

**RUTİN HİDRAT İÇEREN NANOLİF YAPILI YARA ÖRTÜSÜ
GELİŞTİRİLMESİ, *İN VİTRO* VE *İN VİVO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sinan ÖZER

DOKTORA TEZİ

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Evrim AKYIL**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Haziran 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinan ÖZER'in "Rutin Hidrat İçeren Nanolif Yapılı Yara Örtüsü Geliştirilmesi, *İn Vitro* ve *İn Vivo* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 12/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Evrim AKYIL	
Üye	: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL	
Üye	: Prof. Dr. Rana ARSLAN	
Üye	: Doç. Dr. Serdar TORT	
Üye	: Doç. Dr. N. Başaran MUTLU AĞARDAN	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

RUTİN HİDRAT İÇEREN NANOLİF YAPILI YARA ÖRTÜSÜ GELİŞTİRİLMESİ, *İN VİTRO* VE *İN VİVO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinan ÖZER

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2023

Danışman: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ

Deri, vücudu zararlı dış etmenlere karşı korumanın yanında, çeşitli fizyolojik görevleri de bulunan bariyer bir organdır. Bunlara ek olarak insanın güzel, bakımlı ve çekici olma arzusunun birincil şartı sağlıklı bir deriye sahip olmaktır. Deri sağlığında, deri bütünlüğünün bozulmasına yol açacak şekilde oluşan değişikliklere yara adı verilir.

Yara iyileşmesi birbirini takip eden, oldukça karmaşık üç süreçten oluşmaktadır. Yaklaşık 48 saat süren ilk aşamada kan kaybının ve mikrobiyal bulaşın önlenmesi gibi acil cevaplar görülür. Ardından yaklaşık 10 gün süren ve iyileşme sürecinin ana odağı olan yeni doku oluşumu yani ikinci aşama başlar. Damarlar tekrar oluşur. Son olarak yeniden modelleme yani üçüncü aşama başlar ve ikinci aşamada gelişigüzel oluşan proteinik yapılar eski halini alır. Oksidatif stres gibi yara iyileşme mekanizmalarına engel olan etmenlerin ortadan kaldırılması, yara iyileşme hızını ve derinin ilk haline kusursuz şekilde geri dönme ihtimalini arttıracaktır. Sahip olduğu serbest radikal süpürücü ve kolajen üretimini destekleyici özelliklerden ötürü Rutin hidrat'ın yara iyileşme sürecinin özellikle birinci ve ikinci aşamalarında iyileşmeye pozitif etki gösterdiği bilinmektedir. Ancak sahip olduğu düşük çözünürlük gibi çeşitli dezavantajları Rutin hidrat'ın tedavideki potansiyelini azaltmaktadır. Nanolifler arttırılmış yüzey alanı sayesinde Rutin hidrat'ın düşük çözünürlük problemini ortadan kaldırmaya yardım ederken aynı zamanda gözenekli yapısı sayesinde rejenerasyona yardımcı olan hücre ilerlemesi için de gerekli iskelet yapısını oluşturma özelliği göstermektedir.

Bu tez çalışması kapsamında yara örtüsü olarak kullanılmaya uygun ağ yapısı gibi üstün özellikleri nedeniyle elektroegirme yöntemi ile rutin yüklü nanolif yara örtüleri geliştirilmiş, *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: Rutin, nanolif, yara örtüsü, Taguchi metodu, eksizyonel yara modeli

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANOFIBER PATCH FORMULATION CONTAINING RUTIN HYDRATE, *IN VITRO* AND *IN VIVO* EVALUATION

Sinan ÖZER

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Evrim YENİLMEZ

The skin is a barrier organ that has various physiological functions as well as protecting the body against harmful external factors. Besides, the primary condition of human desire to be beautiful, well-groomed and attractive is to have a healthy skin. Changes in skin health that lead to impaired skin integrity are called wounds.

Wound healing consists of three consecutive, highly complex stages. Firstly, inflammation stage with immediate responses such as prevention of blood loss and microbial contamination, occurs immediately and lasts approximately 48 hours. Then, the new tissue formation phase, which is the fundamental of wound healing, begins. Finally, the randomly formed proteinic structures are restored in remodelling phase. Elimination of factors that interfere with wound healing mechanisms, such as oxidative stress, will increase the rate of wound healing and the possibility of perfect recovery of the skin to its original state. It is known that rutin will have a positive effect on healing, especially in the first and second stages of the wound healing process, due to its free radical scavenging and collagen production-supporting properties. However, various molecular disadvantages such as low solubility reduce the therapeutic potential of Rutin hydrate. Thanks to its increased surface area, nanofibers help to eliminate the low solubility problem and show the necessary skeletal structure for cell progression, which helps regeneration thanks to its porous structure.

Within the scope of this thesis, Rutin-hydrate loaded nanofibers were developed by electrospinning method and evaluated *in vitro* and *in vivo* for use as a wound dressing.

Keywords: Rutin, nanofiber, wound dressing, Taguchi method, excisional wound model

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yürüttüğüm bu süreç boyunca ihtiyacım olan her türlü desteği sunan, her konuda ilkeli ve anlayışlı davranan, değerli bilgilerini ve yardımını esirgemeyen aynı zamanda beni çalışmalarım boyunca cesaretlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Evrim AKYIL'a,

Çalışmalarım sırasında deneyimlerine ve bilgilerine sıkça başvurduğum değerli hocalarım Prof.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Prof.Dr. Ebru BAŞARAN'a, Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a, Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e ve Doç Dr. Alper ÖZTÜRK'e,

In vivo çalışmalarda bilgi, tecrübe ve yardımlarından faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Rana ARSLAN'a ve çalışmalarda bana yardımcı olan Ecz. Ahmed ALSHAMEERY'e, Dr. Ecz. Elhem DALLALİ'ye, Araş. Gör. Cansu BÖLÜKBAŞ'a Ecz. İrem MOLLALISA'ya

FT-IR analizlerinde bana yardımcı olan Serkan LEVENT'e,

NMR analizlerinde yardımlarından faydalandığım Süleyman YUR'a

SEM ile yaptığım çalışmalarında yol gösteren Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

Doktora sürecim boyunca birlikte zaman geçirdiğim ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli bölüm arkadaşlarım Araş. Gör. Kadir AYKAÇ'a, Ecz. İrem NAMLI OKUYUCU'ya, Araş. Gör. Ceyda KÖROĞLU'na, Ecz. Kaan YALÇINKAYA'ya

Birbirimizden uzakta yaşasak da her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, maddi ve manevi her konuda bana destek olan, güvenen ve arkamda duran, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem, babam ve kardeşime,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sinan ÖZER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GÖRSELLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	2
2.1. Deri	2
2.1.1. Epidermis.....	5
2.1.2. Dermis	6
2.1.3. Hipodermis	7
2.2. Yara İyileşmesi	7
2.2.1. Enflamasyon	10
2.2.1.1. Hemostaz.....	10
2.2.1.2. Enflamasyon	11
2.2.2. Yeni doku oluşumu	12
2.2.3. Yeniden modelleme - olgunlaşma	14

2.3.	Yara Tedavisi.....	15
2.3.1.	Akut yaralar	16
2.3.2.	Kronik yaralar	16
2.3.2.1.	Yara takip sistemi (TIME).....	17
2.4.	Yara Örtüleri.....	17
2.4.1.	Nanolif yara örtüleri.....	18
2.4.1.1.	Elektroegirme.....	20
2.4.1.1.1.	Elektroegirme yönteminde kullanılan polimerler.....	23
2.4.1.1.2.	Elektroegirme yönteminde nanolif özelliklerini etkileyen parametreler	24
2.5.	Rutin	25
3.	GEREÇLER	28
3.1.	Kullanılan Maddeler	28
3.2.	Kullanılan Cihazlar.....	28
4.	YÖNTEM.....	30
4.1.	Önformülasyon Çalışmaları.....	30
4.1.1.	Etkin maddenin spektroskopik analizleri.....	30
4.1.1.1.	Dalga boyu belirleme.....	30
4.1.1.2.	Analitik yöntem geliştirme.....	30
4.1.1.3.	Analitik yöntem validasyonu	30
4.1.1.3.1.	Çalışma Aralığı.....	30
4.1.1.3.2.	Doğrusallık	31
4.1.1.3.3.	Doğruluk.....	31
4.1.1.3.4.	Kesinlik	31
4.1.1.3.5.	Duyarlılık.....	32
4.1.1.3.6.	Seçicilik.....	32

4.1.1.4.	<i>Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)</i>	32
4.1.1.5.	<i>Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)</i>	32
4.1.2.	Yardımcı maddelerin spektroskopik analizleri	32
4.1.2.1.	<i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)</i>	32
4.1.2.2.	<i>Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)</i>	33
4.1.3.	Çözünürlük.....	33
4.1.4.	Termal analizler	33
4.2.	Formülasyon Çalışmaları	33
4.2.1.	Elektroegirme yöntem parametrelerinin belirlenmesi.....	33
4.2.1.1.	<i>Taguchi Metodu</i>	33
4.2.2.	Etkin madde miktarının belirlenmesi	35
4.2.3.	Elektroegirme çözeltilerinin hazırlanması	35
4.2.4.	Çözeltilerin eğrilmesi.....	35
4.3.	Karakterizasyon Çalışmaları	35
4.3.1.	Fiziksel görünüm.....	36
4.3.2.	Mikroskobik analizler	36
4.3.2.1.	<i>Taramalı elektron mikroskobu (SEM)</i>	36
4.3.2.2.	<i>Lif çapının belirlenmesi</i>	36
4.3.2.3.	<i>Boncuk sayısının belirlenmesi</i>	36
4.3.3.	Spektroskopik analizler.....	36
4.3.3.1.	<i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)</i>	36
4.3.3.2.	<i>Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)</i>	36
4.3.4.	Termal analizler	37
4.3.5.	Mekanik özelliklerin belirlenmesi	37
4.3.6.	Antioksidan aktivite testi.....	37
4.3.7.	Etkin madde miktar tayini.....	37

4.3.8.	Etkin madde salım çalışması.....	38
4.4.	Kararlılık Çalışmaları	39
4.5.	<i>İn Vivo</i> Etkinlik Çalışması.....	39
5.	SONUÇLAR	42
5.1.	Önformülasyon Çalışmaları.....	42
5.1.1.	Etkin maddenin spektroskopik analizleri.....	42
5.1.1.1.	<i>Dalga boyu belirleme</i>	42
5.1.1.2.	<i>Analitik yöntem geliştirme</i>	42
5.1.1.3.	<i>Analitik yöntem validasyonu</i>	43
5.1.1.3.1.	<i>Çalışma aralığı</i>	43
5.1.1.3.2.	<i>Doğrusallık</i>	45
	<i>1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	45
	<i>10-100 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	46
5.1.1.3.3.	<i>Doğruluk</i>	47
	<i>1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	47
	<i>10-100 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	47
5.1.1.3.4.	<i>Kesinlik</i>	47
	<i>1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	47
	<i>10-100 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	48
5.1.1.3.5.	<i>Duyarluluk</i>	49
	<i>1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	49
	<i>10-100 µg.mL⁻¹ derişim aralığında</i>	49
5.1.1.3.6.	<i>Seçicilik</i>	49
5.1.1.4.	<i>Etkin maddenin fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi</i>	50
5.1.1.5.	<i>Etkin maddenin nükleer manyetik rezonans spektrometresi</i>	51
5.1.2.	Yardımcı maddelerin spektroskopik analizleri	51

5.1.2.1.	<i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi</i>	51
5.1.2.2.	<i>Nükleer manyetik rezonans spektrometresi</i>	52
5.1.3.	<i>Çözünürlük</i>	53
5.1.4.	<i>Termal analizler</i>	54
5.2.	<i>Formülasyon Çalışmaları</i>	54
5.2.1.1.	<i>Taguchi metodu deney örgüsü</i>	56
5.2.1.2.	<i>Formülasyonların hazırlanması ve değerlendirilmesi</i>	58
5.2.1.2.1.	<i>PVA nanolifler için Taguchi analiz sonuçları</i>	68
5.2.1.2.2.	<i>Eudragit® L100 nanolifler için Taguchi analiz sonuçları</i>	70
5.2.1.3.	<i>Optimum elektroegirme parametrelerinin seçimi</i>	72
5.3.	<i>Karakterizasyon Çalışmaları</i>	74
5.3.1.	<i>Fiziksel görünüş</i>	74
5.3.2.	<i>Mikroskopik analizler</i>	74
5.3.2.1.	<i>Taramalı elektron mikroskobu (SEM)</i>	74
5.3.2.2.	<i>Lif çapının belirlenmesi</i>	77
5.3.3.	<i>Spektroskopik analizler</i>	77
5.3.3.1.	<i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)</i>	77
5.3.3.2.	<i>Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)</i>	78
5.3.4.	<i>Termal analizler</i>	79
5.3.5.	<i>Tekstür profil analizi</i>	79
5.3.6.	<i>Antioksidan aktivite testi</i>	80
5.3.7.	<i>Etkin madde miktar tayini</i>	80
5.3.8.	<i>Etkin madde salım çalışması</i>	81
5.4.	<i>Kararlılık Çalışmaları</i>	83
5.4.1.	<i>Fiziksel görünüş</i>	83
5.4.2.	<i>Mikroskopik analizler</i>	83

5.4.3.	Spektroskopik analizler.....	85
5.4.4.	Termal analizler	88
5.4.5.	Antioksidan aktivite testi.....	88
5.4.6.	Etkin madde miktar tayini.....	88
5.5.	<i>İn Vivo</i> Etkinlik Çalışması.....	89
5.5.1.	Histolojik değerlendirme.....	97
6.	TARTIŞMA	104
6.1.	Önformülasyon Çalışmaları.....	104
6.2.	Formülasyon Çalışmaları	105
6.3.	Karakterizasyon Çalışmaları	109
6.4.	Kararlılık Çalışmaları	113
6.5.	<i>İn Vivo</i> Etkinlik Çalışması.....	114
7.	SONUÇ	117
	KAYNAKÇA.....	118
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Derinin Basit Anatomisi	3
Şekil 2.2. Epidermis katmanlarının şematik gösterimi	5
Şekil 2.3. Yara iyileşme aşamaları	9
Şekil 2.5. Elektroeğirme yöntemiyle nanolif üretiminin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.6. Elektroeğirme ile nanolif üretiminin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.7. Rutinin kimyasal yapısı	26
Şekil 4.1. Franz difüzyon hücresi	38
Şekil 5.1. Çalışma aralığı derişim eğrisi	44
Şekil 5.2. Doğrusallık eğrisi (1-10 µg.mL ⁻¹)	45
Şekil 5.3. Doğrusallık eğrisi (10-100 µg.mL ⁻¹)	46
Şekil 5.4. Seçicilik çalışmasına ait kromatogramlar.....	50
Şekil 5.5. Etkin madde FTIR spektrumu	50
Şekil 5.6. Etkin madde NMR spektrumu.....	51
Şekil 5.7. PVA polimerinin FTIR spektrumu	51
Şekil 5.8. Eudragit® L100 polimerinin FTIR spektrumu.....	52
Şekil 5.9. PVA polimerinin NMR spektrumu	52
Şekil 5.10. Eudragit® L100 polimerinin NMR spektrumu	53
Şekil 5.11. Rutin hidrat'ın DSC termogramı	54
Şekil 5.12. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (PVA ile hazırlanan)	68
Şekil 5.13. Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (PVA ile hazırlanan)	69
Şekil 5.14. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (Eudragit® L100 ile hazırlanan)	70

Şekil 5.15. Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (Eudragit® L100 ile hazırlanan)	71
Şekil 5.16. Karşılaştırmalı FTIR Spektrumları	77
Şekil 5.17. Karşılaştırmalı NMR Spektrumları	78
Şekil 5.18. Karşılaştırmalı DSC termogramları	79
Şekil 5.19. Formülasyonların test süresince gösterdiği mekanik değişiklikler	79
Şekil 5.20. Salım grafiği	82
Şekil 5.21. Kararlılık için FTIR spektrumları (5°C)	85
Şekil 5.22. Kararlılık için FTIR spektrumları (25°C)	86
Şekil 5.23. Kararlılık için FTIR spektrumları (40°C)	86
Şekil 5.24. Kararlılık için NMR spektrumları (4°C)	86
Şekil 5.25. Kararlılık için NMR spektrumları (25°C)	87
Şekil 5.26. Kararlılık için NMR spektrumları (40°C)	87
Şekil 5.27. Kararlılık için DSC termogramları	88
Şekil 5.28. F-PVA-Rutin için kararlılık etkin madde miktar tayini sonuçları	89
Şekil 5.29. F-EUD-Rutin için kararlılık etkin madde miktar tayini sonuçları	89
Şekil 5.30. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi için ANOVA istatistik sonuç grafiği	91

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Deri Anatomisinin Histolojik İncelenmesi	3
Görsel 2.2. Normal deri ile iyileşmiş derinin karşılaştırılması	14
Görsel 4.1. Etkin madde miktar tayini için kullanılan nanoliflerin alan hesapları	38
Görsel 4.2. Kararlılık ambalajı	39
Görsel 4.3. Ratların eksizyon bölgesinde yapılan dairesel işaretleme örneği	41
Görsel 4.4. Eksizyonel model sonrası tedavi uygulanma örneği	41
Görsel 5.1. Rutin hidrat'ın spektrum taraması	42
Görsel 5.2. Deneme çalışmalarının SEM görüntüleri	56
Görsel 5.3. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 1	59
Görsel 5.4. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 2	60
Görsel 5.5. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 3	61
Görsel 5.6. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 4	62
Görsel 5.7. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 1	63
Görsel 5.8. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 2	64
Görsel 5.9. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 3	65
Görsel 5.10. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 4	66
Görsel 5.11. PVA miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametrelerin SEM görüntüleri	72
Görsel 5.12. Eudragit® L100 miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametrelerin SEM görüntüleri	73
Görsel 5.13. F-PVA-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (30Kx büyütme)	75
Görsel 5.14. F-PVA-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (200Kx büyütme)	75
Görsel 5.15. F-EUD-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (30Kx büyütme)	76

Görsel 5.16. F-EUD-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (220Kx büyütme)	76
Görsel 5.17. Kararlılık için SEM görüntüleri.....	84
Görsel 5.18. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi kontrol grubu görselleri	92
Görsel 5.19. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi pozitif kontrol grubu görselleri.....	93
Görsel 5.20. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi F-PVA grubu görselleri	94
Görsel 5.21. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi F-PVA-Rutin grubu görselleri	95
Görsel 5.22. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi F-EUD grubu görselleri	96
Görsel 5.23. <i>İn vivo</i> etkinlik deneyi F-EUD-Rutin grubu görselleri.....	97
Görsel 5.24. Hematoksilen & Eozin boyama sonucu günlere göre elde edilen görüntüler	98
Görsel 5.25. Masson tricrom boyama sonucu 14. günde elde edilen görüntüler	99

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Nanolif üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	19
Tablo 2.2. Elektroegirme parametrelerinin nanolif üretimine etkileri	24
Tablo 4.1. PVA ile hazırlanan nanoliflerin Taguchi tasarımı için faktör ve seviyeleri .	34
Tablo 4.2. Eudragit® L100 ile hazırlanan nanoliflerin Taguchi tasarımı için faktör ve seviyeleri.....	34
Tablo 5.1. UPLC Çalışma koşulları	43
Tablo 5.2. Çalışma aralığı sonuçları	43
Tablo 5.3. Doğrusallık sonuçları (1-10 µg.mL ⁻¹).....	45
Tablo 5.4. Doğrusallık eğrisinin değerleri (1-10 µg.mL ⁻¹)	45
Tablo 5.5. Doğrusallık sonuçları (10-100 µg.mL ⁻¹).....	46
Tablo 5.6. Doğrusallık eğrisinin değerleri (10-100 µg.mL ⁻¹)	46
Tablo 5.7. Doğruluk çalışması sonuçları (1-10 µg.mL ⁻¹)	47
Tablo 5.8. Doğruluk çalışması sonuçları (10-100 µg.mL ⁻¹)	47
Tablo 5.9. Kesinlik çalışması sonuçları (1-10 µg.mL ⁻¹)	47
Tablo 5.10. Kesinlik çalışması sonuçları (10-100 µg.mL ⁻¹)	48
Tablo 5.11. Saptama ve tayin sınırları (1-10 µg.mL ⁻¹)	49
Tablo 5.12. Saptama ve tayin sınırları (10-100 µg.mL ⁻¹)	49
Tablo 5.13. Rutin hidrat'ın farklı çözücülerdeki çözünürlük değerleri	53
Tablo 5.14. Deneme çalışmalarının bileşen miktarları	54
Tablo 5.15. PVA kullanılan formülasyonlar için bileşen miktarları	57
Tablo 5.16. Eudragit® L100 kullanılan formülasyonlar için bileşen miktarları.....	57
Tablo 5.17. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin lif çapları	67
Tablo 5.18. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin lif çapları.....	67

Tablo 5.19. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerde 10kx büyütme ile birim alandaki boncuk sayıları	68
Tablo 5.20. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerde 10kx büyütme ile birim alandaki boncuk sayıları	68
Tablo 5.21. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (PVA ile hazırlanan)	68
Tablo 5.22. Nanolif çapı için varyans analiz sonuçları (PVA ile hazırlanan).....	69
Tablo 5.23. Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (PVA ile hazırlanan)	69
Tablo 5.24. Boncuk sayısı için varyans analiz sonuçları (PVA ile hazırlanan).....	70
Tablo 5.25. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (Eudragit® L100 ile hazırlanan)	70
Tablo 5.26. Nanolif çapı varyans analiz sonuçları (Eudragit® L100 ile hazırlanan)	71
Tablo 5.27. Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (Eudragit® L100 ile hazırlanan)	71
Tablo 5.28. Boncuk sayısı için varyans analiz sonuçları (Eudragit® L100 ile hazırlanan)	72
Tablo 5.29. PVA miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametreler	72
Tablo 5.30. Eudragit® L100 miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametreler	73
Tablo 5.31. PVA ile hazırlanan nanoliflerin optimum elektroğirme parametreleri	73
Tablo 5.32. Eudragit® L100 ile hazırlanan nanoliflerin optimum elektroğirme parametreleri	74
Tablo 5.33. Optimum formülasyonların lif çapları	77
Tablo 5.34. Tekstür profilinin matematiksel değerleri.....	80
Tablo 5.35. Karşılaştırmalı antioksidan aktivite testi sonuçları	80
Tablo 5.36. F-PVA-Rutin etkin madde miktar tayini	80
Tablo 5.37. F-EUD-Rutin etkin madde miktar tayini	81

Tablo 5.38. Zamana karşı dozaj şeklinden salınan kümülatif etkin madde miktarı.....	81
Tablo 5.39. Salım profilinin matematiksel modellere uyumu.....	82
Tablo 5.40. Salım ortamında etkin madde kararlılığı (% Geri kazanım).....	83
Tablo 5.41. Kararlılık çalışmalarının özet tablosu	83
Tablo 5.42. Kararlılık için lif çapı sonuçları	84
Tablo 5.43. Kararlılık için antioksidan aktivite sonuçları.....	88
Tablo 5.44. Yara alanları.....	90
Tablo 5.45. 3. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları	100
Tablo 5.46. 7. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları	101
Tablo 5.47. 10. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları	102
Tablo 5.48. 14. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°	Derece
µg	Mikrogram
¹ H	Hidrojen
AIC	Akaike ölçütü
BDS	Bidistile su
C	Selsius
CDST	Klinik karar destek aracı
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMF	Dimetil formamit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EtOH	Etanol
EUD	Eudragit® L100
FK	Fiziksel karışım
Form.	Formülasyon
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
G	Gauss
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konsülü
i.p.	İntraperitonal
İTS	İlaç taşıyıcı sistem
K, k	Bin
kg	Kilogram
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MCP	Monosit kemoatraktan protein
MeOH	Metanol
mg	Miligram

mL	Mililitre
mm	Milimetre
NET	Nötrofil hücre dışı tuzakları
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
NO	Nitrik oksit
Ort	Ortalama
PBS	Fosfat tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PLA	Polilaktik asit
ppm	Milyonda kısım
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
R ²	Determinasyon katsayısı
RH	Bağıl nem
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Rt	Alıkonma süresi
S/N	Sinyal / gürültü
SE	İkincil elektron
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SH	Standart hata
sn	Saniye
SS	Standart sapma
T	Geçirgenlik
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
UPLC	Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
UV	Kızılötesi
V	Volt

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yara en basit tanımıyla deri ya da mukoza bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi, enflamasyon, yeni doku oluşumu ve yeniden modelleme - olgunlaşma gibi çeşitli hücresel ve biyokimyasal olayları içeren karmaşık bir süreçtir. Potansiyel yara iyileştirici özellikleri araştırılan doğal bileşikler arasında, flavonoidler antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle ilgi görmektedir. Birçok bitkide bulunan bir flavonoid olan Rutinin de yara iyileşmesini başarılı bir şekilde hızlandırdığı bilinmektedir.

Son yıllarda, nanolif yapılı yara örtüleri, benzersiz fiziksel, mekanik ve biyolojik özelliklerinden dolayı geleneksel yara örtülerine umut verici alternatifler olarak ortaya çıkmıştır. Nanolif yara örtüleri, enfeksiyonu önlemek, fazla eksüdanın uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak ve hücre çoğalmasını desteklemek için koruyucu bir bariyer sağlayabilmektedir. Ayrıca, nanoliflerin geniş yüzey alanı ve yüksek gözenekliliği, çeşitli etkin maddelerin, büyüme faktörleri ve peptitler gibi biyolojik moleküllerin taşınmasını sağlamaktadır.

Bu tezde, etkin madde olarak Rutin hidrat içeren nanolif yara örtülerinin geliştirmesi amaçlanmıştır. Nanolif yara örtülerinin elde edilmesi için Polivinil alkol (PVA) ve Eudragit® L100 olmak üzere iki farklı polimer kullanılmıştır. PVA, ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan, biyolojik olarak uyumlu bir polimerdir. Eudragit L100 ise etkin madde salımını kontrol etmek için kullanılabilen, pH'a duyarlı ve biyolojik olarak parçalanmayan bir polimerdir.

Tez kapsamında, Rutin hidrat yüklü nanolif yara örtüsü formülasyonları geliştirilmiş ve elde edilen nanolifler *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* çalışmalar kapsamında, nanoliflerin fizikokimyasal ve mekanik özelliklerinin yanında etkin madde salım profilleri ve anti oksidan aktivitesi de incelenmiştir. *In vivo* çalışmalar kapsamında ise eksizyonel yara modeli oluşturulan ratlar üzerinde iyileşme oranları kontrol grubu kullanılarak değerlendirilmiştir.

Özetle, tez çalışmamız Rutin hidrat yüklü nanolif yara örtüleri geliştirmek için yeni bir yaklaşım sunarken yara tedavisinde etkili olan potansiyelleri hakkında bilgi vermektedir.

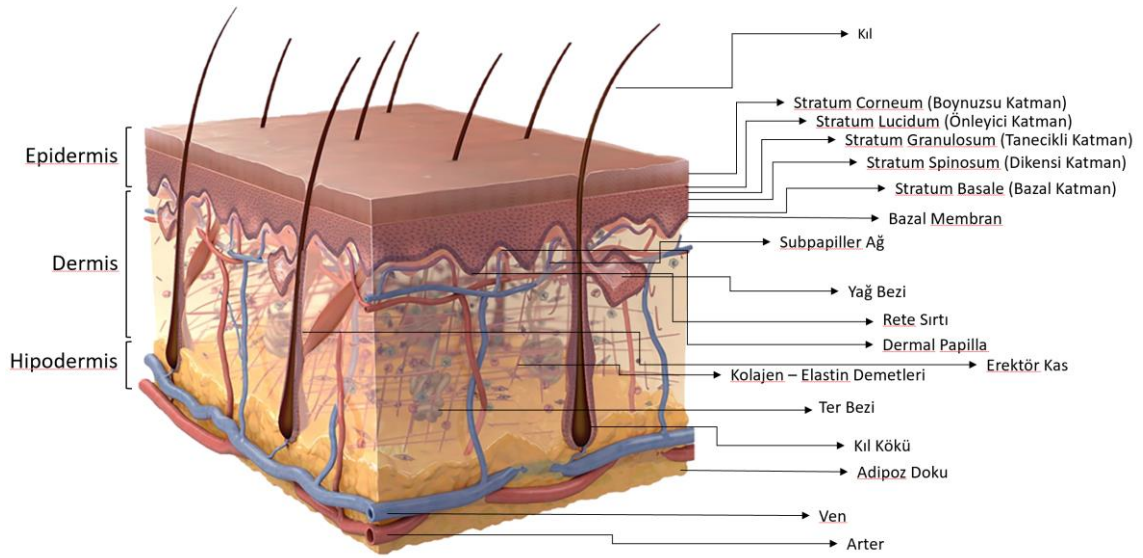
2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Deri

İnsan vücudunun en büyük organıdır. Yaklaşık 2 m² yüzey alanı, 4 kg ağırlığı, 1,5-4 mm arasında değişen kalınlığı ve hidrofobik özelliği ile deri, yalıtım ve fiziksel direnç sağlayarak vücudu çevresel strese koruyan bir bariyerdir (Falco, Pisano, ve Luca, 2014; Fenner ve Clark, 2016; Gilaberte vd., 2016). UV radyasyon, fiziksel ve kimyasal travmalar, patojenler gibi zararlı dış etmenlere, transepidermal su ve elektrolitlerin kaybı gibi olası iç etmenlere karşı bariyer görevinin yanı sıra deri, vücut ısını düzenleme, duyu algı, bazı maddelerin emilimi, yağ, su depolama, D vitamini sentezleme ve depolama, immünolojik reaksiyonlar ve hormonların sentezi gibi birçok diğer görevi de üstlenmektedir (Gilaberte vd., 2016; McKnight, Shah, ve Hargest, 2022; Sevgi Akarsu Özlem Özbağcıvan, 2016). Tüm bunlara ek olarak deri, enfeksiyonları önleyen antimikrobiyal peptidler, biyolojik etkileri olan hormonlar, nöropeptitler ve sitokinleri de üretir (Leis vd., 2019).

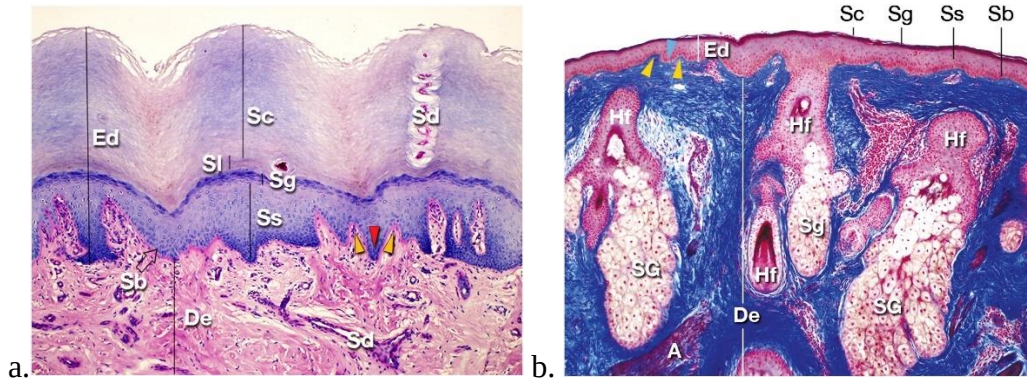
İnsan derisi kendisini oluşturan hücre ve doku tiplerine göre katmanlara ayrılmıştır. Hücreler her katman içerisinde bağ dokuları aracılığıyla birbirine bağlanarak katmana özgü dizilişler oluştururlar. Cildin 1 santimetre karelik alanı ortalama 5 kıl kökü 6.000.000 hücre, 15 yağ, 100 ter bezi, 200 ağrı reseptörü, 12 soğuk ve 2 sıcak olmak üzere 14 ısı reseptörü, 400 cm sinir lifi ve iç katmanlarında 100 cm kan damarı içerir. Deri, vücudun farklı bölgelerinde, bölgenin ihtiyacına göre modifikasyonlara sahiptir. Avuç içi ve ayak altında deri kılsızken vücudun geri kalanındaki derinin tamamında kıl folikülleri bulunur. Ayrıca kılsız bölgeler diğer bölgelere oranla daha sıkı ve kalın bir epidermise (Görsel 2.1) sahiptir ve enkapsüle duyu reseptörleri bu bölgelerde daha yoğundur (Falco vd., 2014; Yadav vd., 2019).

Deri, Şekil 2.1’de görüldüğü gibi epidermis ve dermis olarak adlandırılan iki ana katman ve dermisin altında bu katmanlara destek olan, çoğunluğunu adipositlerin (yağ hücreleri) oluşturduğu hipodermisten meydana gelmektedir. Deri ve deri uzantıları aynı zamanda saç folikülleri, tırnaklar, yağ ve ter bezlerini içeren türev yapılarını da içerir (Falco vd., 2014; Fenner ve Clark, 2016; Gilaberte vd., 2016; Leis vd., 2019).



Şekil 2.1. Derinin Basit Anatomisi (Abdo, Sopko, ve Milner, 2020)

Deriyi oluşturan tabakalardan epidermis ektoderm kökenlidir ve genel olarak keratinositlerden oluşur. Epidermisi, hipodermise bağlayan dermis ise mezoderm kökenlidir ve epidermin aksine genel olarak deriye sağlamlık ve esneklik sağlayan ekstraselüler matriks proteinleri kolajenden ve daha az miktardaki elastinden meydana gelir. Kolajen ve elastin proteinlerini oluşturan fibroblastlar ise bu yapıların arasında dağınık olarak bulunur (Arda, Göksüğü, ve Tüzün, 2014; Biggs vd., 2020; Uysal, Oltulu Duygu, ve Özdil, 2016; Yadav vd., 2019).



Görsel 2.1. Deri Anatomisinin Histolojik İncelenmesi (Arda vd., 2014)

Ed, epidermis; De, dermis; Sc, boynuzsu katman (*stratum corneum*); Sl, önleyici katman (*stratum lucidum*); Sg, tanecikli katman (*stratum granulosum*); Ss, dikensi katmanı (*stratum spinosum*); Sb, bazal katmanı (*stratum basale*); Hf, kıl folikülü; Sg, yağ bezleri; Sd, ter bezi kanalı; A, erektör kaslar; Kırmızı ve mavi oklar rete sırtları; sarı oklar dermal papillalar

Görselde (a- Ayak başparmağının volar yüzeyinin uzunlamasına kesitinin ışık mikrofrafı, b- Yanağın uzunlama kesitinin ışık mikrofrafı) epidermisin ayak tabanı gibi bölgelerde kalınlaştığı ve bu bölgelerde kıl folikülü bulunmadığı görülmektedir (Arda vd., 2014).

Vücudun tüm organları gibi deri de yaşlandıkça çeşitli değişikliklere uğrar. Bebeklikte nispeten daha ince, su kaybına daha yatkın, enfeksiyon ve diğer zararlı uyarılara karşı daha zayıf bir bariyer işlevine sahipken, yetişkinlikte bu işlevlerin gelişmesiyle cilt fizyolojisi, çevresel etkilere karşı optimum korumayı sağlamaya başlar (McKnight vd., 2022).

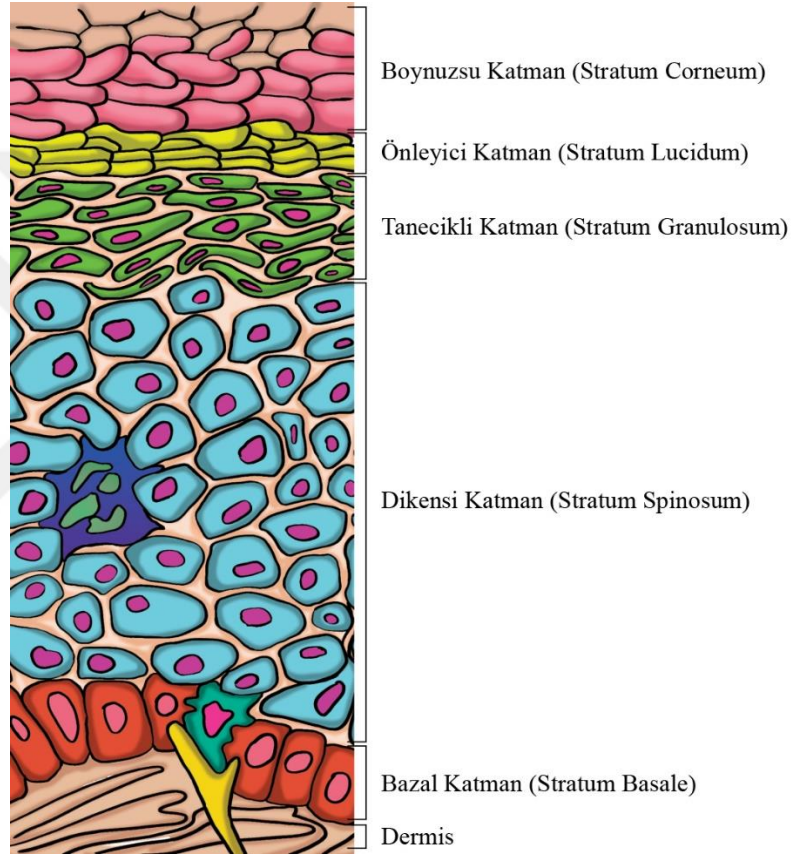
Yaşlanmanın insan derisi üzerinde gözle görülür, belirgin bir etkisi vardır. Yaşamın yaklaşık otuzuncu yılından itibaren epidermis incelmeye başlar, dermisin kolajen içeriğinde her yıl %1 oranında azalmalar meydana gelir. Her ne kadar UV ışınlarının kolajen sentezinde yıkıcı bir etkisi olsa da bu %1'lik azalma UV ışınlarına maruz kalınmayan bölgelerde de görüldüğü için UV ışınlarından bağımsız olarak gerçekleşmektedir (McKnight vd., 2022).

Yaşlanmayla birlikte epidermal kök hücre belirteçlerinde azalmalar görülmesi ve yaşlı insan derisinden izole edilen keratinositlerin genç insan derisinden izole edilenlere göre daha kısa replikatif ömre sahip olması yaşlanmanın, yara onarımını doğrudan engellemese de yara iyileşmesi süreçlerinin tamamında süreci negatif yönde etkileyen bir etmen olduğunu göstermektedir (Rittie ve Fisher, 2015).

Deri sahip olduğu çeşitli mekanizmalar sayesinde mekanik kararlılığa sahiptir. Birbirine komşu keratinositlerin desmozomlar ve tonofilament ağ örgüsü ile birbirlerine bağlanması epidermal kararlılık sağlayan örneklerden biridir. Ayrıca epidermis ve dermis arasındaki dalgalı bağlantı da mekanik kararlılık sağlayan bir diğer oluşum olarak gösterilebilir. Epidermis, dermis içerisine uzanan epidermal çıkıntıların (rete sırtları) ve epidermise çıkıntı yapan dermal halkaların (dermal papilla) birbirine kenetlenmesiyle dermise bağlanır; böylece katmanlar arasında bağ oluşturan yüzey alanı arttırılır (Abdo vd., 2020). Deri dikey kesitle incelendiğinde ortaya çıkan ve rete sırtları olarak adlandırılan bu özelleşmiş dalgalı bağlantılar, deriyi vücut içi yapıların hareketleri nedeniyle oluşabilecek kesme travmasına (*shear trauma*) karşı koruyan bir mekanik dayanıklılık sağlar (Falco vd., 2014).

Deri, kendi katmanlarının dışında büyük oranda steril olan vücudun iç kısmı ile, mikrobiyal olarak kontamine olmuş çevre arasında koruyucu bir bariyer olması nedeniyle çeşitli ve aktif bir mikrobiyata ile kolonize edilmektedir (Egert ve Simmering, 2016). Bağırsaklarımızdakilere benzer şekilde bu mikrobiyata da istilacı patojenlere karşı korunmada, bağışıklık sistemimizin güçlendirilmesinde ve doğal ürünlerin parçalanmasında önemli rollere sahiptir (Byrd, Belkaid, ve Segre, 2018).

2.1.1. Epidermis



Şekil 2.2. Epidermis katmanlarının şematik gösterimi (Yousef, Alhajj, ve Sharma, 2017)

Epidermis, yassı yapıda epitel katmanlardan oluşan, derinin en dış tabakasıdır (Montagna, Kligman, ve Carlisle, 2012). Kalınlığı genellikle 0,05 mm (göz kapağı) ile 1,5 mm (avuç içi ve ayak tabanı) arasında değişmektedir. Epidermiste yer alan hücrelerin büyük kısmını keratinositler oluşturur. Keratinositler ince deride dört, kalın deride beş tabaka şeklinde sıralanarak epiderminin yapısını oluştururlar. Epidermiste ayrıca keratinositlerin aralarına dağılmış biçimde lenfositler, Langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücreleri de yer alır (Arda vd., 2014; Fenner ve Clark, 2016; Rousso ve Bassiri-Tehrani, 2015).

Epidermis, dermis ile arasında yer alan bazal membrandan başlayarak, içten dışa doğru sırasıyla bazal katman (*stratum basale*), dikensi katman (*stratum spinosum*), tanecikli katman (*stratum granulosum*), önleyici katman (*stratum lucidum*) ve boynuzsu katmandan (*stratum korneum*) oluşur (Şekil 2.2). Epidermis kendisini yaş, vücut bölgesi gibi faktörlere göre değişen 15-30 günlük bir süreçte yeniler. Bazal katmanda bölünen keratinositler korneum katmanına doğru ilerleyerek epidermin kendisini yenilemesine yardımcı olur. Bu yenilenme sürecinde üst katmanlara doğru ilerleyen keratinositler yassılaşır ve hücre çekirdekleri de sitoplazmada gerçekleşen bu yassılaşmaya ayak uydurarak yassılaşırlar. Bir süre sonra çekirdekler kaybolarak hücreler canlılığını yitirir. Bu süreç nedeniyle her bir katmanda keratinositlerin katmana özgü şekilleri vardır. Görsel 2.1’de görüldüğü gibi önleyici katman kalın deride yer alırken ince deride kaybolur. (Arda vd., 2014; Montagna vd., 2012; Rouso ve Bassiri-Tehrani, 2015; Akarsu ve Özbağcıvan, 2016).

Epidermis ile dermis arasında, *lamina lucida* ve *lamina densa* olarak ikiye ayrılan bazal membran bulunur. *Lamina lucida* doğrudan bazal keratinositlerin altında yer alırken, daha kalın olan *lamina densa* doğrudan dermis ile temas halindedir. Epidermis avasküler yapısı nedeniyle derminin, epidermise yakın papiller bölgesinde yer alan subpapiller damar ağından (Şekil 2.1) *lamina lucida* ve *lamina densa* aracılığıyla difüzyon ile beslenir (Wortsman vd., 2013).

2.1.2. Dermis

Epidermis ile hipodermis arasında yer alan fibröz ve elastik cilt tabakasıdır. Cildin dayanıklılığını, gücünü ve esnekliğini sağlar. Kalınlığı 0,3 mm (göz kapağı) ile 3 mm (sırt) arasında değişiklik gösterir. Bu nedenle epidermise göre çok daha kalın bir yapıdadır. Papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki farklı katmandan oluşur (Fenner ve Clark, 2016; Gilaberte vd., 2016; Mohamed ve Hargest, 2022).

Dermis, epidermise hem besleyici hem de yapısal destekte bulunur. Esas olarak bağ dokusundan oluşan dermiste yoğun olarak yer alan lenfatik sistem uzantıları, sinir dokuları ve kan damarları deriye beslenme ve duyuşsal algılama özelliklerini kazandırır. Dermisi oluşturan esas hücreler fibroblastlardır. Ancak bunların yanında fibrositler, kan ve lenf damarlarının yapısal hücreleri gibi stromal hücreleri ayrıca miyeloid ve lenfoid bağışıklık hücrelerini de bulundurulur. Epidermin aksine hücreler arası matriks bileşenleri

oldukça fazla bulunur. Bu bileşenlerin yaklaşık %70'ini cildin sağlamlığından sorumlu kolajen proteini oluştururken, kalan kısmını cilde esneklik veren elastin ve bu proteinleri bir arada tutan ve proteoglikanları içeren bir mukopolisakkarit oluşturur. Proteoglikanlar dermisin viskoz yapısından ve hidrasyonundan sorumlu proteinlerdir. Ayrıca kıl kökü, yağ ve ter bezleri gibi çeşitli deri bileşenleri bu tabakada yer alır (Fenner ve Clark, 2016; Mohamed ve Hargest, 2022).

2.1.3. Hipodermis

Deri altı dokusu olarak adlandırılan hipodermis tabakası, gevşek bir bağ dokusu arasına yerleşmiş adipositlerden oluşan bir yağ dokusu olarak da bilinir. Dermisin retiküler katmanının altında yer alır ve genişliği vücut bölgesi, kişinin beslenme alışkanlıkları gibi parametrelere göre değişiklik gösterir. Vücut için ısı yalıtımı, yedek enerji kaynağı ve mekanik koruma sağlayan deri katmanıdır. Ayrıca derinin, altta yer alan iskelet ve kas dokuları üzerinde kayarak hareket etmesine olanak sağlar. Hipodermiste vasküler sistemin geniş bir kılcal ağı bulunur. Bu nedenle enjeksiyon için de sıkça tercih edilen bir bölgedir. Ek olarak, aromataz enzimi ile androstenedionu estrona dönüştürmesi, tokluk hormonu olarak bilinen leptini salgılaması nedeniyle de endokrin bir organ olarak kabul edilir (Arda vd., 2014; Gilaberte vd., 2016).

2.2. Yara İyileşmesi

Canlıların bozulan organ fonksiyonlarını, basit doku onarımlarından tam organ yenilenmesine kadar çeşitli şekillerde tamir etme ve eski haline getirebilme yetenekleri doğada seçici bir avantaj ve hayatta kalma faktörü olmuş ve olmaya devam etmektedir. Tek hücrelilerden, gelişmiş organizmalara kadar tüm canlılarda yaşamın en önemli destekçilerinden birisi olan sağlam bir dış kılıfa sahip olma ve bu sağlamlığı devam ettirebilme de doğada hayatta kalabilmenin gerekliliğidir (Reinke ve Sorg, 2012).

Yara, basitçe normal anatomik yapıdaki bir dokunun fonksiyon kaybı olacak şekilde bütünlüğünün bozulması durumudur. İnsanlar için oldukça değerli olan bu dış kılıfın eski haline getirilme süreci olan yara iyileşmesi ise birçok hücre tipinin ve ürünlerinin iş birliği sonucu bir dizi moleküler ve hücresel olaydan oluşan oldukça karmaşık bir biyolojik süreçtir. Yetişkinlerde yara iyileşme süreci yara izi (skar) adı verilen fibrotik bir doku kütleline yol açar. Bu süreç özellikle yaşlanma, diyabet, orak hücre hastalığı gibi yara iyileşmesini negatif etkileyen etmenlerin varlığında daha uzun

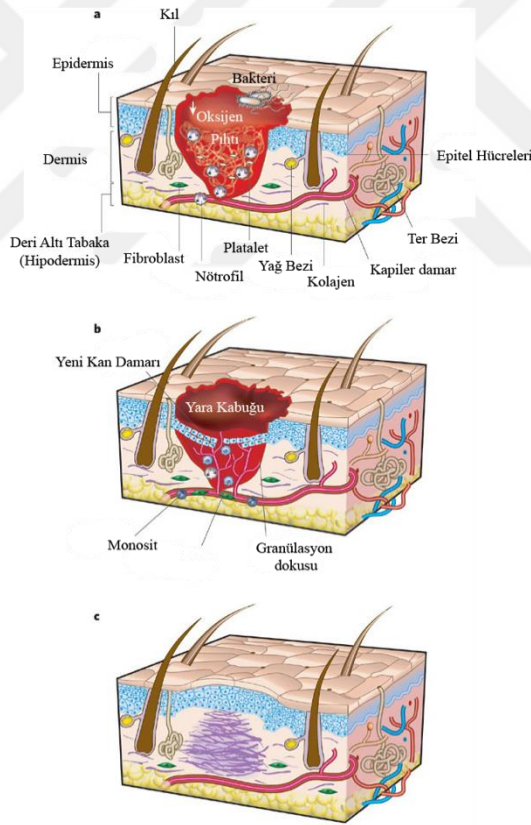
sürelî yara izleri bırakmaktadır. Bunun aksine fetal dönemde oluşmuş yaralar fibroz oluşmadan rejenerasyon ile iyileşmektedir. Ayrıca diğêr bazı canlıların yetişkin yaşamları boyunca da rejenerasyon yani dokuyu yeniden oluşturma yeteneklerini sürdürmeleri göz önüne alındığında yara iyileşmesinde fibroz oluşumunu azaltarak doku yenilemenin sağlanabileceğı yöntemler tartışılmalıdır (Gonzalez vd., 2016; Gurtner vd., 2008; Reinke ve Sorg, 2012; Rodrigues vd., 2019).

Bir yaralanma meydana geldikten sonraki anlarda, doku bütünlüğü ve homeostazın yeniden sağlanması için, çeşitli hücre içi ve hücreler arası yollar oldukça koordineli bir şekilde aktive olur. Bağışıklık sisteminin hücresel bileşenleri, kan pıhtılaşma faktörleri ve enflamatuar yollar aktive edilir. Bağışıklık hücreleri (nötrofiller, monositler, lenfositler ve dendritik hücreler), endotel hücreleri, keratinositler ve fibroblastlar dahil olmak üzere birçok hücre tipi, gen ekspresyonunda ve fenotipinde belirgin değişikliklere uğrayarak hücre çoğalmasına, farklılaşmasına ve göçüne yol açar. Bu yanıt başarılı olur ve yaralanma organizmanın ölümüyle sonuçlanmazsa, yara iyileşme süreci hücre proliferasyonuna karşılık gelen rejenerasyon ve bununla birlikte kolajen birikiminin getirdiğı özel skar yapılarının oluşması ile sonuçlanır (Gonzalez vd., 2016; Gurtner vd., 2008).

