



**FATİH SULTAN MEHMET VAKIF ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**HİYALÜRONİK ASİT BAZLI GLUTATYON-
AVOKADO YAĞI-JELATİN-KOLAJEN-LAMİNİN
YÜKLÜ 3 BOYUTLU BİYOAKTİF TRANSDERMAL
DOKU İSKELESİ TASARIMI: FRANZ DİFÜZYON
SALIM KİNETİĞİ MODELLEMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BETÜL KILIÇ

İSTANBUL, 2024



**FATİH SULTAN MEHMET VAKIF ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**HİYALÜRONİK ASİT BAZLI GLUTATYON-
AVOKADO YAĞI-JELATİN-KOLAJEN-LAMİNİN
YÜKLÜ 3 BOYUTLU BİYOAKTİF TRANSDERMAL
DOKU İSKELESİ TASARIMI: FRANZ DİFÜZYON
SALIM KİNETİĞİ MODELLEMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BETÜL KILIÇ
(210231003)**

**Danışman
(Dr. Öğr. Üyesi Fatih Çiftçi)**

Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 2022-B-03 Proje çağrısı kapsamında desteklenen 24405 proje numarası ile desteklenmiştir.

İSTANBUL, 2024

01/07/2024

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans programı öğrencisi 220231003 numaralı Betül KILIÇ'ın hazırladığı Esansiyel Yağ ve İlaç Yüklü Kompozit Transdermal Doku İskelelerin Biyoaktif Salım Kinetik Matematisel Modellemesi" konulu Yüksek Lisans/Doktora/Sanatta Yeterlik tezi ile ilgili Tez Savunma Sınavı, 01/07/2024 Pazartesi günü saat 11:00'da yapılmış, sorulara alınan cevaplar sonunda adayın tezinin **Kabulüne Oy Çoğunluğu/Oy Birliği** ile karar verilmiştir.

Tez adı değişikliği yapılması halinde: Tez adının HİYALÜRONİK ASİT BAZLI GLUTATYON-AVOKADO YAĞI-JELATİN-KOLAJEN-LAMİNİN YÜKLÜ 3 BOYUTLU BİYOAKTİF TRANSDERMAL DOKU İSKELESİ TASARIMI: FRANZ DİFÜZYON SALIM KİNETİĞİ MODELLEMESİ şeklinde değiştirilmesi uygundur.

Jüri Üyesi	Karar
1. (Danışman) Dr. Öğr. Üyesi Fatih ÇİFTÇİ	KABUL
2. Dr. Öğr. Üyesi Burçin ÖZBAY KISASÖZ	KABUL
3. Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer DUYGULU	KABUL
4.
5.
6. (İkinci Danışman)*

*2. Danışman varsa doldurulması gerekmektedir.

ETİK BİLDİRİM

Bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bağlı olduğum üniversite veya bir başka üniversitedeki başka bir çalışma olarak sunulmadığını beyan ederim.

Betül Kılıç

**HİYALÜRONİK ASİT BAZLI GLUTATYON-AVOKADO YAĞI-
JELATİN-KOLAJEN-LAMİNİN YÜKLÜ 3 BOYUTLU
BİYOAKTİF TRANSDERMAL DOKU İSKELESİ TASARIMI:
FRANZ DİFÜZYON SALIM KİNETİĞİ MODELLEMESİ**

Betül Kılıç

ÖZET

Diyabetik yaralar, sitotoksik enzimler, radikal oksijen türleri (ROS) ve inflamatuvar araçlar salgılayarak çevre dokulara büyük zarar veren sürekli bir nötrofil akını ile öne çıkan inflamatuvar fazda kalır. ROS, istilacı patojenlere karşı savunma için gereklidir ve düşük ROS seviyeleri de hücre içi sinyalizasyonun temel araçlarıdır. Bununla birlikte, iltihaplı diyabetik yaralarda gözlemlendiği gibi aşırı ROS üretimi, lökositlerin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin hasar görmesine neden olur. Bu nedenle, kalıcı enflamasyonun azaltılması/sonlandırılması ve serbest radikallerin bir antioksidan ile ortadan kaldırılması iyileşmeyi artırmak için önemli bir strateji olabilir.

Transdermal membran (TDM) doku iskelesi, yara iyileşmesini kolaylaştırmak ve yerel çevrenin hassas dengesini korumak için cildin doğal bileşenlerinden oluşur. Bu yara örtüsü, dermal steril bir matris (iskele)tir ve cilt yüzeyinin iyileşme sürecini kolaylaştırır. İskele kolajen (KOL), laminin (LM) ve yüzeyde sodyum hiyalüronat (hiyalüronik asit), dipalmytoyl fosfatidilkolin (DPPC) ve glutatyondan (GSH) yapılmış mikropartiküller içerir.

GSH yüklü mikropartiküller, TDM 'nin antioksidan etkisinden sorumlu olan kısmıdır. Serbest radikallerin aktivitesini kontrol etme ihtiyacı nedeniyle, GSH serbest radikal hasarına karşı güçlü bir antioksidan olarak seçilmiştir. GSH, proteaz enzimlerinden koruyarak, fibroblastların fonksiyonlarını artırarak ve kolajen sentezini artırarak dermiste hücre çoğalmasını uyarır. Bu bileşiğin, serbest radikallerin temizlenmesi gibi kimyasal özellikleri veya belirli bir biyolojik sistemdeki dolaylı etkileri nedeniyle cilt için olağanüstü faydalara sahip olduğu gösterilmiştir.

Yukarıdaki bilgiler dikkate alınarak, mikropartiküller içinde kapsüllenmiş ve daha düşük aralıklarda tek başına GSH konsantrasyonları, hücre canlılığı ve hücrelerdeki ROS üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için değerlendirilmiştir. Diyabetik yaralar yavaş iyileşme eğilimindedir ve iyileşme süreci, daha yüksek uzuv amputasyonu riski nedeniyle çok karmaşık olabilir. Diyabetik yaralar, sitotoksik enzimler, ROS ve inflamatuvar araçları serbest bırakan nötrofillerin sürekli akışıyla karakterize inflamatuvar fazda kalır ve çevredeki dokuya büyük zarar verir. İstilacı patojenlere karşı savunma için ROS gereklidir ve düşük ROS seviyeleri aynı zamanda hücre içi sinyallemenin temel araçlarıdır. Bununla birlikte, iltihaplı diyabetik yaralarda gözlenen aşırı ROS üretimi, lökositlerin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinde hasara neden olur. Bu nedenle, kalıcı inflamasyonun azaltılması veya sonlandırılması ve bir antioksidanın eklenmesiyle serbest radikallerin ortadan kaldırılması, iyileşme oranını arttırdığı için önemli bir strateji olabilir.

Yara bakımı alanındaki araştırmalar, hücre dışı matrisin (ECM) çeşitli proteinlerinden üretilen biyoaktif dermal matrislerin iyileşme sürecini destekleme yeteneğine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. ECM, fibroblastların göçünde yer alan faktörlerden biridir ve bunların göç yolları, KOL, hiyalüronik asit (HyA) ve LM gibi ECM bileşimi tarafından yönlendirilir. Tip 1 kolajen, dermal matrislerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir malzemedir. Emilebilirdir, yüksek su afinitesine, düşük antijeniteye, iyi hücre uyumluluğuna ve doku yenilenmesini destekleme yeteneğine sahiptir. HyA, morfogenez ve onarım döneminde hücre göçünü kolaylaştırır. ECM proteinleri arasında, epidermiste keratinosit yapışması için önemli bir ligand olan laminin-5, keratinositin hayatta kalmasını destekler. DPPC, lipit çift katmanları oluşturma yetenekleri nedeniyle tüm hücre zarlarının ana bileşeni olan bir lipit sınıfına aittir.

Bu bilgiler göz önüne alındığında, antioksidanı diğer bileşenlerle sinerjistik bir şekilde iletecek ve yara ortamının hassas dengesini koruyacak bir dermal matris tasarlandı. Böylece üç boyutlu (3B) Kolajen-Laminin gözenekli yapıli dermal matris hazırlanarak GSH yüklü HyA/AVO mikropartiküller ile doygun hale getirildi. Böylece TDM, kronik yara tedavilerinin etkinliğini artırarak iyileşme süresini kısaltır ve doku onarımına yardımcı olur. Yara bölgesindeki serbest/oksijen radikallerini azaltma

yeteneği ile savunma mekanizması ve yara alanının dengesini ve yüzey cilt bileşenlerini telafi ederek doğal olarak oluşan yara iyileşme sürecini de kolaylaştırır.

Anahtar Kelimeler: Transdermal Yara Örtüsü, Doku İskelesi, Glutasyon, Laminin, Kolajen, Jelatin

**DESIGN OF HYALURONIC ACID BASED GLUTATHIONE-
AVOCADO OIL-GELATIN-COLLAGEN-LAMININ LOADED 3D
BIOACTIVE TRANSDERMAL TISSUE SCAFFOLD: FRANZ
DIFFUSION RELEASE KINETICS MODELING**

Betül Kılıç

ABSTRACT

Diabetic wounds remain in the inflammatory phase, characterized by a constant influx of neutrophils that cause extensive damage to surrounding tissues by secreting cytotoxic enzymes, radical oxygen species (ROS) and inflammatory mediators. ROS are essential for defense against invading pathogens, and low levels of ROS are essential mediators of intracellular signaling. However, excessive ROS production, as observed in inflamed diabetic wounds, leads to activation of leukocytes and damage to endothelial cells. Therefore, reducing/terminating persistent inflammation and eliminating free radicals with an antioxidant may be an important strategy to improve healing.

TD dressing consists of skin's natural ingredients to facilitate wound healing and maintain the delicate balance of the local environment. This dressing is a dermal sterile matrix (scaffold) and facilitates the healing process of the skin surface. The scaffold contains collagen, laminin, and surface microparticles made of sodium hyaluronate (hyaluronic acid), dipalmytoyl phosphatidylcholine (DPPC), and glutathione (GSH).

GSH-loaded microparticles are the part of TD responsible for its antioxidant effect. Because of the need to control the activity of free radicals, GSH has been selected as a powerful antioxidant against free radical damage. GSH stimulates cell proliferation in the dermis by protecting it from protease enzymes, increasing the functions of fibroblasts and increasing collagen synthesis. This compound has been

shown to have extraordinary benefits for the skin due to its chemical properties, such as scavenging free radicals, or indirect effects on a specific biological system.

Considering the above information, GSH concentrations encapsulated in microparticles and alone at lower ranges were evaluated to determine its effect on cell viability and ROS production in cells. Diabetic wounds tend to heal slowly and the healing process can be very complicated due to the higher risk of limb amputation. Diabetic wounds remain in the inflammatory phase, characterized by a constant influx of neutrophils that release cytotoxic enzymes, radical oxygen species (ROS), and inflammatory mediators, causing extensive damage to the surrounding tissue. ROS are required for defense against invading pathogens, and low levels of ROS are also essential mediators of intracellular signaling. However, excessive ROS production observed in inflamed diabetic wounds causes activation of leukocytes and damage to endothelial cells. Therefore, reducing or ending persistent inflammation and eliminating free radicals through the addition of an antioxidant may be an important strategy as it increases the rate of healing.

Research in the field of wound care has revealed that bioactive dermal matrices produced from various proteins of the extracellular matrix (ECM) have the ability to support the healing process. ECM is one of the factors involved in the migration of fibroblasts, and their migration pathways are guided by the ECM composition, such as collagen, hyaluronic acid (HyA), and laminin. Type 1 collagen is a widely used material in the production of dermal matrices. It is absorbable, has high water affinity, low antigenicity, good cell compatibility and the ability to promote tissue regeneration. HyA facilitates cell migration during the period of morphogenesis and repair. Among ECM proteins, laminin-5, an important ligand for keratinocyte adhesion in the epidermis, promotes keratinocyte survival. DPPC belongs to a class of lipids that are a major component of all cell membranes due to their ability to form lipid bilayers.

Given this information, a dermal matrix was designed that would deliver the antioxidant synergistically with other ingredients and maintain the delicate balance of the wound environment. Thus, a three-dimensional (3D) collagen-laminin porous structured dermal matrix was prepared and saturated with GSH-loaded HyA/AVO microparticles. Thus, TD increases the effectiveness of chronic wound treatments,

shortens healing time and helps tissue repair. With its ability to reduce free/oxygen radicals in the wound area, it also facilitates the naturally occurring wound healing process by compensating the defense mechanism and balance of the wound area and surface skin components.

Keywords: Transdermal Wound Dressing, Tissue Scaffold, Glutathione, Laminin, Collagen, Gelatine

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamı yürüten ve bu süreçte bilgisi ile bana destek olan, tecrübesini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatih ÇİFTÇİ' ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her güzel ve zor zamanımda yanımda olup beni motive eden ve beni olduğum gibi seven ailem ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi borç bilirim. Son olarak sevgisini her daim içimde yaşattığım anneme içtenlikle minnettarım.

Temmuz, 2024

Betül Kılıç

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vii
ÖN SÖZ.....	x
SEMBOLLER.....	xiv
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvi
KISALTMALAR.....	xviii
GİRİŞ.....	1
BİRİNCİ BÖLÜM.....	5
1. DERİ VE GEÇİRGENLİK	5
1.1. DERİNİN YAPISI VE İŞLEVLERİ	5
1.1.1. Canlı Epidermis	6
1.1.2. Dermis	7
1.1.3. Hipodermis	7
1.2. TRANSDERMAL İLAÇ DAĞITIM SİSTEMLERİ	7
1.2.1. İlaç Dağıtım Sistemleri	8
1.2.2. Deri ve İlaç Geçirgenliği.....	9
İKİNCİ BÖLÜM	11
2. TRANSDERMAL ÜRETİM YÖNTEMLERİ	11
2.1. MİKROİĞNELER (MİKRON BOYUTLU İĞNELEME SİSTEMİ). 11	
2.1.1. Kalıba Döküm Yöntemi.....	15
2.1.2. Enjeksiyon ile Kalıplama Yöntemi.....	15
2.2. MİKRO EKSTRÜZYON ÜÇ BOYUTLU (3B) YAZICI TEMELLİ	
ÜRETİM.....	16
2.2.1. Eriyik Birikim Modelleme Yöntemi (FDM)	17
2.3. ELEKTRO EĞİRME YÖNTEMİ	18
2.4. ÇÖZÜCÜ DÖKÜM YÖNTEMİ	20
2.5. FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ VE DERİ GEÇİRGENLİĞİ	
ARAŞTIRMALARI ÜZERİNE ETKİSİ	21
2.5.1. Cilt Geçirgenliğini Değiştiren Unsurlar	21
2.5.2. Franz Difüzyon Hücresi	22
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	25
3. MALZEME VE YÖNTEM	25
3.1. MALZEMELER.....	25
3.1.1. Sodyum Hiyalüronat.....	25
3.1.2. Glutasyon	27
3.1.3. Avokado Yağı	29
3.1.4. Jelatin	30
3.1.5. Kolajen	31
3.1.6. Laminin.....	32

3.1.7. Yardımcı Maddeler.....	34
3.1.7.1. Arıtılmış Su.....	34
3.1.7.2. Etanol	34
3.1.7.3. Hidroklorik asit.....	34
3.2. YÖNTEMLER.....	35
3.2.1. Hidrojel Tasarımı ve Glutasyon (GSH) biyoaktif ajanların hazırlanması: Sprey kurutma metodu.....	36
3.2.2. 3 Boyutlu TDM'lerin hazırlanışı (KOL –LM–Jel matris)	37
3.2.2.1. Dondurularak Kurutulmuş Bir TDM Elde Etmek İçin KOL-LM-Jel Toplu Çözeltilerin Polietilen Tereftalat Kalıbında (PET kalıp) Dondurularak Kurutulması.....	37
3.2.2.2. 3 Boyutlu TDM'lerin UV ile Çapraz Bağlanması.....	38
3.2.3. Akış Özelliklerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.4. Mekanik Özellikler	38
3.2.5. Biyoadezyon testi.....	39
3.2.6. Dinamik Buhar Sorpsiyonu (DVS) analizi	39
3.2.7. Parçacık boyutu ve Stabilite Testi.....	39
3.2.8. Spesifik Yüzey Alanının Belirlenmesi (BET)	40
3.2.8.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	40
3.2.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	40
3.2.10. Termogravimetrik Analiz (TGA)	41
3.2.11. GSH Kapsülleme Verimliliği, Salm Kinetiği, Franz Hüresi Modelleme	41
3.2.12. <i>In vitro</i> Antibakteriyel Testler	41
3.2.13. <i>In vitro</i> Hücre Çalışmaları.....	42
3.2.14. Sitotoksikite Deneyi	43
3.2.15. ROS Tayini	44
3.2.16. Oksidatif Stres Çalışmaları.....	44
3.2.17. İstatistiksel Veriler	45
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	46
4. BULGULAR	46
4.1. TDM' DEKİ GSH İÇERİK ANALİZİ.....	46
4.2. GSH'İN STABİLİTESİNİ ETKİLEYEN PARAMETRELER.....	48
4.2.1. Sıcaklığın Etkisi.....	48
4.2.2. UV Işığının Etkisi.....	48
4.2.3. pH' ın Etkisi.....	48
4.2.4. Oksijen Etkisi	49
4.2.5. Gama Sterilizasyonunun Etkisi	49
4.3. UV-ÇAPRAZ BAĞLAMA YÖNTEM TASARIMI VE HESAPLANMASI	49
4.4. UV-ÇAPRAZ BAĞLANMASI.....	50
4.5. DOKU PROFİLİ ANALİZİ (TPA) ve MEKANİK TESTLER	50
4.6. DİNAMİK BUHAR SORPSİYONU (DVS) ANALİZİ	51
4.7. PARÇACIK BOYUTU VE STABİLİTE TESTİ.....	56
4.8. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR) ANALİZİ.....	58
4.9. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM)	61

4.10. TERMOGRAVİMETRİK (TGA) ANALİZİ	62
4.11. <i>İN VİTRO</i> SALIM KİNETİĞİ: FRANZ HÜCRESİ MATEMATİKSEL MODELLEMESİ	64
4.12. <i>İN VİTRO</i> ANTİBAKTERİ ANALİZLERİ	67
4.13. <i>İN VİTRO</i> HÜCRE KÜLTÜRÜ ANALİZİ	71
4.14. HÜCRE İÇİ GSH AKTİVİTESİ	76
4.15. ROS TAHMİNİ	77
4.16. OKSİDATİF STRES	77
SONUÇ	78
KAYNAKÇA	79

SEMBOLLER

pH	: Hidrojen Potansiyeli
μm	: Mikrometre
μg	: Mikrogram
mm	: Milimetre
m^2	: Metrekare
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece
%	: Yüzde
kV	: Kilovolt
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
cm^2	: Santimetrekare

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2. 1: Topikal krem, Transdermal yama, hipodermik iğne ve mikroığnelerin karşılaştırılması.....	12
Tablo 3. 1: TDM yara örtüsünün formülizasyon süreçleri.....	35
Tablo 3. 2: Mikropartikül tozlarının spesifik yüzey alanı.....	40
Tablo 4. 1: Oda sıcaklığında mikropartiküllerin stabilite çalışmasının sonuçları.....	56
Tablo 4.2: GSH katkılı TDM doku iskelerin fonksiyonel bağ yapıları.....	59
Tablo 4. 3: GSH yüklü TDM örneklerinin özellikleri.....	64
Tablo 4. 4: 0,1 N HCl ortamlı çözünürlük çalışması.....	65
Tablo 4. 5: 4.5 pH Asetat ortamlı çözünürlük çalışması.....	65
Tablo 4. 6: 6.8 pH Fosfat ortamlı çözünürlük çalışması.....	65
Tablo 4. 7: Distile su ortamlı çözünürlük çalışması.....	66
Tablo 4. 8: Dört rutenyum kompleksinin minimum inhibitör konsantrasyonları.....	68
Tablo 4. 9: TDM'lerin kontrol grupları ve zamanlarına göre karşılaştırılması.....	69
Tablo 4. 10: TDM'lerin farklı MIC konsantrasyonlarda <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> 'ye karşı membran depolarizasyon yüzdesi.....	69

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1: İnsan derisi yapısının kesitsel olarak diyagramatik bir temsili.....	6
Şekil 1. 2: İlaçların insan derisine nüfuz etme yolları.....	9
Şekil 2. 1: Topikal krem, hipodermik iğne, mikroiğne ve transdermal yamaların karşılaştırılması.....	13
Şekil 2. 2: FDM yöntemi ve FDM ile üretilen mikroiğneler.....	17
Şekil 2. 3: Elektrospinning cihazının temel diyagramı.....	19
Şekil 2. 4: Polimer MN' lerin hazırlanmasında kullanılan çeşitli döküm ve kalıplama teknikleri.....	20
Şekil 2. 5: Franz Difüzyon hücresinin temsili diyagramı.....	23
Şekil 3. 1: Hiyalüronik Asit.....	25
Şekil 3. 2: Glutasyon molekülünün kimyasal yapısı.....	28
Şekil 3. 3: ECM' nin yerleşimi.....	33
Şekil 4. 1: UV çapraz bağlama ile üretilen TDM gösterimi.....	50
Şekil 4. 2: UV çapraz bağlama sonrasında TDM' nin A. Stres gerilimi B. Elastikiyet modülü, C. Basınç dayanımı ve D. Doku Profili Analiz grafiği.....	51
Şekil 4. 3: A. TD buhar emilimi ve desorpsiyon eğilimi, B. %65 rH sisteminde 25°C'de TD buhar emilimi DVS analizi.....	55
Şekil 4.4: TDM doku iskeleleri içinde kullanılan malzemelerin FTIR analizi.....	58
Şekil 4.5: TDM öncesi tasarlanan hidrojel çözeltilerinin SEM morfolojik görüntüleri.....	61
Şekil 4.6: TDM doku iskelelerin SEM morfolojik görüntüleri.....	61
Şekil 4. 7: TDM yapısının TGA grafiği.....	63
Şekil 4. 8: Çözünme profili grafiği.....	64
Şekil 4. 9: <i>In vitro</i> GSH salım profili çalışması.....	66

Şekil 4. 10: GSH yüklü TDM_3 örneğinin salım profili.....	67
Şekil 4. 11: Mikrobiyolojik testte, TDM örneklerine uygulanan ortalama sterilizasyon dozu profili.....	67
Şekil 4. 12: A. MIC değeri, B. TDM_3 (1 ×, 2 × MIC) ile muamele edilen <i>S. aureus</i> 'ta GSH aktivitesi kaybı.....	68
Şekil 4. 13: TDM örnekleri (2×MIC) ile 4 saat boyunca muamele edilen ve canlı/ölü boyamaya tabi tutulan <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> 'nin floresan konfokal görüntüleri.....	70
Şekil 4. 14: MTT testinden sitotoksosite değerlendirmesi.....	72
Şekil 4. 15: Hücre lizatlarından elde edilen A. Toplam GSH, B. Toplam GSH/GSSG, C. GPx, D. MDA, SOD seviyeleri.....	74
Şekil 4. 16: GSH ve biyoaktif yüklü malzemeler ile yapılan değerlendirmeler.....	75
Şekil 4. 17: Biyoaktif Yara Örtüsü özütlerine 24 saat boyunca maruz kalmanın ardından Kontrol 2' ye göre hücre canlılığı yüzdesi.....	76

KISALTMALAR

TD	: Transdermal
SC	: Stratum Corneum
TDDS	: Transdermal İlaç Dağıtım Sistemleri
DDS	: İlaç Dağıtım Sistemleri
MN	: Mikroigne
FDM	: Eriyik Birikim Modelleme
PVA	: Polivinil Alkol
PVP	: Polivinilpirolidon
3B	: 3 Boyutlu
UV	: Ultraviyole
HyA	: Hiyalüronik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TPA	: Doku Profili Analizi
SH	: Sodyum Hiyalüronat
MP	: Mikropartikül
Gly	: Glisin
Hyp	: Hidroksiprolin
Pro	: Prolin

GİRİŞ

İlaç vermenin en yaygın yolları oral ve parenteral yollardır ve küçük molekülü ilaçların çoğunluğu geleneksel olarak oral yoldan verilir. Oral yol, önceden belirlenmiş dozlar, taşınabilirlik ve hastanın kendi kendine uygulama avantajına sahiptir. Bu nedenlerden dolayı oral yol, ilaç vermenin en uygun yolu olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, çoğu terapötik peptit veya protein, midedeki hızlı bozunma ve epitelyum boyunca sınırlı miktardaki taşınma nedeniyle oral yoldan iletilmez. Bu nedenle, makromoleküllerin birincil uygulama modu, eğitimli bir yönetici tarafından uygulama gerekliliğine ek olarak, enjeksiyonların invazif doğasının ağrıya neden olması ve hastalar tarafından daha düşük kabul/uyum sağlaması gibi sınırlamalar olmaksızın enjeksiyon yoluyla (Schoellhammer vd., 2014). Ayrıca gastrointestinal sistem, karaciğerde malabsorbsiyon veya enzimatik bozulma nedeniyle ilacın ağızdan uygulanması mümkün olmadığında ağırlı deri altı enjeksiyonlar, en yaygın alternatif olarak kullanılmaktadır (Prausnitz, 2004).

Transdermal (TD) uygulama, ilaçların ağız yoluyla verilmesine ve deri altı enjeksiyonlarının yanında etkili bir alternatif yöntemdir (Prausnitz ve Langer, 2008). İlaçların deri yoluyla sistemik dolaşıma TD olarak verilmesi, çeşitli klinik endikasyonlar için uygun olan uygulamaya olanak tanır (H. Benson, 2005). İlacın bant veya yama kullanılarak deriye verilmesi hastalar açısından daha cazip bir yöntem olup, ilacın zamanla kontrollü salınımına da olanak sağlamaktadır (Prausnitz, 2004). Uzun yıllardır insanlar terapötik etki elde etmek için cilde çeşitli maddeler uygulamış ve modern çağda tıbbi sorunları lokal olarak tedavi etmek için birçok farklı topikal formülasyon geliştirilmiştir (Prausnitz ve Langer, 2008). Araştırmacılar yıllardır geleneksel ilaç dağıtım formatlarındaki sorunların üstesinden gelmek için cildi ilaç giriş noktası olarak kullanmanın yollarını bulmaya çalışmışlardır (Touitou, 2002).

İlacın deri yoluyla iletilmesi için deri geçirgenliğinin artırılması gerekmektedir. Geleneksel yöntemler temel olarak ilaç ve deri etkileşimlerinin modülasyonuna veya kimyasal olarak geliştirilmesine odaklanır. Son çalışmalarda yenilikçi veziküler taşıyıcıları, elektrik destekli dağıtım ve çeşitli mikro invaziv yöntemler kullanılmıştır. Bu yeni ve heyecan verici ilaç dağıtım yöntemleri,

halihazırda dermal ve TD tedavilerin sayısını ve kalitesini artırmaktadır (Touitou, 2002).

TD yamalar, biyoyapışkan sistemler, mikro-implantlar, ozmotik mikro pompalar, mikro enkapsülasyonlar ve nano-parçacıklar, günümüzde bu tür kontrollü ilaç salım süreçlerini gerçekleştirebilecek mekanizmalar arasındadır (Schäfer-Korting, 2010). TD uygulama, ilacın dolaşım sistemine nüfuz etmesi yoluyla sistemik durumları tedavi etmeyi amaçlamaktadır. Topikal ve TD uygulama sistemleri arasında fark bulunmaktadır. Genel olarak cilde uygulanan topikal tedavilerin amacı, deride bir ilaç rezervuarı oluşturmaktır. Aktif maddenin, sistemik dolaşım veya daha derin cilt katmanlarına girmesi gerekmez. Bölgesel uygulama, topikal uygulamaya göre daha derin penetrasyon gerektirir ve kas, kan damarı gibi derin doku hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Touitou, 2002).

Avokado yağı, *Persea americana* bitkisinin meyvesinden elde edilir. Yara iyileşmesinde, sedef hastalığının, kırışıklıkların ve çatlakların tedavisinde ve bunların hepatoprotektif etkilerinde kullanılmaktadır. Bu yağın sabunlaştırılmayan kısmı, sklerodermayı iyileştirmenin yanı sıra epidermin yenileyici özelliklerine de sahiptir. Meyvenin posasından elde edilen avokado yağı, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), linoleik (%6,1-22,9), linolenik asitler (%0,4-4,0) tekli doymamış yağ asidi (MUFA) ve oleik asit (%31,8-69,6) açısından zengindir. Ayrıca β -sitosterol, β -karoten, lesitin, mineraller ve A, C, D ve E vitaminlerini de içerir (De Oliveira vd., 2013).

Glutatyon, hücre içi redoks dengesinin korunmasında önemli bir rol oynayan düşük molekül ağırlıklı bir tiyol-tripeptiddir. Dikkat çekici antioksidan özelliklerine ek olarak, yaşlanma karşıtı özelliklerinin keşfedilmesi, cilt rengi açıcı olarak tanıtılmasına yol açmıştır. Hücrelerin içinde indirgenmiş formda bulunur ve çeşitli fizyolojik işlevlerde önemli bir rol oynar. Cilt rengini açma etkisi, tirozinaz enziminin doğrudan ve dolaylı inhibisyonundan ve eumelanin'den feomelanin üretimine geçişten kaynaklanmaktadır. Oral, enjekte edilebilir ve topikal formlarda mevcuttur (Sonthalia vd., 2016).

Hyaluronik asit (HyA), sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır, yani dermis, sinovyal sıvı, diş özü ve vitreus mizahı da dahil olmak üzere insan vücudunda yaygın olarak dağılır. Toplam HyA' nın yaklaşık %50' si ciltte dağılır. İnsan vücudunda bulunan toplam HyA' nın yaklaşık üçte biri günlük olarak bozunur ve aynı miktar taze sentezlenen HyA tarafından yenilenir. HyA, fizyolojik koşullarda daha hidrofilik olan sodyum tuzuna dönüştürülür. Orijinal ağırlığından 1000 kat daha fazla su tutabilir. Bunun nedeni üzerinde birkaç hidroksil grubunun bulunmasıdır. Bu sayede homeostazın korunmasına yardımcı olur ve insan vücudundaki çeşitli fizyolojik süreçleri destekler. HyA, diz eklemlerinin visko takviyesinde, göz cerrahisinde ve ilaç dağıtımında başarıyla kullanılmıştır ve ayrıca bir glikozaminoglikandır ve bağ dokularının ve dermisen doğal bir bileşenidir. Çok yönlülüğü ve biyouyumluluğu nedeniyle çeşitli kemik , göz ve cilt bozukluklarına karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Saha ve Rai, 2021).

İnsan vücudunun kütlece %20' si proteinlerden oluşur ve toplam proteinin %25-35'i kolajen tarafından temsil edilir; bunun kabaca %90'ı Tip 1 kolajendir (C1). C1, cilt, tendon, dişler, kemik ve endotelyal astar dahil olmak üzere insan vücudundaki birçok doku türünün oluşumuna katkıda bulunur. C1 eksikliği, kırışıklıklar ve yara iyileşmesinin azalması gibi kozmetik kusurlardan, osteogenezis imperfekta ve Ehlers-Danlos sendromu gibi yaşamı değiştiren ve zayıflatıcı hastalıklara kadar çeşitli olumsuz etkilere neden olabilir (Sun vd., 2015). Kozmetik yara izlerini tedavi etmek ve yara iyileşmesine yardımcı olmak amacıyla C1' in cilde uygulanması için çeşitli yaklaşımlar benimsenmiştir. Kozmetik kolajen uygulaması genellikle şırınga enjeksiyonu kullanılarak yapılır. Yara iyileşmesini desteklemek için kolajen bazlı membranlardan da yararlanır (Zheng vd., 2023).

Yara onarımı önemli bir klinik yüküdür. Normal ve patojenik yara onarımında yer alan temel süreçlerin daha iyi anlaşılması, yeni veya geliştirilmiş terapötik yaklaşımların geliştirilmesinin ön koşuludur. Lamininler ve bunlarla ilgili proteinler, netrinler ve LaNt' lerin, yara onarımı için gerekli çekirdek hücre davranışlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu proteinler, doğrudan yara ortamına uygulanabildiklerinden, her terapiyi terapötik gelişim için mükemmel bir hedef aday haline getirebilirler. Pratik açıdan laminin, proteinin tamamının doğrudan

değiştirilmesi, sinyalleme aktivitesinin taklit edilmesi, yara yatağı boyunca (yeniden epitelizasyon) veya yara mikro ortamında epitelyal göçü destekleyebilecek şekildedir (Iorio vd., 2015).

