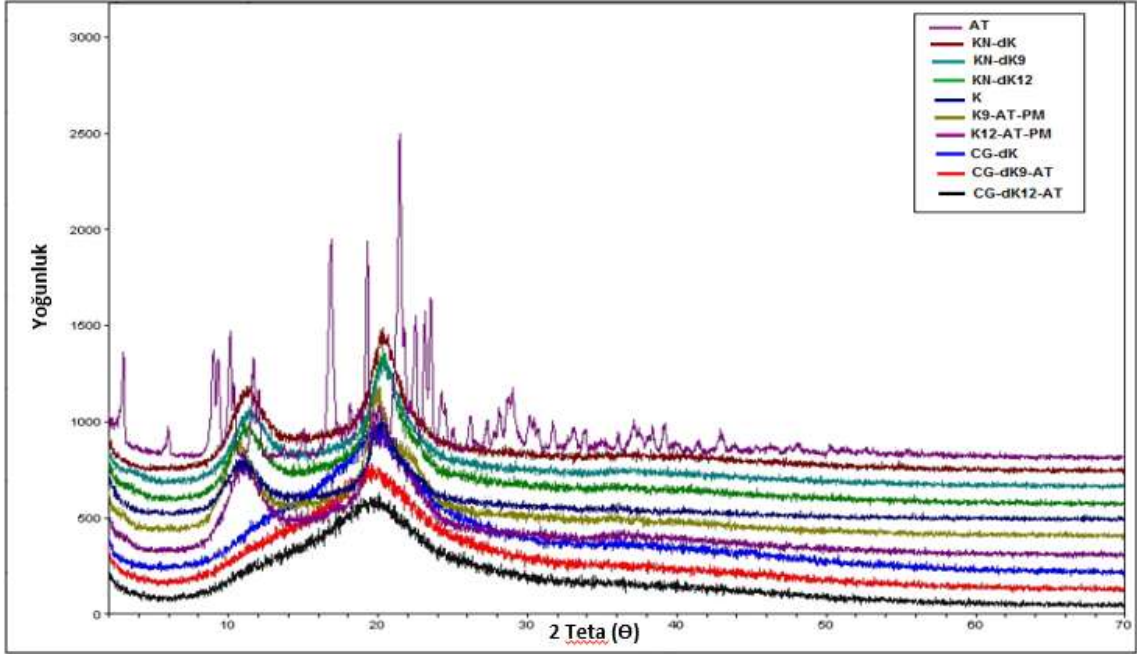
a)



b)



c)



**Şekil 4.10.** Farklı polimerler: a) PEG 6000; b) Pluronic F-68; c) baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait X-ışını kırınımı

Polimer oranında artış ve hazırlama yönteminin X-ışını kırınımı ile elde edilen desenler üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür.

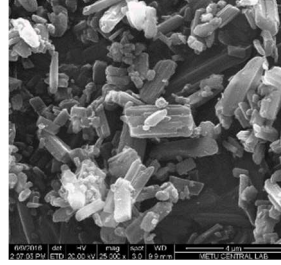
### **Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Çalışmaları**

SEM analizi ile etkin madde, polimer, bunların fiziksel karışımları ve katı dispersiyonlarının yüzey özellikleri incelenmiştir. Atorvastatin kristal yapıda düzenli çubuk şeklinde bir yapıda (Şekil 4.11) iken polimerlerin düzensiz bir yapıya sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.12-4.14a).

Fiziksel karışımlara ait şekillerde (4.12-4.14, d-e) atorvastatin kristallerinin fiziksel olarak polimerler üzerine tutunduğu gözlenirken katı dispersiyon karışımlarında (Şekil 4.12-4.14, f-ı) atorvastatinin düzenli kristal yapısına rastlanmamış ve düzensiz şekilli partiküller elde edilmiştir. Bu durum etkin madde ve polimer arasındaki etkileşimi göstermektedir ve bu etkileşim sonucu atorvastatin kristal yapısını kaybetmiştir.

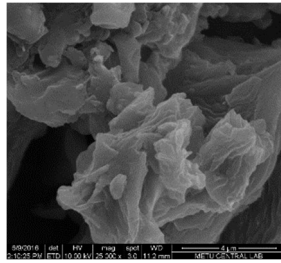


a) AT

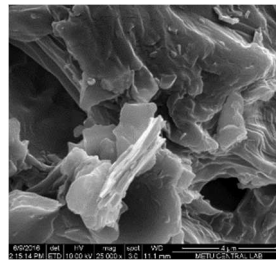


Şekil 4.11. Atorvastatine ait SEM mikrografları (x25.000)

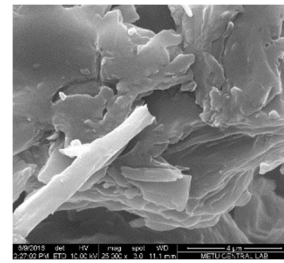
a) PEG



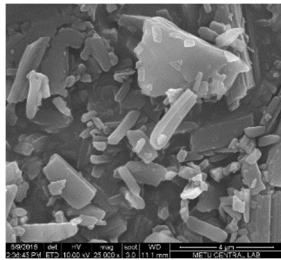
b) ML-dPEG



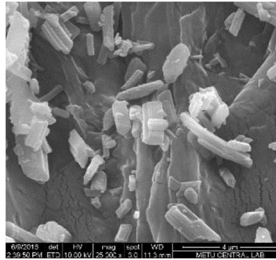
c) CE-dPEG



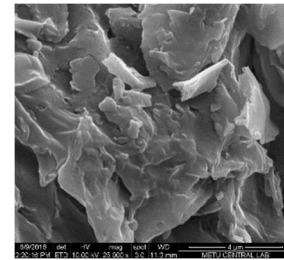
d) PEG9-AT-PM



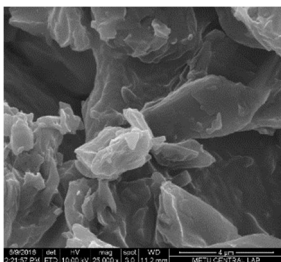
e) PEG12-AT-PM



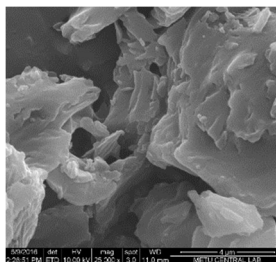
f) ML-dPEG9-AT



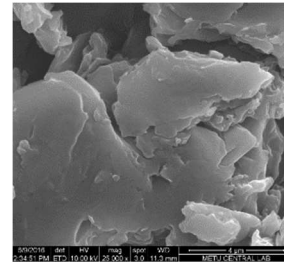
g) ML-dPEG12-AT



h) CE-dPEG9-AT

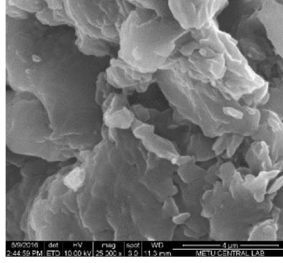


i) CE-dPEG12-AT

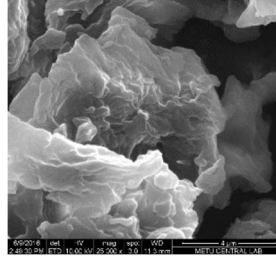


Şekil 4.12. PEG 6000 ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait SEM mikrografları (x25.000)

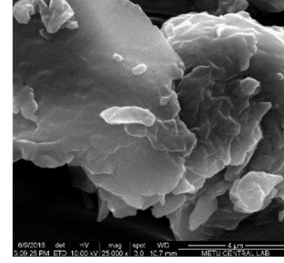
a) PL F-68



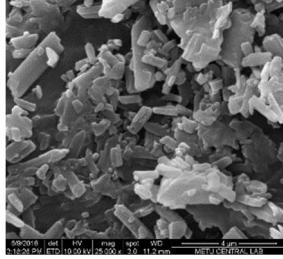
b) ML-dPL



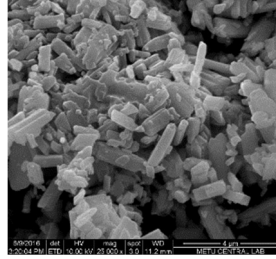
c) CE-dPL



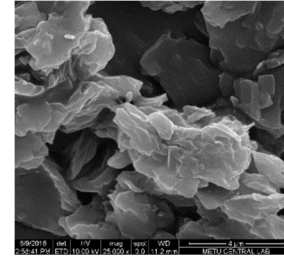
d) PL9-AT-PM



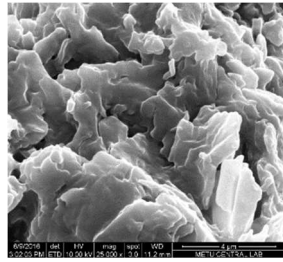
e) PL12-AT-PM



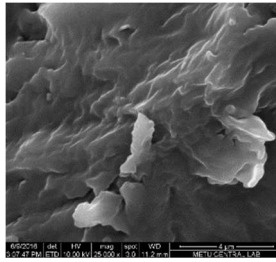
f) ML-dPL9-AT



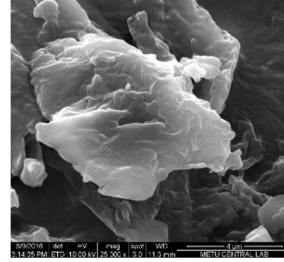
g) ML-dPL12-AT



h) CE-dPL9-AT

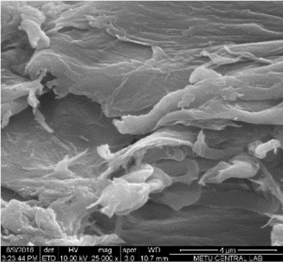


i) CE-dPL12-AT

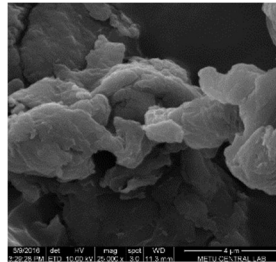


**Şekil 4.13.** Pluronik F-68 ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait SEM mikrografları (x25.000)

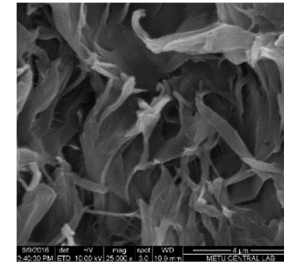
a) Kitosan

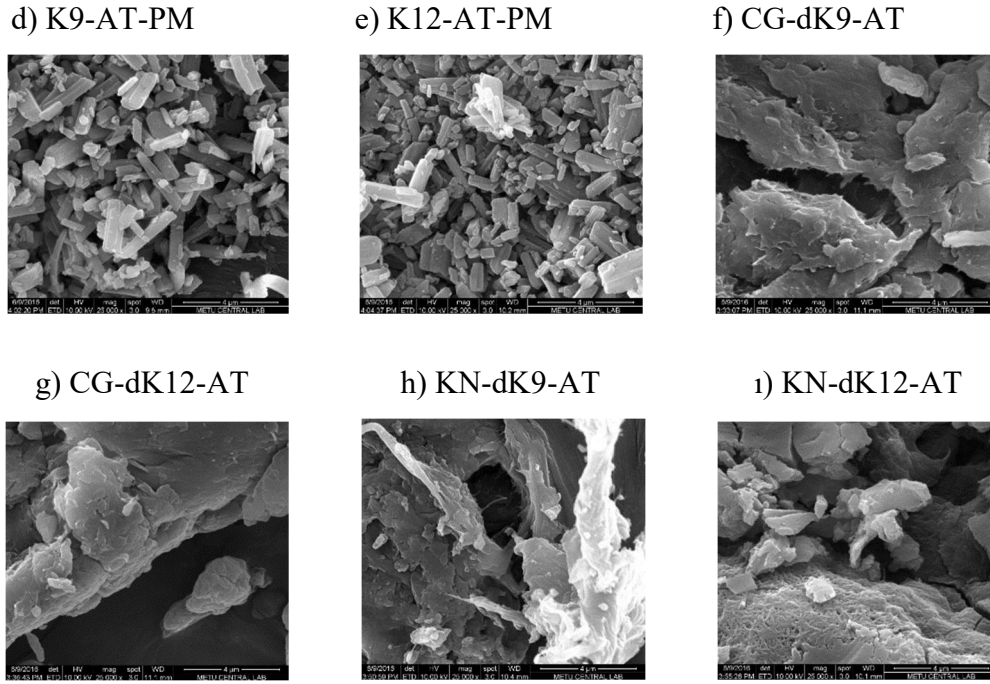


b) CG-dK



c) KN-dK





**Şekil 4.14.** Baz kitosan ile hazırlanan AT katı dispersiyonlarına ait SEM mikrografları (x25.000)

#### 4.2.2. Jel formülasyonları

- Atorvastatin içeren jel formülasyonları
- Katı dispersiyon halinde atorvastatin içeren jel formülasyonları

#### Formülasyonlar Üzerinde Yapılan İn Vitro Çalışma Sonuçları

##### Viskozite Ölçümü

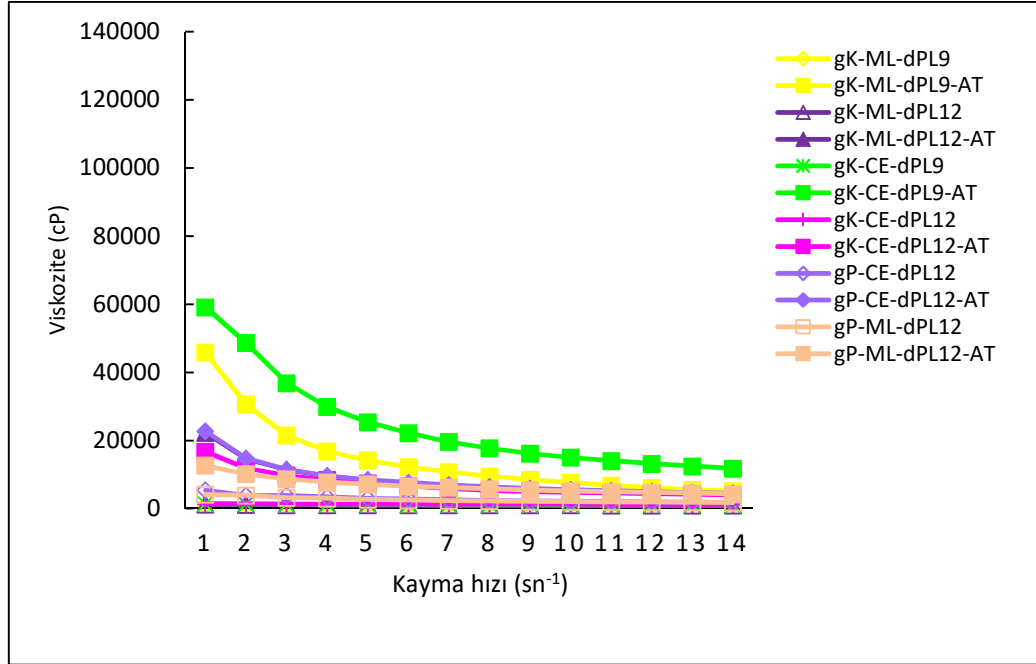
Jel formülasyonları ve Atorvastatin ve PEG 6000, Pluronic F-68, Baz kitosan polimerleri kullanılarak hazırlanan katı dispersiyonlardan hareketle hazırlanan jel formülasyonlarının viskozite değerleri Tablo 4.9.'da verilmiştir. Hazırlanan formülasyonların akış profilleri Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da verilmiştir. Formülasyonların viskoziteleri periodontal cebe uygulama için uygun olduğu görülmüştür.

**Tablo 4.9.** Formülasyonların viskozite değerleri ( $25 \pm 0.1$  °C) (n=3)

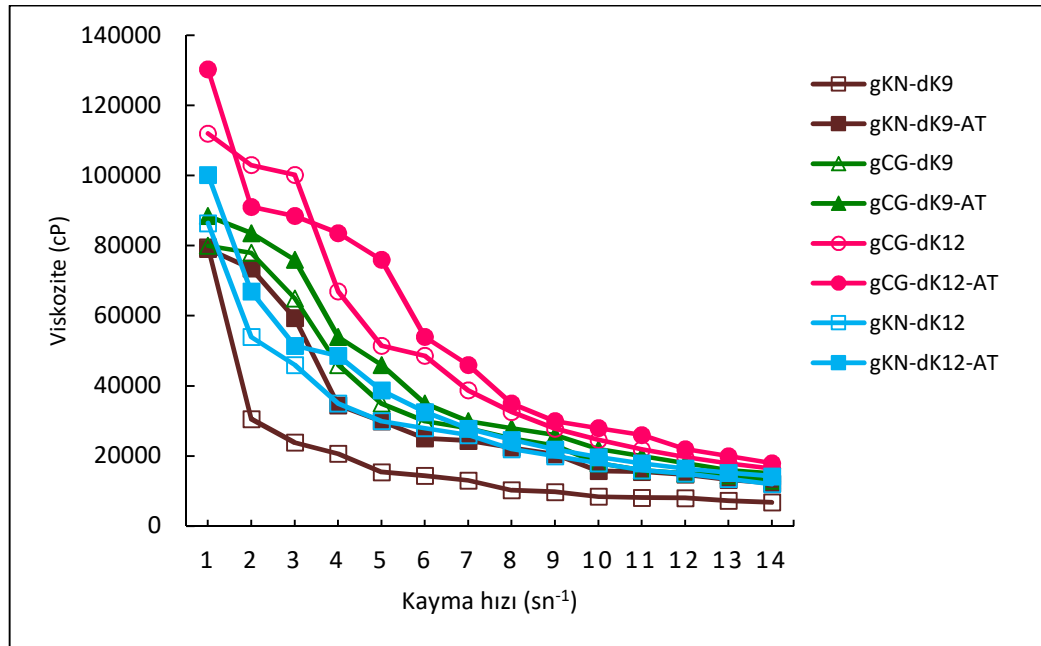
<b>Formülasyon kodu</b>	<b>Viskozite (cP)± Std Sapma</b>
gK-ML-dPEG9	881±2,3
gK-ML-dPEG9-AT	9657±2,9
gK-ML-dPEG12	1124±2,2
gK-ML-dPEG12-AT	12845±2,7
gK-CE-dPEG9	870±1,7
gK-CE-dPEG9-AT	2394±3,9
gK-CE-dPEG12	848±2,6
gK-CE-dPEG12-AT	6191±4,8
gP-CE-dPEG12	836±2,2
gP-CE-dPEG12-AT	5384±3,2
gP-ML-dPEG12	1049±1,6
gP-ML-dPEG12-AT	8321±2,4
gK-ML-dPL9	1111±3,1
gK-ML-dPL9-AT	14208±5,1
gK-ML-dPL12	1075±1,8
gK-ML-dPL12-AT	8347±2,1
gK-CE-dPL9	1230±4,1
gK-CE-dPL9-AT	25413±5,2
gK-CE-dPL12	1319±2,4
gK-CE-dPL12-AT	7487±3,3
gP-CE-dPL12	3042±2,5
gP-CE-dPL12-AT	8519±2,5
gP-ML-dPL12	2679±4,3
gP-ML-dPL12-AT	7156±4,8
gKN-dK9	15412±3,5
gKN-dK9-AT	29959±6,3
gCG-dK9	35364±2,3
gCG-dK9-AT	46000±5,4
gKN-dK12	32472±4,6
gKN-dK12-AT	38735±4,6
gCG-dK12	51462±5,3
gCG-dK12-AT	76428±3,9
PEG 400	104,6±2,1
gK	243,3±3,5
gP	295,0±1,4
PEG 400-AT	178,0±2,2
gK-AT	1692,7±3,1
gP-AT	1488±1,7



b)



c)



Şekil 4.16. AT katı dispersiyonları içeren jel formülasyonların viskozite eğrileri (n=3)

Katı dispersiyonlarda polimer oranının artmasıyla, formülasyonların viskozitelerinin arttığı görülmüştür (Tablo 4.9). Baz kitosan ile hazırlanan katı dispersiyonlarla hazırlanan kitosan jellerin viskozitesi en yüksek bulunurken, PEG ile hazırlananların ise en düşük bulunmuştur.

Farklı yöntem ile hazırlanan katı dispersiyonların kitosan ile birleştirildiğinde farklı özellikler gösterdiği görülmüştür. Yoğurma ve birlikte öğütme ile hazırlanan katı dispersiyonlar kitosan jel ile karıştırıldığında, diğer yöntemle hazırlananlara göre daha yüksek viskozite değerleri elde edilmiştir. Yoğurma yöntemiyle 1:12 (etkin madde:polimer) oranında hazırlanan atorvastatin:baz kitosan katı dispersiyonun, sadece %1 laktik asit çözeltisi içinde disperse edilmesi ile elde edilen formülasyonun viskozite değeri  $76428 \pm 3,9$  cP olarak bulunmuştur. Yani, kitosan ile hazırlanan katı dispersiyonlarının doğrudan laktik asit içinde disperse edilmesi mümkün olmuştur.

PEG ile eritme yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyon formülasyonlarının baz kitosan jel içindeki viskoziteleri, birlikte buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyon formülasyonlarının baz kitosan jel içindeki viskozitelerinden yüksek bulunmuştur (eritme yöntemiyle:  $9657 \pm 2,9$ cP; buharlaştırma yöntemiyle  $2394 \pm 3,9$  cP). Pluronik ile hazırlanan katı dispersiyonlar+kitosan jel formülasyonların viskozitesine bakıldığında, hazırlama yönteminin viskozite üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür.

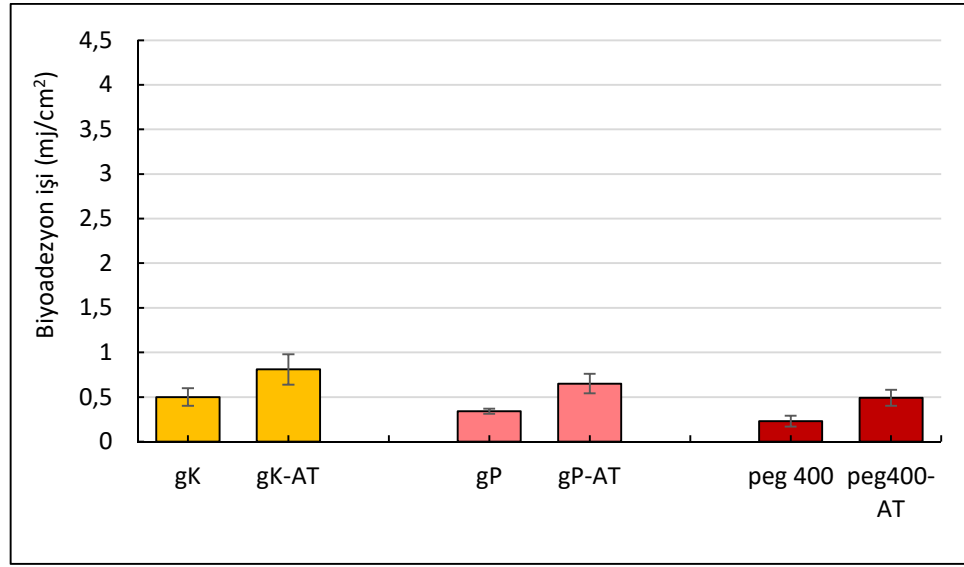
### **Biyoadezyon Çalışmaları**

Jel formülasyonlarına ve Atorvastatin:baz kitosan Atorvastatin:PEG 6000, Atorvastatin:Pluronik F-68 katı dispersiyonlarından hareketle hazırlanan jellere ait biyoadezyon sonuçları Tablo 4.10'da, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

**Tablo 4. 10.** Jel formülasyonlarının biyoadezyon özellikleri (n=3)

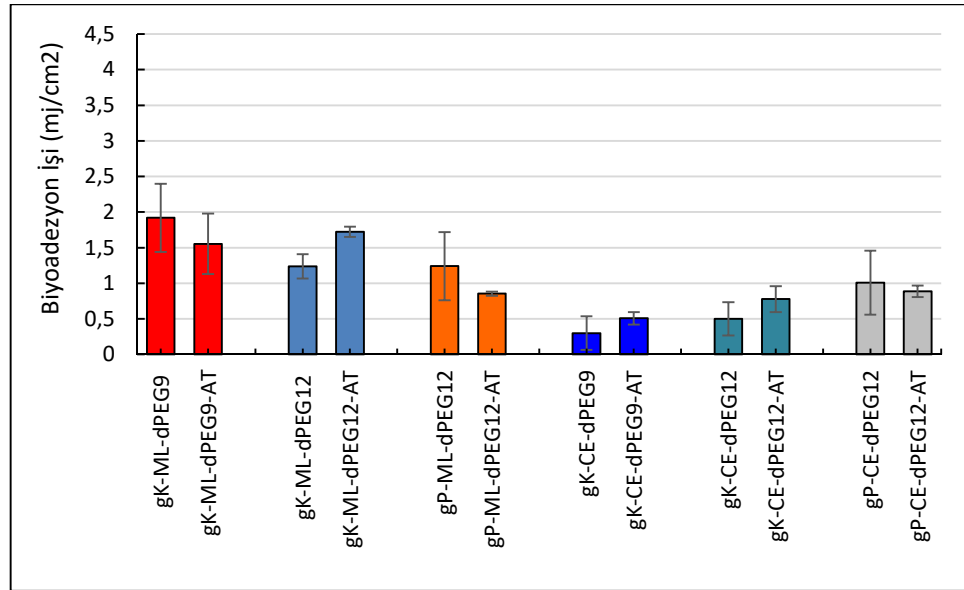
<b>Formülasyon kodu</b>	<b>Biyoadezyon işi (mJ/cm<sup>2</sup>) ± SD</b>
gK-ML-dPEG9	0,799±0,47
gK-ML-dPEG9-AT	1,553±0,42
gK-ML-dPEG12	1,237±0,16
gK-ML-dPEG12-AT	1,721±0,07
gP-ML-dPEG12	1,241±0,47
gP-ML-dPEG12-AT	0,853±0,03
gK-CE-dPEG9	0,327±0,23
gK-CE-dPEG9-AT	0,508±0,08
gK-CE-dPEG12	0,556±0,23
gK-CE-dPEG12-AT	0,776±0,18
gP-CE-dPEG12	1,007±0,45
gP-CE-dPEG12-AT	0,885±0,08
gK-ML-dPL9	1,140±0,46
gK-ML-dPL9-AT	2,782±0,24
gK-ML-dPL12	0,832±0,25
gK-ML-dPL12-AT	2,040±0,80
gP-ML-dPL12	1,457±0,61
gP-ML-dPL12-AT	1,479±0,60
gK-CE-dPL9	0,841±0,12
gK-CE-dPL9-AT	3,276 ±0,93
gK-CE-dPL12	1,203±0,31
gK-CE-dPL12-AT	2,195±0,23
gP-CE-dPL12	1,457±0,08
gP-CE-dPL12-AT	1,162±0,27
gP-CE-dPEG12-AT	0,885±0,08
gP-ML-dPL12-AT	1,479±0,60
gP-ML-dPEG12-AT	0,853±0,03
gKN-dK9	0,635±0,10
gKN-dK9-AT	0,820±0,24
gKN-dK12	0,441±0,05
gKN-dK12-AT	0,056±0,05
gCG-dK9	0,784±0,33
gCG-dK9-AT	0,940±0,20
gCG-dK12	0,336±0,16
gCG-dK12-AT	0,102±0,09
PEG 400	0,23 ± 0,06
gK	0,50 ± 0,10
gP	0,34 ± 0,03
PEG 400-AT	0,49 ± 0,09
gK-AT	0,81 ± 0,11
gP-AT	0,65 ± 0,17



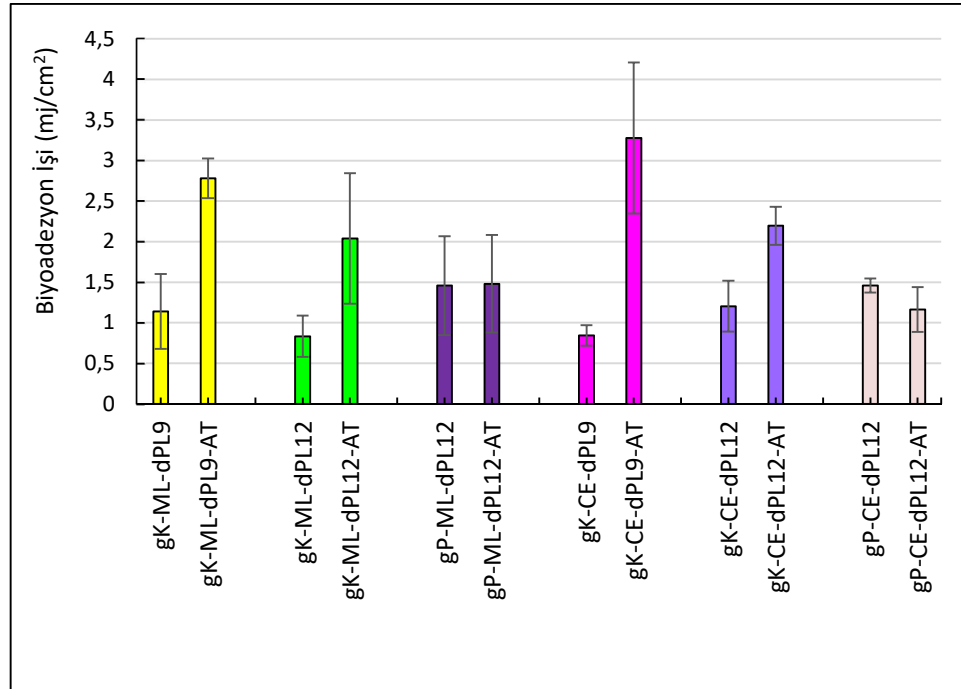


Şekil 4.17. Jel formülasyonlarının biyoadazyon özellikleri  $\pm$  SS (n=3)

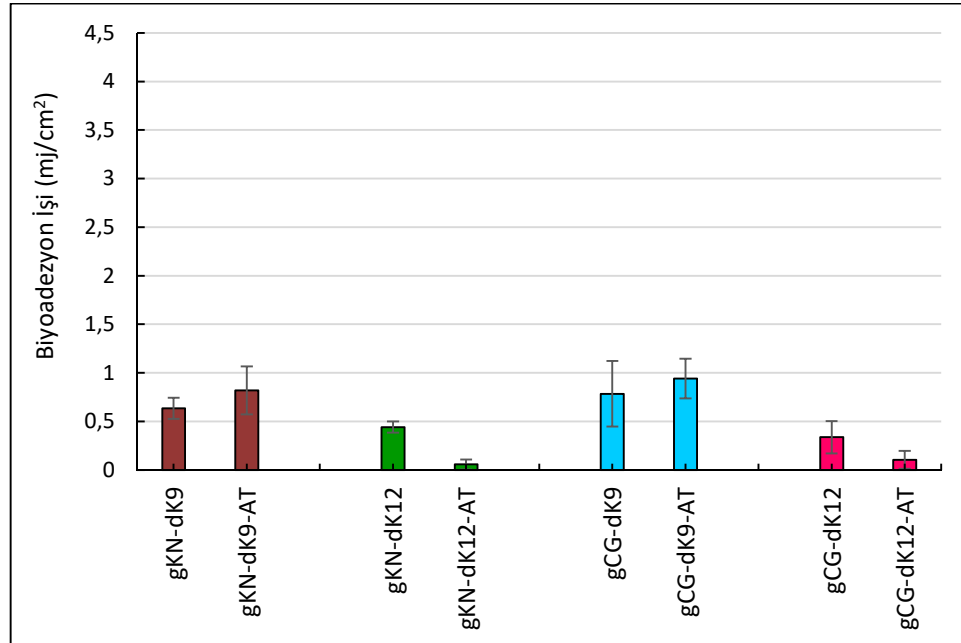
a)



b)



c)



Şekil 4.18. AT katkı dispersiyonları içeren formülasyonların biyoadezyon özellikleri  $\pm$  SS (n=3)

Katı dispersiyonlarda polimer oranı artıkça kitosan jel ile birleştirme zorlaşmıştır. Özellikle kitosana hazırlanan katı dispersiyonlarda kitosan oranı artırıldığında (1:9 ve 1:12), kıvamlı bir kütle elde edildiği için ayrıca kitosan jel içine eklenmeyip sadece %1 laktik asit içinde disperse edilmiştir. Ancak bu durumda biyoadezyon değerinin kitosan jel ile hazırlananlara göre daha düşük olduğu görülmüştür: Atorvastatin+Baz kitosan jel'in biyoadezyon iş değeri  $0.81 \pm 0,11$  mJ/cm<sup>2</sup>; Atorvastatin+Baz kitosan dispersiyonlar (1:12) için biyoadezyon iş değerleri, öğütme yöntemi:  $0.102 \pm 0,09$  mJ/cm<sup>2</sup>; yoğurma yöntemi:  $0.056 \pm 0,05$  mJ/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur.

Biyoadezyon en yüksek Pluronik F-68 ile birlikte buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyon (1:9)+ kitosan jel formülasyonlarında elde edilmiştir ( $3,276 \pm 0,93$  mJ/cm<sup>2</sup>). Pluronik F-68 ile hazırlanan katı dispersiyonlar için polimer oranı artıkça, jel ile birleştirildiğinde biyoadezyon özeliğın azaldığı görülmüştür. 1:12 oranında hazırlanan formülasyonda biyoadezyon iş değeri  $2,196 \pm 0,23$  mJ/cm<sup>2</sup> bulunmuştur. Farklı yöntem kullanılarak hazırlanan Pluronik F-68 katı dispersiyonlar+jel formülasyonlarının biyoadezyonlarında fark bulunmuştur: 1:12 oranda eritme yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyon+ kitosan jel formülasyonlarında biyoadezyon iş değeri  $2,040 \pm 0,80$  mJ/cm<sup>2</sup>; 1:9 oranında hazırlanan formülasyon için:  $2,782 \pm 0,24$  mJ/cm<sup>2</sup> bulunmuştur.

PEG 6000 ile hazırlanan katı dispersiyonların baz kitosan jel formülasyonları içindeki adeziv özelliklerinin ise artan polimer oranından bağımsız olduğu gözlenmiştir. Hazırlama yönteminin ise biyoadezyon özellik üzerine etkili olduğu görülmüştür (1:12 oranda eritme yöntemi ile hazırlanan:  $1,721 \pm 0,07$  mJ/cm<sup>2</sup>; birlikte buharlaştırma:  $0,776 \pm 0,18$  mJ/cm<sup>2</sup>).