Yara, şeker hastalığı gibi kronik, kalp krizi gibi akut bir hastalığın sonucu olarak veya kesilme, yanma, delinme gibi dışarıdan gelen bir müdahale ile oluşabilir. Etiyolojisi her ne olursa olsun, yaraların iyileşmesi benzer süreçler üzerinden ilerler. Çoğu durumda, iyileşme sonucu derinin bariyer fonksiyonu ve gerilme mukavemeti ilk haline yakın duruma erişmektedir. Bununla birlikte, orijinal cilt yapısının tekrar elde edilebildiğı rejeneratif bir süreç olan doğum öncesi yara iyileşmesinden farklı olarak, yetişkinlerde yara iyileşmesi, yara için hızlı bir yama görevi gören fibrotik bir skar ile sonuçlanır. Bu yabancı oluşumun ilgili organ fonksiyonlarını engelleyici yönde etkileri olmaktadır. Deri üzerindeki esnekliğin azalması, his kaybı gibi hayati önem taşımayan sonuçlar ortaya çıkartırken, kalp krizi gibi durumlarda oluşan miyokardiyal skar dokusu konjestif kalp yetmezliği ile sonuçlanabilir. Yine karaciğer sirozu ve bazı akciğer fibroz formlarının, toksin aracılı hasara karşı fibrotik yanıtlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Gurtner vd., 2008; Rodrigues vd., 2019).

Skar dokusunun oluşma mekanizması tam olarak belirlenemese de fetal dönemde skar dokusunun oluşmamasının bağışıklık sisteminin olgunlaşmamış olmasıyla

ilişkilendirilmesi nedeniyle bağışıklık sistemi kaynaklı olduğunu savunan hipotezlerin yanında yara üzerinde oluşan mekanik strese karşı verilen hücresel yanıt kaynaklı olduğu düşüncesi de yer almaktadır. Evrimsel gelişmede skar dokusunun oluşma nedeninin enfeksiyöz mikroorganizmaların yarayı istila etmesini önlemek ve daha büyük dokuların devam eden mekanik deformasyonunu engellemek olduğu düşünülmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda omurilik yaralanması sonucu nöronlar büyümesine rağmen glial hücrelerin skar oluşumunu stimüle etmesi sonucu iyileşme engellenmektedir. Ancak skar oluşumunu engelleyecek şekilde yapılan kesiler sonucu nöronların tekrar bağlandığı görülmektedir. Anlaşıldığı gibi fibrotik iyileşmenin, rejeneratif bir sürece dönmesini sağlayacak bir fibrotik yanıtı yavaşlatma manipülasyonu, kök ve öncül (progenitör) hücrelere, rejenerasyon ile yara tedavisini sağlayacak yeterli zamanı verecektir (Gurtner vd., 2008; Rodrigues vd., 2019; Singh, Young, ve McNaught, 2017).



Şekil 2.3. Yara iyileşme aşamaları (a- enflamasyon, b- yeni doku oluşumu ve c- yeniden modelleme) (Gurtner vd., 2008)

Deride gerçekleşen bir yaralanmaya karşı insan vücudunun yanıtı enflamasyon, yeni doku oluşumu (*proliferasyon*) ve yeniden modelleme (*remodelling*) olmak üzere üç temel aşamadan oluşur. Bazı çalışmalarda enflamasyon öncesi kanamanın durması gibi

dengeleme olayları hemostaz adı altında dördüncü bir aşama olarak literatüre geçmiştir. Ancak bu tez kapsamında hemostaz aşaması enflamasyonun bir bölümü olarak ilk aşamaya dahil edilecektir. Yara onarımının ilk aşaması doku hasarından hemen sonra ortaya çıkar. Bu aşamada pıhtılaşma ajanları, enflamasyon metabolizması ve bağışıklık sisteminin bileşenleri, kan ve sıvı kayıplarını engellemek, ölü ve devitalize (ölmekte olan) dokuları ortadan kaldırmak ve enfeksiyonu önlemek için devreye girer. İkinci aşama iyileşme sürecinin ana odağıdır. Yara yüzeyinin kaplanması, granülasyon dokusunun oluşumu ve vasküler ağın restore edilmesini kapsar. Keratinositler aracılığıyla epitelizasyon yeniden sağlanır. Fibroblastlar ve miyofibroblastlar, esas olarak olgun yaranın büyük kısmını oluşturan kolajeni ve hücre dışı matris üretir. Damarlar tekrar oluşmaya başlar. Bu sürecin sonunda yara bir fermuar gibi kapanır (Gurtner vd., 2008; Reinke ve Sorg, 2012).

2.2.1. Enflamasyon

Doku hasarından hemen sonra hızla başlayan aşamadır. Hemostaz ile başlayan ve enflamasyon ile devam eden vücudun ilk müdahalesi olarak tanımlanabilir.

2.2.1.1. Hemostaz

Vasküler hasardan sonra kanamayı durduran yara iyileşmesinin başlangıcıdır. Vazokonstriksiyon, birincil hemostaz ve ikincil hemostaz olmak üzere üç adımda gerçekleşir. Bu süreçte yer alan kritik hücre trombosit, kritik matris bileşeni ise fibrinojendir. Normal durumda, endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit (NO) ve prostasiklin gibi anti-trombotik ajanlar, trombositlerin sağlıklı damardaki endotel hücre tabakasına yapışmasını ve birbirleriyle bir kümelenme oluşturmalarını engelleyerek damar içerisinde serbestçe dolaşmasını sağlarlar. Ancak endotel yapıda oluşan bir yaralanma durumunda kanda bulunan trombositler hızlıca hasarlı bölgede kümelenir ve ardından fibrinojenlerden oluşan fibrinler trombositlere bir ağ yapısı kurarak sağlamlık verir (Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

Deri yaralandığında, kanamayı durdurmak için ortaya çıkan ilk tepki damar duvarlarının vazokonstriksiyonudur. Daha sonra, subendotelyal matris içinde ortaya çıkan kolajene trombosit agregasyonu ile trombosit tıkaç oluşması sonucu birincil hemostaz gerçekleşir. Hemen ardından ikincil hemostaz başlar. Trombosit tıkaç adı verilen gevşek yapının sağlamlaştırılması için fibrinojenden fibrin ağları oluşur. Fibrin

ağları açıklık üzerinde geçici bir yapı iskelesi kurarak trombosit tıkaçını destekler ve sağlam bir pıhtı (trombüs) oluşturur. Aynı zamanda bu ağ, yara iyileşmesi için gerekli olan çeşitli hücreler için geçici bir yapı iskelesi sağlar. Pıhtılaşma sürecinin tetiklenmesinde intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki farklı yol görev alır. İntrinsik yol hasarlı damar tarafından, ekstrinsik yol ise hasarlı doku tarafından gönderilen sinyallerle gerçekleşir (Reinke ve Sorg, 2012; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

2.2.1.2. Enflamasyon

Yaralanma sonrası derinin bariyer özelliği kaybolur. Bu nedenle, hemostaz sırasında başlayan enflamasyon aşamasının da temel amacı istilacı mikroorganizmaların potansiyel zararlarını önlemektir.

Yaralanmadan hemen sonra lökosit kemotaksisi adı verilen nötrofillerin yaraya doğru göçü başlar. Çeşitli organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar, yarada hızlıca gerçekleşen H_2O_2 üretiminin enfeksiyonları en aza indirdiğini, keratinosit rejenerasyonunu aktive ettiğini, nötrofilleri topladığını ve yeni damar oluşumunu desteklediğini göstermiştir (Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

Nötrofiller, yaradaki hücresel kalıntıları ve bakterileri yok etmek için üç ana mekanizma kullanır. Hücre içi granüllerinden aktoferrin, proteazlar, nötrofil elastaz ve katepsin gibi toksik bileşikler salarak patojenlerle savaşır. Ayrıca NETosis adı verilen bir süreçle patojenleri yakalayan nötrofil hücre dışı tuzakları (Neutrophil extracellular traps – NET) üretirler. Üçüncü olarak nötrofiller yarada fagositoz gerçekleştirir. Yüzey reseptörlerini ve integrinleri kullanarak antijenleri araştırırlar ve antijenleri yutan fagositik bir oyuk oluştururlar. Nötrofillerin ortamdan doğru zamanda uzaklaşması inflamasyonun çözülmesi için kritiktir. Nötrofiller apoptoza uğrayarak, eferositoz yoluyla makrofajlar tarafından yutularak veya ters migrasyon adı verilen bir süreçle tekrar dolaşıma girerek yarayı terk ederler. Nötrofil eferositozun aktive edilmemesi, nötrofillerin parçalandığı sekonder nekroza yol açarak proinflamatuvar ve sitotoksik moleküllerin salınmasına ve doku hasarının artmasına neden olabilir. Kalıcı nötrofiller diyabetik ayak ülserleri, bası ülserleri ve venöz bacak ülserlerinde görüldüğü gibi uzamış bir inflamatuvar durumuna ve sonuç olarak kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olur (Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

Kemik iliğinde üretilen monositler damar lümeni içindeki iç endotel duvarında sürekli yuvarlanır ve hasar olup olmadığını araştırır. Yaralanma sonucu trombositlerden ve hasarlı hücrelerden salınan kimyasal haberciler tarafından yaraya çekilirken, makrofajlara dönüşerek damar dışına çıkarlar. Yaralanmadan yaklaşık 2-3 gün sonra makrofajlar yaralanma bölgesinde en yüksek derişime ulaşır ve büyüme faktörlerinin, kemokinlerin ve sitokinlerin salgılanmasının yanı sıra patojenlerin ve hücre kalıntılarının fagositozunu devam ettirerek süreci destekler. Yaradaki erken makrofajlar, kemik iliğinden daha fazla monosit çekmek ve makrofaj tepkisini artırmak için monosit kemoatraktan protein (MCP)-1 salgılar. Bu makrofajlar ayrıca patojenlerin fagositozuna aktif olarak katılırlar. Enflamatuvar fazın sonunda makrofajlar, yara iyileşmesinin enflamatuvar fazının sonunu işaret eden ölmekte olan nötrofilleri yutar. Makrofajlar, TGF- β ve EGF gibi büyüme faktörlerini barındırır. Bu nedenle inflamatuvar yanıt düzenlemenin yanında yeni doku oluşumu aşamasının başlamasında, anjiyogenezi uyarmada, granülasyon dokusu oluşumunu artırmada önemlidir. Lenfositler ise yarada 72 saat sonra ortaya çıkar ve hücre dışı bir matriks iskelesi ve kolajen üretimi yoluyla yara iyileşmesini düzenlemede önemli oldukları düşünülür (Abazari vd., 2022; Enoch ve Leaper, 2008; Gonzalez vd., 2016; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

Ayrıca makrofajlar yaranın yeniden modellenmesi sırasında, iyileşmiş cildi homeostatik bir duruma getirmek için hem hücre kalıntılarını hem de aşırı hücreler arası matriksi yeniden oluşturabilmek için fagositik bir rol üstlenirler (Rodrigues vd., 2019).

Yara iyileşmesinin enflamatuvar fazı, ihtiyaç olduğu sürece devam ederek yaradaki tüm bakteri ve kalıntıların tamamını temizlenmesini sağlayacaktır. Bununla birlikte, uzun süreli iltihaplanma, geniş doku hasarına, gecikmiş proliferasyona yol açabilir ve kronik bir yara oluşumuyla sonuçlanabilir (Singh vd., 2017).

2.2.2. Yeni doku oluşumu

Yaralayıcı uyaran sona erdiğinde, hemostaz sağlandığında, inflamatuvar yanıt dengelendiğinde ve yara artıklardan arındırıldığında, yara iyileşmesi kaskadının proliferatif aşaması başlar. Bu karmaşık süreç, yaklaşık 10 gün süren ve aynı anda meydana gelen granülasyon dokusu oluşumu, anjiyogenez, kolajen birikimi ve epitelizasyonu içerir. Bu nedenle yerel fibroblastlar fibrin ağı boyunca göç ederken ve yara kenarlarından epitelizasyon başlarken aynı zamanda kapiller filizlenme aracılığıyla

neovaskülarizasyon ve anjiyogenez de başlar. Fibroblastlar tarafından kolajen, fibronektin ve yara iyileşmesi için gerekli diğer temel maddelerin sentezi, doku boşluklarının kapatılmasını, restorasyonu ve yaranın mekanik gücünün arttırılmasını destekleyen yeni bağ dokusu matrisinin temelini oluşturur (Cañedo-Dorantes ve Cañedo-Ayala, 2019; Reinke ve Sorg, 2012; Singh vd., 2017).

Enflamasyonu takiben sağlıklı fibroblastlar hemostatik pıhtıdan salınan büyüme faktörleri (ağırlıklı olarak TGF- β ve PDGF tarafından) tarafından çoğalıp yaraya göç etmek üzere uyarılır. Böylece üçüncü günden itibaren yara, hücre dışı matriks proteinleri (hyaluronan, fibronektinler ve proteoglikanlar) oluşturan ve ardından kolajen ve fibronektin üreten fibroblastlar açısından zengin hale gelmeye başlar. Yara yerinde pıhtının yerini alan pembe, vasküler, fibröz, granülasyon dokusu oluşur. Bu doku, sağlam deride görülenden daha gevşek ve farklı bir kolajen dağılımına (daha yüksek oranda tip 3 kolajen) sahiptir. Yeterli hücreler arası matriks oluşturulduktan sonra, fibroblastlar ya apoptoza uğrar ya da bir miyofibroblast fenotipine dönüşür ve yalancı ayaklar geliştirir. Bu sayede çevredeki fibronektin ve kolajen proteinlerine bağlanmaları kolaylaşır ve böylece yaranın kontraksiyonuna yardımcı olmaları sağlanır. Miyofibroblastlar ayrıca (Matriks metalloproteinaz) MMP aktivitesine aracılık ederek anjiyogenezi teşvik eder (Enoch ve Leaper, 2008; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

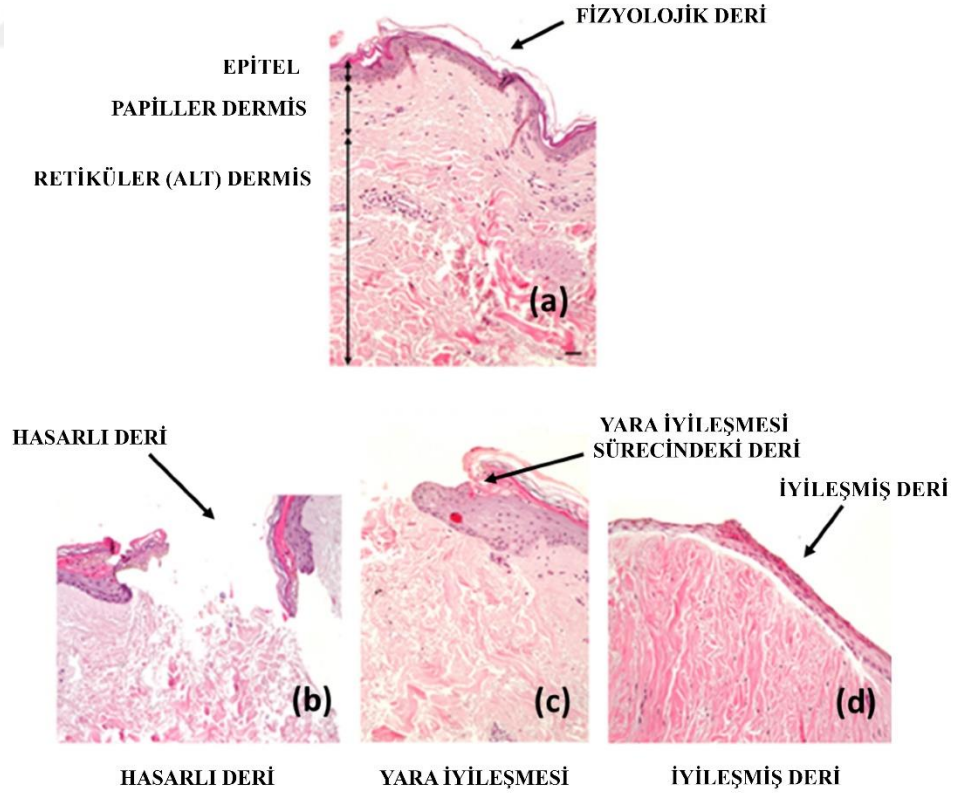
Etkili yara iyileşmesi için anjiyogenez kritik öneme sahiptir. Hücre proliferasyonu ve doku rejenerasyonunun sağlanması için gerekli besinlerin dokuya ulaştırılması ve oksijen homeostazının sürdürülmesi neovaskülarizasyona yani yeni kan damarı oluşumuna bağlıdır. Başlangıçta yaranın merkezi avaskülerdir ve yalnızca yara kenarındaki hasar görmemiş kılcal damarlardan difüzyona aracılığıyla beslenir. Anjiyogenez süreci ilerledikçe, yara boyunca sağlıklı damarların dallanmasıyla zengin bir kılcal damar ağı oluşur (Cañedo-Dorantes ve Cañedo-Ayala, 2019; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

Yeniden epitelizasyon, yara kenarının bazal tabakasındaki mevcut keratinositlerin ve yakındaki kıl foliküllerinden veya ter bezlerinden gelen epitel kök hücrelerinin göçü ve farklılaşmasıyla gerçekleşir. Yaralanmadan birkaç saat sonra, sağlam kalan epidermal keratinositler, yara kenarlarından göç ederek açıkta olan yara alanı üzerinde bütün bir keratinosit tabakasından oluşan hassas bir hücre örtüsü oluşturmaya başlar. Yaklaşık 24 saat içerisinde hücre göçü tamamlanır. Ardından artan stokin derişimindeki değişiklikler

ile birlikte epitel hücreler hareketli bir fenotipten, proliferatif bir fenotipe geçerek epiderminis tabakalarını tekrar oluşturmaya başlar. Yeniden epitelizasyonun gerçekleşebilmesi için yeterli sayıda yerleşik kök hücrenin yara bölgesinde bulunması gereklidir (Abazari vd., 2022; Enoch ve Leaper, 2008; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).

2.2.3. Yeniden modelleme - olgunlaşma

Yara iyileşmesinin, yara izi oluşup oluşmayacağının ve yaranın tekrarlayıp tekrarlamayacağının belli olacağı son aşamasıdır. Tamamlanması bazen aylar bazen de yıllar alabilir. Bu aşamanın temel amacı, granülasyon dokusundaki hücre dışı matrisin bozulması ve tekrar sentezlenmesi yoluyla yeniden modellenerek, iyileşen derinin orijinal gerilme kuvvetine yaklaşmasını sağlamaktır. Yeniden modelleme fazında neovaskülasyon geriler, hücreler arası matriks periyodik olarak birikmeye başlar ve böylece granülasyon dokusu skar dokusuna dönüşür. Bu nedenle olgunlaşan yaralar avasküler ve aselüler olarak karakterize edilir (Gonzalez vd., 2016; Reinke ve Sorg, 2012; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017).



Görsel 2.2. Normal deri ile iyileşmiş derinin karşılaştırılması (a- Normal deri, b- yaralanmış deri, c- yara iyileşmesi sürecindeki deri, d- iyileşmiş deri) (Tottoli vd., 2020)

Yara iyileşmesinin yeniden epitelizasyon aşaması gerçekleştiğinde, granülasyon dokusunda yoğun miktarda bulunan kolajen III miktarı giderek azalır ve yerini kolajen I'e bırakır. Kolajen Tip I moleküllerinin sayısı artar, moleküller kalınlaşır ve paralel olarak yerleşerek doku için artan bir gerilme dayanıklılığı sağlanır. Bu süreçte hyaluronan ve fibronektin gibi hücreler arası matriks glikoproteinlerinde de azalmalar görülür. Yara iyileşme süreci tamamlandığında, granülasyon dokusu içindeki miyofibroblastlar apoptoz geçirir. Bu nedenle yaranın yeniden modellenmesi sonrası deride hipertrofik skarların oluşması beklenir. Rejenerasyon ile gerçekleşen fetal yara iyileşmesinin aksine, yetişkinlerde yara kapandıktan sonra tam olarak iyileşmesi mümkün olmayan saç folikülleri, ter bezleri gibi subepidermal uzantıların ciddi yaralanmalardan sonra iyileşme veya yeniden büyüme potansiyeli yoktur. Ortaya çıkan skarın epidermisi, rete sırtlarından yoksun olması nedeniyle yara iyileşmesinden sonra yaralanmamış deriden daha farklıdır. Görsel 2.2 incelendiğinde epidermisin dermis ile bağlantısını oluşturan rete sırtları ve dermal papillaların yok olduğu, epidermisin düzleştiği, dermis tabakasında yer alan fibroblastların, kan damarlarının azaldığı, papiller ve retiküler dermisin yapılarının bozulduğu, hücreler arası matriks açısından çok yoğun olduğu görülmektedir. (Gonzalez vd., 2016; Gurtner vd., 2008; Reinke ve Sorg, 2012; Rodrigues vd., 2019; Singh vd., 2017; Tottoli vd., 2020).

2.3. Yara Tedavisi

Geçmişten bugüne yara tedavisinde uygulanan birçok strateji bulunmaktadır. Güncel olarak kullanılan yara tedavi yöntemleri “Geleneksel” ve “Rejeneratif” olarak sınıflandırılabilir. Geleneksel tedavi, estetik ve olası fonksiyonel değişikliklerden bağımsız olarak skar oluşumuna yol açmaktadır. Geleneksel yöntemler ampirik, tımdengelim ve doğrulanmamış kökenlere bağlı olmasına rağmen çok uzun zamandır kullanılması ve başarısını kanıtlaması nedeniyle bu yöntemlere olan bir bağlılık görülmektedir. Bu bağlılık yenilikçi yöntemlerin gelişmesinin önünde kısmen bir engel oluştursa da son yirmi otuz yılda, yaraların ve patofizyolojilerinin klinik olarak anlaşılmasındaki ilerlemeler sayesinde yaraların tedavisinde rejeneratif tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Rejeneratif yara tedavisi, biyomedikal araştırmalarda yeni ve hızla gelişen bir alandır. Cildi bozulmamış işlevine geri döndürmeyi, hasarlı hücreleri ve cilt dokusunu skar dokusu bırakmadan yeniden oluşturmayı amaçlar. Her durumda, rejenerasyon

stratejileri, debridman gibi temel geleneksel tedavileri tamamlayıcı olarak düşünölmelidir (Tottoli vd., 2020; Vyas ve Vasconez, 2014).

Yaralar, akut yani kendi kendine iyileşen veya düzenli ve iyileşme zamanına uygun şekilde tedavi edilebilenler ve kronik yani uzun süre boyunca tedavi edilemeyenler olarak sınıflandırılabilir. Akut yaraların tedavisinde bağışıklık sistemi önemli bir rol oynar. Bağışıklık sistem hücreleri ve faktörlerinin aktive edilmesi enflamasyon sürecini başlatır ve yaranın patojenlerden temizlenmesini sağlayarak doku iyileşmesine imkan verir. İmmün yanıtaki düzensizlikler yaranın enflamasyon sürecinin devam etmesine ve bakteriyel biyofilmlerin oluşmasına sebep olarak akut yaraların kronik yaralara dönüşmesine sebebiyet verebilir (Franz vd., 2008; Raziyeve vd., 2021).

2.3.1. Akut yaralar

Akut yaralar genellikle yanık, kesik, sıyrık yırtık şeklinde cerrahi bir müdahale ya da dışardan gelen bir travma sonucu ortaya çıkar (Dai, Shih, ve Khachemoune, 2020).

Akut yara tedavisinde temel adımlar, nekrotik dokunun uzaklaştırılması, altta yatan yaralanmaların araştırılması, enfeksiyonların kontrol edilmesi ve yaranın bazı özel durumlar haricinde uygun şekilde kapatılmasıdır. Akut yaraların kirli ve kontamine olması durumunda temizliği önerilmektedir. Temizleme işlemi temiz bir ılık su ile hafif fişkirtme şeklinde gerçekleştirilebilir. Enfeksiyon riskine karşı etkili ve mümkünse mikroorganizmalara selektif olan, granülasyonu engellemeyecek bir antiseptik ile tedavi edilebilir. Yaralarda kalan doku artıkları mikroorganizmalar için uygun bir yuva görevi görebilir ve aynı zamanda iyileşen doku için toksik olabilir. Bu nedenle rezeke edilebilir. Bir deri flebi rezeke edildikten sonra mümkün olduğu kadar uzun süre deride kalabilecek bir örtüyle kapatılmalıdır. Derinin bir bölümünün ortadan kaybolduğu yaralanmalarda da ince bir yara örtüsü kullanılması önerilir. Genellikle tedavilerde yaraların uygun şekilde kapatılması önerilirken kontaminasyon varlığında, anaerobik enfeksiyonların gelişimini önlemek için veya ileride debridmana ihtiyaç duyulma ihtimali varsa açık bırakılmaları gerekebilir (Dai vd., 2020; Ubbink vd., 2015).

2.3.2. Kronik yaralar

Kronik yaralar, altı haftadan uzun süren veya sıklıkla tekrarlayan, iyileşmesi zor yaralardır. Kronik yaralara yol açan faktörler arasında yetersiz kan dolaşımı, diyabet, enfeksiyonlar veya zayıf birincil tedavi gibi normal iyileşmeyi engelleyen diğer faktörler

yer alır. Diyabetik ayak ülserleri, bası ülserleri ve tedavileri için çok çeşitli biyomateriyaller geliştirilmekte olan vasküler ülserler kronik yara örnekleri arasında yer almaktadır (Dai vd., 2020).

Kronik yara yönetimi, debridman, enfeksiyon ve inflamasyon kontrolü, nem dengesinin sağlanması gibi bir tedavi kombinasyonu kullanılarak yara kenarlarındaki durmuş epitelizasyonu uyarmaya odaklanır (Dai vd., 2020).

2.3.2.1. Yara takip sistemi (TIME)

Yaraların birçoğu yukarıda bahsedilen normal iyileşme sürecini herhangi bir engelle karşılaşmadan tamamlar. Ancak bazı durumlarda yara iyileşme süreci çeşitli bireysel, çevresel ve yaraya özgü farklılıklar nedeniyle sekteye uğrayarak, yaranın kronikleşmesine neden olabilir. Akut yaraların tedavisinde izlenecek sistematik bir yöntem kullanılsa da kronik yaralar için 2004 senesinde Schultz vd. (2004) tarafından TIME (*T- Tissue, I- Infection, M- Moisture Balance, E- Epidermis/Edge*) kısaltmasıyla bir yara takip yöntemi ortaya atılmıştır. Günümüzde hala devam eden bu sistem, klinik karar destek aracı (CDST – Clinical Decision Support Tool) ile TIME CDST olarak güncellenmiştir (Harries, Bosanquet, ve Harding, 2016; Moore vd., 2019).

2.4. Yara Örtüleri

Yara tedavisinde, yara iyileşmesi sürecinde gerekli olan deri işlevlerinin taklit edebilecek geçici veya kalıcı yara örtüleri kullanılmaktadır. Bu örtüler kronik yaraların tedavisinde etkinlik sergileyen araçlardır. Konvansiyonel yöntemlerde kullanılan yara örtüleri gazlı bezler ve basit bandajlar kullanılmaktadır. Ancak bu ürünler skar oluşumunu hızlandırarak yara kapanmasında yardımcı olsalar dahi hem enfekte yaralara karşı başarısız olmakta hem de belirli aralıklarla yenilenmeleri gerektiği için yaranın tekrar açılmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle modern yara örtüleri biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve ihtiyaca göre modifiye edilebilir şekilde üretilmektedir (Ambekar ve Kandasubramanian, 2019; Dai vd., 2020).

Etkin bir tedavi için, yara tedavisinde kullanılacak yöntemin seçiminde, yaranın tipi, derinliği ve ayrıca eksüda miktarı dahil olmak üzere yarayla ilgili çeşitli önemli hususlar dikkate alınmalıdır. İdeal bir yara örtüsü, iyileşme süreci için gerekli olan nemli ortamı muhafaza edebilmeli veya sağlayabilmelidir. Ayrıca gaz geçirgenliğine uygun olmalı ve eksüdanın fazla olduğu yaralarda, yara yüzeyinden fazla eksüdayı

uzaklaştırabilmelidir. Ek olarak, bir diğer önemli husus, antibakteriyel bir ortam sağlayarak mikroorganizmalar için hem mekanik hem de biyolojik bir bariyer görevi görme yeteneğine sahip olmalıdır. Pansumanın biyoyumlu, düşük maliyetli, uygulaması kolay ve sürekli değiştirme gerektirmemesi de diğer önemli avantajlardır (Öztaş, 2021; Stoica, Chircov, ve Grumezescu, 2020).

Yara tedavisinde kullanılan yara örtüleri üretimlerinde kullanılan materyallere, fiziksel şekillerine, içerdiği etkin maddelere, uygulanma şekillerine göre olmak üzere bir çok farklı şekilde sınıflandırılabilir (Kurtoglu ve Karataş, 2009; Stoica vd., 2020).

Geleneksel yöntem olan bandaj ve gazlı bezin yara tedavisindeki eksikliklerinin tamamlanması için geliştirilen köpükler, filmler, nano/mikro jeller, hidrojel, mikro/nano küreler ve süngerler gibi yeni yöntemler oldukça umut verici sonuçlar vermektedir (Ambekar ve Kandasubramanian, 2019; K. Chen vd., 2022). Tezin bu kısmında nanolif yara örtüleri detaylı olarak incelenecektir.

2.4.1. Nanolif yara örtüleri

Son yıllarda hızla gelişen nanoteknoloji sayesinde, etkin maddelerin polimerlere yüklenmesi oldukça çekici bir araştırma alanı haline gelmiştir. Nanoteknoloji, yüksek özgül yüzey alanı, yüzey kimyası (kompozisyon), yüzey termodinamiği (ıslanabilirlik ve serbest enerji) ve yüzey fiziği (topografya ve pürüzlülük) gibi karakteristik özelliklere sahip bir teknoloji olması nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça uyumlu ve istenen bir yöntemdir. Etkin maddelerin ilaç taşıyıcı sistemlerde (İTS'ler) kapsüllenmesi, etkin maddeleri olumsuz ortamlarda bozunmadan koruyabilen, yan etkilerini azaltabilen, çözünürlüğü iyileştirebilen, kontrollü salım sağlayan ve biyoyumluluğu artıran geçerli bir yöntemdir. Nanolifler, etkin maddenin hapsedilmesi için maksimum verimliliğe sahip olmasının yanında etkin maddenin hedef bölgedeki biyoaktif moleküllerle optimum etkileşime girmesini sağlamaktadır. Son zamanlarda, ilaç yüklü nanolif yara örtüleri, yüzey modifikasyonuna açık olma, sahip oldukları yüksek ve ayarlanabilir gözeneklilik, ayarlanabilir mekanik ve etkin madde salım özellikleri, geniş polimer seçeneği ve hasarlı dokunun onarımını artıran yüksek biyoyumlulukları gibi özellikleri nedeniyle doku mühendisliği, ilaç taşıyıcı sistemler, yara tedavisi ve kanser tedavisi dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalar yapan araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Ambekar ve Kandasubramanian, 2019; K. Chen vd., 2022; Feng vd., 2019; Morie vd., 2016). 2021

senesinde yapılan bir araştırmada 2010-2020 arasında elektroegirme ile üretilen yara örtüsü konulu makaleler yıllara göre yaklaşık 5 kat arttığı görülmektedir (Liu vd., 2021).

Nanolifler, sahip olduğu yukarıda bahsedilen avantajlar sayesinde yara üzerindeki eksüdanın fazlasını etkili bir şekilde uzaklaştırma, yara yüzeyindeki nemi dengelemeye ve yara yüzeyini nemli tutmaya yardımcı olan gaz değişimini yapabilme gibi önemli özelliklere sahiptir. Sahip oldukları benzersiz yapı, etkin madde yükleme verimliliğini ve etkin madde çözünürlüğünü arttırabilir aynı zamanda etkin maddenin yara bölgesindeki salım kinetiklerini hedeflenen şekilde düzenleyebilir. Nanolifler ayrıca normal deriye benzer bir doğal hücreler arası matriks yapısı oluşturarak ve hücrelerin göçü ve çoğalması için uygun bir alan yarabilmektedir. Ek olarak büyüme faktörleri gibi rejenerasyonu destekleyici moleküller için üç boyutlu yaşam alanı sağlayarak ve dermis ile epidermisin rejenerasyonunu teşvik edebilirler. Nanoliflerin sahip olduğu gözenekli yapı biyolojik olarak aktif hücreler arası matriks molekülleri arasındaki etkileşimin artmasına, besinlerin vücutta taşınmasının kolaylaşmasına, hücre büyümesinin ve anjiyogenezin indüklenmesine katkıda bulunur (K. Chen vd., 2022).

Etkin madde içeren nanoliflerin üretimi için eriyik üfleme, döner jet, elle döndürme, basınçlı döndürme ve elektroegirme gibi çeşitli nanolif üretim metotları geliştirilmiştir. Nanolif üretim yöntemlerinin avantaj ve sınırlamaları Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Nanolif üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Ambekar ve Kandasubramanian, 2019)

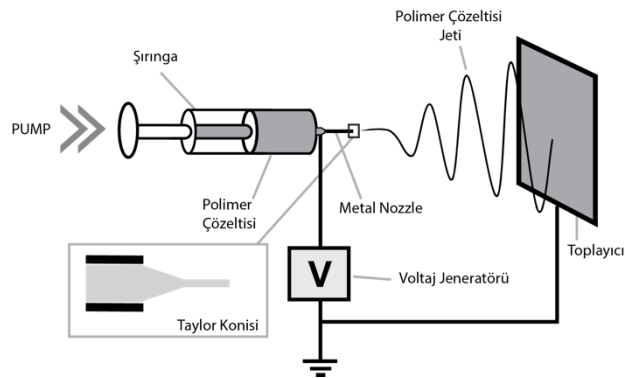
Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Eriyik üfleme	Yüksek miktarda üretim, uzun ve sürekli lifler, çözücü içermez	Yüksek sıcaklık nedeniyle polimer ve etkin madde seçiminde sınırlılık
Döner jet	Çevre dostu, çok yüksek voltaj içermez	Yüksek sıcaklık nedeniyle polimer ve etkin madde seçiminde sınırlılık
Elle döndürme	Polimer ve çözücünün elektriksel özelliklerinden bağımsız, yüksek oranda derişik ve iyi hizalanmış nano dolgu maddeleri, daha yüksek verimliliğe sahip yüksek kaliteli nanolifler	Düşük miktarda üretilebilme

Basınçlı Döndürme	Yüksek verimlilik, Homojen lifler, nihai ürün morfolojisi üzerinde daha iyi kontrol, elektrik alanından bağımsız	Yüksek sıcaklık nedeniyle polimer ve etkin madde seçiminde sınırlılık
Elektroeğirme	Yüksek yüzey/hacim oranı, Sürekli ve uzun lifler, yüksek en-boy oranı, uygun maliyet, koaksiyel eğirme, gelişigüzel veya yönlendirilmiş lifler geliştirme olasılığı	Püskürtme dengesizliği, üç boyutlu gözenek çapının kontrol edilememesi, sonucu etkileyebilecek çok fazla değişken bulunması

Nanolifler, basit, tekrar üretilebilir, uygun maliyetli ve endüstriyel boyuta uyarlanabilir olması nedeniyle en yaygın olarak elektroeğirme yöntemiyle üretilir (Ambekar ve Kandasubramanian, 2019; Kajdič vd., 2019; Lipol ve Rahman, 2016).

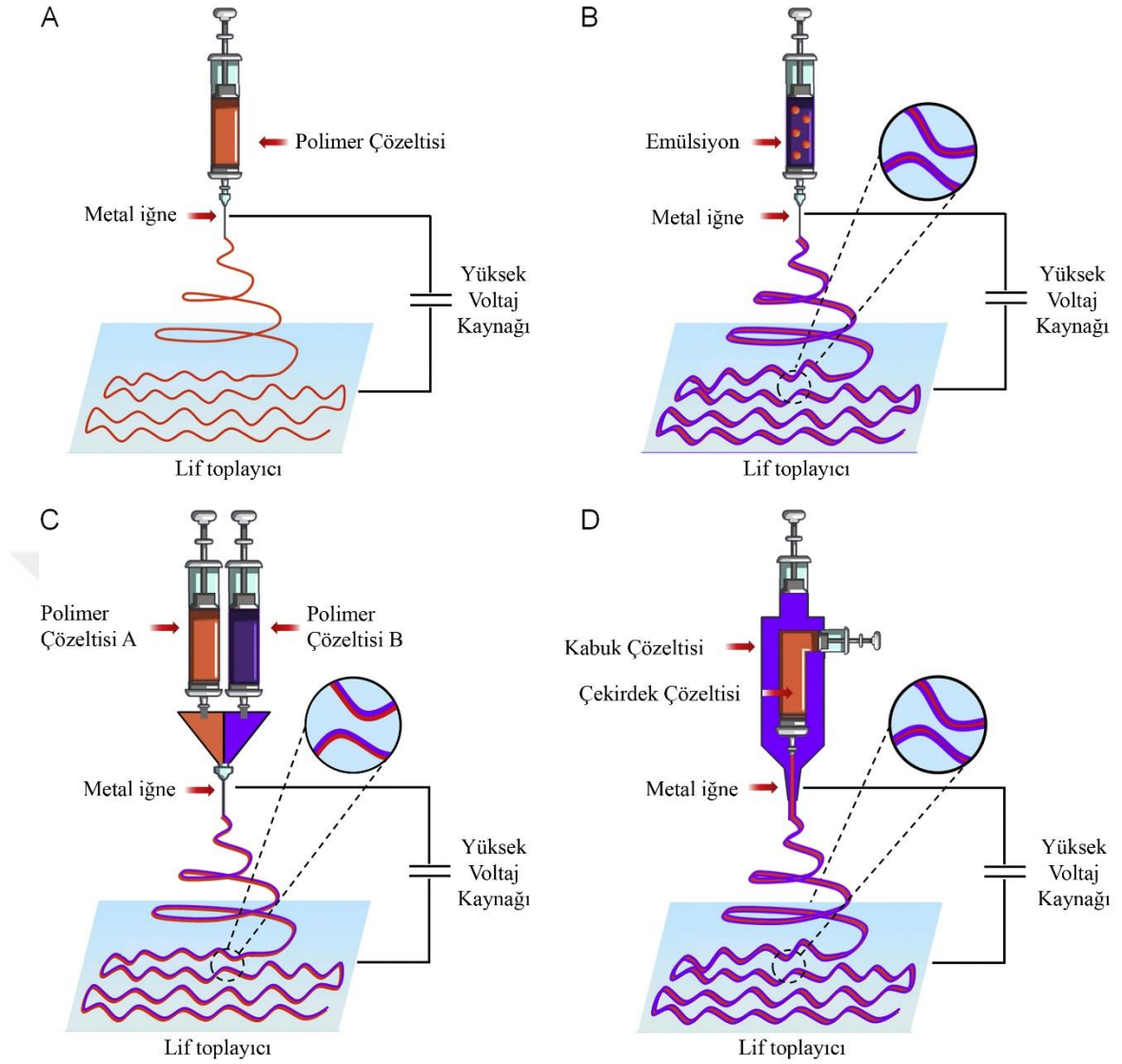
2.4.1.1. Elektroeğirme

Elektriksel kuvvetlerin yardımıyla filament üretilmesi yüzyıldan fazla bir süredir bilinen bir yöntemdir. Elektrostatik kuvvetlerin yardımıyla liflerin bükülmesi işlemine elektroeğirme denir. Elektroeğirme yöntemi, 1990'lı yılların sonlarından beri çeşitli polimerik liflerin üretilmesindeki çok yönlülüğünün yanı sıra, mikron altı aralıkta lif üretme yeteneğiyle daha da dikkat çekmeye başlamıştır. Normal liflerden daha küçük gözeneklere ve daha yüksek yüzey alanına sahip bu nano boyutlu lifler, nanokataliz, doku örtüleri - iskeleleri, koruyucu kıyafetler, filtrasyon gibi çok yönlü uygulamalara sahiptir (Subbiah vd., 2005; Teo, Inai, ve Ramakrishna, 2011). Elektroeğirme yöntemi 10 nanometreden birkaç mikrometreye kadar geniş bir çap aralığında lifler üretilmesini sağlar. Literatürde 1 nm'nin altında lifler elde edildiği de bildirilmektedir (Xue vd., 2019).



Şekil 2.4. Elektroeğirme yöntemiyle nanolif üretiminin şematik gösterimi (Kajdič vd., 2019)

Elektroegirme yonteminde nanolif eldesi iwin, polimer wozeltisi veya eriyiwi olan bir akışkana gwuwlw bir elektrik alanının uygulanmasına dayanan bir swreaw kullanılır. Elektroegirme cihazı, bir metal bir enjektwrw iwnesi (nozwl), iletken bir toplayıcı, ywksek elektrik voltajı kaynağı ve sıvı akışkanı şırgananın nozwlunden toplayıcıya doaru ywnlendiren bir pompa iwerir. Nozwl ve toplayıcı arasındaki elektrik alanı ile Taylor konisi (şekil 2.4) olarak adlandırılan sıvı damlacıklarının koni şeklindeki deformasyonu ve ywklw bir sıvı akımının (yani 'jet akışı') oluşması sağlanır. Bu jet akışı toplayıcıya doaru daha da uzar ve geniş ywzey alanı nedeniyle, wzwcw hızla buharlaşır veya polimer eriyik soğur, bu da katı nanoliflerin oluşumuyla sonuawlanır. Bu nanolifler nihayetinde topraklanmış olan toplayıcıda biriktirilir. Wzwcwünün buharlaşması sırasında, jet mikrometrelere, hatta onlarca nanometreye kadar gerilir, son olarak katılaşır ve nanolif oluşturmak wzere toplayıcı wzerinde biriktirilir. Bu prensibe dayanarak, nanoliflerin morfolojisi ve boyutu, elektroegirme işleminin sistem parametreleri (polimer tipi, molekwlw ağırlık, viskozite, wzweltinin iletkenliği, ywzey gerilimi), işlem parametreleri (voltaj, akış hızı, alım mesafesi) ve wvresel parametreler (nem, sıcaklık) dwzenlenerek ayarlanabilir. Elektroegirme teknolojsi halen geliştirilmekte ve optimize edilmektedir. Elektroegirme yonteminde şekil 2.5'da da gwrwldwęu gibi nanolifin wretim amacına gwre modifiye edilmiş birwok metot kullanılabilir. Tek sıvılı veya wok sıvılı elektroegirme metotları mevcuttur (Kajdiw vd., 2019; Lipol ve Rahman, 2016; Liu vd., 2021).



Şekil 2.5. Elektroegirme ile nanolif üretiminin şematik gösterimi A) Tekli nozül ile çözelti eğirme B) Tekli nozül ile emülsiyon/süspansiyon eğirme C) Side by side nozül ile eğirme D) Koaksiyel eğirme (Feng vd., 2019)

Elektroegirme metotlarına göre farklı tipte nanolif yapıları elde edilebilmektedir. Tek sıvılı metot ile elde edilen liflerde yüklenmesi istenen etkin madde dış faz içinde çözündürüldüyse etkin maddenin polimer matriksinde homojen halde dağılmış olduğu nanolifler, süspande edildiyse, yine polimer matriksinin içerisinde dağılmış çekirdek-kabuk yapıları nanoliflerin elde edilmesi beklenmektedir. Emülsiyon halinde olan tek sıvılı metotta oluşan nanolifin koaksiyel yani iç fazda bulunan polimerin oluşturduğu lifin dış fazla bulunan polimer ile kaplandığı bir yapıda oluşması beklenmektedir. Çok sıvılı elektroegirme metodunda side by side özellikli bir nozül kullanılması halinde çok

katmanlı bir nanolif, koaksiyal nozül kullanılması halinde ise koaksiyal yapı bir nanolif oluşması beklenmektedir (K. Chen vd., 2022; Feng vd., 2019; Liu vd., 2021).

2.4.1.1.1. Elektroğirme yönteminde kullanılan polimerler

Elektroğirme yöntemiyle nanolif eldesinde, sentetik, doğal, yarı sentetik veya bu polimer gruplarının ortak kullanıldığı polimer karışımları kullanılmaktadır (Bombin, Dunne, ve McCarthy, 2020; Keshvardoostchokami vd., 2020; Li ve Yang, 2020).

Nanolif üretiminde sentetik polimer olarak polivinil alkol (PVA), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), polivinil prolidon (PVP), yarı sentetik polimer olarak selüloz asetat, etil selüloz gibi selüloz türevleri, doğal polimerler olarak kitosan, jelatin, hyaluronik asit, kolajen gibi polimerler sıklıkla tercih edilmektedir (K. Chen vd., 2022).

Uygun polimerlerin seçiminde, uygulamanın amacı ve nanolifin uygulama koşulları dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir. Kemik rejenerasyonu gibi uzun süreli tedavi gerektiren hastalıklar için PCL ve PLA gibi parçalanma hızı daha düşük olan biyomateryaller tercih edilmesi gerekirken, kısa süreli tedavilerde biyoparçalanma hızı daha yüksek olan polimerlerin kullanılması tavsiye edilmektedir (Feng vd., 2019).

PVA, yüksek biyoyumluluk, biyobozunurluk, biyoyapışkanlık, kolay şekillendirilebilirlik, kimyasal direnç, nem emme ve şişme özelliklerine sahip, toksik olmayan ve iyi bilinen bir biyopolimerdir. Kan ve doku hücreleriyle geçimlidir. Ayrıca düşük yüzey gerilimi ve yumuşak kıvamı sayesinde elektroğirmeye oldukça uygundur. Bu özellikleri sayesinde PVA ile oluşturulan nanolifler, yara eksüdasını emebilir ve doku rejenerasyonunu destekleyebilir (Jannesari vd., 2011; Jatoi vd., 2019; Song vd., 2021; Varshosaz vd., 2011).

Polimetakrilat türevleri (Eudragitler), biyolojik olarak parçalanmayan ve biyoyumlu polimerlerdir. Hidrofobisite, şekillendirilebilirlik, mekanik dayanıklılık, doku afinitesi ve yavaş bozunma gibi fizikokimyasal özellikleri, Eudragitlerin ideal bir pansuman malzemesi olarak kullanılmasını sağlar. Etkin maddenin kontrollü salımını sağlayabilir olması ve yüksek pH'ya duyarlılığı nedeniyle yara pansumanlarında etkili bir polimerdir (Ao vd., 2020; Illangakoon vd., 2015).

2.4.1.1.2. Elektroğirme yönteminde nanolif özelliklerini etkileyen parametreler

Elektroğirme işlemi sırasında, nanoliflerin morfolojik özelliklerinin optimizasyonu için kontrol edilmesi gereken birçok parametre bulunmaktadır. Bu parametreler Elektroğirme sıvısıyla alakalı parametreler, elektroğirme cihazıyla alakalı parametreler ve çevresel faktörler olmak üzere üç ana başlıkta toplanabilir. Belirilen parametrelerin tamamı birbirleriyle dolaylı olarak, çözücü derişimi – viskozitesi – ortam sıcaklığı, voltaj – akış hızı gibi parametreler ise birbirleriyle doğrudan bağlantılıdır. Parametrelerin birçoku kritik uygulama değerlerine sahiptir. Uygulama değerlerinin, kritik değerlerin altında veya üstünde boncuk oluşumu, kalın veya düzensiz lif çapı, jet akışının sağlanamaması gibi çeşitli istenmeyen durumlara sebep olmaktadır. Parametrelerin nanolif morfolojisine etkileri Tablo 2.2’de özetlenmiştir (Haider, Haider, ve Kang, 2018; He vd., 2021; Ibrahim ve Klingner, 2020).

