

BURCU ÜNER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021



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

DOKTORA TEZİ

**GÖZE UYGULANMAK ÜZERE İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN TASARIMI HAKKINDA ÇALIŞMALAR**

BURCU ÜNER

**DANIŞMAN
PROF. DR. YILDIZ ÖZSOY ERGİNER**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ SAMET ÖZDEMİR**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ve tüm sevdiklerime ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince ilgisi, desteği ve değerli yorumlarını paylaşarak tezime yönelik yol haritasını çizmemde bana yardımcı olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız Özsoy Erginer'e,

Doktora eğitimim ve tezimin tüm aşamalarında beni sürekli destekeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle koşulsuz olarak paylaşarak akademik hayata hazırlanmamda katkısı büyük olan Sayın Prof. Dr. Melike Üner'e,

Doktora tez çalışmalarım süresince motive edici yaklaşımıyla benden yardım, bilgi ve değerli yorumlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Çetin Taş'a,

Doktora çalışmam boyunca her sorum ve sorunuma cevap veren, bana öneriler sunarak bakış açımı değiştiren, haftasonu veya tatillerde çalışmalarına katılarak beni hep motive eden İkinci Tez Danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Samet Özdemir'e,

Çalışmalarım boyunca değerli yorumlarını ve desteğiyle yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine Kahraman'a ,

Doktora sürecim boyunca tecrübeleriyle ve bilgi birikimiyle yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Gülelgül Duman'a,

Doktora tez çalışmalarımın boyunca deneyim ve bilgisiyle bana her zaman yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Juste Ortasöz'e,

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Sayın Doc. Dr. Aylin Yaba Uçar, Sayın Doc. Dr. Semra Akkaya, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pınar Akkuş, Sayın Arş. Gör. Ecem Yıldırım ve Sayın Vet. Hek. Mustafa Demirel'e,

Çalışmalarım boyunca içtenlikleriyle yanımda olan Sayın Ecz. Yağmur Özhan, Ecz. Latif Murat Erdoğan, Ecz. Elif Ayça Dedeoğlu Erdoğan, Ecz. Ecem Gökoğlan ve Ecz. Cemre Şahin Şenyüz'e,

Doktora çalışmalarım sırasında her türlü teknik desteği sağlayarak bana yardımcı olan Sayın Bilal Şenkal'a,

Hayatım boyunca beni akademik açıdan her zaman destekleyen ve evlatları olmaktan gurur duyduğum babam Sayın Prof. Dr. Osman Yeşildağ'a ve annem Sayın Ecz. Nimet Müge Yeşildağ'a

Üniversite hayatımdan bu yana benim akademisyenlik yolunda ilerlememdeki en önemli ayrıntı olan eşim Sayın Ecz. Faruk Üner'e ve manevi desteği için kızım Elif Ece Üner'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİİ
ÖZET	XİX
ABSTRACT.....	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi	4
2.1.1. Kornea ve Sklera.....	5
2.1.2. İris, Siliyer Cisim ve Koroid	7
2.1.3. Retina	8
2.1.4. Nazolakrimal Sistem	9
2.2. Gözde Meydana Gelen İnflamasyonların Patogenezi ve Sınıflandırılması	11
2.2.1. Tedavi.....	18
2.3. Göze İlaç Uygulanması.....	27
2.3.1. Korneadan Geçişte İlaç Kaybı Mekanizmaları	29
2.3.2. Korneadan Geçişte İlaç Kaybının Önlenmesine Yönelik Yaklaşımlar.....	30
2.4. KLN, NLT ve NE Hakkında Genel Bilgiler	31
2.4.1. KLN, NLT ve NE'ları Hazırlama Yöntemleri	38
2.4.2. KLN, NLT ve NE'ların Karakterizasyonu.....	43
2.4.3. KLN, NLT ve NE'ların Stabilitesi	54
2.4.4. KLN, NLT ve NE'ların Uygulama Yolları	62
2.5. İlaçta Kalite Tasarımı (Quality by Design- QbD).....	66
2.5.1. İlaçta Kalite Tasarımına Ait Kılavuzlar	68
2.5.2. Kalite Tasarımı (QbD) Uygulamaları	71
2.5.3. Deneysel Tasarım (DoE).....	72
2.6. Etkin Madde ile İlgili Genel Bilgiler	78
2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri	78

2.6.2. Farmakolojik Özellikleri	79
2.6.3. Miktar Tayini	80
2.6.4. Toksisite ve Güvenlik Profili	81
2.7. Çalışmada Kullanılan Yardımcı Maddeler Hakkında Genel Bilgiler	82
2.7.1. Precirol® ATO 5	82
2.7.2. Oleik Asit	83
2.7.3. Pluronic F68® (Poloxamer®188).....	84
3. GEREÇ VE YÖNTEM	85
3.1. Gereçler.....	85
3.1.1. Kimyasal Maddeler	85
3.1.2. Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	86
3.2. Yöntem.....	88
3.2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar	88
3.2.2. Etkin Maddenin Miktar Tayini Yöntemleri	89
3.2.3. Etkin Maddenin Çözünürlüğünün Tayini	93
3.2.4. Ön Çalışmalar	93
3.2.5. KLN, NLT ve NE'ların DoE Yazılımı ile Tasarımı	95
3.2.6. KLN, NLT ve NE'larda Yapılan Tayinler	96
3.2.7. İstatistiksel Analizler	105
4. BULGULAR.....	106
4.1. LE Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	106
4.1.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu.....	106
4.1.2. UV Spektrumu	107
4.1.3. HPLC Analizine Ait Bulgular.....	107
4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizine Ait Bulgular	108
4.1.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizine Ait Bulgular	109
4.2. LE'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Validasyonuna Ait Bulgular	109
4.2.1. UV Spektroskopisi Yöntemi ile Miktar Tayini ve Miktar Tayinin Validasyonuna Ait Bulgular.....	109
4.2.2. HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini ve Miktar Tayininin Validasyonuna Ait Bulgular.....	114
4.3. LE'nin Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular	120
4.4. Ön Çalışmalara Ait Bulgular	120

4.5. KLN, NLT ve NE'ların Sistemlerin Bilgisayar Programı ile Tasarımına Ait Bulgular	129
4.6. KLN, NLT ve NE'larda Yapılan Tayinlere Ait Bulgular	142
4.6.1. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelinin Tayinine Ait Bulgular.....	142
4.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizine Ait Bulgular	149
4.6.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi Tayinine Ait Bulgular	153
4.6.4. DSC Analizine Ait Bulgular	153
4.6.5. FT-IR Analizi.....	158
4.6.6. Viskozite ve pH Analizine Ait Bulgular	160
4.6.7. <i>İn vitro</i> Salım Çalışmasına Ait Bulgular	160
4.6.8. <i>Ex vivo</i> Korneadan Geçiş Çalışmasına Ait Bulgular	166
4.6.9. Bant Sıyırma Testi ve Korneada İlaç Tutma Tayinine Ait Bulgular	172
4.6.10. Korneaların Histopatolojik İncelenmesine Ait Bulgular	176
4.6.11. Stabilitate Çalışmalarına Ait Bulgular	179
5. TARTIŞMA	201
KAYNAKLAR	219
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	253

