

ÖZET

ANALJEZİK BİTKİ EKSTRELERİ YÜKLENMİŞ ÖZGÜN POLİMERLERLE KAPLI BEBEK DİŞLİĞİ

- 5 Bu buluş, bebeğin ısırması ile temas ettiği noktaya analjezik bitki ekstralarının salımını sağlayan polimerle kaplı bir bebek dişliği ile ilgilidir. Bebek dişliği, içerisine en az bir çeşit analjezik bitki ekstresi yüklenmiş biyouyumlu ve tükürük sıvısına duyarlı ve katmanlı polimer yapısı sayesinde kontrollü salım yapan en az bir çeşit polimer ile kaplıdır.

İSTEMLER

1. Silikon veya kauçuk malzemeden mamul bebek dişliğı olup özelliğı; dişlik üzerine iki ayrı katmandan oluşan bir taşıyıcı sistem kaplanması olup, burada birbiri üzerine lamine edilen katmanların biri, içerisine Rosmarinus officinalis ve Origanum vulgare bitkisi yaprakları ekstresi yüklenmiş olan, biyouyumlu ve tükürük sıvısına duyarlı ve kontrollü salım yapan en az bir çeşit polimerden diğeri ise etken madde içermeyen ve mukozada daha zor çözünen polimerden oluşur.
2. İstem 1'e uygun bebek dişliğı olup özelliğı; biyouyumlu ve tükürük sıvısına duyarlı ve kontrollü salım yapan polimerin 2-etilhekzil akrilat, metilakrilat, akrilik asit, envinilkaprolaktam, pirolidon, polietilen oksit, polivinil alkol, maltodekstrin, poloksamer, jelatinleştirilmiş hidroksipropil bezelye nişastası, hidroksipropil metil selülüz, patates nişastası, ksantan gum, karomel, hyaluronik asit, karboksimetil selüloz, polioksietilen glikol ve polietilen glikol içeren grup veya bunların kombinasyonlarını içeren gruptan seçilmesidir.
3. İstem 1 veya 2'ye uygun bebek dişliğı olup özelliğı; ekstrenin güvenli doz aralığının 1-10 mg/mL olmasıdır.

TARİFNAME

ANALJEZİK BİTKİ EKSTRELERİ YÜKLENMİŞ ÖZGÜN POLİMERLERLE KAPLI BEBEK DİŞLİĞİ

5

Buluşun İlgili Olduğu Alan

Bu buluş, bebeğin ısırması ile temas ettiği noktaya analjezik bitki ekstralarının salımını sağlayan polimerle kaplı bir bebek dişliği ile ilgilidir.

10 Buluşla ilgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

Bebeklerde diş çıkarma dönemlerinde diş etlerinde yaşanan ağrıların hafifletilmesi için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. En sık kullanılan yöntemler arasında diş etlerine sürülen krem/jel preparatları ile diş etlerinin diş çıkarma dönemlerindeki kaşıntılarına yönelik kullanılan silikon dişlikler yer almaktadır. Dişlikler genellikle herhangi bir ilaç içermeden bebeğin 15 dişlerinde var olan kaşıntıyı fiziksel olarak rahatlatabilmek için kullanılmaktadır. Bölgedeki ağrıyı azaltmaya yönelik kullanılan krem/jel preparatlarında ise çeşitli lokal analjezik ajanlar yer almaktadır. Bu preparatların bebeğin diş etlerine uygulanmasında ise çeşitli zorluklar yaşanmakta ve uygulama açısından pratiklik sağlamamaktadır. Ayrıca diş etleri için olan lokal uygulanan krem/jel formülasyonlarının doğru noktaya gerekli miktarda uygulanma zorluğu 20 bulunmaktadır.