### **Sırınga Edilebilirlik Çalışmaları**

Formülasyonlar için elde edilen şırınga edilebilirlik işi değerleri Tablo 4.11'de ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir. İlaç varlığında FT-IRlılık işinin (WS) arttığı gözlenmiştir (PEG ile hazırlanan katı dispersiyonda (1:12) WS değeri:  $254,22 \pm 0,40$  N.mm; PL F-68 ile

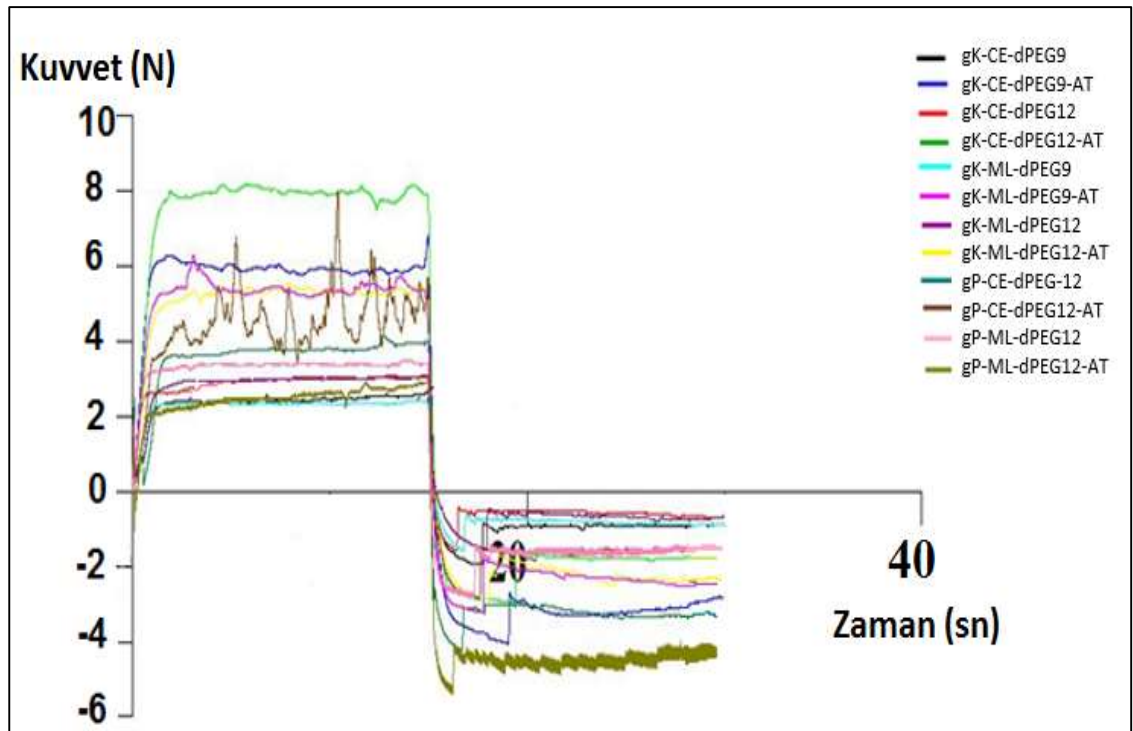
hazırlanan katı dispersiyonda (1:12) WS değeri:  $134,19 \pm 0,24$  N.mm; baz kitosan ile hazırlanan katı dispersiyonda (1:12) WS değeri:  $370,74 \pm 0,73$  N.mm). Diğer bir deyişle, jel formülasyonlarını enjektörden itebilmek için daha fazla kuvvete gerek olduğu saptanmıştır. Baz kitosan ile hazırlanan katı dispersiyonlarla hazırlanan kitosan jellere ait değerler en yüksek bulunurken, Pluronik F-68 ile hazırlananlar en düşük bulunmuştur (Tablo 4.10.). Polimer oranı artıkça şırınga edilebilirliğin azaldığı gözlenmiştir (PEG ile hazırlanan katı dipersiyonlarda WS değerleri 1:9 ve 1: 12 için sırasıyla,  $197,52 \pm 0,37$  N.mm ve  $254,22 \pm 0,4$  N.mm; PL F-68 ile hazırlanan katı dipersiyonlarda WS değerleri 1:9 ve 1: 12 için sırasıyla,  $109,62 \pm 0,09$  N.mm ve  $134,19 \pm 0,24$  N.mm; baz kitosan ile hazırlanan katı dipersiyonlarda WS değerleri 1:9 ve 1: 12 için sırasıyla,  $291,71 \pm 0,04$  N.mm ve  $326,35 \pm 0,13$  N.mm).

Farklı hazırlama yöntemleri göz önüne alındığında ise, PEG ile hazırlanan katı dispersiyon içeren jellerin şırınga edilebilirlik özelliği üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. göz önüne alındığında, Pluronik F-68 ile eritme yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyonların baz kitosan jel içindeki şırınga edilebilirlik işi verisi, birlikte buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyonların baz kitosan jel içindeki şırınga edilebilirlik işinden yüksek bulunmuştur (1:12 etkin madde:polimer oranında eritme yöntemiyle:  $134,19 \pm 0,24$  N.mm; buharlaştırma yöntemiyle  $115,53 \pm 0,18$  N.mm). PEG ile hazırlanan katı dispersiyonlar+kitosan jel formülasyonların viskozitesine bakıldığında, şırınga edilebilirlik özelliğinin hazırlama yöntemine bağlı olmadığı görülmüştür.

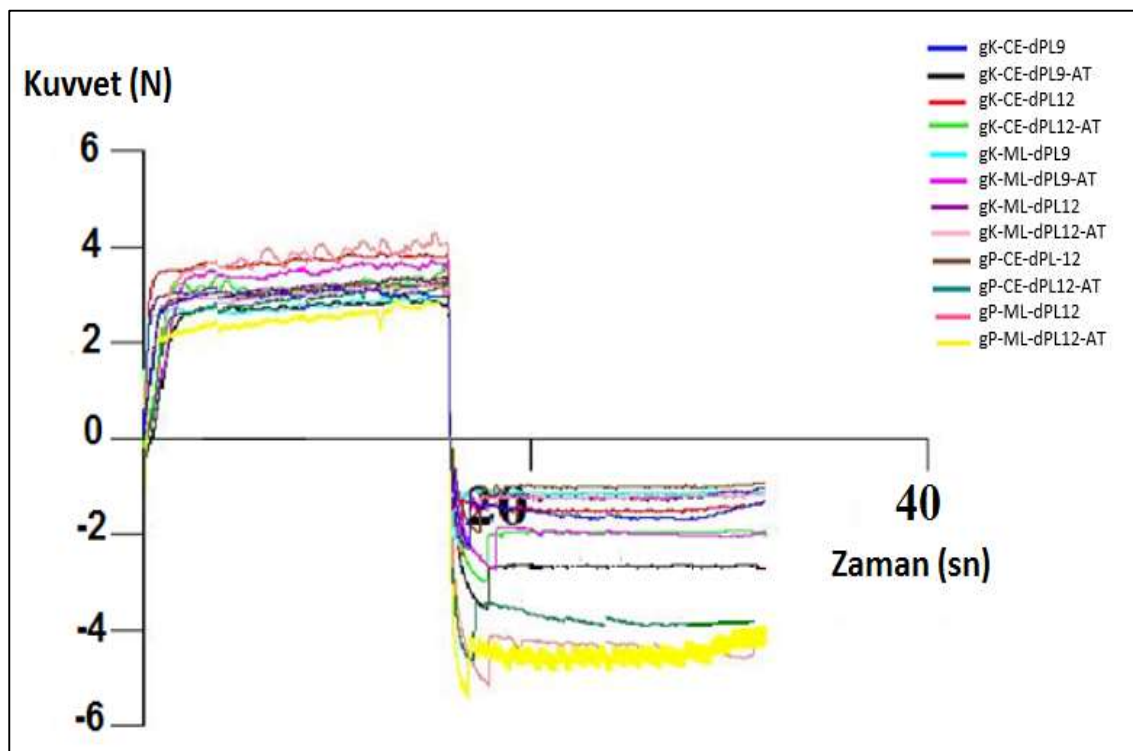
PEG ve Pluronik ile hazırlanan katı dispersiyonların baz kitosan jel içindeki formülasyonlarının şırınga edilebilirlik özelliklerine ait değerlerin, suda çözünen kitosan jel içindeki formülasyonlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (eritme yönteminde AT:PEG (1:12) baz kitosan jel içinde:  $254,22 \pm 0,40$  N.mm, suda çözünen kitosan jel içinde:  $130,23 \pm 2,23$  N.mm).

Katı dispersiyonlarda polimer oranının artmasıyla, formülasyonların şırınga edilebilirlik işi verilerinin arttığı görülmüştür (Tablo 4.11.).

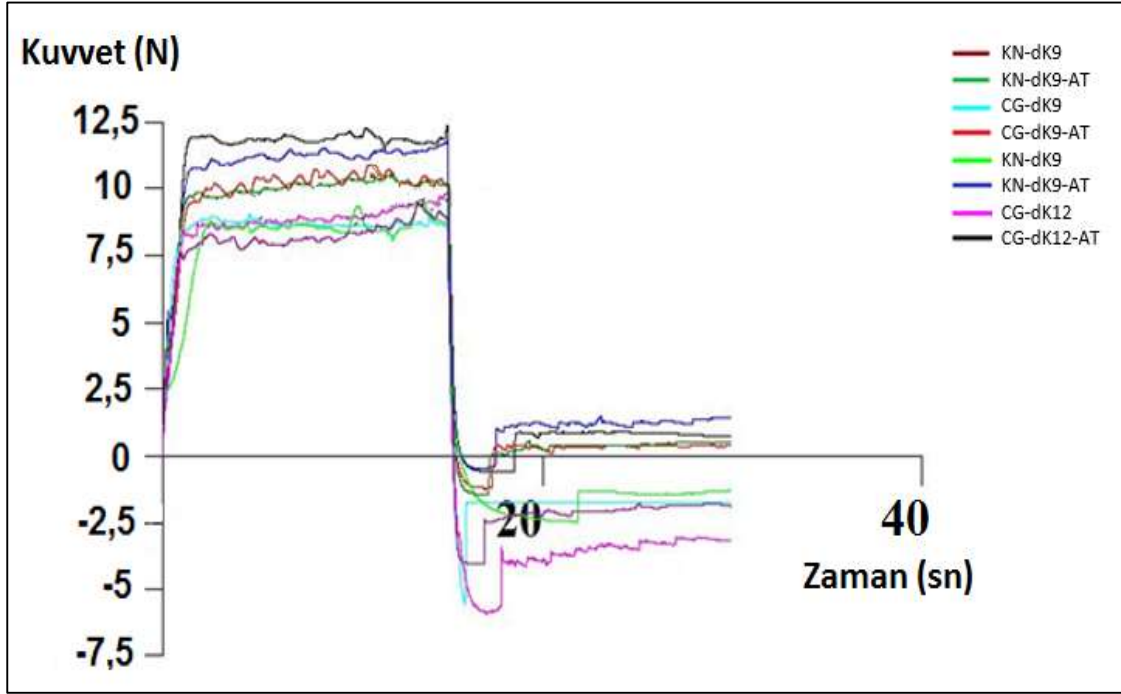
a)



b)



c)



Şekil 4.19. AT katı dispersiyonları içeren formülasyonların şırınga edilebilirliğini gösteren iş eğrileri (n=3)

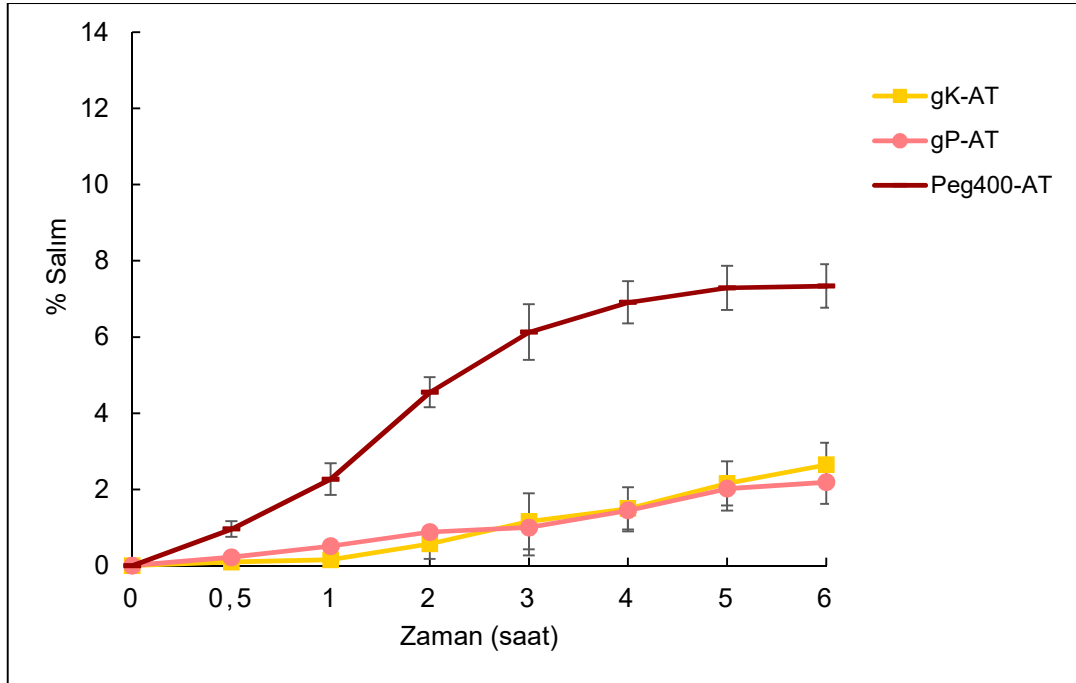
**Tablo 4.11.** Jel formülasyonlarının şırınga edilebilirlik özellikleri (n=3)

<b>Formülasyonlar</b>	<b>Şırınga edilebilirlik işi (N.mm)</b>
gK-CE-dPEG9	79,17±0,16
gK-CE-dPEG9-AT	197,52±0,37
gK-CE-dPEG12	93,54±0,01
gK-CE-dPEG12-AT	254,22±0,40
gK-ML-dPEG9	77,19±0,17
gK-ML-dPEG9-AT	201,15±0,34
gK-ML-dPEG12	93,63±0,27
gK-ML-dPEG12-AT	161,67±0,19
gP-CE-dPEG12	166,86±1,68
gP-CE-dPEG12-AT	135,6±1,7
gP-ML-dPEG12	106,17±0,03
gP-ML-dPEG12-AT	130,23±2,23
gK-CE-dPL9	87,00±0,04
gK-CE-dPL9-AT	92,61±0,25
gK-CE-dPL12	112,32±0,10
gK-CE-dPL12-AT	115,53±0,18
gK-ML-dPL9	89,67±0,11
gK-ML-dPL9-AT	109,62±0,09
gK-ML-dPL12	99,96±0,06
gK-ML-dPL12-AT	134,19±0,24
gP-CE-dPL12	94,8±0,17
gP-CE-dPL12-AT	104,76±0,23
gP-ML-dPL12	97,2±0,07
gP-ML-dPL12-AT	88,02±0,18
gKN-dK9	219,15±0,36
gKN-dK9-AT	291,71±0,04
gCG-dK9	224,54±0,43
gCG-dK9-AT	294,55±0,21
gKN-dK12	237,02±0,01
gKN-dK12-AT	326,35±0,13
gCG-dK12	243,42±0,37
gCG-dK12-AT	370,74±0,73

### **Salım Çalışmaları**

Jel formülasyonlarına ait salım profilleri Şekil 4.20’de ve katı dispersiyonlardan hareketle hazırlanan jellerden atorvastatinin salım profilleri Şekil 4.21a-c’de verilmiştir.

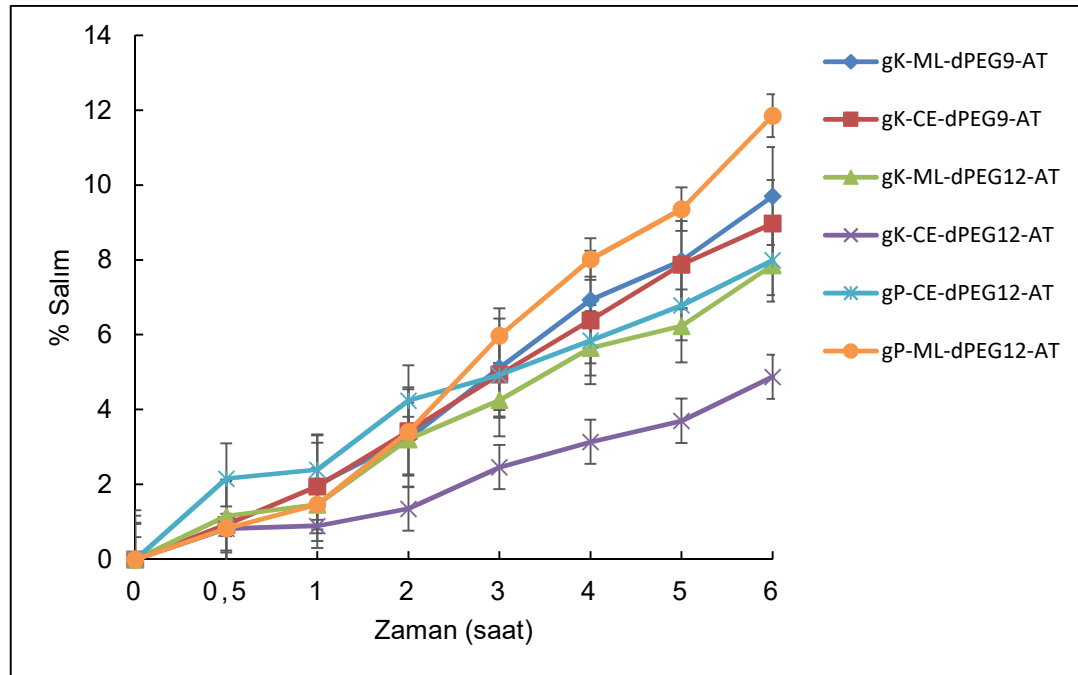
Katı dispersiyonlarla çözünme artırıldığı bulunmuştur. 2.saat sonunda PEG içinde çözüldürülmüş etkin maddenin salımı %4.55; 6 saatte %7.34, kitosan jel içinde 2.saatte % 0.57, 6.saatte %2.65 bulunmuştur. PEG ile hazırlanan (birlikte buharlaştırma yöntemi, 1:12) katı dispersiyon+jel formülasyonunda 2. saatte çözünen miktar %4.24, 6.saatte %7.99 bulunmuştur. Pluronic F-68 ile hazırlanan formülasyonlardan etkin maddenin salımının diğer polimerlere göre düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.21).



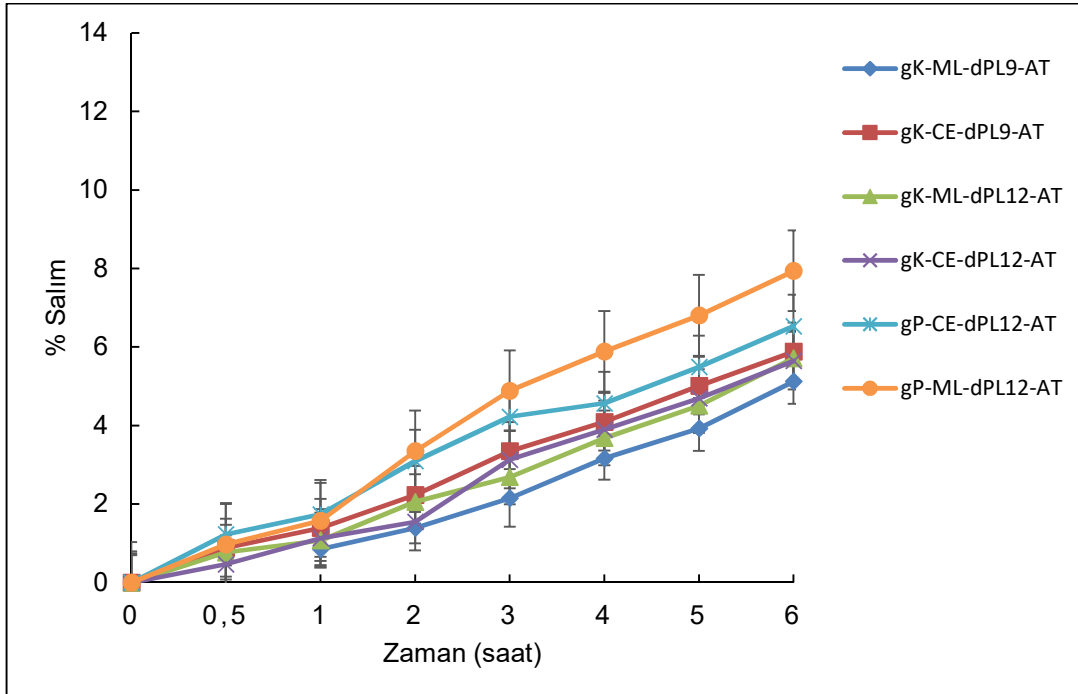
Şekil 4.20. AT içeren jel formülasyonlardan etkin madde salım profilleri  $\pm$  SS (n=6)



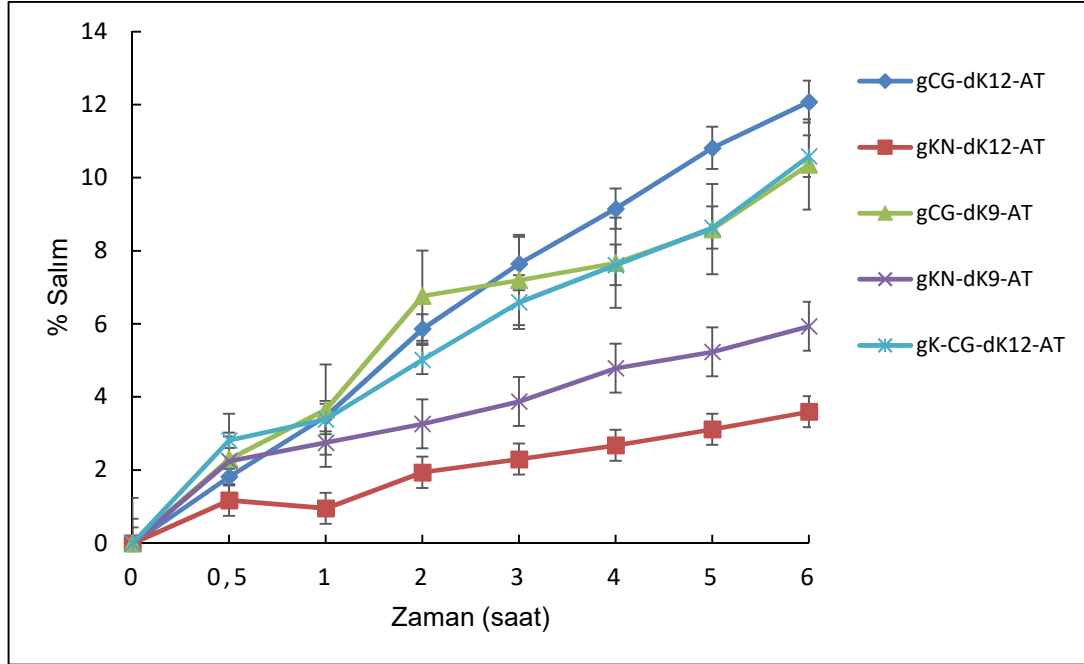
a)



b)



c)



**Şekil 4.21.** AT katı dispersiyonları içeren jel formülasyonlardan etkin madde salım profilleri  $\pm$  SS (n=6)

Atorvastatin:PEG ile artan polimer oranlarıyla hazırlanan katı dispersiyonların baz kitosan jel içindeki formülasyonlarından etkin madde salımının azaldığı görülmüştür. Eritme yöntemiyle hazırlanan atorvastatin:PEG katı dispersiyon formülasyonlarından salımın, birlikte buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyonların jel formülasyonlarından salımına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Pluronik F-68 ile hazırlanan katı dispersiyonların baz kitosan jeller içindeki formülasyonlarından salımlarında, polimer oranının değiştirilmesinin salıma bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca farklı yöntemler kullanarak hazırlanan atorvastatin:pluronik F-68 katı dispersiyonların jel formülasyonlarından salımında yöntemin anlamlı bir artış ya da azalmaya neden olmadığı gösterilmiştir. Öğütme yöntemiyle hazırlanan atorvastatin:baz kitosan katı dispersiyonlarının baz kitosan jel içindeki formülasyonlarından salımın, yoğurma metoduyla hazırlanan katı dispersiyonun jel formülasyonuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca atorvastatin:baz kitosan ile artan polimer oranlarında hazırlanan katı dispersiyonların jel formülasyonlarından salımın anlamlı bir artış ya da azalma göstermediği bulunmuştur.

PEG ve pluronik F-68 ile hazırlanan katı disperisyonların suda çözünen kitosan jelden etkin madde salımının baz kitosan jel içindeki katı dispersiyon formülasyonlarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Eritme yöntemiyle hazırlanan atorvastatin:PEG (1:9) katı dispersiyonun suda çözünen kitosan jel içindeki formülasyonu ile en yüksek salım elde edilmiştir.

### **Antiinflamatuvar Etkinin İncelenmesi**

Transforme edici büyüme faktörü (TGF-beta) ailesinden olan TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3 alt tipleri inflamasyonda rol oynayan polipeptid yapıda büyüme faktörleridir (200). IL-8, IL-6, IL-10 ve IL-1beta ise periodontal hastalığın belirlenmesinde önemli olan kemik yıkımı ve ataşman kaybına sebep olarak inflamatuvar cevabı artıran sitokinlerdir (201). Literatürde periodontal hastalığın değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılan TGF-beta ve IL-1beta sitokinleri seçilerek TNF- $\alpha$  ile uyarılan insan gingival fibroblast hücreleri üzerine formülasyonlar uygulandıktan 4 ve 8 saat sonra bu belirteçlerin konsantrasyonlarına bakılmıştır.

Çalışmanın son döneminde, hazırlanan formülasyonların antiinflamatuvar etkisini incelemek amacıyla IL-8, IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  ve transforme edici büyüme faktörleri ailesinden olan TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3 sitokinleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Alveolar kemik kaybıyla karakterize olan periodontal hastalıkta formülasyonların TNF-alfa ile uyarılan insan gingival fibroblast hücrelere uygulandıktan 4 ve 8 saat sonra, serbest bırakılan interlökinler ve diğer transforme edici büyüme faktörlerinin konsantrasyonları ölçülmüştür. Atorvastatin, serbest bırakılan interlökin konsantrasyonunu ve kemik yıkımını azaltmaktadır (14, 22-24).

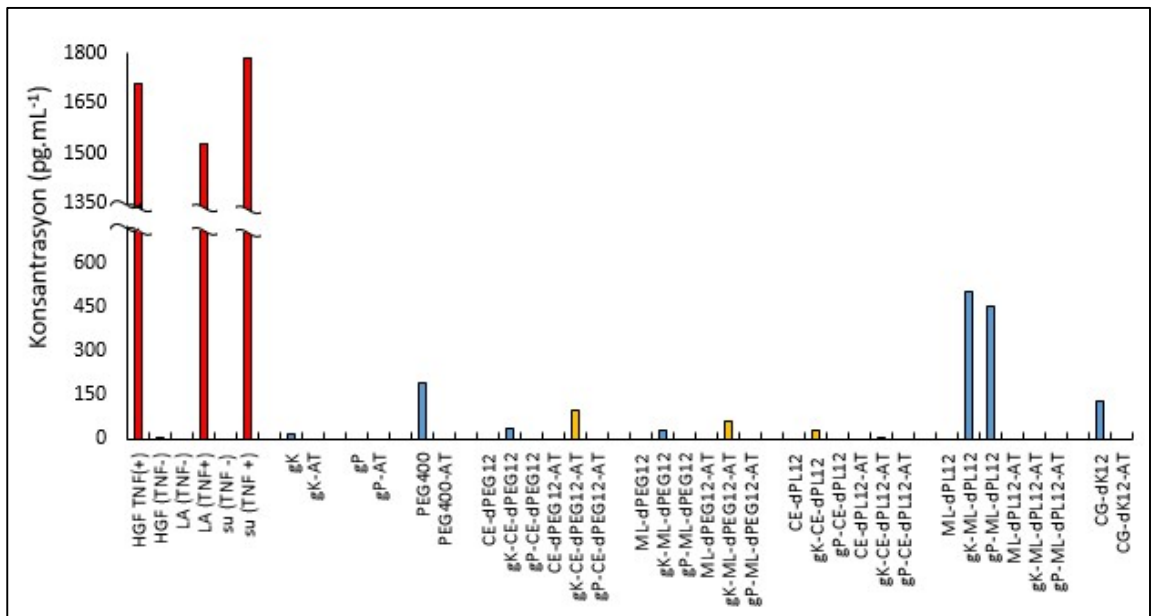
Bu çalışmada atorvastatin, proinflamatuvar belirteçler olan IL-8, IL-6 ve IL-1beta'yı ve antiinflamatuvar belirteç olan IL-10'u inhibe etmiştir. TGF-beta ailesi ise periodontal hastalıkta çift yönlü çalışan (stimulasyon ve inhibisyon) sitokinler olarak bilinmektedir (25, 200, 202-204).

## IL-1beta sitokin seviyeleri

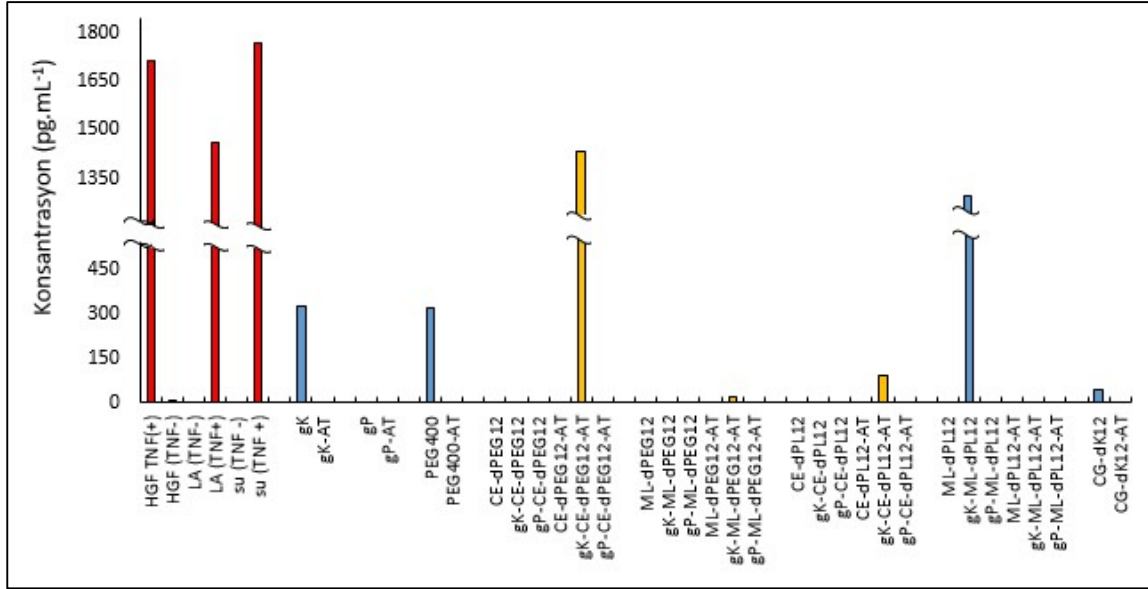
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatantından ölçülen IL-1beta düzeyleri Şekil 4.22a-b’de gösterilmiştir.