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Gözde meydana gelen inflamatuvar hastalıklar	11
Tablo 2-2: Gözde meydana gelen hastalıklar ve tedavileri.....	19
Tablo 2-3: KLN, NLT ve NE’larda meydana gelen stabilite sorunları	58
Tablo 2-4: Kalite risk yönetimi için tanımlar (Elder ve Teasdale 2017)	70
Tablo 2-5: DoE'nin aşamaları (NIST 2016).....	75
Tablo 4-1: LE’ın metanol içerisinde UV spektroskopisi yöntemi ile çizilen standart eğrisine ait bulgular (n=6).....	110
Tablo 4-2: LE’ın UV spektroskopisi ile yapılan doğruluğuna ait bulgular (n=6)	111
Tablo 4-3: LE’ın UV spektroskopisi ile yapılan gün içi kesinliğine ait bulgular (n=6).....	111
Tablo 4-4: LE’ın UV spektroskopisi ile yapılan günler arası kesinliğine ait bulgular (n=6)	112
Tablo 4-5: LE’ın metanol içerisindeki stabilitesine ait bulgular	114
Tablo 4-6: LE’ın pH 6.8 fosfat tamponunda HPLC yöntemi ile doğrusallığına ait bulgular (n=6).....	115
Tablo 4-7: LE’ın HPLC yöntemi ile yapılan doğruluk çalışmasına ait sonuçlar (n=6) ..	116
Tablo 4-8: LE’ın HPLC yöntemi ile gün içi kesinlik çalışmasına ait sonuçlar (n=6) ..	116
Tablo 4-9: LE’ın HPLC yöntemi ile günler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar (n=6)	117
Tablo 4-10: LE’ın pH 6.8 fosfat tampon çözeltisindeki stabilitesine ait sonuçlar	119
Tablo 4-11: LE’ın HPLC yöntemindeki uygunluk parametreleri.....	120
Tablo 4-12: LE’ın çözünürlüğü	120
Tablo 4-13: Lipit görüntüleme çalışması.....	121
Tablo 4-14: Sıvı lipidlerde yapılan lipit görüntüleme çalışması.....	122
Tablo 4-15: LE’ın katı lipidlerdeki çözünürlüğü	123
Tablo 4-16: LE’ın sıvı lipidlerdeki çözünürlüğü	124
Tablo 4-17: Yüzey etkin madde görüntüleme çalışması	124
Tablo 4-18: LE’ın yüzey etkin maddelerdeki çözünürlüğü	125
Tablo 4-19: KLN formülasyonları için yüzey etkin madde seçimi için gerçekleştirilen tarama çalışmasına ait sonuçlar	125
Tablo 4-20: NLT formülasyonları için yüzey etkin madde seçimi için gerçekleştirilen tarama çalışmasına ait sonuçlar	126

Tablo 4-21: NE formülasyonları için yüzey etkin madde seçimi için gerçekleştirilen tarama çalışmasına ait sonuçlar	126
Tablo 4-22: Compritol® 888 ATO ile amplitüdün ve ultrasonikasyon süresinin tespitine yönelik çalışma sonuçları.....	127
Tablo 4-23: Setostearil alkol ile amplitüdün ve ultrasonikasyon süresinin tespitine yönelik çalışma sonuçları.....	127
Tablo 4-24: Precirol® ATO 5 ile amplitüdün ve ultrasonikasyon süresinin tespitine yönelik çalışma sonuçları.....	128
Tablo 4-25: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan KLN formülasyonları.....	129
Tablo 4-26: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonları	130
Tablo 4-27: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NE formülasyonları.....	131
Tablo 4-28: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımlı değişkenlerine ait sonuçlar (n=3).....	132
Tablo 4-29: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımlı değişkenlerine ait sonuçlar (n=3)	133
Tablo 4-30: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NE formülasyonlarının bağımlı değişkenlerine ait sonuçlar (n=3).....	134
Tablo 4-31: Tasarımı tamamlanan formülasyonlar	141
Tablo 4-32: KLN formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve dağılımı (n=3).....	142
Tablo 4-33: NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve dağılımı (n=3)	143
Tablo 4-34: NE formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=3)	145
Tablo 4-35: Formülasyonların zeta potansiyeli (n=3)	146
Tablo 4-36: Formülasyonların EE ve YK değerleri (n=3).....	153
Tablo 4-37: Katı lipid ve katı lipid içeren formülasyonların ΔH , erime derecesi ve %CI değerleri	156
Tablo 4-38: KLN ve NLT formülasyonlarının kristalizasyonlarının (%CI) istatistiksel olarak değerlendirilmesi	157
Tablo 4-39: Formülasyonlara ait viskozite ve pH ölçüm sonuçları (n=3).....	160
Tablo 4-40: KLN505 kodlu formülasyondan LE'ın salımı (n=6)	161
Tablo 4-41: NLT532 kodlu formülasyondan LE'ın salımı (n=6).....	162

Tablo 4-42: NE550 kodlu formülasyonundan LE'in salımı (n=6)	163
Tablo 4-43: Formülasyonların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi.....	164
Tablo 4-44: <i>In vitro</i> salım çalışması sonuçlarına göre formülasyonların salım kinetikleri	165
Tablo 4-45: <i>In vitro</i> salım çalışmasına ait akı ve permeasyon katsayısına ait sonuçlar (n=6).....	166
Tablo 4-46: KLN505 kodlu formülasyondan LE'in salımı (n=3)	167
Tablo 4-47: NLT532 kodlu formülasyondan LE'in salımı (n=3).....	168
Tablo 4-48: NE550 kodlu formülasyondan LE'in salımı (n=3)	169
Tablo 4-49: Formülasyonların <i>ex vivo</i> salım sonuçlarının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	170
Tablo 4-50: <i>Ex vivo</i> salım çalışmasına ait akı ve permeasyon katsayısına ait sonuçlar (n=3).....	171
Tablo 4-51: <i>Ex vivo</i> salım çalışması sonuçlarına göre formülasyonların salım kinetikleri	171
Tablo 4-52: Bant sıyırma testi sonrası tespit edilen LE miktarı (n=3)	172
Tablo 4-53: Bant sıyırma testi sonrası formülasyonlar arası anlamlılık derecesine ait sonuçlar.....	173
Tablo 4-54: Korneanın homojenizasyonu çalışması sonrası korneada tespit edilen LE miktarı.....	174
Tablo 4-55: Korneada tutulan LE miktarlarına göre formülasyonlar arası anlamlılık derecesine ait sonuçlar	174
Tablo 4-56: Formülasyonlardan salımı yapılan LE miktarının dağılımına ait sonuçlar.....	175
Tablo 4-57: KLN505 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki partikül büyüklüğü ve PI değerleri.....	179
Tablo 4-58: NLT532 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki partikül büyüklüğü ve PI değerleri.....	182
Tablo 4-59: NE550 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki partikül büyüklüğü ve PI değerleri	184
Tablo 4-60: KLN505 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki EE (%) değerleri	187
Tablo 4-61: NLT532 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki EE (%) değerleri.....	188
Tablo 4-62: NE550 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki EE (%) değerleri	189
Tablo 4-63: KLN505 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki zeta potansiyeli	190

Tablo 4-64: NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C'deki zeta potansiyeli.....	191
Tablo 4-65: NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C'deki zeta potansiyeli	192
Tablo 4-66: KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C'deki viskozite ve pH değerleri	193
Tablo 4-67: NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C'deki viskozite ve pH değerleri	194
Tablo 4-68: NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C'deki viskozite ve pH değerleri	195
Tablo 4-69: KLN505 kodlu formülasyonlara ait ΔH , erime derecesi ve % CI değerleri	196
Tablo 4-70: NLT532 kodlu formülasyonlara ait ΔH , erime derecesi ve % CI değerleri	197