Bu çalışmada, biyomedikal uygulamalarda yara iyileştirilmesine katkı sağlayacak antibakteriyel özellikli, hücresel tutunmaları gerçekleştirebilir ve hücre canlılığı gösterebilen, ilaç salım kapasitesi yüksek, raf ömrü uzun, antioksidan içerikli ve sitotoksiste olmayan kompozit yapıları polimerlerin tasarımı ve geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda yapılacak çalışmalar, farklı çalışma grupları altında ele alınmış olup, farmokinetik özellik gösteren ilaç, antioksidan özellik gösteren bitki ekstresinden elde edilecek esansiyel yağ katkıları biyoaktif malzemelerin doğal ve sentetik polimerler ile kompozit yapıların morfolojik ve in vitro Franz difüzyon temelli salım kinetiği matematiksel modelinin tasarlanması olacaktır.

BİRİNCİ BÖLÜM

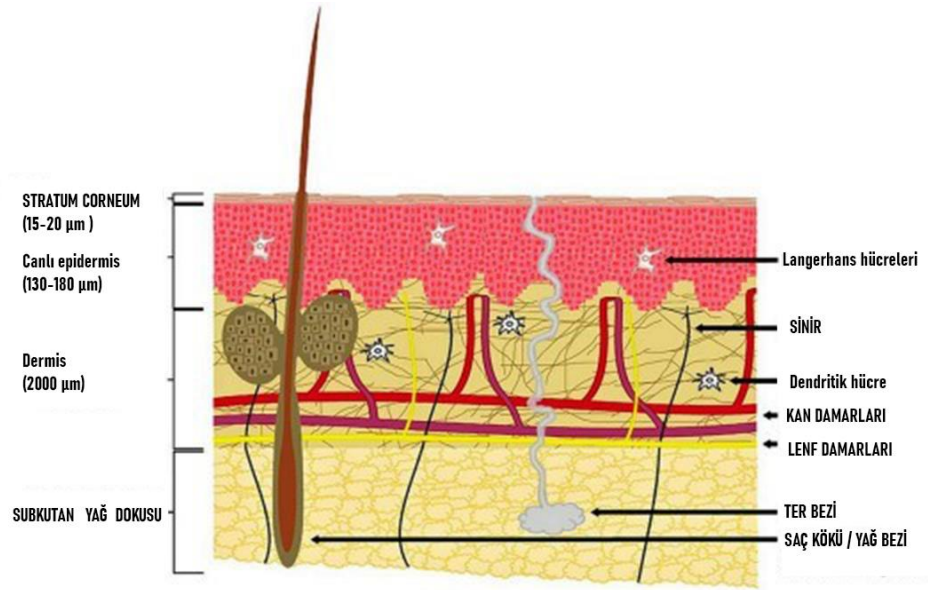
1. DERİ VE GEÇİRGENLİK

Deri, insan vücudunda 1,7 m²lik bir alanı kapsayan ve ortalama bir insanın toplam vücut kitle indeksinin %10'unu oluşturan en büyük organdır (H. A. E. Benson ve Watkinson, 2012; Brown vd., 2006). Vücut bölgesine göre değişiklik göstermekle birlikte insan derisinin kalınlığı 0,5- 3 mm kalınlığında, pH'ı ise 5,2- 5,6 aralığındadır. Deri, insan vücudunu kaplar ve fizyolojik bir ortamda hayati organların çalışmasını sağlar. Önemli metabolik, immünolojik ve duyuşal işlevlere hizmet etmektedir. Melanin, D vitamini, lipitler, kollajen ve keratin metabolizmasında önemli bir role sahiptir. İnsan vücudu ile dış dünya arasındaki madde geçişleri deri yoluyla gerçekleşmektedir ve hangi maddelerin vücuda alınacağını ve ne kadarının atılacağını belirleme konusunda oldukça seçicidir (Ng ve Lau, 2015).

Bir ilacın TD olarak verilme yeteneğini doğru bir şekilde değerlendirmek ve rasyonelleştirmek için cilt anatomisi ve fizyolojisinin temel yönlerinin anlaşılması çok önemlidir. Derinin kesitsel diyagramatik gösterimi Şekil 1.1' de verildiği gibidir.

1.1. DERİNİN YAPISI VE İŞLEVLERİ

Epidermis (canlı epidermis), dermis ve hipodermis (deri altı dokular) olmak üzere üç temel tabakadan oluşan insan derisi, farklı işlevleri yerine getiren ve farklı hücrelerden oluşan bir epiteldir. Epidermal tabaka, en dış tabakadan dermise kadar; stratum korneum (boynuzsu tabaka), stratum granulosum (granular tabaka), stratum spinosum (dikenli hücre tabakası) ve stratum bazal 'dan oluşur. Kalınlığı 10-20 µm civarında olan stratum corneum (SC), epidermis tabakasının en dış yüzeyinde bulunmakta ve 10-15 korneosit tabakasından oluşmaktadır (Murdan, 2004). Epiderminin daha derin katmanlarındaki keratonisitler, ölü hücreler olan korneositlere dönüşür. Bunlar; 0.2 µm kalınlığında ve 40-60 µm genişliğinde yassı hücrelerdir (Kashibuchi vd., 2002).



Şekil 1. 1: İnsan derisi yapısının kesitsel olarak diyagramatik bir temsili(Van Der Maaden vd., 2012)

Deriden geçişin büyük çoğunluğu SC katmanından difüzyonla meydana gelir. Hücre dışı matrisin çoğunluğu lipit yapılarda bulunduğundan, SC 'lerin bariyer fonksiyonunun bu lipit yapısından geldiği bilinmektedir (Bouwstra vd., 2002). Nitekim TD ilaç dağıtımına yönelik temel bariyer SC lipitlerinde bulunmaktadır. Bu bariyer özelliği, terapötik maddelerin TD iletiminde zorluklara neden olur. Bu yolla etkili bir şekilde dağıtılabilen ilaç çeşitliliğini arttırmaya yönelik uzun süredir devam eden bir yaklaşım, ilaç akışını teşvik etmek için cilt bileşenleriyle etkileşime giren kimyasallar olan penetrasyon arttırıcıların kullanılmasıyla mümkün olmuştur (Williams ve Barry, 2012).

1.1.1. Canlı Epidermis

Epiderminin SC dışında kalan bölümlerinin çekirdekli hücrelerden meydana gelmesi sebebiyle canlı epidermis olarak adlandırılmaktadır. Sinir hücresi ve kılcıl damar içermemektedir ve ortalama 50 – 100 µm kalınlığındadır (Agache vd., 2017). Epiderminin hücresel içeriği ağırlıklı olarak keratinositlerden (hücrelerin yaklaşık %95'i) oluşur. Geriye kalan kısımlarında ise melanositler, langerhans ve merkel hücreleri bulunur. SC epiderminin en yüzeysel tabakasıdır. Dış ortamla doğrudan temas halindedir ve bariyer özellikleri yüksek yoğunluğa (kuru halde 1,4 g/cm³) ve

düşük hidrasyona (%15-25) bağlı olabilir. SC hücreleri esas olarak çözünmeyen keratinlerden (%70) ve lipitten (%20) oluşur (Walters, 2002). SC'deki su, korneositlerdeki keratin ile ilişkilidir.

1.1.2. Dermis

Dermis yaklaşık 2-3 mm kalınlığında olup cilde güç ve elastikiyet veren kollajen ve elastin liflerinden oluşur (X. Liu vd., 2014). Dermiste bulunan kan damarları hem dermis hem de epidermise besin sağlar. Şekil 1.1.'de görüldüğü üzere dermis tabakasında sinirler, makrofajlar ve lenfatik damarlar da mevcuttur.

1.1.3. Hipodermis

Hipodermis veya deri altı tabakası, derinin en derin tabakasıdır ve yağ hücreleri açısından oluşmaktadır (X. Liu vd., 2014). Bu tabakada deri ile kaslar ve kemikler gibi vücudun altındaki dokular arasında temas bulunmaktadır. Bu nedenle hipodermisin ana işlevleri; fiziksel şoka karşı koruma, ısı yalıtımı ve derinin damar ve sinir sinyallerinin desteklenmesi ve iletilmesidir (Sherwood vd., 2007). Hipodermiste yerleşik yağ hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlardan oluşan diğer büyük deri altı hücrelerle birlikte vücut yağının yaklaşık %50'sini oluşturur (McLennan vd., 2005).

1.2. TRANSDERMAL İLAÇ DAĞITIM SİSTEMLERİ

Transdermal ilaç dağıtım sistemleri (TDDS), ilaçların deri yüzeyine uygulanarak sürekli olarak deri yoluyla vücuda iletildiği ve ardından topikal, yüzeysel veya sistemik terapötik etkilerin görüldüğü uygulama yoludur (Bellucci, 2022). Bu sayede vücutta sistemik etkiler oluşturarak deriyi ilacın emilim yeri olarak kullanmaktadır. Geleneksel enjeksiyon ve oral yöntemlerle karşılaştırıldığında enjeksiyondan kaynaklanan ağrıların azaltılması, ilacın sabit bir oranda salınması, karaciğerden ilk geçişin etkisinden kaçınılması ve ilacın gastrointestinal yoldan bozulmasını önlemek gibi avantajlara sahiptir (Prausnitz ve Langer, 2008). TD yol ile ilaç dağıtımındaki en büyük zorluk, derinin ilk koruyucu tabakası olarak görev yapan SC' dendir. Derinin bu tabakası terapötik maddelerin veriliş etkinliğini büyük oranda azaltır ve cilde iletilebilecek ilaçları sınırlandırır (Ahmed Saeed AL-Japairai vd.,

2020). Bu nedenle SC direncinin aşılması ve deri geçirgenliğinin artırılması, transdermal ilaç dağıtımında var olan önemli hususlardandır (D. Yang vd., 2021).

1.2.1. İlaç Dağıtım Sistemleri

İlaç dağıtım sistemi (DDS), terapötik açıdan etkili miktarlardaki ilaçları vücutta hedeflenen bölgelere güvenilir bir şekilde ileten bir yöntemdir (Adepu ve Ramakrishna, 2021; Ramasamy vd., 2017). Tabletler, kapsüller ve şuruplar DDS' nin geleneksel örnekleriyken; lipozomlar, nanopartiküller, mikroğneler ve mikro pompalar gelişmiş sistemlerdir. İlaç dağıtım sistemlerinde difüzyon, erozyon ve şişme olmak üzere üç ana tip ilaç salınım mekanizması vardır.

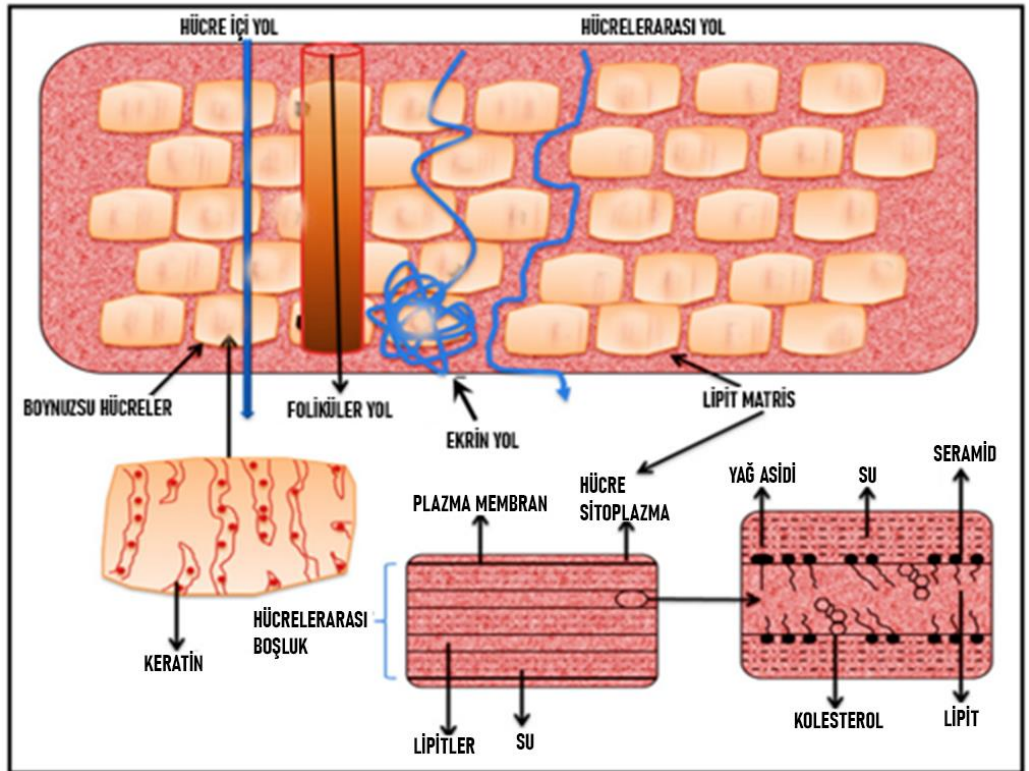
Difüzyon mekanizmasında ilaç parçacıkları Brownian hareketi nedeniyle düşük konsantrasyonlu alanlar boyunca rastgele hareket eder. Brown hareketi, nanometre ile milimetre aralığındaki ilaç parçacıklarının iletilmesi için önemli bir olgudur (Tangboriboon, 2018). Erozyon mekanizması, ilaç taşıyıcı matrisin (örn. polimer) enzimatik reaksiyon veya hidroliz yoluyla fiziksel çözünmesine dayanmaktadır. Çözünme sürecinin şekline göre erozyon mekanizmaları yığın ve yüzey erozyonu olarak iki alt kategoriye ayrılabilir. Toplu erozyon matris boyunca homojen bir şekilde meydana gelirken, yüzey erozyonu yalnızca matris yüzeyinde meydana gelir (Kohrs vd., 2019). Diğer bir mekanizma ise şişmedir. Bu mekanizma, ilaç taşıyıcı matrisin sıvı (örn. su) ile şişmesi yoluyla ilaç moleküllerinin geçebileceği kanalların oluşmasına dayanır (Moffatt ve Donnelly, 2021). Genel İtibariyle DDS' ler bu salınım mekanizmalarıyla üretilmektedir, ancak yeni ilaç dağıtım sistemlerinde ilaç salınım mekanizmalarını desteklemek için manyetik alan veya ultrason dalgaları da kullanılmaktadır (Bok vd., 2020; J. F. Liu vd., 2019). DDS' nin hedef bölgeye yeterli miktarda ilaç iletilmesi ve ardından terapötik bir yanıt üretmesi beklenir. Ek olarak, DDS' nin yan etkilere neden olmadan uzun vadeli bir terapötik aralıkta çalışması gerekir.

Geleneksel dağıtım sistemlerinin ana dezavantajı, kısa aralıklarla tekrarlanan uygulama ihtiyacıdır ve bu durum yan etkilere neden olabilir (Adepu ve Ramakrishna, 2021). Sürekli salım sistemlerinde ilacın sistemden salınma hızı önceden belirlenen bir sabittir. Geleneksel muadilleriyle karşılaştırıldığında bu sistemler, ilaç

moleküllerinin uzun süreler boyunca yavaşça salınmasına izin vererek plazma konsantrasyonlarını terapötik aralıkta tutmaktadır. Bu sistemler hasta uyumunu arttırmada ve ilaç yan etkilerini önlemede fayda sağlamaktadır.

1.2.2. Deri ve İlaç Geçirgenliği

Bir TDD sisteminin etkili olabilmesi için ilacın cilt katmanlarından uygulama süresi boyunca sabit bir hızla ve sürekli olarak geçerek sistemik dolaşıma veya hedef bölgeye ulaşması gerekir. İlaç doğrudan cilde uygulandığı için absorpsiyon meydana gelir (Erkuş, 2023). Şekil 1.2' de şematik olarak gösterildiği üzere ilacın deriye nüfuz etmesinin iki olası yolu vardır. Bunlar transepidermal yol ve transappendageal yoldur (Alkilani vd., 2015). TD yol ile alınan ilaçlar kan dolaşımına ulaşır ve derinin SC tabakası, transepidermal alan veya transapendiks yoluyla sistemik girer. İlaç difüzyonu transepidermal yolu izlemesi durumunda hücre içi (transselüler) ve hücreler arası (interselüler) olmak üzere iki yolu takip eder (Erkuş, 2023).



Şekil 1. 2: İlaçların insan derisine nüfuz etme yolları(Shahzad vd., 2015)

Transselüler yolda ilaçlar absorpsiyon sırasında SC hücrelerinden geçer. SC hücre zarlarındaki lipit kompleksleri hidrofobik olduğundan bu yol, hidrofobik ilaçlar için daha uygundur. Uygun büyüklükteki hidrofilik ilaçlar transelüler yoldan kolayca geçerken, lipofilik ilaçlar genellikle interselüler yolu kullanır. İnterselüler yolda ilaçların, SC' de bulunan keratinositlerin hücreler arası boşluğunun lipit matrisi boyunca yayılması gerekir. Hidrofilik ilaçlar ve küçük moleküller bu yolla dermisteki kılcal kan damarlarına taşınır. İlaçların interselüler yol ile taşınmasında hem lipit tabaka hem de sulu ortamda çözünürlük sağlaması sebebiyle daha baskın görülmektedir.

İKİNCİ BÖLÜM

2. TRANSDERMAL ÜRETİM YÖNTEMLERİ

TD dağıtım ürünleri ve yara iyileştirme malzemeleri, yararlı etkileri, biyoyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve maliyet etkinliğini artırmak için sürekli olarak geliştirilmekte ve iyileştirilmektedir. TD ilaç dağıtım sistemleri, farmasötik teknoloji alanında dikkat çeken araştırma konusu haline gelmiştir ve küresel pazarda en yaygın olarak geliştirilen farmasötik ürünlerden biridir. Birinci nesil TD ürünlerin geliştirilmesinde kullanılan çeşitli TD geliştirme yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında ilaç/araç etkileşimleri, kesecikler ve parçacıklar, SC modifikasyonu, enerji manipülasyon yöntemleri ve SC bypass teknikleri yer alır (Ramadon vd., 2022).

SC aktif ara bağlantı yöntemlerinin, özellikle de mikroigne teknolojisinin uygun şekilde tasarlanması ve uygulanması yoluyla, TD dağıtım sistemlerinin hem düşük molekül ağırlıklı hem de yüksek iletim sağladığı görülmektedir. Mikroigne teknolojisi platformunun, intradermal ilaç/biyolojik dağıtım ve terapötik ilaç izleme fırsatları sunarak diğer TD sistemlerden daha çok yönlü olduğu kanıtlanmıştır. Bunlar, mikroignelerin TD dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için potansiyel bir strateji oluşturduğunu göstermiştir (Ramadon vd., 2022).

2.1. MİKROİĞNELER (MİKRON BOYUTLU İĞNELEME SİSTEMİ)

Mikroigneler (MN' ler), küçük bir yama üzerinde düzenlenmiş, boyutları birkaç ila birkaç yüz mikron arasında değişen iğne sıralarından oluşur (Haj-Ahmad vd., 2015; Waghule vd., 2019). Küçük boyutları, kontrol edilebilir uygulamaları ve çeşitli malzemelerle kullanılabilmeleri nedeniyle birçok avantaja sahiptir. MN' ler aracılığıyla ilaçlar, SC' den direkt olarak sistemik olarak iletilebilir (Mdanda vd., 2021). İlaç doğrudan kılcal damarlara ve lenfatik damarlara gittiği için ilacın etkileri

daha hızlı gözlemlenir ve MN'leme formülü ayarlanarak ilaç dozajı kontrol edilebilir (Aldawood vd., 2021; J. H. Jung ve Jin, 2021).

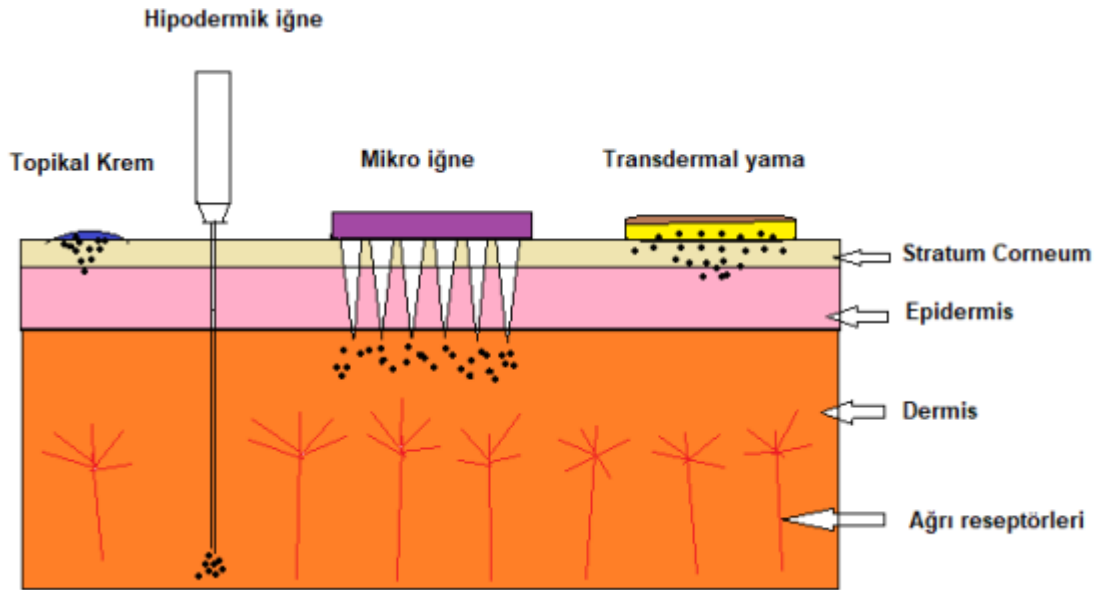
Aktif maddelerin deri yoluyla verilmesi için en yaygın yöntemler topikal kremler ve hipodermik iğnelerdir. Bu yöntemlerin bazı dezavantajları, kullanım sırasında oluşan ağrı nedeniyle hipodermik iğnelerin hastalar tarafından kabul edilmek istenmemesi ve topikal kremlerin biyoyararlılığının düşük olmasıdır (Samancı, 2021). Nano taşıyıcılar içeren topikal kremler, TD yamalar ve MN'ler gibi çeşitli topikal veya TD sistemler hakkında cilt bariyer engelini aşılması için çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Gupta vd., 2012; Prausnitz ve Langer, 2008). Bu araştırmalarla birlikte TD sistemler hakkında elde edilen bulgular artmıştır. Belirli TD sistemlerin karşılaştırılması Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2. 1: Topikal krem, Transdermal yama, hipodermik iğne ve mikroiğnelerin karşılaştırılması(Waghule vd., 2019)

	Topikal Krem	Transdermal Yama	Hipodermik İğne	Mikroiğne
Tanım	Krem/merhem/ Emülsiyon/ Emüljel	Cilt üzerine yapıştırılacak yapışkan yama	Ucunda küçük bir açıklık bulunan keskin bir uca sahip ince, içi boş tüp	Mikron boyutunda iğnelerin küçük bir yamanın yüzeyine hizalanması
Etki başlangıcı	Yavaş	Yavaş	Hızlı	Hızlı
Ağrı	Ağrı yok	Ağrı yok	Ağrılı	Ağrı yok
Biyoyararlanım (Biyoverişlilik)	Zayıf	Yeterli değil	Yeterli	Yeterli

Hasta uyumu	Daha az	Daha iyi	Daha az	Daha iyi
Kendiliğinden Uygulama	Olabilir	Olabilir	Olamaz	Olabilir
Mekanizma	Cilt gözeneklerinden penetrasyon	İlaç SC bariyerini geçmek zorunda olduğundan büyük moleküllerin difüzyonu zayıftır	İlaç doğrudan dermise yerleştirilir	SC bypass edilip ilaç doğrudan epidermise veya dermise iletilir, böylece geçirgenlik artırılır

Topikal krem, TD yama, hipodermik iğne ve MN' ler ile aktif maddelerin uygulanması Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2. 1: Topikal krem, hipodermik iğne, mikro iğne ve transdermal yamaların karşılaştırılması(Samancı, 2021)

MN' li ilaç dağıtım sistemi, ilaçları iğneler aracılığıyla dolaşım sistemine ileten bir ilaç dağıtım sistemidir (Jeong vd., 2021). MN' ler, fiziksel penetrasyonu artıran uygulamalardan biridir. Polimer ve malzeme bilimindeki ilerlemeler, üretim yöntemlerindeki teknolojik yenilikler ve nanoteknoloji ve mühendislikteki gelişmeler, MN' lerin TDD sistemleri olarak kullanımına yönelik araştırmaları yoğunlaştırmıştır (H. A. E. Benson vd., 2019). İğne yükseklikleri 25 ila 2000 µm arasında değişir ve küçük bir yama üzerine yerleştirilen mikron boyutlu iğnelere oluşur. Ciltte mikrokanallar oluşturarak ağrı, kanama veya enfeksiyona neden olmadan epidermal katmanlara nüfuz edecek şekilde tasarlanmıştır (Ahmed Saeed AL-Japairai vd., 2020; Aldawood vd., 2021). Bu mikro kanallar moleküler boyutlardan çok daha büyüktür (Donnelly vd., 2010). Böylece mikromoleküllerin, makromoleküllerin, nano/mikropartiküllerin, kozmetik ürünlerin ve bazı durumlarda supramoleküler komplekslerin taşınması mümkün olabilmektedir (Mdanda vd., 2021; Prausnitz, 2004). MN' ler yüksek ilaç biyoyararlanımına sahiptir ve diğer yöntemlere göre daha az invaziv ve ağrısızdır.

Bu teknolojiyi geliştirmenin temel amacı, büyük moleküllerin geçişine izin veren SC' yi kesintiye uğratarak geçirgenliği arttırmak, böylece molekül boyutundan daha büyük ve hipodermik iğne deliğinden daha küçük mikron ölçeklerinin ilerlemesini ve bu sayede geçirgenliğin artırılmasını sağlamaktır (Waghule vd., 2019).

TD ilaç dağıtımında kullanılan MN' leri üretmenin çeşitli yöntemleri vardır. MN' lerin üretim yöntemi, iğnenin türüne, şekline ve malzemesine bağlı olarak değişir. MN' lerin üretiminde en yaygın kullanılan yöntemler, mikro elektromekanik sistemler, lazer kesim, lazer ablasyon, mikro kalıplama (çözücü döküm), atomize sprey, damlacık kaynaklı hava üfleme ve katmanlı imalattır (Camcı vd., 2022; Sirbubalo vd., 2021; Q. Yang vd., 2021). Mikrokalıplama yönteminde mikro yapının eksik kalıplanması ve yapı içerisinde hava kabarcıklarının oluşması bu işlemin temel sorunlarından biridir. Eriyik biriktirme yöntemiyle (FDM) çalışan 3B yazıcıda baskı esnasında, ısıya duyarlı ilaçların bozunma riski vardır, bu da bu yöntemin uygulanabilirliğini sınırlar (Camcı vd., 2022).

Fotolitografi ve mikro kalıplama işlemleri, polimer MN' lerin hazırlanmasında kullanılan ana yöntemlerdir. Fotolitografide malzemeler, ışığa tepki verirken

katılaştırıcılar kullanılarak şekillendirilir. Bu amaçla foto-maskeleme yönteminde maske ışık kaynağının önüne yerleştirilerek istenilen bölgelerde katılma sağlanır veya mikro lensler kullanılıp ışık kırılarak koni oluşturulur ve konik iğneler elde edilebilir. Ardından lazer ışınlarının hedeflendirilmesiyle istenen şekiller meydana gelir (Kochhar vd., 2014, 2012; Migalska vd., 2011). Mikro kalıplama işleminde polimere eritilip dondurularak veya çözücünün buharlaştırılmasıyla kalıbın şekli verilir. Eritme yönteminde uzun süre sıcaklığa maruz kalmanın dezavantajları, yapıdaki gözeneklerin varlığı nedeniyle düşük mekanik direnç ve çözücü buharlaştırma yönteminde çözücü kalıntısı bu yöntemin kullanımını sınırlayan yönlerdir (Lee vd., 2013). Mikro kalıplama teknikleri, enjeksiyon ile kalıplama ve döküm yöntemlerini içerir.

2.1.1. Kalıba Döküm Yöntemi

Polidimetilsiloksan (PDMS) kalıba döküm yönteminde esnekliği ve tekrar kullanılabilirliğiyle kalıplama işlemine uygundur. Kalıp kullanılarak yapılan üretim, laboratuvar testlerinin ardından ölçek büyütme araştırmalar ile geniş ölçekli üretime de uygundur. Yüksek üretim verimliliğine ulaşmanın en önemli unsuru esnek kalıpların tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Kullanıma hazır MN' ler genellikle PDMS kalıplarını üretmek için kullanılır. Monomer ve sertleştirici madde 10:1 oranında karıştırılır ve karışımdaki hava kabarcıklarını vakum altında çıkarılır. Düz bir yüzeye yerleştirilen MN üzerine dökülen PDMS, bekletme sıcaklığına uygun bir süre beklenerek sertleştirilir. Esnek durumdaki PDMS, kalıp oluşturmak için kullanılan MN' lerden ayrılarak üretim için kullanılabilir (Q. L. Wang vd., 2016). Hazırlanan polimer veya polimer-ilaç karışımı kalıba enjekte edildikten sonra santrifüj yapılarak kalıp tamamen doldurulur ve polimer çözeltisinden çözücü çıkarılıp kurutularak MN' ler kalıptan çıkarılır (Bediz vd., 2014; Donnelly vd., 2011). PDMS ile çalışırken kullanılan çözücü, PDMS yapısının şişmesine veya bozulmasına neden olmamalıdır. Su, etanol ve metanol gibi çözücüler PDMS ile güvenle kullanılırken trietilamin PMDS yapısında şişmeye ve bozulmaya sebep olmaktadır.

2.1.2. Enjeksiyon ile Kalıplama Yöntemi

Başka bir kalıplama yöntemi olan enjeksiyonlu kalıplamanın, MN' lerin hem uygun maliyetli üretimini hem de arzu edilen dayanıklılığını başarabildiği gösterilmiştir. Bu yöntemde öncelikle MN' ler için kalıp hazırlanır, bir boşluk açılır ve uygun hassasiyetle MN' ler oluşturulur ve hazırlanan plakaların birleştirilmesi ile kalıplar oluşturulur. MN' leri oluşturan polimer ısıtılarak sıvı hale getirilir ve kalıbı doldurmak üzere enjekte edilir. Malzeme soğuyup şekillendirilip katılaştıktan sonra kalıptan çıkarılır (Hamilton, 2010; Hecke ve Schomburg, 2004). Enjeksiyon ile kalıplama, az miktarda yardımcı malzeme ve işlem basamağı gerektirdiği için dikkat çekici bir alternatiftir.