Tablo 2.2. Elektroğirme parametrelerinin nanolif üretimine etkileri

	Parametre	Kritik Değerden sapma	Sonuç
Sıvıyla alakalı parametreler	Derişim	↑	Jet oluşumunun engellenmesi
		↓	Boncuk oluşumu
	Viskozite	↑	Jet oluşumunun engellenmesi
		↓	Boncuk oluşumu
	Yüzey Gerilimi	Kritik değer yoktur	Yüzey gerilimi arttıkça kararsız jet oluşumu
	İletkenlik	Kritik değer yoktur	İletkenlik azaldıkça boncuk oluşumu artar
Elektroğirme cihazıyla alakalı parametreler	Çözücünün kaynama noktası	↑	Islanma, boncuk oluşumu
		↓	Polimerin iğne ucunda donması
	Voltaj	↑	Polimerin iğne ucunda donması, boncuk oluşumu
		↓	Kalın lif çapı, eğrilmemiş çözücü damlacıkları
	Akış Hızı	↑	Kalın lif çapı, eğrilmemiş çözücü damlacıkları
		↓	Polimerin iğne ucunda donması, boncuk oluşumu
	Mesafe	↑	Islanma
		↓	Jet oluşmaması

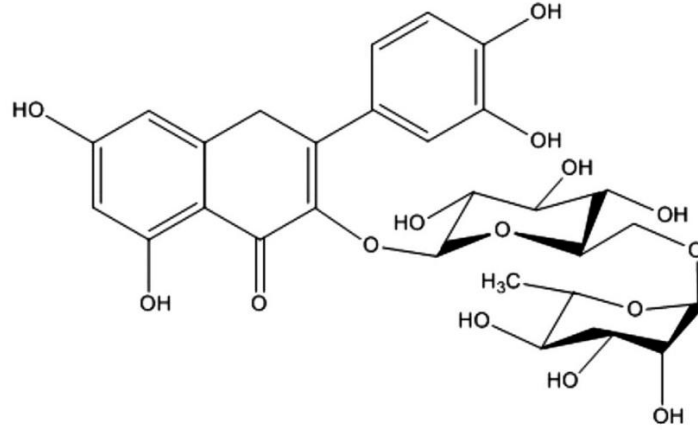
Çevresel Faktörler	İğne Çapı	↑	Jet hızının yavaşlaması, kalın lif çapı
		↓	İğnenin tıkanması, jet hızının artışı
	Sıcaklık	Polimer tipine göre viskoziteyi değiştirir, çözücü buharlaşma hızını etkiler. Çözelti tipine göre optimum sıcaklık belirlenmelidir.	
	Nem	↑	Hızlı çözücü buharlaşması sonucu iğne ucunun tıkanması
		↓	Lif oluşumunun engellenmesi

Nanolif özelliğini etkileyen birçok parametrenin varlığında, optimum parametrelerin belirlenmesinde gerçekleştirilmesi gereken deney sayısını azaltmak için Taguchi yöntemi kullanılabilir. Taguchi tekniğinin temel amacı, hedef üründen beklenen bir özelliğin en iyi seviyelerini minimum varyasyonla elde eden parametre (faktör) ayarlarını belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda, ürün veya süreç tasarımı için bir mühendislik yöntemi olan parametre tasarımı kullanılmaktadır. Teknik, belirlenen faktör ve seviye sınırları içinde gerçekleştirilecek minimum deney sayısını bulmak için kullanılan en iyi deneysel yöntemlerden biridir. Taguchi yönteminde çok sayıdaki deneysel durumu açıklamak için ortogonal diziler oluşturulmaktadır. Ortogonal dizilerin sahip olduğu en önemli özellik, deney sonucunu etkileyecek birçok faktörün en düşük sayıda test ile değerlendirilmesini sağlanmasıdır. Bu nedenle konvansiyonel kontrollü deney metodundan farklı olarak faktör seviyelerini tek tek değiştirmek yerine eş zamanlı olarak değişiklikler yapmayı önermektedir. Bu sayede deney sayısı minimuma indirilebilmektedir. Taguchi, kalite göstergesi olarak sinyal/gürültü (S/N) oranını kullanmıştır. Yani hedeflenen kalite parametresinin, ortogonal diziler ile belirlenen deneyler sonucundaki ortalamasının (sinyal) standart sapmaya (gürültü) oranıdır. S/N oranı en büyük en iyi, en küçük en iyi ve nominal en iyi olmak üzere üç farklı seçenek üzerinden değerlendirilebilir (Karna ve Sahai, 2012; Meena vd., 2018).

2.5. Rutin

Flavonoidler, polifenolik bileşikler, benzopiran fonksiyonel grubu içeren bitki kaynaklı kimyasalların önemli sınıflarından biridir. Flavonoidler ve bunların glikozidleri, bitki metabolitlerinin ana sınıflarından birini oluşturur. Serbest radikal tutucu, antienflamatuvar, immünomodülatör, antimikrobiyal özellikleri ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet veya osteoporoz gibi

çeşitli hastalıkların önlenmesindeki rolleri nedeniyle flavonoidler değerli potansiyel ilaçlardır. Bitkilerde yaklaşık 4000 çeşit flavonoid bulunduğu bildirilmiştir (Ganeshpurkar ve Saluja, 2017; Gullon vd., 2017; Negahdari vd., 2021).



Şekil 2.6. Rutinin kimyasal yapısı (Frutos, Rincón-Frutos, ve Valero-Cases, 2019)

Rutin hidrat (30,40,5,7-tetrahidroksi-flavon-3-rutinosid) BCS Class II’de yer alan sarı renkli, zayıf biyoyararlanım ve düşük kararlılık gösteren toz bir etkin maddedir. Vitamin P olarak da tanınmaktadır. Karabuğday başta olmak üzere sedef otu, çarkıfelek, çay, elma gibi bitkilerden elde edilen ve yaklaşık 70 bitkide bulunduğu bilinen bir flavonol glikozittir. Klinik olarak anlamlı fonksiyonel gruplar taşımaktadır. Rutinin farmakolojik açıdan antioksidan, sitoprotektif, vazoprotektif, antikarsinojenik, nöroprotektif ve kardiyoprotektif aktiviteler gösterdiği ve genom stabilitesinin korunmasında potansiyel olarak faydalı olduğu bildirilmiştir (Frutos vd., 2019; Ganeshpurkar ve Saluja, 2017; Gullon vd., 2017; Negahdari vd., 2021; Truzzi vd., 2021).

Rutin serbest radikal süpürücü etkisi nedeniyle yara tedavisinde umut vadeden doğal bir moleküldür (Asfour vd., 2017). İnsan fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada rutin toplam protein oranını değiştirmeden kolajen oranını kontrol grubuna göre %61 oranında arttırdığı gösterilmiştir (Stipcevic, Piljac, ve Berghe, 2006).

Bir hücre kültürü çalışmasında yükselen derişimlerde H_2O_2 ile muamele edilen fare fibroblast hücrelerine kuersetin ve rutin içeren lipozomlar uygulanmıştır. Ölçülen hücre canlılıklarına göre kuersetin içeren lipozomlar belirli bir H_2O_2 derişimine kadar rutin ile benzer oranda hücre canlılığı sağlamıştır. Ancak yüksek H_2O_2 derişimlerinde rutin hücre canlılığına pozitif etkisi devam ederken kuersetin aynı koruyucu etkiyi göstermemiştir (Bonechi vd., 2018).

İnsan deri fibroblast hücreleriyle yapılan bir hücre kültürü çalışmasında rutinin ve polimerize edilerek suda çözünür hale getirilmiş polyrutinin proliferatif kontrol grubuna göre proliferatif özellik gösterdiği saptanmıştır (Pivec vd., 2019).

Rutin ile hazırlanan bir pickering emülsiyon çalışmasında, ratlar üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* yara iyileşmesi deneyi sonuçlarına göre rutin içeren formülasyonun yara kapanmasında tedavi uygulanmamış kontrol grubuna göre çok daha hızlı iyileştiği gösterilmiştir (Asfour vd., 2017).

Hiperglisemik ratlar üzerinde yapılan bir araştırmada, intraperitoneal olarak uygulanan rutinin diyabetik ratlardaki yara tedavisine katkısı, kontrol grubu olarak kullanılan ve tedavi uygulanmayan diyabetik ve diyabetik olmayan iki farklı rat grubu ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde en geç iyileşme diyabetik rat kontrol grubunda görülürken, rutin ile tedavi edilmiş diyabetik rat grubu en hızlı iyileşmeyi göstermiştir (L.-Y. Chen vd., 2020).

Hiperglisemik ratlar üzerinde yapılan bir diğer araştırmada, yine tedavi uygulanmayan diyabetik ve diyabetik olmayan ratların kontrol grubu olarak seçildiği yara tedavisi çalışması yapılmıştır. Tedavi uygulanmayan diyabetik ve diyabetik olmayan normal rat grupları kontrol grubu olarak seçilmiş ve yalnızca diyabetik ratlardan oluşan bir grup rutin nanolifleri ile tedavi edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en geç iyileşme diyabetik rat kontrol grubunda görülürken, rutin nanolifleri ile tedavi edilmiş diyabetik rat grubu en hızlı iyileşmeyi göstermiştir. Çalışmada nanolif üretimi için kitosan/PVA polimer kombinasyonu kullanılmıştır. Etkin maddesiz formülasyonları içeren bir çalışma grubu olmaması nedeniyle tedavi edici özellikteki rutinin etkisi net olarak görülememektedir (Majd vd., 2016).

Bu tez çalışması kapsamında nanoliflerin yara tedavisi açısından oldukça değerli geometrik yapısı ve avantajlarının, rutinin antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri ile birleştirilerek yama formülasyonu geliştirilmesi planlanmıştır.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde Adı	Firma Adı, Menşei
Asetonitril	Sigma-Aldrich, Almanya
Develosil FlexFire C18, 1.6 µm, 2x100 kolon	Nomura Chemicals - Japonya
Dimetilformamid	Merck, Almanya
Dötero DMSO	Merck, Almanya
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	Merck, Almanya
DSC Hücresi	Schimadzu, Japonya
Etanol	Carlo Erba, İtalya
Eudragit® L100	Evonik, Almanya
Formik Asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Ketamin	Richter Pharma, Avusturya
Ksilazin	Bioveta, Çek Cumhuriyeti
Metanol	Carlo Erba, İtalya
Polivinil Alkol	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum Fosfat Monobazik	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum Klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Rutin Hidrat	BLD Pharmatech - Çin
Sodyum Fosfat Dibazik	Merck, Almanya
Sodyum Klorür	Merck, Almanya
Şırınga (5, 10, 20 mL)	Set, Türkiye

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Firma Adı, Menşei
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Distile Su Cihazı	Millipore, Fransa
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	Shimadzu, Japonya
Elektroegirme Cihazı	Inovenso, Türkiye

Etüv	Nüve, Türkiye
Hassas Terazı	Mettler Toledo, ABD
Infrared Spektrofotometresi	Shimadzu, Japonya
Işık Mikroskobu	Leica, Almanya
Kararlılık Kabini	Aymes, Türkiye
Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
pH Metre	Mettler Toledo, ABD
Taramalı Elektron Mikroskobu (Masaüstü)	Hitachi, Japonya
Taramalı Elektron Mikroskobu	Carl Zeiss, Almanya
Termometre	Ebro, Almanya
Ultra Basınçlı Sıvı Kromatografisi	Agilent Technologies, ABD
Ultrashield CP MAS NMR	Brucker, Almanya
Ultrasonik Banyo	Wisd, Güney Kore
Vorteks	Jeitech, Güney Kore

4. YÖNTEM

4.1. Önformülasyon Çalışmaları

4.1.1. Etkin maddenin spektroskopik analizleri

Etkin maddenin spektroskopik analizleri, etkin madde miktar tayini, karakterizasyon ve kararlılık gibi karşılaştırma gereken çalışmalarda kullanılmak üzere UV Spektrofotometre, UPLC, FTIR ve NMR cihazlarında gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.1. Dalga boyu belirleme

Rutin hidratın miktar tayini çalışmalarının gerçekleştirileceği dalga boyunu belirlemek için Rutin hidrat metanol içerisinde çözölmüş ve UV spektrometre aracılığıyla spektrum taraması yapılmıştır. Yapılan spektrum taramasında literatürle paralel olarak Rutin hidrat'ın en yüksek absorbans değerini verdiği dalga boyu analitik yöntem geliştirmek üzere seçilmiştir (Desnita ve Luliana, 2021; Pinto vd., 2021).

4.1.1.2. Analitik yöntem geliştirme

Analitik yöntem geliştirme çalışmalarında Rutin hidrat etkin maddesinin miktar tayini için sıvı kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu nedenle tez çalışması için tercih sebebi olmuştur.

4.1.1.3. Analitik yöntem validasyonu

Geliştirilen analitik yöntemin doğruluk, güvenilirlik ve geçerliliğinin veriler aracılığıyla kanıtlanabilmesi için analitik yöntem validasyonu yapılmaktadır. Uluslararası Harmonizasyon Konsülü (ICH) tarafından analitik yöntemlerin valide edilmesinde kullanılmak üzere belirlenen prosedürlere uygun olarak gerçekleştirilmiştir (ICH Guideline, 2005).

4.1.1.3.1. Çalışma Aralığı

Analitik prosedürün doğrusallık, doğruluk ve kesinliğinin kanıtlandığı maksimum ve minimum derişimleri içeren aralıktır. Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük derişimden, doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan derişim aralığını kapsar.

Etkin maddenin metanol içerisinde ana stoktan seri dilüsyon yöntemiyle, 1-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında hazırlanan 10 farklı derişimi UPLC aracılığıyla analiz edilmiştir.

Derişime karşı çizilen alan grafiğinde determinasyon katsayısı incelenerek doğrusallığın korunduğu en alt ve en üst derişimler çalışma aralığı olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, düşük konsantrasyonların analizi için tek çalışma aralığından iki farklı konsantrasyon aralığı seçilerek valide edilmiştir. Bundan sonraki validasyon çalışmaları her iki aralık için de tekrarlanmıştır.

4.1.1.3.2. Doğrusallık

Çalışma aralığı içerisindeki bir aralıkta seçilen derişim değerlerine karşılık gelen analiz sonuçlarının veya bazı durumlarda gerekli matematiksel dönüşüm uygulanmış sonuçların birbiriyle doğru orantı oluşturabilme yeteneğidir.

Doğrusallık değerlendirilirken uygun istatistiksel yöntemlerle regresyon hesaplaması kullanılmaktadır.

Doğrusallığın kanıtlanması amacıyla farklı derişimlerde 3 analit serisi hazırlanmış ve örnekler UPLC ile analiz edilerek alan/alıkonma süresi değerleri bulunmuştur. Derişime karşı elde edilen değerler ile regresyon eşitliği oluşturulmuştur.

4.1.1.3.3. Doğruluk

Gerçek veya kabul edilen referans değer ile analizden elde edilen değer arasındaki yakınlık yöntemin doğruluğunu göstermektedir. Doğruluğun kanıtlanması için doğrusallığın kanıtlandığı aralıktan seçilen, birbirinden farklı 3 derişimde 3'er adet hazırlanan analitler analiz edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen derişimler % geri kazanım, bağıl standart sapma ve %95 güven aralığı açısından değerlendirilmiştir

4.1.1.3.4. Kesinlik

Kesinlik, aynı örnekten alınan farklı derişimlerde yapılan tekrarlı analiz sonuçlarının birbirine yakınlığını gösterir.

Kesinliğin kanıtlanması için 3 farklı derişimde seyreltilen analitlerin 3'er defa analiz edilmesi sonucu elde edilen her bir derişim standart sapma, varyasyon katsayısı ve güven aralığı değerleriyle incelenmiştir.

Kesinlik çalışması farklı günlerde tekrar edilerek günler arası tekrarlanabilirlik gösterilmiştir.

4.1.1.3.5. Duyarluluk

Geliştirilen analitik yöntemin saptayabildiği ve tayin edebildiği en düşük derişimlerdir. Saptama sınırı (LOD) analit içerisindeki etkin maddenin saptanabildiği en düşük derişim değeridir ve her zaman kantitatif olmayabilir. Tayin sınırı (LOQ) ise analit içerisindeki etkin maddenin doğru ve kesin bir kantitatif değerle saptanabildiği en düşük derişim değeridir.

LOD ve LOQ değerleri Eşitlik 4.1 ile hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

(4.1)

σ : Standart Sapma; S : Eğim

4.1.1.3.6. Seçicilik

Analitik yöntemin analiz edilecek etkin maddeye özgül ve seçici olduğunun, analitin içerisindeki diğer maddelerin, etkin maddeye girişim yapmadığının gösterilmesidir. Seçiciliğin gösterilmesi için etkin madde içeren ve içermeyen iki farklı analit hazırlanmış ve analitlerden birine çalışma boyunca kullanılan ve analiz ortamında bulunabilecek diğer maddeler eklenerek ölçüm yapılmıştır.

4.1.1.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Etkin maddenin infrared ışık spektrumu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak 500-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ölçülmüştür.

4.1.1.5. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Etkin maddenin ¹H-NMR spektroskopisi dötoro DMSO kullanılarak Ultrashield CP MAS NMR ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. Yardımcı maddelerin spektroskopik analizleri

4.1.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Formülasyonda kullanılan polimerlerin infrared ışık spektrumu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak 500-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ölçülmüştür.

4.1.2.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Formülasyonda kullanılan polimerlerin ^1H -NMR spektroskopisi dötoro DMSO kullanılarak Ultrashield CP MAS NMR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Çözünürlük

Etkin maddenin çözünürlük çalışmasında çözünme kabı olarak 10 mL’lik vida kapaklı cam deney tüpleri kullanılmıştır. Deney tüplerinin içerisine 0,4 gram etkin madde koyulmuş, üzerine 5 mL çözücü eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra parafilmlelenmiştir. Hazırlanan çözünme ortamı deney süresi boyunca yatay çalkalayıcıda oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Her çözücü için 9 adet deney tüpü hazırlanmış ve 24, 48 ve 72. saatlerde 3’er deney tüpünden süpernatantlar filtrelenerek ayrıldıktan sonra analiz edilmiştir. Doymuş çözeltilerdeki çökmenin engellenmesi için örnek alımından hemen sonra analitler uygun miktarda metanol ile seyreltilmiştir.

4.1.4. Termal analizler

Etkin madde ve yardımcı maddelerin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek ~ 4 mg tartılarak sızdırmaz alüminyum hücrelerde 50–300 °C sıcaklık aralığında dakikada 10 °C artış uygulanarak 50 mL dk⁻¹ hızında nitrojen gazı akışı eşliğinde analiz edildi.

4.2. Formülasyon Çalışmaları

4.2.1. Elektroegirme yöntem parametrelerinin belirlenmesi

Sistem parametrelerinin belirlenmesinde Taguchi metodu kullanılmıştır.

4.2.1.1. Taguchi Metodu

Tasarımın oluşturulması için hedeflenen özelliği etkileyebilecek sistem parametrelerinin belirlenmesi ve bu parametrelerin değişken seviyelerinden oluşan bir deney tasarımı oluşturulması gerekmektedir.

Taguchi tasarımına uygun bir deney örüntüsü oluşturmak amacıyla elektroegirme cihazının ön denemelerinden ve literatür taramalarından elde edilen bilgiler ışığında nanolif kalınlığını ve nanolifte istenmeyen boncuk oluşumunu en çok etkileyen faktörler; polimer derişimi, kullanılan çözücü karışımının birbirlerine oranı; nozül ve toplayıcı

arasındaki mesafe ve iğne çapı olarak belirlenmiştir (Horuz ve Belibağlı, 2017; Khanlou vd., 2015).

Yapılan ön denemelerde, rastgele seçilen deney koşullarının nanolif oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Rutin hidrat içeren nanolifleri üretmek amacıyla seçilmiş olan PVA ve Eudragit® L100 polimerleri belirli oranlarda uygun çözücülerde çözündürülmüş ve eğrilmiştir. Toplanan örneklerde nanolif oluşumunun varlığı öncelikle ışık mikroskobunda ardından nanolif oluşumundan şüphelenilen örnekler elektron mikroskobunda incelenmiştir.

Ön denemelerden elde edilen bilgiler ışığında, Taguchi deney tasarımı oluşturmak için belirlenen faktörlerin nanolif oluşmasını engellemeyecek şekilde belirlenen seviyeleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Taguchi hesaplamaları Minitab® 18 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1. PVA ile hazırlanan nanoliflerin Taguchi tasarımı için faktör ve seviyeleri

Faktörler				
	PVA Miktarı (mg)	Çözücüdeki Su Hacmi* (mL)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
Seviyeler	1050	8	17	17
	1000	7,5	15	19
	950	7	13	21
	900	6,5	11	23

* DMF ve BDS'den oluşan toplam çözücü hacmi 13 mL'dir.

Tablo 4.2. Eudragit® L100 ile hazırlanan nanoliflerin Taguchi tasarımı için faktör ve seviyeleri

Faktörler				
	Eudragit® L100 Miktarı (mg)	Çözücüdeki DMF miktarı* (mL)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
Seviyeler	1400	4	11	17
	1350	3,5	13	19
	1300	3	15	21
	1250	2,5	17	23

* DMF ve MeOH'den oluşan toplam çözücü hacmi 10 mL'dir.

Oluşturulan deney örüntüsü ve sonuçlarından Bölüm 5’te bahsedilmiştir.

4.2.2. Etkin madde miktarının belirlenmesi

Elektroegirme çözeltisinin içerisinde polimere oranla %10 etkin madde eklenmiştir.

4.2.3. Elektroegirme çözeltilerinin hazırlanması

Elektroegirme cihazı aracılığıyla eğrilecek olan çözeltilerin hazırlanmasında PVA polimeri için sıcakta çözündürme, Eudragit® L100 polimeri için ise soğukta çözündürme yöntemi kullanılmıştır. Tablo 5.15 ve Tablo 5.16’da belirtilen oranlarda polimerler tartıldıktan sonra 40 mL hacimli, vida kapaklı, cam vial içerisine koyulmuştur. Polimerlerin üzerine çözücü karışımı eklendikten hemen sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 20 mm uzunluğundaki manyetik balık aracılığıyla 750 rpm hızda karıştırma başlatılmıştır. PVA içeren viallerin yer aldığı manyetik karıştırıcının sıcaklığı 140°C’ye ayarlanmış, Eudragit® L100 içeren viallerin yer aldığı karıştırıcıya herhangi bir ısıtma uygulanmadan oda sıcaklığında karışması sağlanmıştır. PVA polimerinin çözündürüldüğü manyetik karıştırıcının ısıtıcısı 22 saatin sonunda kapatılmış ve 1 saatlik soğuma süresinin ardından hala karışmakta olan çözeltilere hesaplanan miktarlarda tartılan Rutin hidrat eklenmiştir. Rutin hidrat’ın çözünmesi için karıştırma işlemi 1 saat daha devam ettirilerek toplam 24 saatlik sürenin sonunda elektroegirme çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler 20 dakika boyunca ultrasonik banyo içerisinde tutularak hava kabarcıklarından arındırılmış ve elektroegirmeye uygun hale getirilmiştir.

4.2.4. Çözeltilerin eğrilmesi

Elektroegirme çözeltileri uygun bir şırınga içerisine aktarıldıktan sonra poliüretan boru ile nozüle aktarılacak üzere pompaya yerleştirilmiştir. Nozülün toplayıcıya bakan çıkışına kadar yalnızca pompa yardımıyla ilerletilen çözelti, nozül ucunda damla oluşturulduktan sonra akış ve yüksek voltaj başlatılarak polimerin lifler halinde toplayıcıya ulaşması sağlanmıştır. Akış hızı ve voltaj değerleri gözle görülür ve kesintisiz bir Taylor konisi oluşturacak değerlere göre ayarlanmıştır. Tambur toplayıcı 80 mm doğrusal yörüngede 3 mm.sn^{-1} hızda hareket edecek ve 300 rpm hızda kendi eksenini etrafında dönecek şekilde ayarlanmıştır.

4.3. Karakterizasyon Çalışmaları

Elde edilen formülasyonların karakterizasyonları aşağıda belirtilen yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Fiziksel görünüm

Formülasyonların renk ve dokuları görsel olarak değerlendirilmiştir.

4.3.2. Mikroskopik analizler

Nanolif morfolojilerinin belirlenebilmesi için aşağıdaki mikroskopik yöntemler kullanılmıştır.

4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Formülasyonların morfolojik özellikleri, lif çapları ve boncuk sayılarının belirlenmesi için SEM kullanılmıştır. Görüntüler 5 kV-yüksek büyütme gözlem koşulu, şarjlanma azaltıcı gözlem modu ve SE görüntü sinyalinde alınmıştır.

4.3.2.2. Lif çapının belirlenmesi

Formülasyonlara masaüstü SEM ile 10kx büyütme uygulandıktan sonra 15 farklı lif çapı ölçülmüş ve ortalaması alınarak formülün ortalama lif çapı belirlenmiştir. Formülasyon çalışmalarının sonucunda seçilen optimum formüllerin lif çapları ise daha gelişmiş bir SEM cihazı ile 30kx büyütülerek belirlenmiştir.

4.3.2.3. Boncuk sayısının belirlenmesi

Formülasyonlara masaüstü SEM ile 10kx büyütme uygulandıktan sonra elde edilen alandaki boncuk sayıları görsel olarak sayılmıştır.

4.3.3. Spektroskopik analizler

Formülasyonların spektroskopik analizleri, karşılaştırma gereken çalışmalarda kullanılmak üzere FTIR ve NMR spektrometrik cihazlarında gerçekleştirilmiştir.

4.3.3.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Formülasyonların infrared ışık spektrumu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak 500-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ölçülmüştür.

4.3.3.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Formülasyonların ¹H-NMR spektroskopisi dötoro DMSO kullanılarak Ultrashield CP MAS NMR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

4.3.4. Termal analizler

Formülasyonların termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek ~ 4 mg tartılarak sızdırmaz alüminyum hücrelerde 50–300 °C sıcaklık aralığında dakikada 10 °C artış uygulanarak 50 mL dk⁻¹ hızında nitrojen gazı akışı eşliğinde analiz edilmiştir.

4.3.5. Mekanik özelliklerin belirlenmesi

Formülasyonların tekstür profil analizi Tekstür analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar 3x2 cm boyutlarında ve uzun kenarı gerilim uygulayan aparata dik olacak şekilde yerleştirilmiştir. Test 5,6 g (0,05 Nm) gerilim algılandığında, 1 mm/sn hızla başlamış ve 10 mm boyunca uygulanan gerilim takip edilerek kopma mukavemeti ve kopma uzaması değerleri belirlenmiştir. Her formülasyon için testler 3 kez tekrarlanmıştır.

4.3.6. Antioksidan aktivite testi

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radikal DPPH testi uygulanmıştır. Bunun için 25 µg/mL konsantrasyonunda Rutin hidrat'ın 100 mL metanol çözeltisi içerisine %2,5 (a/h) 100 mL DPPH metanol çözeltisi eklenmiştir. Ardından karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilip 517 nm'de oluşan absorbans farkları ölçülerek Eşitlik 4.2 ile serbest radikalleri süpürme yeteneği gözlemlenmiştir (Yenilmez ve Yazan, 2017). Aynı işlem, aynı miktarda Rutin hidrat içeren formülasyonlar ve formülasyonlar ile aynı ağırlıkta etkin maddesiz formülasyonlar tekrarlanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

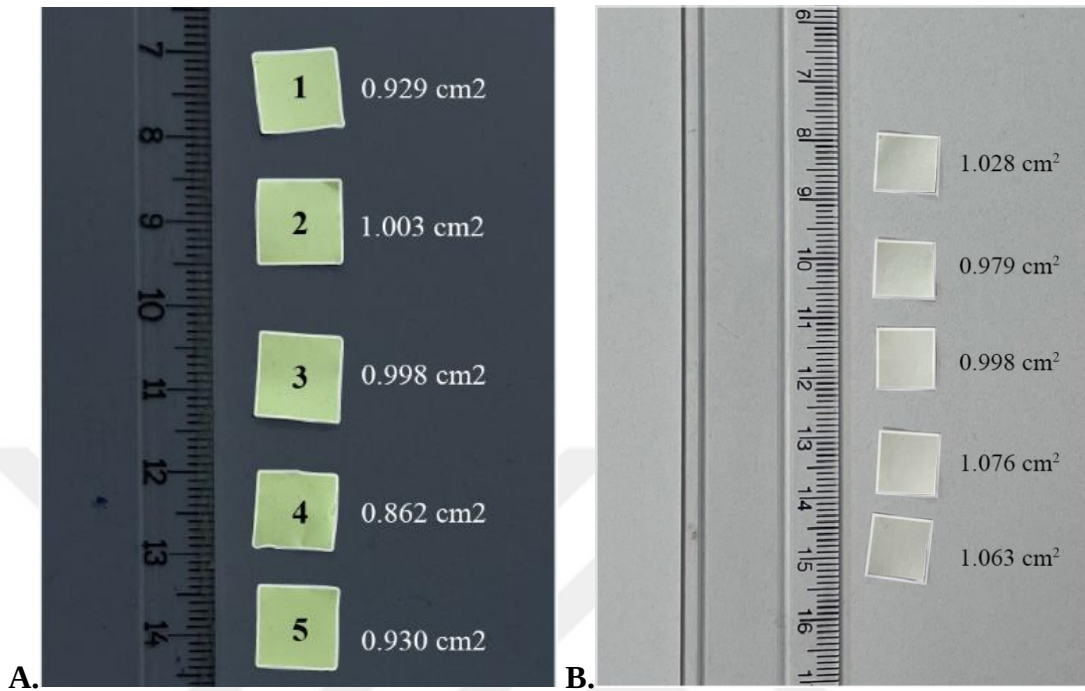
$$\%Süpürme = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

(4.2)

4.3.7. Etkin madde miktar tayini

Etkin madde miktar tayini için üretilen nanoliflerin gelişigüzel 5 cm²'lik kare şeklindeki bölümünün köşelerinden ve tam ortasından 1'er cm²'lik alanlar çıkartılıp (Görsel 4.1) tartılmış ve PVA ile hazırlanan nanolifler 1 mL BDS içerisinde çözündürülerek, Eudragit® L100 ile hazırlanan nanolifler ise 1 mL metanol içerisinde

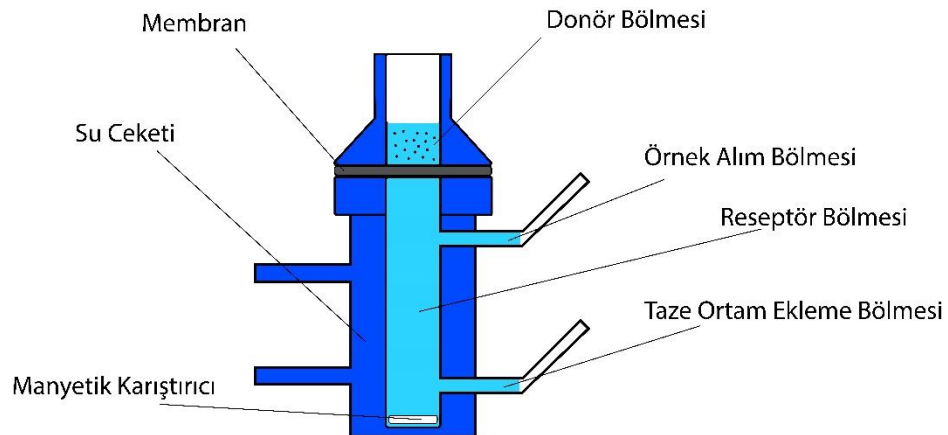
çözündürülerek UPLC cihazında analiz edilmiştir. Yüklenen etkin madde miktarı birim alana ve birim miktara düşen etkin madde miktarı olarak iki farklı şekilde hesaplanmıştır.



Görsel 4.1. Etkin madde miktar tayini için kullanılan nanoliflerin alan hesapları

4.3.8. Etkin madde salım çalışması

Etkin maddenin *in vitro* salım çalışması 6'lı Franz difüzyon hücre sistemi (**Şekil 4.1**) kullanılarak yapılmıştır. Piyasada Rutin hidrat içeren bir yara tedavi edici müstahzar bulunmaması nedeniyle formülasyonların salımları saf etkin madde çözeltisi ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.1. Franz difüzyon hücresi

Deney süresince reseptör kompartmana koyulan pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) 100 rpm hızla karıştırılmıştır. Döner kompartman ile reseptör kompartman 0,45 µm por çaplı selüloz membran filtre ile ayrılmış ve reseptör kompartmanın tepe yüzey alanı çapında kesilen formülasyonlar yarım saat süreyle şartlandırılmış membran filtrenin üzerine yerleştirilerek salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince reseptör kompartman manyetik karıştırıcıya bağlı bir yay ile 100 rpm hızda karıştırılmıştır. Saf etkin madde salımı için, formülasyonların içerdiği ortalama miktardaki etkin madde tartılarak membran filtrenin döner kompartman yüzüne koyulduktan sonra üzerine 1 mL PBS eklenmiştir.

Etkin maddenin deney ortamındaki kararlılığının gösterilebilmesi için 1000 µg.mL⁻¹ Rutin hidrat 10 mL çözünme ortam ve sıcaklığında 24 saat süreyle 100 rpm hızla karıştırılarak analiz edilmiş ve % geri kazanım hesaplanmıştır.

4.4. Kararlılık Çalışmaları

Kararlılık çalışmaları 5±3°C, 25±2°C (60% RH ± 5% RH) ve 40±2°C (75% RH ± 5%) koşullarında 30., 60. ve 90. günlerde alınan örneklerde yapılan karakterizasyon karşılaştırmaları ile gerçekleştirilmiştir (ICH Guideline, 2003). Kararlılık için nanolifler iki yağlı kağıt arasına yerleştirildikten sonra alüminyum folyo ile hava almayacak şekilde ambalajlanmıştır (Görsel 4.2).



Görsel 4.2. Kararlılık ambalajı

4.5. *In Vivo* Etkinlik Çalışması

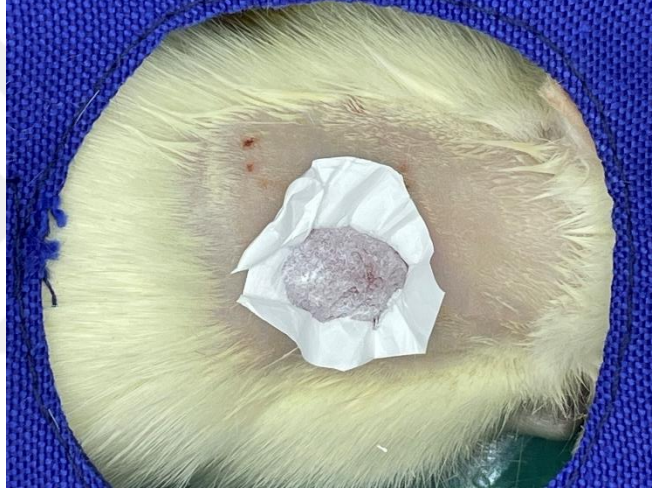
Deneylerde dişi sıçanlar (160-180 g) kullanılmıştır. Bütün hayvanlar, 22 ± 1°C'de 12 saatlik aydınlık / karanlık döngüye sahip iyi havalandırılan bir odaya koyulup su ve

suya serbestçe erişimleri sağlanmıştır. Çalışma hayvan bakımı ve araştırma protokolleri “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No: 85–23, revised in 1985)” tarafından kabul edilen ilke ve kılavuzlara göre gerçekleştirilmiştir.

Sıçanlar 75 mg/kg (i.p.) ketamin ve 15 mg/kg (i.p.) ksilazin ile anestezi altına alınmıştır. Ardından sıçanların dorsal kılları tıraş edilip yara oluşturulacak deri bölgesi %70’lik alkol ile dezenfekte edildikten sonra her bir hayvanın dorsal interskapular bölgesinde dairesel olarak (10-12 mm) işaretlenen bölge (Görsel 4.3) steril bir makasla cilt eksize edilerek oluşturulmuştur. Yara oluşturulmasının hemen ardından tedavi gruplarına tedavileri Görsel 4.4’da görüldüğü gibi uygulanmıştır. Tedavi uygulanmayan ayrı bir kontrol grubu olması nedeniyle her hayvan üzerinde tek bir yara oluşturulmuştur. İşlem sonrası deney hayvanlarına analjezik etkisi göstermesi amacıyla İ.P. 100mg/kg asetil salisilik asit verilmiştir. Yara oluşturulduktan sonra, deneklerin birbirleriyle etkileşmelerinden kaynaklanacak herhangi bir hasarı önlemek için deney süresi boyunca hayvanlar ayrı kafeslere yerleştirilmiştir. Hayvan tedavi grupları: kontrol (tedavi edilmeyen), pozitif kontrol (Formülasyonların Madecassol® ile tedavi edilen), etkin maddesiz formüller (F-PVA; F-EUD) ile tedavi edilen gruplar (negatif kontrol) ve formülasyonlar ile (F-PVA-Rutin; F-EUD-Rutin) tedavi edilenler olarak oluşturulmuştur. Kullanılan Madecassol® miktarı (~25 mg) etkin maddeli formülasyon uygulanan hayvanlarda birim yara alanına düşen ortalama etkin madde miktarı kadar etkin madde içerecek şekilde belirlenmiştir. Tedavideki progresif değişiklikler 0, 3, 7, 10 ve 14. günlerde kamera ile fotoğraflanmış ve yara alanları hesaplanmıştır. Ölçüm için belirtilen günlerde, gruplardan 4’er hayvan ayrılarak yara kesiti çıkarılıp histolojik incelemeye gönderilmiştir. Sıçanlara formülasyonlar örnek günlerinde tekrar uygulanmıştır.



Görsel 4.3. Ratların eksizyon bölgesinde yapılan dairesel işaretleme örneği



Görsel 4.4. Eksizyonel model sonrası tedavi uygulanma örneği

5. SONUÇLAR

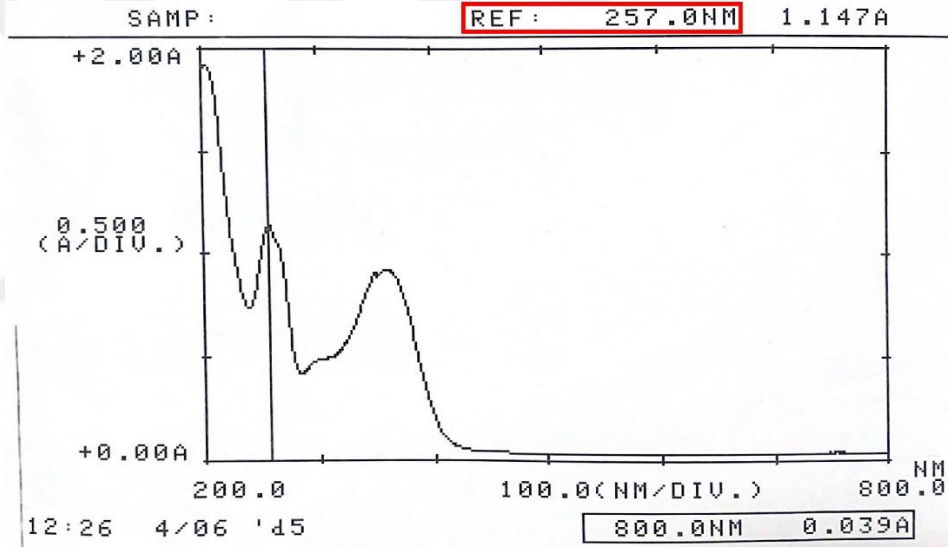
5.1. Önformülasyon Çalışmaları

5.1.1. Etkin maddenin spektroskopik analizleri

5.1.1.1. Dalga boyu belirleme

Rutin hidrat'ın miktar tayini için geliştirilecek analitik yöntemde molekülün saptanabileceği en yüksek sinyal değerini veren dalga boyunun belirlenmesi için yapılan spektrum sonuçları Görsel 5.1'de gösterilmiştir.

Yapılan spektrum taramasında elde edilen verilerin literatür bilgisi ile karşılaştırılması sonucunda analitik yöntem çalışmalarında kullanılacak dalga boyu 257 nm olarak belirlenmiştir.



Görsel 5.1. Rutin hidrat'ın spektrum taraması

5.1.1.2. Analitik yöntem geliştirme

Etkin madde miktar tayininde kullanılan koşullar Tablo 5.1'de görüldüğü şekilde belirlenmiştir.

Tablo 5.1. UPLC Çalışma koşulları

Analitik Cihaz	Agilent 1290 Infinity LC System
Kolon	Develosil FlexFire C18, 1.6µm, 2x100
Kolon Sıcaklığı	40°C
Mobil Faz	82:16:2 / %1 o-Fosforik asit çözeltisi:Asetonitril:Metanol
Dedektör	Max-Light Cartridge Cell – DAD Dedektör
Akış hızı	0,4 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	2 µL

5.1.1.3. *Analitik yöntem validasyonu*

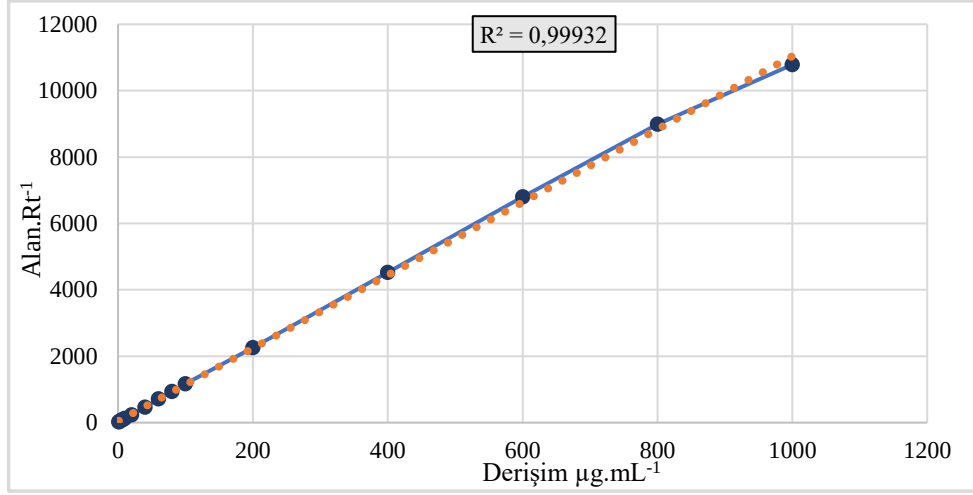
Rutin hidrat'ın miktar tayini analiz sonuçlarının daha hassas olabilmesi için tek bir çalışma aralığı üzerinde iki farklı konsantrasyon aralığında analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.1.1.3.1. *Çalışma aralığı*

Çalışma aralığı sonuçları Tablo 5.2 ve Şekil 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. Çalışma aralığı sonuçları

Derişim	Alan	Rt	Alan.Rt⁻¹
1	23,88	1,879	12,70889
2	34,14	1,868	18,27623
4	63,82	1,865	34,21984
6	84,54	1,857	45,52504
8	101,92	1,858	54,85468
10	129,12	1,859	69,4567
20	234,8	1,859	126,3045
40	469,26	1,863	251,8841
60	712,84	1,857	383,8665
80	939,88	1,873	501,8046
100	1164,72	1,874	621,5155
200	2260,36	1,865	1211,989
400	4525	1,866	2424,973
600	6699,78	1,856	3609,795
800	8986,94	1,871	4803,282
1000	10749,88	1,869	5751,675



Şekil 5.1. Çalışma aralığı derişim eğrisi

Çalışma aralığının belirlenmesi için Tablo 5.2’de belirtilen derişimlerde Rutin hidrat’ın miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde doğrusallığın 800 µg derişimden sonra bozulduğu keşfedilmiş, bu nedenle çalışma aralığı 1-800 µg olarak belirlenmiştir (Şekil 5.1).