CN103784394A numaralı patent dokümanı farmasötik bir preparasyonla ve daha özel olarak akıllı, sıcaklığa duyarlı, sürekli salımlı bir jel ve bunun bir hazırlama yöntemiyle ilgilidir. CN103784394A numaralı patentte yer alan çalışmada in-situ jel geliştirilmiştir. Bu da sıcaklığa duyarlı bir jeldir yani oda ısısında sıvı formda iken vücut sıcaklığında jel formuna 25 dönüşen bir yapıdır. Ancak ikinci bir kişinin ilaç uygulamasına gereksinim duyulmaktadır.

[https://www.amazon.in/Nuby-Natural-Soothing-Benzocaine-](https://www.amazon.in/Nuby-Natural-Soothing-Benzocaine-Belladonna/dp/B079QLR1YX?th=1)

[Belladonna/dp/B079QLR1YX?th=1](https://www.amazon.in/Nuby-Natural-Soothing-Benzocaine-Belladonna/dp/B079QLR1YX?th=1) ürünü dişlik şeklindeki emziğin yüzeyine doğal içerikli bir jel sürülmesi ile ilgilidir. Bu dişliğe ilgili jeli uygulayarak bebeğe taktıklarında ısırma sırasında jel dişlere ve diş diplerine sürülecektir. Burada doğal içerikli jelin emziğin üzerine

sürülmesi söz konusu olup kaplamanın kendisinden salınım yapılarak maddenin ilgili yüzeye salımı söz konusu değildir.

US2006280778A1 numaralı patent dokümanında buluş, homeopatik ilaçlarla ve daha özel olarak, diş çıkaran çocuklarda ağrı ve rahatsızlığı azaltan homeopatik ilaç karışımları ve bu
5 karışımların soğutularak verilmesi ile ilgilidir.

US5957954A numaralı patent dokümanında buluş diş çıkaran bir çocuğun diş etlerine yatıştırıcı jel uygulamak için bir cihazla ilgilidir. Mevcut buluş, dışarıdan ürün içine jel doldurulması ve bebeğin kaşıyıcıyı ısırıldığında basınç nedeniyle dışarı salınım yapması ile çalışmaktadır. US5957954A numaralı buluşta titreşimle (fiziksel olarak) diş etlerini rahatlatan
10 bir sistemden ve titreşimle anestezi bir ajan yayabilen sistemlerden bahsetmektedir.

CN204972316U, GB2285751A ve CN208065480U numaralı patent dokümanlarında bahsi geçen ürünler, jel ile bileşik titreşimli diş kaşıyıcılardır. Vibratörlerin özellikleri farklıdır ancak hepsi titreşimle diş etlerini rahatlatma prensibine dayanmaktadır. Vibratör içeren diş kaşıyıcıları tamamen fiziksel olarak kaşıntıyı rahatlatan sistemlerdir.

15 **Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları**

Buluşun öncelikli amacı, *Rosmarinus officinalis* ve *Origanum vulgare* bitki ekstralarının yüklendiği ağız sıvısında madde salımı yapan polimer sistemlerin elde edilmesi ve basit silikon ve kauçuk dişliklerin yüzeyinin bu polimerlerle kaplanmasıdır.

Buluşun amacı, elde edilen aktif ekstralardan majör bileşenleri/markörleri üzerinden
20 standardize preparat(ların) yapılması ve tıyon benzeri bileşiklerin elimine edilerek özgün ekstraların geliştirilmesidir.

Buluşun bir diğer amacı, lokal analjezik etkisi nedeniyle halk arasında kullanımı olan veya literatürde yer alan *R. officinale* ve *O. vulgare* yapraklarından elde edilen ekstralardan *in-vitro* hücre kültüründe analjezik etkinlik çalışmalarının yapılmasıdır. Fitokimyası tartışılabilir ve
25 aktivite sonuçları tekrarlanabilir olan standardize ekstraların elde edilmesidir.

Buluşun bir diğer amacı, tükürük sıvısına duyarlı salım yapan yenilikçi polimerlerin geliştirilmesi ve etkili kombinasyonların bu polimerlere yüklenmesidir.

Buluşun diğer bir amacı, polimerlerin silikon ve kauçuk malzeme yüzeyine kaplanması ve bu silikon ve kauçuk malzemelerden endüstriyel tasarımla bebek dişlik prototiplerinin geliştirilmesidir.