2.2. MİKRO EKSTRÜZYON ÜÇ BOYUTLU (3B) YAZICI TEMELLİ ÜRETİM

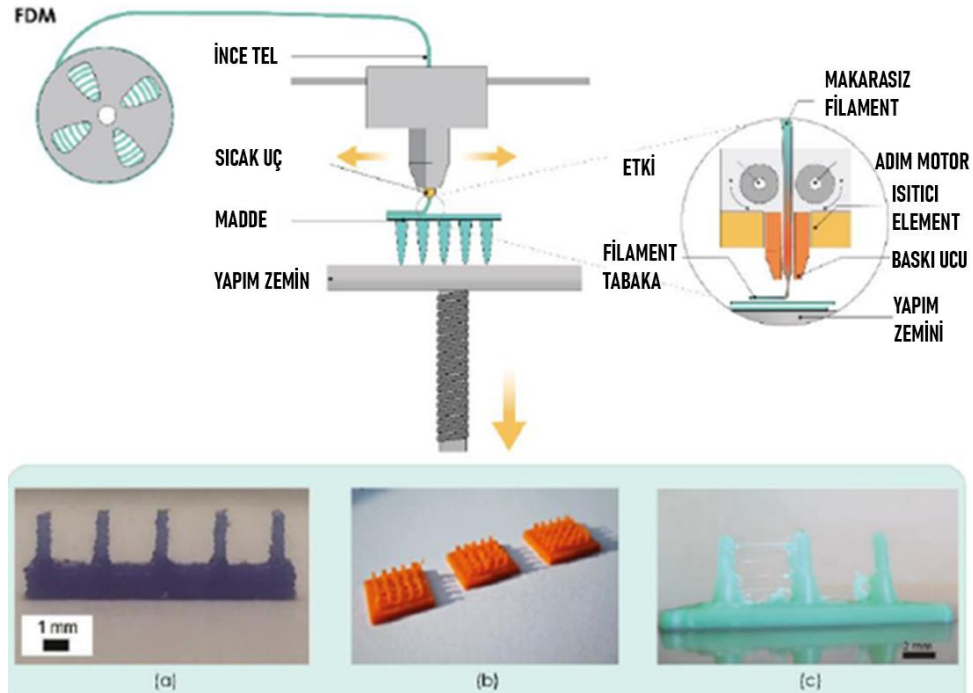
3B (3 Boyutlu) baskı teknikleri, bilgisayar yazılımı aracılığıyla tasarlanan istenen 3B nesneyi oluşturmak için malzemenin bir alt tabaka üzerine katman katman biriktirilmesini içeren bir eklemeli üretim tekniğidir. Tüm 3B baskı teknikleri iki temel adımı içerir: Biri, nesnelerin bilgisayar yazılımı aracılığıyla tasarlanması, diğeri ise nesnelerin 3B yazıcı aracılığıyla oluşturulmasıdır. 3B nesnelerin tasarımı Auto CAD (Bilgisayar Destekli Tasarım), 3D Slash, SketchUp, Fusion 360 ve Solidworks gibi çeşitli bilgisayar yazılımları kullanılarak yapılabilmektedir. Bir sonraki adım, oluşturulan tasarımı KISSlicer, Slic3r, OctoPrint, Simplify 3B ve Cura gibi dilimleme yazılımlarını kullanarak kesmektir. Bu 3B dilimleme yazılımı, bir 3B tasarım dosyasını (STL dosyası) bir 3B yazıcı tarafından okunabilen G-koduna dönüştürecektir. Dilimleme yazılımı; dilimlenmiş nesne katman sayısı, dolgu yüzdesi, yazıcı başı ile yazıcı platformu arasındaki başlangıç ofset yüksekliği, her katman arasındaki boşluk, yazdırma hızı ve toplam yazdırma süresi gibi yazdırma parametrelerini ayarlamak için kullanılır. Bu G-kodu daha sonra 3B yazıcıya yüklenir ve yazıcının print komutuyla çalıştırılmasıyla istenilen boyut ve şekilde bir nesne oluşturulur. Nesnelerin 3B yazıcı aracılığıyla biriktirilme işlemi, kullanılan 3B yazıcının türüne göre değişiklik gösterir. 3B yazıcılar temelde mürekkep püskürtmeli sistem, ekstrüzyon tabanlı sistem ve lazer tabanlı sistem olmak üzere üç prensipte çalışır (Mohammed vd., 2021).

Ekstrüzyon bazlı sistemlerden biri olan FDM (Eriyik Birikim Modelleme) teknolojisi, ilaç sektöründe en çok araştırılan 3B baskı teknolojisidir. FDM tabanlı

yazıcıların kullanımının kolay olması ve piyasadaki diğer yazıcılara göre maliyetinin daha düşük olması araştırmacıların bu yazıcılara olan ilgisini arttırmaktadır (Çobanoğlu vd., 2021).

2.2.1. Eriyik Birikim Modelleme Yöntemi (FDM)

3B baskı, düşük maliyetli ve yüksek verimli bir eklemeli işleme teknolojisidir ve hızlı prototipler oluşturur ve bu teknoloji son zamanlarda MN' ler gibi küçük yapıların üretimine kadar genişlemiştir (Economidou ve Douroumis, 2021; J. H. Jung ve Jin, 2021). Halihazırdaki üretim teknolojisi basit yapıya sahip bir MN' nin üretimi ile sınırlıyken; Yeni 3B baskı teknolojisi, daha karmaşık şekillere sahip MN' li yapılar oluşturabilmektedir (Erkuş, 2023). Kullanılan baskı tekniği, filamanlı termoplastik malzemeyi kullanan, sıcakta eriyen ekstrüzyon bazlı bir 3B baskı tekniği olan erimiş biriktirme modellemesidir (FDM) (Economidou ve Douroumis, 2021).



Şekil 2. 2: FDM yöntemi ve FDM ile üretilen mikroïğneler(Sirbubalo vd., 2021)

Şekil 2.2' deki şekilde görüldüğü üzere bir nesnenin katmanlarını oluşturmak için filament, yarı erimiş bir duruma kadar ısıtılır ve ardından hareketli bir uçtan çıkarılır. PVA (Polivinil alkol), PLA (Polilaktik asit), PGA (Poliglikolik asit), PCL (Polikaprolakton), ve PLGA (Polilaktik ko-glikolik asit) gibi bazı biyomalzemeler,

FDM substratları olarak kullanılabilir (Bhatnagar vd., 2019). FDM yöntemi, düşük maliyetli olmasıyla dikkat çekmektedir. Gerekli kimyasal son işlem adımları, nihai ürünün kalitesinde değişikliklere yol açabilir. Bu durum, ekstrüzyon bazlı baskının çözünürlüğünü artıran ve mikro cihazların tek adımda üretilmesini mümkün kılan daha fazla teknolojik ilerlemeye olan ihtiyacın altını çizmektedir (Erkuş, 2023).

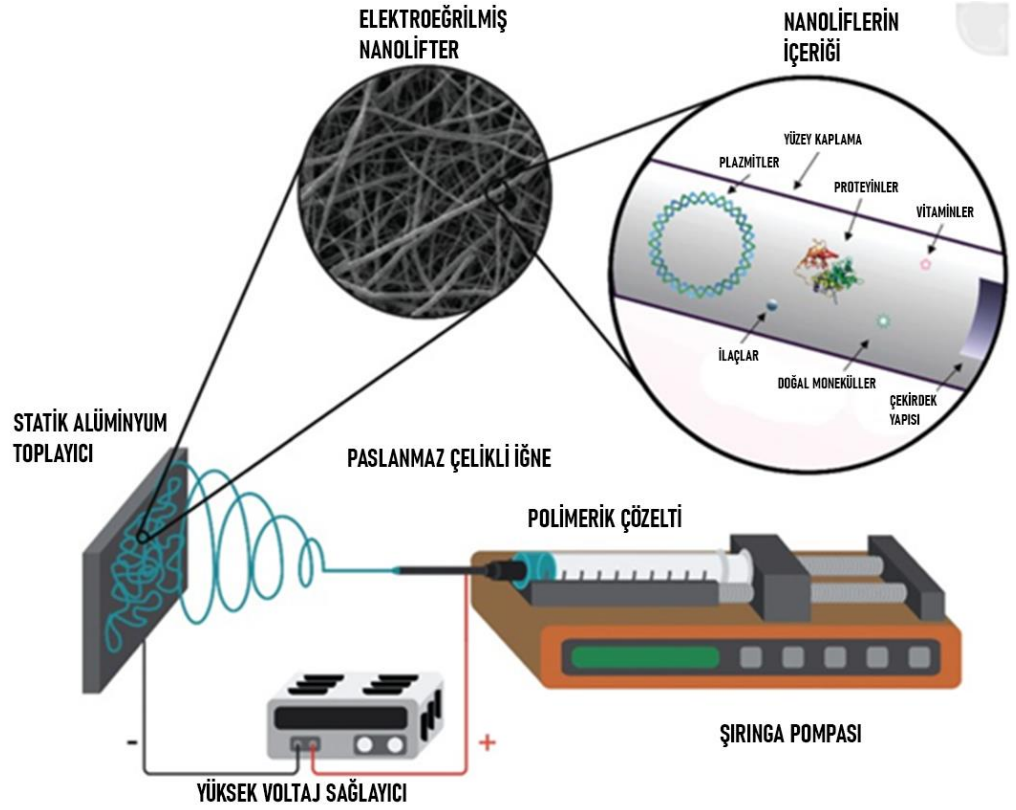
2.3. ELEKTRO EĞİRME YÖNTEMİ

Kontrollü salım, ilaç dağıtımını için yeni stratejiler geliştirmede büyük önem taşımaktadır. Bilinen ilaç dağıtım sistemlerinin çoğu tabletler, kapsüller granüller vb. dir. Bazıları enteral yolla uygulanırken bazıları intravenöz, intraarteriyel veya intramusküler gibi parenteral yolla uygulanmaktadır. Uygulama yolları ve şekilleri rahatsızlık veya ağrı gibi bazı olumsuzlara neden olmaktadır. Bu olumsuzluklar ilaçların doğrudan ağız boşluğuna verilmesiyle çözülebilir. Bu amaca ulaşmak için nanoliflerin içine aktif maddeler katılarak elektro eğirme yöntemiyle üretilen nanoliflerin yutulmasına veya çiğnenmesine gerek olmadan tükürük tarafından hızla ıslanarak hastanın ağızda çözülür veya parçalanır (Torres-Martinez vd., 2018). Kontrollü ilaç salımı için alternatif bir yöntem olan elektro eğirme yönteminde aktif farmasötik bileşenler, elektro spinleme tekniği ile yüklenir ve kontrollü yüzey morfolojisine sahip ultra ince lifler (mikrodan nanometre çapa kadar) üretilir. Bu lifler, istenen polimer çözeltisinde güçlü bir elektrik alan oluşturularak veya polimerin iyi bir çözücüye sahip olmaması durumunda polimerin eritilmesi ve bir elektrik alanına maruz bırakılmasıyla oluşturulur (Huang vd., 2003; Villarreal-Gómez vd., 2016).

Elektro eğirme tekniği Şekil 2.3' te görüldüğü üzere yüksek voltaj kaynağı, şırınga pompası ve iletken toplayıcı olmak üzere üç ana kaynaktan oluşmaktadır (Villarreal-Gómez vd., 2016). Bu teknikte çözünmüş polimer çözeltisi bir şırıngaya doldurulur ve şırınga pompasının üzerine yerleştirilir. İletken bir metalden yapılan iğnenin ucunda bir polimer çözeltisi damlacığı belirir ve aynı damlacığa 5 kV ila 50 kV arasında yüksek bir voltaj uygulanır. Daha sonra bu damlacık elektriklenir ve indüklenen yükler yüzeye eşit olarak dağıtılır. Bu damlacık Taylor konisi olarak bilinen bir nesneye dönüşür. Bu koni, iletken sıvı ile yalıtkan arasındaki boşluk kritik bir voltajı aştığında oluşur ve damlacığın kararsız hale gelmesine ve daireselden konik

şekle değişmesine neden olur (Chou vd., 2015; J, 2007). Gerilim eşiği aşıldığında, elektrik kuvveti damlanın yüzey gerilimini geçer ve ardından elektrik alan kuvvetine bağlı olarak bir veya daha fazla jet damlanın ucundan dışarı atılır. Jet, metal bir toplayıcıya (genellikle alüminyum gibi iletken bir toplayıcıya) doğru ilerledikçe, çözücü buharlaşır ve toplayıcı yüzeyinde dokunmamış bir yapı iskelesi oluşur (Singh vd., 2015; Tucker vd., 2011; Velasco Barraza vd., 2016).

Polimerlerin, özellikle biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin kullanımı, elektro eğirme araştırmalarında polimerlerin açık avantajlara sahip olması nedeniyle belirgin ilgi görmüştür. Polimerin vücut tarafından emilmesi ve parçalanması sayesinde implante edilmiş bir desteğin çıkarılması gibi ikinci bir cerrahi prosedüre gerek kalmamış olur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), polivinil alkol (PVA), polivinilpirolidon (PVP) ve kitosan gibi polimerler, doku mühendisliği ve ilaç dağıtımını için istenen özelliklere sahip lifler yapmak üzere kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Potrč vd., 2015; Velasco Barraza vd., 2016).

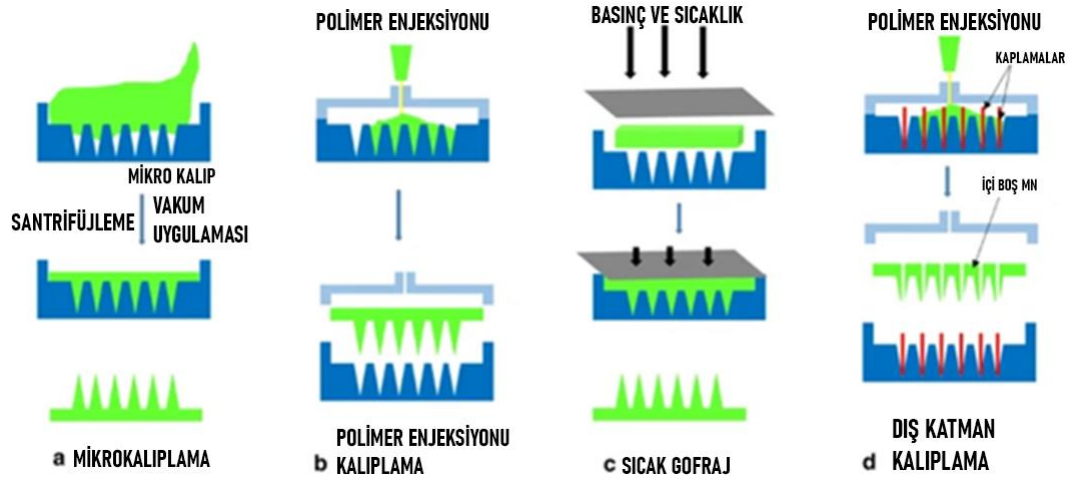


Şekil 2. 3: Elektrosinning cihazının temel diyagramı (Villarreal-Gómez vd., 2016)

Son yıllarda elektro eğirme, DDS' yi üretmek için sıkça araştırılan bir teknik haline gelmiştir. Elektro eğirme; polimerler, seramikler ve kompozitler gibi çeşitli malzemelerden yüksek yüzey alanına sahip ultra ince liflerin hazırlanmasına yönelik bir tekniktir. Bir asırdan fazla bir süre önce keşfedilmiş olmasına rağmen, elektro-eğirme süreci yoğun bir şekilde araştırılmış ve son 20 yılda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Tekniğin avantajları; düşük maliyet, kolay kullanım, çapları nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişen ultra ince lifleri üretme kolaylığı, morfolojinin kontrolü ve kullanılacak malzemelerin çok yönlülüğü olarak bilinmektedir (Martínez-Pérez, 2020).

2.4. ÇÖZÜCÜ DÖKÜM YÖNTEMİ

Çözücü döküm yöntemi ve kalıplama, polimerik MN' lerin üretilmesi için en yaygın tekniktir. Şekilde gösterildiği gibi enjeksiyon kalıplama, sıcak kabartma veya mikro kalıplama yoluyla yapılır. Şekil 2.4'te gösterildiği gibi enjeksiyon kalıplama, sıcak kabartma veya mikro kalıplama yoluyla yapılır (Erkuş, 2023).



Şekil 2. 4: Polimer MN' lerin hazırlanmasında kullanılan çeşitli döküm ve kalıplama teknikleri(Bhatnagar vd., 2019)

Çözücü döküm yöntemi tipik olarak elde edilmesi amaçlanan nihai MN yapısına karşılık gelen boşluklardan oluşan bir ana kalıp içerir (Bhatnagar vd., 2019). Bu kalıplar çeşitli malzemelerden yapılabilir ancak en yaygın olarak Polidimetilsiloksan (PDMS)' dan yapılır. Şeffaflığı, sertleşme süresinin kısa olması, esnekliği ve ikincil yapı oluşumunda iyi tekrarlanabilirlik özelliği sunması nedeniyle

PDMS yaygın olarak kullanılmaktadır (Erkuş, 2023). Bu teknikte sıvı bir polimer çözeltisini bir kalıba eşit şekilde akıtmak ve hava boşluklarını ortadan kaldırmak için birden fazla yaklaşım kullanılır (Gittard vd., 2009). Hava boşluklarının çıkarılması, bir vakum veya santrifüj kullanılarak, ardından fırında kurutma ve kalıptan çıkarma işlemi yapılarak kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Pektinden PVA' ya ve PVP' ye kadar çeşitli polimerik MN' ler kalıplama yoluyla üretilmektedir (Dharadhar vd., 2019; Nagarkar vd., 2020).

2.5. FRANZ DİFÜZYON HÜCRESİ VE DERİ GEÇİRGENLİĞİ ARAŞTIRMALARI ÜZERİNE ETKİSİ

TDD, yan etkilere neden olabilecek sistemik dolaşıma darbe penetrasyonu olmadan istikrarlı ilaç dağıtımını sağlar. İlaçların TD uygulaması, ilaç uygulamanın en etkin yollardan biridir (Kajbafvala ve Salabat, 2022). Günümüzde TD yolla uygulanan birçok ilaç bulunmaktadır. Uzmanlar, çeşitli cilt durumlarını tedavi etmek ve derinin geçirgenliğini ve ilaç emilimini artırmak amacıyla çok çeşitli yöntemler kullanır. İn vitro ve ex vivo cilt geçirgenliğini araştırmak için Franz difüzyon hücre aparatı yaygın olarak kullanılmaktadır. Franz difüzyon hücreleri öncelikle jeller, kremler, mikroemülsiyonlar, TD yamalar ve kremler gibi cilde uygulanan birçok formülasyonun ex vivo cilt penetrasyonunu ve in vitro ilaç salınımını ölçmek için kullanılır. Franz difüzyon hücreleri temelde donör ve reseptör bölmesi olmak üzere iki bölmeden oluşur. Reseptör bölmesi çözünme ortamını, donör kısmı aktif farmasötik bileşenler içeren formülasyonu içerir (Lafarge vd., 2022; Suo vd., 2022).

2.5.1. Cilt Geçirgenliğini Değiştiren Unsurlar

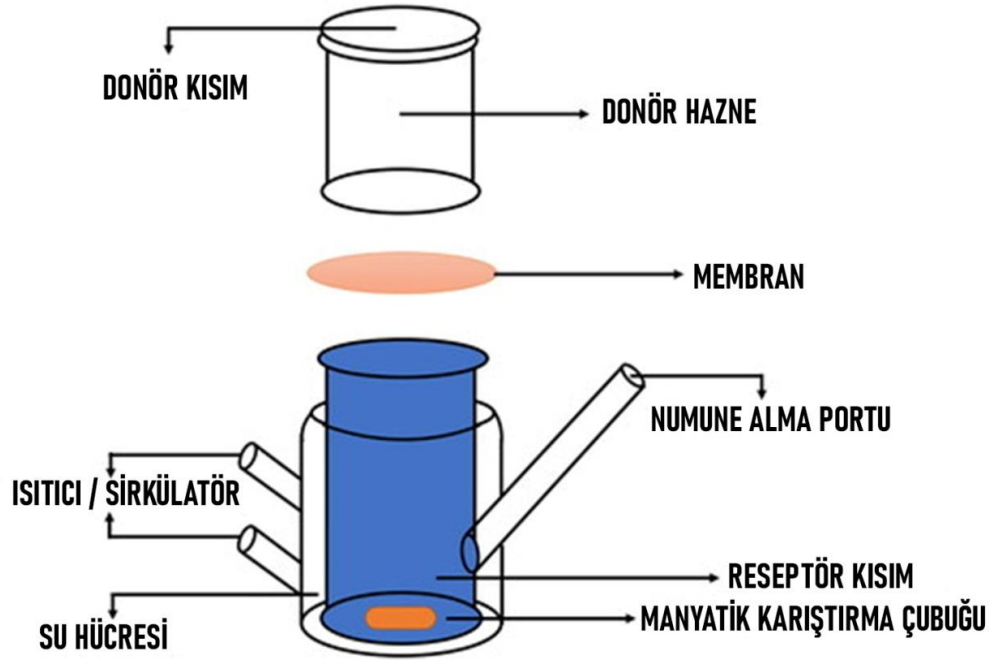
Formülasyondan ilacın salınması ve canlı deri katmanlarına nüfuz etme yeteneği, ilaç, araç ve deri arasındaki etkileşime bağlıdır. Cilde uygulanan bir ilaçtan aktif maddenin veya ilacın sistemik dolaşıma salınması için birtakım adımlar gereklidir. Bu adımlar, ilacın formülasyondan salınması; ilacın SC tabakasına bölünmesi, ilacın SC tabakasına difüzyonu, ilacın SC tabakasından canlı epidermis tabakalarına bölünmesi ve ilacın canlı epidermis katmanları boyunca difüzyonu olarak ilerlenmektedir. Cilde verilmek üzere aktif bir farmasötik bileşenin (API) seçilmesi, fizikokimyasal özellikler, farmakokinetik ve ilaç-membran etkileşimleri dahil olmak

üzere çok sayıda parametrenin dikkate alınmasını gerektirir. Bölme katsayısı yüksek fakat kararlı olması, optimum konsantrasyon gradyanı elde etmek ve cilt üzerindeki difüzyon kuvvetini arttırmak için su ve yağlarda çözünürlük ve uygun çözünürlüğe bağlı 200 °C' den düşük erime noktasına sahip olması gibi fizikokimyasal özellikler, ilacın deriden etkili bir şekilde geçebildiğini gösterir (Delgado-Charro ve Guy, 2014; Kalia ve Guy, 2001). Ayrıca artan hidrasyonla da daha iyi geçirgenlik elde edilmektedir.

2.5.2. Franz Difüzyon Hücresi

Difüzyon hücresi esas olarak ürünlerin geçirgenliğini ve stabilitesini değerlendirmek için kullanılır (Yu vd., 2022). Yeni formülasyonların tasarlanması ve geliştirilmesinin yanı sıra toksisite testleri ve kalite kontrolü için de fayda göstermektedir (Levintova vd., 2011; Pineau vd., 2012). Çoğu durumda Franz difüzyon hücreleri, cerrahi olarak çıkarılan insan veya hayvan derisi kullanılarak uygulanır. Sentetik membranlar ise biyolojik derinin kolayca erişilemediği yerlerde kullanılır. İnsan derisi eksplantlarının dermatomuyla cilt geçirgenliğinin incelenmesi, transdermal cihazlar yoluyla ilaç dağıtımını değerlendirmede altın standart olarak kabul edilir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* prosedürler, ilacın ne kadarının cilt yüzeyinden geçebileceğini belirler.

Franz difüzyon hücre sistemi Şekil 2.5' te gösterildiği üzere ikiye ayrılmaktadır. Yan yana hücreler olarak da bilinen dikey hücreler, sabit hacimli bir alıcı bölmesine, bir sıcaklık kontrol sistemine, sıvı örnekleme için bir bağlantı noktasına ve bir sıcaklık izleme sistemine sahiptir. Bu Franz hücreleri yukarıdan açıldığı için ölçümler hava basıncına dayalıdır. Ancak çoğu hücre üstten üstten kapalıdır, bu da daha yüksek basınç ve daha yüksek geçirgenlik seviyelerine işaret eder (Kumar vd., 2023).



Şekil 2. 5: Franz Difüzyon hücresinin temsili diyagramı(Kumar vd., 2023)

Bununla birlikte, akış hücreleri, alıcı ortamın sabit bir akışına sahiptir, bu da reseptör odasında türbülans yaratır ve karıştırmayı taklit eder. Akış hücreleri, sabit bir hacme, kontrollü bir sıcaklığa ve esnek bir akış hızına sahip bir reseptör odasına sahiptir (László vd., 2022). Franz difüzyon hücresinin bileşenlerinden biri, yarı katı veya cilde uygulanan formülasyonu içeren donör bölmesi ve çözünme ortamını içeren reseptör bölmesidir. Membran bir bariyer ortamı görevi görür ve alıcı ve verici bölmeleri arasına yerleştirilir. Numuneler, belirlenen aralıktan sonra numune alma bağlantısı üzerinden alınır. İşlem boyunca sıcaklığı korumak için bir su ceketini kullanılır ve dağılmış ilacı eşit bir şekilde karıştırmak üzere çözünme ortamını döndürmek için bir karıştırma çubuğu kullanılmaktadır (S. Yang vd., 2012). Franz difüzyon hücreleri, in vitro ilaç salınımını tahmin etmek için kullanılır. Alıcı ve donör bölmeleri arasına bariyer görevi görmesi için membran veya selüloz asetat membran gibi bir deri örneği yerleştirilir. İlaç salım miktarı, geliştirilen HPLC veya UV yöntemleri kullanılarak değerlendirilir.

Membran teknolojisi; Geleneksel ayırma yöntemlerine göre ekonomik olması ve uygulama kolaylığı nedeniyle son yıllarda ayırma işlemlerinde yaygın olarak popülerlik kazanmıştır (Tang vd., 2017). Membran üretiminde temel amaç, yeterli

mekanik dayanıma sahip, yüksek seçicilikle yüksek filtrasyon sağlayabilen bir malzeme oluşturmaktır. Küçük gözenekli membranlar kullanılarak yüksek derecede seçicilik elde edilebilmekte ve dolayısıyla bu tür membranlarda düşük geçirgenlik gözlenmektedir. Geçirgenlik gözeneklilik arttıkça artar (Stephenson vd., 2007). Membranın çalışma sistemi temel olarak filtrasyon sırasında çözeltinin konsantre ve filtrata bölünmesi ve filtrasyonun sonunda konsantrenin tutularak süzütünün membrandan geçmesine izin verilmesi şeklinde ifade edilebilir (Gzara ve Dhahbi, 2001; Judd, 2017). Halihazırda polimerler membran üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu polimeri içeren membranların özellikleri bu amaçla kolaylıkla geliştirilebilir (Mokhtar vd., 2018).

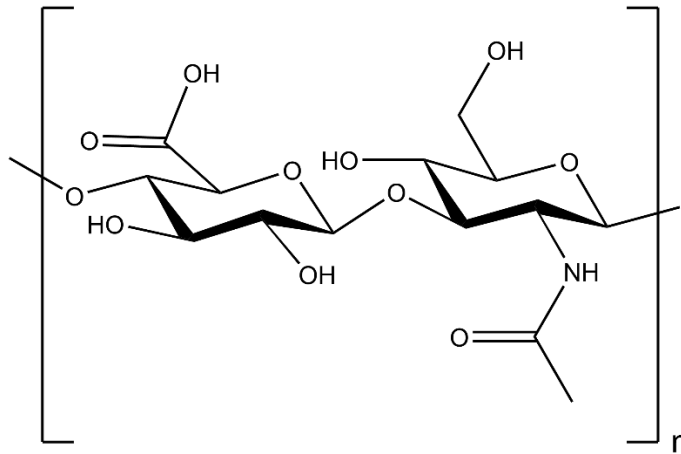
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEMELER

3.1.1. Sodyum Hiyalüronat

Doğal olarak oluşan hiyalüronik asitler, hücre dışı matrisin bir parçası olarak canlı organizmalarda evrensel olarak bulunur. Hiyalüronik asit (HyA), N-asetil-Dglukozaminin glukuronik asit ile bağlanmasıyla oluşan doğal glikozaminoglikandır ve bu ekstraselüler matriks bileşenlerinden biridir ve onarım döneminde morfogenez sırasında hücre göçünü kolaylaştırır. Ekstraselüler matriks (ECM), HyA bakımından zengindir ve yara iyileşmesi boyunca, özellikle de yara iyileşmesinin ilk evresinde büyük miktarlarda üretilir. HyA bazal laminada sentezlenir ve ekzositoz yoluyla salınır. Yara iyileşmesi sırasında büyük miktarlarda üretilerek hücre göçünü kolaylaştırır. Yeni hücre oluşumunu ve hareketliliğini sürdürmek için HyA bakımından zengin bir ortam gereklidir.



Şekil 3. 1: Hiyalüronik Asit

Sodyum hiyalüronat olarak da bilinen HyA (CAS no. 9067-32-7), HyA' nın sodyum tuzudur. HyA sodyum tuzu, HyA'nın çözünebilir formudur. HyA suda yavaş

ama tamamen çözünerek berraktan hafif opalesana renksiz ve oldukça viskoz bir çözelti verir.

HyA formları uzun yıllar boyunca eklem içi enjeksiyonlarda ve katarakt ameliyatı gibi oftalmolojik prosedürlerde kullanılmıştır. Daha yakın zamanlarda, dermal dolgu maddeleri ve şekillendirme ajanları olarak önemli hale gelmişlerdir. HyA dolgu maddeleri mükemmel bir güvenlik profiline sahiptir, doz sınırı yoktur. İyileşme sürecini artırmak için HyA ile hazırlanan başta göz damlaları olmak üzere birçok ticari formülasyon bulunmaktadır. Klinik çalışmalar, ürün etiketleri ve klinik deneyimlere göre, sonuçlar doza bağlı olmadığından sabit bir doz dönüşüm oranı yoktur. Kolajen, jelatin, fibrin, aljinik asit ve kitosan gibi biyoyumlu doğal polimerler arasında HyA, immünojenite ve aşırı duyarlılık riskini azaltan ve kontrol edilebilir mekanik ve bozunma özelliklerine sahip doğal olarak türetilmiş bir malzeme olarak kabul edilmektedir. HyA' nın biyolojik olarak hareketsiz ve alerjik olmadığı ve implantasyondan önce alerji testi gerektirmediği bildirilmektedir.

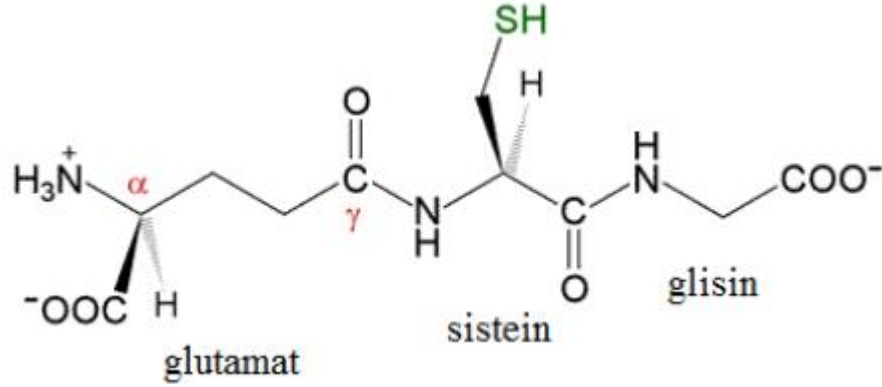
Dermal ogmentasyon için özel olarak üretilen HyA jellerinden ikisi farklı kaynaklardandır. Kaynaklardan biri horoz taraklarından elde edilen, yüksek moleküler ağırlığa sahip ancak daha düşük konsantrasyonludur. Diğer kaynak ise bakteriyel fermantasyon olup daha düşük moleküler ağırlığa ve daha viskoz bir eğilime sahiptir. Kozmetikte kullanılan tek HyA kaynakları bakteriyel fermantasyon ve horoz tarağıdır ve moleküler ağırlıkları 5 ila 1800 kD arasındadır. 0,1'lik HyA kuru gözlerde terapötik fayda sağlar, bunun nedeni HyA' nın konjonktival kesede uzun süre kalması ve kornea ile uzun süreli temasıdır. Ayrıca glokom ve diğer göz cerrahisi tekniklerinde de kullanılması önerilmiştir.