5.1.1.3.2. Doğrusallık

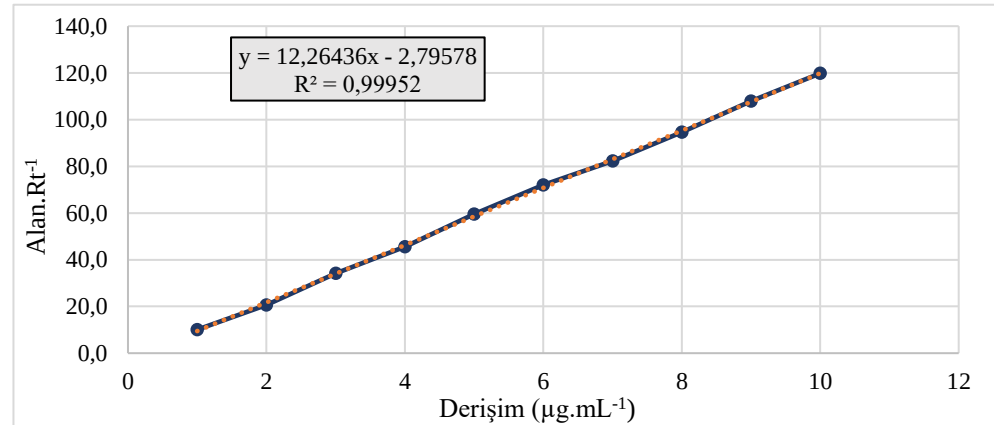
1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında

Tablo 5.3. Doğrusallık sonuçları (1-10 µg.mL⁻¹)

Derişim (µg.mL ⁻¹)	Seri 1			Seri 2			Seri 3			Ortalama	SS	SH
	Alan	Rt	Alan.Rt ⁻¹	Alan	Rt	Alan.Rt ⁻¹	Alan	Rt	Alan.Rt ⁻¹			
1	19,2	1,882	10,202	19,2	1,869	10,273	18,0	1,857	9,693	10,056	0,3163	0,1826
2	39,3	1,874	20,971	38,2	1,867	20,461	38,3	1,868	20,503	20,645	0,2833	0,1636
3	65,0	1,878	34,611	63,8	1,862	34,264	62,8	1,867	33,637	34,171	0,4939	0,2851
4	84,4	1,871	45,110	86,9	1,869	46,495	84,0	1,871	44,896	45,500	0,8685	0,5014
5	109,9	1,874	58,645	113,1	1,867	60,578	111,3	1,873	59,423	59,549	0,9730	0,5618
6	134,2	1,871	71,726	134,1	1,864	71,942	135,3	1,867	72,469	72,046	0,3822	0,2206
7	152,1	1,868	81,424	154,9	1,862	83,190	153,3	1,863	82,287	82,300	0,8831	0,5099
8	175,0	1,871	93,533	178,5	1,859	96,019	175,5	1,862	94,253	94,602	1,2793	0,7386
9	205,0	1,870	109,626	199,7	1,860	107,366	197,5	1,850	106,757	107,916	1,5116	0,8727
10	226,0	1,876	120,469	225,6	1,855	121,617	217,6	1,855	117,305	119,797	2,2335	1,2895

Tablo 5.4. Doğrusallık eğrisinin değerleri (1-10 µg.mL⁻¹)

	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
R²	0,99888	0,99940	0,99905	0,99952
Eğim	12,30072	12,36762	12,12473	12,26436
y-kesişim	-3,02231	-2,80131	-2,56371	-2,79578



Şekil 5.2. Doğrusallık eğrisi (1-10 µg.mL⁻¹)

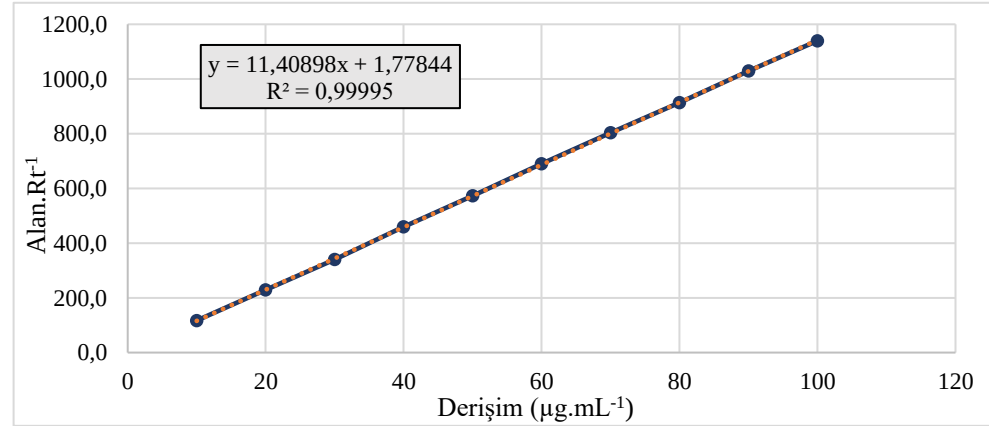
10-100 µg.mL⁻¹ derişim aralığında

Tablo 5.5. Doğrusallık sonuçları (10-100 µg.mL⁻¹)

Derişim (µg.ml ⁻¹)	Seri 1			Seri 2			Seri 3			Ortalama	SS	SH
	Alan	Rt	Alan.Rt ⁻¹	Alan	Rt	Alan.Rt ⁻¹	Alan	Rt	Alan.Rt ⁻¹			
10	215,3	1,834	117,394	218,1	1,842	118,404	215,3	1,865	115,442	117,080	1,5055	0,8692
20	425,0	1,837	231,355	422,4	1,840	229,565	420,0	1,866	225,080	228,667	3,2325	1,8663
30	630,4	1,840	342,609	621,2	1,837	338,160	630,7	1,865	338,177	339,649	2,5636	1,4801
40	845,6	1,838	460,065	846,7	1,841	459,913	849,0	1,857	457,189	459,056	1,6185	0,9344
50	1052,3	1,839	572,213	1064,2	1,837	579,314	1055,5	1,856	568,696	573,408	5,4089	3,1228
60	1264,0	1,835	688,828	1284,4	1,853	693,146	1274,7	1,856	686,800	689,591	3,2414	1,8714
70	1484,4	1,841	806,301	1498,4	1,866	803,001	1485,3	1,857	799,838	803,047	3,2315	1,8657
80	1685,7	1,834	919,138	1706,9	1,875	910,347	1688,3	1,856	909,644	913,043	5,2904	3,0544
90	1899,8	1,834	1035,878	1900,5	1,873	1014,682	1924,2	1,855	1037,305	1029,288	12,6692	7,3146
100	2110,4	1,837	1148,830	2117,1	1,874	1129,723	2111,1	1,850	1141,135	1139,896	9,6137	5,5504

Tablo 5.6. Doğrusallık eğrisinin değerleri (10-100 µg.mL⁻¹)

	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
R²	0,99888	0,99940	0,99905	0,99952
Eğim	12,30072	12,36762	12,12473	12,26436
y-keseşim	-3,02231	-2,80131	-2,56371	-2,79578



Şekil 5.3. Doğrusallık eğrisi (10-100 µg.mL⁻¹)

5.1.1.3.3. Doğruluk

1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında

Tablo 5.7. Doğruluk çalışması sonuçları (1-10 µg.mL⁻¹)

Bilinen Derişim (µg.mL ⁻¹)	2	5	10
	1,9679	5,0727	9,8462
Elde edilen derişim (µg.mL ⁻¹)	2,0169	4,9388	9,8706
	2,0306	4,9388	10,0714
	98,3973	101,4532	98,4617
%Geri kazanım	100,8470	98,7759	98,7057
	101,5318	98,7759	100,7137
Ortalama % Geri Kazanım	100,2587	99,6684	99,2937
Standart Hata	0,0190	0,8924	0,7135
Varyasyon Katsayısı	0,0002	0,0090	0,0072
%95 Güven Aralığı	0,0373	0,0875	0,1398

10-100 µg.mL⁻¹ derişim aralığında

Tablo 5.8. Doğruluk çalışması sonuçları (10-100 µg.mL⁻¹)

Bilinen Derişim (µg.mL ⁻¹)	10	50	100
	10,1265	49,4265	99,0583
Elde edilen derişim (µg.mL ⁻¹)	9,9225	49,5379	99,3823
	10,1562	50,6050	99,8871
	101,2653	98,8530	99,0583
%Geri kazanım	99,2248	99,0757	99,3823
	101,5619	101,2101	99,8871
Ortalama % Geri Kazanım	100,6840	99,7130	99,4426
Standart Hata	0,0735	0,7513	0,2411
Varyasyon Katsayısı	0,0007	0,0075	0,0024
%95 Güven Aralığı	0,1439	0,7356	0,4722

5.1.1.3.4. Kesinlik

1-10 µg.mL⁻¹ derişim aralığında

Tablo 5.9. Kesinlik çalışması sonuçları (1-10 µg.mL⁻¹)

Gün İçi Kesinlik			
1. Gün			
Bilinen Derişim (µg.mL ⁻¹)	2	5	10
	1,9063	4,8753	9,7472
Elde edilen derişim (µg.mL ⁻¹)	1,9028	4,9747	9,7744
	1,9717	5,0911	9,8995
Ortalama	1,9269	4,9804	9,8070

Standart Sapma	0,0388	0,1080	0,0812
Varyasyon Katsayısı	0,0202	0,0217	0,0083
%95 Güven Aralığı	0,0439	0,1222	0,0919
Günlerarası Kesinlik			
2. Gün			
Bilinen Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2	5	10
	1,9786	4,9492	10,0783
Elde edilen derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,9818	4,8772	10,2406
	1,9915	5,0056	10,2019
Ortalama	1,9840	4,9440	10,1736
Standart Sapma	0,0067	0,0644	0,0847
Varyasyon Katsayısı	0,0034	0,0130	0,0083
%95 Güven Aralığı	0,0076	0,0728	0,0959
3. Gün			
Bilinen Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2	5	10
	1,9288	5,0445	9,9295
Elde edilen derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,8912	5,0832	9,9058
	1,9202	4,9777	10,0732
Ortalama	1,9134	5,0351	9,9695
Standart Sapma	0,0197	0,0534	0,0906
Varyasyon Katsayısı	0,0103	0,0106	0,0091
%95 Güven Aralığı	0,0223	0,0604	0,1025

10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim aralığında

Tablo 5.10. Kesinlik çalışması sonuçları (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Gün İçi Kesinlik			
1. Gün			
Bilinen Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10	50	100
	10,3772	50,3074	97,5196
Elde edilen derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10,4258	50,5928	99,3144
	10,4904	50,6641	97,8881
Ortalama	10,4311	50,5214	98,2407
Standart Sapma	0,0568	0,1887	0,9479
Varyasyon Katsayısı	0,0054	0,0037	0,0096
%95 Güven Aralığı	0,0642	0,2134	1,0718
Günlerarası Kesinlik			
2. Gün			
Bilinen Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10	50	100
	9,9797	50,8830	100,3755
Elde edilen derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10,1413	50,5646	99,8389
	10,0277	50,6421	98,9110
Ortalama	10,0496	50,6965	99,7085
Standart Sapma	0,0830	0,1660	0,7409
Varyasyon Katsayısı	0,0083	0,0033	0,0074

%95 Güven Aralığı	0,0938	0,1877	0,8377
3. Gün			
Bilinen Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10	50	100
	9,9844	50,4711	99,9514
Elde edilen derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10,0283	50,3002	100,2383
	9,8653	50,3797	99,9943
Ortalama	9,9594	50,3837	100,0613
Standart Sapma	0,0843	0,0855	0,1548
Varyasyon Katsayısı	0,0085	0,0017	0,0015
%95 Güven Aralığı	0,0954	0,0967	0,1750

5.1.1.3.5. Duyarlılık

1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim aralığında

Tablo 5.11. Saptama ve tayin sınırları (1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Sınır	Derişim
LOD (Saptama Sınırı)	0,2475
LOQ (Tayin Sınırı)	0,7499

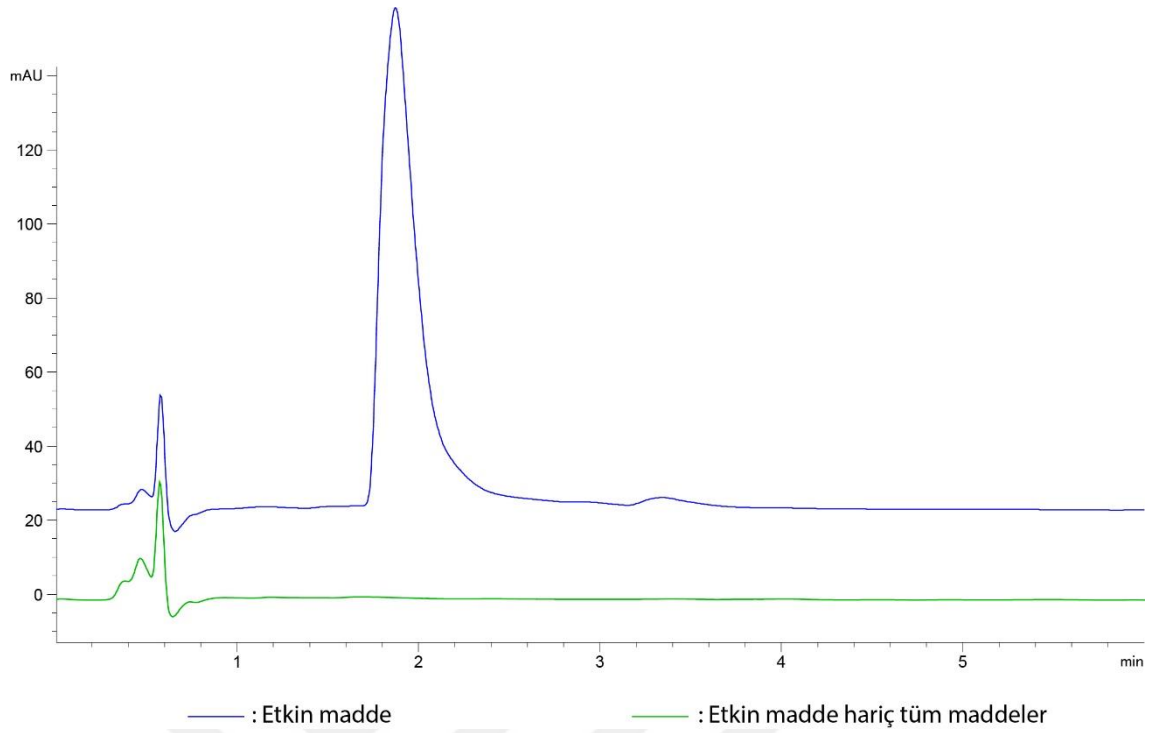
10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim aralığında

Tablo 5.12. Saptama ve tayin sınırları (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Sınır	Derişim
LOD (Saptama Sınırı)	1,3898
LOQ (Tayin Sınırı)	4,2115

5.1.1.3.6. Seçicilik

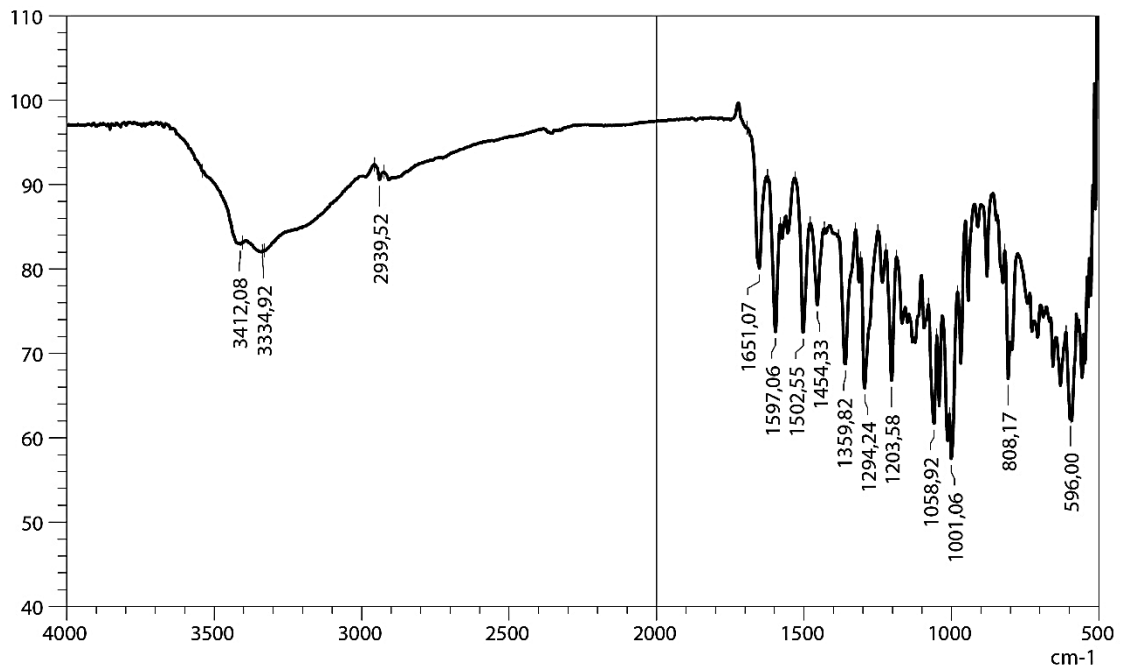
Saf etkin maddenin ve etkin madde hariç analiz ortamında bulunabilecek diğer maddelerin fiziksel karışımının UPLC kromatogramları Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4. Seçicilik çalışmasına ait kromatogramlar

5.1.1.4. Etkin maddenin fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi

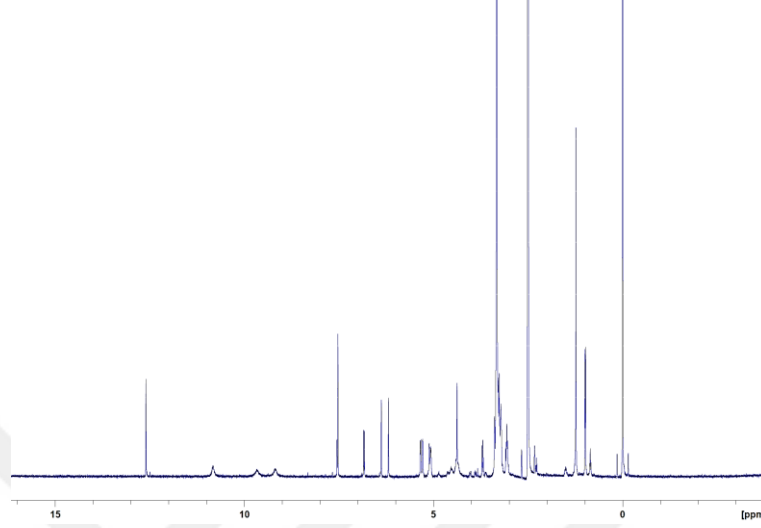
Etkin maddenin FTIR analiz sonuçları Şekil 5.5'te gösterilmiştir.



Şekil 5.5. Etkin madde FTIR spektrumu

5.1.1.5. Etkin maddenin nükleer manyetik rezonans spektrometresi

Etkin maddenin NMR spektrumları Şekil 5.6’te gösterilmiştir.

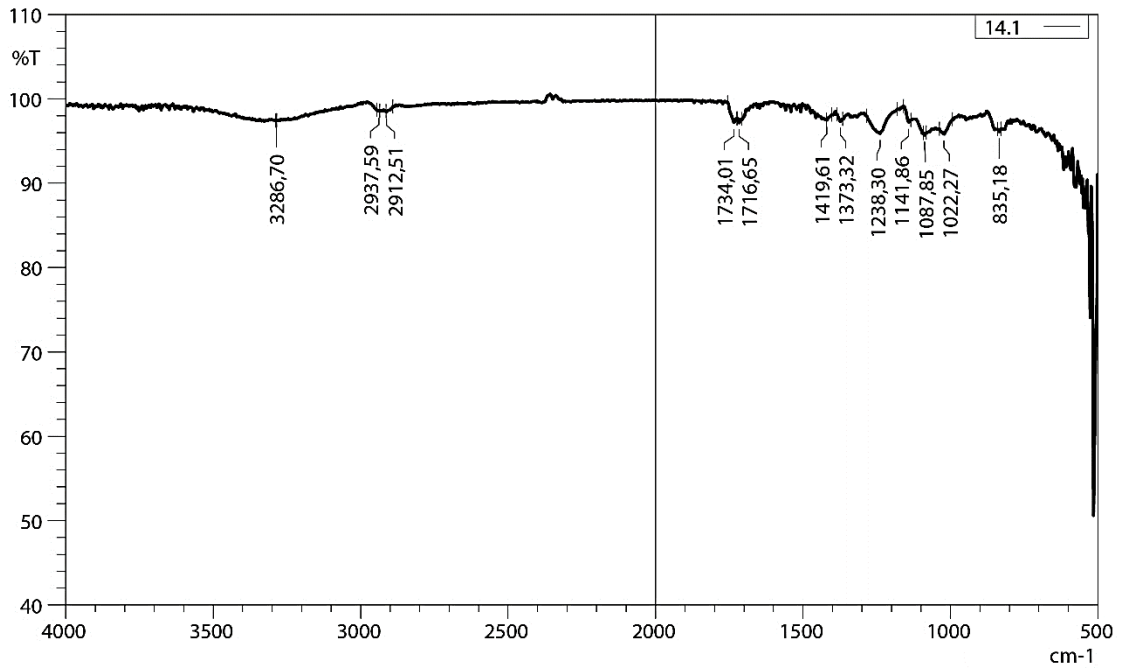


Şekil 5.6. Etkin madde NMR spektrumu

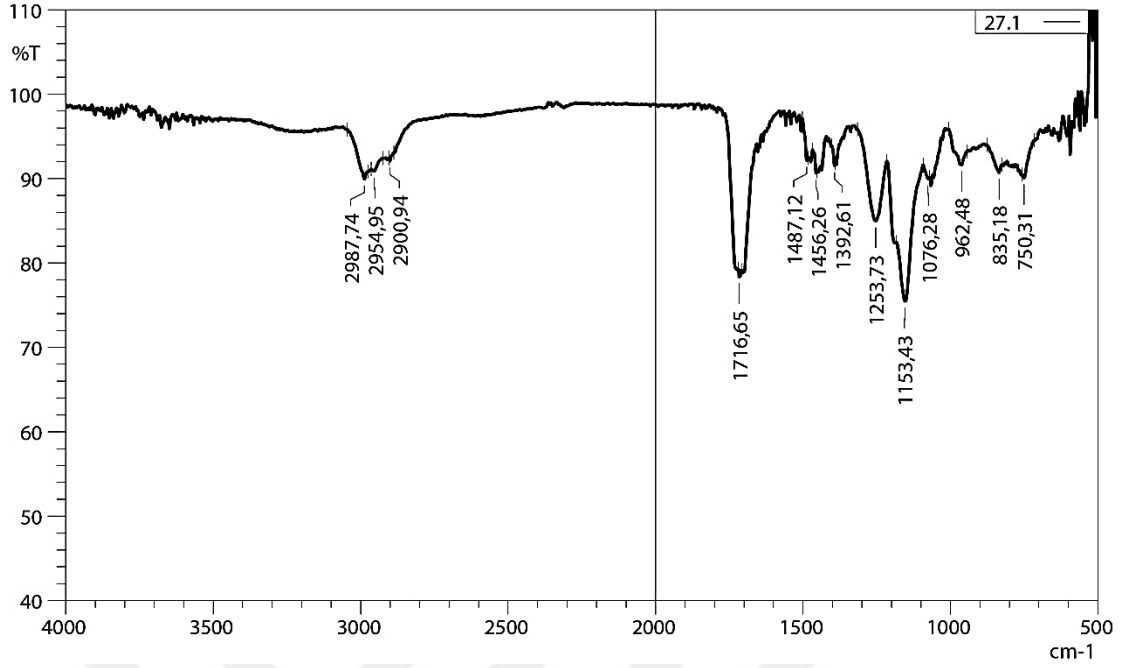
5.1.2. Yardımcı maddelerin spektroskopik analizleri

5.1.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi

Formülasyonlarda yardımcı madde olarak kullanılan PVA (Şekil 5.7) ve Eudragit® L100 (Şekil 5.8) polimerlerinin FTIR spektrumları gösterilmiştir.



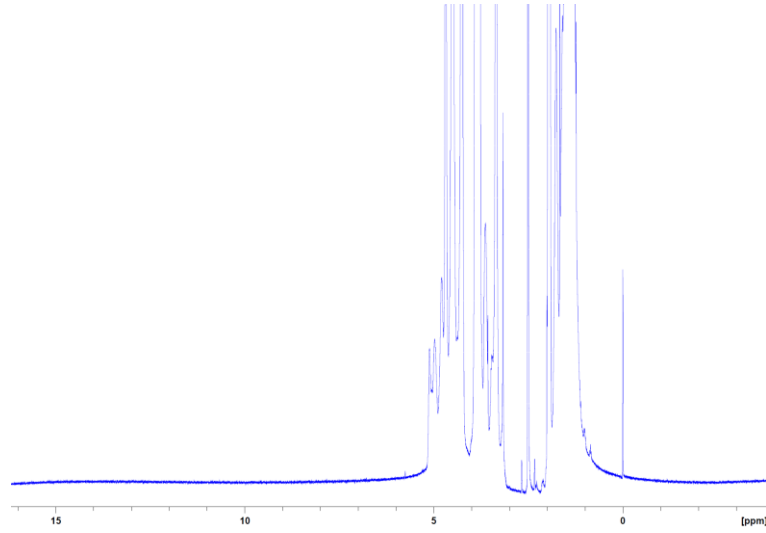
Şekil 5.7. PVA polimerinin FTIR spektrumu



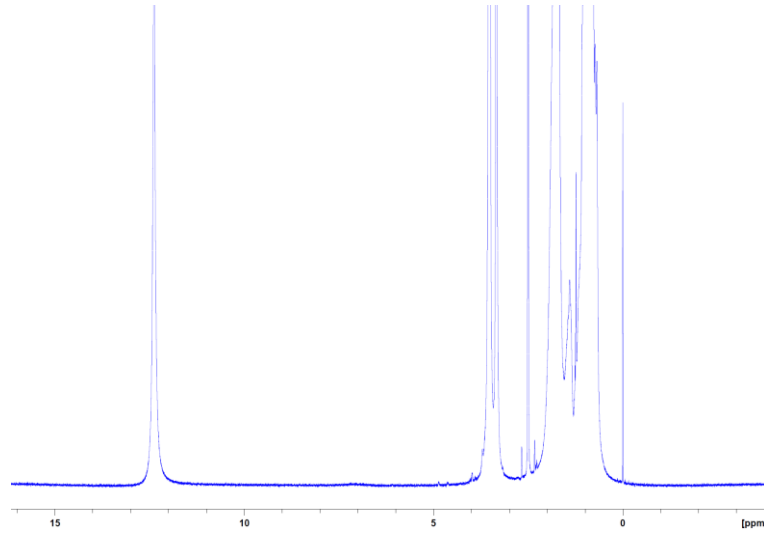
Şekil 5.8. Eudragit® L100 polimerinin FTIR spektrumu

5.1.2.2. Nükleer manyetik rezonans spektrometresi

Formülasyonlarda yardımcı madde olarak kullanılan PVA (Şekil 5.9) ve Eudragit® L100 (Şekil 5.10) polimerlerinin NMR spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 5.9. PVA polimerinin NMR spektrumu



Şekil 5.10. Eudragit® L100 polimerinin NMR spektrumu

5.1.3. Çözünürlük

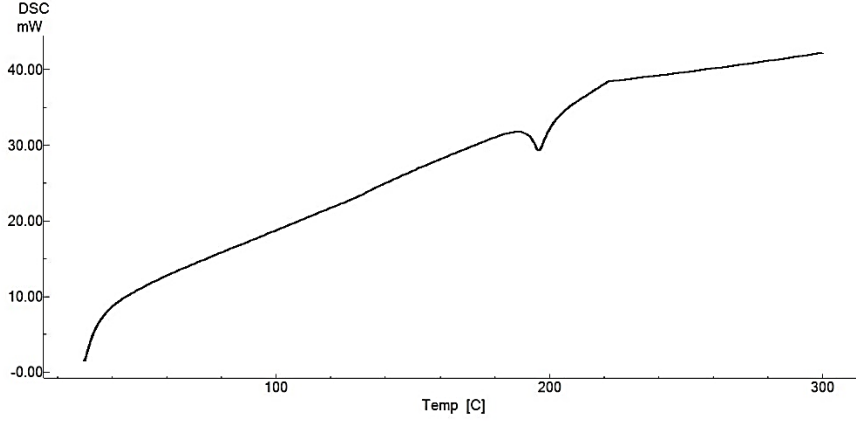
Etkin maddenin çeşitli çözücülerdeki çözünürlük çalışmasının sonuçları Tablo 5.13'te gösterilmiştir. Çözünürlük çalışması DMF ile de gerçekleştirilmiş, yöntemde belirtilen 0,4 gram etkin maddenin tamamı çözüldüğü için Rutin hidrat'ın DMF'teki çözünürlüğü $> 80 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 5.13. Rutin hidrat'ın farklı çözücülerdeki çözünürlük değerleri

Günler (n=3)		Günlere Göre Çözünürlük (mg.mL ⁻¹)			
		BDS	PBS	MeOH	EtOH
1. Gün	1	0,118	0,121	41,065	37,284
	2	0,119	0,126	40,494	37,674
	3	0,117	0,114	39,876	36,011
Ortalama		0,118	0,120	40,478	36,990
SS		0,001	0,006	0,595	0,870
2. Gün	1	0,114	0,117	46,642	38,981
	2	0,109	0,114	45,274	38,054
	3	0,110	0,113	40,332	36,791
Ortalama		0,111	0,115	44,083	37,942
SS		0,003	0,002	3,319	1,099
3. Gün	1	0,112	0,124	43,821	37,246
	2	0,102	0,114	46,488	37,954
	3	0,113	0,121	40,754	36,466
Ortalama		0,109	0,120	43,688	37,222
SS		0,006	0,005	2,869	0,744
Çözünürlük		0,113 ± 0,005	0,118 ± 0,003	42,750 ± 1,977	37,387 ± 0,497

5.1.4. Termal analizler

Etkin maddenin DSC termogramı Şekil 5.11’de gösterilmiştir.



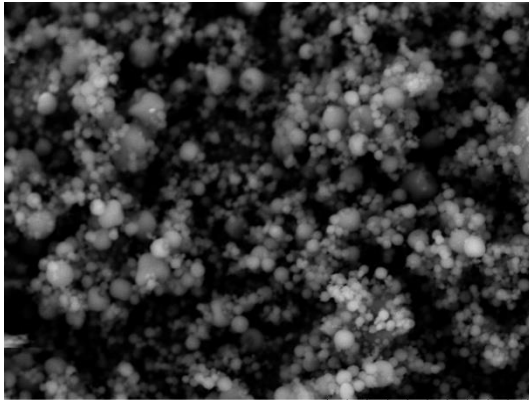
Şekil 5.11. Rutin hidrat'ın DSC termogramı

5.2. Formülasyon Çalışmaları

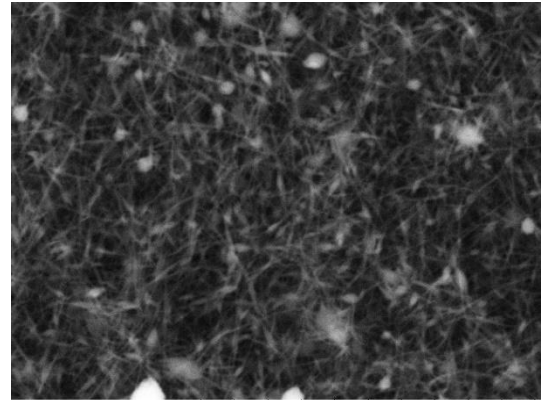
Nanolif formülasyonlarının üretim yönteminin optimizasyon ve standardizasyonu için sistemler oturtmadan önce, elektroegirme cihazının parametrelerini tanımak ve değişiklikleri görebilmek için gerçekleştirilen kontrolsüz denemelerden birkaç örnek (Tablo 5.14) ve sonuçları (Görsel 5.2) gösterilmiştir.

Tablo 5.14. Deneme çalışmalarının bileşen miktarları

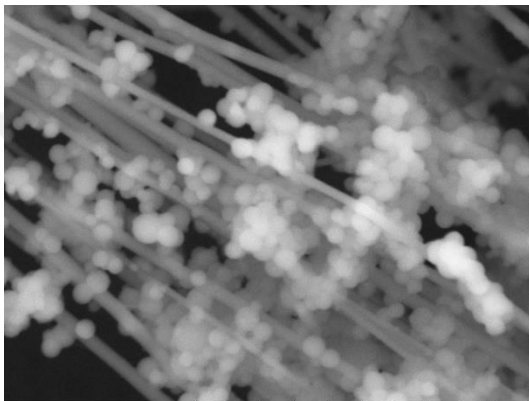
Formül Kodu	Rutin Hidrat (g)	Polimerler (g)				Çözücüler (mL)		
		PVP	EUD	PVA	BDS	EtOH	MeOH	DMF
D1			30				70	
D2				7,5	100			
D3		6				34		
D4			2,5		6	14		
D5		8				90		10
D6		6				90		10
D7	80		1,6			18	2	
D8	80		1,6			16	4	
D9	80		1,8			18	2	



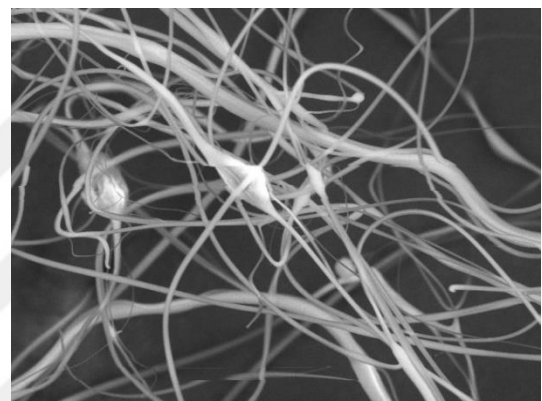
D1 AUBIBAM 2021/06/01 10:42 HMMD4.7 x2.0k 30 μ m



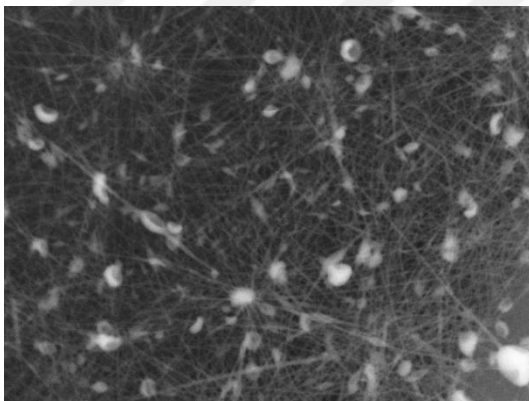
D2 AUBIBAM 2021/06/23 12:28 HMMD5.7 x5.0k 20 μ m



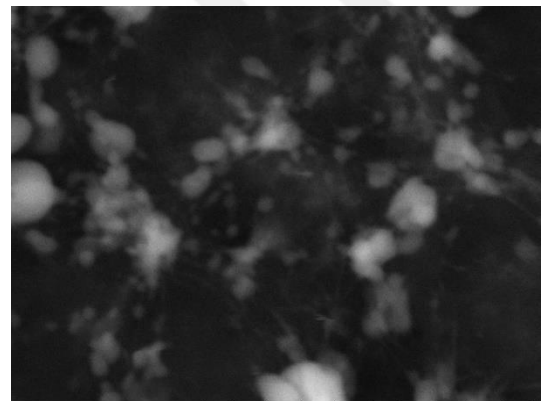
D3 AUBIBAM 2021/09/23 13:50 HMMD5.5 x5.0k 20 μ m



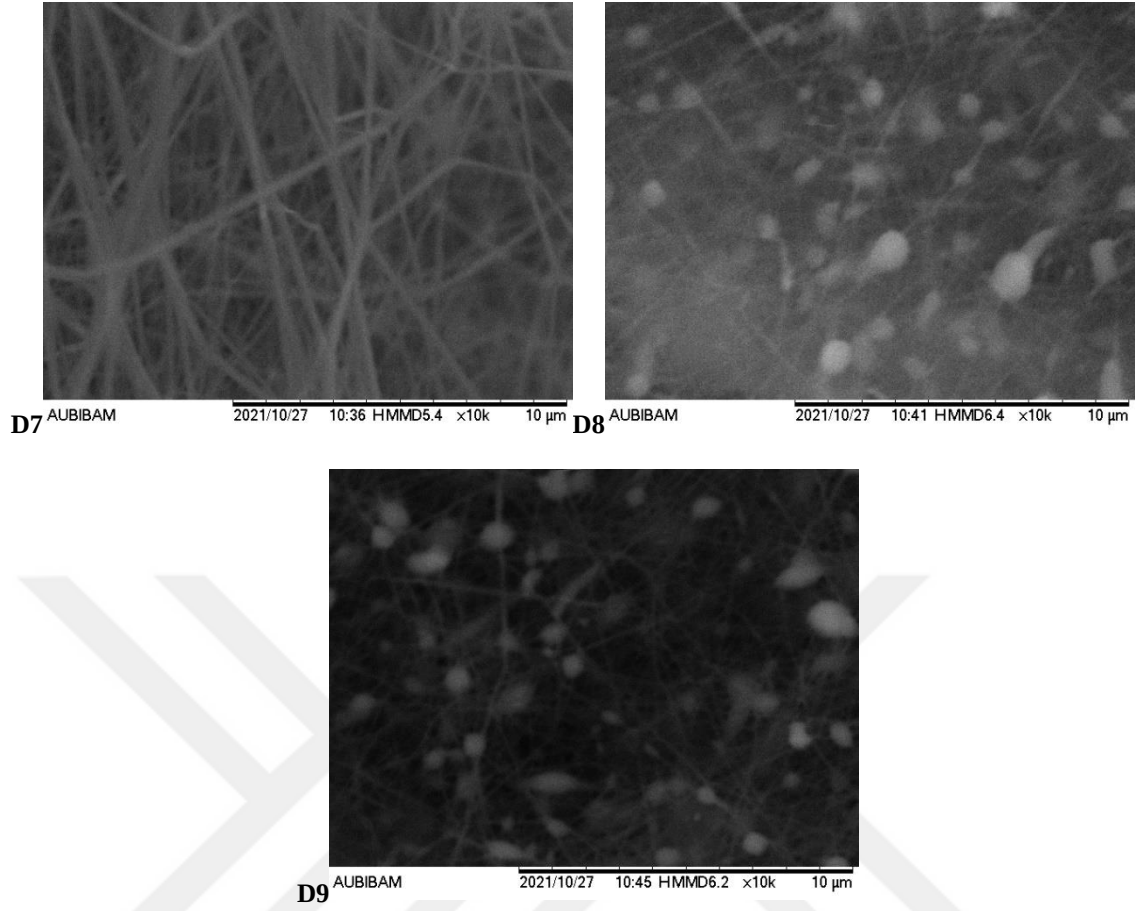
D4 AUBIBAM 2021/09/23 13:54 HMMD5.9 x1.5k 50 μ m



D5 AUBIBAM 2021/09/23 13:59 HMMD5.2 x5.0k 20 μ m



D6 AUBIBAM 2021/09/23 14:23 HMMD5.6 x10k 10 μ m



Görsel 5.2. Deneme çalışmalarının SEM görüntüleri

Yapılan geniş çaplı ön denemeler ve literatür araştırmaları sonucunda nanolif formülasyonlarının hedeflenen etkilerini sağlamak için PVA ve Eudragit® L100 polimerleri seçilmiştir.

5.2.1.1. Taguchi metodu deney örgüsü

Taguchi metodu için belirlenen faktör ve seviyelere göre hazırlanan deney örgütüsü PVA kullanılan formülasyon için Tablo 5.15'te, Eudragit® L100 kullanılan formülasyon içinse Tablo 5.16'da gösterilmiştir. Formülasyonlara eklenen Rutin hidrat miktarları polimerin Bölüm 4.2.2'de belirtildiği gibi %10'u olacak şekilde hesaplanmıştır. Ayrıca Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de belirtilen faktörler arasında yer almayan çözücü miktarları, Taguchi faktörlerindeki çözücü seviyelerinin toplam çözücü miktarından çıkartılmasıyla hesaplanmıştır.

Tablo 5.15. PVA kullanılan formülasyonlar için bileşen miktarları

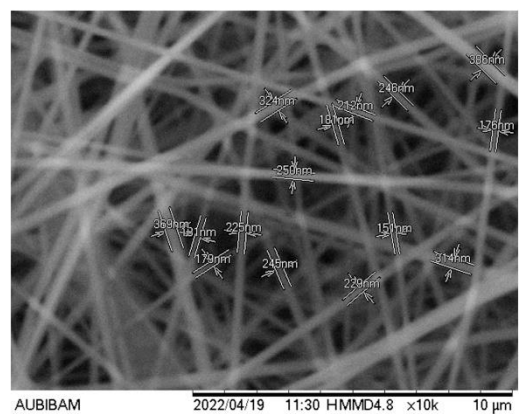
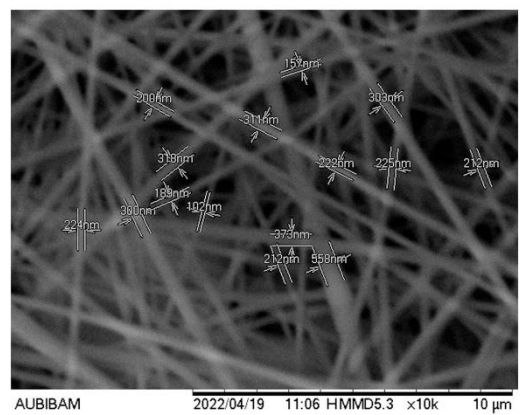
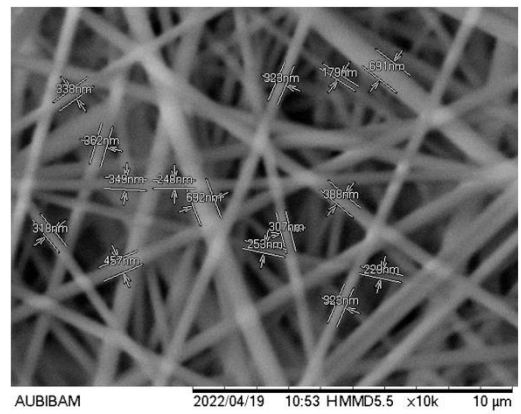
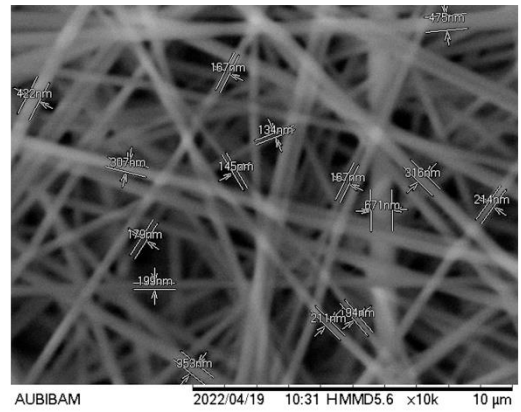
	PVA (mg)	DMF (mL)	BDS (mL)	Rutin hidrat(mg)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
P1	1050	5	8	105	17	17
P2	1050	5,5	7,5	105	15	19
P3	1050	6	7	105	13	21
P4	1050	6,5	6,5	105	11	23
P5	1000	5	8	100	15	21
P6	1000	5,5	7,5	100	17	23
P7	1000	6	7	100	11	17
P8	1000	6,5	6,5	100	13	19
P9	950	5	8	95	13	23
P10	950	5,5	7,5	95	11	21
P11	950	6	7	95	17	19
P12	950	6,5	6,5	95	15	17
P13	900	5	8	90	11	19
P14	900	5,5	7,5	90	13	17
P15	900	6	7	90	15	23
P16	900	6,5	6,5	90	17	21

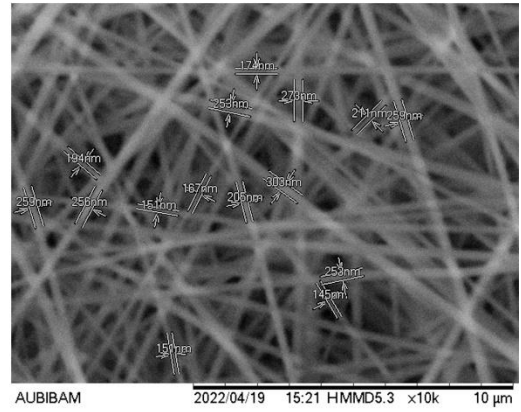
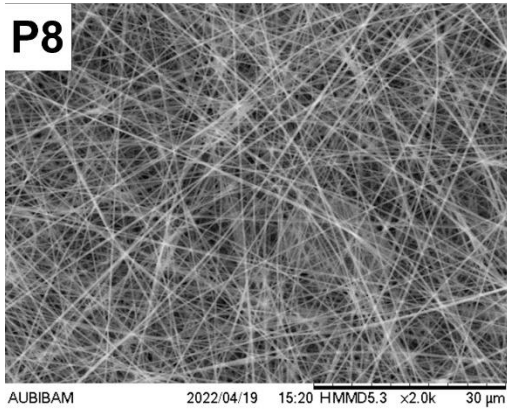
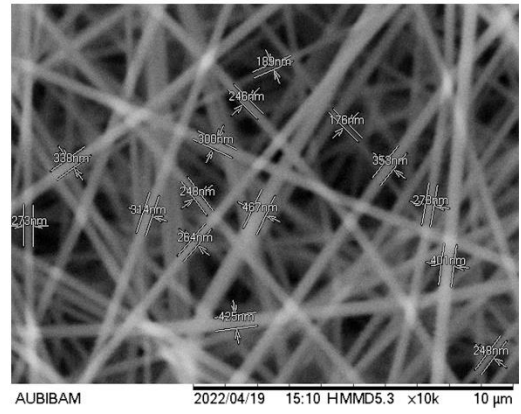
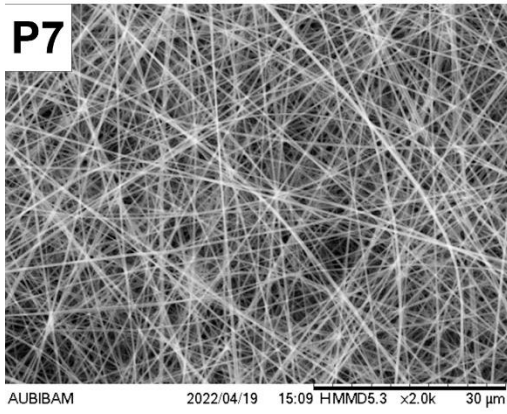
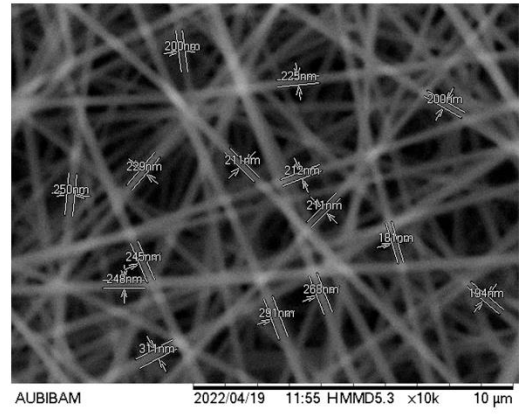
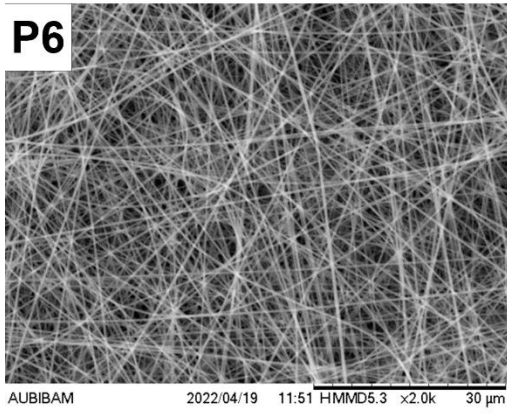
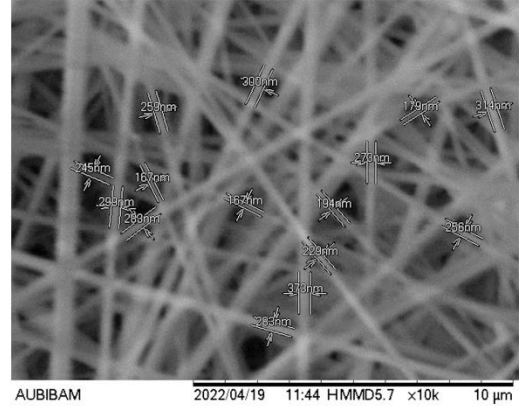
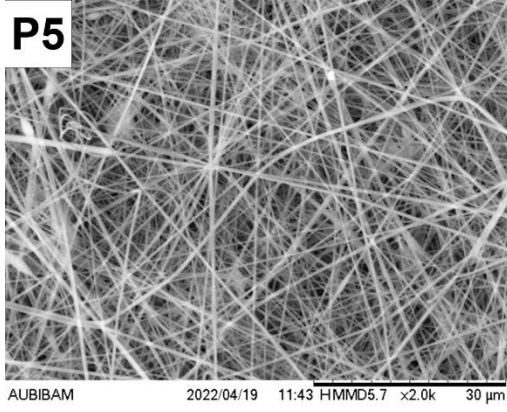
Tablo 5.16. Eudragit® L100 kullanılan formülasyonlar için bileşen miktarları

	EUD (mg)	MeOH (mL)	DMF (mL)	Rutin hidrat(mg)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
E1	1400	6	4	140	11	17
E2	1400	6,5	3,5	140	13	19
E3	1400	7	3	140	15	21
E4	1400	7,5	2,5	140	17	23
E5	1350	6	4	135	13	21
E6	1350	6,5	3,5	135	11	23
E7	1350	7	3	135	17	17
E8	1350	7,5	2,5	135	15	19
E9	1300	6	4	130	15	23
E10	1300	6,5	3,5	130	17	21
E11	1300	7	3	130	11	19
E12	1300	7,5	2,5	130	13	17
E13	1250	6	4	125	17	19
E14	1250	6,5	3,5	125	15	17
E15	1250	7	3	125	13	23
E16	1250	7,5	2,5	125	11	21

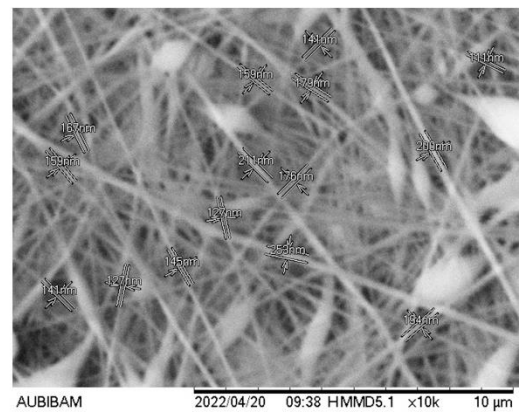
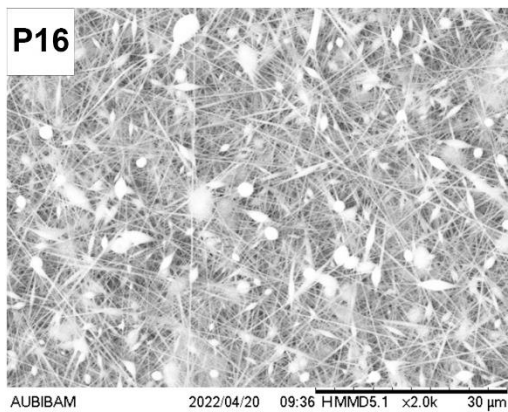
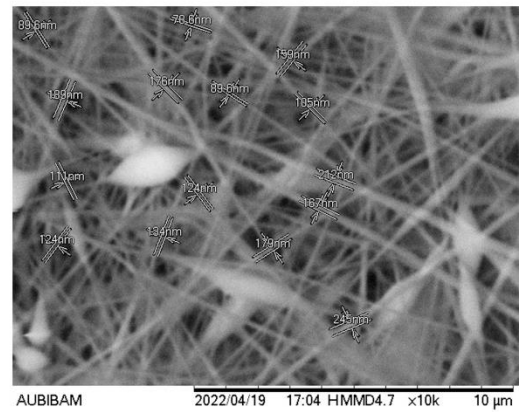
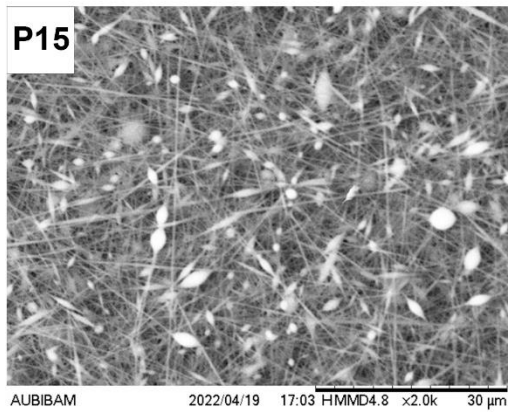
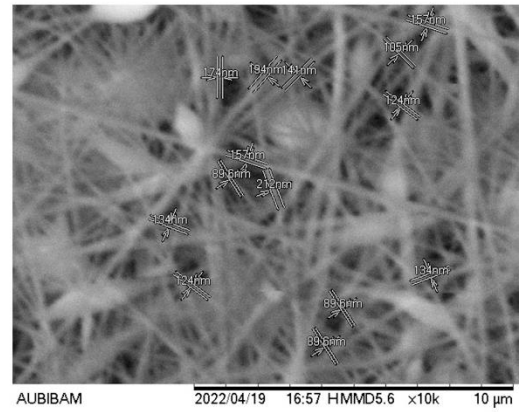
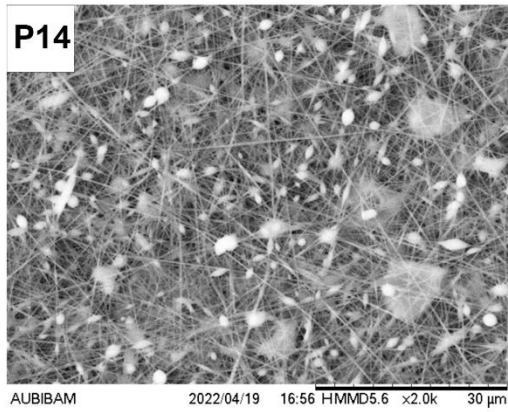
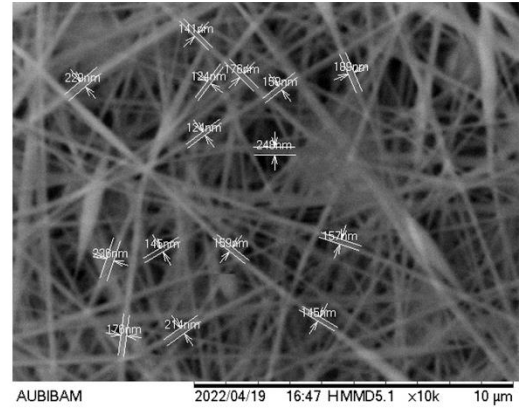
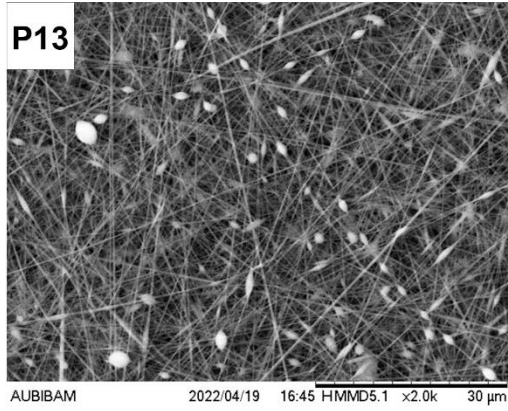
5.2.1.2. Formülasyonların hazırlanması ve değerlendirilmesi

Çözeltiler, Bölüm 4.2.3'te açıklandığı şekilde hazırlanmış ve ardından Bölüm 4.2.4'e uygun şekilde eğilerek nanolifler elde edilmiştir. Elde edilen nanoliflerin lif çapları ve boncuk sayıları Bölüm 4.3.1'de belirtildiği gibi analiz edildikten sonra Taguchi metodu aracılığıyla en küçük lif çapına sahip boncuksuz formülasyonlar için deney düzeneği hazırlanan faktörlerin hangi seviyelerinin kullanılması gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan ANOVA analiziyle bu faktörlerin lif çapı ve boncuk oluşumu üzerindeki etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Oluşturulan nanoliflerin SEM görüntüleri Görsel 5.3, Görsel 5.4, Görsel 5.5, Görsel 5.6, Görsel 5.7, Görsel 5.8, Görsel 5.9, Görsel 5.10'da lif çapları Tablo 5.17 ve Tablo 5.18'de, boncuk sayıları ise Tablo 5.19 ve Tablo 5.20'de gösterilmiştir.