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Gözün yapısı (Zhu ve ark. 2010).....	4
Şekil 2-2: Kornea ve katmanları (Masterton ve Ahearne, 2018).....	5
Şekil 2-3: Konjonktiva ve bölümleri (Mikkelsen 2020).....	7
Şekil 2-4: İris, siliyer cisim, lens ve koroid (Jones 2021).....	8
Şekil 2-5: Lakrimal sistemin anatomisi (Örge ve Boente 2014)	9
Şekil 2-6: Gözyaşı filmine ait katmanlar (Wilcox ve ark. 2017).....	10
Şekil 2-7: Bilateral konjunktivit (Pokroy ve Marcovich 2003)	13
Şekil 2-8: Kuru göz hastalığında oluşan inflamatuvar kısır döngü (Baudouin ve ark. 2016)	14
Şekil 2-9: Büyük drusenlerin (>125 µm) gözleendiği bir erken evre AMD vakası (Lim ve ark. 2012)	16
Şekil 2-10: AMD tedavi protokolü (Wang ve ark. 2010)	25
Şekil 2-11: Gözün ön segmentinin yapısı ve oküler bariyerler (Janagam ve ark. 2017) ..	28
Şekil 2-12: Gözün yapısı ve ana bariyerler (Willoughby ve ark. 2010)	30
Şekil 2-13: S/Y veya Y/S tipi NE (Barradas ve Holanda 2020)	33
Şekil 2-14: Saklama süresinin bir fonksiyonu olarak kararsız NE'un damlacık büyüklüğünün artışı (Mustafa ve Hussein 2020)	34
Şekil 2-15: KLN içerisine etkin madde hapsetme modelleri (homojen katı çözelti matrisi (üst), etkin madde bakımından zengin kabuk içeren çekirdek kabuk modeli (orta), etkin madde bakımından zengin çekirdek içeren çekirdek kabuk modeli (alt)) (Üner ve Yener 2007)	36
Şekil 2-16: KLN, NLT ve NE'un yapısı(Kharat ve McClements 2019).....	37
Şekil 2-17: Yüksek basınçlı homojenizatör ve üretim aşamaları (Rajendran ve ark. 2016)	39
Şekil 2-18: Mikroemülsiyon yönteminin aşamaları (Shrestha ve ark. 2021)	40
Şekil 2-19: Çözücü difüzyon yöntemi ile KLN, NLT ve NE'ların hazırlanması (Wang ve ark. 2016)	41
Şekil 2-20: Yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon tekniği (Sistra ve ark. 2020)..	42
Şekil 2-21:PCS ölçüm sistemine ait temel yapı.....	44
Şekil 2-22: LD cihazının çalışma mekanizması (Igushi ve Yoshida 2011).....	45
Şekil 2-23:Alan akışı fraksiyonlama cihazı (Rawal ve Patel 2018)	46

Şekil 2-24: Coulter Sayacı	47
Şekil 2-25:Zeta potansiyel diyagramı (Pate ve Safier 2016)	48
Şekil 2-26: DSC cihazının çalışma prensibi (Lazaro ve ark. 2013).....	51
Şekil 2-27: XRD cihazının çalışma prensibi.....	53
Şekil 2-28:Potansiyel enerjiye karşı partiküller arası mesafeyi gösteren eğri (Shah ve ark. 2015)	56
Şekil 2-29: KLN, NLT ve NE’larda stabilizasyon mekanizmaları (Kong ve ark. 2017)57	
Şekil 2-30: Ostwald büyümesi (Ndolomingo ve ark. 2020)	59
Şekil 2-31: KLN, NLT ve NE’lerde görülen stabilite sorunları (Gu ve ark. 2005).....	60
Şekil 2-32: Yarı kararlı α , β' ve kararlı β polimorfları (Rogers 2017).....	61
Şekil 2-33: DoE'nin temeli (Montgomery 2013)	73
Şekil 2-34: Ana DoE kategorileri: karışımlar (solda), faktöriyel tasarımlar (ortada) ve karışım-faktöriyel tasarımlar (sağda) (Politis ve ark. 2017)	76
Şekil 2-35: LE’in kimyasal yapısı	78
Şekil 2-36: Precirol® ATO 5 (Devi ve Agarwal 2019).....	82
Şekil 2-37: Oleik asit (Baishya ve ark. 2017).....	83
Şekil 2-38: Pluronic® F68 (Wei ve ark. 2015)	84
Şekil 3-1: Franz difüzyon hücresi	98
Şekil 4-1: LE’nin FT-IR spektrumu.....	106
Şekil 4-2: LE’ye ait spektrogram.....	107
Şekil 4-3: LE’nin HPLC kromotogramı	107
Şekil 4-4: LE’in SEM görüntüsü (2500x büyütme).....	108
Şekil 4-5: LE’in SEM görüntüsü (7500x büyütme).....	108
Şekil 4-6: LE’a ait DSC termogramı	109
Şekil 4-7: LE’in UV spektroskopisi ile çizilen kalibrasyon eğrisi.....	110
Şekil 4-8: Mobil fazın UV spektrumu	112
Şekil 4-9: Boş-KLN505 formülasyonuna ait UV spektrumu	113
Şekil 4-10: Boş-NLT532 formülasyonuna UV spektrumu.....	113
Şekil 4-11: Boş-NE550 formülasyonuna ait UV spektrumu	113
Şekil 4-12: LE’in HPLC yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisi.....	115
Şekil 4-13: Mobil fazın HPLC kromotogramı	117
Şekil 4-14: KLN505 kodlu boş formülasyona ait HPLC kromotogramı.....	118
Şekil 4-15: NLT532 kodlu boş formülasyona ait HPLC kromotogramı	118

Şekil 4-16: NE550 kodlu boş formülasyona ait HPLC kromotogramı.....	118
Şekil 4-17: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	135
Şekil 4-18: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü dağılımı (PI) üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı.....	136
Şekil 4-19: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı.....	136
Şekil 4-20: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	137
Şekil 4-21: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	137
Şekil 4-22: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü dağılımı üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	138
Şekil 4-23: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı.....	138
Şekil 4-24: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	139
Şekil 4-25: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	139
Şekil 4-26: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü dağılımı üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	140
Şekil 4-27: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	140
Şekil 4-28: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı	141
Şekil 4-29: KLN505 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı	142
Şekil 4-30: Boş-KLN505 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı.....	143
Şekil 4-31: NLT532 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı.....	144
Şekil 4-32: Boş-NLT532 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı	144
Şekil 4-33: NE550 kodlu formülasyonun damlacık büyüklüğü dağılımı	145
Şekil 4-34: Boş-NE550 kodlu formülasyonun damlacık büyüklüğü dağılımı	146
Şekil 4-35: KLN505 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli	147
Şekil 4-36: Boş-KLN505 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli.....	147