HyA insanlarda çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Avena rhealba extract® ve HyA'nın cilt epitelizasyon potansiyeli, erbiyum-YAG lazer ile cilt lezyonlarının oluşturulduğu küçük bir gönüllü örneğinde gösterilmiştir. HyA'nın farklı jel formülasyonları, yanık hastalarında ve inatçı ülserlerin tedavisinde kullanılmıştır. Dört üst ekstremitte derin yara vakası, bakteriyel fermente HyA tuzu (%0,2 w/w) ile tedavi edilmiştir. Yara iyileşmesinin yanı sıra, bu tedavi tatmin edici estetik sonuçlara ve etkilenen uzuv işlevselliğinin optimum düzeyde iyileşmesine yol açmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında üretilen TD yara örtüsü, mikropartiküllerin (4mg/TD) tabanını oluşturmak için HyA sodyum tuzu içerir. HyA, avokado yağı kombinasyonu ile Glutasyon barındıran mikropartiküllerin yapısını oluşturur. Kullanılan HyA sodyum tuzu Streptococcus Zooepidemicus Equi bakterisinin fermantasyonundan elde edilir. Üretim süreci ISO 9001:2008 sertifikalı bir kalite yönetim sistemi kapsamındadır.

3.1.2. Glutasyon

Glutasyon (GSH), canlı organizmalarda en bol bulunan antioksidanlardan biridir (Sayed, 2012). GSH insanlarda (Leeuwenburgh ve Ji, 1998), hayvanlarda (Laganriere ve Yu, 1989), bitkilerde (Burk vd., 2001) mantar (B. Pradhan vd., 2021) ve bakteri gibi mikrobiyal hücrelerde biyosentezlenir (H. S. Jung vd., 2012; P. Pradhan vd., 2020; Tripathy ve Pradhan, 2019). GSH'nin kimyasal adı -l-glutamil-l-sisteinilglisindir ve yapısı Şekil 3.2' deki gibidir. Bu biyolojik tripeptid, DNA sentezi (Eteshola vd., 2020), protein sentezi (Nauser vd., 2005), hücre gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde hayati roller oynar. Membran stabilizasyonu (Pittman vd., 2005; Tamer vd., 2020), aminoasit nakli (Ribas vd., 2014) ve ksenobiyotik detoksifikasyon (Balabanova vd., 2018) görevleri vardır. GSH, sistein kısmındaki tiyol grubunun indirgenmesi ve oksitlenmiş disülfid formunun (GSSG) oluşumu yoluyla bir elektron donörü görevi görür (Moreno-Sánchez vd., 2018; Schmitt vd., 2015). Bundan sonra, GSH redüktaz enzimi, bir kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojeni (NADPH) kullanarak GSSG'yi tekrar GSH'ye dönüştürür. Bu nedenle, GSH/GSSG'nin molar oranı, hücrel oksidatif stresin önemli bir göstergesidir. Düşük GSH/GSSG oranı, katarakt, kanser, parkinsonizm, diyabet, böbrek yetmezliği, pnömoni, Alzheimer hastalığı, kurşun toksisitesi, kistik fibroz, distrofik cilt fibroblastları, nörodejeneratif bozukluklar, insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonları gibi bir dizi insan bozukluğunda önemli bir biyobelirteçtir (Aoyama vd., 2008; Lu, 2009; Sánchez-Rodríguez ve Mendoza-Núñez, 2019). (GSH kristal toz formunda bulunmaktadır. Hidrojel içerisinde önceden çözündürülüp formüle edileceğinden kullanılacak GSH partikül boyutu önem arz etmektedir). Bu tezde kullanım amacı yara üzerindeki oksidasyonu engelleyen ve yara iyileşmesini hızlandıran bir biyoaktif teröpatik antioksidan ajan olarak kullanılacaktır.



Şekil 3. 2: Glutatyon molekülünün kimyasal yapısı

Doku mühendisliği uygulamalarında doku zedelenmesi ve yaralanmalarında antioksidan mekanizmalar ile serbest radikal oluşumu arasında bir dengesizlik olduğu bildirilmiştir. Glikoz ve glikozile proteinlerin oto-oksidasyonunun varlığında devam eden hiperglisemi, savunma mekanizmalarında bir azalma ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olur. ROS, başta mitokondride olmak üzere hücre metabolizma tarafından üretilir. Üretimleri hücrenin antioksidan kapasitesini aştığında, lipitler, proteinler ve DNA gibi makromoleküller zarar görebilir. Ciltte aşırı ROS üretiminin iyileşmeyen yaralara önemli bir katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi ROS' lar da birçok durumda kritik bir rol oynamaktadır.

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bulduklarında ilgili maddelerin oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak, antioksidanlar zincir kırma reaksiyonları, ROS konsantrasyonunu azaltarak, başlatıcı radikalleri temizleyerek ve geçiş metal katalizörlerini uzaklaştırarak etki ederler. Antioksidanlar, doku rejenerasyonu sürecinde oluşan oksijen radikallerini inhibe ederek yara bölgesini serbest radikal hasarlarına karşı korur ve böylece cildin onarımına yardımcı olur. Bu serbest radikallerin aktivitesini kontrol etme ihtiyacı nedeniyle, GSH serbest radikal hasarına karşı güçlü bir antioksidan olarak seçilmiştir. GSH, proteaz enzimlerinden koruyarak, fibroblastların fonksiyonlarını ve kolajen sentezini artırarak dermiste hücre çoğalmasını uyarır (Averill-Bates, 2023).

3.1.3. Avokado Yağı

Fosfolipitler; gliserol, iki yağ asidi ve bir fosfat grubu içeren doğal olarak oluşan kompleks lipitlerdir. Fosfolipitler aynı zamanda lipit çift tabakaları oluşturma yetenekleri sayesinde tüm hücre zarlarının önemli bir bileşenidirler. Fosfolipit, gıda endüstrisinde doğal yüzey aktif maddelerin kullanımına artan ilginin yanı sıra ara yüzey özellikleri nedeniyle yüksek bir katma değere sahiptir. Fosfolipitler veya gliserofosfolipitler fosfatın bulunduğu triasilgliserollerin modifikasyonlarıdır (Bai vd., 2016; Nelson ve Cox, 2014). Fosfolipitlerin yaygın kaynakları yumurta ve soya fasulyesinin yanı sıra süt, ayçiçeği çekirdeği ve kolza tohumudur. Avokado posası lipit fraksiyonu, fosfolipitler gibi polar lipitler açısından zengindir. Avokadoda bulunan bazı fosfolipitler; fosfatidilkolin (PC), lisofosfatidilkolin (LPC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidik asit (PA) ve fosfatidilgliseroldür (PG) (Takenaga vd., 2008). Avokado yağı (*Persea americana*) (AVO) temel olarak yağ asitlerinden oluşur ve ana bileşeni oleik asittir (Qin ve Zhong, 2016). Bileşiminde karotenoidler, tokoferoller, steroller ve klorofiller de bulunmaktadır. AVO' nun cilde ilişkin antioksidan, yaşlanma karşıtı, iltihap önleyici ve iyileştirici özellikleri vardır.

AVO, cilde sağladığı faydalar açısından oldukça avantajlara sahiptir. Bununla birlikte rafine AVO, cilt formülasyonlarında en çok kullanılan yağdır. Gün ışığına ve termal ısıya maruz kalan ham AVO bileşenleri, cilt özelliklerini tehlikeye sokan bozulmaya maruz kalmaktadır. Rafinasyon işleminde klorofiller uzaklaştırılarak ışıkla oksidasyona daha az duyarlı rafine AVO elde edilir. İlaç dağıtım sistemleri yaygın olarak kozmetik ve farmasötik taşıyıcılar olarak tanımlanmaktadır.

Hücresel membranın ana bileşenleri olarak fosfolipitler mükemmel biyouyumluluğa sahiptir. Ayrıca fosfolipitler amfifilik yapılarıyla da ünlüdür. Emülsifikasyon, solubilizasyon, nemlendirme, bariyer fonksiyonunu iyileştirme, tahrişi azaltma, cilt gözenek boyutunu azaltma, hücre çoğalmasını uyarma, dağıtma/ıslatma ajanları, aktif penetrasyonu artırma, saç bakımı, kapsülleme/liposomal aktif dağıtım sistemleri olarak kullanılırlar.

Piyasadaki topikal cilt sağlığı uygulamalarına yönelik çeşitli terapötik ve kozmetik formülasyonlar, en yaygın olarak fosfatidilkolin (lesitin) olmak üzere

fosfolipitler içerir. Fosfolipitlerin kıkırdak yüzeylerinde çok katmanlı yapılar oluşturduğu bildirilmiştir. Eklemlerde bulunan fosfolipitler arasında AVO en bol bulunan doymuş fosfolipittir ve bu nedenle fosfolipitlerin biyolojik yüzey kayganlığındaki rolünü aydınlatmak için araştırılacak doğal bir seçimdir.

Dikkat çekici bir şekilde, bir yaraya fosfolipit uygulandığında, HyA üretimini uyardığı bulunmuştur. Başka bir deyişle, fosfolipit tercihen epitelyal veya diğer yüzey hücrelerinin yeniden büyümesi anlamına gelen yeniden epitelizasyonu kolaylaştırarak bir yarayı tedavi etmek için kullanılır.

3.1.4. Jelatin

Kolajenin denatüre bir formu olan jelatin (Jel), gıdalarda, ilaçlarda, kozmetiklerde ve diğer ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İdari makamların çoğu tarafından gıda maddesi olarak sınıflandırılmış ve FDA' dan GRAS statüsü almıştır. Temelde %85 protein, %13 su ve %2 mineralden oluşan doğal bir protein gıdasıdır. Jel genellikle gıda endüstrisinde jelleştirici, stabilizatör ve/veya emülgatör olarak ve gıdaları korumak ve raf ömürlerini uzatmak için ambalaj filmlerinin ve kaplamaların formülasyonunda kullanılır. Şu anda gıda için kullanılan ve ilaç endüstrisi tarafından kullanılan Jel neredeyse sadece hayvansal ürünlerden elde edilmektedir. Jel, hayvan deri ve kemiklerinde bulunan Tip 1 kolajenin kısmi hidrolizi yoluyla elde edilir. Jel üretimi için kullanılan kolajen farklı kaynaklardan elde edilebilir, bunlar arasında sığır ve domuz jelatinleri daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolajen çoğu proteaza karşı dirençlidir ve enzim hidrolizi için özel kolajenazlar gerektirir. Jel ise çoğu proteaza karşı hassastır, ancak bu proteazlar jeli 20 amino asitten daha az amino asit içeren peptitlere ayırmaz.

İlaçlardaki jelatin oral, topikal veya parenteral yolla veya uygulama yerinde daha uzun süre kalabilen implante edilebilir tıbbi cihazlar olarak uygulanabilir. Yüksek standartlar uygulanmakta ve jelatinin parenteral veya oftalmik uygulama için güvenliği belirlenmektedir. Topikal olarak güvenli kabul edilir, doz için bir sınır yoktur.

Jel, 1970' lerden itibaren doku mühendisliği ve son yıllarda yara örtüleri veya diğer biyomalzemelere gömülü mikro taşıyıcı olarak biyomalzeme olarak daha yakın

zamanda kullanılmıştır. Jel'ler, süngerler ve dokuma ağlar şeklinde in vivo doku mühendisliği için iskele olarak kullanılan kolajen/jelatin bazlı biyomalzeme, doku rejenerasyonunun tamamlanmasının ardından vücutta emilerek yok olur.

3.1.5. Kolajen

Kolajen (KOL) ve Jel, mükemmel biyoyumlulukları ve kolay biyobozunurlukları nedeniyle gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok sayıda çalışma KOL, Jel ve bunların hidrolize peptitlerinin biyoaktivitelerini ve biyolojik etkilerini araştırmıştır. Bir protein kaynağı olarak yerleşik besin değerlerine ek olarak, KOL ve KOL türevi ürünler, alımdan sonra hücre dışı matristeki hücreler üzerinde çeşitli potansiyel biyolojik aktiviteler gösterir ve bu, diyet takviyeleri ve farmasötik ilaçlardaki uygulamalarını haklı çıkarabilir (Ata ve Tavman, 2019).

KOL; kolayca izole edilebilen ve büyük miktarlarda saflaştırılabilen, iyi belgelenmiş yapısal, fiziksel, kimyasal ve immünolojik özelliklere sahip olan, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu olan ve sitotoksik olmayan, hücre sel büyüme destekleme kabiliyetine sahip olan bir biyomalzemedir. Son yıllarda gelişen doku mühendisliği teknolojisi, iskele olarak KOL malzeme araştırmalarına yeni bir ivme kazandırmıştır ve Tip 1 KOL, doku mühendisliği alanında altın standart olarak görülmektedir. Yeniden yapılandırılmış ürünler, düşük immünojenite ile ilişkili yüksek biyokimyasal saflık, genellikle kısa zaman aralıklarında kontrollü devir, kontrollü gözeneklilik ve hücre-matris etkileşimlerinin korunması ile karakterize edilir. Bu nedenle KOL, son birkaç yıldır klinik tıpta, doku defektlerinin büyütülmesi, hemostaz, yanık ve yara pansumanları, fitik onarımı, biyoprostetik kalp kapakçıkları, vasküler greftler, ilaç dağıtım sistemi, oküler yüzeyler ve sinir rejenerasyonu için enjekte edilebilir KOL gibi önemli bir kullanım alanı bulmuştur (Sahithi vd., 2013).

KOL, yeryüzünde en bol bulunan proteinlerden biri olması nedeniyle hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilebilmektedir. Hayvansal kaynaklardan en yaygın olanları sığır, domuz, insan kolajeni ve pullu balık ve balık derisi gibi deniz organizmalarıdır. Bu hayvansal kaynaklar arasında sığır kolajeni, ağız dışı yaralar ve vücuttaki yanıklar için geçici bir örtü olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Biyouyumluluğu nedeniyle geniş uygulama alanlarına sahiptir. FDA tarafından güvenli olarak kabul edilmiştir, ancak kaynak hayvan bazlı ise TSE/BSE gibi hastalık bulaştırma riski olmadığı gösterilmesi gerekmektedir.

KOL iskeleler başlangıçta yara pansumanı ve hemostiptik olarak geliştirilmiştir. Genellikle yaklaşık %0,1-5 kuru madde içeriğine sahip sulu asit veya alkali ile şişirilmiş KOL preparatlarının dondurularak kurutulması ile hazırlanırlar. Her doku ve organda bulunabildiği için belirli bir doz sınırı yoktur. Liyofilize KOL pastasının gözenekliliği, KOL konsantrasyonu ve donma hızı değiştirilebilir. Ek olarak, KOL elastin fibronektin veya glikoaminoglikanlar gibi diğer malzemelerle birleştirilebilir ve başlangıç malzemesi veya tercihen elde edilen yapak, esnek malzemeler oluşturmak için çapraz bağlanabilir. Bu kolajen bazlı tıbbi cihazlar ciddi yanıkların tedavisinde çok değerlidir ve bası yaraları, donör alanlar, bacak ülserleri ve dekübit ülserleri gibi diğer birçok yara türü için pansuman olarak kullanım alanı bulmuştur. KOL sargıların başlıca faydaları arasında büyük miktarlarda doku eksüdasını kolayca emebilmeleri, ıslak yara yatağına pürüzsüz bir şekilde yapışarak bu nemli mikro iklimi korumalarının yanı sıra mekanik hasara karşı koruma sağlamaları ve ikincil bakteriyel enfeksiyonu önlemeleri yer almaktadır. Bu fiziksel etkilerin yanı sıra KOL, hücre hareketliliği ve büyümeyi teşvik eder. Bu da yara üzerinde yeni granülasyon dokusu ve epitel oluşumunu sağlar (Zheng vd., 2023).

KOL, içecek ve gıda, kozmetik ve sağlık hizmetleri pazarından talep görmektedir. Gıda takviyesi olarak ağızdan günlük KOL alımının (Pure gold collagen; 5mg/day po) dermiste yeni KOL oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir.

KOL, tıbbi cihazların yüzeyini kaplamak için en yaygın şekilde kullanılan ECM proteindir. KOL kaplamalar vasküler greftlerde kullanılmıştır. Ayrıca, Surmodics'in Kolajen-1 ve Laminin-1 karışımı kullanan finale prohealing kaplaması, biyouyumluluğu artırmak ve stentler için bir yüzey işlemi olarak değerlendirilmiştir.

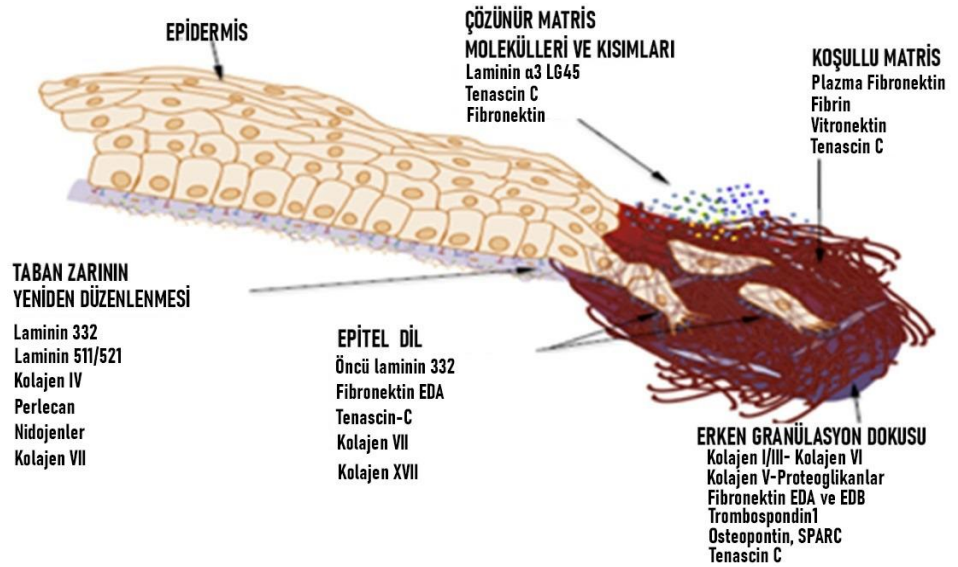
3.1.6. Laminin

Laminin (LM), deri yapısında bulunan doğal bir insan proteindir. Büyük biyolojik önemi nedeniyle LM, omurilik veya periferik sinirleri onarmayı amaçlayanlar da dahil olmak üzere çeşitli biyomühendislik protokollerinde (yapay

deriler) hücre infüzyonu için bir iskele olarak kullanılmıştır. Buna ek olarak, LM içeren biyomalzemeler insanlarda kalıcı deri ülserasyonunu tedavi etmek için de kullanılmıştır (Ikemoto vd., 2006).

Bazal membranlar, tüm epitel ve endotellerin bazal yönünü kaplayan ve kas, yağ ve periferik sinir hücrelerini çevreleyen hücre ile ilişkili tabaka benzeri hücre dışı matrislerdir. Bazal membranlar tüm hayvanlarda doku oluşumu için gereklidir. Farklı hücre tipleri arasında mekanik stabilite ve bariyerler sağlarlar. LM'ler, bazal LM'nin başlıca hücre dışı matriks protein bileşenidir. Genel olarak LM'ler kolajen, integrinler, hücresel alanlar ve proteoglikanlar için bağlanma bölgelerine sahiptir ve bazal laminada tabakalar oluşturmak için kendisiyle bağlanabilmektedir (Iorio vd., 2015).

Çeşitli dozlarda oral uygulama yoluyla gıda takviyelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. LM ayrıca ABD Gıda ve İlaç Dairesi FDA (Food and Drug Administration) sertifikasına sahiptir. LM'nin tanımı, ABD ve Kanada'daki doktorlar için prestijli bir yayın olan "2015 Physicians Desk Reference "ın 69 baskısında yer almış, önerilen ve kullanılan ilaçlar ve gıda takviyeleri hakkında güncel ve detaylı bilgiler yayınlanmıştır. TD, dokunun bağlanmasına yardımcı olmak için tek bir üründe 30 µg laminin içerir.



Şekil 3. 3: ECM' nin yerleşimi

3.1.7. Yardımcı Maddeler

3.1.7.1. Arıtılmış Su

Arıtılmış su, aktif farmasötik bileşenlerin, ara ürünlerin ve analitik reaktiflerin işlenmesinde, formülasyonunda ve üretiminde hammadde, bileşen ve çözücü olarak yaygın şekilde kullanılır. Renksiz, kokusuz, tatsız ve berrak bir sıvıdır. Farmasötik formülasyonlarda yardımcı madde olarak da yaygın bir şekilde kullanılır. Belirli derecelerdeki saflaştırılmış sular, farklı uygulamalarla %100'e kadar kullanılabilir.

TD içindeki saflaştırılmış su, özellikle GSH biyoaktif ajanların hazırlanması sırasında GSH'ın çözüldürülmesinde ve dondurarak kurutma işleminin başlatılmasından önce dermal matrisin Jel çözeltisinin hazırlanması sırasında işlem çözücüsü olarak kullanılmaktadır. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma işlemleri uygulanırken saflaştırılmış suyun üründen uzaklaştırılacağı unutulmamalıdır.

3.1.7.2. Etanol

Etanol ve çeşitli konsantrasyonlardaki sulu etanol çözeltileri farmasötik formülasyonlarda ve kozmetikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Etanol esas olarak bir çözücü olarak kullanılmasına rağmen, dezenfektan olarak ve çözeltilerde antimikrobiyal koruyucu olarak da kullanılır. Alkol hafif, karakteristik bir kokusu ve yakıcı tadı olan berrak, renksiz ve uçucu bir sıvıdır. TDM' de bulunan mutlak etanol, özellikle su varlığında çözünürlük sorunları ortaya çıkaran GSH biyoaktif ajanların hazırlanması sırasında AVO ve GSH çözünürlüştürülmesi için bir işleme çözücüsü olarak kullanılır. Püskürtmeli kurutma işlemi uygulanırken Etanol absolütünün üründen uzaklaştırılacağı unutulmamalıdır.

3.1.7.3. Hidroklorik asit

Hidroklorik asit (HCl), çeşitli farmasötik ve gıda preparatlarında asitleştirici bir ajan olarak yaygın şekilde kullanılır. Ayrıca, bir yardımcı madde olarak kullanımına ek olarak, metabolik alkaloz tedavisinde intravenöz olarak ve aklorhidri tedavisinde oral olarak bazı terapötik kullanımları olan seyreltik hidroklorik asit hazırlamak için de kullanılabilir. HCl 0.01 M KOL, Jel ve LM dökme çözeltisinin hazırlanması sırasında seyreltici ve işleme çözücüsü olarak kullanılır.

3.2. YÖNTEMLER

Transdermal membran (TDM) yara örtüsünün formülizasyon süreçleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

TDM; GSH, Dipalmitoil Fosfatidil Kolin (DPPC) içeren MP’lerden ve Jel/KOL bazlı bir yapı iskelesinden oluşmaktadır. **Formülizasyonlar;**

HyA (TDM0)

HyA/GSH (TDM1),

HyA/Jel-KOL-LM-AVO (TDM2),

HyA/Jel-KOL-LM/ AVO-GSH (TDM3) şeklindedir.

Tablo 3. 1: TDM yara örtüsünün formülizasyon süreçleri

Üretim Aşaması	Malzeme Adı	Miktar/Matris (5*5 cm)	Ölçü Birimi	Fonksiyonel Kategori
GSH mikropartikül bileşenleri	GSH	0.05	mg	Antioksidan
	HyA	4.0	mg	Mikropartikül oluşturan glikozaminoglikan
	AVO	15.8	mg	Mikropartikül oluşturan lipit
	Saf su	3.0	ml	Yardımcı çözücüler
	Mutlak etanol %99	7.0	ml	Yardımcı çözücüler
Transdermal bileşenleri	Jelatin Tip 250 LB 8	10.0	mg	Matris oluşturuca ajan
	KOL (Tip 1)	1.0	ml	Matris oluşturuca ajan
	LM	0.03	mg	Hücreleri bağlamak için yapıştırıcı
	0.01 M HCl	4.5	ml	Yardımcı çözücüler
	Saf su	1.0	ml	Yardımcı çözücüler

TDM yara örtüsünün üretim süreci aşağıdaki alt süreçlerden oluşmaktadır;

- Sprey kurutma işlemi kullanılarak GSH biyoaktif ajanların hazırlanması.
- TDM matrisin hazırlanması (Kolajen - Laminin - Jelatin matrisi)
 - Dondurularak kurutulmuş bir dermal matris elde etmek için Polietilen tereftalat kalıpta (PET kalıp) Kolajen - Laminin - Jelatin dökme çözeltisinin dondurularak kurutulması
 - 3 boyutlu bir dermal matris elde etmek için PET kalıbında dondurularak kurutulmuş dermal matrisin UV çapraz bağlanması
- GSH biyoaktif ajanların 3 B'lu dermal matrise eklenmesi ve böylece TDM 'nin hazırlanması şeklindedir.

3.2.1. Hidrojel Tasarımı ve Glutasyon (GSH) biyoaktif ajanların hazırlanması: Sprey kurutma metodu

- Toplu üretim protokolüne göre GSH biyoaktif ajanların hazırlanması için gereken tüm malzemeleri tartıldı.
- Ölçülen hacimde Saflaştırılmış su, ayrı ve uygun bir karıştırma kabına alındı ve 40°C'de ısıtıldı.
- Sodyum hiyalüronat (HyA) saflaştırılmış suyla karıştırarak eklendi ve berrak bir çözelti elde edilene kadar karıştırmaya devam edildi (Bundan sonra bu çözelti, **TDM_0** olarak adlandırılacaktır).
- Ölçülen mutlak Etanol hacmi, uygun bir karıştırma kabına alındı.
- AVO ve GSH mutlak Etanol'e karıştırılarak eklendi ve berrak bir çözelti elde edilene kadar karıştırılmaya devam edildi (Bundan sonra bu çözelti, **TDM_1** olarak adlandırılacaktır).
- Berrak bir homojen çözelti elde edilene kadar TDM_0 (40°C'de tutuldu), **TDM_1** ile karıştırıldı. Isıtma ve karıştırma işlemi sonlandırıldı ve oda sıcaklığında saklandı.
- Elde edilen mikropartiküller toplanıp Nitrojen temizleme altında amber renkli cam kaptaki saklandı.

3.2.2. 3 Boyutlu TDM'lerin hazırlanışı (KOL –LM–Jel matris)

3.2.2.1. Dondurularak Kurutulmuş Bir TDM Elde Etmek İçin KOL-LM-Jel Toplu Çözeltisinin Polietilen Tereftalat Kalıbında (PET kalıp) Dondurularak Kurutulması

- TDM (KOL-LM-Jel matris) hazırlanması için gereken tüm malzemeler toplu üretim protokolüne göre tartıldı.
- KOL (Tip 1, 0,01M HCl içinde 6mg/ml) solüsyonu ve 0,01 M HCl' yi uygun bir karıştırma kabına karıştırarak eklendi ve berrak bir solüsyon elde edilinceye kadar karıştırıldı.
- Ölçülen hacimde arıtılmış su uygun bir karıştırma kabına alınıp 40°C'de ısıtıldı.
- Saflaştırılmış suya Jel eklendi ve berrak bir çözelti elde edilene kadar karıştırmaya devam edildi. Elde edilen yapı oda sıcaklığında soğutuldu.
- LM, KOL ve Jel çözeltilerine karıştırılarak eklendi ve berrak bir solüsyon elde edilene kadar karıştırmaya devam edildi.
- Daha önce hazırlanan TDM_0'a Jel-KOL-LM formülizasyonu eklenerek TDM_2 elde edildi. Bu kombinasyona daha sonra GSHda eklendi. Son formalizasyonda TDM_3 olarak elde edildi.
- Sürekli karıştırarak, TDM_3 uygun doldurma aparatı kullanarak PET kalıplara dolduruldu.
- Doldurulmuş PET kalıpları dondurarak kurutma ekipmanına yüklendi.
- Toplu üretim protokolünde belirtildiği gibi tanımlı işlem parametreleriyle dondurarak kurutma işlemine başlandı.
- Dondurarak kurutma işleminin tamamlanmasının ardından dondurularak kurutulmuş TDM PET kalıplarında (gözenekli iskeleler) toplandı.

3.2.2.2. 3 Boyutlu TDM'lerin UV ile Çapraz Bağlanması

- PET kalıplarındaki dondurularak kurutulmuş dermal matris, UV çapraz bağlama ekipmanına yüklendi ve toplu üretim protokolünde belirtildiği gibi tanımlanmış işlem parametreleriyle dondurularak kurutulmuş dermal matrislerin çapraz bağlanması için UV ışınına maruz bırakıldı.
- UV çapraz bağlama işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen 3B'li dermal matris (yüksek gözenekli iskeleler), UV kabininden toplandı.

3.2.3. Akış Özelliklerinin Belirlenmesi

Kütle ve sıkıştırılmış yoğunluklar, 10 mL'lik dereceli silindir kullanılarak ölçüldü. Silindire dökülen numuneye 1250 defa mekanik olarak vuruldu. Carr indeksi ve Hausner oranı, yığın ve sıkıştırılmış yoğunluklardan hesaplandı. Mikromeritik özelliklere yönelik her deney, karmaşık bir şekilde gerçekleştirildi.

$$\text{Carr (\%)} = \frac{\text{Kılavuz yoğunluğu} - \text{Yığın yoğunluğu}}{\text{Kılavuz yoğunluğu}} \times 100 \quad (\text{Denklem 2})$$

$$\text{Hausner oranı} = \frac{\text{Kullanılmış yoğunluk}}{\text{Toplu yoğunluk}} \quad (\text{Denklem 3})$$

3.2.4. Mekanik Özellikler

TDM'lerin mekanik özelliklerini (çekme dayanımı ve kopma uzaması ölçümleri) değerlendirmek için doku analizörü (Stable Micro Systems) kullanıldı. Biyoaktif kompozit filmler, basınç testleri için 6 mm çapında ve 100 mm yüksekliğinde, çekme testleri için ise 5 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde ve 3 mm kalınlığında silindirik filmler olarak hazırlandı. Biyoaktif filmler, % 80 maksimum gerinime kadar 10 mm/dakika hızında yapıldı. Her numune dörtlü olarak ölçüldü. Bir kompozit filmin basınç modülü ve Young modülü, % 0-25 gerinime karşılık gelen gerinim-gerilim eğrilerinin başlangıçtaki doğrusal bölümünün eğimi kullanılarak hesaplandı. Kompozit filmlerin esnekliğini ve geri kazanılabilirliğini karakterize

etmek için aynı hızı izleyerek % 70 gerinime kadar dört ardışık basınç döngüsü için döngüsel basınç testleri gerçekleştirildi. Her numune dört tekrar halinde test edildi.

3.2.5. Biyoadezyon testi

TDM'lerin ex vivo biyoadezyon doğasını araştırmak için tavuk derisi üzerinde doku profili analizi (TPA; TA-TX Plus, Stable Micro Systems, Godalming, İngiltere) gerçekleştirildi. Tavuk derisi tutturulmuş 2x2 cm²'lik bir biyoadeziv halka, PBS'ye (pH 7,4) daldırıldı. Siyanoakrilat tutkal kullanılarak sargılar cihaza tutturuldu. Daha sonra cihaz, tavuk derisi sağlam kalırken 0,5 mm/sn hızında 3 dakika boyunca test edildi (0,5 N kuvvet uygulandı). Cihaz, TDM'leri tavuk derisi yüzeyinden ayırmak için 0,5 mm/sn hızında tavuk derisi yüzeyinden çekildi. Biyoadezyon kuvveti (F_{max}), biyoaktif kompozit filmleri tavuk derisinden ayırmak için uygulanan maksimum kuvvet olarak kabul edildi. Ortaya çıkan kuvvet-zaman eğrisinden (n = 6) mekanik özellikler (sertlik, sıkıştırılabilirlik, yapışkanlık ve elastikiyet) belirlendi. TDM'ler testin ikinci çalışması için kullanıldı.

3.2.6. Dinamik Buhar Sorpsiyonu (DVS) analizi

DVS Adventure ile su emilimi ve desorpsiyon izotermelerini eldesi için kullanılmıştır. İhtiyaç duyulduğunda sistem organik solvent buharı veya gazlarla çalışmak üzere yükseltilebilir özelliktedir. TDM numunelerin kurutulması için DVS Adventure ile 200 °C sıcaklığa kadar numune, sistem içerisinde kurutulmuştur. Devamında çoklu sorpsiyon/desorpsiyon döngüleri ile TDM formülizasyonlar oluşturularak bu döngülere numune kurutma aşamaları dahil edilmiştir. Sistemle difüzyon ve geçirgenlik ölçümlerini de gerçekleştirmek mümkündür.