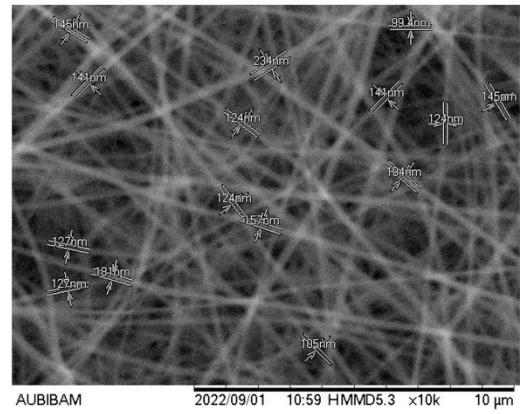
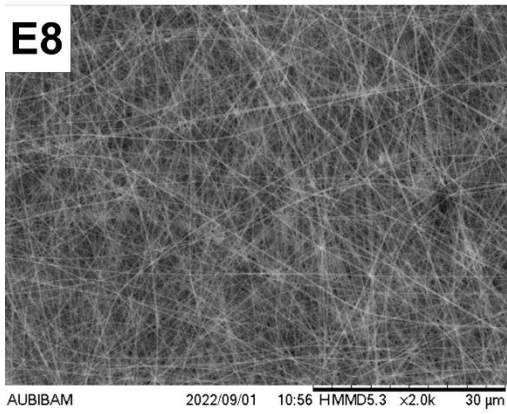
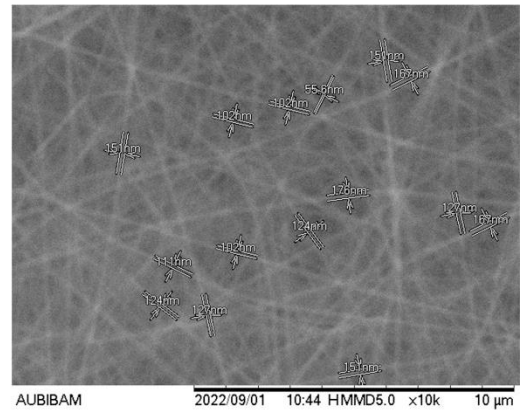
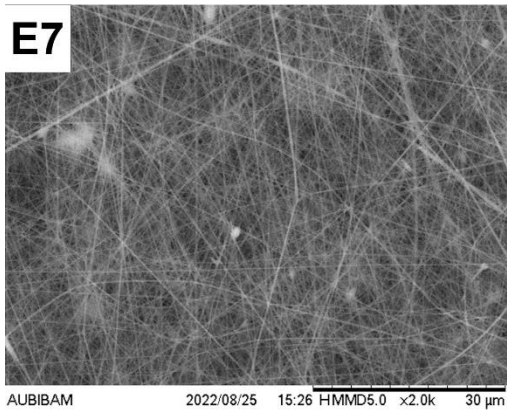
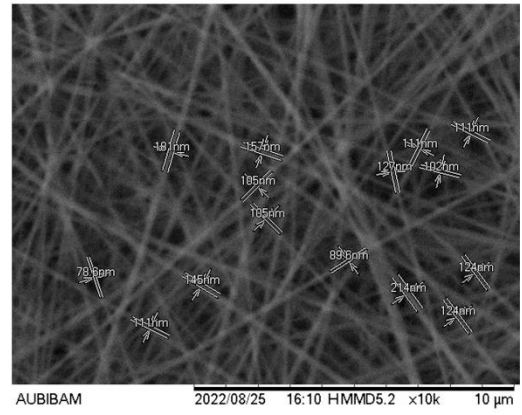
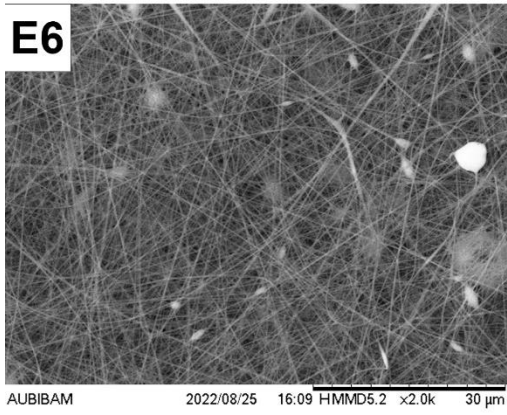
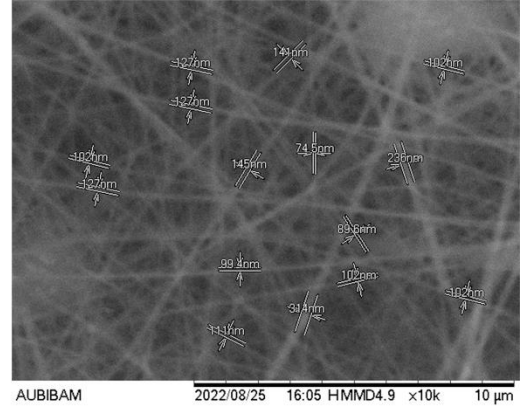
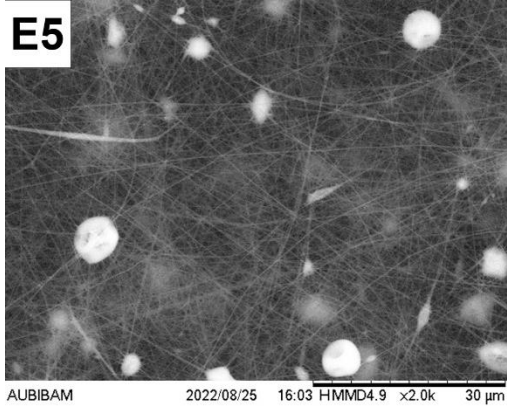




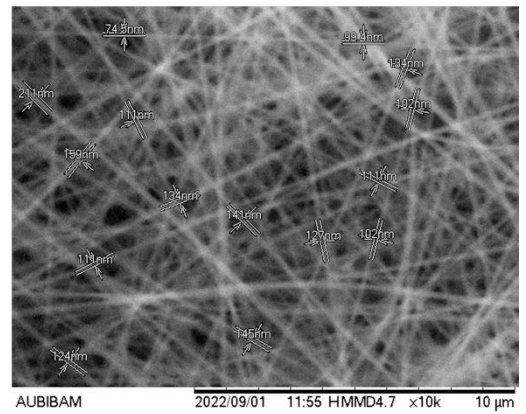
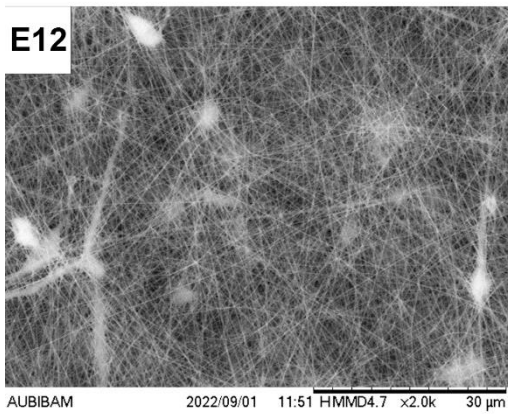
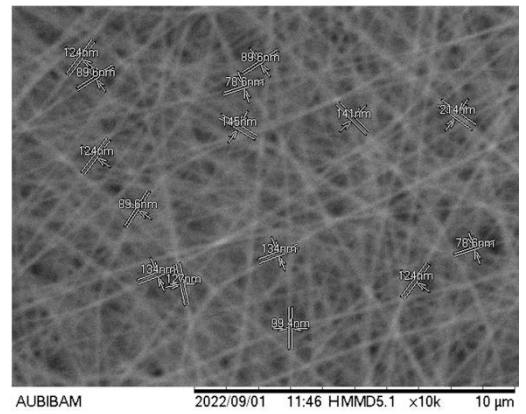
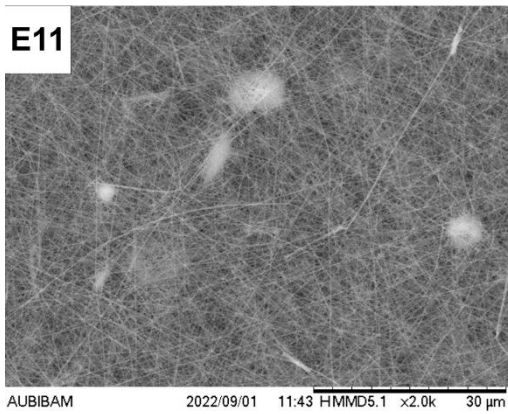
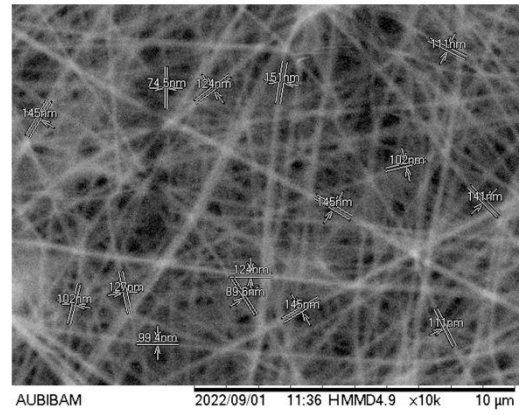
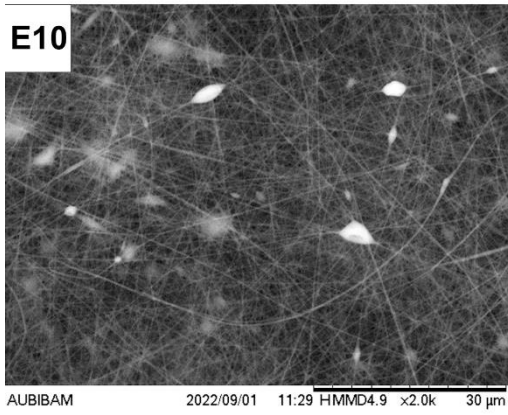
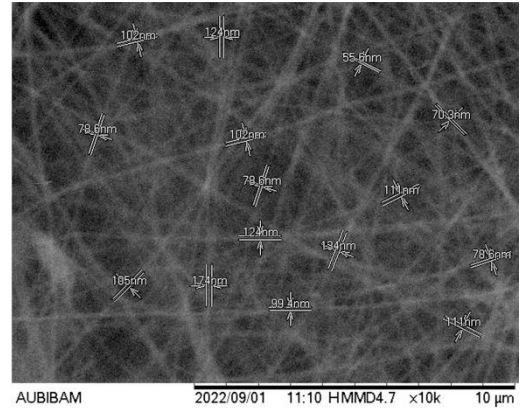
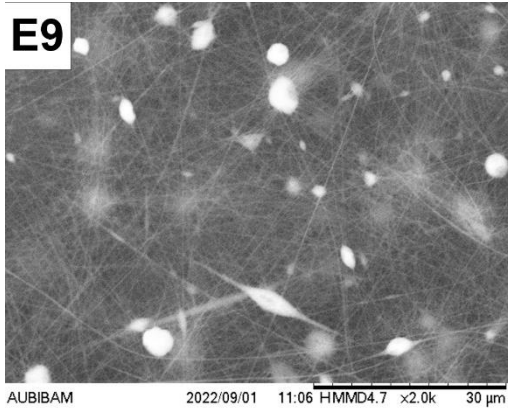
Görsel 5.4. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 2



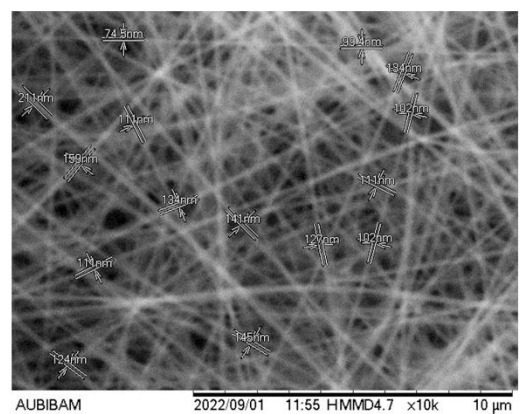
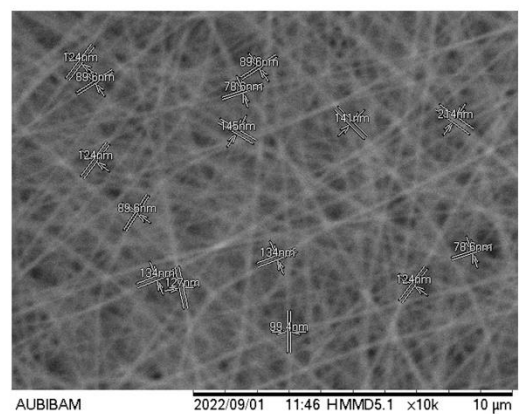
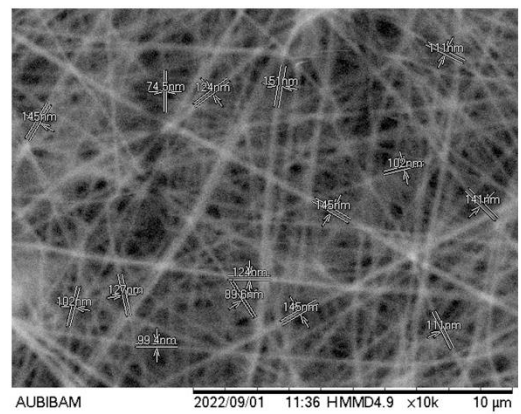
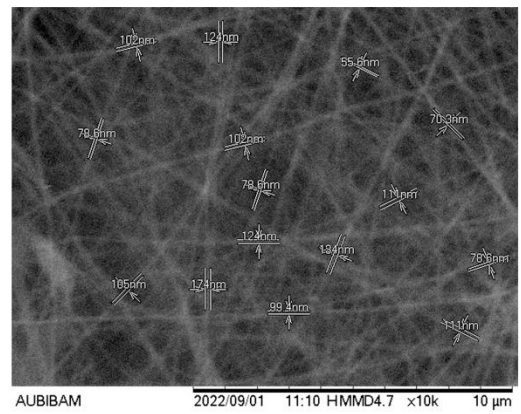
Görsel 5.6. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 4



Görsel 5.8. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 2



Görsel 5.9. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin SEM görüntüleri – 3



Tablo 5.17. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerin lif çapları

Form.	Lif çapı (nm)															Ortalama Lif Çapı
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
P1	422	307	179	199	353	167	145	134	211	194	167	671	316	214	475	276,933
P2	318	338	362	349	457	248	692	253	307	323	179	388	323	229	691	363,800
P3	224	300	200	318	189	102	311	373	212	558	157	222	225	303	212	260,400
P4	369	181	179	225	245	250	324	181	229	212	151	246	314	176	386	244,533
P5	245	299	283	167	259	300	167	283	373	229	194	273	179	256	314	254,733
P6	250	229	245	248	311	200	211	291	225	212	211	268	181	194	200	231,733
P7	273	338	314	264	248	300	425	467	246	189	176	353	278	401	248	301,333
P8	174	273	253	211	259	303	253	145	167	205	151	151	256	259	194	216,933
P9	291	176	111	151	102	181	157	127	127	124	134	127	124	145	189	151,067
P10	159	245	151	291	373	102	111	99	159	111	105	246	159	149	111	171,427
P11	225	248	475	274	124	90	245	102	124	105	111	181	124	124	194	183,040
P12	176	167	214	236	214	159	167	167	181	200	176	268	278	189	256	203,200
P13	141	229	336	176	124	124	145	214	176	159	159	248	145	157	189	181,467
P14	157	105	174	194	141	124	157	90	212	134	124	134	90	90	-	137,486
P15	90	189	111	124	176	79	134	124	90	159	105	179	167	212	245	145,520
P16	141	111	159	179	200	211	176	127	253	194	145	127	141	159	167	166,000

Tablo 5.18. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerin lif çapları

Form.	Lif çapı (nm)															Ortalama Lif Çapı
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
E1	127	176	134	167	75	75	124	159	229	253	176	124	145	124	127	147,600
E2	278	224	124	111	127	127	124	99	127	145	174	111	205	145	181	153,493
E3	176	200	159	151	79	105	151	159	205	194	179	149	234	149	212	166,773
E4	222	157	145	124	145	151	145	174	181	212	151	268	225	174	157	175,400
E5	127	141	102	127	127	102	145	75	236	90	99	102	314	111	102	133,300
E6	79	111	145	181	157	105	105	90	214	127	111	102	111	124	124	125,680
E7	151	111	124	127	102	124	176	102	102	56	151	167	127	167	151	129,173
E8	145	141	127	127	181	124	124	234	157	105	194	141	99	124	145	144,560
E9	79	102	105	124	174	102	79	124	99	134	56	111	70	79	111	103,207
E10	145	75	124	151	145	102	111	141	102	127	99	90	124	145	111	119,433
E11	124	90	124	90	134	127	79	90	145	134	99	124	79	141	214	119,493
E12	75	99	134	211	111	159	102	134	111	111	141	127	102	145	124	125,727
E13	111	111	79	124	102	90	90	124	99	90	90	90	127	127	102	103,600
E14	70	102	157	102	124	124	102	90	102	56	56	134	90	124	90	101,420
E15	99	127	99	79	127	102	70	127	127	90	50	102	79	102	145	101,640
E16	79	179	102	79	75	79	56	124	70	99	90	111	50	90	79	90,607

Tablo 5.19. PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerde 10kx büyütme ile birim alandaki boncuk sayıları

Formülasyon	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
Boncuk Sayısı	0	0	0	0	0	0	0	0	62	72	60	34	55	152	105	149

Tablo 5.20. Eudragit® L100 polimeri ile hazırlanan nanoliflerde 10kx büyütme ile birim alandaki boncuk sayıları

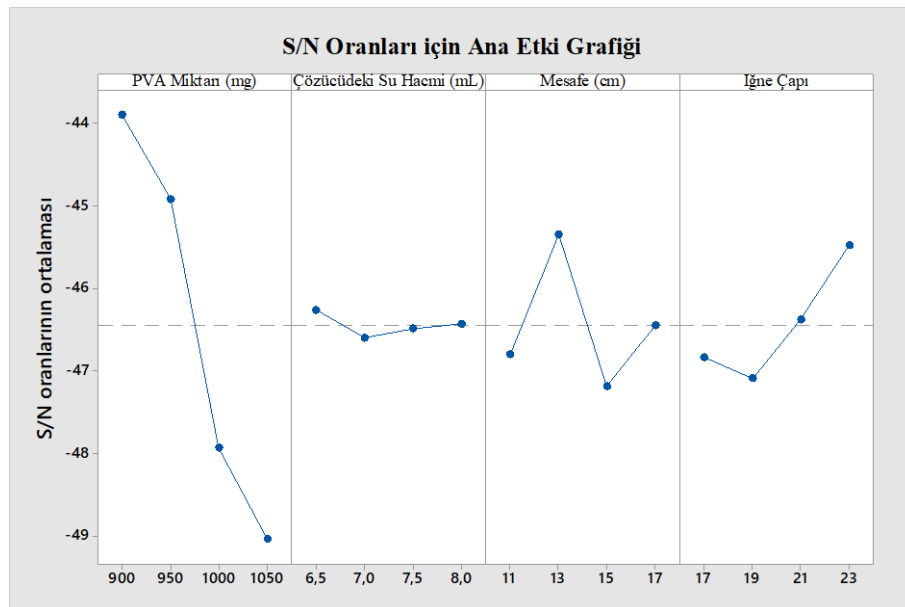
Formülasyon	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16
Boncuk Sayısı	7	0	2	0	22	19	9	0	38	28	11	7	57	28	30	21

Hem nanolif çapları hem de boncuk sayıları için iki ayrı Taguchi ve ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir.

5.2.1.2.1. PVA nanolifler için Taguchi analiz sonuçları

Tablo 5.21. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (PVA ile hazırlanan)

Seviye	PVA Miktarı (mg)	Çözücüdeki Su Hacmi (mL)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
1	-43,9	-46,26	-46,8	-46,84
2	-44,92	-46,6	-45,35	-47,09
3	-47,93	-46,49	-47,19	-46,38
4	-49,04	-46,43	-46,45	-45,48
Delta	5,14	0,34	1,84	1,62
Rank	1	4	2	3

**Şekil 5.12.** Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (PVA ile hazırlanan)

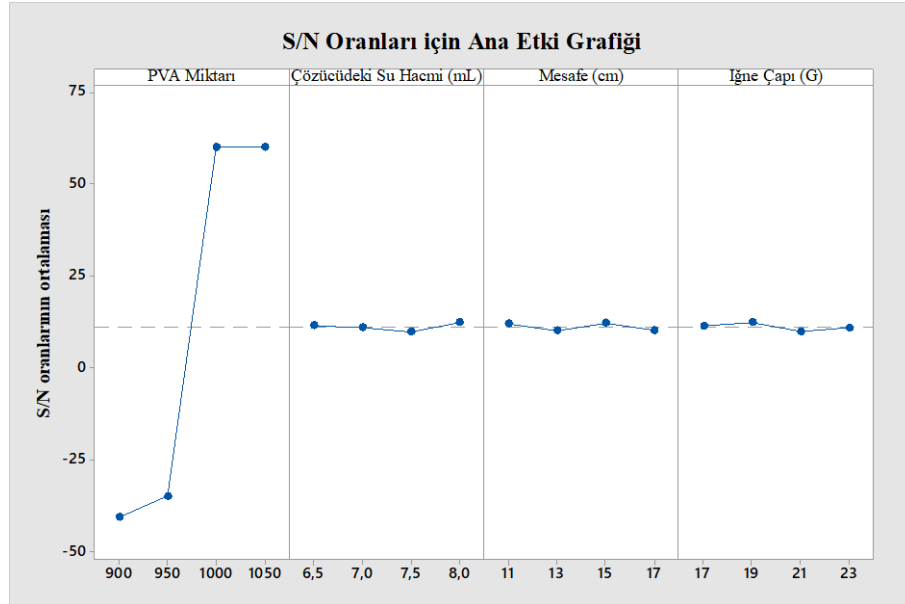
Tablo 5.22. Nanolif çapı için varyans analiz sonuçları (PVA ile hazırlanan)

Faktör	Etki	P değeri
PVA Miktarı (mg)	74,48%	0,048
Çözeltildeki Su Hacmi (mL)	1,32%	0,911
Mesafe (cm)	8,92%	0,458
İğne Çapı (G)	7,46%	0,515

Modelin determinasyon katsayısı (r^2) %92,18 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.23. Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (PVA ile hazırlanan)

Seviye	PVA Miktarı (mg)	Çözücüdeki Su Hacmi (mL)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
1	-40,583	11,477	12,012	11,433
2	-34,797	11,003	10,129	12,407
3	60	9,804	12,237	9,847
4	60	12,336	10,243	10,932
Delta	100,583	2,532	2,108	2,56
Rank	1	3	4	2

**Şekil 5.13.** Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (PVA ile hazırlanan)

Tablo 5.24. Boncuk sayısı için varyans analiz sonuçları (PVA ile hazırlanan)

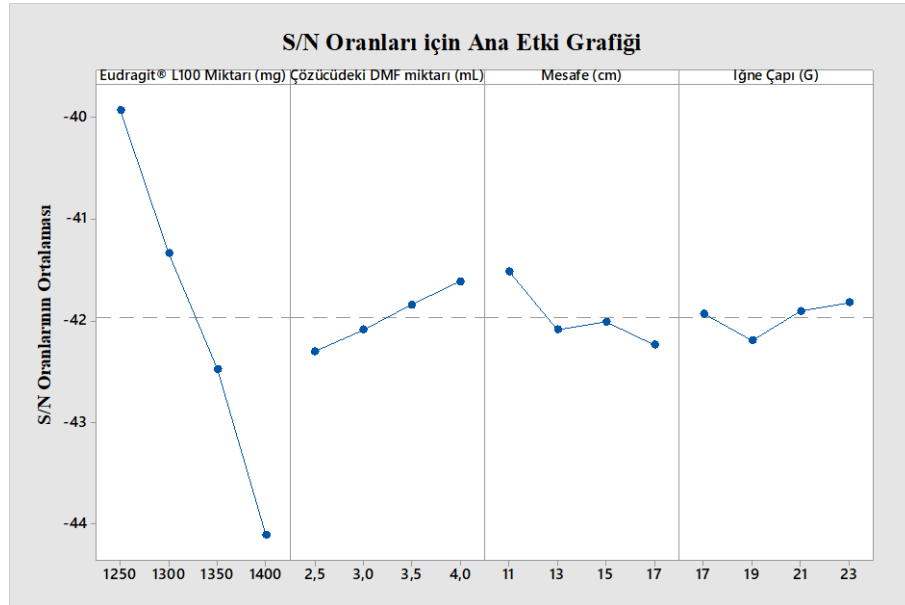
Faktör	Etki	P değeri
PVA Miktarı (mg)	83,87%	0,027
Çözeltildeki Su Hacmi (mL)	3,39%	0,663
Mesafe (cm)	3,59%	0,647
İğne Çapı (G)	3,38%	0,665

Modelin determinasyon katsayısı (r^2) %94,23 olarak hesaplanmıştır.

5.2.1.2.2. Eudragit® L100 nanolifler için Taguchi analiz sonuçları

Tablo 5.25. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (Eudragit® L100 ile hazırlanan)

Seviye	Eudragit® L100 Miktarı (mg)	Çözücüdeki Su Hacmi (mL)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
1	-39,93	-42,3	-41,51	-41,93
2	-41,34	-42,09	-42,09	-42,19
3	-42,48	-41,84	-42,01	-41,91
4	-44,11	-41,61	-42,24	-41,82
Delta	4,18	0,69	0,72	0,37
Rank	1	3	2	4



Şekil 5.14. Nanolif çapı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (Eudragit® L100 ile hazırlanan)

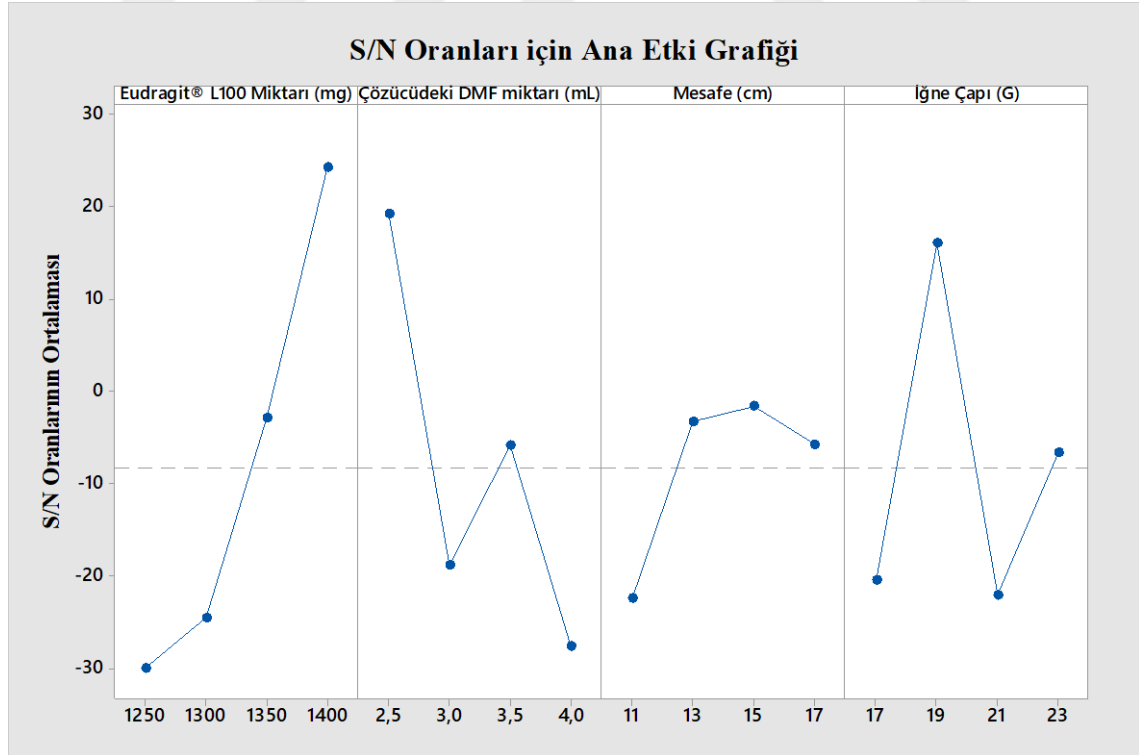
Tablo 5.26. Nanolif çapı varyans analiz sonuçları (Eudragit® L100 ile hazırlanan)

Faktör	Etki	P değeri
Eudragit® L100 miktarı (mg)	88,53%	0,018
Çözücüdeki DMF Hacmi (mL)	3,61%	0,568
Mesafe (cm)	2,89%	0,636
İğne Çapı (G)	0,48%	0,95

Modelin determinasyon katsayısı (r^2) %95,52 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.27. Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt tablosu (Eudragit® L100 ile hazırlanan)

Seviye	Eudragit® L100 Miktarı (mg)	Çözücüdeki DMF Hacmi (mL)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
1	-30,012	19,163	-22,437	-20,458
2	-24,567	-18,869	-3,323	16,014
3	-2,877	-5,865	-1,64	-22,064
4	24,269	-27,616	-5,786	-6,678
Delta	54,281	46,779	20,797	38,078
Rank	1	2	4	3

**Şekil 5.15.** Boncuk sayısı Taguchi analizinin S/N oranları için yanıt grafiği (Eudragit® L100 ile hazırlanan)

Tablo 5.28. Boncuk sayısı için varyans analiz sonuçları (Eudragit® L100 ile hazırlanan)

Faktör	Etki	P değeri
Eudragit® L100 miktarı (mg)	55,80%	0,012
Çözücüdeki DMF Hacmi (mL)	32,35%	0,026
Mesafe (cm)	5,43%	0,234
İğne Çapı (G)	4,26%	0,294

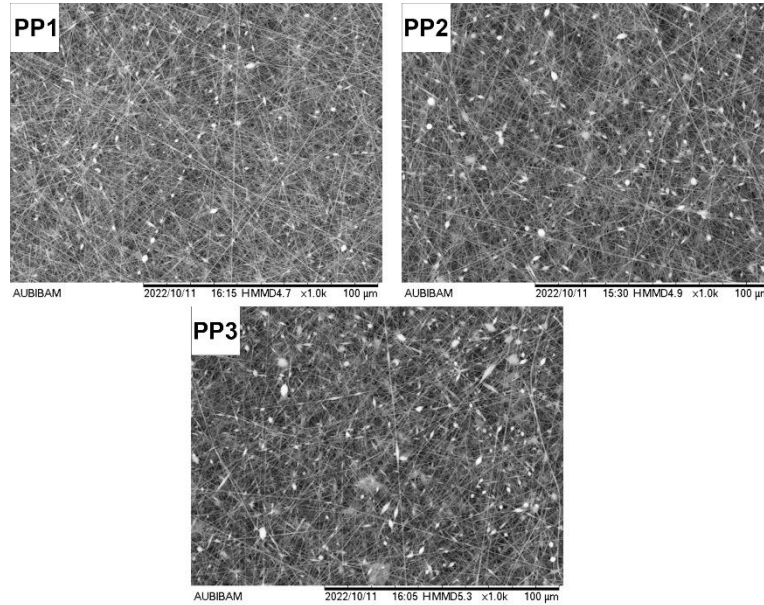
Modelin determinasyon katsayısı (r^2) %97,85 olarak hesaplanmıştır.

5.2.1.3. *Optimum elektroegirme parametrelerinin seçimi*

Çözücünün içerdiği su hacmi, mesafe ve iğne çapı Taguchi analiz sonuçlarının önerdiği en uygun seviyelerde sabit tutulup PVA miktarı değiştirilerek Tablo 5.29'daki oranlarla deneyler tekrarlanmış ve sonuçları Görsel 5.11'de gösterilmiştir.

Tablo 5.29. PVA miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametreler

	PVA (mg)	DMF (mL)	BDS (mL)	Rutin hidrat(mg)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
PP1	987,5	6,5	6,5	98,75	13	23
PP2	975	6,5	6,5	97,5	13	23
PP3	962,5	6,5	6,5	96,25	13	23

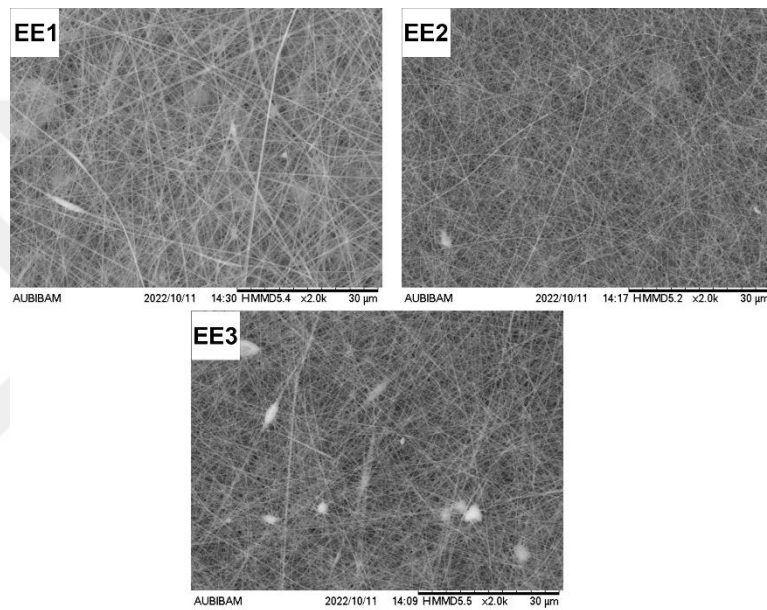


Görsel 5.11. PVA miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametrelerin SEM görüntüleri

Çözücünün içerdiği su hacmi, mesafe ve iğne çapı Taguchi analiz sonuçlarının önerdiği en uygun seviyelerde sabit tutulup Eudragit® L100 miktarı değiştirilerek Tablo 5.30'daki oranlarla deneyler tekrarlanmıştır. Sonuçlar Görsel 5.12'de gösterilmiştir.

Tablo 5.30. Eudragit® L100 miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametreler

	EUD (mg)	MeOH (mL)	DMF (mL)	Rutin hidrat(mg)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
EE1	1387,5	7,5	2,5	138,75	11	23
EE2	1375	7,5	2,5	137,5	11	23
EE3	1362,5	7,5	2,5	136,25	11	23



Görsel 5.12. Eudragit® L100 miktarına göre lif çapı değişimlerinin incelendiği parametrelerin SEM görüntüleri

Yapılan formülasyon çalışmalarının sonucu olarak, boncuk yapısı içermeyen en ince liflere sahip optimum yara örtülerinin elde edilmesi için elektroğirme parametreleri **Tablo 5.31** ve

Tablo 5.32'deki gibi belirlenmiştir. Etkin maddesiz formülasyonlar olan F-PVA ve F-EUD nanoliflerinin üretiminde ise aynı parametreler etkin madde olmadan tekrarlanmıştır.

Tablo 5.31. PVA ile hazırlanan nanoliflerin optimum elektroğirme parametreleri

	PVA (mg)	DMF (mL)	BDS (mL)	Rutin hidrat(mg)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
F-PVA-Rutin	1000	6,5	6,5	100	13	23

F-PVA	1000	6,5	6,5	0	13	23
-------	------	-----	-----	---	----	----

Tablo 5.32. Eudragit® L100 ile hazırlanan nanoliflerin optimum elektroegirme parametreleri

	EUD (mg)	MeOH (mL)	DMF (mL)	Rutin hidrat(mg)	Mesafe (cm)	İğne Çapı (G)
F-EUD-Rutin	1375	7,5	2,5	137,5	11	23
F-EUD	1375	7,5	2,5	0	11	23

PVA içeren elektroegirme çözeltileri 3,5 mL/sa akış hızı ve 26 kV voltaj değerinde 6,5 mL, Eudragit® L100 içeren elektroegirme çözeltileri 3 mL/sa akış hızı ve 20 kV voltaj değerinde 3,64 mL hacimlerinde eğrilmiştir.

5.3. Karakterizasyon Çalışmaları

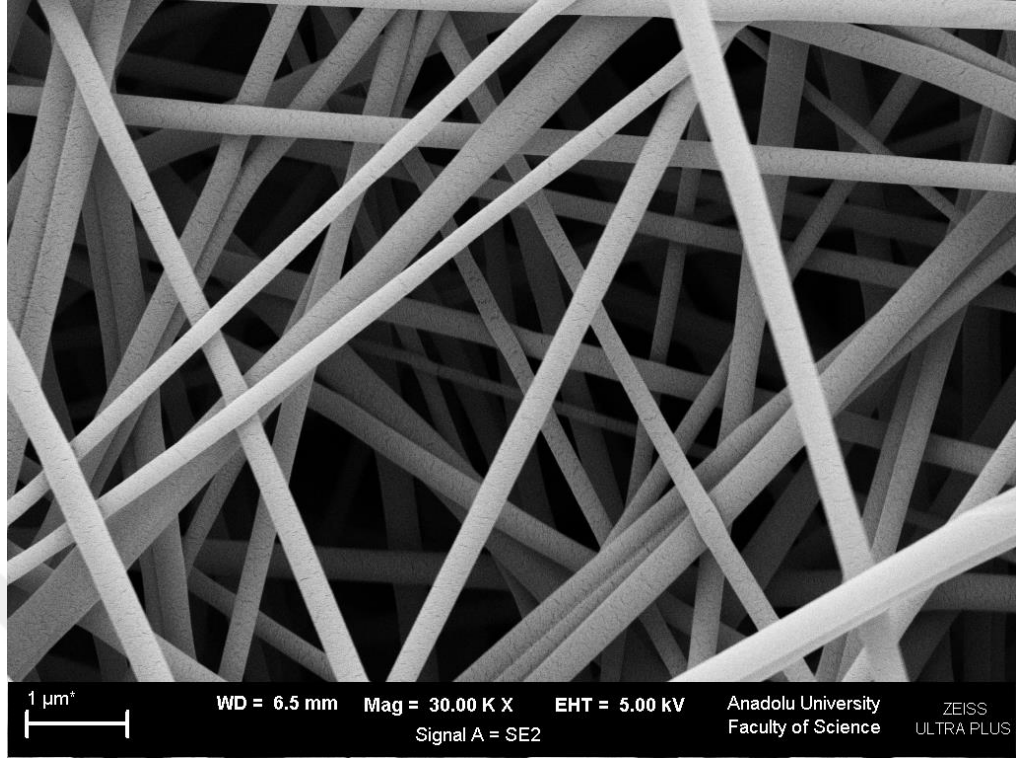
5.3.1. Fiziksel görünüş

F-PVA ve F-EUD formülasyonlarının opak beyaz renkli, pürüzsüz, homojen; F-PVA-Rutin formülasyonunun opak sarı renkli, pürüzsüz, homojen; F-EUD-Rutin formülasyonunun ise opak sarımtırak, pürüzsüz, homojen birer düzlemsel örtü görünümüne sahip oldukları gözlenmiştir.

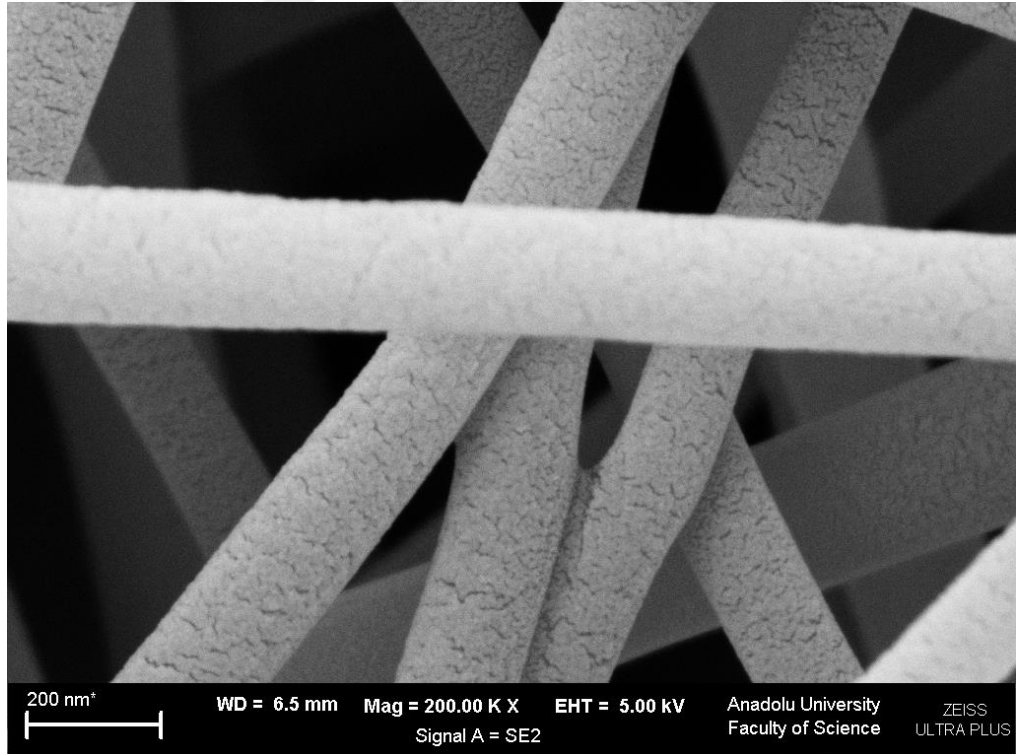
5.3.2. Mikroskobik analizler

5.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

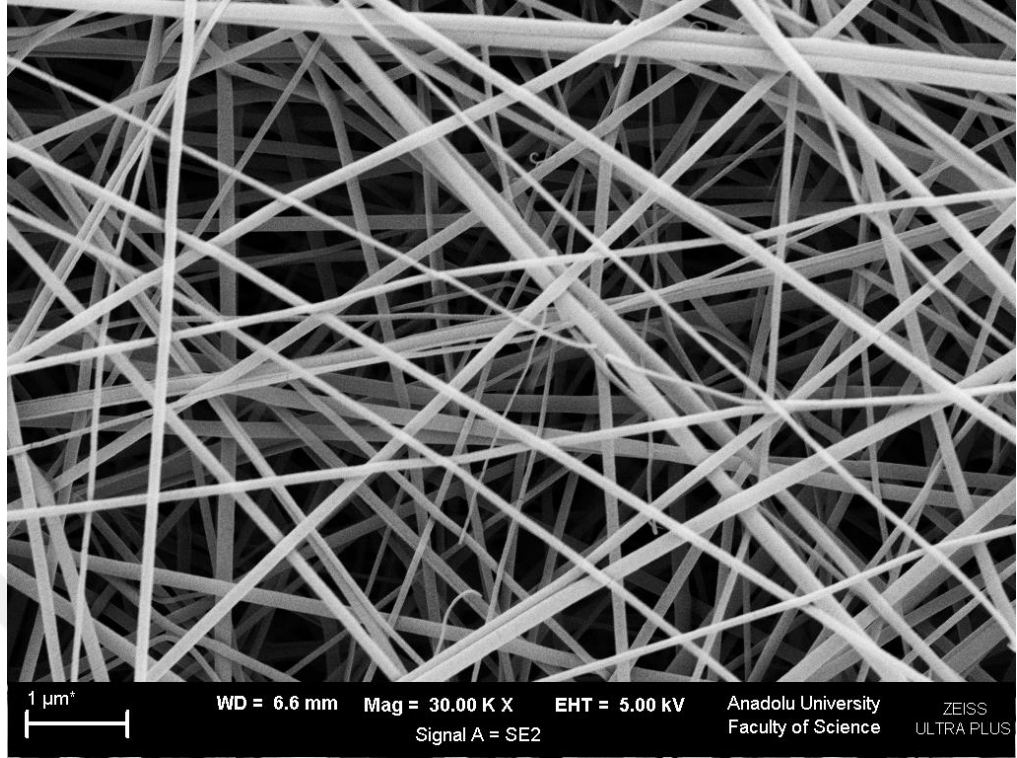
PVA-Rutin formülasyonunun 30Kx ve 220Kx büyütmedeki SEM görüntüleri Görsel 5.13 ve Görsel 5.14, EUD-Rutin formülasyonunun 30Kx ve 200 Kx büyütmedeki SEM görüntüsü Görsel 5.15 ve Görsel 5.16’de gösterilmiştir.



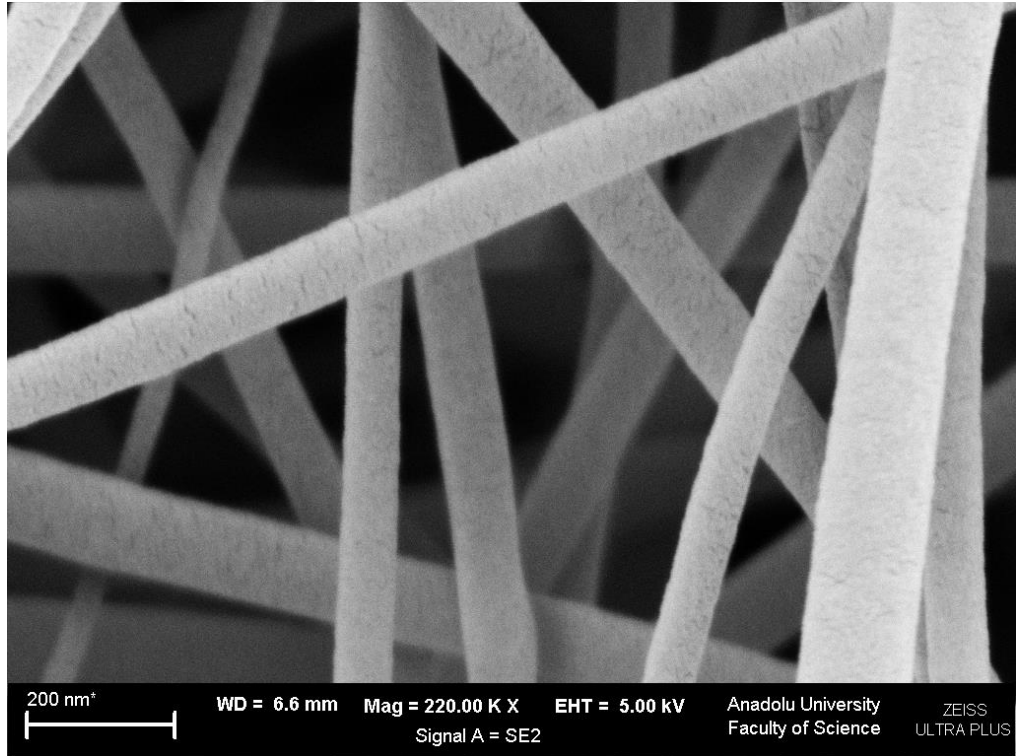
Görsel 5.13. F-PVA-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (30Kx büyütme)



Görsel 5.14. F-PVA-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (200Kx büyütme)



Görsel 5.15. F-EUD-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (30Kx büyütme)



Görsel 5.16. F-EUD-Rutin formülasyonunun SEM görüntüsü (220Kx büyütme)

5.3.2.2. Lif çapının belirlenmesi

Formülasyonların lif çapları Tablo 5.33’de gösterilmiştir.