5 Buluş amaçlarından biri bebeklerin kaşınan ağız mukozasına teması ile tükürük sıvısına duyarlı olarak ayrıca kontrollü madde salımı yapan polimer sistemleri ile gerekli miktarda ekstre uygulamasının ürün yüzeyinden yapılacağı bir sistem geliştirilmesidir. Böylelikle doğru bölgeye gerekli miktarda etkisi kanıtlanmış doğal ajanların uygulanacağı güvenli, etkili ve ergonomik tasarımlı bir bebek ürünü prototipi ortaya konulmuştur. Taşıyıcı sistem ile gerekli miktarda ekstre uygulanması için tercihen iki ayrı katman polimer kullanılabilmektedir. Birisi 10 etken madde içeren ve mukozada kolay çözünen, diğeri ise etken madde içermeyen ve mukozada daha zor çözünen katmanlar birbiri üzerinde lamine edilmektedir. Bu katman sayısı iki veya daha fazla da olabilmektedir.

Buluş ile bebeklerin sıklıkla kullandığı silikon ve kauçuk dişliklere yeni bir yaklaşım kazandırmıştır. Dişliklerin yüzeyine kaplanacak olan polimerle diş etlerine kontrollü salımla 15 madde uygulanmış ve bu madde doğal kaynaklardan geliştirilen ve etkinliği hem geleneksel hem modern yöntemlerle ortaya konulmuştur. Teknikte bilinen dişlikler genellikle silikon ve kauçuk yapıda ve yalnızca fiziksel olarak diş etlerindeki ağrı ve rahatsızlığı gidermeye yönelik hizmet etmektedir. Bazı dişliklerin içerisinde jelimsi yapılar bulunmakta ve bu jeller buzdolabında bekletilerek bebeklere verilmektedir. Bu dişlik tipinde de diş etlerindeki 20 rahatsızlık yalnızca fiziksel olarak hafifletilmektedir (<https://lansinoh.com.tr/bebek-dis-kasiyici-urunler/>). Ancak bu buluş ile geliştirilen ürünün oluşan ağrıyı hafifletmesi hem fiziksel olarak sağlanmakta hem de bölgeye doğal bir ajan uygulanarak iki yönlü etki sağlanmıştır. Calgel® gibi bebek diş etlerine uygulanan lokal preparatların ise bir ebeveyn tarafından bebeğin diş etlerine uygulanması gerekmektedir. Buluş ile Calgel® gibi hem bir 25 ilaç uygulaması sağlanacak hem de ikincil kişiler tarafından bölgeye ilaç uygulama zorluğu ortadan kaldırılacak hem de normal silikon ve kauçuk dişliklerde var olan fiziksel olarak rahatsızlığın yatıştırılması sağlanmış olunacaktır. Böylelikle pek çok yönden etkinliğin desteklenmesi hedeflenmiştir.

Kullanılacak bitki ekstreleri seçilirken Türkiye’de doğal olarak yetişen ve hatta profesyonel 30 tarımı yapılabilen, üretim maliyeti yüksek olmayan iki bitki seçilmiştir. Ekstrenin elde edilmesi aşamasında da yüksek maliyet gerektiren teknikler kullanılmamakta sadece zaman

ve çözücü parametreleri değiştirilerek hem biyoaktif hem de istenmeyen fitokimyasalların minimize edileceği ekstraksiyon ve kromatografi yöntemleri ile devam edilmiştir. Polimerler için ise piyasada kolaylıkla ulaşılabilinen ve maliyeti yüksek olmayan polimer hammaddeleri ile çalışılmıştır.

5 Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Buluş bebek dişliği, içerisine en az bir çeşit analjezik bitki ekstresi yüklenmiş olan, biyouyumlu ve tükürük sıvısına duyarlı salım yapan en az bir çeşit polimer ile kaplıdır.