3.2.7. Parçacık boyutu ve Stabilite Testi

Mikropartiküllerin (MP) partikül boyutunu ölçmek için Malvern Mastersizer (Malvern, İngiltere) kullanılmıştır. MP'ler, distile suda süspansiyon edilmiş ve boyutları hemen ölçülmüştür. 10 mg MP 25 ml etanol:su (1:1) ile karıştırılmış ve 3 dakika boyunca vortekslenmiştir. Karışım gece boyunca çalkalayıcı altında tutulmuş ve 0.45 µm membran filtreden süzöldükten sonra glutatyon miktarı doğrulanmış UPLC yöntemi ile araştırılmıştır.

Dermal matriks tartılmış ve dermal matriksin çapını değerlendirmek için dijital bir pusula kullanılmıştır.

3.2.8. Spesifik Yüzey Alanının Belirlenmesi (BET)

MP'lerin BET'e özgü yüzey alanı, bir porozimetre ASAP 2000 (Micromeritics, ABD) kullanılarak ölçüldü. Numunelerin analizden önce oda sıcaklığında 6 saat boyunca gazı giderildi. Adsorpsiyon ve desorpsiyon özellikleri 22°C'de 10 saat değerlendirildi.

Tablo 3. 2: GSH yüklü TDM'lerin spesifik yüzey alanı

	BET (m ² /g)	Langmuir (m ² /g)
TDM0	-	24.100 ± 1.41
TDM1	12.004 ± 1.027	27.971 ± 1.49
TDM2	-	-
TDM3	8.320 ± 0.208	15.731 ± 0.34

3.2.8.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Üretilen tüm nanofiberlerin morfolojik analizi taramalı elektron mikroskobu (SEM) (EVO LS 10, ZEISS) ile gerçekleştirildi. Çalışma koşulları 15 kV ve ikincil geri saçılmış elektron modu olarak belirlendi. Tüm örnekler iletkenliği sağlamak için altın-paladyum ile kaplandı çünkü polimerler bu özelliğe sahip değildi. Örneklerin morfolojik özellikleri, element analizi ve homojenliği EDX (Enerji Dağıtıcı X-Ray Spektrometresi) ile incelendi.

3.2.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Tüm örnekler, 450-4000 cm⁻¹ aralığında IR Affinity-1 kızılötesi spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum One) üzerinde Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile kimyasal olarak karakterize edildi ve KBr pelet yöntemi kullanılarak geçirgenlik modunda 4 cm⁻¹ çözünürlükte 32 tarama üzerinden ortalaması alındı. FTIR dedektörü TGS'dir.

3.2.10. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Elde edilen kompozit malzeme üç karakterizasyon yöntemi ile analiz edildi. Termogravimetrik analiz (TGA) ölçümleri biyomembranlar üzerinde 10°C/dk ısıtma hızında TGA Q500 kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.11. GSH Kapsülleme Verimliliği, Salım Kinetiği, Franz Hücresi Modelleme

Falcon tüpüne 10 mg GSH yerleştirildi ve 25 mL etanol ilave edildi. Bu tüpler 3 dakika vortekslendi ve daha sonra 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Berrak süpernatant alınmış ve 1:1 (v:v) oranında fosfat tamponlu salin (PBS) ile seyreltilti. Solüsyondaki GSH miktarı HPLC yöntemiyle ölçüldü. HPLC sistemi (Hewlett Packard-1100), 20 µL numune döngüsüne sahip C18 ters faz kolonundan (ACE 5-C18 250 mm x 4,6 mm) oluşmuştur. Mobil faz, 52:48:0.05 metanol:su:asetik asit (h:h:h) karışımı olarak belirlendi. Akış hızı ve UV dalga boyu sırasıyla 1 mL/dak ve 310 nm'ye ayarlandı. Zirve alanı, 0,1–20 µg/mL ($R^2 = 0,999$) aralığındaki GSH konsantrasyonlarıyla doğrusal olarak ilişkilidir.

Formülasyondaki GSH konsantrasyonunu belirlemek için her parti üç kez değerlendirildi. Kapsülleme verimliliğini (%EE) hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı; burada W_i , başlangıçtaki GSH miktarıdır ve W_d , belirlenen GSH miktarıdır.

$$EE \% = \frac{W_d}{W_i} \times 100 \quad (\text{Denklem 1})$$

3.2.12. *In vitro* Antibakteriyel Testler

TDM yapılarının mikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi için ASTM E2180-07, 2012 standardında belirlenen prosedür izlendi (Ciftci ve Özarslan, 2023). TDM'ler 3 x 3 cm'lik parçalara kesilerek steril petri kaplarının tabanına yerleştirildi ve bu deney her örnek ve her mikroorganizma için üç kez gerçekleştirildi. Antimikrobiyal aktivite *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 6538), *Candida albicans* (*C. albicans*, ATCC 10231)

üzerinde değerlendirildi. Standart olarak önerilen Soya Tripsin Agar (TSA) ve Beyin Kalp İnfüzyonu (BHI) kültür ortamları da test edildi.

3 adet numune, 300 mL NaCl Pepton % 1 tween 80 Solüsyonu içinde 10 dakika çalkalanmıştır. Karışımdan 100'er mL numune, maksimum 0,45 µm por çaplı membran filtreden süzülmüştür. Filtrasyon işleminden sonra filtre, ilgili besiyeri üzerine alınmıştır. Her çalışmada tek petri kullanılmış olup bakteriler için Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458) besiyeri kullanılmıştır. TSA (30-35°C) petrileri ilgili sıcaklıklarda 7 gün boyunca inkübe edilip 3. ve 7. günlerde değerlendirilmiştir. Bakteri sayıları 1. günden itibaren net bir şekilde gözlenmiş, 7. gün sonuçları 3. güne göre anlamlı bir şekilde farklılık göstermemiştir, bu nedenle %RSD hesaplamalarında 3. gün sonuçları kullanılmıştır. Küf-maya kolonileri 3. günden itibaren net bir şekilde gözlenmiştir, maya kolonileri için ise 7. gün sonuçları 3. güne göre anlamlı bir şekilde farklılık göstermemiştir ancak küf kolonilerinin 3. günde sayımı mümkünken 4. günden itibaren petriyi kaplamaya başladığı ve 7. günde sayımın mümkün olmadığı görülmüştür. Maya kolonileri için % RSD hesaplamalarında 7. gün sonuçları kullanılmış, küf kolonileri içinse %RSD hesaplamasında 7. gün sonuçları kullanılmıştır.

3.2.13. *In vitro* Hücre Çalışmaları

TDM Sitotoksitenin (EN ISO 10993-5) yanı sıra biyoaktif malzemeler üzerinde yürütülen iki hücre kültürü çalışması daha bulunmaktadır. Çünkü bu biyoaktif malzemeler GSH içeriği ile antioksidan etkiden sorumludur. İnsan dermal fibroblast hücreleri (Invitrogen C-OI3-5C), üreticinin talimatlarına uygun olarak, CO₂ ile nemlendirilmiş bir atmosferde 37⁰C'de takviye edilmiş besiyerler içinde kültürlenmiştir. Hücreler, 5x10³ hücre/cm yoğunlukta 25 cm'lik lamellere ekilmiştir ve tüm deneyler 2. ve 5. pasajlardaki hücrelerle gerçekleştirilmiştir.

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 5x10³ hücre/cm² yoğunlukta yerleştirilmiş ve yapışmalarını sağlamak için 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücreler GSH konsantrasyonlarına göre hesaplanan PBS içinde süspansiyonlar halinde 5.55, 16.66, 50 ve 150 µM formülasyonlar veya

GSH ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sadece araç, negatif (sadece ortam) ve pozitif (15 mM TritonX-100) kontroller de her deneye dahil edilmiştir. Ortam uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL ortam ve 20 µL MTT çözeltisi (PBS içinde 5 mg/mL) eklenmiştir. Bir 4 saat daha inkübasyondan sonra ortam uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Mor çözeltinin absorbansı, mikroparka okuyucuda 490 nm olarak ölçülmüştür. Canlılık, saf ortamdaki muamele edilmemiş hücrelere kıyasla yüzde olarak ifade edilmiştir. 90'dan büyük canlılık toksisite yokluğu olarak kabul edildi.

3.2.14. Sitotoksosite Deneyi

TDM formülasyonunun ve GSH sitotoksosite potansiyeli MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tahlili ile değerlendirildi. MTT reaktifi canlı hücrelerle inkübe edildiğinde koyu mavi formazan ürünü üreten sarı bir substrattır. Bu nedenle MTT' nin formazan oluşturacak şekilde azalma düzeyi hücre metabolizmasının düzeyini yansıtabilir.

Fare embriyonik fibroblast hücre çizgisi (NIH-3T3, ATCC), %10 fetal sığır serumu takviyeli DMEM ortamında kültürlendi. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 5×10^4 hücre/oyuk yoğunluğunda plakalandı ve hücre bağlanması için 18 saat boyunca %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C' de inkübe edildi. Daha sonra hücrelere farklı dozlarda MP formülasyonu veya GSH uygulandı ve hücreler 24 saat inkübe edildi. Tedavi edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, her bir hücre kültürünün ortamı, 0,2 mL tam ortam ile değiştirildi ve buna 0,02 mL MTT stok çözeltisi (5 mg/mL) ilave edildi. Hücreler 4 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi, ardından ortam çıkarıldı ve kültür, PBS ile yıkandı. Formazan kristallerini çözmek için 0.02 mL DMSO ilave edildi ve ardından 96 oyuklu bir plakaya aktarıldı. Formazan çözeltisinin absorbansı bir plaka okuyucuda (Thermo Varioskan Flash) 570 ve 650 nm'de ölçüldü. Muamele edilen numunelerin absorbansının absorbans kontrolüne oranı (%100 olarak alınmıştır) hücre canlılığı %'si olarak ifade edildi. Hücrenin hayatta kalması formazan absorbansının yüzdesi olarak

ifade edildi. Sonuçlar, üç kopya halinde en az üç farklı deneyden elde edilen ortalama + standart sapma (Ortalama \pm SD) şeklindedir.

3.2.15. ROS Tayini

Hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin tahmini, Srivastava ve arkadaşlarının standart protokolü izlenerek gerçekleştirildi. Kısaca, NIH-3T3 hücreleri, kuyucuk başına 10 hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve hücre bağlanması için 18 saat boyunca %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra hücreler 4 saat boyunca H₂O₂'ye (250 μ M) maruz bırakıldı. Bu sürenin sonunda ortam çıkarıldı ve hücreler, sırasıyla 0,05-2 mg/200 μ l ve 0,05-20 μ g/200 μ l konsantrasyon aralığında incelenmek üzere 24 saat boyunca MP formülasyonuna veya GSH'a maruz bırakıldı. Maruz bırakmanın ardından hücreler, 2,7-dikloro-dihidrofloresein-diasetat (DCFH-DA) (20 μ M) ile 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Reaksiyon karışımı daha sonra oyuk başına 200 μ l PBS ile değiştirildi. Plakalar, oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dakika boyunca çalkalayıcıda tutuldu ve floresans yoğunluğu, bir mikropilaya okuyucu (Thermo Varioskan Flash) üzerinde 485 nm (eksitasyon) ve 527 nm (emisyon) dalga boylarında ölçüldü. Aynı koşullar altında H₂O₂'ya (250 μ M) maruz kalan hücreler pozitif kontrol olarak görev yaptı. Muamele edilen numunelerin floresans yoğunluğunun absorbans pozitif kontrolüne oranı (%100 olarak alınmıştır) % hücre içi ROS olarak ifade edildi. Sonuçlar, üç kopya halinde en az üç farklı deneyden elde edilen Ortalama + Standart sapma (Ortalama SD) idir.

3.2.16. Oksidatif Stres Çalışmaları

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 25 x 10 hücre/cm² yoğunlukta yerleştirilmiş ve hücrelerin yapışmasını sağlamak için 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra kuyucuklara 50 μ M formülasyon veya PBS'de süspansiyon halinde GSH (GSH konsantrasyonlarına göre hesaplanmıştır) eklenmiş ve hücreler 24 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra numuneleri içeren ortam uzaklaştırılmış, hücreler tripsinize edilmiş ve 200 \times g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra toplanmıştır. Total glutatyon (GSH), oksitlenmiş glutatyon (GSSG), glutatyon peroksidaz (GPx), malondialdehit (MDA), süperoksit

dismutaz (SOD) lizatlarda kitler (Bioxytech, Oxis Research, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Hücre peletleri analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.17. İstatiksel Veriler

Tüm istatistiksel analizler, $p < 0.05$ olarak belirtilen 0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PI'lerin sitotoksitesi arasındaki farklar, Unpaired t testi veya Bonferroni veya Dunnet düzeltmeleri ile tek yönlü Anova testleri kullanılarak belirlenmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR

4.1. TDM' DEKİ GSH İÇERİK ANALİZİ

Daha önceden sunulan toplu üretim prosesi talimatlarına göre, her bir TDM ünitesi başına 0,05 mg'lık hedeflenen konsantrasyona ulaşmak için dağıtmak üzere 0,2 mg GSH gereklidir. Bu fazla miktarda GSH, GSH'ın çeşitli fiziksel ve kimyasal koşullara duyarlılığı nedeniyle meydana gelen süreç kaynaklı kayıpların telafisi için kullanıldı. GSH, hücre içi redoks dengesinin korunmasında önemli bir rol oynayan düşük molekül ağırlıklı bir tiyol-tripeptiddir. Geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip stilbenler araştırılmıştır. Bu bileşiğin, serbest radikalleri temizleme gibi kimyasal özellikleri veya belirli bir biyolojik sistemdeki dolaylı etkileri nedeniyle cilt için olağanüstü faydalara sahip olduğu görülmüştür. GSH serbest radikal hasarına karşı güçlü bir antioksidandır. Proteaz enzimlerinden koruyarak, fibroblastların fonksiyonunu ve kolajen sentezini artırarak dermiste hücre çoğalmasını uyarır. Bununla birlikte, GSH' ın UV ışığı, pH ve iyonlaştırıcı radyasyon dahil sıcaklık gibi çeşitli bireysel faktörlere duyarlılığı, arzu edilen ürün halinde işlenirken GSH içeriğinde önemli kayıplara neden olur. GSH içeriğindeki ilgili kayıp esas olarak termal bozunma mekanizmaları dahil oksidatif, pH' a bağlı hidrolitik, fotolitik, radyoliz gibi çeşitli bozunma yollarına atfedilir.

GSH' ın yukarıda sıralanan faktörlere karşı hassasiyeti nedeniyle, GSH içeren ürünlerin işlenmesi, arzu edilen ürüne dönüştürülmesi ve işlenmesi sırasında formülasyon bilimcisi için sıklıkla zorluklar oluşturur. Yukarıdakiler göz önüne alındığında, üründe hedeflenen içeriğin elde edilmesi için, üretim sürecinde prosesten kaynaklanan kayıpların telafisi için fazla miktarda GSH kullanılması tavsiye edilir.

GSH, TD' de antioksidan olarak kullanılır. Antioksidan olduğundan, içeriğinin piyasaya sürülmesi sırasında ve raf ömrü boyunca izlenmesi gerekir. Prototip geliştirme çalışmaları sırasında kazanılan deneyime dayanarak, prosten kaynaklanan kayıpları telafi etmek ve her TD ünitesinde hedeflenen 0,05 mg miktarına ulaşmak için başlangıç miktarı olarak 0,2 mg dağıtılmasının gerekli olduğu gözlemlendi.

TDM' nin üretim süreci aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli işlem adımlarını içerdiğinden fazla miktarın kullanılması gerekmektedir;

1. Etanol gibi işleme solventleri, Dipalmitoil Fosfatidil Kolin ve Sodyum hiyaluronat gibi solüsyondaki diğer bileşenleri içeren saf ve saf su kullanılarak pH' ı 8.45'e kadar olan GSH solüsyonunun hazırlanması.

Yayımlanan çeşitli araştırma makalelerine dayanarak GSH' ın ağırlıklı olarak düşük pH koşullarına karşı stabil olduğu gösterilmiştir. Ancak çözeltide SH'ın varlığı pH'ın daha yüksek tarafa doğru çıkmasına neden olmuştur ve bu durum aslında GSH için stresli bir durum olarak değerlendirilmiştir.

2. GSH biyoaktif ajanların hazırlanması için püskürtmeli kurutma işleminin kullanılması. Püskürterek kurutma işlemi sürekli bir işlemdir; GSH çözeltisinin sıcak kurutma gazı içinde çok küçük damlacıklar halinde atomize edilmesini ve damlacıkların katı MP'ler halinde hızla kurumasını sağlar. Bu MP' ler daha sonra spreyle kurutulmuş son GSH MP' leri olarak bir siklon kullanılarak kurutma gazından ayrılır. MP' lerdeki nem seviyesi, partikül morfolojisi veya boyutu ve toz yoğunluğu gibi özellikler, hedef seviyelere büyük ölçüde manipüle edilebilir.

Bununla birlikte, kurutma işlemi sırasında atmosferik gaz varlığında daha yüksek sıcaklığın (180°C) kullanılması GSH için sıklıkla aşırı stresli koşullar oluşturur. GSH' ın oksidasyona ve sıcaklığa duyarlılığı çeşitli bilimsel temelli çalışmalarla ciddi bir şekilde ortaya konmuştur. Ancak GSH' ın mikropartiküller halinde sunulabilmesi için spreyle kurutma işleminin zorunlu olarak kullanılması gerekiyordu.

3. TD' nin sterilizasyon sürecinden geçmesi gerektiğinden, ürün özelliklerinin doğasına bağlı olarak, gama ışınlanması (15,8 kGy'de) kullanılarak terminal sterilizasyonu sonlandırıldı. Bununla birlikte, gama ışınlanması sırasında GSH' ın

serbest radikal iyonlarına (radyoliz) duyarlılığı iyice belirlenmiş ve çeşitli araştırma makalelerinde yayınlanmıştır.

Suyun iyonlaştırıcı radyasyonla radyolizi, radyasyonun dolaylı etkisiyle GSH'a saldırabilecek önemli miktarlarda oksitleyici türlerin üretilmesiyle sonuçlanabilir. Prototip çalışmaları sırasında elde edilen verilere dayanarak TDM'de GSH'ın en büyük işlem kaybının sterilizasyon işlemi aşamasında olduğu gözlemlendi.

4. Yukarıdakilere ek olarak, TDM'deki GSH' ın diğer işlem kayıpları, GSH'ın foto duyarlılığına ve mikropartiküllerin 3B' li dermal matrikse fiziksel yollarla eklenmesi sırasında GSH MP' lerinin kaybına bağlanır.

4.2. GSH'IN STABİLİTESİNİ ETKİLEYEN PARAMETRELER

4.2.1. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık artışına neden olacak şekilde GSH' a 20 dakika maruz bırakıldığında bozunmanın boyutu; 125°C'de %17, 150°C'de %39, 175°C'de %70, TD 180°C olur.

4.2.2. UV Işığının Etkisi

GSH, UV ışığına maruz bırakıldığında izomerizasyon meydana gelir. TD, UV' ye maruz kalmaz.

4.2.3. pH' ın Etkisi

pH aralığında GSH bozulması;

pH 1,2–7,4: Bozunma 1. dereceden kinetiğe göre gerçekleşir ve günlerce stabilite görülür. pH 8,0' de iken bozunma 1. dereceden kinetiğe uygundur ve saatlerce stabilite görülmüştür. pH 9.0' da iken bozunma sıfır ve 1. derece kinetiğe göre gerçekleşip 24 dakikadan kısa sürede bozulmuştur. pH 10,0'da iken bozunma sıfır dereceli kinetiğe göre gerçekleşip 9 dakikadan kısa sürede bozulmuştur ve TD' nin GSH solüsyon pH' ı 8,45' tir.

4.2.4. Oksijen Etkisi

Reaksiyon koşullarına bağlı olarak GSH, yarı kinonlar ve nispeten stabil 4'-fenoksiradikal oluşturmak üzere (otomatik) oksitlenebilir; son olarak bu oksidasyon süreci reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açabilir.

Polifenollerin oksidatif reaksiyonları değişen pH' dan, özellikle de hidroksil anyonlarının veya organik bazların varlığından etkilenir. Ayrıca metal iyonları (örn. Demir II iyonları) Fenton reaksiyonu yoluyla oksidatif reaksiyonları ve radikal oluşumunu kolaylaştırır. TD' deki GSH çözeltisi, arıtılmış sudaki metal iyonu safsızlıklarından kaynaklanan katalitik bozunmayı önlemek için herhangi bir kenetleme maddesi içermez.

4.2.5. Gama Sterilizasyonunun Etkisi

Sulu çözeltide gama radyasyonuna maruz kalmak, aktif bileşiğin aktivitesini değiştiren istenmeyen hidroliz reaksiyonlarına neden olabilir. Suyun iyonlaştırıcı radyasyonla radyolizi, radyasyonun dolaylı etkisiyle GSH' a saldırabilecek önemli miktarlarda oksitleyici türlerin üretilmesiyle sonuçlanabilir. Ana bozunma ürününün muhtemelen 3,5-dihidroksi benzoik asit olması muhtemeldir. GSH'ın bozunma ürünleri olarak ayrıca bir Aldehit ve Karboksilik asit karışımı oluşur.

4.3. UV-ÇAPRAZ BAĞLAMA YÖNTEM TASARIMI VE HESAPLANMASI

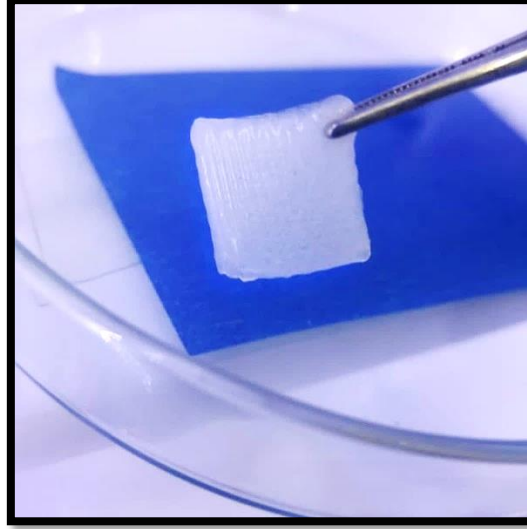
KOL, en umut verici malzeme olarak bilinmekte ve mükemmel biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu sayesinde doku mühendisliğinde çeşitli uygulamalarla karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, işlenmemiş KOL iskelesinin düşük mekanik mukavemeti çok önemli bir sorundur. KOL bazlı iskelelerin çapraz bağlanması, mekanik özelliği optimize etmek için etkili bir yöntemdir.

KOL' e çapraz bağlanma tedavisi, kolajen bazlı iskeleler için en önemli konulardan biri haline geldi. Şu anda KOL bazlı yapı iskelelerinin özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılan iki farklı türde çapraz bağlama yöntemi vardır. Bunlar kimyasal ve fiziksel yöntemlerdir. Çapraz bağlama; glutaraldehit, formaldehit, tripolifosfat, karbodiimid vb. gibi maddelerle kimyasal olarak gerçekleştirilebilir. Fiziksel yöntemler arasında foto oksidasyon, dehidrotermal işlemler (DHT) ve

ultraviyole ışınımı yer alır; bunlar potansiyel sitotoksik kimyasal kalıntıların ortaya çıkmasını önleyebilir ve mükemmel etkiyi sürdürebilir. KOL çapraz bağlamaya yönelik UV gibi fiziksel yöntemler, çapraz bağlama sırasında malzemeye toksik maddeler almaz. Bu nedenle çapraz bağlama yöntemi olarak UV çapraz bağlama seçilmiştir.

4.4. UV-ÇAPRAZ BAĞLANMASI

TDM' nin üretim sürecinde; KOL-LM-Jel çözeltisi donduruldu ve bir liyofilizatör kullanılarak dondurarak kurutma gerçekleştirildi. Elde edilen liyofilizatlar bir UV kabini Biosan UVC/T UV çapraz bağlayıcıda çapraz bağlandı. $\lambda=254$ nm ile UV ışınlanması; $t=3$ saat, dermal matrisin çapraz bağlanması için 15 mW/cm²/sn yoğunluk kullanıldı. Verilen toplam enerji 162 Joule/cm²'dir.



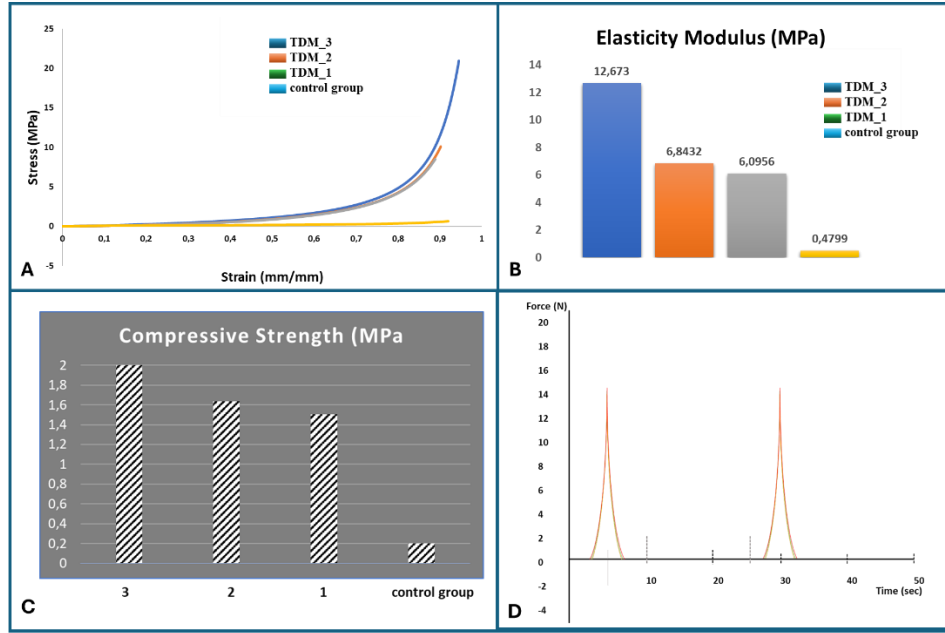
Şekil 4. 1: UV çapraz bağlama ile üretilen TDM gösterimi

4.5. DOKU PROFİLİ ANALİZİ (TPA) ve MEKANİK TESTLER

Doku profili analizi (TPA), dokuda 500 g yük hücresiyle donatılmış yazılım kontrollü bir penetrometre (TA-TX Plus, Stable Micro Systems, Godalming, UK) kullanılarak UV çapraz bağlamadan önce ve TDM sonrasında dermal matrisler üzerinde gerçekleştirildi. Analitik bir prop (10 mm çapında), cam şişelerdeki

formülasyonlara, tanımlanmış bir hızda (2 mm s^{-1}) tanımlanmış bir derinliğe (15 mm) kadar iki kez sıkıştırıldı ve bu işlemin sonu arasında bir gecikme süresine (15 s) izin verildi. Mekanik parametreler (sertlik, sıkıştırılabilirlik, yapışkanlık ve elastikiyet), sonuçta ortaya çıkan kuvvet-zaman eğrisinden ($n = 6$) elde edildi.

Mekanik mukavemet, TPA vasıtasıyla çapraz bağlamadan önce ve sonra değerlendirildi. Mekanik özellikler, UV çapraz bağlama işlemi olmadan TPA cihazının tespit limitinin altındaydı. Şekil 4.2.D’ de görüldüğü üzere Biosan UVC/T ile çapraz bağlanma sonrasında dermal matrislerden elde edilen mekanik özellikler sertlik için $14,6 \pm 2,0 \text{ g}$, sıkıştırılabilirlik için $12,8 \pm 2,8 \text{ g x mm}$, yapışkanlık için $0,92 \pm 0,07$ ve elastikiyet için $0,57 \pm 0,04$ idi.



Şekil 4. 2: UV çapraz bağlama sonrasında TDM' nin A. Gerilme-gerinim B. Elastikiyet modülü, C. Basınç dayanımı ve D. Doku Profili Analiz grafiği

4.6. DİNAMİK BUHAR SORPSİYONU (DVS) ANALİZİ

TDM' nin ana bileşenleri 3B matris (KOL/Jel/LM ‘den yapılmış) ve 3B matrisin yüzeyine/yapısına yüklenen MP’ lerdir (MP; NaHyaluronat, AVO ve GSH’ dan yapılmıştır). Hyaluronidaz ve kollajenaz enzimlerinin varlığında TDM bozunma davranışının anlaşılması önemlidir, çünkü bozunma süresi iyileşme sürecini

desteklemelidir. Bu nedenle, 3B matrisin (KOL/Jel/LM 'den yapılmış) ve TDM' nin (MP yüklü 3B matris) enzimatik bozunma çalışmaları, hyaluronidaz ve kolajenaz enzimlerinin varlığında şişelerde gerçekleştirildi.

İlk aşamada Hiyalüronidaz, 10 birim/mL'lik bir konsantrasyon elde etmek için pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) ve 3:1 oranında (h:h) fetal sıgır serumundan oluşan bir karışım içerisinde çözündürüldü. Kolajenaz, 28 birim/mL'lik bir konsantrasyon verecek şekilde pH 7.4 PBS içerisinde çözüldü. Bu karışımlar, enzimlerin aktif kalması için ayrı ayrı $37 \pm 0,5$ °C'de inkübe edildi ve manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Sonraki aşamada enzim çözeltilerine ayrı ayrı 3B matris (Kolajen/Jelatin/Laminin 'den yapılmış) ve TDM (MP yüklü 3B matris) ilave edildi ve bozunma süresi, $37 \pm 0,5$ °C'deki bir inkübatörde 6 saat boyunca görsel olarak gözlemlendi.

Bozunma süresi deney başına üç numune için belirlendi. Sonuç olarak in vitro koşullarda enzimlerin numuneleri parçaladığı görüldü. 3B matris (KOL/Jel/LM 'den yapılmış) 30 dakikada ölçülen her numune için bozundu. TDM (MP yüklü 3B matris) bozunma süresi yaklaşık olarak 2 saate kadar sürdü.

KOL parçalanma ürünleri fibroblast, keratinosit ve vasküler endotelial hücre proliferasyonunu uyarır. GSH' ın cilt fibroblast proliferasyonu üzerindeki önemli etkisinin yanı sıra anti-kollajenaz aktivitesine de sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında, GSH ilavesinin sadece yara iyileşmesine katkıda bulunmadığını, aynı zamanda ikincil bir avantaj olarak matris bütünlüğünü uzun süre korumak için kollajenaza karşı etki ettiğini ortaya çıkardı.

KOL, memelilerdeki birçok bağ dokusunun hücre dışı matrislerinde bulunan temel yapısal proteinlerden biridir ve tüm vücut protein içeriğinin yaklaşık %25 ile %35'ini oluşturur. KOL çoğunlukla tendonlar, bağlar ve deri gibi fibröz dokularda (toplam vücut kolajenin yaklaşık yarısı) bulunur ve ayrıca kornealarda, kıkırdaklarda, kemiklerde, kan damarlarında, bağırsaklarda ve omurlar arası disklerde de bol miktarda bulunur. Kas dokusunun %1 ile %2'sini oluşturur ve güçlü tendinöz kas ağırlığının %6'sını oluşturur.

KOL birincil yapısı, cins ve komşu aile soyu boyunca güçlü bir sekans homolojisi gösterir, dolayısıyla KOL' ün ayırt edici bir özelliği, KOL alt birimlerinin üç zincirinin her birinde amino asitlerin düzenli düzenlenmesidir. Amino asit dizisi, tekrarlayan bir glisin (Gly)-prolin (Pro)-X veya Gly-X-hidroksiprolin (Hyp) birimi ile karakterize edilir; burada Gly, dizinin 1/3'ünü oluştururken, X ve Y, diğer çeşitli amino asit kalıntılarından herhangi biri olabilir. Bununla birlikte, X konumu neredeyse yalnızca Pro tarafından işgal edilirken Hyp ağırlıklı olarak Y konumunda bulunur ve her ikisi de toplam dizinin yaklaşık 1/6'sını oluşturur. Bu tür düzenli tekrar ve yüksek Gly içeriği, ipek fibroin ve elastin gibi yalnızca birkaç başka lifli proteinde bulunur, ancak küresel proteinlerde asla bulunmaz. Böylece KOL' ün süper sarmalı, komşu zincirlerde yer alan Gly ve Pro arasındaki hidrojen bağları ve çeşitli karbonil ve hidroksil peptid kalıntıları arasında hidrojen bağları oluşturabilen geniş bir su ağı ile stabilize edilir.