Şekil 4-37: NLT532 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli.....	148
Şekil 4-38: Boş-NLT532 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli	148
Şekil 4-39: NE550 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli	149
Şekil 4-40: Boş-NE550 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli.....	149
Şekil 4-41: KLN505 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (2500x)	150
Şekil 4-42: KLN505 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (5000x)	150
Şekil 4-43: NLT532 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (2500x).....	151
Şekil 4-44: NLT532 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (5000x).....	151
Şekil 4-45: NE550 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (2500x)	152
Şekil 4-46: NE550 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (5000x)	152
Şekil 4-47: KLN505 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait termogram	154
Şekil 4-48: NLT532 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait termogram	154
Şekil 4-49: NE550 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait termogram	155
Şekil 4-50: KLN505 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait spektrum	158
Şekil 4-51: NLT532 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait spektrum.....	159
Şekil 4-52: NE550 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait spektrum	159
Şekil 4-53: KLN505 kodlu formülasyona ait salım profili.....	161
Şekil 4-54: NLT532 kodlu formülasyona ait salım profili	162
Şekil 4-55: NE550 kodlu formülasyonuna ait salım profili.....	163
Şekil 4-56: Formülasyonlara ait <i>in vitro</i> salım profili	164
Şekil 4-57: LE'ın KLN505, NLT532 ve NE550'den Korsmeyer Peppas eşitliğine göre <i>in vitro</i> salım profili	165
Şekil 4-58: KLN505 kodlu formülasyona ait <i>ex vivo</i> salım profili.....	167
Şekil 4-59: NLT532 kodlu formülasyonun ait <i>ex vivo</i> salım profili.....	168
Şekil 4-60: NE550 kodlu formülasyonun ait <i>ex vivo</i> salım profili	169
Şekil 4-61: KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonların <i>ex vivo</i> salım profili	170
Şekil 4-62: LE'ın KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonlardan Korsmeyer Peppas eşitliğine göre <i>ex vivo</i> salımı	172
Şekil 4-63: Bant sıyırma testi sonrası tespit edilen LE miktarı	173
Şekil 4-64: Korneada tutulan LE miktarı.....	174
Şekil 4-65: LE miktarının % olarak dağılımı.....	175
Şekil 4-66: Kontrol grubundaki korneaya ait mikroskop görüntüsü	176

Şekil 4-67: KLN505 kodlu formülasyon ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü	177
Şekil 4-68: NLT532 kodlu formülasyon ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü	177
Şekil 4-69: NE550 kodlu formülasyon ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü	178
Şekil 4-70: Piyasa preparatı ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü...	178
Şekil 4-71: KLN505 kodlu formülasyonunun 5°C'deki stabilitesi.....	180
Şekil 4-72: KLN505 kodlu formülasyonunun 25°C'deki stabilitesi.....	180
Şekil 4-73: KLN505 kodlu formülasyonunun 40°C'deki stabilitesi.....	181
Şekil 4-74: NLT532 kodlu formülasyonunun 5°C'deki stabilitesi	182
Şekil 4-75: NLT532 kodlu formülasyonunun 25°C'deki stabilitesi	183
Şekil 4-76: NLT532 kodlu formülasyonunun 40°C'deki stabilitesi	183
Şekil 4-77: NE550 kodlu formülasyonun 5°C'deki stabilite sonuçları.....	185
Şekil 4-78: NE550 kodlu formülasyonun 25°C'deki stabilite sonuçları.....	185
Şekil 4-79: NE550 kodlu formülasyonun 40°C'deki stabilite sonuçları.....	186
Şekil 4-80: KLN505 kodlu formülasyonun EE (%) değerleri	187
Şekil 4-81: NLT532 kodlu formülasyonun EE (%) değerleri.....	188
Şekil 4-82: NE550 kodlu formülasyonun EE (%) değerleri	189
Şekil 4-83: KLN505 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda zeta potansiyelleri	190
Şekil 4-84: NLT532 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda zeta potansiyelleri	191
Şekil 4-85: NE550 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda zeta potansiyelleri	192
Şekil 4-86: KLN505 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda viskozite ve pH değerleri	193
Şekil 4-87: NLT532 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda viskozite ve pH değerleri	194
Şekil 4-88: NE550 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda viskozite ve pH değerleri	195
Şekil 4-89: KLN505 kodlu formülasyonun sıcaklık ve günlere bağlı % CI değerleri .	196
Şekil 4-90: NLT532 kodlu formülasyonun sıcaklık ve günlere bağlı %CI değerleri..	197
Şekil 4-91: KLN505 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (2500x).....	198

Şekil 4-92: KLN505 kodlu formülasyona ait 6.ay SEM görüntüsü (5000x büyütme).	198
Şekil 4-93: NLT532 kodlu formülasyona 6. ay SEM görüntüsü (5000x)	199
Şekil 4-94: NLT532 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (5000x)	199
Şekil 4-95: NE550 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (2500x).....	200
Şekil 4-96: NE550 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (7500x).....	200



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AMD	Age Related Macula Degeneration/ Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
BCS	Biopharmaceutical Classification System/ Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
BN	Bağıl Nem
CAS	Chemical Abstracts Service / Kimyasal Bildiri Servisi
cGMP	Current Good Manufacturing Process / Güncel İyi İmalat Uygulamaları
CQA	Critical Quality Attributes / Kritik Kalite Özellikleri
DED	Dry Eye Disease/ Kuru Göz Sendromu
DLS	Dynamic Light Scattering/Dinamik Işık Kırınımı
DoE	Design of Experiment / Deneysel Tasarım
DR	Diyabetik Retinopati
DSC	Differential Scanning Calorimetry / Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GMP	Good Manufacturing Process / İyi İmalat Uygulamaları
GRAS	Generally recognize as safe/ Güvenli Materyel
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	International Conference (Council) on Harmonization / Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
KAB	Kan Aköz Bariyeri
KLN	Solid Lipid Nanoparticles/ Katı Lipit Nanopartiküller

LE	Loteprednol Etabonat
LOD	Limit of Detection / Teşhis Limiti
LOQ	Limit of Quantification / Miktar Tayini Limiti
NE	Nanoemülsiyon
NLT	Nanostructured lipid Carriers / Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar
NMO	Nöromiyelitis Optika Sendromu
ON	Optik Nörit
QbD	Quality by Design / Kalite Tasarımı
RE	Relative Error / Bağlı Hata
RSD	Relative Standart Deviation / Bağlı Standart Sapma
Rt	Retention time / Tutulma zamanı
SEM	Scanning Electron Microscopy / Taramalı Elektron Mikroskopisi
YK	Yükleme kapasitesi

ÖZET

Üner, B. (2021). Göze uygulanmak üzere ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı hakkında çalışmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Loteprednol etabonat (LE), korneanın ve gözün ön segmentinin inflamatuvar rahatsızlıklarının tedavisi ve ödeminin azaltılmasında kullanılan topikal bir kortikosteroiddir. Oküler biyoyararlanımı düşük olan LE'nin baş ağrısı, korneal bozukluk, gözde akıntı, oküler rahatsızlık ve gözde kuruluk gibi yan etkileri vardır. LE'nin yan etkilerinin azaltılması, biyoyararlanımının ve tedavi edici özelliğinin artırılması geleneksel topikal dozaj şekline alternatif olarak geliştirilecek yeni dozaj şeklinin tasarımı ile mümkün olabilir. KLN, NLT ve NE suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların oküler yolla uygulanabilmesi için avantaj sağlayan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemler, partikül/damlacık büyüklüğünün nanometre seviyesinde olması nedeniyle korneadan ilaç geçişini kolaylaştırırlar. Ayrıca, sterilizasyona ve büyük çaplı üretime uygun sistemlerdir. Bu çalışmada, deneysel tasarım (DoE) ile LE'nin KLN, NLT ve NE formülasyonlarının geliştirilmesi kalite tasarımı (QbD) kapsamında yapılmıştır. Formülasyonlarda katı lipit olarak Precirol® ATO 5, sıvı yağ olarak oleik asit kullanılmıştır. Formülasyonlarda kullanılan total lipit/sıvı yağ oranı %4, %5, %6, %7 ve %8 oranında kullanılırken en stabil formülasyonlar Pluronic® F68'in %5 kullanıldığı formülasyonlar olarak tespit edilmiştir. Bu formülasyonlar içerisinde KLN ve NLT 100 nm'nin altında partikül büyüklüğüne ve NE'un 140 nm'nin altında damlacık büyüklüğüne sahip olduğu ve 180 gün boyunca en yüksek stabiliteyi 5 °C' de gösterdikleri saptanmıştır. Formülasyonlardan ilacın salımının Korsmeyer-Peppas salım kinetiğine göre Fick'in 1. Yasası ile tarif edilen difüzyon yoluyla olduğu tespit edilmiştir. Seçilen formülasyonlar sıgır gözünden kesilip çıkarılan korneadan *ex vivo* geçiş çalışması yapılarak denenmiş ve korneada tespit edilen en yüksek ilaç miktarını KLN ve NLT formülasyonları gösterirken, kornea yüzeyinde tespit edilen en yüksek ilaç miktarının kontrol grubu ve piyasa preparatında olduğu görülmüştür. Bu çalışmada tasarımı yapılan formülasyonlar ile LE'nin süspansiyonuna kıyasla biyoyararlanımının artırılması mümkün olabilecektir. Kullanılan kortikosteroid miktarı azaltılarak antiinflamatuvar etki için bir alternatif sunulabilecektir.