Bahsi geçen analjezik bitki ekstresi olarak *Rosmarinus officinalis* veya *Origanum vulgare* bitkisi yaprakları ekstresi veya bunların ikili kombinasyonu kullanılmaktadır.

- 10 Polimer; 2-etilhekzil akrilat, metilakrilat, akrilik asit, envinilkaprolaktam, pirolidon, polietilen oksit, polivinil alkol, maltodekstrin, poloksamer, jelatinleştirilmiş hidroksipropil bezelye nişastası, hidroksipropil metil selülüz, patates nişastası, ksantan gum, karomel, hyaluronik asit, karboksimetil selüloz, polioksietilen glikol ve polietilen glikol içeren grup veya bunların kombinasyonlarını içeren gruptan seçilmektedir.
- 15 Buluş kapsamında, halk arasında lokal analjezik etkileri bilinen *Rosmarinus officinalis* ve/veya *Origanum vulgare* bitkilerinden elde edilen özel ekstratlar, ağız sıvısında madde salımı yapan polimer sistemlerine yüklenmekte ve basit silikon ve kauçuk dişliklerin yüzeyi bu polimerlerle kaplanmaktadır. Polimerden madde salımı tükürük sıvısına duyarlı olduğundan dolayı polimer kaplı dişlik yüzeyinin diş etleri ile temasında ekstre diş eti yüzeyi ile temas edecek ve ağrının hafifletilmesi yalnızca fiziksel olarak değil ekstrenin lokal analjezik etkisinden dolayı da gerçekleşmektedir. Diş etleri için olan lokal uygulanan krem/jel formülasyonlarının doğru noktaya gerekli miktarda uygulanması zorluğu da böylelikle aşılmış olacaktır. Bebek doğrudan kaşınan-ağrı oluşan noktada uygulayacağı temasla polimere yüklenmiş maddenin salınımını sağlayacak ve gerekli bölgeye madde uygulanmış olacaktır.
- 25 Böylelikle doğal bitki ekstratları ile annelerin ve bebeklerin büyük sorun yaşadığı diş çıkarma dönemlerinde güvenle kullanabilecekleri yenilikçi bir ürün tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Taşıyıcı sistemin tükürük sıvısında çözünürlüğü vardır. Aynı zamanda ağız pH'ına da duyarlıdır. Tükürük sıvısına duyarlılık ağız içerisinde çözünen polimerler uygun oranda karıştırılarak salımın ve çözünürlüğün süresi, etken madde salım dozajı optimize edilecektir.

Bu buluşta, lokal analjezik etkisi nedeniyle halk arasında kullanılan bitkiler Avrupa Farmakopesi kalitesinde temin edilmekte ve elde edilen ekstrelerle *in vitro* hücre kültürü deneyleri ile NO ve PGE2 deneyleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle bitkilerin analjezik etkinliği etnobotanik bilgiden yola çıkılarak bilimsel verilerle de teyit edilmiştir. Ekstreler

5 HPLC yöntemi ile fitokimyasal açıdan standardize edilerek yenilikçi ve özgün polimer sistemleri içerisine yüklenmekte ve silikon ve kauçuk dişlik yüzeyi bu polimer ile kaplanmaktadır. Böylelikle bebeklerde diş çıkarma dönemlerinde oluşan ağrıya yönelik kullanılabilecek bir fitofarmasötik ürün geliştirilmiştir.

Buluş kapsamında belirlenen Avrupa Farmakopesi kalitesinde temin edilmiş *O. vulgare*

10 ve/veya *R. officinalis* yaprak droglarından elde edilen özel ekstrelerin, tükürük sıvısına duyarlı bir polimer sistemine yüklenerek silikon ve kauçuk bir malzeme yüzeyine kaplanarak tasarlanmış bir ticari ürün elde edilmiştir. Kullanılacak olan bitki materyalleri Avrupa Farmakopesi standartlarında sertifikalı olarak temin edilecek olup, elde edilecek ekstreler farklı yöntemlerle geliştirilecektir. Tuyon gibi istenmeyen bileşikler elimine edilerek özgün

15 bir ekstre hazırlanmıştır. Daha sonra bu iki bitki ekstresinden checkerboard tekniği ile analjezik etki yönünden etkili kombinasyonlar ortaya konulmuştur.

a) Bitkisel Materyal

R. officinalis ve *O. vulgare* kuru droglar olmak koşuluyla, sertifikalı olarak Farmakope kalitesinde Anoxymer International GmbH ve Caelo gibi ticari kaynaklardan temin edilmiştir.