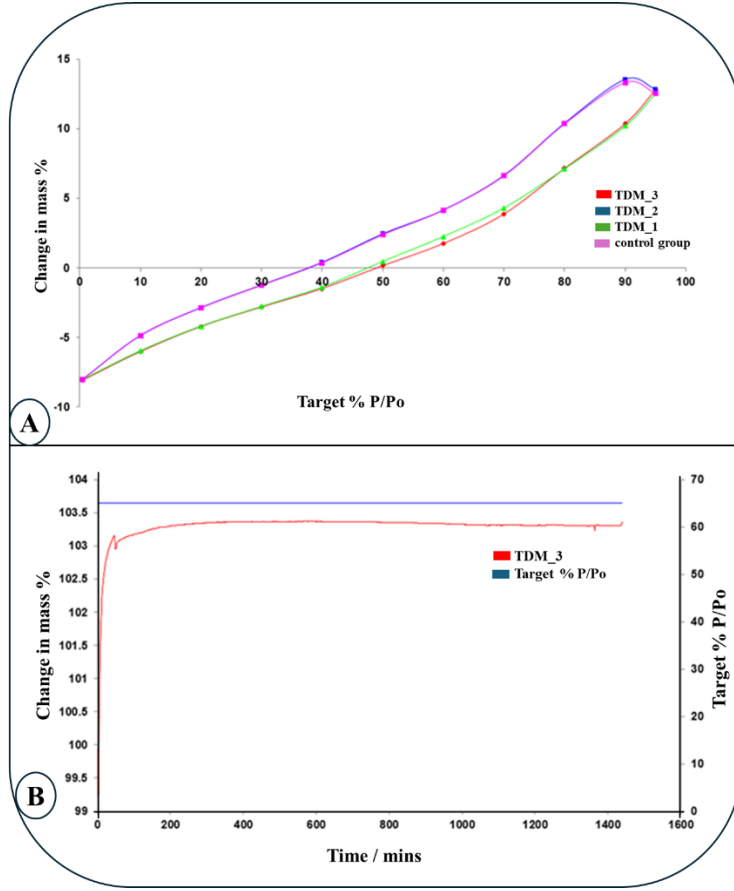
Jel, KOL'ün kaynağına ve KOL' den geri kazanım üretim prosesinin yöntemine bağlı olarak çeşitli moleküler ağırlıklara (MA'lar) ve izoionik noktalara (IEP'ler) sahip çözünmeyen kolajenin termal denatürasyonunun veya parçalanmasının ürünüdür. KOL birçok farklı formda mevcuttur ancak Jel, genellikle Cys içermeyen Tip 1 kolajen açısından zengin kaynaklardan elde edilir. Jel üretimi için kullanılan KOL, sığır ve domuz Jel' lerinin daha yaygın olarak kullanıldığı farklı kaynaklardan olabilir. Balık derileri, kemikleri ve yüzgeçleri, denizkestanesi, denizanası ve Encephalopat'tan gelen kuş ayakları gibi Jel üretimi için alternatif KOL kaynakları son on yılda araştırılmıştır. Bununla birlikte, amino asit bileşimleri, farklı kaynaklardan elde edilen tüm Jel türleri arasında biraz farklıdır. Domuz derisi Jel'i ve kemik Jel' lerinden elde edilen amino asitler Cys içermez, bunun yerine balık pulu ve kemik jeli içerir; bu da memeli kaynaklarıyla karşılaştırıldığında daha az Gly içeriğine sahiptir. Domuz derisinden elde edilen Jel haricinde diğer jelatinlerin hiçbiri aspartik asit (Asp) ve glutamik asit (Glu) içermez.

Jel için farmakope spesifikasyonları, su içeriği (kurutma kaybı yoluyla) sınırının %15,0'dan fazla olmadığını göstermektedir. Genel olarak Jel, %9-11 nem içeriğine sahiptir. Buna ek olarak; KOL, stabilizasyon için komşu zincirlerde bulunan Gly ve Pro arasında hidrojen bağlarına ihtiyaç duyar ve bu, kapsamlı bir su ağıyla

başarılabilir. Bahsi geçen yayınlar ışığında; T, Kolajen/Jelatin iskelelerin dermal matrisi, iskele yapısını oluşturmak, çapraz bağlanmak ve 3B matris formunu korumak için önemli miktarda sudan oluşacaktır. Öyleyse; TD' nin KOL/Jel matrisi üretiminin ana prosesi olan liyofilizasyon işleminden sonra ~%10-%20 su miktarına sahip KOL/Jel matrisi doğuracak şekilde tasarlanmıştır. TD' de kimyasal ve yapısal olarak stabil KOL/Jel iskelesinin olması için su içeriği limiti %20' yi geçmeyecek şekilde belirlendi.

TDM yara örtüsü hem dermal matristen hem de MP' lerden oluşur. MP' ler, GSH, SH ve DPPC' nin bir etanol/su karışımı içinde çözülmesi ve elde edilen karışımın püskürtülerek kurutulmasıyla üretilir. MP' ler daha sonra TD' yi oluşturmak için dermal matris üzerine eklendi. Ürün kararlılığı hem dermal matrisin hem de MP' lerin su içeriği dikkate alındığında stabil bir ürün elde edebilmek için TD tıbbi cihazının su içeriğinin salınım limiti %20' yi geçmeyecek şekilde belirlenmiştir.

TDM' nin ürünün raf ömrü için su içeriği limiti sağlamak amacıyla TDM üzerinde Dinamik Buhar Sorpsiyonu (DVS) analizi yapılmıştır. Şekil 4.3 'te TDM' nin buhar emme ve desorpsiyon eğilimi verilmiştir.



Şekil 4. 3: A. TDM buhar emilimi ve desorpsiyon eğilimi, B. %65 rH sisteminde 25°C'de TDM buhar emilimi (Dinamik Buhar Sorpsiyonu (DVS) analizi)

TDM Şekil 4.3.A 'daki grafikten de anlaşılacağı gibi havadan %5 (w/w)'den daha az buhar absorbe edebilmektedir. Buna ek olarak; buhar emme seviyelerini detaylı olarak görebilmek için TDM %65 rH sisteminde 25°C koşullarında 24 saat bekletildi. Şekil 4.3.B 'deki TDM' nin %65 rH sisteminde 25°C' de buhar emilimi verilmiştir.

Böylece; DVS analizinden elde edilen veriler ve yukarıda belirtilen Türkiye'nin iklim koşulları ve TDM 'nin su içeriğinin %20' i aşmayan salınım limiti hakkındaki bilgiler esas alınarak, su içeriğinin raf ömrü sınırının belirlenmesine karar verilmiştir. TD oranı %25'ten fazla olmamalıdır.

Özetle; TDM' nin su içeriği limitleri aşağıdaki gibidir:

- Liyofilize dermal matris için su içeriği limiti = %20'den fazla değil (a/a)
- TDM için su içeriği sınırı (Salım sınırı) = %20'den fazla değil (a/a)

- TDM için su içeriği sınırı (Raf ömrü sınırı) = %25'ten fazla değil (a/a)

4.7. PARÇACIK BOYUTU VE STABİLİTE TESTİ

Tablo 4.1'de TDM'lerin stabilite çalışmalarının sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar GSH miktarının ve partikül boyutunun 1, 3, 6 ve 12. aylarda değişmediğini göstermiştir.

Stabilite kabinlerinde $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de (bağıl nem %60) sonuçların görüldüğü üzere 12 ay depolandıktan sonra, dermal matriks örneklerinin fiziksel görünümü, ağırlığı ve boyutlarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. ICH tarafından önerildiği gibi stabilite çalışmaları aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

A. Uzun Vadeli İstikrar; $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60 \pm \%5$ bağıl nem

B. Orta Düzey Kararlılık; $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65 \pm \%5$ bağıl nem

İki validasyon serisinin (7181711P1 ve 7181801P2) 3 aylık stabilite sonuçları aşağıdaki kısımlarda sunulmaktadır. TDM'nin raf ömrü spesifikasyonlarında yer alan görünüm, su içeriği, GSH tahlili, sızıntı testi, mekanik dayanım ve sterilite testleri sonuçlarına göre uzun dönem ve orta stabilite koşullarında 3 ay limitlerini karşılamaktadır

Yöntem olarak MP'lerin parçacık boyutunu ölçmek için Malvern mastersize (Malvera, İngiltere) kullanıldı. MP'ler damıtılmış su içinde süspanse edildi ve boyutu hemen ölçüldü. 10 mg MP'ler etanol-su (1:1) ile karıştırıldı ve 3 dakika boyunca vortekslendi. Karışım gece boyunca çalkalayıcı altında tutuldu ve 0.45 µm membran filtreden süzöldükten sonra GSH miktarı, valide edilmiş UPLC yöntemiyle belirlendi. Dermal matris ağırlıklandırıldı ve dermal matrisin çapını değerlendirmek için dijital bir pusula kullanıldı.

Tablo 4. 1: Oda sıcaklığında mikropartiküllerin stabilite çalışmasının sonuçları

Formülasyon	Süre (ay)	Parçacık boyutu (µm)	GSH miktarı (mg)

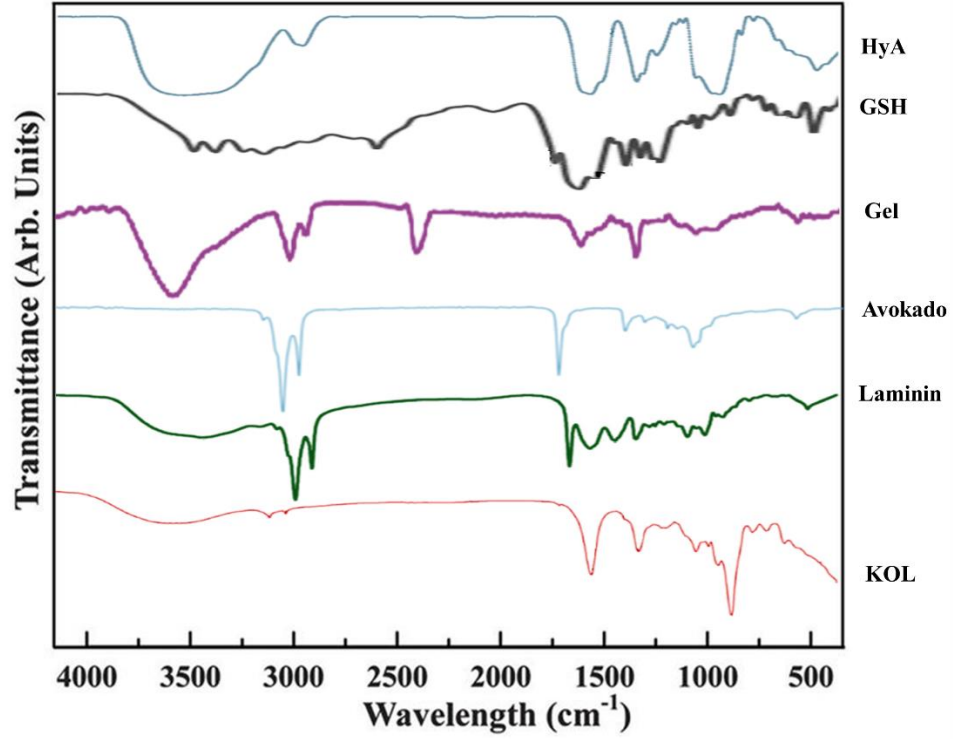
TDM_0	0	27,33±0,30	
	1	20,34±0,12
	3	19,86±0,21
	6	18,44±0,16
	12	20,25±0,23
TDM_1	0	30,25±0,30	0,98 mg
	1	31,18±1,49	0,97 mg
	3	33,28±2,56	0,96 mg
	6	36,35±4,08	0,97 mg
	12	34,56±4,22	0,97 mg
TDM_2	0	27,33±0,30	
	1	31,07±0,76
	3	33,21±0,82
	6	34,37±1,56
	12	33,56±1,83
TDM_3	0	30,25±0,30	0,98 mg
	1	44,67±1,22	0,99 mg
	3	45,44±2,05	0,99 mg
	6	47,12±1,85	0,97 mg

	12	45,68±3,15	0,96 mg
--	----	------------	---------

4.8. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZİLÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR) ANALİZİ

Kullanılan malzemelerin birbiriyle olan fonksiyonel yapısı Fourier transform infrared spektrumları (FTIR) kullanılarak doğrulanmıştır. FTIR spektrumları, absorpsiyon piklerinin sırasıyla C=O, N-H ve C-N'nin karakteristik absorpsiyon pikleri olan 1634 cm⁻¹ (amid I), 1541 cm⁻¹ (amid II) ve 1232 cm⁻¹'de (amid III) ortaya çıktığını göstermiştir (Nashchekina vd., 2023; Sionkowska vd., 2020; Y. Wang vd., 2022). HA'nın tipik absorpsiyon pikleri, COO-'nun antisimetrik gerilme titreşimine ve simetrik gerilme titreşimine atfedilen 1599 cm⁻¹ ve 1401 cm⁻¹'de ortaya çıkmıştır. KOL ve HyA'da yeni pikler ortaya çıkmamasına rağmen, amid I ve amid II (kolajende 1634 cm⁻¹ ve 1541 cm⁻¹) sırasıyla düşük dalga sayılarına (1624 cm⁻¹ ve 1539 cm⁻¹) kaymıştır. HyA'daki karboksilik gruplar ile KOL'daki amin grupları arasındaki etkileşimler, karboksilik grupların karakteristik absorpsiyon bandının (1599 cm⁻¹) TDM_2 ve TDM_3'te 1624 cm⁻¹'e kaymasına yol açmıştır, bu da KOL amid I'i ile HyA'nın karbonil grupları arasındaki etkileşime bağlanmaktadır (Bakoš vd., 1999; Bavaresco vd., 2020; Liang vd., 2023; Xu vd., 2021). FTIR spektrumlarındaki bu değişiklikler, HyA'nın uygulanabilir yöntemle KOL ile başarılı bir şekilde birleştirildiğini göstermiştir

GSH, FTIR spektrumları; 3550-3240 cm⁻¹ bölgesindeki geniş absorpsiyon bandı -OH, H₂O ve -NH germe titreşimlerine atfedilmektedir. GSH için 2526 cm⁻¹'de zirve yapan absorpsiyon bandı, GSH'nin HyA'da için spektrumda kaybolan ν (SH) germe modundan kaynaklanmaktadır, bu da tiyol grubunun deprotonasyonunu ve GSH'ye bağlanmasını göstermektedir (Kuroi vd., 2022). GSH'de 1718 cm⁻¹'de gözlenen pik, glisin resi-due'nin -COOH grubunun C=O stretching titreşimine atanmıştır. 1537 ve 1398 cm⁻¹'deki pikler, GSH'nin TDM_1 ve TDM_2 TDM_2 ve TDM_4'te 1414-1256 cm⁻¹'e kayan -COO- titreşiminin simetrik ve asimetrik germe modlarına atfedilir ve bu da GSH'nin TDM'lere bağlandığını doğrular (Orłowska vd., 2023; Raza vd., 2023; Zeng vd., 2022).



Şekil 4.4: TDM doku iskeleleri içinde kullanılan malzemelerin FTIR analizi

Tablo 4.2: GSH katkılı TDM doku iskelerin fonksiyonel bağ yapıları

GSH katkılı TDM doku iskelesi	Fonksiyonel bağ yapıları
	C=O stretching of GSH
	C=O stretching of GSH
1148	C–O stretching of GSH
1105	C–O stretching of GSH
780	C–S stretching of GSH
	C–Cl stretching
637	C–S stretching of GSH
547	C–S stretching of GSH

TDM_2 ve TDM_3'te modifiye edilmiş Laminin numunenin sonuçları: 1,240-1,170 cm^{-1} 'deki gerilme bandının -- C -- O -- C -- grubuyla ilişkili olduğu ve 2,800-2,900 cm^{-1} 'deki gerilme bandının -- CH_2 gruplarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Spektrum, 1,650 cm^{-1} 'deki güçlü bandın C ==O grubuyla ilişkili olduğunu ve 2,800-2,900 cm^{-1} 'deki gerilme bantlarının -- CH_2 gruplarıyla ilişkili olduğunu

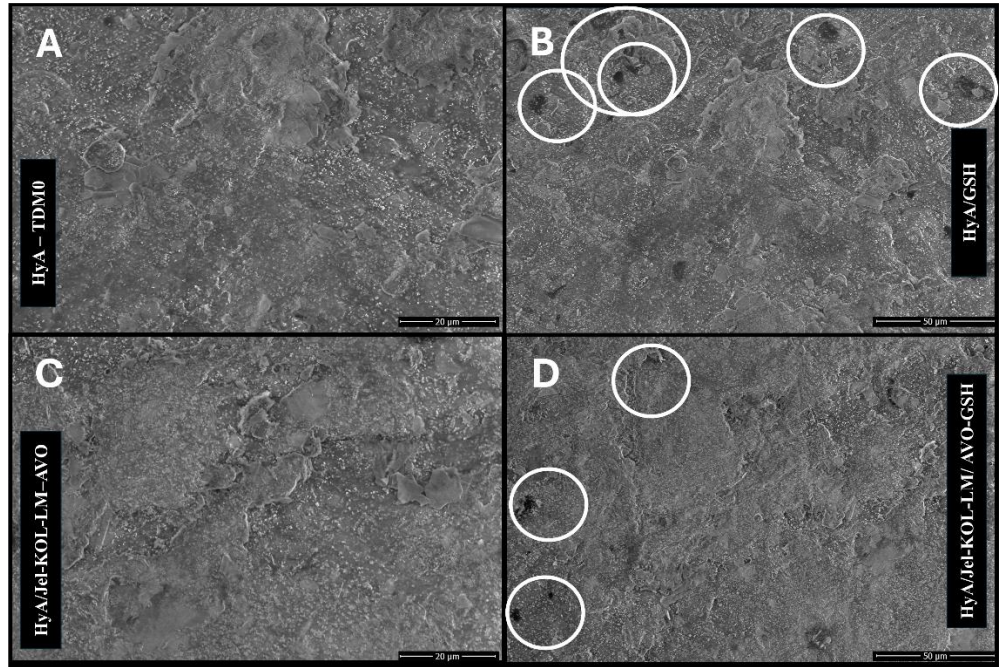
göstermektedir. 3,431 cm^{-1} 'deki gerilme bandı OH grubu ile ilgilidir. Ayrıca 1,722 cm^{-1} 'deki güçlü bandın C=O grubu ile ilişkili olduğunu ve 2,800-2,900 cm^{-1} 'deki gerilme bandının --CH₂ grupları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Laminin muamelesinin etkisiyle 3,408 cm^{-1} 'deki ve 3,761 cm^{-1} 'deki gerilme bantları OH ve NH gruplarıyla ilişkilidir (Chen vd., 2018; Pidhatika vd., 2019; Sahebalzamani vd., 2015).

AVO için FTIR spektrumları: sırasıyla -c-CO-c gerilmesi (aromatikler), C=C gerilmesi (Alkenler) ve C=H gerilmesi (Alkanlar) fonksiyonel gruplarına (belirtilen bileşikler) karşılık gelen 1253 cm^{-1} , 1623 cm^{-1} ve 2911 cm^{-1} bölgelerindeki pikleri sergilemektedir. 1758 cm^{-1} 'deki pik, bitki ekstraktındaki fitokimyasalların ve amino asitlerin varlığını gösteren C=O bağ gerilmesine karşılık gelmektedir (Alemu vd., 2022; Arpi vd., 2023; Quiñones-Islas vd., 2013). 3443 cm^{-1} de gözlenen geniş tepe noktası polifenollere karşılık gelmektedir. 602 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 1409 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 2361 cm^{-1} ve 2938 cm^{-1} 'deki bantlar alkil halojenürler, alkanlar, sülfonamidler, sülfonil klorürler ve ester gibi biyoaktif bileşikler göstermektedir (Castro-García vd., 2022; Cervantes-Paz vd., 2023; Foudjo vd., 2013). FTIR sonuçları, AVO'nun çoklu biyolojik uygulamalar için daha iyi ajanlar olarak hareket eden esnek fonksiyonel grupların varlığını göstermiştir

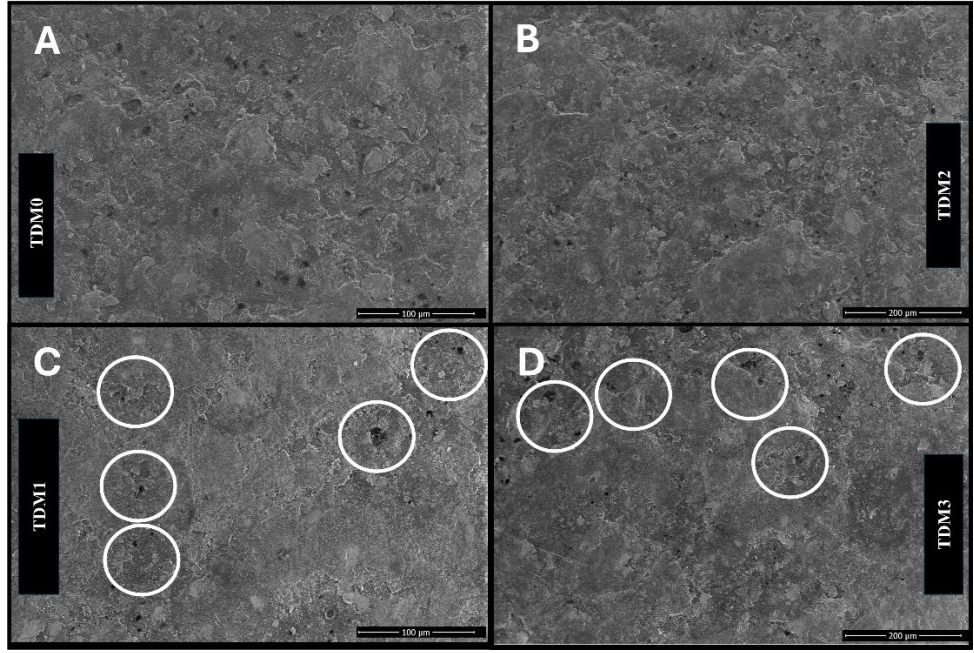
FTIR, moleküler yapının incelenmesinde önem taşımaktadır. Çevresel değişiklikler ve makromoleküllerin konformasyonu, spektrum bantlarının yoğunluğu ve genişliğinin yanı sıra piklerin düzeninde de değişikliklere yol açar. Saf JEL'in FTIR spektrumu 3450 ve 3423 cm^{-1} 'deki piklerin ikincil amidin N-H gerilmesine, 1680 ve 1640 cm^{-1} 'deki C=O gerilmesine, 1550 ve 1500 cm^{-1} arasındaki N-H bükülmesine, 670 cm^{-1} 'deki N-H düzlem dışı sallanmasına ve 922 ve 2850 cm^{-1} 'deki C-H gerilmesine bağlı olduğunu göstermiştir (Cebi vd., 2019; Derkach vd., 2020; Srinivasa Rao vd., 2022). KOL kıvrımının 3360 cm^{-1} 'deki karakteristik piki spektrumda yoktur, bu da JEL üretmek için KOL denatürasyonunu gösterir. Öte yandan, JEL katkılı TDM_3 ve TDM_4 doku iskeleleri FTIR spektrumunda 1700 ile 1800 cm^{-1} arasında değişen karakteristik bir pikin geliştiği ve bunun polimerik birleşim ile bir hidroksil grubunun ve ikincil bir amidin varlığını gösterdiği tespit edilmiştir.

4.9. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM)

TDM doku iskeleleri, hidrojel tasarımları ve çapraz bağlama olmuş TDM yapıları olarak iki farklı SEM yüzey morfolojisine tabi tutulmuştur. Yüzey morfolojik yapılarında GSH biyoaktif parçacıkları gösterilmiştir. Herhangi bir boncuklanma gözlenmemiştir. Elde edilen görüntüler düz bir yüzey göstermiştir. Bunun nedeni, hazırlanan HyA bazlı membran yapılarının matris bileşiminin iç yapıları üzerinde önemli bir uyumluluk göstermesidir. Öte yandan, gözenekli görüntülerde GSH' ın gözenekli bir yapı oluşturduğunu göstermiştir. Bunun nedeni KOL' ün pozitif yüklü amino gruplarının AVO ve diğer biyoaktif maddelerin negatif yüklü sülfat gruplarıyla güçlü iyonik etkileşimidir, bu da polimer çözeltilerinin çökmesine ve gözenekli ağların oluşmasına neden olur. TDM soku iskelesi, GSH ilavesiyle matrislere yüklendiğinde HyA hidrojellerindeki gözenek boyutunun daha da azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum TDM doku iskelesinin yapışma ve hücre çoğalması için uygun olduğu doku mühendisliği yara örtüsü uygulamalarında kullanılabilirliğine kanıt olarak gösterilebilir.



Şekil 4.5: TDM öncesi tasarlanan hidrojel çözeltilerinin SEM morfolojik görüntüleri

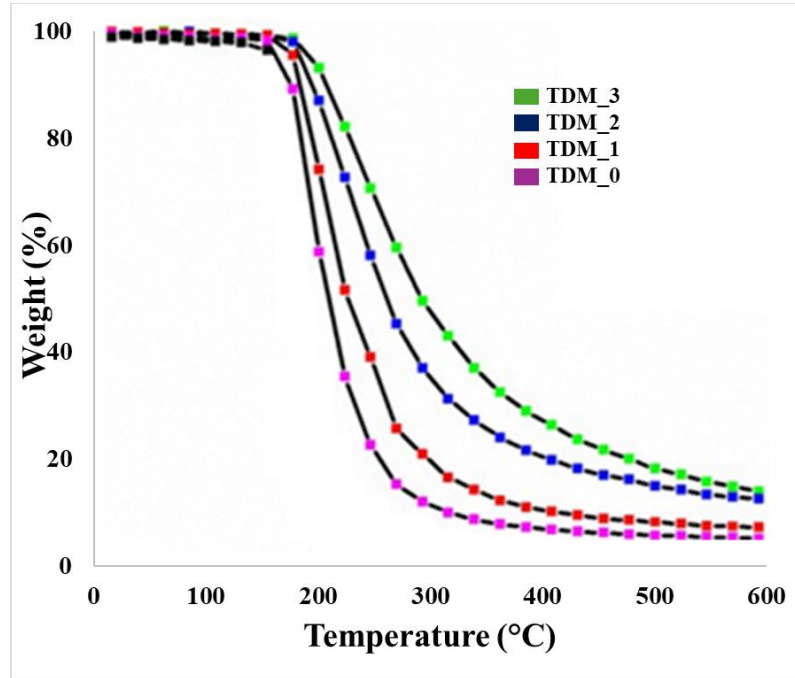


Şekil 4.6: TDM doku iskelelerin SEM morfolojik görüntüleri

4.10. TERMOGRAVİMETRİK (TGA) ANALİZİ

Mineralize kolajendeki organik madde olan kolajen, sıcaklığın artmasıyla kademeli olarak bozunabilir ve ağırlık belirgin bir şekilde kaybolur. Mineralize kolajende organik bir madde olan HyA, sıcaklığın artmasıyla bozulmaz ve önemli bir ağırlık kaybı olmaz. Bu nedenle, mineralize kolajen içindeki inorganik maddenin organik maddeye oranı, ağırlık kayıpları analiz edilerek belirlenebilir. Sıcaklığın artmasıyla birlikte, kolajenin TG eğrilerinde iki ağırlık kaybı adımı ayırt edilebilir. Sıcaklık arttıkça, bağlayıcı su ilk olarak 30-150 °C aralığında kaybolur. 250-600 °C aralığında, kolajen zincirleri kırılmış ve yapı bozulmuştur. Zincirlerin bozulması ikincil konformasyon yapısının yok olması anlamına gelmektedir. Ağırlık kayıplarının çoğu bozunma sürecinde meydana gelir. HA sadece bağlayıcı suyun ağırlığını kaybedebildiğinden, ağırlık kaybı çok azdır ve mineralize mikro yapıdan bağımsız olarak mineralize kolajenin ağırlık kayıpları, mineralize olmayan kolajeninkinden daha düşüktür. TDM tabanlı hidrojel sterilize edilmemiş ve sterilize edilmiş hidrojel iskelenin ilk ısıtma taramasında, 10 -200 °C sıcaklık aralığında geniş bir endotermik geçiş gözlenmiştir. İkinci ısıtma taramasında endotermik pik gözlenmediği için bu

geçiş tersinmezdir. Camsı geçiş ve erime tersine çevrilebilirken dehidrasyon, buharlaşma/bozunma tersine çevrilemez. Bununla birlikte, ikinci ısıtma taramasında, sterilize edilmiş numunede daha yüksek bir sıcaklıkta gözlenen taban çizgisinde bir kayma gözlenmiştir. Sterilizasyonun plastikleştirici olarak işlev görebilecek uçucu içeriği ortadan kaldırması beklendiğinden bu durum beklenmektedir. Oldukça higroskopik olan bu hidrojellerde, bu endotermin adsorbe edilen/tutulan ve/veya bağlanan suyun kaybindan kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. Tamamlayıcı olarak, TGA izleri 0-600 °C sıcaklık aralığında da kaydedilmiştir. Sterilize edilmemiş ve sterilize edilmiş çift katmanlı hidrojel bazlı iskeleler için TGA termogramı benzer termal bozunma modeli göstermiştir. Hem sterilize edilmemiş hem de sterilize edilmiş çift katmanlı hidrojel bazlı iskele için 0°C-100°C sıcaklık aralığında %12-18 ağırlık kaybı gözlenmiştir. Ağırlık kaybı, ilk ısıtma taraması sırasında gözlemlenen endotermik geçişe karşılık gelmektedir. Polimer bozunması her iki durum için de 200 °C-400°C arasında gözlenmiştir. Bu sonuçlar, gama radyasyonu ile sterilizasyonun geliştirilen çift katmanlı hidrojel bazlı iskelelerin termal stabilitesini etkilemediğini göstermektedir.

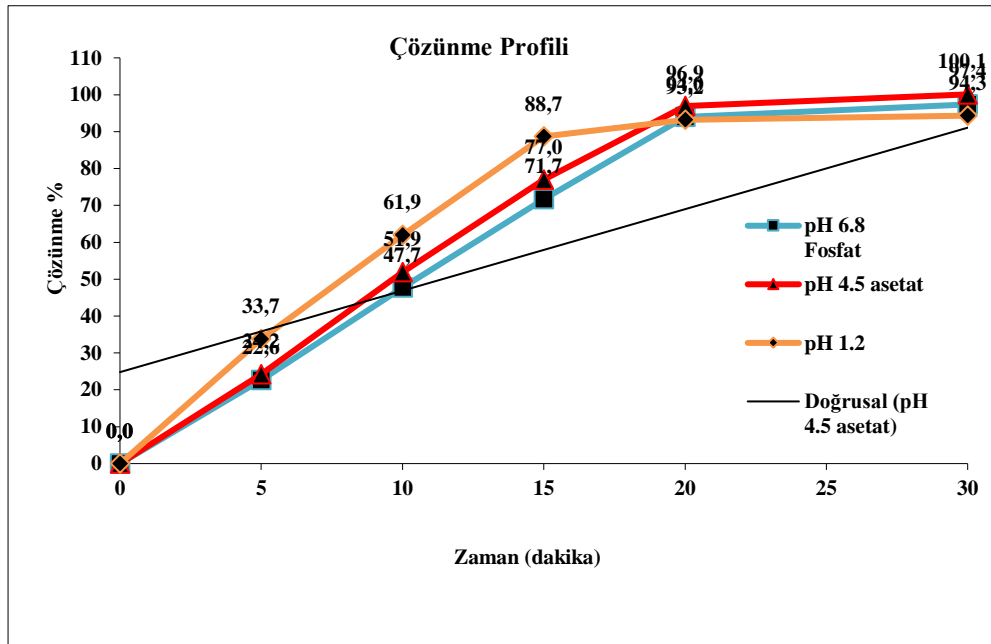


Şekil 4. 7: TDM yapısının TGA grafiği

4.11. İN VİTRO SALIM KİNETİĞİ: FRANZ HÜCREŞİ MATEMATİKSEL MODELLEMESİ

Tablo 4. 3: GSH yüklü TDM örneklerinin özellikleri (Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) n=3 olarak gösterilmiştir)

GSH	Ortalama φ	Zeta potansiyeli	Kapsülleme	İlaç Yükleme
(w/w)	(nm)	(mV)	Verim (%)	(%)
0	119,4 \pm 1,1	-17,1 \pm 0,5	--	--
0,2	130,4 \pm 1,9	-23,9 \pm 0,6	81,71 \pm 0,55	13,62 \pm 0,23
0,4	134,3 \pm 3,2	-20,8 \pm 0,3	75,53 \pm 0,55	21,58 \pm 0,23
0,6	141,3 \pm 2,7	-15,2 \pm 0,7	63,17 \pm 1,07	23,69 \pm 0,58



Şekil 4. 8: Çözünme profili grafiği

GSH yüklü TDM için çökme koşullarının belirlenmesine yönelik yapılan test sonuçları ile hem etkin madde hem de referans ürün ile yapılan çözünme çalışmaları sonucunda ph 1.2 çözüme ortamı olarak seçilmiştir.