IL-1beta ile yapılan çalışmalarda farklı polimerler ve farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanan atorvastatin katı dispersiyonlarıyla hazırlanan jel formülasyonların tümünde kontrole göre daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir. Katı dispersiyonlar için polimer oranı ve hazırlama yöntemi karşılaştırıldığında aralarında etki düzeyi yönünden bir fark gözlenmemiştir. Jel formülasyonunda kullanılan kitosanın tipine göre (suda çözünen veya bazık) ise antiinflamatuvar etkinin şiddetinin değiştiği gözlenmiştir. Suda çözünen kitosan (Protasan) ile hazırlanan jel formülasyonlarıyla, bazık kitosan (Koyo) ile hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek antiinflamatuvar etki sağlanmıştır. 8 saat sonra formülasyonların antiinflamatuvar etkisinin devam ettiği gözlenmiştir.

a)



b)



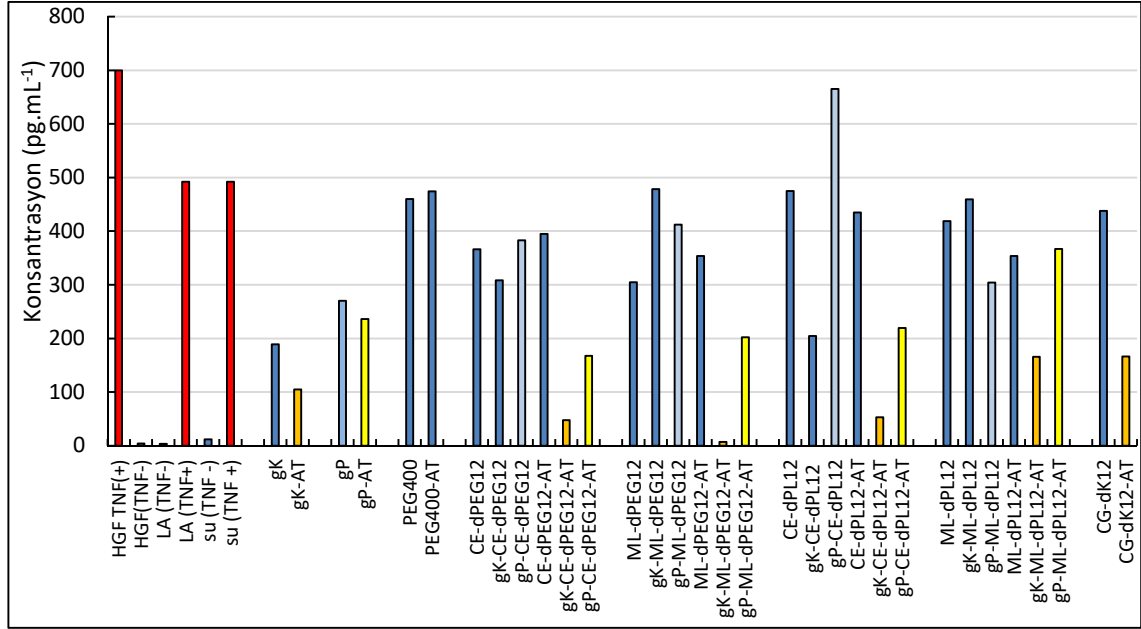
**Şekil 4.22.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-1beta seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

### IL-6 sitokin seviyeleri

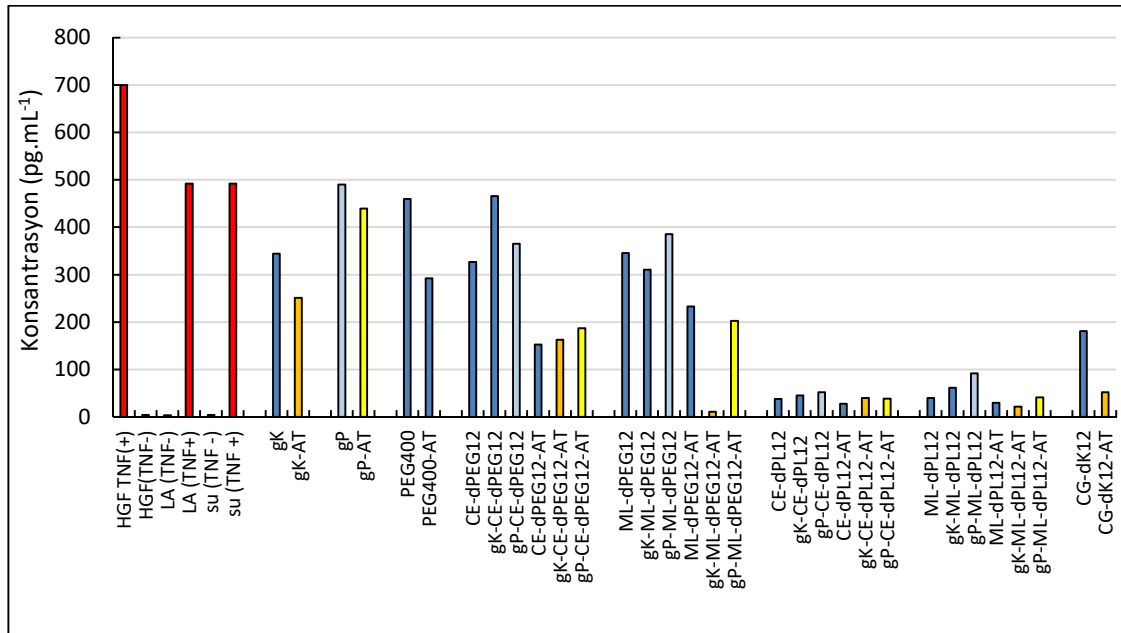
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatantından ölçülen IL-6 düzeyleri Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

IL-6 ile yapılan çalışmalarda, farklı polimerler ve farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanan atorvastatin katı dispersiyonlarıyla hazırlanan jel formülasyonların tümünde kontrole göre daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir. Katı dispersiyonlar için polimer oranı ve hazırlama yöntemi karşılaştırıldığında aralarında etki düzeyi yönünden bir fark gözlenmemiştir. Jel formülasyonunda kullanılan kitosanın tipine göre (suda çözünen veya bazık) ise antiinflamatuvar etkinin şiddetinin değiştiği gözlenmiştir. Bazık kitosan (Koyo) ile hazırlanan jel formülasyonlarıyla, suda çözünen kitosan (Protasan) ile hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek antiinflamatuvar etkinin sağlanmıştır. Hem 4. hem de 8. saat ölçümlerinde etkinin devam ettiği gözlenmiştir.

a)



b)



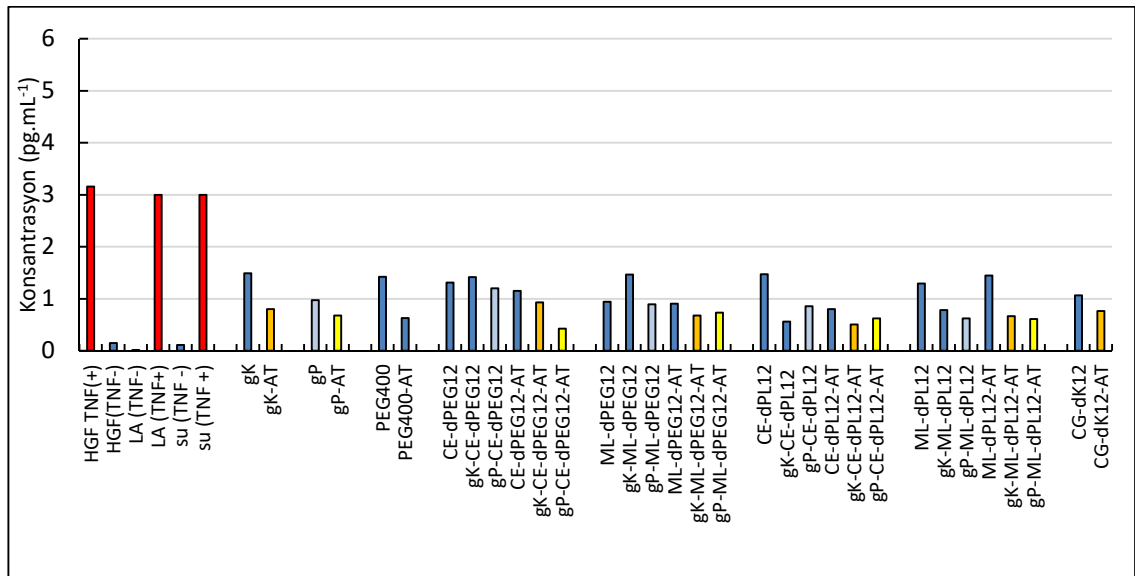
**Şekil 4.23.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-6 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

## IL-8 sitokin seviyeleri

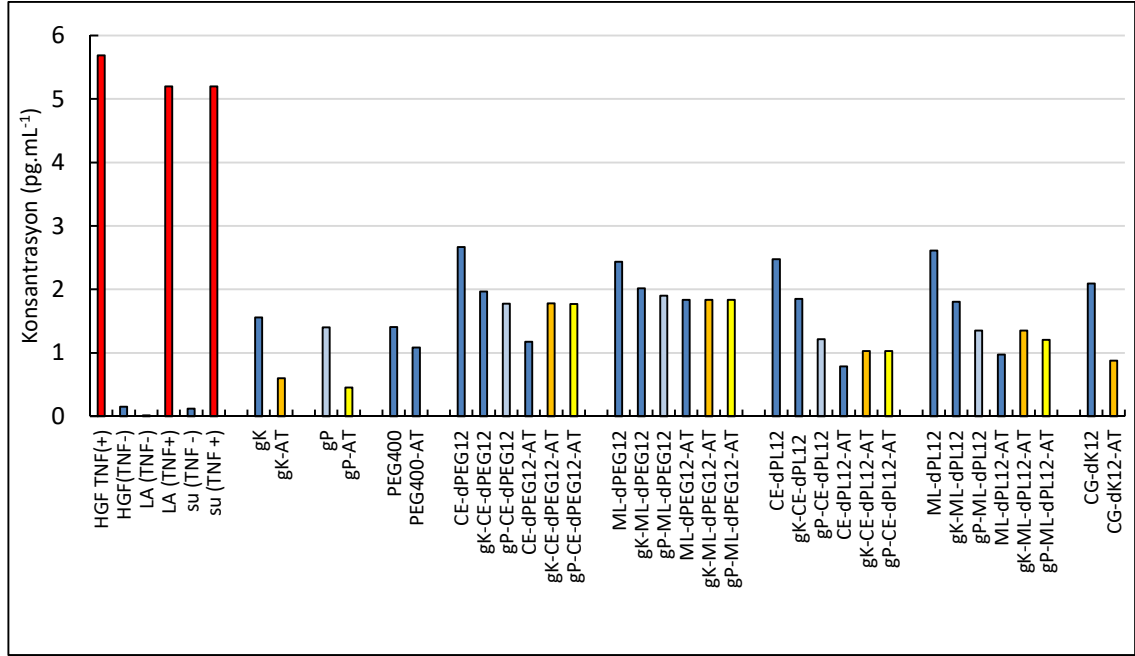
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatanından ölçülen IL-8 düzeyleri Şekil 4.24'te gösterilmiştir.

IL-8 ile yapılan çalışmalarda, IL-6 ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde, farklı polimerler ve farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanan atorvastatin katı dispersiyonlarıyla hazırlanan jel formülasyonların tümünde kontrole göre daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir. Katı dispersiyonlar için polimer oranı ve hazırlama yöntemi karşılaştırıldığında aralarında etki düzeyi yönünden bir fark gözlenmemiştir. Jel formülasyonunda kullanılan kitosanın tipine göre (suda çözünen veya bazık) ise antiinflamatuvar etkinin şiddetinin değiştiği gözlenmiştir. Suda çözünen kitosan (Protasan) ile hazırlanan jel formülasyonlarıyla, bazık kitosan (Koyo) ile hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek antiinflamatuvar etkinin sağlanmıştır. Hem 4. hem de 8.saat ölçümlerinde etkinin devam ettiği gözlenmiştir.

a)



b)



**Şekil 4.24.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-8 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

### IL-10 sitokin seviyeleri

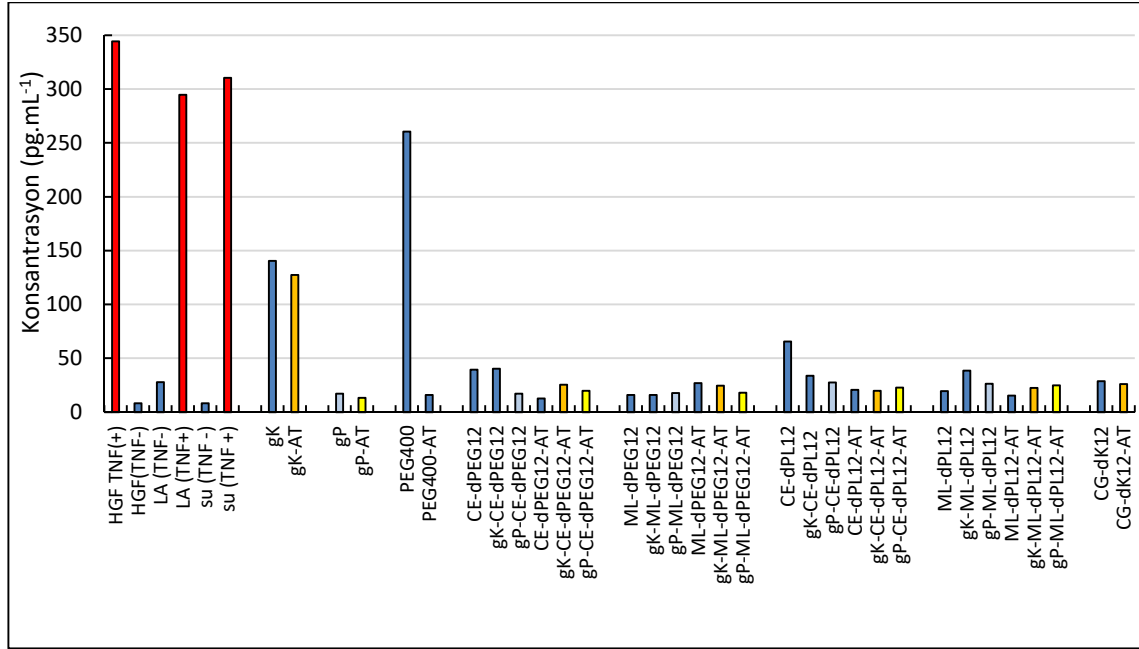
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatanından ölçülen IL-10 düzeyleri Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

IL-10 ile yapılan çalışmalarda da diğer incelenen sitokinlere benzer şekilde farklı polimerler ve farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanan atorvastatin katı dispersiyonlarıyla hazırlanan jel formülasyonların tümünde kontrole göre daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir. Katı dispersiyonlar için polimer oranı ve hazırlama yöntemi karşılaştırıldığında aralarında etki düzeyi yönünden bir fark gözlenmemiştir. Jel formülasyonunda kullanılan kitosanın tipine göre (suda çözünen veya bazik) ise antiinflamatuvar etkinin şiddetinin değiştiği gözlenmiştir. Suda çözünen kitosan (Protasan) ile hazırlanan jel formülasyonlarıyla, bazik kitosan (Koyo) ile hazırlanan

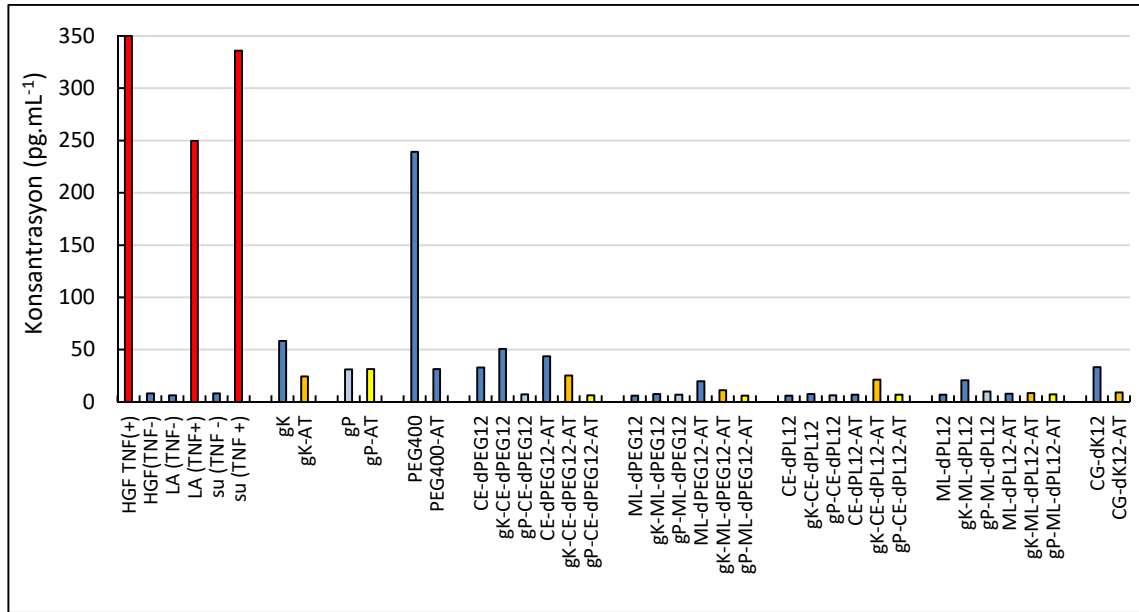


formülasyonlara göre daha yüksek antiinflamatuvar etkinin sağlanmıştır. 8 saat sonra formülasyonların antiinflamatuvar etkisinin arttığı gözlenmiştir.

a)



b)



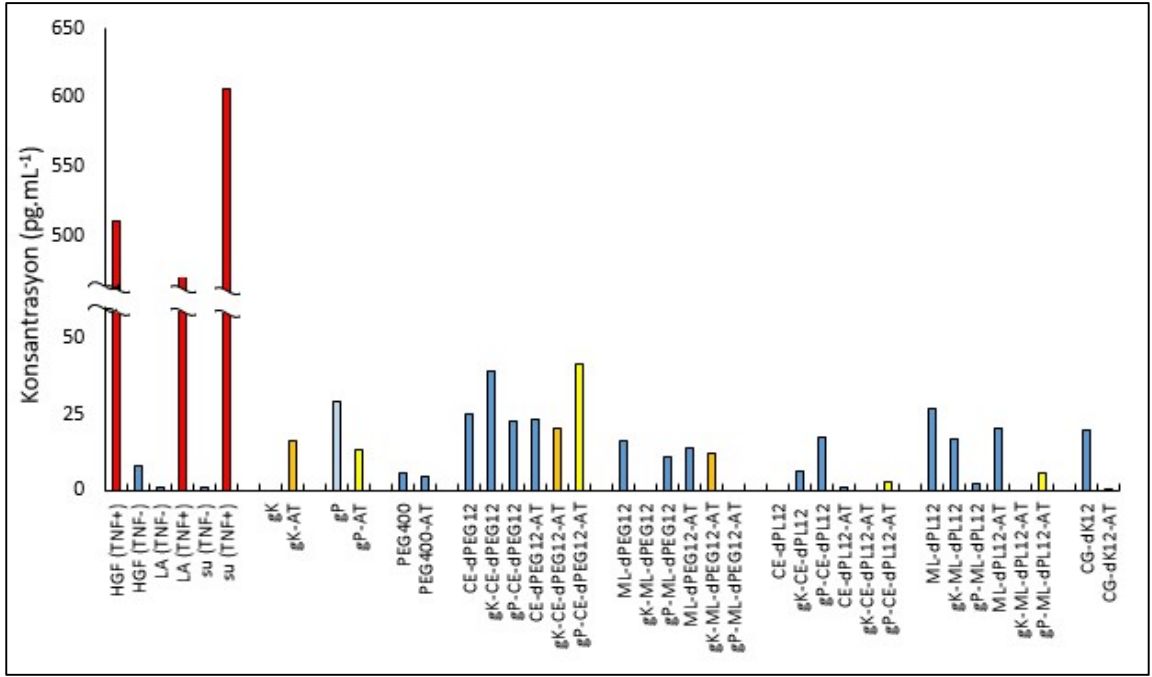
**Şekil 4.25.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-10 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

### **TGF-beta1 sitokin seviyeleri**

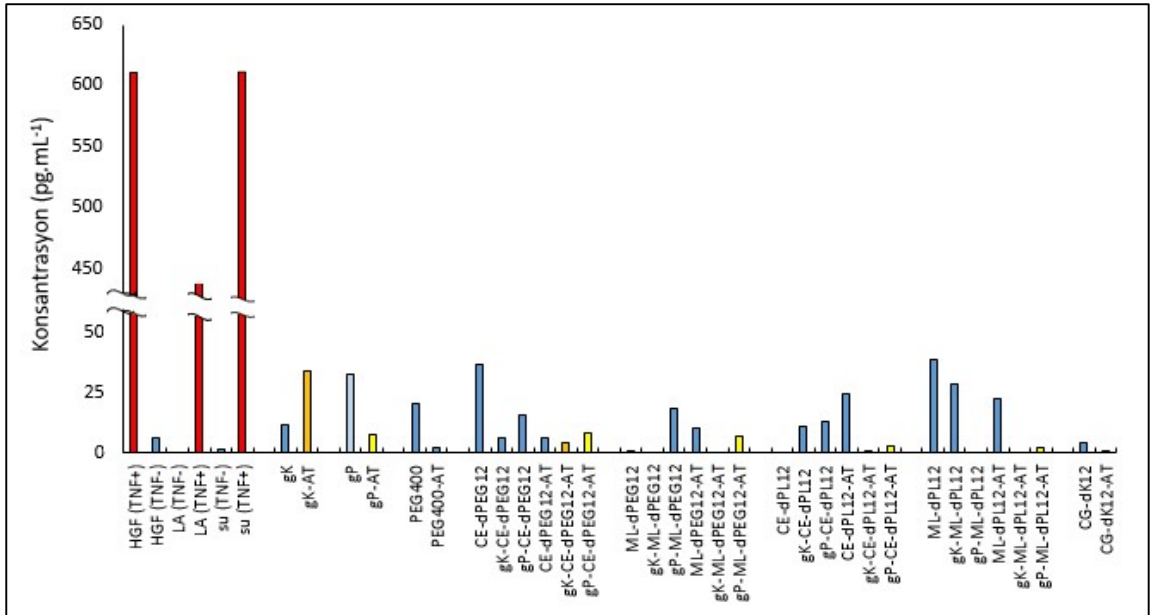
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatanından ölçülen TGF-beta1 düzeyleri Şekil 4.26a-b'de gösterilmiştir.

TGF-beta1 ile yapılan çalışmalarda da IL-1beta'ya benzer şekilde farklı polimerler ve farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanan atorvastatin katı dispersiyonlarıyla hazırlanan jel formülasyonların tümünde TGF-beta1 seviyesi kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Baz kitosan ve suda çözünen kitosan kullanımına göre TGF-beta1 seviyeleri farklılık göstermiştir, Baz kitosan ile daha düşük sitokin salınımı elde edilmiştir; atorvastatin varlığında ise suda çözünen kitosan jel ile daha düşük TGF beta 1 değerleri bulunmuştur. Farklı hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında hem 4 saat hem de 8 saat sonra TGF beta 1 konsantrasyonunda etkinlik yönünden bir farklılık görülmemiştir. Belirgin bir fark olmamakla birlikte 4 ve 8 saat sonra pluronik F-68 ile hazırlanan formülasyonlarda TGF-beta1 seviyeleri daha düşük bulunmuştur. Baz kitosan jel ile hazırlanan formülasyonlarda 4 saat sonunda TGF beta 1 konsantrasyonları yönünden bir farklılık gözlenmezken 8 saat sonunda katı dispersiyonla hazırlanan formülasyonlarla TGF-beta1 seviyeleri daha düşük bulunmuştur.

a)



b)



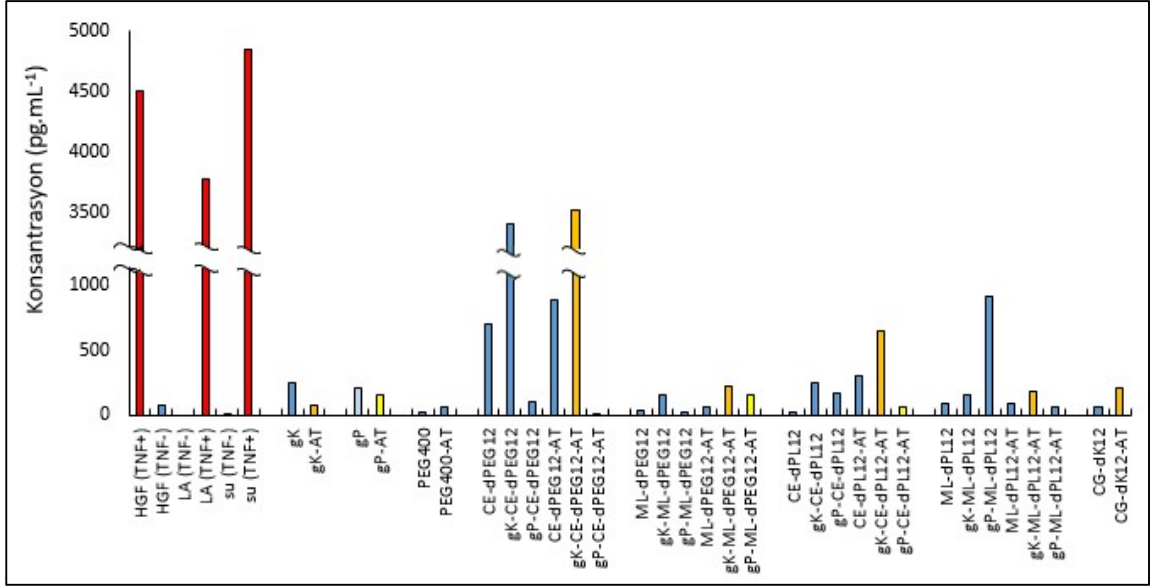
**Şekil 4.26.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta1 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

### **TGF-beta2 sitokin seviyeleri**

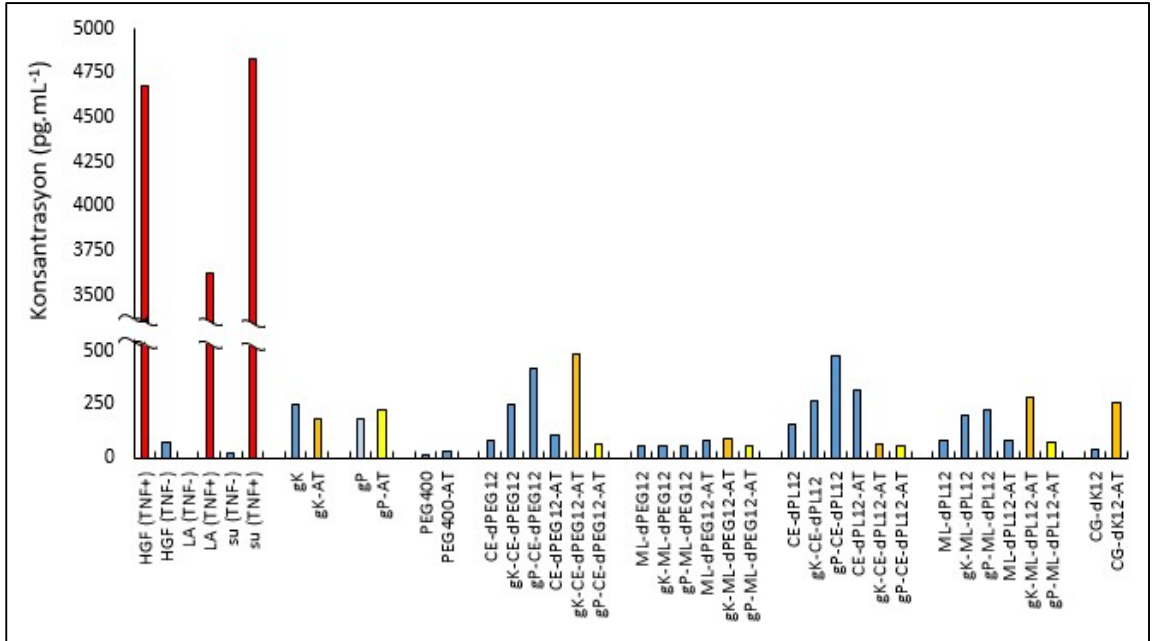
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatanından ölçülen TGF-beta2 düzeyleri Şekil 4.27a-b’de gösterilmiştir.

TGF-beta2 ile yapılan çalışmalarda TGF-beta1’de elde edilen verilerden farklı olarak atorvastatin varlığında hem suda çözünen kitosan jel hem de baz kitosan jellerin uygulanmasıyla TGF beta 2 ölçümleri daha düşük bulunmuştur ve 8 saat sonunda etkinin devam ettiği gözlenmiştir. Farklı hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında, 4 saat sonunda eritme yöntemiyle hazırlanan katı dispersiyon+jel formülasyonlarıyla TGF-beta2 konsantrasyonu birlikte buharlaştırma yöntemine göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca suda çözünen kitosan jel+katı dispersiyon karışımlarının TGF-beta2 üzerindeki etkisi baz kitosana göre daha yüksek bulunmuştur Şekil 4.27b’de 8 saat sonunda tek başına atorvastatinle TGF-beta2 düzeyi çok düşük bulunmuştur. Farklı polimerlerle hazırlanan katı dispersiyon+jeller karşılaştırıldığında aralarında sitokin konsantrasyonları yönünden bir fark gözlenmemiştir.

a)



b)



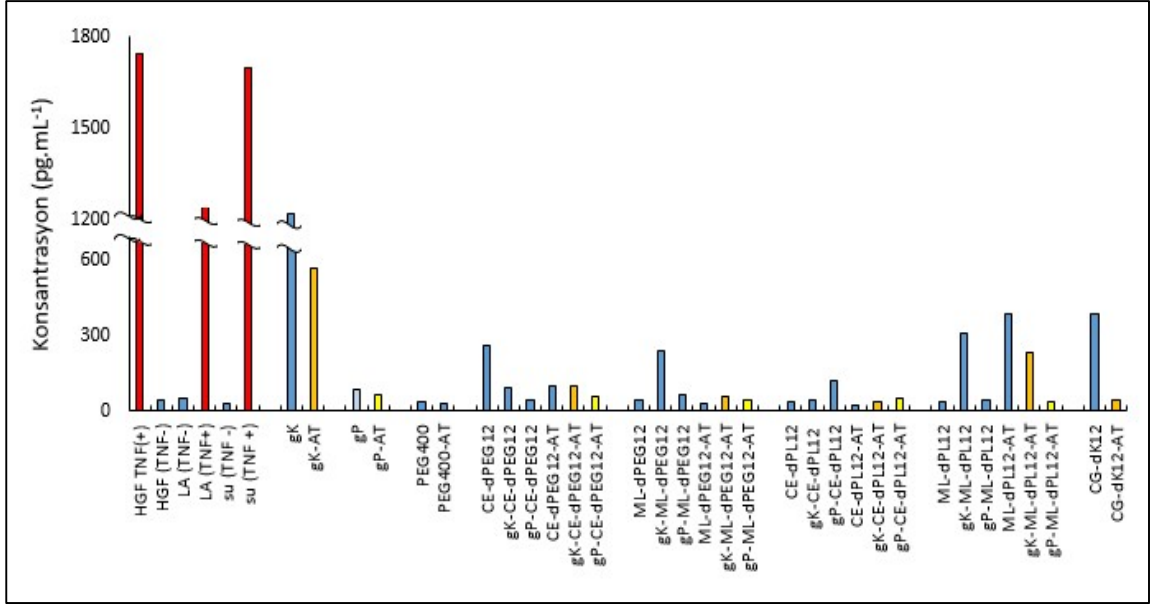
**Şekil 4.27.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta2 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

### **TGF-beta3 sitokin seviyeleri**

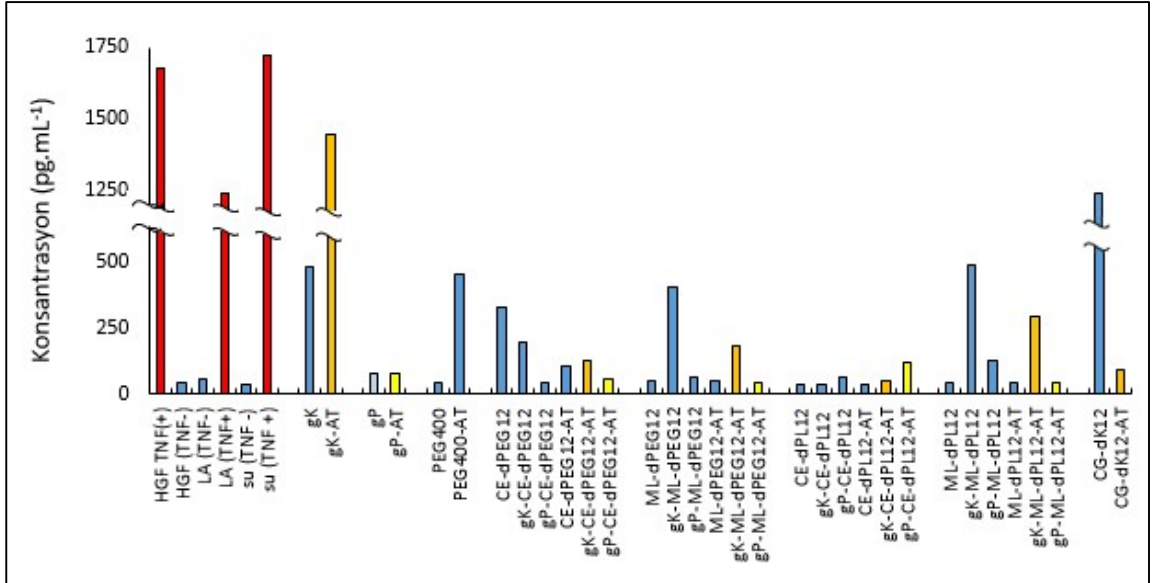
İn vitro insan gingival fibroblast hücreleri (hGF) kullanılarak yapılan hücre kültürü ortamında formülasyonların uygulamasından sonra hücre kültür süpernatanından ölçülen TGF-beta3 düzeyleri Şekil 4.28a-b’de gösterilmiştir.

TGF-beta3 ile yapılan çalışmalarda polimerler arası yapılan karşılaştırmada diğer sitokinlerden farklı olarak baz kitosan ile TGF-beta3 konsantrasyonu yüksek bulunmuştur. 4 saat ve 8 saatin sonunda suda çözünen kitosanla hazırlanan formülasyonlarda TGF-beta3 düzeyleri benzer bulunmuştur. Sadece atorvastatin ile, 8 saatin sonunda TGF-beta3 konsantrasyonu 4 saate göre daha yüksek bulunmuştur. Baz kitosanın transforme edici büyüme faktörü konsantrasyonu 8 saat sonunda daha düşük bulunduğu halde, atorvastatin varlığında baz kitosan jel ile TGF-beta3 konsantrasyonu 8 saatin sonunda yüksek bulunmuştur. Jel formülasyonunda kullanılan kitosanın tipine göre (suda çözünen veya bazik) ise TGF-beta3 düzeyleri farklı bulunmuştur. Suda çözünen kitosan (Protasan) ile hazırlanan jel formülasyonlarıyla, bazik kitosan (Koyo) ile hazırlanan formülasyonlara göre TGF-beta3 konsantrasyonları daha düşük bulunmuştur. Hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında ise aralarında sitokin konsantrasyonları yönünden bir fark gözlenmemiştir.

a)



b)



**Şekil 4.28.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta3 seviyeleri: a) uygulamadan 4 saat sonra; b) uygulamadan 8 saat sonra

### 4.3. İn Vivo Çalışmalar

Sıçanlarda ip bağlayarak (ligatürle) indüklenmiş periodontitis modelinde, 11. günde periodontitis oluşturulduğu histolojik ve gözlemsel olarak belirlenmiştir ve çalışmalar bu hayvanlarla sürdürülmüştür (Şekil 4.29) Her çalışma grubunun ağırlık ortalaması yakın olup (Şekil 4.30) deney süresince grup içi ve gruplar arası ağırlık değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

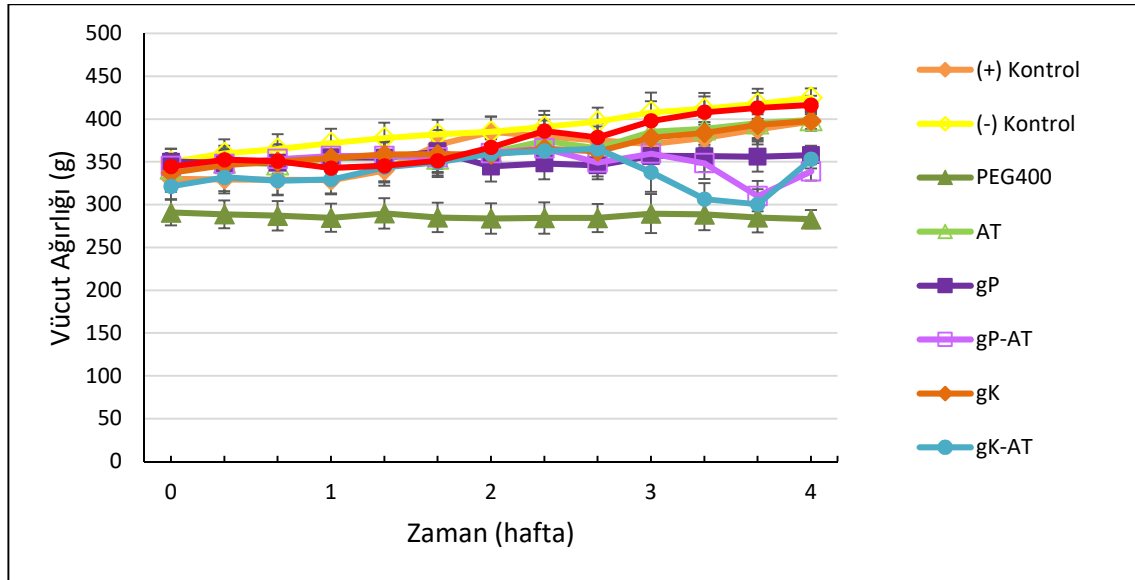
a) (-) Kontrol (sağlıklı)



b) (+) Kontrol (periodontitisli)



Şekil 4.29. Sağlıklı (- kontrol) (a) ve periodontitis (+ kontrol) (b) geliştirilmiş sıçanlarda periodontal dokuların görünümü



Şekil 4.30. Çalışma boyunca sıçan ağırlıkları (g)

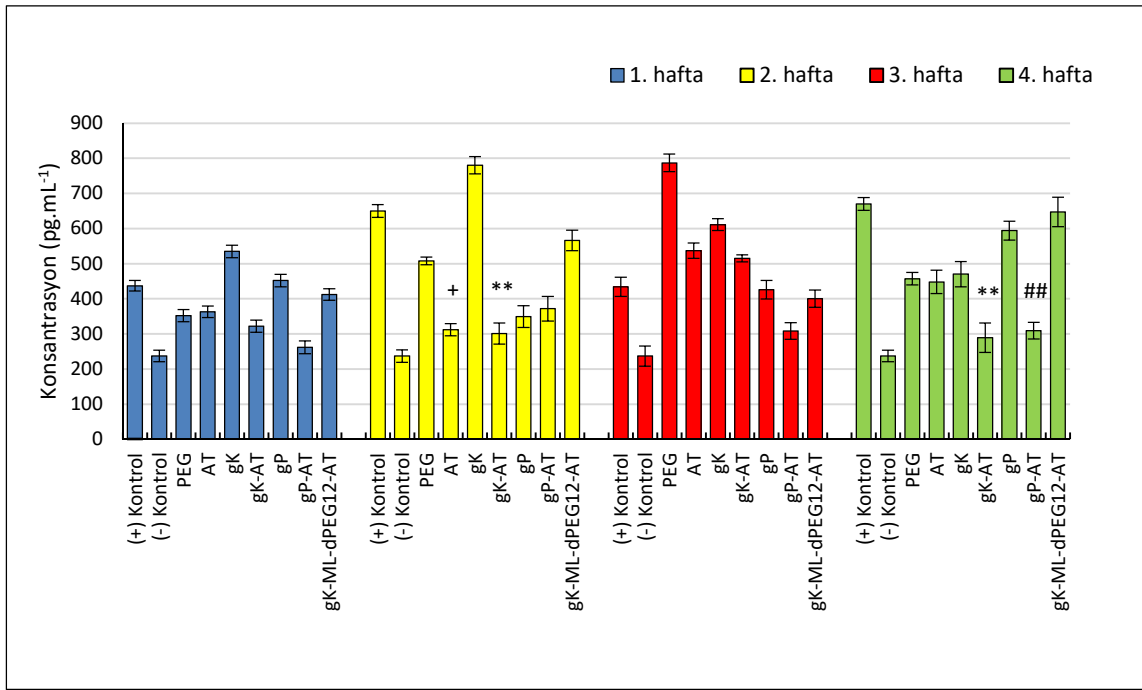


### 4.3.1. Doku Örneklerinde Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

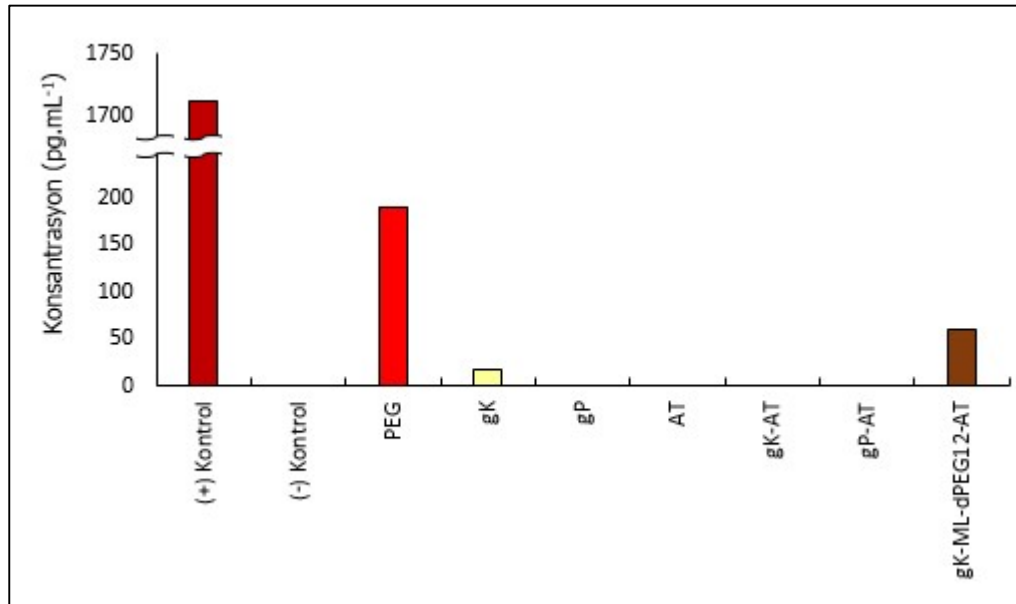
#### **Sıçan dokularındaki IL-1beta düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jıjival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen IL-1beta düzeyleri Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.32’de verilmiştir.