Anahtar Kelimeler : loteprednol etabonat, katı lipit nanopartikül, nanoyapılı lipit taşıyıcı, nanoemülsiyon, oftalmik uygulama

ABSTRACT

Uner, B. (2021). Studies on the design of drug delivery systems for ophthalmic application. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. Ph. D. Thesis, İstanbul.

Loteprednol etabonate (LE) is a topical corticosteroid used for the treatment of inflammatory conditions of the cornea and anterior segment of the eye and for the reduction of edema. LE, which has low ocular bioavailability, has side effects such as headache, corneal disorder, eye discharge, ocular discomfort and dry eye. Reducing the side effects of LE, increasing its bioavailability and therapeutic properties may be possible with the design of a new dosage form to be developed as an alternative to the traditional topical dosage form. Colloidal nanoparticulate systems (SLN, NLC and NE) are advantageous systems for ocular administration of drugs with low water solubility. Since the droplet/particle size is at the nanometer level, they facilitate the passage of drugs through the cornea. These systems are suitable for sterilization and large-scale production. In this study, the experimental design (DoE) of LE and the design of SLN, NLC and NE formulations were made within the scope of quality design (QbD). While Precirol® ATO 5 was used as lipid in SLN and NLC formulations, oleic acid was used for NE and NLC formulations. While the total lipid/fat ratio used in the formulations is 4%, 5%, 6%, 7% and 8%, the most stable formulations are those using 5% Pluronic® F68. Among these formulations, it was determined that the particle size of SLN and NLC was below 100 nm, droplet size of NE was below 150 nm, and showed the highest stability at 5 °C for 180 days. It was determined that the release of the drug from the formulations was in accordance with the Korsmeyer-Peppas release kinetics and was via diffusion according to Fick's 1st Law. The selected formulations were tested by performing an *ex vivo* permeation study from the cornea excised from the bovine eye, SLN and NLC formulations showed the highest amount of drug detected in the corneal epithelium, while the highest amount of drug detected on the corneal surface was seen in the control group and marketing product. With the formulations developed in this study, it will be possible to increase the bioavailability of LE compared to the suspension form. By reducing the amount of corticosteroid used, an alternative could be offered for anti-inflammatory effect.

Key Words: loteprednol etabonate, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, nanoemulsion, ophthalmic administration

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kortikosteroidler, birçok göz hastalığının tedavisinde önemli bir yer teşkil etmektedir. Endikasyonlara göre uygun kortikosteroidlerin seçimi ve uygulama metodları ile birlikte kullanımları tartışılmaktadır (Ericson-Neilsen ve Kaye 2014). Gözün alerjik reaksiyonları, iltihabi durumları ve göz cerrahisini takiben ameliyat sonrası oluşan iltihabın tedavisinde genellikle hedeflendirilmiş ve sistemik yan etkileri en aza indirgenmiş bir tedavi sağlamak için kortikosteroid içeren damlalar tercih edilmektedir (Pan ve ark. 2015; Holland ve ark. 2019).

Gözde çeşitli statik (korneal epitel, stroma ve kan-aköz bariyeri) ve dinamik bariyerler (konjonktival kan akışı, lenfatik akış ve lakrimasyon gibi anatomik bariyerler) bulunmaktadır. Bu bariyerler uygulanan topikal ilaçların gözden hızla atılması ile penetre olan ilaç miktarının düşük olması nedeniyle uygulama sıklığının artmasına neden olmaktadır (Shimazaki ve ark. 2012; Pan ve ark. 2015; Gorantla ve ark. 2020).

İstenen antiinflamatuvar etkiyi sağlamak ve ardından inaktif metabolitlere hızlıca dönüşebilmesi için prednizolonun modifikasyonu yoluyla tasarlanmış olan LE oküler yolla uygulanan topikal bir kortikosteroiddir (Timothy ve ark. 2018; Fong ve ark. 2019).

Oküler kortikosteroidlerin genel olarak kabul edilmiş bir etki mekanizmasının olmamasına rağmen, fosfolipaz A2 inhibitör proteinleri olan lipokortinleri indükleyerek etki ettikleri düşünülmektedir. Bu proteinlerin membran fosfolipidlerinden araşidonik asit açığa çıkmasını inhibe ederek prostaglandinler ve lökotrienler gibi güçlü inflamasyon mediatörlerinin biyosentezini kontrol ettikleri öne sürülmektedir (Reddy ve Kim 2011).

Oküler uygulanan ilaçların geleneksel topikal dozaj şekillerinden elde edilen biyoyararlanımı çok düşüktür ve uygulanan ilacın %5-10' undan daha azının iç oküler dokulara ulaştığı bildirilmiştir (Fong ve ark. 2019). Bunun yanı sıra korneal kalış süresini uzatma ve transkorneal geçirgenlik özelliklerini iyileştirmeye yönelik yaklaşımların, göz içi biyoyararlanımı artırabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Balguri ve ark. 2016). Son yıllarda, mumlar veya yağlar gibi lipofilik bileşenler kullanılarak hazırlanan kolloidal nanopartiküler sistemler oküler uygulamada umut verici ilaç taşıyıcı sistemler olarak popülerlik kazanmıştır (Balguri ve ark. 2016; Üner ve ark. 2017; Özdemir ve ark. 2019).

KLN, NLT ve NE, özellikle lipofilik ilaçların verilmesi için tasarlanmış ve geliştirilmiş koloidal sistemlerdir. Bu sistemler: biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bileşenlerden meydana gelir, nanometre büyüklüğündedir ve işlem ölçeğinin büyütülmesi mümkündür (Deli ve ark. 2009; Üner ve ark. 2017; Balguri ve ark. 2016). Bu formülasyonlarda kullanılan tüm yardımcı maddeler genellikle güvenli olarak kabul edilir (GRAS), geleneksel uygulanan sistemlere kıyasla tahriş edici ve toksik olmayan bu bileşenler, gözde meydana gelen hasarlı veya iltihaplı durumlarda kullanım için çok uygundur.

Son yıllarda, ilaç üretiminde özellikle kalite ve risk yönetiminde önemli gelişmeler yaşanmaktadır. Kalite tasarımı (Quality by Design-QbD) meydana gelen önemli gelişmelerdendir, özellikle akademik ve endüstriyel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Aksu ve Mesut 2015; Özdemir ve ark 2018). QbD çalışmalarının temelini ürünün ve işlemin bilimsel olarak anlaşılması, dolayısıyla da istatistiksel deney tasarımları (Design of Experiments, DoE) oluşturmaktadır.