Tablo 4. 4: 0,1 N HCl ortamlı çözünürlük çalışması

Numune (n)	Teorik Tartım (gr)	Deneysel Tartım (gr)	% Geri Kazanım
0,1N HCl-n1	10,30	10,10	98,07
0,1N HCl-n2	10,04	9,73	96,93
0,1N HCl-n3	10,35	10,12	97,78
0,1N HCl-n1	20,70	18,84	90,99
0,1N HCl-n2	20,13	18,52	92,01
0,1N HCl-n3	20,68	18,75	90,67
0,1N HCl-n1	40,77	21,13	51,83
0,1N HCl-n2	40,11	21,04	52,45
0,1N HCl-n3	40,67	21,08	51,84

Tablo 4. 5: 4,5 pH Asetat ortamlı çözünürlük çalışması

Numune (n)	Teorik Tartım (gr)	Deneysel Tartım (gr)	% Geri Kazanım
pH 4,5 Asetat-n1	10,15	10,00	98,57
pH 4,5 Asetat-n2	9,99	9,96	99,70
pH 4,5 Asetat-n3	9,95	9,86	99,10
pH 4,5 Asetat-n1	20,16	17,79	88,26
pH 4,5 Asetat-n2	20,18	18,06	89,48
pH 4,5 Asetat-n3	19,97	18,02	90,26
pH 4,5 Asetat-n1	40,24	21,32	52,98
pH 4,5 Asetat-n2	40,23	21,50	53,45
pH 4,5 Asetat-n3	40,04	21,61	53,97

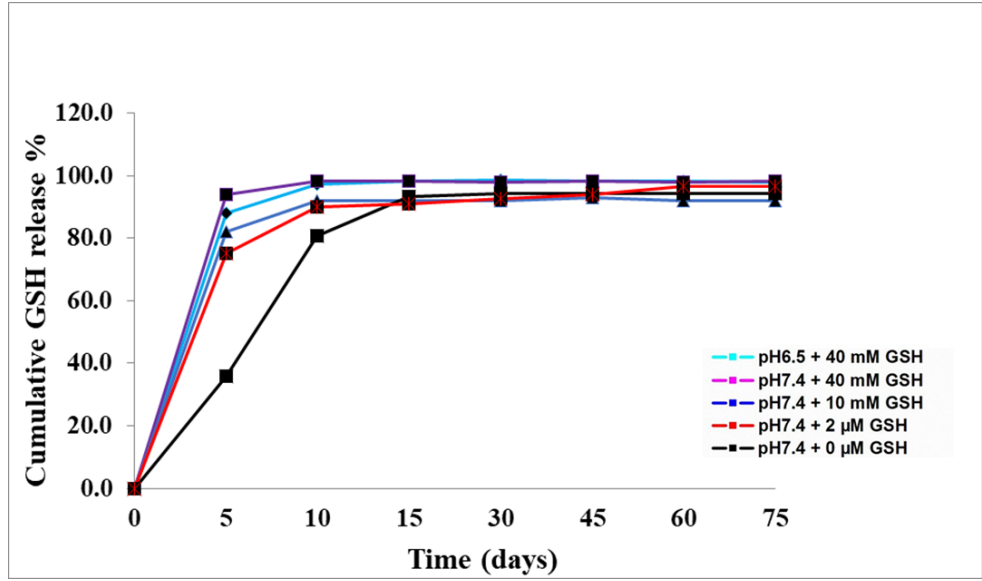
Tablo 4. 6: 6,8 pH Fosfat ortamlı çözünürlük çalışması

Numune (n)	Teorik Tartım (gr)	Deneysel Tartım (gr)	% Geri Kazanım
pH 6,8 Fosfat-n1	9,95	9,75	98,03

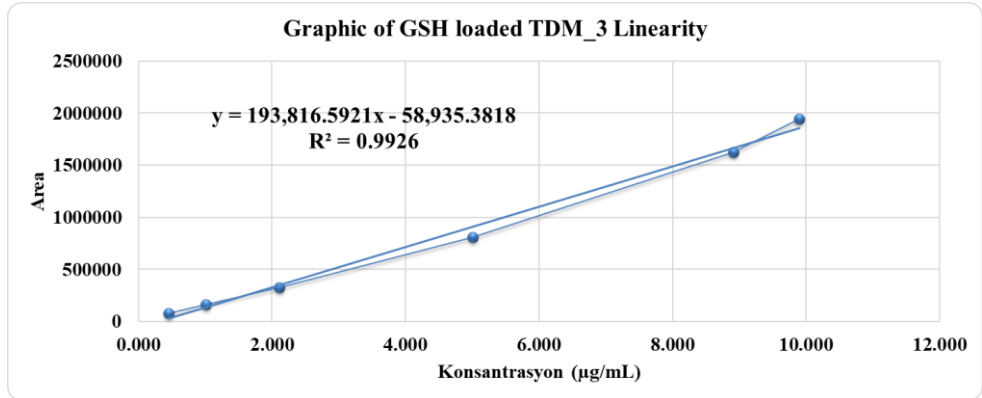
pH 6,8 Fosfat-n2	9,97	9,87	98,96
pH 6,8 Fosfat-n3	9,96	9,85	98,91
pH 6,8 Fosfat-n1	20,09	17,56	87,43
pH 6,8 Fosfat-n2	19,9	17,25	86,70
pH 6,8 Fosfat-n3	20,23	17,62	87,09
pH 6,8 Fosfat-n1	40,07	19,77	49,35
pH 6,8 Fosfat-n2	39,94	19,59	49,05
pH 6,8 Fosfat-n3	40,32	19,83	49,18

Tablo 4. 7: Distile su ortamlı çözünürlük çalışması

Numune (n)	Teorik Tartım (gr)	Deneysel Tartım (gr)	% Geri Kazanım
Distile Su-n1	9,99	9,83	98,41
Distile Su-n2	9,95	9,72	97,71
Distile Su-n3	10,08	9,93	98,56
Distile Su-n1	20,29	18,73	92,30
Distile Su-n2	20,09	18,48	91,99
Distile Su-n3	20,32	18,42	90,64
Distile Su-n1	40,33	21,26	52,71
Distile Su-n2	40,08	21,15	52,77
Distile Su-n3	40,40	21,16	52,38



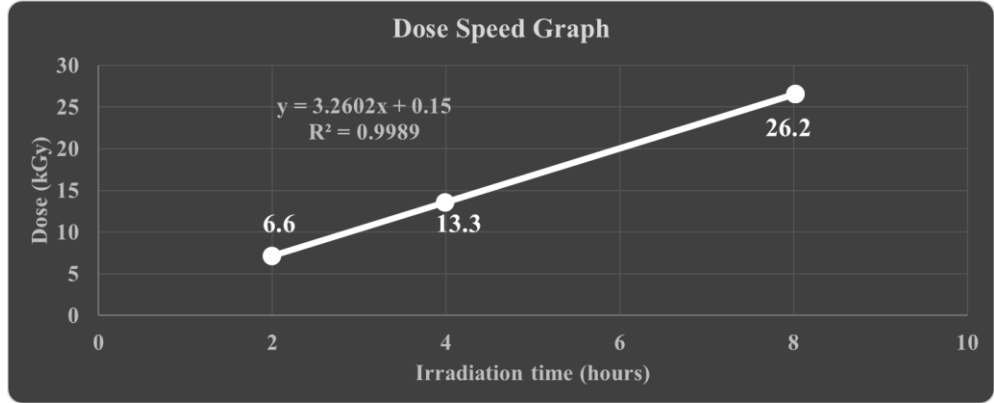
Şekil 4. 9: *In vitro* GSH salım profili çalışması



Şekil 4. 10: GSH yüklü TDM_3 örneğinin salım profili

4.12. *IN VITRO* ANTİBAKTERİ ANALİZLERİ

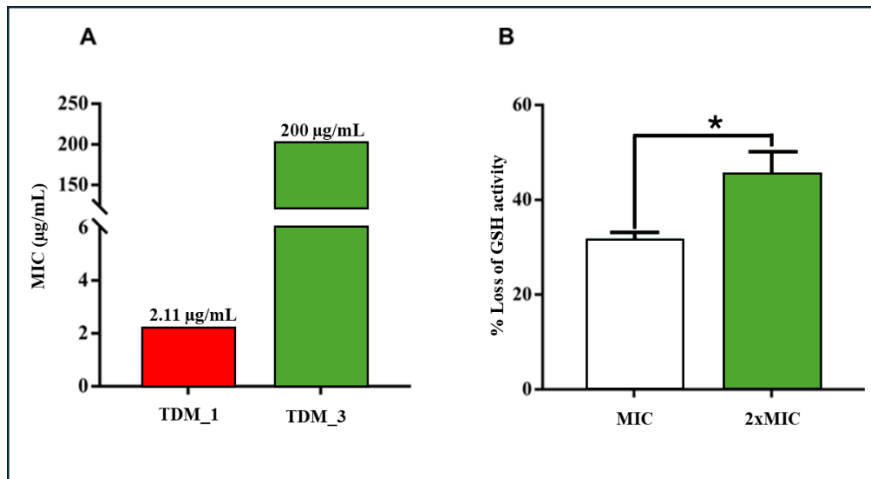
Biyolojik yük testindeki örnek sayıları; 10 Tahmini biyolojik yük (cfasample), 2,8 Sterilite testindeki numune sayısı, 100 - Sterilite testinin pozitifitesi, 0 - Sonuç (Sterilizasyon dozu- kGy), 15.8.2'den fazla pozitif sonuç olmadığı için sterilizasyon dozu olarak 15,8 kGy belirlenmiştir. Tüm proses adımları göz önüne alındığında: sprey kurutma, liyofilizasyon, UV çapraz bağlama TDM üzerindeki biyolojik yük çok düşük bulunmuştur.



Şekil 4. 11: Mikrobiyolojik testte, TDM örneklerine uygulanan ortalama sterilizasyon dozu profili

Tablo 4. 8: Dört rutenyum kompleksinin minimum inhibitör konsantrasyonları

Örnekler	Gram-negatif bakterilere karşı MİK'ler (MICs) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
TDM_0	>200	>200
TDM_1	>200	>200
TDM_2	>200	>200
TDM_3	>200	>200



Şekil 4. 12: A. MIC değeri, B. TDM₃ (1 ×, 2 × MIC) ile muamele edilen *S. aureus*'ta GSH aktivitesi kaybı (Veriler ortalama \pm SD olarak sunulmuştur)

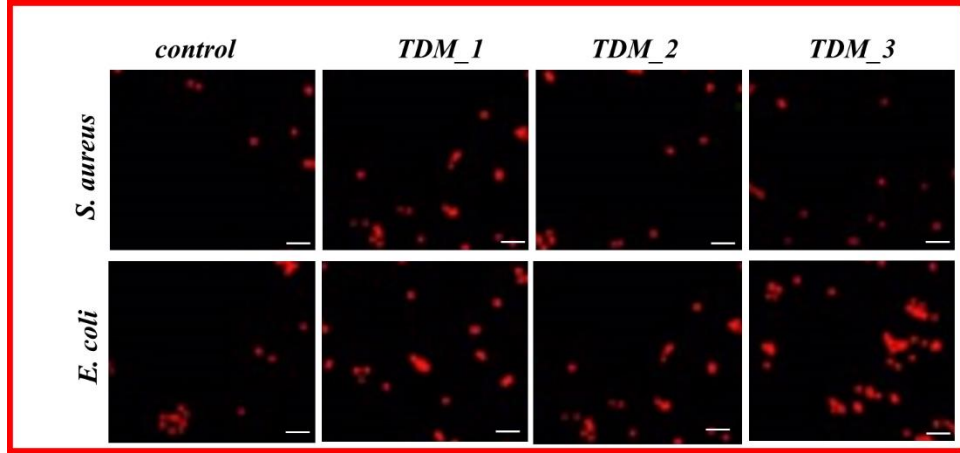
Tablo 4. 9: TDM' lerin kontrol grupları ve zamanlarına göre karşılaştırılması

Bacteri	Süre sayısı	Kontrol	TDM_1	TDM_2	TDM_3
	1	100	100	100	200
MIC' e karşı	2	100	100	100	200
<i>S. aureus</i>	3	100	100	100	200
	Ortalama	100	100	100	200
	1	200	100	100	200
MIC'e karşı	2	200	200	200	400
<i>E. coli</i>	3	200	200	200	400
	Ortalama	200	167±47	167±47	333±94
	1		400	400	100
MIC'e karşı	2		400	200	100
<i>C. albicans</i>	3		400	200	100
	Ortalama		400	267±94	100

Tablo 4. 10: TDM'lerin farklı MIC konsantrasyonlarda *S. aureus* ve *E. coli* 'ye karşı membran depolarizasyon yüzdesi

Örnekler	Bakteri	Konsantrasyon (µg/mL)	Depolarizasyon (% , Ortalama)
TDM_0	<i>S. aureus</i>	50 (0.5×MIC)	25
		100 (1×MIC)	28
		200 (2×MIC)	38
		400 (4×MIC)	44
	<i>E. coli</i>	50 (0.25×MIC)	18
		100 (0.5×MIC)	21
		200 (1×MIC)	28
		400 (2×MIC)	35
TDM_1	<i>S. aureus</i>	50 (0.5×MIC)	42

		100 (1×MIC)	59
		200 (2×MIC)	75
		400 (4×MIC)	83
	<i>E. coli</i>	50 (0.5×MIC)	39
		100 (1×MIC)	47
		200 (2×MIC)	60
		400 (4×MIC)	68
TDM_2	<i>S. aureus</i>	50 (0.5×MIC)	25
		100 (1×MIC)	28
		200 (2×MIC)	38
		400 (4×MIC)	44
	<i>E. coli</i>	50 (0.5×MIC)	18
		100 (1×MIC)	21
		200 (2×MIC)	28
		400 (4×MIC)	35
TDM_3	<i>S. aureus</i>	50 (0.5×MIC)	42
		100 (1×MIC)	59
		200 (2×MIC)	75
		400 (4×MIC)	83
	<i>E. coli</i>	50 (0.5×MIC)	39
		100 (1×MIC)	47
		200 (2×MIC)	60
		400 (4×MIC)	68



Şekil 4. 13: TDM örnekleri ($2\times\text{MIC}$) ile 4 saat boyunca muamele edilen ve ardından canlı/ölü boyamaya tabi tutulan *S. aureus* ve *E. coli*'nin floresan konfokal görüntüleri

Şekil 4.13' de pozitif kontrol olarak izopropil alkol (%70) ile muamele edilmiş bakteriler ve muamele edilmemiş bakteriler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. SYTO 9 boyası (yeşil floresan) genellikle membranları sağlam (canlı) bakterileri etiketlerken, propidyum iyodür (PI, kırmızı floresan) yalnızca membranları hasarlı (ölü) bakterilere nüfuz eder. Ölçek çubuğu $20\ \mu\text{m}$ 'dir.

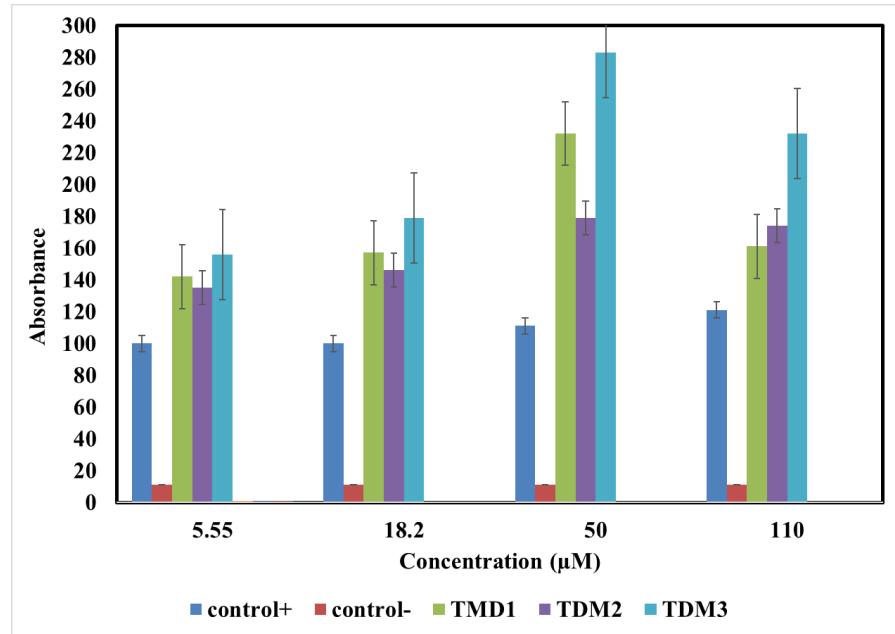
4.13. *IN VITRO* HÜCRE KÜLTÜRÜ ANALİZİ

GSH $5,55\ \mu\text{M}$ - $150\ \mu\text{M}$ 'nin hücre canlılığı açısından taranmasını ve bu hücrelerden antioksidan belirteçlerin araştırılmasını içermektedir. İnsan dermal fibroblastları ile doku onarımı, çoğalma ve hücre hareketliliğini artırma üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirildi. İnsan dermal fibroblast üzerindeki sitotoksikite, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tahlili aracılığıyla belirlendi. Şekil 4.14' de MTT testinin sitotoksikte değerlendirilmesi görülmektedir. Sayılar proliferasyonun yüzde oranını, sütunlar ise absorbansı temsil etmektedir. Hata çubukları \pm SD ortalamalarıdır.

Antioksidatif etki sağlayan hücreler üzerinde toksik etki görülmedi ve $50\ \mu\text{M}$ 'de %269'a varan yüksek çoğalma gözlemlendi. Diğer konsantrasyonlarda hücrelerin tümü canlıydı ve $150\ \mu\text{M}$ 'de minimum %135 gibi çoğalma oranları gösteriyordu. GSH çözümü, test edilen tüm konsantrasyonlar için benzer canlılıklara yol açtı. Beklenildiği üzere %269 canlılığa sahip dramatik bir hücre çoğalması

yaşandı. Aynı seyreltme yüksüz MP' ler üzerinde de yapıldı ve şaşırtıcı bir şekilde aynı noktada %283 oranında bir çoğalma gözlemlendi. MP matrisinin bileşenleri hücre canlılığını sinerjistik bir şekilde etkiledi. AVO yapısındaki fosfolipitler yeni hücre membranlarının oluşumunu olumlu yönde değiştirmiş ve HyA hücre göçünü arttırmıştır. Antioksidan belirteçler, GSH kapsüllü MP' lerle tedavi edilen hücrelerin GSH/GSSG oranının, çözeltideki GSH etkinliğinin ve MP' lerdeki kalıcı aktivitenin bir kanıtı gibi davrandığını ortaya çıkardı. Tüm konsantrasyonlardaki MP' lerin proliferatif olduğu ve ayrıca oksidatif strese karşı savunma mekanizmasına yardımcı olduğu bulunmuştur.

Yara bölgesindeki sıvı miktarını ve ayrıca GSH' ın MP' lerden yavaş salınımını da göz önüne aldığımızda, çalışmamızın sonuçlarında 200 µg'a kadar GSH'ın güvenli bir şekilde kapsüllenebileceği sonucuna varabiliriz. Yara bölgesinde optimum konsantrasyon olarak 50 µM aldığımızda optimum konsantrasyon 50 µg GSH' a ayarlanabilmektedir. Şekil 4.14' de grafiksel olarak sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 4. 14: MTT testinden sitotoksosite değerlendirme

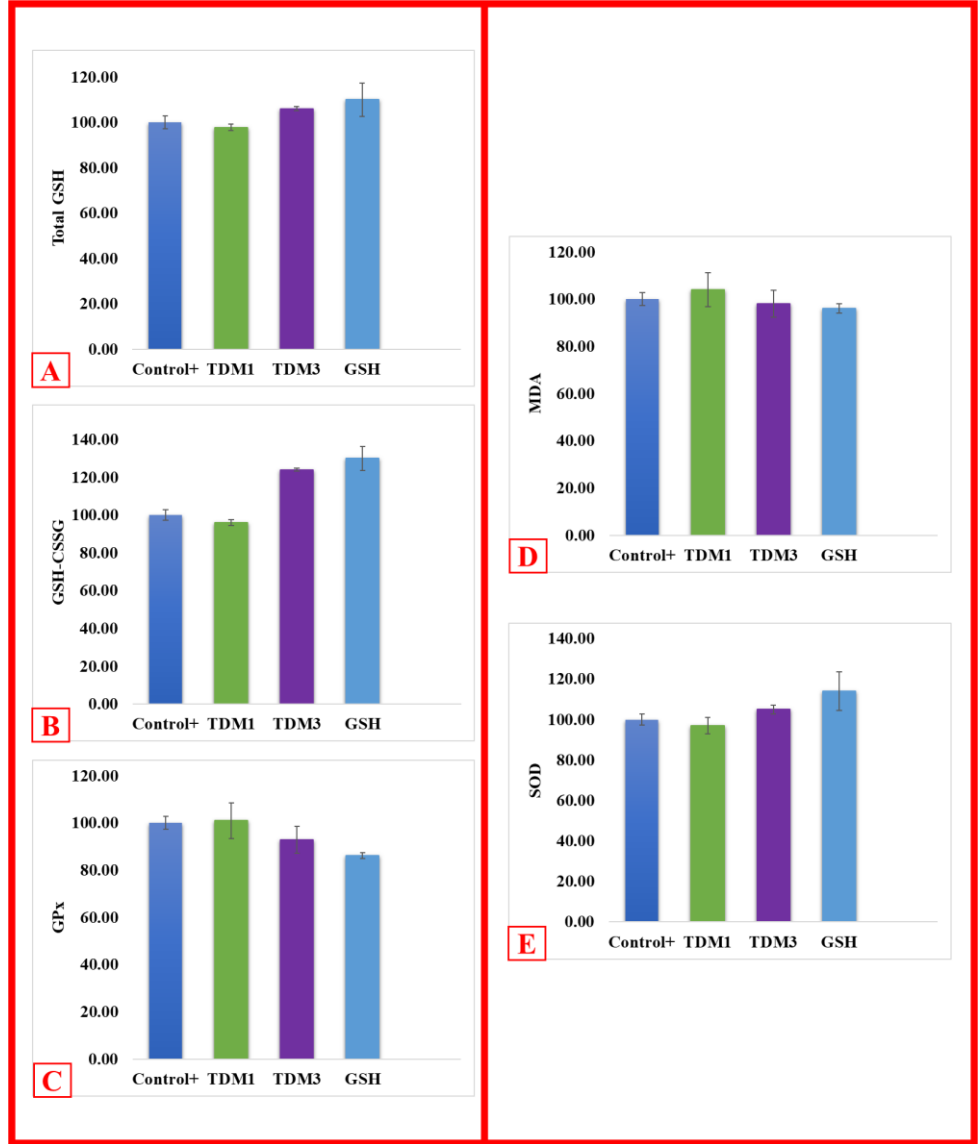
GSH çözeltisi test edilen tüm konsantrasyonlar için benzer canlılığa yol açmıştır. Lipid nanopartiküllerle yapılan çalışmalar 50 µM GSH konsantrasyonunun dermal uygulamalar için optimum olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle TDM_3 nihai GSH konsantrasyonları 5,5 olacak şekilde seyreltilmiştir. Beklendiği gibi, 50 µM'de % 283 canlılık ile hücrelerde bir çoğalma olmuştur.

Aynı seyreltme yüksüz MP' ler üzerinde de gerçekleştirilmiş ve aynı noktada %232' lük bir çoğalma gözlenmiştir. Hücre çoğalması açısından GSH solüsyonunun MP' lere ulaşamaması ve yüksüz MP' ün dramatik bir performans göstermesi nedeniyle, MP matris bileşenlerinin sinerjik bir şekilde sonucu etkileyebileceği düşünülmüştür.

AVO' nun yapısındaki fosfolipitler yeni hücre membranlarının oluşumunu olumlu yönde değiştirebilir ve HyA hücre göçünü artırabilir.

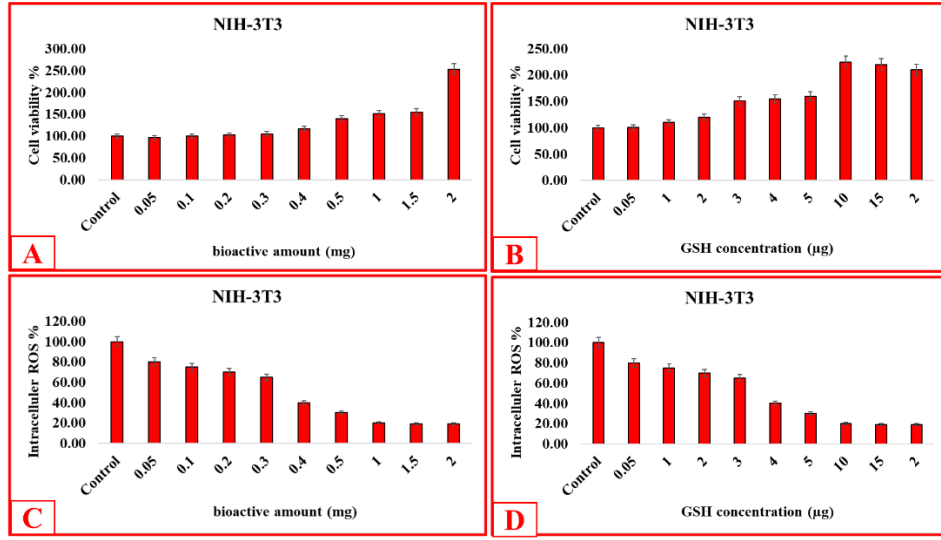
Sonuç olarak yüksüz ve GSH yüklü formülasyonlar hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir. Üretilen MP' lerin hücre çoğalması üzerinde sinerjik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. MP matrisi içindeki HyA ve AVO' nun hücre büyümesi açısından faydaları olabilir ancak GSH' ın tek başına fayda sağlamayacağı anlaşılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarıyla elde edilen GSH/GSSG seviyeleri, GSH' ın antioksidan aktivitesinin bir kanıtı olarak işlev görmüştür. GSH yüklü MP' lerin etkisini araştırmak için antioksidatif parametreler test edilmiştir ve Şekil 4.15 'te grafiksel olarak gösterilmiştir. İnsan antioksidan savunması süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) gibi enzimatik tutucular ve GSH gibi hidrofilik tutucularla donatılmıştır. Savunma ayrıca glutatyon redüktaz (GSSG) gibi moleküler antioksidanların oksitlenmiş formlarının indirgenmesinde rol oynayan enzimleri de içermektedir. Malondialdehit (MDA) serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun en önemli ürünüdür. Bu nedenle, hücre kültürü çalışmalarından elde edilen hücre lizatlarında yukarıda belirtilen antioksidan parametreler analiz edilmiştir.



Şekil 4. 15: Hücre lizatlarından elde edilen A. toplam GSH, B. toplam GSH/GSSG, C. GPx, D. MDA ve E. SOD seviyeleri

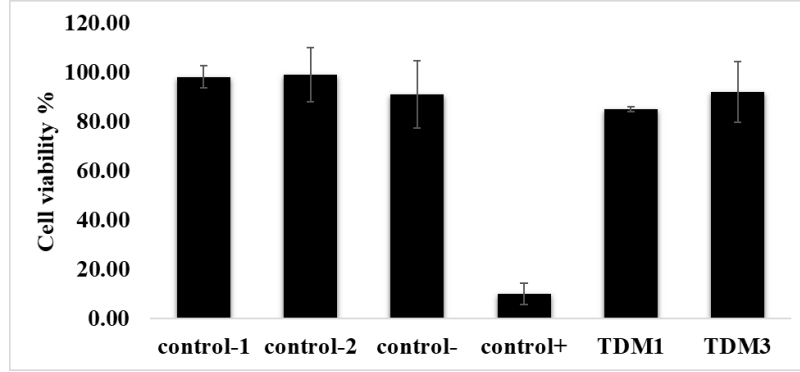
Sonuçların GSH' in radikal süpürücü özelliklerinden ve glutatyon redüktaz ile etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmüştür. TDM_3 ve GSH süspansiyonunun GSH/GSSG oranı farklı değildi. Bu sonuç, GSH' in çözeltideki etkinliğinin ve MP' lerdeki kalıcı etkinliğinin bir kanıtı gibi davranmıştır.



Şekil 4. 16: GSH ve biyoaktif yüklü malzemeler ile yapılan değerlendirmeler

TDM Yara Örtüsü, yüzeyinde antioksidan etkiden sorumlu olan GSH kapsüllü MP' lere sahiptir. GSH, hücre çoğalmasını uyaran güçlü bir antioksidandır ve serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi nedeniyle faydaları vardır. Hücre kültürü çalışmalarından da görülebileceği gibi, TDM Yara Örtülerinin yüzeyindeki MP' lerden salınacak GSH konsantrasyonlarının hücre çoğalmasının artması ve hücrelerde ROS üretiminin azalması üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Hücre kültürü çalışmaları, GSH yüklü HA-DPPC biyoaktif ajanların 0,5 µg (500 ng) gibi düşük konsantrasyonlarda yüksek proliferasyon ve antioksidan aktivite sergilediğini ortaya koymuştur. Buna göre, klinik partiler ve kontrol limitleri tasarlanmış ve sabitlenmiştir.

Şekil 4.16' da görülen grafiksel sonuca göre L929 hücre kültürü 24 saat boyunca "TDM biyoaktif yara örtüsü" ekstraktına maruz bırakılarak, kontrole göre hücre ölümüne neden olma potansiyeli değerlendirilmiştir. Kontrol örneğine göre hücre canlılığı 84 olarak bulunmuştur. Biyoyuymululuk ISO 10993-5;2009 sitotoksosite test prosedürü sonucunda $\%23 \pm 14.21$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 17: Biyoaktif Yara Örtüsü özütlerine 24 saat boyunca maruz kalmanın ardından Kontrol 2' ye göre hücre canlılığı yüzdesi

"TDM Biyoaktif Yara Örtüsü" örneklerinin sitotoksitesi, herhangi bir işlem uygulanmadan örneklerle aynı koşullarda inkübe edilen Kontrol 2'nin % hücre canlılığı normalizasyonuna dayalı olarak analiz edilmiştir.

Sonuçlar, üç kopya halinde çalıştırılan üç rastgele numunenin ortalamasını göstermektedir. Ortalama değer grafikte belirtilmiştir. Standart sapmalar üç bağımsız numuneden elde edilen değerlere göre çizilmiştir. TDM Biyoaktif Yara Örtüsü ekstraktları WST-1 Hücre canlılığı testini (Kolorimetrik) takiben analiz edilmiş ve numunenin sitotoksik olmadığı bulunmuştur. Ancak, sitotoksite açısından numuneler arasında tutarsızlık bulunmuştur.