Jel formülasyonunda kullanılan kitosanın tipine göre (suda çözünen veya bazik) antiinflamatuvar etkinin şiddetinin değiştiği gözlenmiştir. 1. ve 3. haftalarda suda çözünen kitosan grubunda, bazik kitosan grubuna göre daha yüksek antiinflamatuvar etki sağlanmıştır, bu formülasyonlarla periodontitis kontrol grubuna göre daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir ve atorvastatin+kitosan jel uygulamasıyla antiinflamatuvar etkinin arttığı gözlenmiştir. İnflamasyonun 2. ve 4. haftalarda arttığı tespit edilmiştir. Sadece atorvastatin uygulaması yapılan grupta antiinflamatuvar etki 2. haftadan sonra azalmıştır. Atorvastatin içeren baz kitosan jel grubunda, inflamasyonun arttığı haftalarda, diğer haftalara göre daha yüksek etkinlik elde edilerek inflamasyon baskılanmış, IL-1beta seviyeleri düşük bulunmuştur. Atorvastatin içeren suda çözünen kitosan jel gruplarında ise 4 hafta boyunca IL-1beta seviyeleri periodontitis grubuna göre düşük bulunmuştur.



**Şekil 4.31.** Sıçan diş eti dokularında IL-1beta seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). ## gP-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).

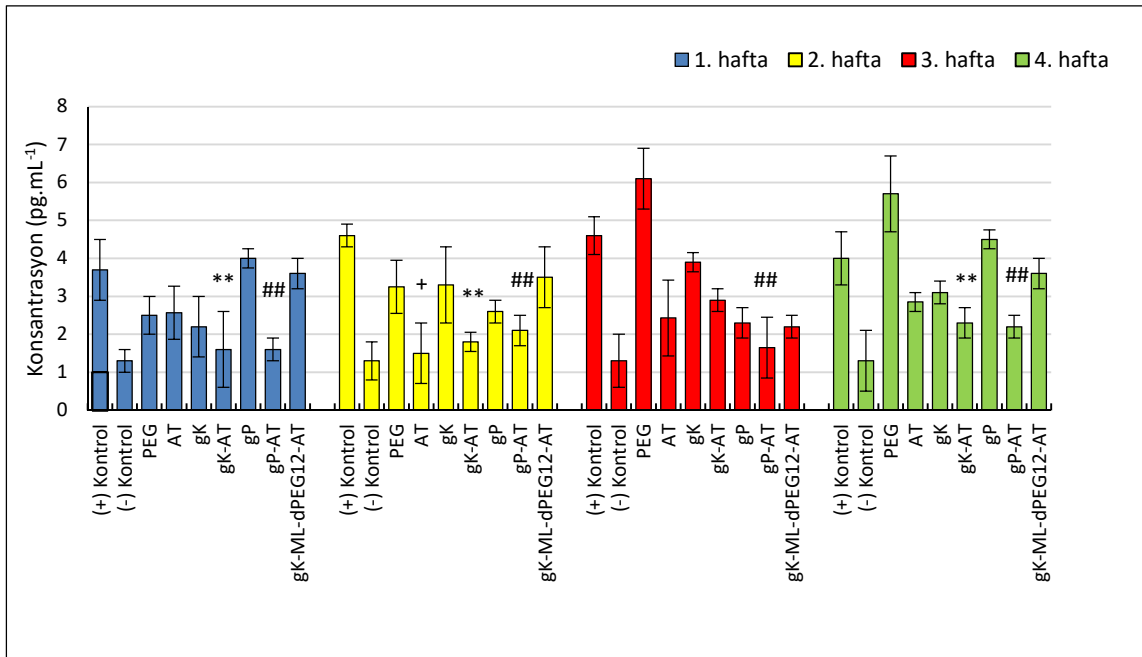


**Şekil 4.32.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-1beta seviyeleri (4 saat sonra)

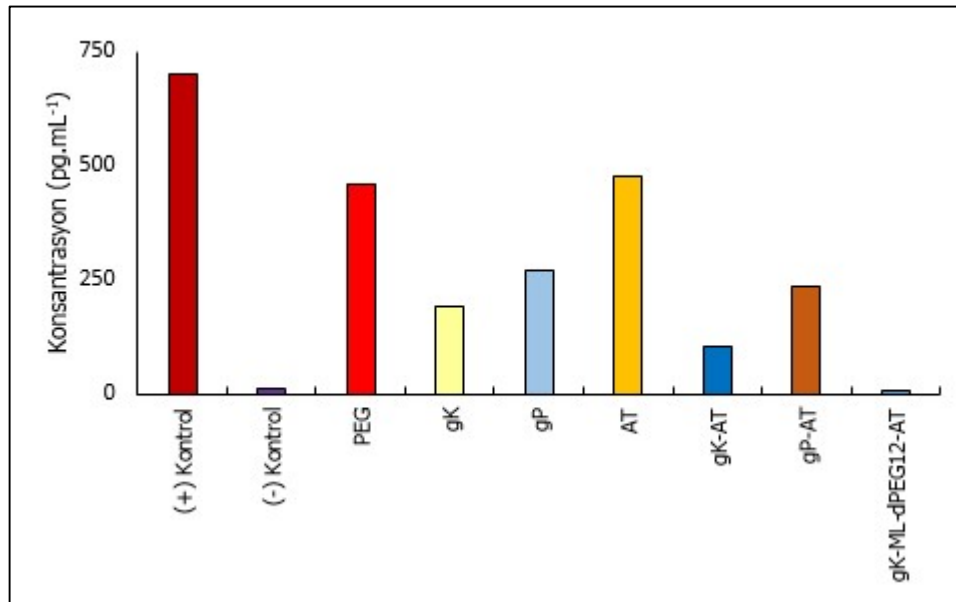
### **Sıçan dokularındaki IL-6 düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jinvival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen IL-6 düzeyleri Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.34'te verilmiştir.

Periodontitis kontrol gruplarında IL-6 sitokin seviyeleri 4 hafta boyunca sağlıklı gruba göre yüksek bulunmuştur. Atorvastatin içeren kitosan jel gruplarının antiinflamatuvar özelliklerinin periodontitis kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur ve 4 hafta boyunca IL-6 sitokinlerini baskılayarak yüksek antiinflamatuvar etki gösterdikleri gözlenmiştir. Tek başına atorvastatin uygulaması ile IL-6 seviyesi 2. hafta sonunda düşük bulunurken, sonraki haftalarda atorvastatin+kitosan jel formülasyonlarıyla IL-6 seviyesinin daha da düştüğü gözlenmiştir. Atorvastatin içeren farklı kitosanlarla hazırlanan jel gruplarında, kullanılan farklı kitosan tipleriyle antiinflamatuvar etki şiddetinin değişmediği gözlenmiştir.



**Şekil 4.33.** Sıçan diş eti dokularında IL-6 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). ## gP-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).

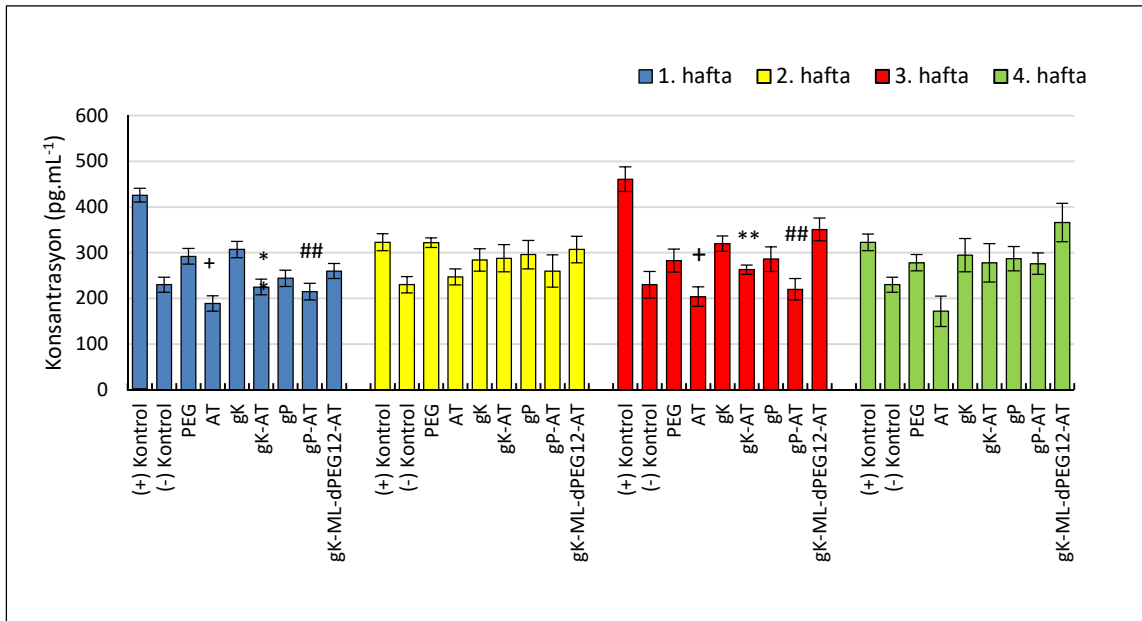


**Şekil 4.34.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-6 seviyeleri (4 saat sonra)

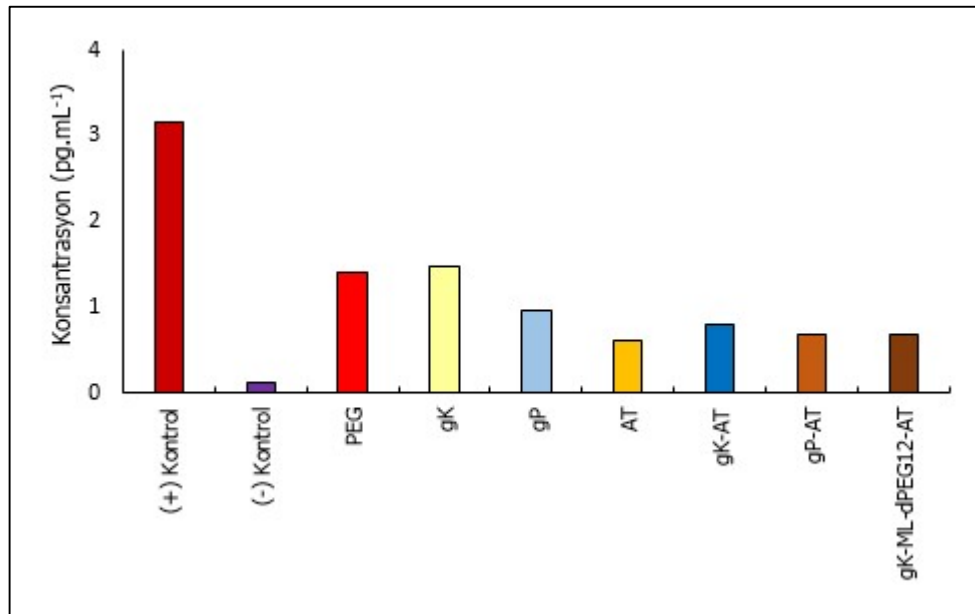
### **Sıçan dokularındaki IL-8 düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jıjival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen IL-8 düzeyleri Şekil 4.35'te gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.36'da verilmiştir.

Periodontitis kontrol grubunda 1. ve 3. haftalarda serbest bırakılan IL-8 konsantrasyonlarının arttığı ve buna bağılı olarak inflamasyon şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Atorvastatin içeren kitosan jel gruplarında tüm haftalarda antiinflamatuvar etkilerine bağılı olarak IL-8 düzeyleri periodontitis kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Atorvastatin içeren kitosan jellerde kullanılan kitosanın tipine göre antiinflamatuvar etkinin şiddetinin değıştiğı gözlenmiştir, suda çözünen kitosan ile daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir.



**Şekil 4.35.** Sıçan diş eti dokularında IL-8 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).

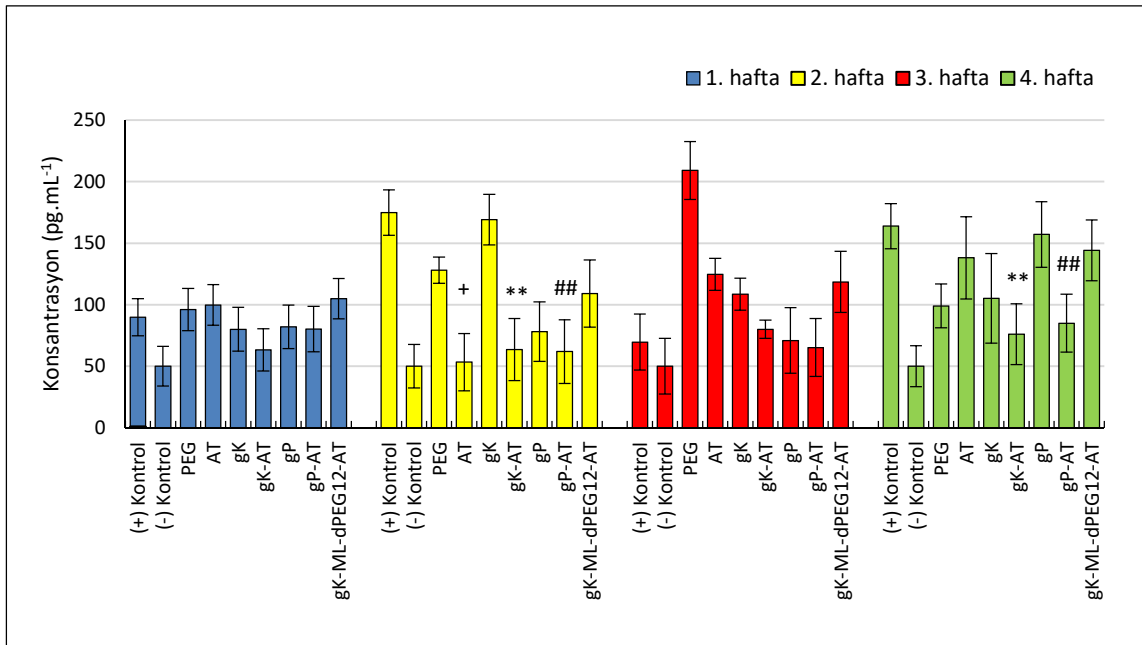


**Şekil 4.36.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-8 seviyeleri (4 saat sonra)

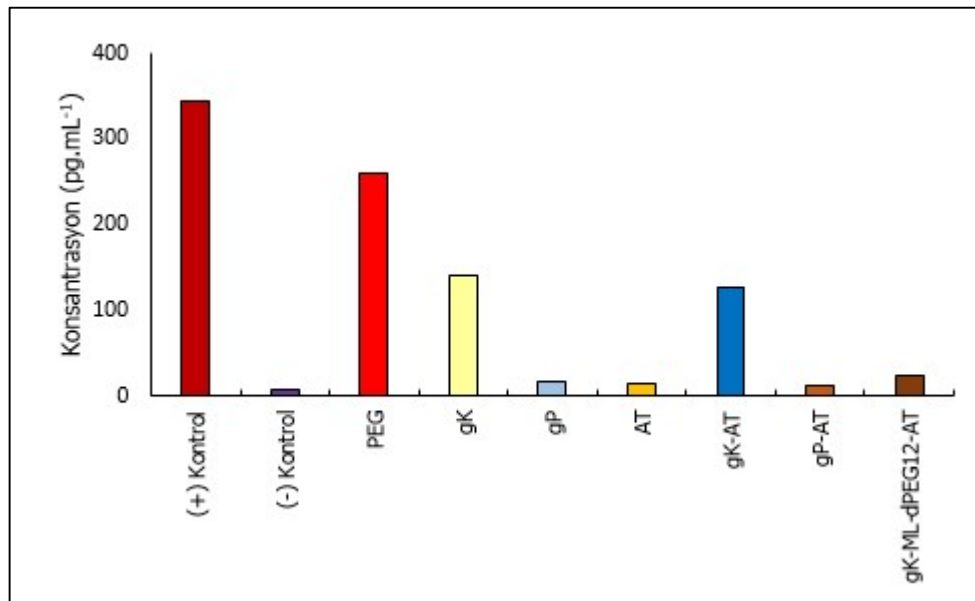
### **Sıçan dokularındaki IL-10 düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jıjival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen IL-10 düzeyleri Şekil 4.37'de gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.38'de verilmiştir.

Periodontitis kontrol grubunda 2. ve 3. haftalarda inflamasyon şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Etkin madde içermeyen kitosan jel gruplarında kullanılan kitosan tipine göre antiinflamatuvar etkinliğin değiştiği gözlenmiştir. 2. ve 3. haftalarda suda çözünen kitosan jel grubunda antiinflamatuvar etki yüksek bulunurken 4. haftada bu etkinin azaldığı tespit edilmiştir. IL-6 verileriyle uyumlu olarak, atorvastatin içeren kitosan jel gruplarında ise kullanılan kitosan tipine göre bir değişiklik gözlenmemiştir ve 4 hafta boyunca atorvastatin içeren bazik kitosan ve suda çözünen kitosan jel gruplarının antiinflamatuvar etkinlikleri devam etmiştir.



**Şekil 4.37.** Sıçan diş eti dokularında IL-10 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).



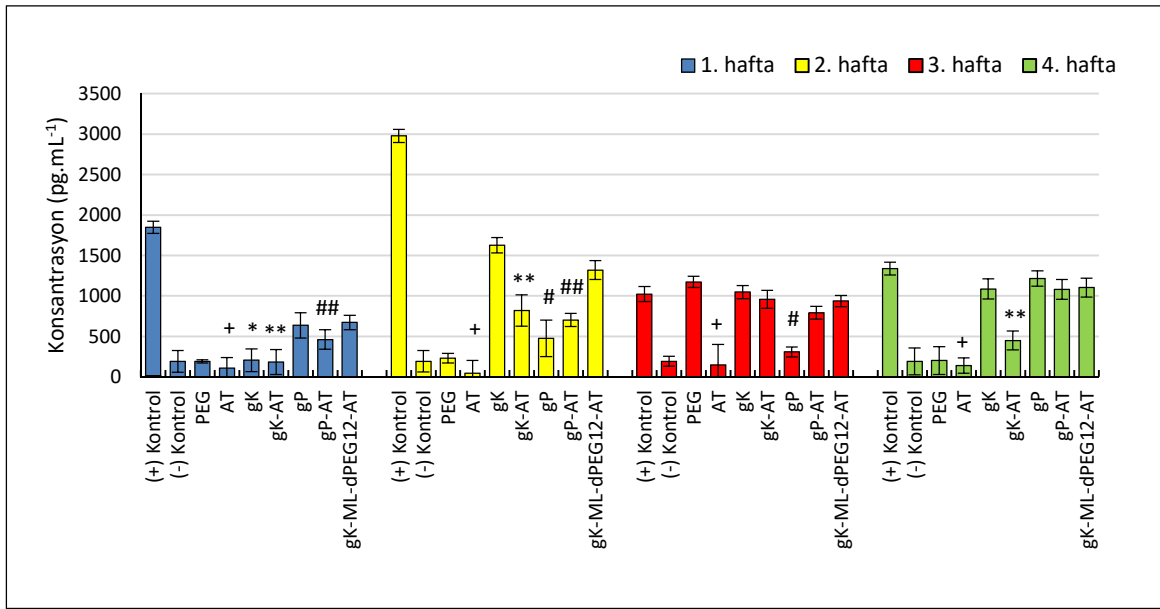
**Şekil 4.38.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde IL-10 seviyeleri (4 saat sonra)



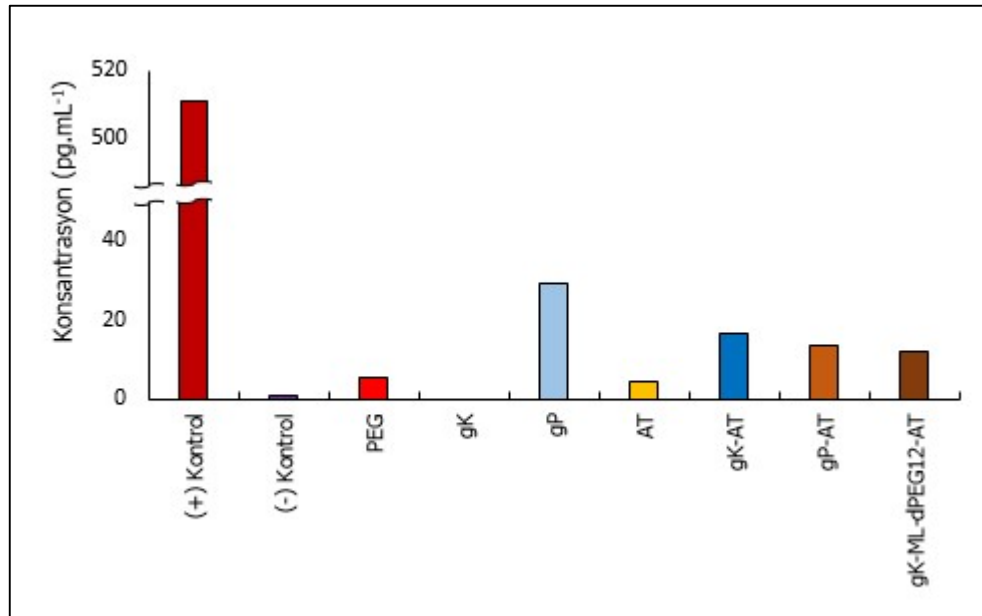
### **Sıçan dokularındaki TGF-beta1 düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jıjival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen TGF-beta1 düzeyleri Şekil 4.39'da gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.40'ta verilmiştir.

Periodontitisli grupta TGF-beta1 düzeylerinde ilk 2 hafta artış gözlenmiş, 3. hafta azalmış ancak 4. hafta yeniden artış gösterdiği bulunmuştur. Sadece atorvastatin uygulanan grupta TGF-beta1 konsantrasyonu sağlıklı gruba ve diğer gruplara göre daha düşük bulunmuş ve haftalar arasında etki yönünden bir fark gözlenmemiştir. Atorvastatin içeren baz kitosan jellerle, etkin madde içermeyen baz kitosan jellere göre TGF-beta1 düzeyi 2. ve 4. haftalarda daha düşük bulunmuştur. Etkin madde içermeyen suda çözünen kitosan jel ile TGF-beta1 düzeyleri ilk 3 hafta düşük bulunurken, 4. hafta yükseldiği gözlenmiştir.



**Şekil 4.39.** Sıçan diş eti dokularında TGF-beta1 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). # gP ve (+)kontrol grubu arasında anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).

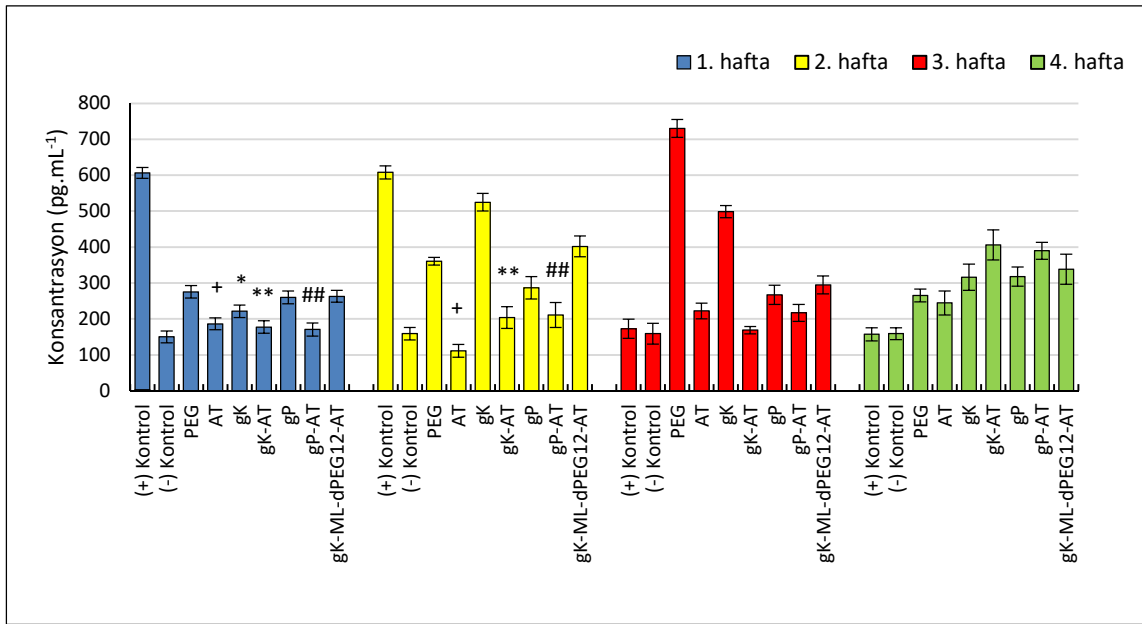


**Şekil 4.40.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta1 seviyeleri (4 saat sonra)

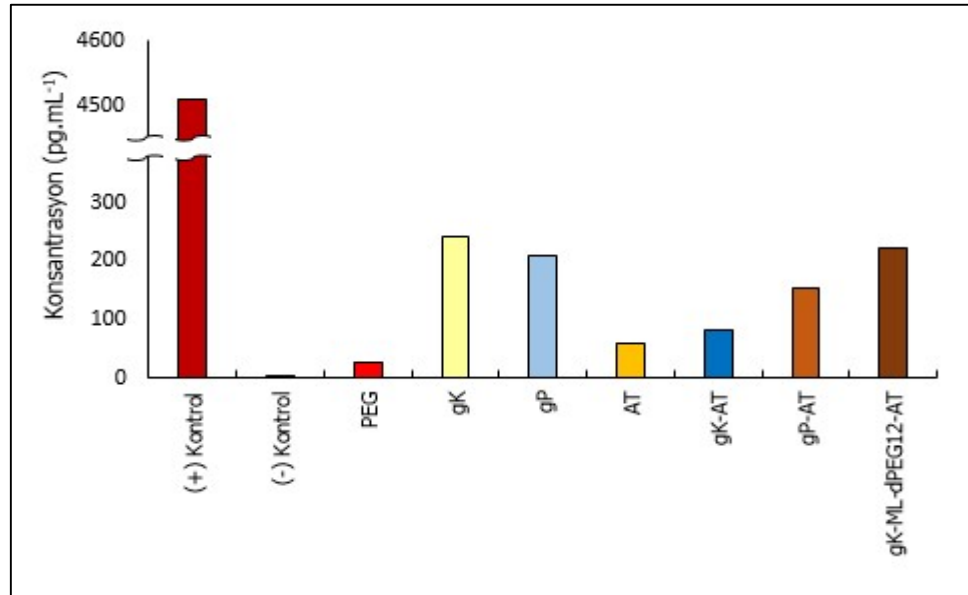
### **Sıçan dokularındaki TGF-beta2 düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jinvival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen TGF-beta2 düzeyleri Şekil 4.41'de gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.42'de verilmiştir.

TGF-beta1'den farklı olarak, periodontitisli grupta ölçülen TGF-beta2 konsantrasyonları ilk 2 hafta yüksek bulunmuştur, 3. ve 4. haftalarda ise ölçülen sitokin konsantrasyonlarının düştüğü gözlenmiştir. 1. ve 2. haftalarda TGF-beta2 seviyeleri, tek başına atorvastatin ve atorvastatin+kitosan jellerle düşük bulunmuştur. 3. ve 4. haftaların sonunda sağlıklı kontrol ve periodontitisli kontroller karşılaştırıldığında TGF-beta2 düzeyleri yönünden farklılık gözlenmemiştir. TGF-beta2 ile yapılan çalışmalarda, atorvastatin içeren suda çözünen kitosan jel uygulanan grupta sitokin konsantrasyonlarının 3. haftadan sonra arttığı gözlenmiştir.



**Şekil 4.41.** Sıçan diş eti dokularında TGF-beta2 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).

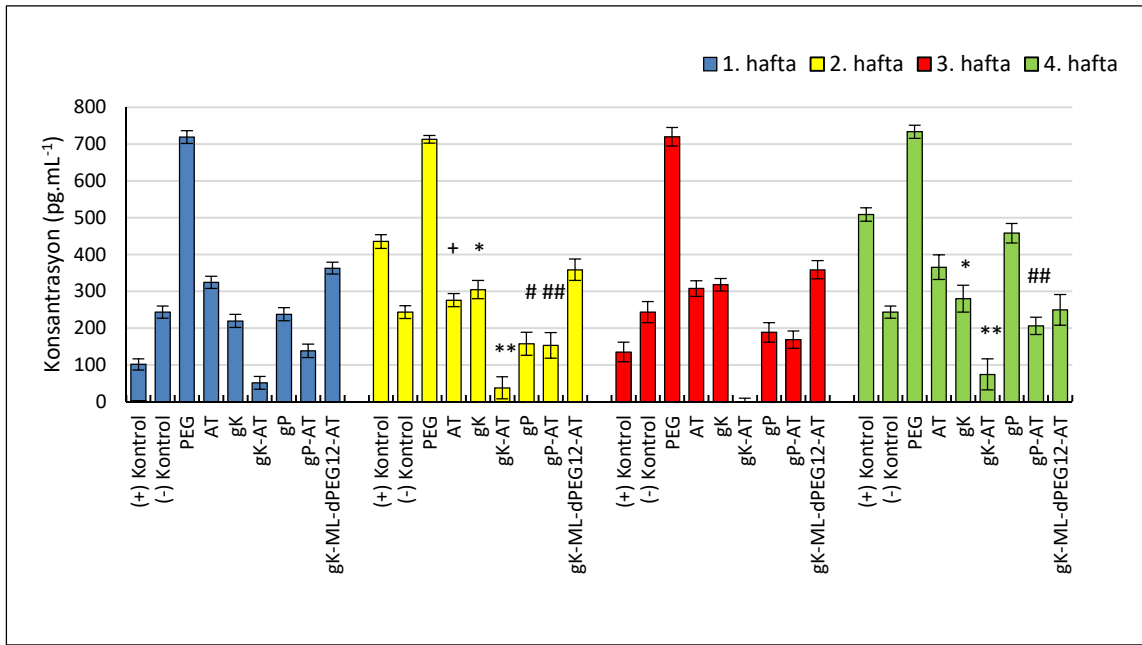


**Şekil 4.42.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta2 seviyeleri (4 saat sonra)

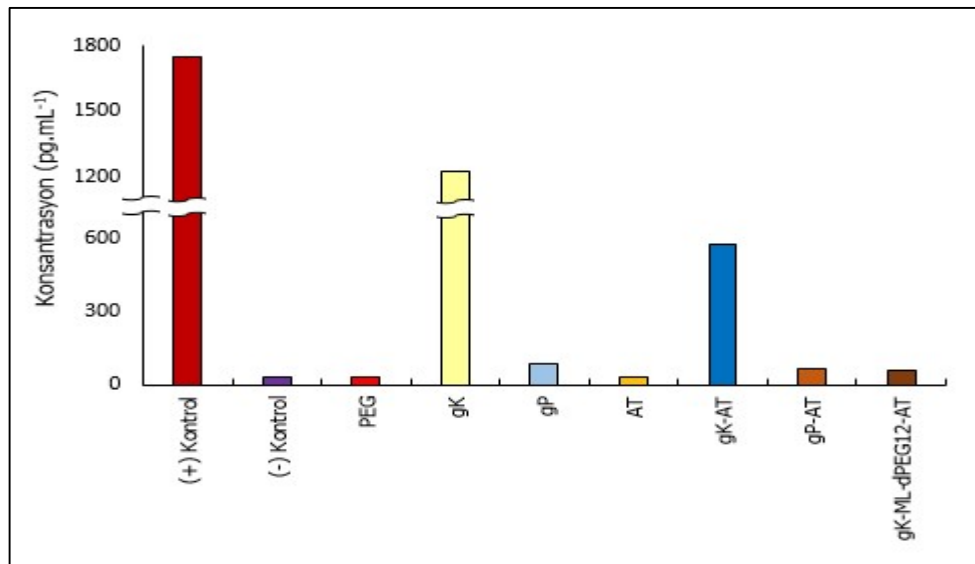
### **Sıçan dokularındaki TGF-beta3 düzeyleri:**

Sıçan dokularında ligatür tekniği ile inflamasyon oluşturulan sağ ve sol üst 2. molar dişlere ait jinvival dokulara, hazırlanan formülasyonların gün aşırı yapılan uygulamalarından sonra 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonunda çıkartılan Sıçan dokularından ölçülen sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. In vivo çalışmalarda elde edilen TGF-beta3 düzeyleri Şekil 4.43'te gösterilmiştir. Bu formülasyonların in vitro çalışmalarına ait grafik ise Şekil 4.44'te verilmiştir.