Deney tasarımı (DoE), optimum değerler için reaksiyon alanını tarama amacıyla, aynı anda farklı faktörlerin varyasyonuna izin veren, reaksiyon ve işlem optimizasyonuna yönelik istatistiksel bir yaklaşımdır. Kimyasal ürünlerin geliştirilmesinde, DoE, optimizasyonun hızlandırılması için referans bir yöntem haline gelerek, az sayıda deney ile çok sayıda parametrenin değerlendirilmesine izin vermektedir (Murray ve ark. 2016). Bu sayede, işlemin daha kısa sürede daha iyi şekilde anlaşılması ve üretimin geliştirilmesinde harcanan zamanın kısılması mümkün olabilmektedir (Souza ve ark. 2013).

Bu tez çalışmasında, oküler yolla uygulanmak üzere LE yüklü KLN, NLT ve NE'ların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu sistemler tasarlanırken, QbD yaklaşımından yararlanılmıştır. Bu formülasyonların tasarımında sırasıyla, etkin madde miktar tayini, lipid ve sürfaktan görüntüleme çalışmaları, formülasyonların hazırlanma koşullarına yönelik çalışmalar ve bu formülasyonların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. KLN, NLT ve NE formülasyonlarının silanize edilmiş flakonlarda 5 °C, 25 °C (%60 BN $\pm$ %5) ve 40 °C' de (%75 BN $\pm$ %5) 6 ay süresince iklimlendirme kabinlerinde (karanlıkta) bekletilerek stabilite çalışmaları yapılmıştır. Formülasyonlardan ilacın *in vitro* salımı Franz difüzyon hücreleri kullanılarak tayin edilmiştir. Kararlı olduğu tayin edilen formülasyonların sıgır gözü korneasından geçişi ve dokularda tutulumu *ex vivo* geçiş

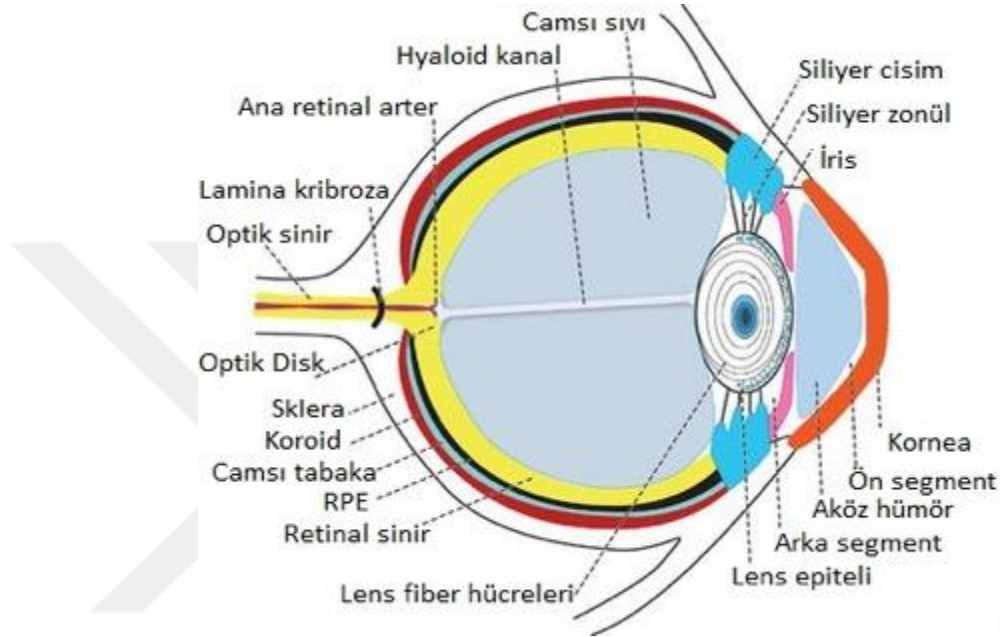
alışması ve bant sıyırma yöntemi ile yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler istatistiksel olarak kıyaslanarak, aralarındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığı tayin edilmiştir. Formülasyonların korneaya herhangi bir zarar verip vermediğinin tespit edilmesi amacıyla, kornealar histopatolojik olarak da incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi

Göz insan vücudunun en karmaşık organlarından biridir. Üç katmandan oluşmaktadır (Şekil 2-1) (Zhu ve ark. 2012).



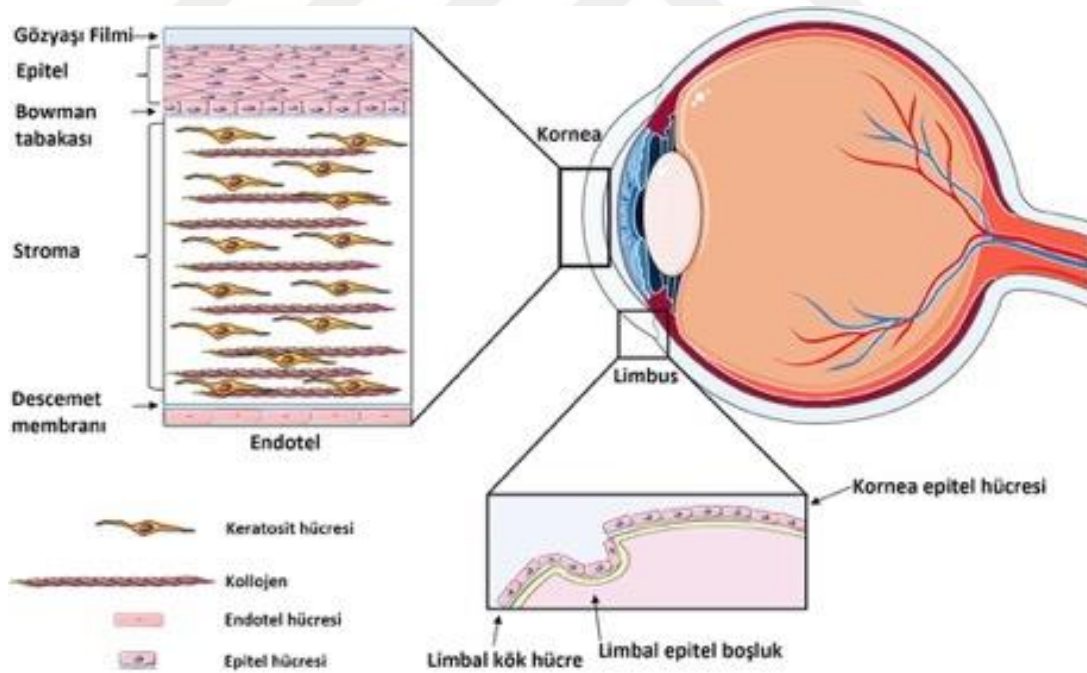
Şekil 2-1: Gözün yapısı (Zhu ve ark. 2010)

Gözün dış kısmını kornea ve sklera (sert tabaka) oluşturur. Kornea ışığı kırarak merceğe, oradan da retinaya iletir ve gözü enfeksiyondan dolayı meydana gelecek daha ciddi yapısal hasara karşı korur. Sklera gözü iç ve dış etkilerden koruyarak aynı zamanda göze şeklini de veren bağ dokusundan oluşur. Sklera'nın görünen kısmı, konjonktiva olan transparan bir mukoz membranla kaplıdır (Willoughby ve ark. 2010; Sridhar 2018). Gözün orta tabakası iris, siliyer cisim, koroidden oluşur. İris, gözbebeğinin boyutunu ve dolayısıyla retinaya ulaşan ışık miktarını kontrol eder; siliyer cisim merceğin gücü ve şeklini kontrol eder. Bunun yanı sıra iris aköz hümörün üretim yeridir ve retinanın dış katmanlarına oksijen ve besin sağlayan vasküler bir katmandır (Willoughby ve ark. 2010; Sridhar 2018; Pradeep ve ark. 2021). Gözün iç tabakası ise, ışığı yakalayan ve işleyen nöronların karmaşık, katmanlı bir yapıda bulunduğu retinadır. Oküler tabakalarla çevrili

olan üç şeffaf yapı ise aköz hümör, camısı (vitröz) sıvı ve lenstir (Willoughby ve ark. 2010).