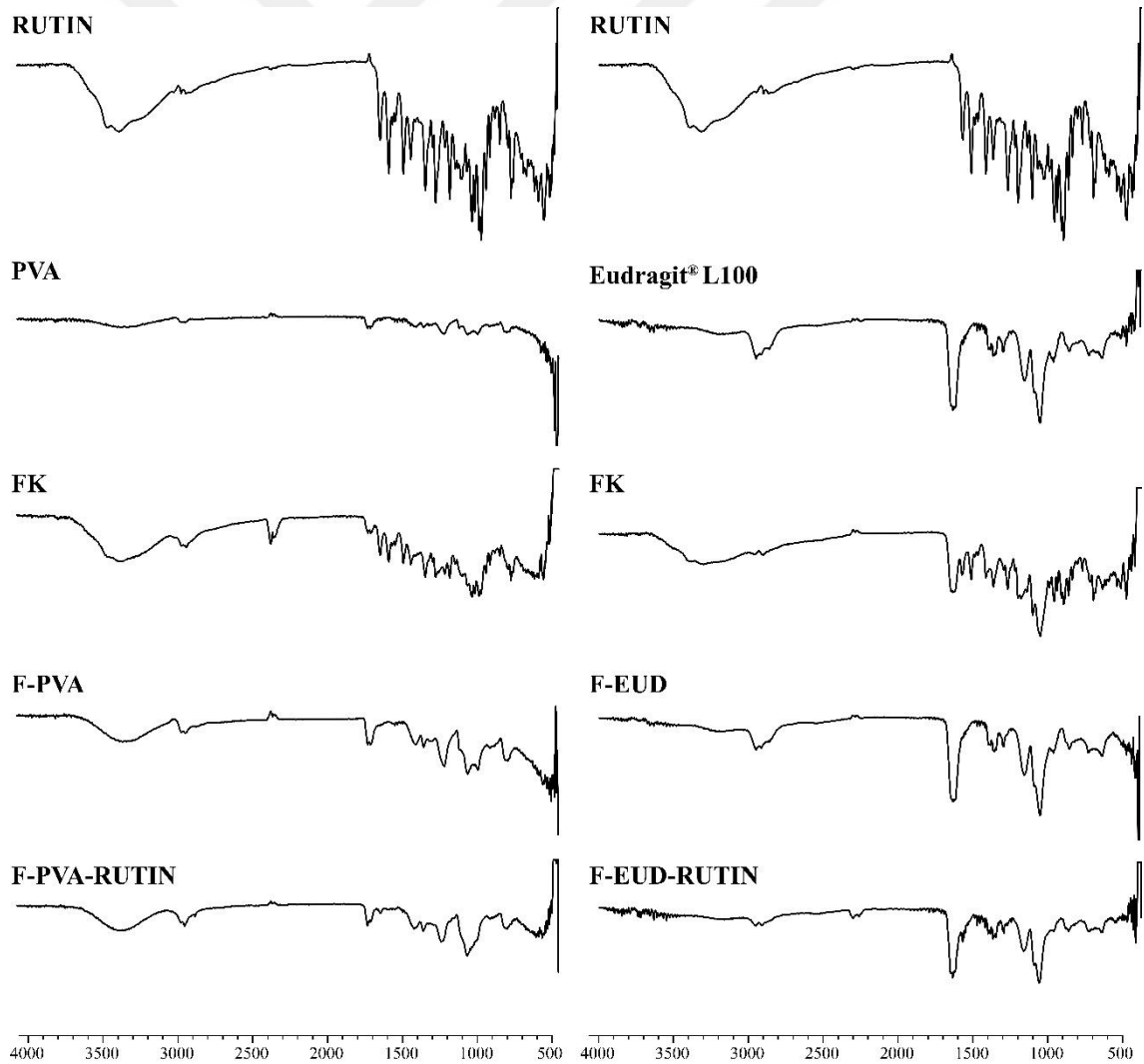
Tablo 5.33. Optimum formülasyonların lif çapları

Formülasyon	Lif apı (nm)
PVA-Rutin	258,371 ± 104,813
EUD-Rutin	125,115 ± 63,365

5.3.3. Spektroskopik analizler

5.3.3.1. Fourier dönüşümlü kızılgtesisi spektroskopisi (FTIR)

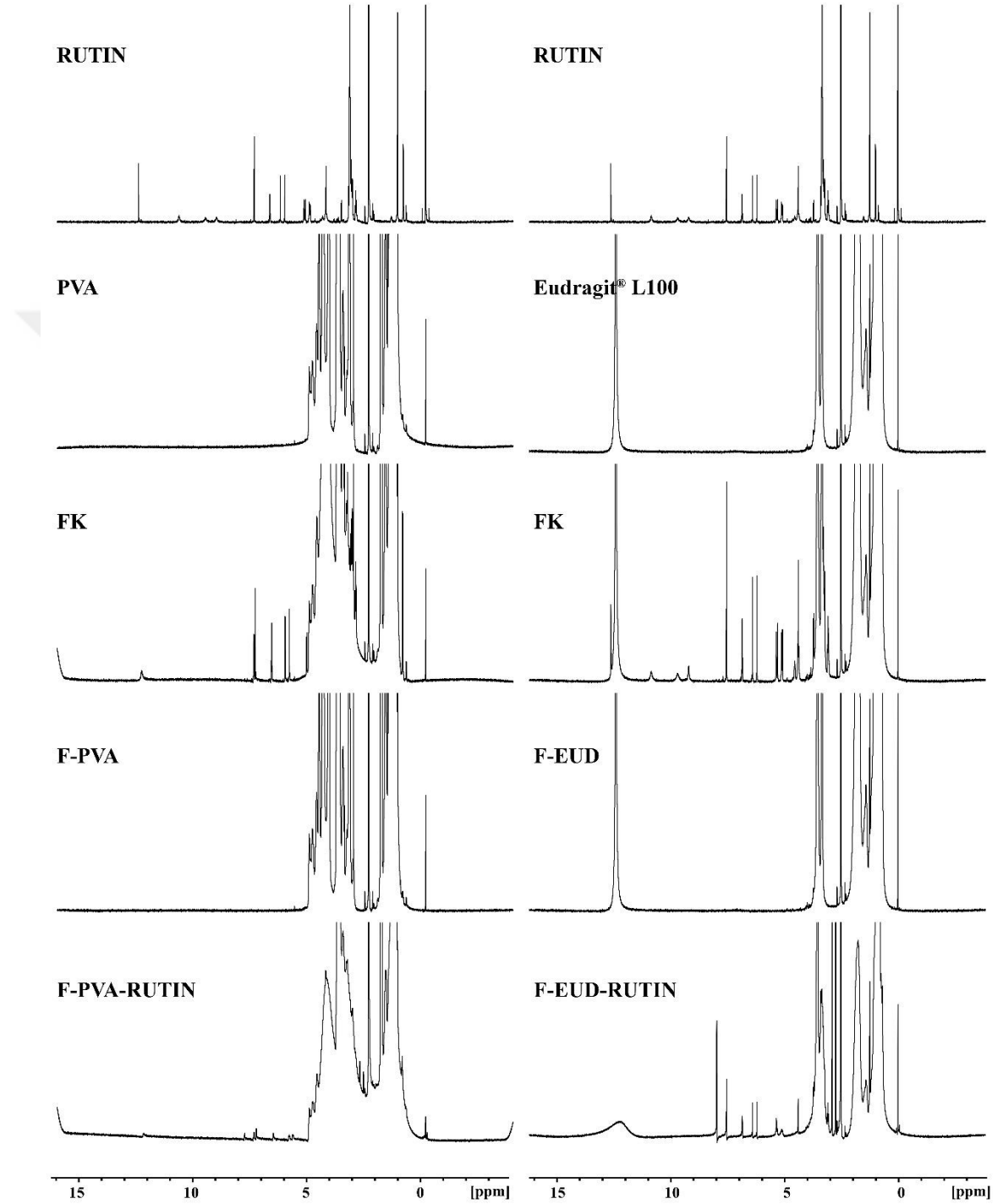
Formülasyonların FTIR spektrumları, etkin madde, fiziksel karışım ve etkin maddesiz formülasyonlar ile karşılaştırmalı olarak şekil 5.16’te gösterilmiştir.



şekil 5.16. Karşılaştırmalı FTIR Spektrumları

5.3.3.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

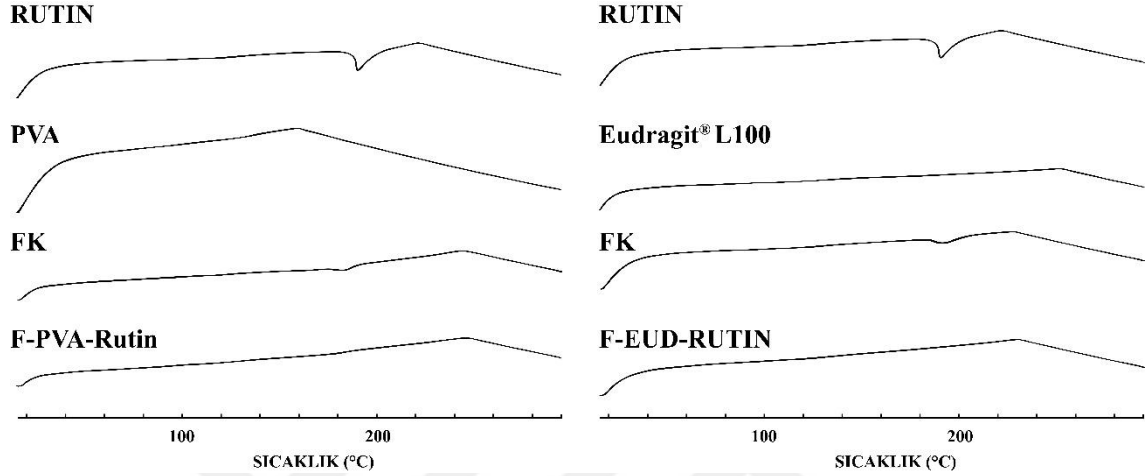
Formülasyonların NMR spektrumları, etkin madde, fiziksel karışım ve etkin maddesiz formülasyonlar ile karşılaştırmalı olarak Şekil 5.17’da gösterilmiştir.



Şekil 5.17. Karşılaştırmalı NMR Spektrumları

5.3.4. Termal analizler

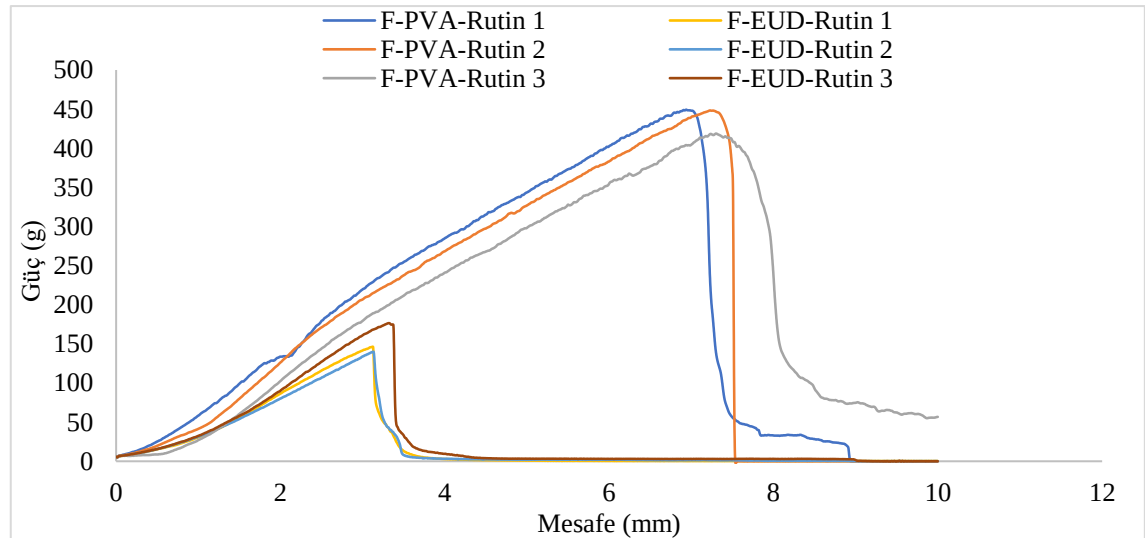
Formülasyonların DSC termogramları, etkin madde, fiziksel karışım ve polimer ile karşılaştırmalı olarak Şekil 5.18’te gösterilmiştir.



Şekil 5.18. Karşılaştırmalı DSC termogramları

5.3.5. Tekstür profil analizi

Formülasyonların tekstür profil analizlerinin sonuçları Şekil 5.19 ve Tablo 5.34’te verilmiştir.



Şekil 5.19. Formülasyonların test süresince gösterdiği mekanik değişiklikler

Tablo 5.34. Tekstür profilinin matematiksel değerleri

Formülasyon	Kopma Uzaması (mm)	Çekme Mukavemeti (g)
F-PVA-Rutin	7,156 ± 0,193	438,8 ± 17,33
F-EUD-Rutin	3,192 ± 0,111	155,46 ± 18,28

5.3.6. Antioksidan aktivite testi

Etkin maddeli ve etkin madesiz formülasyonların karşılaştırmalı antioksidan aktivite sonuçları olarak Tablo 5.35’te gösterilmiştir

Tablo 5.35. Karşılaştırmalı antioksidan aktivite testi sonuçları

Formülasyon	% Süpürme
Rutin Hidrat	69,42 ± 0,6
F-PVA	5,68 ± 2,92
F-EUD	Etkisiz
F-PVA-Rutin	73,61 ± 2,01
F-EUD-Rutin	70,23 ± 1,77

5.3.7. Etkin madde miktar tayini

Formülasyonların etkin madde miktar tayinleri Tablo 5.36 ve Tablo 5.37’te gösterilmiştir.

Tablo 5.36. F-PVA-Rutin etkin madde miktar tayini

	1	2	3	4	5	Ort
Alan	0,929	1,003	0,998	0,862	0,930	0,944
Kütle (mg)	1,000	1,110	1,160	0,980	1,030	1,056
EM Miktarı (µg)	81,687	84,885	89,719	75,911	83,132	83,067
						ORT 78,735
EM/Kütle (µg/mg)	81,687	76,473	77,344	77,460	80,711	SS 2,307
						SH 1,032
						ORT 87,983
EM/Alan (µg/cm ²)	87,930	84,631	89,898	88,064	89,389	SS 2,055
						SH 0,919

Tablo 5.37. F-EUD-Rutin etkin madde miktar tayini

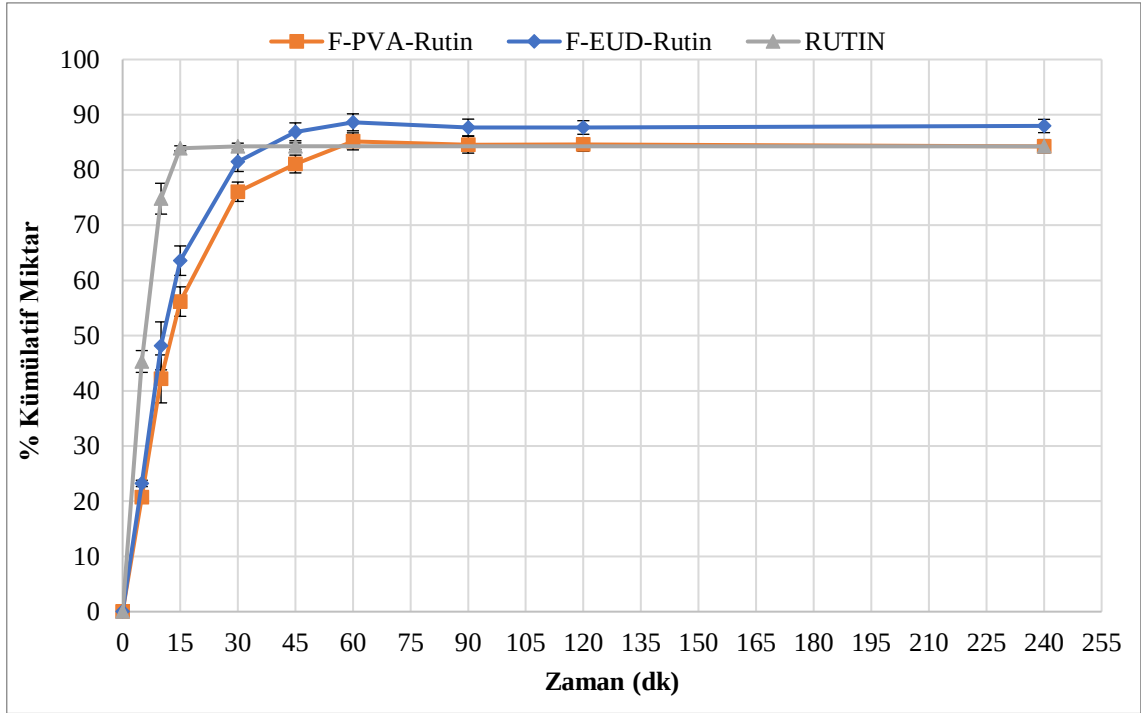
	1	2	3	4	5	Ort	
Alan	1,028	0,979	0,998	1,076	1,063	1,029	
Kütle (mg)	1,090	1,000	1,110	1,200	1,170	1,114	
EM Miktarı (µg)	87,541	81,885	87,401	92,524	92,132	88,297	
							ORT 76,833
EM/Kütle (µg/mg)	79,687	74,671	75,620	75,419	78,769		SS 2,238
							SH 1,001
							ORT 85,807
EM/Alan (µg/cm ²)	85,157	83,641	87,576	85,989	86,672		SS 1,502
							SH 0,672

5.3.8. Etkin madde salım çalışması

Saf etkin madde ve F-PVA-Rutin, F-EUD-Rutin formülasyonlarının *in vitro* salım profili Tablo 5.38’de, salım kinetiklerine uyumlulukları Tablo 5.39’da ve salım profilinin grafiksel gösterimi Şekil 5.20’de sunulmuştur. Etkin maddenin deney ortamındaki kararlılığını gösteren veriler Tablo 5.40’da gösterilmiştir.

Tablo 5.38. Zamana karşı dozaj şeklinden salınan kümülatif etkin madde miktarı

Zaman	Etkin Madde		F-PVA-Rutin		F-EUD-Rutin	
	%	SH	%	SH	%	SH
5. dk	45,31	1,98	22,55	1,74	22,35	0,57
10. dk	74,80	2,79	43,55	0,74	38,78	4,34
15. dk	83,91	0,46	55,04	1,04	57,43	2,67
30. dk	84,24	0,62	74,07	0,83	78,67	1,76
45. dk	84,30	0,59	77,50	1,50	84,53	1,62
60. dk			86,31	0,77	87,03	1,53
90. dk			86,69	0,87	87,75	1,51
120. dk			86,43	0,92	86,28	1,23
240. dk			85,21	0,40	87,14	1,20



Şekil 5.20. Salım grafiği

Tablo 5.39. Salım profilinin matematiksel modellere uyumu

Formül	Değerlendirme	Model		
		Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi
F-PVA-Rutin	r^2	0,5919	0,9955	0,9513
	k	2,1330	0,0680	14,4500
	AIC	59,3255	27,8480	44,4464
F-EUD-Rutin	r^2	0,4987	0,9873	0,9276
	k	2,187	0,070	14,930
	AIC	60,9406	35,2343	47,3984
Rutin Hidrat	r^2	0,8973	0,8923	0,9898
	k	7,571	0,306	26,217
	AIC	27,7152	27,9036	18,4870
F-PVA-Rutin		Hixson-Crowell	Baker-Lonsdale	Korsmeyer-Peppas
	r^2	0,9761	0,0000	0,8430
	k	0,016	0,009	10,826
F-EUD-Rutin	AIC	39,4610	84,0951	54,6402
	r^2	0,9825	0,0000	0,8437
	k	0,0226	0,011	16,723
Rutin Hidrat	AIC	37,2096	85,1533	54,7810
	r^2	0,9968	0,0000	0,9894
	k	0,047	0,040	21,781
	AIC	13,8299	49,2411	20,6184

Tablo 5.40. Salım ortamında etkin madde kararlılığı (% Geri kazanım)

	1	2	3	Ortalama ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	SS
Rutin hidrat	101,587	100,820	100,180	100,862	0,704

5.4. Kararlılık Çalışmaları

Kararlılık çalışmalarının özeti Tablo 5.41’de gösterilmiştir.

Tablo 5.41. Kararlılık çalışmalarının özet tablosu

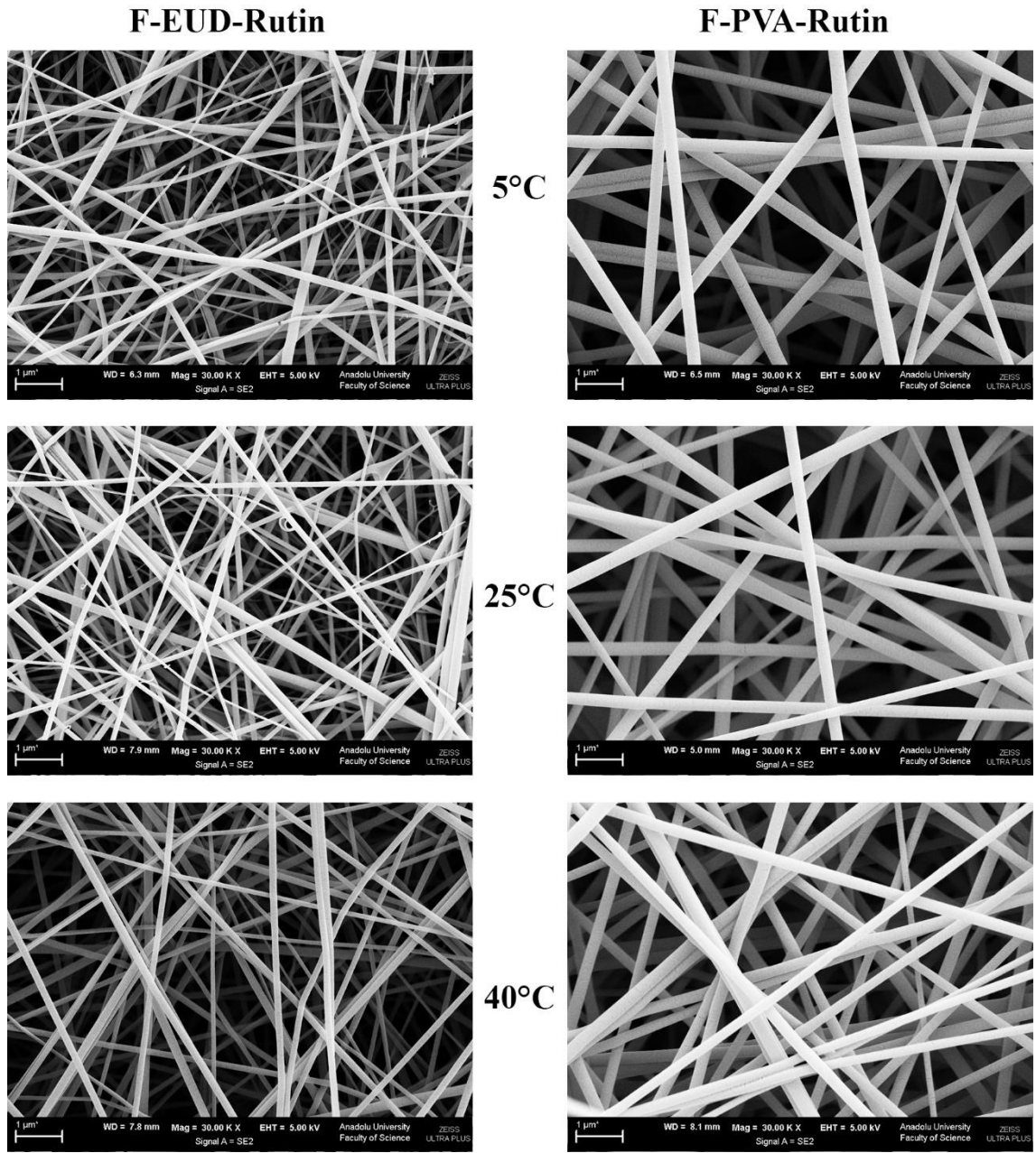
	F-PVA-Rutin			F-EUD-Rutin		
	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
Fiziksel Görünüş	Sarı - Opak	Sarı - Opak	Sarı - Opak	Sarımtırak - Opak	Sarımtırak - Opak	Sarımtırak - Opak
SEM - Lif Çapı (nm)	136,92 $\pm$ 9 1,72	124,64 $\pm$ 70,84	144,79 $\pm$ 50,36	215,63 $\pm$ 73,96	295,4 $\pm$ 65,075	224,97 $\pm$ 53,41
FTIR	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok
DSC	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok
NMR	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok	Değişim Yok
Antioksidan Aktivite (%)	73,97 $\pm$ 0,72	71,45 $\pm$ 2,5	71,72 $\pm$ 1	70,56 $\pm$ 0,42	71,79 $\pm$ 0,42	71,69 $\pm$ 2,17
Etkin Madde Miktar Tayini	$\pm$ %2 içerisinde	$\pm$ %2 içerisinde	$\pm$ %2 içerisinde	$\pm$ %2 içerisinde	$\pm$ %2 içerisinde	$\pm$ %2 içerisinde

5.4.1. Fiziksel görünüş

Tüm formülasyonların fiziksel görünüşleri Bölüm 4.4’te belirtilen koşullarda 30,60 ve 90. günlerde değerlendirilmiştir. F-PVA ve F-EUD formülasyonlarının opak beyaz renkli, pürüzsüz, homojen; F-PVA-Rutin formülasyonunun opak sarı renkli, pürüzsüz, homojen; F-EUD-Rutin formülasyonunun ise opak sarımtırak, pürüzsüz, homojen görünümünü tüm koşullar ve zamanlarda korudukları görülmüştür.

5.4.2. Mikroskopik analizler

Tüm formülasyonların fiziksel görünüşleri Bölüm 4.4’te belirtilen koşullarda yalnızca 90. günde değerlendirilmiştir. SEM ile elde edilen görüntüler Görsel 5.17’de, hesaplanan lif çapları Tablo 5.42’de gösterilmiştir.



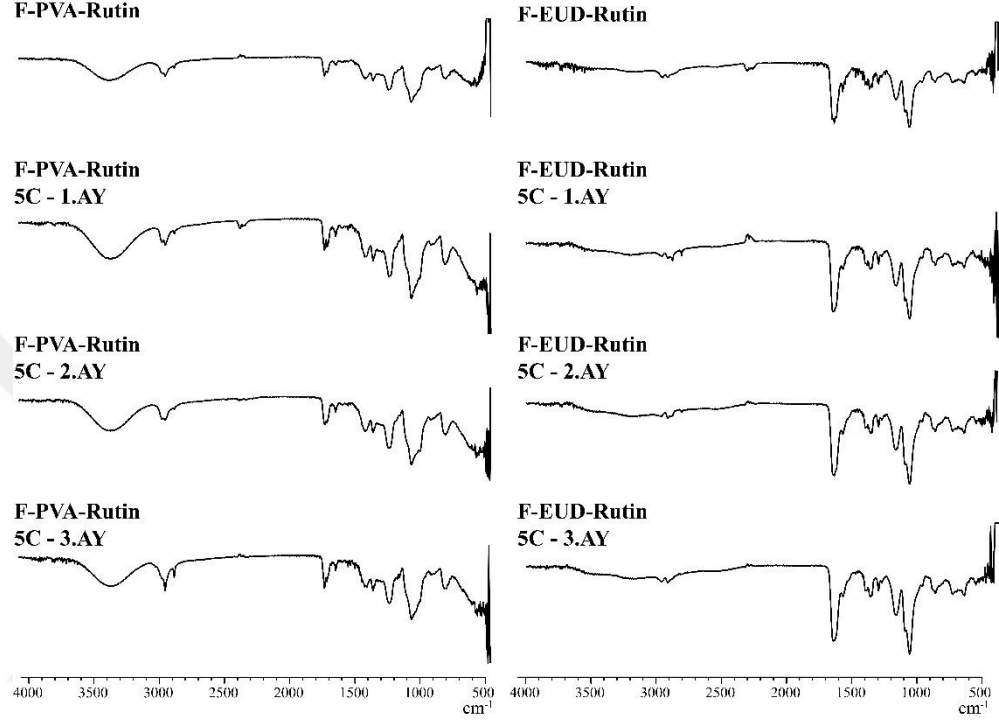
Görsel 5.17. Kararlılık için SEM görüntüleri

Tablo 5.42. Kararlılık için lif çapı sonuçları

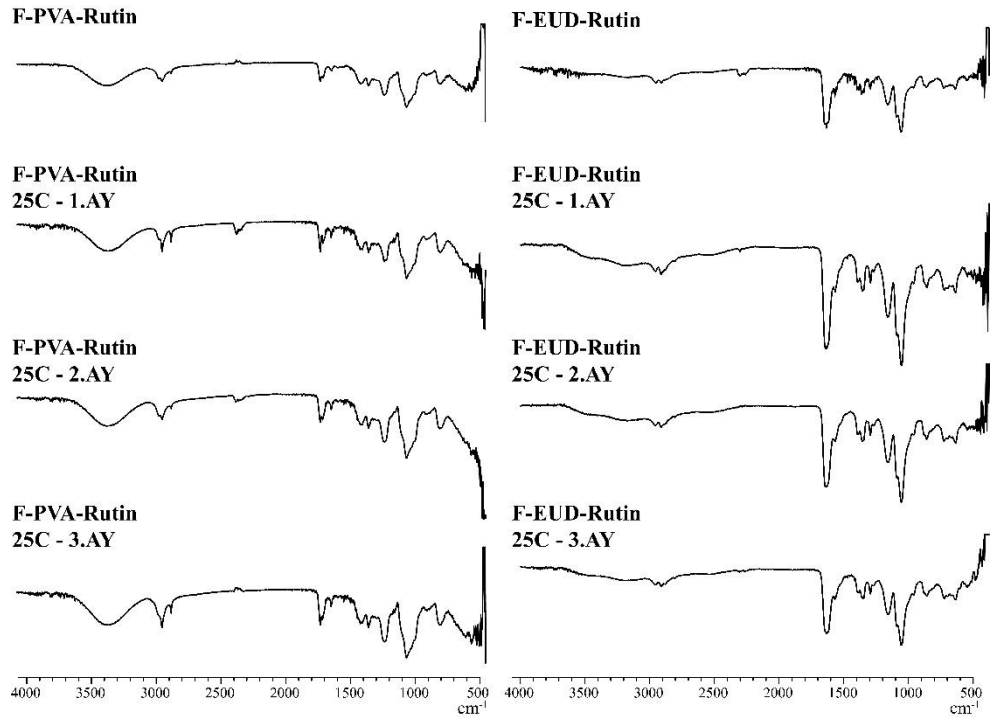
Koşul	Lif Çapı	
	F-PVA-Rutin	F-EUD-Rutin
0. Gün	258,37±104,81	125,12±63,37
5°C	215,63±73,96	136,92±91,72
25°C	295,4±65,075	124,64±70,84
40°C	224,97±53,41	144,79±50,36

5.4.3. Spektroskopik analizler

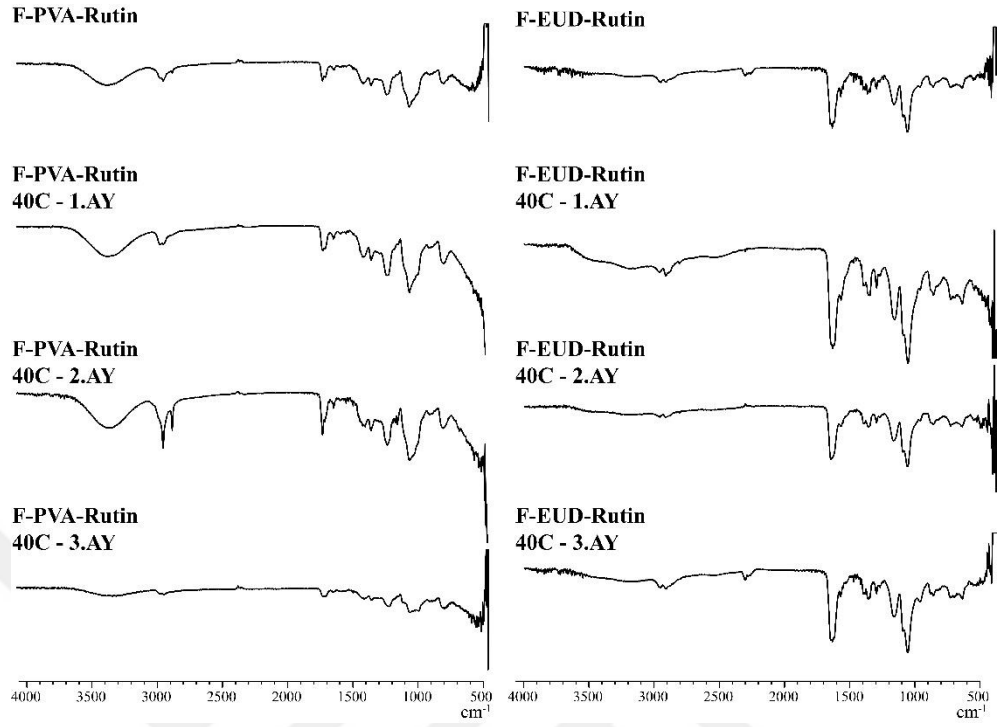
Formülasyonların Bölüm 4.4'te belirtilen koşullarda 30., 60. ve 90. günlerdeki FTIR (Şekil 5.21, Şekil 5.22 ve Şekil 5.23) ve NMR (Şekil 5.24, Şekil 5.25 ve Şekil 5.26) spektrumları gösterilmiştir.



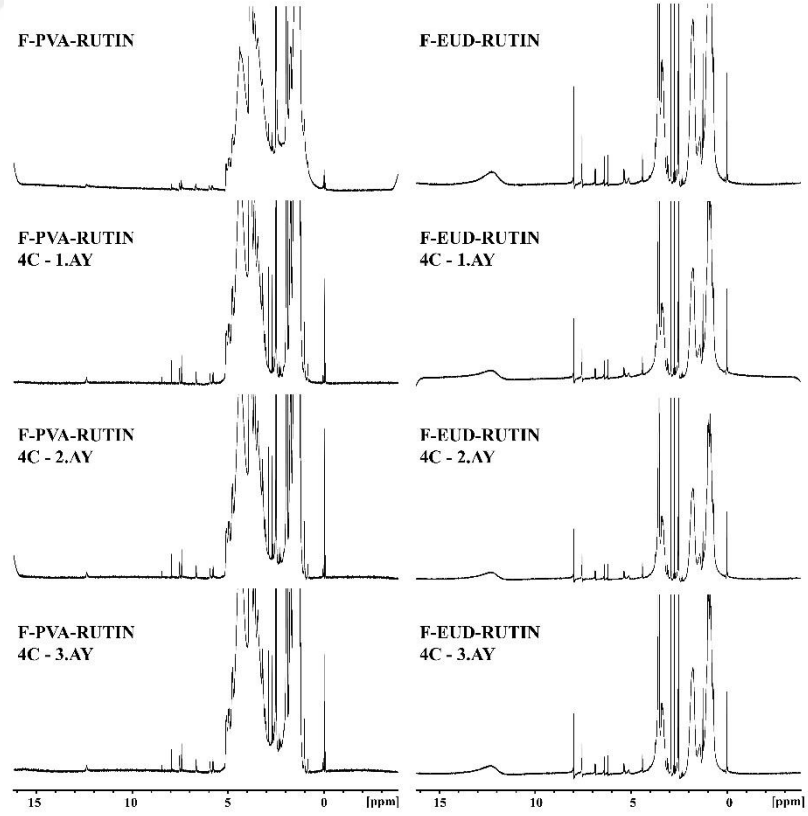
Şekil 5.21. Kararlılık için FTIR spektrumları (5°C)



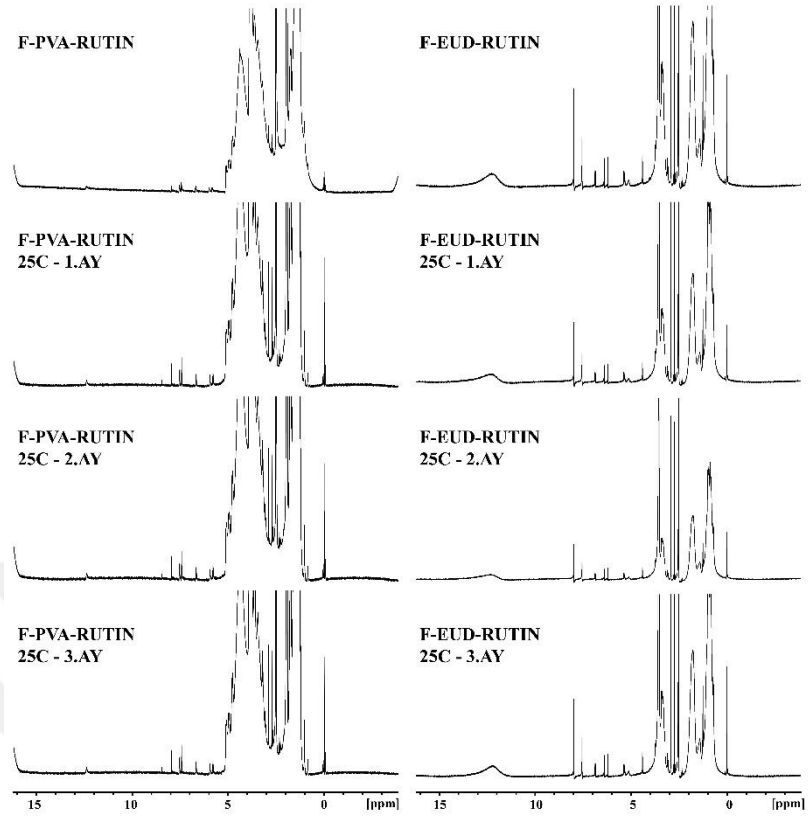
Şekil 5.22. Kararlılık için FTIR spektrumları (25°C)



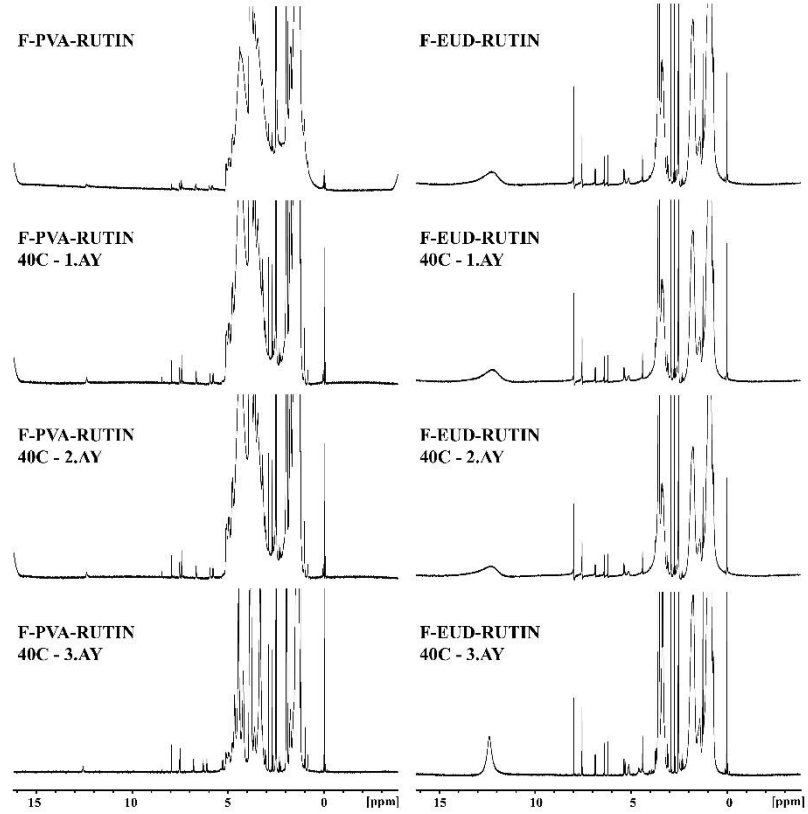
Şekil 5.23. Kararlılık için FTIR spektrumları (40°C)



Şekil 5.24. Kararlılık için NMR spektrumları (4°C)



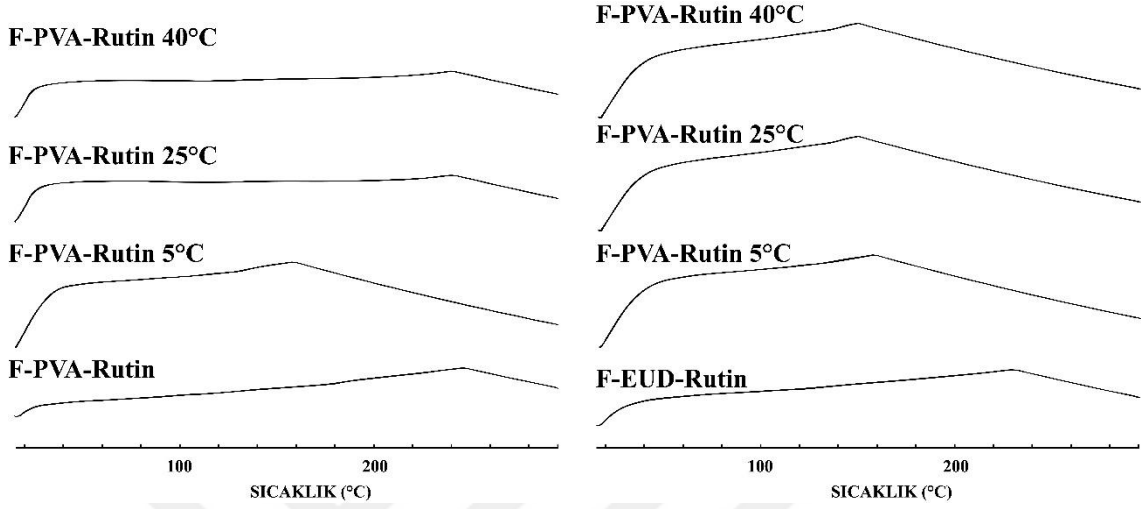
Şekil 5.25. Kararlılık için NMR spektrumları (25°C)



Şekil 5.26. Kararlılık için NMR spektrumları (40°C)

5.4.4. Termal analizler

Formülasyonların Bölüm 4.4'te belirtilen koşullarda 90. gündeki DSC termogramları Şekil 5.27'te gösterilmiştir.



Şekil 5.27. Kararlılık için DSC termogramları

5.4.5. Antioksidan aktivite testi

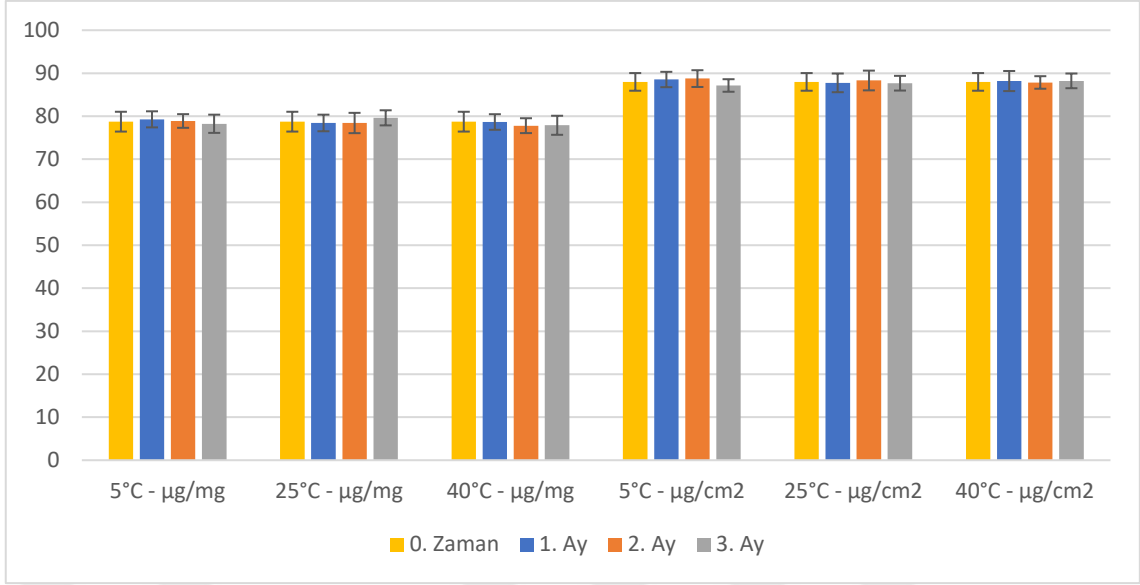
Formülasyonların Bölüm 4.4'te belirtilen koşullarda 90. gündeki antioksidan aktivitelerinin sonuçları Tablo 5.43'de gösterilmiştir.

Tablo 5.43. Kararlılık için antioksidan aktivite sonuçları

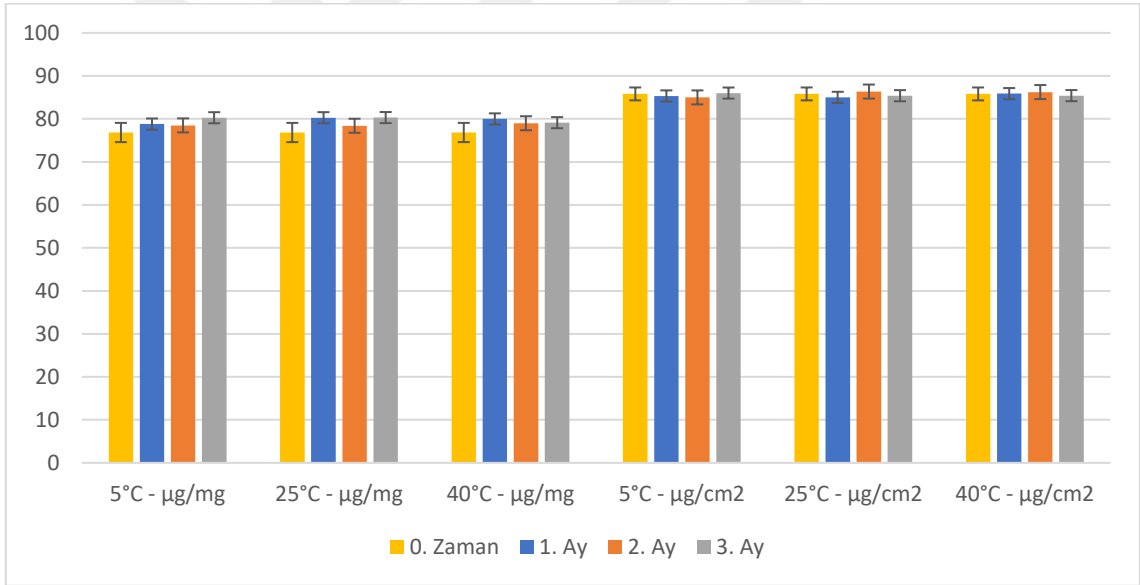
Formülasyon	% Süpürme
F-PVA-Rutin	73,61 ± 2,01
F-PVA-Rutin 4°C	73,97 ± 0,72
F-PVA-Rutin 25°C	71,45 ± 2,5
F-PVA-Rutin 40°C	71,72 ± 1
F-EUD-Rutin	70,23 ± 1,77
F-EUD-Rutin 4°C	70,56 ± 0,42
F-EUD-Rutin 25°C	71,79 ± 0,42
F-EUD-Rutin 40°C	71,69 ± 2,17

5.4.6. Etkin madde miktar tayini

Formülasyonların Bölüm 4.4'te belirtilen koşullarda 30., 60. ve 90. günlerdeki etkin madde miktar tayini sonuçları Şekil 5.28 ve Şekil 5.29'da gösterilmiştir.



Şekil 5.28. F-PVA-Rutin için kararlılık etkin madde miktar tayini sonuçları



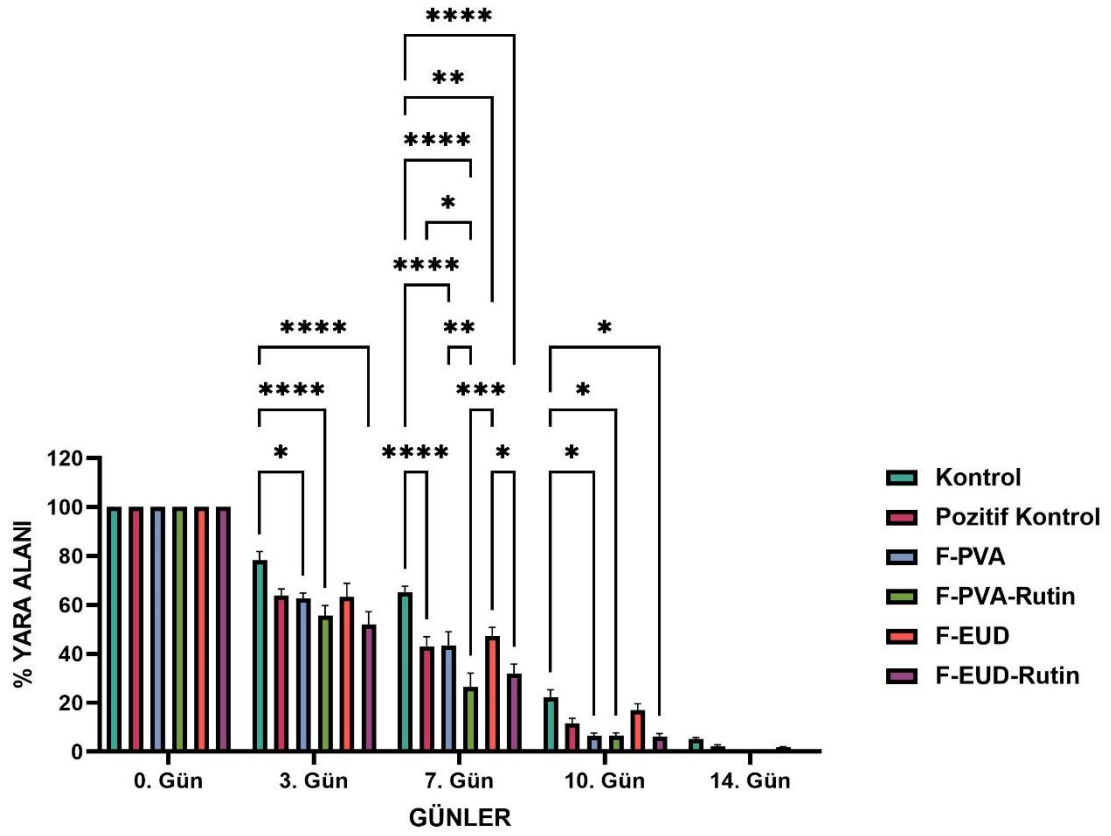
Şekil 5.29. F-EUD-Rutin için kararlılık etkin madde miktar tayini sonuçları

5.5. *In Vivo* Etkinlik Çalışması

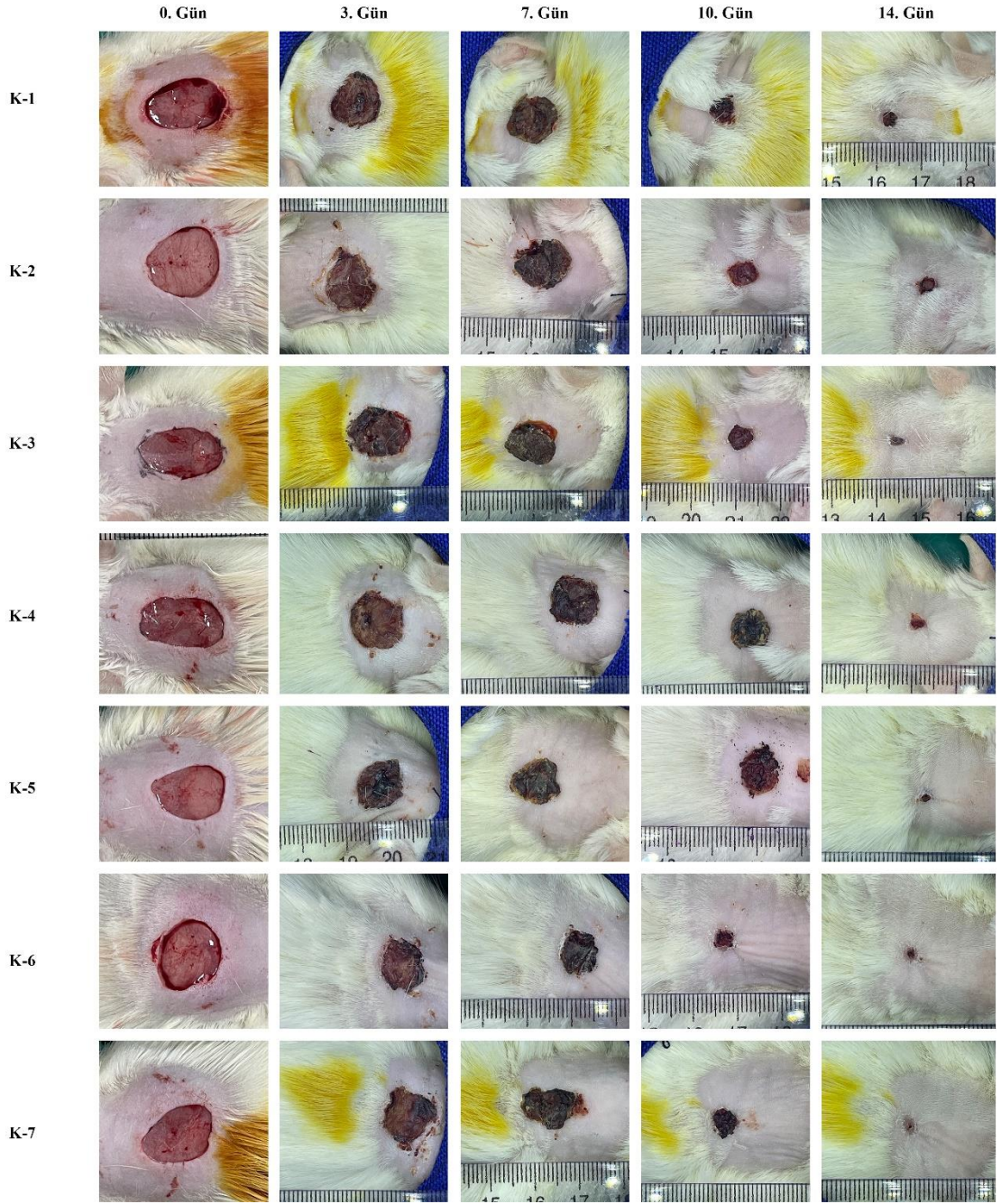
Günlere göre yara alanlarının dağılımları Tablo 5.44'te, ANOVA istatistik sonuç grafiği Şekil 5.30'te, deney görselleri Görsel 5.18, Görsel 5.19, Görsel 5.20, Görsel 5.21, Görsel 5.22, Görsel 5.23'te gösterilmiştir.