Periodontitis grubundan ölçülen TGF-beta3 konsantrasyonlarının TGF-beta1'e benzer şekilde, 2. hafta yükseldiği, 3. hafta azaldığı ancak 4. hafta yeniden arttığı gözlenmiştir. İlk hafta ve 3. hafta sağlıklı kontrol ve periodontitistli kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada, sağlıklı kontrol grubundaki Sıçanlarda ölçülen TGF-beta3 konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur. Atorvastatin içeren baz kitosan jel grubunda TGF-beta3 sitokin düzeyi 4 hafta boyunca diğer gruplara göre en düşük bulunmuştur. Atorvastatin içeren baz kitosan ve suda çözünen kitosan jellerle, etkin madde içermeyen jellere göre TGF-beta3 düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Farklı kitosan tipleri karşılaştırıldığında atorvastatin varlığında, baz kitosan jellerle suda çözünen kitosan jellere göre TGF-beta3 değerleri daha düşük bulunmuştur. Sadece atorvastatin içeren grupta haftalar arası TGF-beta3 değerleri bakımından farklılık gözlenmemiştir.



**Şekil 4.43.** Sıçan diş eti dokularında TGF-beta3 seviyeleri  $\pm$  SS. + atorvastatin çözeltisi ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \* gK ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). # gP ve (+)kontrol grubu arasında anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ). \*\* gK-AT ve (+)kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık. ## gP-AT ve (+) kontrol grubu arasındaki anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.44.** Formülasyon (1/2 dilüsyonunda) uygulamasını takiben hGF hücrelerinde TGF-beta3 seviyeleri (4 saat sonra)

### **4.3.2. Histolojik ve Histometrik Analiz Sonuçları**

Histopatolojik değerlendirme için hayvanlardan alınan çene kemiklerinin osteoklastik aktivite ve inflamasyon yönünden değerlendirmesine ait skorlamayı gösteren histolojik mikrograflar Şekil 4.45-4.46'da verilmiştir ve uygulama gruplarının periodontal dokularına ait mikrograflar üzerinde yapılan ölçümler Tablo 4.12-4.19'da verilmiştir.

**Tablo 4.12.** Çıkarılan sıçan çenelerinde mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığının mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>Mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığı (µm)</b>												
(+) Kontrol	342,5	510	73	191	197	186	169	372	108	271	423	247
(-) Kontrol	41	94	0	41	94	0	41	94	0	41	94	0
PEG400	431,5	970	218	257	535	64	299	836	164	551,5	752	172
AT	243	1309	0	312	607	0	241	473	104	280,5	414	126
gK	123	198	48	177	212	117	634	770	319	253,5	431	146
gK-AT	252	898	133	157	290	0	250	581	176	131,5	398	0
gP	164,5	285	73	226	947	179	153	445	86	240	484	190
gP-AT	293	698	117	231	318	101	111	149	74	229,5	536	175
gK-ML-dPEG12-AT	252	256	248	318	1611	294	575	852	153	714,5	927	532



**Tablo 4.13.** Çıkarılan sıçan çenelerinde mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığının mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>Mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığı (µm)</b>												
(+) Kontrol	790,5	1079	689	570	673	504	747	804	501	868	884	438
(-) Kontrol	351	679	238	351	679	238	351	679	238	351	679	238
PEG400	612,5	877	499	693	987	553	979	1837	574	894	1052	736
AT	651	1895	462	764	1270	496	691	902	400	696,5	973	508
gK	544	669	419	706	1726	588	1291	1589	620	568,5	1081	414
gK-AT	895	1446	413	564	800	479	558	684	502	523,5	945	309
gP	686,5	887	499	628	678	586	865	1135	596	950	1024	860
gP-AT	787	1800	600	700,5	938	494	450	490	411	741,5	1067	624
gK-ML-dPEG12-AT	735	788	682	596	596	596	1333	1725	989	1011	1225	851

**Tablo 4.14.** Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemiğin dişe olan uzaklığının (üst) mikroskopik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (µm)</b>												
(+) Kontrol	156,5	198	88	157	235	98	186	203	148	151	183	83
(-) Kontrol	133	176	90	133	176	90	133	176	90	133	176	90
PEG400	201	272	146	179	248	91	170	282	133	186	186	186
AT	195	260	103	131	244	83	139	244	129	148,5	225	108
gK	242,5	303	182	186	211	162	195	197	194	163,5	246	77
gK-AT	164,5	225	75	164	246	135	207	225	190	181	198	164
gP	167	305	97	188	254	79	164	188	89	127,5	154	101
gP-AT	226	387	205	131	140	124	232	272	192	186,5	513	137
gK-ML-dPEG12-AT	196	211	182	172	242	0	207	207	207	142	258	132

**Tablo 4.15.** Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemiğin dişe olan uzaklığının (mid) mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (mid) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>												
(+) Kontrol	171	208	92	88	180	75	119	136	93	126	135	111
(-) Kontrol	118	135	12	122	135	89	122	135	89	122	135	89
PEG400	103,5	156	33	98	132	61	95	124	82	111	181	41
AT	108,5	169	93	95	124	86	107	166	75	109	135	92
gK	140,5	153	128	137	215	56	81	170	67	138	162	79
gK-AT	114	144	96	123	164	89	124	141	107	135	154	99
gP	140,5	153	128	80	105	48	164	188	89	101	104	31
gP-AT	105	162	58	95	126	76	130	154	107	125,5	444	87
gK-ML-dPEG12-AT	111	166	82	91,5	135	0	124	124	124	87	171	57

**Tablo 4.16.** Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemiğin dişe olan uzaklığının (alt) mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>Alveolar kemiğin dişe olan uzaklığı (alt) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>												
(+) Kontrol	146	192	132	105	180	89	94	219	52	110	160	78
(-) Kontrol	114	165	12	128	165	99	128	165	99	128	165	99
PEG400	108,5	169	73	124	133	99	114	220	63	94,5	124	65
AT	157	188	96	128	216	96	137	171	112	116	118	56
gK	153,5	191	116	117	148	111	149	186	117	96	150	94
gK-AT	141,5	166	121	144	227	94	118	253	92	85	159	82
gP	143	197	114	88	196	83	98,5	173	90	84	103	58
gP-AT	125	148	106	97	127	81	112	119	105	144	161	99
gK-ML-dPEG12-AT	165	204	88	85	164	0	153	167	51	116	136	101

**Tablo 4.17.** Çıkarılan sıçan çenelerinde alveolar kemik alanının mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>Alveolar kemiğin alanı (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>												
(+) Kontrol	155178	220101	48836	199588	262471	136706	129693	140644	118742	210554	248416	206879
(-) Kontrol	295450	439356	173334	295450	439356	173334	295450	439356	173334	295450	439356	173334
PEG400	89221	288908	76241	203332	279094	126552	227809	276980	12770	44499	122076	28119
AT	191145	332739	11190	76962	188523	25117	124518	332853	20106	68896	113871	29781
gK	500032	566667	433396	94890	170675	51528	74185	167406	11386	149227	426746	21667
gK-AT	218037	477011	129358	219143	350970	131297	311026	462486	121560	438491	633959	196957
gP	288969	418845	37140	120136	282115	118860	257924	301800	190664	165622	244213	90764
gP-AT	191490	406349	51169	182687	206885	147866	304560	339688	198423	356327	368051	30818
gK-ML-dPEG12-AT	151255	151623	49363	85917	157129	0	73794	93284	2955	112552	304370	41994

**Tablo 4.18.** Çıkarılan sıçan çenelerinde osteoklastik aktivitenin mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar												
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda			
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	
(+) Kontrol	3	3	2	2	3	2	2	2	3	1	2	3	2
(-) Kontrol	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
PEG400	2,5	3	2	1,5	3	0	1,5	3	3	1	3	3	3
AT	1	3	0	2	3	1	1	3	3	0	2	3	1
gK	0	0	0	2	3	2	1,5	3	3	1	2,5	3	1
gK-AT	1	2	0	1,5	2	0	1,5	3	3	0	1	1	1
gP	0,5	1	0	1	2	0	0,5	2	2	0	2	2	0
gP-AT	1	3	0	0,5	2	0	0,5	1	1	0	1	3	1
gK-ML-dPEG12-AT	2	2	2	3	3	2	3	3	3	2	2	3	1

Osteoklastik aktivite (skor) (0-3)

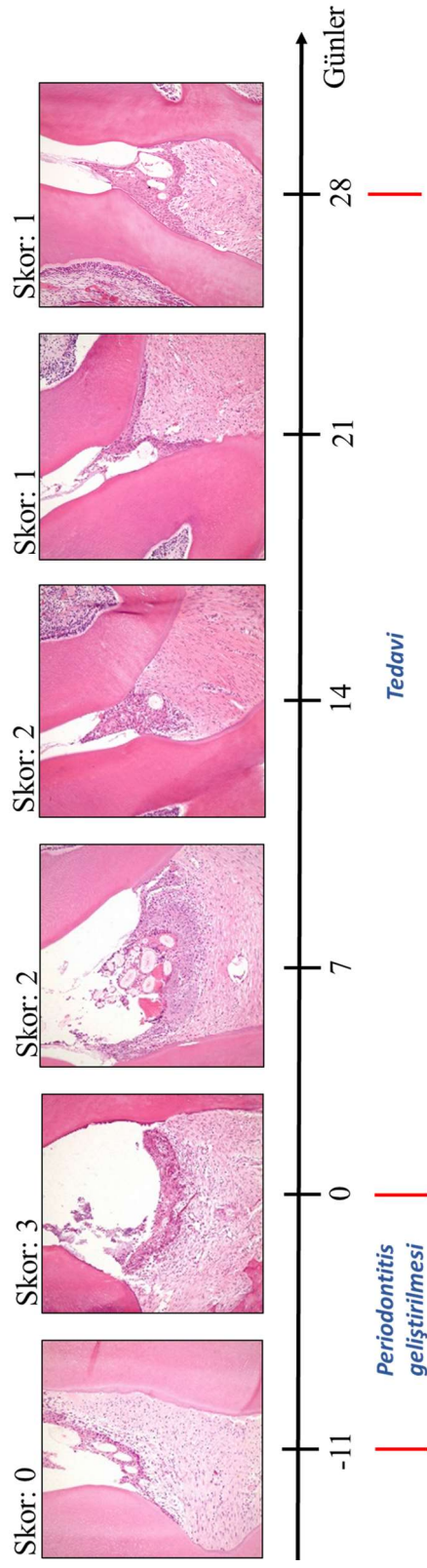
**Tablo 4.19.** Çıkarılan sıçan çenelerinde inflamasyonun mikroskobik olarak değerlendirilmesi

Gruplar	Periyodlar											
	1. hafta sonunda			2. hafta sonunda			3. hafta sonunda			4. hafta sonunda		
	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.	Ortanca	Maks.	Min.
<b>İnflamasyon (skor) (0-3)</b>												
(+) Kontrol	3	3	2	2	3	1	3	3	3	2	3	2
(-) Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEG400	1	3	1	1,5	3	1	2	3	1	2	3	1
AT	1	3	1	1	2	1	2	3	0	1,5	3	1
gK	1	1	1	2	2	1	2	3	1	1	2	1
gK-AT	1	3	0	1	1	1	1,5	3	1	1	1	1
gP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
gP-AT	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
gK-ML-dPEG12-AT	1	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	2

Osteoklastik ve gingival inflamatuvar aktiviteler, semikantitatif olarak osteoklastik ve inflamatuvar aktivite şiddetleri baz alınarak skorlanmıştır. İnflamasyon ve osteoklastik aktivite şiddetine bağlı olarak 0-3 arasında skorlanmıştır.



Şekil 4.45. İnflamasyon değerlendirilmesine ait skorlama (gP-AT)



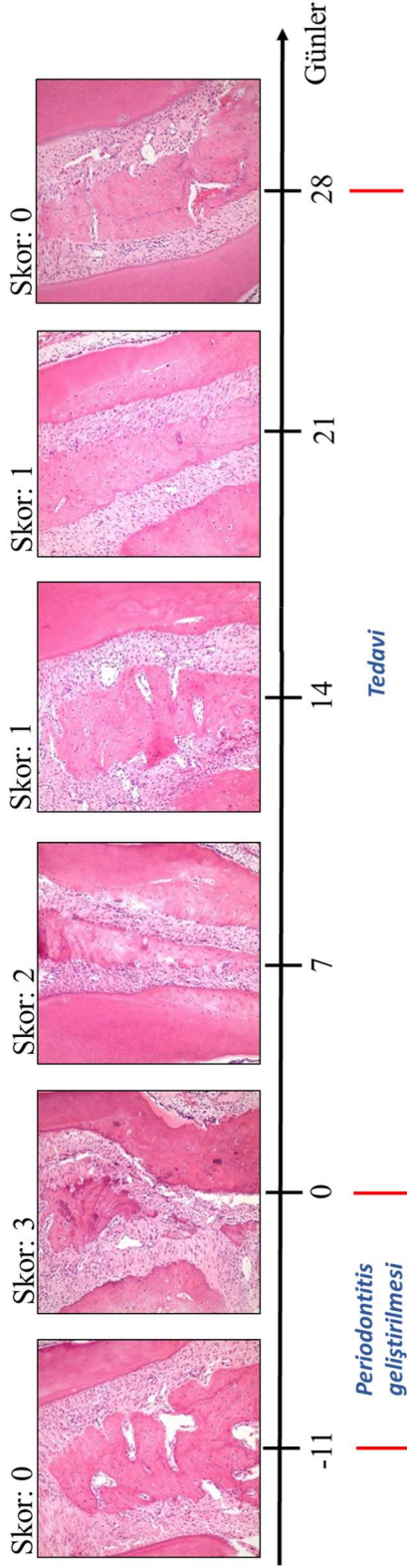
**Skor 0:** İnflamasyon yok

**Skor 1:** Minimal inflamasyon

**Skor 2:** Belirgin intraepitelyal nötrofil infiltrasyonu

**Skor 3:** Bakteri içeren ya da içermeyen eksuda (inflame sızıntı)

**Şekil 4.46.** Osteoklastik aktivite değerlendirilmesine ait skorlama (gK-AT)



**Skor 0:** Değişiklik yok

**Skor 1:** Komşu diş kökleri arasındaki alveolar kemik kreti sınırında minimal düzensizlikler

**Skor 2:** Belirgin osteoklastların varlığı

**Skor 3:** Erimiş alveolar kemik kreti

### **Alveolar kemiğin Alanı:**

Sıçan çene kemiklerine ait kesitler ışık mikroskobu altında incelenmiş ve mikrografik ölçümleri alınarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Deney gruplarında alveolar kemiğin alanına ait ölçümler Şekil 4.47a'da verilmiştir.

1. hafta sonunda periodontitisli kontrol grubunda alveolar kemiğin alanı 155177,5  $\mu\text{m}^2$  ve 4. hafta sonunda 210554  $\mu\text{m}^2$  olarak ölçülmüştür. Atorvastatinin kontrolü olarak uygulama yapılan grupta (PEG400) alveolar kemiğin alanı kronik hale gelen hastalıkla beraber azalmış ve 1. hafta 89221  $\mu\text{m}^2$  bulunan uzaklık 4. haftanın sonunda 44499  $\mu\text{m}^2$ 'e düşmüştür. gK-AT grubunda 1. hafta 218037  $\mu\text{m}^2$  olarak ölçülen kemiğin alanı 4. hafta sonunda 438490,5  $\mu\text{m}^2$  ölçülmüştür. gK-AT grubunda 4. hafta sonunda alveolar kemiğin alanı artmıştır.

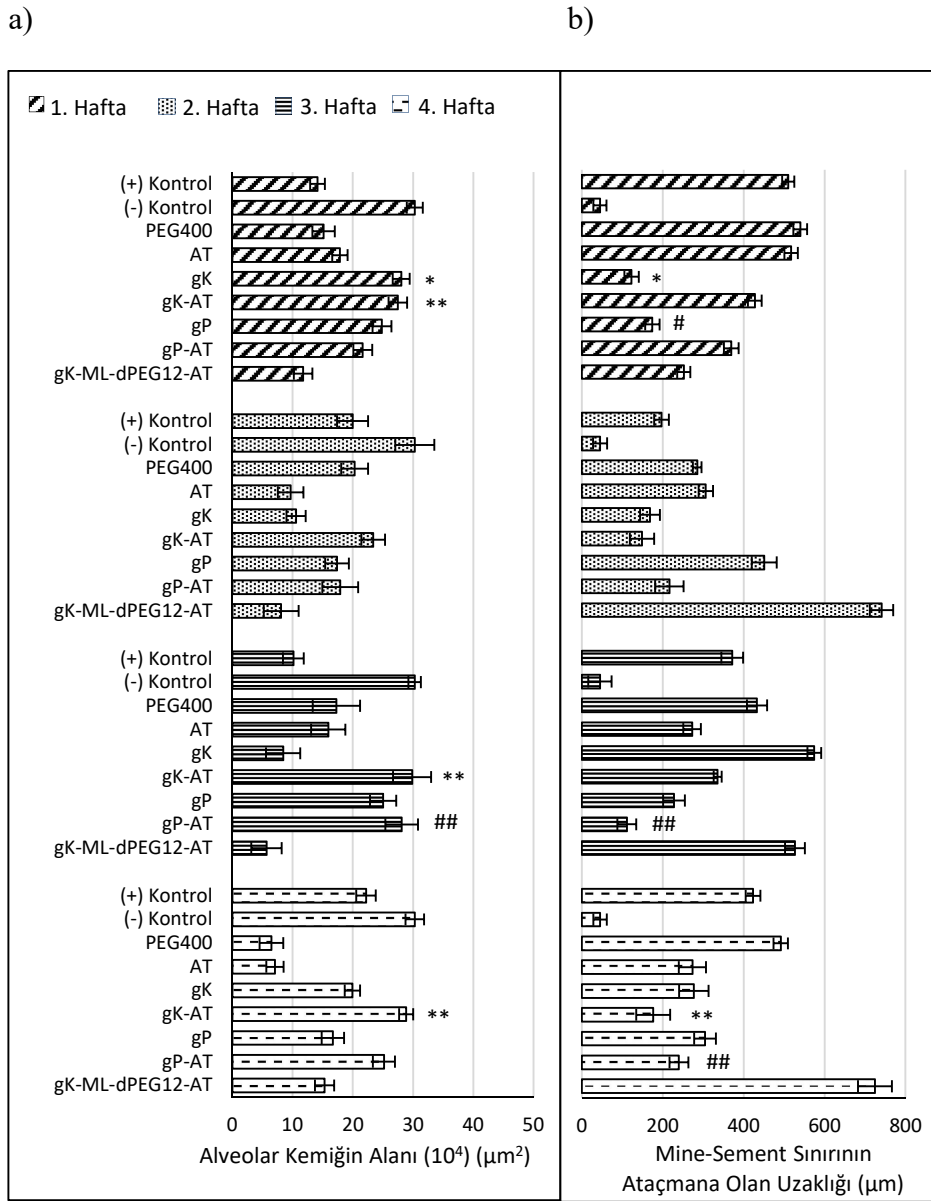
1. hafta gP-AT grubunda kemiğin alanı 191490  $\mu\text{m}^2$  ve 4. hafta 356326,5  $\mu\text{m}^2$  olarak ölçülmüştür. Etkin madde içermeyen kitosan jel gruplarında 4. hafta sonunda alveolar kemiğin alanının azaldığı bulunurken; atorvastatin varlığında kitosan jellerde alveolar kemiğin alanı artmıştır.

### **Mine-Sement Sınırının Ataşmana Olan Uzaklığı:**

Sıçan çene kemiklerine ait kesitler ışık mikroskobu altında incelenmiş ve mikrografik ölçümleri alınarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Deney gruplarında mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığına ait ölçümler Şekil 4.47b'de verilmiştir.

1. hafta sonunda periodontitisli kontrol grubunda bu uzaklık 342,5  $\mu\text{m}$  iken 2. ve 3. haftalarda bu değer azalmış (sırasıyla 191,5  $\mu\text{m}$  ve 169  $\mu\text{m}$ ), ancak 4. hafta sonunda hastalığın kronik hale dönüşmesiyle birlikte bu uzaklık 271  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Atorvastatinin kontrolü olarak uygulama yapılan grupta (PEG400) ise 1. hafta sonunda 431,5  $\mu\text{m}$  bulunan uzaklık 894  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Kontrol gruplarında hastalığın ilerlemesiyle beraber bu uzaklıkların arttığı bulunmuştur.

Atorvastatin içeren baz kitosan jel (gK-AT) uygulaması yapılan grupta 1. hafta sonunda 252  $\mu\text{m}$  olarak ölçülen uzaklık, uygulama sonucu 4. hafta sonunda 131,5  $\mu\text{m}$ 'ye düşmüştür. Atorvastatin içeren suda çözünen kitosan jel (gP-AT) uygulaması yapılan grupta ise bu ölçümler 1. hafta sonunda 293  $\mu\text{m}$  ve 4. hafta sonunda 229,5  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Atorvastatin varlığında kitosan jel uygulamalarında mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklıkları azalmıştır. Sadece atorvastatin uygulaması yapılan grupta ise 1. hafta 243  $\mu\text{m}$  olan mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığı 4. hafta sonunda 280,5  $\mu\text{m}$ 'ye yükselmiştir.



Şekil 4.47. a) Alveolar kemiğin alanı; b) Mine-sement sınırının ataçmana olan uzaklığı

### Mine-Sement Sınırının Alveolar Kemiğe Olan Uzaklığı:

Sıçan çene kemiklerine ait kesitler ışık mikroskobu altında incelenmiş ve mikrografik ölçümleri alınarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

1. hafta sonunda periodontitisli kontrol ((+) kontrol) grubunda bu uzaklık 790,5 μm ölçülmüştür. 2. hafta hastalığın ilerlemesi yavaşlamış ve bu uzaklık 570,5 μm olarak

ölçülmüştür. 3. ve 4. haftalarda ise kronik hale dönüşerek ilerlemeye devam eden periodontal hastalıkta bu uzaklıklar sırasıyla 747 µm ve 868 µm olarak ölçülmüştür. gK-AT grubunda 1. hafta 895 µm olarak ölçülen uzaklık 4. hafta sonunda 523,5 µm olarak bulunmuştur. gP-AT grubunda ise 1. hafta ölçülen uzaklık 787 µm iken 4. hafta sonunda bu uzaklık 741,5 µm bulunmuştur. Sadece AT uygulanan grupta ise 1. haftaya göre 4. hafta sonunda bu uzaklığın arttığı tespit edilmiştir (sırasıyla 651 µm ve 696,5 µm). Etkin madde içermeyen baz kitosan jel grubunda ilk hafta 544 µm olarak bulunan uzaklık sonraki haftalarda hastalığın ilerlemesiyle birlikte artarken 4. haftada iyileşme ile 568,5 µm ölçülmüştür.

### **İnflamasyon Skoru:**

1. hafta sonunda periodontitisli kontrol grubunda inflamasyon skoru “3” tür. Diğer haftalarda ise bu skor sırasıyla “2, 3, 2” olarak devam etmiştir. Atorvastatinin kontrolü olan grupta (PEG400) ilerleyen haftalarda inflamasyon skoru yükselmiştir, 1. hafta “1” olan skor 4. hafta sonunda “2”ye yükselmiştir. gK-AT grubunda ise ilk hafta “1” olan skor, 4. haftada da “1” olarak tespit edilmiştir. gP-AT grubunda ise 1. hafta sonunda “2” olarak tespit edilen skor uygulama devam ettikçe diğer haftalarda “1”e düşmüştür. Atorvastatin içeren kitosan jellerin antiinflamatuvar etkileri bulunmaktadır. Etkin madde içermeyen suda çözünen kitosan ve baz kitosan jellerde de antiinflamatuvar etki saptanmıştır.

### **Osteoklastik Aktivite:**

1. hafta sonunda periodontitisli kontrol grubunda osteoklastik aktivite skoru “3” tür. Diğer haftalarda ise bu skor “2” olarak tespit edilmiştir. Atorvastatinin kontrolü olarak uygulama yapılan grupta (PEG400) ilk hafta “2,5” olan osteoklastik aktivite hastalığın ilerlemesiyle birlikte 4. haftanın sonunda “3”e yükselmiştir. gK-AT grubunda ise ilk hafta “1” olarak tespit edilen skor, 2. ve 3. haftalarda “1,5” ve 4. hafta “1” olarak tespit edilmiştir. gP-AT grubunda 1. hafta “1” olarak bulunana osteoklastik aktivite 2. ve

3. haftalarda “0,5”e düşmüş ve 4. haftanın sonunda ise “1” olarak tespit edilmiştir. Etkin madde içermeyen kitosan jel gruplarında 4. haftanın sonunda osteoklastik aktivite yükselmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bu bölümde gerçekleştirilen çalışmaların ve elde edilen bulguların genel bir değerlendirmesi yapılarak sonuçları tartışılacaktır.

### **Geliştirilen Formülasyonların Teknolojik Olarak Değerlendirilmesi**

Bu çalışmada, periodontal hastalığın tedavisinde antiinflamatuvar etkisinden yararlanılacak şekilde statin grubu etkin madde içeren lokal olarak uygulanacak bir taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla etkin madde olarak antiinflamatuvar (53, 205) ve kemik iyileştirici (206) özelliği gösterilen atorvastatin seçilmiştir. Formülasyonda taşıyıcı olarak biyoadeziv ve biyoparçalanabilir özelliğe sahip bir polimer olan kitosan kullanılmıştır. Kitosanın ayrıca antiinflamatuvar, doku iyileştirici etkilerinin olması da bu seçimi desteklemiştir. Formülasyon şekli olarak jel hazırlanması tercih edilmiştir. Jel sistemleri hasta tarafından daha kolay uygulanabilmesi, uygulama bölgesinde biyoadeziv özelliğinden dolayı uzun süre kalabilmesi (47, 61, 207) ve istenen süre boyunca istenen hızda etkin madde salımını sağlaması ve dayanıklılığının iyi olması gibi avantajlardan dolayı tercih edilmiştir.

Öncelikle atorvastatin için bir miktar tayini yöntemi (ultraviyole spektrofotometrik yöntem) geliştirilip ve validasyonu yapmıştır. Seçilen etkin maddemizin çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle, çözünürlüğü artıracak yöntemler araştırıldı ve katı dispersiyonunun hazırlanmasına karar verildi. Bu amaçla farklı polimerlerden (PEG6000, pluronik F-68, baz kitosan) hareketle farklı hazırlama yöntemleri kullanılarak atorvastatin katı dispersiyonları hazırlanmıştır. Pluronik F-68 kullanılarak birlikte buharlaştırma yöntemiyle 1:12 etkin madde:polimer oranında hazırlan katı dispersiyonun çözünürlüğü en yüksek bulundu ( $5.55 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Suda çözünen kitosanla yapılan katı dispersiyon hazırlama denemelerinde uygun sonuç alınmadığı için çalışmalara katı dispersiyon çalışmalarında kullanılmamıştır.



Suda çözünen ve hidrofilik polimerlerle hazırlanan katı dispersiyonlarda ıslanabilirlik artmakta ve taşıyıcı içinde disperse edilen etkin madde amorf yapı kazandığı için çözünürlük artmaktadır. Partikül boyutu küçültme yöntemleri de çözünürlüğü artırmaktadır (132, 208). Hazırlanan katı dispersiyonlarla atorvastatinin çözünürlüğü artmıştır. Pluronik F-68 surfaktan olarak yüzey gerilimini düşürmektedir (209), bu polimerle hazırlanan katı dispersiyonun çözünürlüğü en yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan statin grubu bir etkin madde olan suda çözünürlüğü düşük olan atorvastatinin çözünürlüğü artırmak amacıyla katı dispersiyon oluşturma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle partikül boyutu küçültülür, partiküllerin ıslanabilirliği artar, partiküllerin porozite (132) ve böylece çözünürlük artar. Ayrıca bu katı dispersiyon oluşturma yöntemleriyle ilaçların biyoyararlanımı artmaktadır.

Çalışmamızda farklı polimerler ve farklı hazırlama teknikleriyle katı dispersiyonlar oluşturulmuş ve daha sonra atorvastatinin katı formlarının çözünürlüklerine bakılmıştır. Suda ve pH 6.8 fosfat tamponunda yapılan çalışmada atorvastatin çözünürlüğü katı dispersiyonlarla artmıştır.

Katı dispersiyonlar üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılarak etkin madde-polimer etkileşimleri ve ilacın kristal özellikleri incelenmiştir.

İlk olarak X-ışını kırınım çalışmaları ile atorvastatin ve katı dispersiyonlarının kristal yapısı incelenmiştir. Hazırlanan katı dispersiyonlarda atorvastatine ait yoğun karakteristik difraksiyon piklerinin kaybolduğu gözlenmiştir. Ayrıca piklerde görülen kaymalar etkin madde-polimer etkileşimini göstermektedir. Hazırlanan katı dispersiyonlarda atorvastatin kristal özelliğini kaybederek amorf yapı kazanmıştır (210).

İlacın kristal özelliğinin incelenmesi amacıyla yapılan diferansiyel taramalı kalorimetri çalışmasında kademeli sıcaklık artışıyla atorvastatin ve katı dispersiyonlarının termogramları çekilmiştir. Atorvastatine ait 165 °C'de elde edilen erime pikine katı

dispersiyon formlarında rastlanmamıştır. Bu durum atorvastatinin kristal özelliğini kaybettiğini göstermektedir (129).

Fourier transform infrared spektroskopisi çalışmasında etkin madde-polimer etkileşimleri incelenmiştir. Elde edilen spektrumlarda atorvastatinin yapısına ait karakteristik bantların hazırlanan katı dispersiyonlarda kaybolduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar diferansiyel taramalı kalorimetri ve X-ışını kırınım çalışmalarıyla uyumludur.

Taramalı elektron mikroskobu altında yapılan çalışmada atorvastatine ait kristal, çubuk görünümlü ve düzgün şekilli yapısına katı dispersiyon formlarında rastlanmamıştır. Hazırlanan katı dispersiyonlarda, düzensiz şekilli partiküller elde edilmiştir. Bu çalışma etkin madde ve polimer arasında etkileşim olduğunu ve atorvastatin sahip olduğu kristal yapısını kaybederek amorf forma geçtiğini göstermektedir (129).

Taşıyıcı olarak çözünürlükleri farklı tipte kitosan kullanılmıştır. Bu amaçla baz kitosan ve suda çözünen kitosan kullanılmıştır. Suda çözünen kitosan (protasan), kitosanın klorür tuzudur. Baz kitosan ve protasanın deasetilasyon dereceleri farklıdır, sırasıyla %86, %85. Ayrıca molekül ağırlıkları ve çözünme ortamları bakımından da farklılık gösterirler. Baz kitosan dilüe asidik çözeltilerde çözünürken protasan suda çözündürülerek hazırlanır. Formülasyon geliştirirken öncelikle jel formülasyonları hazırlanmış ve atorvastatin bu jel formülasyonlarına doğrudan eklenerek biyoadezyon, viskozite, salım çalışmaları yapılmıştır.

İlk olarak viskozite çalışmaları yapılmış ve tüm jel formülasyonlarının psödoplastik akış gösterdikleri bulunmuştur. Bu akış sistemlerinde kayma hızı arttıkça jellerin viskozitesi azalmaktadır. Kullanılan farklı kitosan tiplerinin viskozite üzerine etkisi incelendiğinde baz kitosan jellerin viskozitesi suda çözünen kitosan jellerin viskozitesine göre daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu farklılık kullanılan kitosan tiplerinin farklı deasetilasyon dereceleri (78, 211) molekül ağırlığı ve farklı

çözünürlüklere sahip olmasından kaynaklanıyor olabilir. Baz kitosan dilüe asidik çözeltilerde iyi bir viskozite artırıcı ajandır.

Daha sonra jellerin biyoadezif özellikleri incelenmiştir. Öncelikle baz kitosan ve suda çözünen kitosan jeller karşılaştırıldığında baz kitosanın biyoadezif özelliği suda çözünen kitosana göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Baz kitosan jellerin biyoadezif özelliklerinin farklı olması, baz kitosan ve kitosan tuzu olarak farklı çözünürlük özelliklerine sahip olup (78) yüzeylere tutunma özelliklerinin değişmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Formülasyonlara etkin madde ilavesi biyoadezif özelliği artırmıştır ( $p<0.05$ ).

Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapılan in vitro salım çalışmalarında ise kullanılan farklı kitosanların salım profilleri üzerine etkisi incelendiğinde, baz kitosan ve suda çözünen kitosan ile hazırlanan jellerden salınan etkin madde konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Kitosan jeller atorvastatinin salımını yavaşlatmıştır (4. saatin sonunda baz kitosan ve protasan jellerden salım konsantrasyonları sırasıyla  $1,5\pm 0,45$  ve  $1,45\pm 0,16$  bulunurken kontrol olarak kullanılan PEG400 içindeki atorvastatinde bu değer  $16,91\pm 0,73$  bulunmuştur). İn vitro salım değerlerine bakıldığında; etkin madde salımının düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, etkin maddenin kristal yapıya sahip olması ve sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından kaynaklanmıştır (212, 213).

Jellerden salımları düşük bulunan ve çözünürlüğü düşük olan atorvastatinin ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) hazırlanan katı dispersiyonları jel formülasyonlarına eklenmiş ve bu formülasyonların in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Viskozite çalışmalarında tüm jel formülasyonlarının psödoplastik akış gösterdikleri bulunmuştur. Jellerin uygulama bölgesinde kolayca sürülebilmesi için istenilen bir özelliktir.