20 Yerli güvenilir üreticilerden de bitki örnekleri satın alınarak Farmakope kalitesine en yakın ticari bitki kaynağı belirlenmiş ve çalışmalara o bitkilerle devam edilmiştir.

b) Ekstraksiyon ve Ekstrelerin Polimerlere Yüklenmesi

R. officinalis ve *O. vulgare* bitki örnekleri öncelikle uygun boyutta tercihen 250-400 mesh aralığında öğütülmektedir. Ardından, farklı oranda farmakopeye uygun ve yeşil kimya

25 kapsamında yer alan çözücüler (etanol-su, 1:1 h/h veya etanol-su, 1.5:0.5, h/h vb., etanol, su vb.) kullanılarak maserasyon tekniği ile çeşitli ekstreler hazırlanmıştır. Droglar farklı oranlarda çözücülerde farklı sürelerde ultrasonik banyolu/banyosuz ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) kıyaslanarak majör bileşenleri açısından standardize edilen ekstreler (%0.1-10 rosmarinik asit içeren ekstreler)

30 polimerlere yüklenmiştir.

Polimer olarak 2-etilhekzil akrilat, metilakrilat, akrilik asit, envinilkaprolaktam, pirolidon, polietilen oksit, polivinil alkol, maltodekstrin, poloksamer, jelatinleştirilmiş hidroksipropil bezelye nişastası, hidroksipropil metil selüloz, patates nişastası, ksantan gum, karomel, hyaluronik asit, karboksimetil selüloz, polioksietilen glikol, polietilen glikol vb. biyouyumlu ve biyolojik kaynaklı polimerler kullanılmaktadır. Bunların kimisi tükürük sıvısında zor kimisi yavaş çözünmektedir. Bunların karışımları (farklı oranlarda) da kullanılabilir.

c) Standardizasyon

Belirlenecek olan majör maddeler üzerinden, elde edilen ekstreler standardize edilmekte ve bu standardizasyon YBSK yöntemiyle birlikte farklı dedektörler kullanılarak (Diyot array dedektör (DAD), Kütle Spektrometresi (KS) vb.) detaylı olarak ortaya konulmuştur. Standardizasyon polar ekstrelerin uygun bileşenler üzerinden gerçekleştirilmekte ve farmakope şartlarına uygun olarak yapılmaktadır. Bu işlemler için her bir ekstre özelinde ayrı metotlarla çalışılmış olup özgün yöntem çalışmaları denenmiştir. YBSK için farklı boyut ve özelliklerdeki C18 YPSK kolonunda 1-1.5 arası akış hızı kullanılarak gradient (A=Su:orto- fosforik asit; B=Metanol/Asetonitril) akış ile en uygun ayırım elde edilene kadar denemeler yapılmış ve en uygun yöntem seçilmiştir.

IN-VITRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ETKİNLİK ÇALIŞMALARI VE CHECKERBOARD İLE KOMBİNASYON TASARLANMASI

a) Sitotoksite tayini:

RAW 264.7 hücre hattı kullanarak antienflamatuvar ve analjezik etki araştırılmadan önce, ekstrelerin sitotoksik olmayan güvenli doz aralığı belirlenmiştir. Bu doz aralığı 1-10 mg/mL olarak belirlenmiştir. Hücre canlılığı üzerine etkinin değerlendirilmesinde, enzimatik bir test olan MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi kullanılmış ve canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanmıştır. Hücreler %10 FBS (Gibco, ABD) ve %1 penisilin/streptomisinle (Gibco, ABD) tamamlanmış DMEM (Gibco, İngiltere) ile %5 CO₂ ve 37°C’de kültür edilmiştir. Çalışmaların tamamı laminar akışlı steril kabinde yapılmış ve hücrelerin inkübasyonu için 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamını sağlayan bir etüv kullanılmıştır.