Tablo 5.44. Yara alanları

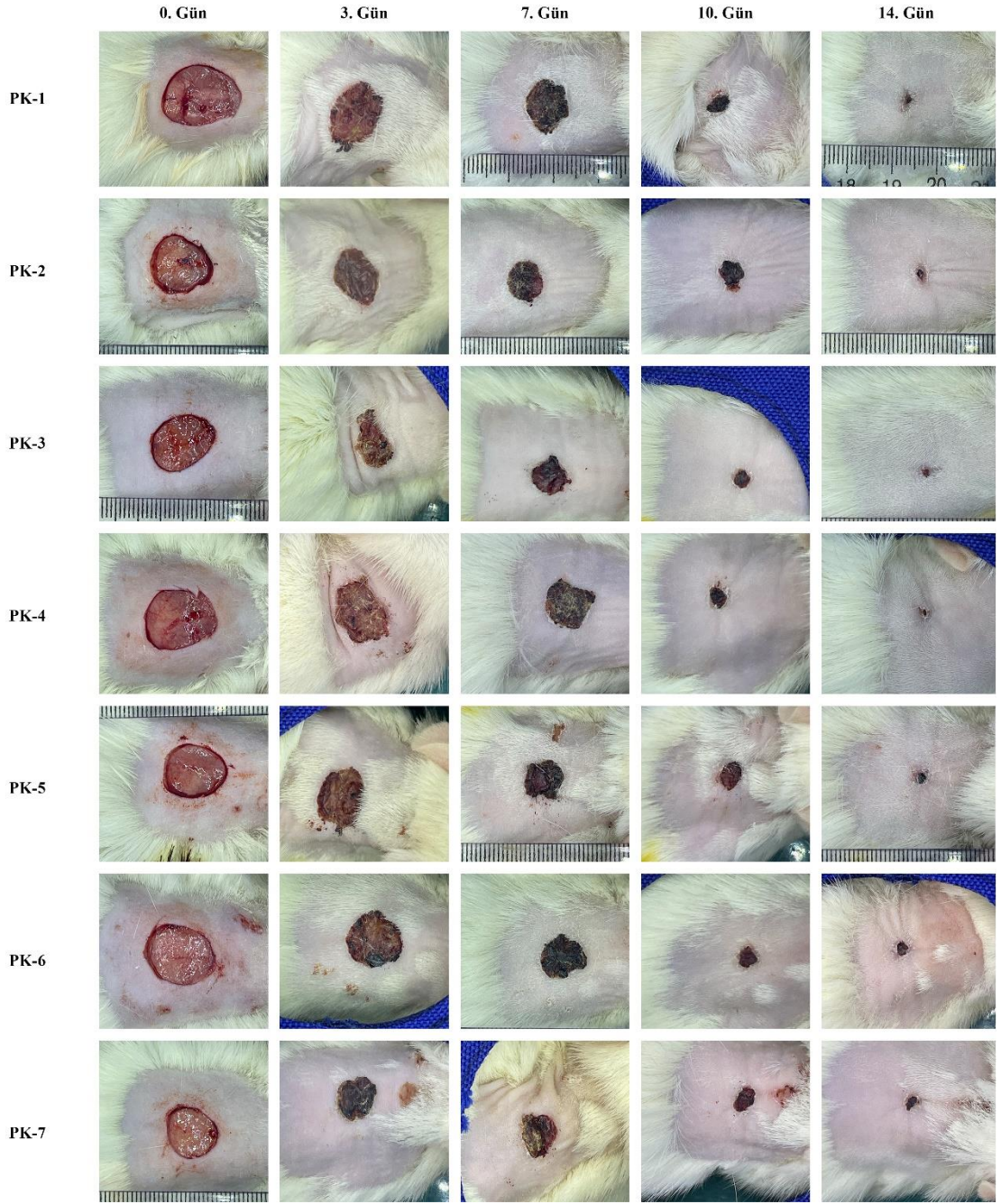
Kontrol	Alan (cm ²)						
	1	2	3	4	5	6	7
0. Gün	1,396	1,400	1,390	1,527	1,328	1,335	1,365
3. Gün	1,019	1,139	1,210	1,010	1,197	0,957	1,108
7. Gün	0,959	1,058	0,877	0,978	0,863	0,739	0,870
10. Gün	0,290	0,329	0,266	0,590	0,183	0,217	0,323
14. Gün	0,091	0,106	0,072	0,048	0,044	0,071	0,066
Pozitif Kontrol	Alan (cm ²)						
	1	2	3	4	5	6	7
0. Gün	1,913	1,438	1,393	1,778	1,370	1,691	1,053
3. Gün	1,287	0,929	0,725	1,170	1,022	1,091	0,658
7. Gün	0,566	0,566	0,506	0,848	0,603	0,719	0,611
10. Gün	0,148	0,259	0,100	0,125	0,228	0,137	0,180
14. Gün	0,022	0,025	0,022	0,008	0,035	0,067	0,049
F-PVA	Alan (cm ²)						
	1	2	3	4	5	6	7
0. Gün	1,647	1,423	1,093	1,268	1,050	1,155	1,531
3. Gün	0,948	0,850	0,711	0,807	0,702	0,628	1,090
7. Gün	0,523	0,286	0,693	0,598	0,617	0,447	0,675
10. Gün	0,084	0,051	0,121	0,120	0,019	0,090	0,092
14. Gün	0,020	0,000	0,004	0,005	0,000	0,000	0,002
F-PVA-Rutin	Alan (cm ²)						
	1	2	3	4	5	6	7
0. Gün	1,836	1,589	1,556	1,398	1,278	1,411	1,325
3. Gün	0,935	0,614	0,788	0,923	0,912	0,758	0,774
7. Gün	0,376	0,447	0,197	0,651	0,611	0,222	0,179
10. Gün	0,092	0,145	0,032	0,156	0,111	0,056	0,074
14. Gün	0,005	0,000	0,011	0,001	0,007	0,000	0,004
F-EUD	Alan (cm ²)						
	1	2	3	4	5	6	7
0. Gün	1,702	1,235	1,459	1,629	1,264	1,224	1,320
3. Gün	0,955	1,025	1,155	0,878	0,520	0,834	0,813
7. Gün	0,762	0,739	0,841	0,585	0,469	0,556	0,670
10. Gün	0,505	0,172	0,140	0,326	0,169	0,246	0,169
14. Gün	0,028	0,018	0,013	0,028	0,038	0,020	0,031
F-EUD-Rutin	Alan (cm ²)						
	1	2	3	4	5	6	7
0. Gün	1,414	1,662	1,236	1,170	1,232	1,086	1,194
3. Gün	0,583	1,081	0,454	0,801	0,811	0,489	0,505
7. Gün	0,293	0,585	0,251	0,535	0,441	0,455	0,289
10. Gün	0,065	0,111	0,013	0,123	0,110	0,071	0,066
14. Gün	0,005	0,000	0,000	0,024	0,005	0,000	0,000



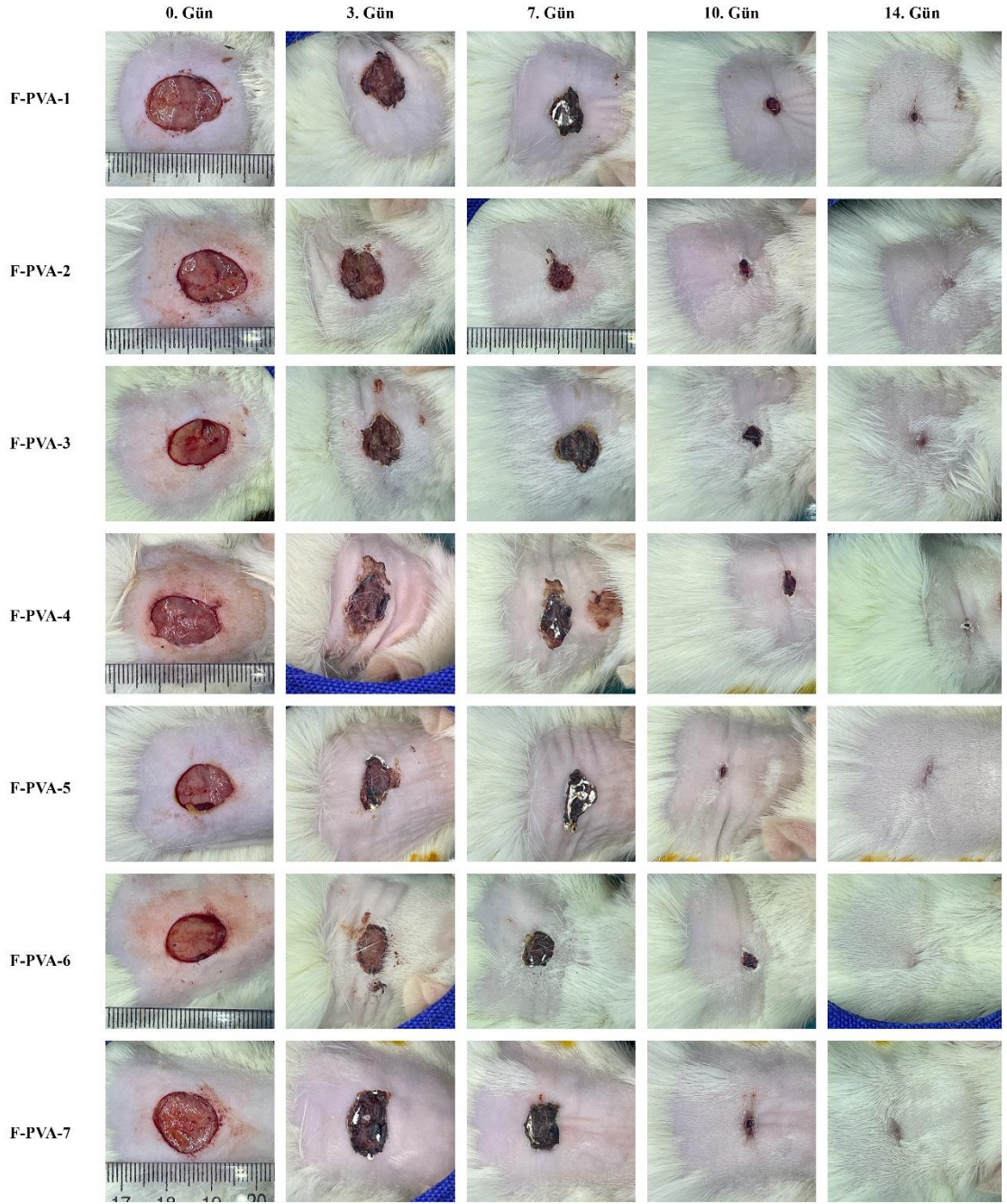
Şekil 5.30. *İn vivo* etkinlik deneyi için ANOVA istatistik sonuç grafiği
(*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$)



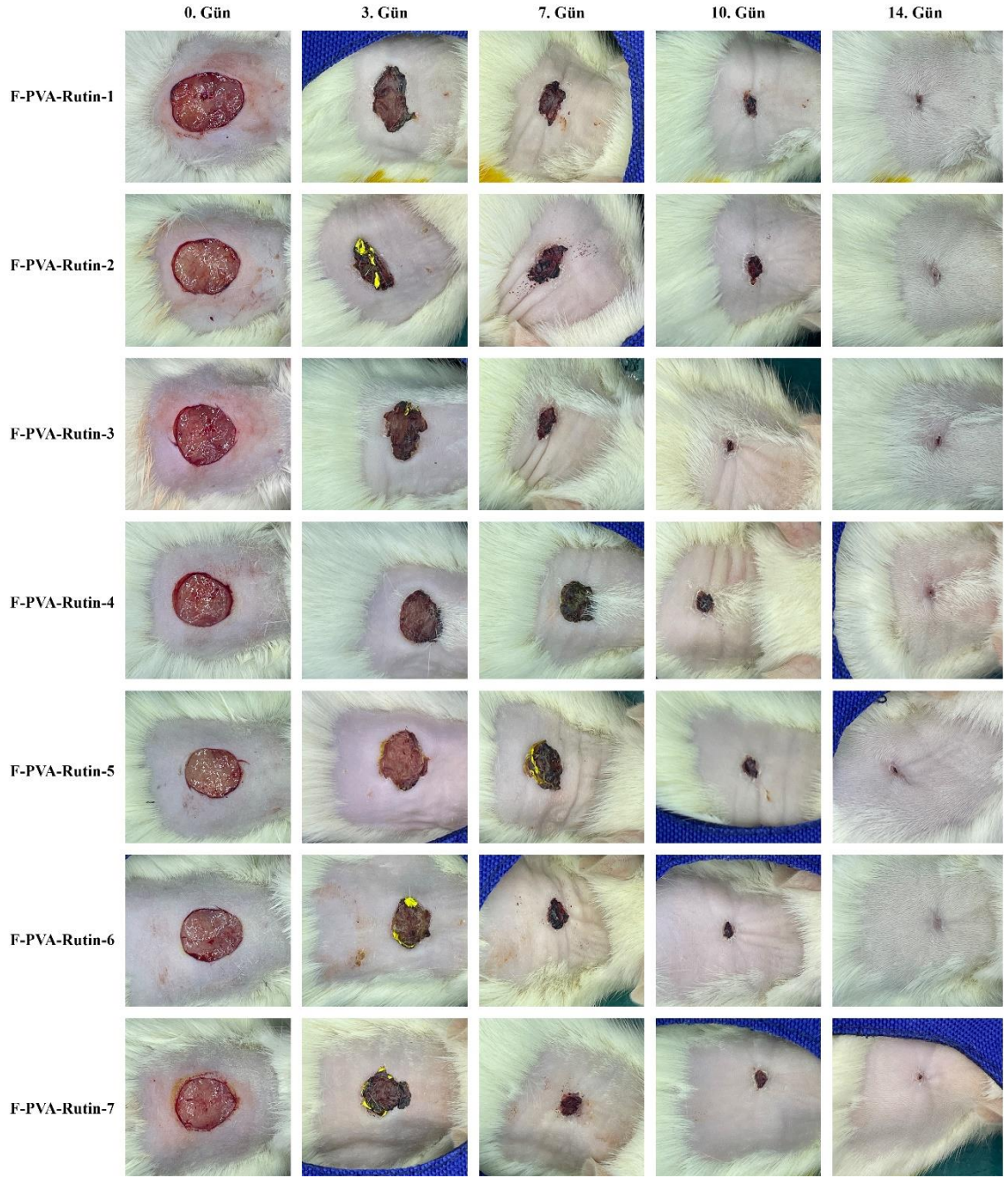
Görsel 5.18. *İn vivo* etkinlik deneyi kontrol grubu görselleri



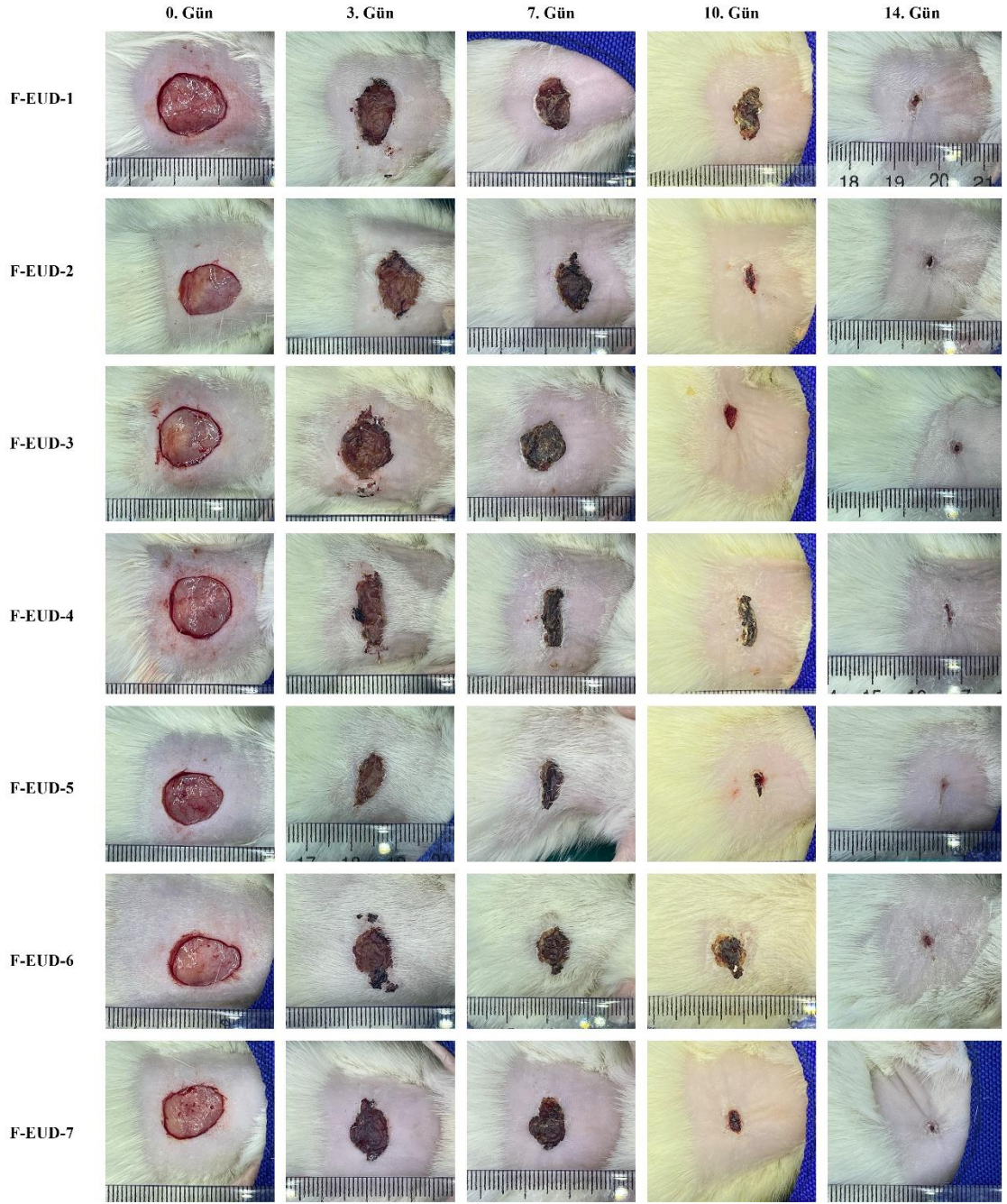
Görsel 5.19. *İn vivo* etkinlik deneyi pozitif kontrol grubu görselleri



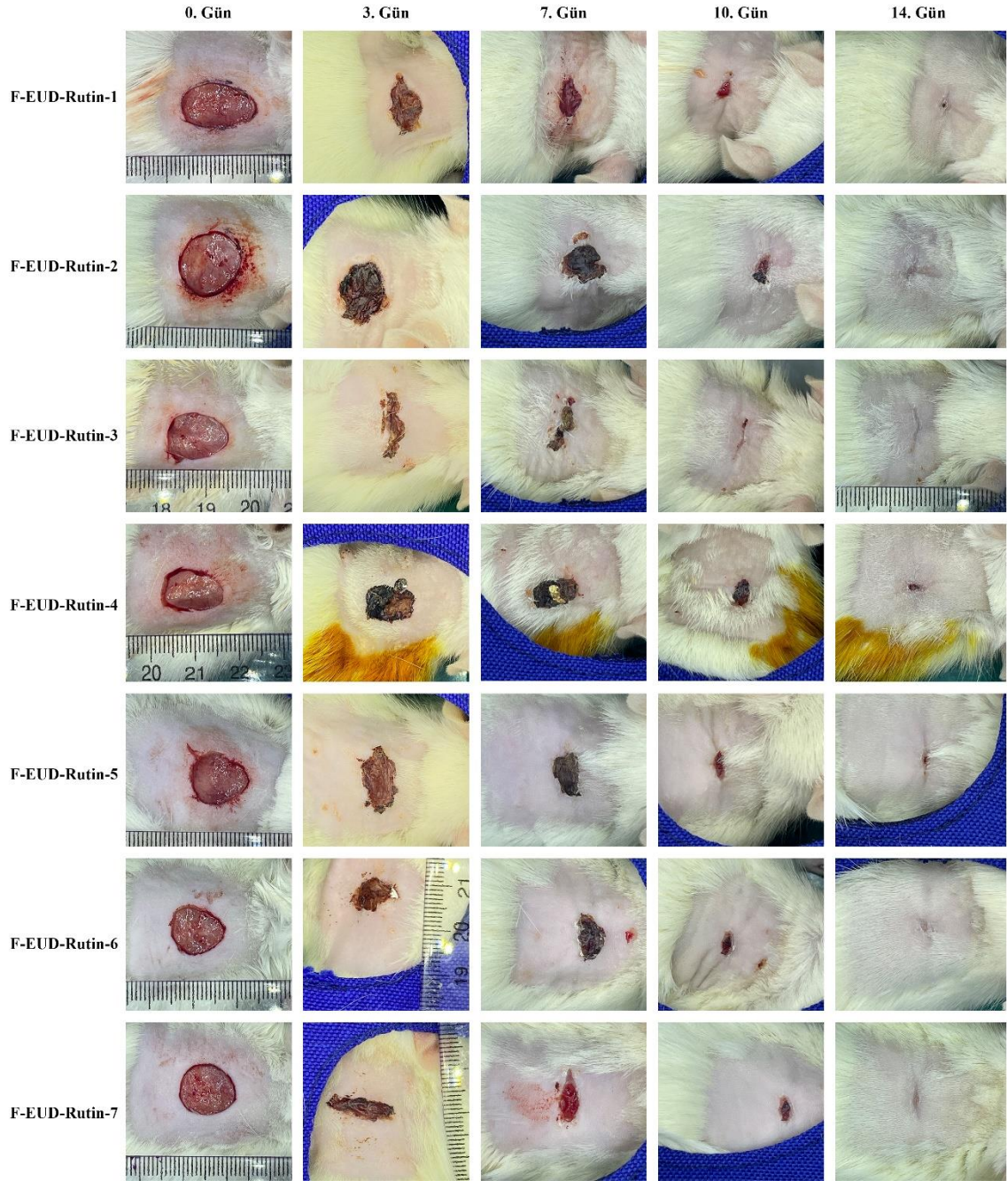
Görsel 5.20. *İn vivo* etkinlik deneyi F-PVA grubu görselleri



Görsel 5.21. *İn vivo* etkinlik deneyi F-PVA-Rutin grubu görselleri



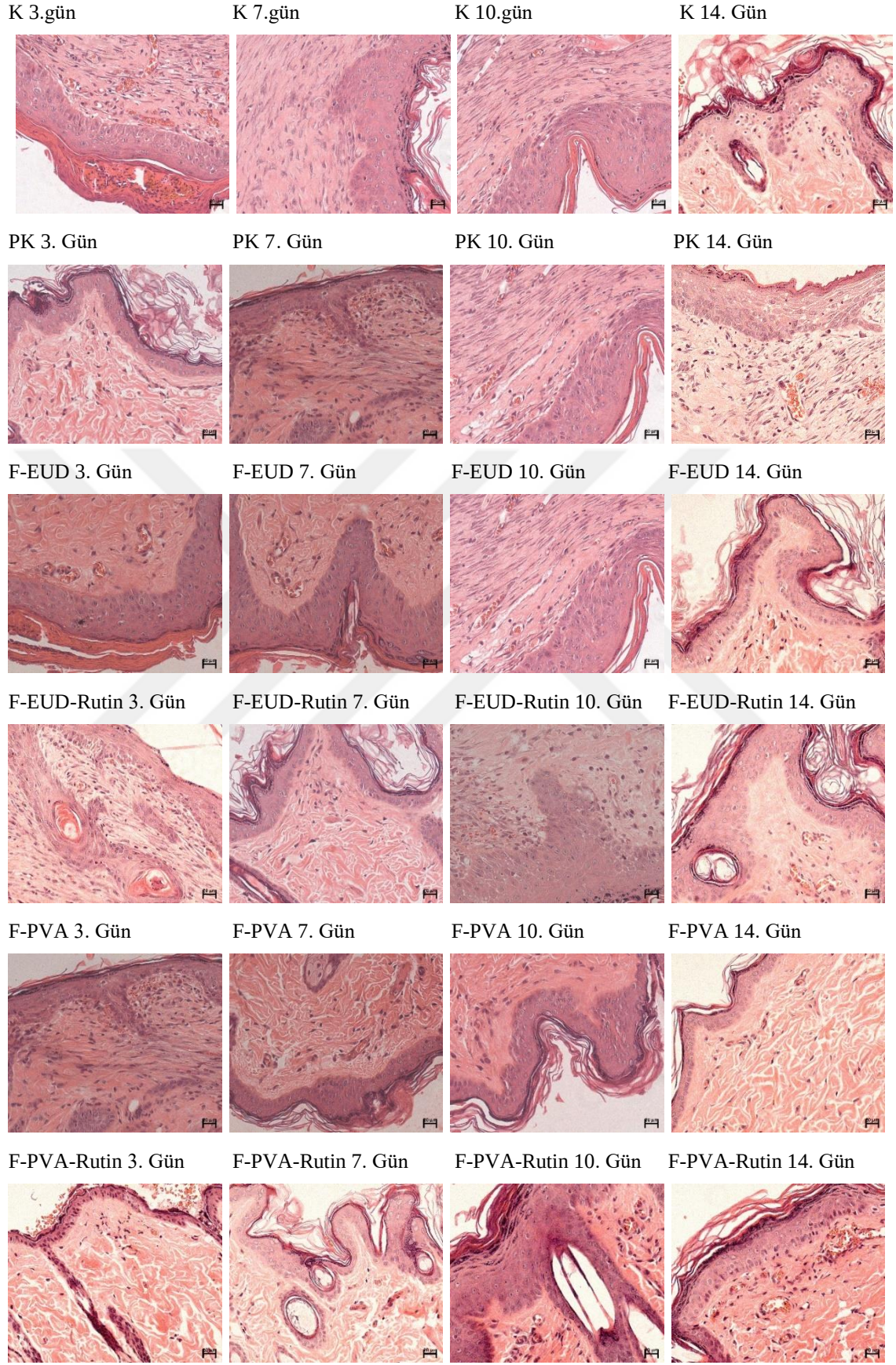
Görsel 5.22. *İn vivo* etkinlik deneyi F-EUD grubu görselleri



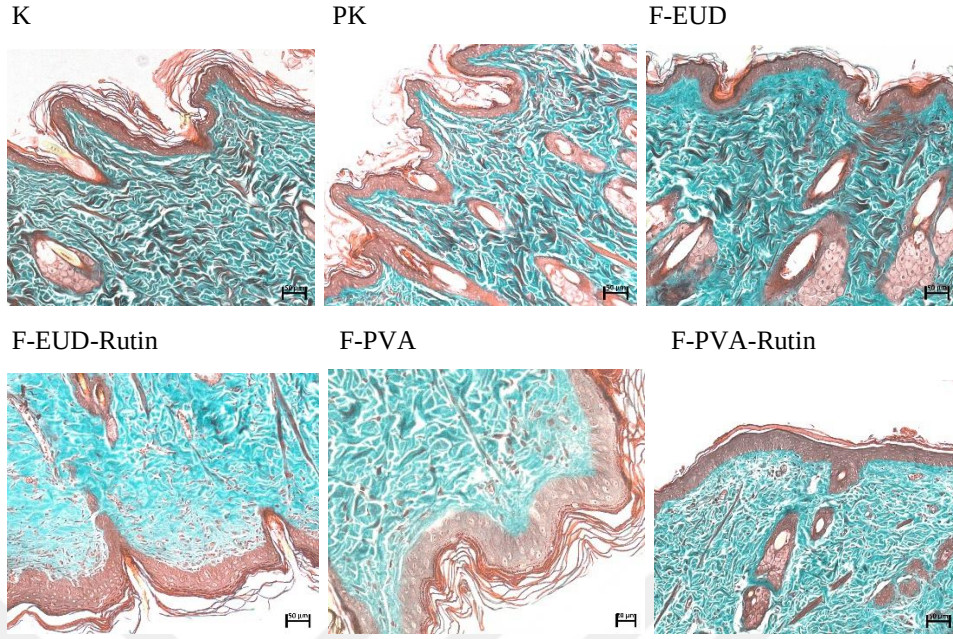
Görsel 5.23. *İn vivo* etkinlik deneyi F-EUD-Rutin grubu görselleri

5.5.1. Histolojik değerlendirme

Hematoksilen & Eozin boyama sonucu elde edilen görüntüler Görsel 5.24'te, Masson Tricrom boyama sonucu elde edilen görüntüler Görsel 5.25'te verilmiştir.



Görsel 5.24. Hematoksilen & Eozin boyama sonucu günlere göre elde edilen görüntüler



Görsel 5.25. Masson tricrom boyama sonucu 14. günde elde edilen görüntüler

Örnek alınan gün içinde deney gruplarının reepitelizasyon, kolajen doku disorganizasyonu, nötrofil infiltrasyonu, hemoraji, granülasyon doku oluşumu ve anjiogenez açısından istatistiksel olarak değerlendirmeleri 3., 7., 10., ve 14. günler olmak üzere sırasıyla Tablo 5.45, Tablo 5.46, Tablo 5.47 ve Tablo 5.48’de verilmiştir.

Tablo 5.45. 3. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları

Ölçümler	Alt Grup	N	SS	Sıra Ortalaması	Ki Kare	p	
Reepitelizasyon	K	20	1	0	60,5	.000	1.000
	PK	20	1	0	60,5		
	F-PVA	20	1	0	60,5		
	F-PVA-Rutin	20	1	0	60,5		
	F-EUD	20	1	0	60,5		
	F-EUD-Rutin	20	1	0	60,5		
Kollajen doku disorganizasyonu	K	20	0,1	0,3	60	.428	.995
	PK	20	0,1	0,3	60		
	F-PVA	20	0,1	0,3	60		
	F-PVA-Rutin	20	0,1	0,3	60		
	F-EUD	20	0,1	0,3	60		
	F-EUD-Rutin	20	0,15	0,4	63		
Nötrofil infiltrasyonu	K	20	2,15	0,6	69,05	17,105	.004**
	PK	20	1,7	0,5	45,9		
	F-PVA	20	2,1	0,5	66,55		
	F-PVA-Rutin	20	2,1	0,5	66,55		
	F-EUD	20	2,15	0,5	69,1		
	F-EUD-Rutin	20	1,7	0,6	45,85		
Hemoraji	K	20	2,3	0,5	61,95	10.650	.059
	PK	20	2,05	0,7	50,93		
	F-PVA	20	2,3	0,5	61,95		
	F-PVA-Rutin	20	2	0,6	47,33		
	F-EUD	20	2,45	0,5	70,43		
	F-EUD-Rutin	20	2,45	0,5	70,43		
Granulasyon doku oluşumu	K	20	0,1	0,3	60	.428	.995
	PK	20	0,1	0,3	60		
	F-PVA	20	0,1	0,3	60		
	F-PVA-Rutin	20	0,1	0,3	60		
	F-EUD	20	0,1	0,3	60		
	F-EUD-Rutin	20	0,15	0,4	63		
Anjiogenezis	K	20	0	0	60,5	.000	1.000
	PK	20	0	0	60,5		
	F-PVA	20	0	0	60,5		
	F-PVA-Rutin	20	0	0	60,5		
	F-EUD	20	0	0	60,5		
	F-EUD-Rutin	20	0	0	60,5		

Not: * = $p < .05$; ** = $p < .01$; *** = $p < .001$.

Tablo 5.46. 7. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları

Ölçümler	Alt Grup	N	SS	Sıra Ortalaması	Ki Kare	p
Reepitelizasyon	K	20	1,1	0,3	55	6667 .247
	PK	20	1,1	0,3	55	
	F-PVA	20	1,3	0,5	67	
	F-PVA-Rutin	20	1,3	0,5	67	
	F-EUD	20	1,1	0,3	55	
	F-EUD-Rutin	20	1,25	0,4	64	
Kollajen doku disorganizasyonu	K	20	0,35	0,5	54,5	7613 .179
	PK	20	0,35	0,5	54,5	
	F-PVA	20	0,45	0,5	60,5	
	F-PVA-Rutin	20	0,7	0,5	75,5	
	F-EUD	20	0,35	0,5	54,5	
	F-EUD-Rutin	20	0,5	0,5	63,5	
Nötrofil infiltrasyonu	K	20	2,65	0,5	70,2	19913 .001***
	PK	20	2	0,6	36,7	
	F-PVA	20	2,6	0,5	67,3	
	F-PVA-Rutin	20	2,6	0,5	67,3	
	F-EUD	20	2,65	0,5	70,2	
	F-EUD-Rutin	20	2,3	0,6	51,3	
Hemoraji	K	20	1,45	0,5	65,28	9.749 .083
	PK	20	1,1	0,5	45,55	
	F-PVA	20	1,4	0,5	62,3	
	F-PVA-Rutin	20	1,25	0,4	53,38	
	F-EUD	20	1,5	0,5	68,25	
	F-EUD-Rutin	20	1,5	0,5	68,25	
Granulasyon doku oluşumu	K	20	0,35	0,5	54,5	7613 .179
	PK	20	0,35	0,5	54,5	
	F-PVA	20	0,45	0,5	60,5	
	F-PVA-Rutin	20	0,7	0,5	75,5	
	F-EUD	20	0,35	0,5	54,5	
	F-EUD-Rutin	20	0,5	0,5	63,5	
Anjiogenezis	K	20	1	0	49,5	16338 .006**
	PK	20	1,1	0,3	55,5	
	F-PVA	20	1,2	0,4	61,5	
	F-PVA-Rutin	20	1,25	0,4	64,5	
	F-EUD	20	1,1	0,3	55,5	
	F-EUD-Rutin	20	1,45	0,5	76,5	

Not: * = $p < .05$; ** = $p < .01$; *** = $p < .001$.

Tablo 5.47. 10. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları

Ölçümler	Alt Grup	N	SS	Sıra Ortalaması	Ki Kare	p
Reepitelizasyon	K	20	2,3	0,5	56	4125 .532
	PK	20	2,3	0,5	56	
	F-PVA	20	2,4	0,5	62	
	F-PVA-Rutin	20	2,4	0,5	62	
	F-EUD	20	2,3	0,5	56	
	F-EUD-Rutin	20	2,55	0,5	71	
Kollajen doku disorganizasyonu	K	20	1,65	0,5	52,35	13694 .018*
	PK	20	1,65	0,5	52,35	
	F-PVA	20	1,85	0,4	64,15	
	F-PVA-Rutin	20	2,05	0,4	74,7	
	F-EUD	20	1,65	0,5	52,35	
	F-EUD-Rutin	20	1,9	0,3	67,1	
Nötrofil infiltrasyonu	K	20	1,35	0,5	59	4125 .532
	PK	20	1,2	0,4	50	
	F-PVA	20	1,45	0,5	65	
	F-PVA-Rutin	20	1,45	0,5	65	
	F-EUD	20	1,45	0,5	65	
	F-EUD-Rutin	20	1,35	0,5	59	
Hemoraji	K	20	0,55	0,5	60,08	1.113 .953
	PK	20	0,5	0,6	56	
	F-PVA	20	0,65	0,7	63,23	
	F-PVA-Rutin	20	0,5	0,5	57,25	
	F-EUD	20	0,65	0,7	63,23	
	F-EUD-Rutin	20	0,65	0,7	63,23	
Granulasyon doku oluşumu	K	20	1,65	0,5	56,18	4145 .529
	PK	20	1,65	0,5	56,18	
	F-PVA	20	1,75	0,4	62,13	
	F-PVA-Rutin	20	1,9	0,5	70,23	
	F-EUD	20	1,65	0,5	56,18	
	F-EUD-Rutin	20	1,75	0,4	62,13	
Anjiogenezis	K	20	1,4	0,5	53,8	16847 .005**
	PK	20	1,5	0,5	59,75	
	F-PVA	20	1,45	0,5	56,78	
	F-PVA-Rutin	20	1,95	0,4	85,08	
	F-EUD	20	1,35	0,5	50,83	
	F-EUD-Rutin	20	1,45	0,5	56,78	

Not: * = $p < .05$; ** = $p < .01$; *** = $p < .001$.

Tablo 5.48. 14. gün ölçümlerinin karşılaştırılma sonuçları

Ölçümler	Alt Grup	N	SS	Sıra Ortalaması	Ki Kare	p
Reepitelizasyon	K	20	1,05	0,2	57	5561 .351
	PK	20	1,05	0,2	57	
	F-PVA	20	1,2	0,4	66	
	F-PVA-Rutin	20	1,2	0,4	66	
	F-EUD	20	1,05	0,2	57	
	F-EUD-Rutin	20	1,1	0,3	60	
Kollajen doku disorganizasyonu	K	20	1,2	0,4	54,5	11806 .038*
	PK	20	1,2	0,4	54,5	
	F-PVA	20	1,2	0,4	54,5	
	F-PVA-Rutin	20	1,45	0,5	69,5	
	F-EUD	20	1,2	0,4	54,5	
	F-EUD-Rutin	20	1,55	0,5	75,5	
Nötrofil infiltrasyonu	K	20	0,7	0,5	64,6	5402 .369
	PK	20	0,45	0,5	50,1	
	F-PVA	20	0,75	0,6	65,35	
	F-PVA-Rutin	20	0,75	0,6	65,35	
	F-EUD	20	0,7	0,5	64,6	
	F-EUD-Rutin	20	0,5	0,5	53	
Hemoraji	K	20	0,2	0,4	62,5	1.904 .862
	PK	20	0,1	0,3	56,5	
	F-PVA	20	0,2	0,4	62,5	
	F-PVA-Rutin	20	0,1	0,3	56,5	
	F-EUD	20	0,2	0,4	62,5	
	F-EUD-Rutin	20	0,2	0,4	62,5	
Granulasyon doku oluşumu	K	20	1,2	0,4	53,4	15661 .008**
	PK	20	1,2	0,4	53,4	
	F-PVA	20	1,2	0,4	53,4	
	F-PVA-Rutin	20	1,55	0,6	72,2	
	F-EUD	20	1,2	0,4	53,4	
	F-EUD-Rutin	20	1,6	0,5	77,2	
Anjiogenezis	K	20	2,15	0,4	51	14609 .012*
	PK	20	2,4	0,5	66	
	F-PVA	20	2,2	0,4	54	
	F-PVA-Rutin	20	2,6	0,5	78	
	F-EUD	20	2,15	0,4	51	
	F-EUD-Rutin	20	2,35	0,5	63	

Not: * = $p < .05$; ** = $p < .01$; *** = $p < .001$.

6. TARTIŞMA

6.1. Önformülasyon Çalışmaları

Formülasyon, karakterizasyon ve kararlılık çalışmalarında etkin madde miktar tayini analizleri için UPLC cihazı kullanılmıştır. Rutin hidrat ile yapılan spektrofotometrik çalışmalarda (Modi vd., 2019; Murathan, Arslan, ve Erbil, 2020; Stoyanova vd., 2022) ve UV spektrometre ile yapılan spektrum taramasında Rutin hidrat'ın en yüksek pik verdiği dalga boyu olan 257 nm (Görsel 5.1) UPLC cihazının dedektör dalga boyu olarak seçilmiştir. UPLC, sağladığı arttırılmış basınç sayesinde HPLC'ye göre daha yüksek akış hızları, daha kısa kolonlar, 10 kata kadar daha az örnek ve hareketli faz hacmi, daha yüksek hassasiyet gibi özellikleri sayesinde elde edilen verinin kalitesini ve analiz hızını arttırmaktadır (Gumustas vd., 2013).

Geliştirilen analitik yöntemin ICH kılavuzlarına göre yapılan iki farklı konsantrasyon aralığındaki validasyonları incelendiğinde, her iki konsantrasyon için de determinasyon katsayısının $r^2 > 0,999$ olduğu, doğrusalılık çalışmasında geri kazanılabilirliğin ve kesinlik çalışmasında varyasyon katsayısının $\pm\%2$ sınırları içerisinde olduğu gözlenmiştir. Analiz yapılan analitlerde yer alabilecek tüm yardımcı maddeler incelenerek girişim yapmadığı gözlenmiş ve tez içerisinde yapılan tüm çalışmalar LOQ değerinin üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Rutin hidratın FT-IR spektrumları incelendiğinde; 1651 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi, 1503 cm^{-1} 'de C=C gerilmesi, 1294 cm^{-1} 'de O-H gerilmesi, 1204 cm^{-1} 'de fenil gerilmesi, 1059 cm^{-1} 'de C-O-C ve 2939 cm^{-1} 'de alkan yapısından kaynaklı ve literatürle uyumlu spesifik gerilmeler görülmektedir (Dhiman vd., 2019).

Rutin hidratın $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde literatürle uyumlu olarak 4 ile 8 ppm arasında rutin hidrata spesifik ($\sim 7\text{ Ar-H}$ / $\sim 5,1\text{ -OH}$ / $5,3\text{ -CH}$) pikler görülmektedir (Dhiman vd., 2019).

Rutin hidratın DSC termogramları incelendiğinde literatürle uyumlu olarak $145\text{-}190^\circ\text{C}$ sıcaklıklar arasında ($\sim 175^\circ\text{C}$) erime piki verdiği görülmektedir (Franco ve De Marco, 2021).

6.2. Formülasyon Çalışmaları

Formülasyonların hazırlanmasında PVA ve Eudragit® L100 olmak üzere iki farklı polimer kullanılmıştır. PVA, kolayca şekillendirilebilen bir polimer olması, çözeltilerinde yüzey gerilimini düşürme özelliği nedeniyle yüzey etkin madde ve/veya stabilizör olarak kullanılabilmesi (Jalalian, Mirkazemi, ve Alamolhoda, 2016; Scholes vd., 1999) sayesinde elektroegirmeye oldukça uygun bir polimerdir. Ayrıca Bölüm 2.4.1’de belirtildiği gibi sahip olduğu yüksek biyouyumlu, biyobozunur, biyoadeziv yapısı ve nem çekme özelliği sayesinde fazla eksüdayı ortamdan uzaklaştırma potansiyeline sahip olması PVA ile hazırlanmış nanoliflerin yara örtüsü olarak kullanılması için önemli avantajlardır.

Eudragit® L100’ün biyoparçalanmayan, biyouyumlu hidrofobik bir polimer olması aynı zamanda iyi bükülebilirlik özellikleri nanolif üretimi açısından tercih sebebi olmaktadır. Ayrıca, sahip olduğu gelişmiş mekanik özellikler ve yavaş bozunma gibi fizikokimyasal özellikleri, bu polimerin ideal bir yara örtüsü malzemesi olarak kullanılmasını sağlar (Ao vd., 2020). İnsan derisi normalde asidik bir yapıya (pH 5,5) sahiptir. Bu sayede ideal olarak pH 6 değerinin üzerinde yaşayan patojenlerin (bakteriler, mantarlar vb.) üremesi engellenir. Ancak yaralanma durumunda pH 7,4 değerine sahip olan vücut sıvıları ve alt deri dokuları sebebiyle asidik yapı bozulur. Patojenlerin kolonizasyonu artar ve buna bağlı olarak pH daha da yükselmeye başlar (Schneider vd., 2007). Eudragit® L100 normalde kolon hedefli etkin maddelerin taşınmasında kullanılan bir polimerdir (Lee vd., 2020). pH duyarlı yapısı yüksek pH’larda polimerin parçalanmasını ve dolayısıyla etkin madde salım hızını arttırmasını sağlar. Normal cilt pH’sı 5,5 iken yaralanma durumunda yara bölgesinde vücut sıvılarının ortaya çıkışı ve enflamasyon sonucu pH yükselmektedir. Yara dokusundaki pH’nın yükselme yönündeki değişiklikleri sonucu etkin madde salımını hızlandırma özelliği Eudragit® L100 polimerinin yara örtüsü formülasyonunda kullanılması açısından tercih sebebi olmuştur.

Piyasada Rutin hidrat içeren herhangi bir yara iyi edici müstahzar bulunmamaktadır. Bu nedenle elektroegirme çözeltilisine eklenecek etkin madde miktarının belirlenmesinde çeşitli literatürlerden yardım alınmıştır.

Rutin yüklü kitosan oligosakarit/polikaprolakton (PCL) nanoliflerin üretildiği bir çalışmada elektroegirme çözeltisindeki etkin madde miktarı PCL miktarının %5'i, toplam polimer miktarının ise %4,85'i olacak şekilde hesaplanmıştır (Karna ve Sahai, 2012).

Hidrojellerin hazırlandığı bir çalışmada formülasyondaki Rutin derişimi $250 \mu\text{g.g}^{-1}$ olarak belirtilmiştir. Çalışmanın ratlarla yapılan *in vivo* yara iyileşmesi bölümünde ratlar günde iki kere 0,5 g formülasyon ile tedavi edilmiştir (Almeida vd., 2012).

Bir diğer hidrojel çalışmasında ise Rutin derişimi $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen *in vivo* çalışmasında yaranın içerisi formülasyonla tamamen doldurulmuştur (Tran vd., 2011).

Pickering emülsiyonu hazırlanan bir çalışmada formülasyondaki rutin derişimi $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirtilmiştir. Çalışmanın *in vivo* kısmında eksizyonel modellenli yara iyileşmesinde ratlara günde iki kere 0,5 mL formülasyon uygulanmıştır (Asfour vd., 2017).

Yukarıda bahsedilen çalışmalar göz önüne alındığında elektroegirme çözeltilerinin içerisinde yer alacak etkin madde miktarı formülasyonda yer alan polimerin %10'u olacak şekilde hesaplanmıştır. Aynı zamanda bu oran yapılan çözünürlük çalışmalarına göre belirtilen miktardaki Rutin hidrat'ın elektro egirme çözeltilerinin içerisinde çözünebildiği bir değerdir.

Elektroegirme cihazı, nanolif üretimi için sahip olduğu avantajları (Tablo 2.1) nedeniyle en sık tercih edilen metot olmasına rağmen optimum ve standart bir prosedür ile nanolif üretebilmek için denenmesi ve kontrol altına alınması gereken birçok parametre bulundurmak gibi büyük bir dezavantaja sahiptir (Bölüm 2.4.1.1.2). Konvensiyonel kontrollü deney metotlarıyla optimum parametreleri bulmak oldukça uzun süre ve sayıda deney gerektireceği için sistem parametrelerinin belirlenmesinde Taguchi metodu kullanılmıştır.