Farklı polimerlerle hazırlanan katı dispersiyonların jel formülasyonlarında kullanılan polimerler karşılaştırıldığında baz kitosan ile hazırlanan formülasyonların viskozitesi en yüksek bulunurken, PEG 6000 ile hazırlanan katı dispersiyon jellerinin viskozitesi en düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Baz kitosan hidrofilik yapıda bir polimerdir, yapısında su tutarak şişer, bu nedenle viskoziteyi artırır (214) Farklı etkin madde:polimer oranlarında hazırlanan katı dispersiyonların jel formülasyonlarında kullanılan oranlar karşılaştırıldığında, 1:12 etkin madde:polimer oranıyla hazırlanan formülasyonların viskozitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Artan polimer oranlarıyla jellerin kıvamları artmıştır. Jel formülasyonlarının viskoziteleri atorvastatin varlığında daha yüksek bulunmuştur. Katı dispersiyonların jel formülasyonlarında hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında baz kitosan ve PEG 6000 için sırasıyla birlikte öğütme ve ertime yöntemleriyle diğer yöntemlere göre viskozite daha yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ); pluronik F-68 polimerinde hazırlama yöntemlerinin viskozite üzerine etkileri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Daha sonra jellerin biyoadezif özellikleri incelenmiştir. Katı dispersiyonlarda polimer oranı arttıkça jel formülasyonlarının kıvamları artmıştır. Baz kitosan katı dispersiyonlarıyla hazırlanan jellerde kıvamlı bir kütle elde edilmiş ve viskozitesi yüksek ancak biyoadezif özelliği düşük formülasyonlar elde edilmiştir. Katı dispersiyon hazırlanmasında kullanılan polimer çeşitleri karşılaştırıldığında pluronik F-68 ile elde edilen jel formülasyonlarının biyoadezif özellikleri en yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Artan polimer oranıyla hazırlanan katı dispersiyonların jel formülasyonlarında polimer oranının biyoadezif özellik üzerindeki etkisi anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Katı dispersiyonları hazırlama yöntemleri arasında yapılan karşılaştırmada pluronik F-68 ve PEG 6000 için sırasıyla birlikte buharlaştırma ve eritme yöntemleriyle diğer yöntemlere göre daha yüksek biyoadezyon değerleri elde edilirken ( $p<0.05$ ), baz kitosan için hazırlama yöntemlerinin biyoadezif özellik üzerindeki etkisi anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Formülasyonlar üzerinde şırınga edilebilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, formülasyonların periodontal cebe uygulanması açısından önemlidir (198, 199). Baz kitosan ve suda çözünen kitosan jeller karşılaştırıldığında baz kitosanın şırınga edilebilirlik işine ait değerler suda çözünen kitosana göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Yani baz kitosanla hazırlanan jellerin enjektörden itilebilmesi için daha fazla kuvvete ihtiyaç duyulmuştur. Bu sonuç viskozite çalışmasında ve biyoadezyon çalışmasında elde edilen verilerle uyumludur (198). Katı dispersiyonların hazırlanmasında kullanılan polimerler karşılaştırıldığında, baz kitosan ile hazırlanan formülasyonların şırınga edilebilirlik işi değerlerinin diğer polimerlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu sonuç viskozite çalışmasıyla uyumludur. Pluronik F-68 ile hazırlanan katı dispersiyonların jellerinin şırınga edilebilirlik işi değerleri ise diğer polimerlere göre daha düşüktür ( $p<0.05$ ). Hazırlanan katı dispersiyonlarda polimer oranı arttığında formülasyonları şırıngadan itmek zorlaşmıştır. Bu durum viskozite çalışmasında, artan polimer oranıyla gözlenen viskozite artışıyla uyumlu bulunmuştur.

İn vitro salım çalışmalarında 6 saat sonunda elde edilen veriler incelendiğinde, hazırlanan katı dispersiyonlarla çözünürlüğü artmış olan atorvastatinin kitosan jellerden salınan konsantrasyonları da artmıştır ( $p<0.05$ ) (129). Artan polimer oranıyla hazırlanan katı dispersiyonların jel formülasyonlarında polimer oranının salınan etkin madde konsantrasyonu üzerindeki etkisi anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Katı dispersiyonların jel formülasyonlarında hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında baz kitosan ve PEG 6000 için sırasıyla birlikte öğütme ve eritme yöntemleriyle diğer yöntemlere göre salım daha yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ); pluronik F-68 polimerinde hazırlama yöntemlerinin salınan etkin madde konsantrasyonu üzerine etkileri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Yapılan salım çalışmalarında katı dispersiyon hazırlama yöntemleriyle etkin maddenin çözünürlüğünün artmasıyla salınan etkin madde konsantrasyonu artmasına rağmen, elde edilen salım değerleri hala düşüktür. Bu durumun ilacın sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

### **Formülasyonlarda Antiinflamatuvar Etkinin In Vitro Değerlendirilmesi**

Atorvastatinin periodontal hastalıkta inflamasyonu tetikleyici rol oynayan interlökinleri inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (54, 183, 184). Çalışmamızda öncelikle in vitro olarak antiinflamatuvar etkinin değerlendirilmesi için TNF-alfa ile uyarılan insan gingival fibroblast hücrelerinde (215) formülasyonların uygulandıktan sonra sitokin seviyelerine bakılmıştır.

Periodontal hastalık durumunda IL-1beta seviyesinin arttığı bildirilmiştir (216). Çalışmamızda jel formülasyonları uygulandığında IL-1beta sitokin seviyelerinde düşüş olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Diğer bir deyişle formülasyonlar sitokin salımlını inhibe ederek inflamasyonu azaltmıştır. Bu etki 8 saatlik takip süresi boyunca devam etmiştir. Fong ve ark. (217) deasetilasyon derecesi %80 ve molekül ağırlıkları 10 ve 90 kDa olan kitosanlar ile yaptıkları çalışmada, IL-1beta seviyesinin kontrole göre sırasıyla 2 ve 5 kat arttığını, aynı çalışmada suda çözünen kitosan oligomerlerinin IL-1beta seviyesini değiştirmediğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da, etkin madde içermeyen kitosan jelleri karşılaştırıldığında, baz kitosan uygulamasından sonra ölçülen IL-1beta seviyesi suda çözünen kitosana göre yüksek bulunmuştur. Ancak literatürde kitosan ile yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı çalışmalarda kitosanın IL-1beta seviyesini artırdığını (218-220), bir çalışmada (221) kitosanla uyarılan dendritik hücrelerin ve makrofajların farklılaşmasında IL-1beta seviyesinin zamanla azaldığı, başka bir çalışmada ise (222) fibroblast hücrelerinde kitosanın IL-1beta üzerinde bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bu farklılık, uyarılan hücrelerin farklı olmasından ve uygulanan kitosanların farklı özelliklere (ör. farklı deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı vb) sahip olmasından kaynaklanmaktadır (223). Farklı kitosan tipleri için sitokin seviyelerinde fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Atorvastatin ilave edilen jel formülasyonlarında ise IL-1beta tamamen inhibe edilmiştir. Bu durum atorvastatinin IL-1beta seviyesini düşürerek antiinflamatuvar etki göstermesiyle açıklanabilir (25, 216, 224). Atorvastatinin katı dispersiyonlarını içeren jel formülasyonlarında da benzer antiinflamatuvar etki

gözlenmiştir. Farklı polimerlerle hazırlananlar arasında antiinflamatuvar etki yönünden fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

IL-6 sitokin düzeyleri incelendiğinde, benzer şekilde formülasyonların uygulamasını takiben kontrole göre sitokin seviyesinde düşüş gözlenmiştir ( $p<0.05$ ) ve 8 saat boyunca antiinflamatuvar etkinin devam ettiği gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada benzer şekilde statin grubu etkin maddelerin IL-6 sitokin seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (225). IL-6 sitokin inhibisyonu üzerine kitosanın etkisi ile ilgili olarak liteSıçanürde farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda kitosanın IL-6 seviyesini düşürdüğü (221, 226-228), bazı çalışmalarda IL-6 seviyesini artırdığı (219, 229) ve bazılarında ise IL-6 seviyesi üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir (222, 230). Çalışmamızda, jel formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan farklı kitosan tipleri karşılaştırıldığında, baz kitosana göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 4 saat sonunda atorvastatin ve atorvastatin içeren suda çözünen kitosan jel karşılaştırıldığında, suda çözünene kitosan jelde IL-6 seviyesi daha düşük bulunmuştur. Corradetti ve Bruna (223) suda çözünen kitosanın IL-6 seviyesini düşürdüğünü bildirmiştir. Çalışmamızda, farklı atorvastatin katı dispersiyonları ile hazırlanan jeller arasında ise antiinflamatuvar etki açısından fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

IL-1beta ve IL-6 değerlerine benzer şekilde, tüm formülasyonlarda IL-8 seviyeleri kontrole göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ), yani yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir. Suda çözünen kitosanın baz kitosana göre daha yüksek antiinflamatuvar etki gösterdiği gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Kim ve ark. (231) suda çözünen kitosanın IL-8'i düşürdüğünü bildirmiştir. Ancak liteSıçanürde kitosanın IL-8 salımını artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (222, 228, 230, 232, 233). Statin grubu etkin maddelerin ise IL-8 sitokin seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir (225). Bizim çalışmamızda da jellere atorvastatin eklendiğinde sitokin seviyelerinde düşüş görülmüştür.

IL-10 seviyelerine bakıldığında, suda çözünen kitosan ile baz kitosana göre daha düşük IL-10 seviyesi elde edilmiştir, yani antiinflamatuvar etki daha yüksek bulunmuştur. Ancak atorvastatin içeren jellerin IL-10 inhibisyonu tek başına atorvastatine göre daha az

olduğu görülmüştür. Farklı atorvastatin katı dispersiyonları içeren jel formülasyonlarında ise antiinflamatuvar etki açısından fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). IL-10 immünsüpresif etkileri bulunan bir sitokin olup, proinflamatuvar sitokinleri inhibe ettiği gösterilmiştir (234). Yapılan çalışmalarda periodontitisli dokularda IL-10 seviyelerindeki birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir (235-237). Kitosanın ise IL-10 seviyesini artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (220, 221, 229).

TGF-beta1 düzeyleri incelendiğinde, kitosan tipine göre farklılık gözlenmiştir. Tek başına baz kitosan ile suda çözünen kitosana göre daha iyi bir inhibisyon elde edilmiş ( $p<0.05$ ) olmasına karşın, atorvastatin içeren formülasyonlarda etki yönüyle benzer sonuç elde edilmiştir. 8.saatte atorvastatin içeren formülasyonlarda TGF-beta1 inhibisyonunun azaldığı gözlenmiştir. LiteSıçanürde de atorvastatinin TGF-beta1 üzerinde farklı sonuçlar verdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Tie ve ark. (238) atorvastatinin TGF-beta1 seviyesi üzerine etkisi olmadığını gösterirken, Wei ve ark. (239) atorvastatinin TGF-beta1 seviyesini düşürdüğünü bildirmiştir. Benzer şekilde kitosanın TGF-beta1 inhibisyonu/salımı üzerinde farklı sonuçlar bildirilmiştir. (221, 223, 228, 232). Bizim sonuçlarımızda da kitosan varlığında daha yüksek TGF-beta1 düzeyleri elde edilmiştir. Katı dispersiyonlarda jel formülasyonlarında, kullanılan farklı polimerler ve farklı hazırlama yöntemleri karşılaştırıldığında TGF-beta1 seviyeleri bakımından aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Etkin madde içermeyen farklı tipteki kitosan jeller arasında TGF-beta2 sitokin seviyeleri bakımından bir fark bulunmamıştır ancak kontrole göre bir inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Atorvastatin eklendiğinde ise TGF-beta2 inhibisyonu artmıştır. Atorvastatin katı dispersiyonlarını içeren jellerde ise inhibisyon düzeyi daha düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Suda çözünen kitosan varlığında baz kitosana göre katı dispersiyon içeren formülasyonlarda daha iyi bir antiinflamatuvar etki gözlenmiştir. Hücrelerden serbest bırakılan sitokin seviyelerindeki bu fark kitosanın çözünürlük farkına bağlanabilir (223). Farklı atorvastatin katı dispersiyonları ile de farklı değerler elde edilmiştir. Özellikle PEG ile hazırlanan katı dispersiyonlarda diğerlerine göre TGF-beta2 salımı daha az inhibe



edilmiştir ( $p>0.05$ ). İnflamasyon durumunda dokulardan alınan cevaplarda TGF-beta2 seviyelerinde farklılık olduğu bildirilmektedir. Bazı durumlarda inflame dokularda TGF-beta2 sitokinleri saptanırken diğer örneklerde TGF-beta2'nin serbest bırakılmadığı tespit edilmiştir (240). Başka bir çalışmada ise diş eti oluğu sıvısı alınan periodontitisli ve sağlıklı örnek gruplarında TGF-beta2 seviyesinin her iki grupta da çok yüksek olduğu bildirilmiştir (241). Wang ve ark. (242) atorvastatinin TGF-beta2 seviyesini düşürdüğünü bildirmiştir.

TGF-beta3 ile yapılan çalışmalarda tek başına baz kitosan jel ile TGF-beta3 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Etkin madde içeren katı dispersiyonların jel formülasyonlarında, kullanılan kitosan tipine göre TGF-beta3 seviyeleri farklılık göstermiştir (223). Suda çözünen kitosan ile baz kitosana göre daha düşük TGF-beta3 seviyesi elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). Katı dispersiyonların jel formülasyonlarında, TGF-beta3 seviyeleri açısından kullanılan farklı polimerler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). İnhibisyon 4 saatte daha yüksekken 8 saatte TGF-beta3 düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir. Kitosan varlığı bunu engelleyememiştir.

In vitro çalışmalarının genel bir değerlendirmesi yapıldığında, kitosan+ atorvastatin içeren formülasyonların insan gingiva fibroblast hücrelerinde oluşturulan inflamasyon üzerine etkili olduğu ve incelenen sitokin (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10) düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir düşüş olduğu ( $p<0.05$ ) görülmektedir. Kitosan varlığında atorvastatinin antiinflamatuvar etkisi artmıştır ( $p<0.05$ ). TGF beta 1, 2 ve 3 ile yapılan çalışmalarda ise sitokinlerin inhibisyonları arasında formülasyonlara göre farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar gerek kitosanın farklı tipte olması gerekse, gerekse atorvastatinin çözünürlüğü nedeniyle olabilir.

### **Formülasyonlarda Antiinflamatuvar Etkinin In Vivo Değerlendirilmesi**

Periodontal hastalığın tedavisinde statinlerin kullanılması antiinflamatuvar ve kemik iyileştirici etkisi ve inflamasyon belirteçleri olan sitokinleri inhibe etmesi açısından

önemlidir. Geliştirilen formülasyonlarla, tedavide periodontal ligamentlerin ve alveolar kemiğin dejenere olması ve ataşman kaybına kadar giden süreçte tetikleyici rol oynayan sitokinlerin inhibe edilerek serbest bırakılmalarının önlenmesi incelenerek antiinflamatuvar etkinin gösterilmesi hedeflendirilmiştir (36, 243). In vivo çalışmalarımızda, her deney periyodunda alınan doku örneklerinde IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, TGF-beta1, TGF-beta2 ve TGF-beta3 sitokinlerin seviyelerine bakılmıştır.

Çalışmalarımızda uygulanan ligatürler indüksiyon modeli ile ortalama 11. günde periodontitis başarılı bir şekilde oluşturulduğu görsel ve histolojik olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak 11. günün sonunda alınan çene kemiklerinde alveolar kemik kaybı ve ataşman kaybı görülmüştür (244-246). Periodontitis geliştiği belirlenen sıçanlara uygulamalar başlamıştır.

Yapılan çalışmalarda periodontitisli grupta, diş eti oluğu sıvısından ve/veya tükürükten alınan örneklerde sağlıklı gruplara göre IL-1beta (25, 216, 224), IL-6 (25, 224, 247, 248) ve IL-8 (25, 247, 248) sitokin seviyelerinin yüksek olduğu bildirilirken, IL-10 sitokini seviyelerinin örneklere göre değişkenlik göstermekte olduğu raporlanmıştır (248). Bir çalışmada sağlıklı grup ve periodontitisli grup arasında yapılan karşılaştırmada, sağlıklı gruptan alınan örneklerde IL-10 seviyesi yüksek bulunurken (249), başka çalışmalarda periodontitisli grup ve sağlıklı gruplar arasında IL-10 seviyeleri bakımından fark bulunmamıştır (250, 251). Bir çalışmada ise IL-10 mRNA ekspresyonları kronik periodontitisli hastaların dişeti dokularında, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, sağlıklı dokulara kıyasla seviyesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (237).

TGF-beta1 ile yapılan çalışmalar hasta gruplarda sağlıklı grupların örneklerine göre daha yüksek TGF-beta1 bulunmaktadır (202, 252-254). Steinsvoll ve ark. (204) periodontitisli grubun periodontal dokularında TGF-beta1 seviyesinin sağlıklı gruba göre 100 kat fazla olduğunu raporlamıştır. TGF-beta2 ve TGF-beta3 ile yapılan çalışmalarda, hasta ve sağlıklı gruplarda sitokin cevaplarının farklılık gösterdiği raporlamıştır. TGF-beta3 bir çalışmada ileri periodontitiste periodontal dokularda yüksek bulunurken (240)

aynı çalışmada TGF-beta2 seviyeleri farklı örneklerde değişik sonuçlar vermiştir, bazı inflame dokularda TGF-beta2 tespit edilirken, diğer örneklerde TGF-beta2 bulunmamıştır. Başka bir çalışmada diş eti oluğu sıvısı alınan periodontitisli ve sağlıklı örnek gruplarında TGF-beta2 seviyesinin her iki grupta da çok yüksek olduğu gözlenmiştir (241).

Hayvanlarla yapılan çalışmalarda statinlerin IL-8 (225, 255), IL-6 (191, 225, 255, 256), IL-1beta (243, 257, 258) seviyelerini düşürürken IL-10 (258, 259) sitokinlerini artırdığı bildirilmiştir. TGF-beta1 üzerine yapılan statin çalışmalarında ise gavajla verilen atorvastatin, serum TGF-beta1 sitokin seviyesi üzerine bir etkisi olmadığı (238), aterosklerozisi olan farelerde oral atorvastatin uygulamasının TGF-beta1 seviyesini artırdığı, fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise implantasyon sonrası oluşan inflamasyonda oral verilen atorvastatin uygulaması sonrası TGF-beta1 düzeyi düşük olduğu bildirilmiştir (260). Wang ve ark. (242) TGF-beta2 seviyesinin, in vitro insan periferik kan lenfositlerinde atorvastatin uygulaması sonrası düşük bulunduğunu raporlamıştır.

Çalışmalarımızda, IL-1beta seviyeleri, atorvastatin içeren tüm jel formülasyonlarında periodontitisli gruba göre düşük bulunmuştur. Kitosan varlığında ise IL-1beta seviyelerinin, daha da düşük olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Atorvastatinin IL-1beta seviyesini düşürdüğü daha önceki çalışmalarda raporlanmıştır (243, 257). Oliveira ve ark. (221) kitosanın IL-1beta seviyesini düşürdüğünü bildirmiştir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da bildirilenle uyumludur. Periodontitisli gruplarda IL-1beta seviyeleri sağlıklı gruplara göre yüksektir (25, 216, 224) ve uygulama gruplarında sitokin seviyelerinin azalması yüksek antiinflamatuvar etkiyi göstermektedir. Farklı kitosan jel grupları karşılaştırıldığında ise, suda çözünen kitosan jelin antiinflamatuvar etkisi baz kitosan grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. 4. haftanın sonunda ise en yüksek antiinflamatuvar etkinlik atorvastatin içeren baz kitosan jel ve suda çözünen kitosan jellerle elde edilmiş ( $p < 0.05$ ) ve 4. hafta sonunda bu iki grup arasında antiinflamatuvar etkinlik yönünden anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Bu sonuçlar in vitro

antiinflamatuvar etkinlik verileriyle uyumludur. İn vitro çalışmalarda da atorvastatin içeren kitosan jellerle IL-1beta seviyeleri çok düşük olup, elde edilen antiinflamatuvar etkinlik çok yüksektir.

IL-6 sitokin seviyeleri, IL-1beta seviyelerine benzer şekilde, tüm atorvastatin içeren jel gruplarında periodontitisli kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ve bu etki 4 hafta boyunca devam etmiştir. Kitosana yapılan çalışmalarda IL-6 seviyesinin düştüğü raporlanmıştır (221, 226-228) ve çalışmaların bizim sonuçlarımız ile uyumlu olduğu görülmüştür. Periodontitis durumunda IL-6 sitokin seviyesi sağlıklı gruba göre yüksektir (25, 224, 247, 248) ve bu sitokinin inhibisyonu antiinflamatuvar etkiyi göstermektedir. Bu doğrultuda atorvastatin içeren kitosan jellerle yüksek antiinflamatuvar etki elde edildiği görülmektedir. 4. haftanın sonunda atorvastatin içeren baz kitosan jel ve suda çözünen kitosan jellerle diğer gruplara göre daha yüksek antiinflamatuvar etki elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). Coradetti ve Bruna (223) suda çözünen kitosana IL-6 seviyesinin düştüğünü bildirmiştir. Bu çalışmayla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da 1. ve 4. haftaların sonunda atorvastatin içeren suda çözünen kitosan jellerde atorvastatine göre daha düşük IL-6 seviyesi elde edilmiştir. Kitosan varlığında IL-6 inhibisyonu artmıştır.

IL-8 seviyeleri, tüm jel gruplarında periodontitisli kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Periodontitisli gruplarda sağlıklı gruplara göre IL-8 seviyeleri de yüksektir (25, 247, 248). Öte yandan kitosan varlığında IL-8 seviyesinin arttığı bildirilmiştir (222, 228, 230, 232, 233). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde atorvastatin grubunda, atorvastatin içeren kitosan jel grubuna göre IL-8 seviyesi daha düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Diğer bir deyişle, kitosan varlığında IL-8 inhibisyonu azalmaktadır. Bu sonuç in vitro antiinflamatuvar etkinlik sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Kim ve ark. (231) suda çözünen kitosanın IL-8 seviyesini düşürdüğünü bildirmiştir. Bizim sonuçlarımızda suda çözünen kitosan ve baz kitosan arasında etki yönünden anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). İn vitro çalışmalarda ise suda çözünen kitosan ile daha yüksek antiinflamatuvar etki gözlenmiştir.

IL-10 antiinflamatuvar bir sitokindir ve IL-1beta, IL-8 (234, 261), IL-6 (261) sitokinlerinin seviyelerini düşürür. Çalışmamızda IL-6 ve IL-1beta seviyelerinin düşük bulunmasının sebebi bu olabilir. Periodontitisli gruplarda yapılan çalışmalarda IL-10 seviyeleri birbirinden farklı bulunmuştur (248). Bu çalışmalarda IL-10 seviyeleri periodontitisli gruptan alınan örneklerde sağlıklı gruba göre yüksek (249) düşük (237) ve anlamlı fark yok (250, 251) olarak bildirilmiştir. Kitosan ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda IL-10 seviyesinin arttığı bildirilmiştir (220, 262, 263). Atorvastatinin de IL-10 seviyesini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (258, 259). Çalışmalarımızda 4. haftanın sonunda kitosan+atorvastatin uygulanan gruplarda IL-10 seviyesi, periodontitisli gruba göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Atorvastatin içeren farklı tip kitosanla hazırlanan jeller karşılaştırıldığında (suda çözünen ve baz kitosan) IL-10 seviyeleri bakımından aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ayrıca tek başına kitosan jellerde, atorvastatin içeren kitosan jellere göre IL-10 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur, bu veriler literatürde bildirilen sonuçlarla uyumludur. In vitro çalışmalarımızda, in vivo sonuçlardan farklı olarak suda çözünen kitosan jellerde baz kitosan jellere göre IL-10 sitokin seviyeleri daha düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu durum çözünürlüğü farklı olan kitosanların farklı immun yanıt oluşturmasıyla açıklanabilir (223).

TGF-beta1 seviyeleri tüm jel gruplarında periodontitisli kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda periodontitisli gruplardan alınan örneklerde TGF-beta1 sitokin seviyelerinin yüksek olduğu raporlanmıştır (202, 204, 252). Kitosanın da TGF-beta1 seviyesini artırdığı bildirilmiştir (230, 264). Tie ve ark. (238) atorvastatinin TGF-beta1 seviyesi üzerine etkisi olmadığını gösterirken, TGF-beta1 seviyesini düşürdüğünü bildiren çalışmalar mevcuttur (239, 260). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde atorvastatin içeren kitosan jel gruplarındaki TGF-beta1 seviyesinin atorvastatin uygulanan gruba göre yüksek olduğu gözlenmiştir ancak bu fark anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). In vitro çalışmalardan farklı olarak, 4. haftanın sonunda atorvastatin içeren baz kitosan jellerle, atorvastatin içeren suda çözünen kitosan jellere göre TGF-beta1 seviyelerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum çözünürlüğü farklı olan kitosan

uygulamamızdan ve farklı hücrelerde farklı immun yanıtlar alınmasından kaynaklanıyor olabilir.

Periodontitisli gruplardan alınan örneklerde TGF-beta2 seviyelerinin farklılık gösterdiği görülmektedir. Atorvastatinin TGF-beta2 seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da ilk 2 hafta atorvastatin varlığında TGF-beta2 sitokin seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir. Bu veriler in vitro çalışmalarla da uyumludur. İlk 2 haftanın sonunda periodontitisli kontrol grubunun sitokin seviyesi sağlıklı kontrole göre yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), 3. ve 4. haftalarda önceki çalışmalarla uyumlu olarak periodontitisli ve sağlıklı kontrol gruplarının sitokin seviyeleri arasında fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). 4. haftanın sonunda atorvastatin içeren farklı tipte kitosan jel grupları arasında sitokin seviyeleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Çalışmamızda 2. ve 4. haftalarda periodontal dokulardan alınan örneklerde TGF-beta3 seviyesi sağlıklı doku örneklerine göre yüksek bulunmuştur. Sitokin düzeylerinde deney süresi boyunca görülen farklılıkların haftalar ilerledikçe hastalığın şiddetindeki değişmeye bağlı olduğu düşünülmektedir. 4. haftanın sonunda kitosan+atorvastatin uygulamasında TGF-beta3 seviyeleri periodontitis grubuna göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kitosan varlığında etki artmıştır ( $p<0.05$ ). In vitro çalışmada, in vivo çalışmadan farklı olarak atorvastatinde sitokin seviyesi diğer gruplara göre en düşük bulunmuştur, bu durum in vitro çalışmada formülasyonların uygulandığı insan gingival fibroblast (hGF) hücre dizisi ve in vivo çalışmalarda kullanılan sıçan dokuları arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. In vitro çalışmalarda suda çözünen kitosan jel gruplarında TGF-beta3 seviyeleri baz kitosan jel gruplarına göre yüksek gözlenirken; in vivo çalışmalarda farklı tip kitosanlarla haftalara göre TGF-beta3 seviyeleri değişkenlik gösterdiğinden aralarında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Çalışmamızda, gruplar arasında osteoklastik aktivite skoru, inflamasyon skoru, mine-sement sınırının atışmana olan uzaklığı, mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığı ve alveolar kemiğin alanı bakımından anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Alveolar kemiğin dişe olan üst, mid ve alt uzaklıklar açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Alveolar kemiğin dişe olan uzaklıkları anlamlı bulunmadığından tartışmaya dahil edilmemiştir.

### **Mine-Sement Sınırının Ataşmana Olan Uzaklığı:**

Periodontitisli kontrol grubunda hastalığın gelişmesi sonucunda ataşman kaybı sebebiyle 1. haftanın sonunda mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığı yüksek bulunmuştur. 2. hafta ölçülen uzaklık düşüktür ancak ilerleyen haftalarda tedavi edilmeyen hastalık ile bu uzaklığın arttığı gözlenmiştir.

Farklı kitosan tipleriyle hazırlanan ve atorvastatin içeren jel grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu gruplarda 1. hafta sonunda ölçülen mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklıkları, 4. hafta sonunda azalmıştır. 1. hafta sonunda tek başına uygulanan kitosan jellerde (gK ve gP) ataşman kaybındaki azalma, kitosanın periodontal dokular üzerindeki destekleyici etkisi ile açıklanabilir (61, 265). Ayrıca, 3 ve 4. haftaların sonunda atorvastatin+kitosan (gK-AT ve gP-AT) jel gruplarında mine-sement sınırının ataşmana olan uzaklığında gözlenen azalmanın, atorvastatinin ataşman kaybını azaltıcı etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir (187). Periodontitisli kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada aralarındaki bu fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

### **Mine-Sement Sınırının Alveolar Kemiğe Olan Uzaklığı:**

Periodontitisli kontrol grubunda 1. haftanın sonunda ölçülen mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığının 4. haftanın sonunda hastalığın ilerlemesine ve alveolar kemiğin erimesine bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Farklı kitosan tipleriyle hazırlanan ve atorvastatin içeren jel grupları arasında bu uzaklık bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Atorvastatin içeren bazı kitosan ve suda çözünen kitosan jellerde 1. hafta sonunda ölçülen uzaklıklar 4. hafta sonunda kemik yapımına bağlı olarak azalmıştır. Ancak bu jel gruplarıyla, periodontitisli kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Sadece atorvastatin uygulanan grupta ise 1. haftayla

4. hafta sonunda elde edilen ölçüm değerleri karşılaştırıldığında, 4. hafta sonunda bu uzaklığın arttığı bulunmuştur.

Atorvastatin içeren kitosan jellerle, mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığının 4. hafta sonunda azaldığı gözlenmiş, ancak o hafta için periodontitisli grupla yapılan karşılaştırmada aralarındaki fark anlamsız bulunduğundan bu verilerle genel bir sonuca varılamamıştır.

### **Alveolar Kemiğin Alanı:**

Periodontitisli kontrol grubunda 1. hafta sonunda ölçülen alveolar kemiğin alanına ilişkin değer 4. haftanın sonunda arttığı bulunmuştur. Ancak haftalar arası kemiğin alanındaki bu artış anlamlı değildir ( $p>0.05$ ).

Fajardo ve ark. (46) atorvastatinin alveolar kemiğin alanında artışa ve mine-sement sınırının alveolar kemiğe olan uzaklığında azalmaya yol açtığını raporlamıştır. Çalışmamızda tek başına kitosan jellerle (gK ve P) sadece 1. hafta sonunda alveolar kemiğin alanında artış gözlenirken, atorvastatin+kitosan jeller (gK-AT ve gP-AT) ile 2. haftadan sonra alveolar kemiğin alanındaki artışın devam ettiği bulunmuştur. Bu durum hem kitosanın (78) ve hem de atorvastatinin (43) kemik yapımı üzerindeki olumlu etkileri ile açıklanabilir. Çalışmamızda, kitosan varlığında atorvastatinin kemiğin iyileşmesi üzerine etkisinin arttığı gösterilmiştir.

### **İnflamasyon:**

Periodontitisli kontrol grubunda 1. hafta sonunda yüksek bulunan inflamasyon skorunun 4. hafta sonunda hala yüksek olduğu gözlenirken; atorvastatin içeren baz kitosan jel grubunda tüm haftalarda bu skor düşük bulunmuştur ve bu gruplar karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu durum kitosanın inflamatuvar belirteçleri elimine edici etkisi ve bu şekilde antiinflamatuvar etki göstermesi ile açıklanabilir (61). Periodontitisli grupla yapılan karşılaştırmada, atorvastatin+kitosan jel



gruplarının (gK-AT ve gP-AT) 2. haftadan sonra periodontitisli gruba göre yüksek antiinflamatuvar özellik gösterdiği ve uygulama süresi boyunca bu etkisinin devam ettiği gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu bulgular atorvastatinin (53) ve kitosanın inflamatuvar aktivite üzerindeki olumlu etkisinden kaynaklanmaktadır. Kitosan varlığında atorvastatinin antiinflamatuvar etkisinin arttığı tespit edildiğinden tedavide atorvastatin+kitosan jel kombinasyonu önerilmektedir.

### **Osteoklastik Aktivite:**

İnflamasyonla ilişkili mononükleer hücrelerin osteoklastlara farklılaşarak alveolar kemiğin erimesine sebep olduğu raporlanmıştır (266). Çalışmamızda tek başına atorvastatin ile sadece 1. hafta sonunda osteoklastik aktivitede düşüş gözlenirken, diğer haftalarda periodontitisli grupta hastalığın ilerlemesine bağlı olarak bu skorun arttığı görülmüştür. Atorvastatin+kitosan (gK-AT ve gP-AT) jel gruplarında ise 2. haftadan sonra uygulama süresi boyunca osteoklastik aktivitedeki düşüşün devam ettiği bulunmuştur. Bu durum, atorvastatinin osteoklastları azaltıcı etkisinin (44) kitosan varlığında arttığını göstermektedir. Atorvastatin içeren ve farklı kitosan tipleriyle hazırlanan gruplar arasında yapılan değerlendirmede ise aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

1. hafta yoğun şekilde görülen osteoklastların 4. hafta sonunda atorvastatin ve kitosan kombinasyonu ile azaldığı gözlenmiştir, bu durum 4. hafta sonunda bu gruplarda kemik yıkımının azaldığını göstermektedir.