4.14. HÜCRE İÇİ GSH AKTİVİTESİ

Hücre içi GSH aktivitesi standart bir Ellman testi kullanılarak belirlendi. *E. faecalis* süspansiyonları (~105 CFU/mL) 37 °C'de 6 saat boyunca artan bileşik konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Hem kontrol hem de muamele edilen hücreler 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi, PBS ile yıkandı ve lize edildi. Berrak üst sıvı toplandı. Daha sonra, Tris-HCl (50 mM) ve 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (100 mM) eklendi ve 37 °C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Elde edilen çözelti spektrofotometri ile 412 nm'de ölçüldü.

4.15. ROS TAHMİNİ

GSH yüklü MP' lerin GSH içeriğine göre 0,05-2 mg konsantrasyon aralıklarında sitotoksisite ve proliferasyon potansiyelini belirlemek amacıyla ikinci hücre kültürü çalışmaları yapıldı. Bu MP' lerin ve GSH'ın tek başına konsantrasyon taraması MTT tahlili ile değerlendirildi. Hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun tahmini hücre kültürü çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan en düşük konsantrasyonda (0,5 µg GSH'a eşdeğer 0,05 mg mikropartikül ve ayrıca sadece 0,05 µg GSH tek başına) herhangi bir sitotoksisitenin gözlenmediği ve 0,02 µg GSH'ın tek başına veya 0,2 mg MP içerisinde hücre çoğalmasının başladığı görüldü. Bu düşük konsantrasyonda bile hücrelerdeki ROS miktarı azalmaya başlamıştır. Bu çalışma, GSH'ın düşük konsantrasyonlarda bile hücre canlılığı ve oksidatif stres üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermiştir. GSH içerikli MP' lerin, 0,5 µg gibi düşük konsantrasyonlarda bile önemli çoğalma ve antioksidan aktivite gösterdiği, hedeflenmiş bir çoğalma ve antioksidan aktivite sergilediği sonucuna açıkça varabiliriz. Sonuçlarımıza göre, test edilen formülasyonlar arasında, 20 µg GSH içeren 2 mg MP ve tek başına 20 µg GSH en yüksek proliferasyon ve antioksidan etkiye sahiptir. 0,5 µg GSH MP' leri proliferasyon açısından kontrolden farklı değildi. Ancak bu sınırın üzerinde her konsantrasyonda proliferasyon görülebilmektedir. Hücre içi ROS konsantrasyonu tüm konsantrasyonlarda ve tüm koşullarda GSH varlığıyla azalmıştır. GSH'ın antioksidan etkilerinin altında yatan mekanizmalar, serbest radikallerin temizlenmesinin yanı sıra membran reseptörleri aracılığıyla enzimlerin aktivasyonunu içerir. Böylece hücrelerdeki ROS konsantrasyonu, proliferasyon ile aynı eğilimle azalmıştır.

4.16. OKSİDATİF STRES

Hücre kültürü örneklerinden elde edilen hücre lizatlarının analizi, MDA, SOD ve GPX seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur. GSH yüklenmiş MP ve GSH solüsyonundan elde edilen GSH/GSSG (indirgenmiş glutatyon/oksidlenmiş glutatyon) oranı, kontrol ve yüklenmemiş MP' lardan istatistiksel olarak farklıydı. Bu oran hücredeki oksidasyonun bir ölçüsü olarak kullanılabilir.

SONUÇ

Bu tez çalışmasında antioksidanları serbest bırakmak ve yara ortamının hassas dengesini korumak için diğer bileşenlerle birlikte çalışan bir dermal matris oluşturulmuştur. Bu amaçla, üç boyutlu gözenekli kollajen-laminin dermal matrisleri hazırlandı ve GSH yüklü HyA/AVO mikropartiküller ile doygun hale getirildi. Bu sayede TDM, kronik yara tedavisinin etkinliğini artırır, iyileşme süresini kısaltır ve doku onarımına yardımcı olur. Yara bölgesindeki oksijensiz radikalleri azaltma yeteneği, savunma mekanizmalarını, yara bölgesinin geri kalanını ve cilt dokularını telafi ederek yara iyileşme sürecini desteklemesi beklenmektedir.

KAYNAKÇA

- Adepu, S., Ramakrishna, S. 2021.** "Controlled drug delivery systems: Current status and future directions". *Molecules*, 26(19).
- Agache, P., Humbert, P., Fanian, F. 2017.** "*Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants: Second Edition*".
- Ahmed Saeed AL-Japairai, K., Mahmood, S., Hamed Almurisi, S., Reddy Venugopal, J., Rebhi Hilles, A., Azmana, M., Raman, S. 2020.** "Current trends in polymer microneedle for transdermal drug delivery". *International Journal of Pharmaceutics*, 587(July), 119673.
- Aldawood, F. K., Andar, A., Desai, S. 2021.** "A comprehensive review of microneedles: Types, materials, processes, characterizations and applications". *Polymers*, 13(16), 1–34.
- Alemu, N., Balakrishnan, S., Debtera, B. 2022.** "Extraction and Characterisation of Avocado Seed Starch, and Its Blend with Enset Cellulosic". *Advances in Materials Science and Engineering*, 2022.
- Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C., Donnelly, R. F. 2015.** "Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum". *Pharmaceutics*, 7(4), 438–470.
- Aoyama, K., Watabe, M., Nakaki, T. 2008.** "Regulation of neuronal glutathione synthesis". *Journal of Pharmacological Sciences*.
- Arpi, N., Satriana, Mustapha, W. A. W., Syamsuddin, Y., Putra, T. W., Supardan, M. D. 2023.** "Effect of cooking pre-treatment on the properties of dried avocado flesh and its oil extract". *South African Journal of Chemical Engineering*, 43, 1–8.
- Ata, Ö., Tavman, Ş. 2019.** "Kolajen Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması". *Gıda/The Journal of Food*, 44(3), 383–395.

- Averill-Bates, D. A. 2023. "The Antioxidan Glutathione". *Vitamins and Hormones*, 121, 109–141.
- Bai, L., Huan, S., Gu, J., McClements, D. J. 2016.** "Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides". *Food Hydrocolloids*, 61, 703–711.
- Bakoš, D., Soldán, M., Hernández-Fuentes, I. 1999.** "Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite". *Biomaterials*, 20(2), 191–195.
- Balabanova, D., Remans, T., Vassilev, A., Cuypers, A., Vangronsveld, J. 2018.** "Possible involvement of glutathione S-transferases in imazamox detoxification in an imidazolinone-resistant sunflower hybrid". *Journal of Plant Physiology*.
- Bavaresco, B., Comín, R., Salvatierra, N. A., Cid, M. P. 2020.** "Three-dimensional printing of collagen and hyaluronic acid scaffolds with dehydrothermal treatment crosslinking". *Composites Communications*, 19, 1–5.
- Bediz, B., Korkmaz, E., Khilwani, R., Donahue, C., Erdos, G., Falo, L. D., Ozdoganlar, O. B. 2014.** "Dissolvable microneedle arrays for intradermal delivery of biologics: Fabrication and application". *Pharmaceutical Research*, 31(1), 117–135.
- Bellucci, H. 2022.** "*Zeytin Yaprağı Ekstratının Transdermal Uygulamada Kullanımının İncelenmesi*".
- Benson, H. 2005.** "Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques". *Current Drug Delivery*, 2(1), 23–33.
- Benson, H. A. E., Grice, J. E., Mohammed, Y., Namjoshi, S., Roberts, M. S. 2019.** "Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies". *Current Drug Delivery*, 16(5), 444–460.
- Benson, H. A. E., Watkinson, A. C. 2012.** "*Transdermal and Topical Drug Delivery*". *John Wiley & Sons, Inc.*
- Bhatnagar, S., Gadeela, P. R., Thathireddy, P., Venuganti, V. V. K. 2019.** "Microneedle-based drug delivery: materials of construction". *J. Chem. Sci.*,

131(9), 90.

- Bok, M., Zhao, Z. J., Jeon, S., Jeong, J. H., Lim, E. 2020.** "Ultrasonically and Iontophoretically Enhanced Drug-Delivery System Based on Dissolving Microneedle Patches". *Scientific Reports*, 10(1), 1–11.
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. R., Ponc, M. 2002.** "Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: The role of natural and synthetic ceramide 1". *Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), 606–617.
- Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A., Akomeah, F. K. 2006.** "Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects". *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 13(3), 175–187.
- Burk, R. F., Lane, J. M., Patel, K., Elaziz, E. A. A., Ibvahim, Z. S., Elkattaw, A. M., Kingston, C. 2001.** "Relationship of Oxygen and Glutathione in Protection against Carbon Tetrachloride-induced Hepatic Microsomal Lipid Peroxidation and Covalent Binding in the Rat". *The American society for Clinical Investigation*.
- Camcı, Y., Türk, S., Gepek, E., İyibilgin, O., Özsoy, M. İ. 2022.** "Fabrication and characterization of innovative chitosan/doxorubicin coated 3D printed microneedle patch for prolonged drug delivery". *Journal of Applied Polymer Science*, 139(32).
- Castro-García, P. G., Vasquez-Garcia, S. R., Flores-Ramirez, N., Rico, J. L., Abdel-Gawwad, H. A., García-González, L., Fernández-Quiroz, D. 2022.** "Polymeric films prepared from starch and a crosslinker extracted from avocado seeds". *Journal of Applied Polymer Science*, 139(31).
- Cebi, N., Dogan, C. E., Mese, A. E., Ozdemir, D., Arıcı, M., Sagdic, O. 2019.** "A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for classification of gelatin gummy candies in relation to the gelatin source". *Food Chemistry*, 277, 373–381.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E. M., Nuñez-Vilchis, A. 2023.** "Identification and quantification of fatty acids and lipid-soluble phytochemicals using GC-MS,

HPLC-MS, and FTIR and their association with quality parameters during avocado ripening". *Journal of Food Science*, 88(1), 119–132.

Chen, W. S., Guo, L. Y., Tang, C. C., Tsai, C. K., Huang, H. H., Chin, T. Y., ... Chen-Yang, Y. W. 2018. "The effect of laminin surface modification of electrospun silica nanofiber substrate on neuronal tissue engineering". *Nanomaterials*, 8(3).

Chou, S. F., Carson, D., Woodrow, K. A. 2015. "Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers". *Journal of Controlled Release*, 220, 584–591.

Ciftci, F., Özarıslan, A. C. 2023. "Fabrication of polycaprolactone-chitosan/curcumin polymer composite fibers and evaluation of their in vitro release kinetic behavior and antibacterial-antifungal activity". *Journal of Sol-Gel Science and Technology*.

Çobanoğlu, E., Varan, C., Bilensoy, E. 2021. "*Printers and Printing Technologies in the Pharmaceutical Field*". *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* (C. 46).

De Oliveira, A. P., Franco, E. D. S., Rodrigues Barreto, R., Cordeiro, D. P., De Melo, R. G., De Aquino, C. M. F., Maia, M. B. D. S. 2013. "Effect of semisolid formulation of persea americana mill (Avocado) oil on wound healing in rats". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Delgado-Charro, M. B., Guy, R. H. 2014. "Effective use of transdermal drug delivery in children". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 73, 63–82.

Derkach, S. R., Voron'ko, N. G., Sokolan, N. I., Kolotova, D. S., Kuchina, Y. A. 2020. "Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies". *Journal of Dispersion Science and Technology*, 41(5), 690–698.

Dharadhar, S., Majumdar, A., Dhoble, S., Patravale, V. 2019. "Microneedles for transdermal drug delivery: a systematic review". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 45(2), 188–201.

Donnelly, R. F., Majithiya, R., Singh, T. R. R., Morrow, D. I. J., Garland, M. J., Demir, Y. K., Woolfson, A. D. 2011. "Design, optimization and characterisation

of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique". *Pharmaceutical Research*, 28(1), 41–57.

Donnelly, R. F., Raj Singh, T. R., Woolfson, A. D. 2010. "Microneedle-based drug delivery systems: Microfabrication, drug delivery, and safety". *Drug Delivery*, 17(4), 187–207.

Economidou, S. N., Douroumis, D. 2021. "3D printing as a transformative tool for microneedle systems: Recent advances, manufacturing considerations and market potential". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 60–69.

Erkuş, H. 2023. "*Transdermal İlaç Dağıtımı İçin Antibiyotik Yüklü Gelma Mikro İğnelerin Üretimi ve Karakterizasyonu*". Yıldız Teknik Üniversitesi.

Eteshola, E. O. U., Haupt, D. A., Koos, S. I., Siemer, L. A., Morris, D. L. 2020. "The role of metal ion binding in the antioxidant mechanisms of reduced and oxidized glutathione in metal-mediated oxidative DNA damage". *Metallomics*.

Foudjo, B. U. S., Kansci, G., Lazar, I. M., Lazar, G., Fokou, E., Etoa, F. X. 2013. "ATR-FTIR characterization and classification of avocado oils from five Cameroon cultivars extracted with a friendly environmental process". *Environmental Engineering and Management Journal*, 12(1), 97–103.

Gittard, S. D., Ovsianikov, A., Monteiro-Riviere, N. A., Lusk, J., Morel, P., Minghetti, P., Narayan, R. J. 2009. "Fabrication of polymer microneedles using a two-photon polymerization and micromolding process". *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(2), 304–311.

Gupta, M., Agrawal, U., Vyas, S. P. 2012. "Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases". *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(7), 783–804.

Gzara, L., Dhahbi, M. 2001. "Removal of chromate anions by micellar-enhanced ultrafiltration using cationic surfactants". *Desalination*, 137(1–3), 241–250.

Haj-Ahmad, R., Khan, H., Arshad, M. S., Rasekh, M., Hussain, A., Walsh, S., ... Ahmad, Z. 2015. "Microneedle coating techniques for transdermal drug delivery". *Pharmaceutics*, 7(4), 486–502.

- Hamilton, J. 2010.** "*Fabrication and Analysis of Injection Molded Plastic Microneedle Arrays*". Georgia Institute of Technology.
- Heckele, M., Schomburg, W. 2004.** "Review on micro molding of thermoplastic polymers. *Journal of Micromechanics and Microengineering*", *14*, 1–14.
- Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. 2003.** "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites". *Composites Science and Technology*.
- Ikemoto, S., Mochizuki, M., Yamada, M., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Kadoya, Y. 2006.** "Laminin peptide-conjugated chitosan membrane: Application for keratinocyte delivery in wounded skin". *Journal of Biomedical Materials Research*, *79A*(3), 716–722.
- Iorio, V., Troughton, L. D., Hamill, K. J. 2015.** "Laminins: Roles and Utility in Wound Repair". *Advances in Wound Care*, *4*(4), 250–263.
- J, F. de la M. 2007.** "The fluid dynamics of Taylor cones". *Annu. Rev. Fluid Mec*, *39*(1), 217–243.
- Jeong, W. Y., Kwon, M., Choi, H. E., Kim, K. S. 2021.** "Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review". *Biomaterials Research*.
- Judd, S. J. 2017.** "Membrane Technology Costs and Me". *Water Research*, *122*, 1–9.
- Jung, H. S., Pradhan, T., Han, J. H., Heo, K. J., Lee, J. H., Kang, C., Kim, J. S. 2012.** "Molecular modulated cysteine-selective fluorescent probe". *Biomaterials*.
- Jung, J. H., Jin, S. G. 2021.** "Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication". *Journal of Pharmaceutical Investigation*, *51*(5), 503–517.
- Kajbafvala, A., Salabat, A. 2022.** "Microemulsion and microemulsion gel formulation for transdermal delivery of rutin: Optimization, in-vitro/ex-vivo evaluation and SPF determination", *43*(12), 1848–1857.
- Kalia, Y. N., Guy, R. H. 2001.** "Modeling transdermal drug release". *Advanced Drug Delivery Reviews*, *48*(2–3), 159–172.
- Kashibuchi, N., Hirai, Y., O’Goshi, K., Tagami, H. 2002.** "Three-dimensional

analyses of individual corneocytes with atomic force microscope: morphological changes related to age, location and to the pathologic skin conditions". *Skin Research & Technology*, 8(4), 203–211.

Kochhar, J. S., Anbalagan, P., Shelar, S. B., Neo, J. K., Ilescu, C., Kang, L. 2014. "Direct microneedle array fabrication off a photomask to deliver collagen through skin". *Pharmaceutical Research*, 31(7), 1724–1734.

Kochhar, J. S., Zou, S., Chan, S. Y., Kang, L. 2012. "Protein encapsulation in polymeric microneedles by photolithography". *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3143–3154.

Kohrs, N. J., Liyanage, T., Venkatesan, N., Najarzadeh, A., Puleo, D. A. 2019. "Drug Delivery Systems and Controlled Release". *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 316–329.

Kumar, M., Sharma, A., Mahmood, S., Thakur, A., Mirza, M. A., Bhatia, A. 2023. "Franz diffusion cell and its implication in skin permeation studies". *Journal of Dispersion Science and Technology*, 0(0), 1–14.

Kuroi, K., Yamada, M., Kawamura, I., Jung, M., Pack, C. G., Fujii, F. 2022. "FTIR study of the surface-ligand exchange reaction with glutathione on biocompatible rod-shaped CdSe/CdS semiconductor nanocrystals". *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(21), 13356–13364.

Lafarge, E., Villette, S., Cario-André, M., Lecomte, S., Faure, C. 2022. "Transdermal diffusion of resveratrol by multilamellar liposomes: Effect of encapsulation on its stability". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76(August).

Laganriere, S., Yu, B. P. 1989. "Effect of chronic food restriction in aging rats II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes". *Mechanisms of Ageing and Development*.

László, S., Bártai, I. Z., Berkó, S., Csányi, E., Dombi, Á., Pozsgai, G., ... Pintér, E. 2022. "Development of Capsaicin-Containing Analgesic Silicone-Based Transdermal Patches". *Pharmaceuticals*, 15(10).

- Lee, J. W., Han, M. R., Park, J. H. 2013.** "Polymer microneedles for transdermal drug delivery". *Journal of Drug Targeting*, 21(3), 211–223.
- Leeuwenburgh, C., Ji, L. L. 1998.** "Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise". *Journal of Nutrition*.
- Levintova, Y., Plakogiannis, F. M., Bellantone, R. A. 2011.** "An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells". *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1–2), 96–106.
- Liang, M., Dong, L., Guo, Z., Liu, L., Fan, Z., Wei, C., ... Sun, W. 2023.** "Collagen-Hyaluronic Acid Composite Hydrogels with Applications for Chronic Diabetic Wound Repair". *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 9(9), 5376–5388.
- Liu, J. F., Jang, B., Issadore, D., Tsourkas, A. 2019.** "Use of magnetic fields and nanoparticles to trigger drug release and improve tumor targeting". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(6), 1–29.
- Liu, X., Kruger, P., Maibach, H., Colditz, P. B., Roberts, M. S. 2014.** "Using skin for drug delivery and diagnosis in the critically ill". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 77, 40–49.
- Lu, S. C. 2009.** "Regulation of glutathione synthesis". *Molecular Aspects of Medicine*.
- Martínez-Pérez, C. A. 2020.** "Electrospinning: A promising technique for drug delivery systems". *Reviews on Advanced Materials Science*, 59(1), 441–454.
- McLennan, D. N., Porter, C. J. H., Charman, S. A. 2005.** "Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics". *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 89–96.
- Mdanda, S., Ubanako, P., Kondiah, P. P. D., Kumar, P., Choonara, Y. E. 2021.** "Recent advances in microneedle platforms for transdermal drug delivery technologies". *Polymers*, 13(15).
- Migalska, K., Morrow, D. I. J., Garland, M. J., Thakur, R., Woolfson, A. D., Donnelly, R. F. 2011.** "Laser-engineered dissolving microneedle arrays for

transdermal macromolecular drug delivery". *Pharmaceutical Research*, 28(8), 1919–1930.

Moffatt, K., Donnelly, R. F. 2021. "*Drug Delivery Devices and Therapeutic Systems*". *Microneedle Technology*.

Mohammed, A. A., Algahtani, M. S., Ahmad, M. Z., Ahmad, J., Kotta, S. 2021. "3D Printing in medicine: Technology overview and drug delivery applications". *Annals of 3D Printed Medicine*, 4, 100037.

Mokhtar, M., Dickson, S. E., Kim, Y., Mekky, W. 2018. "Preparation and characterization of ion selective membrane and its application for Cu²⁺ removal". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 60(November), 475–484.

Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Vázquez, C., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E. 2018. "Control of the NADPH supply and GSH recycling for oxidative stress management in hepatoma and liver mitochondria". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*.

Murdan, S. 2004. "Transdermal and Topical Drug Delivery. From Theory to Clinical Practice". *Pharmacy Education*, 4(1), 49–50.

Nagarkar, R., Singh, M., Nguyen, H. X., Jonnalagadda, S. 2020. "A review of recent advances in microneedle technology for transdermal drug delivery". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 59, 101923.

Nashchekina, Y., Guryanov, E., Lihachev, A., Vaganov, G., Popova, E., Mikhailova, N., Nashchekin, A. 2023. "Effect of Phytic Acid Addition on the Structure of Collagen-Hyaluronic Acid Composite Gel". *Gels*, 9(12).

Nauser, T., Koppenol, W. H., Gebicki, J. M. 2005. "The kinetics of oxidation of GSH by protein radicals". *Biochemical Journal*.

Nelson, D. L., Cox, M. M. 2014. "*LIVRO - Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.*". *Book*.

Ng, K. W., Lau, W. M. 2015. "Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration". *ResearchGate*, 3–11.

- Orłowska, R., Zebrowski, J., Dynkowska, W. M., Androsiuk, P., Bednarek, P. T. 2023.** "Metabolomic Changes as Key Factors of Green Plant Regeneration Efficiency of Triticale In Vitro Anther Culture". *Cells*, 12(1).
- Pidhatika, B., Zhao, N., Zinggeler, M., Rühle, J. 2019.** "Surface-attached dual-functional hydrogel for controlled cell adhesion based on poly(N,N-dimethylacrylamide)". *Journal of Polymer Research*, 26(3).
- Pineau, A., Guillard, O., Fauconneau, B., Favreau, F., Marty, M. H., Gaudin, A., Marty, J. P. 2012.** "In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the FranzTM diffusion cell". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 110, 21–26.
- Pittman, M. S., Robinson, H. C., Poole, R. K. 2005.** "A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm". *Journal of Biological Chemistry*.
- Potrč, T., Baumgartner, S., Roškar, R., Planinšek, O., Lavrič, Z., Kristl, J., Kocbek, P. 2015.** "Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 101–113.
- Pradhan, B., Patra, S., Dash, S. R., Nayak, R., Behera, C., Jena, M. 2021.** "Evaluation of the anti-bacterial activity of methanolic extract of *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] with special reference to antioxidant modulation". *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Pradhan, P., Majhi, O., Biswas, A., Joshi, V. K., Sinha, D. 2020.** "Enhanced accumulation of reduced glutathione by Scopoletin improves survivability of dopaminergic neurons in Parkinson's model". *Cell Death and Disease*.
- Prausnitz, M. R. 2004.** "Microneedles for transdermal drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(5), 581–587.
- Prausnitz, M. R., Langer, R. 2008.** "Transdermal drug delivery". *Nature Biotechnology*, 26(11), 1261–1268.
- Qin, X., Zhong, J. 2016.** "A review of extraction techniques for avocado oil". *Journal*

of Oleo Science.

Quiñones-Islas, N., Meza-Márquez, O. G., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velazquez, T. 2013. "Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis". *Food Research International*, 51(1), 148–154.

Ramadon, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., Donnelly, R. F. 2022. "Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications". *Drug Delivery and Translational Research*.

Ramasamy, T., Ruttala, H. B., Gupta, B., Poudel, B. K., Choi, H. G., Yong, C. S., Kim, J. O. 2017. "Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review". *Journal of Controlled Release*, 258(April), 226–253.

Raza, T., Rasool, B., Asrar, M., Manzoor, M., Javed, Z., Jabeen, F., Younis, T. 2023. "Exploration of polyacrylamide microplastics and evaluation of their toxicity on multiple parameters of *Oreochromis niloticus*". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(2).

Ribas, V., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J. C. 2014. "Glutathione and mitochondria". *Frontiers in Pharmacology*.

Sahebalzamani, M., Biazar, E., Shahrezaei, M., Hosseinkazemi, H., Rahiminavaie, H. 2015. "Surface modification of PHBV nanofibrous mat by laminin protein and its cellular study". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(3), 149–154.

Sahithi, B., Sk, A., Sk, H., Sahithya, G., M, D. P., Lakshmi, Y. 2013. "A review on collagen based drug delivery systems". *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(June), 461–468.

Samancı, B. 2021. "*Resveratrol İçeren Transdermal Mikroemülsiyonların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Katı Mikroïğneler ile Uygulanması*". İstanbul Üniversitesi.

Sánchez-Rodríguez, M. A., Mendoza-Núñez, V. M. 2019. "Oxidative stress indexes

for diagnosis of health or disease in humans". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Sayed, A. A. R. 2012. "Ferulsinaic acid modulates SOD, GSH, and antioxidant enzymes in diabetic kidney". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*.

Schäfer-Korting, M. 2010. "*Drug Delivery*". (Springer Berlin Heidelberg, Ed.) (illustrée).

Schmitt, B., Vicenzi, M., Garrel, C., Denis, F. M. 2015. "Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study.". *Redox Biology*.

Schoellhammer, C. M., Blankschtein, D., Langer, R. 2014. "Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects". *NIH Public Access*, *11*(3), 393–407.

Shahzad, Y., Louw, R., Gerber, M., du Plessis, J. 2015. "Breaching the skin barrier through temperature modulations". *Elsevier*, *202*, 1–13.

Sherwood, A., Bower, J. K., McFetridge-Durdle, J., Blumenthal, J. A., Newby, L. K., Hinderliter, A. L. 2007. "Age moderates the short-term effects of transdermal 17 β -estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(8), 1782–1787.

Singh, H., Sharma, R., Joshi, M., Garg, T., Goyal, A. K., Rath, G. 2015. "Transmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers". *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, *43*(4), 263–269.

Sionkowska, A., Michalska-Sionkowska, M., Walczak, M. 2020. "Preparation and characterization of collagen/hyaluronic acid/chitosan film crosslinked with dialdehyde starch". *International Journal of Biological Macromolecules*, *149*, 290–295.

Sirbubalo, M., Tucak, A., Muhamedagic, K., Hindija, L., Rahić, O., Hadžiabdić, J., ... Vranić, E. 2021. "3D Printing—a “Touch-Button” Approach To

Manufacture Microneedles for Transdermal Drug Delivery". *Pharmaceutics*, 13(7).

Srinivasa Rao, N., Shireesh, D., Kalahasti, S., Sanjeeva Rao, B. 2022. "Effect of gamma irradiation, annealing on spectroscopic and thermal properties of some biopolymers – Gelatin". İçinde *Materials Today: Proceedings* (C. 64, ss. 225–229).

Stephenson, T., Judd, S., Jefferson, B., Brindle, K. 2007. "*Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment*". England: IWA Publishing.

Suo, M., Zhao, X., Yu, G., Zhang, W. 2022. "Lidocaine loaded nanostructured lipid carriers for prolonged local anesthesia: in vitro and in vivo studies". *Journal of Dispersion Science and Technology*, 43(5), 682–689.

Takenaga, F., Matsuyama, K., Abe, S., Torii, Y., Itoh, S. 2008. "Lipid and fatty acid composition of mesocarp and seed of avocado fruits harvested at northern range in Japan". *Journal of Oleo Science*, 57(11), 591–597.

Tamer, T. M., Hassan, M. A., Valachová, K., Omer, A. M., El-Shafeey, M. E. A., Mohy Eldin, M. S., Šoltés, L. 2020. "Enhancement of wound healing by chitosan/hyaluronan polyelectrolyte membrane loaded with glutathione: in vitro and in vivo evaluations". *Journal of Biotechnology*.

Tang, Y., Luo, L., Thong, Z., Chung, T. 2017. "Recent advances in membrane materials and technologies for boron removal". *Journal of Membrane Science*, 541, 434–446.

Tangboriboon, N. 2018. "Carbon and Carbon Nanotube Drug Delivery and Its Characterization, Properties, and Applications". *Nanocarriers for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, (October), 451–467.

Torres-Martinez, E. J., Cornejo Bravo, J. M., Serrano Medina, A., Pérez González, G. L., Villarreal Gómez, L. J. 2018. "A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices". *Current Drug Delivery*, 15(10), 1360–1374.

Touitou, E. 2002. "Drug delivery across the skin". *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2(7), 723–

733.

Tripathy, A., Pradhan, R. K. 2019. "Oxidative stress and role of glutathione s-transferase in brain health and ageing". Indian Journal of Public Health Research and Development.

Tucker, N., Hofman, K., Stanger, J., Staiger, M., Hamid, N. A., Torres, P. L. 2011. "The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995". International Symposium on New Frontiers in Fiber Materials Science, Conference Proceedings.

Van Der Maaden, K., Jiskoot, W., Bouwstra, J. 2012. "Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery". Journal of Controlled Release, 161(2), 645–655.

Velasco Barraza, R. D., Álvarez Suarez, A. S., Villarreal Gómez, L. J., Paz González, J. A., Iglesias, A. L., Vera Graziano, R. 2016. "Designing a low cost electrospinning device for practical learning in a Bioengineering Biomaterials course". Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica, 37(1), 7–16.

Villarreal-Gómez, L. J., Cornejo-Bravo, J. M., Vera-Graziano, R., Grande, D. 2016. "Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey". Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 27(2), 157–176.

Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., Dua, K. 2019. "Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system". Biomedicine and Pharmacotherapy, 109(October 2018), 1249–1258.

Walters, K. A. 2002. "*Dermatological and transdermal formulations*". *Dermatological and Transdermal Formulations*.

Wang, Q. L., Zhu, D. D., Chen, Y., Guo, X. D. 2016. "A fabrication method of microneedle molds with controlled microstructures". Materials Science and Engineering C, 65, 135–142.

Wang, Y., Chen, L., Ren, D. Y., Feng, Z. X., Zhang, L. Y., Zhong, Y. F., ... Tan,

- W. Q. 2022. "Mussel-inspired collagen-hyaluronic acid composite scaffold with excellent antioxidant properties and sustained release of a growth factor for enhancing diabetic wound healing". *Materials Today Bio*, 15.
- Williams, A. C., Barry, B. W. 2012.** "Penetration enhancers". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 128–137.
- Xu, Q., Torres, J. E., Hakim, M., Babiak, P. M., Pal, P., Battistoni, C. M., ... Liu, J. C. 2021.** "Collagen- and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical applications". *Materials Science and Engineering R: Reports*.
- Yang, D., Chen, M., Sun, Y., Jin, Y., Lu, C., Pan, X., ... Wu, C. 2021.** "Microneedle-mediated transdermal drug delivery for treating diverse skin diseases". *Acta Biomaterialia*, 121, 119–133.
- Yang, Q., Zhong, W., Xu, L., Li, H., Yan, Q., She, Y., Yang, G. 2021.** "Recent progress of 3D-printed microneedles for transdermal drug delivery". *International Journal of Pharmaceutics*, 593(August 2020), 120106.
- Yang, S., Liu, W., Liu, C., Liu, W., Tong, G., Zheng, H., Zhou, W. 2012.** "Characterization and Bioavailability of Vitamin C Nanoliposomes Prepared by Film Evaporation-Dynamic High Pressure Microfluidization". *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(11), 1608–1614.
- Yu, L., Madsen, F. B., Eriksen, S. H., Andersen, A. J. C., Skov, A. L. 2022.** "A reliable quantitative method for determining CBD content and release from transdermal patches in Franz cells". *Phytochemical Analysis*, 33(8), 1257–1265.
- Zeng, L., Zhang, P., Li, J., Yu, Q., Zheng, Y., Li, D. 2022.** "Study on combined technology of glutathione reduction and alkali solidification of chromium-containing sludge". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247.
- Zheng, K., Zhou, T., Xiao, E., Wei, Q., Zhao, C. 2023.** "Human collagen decorating microneedle patches for transdermal therapy". *Journal of Polymer Science*.