Taguchi yöntemleri, üretilen ürünlerin kalitesini artırmak için geliştirilen istatistiksel yöntemler olarak literatüre geçmiştir. Mühendislik, biyoteknoloji, pazarlama ve reklamcılık gibi çok çeşitli alanlarda uygulanan bu yöntem sayesinde hedef ürün kalitesinin etkilendiği deneysel gürültüler tanımlanarak kalite odaklı tasarım üretime dahil edilmiştir. Bir ürünün kendisinden beklenenleri sağlayabilme kabiliyeti olarak

tanımlayabildiğimiz kaliteyi daha az varyasyonla sağlayabilmeye imkan vermesi nedeniyle bu tezde formülasyon geliştirme süreçlerinde Taguchi yönteminden faydalanılmıştır (Karna ve Sahai, 2012).

Gerçekleştirilen deneme çalışmaları ve literatür taramaları sonucunda 4 elektroeğirme parametresi (Polimer konsantrasyonu, çözücülerin kendi içindeki oranları, iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe ve iğne çapı) kaliteyi etkileyen faktörler olarak belirlenmiştir (Abbas vd., 2018; Celep ve Dincer, 2017; Horuz ve Belibağlı, 2017). Bu faktörlerden polimer konsantrasyonu ve mesafe faktörleri literatürde sıkça değerlendirilirken çözücülerin kendi içindeki oranları ve iğne çapı hakkında kısıtlı literatür değerlendirmesi bulunmaktadır. Bu nedenle bu faktörlerin optimum formülasyon üzerindeki etkilerinin tez kapsamında araştırılmasına karar verilmiştir.

Rutin hidrat'ın sudaki düşük çözünürlük dezavantajının azaltılması, eksüdanın dengelenmesi ve reepitelizasyonda hücrelerin ilerleyebileceği bir ağ yapısı oluşturulma hedefi neticesinde elde edilen nanoliflerin lif çapının düşük, dolayısıyla porozitesinin yüksek olması hedeflenmiştir. Bu nedenle Taguchi tasarımında kalite parametresi olarak nanolif çapları seçilmiştir.

Lif çap ortalamasını arttırma, etkin maddenin homojen dağılımını engelleme, mekanik özelliklerin değişkenlik göstermesine sebep olma ihtimali gibi dezavantajları nedeniyle nanolifler yara örtülerinde boncuk yapılarının var olması istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle nanoliflerde bir diğer kalite parametresi boncuk sayısı olarak belirlenmiş ve analiz edilen faktörlerin boncuk sayısına etkileri de incelenmiştir.

Taguchi analiz sonuçları incelendiğinde PVA ile hazırlanan nanoliflerin çap kalınlığı ve içerdiği boncuk sayısı için en etkili ve istatistiksel olarak anlamlı tek parametrenin PVA miktarı ($p < 0,05$) olduğu görülmektedir. PVA miktarının ne kadar düşük olursa o kadar ince lif çapları elde edildiği görülmelerine rağmen 950 mg ve altı olduğu değerlerde boncuk yapılarının oluştuğu fark edilmiştir. Nanoliflerde boncuk oluşumu istenmediği için 950 mg PVA miktarı için alt limit olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak 1000 mg ve üzerinde boncuk yapısı olmamasına rağmen boncuk içermeyen en ince lif çapına sahip nanoliflerin eldesi için çözücünün içerdiği su hacmi, mesafe ve iğne çapı Taguchi analiz sonuçlarının önerdiği en uygun seviyelerde sabit tutulup PVA miktarı değiştirilerek Tablo 5.25'teki oranlarla deneyler tekrarlanmış ve sonuçları Görsel 5.9'da

gösterilmiştir. Yapılan tüm analizlerde boncuk yapıları görünmesi nedeniyle, optimum PVA miktarı boncuk yapısı görülmeyen 1000 mg olarak belirlenmiştir.

Eudragit® L100 ile hazırlanan nanoliflerin çap kalınlığı açısından en etkili ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) tek parametrenin PVA ile hazırlananlardaki gibi polimer konsantrasyonu olduğu görülmektedir. Ancak PVA ile hazırlananlardan farklı olarak yapıda boncuk oluşmasından sorumlu ve istatistiksel olarak etkili olduğu gösterilen ($p < 0,05$) Eudragit® L100 miktarı ve çözücüdeki DMF hacmi olmak üzere iki parametrenin varlığı görülmüştür. DMF'in oda sıcaklığındaki yüzey geriliminin ($0,9442 \text{ g.cm}^{-3}$), Etanol'ün oda sıcaklığındaki yüzey gerilimine ($0,7912 \text{ g.cm}^{-3}$) göre daha düşük olması nedeniyle etanol hacmi yükseldikçe (DMF hacmi düştükçe) çözücünün yüzey gerilimi düşerek boncuk oluşmasının önleniği söylenebilir (Gonçalves vd., 2010; Haider vd., 2018; Ibrahim ve Klingner, 2020; Zhang vd., 2018). PVA'nın yüzey etkin madde özelliği sayesinde çözeltinin yüzey gerilimini düşürmesi nedeniyle PVA ile hazırlanan formülasyonlar için DMF konsantrasyonunun boncuk oluşması üzerindeki etkisinin gözlemlenemediği düşünülmektedir. Eudragit® L100 miktarının ne kadar düşük olursa o kadar ince lif çapları elde edildiği görülmeye rağmen 1300 mg ve altı olduğu değerlerde optimum DMF hacmine rağmen boncuk yapılarının oluştuğu fark edilmiştir. Buna ek olarak 1350 mg ve üzerinde boncuk yapısı olmamasına rağmen boncuk içermeyen en ince lif çapına sahip nanoliflerin eldesi için Eudragit® L100 miktarının 1300 mg ve 1350 mg arasındaki seviyeleri tekrar test edilmiştir. Çözücüdeki DMF hacminin lif kalınlığında istatistiksel olarak etkisi olmadığı ($p > 0,05$) göz önüne alınarak, boncuk sayısını azaltmaktaki en etkili değer olan hacim seviyesi ve diğer parametrelerin ise nanolif çapının en küçük olduğu seviyeleri seçilerek sabit tutulmuş ve Eudragit® L100 miktarı değiştirilerek Tablo 5.26'daki oranlarla deneyler tekrarlanmıştır. Sonuçlar Görsel 5.10'da gösterilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde PVA ile hazırlanan nanoliflerin Taguchi ile elde edilen diğer değerleri sabit tutulup polimer miktarı değiştirilerek yapılan analizlerin tümünde boncuk yapıları görülmesi nedeniyle, optimum formülasyondaki optimum PVA miktarı boncuk yapısı görülmeyen 1000 mg olarak belirlenmiştir.

Eudragit® L100 ile hazırlanan nanoliflerin Taguchi ile elde edilen diğer değerleri sabit tutulup polimer miktarı değiştirilerek yapılan analizlerinde ise EE1 ve EE2 isimli formülasyonlarda herhangi bir boncuk yapısı görülmemesi ve EE2'de daha düşük polimer

oranı kullanılması nedeniyle optimum formülasyondaki Eudragit® L100 miktarı 1375 mg olarak belirlenmiştir.

Yapılan tüm formülasyon çalışmalarının sonucunda boncuksuz en ince lif yapısının elde edildiği Tablo 5.30 ve 31’de görülen elektroegirme çözeltileri kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır.

6.3. Karakterizasyon Çalışmaları

Eudragit® L100 polimerinin opak beyaz yapısı nedeniyle F-EUD formülasyonu beyaz görünüme sahiptir. F-EUD-Rutin formülasyonunun rengi Rutin hidrat etkin maddesinin sahip olduğu sarı renge rağmen Eudragit® L100 matrisinde dağılması sebebiyle opak beyaza yakın sarımtırak bir örtü görünümüne sahiptir. PVA polimerinin şeffaf bir polimer olması nedeniyle F-PVA-Rutin formülasyonu Rutin hidrat’ın rengini alarak sarı bir örtü görüntüsü sergilemektedir. Etkin maddesiz olarak hazırlanan F-PVA örtüsünün ise polimerin şeffaf olmasına rağmen nanoliflerdeki ışık kırınımı nedeniyle beyaz bir renk aldığı düşünülmektedir.

Elde edilen formülasyonların her ikisi de pürüzsüz bir dokuya sahiptir. Gözle ve elle herhangi bir poröz yapıya sahip olmadığı anlaşılmıştır. Plastik poşet görünümünde, kolayca bükülebilir ve esnetilebilir bir geometriye sahiptir. Çıplak elle kısa süreli tutulduğunda herhangi bir yapışma gerçekleşmemekte ancak uzun süre tutulması durumunda yapısındaki porlara toplanan sebum nedeniyle cilde adezyon göstermektedir.

Eudragit® L100 ile hazırlanan nanolifler kopartıldığında daha lifli bir yapı halinde ayrılırken PVA ile hazırlanan nanolifler kopartıldığında makas ile kesilmiş bir görüntü oluşmaktadır.

SEM aracılığıyla yapılan morfolojik incelemede her iki formülasyonda da herhangi bir boncuk yapısının oluşmadığı gözlenmiştir. Formülasyonların lif çaplarının F-PVA-Rutin için ortalama 258,371 nm, F-EUD-Rutin için ise 125,115 nm olduğu ve hiçbir lifin mikron düzeyine çıkmadığı görülmektedir.

Eudragit® L100 ile kolon hedefli nanolif ilaç taşıyıcı sistem geliştirilen bir çalışmada ortalama lif çapının 620 ± 190 nm bulunduğu görülmüştür. Çalışmada nanoliflerin hazırlanmasında %20 Eudragit® L100 çözeltisi kullanılmıştır. Bu durum tez

çalışmamızda elde ettiğimiz polimer konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak lif çapının arttığı sonucuyla paralellik göstermektedir (Coban vd., 2021).

PVA ile hazırlanan bir nanolif çalışmasında PVA'nın su içerisindeki %10'luk çözeltisi elektroegirme sıvısı olarak kullanılmış ve ortalama lif çapının 250 ± 10 nm olduğu görülmüştür (Hulupi ve Haryadi, 2019). Bu durum yine tez çalışmamızın polimer konsantrasyonundaki azalışa bağlı olarak lif çapının azalmasına bir örnek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Her iki formülasyonun da düzgün silindirik şekilli lif yapılarına sahip olduğu görülmektedir. Bunun yanında her iki formülasyondaki liflerin üzerinde çatlaklar bulunduğu ancak bu çatlakların sıklığının PVA polimeri ile hazırlanan nanoliflerde Eudragit® L100 polimeri ile hazırlananlara göre daha sık olduğu görülmüştür. Bu durumun mekanik dayanıklılığı azaltacağı düşünülse de tekstür analiz sonuçlarına göre PVA ile hazırlanan nanoliflerin Eudragit® L100 polimeri ile hazırlananlara göre daha yüksek dayanıklılığa sahip olduğu görülmüştür.

Eudragit L100 ile gerçekleştirilen bir çalışmada elde edilen nanoliflerin yatay kesitlerinin dairesel değil yassı olduğu gözlemlenmiş ve yazarlar tarafından bu şeklin nanolif içerisinde kalan çözücülerin buharlaşması sonucu oluştuğu belirtilmiştir. Çalışmada çözücü olarak Dimetilasetamit:Etanol karışımı 30:70 kullanılmıştır (Yu vd., 2014). Tez çalışmamızda böyle bir sonuca rastlanmamış olmasına rağmen dimetilasetamitin kaynama noktasının DMF'ye göre yüksek olmasının böyle bir sonucun ortaya çıkmasına sebep olabileceği düşünülmektedir.

Elektroegirme işlemleri sırasında formülasyonda yer alan etkin maddenin kararlılığının değerlendirilmesi için NMR sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. NMR spektrumları karşılaştırıldığında F-PVA-Rutin ve F-EUD-Rutin formülasyonlarında yer alan polimerlerin spesifik NMR piklerinin yanında Bölüm 5.1.1.5'te belirtilen Rutin hidrat'ın spesifik pikleri de görülmektedir. Bu sonuç formülasyon hazırlama basamaklarının Rutin hidrat'ın kimyasal yapısı üzerinde değişiklik oluşturmadığı göstermektedir.

Etkin maddenin nanoliflerin oluşturulduğu polimerlerin içerisine hapsedilebilmesinin değerlendirilmesinde FTIR spektrumları kullanılmıştır. Spektrumlar incelendiğinde Rutin hidrat'ın Bölüm 5.1.1.4'te belirtilen spesifik gerilmelerinin fiziksel

karışım spektrumlarında görülmesine rağmen, F-PVA-Rutin ve F-EUD-Rutin formülasyonlarının FTIR spektrumlarında görülmemesi, her iki formülasyonda da Rutin hidrat'ın polimerler tarafından hapsedildiğini göstermektedir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2018).

Etkin maddenin nanoliflerin oluşturulduğu polimerlerin içerisine hapsedilebilmesinin değerlendirilmesinde incelenen bir diğer karakter ise DSC termogramlarıdır. Termogramlar incelendiğinde Rutin hidrat'ın Bölüm 5.3.4'te görülen erime pikinin fiziksel karışım spektrumlarında da görülmesine rağmen, F-PVA-Rutin ve F-EUD-Rutin formülasyonlarının FTIR spektrumlarında görülmemesi, her iki formülasyonda da Rutin hidrat'ın amorf forma geçtiğini dolayısıyla polimerler tarafından hapsedildiğini göstermektedir.

Etkin madde miktar tayini ile birlikte etkin maddenin homojen dağılıp dağılmadığı da incelenmiştir. Elde edilen nanoliflerden rasgele seçilen 5 cm² alanın köşelerinden ve tam ortasından 1 cm² olacak şekilde 5 adet nanolif parçası kesilerek etkin madde miktar tayini yapılmış ve hiçbir sonuçta %95 güven aralığına göre istatistiksel farklılık bulunamamıştır (p>0,05).

Nanolif elektroğirme işlemi sonrasında elde edilen nanolifin çalışmalarında elektroğirme çözeltilerine 1:10 a/a (Rutin hidrat – Polimer) oranında eklenen etkin maddenin F-PVA-Rutin formülasyonunda 0,923:10 a/a (Rutin hidrat – EUD) oranında, F-PVA-Rutin formülasyonunda ise 0,921:10 a/a (Rutin hidrat – PVA) oranında geri kazanıldığı görülmüştür. Aradaki farkın elektroğirme sırasında kullanılan şırınga ve borular gibi kompartmanlara adsorbsiyonu veya bu kompartmanlar tarafından absorbe edilmesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Antibakteriyel özellikli nanolif formülasyonların geliştirildiği bir çalışmada Rutin'in saf ve nanolif içerisindeki antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiş ve tezde elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak antioksidan özelliklerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (Zhou vd., 2021). Bunun yanında PVA ile hazırlanan nanolif formülasyonlarında DPPH süpürücü etkinliğin saf etkin maddeye göre arttığı görülmektedir. Bu artışın etkin maddesiz PVA nanoliflerinin gösterdiği antioksidan etkinliğe bağlı olduğu düşünülmektedir.

Yara tedavisi için geliştirilen formülasyonların etkin madde salım profilinin incelenmesinde Franz difüzyon hücreleri sıklıkla kullanılan cihazlardır (Ramadass vd., 2019; Thakur vd., 2008). Tekrarlanabilir sonuçlar vermeleri, transdermal ve deri üzerine lokal uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılmaları Franz difüzyon hücrelerinin salım çalışmasında kullanılması için seçilmesinde etkili olmuştur.

Etkin madde salım çalışmasında yara üzerine uygulanan bir formülasyon olması nedeniyle reseptör kompartman PBS (pH 7,4) çözeltisi ile oluşturulmuştur. Formülasyonun uygulanacağı yara modelinde sıcaklık deri kaybı ve inflamasyon yanıt dolayısıyla vücut sıcaklığı olan 37°C olarak belirlenmiştir. Donör kompartman ile reseptör kompartman arasına 0,45 µm por çaplı diyaliz membran yerleştirilmiştir (İlbasmis-Tamer vd., 2022).

Salım çalışması başlatılmadan önce diyaliz membranın şartlanması için deney ortamında 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süreçte reseptör kompartmanda yer alan PBS ile doyurulmuş ve sıcaklığı deney sıcaklığı olan 37°C'ye getirilmiştir. Diyaliz membranın PBS ile doyurulmuş olması nedeniyle, iç haznenin yatay alanı boyutunda kesilen nanolifler membran üzerine bırakıldığında ıslanmış ve böylece deney süresince kaymadan kalması sağlanmıştır. Nanoliflerin ıslanması için ekstra bir çözücü eklenmesine ihtiyaç duyulmamıştır.

Etkin madde salım çalışmasının sonuçları incelendiğinde etkin maddenin formülasyonlardan salımının saf etkin maddeye göre uzatıldığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar matematiksel modellerle değerlendirildiğinde, saf Rutin hidrat Hixson-Crowell'e uygun ($r^2_{\text{(Rutin Hidrat)}} = 0,9968$) salım gösterirken; formülasyonlardan etkin madde salımının 1. derece salım kinetiğine yüksek derece korelasyon ($r^2_{\text{(F-PVA-Rutin)}} = 0,9955$; $r^2_{\text{(F-PVA-Rutin)}} = 0,9873$) gösterdiği keşfedilmiştir. Tez kapsamında klinik bir farmakokinetik çalışması gerçekleştirilmediği için kesin olarak belirtilememekle birlikte elde edilen nanoliflerin 1. derece salım kinetiğine uygun olacak şekilde modifiye salım sağlama potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Formülasyonların 1. derece salım kinetiğine uygulugu, salım hızının etkin madde konsantrasyonundan etkilendiğini göstermektedir. Bu nedenle salım çalışmasının başlarında *Burst Effect*'e benzer bir hızla başlayan etkin madde salımı ilerleyen dakikalarda yavaşlamıştır. Rutin hidrat'ın nanolif polimerinin içerisinde homojen şekilde

dağıldığı göz önünde bulundurulduğunda salım kinetiğinin bu profilde gerçekleşmiş olması beklenen bir sonuç olmuştur (Paarakh vd., 2018).

Formülasyonların uzatılmış modifiye salım göstermesi, tedavi süresince etkin maddenin istikrarlı bir şekilde salınması sayesinde tedavinin başarısını arttırmanın yanında olası yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır.

Formülasyonlarda kullanılan çözücüler olan metanol ve saf su ICH sınıflandırma sistemine göre *Class 3*, DMF ise *Sınıf 2* çözücülerdir. DMF için limit 8,8mg/gün olarak belirlenmiştir. Formülasyonların 1 cm² alan için kütlesi yaklaşık 1,1 mg olduğu ve elektroğirme işlemi sırasında çözücünün büyük bir kısmının buharlaştığı göz önünde bulundurulduğunda yara örtüsü olarak uygulanacak alan çok daha büyük olsa bile belirtilen limit değerinin altında kalacağı görülmektedir (ICH Guideline, 2022).

Formülasyonda kullanılan maddeler ve benzer çalışmalar incelenerek elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında sitotoksisite çalışması yapılmasına gerek olmadığı görülmüştür. Ilbasmis Tamer vd. (2022), tarafından yapılan bir çalışmada yer alan MTT test sonuçları incelendiğinde Rutin içeren nanolifler ile fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmalarında Rutin'in %0,25 ve %0,5 konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre hücre canlılığında herhangi sitotoksik etkinliğinin olmadığı konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir (Ilbasmis-Tamer vd., 2022).

Eudragit® L100 ve PVA polimerleri ile Ketorolac Trometamin içeren nanopartiküller geliştirilmiştir. Geliştirilen nanopartiküller ile fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan MTT testinde konsantrasyona bağlı hücre canlılığında (125 µg/ml⁻¹ ve 250 µg/ml⁻¹ konsantrasyonlarında) kontrol grubuna göre herhangi bir azalma görülmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde polimerlerin güvenle kullanılabileceği anlaşılmıştır (Mohammadi vd., 2019).

6.4. Kararlılık Çalışmaları

Kararlılık çalışmaları ICH tarafından önerilen sıcaklık ve nem koşulları altında, kararlılık açısından öngörü oluşturma amacıyla 3 aylık bir sürede gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonlar 30., 60., ve 90. günlerde morfolojik olarak incelenmiştir. F-PVA ve F-EUD formülasyonları opak beyaz renkli, pürüzsüz ve homojen görüntüsünü; F-

EUD-Rutin formülasyonu opak sarımtırak, pürüzsüz, homojen; F-PVA-Rutin formülasyonu ise opak sarı renkli, pürüzsüz, homojen görüntüsünü sürdürmüştür.

FTIR, NMR spektrumlarında ve DSC termogramları karakterizasyon sonuçlarıyla karşılaştırıldığında pik yapı ve yerlerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Kararlılık çalışmaları süresince 30,60 ve 90. günlerde gerçekleştirilen etkin madde miktar tayini sonuçları ve 90. günde gerçekleştirilen lif çapı analizlerinde 0. güne göre istatistiksel açıdan bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). Formülasyonların kararlılık çalışması gerçekleştirilen 90 günlük süre boyunca kararlı oldukları görülmüştür.

6.5. *In Vivo* Etkinlik Çalışması

In vivo etkinlik çalışmasında kullanılan eksizyonel yara modeli yara iyileşmesinin *in vivo* olarak değerlendirilmesin sıkça kullanılan bir modeldir. Bu yöntemde deney hayvanının derisinde açık bir yara yaratılmakta ve bu yaranın zamana bağlı kapanma miktarı üzerinden karşılaştırma/değerlendirme yapılmaktadır. Özellikle yara iyileşmesinin ikinci fazında karşımıza çıkan granülasyon dokusunun oluşumu, vasküler ağın restore edilmesi, keratinositler aracılığıyla epitelizasyonun yeniden sağlanması, fibroblastlar ve miyofibroblastların kolajen formuna dönüşmesi gibi olaylar bu model ile değerlendirilebilir (Baktır, 2019).

In vivo etkinlik çalışmasının 3. gününde etkin maddesiz F-PVA formülasyonu ($p<0,05$) ve etkin madde içeren F-PVA-Rutin ($p<0,0001$) ve F-EUD-Rutin ($p<0,0001$) formülasyonları yara alanının küçülmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı etki göstermiştir.

Yara iyileşmesinin inflamasyon fazında etkin maddeli formülasyonların istatistiksel olarak yüksek anlamlılıkta fark ortaya çıkarması Rutin hidrat'ın sahip olduğu antiinflamatuvar etki sebebiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (Yoo vd., 2014). Histoloji çalışmalarında elde edilen sonuçlar incelendiğinde 3. günde nötrofil infiltrasyonunda özellikle F-EUD-Rutin nanolifinin istatistiksel açıdan yüksek anlamlılık ortaya koyması da bu düşüncüyü desteklemektedir.

Çalışmanın 7. gün verileri değerlendirildiğinde ise tüm gruplar kontrol grubuna göre yara alanının daralması açısından anlamlı etki göstermiştir. Etkin madde içeren formülasyonlar (Pozitif kontrol, F-PVA, F-PVA-Rutin, F-EUD-Rutin için $p<0,0001$; F-

EUD için $p<0,01$) etkin maddesiz formülasyonlara göre istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar vermiştir. Ayrıca F-PVA-Rutin formülasyonu, etkin maddesiz F-PVA ($p<0,01$) ve pozitif kontrole ($p<0,05$) göre, F-EUD-Rutin formülasyonu ise etkin maddesiz F-EUD formülasyonuna ($p<0,05$) göre anlamlı etki göstermiştir. Yara iyileşmesinin bu evresinde nötrofil infiltrasyonu devam ederken, granülasyon doku oluşumunun ve yeni damar oluşumlarının başladığı bilinmektedir.

Histolojik değerlendirme sonucu %95 güven aralığında anlamlı bir fark görülmemesine rağmen granülasyon doku oluşumu açısından etkin maddesiz ve etkin maddeli formülasyonların ortalamalarının hem kontrol hem de pozitif kontrol gruba göre daha üstün oldukları görülmektedir. İn vivo deneylerde sınırlı örneklem büyüklüğüne sahip olunması standart sapmayı arttırmaktadır. Standart sapmanın yüksek olması sebebiyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemesine rağmen, elde edilen gözlemsel ve matematiksel sonuçlar daha büyük örneklemle çalışılması durumunda istatistiksel anlamlılık görülebileceğini desteklemektedir.

Granülasyon dokusunun oluşumunda Rutin hidrat'ın antiinflamatuvar özelliklerinin etkisi görülmektedir. Buna ek olarak etkin maddesiz formülasyonların ortalamasının hem kontrol hem de pozitif kontrol grubuna göre daha yüksek olması nanolif yapısının granülasyon dokusu için fibroblast ekstraselüler matriksine ek bir iskelet destek görevi üstlendiğini işaret etmektedir.

Yeniden damarlanma (anjyogenez) açısından değerlendirildiğinde, Rutin'in anjyogenez etmenlerinden olan VEGF proteininin ekspresyonunu azalttığı bilinmesine rağmen (L.Y. Chen vd., 2020) F-PVA-Rutin ve özellikle F-EUD-Rutin formülasyonlarının anjyogenez üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı farklar yarattığı görülmüştür. Bu durumun Rutin hidrat'ın ve nanolif yapısının granülasyon doku oluşumu ve kolajen sentezine olan pozitif etkisi sayesinde granülasyon dokusunun hızla oluşması ve damar epitellerinin ilerleyebileceği iskeletler yaratması ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın 10. gün verilerinde ise pozitif kontrol grubu kontrol grubuna göre yara alanının küçülmesi açısından anlamlı etki göstermezken etkin maddeli formülasyonlar ve etkin maddesiz F-PVA formülasyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($p<0,05$).

Çalışmanın 10. gününde kolajen dokusu açısından kontrol ve pozitif kontrol grupları arasında herhangi bir anlamlılık görülmemesine rağmen etkin maddeli formülasyonların istatistiksel olarak anlamlı şekilde iyileştiği görülmüştür. Rutin hidratin kolajen sentezine pozitif katkı yaptığı hatta karşılaştırmalı çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanıldığı bilinmektedir (Anagnos vd., 2018).

Çalışmanın son günü olan 14. günde iste yaralar neredeyse tamamen iyileştiği için istatistiksel olarak bir anlamlılık ortaya çıkmamıştır. Ancak görsel olarak değerlendirildiğinde, tüm grupların kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir.

Çalışmanın son gününde yapılan histolojik değerlendirmelerde kolajen doku disorganizasyonu, açısından 10. günle paralel sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Anjiyogenez açısından değerlendirildiğinde etkin maddesiz grupların anjiyogenez üzerinde bir etkisi bulunmazken F-PVA-Rutin grubunun istatistiksel olarak anlamlı etkinliği görülmüştür. Pozitif kontrol ve F-EUD-Rutin gruplarının da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasına rağmen ortalamalarının diğer gruplara göre daha iyi olduğu fark edilmiştir.

Çalışmada Rutin hidrat'ın yara iyileşme aşamalarının iyi yönde ilerlemesine baskın bir yardımı olduğu görülmektedir. Özellikle sahip olduğu antiinflamatuvar özellikler sayesinde nötrofil infiltrasyonunda, granülasyon doku oluşumunda ve kolajen sentezinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Nanolif taşıyıcı sistemlerin sahip olduğu iskelet yapısı sayesinde özellikle anjiyogenez ve granülasyon doku oluşumunda pozitif etkilerinin olduğu ortaya koyulmuştur.

7. SONUÇ

Rutin hidrat içeren iki farklı yara örtüsü formülasyonu geliştirilmiştir. Geliştirilen yara örtüleri, etkin madde ve kullanılan polimerden bağımsız olarak yara tedavi edici özelliklere sahip olduğu bilinen nanolif taşıyıcı sistemler şeklinde hazırlanmıştır.

Nanoliflerin eldesinde kalite parametresi olarak düşük lif çapı ve boncuksuz yapı tercih edilmiştir. Bu hedef doğrultusunda elektroegirme için gerekli optimum parametrelerin seçimi için Taguchi yöntemi kullanılmıştır.

Yapılan karakterizasyon çalışmalarında etkin maddenin polimer matrisine başarıyla yüklendiği ve işlemler sırasında kimyasal yapısını koruduğu nano boyuta sahip liflerle eğrilmiş yara örtüleri elde edildiği görülmüştür.

Kararlılık süresi boyunca, formülasyonların, karakterizasyonunda herhangi bir değişiklik olmadan kararlı kaldığı görülmüştür.

Gerçekleştirilen *in vivo* etkinlik testlerinde optimize edilen her iki formülasyonun da kontrol ve pozitif kontrol gruplarına göre avantajlı bir yara iyileştirme süreci ortaya koyduğu görülmüştür.

İlerleyen çalışmalarda formülasyonlar için sterilizasyon yöntemleri geliştirilmesi, elde edilen taşıyıcı sistemler ile farklı etkin maddelerin denenmesi ve daha uzun süre salım sağlayacak polimerlerle çalışmaların tekrarlanması önerilmektedir.

Tezden çalışması sonucunda edilen taşıyıcı sistemler için patent başvurusu yapılması çalışmanın korunması açısından değerlidir.

KAYNAKÇA

- Abazari, M., Ghaffari, A., Rashidzadeh, H., Badeleh, S. M., Maleki, Y. (2022). A systematic review on classification, identification, and healing process of burn wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 21(1), 18-30.
- Abbas, J. A., Said, I. A., Mohamed, M. A., Yasin, S. A., Ali, Z. A., Ahmed, I. H. (2018). Electrospinning of polyethylene terephthalate (PET) nanofibers: Optimization study using taguchi design of experiment. *IOP conference series: materials science and engineering*, 454, 1-14.
- Abdo, J. M., Sopko, N. A., Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*, 28, 1-10.
- Akarsu, S. and Özbağcıvan, Ö., (2016). Deri Anatomisi. Y. Yazan (Ed.), *Dermakozmetik Kozmesötik Madde ve Ürünler içinde* (s. 15-25). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Almeida, J. S., Benvegnú, D. M., Boufleur, N., Reckziegel, P., Barcelos, R. C. S., Coradini, K., de Carvalho, L.M., Beck, R. C. R. (2012). Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. *Drug development and industrial pharmacy*, 38(7), 792-799.
- Ambekar, R. S. and Kandasubramanian, B. (2019). Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *European Polymer Journal*, 117, 304-336.
- Anagnos, D., Trivedi, M. K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Mondal, S. C., Jana, S. (2018). Influence of biofield treated vitamin D3 on proliferation, differentiation, and maturation of bone-related parameters in MG-63 cell-line. *International Journal of Biomedical Engineering and Clinical Science*, 1(4), 6-14.
- Ao, F., Shen, W., Ge, X., Wang, L., Ning, Y., Ren, H., Guodong, F., Huang, M. (2020). Effects of the crystallinity on quercetin loaded the Eudragit L-100 electrospun nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 195, 1-8.
- Arda, O., Göksüğü, N. and Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 32(1), 3-13.

- Asfour, M. H., Elmotasem, H., Mostafa, D. M., Salama, A. A. A. (2017). Chitosan based Pickering emulsion as a promising approach for topical application of rutin in a solubilized form intended for wound healing: in vitro and in vivo study. *International journal of pharmaceutics*, 534(1-2), 325-338.
- Baktır, G. (2019). Wound repair and experimental wound models. *Experimed*, 9(3), 130-137.
- Biggs, L. C., Kim, C. S., Miroshnikova, Y. A., Wickström, S. A. (2020). Mechanical forces in the skin: roles in tissue architecture, stability, and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(2), 284-290.
- Bombin, A. D. J., Dunne, N. J., McCarthy, H. O. (2020). Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing applications. *Materials Science and Engineering: C*, 114, 1-16.
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., Lamponi, S., Magnani, A. (2018). Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry*, 233, 55-63.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y. And Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143-155.
- Cañedo-Dorantes, L. and Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, 2019, 1-15.
- Celep, G. K. and Dincer, K. (2017). Optimization of parameters for electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers by the Taguchi method. *International Polymer Processing*, 32(4), 508-514.
- Chen, K., Hu, H., Zeng, Y., Pan, H., Wang, S., Zhang, Y., Shi, L., Tan, Gç, Weisan, P., Liu, H. (2022). Recent advances in electrospun nanofibers for wound dressing. *European Polymer Journal*, 178, 1-14.
- Chen, L.Y., Huang, C.N., Liao, C.K., Chang, H.M., Kuan, Y.H., Tseng, T.J., Yen, K., Yang, K., Lin, H.C. (2020). Effects of rutin on wound healing in hyperglycemic rats. *Antioxidants*, 9(11), 1-13.

- Coban, O., Aytac, Z., Yildiz, Z. I., Uyar, T. (2021). Colon targeted delivery of niclosamide from β -cyclodextrin inclusion complex incorporated electrospun Eudragit® L100 nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 1-7.
- Çalık Kocatürk, D., Uysal, A., Oltulu, F., Özdil, B. 2016. Deri ve deri eklerinin embriyolojik gelişimi. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1(1), 1-10.
- Dai, C., Shih, S. and Khachemoune, A. (2020). Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(6), 639-648.
- Desnita, R. and Luliana, S. (2021). Optimization of PVA Concentration and Receiver Phase Volume in the Preparation of Rutin Microparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(10), 615-616.
- Dhiman, A., Singh, D., Fatima, K., Zia, G. (2019). Development of rutin ethosomes for enhanced skin permeation. *Int. J. Tradit. Med. Appl.*, 1, 4-10.
- Egert, M. and Simmering, R. (2016). The microbiota of the human skin. A. Schwietz (Ed.), *Microbiota of the Human Body* içinde (s. 61-81). İsviçre: Springer.
- Enoch, S. and Leaper, D. J. (2008). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 26(2), 31-37.
- Falco, M. D., Pisano, M. M. and Luca, A. De. (2014). Embryology and Anatomy of the Skin. A. Baldi, P. Pasquali and E.P. Spugnini (Eds.), *Skin Cancer* içinde (s. 1-15). İsviçre: Springer.
- Feng, X., Li, J., Zhang, X., Liu, T., Ding, J., Chen, X. (2019). Electrospun polymer micro/nanofibers as pharmaceutical repositories for healthcare. *Journal of Controlled Release*, 302, 19-41.
- Fenner, J. and Clark, R. A. F. (2016). Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin. M.Z. Albanna and J.H. Holmes (Eds.), *Skin tissue engineering and regenerative medicine* içinde (s. 1-15). ABD: Elsevier.
- Franco, P. and De Marco, I. (2021). Formation of rutin- β -cyclodextrin inclusion complexes by supercritical antisolvent precipitation. *Polymers*, 13(2), 1-15.

- Franz, M. G., Robson, M. C., Steed, D. L., Barbul, A., Brem, H., Cooper, D. M., Leaper, D., Milner, S.M., Payne, W.G., Wachtel, T.L., Wachtel, T. L., Wiersema Bryant, L., (2008). Guidelines to aid healing of acute wounds by decreasing impediments of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 723-748.
- Frutos, M. J., Rincón-Frutos, L. and Valero-Cases, E. (2019). Rutin. S.M. Nabavi and A.S. Silva (Eds.), *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements* içinde (s. 111-117). USA: Elsevier.
- Ganeshpurkar, A. and Saluja, A. K. (2017). The pharmacological potential of rutin. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(2), 149-164.
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. M.R. Hamblin, P. Avci and T.W. Prow (Eds.), *Nanoscience in Dermatology* içinde (s. 1-14). USA: Elsevier.
- Gonçalves, F., Trindade, A. R., Costa, C., Bernardo, J. C. S., Johnson, I., Fonseca, I. M. A., Ferreira, A. G. M. (2010). PVT, viscosity, and surface tension of ethanol: New measurements and literature data evaluation. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 42(8), 1039-1049.
- Gonzalez, A. C. de O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A., Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91, 614-620.
- Gullon, B., Lú-Chau, T.A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in food science & technology*, 67, 220-235.
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Ozkan, S.A. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76, 1365-1427.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321.

- Haider, A., Haider, S. and Kang, I.K. (2018). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1165-1188.
- Harries, R. L., Bosanquet, D. C. And Harding, K. G. (2016). Wound bed preparation: TIME for an update. *International wound journal*, 13(S3), 8-14.
- He, Z., Rault, F., Lewandowski, M., Mohsenzadeh, E., Salaün, F. (2021). Electrospun PVDF nanofibers for piezoelectric applications: A review of the influence of electrospinning parameters on the β phase and crystallinity enhancement. *Polymers*, 13(2), 174.
- Horuz, T.İ. and Belibağlı, K.B. (2017). Production of electrospun gelatin nanofibers: an optimization study by using Taguchi's methodology. *Materials Research Express*, 4(1), 1-9.
- Hulupi, M. and Haryadi, H. (2019). Synthesis and characterization of electrospinning PVA nanofiber-crosslinked by glutaraldehyde. *Materials Today: Proceedings*, 13, 199-204.
- Ibrahim, H.M. and Klingner, A. 2020. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing*, 90, 1-18.
- Ilbasmis-Tamer, S., Saral-Acarca, E. S., Tort, S., Yücel, Ç., Tamer, U., Acartürk, F. (2022). Fabrication and characterization of starch-copper nanoparticles/rutin nanofiber hybrid scaffold. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 72, 1-9.
- Illangakoon, U. E., Yu, D.G., Ahmad, B. S., Chatterton, N. P., Williams, G.R. (2015). 5-Fluorouracil loaded Eudragit fibers prepared by electrospinning. *International journal of pharmaceutics*, 495(2), 895-902.
- ICH Guideline. 2003. Stability testing of new drug substances and products. Erişim tarihi: 05.05.2023 <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf>
- ICH Guideline. 2005. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology. Erişim tarihi: 05.05.2023 www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

- ICH Guideline. 2022. ICH guideline on impurities: guideline for residual solvents .
Erişim tarihi: 16.05.2023, https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-q3c-r8-impurities-guideline-residual-solvents-step-5_en.pdf
- Jalalian, M., Mirkazemi, S. M. and Alamolhoda, S. (2016). The effect of poly vinyl alcohol (PVA) surfactant on phase formation and magnetic properties of hydrothermally synthesized CoFe₂O₄ nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 419, 363-367.
- Jannesari, M., Varshosaz, J., Morshed, M., Zamani, M. (2011). Composite poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 993-1003.
- Jatoi, A.W., Ogasawara, H., Kim, I.S., Ni, Q.Q. (2019). Polyvinyl alcohol nanofiber based three phase wound dressings for sustained wound healing applications. *Materials letters*, 241, 168-171.
- Kajdič, S., Planinšek, O., Gašperlin, M., Kocbek, P. (2019). Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 672-681.
- Karna, S. K. and Sahai, R. (2012). An overview on Taguchi method. *International journal of engineering and mathematical sciences*, 1(1), 1-7.
- Keshvardoostchokami, M., Majidi, S. S., Huo, P., Ramachandran, R., Chen, M., Liu, B. (2020). Electrospun nanofibers of natural and synthetic polymers as artificial extracellular matrix for tissue engineering. *Nanomaterials*, 11(1), 21.
- Khanlou, H. M., Ang, B. C., Talebian, S., Afifi, A. M., Andriyana, A. (2015). Electrospinning of polymethyl methacrylate nanofibers: optimization of processing parameters using the Taguchi design of experiments. *Textile Research Journal*, 85(4), 356-368.
- Kurtoğlu, A. H. and Karataş, A. (2009). Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: modern yara örtüleri. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 38(3), 211-232.

- Lee, S.H., Bajracharya, R., Min, J.Y., Han, J.W., Park, B. J., Han, H.K. (2020). Strategic approaches for colon targeted drug delivery: an overview of recent advancements. *Pharmaceutics*, 12(1), 68.
- Leis, K., Mazur, E., Jabłońska, M., Kolan, M., Gałązka, P. (2019). Endocrine systems of the skin. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 36(5), 519-523.
- Li, B. and Yang, X. (2020). Rutin-loaded cellulose acetate/poly (ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 1-8.
- Lipol, L. S. and Rahman, M. M. (2016). Electrospinning and electrospun nanofibers. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 6(02), 45.
- Liu, X., Xu, H., Zhang, M., Yu, D.G. (2021). Electrospun medicated nanofibers for wound healing. *Membranes*, 11(10), 22.
- Majd, S. A., Khorasgani, M. R., Moshtaghian, S. J., Talebi, A., Khezri, M. (2016). Application of Chitosan/PVA Nano fiber as a potential wound dressing for streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of biological macromolecules*, 92, 1162-1168.
- McKnight, G., Shah, J. and Hargest, R. (2022). Physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 40(1), 8-12.
- Meena, A., Mali, H. S., Patnaik, A., Kumar, S. R. (2018). Investigation of wear characteristics of dental composites filled with nanohydroxyapatite and mineral trioxide aggregate. S. Thomas, P. Balakrishnan and M.S. Sreekala (Eds.), *Fundamental Biomaterials: Polymers içinde* (s. 287-305). USA: Elsevier.
- Modi, F. D., Bhavsar, S. K., Patel, J. H., Varia, R. D., Modi, L. C., Modi, M., Kale, N. (2019). Pharmacokinetic profile of rutin after intramuscular administration in rats favours its in vivo anti-inflammatory activity in carrageenan-induced rodent model of inflammation. *Annals of Phytomedicine*, 8(1), 185-192.
- Mohamed, S. A. and Hargest, R. (2022). Surgical anatomy of the skin. *Surgery (Oxford)*, 40(1), 1-7.

- Mohammadi, G., Mirzaeei, S., Taghe, S., Mohammadi, P. (2019). Preparation and evaluation of Eudragit® L100 nanoparticles loaded impregnated with KT tromethamine loaded PVA-HEC insertions for ophthalmic drug delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(4), 593-600.
- Montagna, W., Kligman, A. M. and Carlisle, K. S. (2012). *Atlas of normal human skin*. New York: Springer.
- Moore, Z., Dowsett, C., Smith, G., Atkin, L., Bain, M., Lahmann, N. A., Schultz, G.S., Swanson, T., Vowden, P., Weir, D. Zmuda, A., Jaimes, H., (2019). TIME CDST: an updated tool to address the current challenges in wound care. *Journal of wound care*, 28(3), 154-161.
- Morie, A., Garg, T., Goyal, A. K., Rath, G. (2016). Nanofibers as novel drug carrier—an overview. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 135-143.
- Murathan, Z. T., Arslan, M. and Erbil, N. (2020). Analyzing biological properties of some plum genotypes grown in Turkey. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup3), 1729-1740.
- Negahdari, R., Bohlouli, S., Sharifi, S., Maleki Dizaj, S., Rahbar Saadat, Y., Khezri, K., Jafari, S., Ahmadian, E., Jahandizi, N.G., Raeesi, S. (2021). Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research*, 35(4), 1719-1738.
- Öztaş, P. (2021). Yara İyileşmesi, Bakımı ve Tedavisi. *Medical Journal of Ankara Training and Research Hospital*, 54(2), 341-351.
- Paarakh, M. P., Jose, P. A., Setty, C. M., Peterchristoper, G. V. (2018). Release kinetics—concepts and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8(1), 12-20.
- Pinto, D., Lameirão, F., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F., Costa, P. (2021). Characterization and stability of a formulation containing antioxidants-enriched *Castanea sativa* shells extract. *Cosmetics*, 8(2), 1-18.
- Pivec, T., Kargl, R., Maver, U., Bračič, M., Elschner, T., Žagar, E., Gradišnik, L., Stana Kleinschek, K. 2019. Chemical structure—Antioxidant activity relationship of water—

- based enzymatic polymerized rutin and its wound healing potential. *Polymers*, 11(10), 1-21.
- Ramadass, S. K., Nazir, L. S., Thangam, R., Perumal, R. K., Manjubala, I., Madhan, B., Seetharaman, S. (2019). Type I collagen peptides and nitric oxide releasing electrospun silk fibroin scaffold: A multifunctional approach for the treatment of ischemic chronic wounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 636-643.
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A. (2021). Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11(5), 1-25.
- Reinke, J.M. and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European surgical research*, 49(1), 35-43.
- Rittie, L. and Fisher, G.J. (2015). Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 5(1), 1-14.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C.A., Gurtner, G.C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706.
- Rousso, J.J., Bassiri-Tehrani, M. (2015). Skin Anatomy and Physiology. R.T. Sataloff (Ed.), *Sataloff's Comprehensive Textbook of Otolaryngology: Head & Neck Surgery: Facial Plastic and Reconstructive Surgery* içinde (s. 1-9). Yeni Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Schneider, L. A., Korber, A., Grabbe, S., Dissemond, J. (2007). Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?. *Archives of dermatological research*, 298(9), 413-420.
- Scholes, P. D., Coombes, A. G. A., Illum, L., Davis, S. S., Watts, J. F., Ustariz, C., Vert, M., Davies, M. C. (1999). Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *Journal of Controlled Release*, 59(3), 261-278.
- Singh, S., Young, A. and McNaught, C.E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 35(9), 473-477.
- Song, S., Liu, Z., Abubaker, M. A., Ding, L., Zhang, J., Yang, S., Fan, Z. (2021). Antibacterial polyvinyl alcohol/bacterial cellulose/nano-silver hydrogels that

- effectively promote wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 126, 1-13.
- Stipcevic, T., Piljac, J., Berghe, D. Vanden. (2006). Effect of different flavonoids on collagen synthesis in human fibroblasts. *Plant foods for human nutrition*, 61, 27-32.
- Stoica, A.E., Chircov, C. And Grumezescu, A.M. (2020). Nanomaterials for wound dressings: an up-to-date overview. *Molecules*, 25(11), 1-25.
- Stoyanova, N., Spasova, M., Manolova, N., Rashkov, I., Georgieva, A., Toshkova, R. (2022). Quercetin-and Rutin-Containing Electrospun Cellulose Acetate and Polyethylene Glycol Fibers with Antioxidant and Anticancer Properties. *Polymers*, 14(24), 1-17.
- Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Ramkumar, S.S. (2005). Electrospinning of nanofibers. *Journal of applied polymer science*, 96(2), 557-569.
- Teo, W.E., Inai, R. and Ramakrishna, S. (2011). Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Science and technology of advanced materials*, 12, 1-19.
- Thakur, R. A., Florek, C. A., Kohn, J., Michniak, B. B. (2008). Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *International journal of pharmaceutics*, 364(1), 87-93.
- Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., Conti, B. (2020). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 1-30.
- Tran, N. Q., Joung, Y. K., Lih, E., Park, K. D. (2011). In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing. *Biomacromolecules*, 12(8), 2872-2880.
- Truzzi, F., Tibaldi, C., Zhang, Y., Dinelli, G., D' Amen, E. (2021). An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (BCS). *International journal of molecular sciences*, 22(11), 1-23.
- Ubbink, D.T., Brölmann, F.E., Go, P.M., Vermeulen, H. (2015). Evidence-based care of acute wounds: a perspective. *Advances in wound care*, 4(5), 286-294.

- Varshosaz, J., Jannesari, M., Morshed, M., Zamani, M. (2011). Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 993-1003.
- Vyas, K.S. and Vasconez, H.C. (2014). Wound healing: biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. *Healthcare*, 2, 356-400.
- Wortsman, X., Wortsman, J., Carreño, L., Morales, C., Sazunic, I., Jemec, G. B. E. (2013). Sonographic anatomy of the skin, appendages, and adjacent structures. X. Wortsman and G.B.E. Jemec (Eds.), *Dermatologic ultrasound with clinical and histologic correlations* içinde (s.15-35). New York: Springer.
- Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y. (2019). Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chemical reviews*, 119(8), 5298-5415.
- Yadav, N., Parveen, S., Chakravarty, S., Banerjee, M. (2019). Skin anatomy and morphology. A. Dwivedi, N. Agarwal, L. Ray, A.K. Tripathi (Eds.), *Skin Aging & Cancer* içinde (s. 1-10). New York: Springer.
- Yenilmez, E. and Yazan, Y. (2017). Formulation, Chracterization and In Vivo Efficacy of α -Tocopherol Imprinted Polymeric System for Cosmetic Application. *European International Journal of Science and Technology*, 6(3), 11-20.
- Yoo, H., Ku, S.K., Baek, Y.D., Bae, J.S. (2014). Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. *Inflammation Research*, 63, 197-206.
- Yousef, H., Alhajj, M. and Sharma, S. (2017). *Anatomy, skin (integument), epidermis*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Yu, D.G., Xu, Y., Li, Z., Du, L.P., Zhao, B.G., Wang, X. (2014). Coaxial electrospinning with mixed solvents: from flat to round eudragit L100 nanofibers for better colon-targeted sustained drug release profiles. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1-8.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Özer, S., Büyükköroğlu, G., Yazan, Y. (2018). Formulation and in vitro evaluation of moxifloxacin hydrochloride-loaded polymeric nanoparticles for ocular application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 37(9), 1850-1862.

- Zhang, S., Zhao, L., Yue, X., Li, B., Zhang, J. (2018). Density, viscosity, surface tension and spectroscopic studies for the liquid mixture of tetraethylene glycol+ N, N-dimethylformamide at six temperatures. *Journal of Molecular Liquids*, 264, 451-457.
- Zhou, L., Cai, L., Ruan, H., Zhang, L., Wang, J., Jiang, H., Wu, Y., Feng, S., Chen, J. (2021). Electrospun chitosan oligosaccharide/polycaprolactone nanofibers loaded with wound-healing compounds of Rutin and Quercetin as antibacterial dressings. *International journal of biological macromolecules*, 183, 1145-1154.