### **In Vitro - In Vivo Sonuçların Karşılaştırılması**

Atorvastatin içeren kitosan jellerin antiinflamatuvar etkileri in vitro ve in vivo olarak yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda insan gingival fibroblast hücreleri üzerine uygulanan formülasyonlar ile sitokin ölçümleri sonucu yüksek antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilen formülasyonlar, sıçanlar üzerine yapılan uygulama sonrası ölçülen sitokin seviyeleriyle uyum sağlamıştır. Her iki çalışmada da

inflamasyon belirteçlerinin azaldığı gözlenmiştir. Hayvan deneyinde yapılan histometrik analizler sonrasında, atorvastatin içeren kitosan jeller 4. hafta sonunda periodontal hastalıkta görülen ataşman kaybını düzeltmiş, alevolar kemiğin alanında artış sağlamış, 1. haftada görülen osteoklastları 4. haftanın sonunda azaltarak osteoklastik aktiviteyi düşürmüş ve hastalığın gelişimiyle görülen inflamasyonu 4. haftanın sonunda azaltarak antiinflamatuvar özellik göstermiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Statin grubu bir etkin madde olan atorvastatinin antiinflamatuvar etkisi nedeniyle periodontitis tedavisinde kullanmak amacıyla lokal olarak uygulanacak bir formülasyon geliştirilmiştir. Öncelikle etkin maddenin katı dispersiyonu hazırlanarak çözünürlüğü artırılmış ve kitosan jel formülasyonlarına yüklenmiştir. Çözünürlüğünün artmasıyla etkin maddenin jellerden salımı da hızlandırılmıştır. In vitro ve in vivo olarak antiinflamatuvar etki incelendiğinde, katı dispersiyon halde atorvastatin içeren formülasyonların, etkin maddenin hızlı salımı nedeniyle kısa sürede antiinflamatuvar etki gösterdiği, muamele görmemiş atorvastatin içeren formülasyonlarda ise bu etkinin daha uzun süreli olduğu görülmüştür. Kitosan ile birlikte uygulandığında atorvastatinin antiinflamatuvar etkisinin arttığı görülmüştür. In vitro ve in vivo çalışmalar birbirini desteklemektedir. Hızlı etki istenildiğinde katı dispersiyon halde atorvastatin içeren kitosan bazlı formülasyonlar, kronik inflamasyonlarda ise muamele görmemiş atorvastatin içeren kitosan bazlı jel formülasyonlar önerilebilir. Atorvastatin içeren biyoadezif jel şeklinde hazırlanan formülasyonlarla hem jelin uygulama kolaylığı yönüyle hasta uyuncunun artırılması hem de biyoadezif özelliğinden dolayı uygulama bölgesinde daha uzun süre kalarak etkinliğinin artırılması sağlanmıştır. Atorvastatin içeren kitosan bazlı jel formülasyonlarının periodontitis tedavisinde gerek etkinlik gerekse hasta uyuncu yönüyle ümit verici olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 1986;13(5):418-25.
2. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology*. 1965;36(3):177-87.
3. Costerton JW, Cheng K, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*. 1987;41(1):435-64.
4. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1994;5(1):78-111.
5. Papapanou P, editor *Epidemiology and natural history of periodontal disease. Proceeding of the first european workshop on periodontology London Quintessence*; 1994.
6. Fiorellini J, Ishikawa S, Kim D. *Gingival inflammation. Carranza's Clinical Periodontology*, St Louis: WB Saunders. 2006.
7. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 1976;34(3):235-49.
8. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1):7-17.
9. Genco RJ, Jeffcoat M, Caton J, Papapanou P, Armitage G, Grossi S, et al. Periodontal diseases: Epidemiology and diagnosis. *The Journal of the American Dental Association*. 1998(129):9-S-14-S.
10. Kinane D, Berglundh T, Lindhe J. Pathogenesis of periodontitis. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 2008.
11. Van Dyke TE, Dave S. Risk factors for periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2005;7(1):3.
12. Home Remedies for Periodontitis 2015 [Available from: <http://www.top10homeremedies.com/home-remedies/home-remedies-periodontitis-pyorrhea.html>].
13. Goyal G, Garg T, Rath G, Goyal AK. Current nanotechnological strategies for an effective delivery of drugs in treatment of periodontal disease. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2014;31(2).
14. Niemiec BA. Periodontal disease. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2008;23(2):72-80.
15. Cutando A, Montero J, Gómez-de Diego R, Ferrera MJ, Lopez-Valverde A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in patients with type

- 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2015;7(5):e628.
16. Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug delivery*. 2014(0):1-15.
  17. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):79-111.
  18. Ivanyi L, Lehner T. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Archives of Oral Biology*. 1970;15(11):1089-96.
  19. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*. 1970;86(6):1436-40.
  20. Goodson J. Prostaglandins: Potential mediators of periodontal disease. *Journal of Dental Research*. 1972;51:375.
  21. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science*. 1972;177(4051):793-5.
  22. Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009;36(s10):3-8.
  23. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):144-57.
  24. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral diseases*. 2004;10(6):311-8.
  25. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9(3):248-66.
  26. Arabaci T, Cicek Y, Canakci C. Sonic and ultrasonic scalers in periodontal treatment: a review. *International Journal of Dental Hygiene*. 2007;5(1):2-12.
  27. Pejčić A, Kesić L, Obradović R, Mirković D. Antibiotics in the management of periodontal disease. *Acta facultatis medicae Naissensis*. 2010;27(2).
  28. Hau H, Rohanizadeh R, Ghadiri M, Chrzanowski W. A mini-review on novel intraperiodontal pocket drug delivery materials for the treatment of periodontal diseases. *Drug Delivery and Translational Research*. 2014;4(3):295-301.
  29. Krayner JW, Leite RS, Kirkwood KL. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*. 2010;54(1):13-33.
  30. Sheridan RA, Wang HL, Eber R, Oh TJ. Systemic Chemotherapeutic Agents as Adjunctive Periodontal Therapy: A Narrative Review and Suggested Clinical

- Recommendations. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2015;17(4):123-34.
31. Alani A, Seymour R. Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):198-210.
  32. Cheng Y, Chen J, Ge M, Zhou Z, Yin X, Zou S. Efficacy of adjunctive laser in non-surgical periodontal treatment: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in Medical Science*. 2016;31(1):151-63.
  33. Estanislau IMG, Terceiro IRC, Lisboa MRP, Teles PdB, Carvalho RdS, Martins RS, et al. Pleiotropic effects of statins on the treatment of chronic periodontitis—a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2015;79(6):877-85.
  34. Norata GD, Catapano AL. Statins and periodontal inflammation: A pleiotropic effect of statins or a pleiotropic effect of LDL-cholesterol lowering? *Atherosclerosis*. 2014;234(2):381.
  35. Sangwan A, Tewari S, Singh H, Sharma RK, Narula SC. Periodontal status and hyperlipidemia: statin users versus non-users. *Journal of Periodontology*. 2013;84(1):3-12.
  36. Cruz JC, Saver B, Maupome G, Hujoel PP. Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology*. 2006;77(6):1061-6.
  37. Dalcico R, de Menezes AM, Deocleciano OB, Oriá RB, Vale ML, Ribeiro RA, et al. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2013;84(8):1145-57.
  38. Fernández AM, Ramírez LP, Tomás J, Alvarez RM, Rizzo M, Bravo M, et al. Association of Simvastatin and Hyperlipidemia With Periodontal Status and Bone Metabolism Markers. *Journal of Periodontology*. 2014;85(10):1408-15.
  39. Pradeep A, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Guruprasad C, Kumaraswamy K. Efficacy of Locally Delivered 1.2% Rosuvastatin Gel To Non-Surgical Treatment of Patients With Chronic Periodontitis: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*. 2015;86(6):738-45.
  40. Jain N, Jain GK, Javed S, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ, et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. *Drug Discovery Today*. 2008;13(21):932-43.
  41. Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology*. 2003;8(1):115-81.
  42. Lindy O, Suomalainen K, Mäkelä M, Lindy S. Statin use is associated with fewer periodontal lesions: A retrospective study. *BMC Oral Health*. 2008;8(1):16.
  43. Zhang Y, Bradley AD, Wang D, Reinhardt RA. Statins, bone metabolism and treatment of bone catabolic diseases. *Pharmacological Research*. 2014;88:53-61.

44. de Monès E, Schlaubitz S, Catros S, Fricain J-C. Statins and alveolar bone resorption: a narrative review of preclinical and clinical studies. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2015;119(1):65-73.
45. Garrett IR, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Research & Therapy*. 2002;4(4):1.
46. Fajardo ME, Rocha ML, Marin FJS, Chávez EJE. Effect of atorvastatin on chronic periodontitis: a randomized pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*. 2010;37(11):1016-22.
47. da Rocha Júnior HA, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, de Magalhães D. Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2015;17(3):82-90.
48. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *Journal of Periodontology*. 1998;69(5):507-20.
49. Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2008;43(3):261-7.
50. Garg S, Pradeep A. 1.2% Rosuvastatin and 1.2% Atorvastatin Gel Local Drug Delivery and Redelivery in the Treatment of Class II Furcation Defects: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*. 2016(0):1-10.
51. Pradeep AR, Kanoriya D, Singhal S, Garg V, Manohar B, Chatterjee A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 1% alendronate versus 1.2% atorvastatin gel in treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2016.
52. Kumari M, Martande SS, Pradeep AR. Subgingivally delivered 1.2% atorvastatin in the treatment of chronic periodontitis among smokers: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2016.
53. Subramanian S, Emami H, Vucic E, Singh P, Vijayakumar J, Fifer KM, et al. High-dose atorvastatin reduces periodontal inflammation: a novel pleiotropic effect of statins. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25):2382-91.
54. Purushotham S, D'Souza ML, Purushotham R. Statin: A boon in periodontal therapy. *SRM Journal of Research in Dental Sciences*. 2015;6(4):243.
55. Reise M, Wyrwa R, Müller U, Zylinski M, Völpel A, Schnabelrauch M, et al. Release of metronidazole from electrospun poly (L-lactide-co-D/L-lactide) fibers for local periodontitis treatment. *Dental Materials*. 2012;28(2):179-88.
56. Norkiewicz DS. The use of chemotherapeutic agents in localized periodontal pockets. *Military Medicine*. 2001;166(11):940.

57. Goodson J, Holborow D, Dunn R, Hogan P, Dunham S. Monolithic Tetracycline-containing Fibers for Controlled Delivery to Periodontal Pockets\*. *Journal of periodontology*. 1983;54(10):575-9.
58. Sharma A, Pradeep A. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*. 2012;83(1):11-8.
59. Angaji M, Gelskey S, Nogueira-Filho G, Brothwell D. A systematic review of clinical efficacy of adjunctive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2010;81(11):1518-28.
60. İkinci G, Şenel S, Akıncıbay H, Kaş S, Erciş S, Wilson C, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;235(1):121-7.
61. Akıncıbay H, Şenel S, Yetkin Ay Z. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;80(2):290-6.
62. Pichayakorn W, Boonme P. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing metronidazole for periodontitis treatment. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(3):1197-202.
63. Labib GS, Aldawsari HM, Badr-Eldin SM. Metronidazole and Pentoxifylline films for the local treatment of chronic periodontal pockets: preparation, in vitro evaluation and clinical assessment. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014;11(6):855-65.
64. Soskolne WA. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1997;8(2):164-74.
65. Shifrovitch Y, Binderman I, Bahar H, Berdicevsky I, Zilberman M. Metronidazole-loaded bioabsorbable films as local antibacterial treatment of infected periodontal pockets. *Journal of Periodontology*. 2009;80(2):330-7.
66. Friesen LR, Williams KB, Krause LS, Killoy WJ. Controlled local delivery of tetracycline with polymer strips in the treatment of periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2002;73(1):13-9.
67. Reddy NS, Sowmya S, Bumgardner JD, Chennazhi K, Biswas R, Jayakumar R. Tetracycline nanoparticles loaded calcium sulfate composite beads for periodontal management. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(6):2080-90.
68. Vyas S, Sihorkar V, Dubey P. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of metronidazole bearing lectinized liposomes for intra-periodontal pocket delivery. *Die Pharmazie*. 2001;56(7):554-60.



69. Perugini P, Genta I, Conti B, Modena T, Pavanetto F. Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;252(1):1-9.
70. Vandekerckhove BN, Quirynen M, van Steenberghe D. The use of tetracycline-containing controlled-release fibers in the treatment of refractory periodontitis. *Journal of Periodontology*. 1997;68(4):353-61.
71. Garg T, Goyal AK. Biomaterial-based scaffolds—current status and future directions. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014;11(5):767-89.
72. Pragati S, Ashok S, Kuldeep S. Recent advances in periodontal drug delivery systems. *International Journal of Drug Delivery*. 2009;1(1).
73. Garg T, Rath G, Goyal AK. Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery. *Drug Delivery*. 2015;22(8):969-87.
74. Garg T, K Goyal A. Medicated chewing gum: patient compliance oral drug delivery system. *Drug Delivery Letters*. 2014;4(1):72-8.
75. Kong LX, Peng Z, Li SD, Bartold PM. Nanotechnology and its role in the management of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2006;40(1):184-96.
76. Liu D, Yang P. Minocycline hydrochloride nanoliposomes inhibit the production of TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated macrophages. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:4769.
77. Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;77(2):187-99.
78. Şenel S. Potential applications of chitosan in oral mucosal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2010;20(1):23-32.
79. Şenel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(10):1467-80.
80. Kim J, Cai Z, Lee HS, Choi GS, Lee DH, Jo C. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of Polymer Research*. 2011;18(4):739-44.
81. Şenel S, Kremer M, Kaş S, Wertz P, Hincal A, Squier C. Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials*. 2000;21(20):2067-71.
82. Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Muzzarelli C, Caramella C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;21(2):351-9.
83. Netsomboon K, Schnürch AB. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;98:76-89.

84. Hermans K, Van den Plas D, Kerimova S, Carleer R, Adriaensens P, Weyenberg W, et al. Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;472(1):10-9.
85. Casettari L, Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release*. 2014;190:189-200.
86. Abruzzo A, Cerchiara T, Bigucci F, Gallucci MC, Luppi B. Mucoadhesive buccal tablets based on chitosan/gelatin microparticles for delivery of propranolol hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(12):4365-72.
87. Khan G, Yadav SK, Patel RR, Nath G, Bansal M, Mishra B. Development and Evaluation of Biodegradable Chitosan Films of Metronidazole and Levofloxacin for the Management of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech*. 2015:1-14.
88. Du H, Liu M, Yang X, Zhai G. The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery. *Drug Discovery Today*. 2015;20(8):1004-11.
89. Thanou M, Verhoef J, Junginger H. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;50:S91-S101.
90. Caramella CM, Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Sandri G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;92:39-52.
91. Bigucci F, Abruzzo A, Saladini B, Gallucci MC, Cerchiara T, Luppi B. Development and characterization of chitosan/hyaluronan film for transdermal delivery of thiocolchicoside. *Carbohydrate Polymers*. 2015;130:32-40.
92. Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998;25(1):74-82.
93. Ji QX, Zhao QS, Deng J, Lü R. A novel injectable chlorhexidine thermosensitive hydrogel for periodontal application: preparation, antibacterial activity and toxicity evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(8):2435-42.
94. Yar M, Farooq A, Shahzadi L, Khan AS, Mahmood N, Rauf A, et al. Novel meloxicam releasing electrospun polymer/ceramic reinforced biodegradable membranes for periodontal regeneration applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;64:148-56.
95. Chinta DP, Katakam P, Murthy VSN, Newton MJ. Formulation and in-vitro evaluation of moxifloxacin loaded crosslinked chitosan films for the treatment of periodontitis. *Journal of Pharmacy Research*. 2013;7(6):483-90.

96. Govender S, Lutchman D, Pillay V, Chetty D, Govender T. Enhancing drug incorporation into tetracycline-loaded chitosan microspheres for periodontal therapy. *Journal of Microencapsulation*. 2006;23(7):750-61.
97. Lee BS, Lee CC, Wang YP, Chen HJ, Lai CH, Hsieh WL, et al. Controlled-release of tetracycline and lovastatin by poly (d, l-lactide-co-glycolide acid)-chitosan nanoparticles enhances periodontal regeneration in dogs. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:285.
98. Dung TH, Lee SR, Han SD, Kim SJ, Ju YM, Kim MS, et al. Chitosan-TPP nanoparticle as a release system of antisense oligonucleotide in the oral environment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2007;7(11):3695-9.
99. Shen EC, Wang C, Fu E, Chiang CY, Chen TT, Nieh S. Tetracycline release from tripolyphosphate–chitosan cross-linked sponge: a preliminary in vitro study. *Journal of Periodontal Research*. 2008;43(6):642-8.
100. Sekiguchi K, Obi N. New solid state dispersions for increasing dissolution rates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1961;29:866-7.
101. Prajapati S, Gohel M, Patel L. Studies to enhance dissolution properties of carbamazepine. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;69(3):427.
102. Hu L, Gu D, Hu Q, Shi Y, Gao N. Investigation of Solid Dispersion of Atorvastatin Calcium in Polyethylene Glycol 6000 and Polyvinylpyrrolidone. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014;13(6):835-42.
103. Singh A, Sharma PK, Meher JG, Malviya R. Evaluation of enhancement of solubility of paracetamol by solid dispersion technique using different polymers concentration. *Asian journal of Pharmaceutical and Clinical research*. 2011;4(1):117-9.
104. Kim MS, Kim JS, Cho W, Park HJ, Hwang SJ. Oral absorption of atorvastatin solid dispersion based on cellulose or pyrrolidone derivative polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;59:138-42.
105. Silva TD, Arantes VT, Resende JA, Speziali NL, de Oliveira RB, Vianna-Soares CD. Preparation and characterization of solid dispersion of simvastatin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2010;36(11):1348-55.
106. Bobe K, Subrahmanya C, Suresh S, Gaikwad D, Patil M, Khade T, et al. Formulation and evaluation of solid dispersion of Atorvatstain with various carriers. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2011;1(2):1-6.
107. Khan AW, Kotta S, Ansari SH, Sharma RK, Ali J. Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014(0):1-8.

108. Sharma B, Saini V, Sharma A. Preparation, Characterization and In-Vitro Evaluation of Atorvastatin Calcium Solid Dispersions with Various Hydrophilic Polymers and Its FDT Formulation. 2012:620-30.
109. Mishra SR, Ellaiah P, Jena PK, Nayak BS, Mishra G. An approach for enhancement of dissolution rate of Pioglitazone HCL by solid dispersion technique using PEG 6000. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011;2(10):2681.
110. Jithendra KP, Sudhir M, Prasad AR, Saradhi AP, Reddy ES. Dissolution profile enhancement of poorly-water soluble drug midazolam by using solid dispersion technique. *Panacea Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013:5-10.
111. Maurya D, Belgamwar V, Tekade A. Microwave induced solubility enhancement of poorly water soluble atorvastatin calcium. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;62(11):1599-606.
112. Nart V, Franca MT, Anzilaggo D, Riekes MK, Kratz JM, de Campos CEM, et al. Ball-milled solid dispersions of BCS Class IV drugs: Impact on the dissolution rate and intestinal permeability of acyclovir. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;53:229-38.
113. Jahan R, Islam MS, Tanwir A, Chowdhury JA. In vitro dissolution study of atorvastatin binary solid dispersion. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2013;4(1):18.
114. Papageorgiou G, Papadimitriou S, Karavas E, Georgarakis E, Docoslis A, Bikiaris D. Improvement in chemical and physical stability of fluvastatin drug through hydrogen bonding interactions with different polymer matrices. *Current Drug Delivery*. 2009;6(1):101-12.
115. Pandya P, Gattani S, Jain P, Khirwal L, Surana S. Co-solvent evaporation method for enhancement of solubility and dissolution rate of poorly aqueous soluble drug simvastatin: in vitro–in vivo evaluation. *AAPS Pharmscitech*. 2008;9(4):1247-52.
116. Taksande J, Lade S, Trivedi R, Mahore J, Umekar M. Effect of hydrophilic polymer on solubility and dissolution of Atorvastatin inclusion complex. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2012;1(1):374-85.
117. Portero A, Lopez CR, Jato JV. Effect of chitosan and chitosan glutamate enhancing the dissolution properties of the poorly water soluble drug nifedipine. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;175(1):75-84.
118. Liu QY, Zhang ZH, Jin X, Jiang YR, Jia XB. Enhanced dissolution and oral bioavailability of tanshinone IIA base by solid dispersion system with low-molecular-weight chitosan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(6):839-46.

119. Pignatello R, Stancampiano A, Ventura C, Puglisi G. Dexamethasone sodium phosphate-loaded Chitosan based delivery systems for buccal application. *Journal of Drug Targeting*. 2007;15(9):603-10.
120. Chen R, Takahashi H, Okamoto H, Danjo K. Particle design of three-component system for sustained release using a 4-fluid nozzle spray-drying technique. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;54(11):1486-90.
121. Takahashi H, Chen R, Okamoto H, Danjo K. Acetaminophen particle design using chitosan and a spray-drying technique. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;53(1):37-41.
122. Asada M, Takahashi H, Okamoto H, Tanino H, Danjo K. Theophylline particle design using chitosan by the spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;270(1):167-74.
123. Mura P, Zerrouk N, Mennini N, Maestrelli F, Chemtob C. Development and characterization of naproxen–chitosan solid systems with improved drug dissolution properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;19(1):67-75.
124. Vijaya Kumar SG, Mishra DN. Preparation, characterization and in vitro dissolution studies of solid systems of valdecoxib with chitosan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;54(8):1102-6.
125. Zerrouk N, Mennini N, Maestrelli F, Chemtob C, Mura P. Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57(1):93-9.
126. Zhong L, Zhu X, Luo X, Su W. Dissolution properties and physical characterization of telmisartan–chitosan solid dispersions prepared by mechanochemical activation. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):541-50.
127. Dannenfelser RM, He H, Joshi Y, Bateman S, Serajuddin A. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: Application of polyethylene glycol–polysorbate 80 solid dispersion carrier system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(5):1165-75.
128. Fridgeirsdottir GA, Harris R, Fischer PM, Roberts CJ. Support Tools in Formulation Development for Poorly Soluble Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(8):2260-9.
129. Vo CLN, Park C, Lee BJ. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85(3):799-813.
130. Bikiaris D, Papageorgiou GZ, Stergiou A, Pavlidou E, Karavas E, Kanaze F, et al. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs: evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. *Thermochimica Acta*. 2005;439(1):58-67.

131. Van den Mooter G, Weuts I, De Ridder T, Blaton N. Evaluation of Inutec SP1 as a new carrier in the formulation of solid dispersions for poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*. 2006;316(1):1-6.
132. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*. 2007;12(23):1068-75.
133. Ghaderi R, Artursson P, Carlfors J. Preparation of biodegradable microparticles using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *Pharmaceutical Research*. 1999;16(5):676-81.
134. Vippagunta SR, Wang Z, Hornung S, Krill SL. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;96(2):294-304.
135. Yoshioka M, Hancock BC, Zografi G. Crystallization of indomethacin from the amorphous state below and above its glass transition temperature. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994;83(12):1700-5.
136. Shalaev EY, Zografi G. How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996;85(11):1137-41.
137. Guo Z, Lu M, Li Y, Pang H, Lin L, Liu X, et al. The utilization of drug–polymer interactions for improving the chemical stability of hot-melt extruded solid dispersions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014;66(2):285-96.
138. Li X, Peng H, Tian B, Gou J, Yao Q, Tao X, et al. Preparation and characterization of azithromycin–Aerosil 200 solid dispersions with enhanced physical stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;486(1):175-84.
139. Borba PAA, Pinotti M, de Campos CEM, Pezzini BR, Stulzer HK. Sodium alginate as a potential carrier in solid dispersion formulations to enhance dissolution rate and apparent water solubility of BCS II drugs. *Carbohydrate Polymers*. 2016;137:350-9.
140. Oo MK, Mandal UK, Chatterjee B. Polymeric behavior evaluation of PVP K30-poloxamer binary carrier for solid dispersed nisoldipine by experimental design. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2017;22(1):2-12.
141. Baghel S, Cathcart H, O'Reilly NJ. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(9):2527-44.
142. Sareen S, Mathew G, Joseph L. Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2012;2(1):12.

143. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: formulation and process considerations. *International journal of pharmaceutics*. 2013;453(1):253-84.
144. Srinarong P, de Waard H, Frijlink HW, Hinrichs WL. Improved dissolution behavior of lipophilic drugs by solid dispersions: the production process as starting point for formulation considerations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011;8(9):1121-40.
145. Niwa T, Danjo K. Design of self-dispersible dry nanosuspension through wet milling and spray freeze-drying for poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;50(3):272-81.
146. Lim RTY, Ng WK, Tan RB. Amorphization of pharmaceutical compound by coprecipitation using supercritical anti-solvent (SAS) process (Part I). *The Journal of Supercritical Fluids*. 2010;53(1):179-84.
147. Meng F, Gala U, Chauhan H. Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(9):1401-15.
148. Janssens S, Van den Mooter G. Review: physical chemistry of solid dispersions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009;61(12):1571-86.
149. Yan YD, Sung JH, Kim KK, Kim DW, Kim JO, Lee BJ, et al. Novel valsartan-loaded solid dispersion with enhanced bioavailability and no crystalline changes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;422(1):202-10.
150. Li DX, Jang KY, Kang W, Bae K, Lee MH, Oh YK, et al. Enhanced solubility and bioavailability of sibutramine base by solid dispersion system with aqueous medium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010;33(2):279-84.
151. Zheng X, Yang R, Zhang Y, Wang Z, Tang X, Zheng L. Part II: bioavailability in beagle dogs of nimodipine solid dispersions prepared by hot-melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2007;33(7):783-9.
152. Obaidat RM, Tashtoush BM, Awad AA, Al Bustami RT. Using Supercritical Fluid Technology (SFT) in Preparation of Tacrolimus Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech*. 2016;18(2):1-13.
153. Nguyen TNG, Tran PHL, Van Vo T, Duan W, Tran TTD. Development of a Sustained Release Solid Dispersion Using Swellable Polymer by Melting Method. *Pharmaceutical Research*. 2016;33(1):102-9.
154. Xu WJ, Xie HJ, Cao QR, Shi LL, Cao Y, Zhu XY, et al. Enhanced dissolution and oral bioavailability of valsartan solid dispersions prepared by a freeze-drying technique using hydrophilic polymers. *Drug Delivery*. 2016;23(1):41-8.
155. Paidi SK, Jena SK, Ahuja BK, Devasari N, Suresh S. Preparation, in-vitro and in-vivo evaluation of spray-dried ternary solid dispersion of biopharmaceutics

- classification system class II model drug. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015;67(5):616-29.
156. Park YJ, Xuan JJ, Oh DH, Balakrishnan P, Yang HJ, Yeo WH, et al. Development of novel itraconazole-loaded solid dispersion without crystalline change with improved bioavailability. *Archives of Pharmacal Research*. 2010;33(8):1217-25.
  157. Tran TTD, Tran PHL, Choi HG, Han HK, Lee BJ. The roles of acidifiers in solid dispersions and physical mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;384(1):60-6.
  158. Feng J, Xu L, Gao R, Luo Y, Tang X. Evaluation of polymer carriers with regard to the bioavailability enhancement of bifendate solid dispersions prepared by hot-melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2012;38(6):735-43.
  159. Salmani JMM, Lv H, Asghar S, Zhou J. Amorphous solid dispersion with increased gastric solubility in tandem with oral disintegrating tablets: a successful approach to improve the bioavailability of atorvastatin. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2015;20(4):465-72.
  160. Rai VK, Dwivedi H, Yadav NP, Chanotiya CS, Saraf SA. Solubility enhancement of miconazole nitrate: binary and ternary mixture approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40(8):1021-9.
  161. Tawfeek HM, Saleem IY, Roberts M. Dissolution Enhancement and Formulation of Rapid-Release Lornoxicam Mini-Tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(8):2470-83.
  162. Lu T, Sun Y, Ding D, Zhang Q, Fan R, He Z, et al. Study on Enhanced Dissolution of Azilsartan-Loaded Solid Dispersion, Prepared by Combining Wet Milling and Spray-Drying Technologies. *AAPS PharmSciTech*. 2016;18(2):1-8.
  163. Asyarie S, Rachmawati H. In vivo and in vitro evaluation of a solid dispersion system of gliclazide: PEG 6000. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2007;61(5):400-10.
  164. Heo MY, Piao ZZ, Kim TW, Cao QR, Kim A, Lee BJ. Effect of solubilizing and microemulsifying excipients in polyethylene glycol 6000 solid dispersion on enhanced dissolution and bioavailability of ketoconazole. *Archives of pharmacal research*. 2005;28(5):604-11.
  165. Law D, Schmitt EA, Marsh KC, Everitt EA, Wang W, Fort JJ, et al. Ritonavir-PEG 8000 amorphous solid dispersions: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(3):563-70.
  166. Pan RN, Chen JH, Chen RRL. Enhancement of dissolution and bioavailability of piroxicam in solid dispersion systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2000;26(9):989-94.



167. Fawaz F, Bonini F, Guyot M, Bildet J, Maury M, Lagueny A. Bioavailability of norfloxacin from PEG 6000 solid dispersion and cyclodextrin inclusion complexes in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;132(1):271-5.
168. Kedzierewicz F, Zinutti C, Hoffman M, Maincent P. Bioavailability study of tolbutamide  $\beta$ -cyclodextrin inclusion compounds, solid dispersions and bulk powder. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;94(1-3):69-74.
169. Özkan Y, Doğanay N, Dikmen N, Işımer A. Enhanced release of solid dispersions of etodolac in polyethylene glycol. *Il Farmaco*. 2000;55(6):433-8.
170. Gines J, Arias M, Moyano J, Sanchez-Soto P. Thermal investigation of crystallization of polyethylene glycols in solid dispersions containing oxazepam. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;143(2):247-53.
171. Ruan LP, Yu BY, Fu GM, Zhu DN. Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005;38(3):457-64.
172. Sinha S, Ali M, Baboota S, Ahuja A, Kumar A, Ali J. Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(2):518-27.
173. Tashtoush BM, Al-Qashi ZS, Najib NM. In vitro and in vivo evaluation of glibenclamide in solid dispersion systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2004;30(6):601-7.
174. Yüksel N, Karataş A, Özkan Y, Savaşer A, Özkan SA, Baykara T. Enhanced bioavailability of piroxicam using Gelucire 44/14 and Labrasol: in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003;56(3):453-9.
175. Rouchotas C, Cassidy O, Rowley G. Comparison of surface modification and solid dispersion techniques for drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;195(1):1-6.
176. Lim HT, Balakrishnan P, Oh DH, Joe KH, Kim YR, Hwang DH, et al. Development of novel sibutramine base-loaded solid dispersion with gelatin and HPMC: physicochemical characterization and pharmacokinetics in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;397(1):225-30.
177. Moneghini M, Bellich B, Baxa P, Princivale F. Microwave generated solid dispersions containing ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;361(1):125-30.
178. Oh DH, Park YJ, Kang JH, Yong CS, Choi HG. Physicochemical characterization and in vivo evaluation of flurbiprofen-loaded solid dispersion without crystalline change. *Drug Delivery*. 2011;18(1):46-53.

179. Alam MA, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM, Ali R. Effervescence Assisted Fusion Technique to Enhance the Solubility of Drugs. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(6):1487-94.
180. Prabhu P, Patravale V. Dissolution enhancement of atorvastatin calcium by co-grinding technique. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015;6(4):1-12.
181. Ha E-S, Baek I-h, Cho W, Hwang S-J, Kim M-S. Preparation and evaluation of solid dispersion of atorvastatin calcium with Soluplus® by spray drying technique. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;62(6):545-51.
182. Jahangiri A, Barzegar-Jalali M, Garjani A, Javadzadeh Y, Hamishehkar H, Asadpour-Zeynali K, et al. Evaluation of physicochemical properties and in vivo efficiency of atorvastatin calcium/ezetimibe solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;82:21-30.
183. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010;74(5):818.
184. Chan KY, Boucher ES, Gandhi PJ, Silva MA. HMG-CoA reductase inhibitors for lowering elevated levels of C-reactive protein. *American Journal of Health System Pharmacy*. 2004;61(16):1676-81.
185. The United States Pharmacopeia-National Formulary. 2011;[Elektronik sürüm].
186. Martindale: 'Martindale – the Extra Pharmacopoeia' (29th edition bs.). London England: The Pharmaceutical Press. 1989.
187. Pradeep A, Kumari M, Rao NS, Martande SS, Naik SB. Clinical efficacy of subgingivally delivered 1.2% atorvastatin in chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*. 2013;84(7):871-9.
188. Kumari M, Martande SS, Pradeep A, Naik SB. Efficacy of Subgingivally Delivered 1.2% Atorvastatin in the Treatment of Chronic Periodontitis in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*. 2016;87(11):1278-85.
189. Martande SS, Kumari M, Pradeep A, Singh SP, Suke DK, Guruprasad C. Platelet-Rich Fibrin Combined With 1.2% Atorvastatin for Treatment of Intra-bony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of periodontology*. 2016;87(9):1039-46.
190. Rosenberg DR, Andrade CX, Chaparro AP, Inostroza CM, Ramirez V, Violant D, et al. Short-term effects of 2% atorvastatin dentifrice as an adjunct to periodontal therapy: a randomized double-masked clinical trial. *Journal of periodontology*. 2015;86(5):623-30.
191. Fentoğlu Ö, Kırzioğlu F, Özdem M, Kocak H, Sütçü R, Sert T. Proinflammatory cytokine levels in hyperlipidemic patients with periodontitis after periodontal treatment. *Oral Diseases*. 2012;18(3):299-306.

192. Fentoğlu Ö, Köroğlu BK, Hiçyılmaz H, Sert T, Özdem M, Sütçü R, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38(1):8-16.
193. Balli U, Keles GC, Cetinkaya BO, Mercan U, Ayas B, Erdogan D. Assessment of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in the periodontium of rats treated with atorvastatin. *Journal of Periodontology*. 2014;85(1):178-87.
194. Goes P, Lima APS, Melo IM, Rêgo ROCC, Lima V. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. *Brazilian Dental Journal*. 2010;21(3):193-8.
195. Sousa LH, Linhares EV, Alexandre JT, Lisboa MR, Furlaneto F, Freitas R, et al. Effects of Atorvastatin on Periodontitis of Rats Subjected to Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *Journal of Periodontology*. 2016:1-17.
196. ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Stability testing of new drug substance and products: step5;. 2003.
197. Jones DS, Irwin CR, David Woolfson A, Djokic J, Adams V. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(6):592-8.
198. Jones DS, Woolfson AD, Brown AF, Coulter WA, McClelland C, Irwin CR. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*. 2000;67(2):357-68.
199. Jones DS, Woolfson AD, Djokic J, Coulter W. Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. *Pharmaceutical Research*. 1996;13(11):1734-8.
200. Skalerič U, Kramar B, Petelin M, Pavllia Z, Wahl SM. Changes in TGF- $\beta$ 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. *European Journal of Oral Sciences*. 1997;105(2):136-42.
201. Barksby H, Lea S, Preshaw P, Taylor J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical & Experimental Immunology*. 2007;149(2):217-25.
202. Khalaf H, Lönn J, Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- $\beta$ 1 as a marker for disease progression. *Cytokine*. 2014;67(1):29-35.
203. Schierano G, Pejrone G, Brusco P, Trombetta A, Martinasso G, Preti G, et al. TNF- $\alpha$  TGF- $\beta$ 2 and IL-1 $\beta$  levels in gingival and peri-implant crevicular fluid before and

- after de novo plaque accumulation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(6):532-8.
204. Steinsvoll S, Halstensen T, Schenck K. Extensive expression of TGF- $\beta$ 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999;26(6):366-73.
205. Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *Journal of Periodontology*. 2008;79(8S):1544-51.
206. Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Diseases*. 2006;12(2):85-101.
207. Rathbone M, Senel S, Pather I. *Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy*: Springer; 2015.
208. Alam MA, Ali R, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM. Solid dispersions: a strategy for poorly aqueous soluble drugs and technology updates. *Expert opinion on drug delivery*. 2012;9(11):1419-40.
209. Mura P, Moyano J, Rodríguez MG, Alvarez AR, Cirri M, Maestrelli F. Characterization and dissolution properties of ketoprofen in binary and ternary solid dispersions with polyethylene glycol and surfactants. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2005;31(4-5):425-34.
210. Thakral S, Terban MW, Thakral NK, Suryanarayanan R. Recent advances in the characterization of amorphous pharmaceuticals by X-ray diffractometry. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;100:183-93.
211. Wang W, Xu D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994;16(3):149-52.
212. Grohgan H, Priemel PA, Löbmann K, Nielsen LH, Laitinen R, Mullertz A, et al. Refining stability and dissolution rate of amorphous drug formulations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014;11(6):977-89.
213. Brough C, Williams R. Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;453(1):157-66.
214. Kumar MNR. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*. 2000;46(1):1-27.
215. Okada H, Murakami S, Kitamura M, Nozaki T, Kusumoto Y, Hirano H, et al. Diagnostic strategies of periodontitis based on the molecular mechanisms of periodontal tissue destruction. *Oral Diseases*. 1996;2(1):87-95.
216. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M, Prostack L, Haffajee A, Socransky S. Levels of interleukin  $1\beta$  in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 1991;18(7):548-54.

217. Fong D, Gélinas PG, Lavertu M, Sato S, Hoemann CD. Human macrophages release higher IL-1 $\alpha$  over IL-1 $\beta$  when stimulated by block acetylated chitosan microparticles and not by random acetylated chitosans or water-soluble oligomers. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2016.
218. Feng J, Zhao L, Yu Q. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;317(2):414-20.
219. Chung YS, Choi M, Park I, Park KY, Kim KH. Effects of Chitosan on the Production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in Mice. *Cancer Prevention Research*. 2010;15(3):204-10.
220. Fong D, Ariganello MB, Lauzière JG, Hoemann CD. Biodegradable chitosan microparticles induce delayed STAT-1 activation and lead to distinct cytokine responses in differentially polarized human macrophages in vitro. *Acta Biomaterialia*. 2015;12:183-94.
221. Oliveira MI, Santos SG, Oliveira MJ, Torres AL, Barbosa MA. Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. *European Cells & Materials*. 2012;24:136-52.
222. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 1997;18(13):947-51.
223. Corradetti B. *The Immune Response to Implanted Materials and Devices: The Impact of the Immune System on the Success of an Implant*: Springer; 2016.
224. Stadler AF, Angst PD, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2016;43(9).
225. Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, Liao J, Node K, Izumi Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *Journal of Dental Research*. 2006;85(6):520-3.
226. Liu HT, Li WM, Li XY, Xu QS, Liu QS, Bai XF, et al. Chitosan Oligosaccharides Inhibit the Expression of Interleukin-6 in Lipopolysaccharide-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells Through p38 and ERK1/2 Protein Kinases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2010;106(5):362-71.
227. Ma P, Liu HT, Wei P, Xu QS, Bai XF, Du YG, et al. Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW264. 7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(4):1391-8.
228. Kim SK. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*: CRC Press; 2010.