2.1.1. Kornea ve Sklera

Kornea, gözün en ön kısmıdır, iris ve göz bebeğinin önünde bulunmaktadır. Vücudun en yoğun sinir ağına sahip dokusudur ve çoğu kornea siniri, trigeminal sinirin oftalmik dalından türetilen duyu sinirleridir. Yetişkin bir insan gözünün korneası, ortalama 11.5 mm yatay çapa ve 10.5 mm dikey çapa sahip olup, yaşam boyunca sabit kalan bir eğriliktedir. Korneanın kırma fonksiyonunun büyük bir kısmına yardımcı olan optik bölge (pre-pupiller kornea) 4 mm çapındadır ve korneanın merkezinde, göz bebeğinin önünde bulunmaktadır (Willoughby ve ark. 2010; Sridhar 2018). Kornea damarsız bir yapıya sahiptir, ön siliyer arterlerin dalları, korneanın periferlerini besleyen kemerler oluşturarak kornea ve skleranın birleştiği (limbus) kısımda sonlanmaktadır (Şekil 2-2) (Kiwela ve ark. 2015; Masterton ve Ahearne 2018).

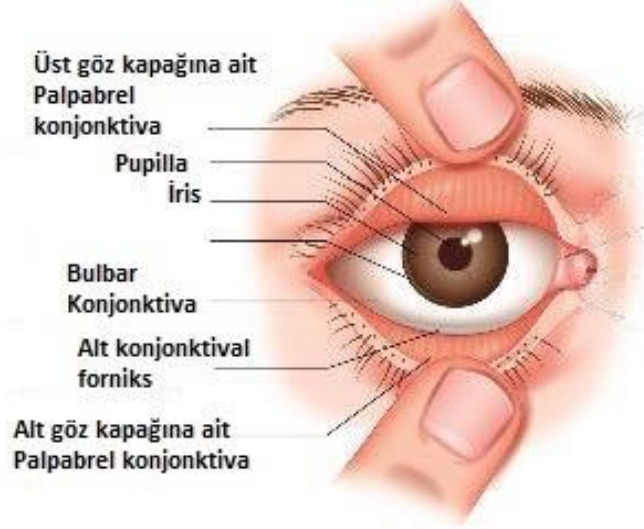


Şekil 2-2: Kornea ve katmanları (Masterton ve Ahearne, 2018)

İnsana korneası, 5 katmandan oluşmaktadır: epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel (Şekil 2-2) (Masterton ve Ahearne 2018). Kornea

epitelinin yüzeyi, kornea yüzeyini koruyan gözyaşı filmi ile kaplıdır. Gözyaşı filmi gözü kimyasal, toksik veya yabancı cisim hasarından ve mikrobiyal etkenlerden korumaktadır (Dart ve Willcox 2013). Kornea epitel, iki ila üç sıra yüzeyel hücre, iki ila üç sıra kanat hücresi ve bir sıra bazal hücreden oluşmaktadır. Yüzeyel epitel hücrelerin yüzeyi, üstteki gözyaşı filmi ile etkileşime giren mikropolikaların varlığından dolayı düzensizdir. Bunun yanında yine epitel yüzeyinde 50'den az aminoasitten oluşan pozitif (+2 veya daha fazla) ve negatif yüklü antimikrobiyal peptitler bulunmaktadır (McDermott 2009; Loret ve ark. 2010). Ön bazal membran kornea epitel hücrelerinin kavşak noktası niteliğinde olduğu için, stabil bir yapıdadır ve geçirgenliği son derece düşüktür (Mantelli ve ark. 2013). Epitel ve Bowman tabakasını içeren ön bazal membranın ortalama gözenek büyüklüğü 92 nm' dir (Chen ve ark. 2017). Bu katmandan sonra gelen ve kornea kalınlığının %90' ını oluşturan stroma tabakasının %80'i sudan oluşmakla birlikte, kollajen, proteinler, mukopolisakkaritler ve proteoglikanlardan meydana gelmektedir (Moiseev ve ark. 2019). Descemet membranı (DM) ise endotel hücrelerinin salgılanması sonucu endotel stromadan ayıran bir membrandır. Descemet membranı, belirli proteinlerin aköz hümörden kornea stromasına sızmasını önleyebilir. Kornea endotelyumu da, kendini yenileme potansiyeli çok düşük veya hiç olmayan, beş ila yedi kenarlı endotel hücrelerinin oluşturduğu tek bir tabakadan meydana gelmektedir (Willoughby ve ark. 2010). Endotelin kalınlığı yaklaşık 5 µm'dir ve tek tabakalı yassı ve küboidal hücrelerden oluşur (Moiseev ve ark. 2019).

Gözün dış tabakasını oluşturan ve en güçlü yapı olan sklera, kollajen fibrillerden meydana gelir. Gözün içeriğini hem iç hem de dış streslerden, zorlamalardan koruma ve stabilize etme önemli biyomekanik roller üstlenirken; göz küresinin, boyutunun ve şeklinin belirlenmesinde en önemli unsurdur (Read ve ark. 2016). Konjonktiva ise göz küresine koruma sağlayan diğer bir tabakadır (Şekil 2-3) (Mikkelsen 2020). Palpebral konjonktiva kan damarlarına sahiptir ve göz kapaklarının arka yüzeyini oluşturmaktadır. Konjonktiva, iki veya daha fazla izoprizmatik ile yüksek derecede prizmatik epitel hücre katmanı içermektedir. Bulbar konjonktiva ise, üst ve alt fornikslerden başlayan ve sklera üzerinde kornea bölgesine kadar uzanan avasküler, hafif hareketli bir tabakadır. Bulbar konjonktivaya ait oluşum, keratinize olmayan çok katlı epitel hücrelerinden meydana gelir (Moiseev ve ark. 2019).



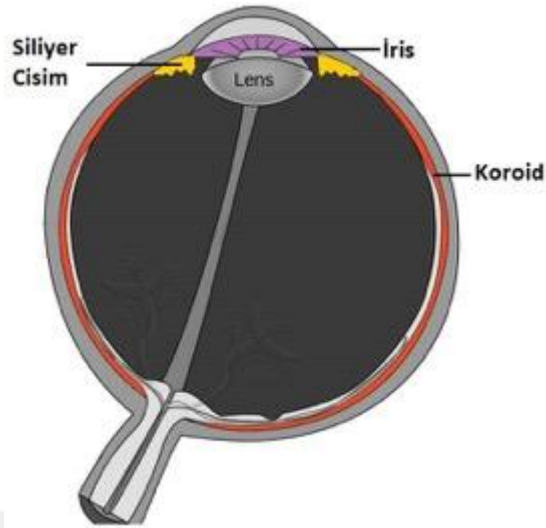
Şekil 2-3: Konjonktiva ve bölümleri (Mikkelsen 2020)

2.1.2. İris, Siliyer Cisim ve Koroid

İris, gözün ön ve arka segmentini ikiye ayırmaktadır. Gözün çevresinden siliyer cismin ön kısmına bağlanan bu anatomik yapının merkezine pupilla (göz bebeği) adı verilir. Pupillanın açıklığı, irise ait stroma (vasküler bağ dokusu) içerisinde yer alan sfinkter ve dilatör kaslar tarafından ayarlanır ve göze gelen ışık miktarı bu şekilde kontrol edilir (McDougal ve Gamlin 2015).