Moleküllerin RAW 264.7 hücre hattındaki etkileri belirtilen inkübasyon zamanından sonra MTT besi ortamı ile karıştırılarak konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µL MTT solüsyonu eklenmiştir. Plakalar 37°C’de 2 saat inkübe edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak, hücre içinde depolanan MTT formazanı açığa çıkarmak için 100 µL izopropanol kullanılmıştır. Her kuyucuğun absorbands değeri 570 nm dalga boyunda mikropate okuyucu ile ölçülerek canlı hücre sayısı belirlenmiştir. %20’lik dimetilsülfoksit (DMSO) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre relatif canlılık (%) Denklem 1’e göre hesaplanmıştır (Sipahi vd. 2017). Çalışma üç tekrar yapıldı ve sonuçlar “ortalama±SS” şeklinde verilmiştir.

- 10 Denklem 1: Hücre relatif canlılık (%) = $OD_{570} (\text{örnek}) \times 100 / OD_{570} (\text{medyum kontrol})$
(OD: Optik yoğunluk)

Sitotoksisite deneyi sonucunda % hücre canlılığı kontrol grubu ile karşılaştırılarak %70’den daha düşük rölatif hücre canlılığı olan dozlar sitotoksik kabul edilmiştir. Buna göre moleküllerin güvenli dozları belirlenerek antienflamatuvar etkinlik test edilmiştir.

- 15 İnflamasyon mediyatörleri hücre süpernatantında ölçülmüştür.

b) Anti-enflamatuvar etkinin değerlendirilmesi

Uygun çalışma dozu belirlenen ekstrelerin ve ekstrelerden elde edilen bileşiklerin anti-enflamatuvar aktivitesi Griess reaktifi kullanılarak, hücre kültürü ortamındaki nitrit oksit (NO) seviyelerinin değerlendirilmesiyle tespit edilmiştir.

- 20 Mürin makrofaj RAW 264.7 hücreleri, 48 kuyulu bir plakaya 1×10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilip, 24 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂’de inkübe edilmiştir. Hücreler, referans ve en az dört farklı konsantrasyonda hazırlanan ekstreler ile 2 saat boyunca ön muamele edildikten sonra, 1 µg/mL LPS ile (lipopolisakarit Eschrechia coli 0111: B4, Sigma, ABD) 22 saat boyunca inkübasyon sonunda hücre kültürü süpernatantı toplanmıştır.
- 25 Süpernatant, eşit hacimde Griess reajanı (%1 fosfanik asit içinde %1 sülfanilamid ve %0,1 N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür) ile 96 kuyulu bir plakada karıştırılarak karanlıkta oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Absorbans, ELISA mikropate okuyucusu (Therma Multiskan Ascent, Finlandiya) ile 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Ekstrelerin nitrik oksit (NO) oluşumu üzerine inhibisyon etkisini tespit etmek için hücre süpernatantında
- 30 nitrit düzeyleri, sodyum nitrit (NaNO₂) standart eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu

Çalışmada hiçbir muamele yapılmayan hücreler ise negatif kontrol olarak, 1 µg/mL LPS ile muamele edilen hücreler pozitif kontrol olarak ve indometazin (100 µM) referans molekül olarak kullanılmıştır. Çalışma üç tekrar yapıldı ve sonuçlar “ortalama±SS” şeklinde verildi.

5 C) Analjezik aktivitenin tayini

PGE2 inhibisyonu: Bileşiklerin PGE2 inhibisyon değerleri, LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 hücrelerinde ELISA kit kullanılarak Sipahi ve arkadaşlarının yayınında belirtilen yöntemle göre hücre süpernatantında ölçülmüştür (Karadağ vd 2019).