229. Canali MM, Porporatto C, Aoki MP, Bianco ID, Correa SG. Signals elicited at the intestinal epithelium upon chitosan feeding contribute to immunomodulatory activity and biocompatibility of the polysaccharide. *Vaccine*. 2010;28(35):5718-24.
230. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;52(2):105-15.
231. Kim MS, You HJ, You MK, Kim NS, Shim BS, Kim HM. Inhibitory Effect of Water-Soluble Chitosan on TNF- $\alpha$  and IL-8 Secretion from HMC-1 Cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2004;26(3):401-9.
232. Lv C, Dai H, Xing X, Zhang J. The systematic effects of chitosan on fibroblasts derived from hypertrophic scars and keloids. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2012;78(4):520.
233. Park CJ, Gabrielson NP, Pack DW, Jamison RD, Johnson AJW. The effect of chitosan on the migration of neutrophil-like HL60 cells, mediated by IL-8. *Biomaterials*. 2009;30(4):436-44.
234. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993;178(6):2207-11.
235. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1 $\beta$ , IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(6):507-13.
236. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of Dentistry*. 2004;32(7):511-20.
237. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *Journal of Periodontology*. 2001;72(5):590-7.
238. Tie C, Gao K, Zhang N, Zhang S, Shen J, Xie X, et al. Ezetimibe attenuates atherosclerosis associated with lipid reduction and inflammation inhibition. *PloS one*. 2015;10(11):e0142430.
239. Wei L, Yamamoto M, Harada M, Otsuki M. Treatment with atorvastatin attenuates progression of insulin resistance and pancreatic fibrosis in the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Metabolism*. 2016;65(2):41-53.
240. Ye P, Simonian M, Chapple C, Gibbins J, Kumar R, Hunter N. Differential expression of transforming growth factors- $\beta$ 1,- $\beta$ 2,- $\beta$ 3 and the type I, II, III receptors in the lining epithelia of inflamed gingiva. *Pathology*. 2003;35(5):384-92.

241. Sakai A, Ohshima M, Sugano N, Otsuka K, Ito K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. *Journal of Periodontology*. 2006;77(5):856-64.
242. Wang Y, Chang H, Zou J, Jin X, Qi Z. The effect of atorvastatin on mRNA levels of inflammatory genes expression in human peripheral blood lymphocytes by DNA microarray. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2011;65(2):118-22.
243. de Araújo Júnior RF, Souza TO, de Moura LM, Torres KP, de Souza LB, Alves Mdo S, et al. Atorvastatin decreases bone loss, inflammation and oxidative stress in experimental periodontitis. *PloS one*. 2013;10:e75322.
244. Goes P, Melo I, Silva L, Benevides N, Alencar N, Ribeiro R, et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2014;49(1):45-54.
245. Furlaneto FA, Nunes NL, Oliveira Filho IL, Frota NP, Yamamoto KO, Lisboa MR, et al. Effects of locally administered tiludronic acid on experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*. 2014;85(9):1291-301.
246. Queiroz-Junior C, Pacheco C, Maltos K, Caliari M, Duarte I, Francischi J. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2009;44(2):153-60.
247. Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. *Journal of Periodontology*. 2012;83(2):156-61.
248. Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2016;70(1):164-83.
249. Prakasam S, Srinivasan M. Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Diseases*. 2014;20(2):171-7.
250. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2009;80(3):436-46.
251. Teles RP, Likhari V, Socransky S, Haffajee A. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *Journal of Periodontal Research*. 2009;44(3):411-7.
252. Gürkan A, Emingil G, Çınarcık S, Berdeli A. Gingival crevicular fluid transforming growth factor- $\beta$  1 in several forms of periodontal disease. *Archives of Oral Biology*. 2006;51(10):906-12.
253. Wright H, Chapple I, Matthews J. Levels of TGF $\beta$ 1 in gingival crevicular fluid during a 21-day experimental model of gingivitis. *Oral Diseases*. 2003;9(2):88-94.



254. Mize T, Sundararaj K, Leite R, Huang Y. Increased and correlated expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor beta 1 in surgically removed periodontal tissues with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2015;50(3):315-9.
255. Usui M, Suda R, Miyazawa Y, Kobayashi M, Okamatsu Y, Takiguchi H, et al. Statin decreases IL-1 and LPS-induced inflammatory cytokines production in oral epithelial cells. *New Frontiers in Lifestyle-Related Diseases*: Springer; 2008. p. 125-31.
256. Omoigui S. The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging—Role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immunity & Ageing*. 2007;4(1):1.
257. Medeiros C, Leitão R, Macedo R, Barboza D, Gomes A, Nogueira N, et al. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011;67(5):1085-100.
258. Ari VC, Ilarslan YD, Erman B, Sarkarati B, Tezcan I, Karabulut E, et al. Statins and IL-1 $\beta$ , IL-10, and MPO Levels in Gingival Crevicular Fluid: Preliminary Results. *Inflammation*. 2016;39(4):1547-57.
259. Grover HS, Kapoor S, Singh A. Effect of topical simvastatin (1.2 mg) on gingival crevicular fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels in chronic periodontitis—A clinicobiochemical study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016;6(2):85-92.
260. Araújo F, Rocha M, Mendes J, Andrade S. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010;64(1):29-34.
261. Moore KW, O'garra A, Malefyt RdW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*. 1993;11(1):165-90.
262. Liu AB, Pu Y, Zheng YQ, Cai H, Ye B. Therapeutic efficacies of chitosan against *Pneumocystis pneumonia* of immunosuppressed rat. *Parasite immunology*. 2014;36(7):292-302.
263. Abdel-Latif M, Abdel-Haleem HM, Abdel-Baki AAS. Anticoccidial activities of Chitosan on *Eimeria papillata*-infected mice. *Parasitology research*. 2016;115(7):1-8.
264. Marques M, Brown SA, Rodrigues-Pereira P, Natália M, Cordeiro D, Morales-Helguera A, et al. Animal model of implant capsular contracture: effects of chitosan. *Aesthetic Surgery Journal*. 2011;31(5):540-50.
265. Muzzarelli R, Biagini G, Pugnali A, Filippini O, Baldassarre V, Castaldini C, et al. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*. 1989;10(9):598-603.



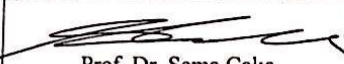
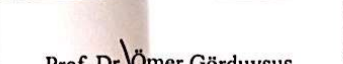



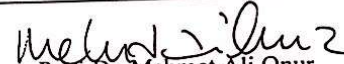
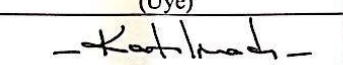

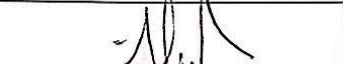
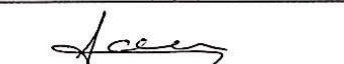

266. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2008;79(8S):1569-76.

## EKLER

## EK -1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

	<b>HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ</b>	06100 Sıhhiye-Ankara
	<b>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU</b>	Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php
S. [REDACTED]		27 Mart 2014
Sayı: 52338575 - 53		
<b>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI</b>		
<b>TOPLANTI TARİHİ</b>	:	21.03.2014 (CUMA)
<b>TOPLANTI SAYISI</b>	:	2014/03
<b>DOSYA KAYIT NUMARASI</b>	:	2014/16
<b>KARAR NUMARASI</b>	:	2014/16-10
<b>ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ</b>	:	Prof. Dr. Sevda ŞENEL
<b>HAYVAN DENEYLERİNDE</b>		
<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI</b>	:	Prof. Dr. Alper B. İSKİT, Ecz. Makbule TOKMAK
<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR</b>	:	Yrd.Doç.Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU, Dr. Yağmur Deniz İLARSLAN, Yrd.Doç.Dr. Gülçin AKÇA
<b>ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI</b>	:	192 adet sıçan
<p>Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevda ŞENEL'in araştırma yürütücüsü olduğu 2014/16 kayıt numaralı "<i>Peridontal Hastalıkların Tedavisi Amacıyla Statin İçeren Bir Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi</i>" isimli çalışma Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy çokluğu ile onaylanmasına karar verilmiştir.</p>		
<p>Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.</p>		
		 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ Etik Kurul Başkanı

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ**  
**TOPLANTI TARİHİ** : 21.03.2014 (CUMA)  
**TOPLANTI SAYISI** : 2014/3  
**TOPLANTI SAATİ** : 14.30

 Prof. Dr. Sema Çalış (Başkan)	 Prof. Dr. Ömer Görduysus (Üye)	 Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)
 Prof. Dr. Yıldırım Sara (Üye)	 Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu Falkmarken (Üye)	 Prof. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)
KATILMADI Prof. Dr. Belgin Can (Üye)	 Doç. Dr. Saniye Ekinci (Üye)	KATILMADI Doç. Dr. Aytekin Akyol (Üye)
 Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel (Üye)	 Doç. Dr. İlyas Önbaşilar (Üye)	 Avukat Yasemin Özselçuk (Üye)
 Mevlüt Öksüzöglü (Üye)		



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

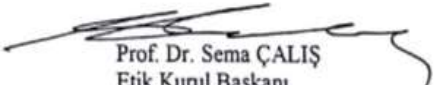
Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 134

**Prof. Dr. Sevda ŞENEL**  
Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. ŞENEL,

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz Kurulumuzun 21.03.2014 tarihli toplantısında onaylanan, 2014/16-10 dosya kayıt numaralı ve "*Peridontal Hastalıkların Tedavisi Amacıyla Statin İçeren Bir Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi*" başlıklı projenin araştırma ekibinde olan Ecz. Makbule TOKMAK'ın kendi isteği ile çalışmadan ve aynı zamanda tez programından ayrılması sebebi ile yerine Ecz. Ayben Işılay ÖZDOĞAN'ın sorumlu araştırmacı olarak dahil edilmesini talep ettiğiniz dilekçeniz Kurulumuzun 18.11.2014 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, oybirliği ile uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

**EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler**

**12th International Conference of the European Chitin Society and 13th International Conference on Chitin and Chitosan - ICC / EUCHIS 2015**

**Chitosan based formulations of atorvastatin for periodontal delivery**

A.İşıl Özdoğan<sup>1</sup>, G. Akca<sup>2</sup>, S. Şenel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-06100, Turkey

<sup>2</sup>Gazi University, Faculty of Dentistry, Department of Medical Microbiology, Ankara-06510, Turkey

In recent years, statin group drugs are investigated for the treatment of periodontal diseases due to their antiinflammatory effect. The efficacy of statins can be enhanced by local administration into the periodontal pocket by appropriate delivery system. The aim of our study was to develop a bioadhesive delivery system for atorvastatin for local treatment of periodontal disease. Due to the low solubility of atorvastatin, solid dispersions were prepared using different types of chitosan. 2 % atorvastatin was loaded into the formulations. The solid dispersions were then incorporated into chitosan gels. The viscosity and mucoadhesive property of the formulations was investigated in absence and presence of the drug. Release and permeation studies were performed in vitro. The compatibility and antiinflammatory effect of the developed formulations was investigated using fibroblast cell lines.

Viscosity of the formulations were found to be suitable for application into the periodontal pockets. Both water soluble and base chitosan gels showed similar mucoadhesive properties. The release of atorvastatin was found to increase in presence of chitosan. Decrease in inflammation was found to be higher in presence of chitosan when compared to that with atorvastatin alone.

Acknowledgements: This study was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758). Authors are thankful to Koyo Company, Japan for their generous gift of chitosan.

**ICCC / EUCHIS 2015 – Poster Ödülü****AAPS PharmSciTech**

An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists

October 7, 2015

Dear Dr. Senel, Pharm. Ozdogan, and Prof. Akca,

Congratulations to your team of researchers on being selected for the *AAPS PharmSciTech* Poster Prize for the ICCC / EUCHIS 2015 12th International Conference of the European Chitin Society and 13th International Conference on Chitin and Chitosan. With this prize, each author will receive a certificate and a one-year AAPS subscription, which grants each author online access to AAPS's four journals—*AAPS PharmSciTech*, *The AAPS Journal*, *Pharmaceutical Research*, and *AAPS Open*—the *AAPS Newsmagazine*, the AAPS book discount code, the *AAPS Open* discount code, eposters from recent meetings, and more!

Further, I invite you to submit the full paper from your winning abstract for peer review in *AAPS PharmSciTech*. You can submit your paper online here: [www.editorialmanager.com/aapspt](http://www.editorialmanager.com/aapspt). Please note in your cover letter that you received the poster prize for this particular conference.

On behalf of the *AAPS PharmSciTech* editorial board, I once again congratulate you on your exceptional work.

Regards,



Robert O. (Bill) Williams III, Ph.D.

## 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition

### Development of Local Delivery Systems for Atorvastatin in Treatment of Periodontal Diseases

I. A. Ozdogan<sup>1</sup>, G. Akca<sup>2</sup>, S. Akbas<sup>1</sup>, S. Senel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe University, <sup>2</sup> Gazi University

#### Purpose

Statins have been reported to exert immunomodulatory and antiinflammatory properties besides their cholesterol lowering effect. Recent clinical studies have indicated that statins have beneficial effect also on periodontal disease, which is inflammation associated. The purpose of this study was to develop a delivery system for a poorly soluble statin drug, atorvastatin (ATV), which would increase the solubility of the drug, and provide local delivery into the periodontal pocket resulting in an improved efficacy. Furthermore, the enhancing effect of chitosan, which also exerts biological activity, on antiinflammatory activity of ATV was investigated in vitro.

#### Methods

Solid dispersions were prepared using different polymers such as PEG 6000 (using conventional fusion method); Pluronic F-68 (using melting method) and base chitosan (Koyo Chitosan DAC-100) (using solvent evaporation method). Different drug:polymer ratios (1:3, 1:1, 3:1) (w/w) were investigated. Subsequently, the solid dispersions were incorporated into chitosan based gels (Koyo Chitosan DAC-100 (base form), Koyo, Japan and Protasan UP CL 213, Mw: 150-400 kDa, Novamatrix, Norway). After characterization of the formulations, bioadhesion properties were examined using Texture Analyzer (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) at speed of 0.1 mm/s, contact force of 0.2 N, contact time 180 sec. Viscosity of the gels were measured using Brookfield viscometer. Release of the drug from the formulations was investigated in vitro in Franz diffusion cells with 2.01 cm<sup>2</sup> diffusion area and 20 mL receptor volume. Antiinflammatory effect of the formulations was evaluated in vitro using tumor necrosis factor (TNF)-alfa induced human gingival fibroblast (hGF) cells. After incubating the hGF cells with the formulations for 4h and 8h, the amount of interleukin (IL)-8 (CXCL-8) release was assayed at 450 nm in Elisa reader, using human IL-8 ELISA (2nd generation) (Affymetrix, eBioscience) kit.

#### Results

The viscosity of the formulations was found to be suitable for delivery into the periodontal pocket. All gel formulations showed pseudoplastic behavior. The gel prepared using base chitosan was found to have higher bioadhesive property (work of adhesion:  $0,50 \pm 0,1 \text{ mJ/cm}^2$ ) when compared to that of prepared with water soluble chitosan (work of adhesion:  $0,34 \pm 0,03 \text{ mJ/cm}^2$ ). Higher work of adhesion values ( $0,65 \pm 0,17 \text{ mJ/cm}^2$  and  $0,81 \pm 0,11 \text{ mJ/cm}^2$  respectively) were obtained when drug was incorporated into the gels. When the drug was incorporated as solid dispersion, the bioadhesivity was found to increase. The highest work of adhesion value found with the solid dispersions prepared with Pluronic F-68 ( $3,45 \pm 0,2 \text{ mJ/cm}^2$ ). There was no significant difference in drug release profiles between the solid dispersions prepared with different polymers. The released amount was between 20 to 25 % in 2 h, and continued upto 6h. Significant decrease in IL-8 amounts was observed with the formulations when compared to that with control (ATV in PEG-600). The inhibition of IL-8 release was increased with chitosan formulations. The inhibition was higher with base chitosan when compared to water soluble chitosan.

#### Conclusion

The developed formulations showed suitable viscosity and bioadhesive properties to retain the drug in the periodontal pocket. Solid dispersions increased the solubility of ATV. The presence of chitosan enhanced the antiinflammatory effect of ATV.

Acknowledgements: This study was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758). Authors are thankful to Koyo Company, Japan for their generous gift of chitosan.

## 43rd Annual Meeting &amp; Exposition of the Controlled Release Society

**Local delivery of atorvastatin with enhanced solubility for the treatment of periodontal disease**A.İşıl Özdoğan<sup>1</sup>, G. Akca<sup>2</sup>, S. Şenel<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-06100,<sup>2</sup>Gazi University, Faculty of Dentistry, Department of Medical Microbiology, Ankara-06510, Turkey

\*ssenel@hacettepe.edu.tr

**Purpose:** Periodontal disease is a bacterial infection, which is associated with tissue destruction occurring as a consequence of the host immune inflammatory response to oral pathogens. Recently, statins have been shown to have anti-inflammatory effects, which are independent of cholesterol lowering (1). The objective of this study was to develop a bioadhesive delivery system for local delivery of a statin group drug, atorvastatin for the treatment of periodontal disease in combination with chitosan which also exerts antiinflammatory property (2).

**Methods:** Due to the low solubility of atorvastatin (AT), solid dispersions were prepared in order to increase the solubility of the drug. Different polymers (PEG 6000 and Pluronic F-68, Merck, Germany; chitosan, Koyo, Japan) at different drug:polymer ratios (1:9, 1:12) (w:w) were used to prepare the solid dispersions, with different preparation methods such as melting, solvent evaporation, kneading and co-grinding. After characterisation by means of DSC, FTIR, light microscopy, drug in solid dispersion form was incorporated into chitosan gels using water soluble (Protasan UP CL 213, Novamatrix, Norway) and base chitosan. The viscosity and bioadhesive properties of the formulations were investigated, and release of the drug was studied in vitro in Franz diffusion cells. Antiinflammatory effect of the formulations was evaluated in vitro by measuring interleukin (IL)-8 (CXCL-8) release, after treatment of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  induced human gingival fibroblast (hGF) cells with the formulations.

**Results:** The solubility of AT was increased from 0.1 to 5.5 g/mL in solid dispersion form, highest with Pluronic F-68, prepared using co-evaporation method. Bioadhesion was increased with solid dispersions compared to that of the drug alone. All gel formulations showed pseudoplastic behavior. Viscosity of the gels were found to be suitable for application into periodontal pocket. Release of the drug was prolonged in chitosan gels. Similar release profiles were obtained with water soluble and base chitosan gels. Significant decrease in IL-8 release was obtained with the drug-chitosan formulations when compared to that with control (AT in PEG-400) (Fig. 1).

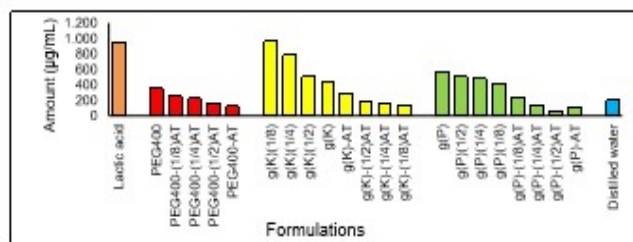


Fig. 1. Release of IL-8 from hGF cells (after 4h)

**Conclusions:** The solubility of AT was increased by solid dispersion preparation, and incorporation of drug in solid dispersion form into chitosan gels provided bioadhesive property with a suitable viscosity for application, and prolonged the release of the drug from the delivery system. The antiinflammatory effect of atorvastatin was shown in hGF cells, increasing in presence of chitosan.

**Acknowledgements:** This project was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758). Authors are thankful to Koyo Company, Japan for their generous gift of chitosan.

**References:**

1. Sakoda K, et al., Inflammation and Regeneration, 2007, 27, 107-111.
2. Şenel S, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2010, 20, 23-32.



## 18<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technology Symposium - IPTS 2016

### Characterisation of Solid Dispersions of Atorvastatin

A.İşıl Öздоğan<sup>1</sup>, Sevda Şenel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-06100, Turkey

#### Introduction

Recent studies have investigated local application of statins for wound healing, bone loss prevention and antiinflammatory effect. However, solubility of atorvastatin is low and in order to have high efficacy, the solubility needs to be improved. In this study, solid dispersions of atorvastatin were prepared [1,2] using different polymers and were characterised in detail.

#### Materials and Methods

Solid dispersion were prepared using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, Merck, Germany), Pluronic F-68 (PL F-68, Merck, Germany) and base chitosan (Koyo Chitosan DAC-100, 85% deacetylation degree, Koyo, Japan) at different drug:polymer ratios (1:9 and 1:12 (w:w)) with different preparation methods such as melting, solvent evaporation, kneading and co-grinding. For characterisation of the developed solid dispersions as well physical mixtures, X-ray diffraction (XRD, D/max-2200/PC, Rigaku Corporation, Japan), differential scanning calorimetry (DSC, Q100, TA Instruments, USA), fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR, 1720-XFT spectrometer, Perkin Elmer Corporation, USA) and scanning electron microscope (SEM, FEI QUANTA 400F, USA) analyses were performed. The crystalline properties of pure AT, its physical mixtures and solid dispersions were examined by means of XRD studies using Cu K $\alpha$  radiation, a voltage of 40 kV, and a 25-mA current at scanning rate of 1° min<sup>-1</sup> over 2 to 50° diffraction angle (2 $\theta$ ) range. Drug-polymer interactions were investigated using FTIR and DSC (10°C/min, 30 to 300°C). Surface morphology of the solid dispersions was examined under SEM.

#### Results and Discussion

The solubility of AT (0.16 mg/mL) was increased in solid dispersion form. The highest solubility was obtained with Pluronic F-68 at 1:12 drug:polymer ratio. Preparation method was found to affect the solubility. For example, with the Pluronic F-68 solid dispersions prepared using the coevaporation method were found to have the highest solubility values (5.55 mg/mL) whilst solubility value was 4.97 mg/mL prepared using the melting method.

Rod shaped atorvastatin crystals (Fig. 1a) were not observed in solid dispersion forms (Fig. 1c), whereas with physical mixtures, crystals were present, physically adsorbed on the surface of the polymer (Fig. 1b).

**11<sup>th</sup> Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium & 5<sup>th</sup> Indian Chitin and Chitosan Society Symposium**

**IN VITRO EVALUATION OF ANTIINFLAMMATORY EFFECT OF LOCALLY DELIVERED ATORVASTATIN FOR TREATMENT OF PERIODONTAL POCKET**

**Özdoğan, A., I.**<sup>1\*</sup>, Akca, G.<sup>2</sup>, Şenel, S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-06100, Turkey,

<sup>2</sup> Gazi University, Faculty of Dentistry, Department of Medical Microbiology, Ankara-06510, Turkey,

[\\*isilay.ozdogan@hotmail.com](mailto:*isilay.ozdogan@hotmail.com)

Periodontal disease is a pathological condition caused by infection which is induced by specific microorganisms, and results in excessive production of inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and L-10. Recent studies have indicated that statins exert direct anti-inflammatory action by decreasing proinflammatory cytokines. In this study, chitosan based bioadhesive local delivery system was developed for atorvastatin (AT), and its antiinflammatory effect was evaluated in vitro using tumor necrosis factor (TNF)-alfa induced human gingival fibroblast (hGF) cells. After incubating the hGF cells with the formulations for 4h and 8h, the amount of interleukin (IL)-8, (IL)-6 release was assayed at 450 nm in Elisa reader.

The presence of chitosan enhanced the antiinflammatory effect of AT. Significant decrease in IL-8, IL-6 amounts was observed with the chitosan formulations when compared to that with control.

Acknowledgment: This study was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758). Authors are thankful to Koyo Company, Japan for their generous gift of chitosan.

## 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition

### Effect of Atorvastatin on Periodontal Inflammation: In Vitro and In Vivo Evaluations

A. I. Ozdogan<sup>1</sup>, G. Akca<sup>2</sup>, A. B. Iskit<sup>1</sup>, K. Kosemehmetoglu<sup>1</sup>, Y. D. Ilarslan<sup>1</sup>, B. Kosekaya<sup>1</sup>, S. Senel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe University, <sup>2</sup>Gazi University

#### Purpose

Recent studies have shown that statins exert antiinflammatory effect besides their serum lipid lowering effect and they have been used topically in treatment of periodontal diseases. We have developed systems for local delivery of a statin group drug, atorvastatin (AT) for the treatment of periodontal inflammation, and in this study we have investigated its antiinflammatory effect in vitro and in vivo.

#### Methods

In order to enhance the solubility of AT, solid dispersions were prepared using different polymers (PEG 6000, Pluronic F-68 and chitosan), and for local delivery, AT in solid dispersion form was incorporated into chitosan gels, which were prepared using base or water soluble chitosan (Koyo Chitosan DAC-100 (base form), Koyo, Japan and Protasan UP CL 213, Mw: 150-400 kDa, Novamatrix, Norway). In vitro release of AT from the gels was performed in Franz diffusion cells using cellulose membrane. Antiinflammatory effect of the formulations was investigated in vitro using tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  induced human gingival fibroblast (hGF) cells. Release of IL-8, IL-6, IL10, IL-1 $\beta$ , which are the main markers for inflammation in periodontal disease, was investigated after incubating the hGF cells with the formulations. Furthermore, the antiinflammatory effect of the formulations was evaluated in model animals using ligature-induced periodontitis model. The formulations were applied locally after periodontitis was obtained. At certain time intervals, the mandibles were dissected, specimens were sectioned for histological examination and stained with hematoxylin and eosin for evaluation of alveolar crest osteoclasts and surrounding inflammation.

#### Results

Release of AT was prolonged with gel formulations (20-25 % in 2h). No significant difference in release of AT was found between water soluble and base chitosan based gels. Significant decrease in release of cytokines (IL-8, IL-6, IL10, IL-1 $\beta$ ) was obtained with the chitosan based gels containing AT in solid dispersion form. The effect of water soluble chitosan gels inhibition of IL-8 and IL-10 was found to be higher than that of base chitosan, whilst IL-6 release was found to be lower with water soluble chitosan. The antiinflammatory effect was observed to continue during 8h period. Periodontitis with alveolar bone loss was experimentally obtained with ligature-induced periodontitis model. Local administration of the gel formulations was found to reduce inflammation, and stimulation of the bone formation was observed.

#### Conclusion

The antiinflammatory effect of AT containing formulations on experimentally induced periodontitis has been shown in vitro and in vivo. Incorporation of AT into chitosan gels has enhanced this antiinflammatory effect.

Acknowledgements: This study was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758). Authors are thankful to Koyo Company, Japan for their generous gift of chitosan.

## 44th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society

### Role of Atorvastatin on Regulation of Transforming Growth Factor-Beta Expression in Periodontal Inflammation

A. Işıl Öздоğan<sup>1</sup>, Yağmur D. İlarlan<sup>2</sup>, Gülçin Akca<sup>3</sup>, H. Burak Kutlu<sup>2</sup>, Elnur Comerdov<sup>2</sup>, Kemal Kösemehmetoğlu<sup>4</sup>, Şevda Şenel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup>Hacettepe University, Faculty of Dentistry, <sup>3</sup>Gazi University, Faculty of Dentistry, <sup>4</sup>Hacettepe University, Faculty of Medicine, Ankara- Turkey.

**Introduction:** Atorvastatin plays important role in periodontal disease, regulating expression of cytokines associated with inflammation [1]. TGF- $\beta$  represents a family of polypeptide growth factors including TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3, involved in inflammation [2]. In this study, we investigated TGF- $\beta$  levels following application of atorvastatin incorporated into chitosan gels.

**Methods:** Atorvastatin (AT) at 2%w/v concentration was incorporated into gels prepared using water soluble (Protasan UP-CL213, Norway) or base chitosan (Koyo, Japan). For control, AT in PEG-400 (Merck, Germany) was prepared and TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 levels were evaluated in vitro, using tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  induced human gingival fibroblast (hGF) cells, and in vivo in rats with ligature-induced periodontitis. Control and gel formulations were applied on cell cultures and TGF- $\beta$  levels were analyzed by ELISA (Affymetrix, eBioscience). In vivo tissue samples were collected, the dissected rat gingival tissues (stored at -80°C) were homogenized and TGF levels were analyzed using Cusabio, PRC kits.

**Results:** TNF- $\alpha$  induction of hGF cells resulted in increased TGF- $\beta$  release. Upon application of AT solution, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 levels were observed to decrease. Following chitosan application, TGF- $\beta$ 1 level was decreased whilst TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 levels were increased. When AT was incorporated into chitosan gels, TGF- $\beta$ 1 release was higher whereas TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 were lower than that obtained with AT and chitosan alone. Chitosan type used for gel formulations was found to have different effect on TGF-beta1 release, resulting in higher levels of TGF- $\beta$  with water soluble chitosan when compared to base chitosan. Varying responses for TGF- $\beta$  expressions were observed in vivo studies. Local application of AT in rats with ligature-induced periodontitis was observed to decrease TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 levels whilst increasing TGF- $\beta$ 3 level. With chitosan alone, an increase was observed in TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 levels whilst a slight decrease was observed in TGF- $\beta$ 3 level. Combination of AT with chitosan gel resulted in decrease in TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 levels. No difference between water soluble chitosan and base chitosan was observed on release of TGF beta levels in vivo studies.

**Conclusion:** Varying levels of TGF- $\beta$  isoforms were obtained in vitro and in vivo which implies that TGF- $\beta$  elicits different responses in different cell types. AT incorporated chitosan gel formulations were found to decrease TGF- $\beta$  levels indicating an antiinflammatory effect and suggesting that regulation of TGF- $\beta$  levels plays a role in treatment of periodontal inflammation. Nonetheless, more studies are needed in order to elucidate TGF- $\beta$  regulation in presence of AT and chitosan.

**Acknowledgements:** This project was supported by TÜBİTAK-SBAG-1001 program (114S758). Authors are thankful to Koyo Company, Japan for their generous gift of chitosan.

#### References:

1. de Araújo Júnior, Raimundo Fernandes, et al. PloS one. 2013. e75322.
2. Okada, H., and S. Murakami. Critical Reviews in Oral Biology&Medicine. 1998. 248-266.

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Ayben Işılray ÖZDOĞAN

Ankara, 1 Ocak 1991, Türkiye Cumhuriyeti

Ataç 1 Sokak No: 33/11 Kızılay, Çankaya ANKARA

isilay.ozdogan@hotmail.com, 0505 306 57 85

### II- Eğitimi

**Doktora** Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eylül 2013-)

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Tez Başlığı: Periodontal Hastalıkların Tedavisi Amacıyla Statin İçeren Bir Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevda ŞENEL

**Lisans** Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2013)

Mezuniyet Projesi Başlığı: Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Yollarla Üretimi

Proje Danışmanı: Prof. Dr. İclal SARAÇOĞLU

Eylül 2011-Temmuz 2012 (Erasmus)

Parma Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Lise** Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi (2008)

### III- Mesleki Deneyimi

Nisan 2014-devam etmekte **Türk Patent ve Marka Kurumu**  
Sınai Mülkiyet Uzmanı

Aralık 2013-Nisan 2014 **FarmaPatent Limited Şirketi**  
Patent Uzmanı

**Türk Patent ve Marka Kurumu Uzmanlık tezi** (A.Ü. Hukuk Fakültesi)

- Eşdeğerler Doktrini ve İlaçlarda Eşdeğerler Yoluyla Tecavüz Davalarının İncelenmesi.  
Haziran 2017  
Danışman: Doç Dr. Süleyman YILMAZ

### Yayımlar

- Azeran N. S., Zazali N.D., Timur S.S., Özdoğan A.I., Ekizoğlu M., Sheshala R., Dua K., Sahu P. S., Şenel S., Moxifloxacin loaded chitosan gel formulations for the treatment of periodontal diseases, Journal of Polymer Materials, Vo. 34, 157-169, 2017
- Özdoğan, A. I., İlarıslan, Y. D., Kösemehmetoğlu, K, Akca, G., Kutlu, H. B., Comerđov, E., İskit, A. B., Şenel, S. In Vivo Evaluation of Antiinflammatory Effect of Locally Delivered Atorvastatin in Treatment of Periodontitis (hazırlık aşamasında).
- Özdoğan, A. I., Akca, G., Şenel, S. Antiinflammatory Effect of Atorvastatin Containing Local Delivery Systems: In Vitro Evaluations (hazırlık aşamasında).
- Özdoğan, A. I., Şenel, S. Development of Atorvastatin Containing Local Delivery System for the Treatment of Periodontitis (hazırlık aşamasında).

**Bildiriler (Poster)**

- Özdoğan, A. I., Akca, G., Şenel, S., “Chitosan Based Formulations of Atorvastatin for Periodontal Delivery”, 12th International Conference of the European Chitin Society, 30 Ağustos-2 Eylül, 2015, Münster-ALMANYA.
- Özdoğan, A. I., Akca, G., Akbaş, S., Şenel, S., “Development of Local Delivery Systems for Atorvastatin in Treatment of Periodontal Disease”, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Kasım, 2015, Orlando-ABD.
- Özdoğan, A. I., Akca, G., Şenel, S., “Local Delivery of Atorvastatin with Enhanced Solubility for the Treatment of Periodontal Disease”, 43rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 17-20 Temmuz, 2016, Seattle-ABD.
- Özdoğan, A. I., Şenel, S., “Characterisation of Solid Dispersions of Atorvastatin”, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2016, 18-21 Eylül, 2016, Antalya-TÜRKİYE.
- Özdoğan, A. I., Akca, G., Şenel, S., “In Vitro Evaluation of Antiinflammatory Effect of Locally Delivered Atorvastatin for Treatment of Periodontal Pocket”, 11th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium & 5th Indian Chitin and Chitosan Society Symposium, 28-30 Eylül, 2016 Kochi-HİNDİSTAN.
- Özdoğan, A. I., Akca, G., İskit, A. B., Kösemehmetoğlu, K., İlarıslan, Y. D., Kösekaya, B., Şenel, S., “Effect of Atorvastatin on Periodontal Inflammation: in Vitro and in Vivo Evaluations”, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım, 2016, Denver-ABD.
- Özdoğan, A. I., İlarıslan, Y. D., Akca, G., Kutlu, H. B., Comerdov, E., Kösemehmetoğlu, K., Şenel, S., “Role of Atorvastatin on Regulation of

Transforming Growth Factor-Beta Expression in Periodontal Inflammation”, 44th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 16-19 Temmuz, 2017, Boston-ABD.

### **Ödül**

- “AAPS PharmSciTech Poster Prize” (2015). Özdoğan, A. I., Akca, G., Şenel, S., “Chitosan Based Formulations of Atorvastatin for Periodontal Delivery”, 12th International Conference of the Europe.

### **Projeler**

- Periodontal Hastalıkların Tedavisi Amacıyla Statin İçeren Bir Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi. TÜBİTAK-SBAG 1001 (114S758)  
(01/11/2014 – 01/11/2016)  
Bursiyer