İrisin hemen arkasında, aköz hümörün üretimi ve uveasklral akımından sorumlu siliyer cisim bulunmaktadır (Şekil 2-4). Buna ek olarak siliyer cisim, hiyalüronat üretimi, camsı (vitröz) tabaka içerisine salınması ve kan-aköz bariyerin (KAB) korunmasından sorumludur (Moiseev ve ark. 2019). İris ile camsı cisim arasında, şeffaf bikonveks ve avasküler yapıda kolajenlerin oluşturduğu elastik yapının içerisinde kristalize halde lens bulunmaktadır (Şekil 2-4) (Jones 2021). Lensin gözün (korneadan sonra) en güçlü ikinci yapı olarak ışığı kırmış olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Andley 2007;

Moiseev ve ark 2019). Lens, göze gelen ışığı kırarak retinaya odaklamaya yardımcı olmaktadır.



Şekil 2-4: İris, siliyer cisim, lens ve koroid (Jones 2021)

Gözün orta tabakasına ait son kısım olan koroid, sklera ile Bruch membranı (BM) arasında ora serratadan (retinanın ön kısmının bittiği bölge) optik sinire uzanan vasküler bir tabakadır. Koroid katman, Burch membranı, koryokapiller bölge, stroma, melanositler, bağ dokusu elemanları (fibroblastlar, mastositler, elastik ve kollajen fibriller dahil), kan damarları, makrofajlar, dendritik hücreler, lenfositler, vasküler olmayan hücreler, düz kas hücreleri, nöronlar ve sinir liflerinden meydana gelir (Nag ve ark. 2017; Schachat ve ark. 2017; Moiseev ve ark. 2019).

2.1.3. Retina

Retina, gözün en iç tabakasıdır, algısal olmayan ön kısım ve ora serrata tarafından bölünen optik özellikte diğer bir kısımdan oluşmaktadır. Herhangi bir algısal fonksiyon sağlamayan ön kısım, siliyer cisim ve irisi de içinde barındıran bilaminar epitel ile kaplıdır. Retinanın arka kısmı, ora serratadan optik diske kadar uzanır ve sadece bu iki yere bağlanır. Bunun yanı sıra, optik retina üzerinde, makula (makula lutea veya merkezi retina) olarak adlandırılan ve optik diskin merkezine yaklaşık 4 mm temporal ve 0,8 mm aşağıda ortalanmış, yaklaşık 5.5 mm çapında bir alan vardır. Retinanın optik kısmı, retina pigmentli epitel (RPE; dış tabaka) ve serebral epitelden (iç tabaka) oluşur. RPE, nöro-

duyusal tabakanın beslenmesinden ve metabolik ürünleri ortadan kaldırmaktan sorumludur. Buna ek olarak, kan-retina bariyerinin (BRB) korunmasında önemli bir rol oynar. Retinanın iç kısmında yer alan fotoreseptörler (ilk nöronu oluşturan yaklaşık 120 milyon çubuk ve 6-7 milyon koni hücresi), bipolar hücreler (ikinci nöron) ve çok kutuplu ganglion hücreleri (üçüncü nöron) ile birlikte yatay ve amakrin hücrelerden oluşur (Kim ve Woo 2021). Çubuk hücreler, görsel fototransdüksiyonda ışığa duyarlı bir molekül olan rodopsini kullanarak düşük ışık seviyelerinde hareket eden çevresel görüşten sorumludur. Bu nedenle retina, ışık enerjisinin optik sinir yoluyla görsel kortekse iletilerek beyin tarafından çevreyi “görmeye” yardımcı olan bir sinir sinyaliye dönüştürüldüğü yerdir (Moiseev ve ark. 2019).

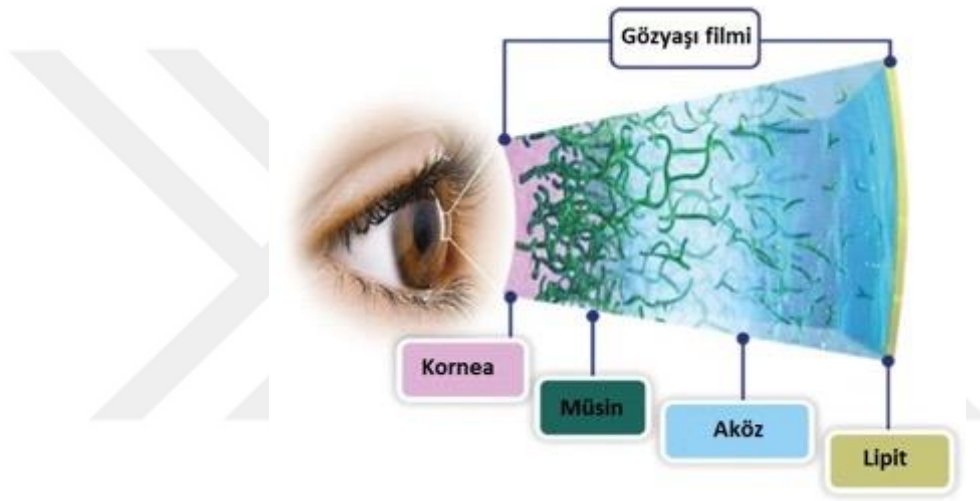
2.1.4. Nazolakrimal Sistem

Nazolakrimal sistem, gözyaşını gözün yüzeyinden burun boşluğuna iletir. Lakrimal bez, konjonktivanın epitel hücrelerinden oluşan ekzokrin bir bezdir. Gözyaşının sulu kısmını salgılayan kanallar içerir. Gözyaşı, nazolakrimal boşluklardan kanal sistemine girer ve göz kapağındaki nazolakrimal kanalcıklar aracılığıyla iletilir. Bu kanalcıklar gözyaşı kesesine boşalır. Gözyaşı, burun boşluğuna çıkan kemik içinde bulunan gözyaşı kanalı boyunca akmaya devam eder (Şekil 2-5) (Ali ve ark. 2017).



Şekil 2-5: Lakrimal sistemin anatomisi (Örge ve Boente 2014)

Gözyaşı drenajı karmaşık bir olaydır. Gözyaşının sadece yerçekimi etkisiyle akışı gerçekleşmez. Normal bir lakrimal akış sisteminde, göz kası (orbikularis okuli) tarafından kontrol edilen göz kırpma, lakrimal kesenin aynı anda açılmasıyla birlikte nazolakrimal kanalcıkların kapanmasına neden olur. Sonuç olarak, negatif bir basınç oluşturularak gözyaşının nazolakrimal boşluk ve kanalcıklar yoluyla keseye çekilmesi sağlanır. Göz kapakları açıldığında ise, bu boşluklar tekrar açılır ve lakrimal kesede pozitif basınç tekrar oluşturulur, bu sayede gözyaşı nazolakrimal kanaldan buruna pompalanmış olur (Holds ve ark. 2012).



Şekil 2-6: Gözyaşı filmine ait katmanlar (Wilcox ve ark. 2017)

Nazolakrimal sistemi oluşturan bir diğer bileşen ise gözyaşı filmidir (Şekil 2-6). Gözyaşı filmi, 2-5 μm kalınlığında olup 3 tabakadan oluşur. Birinci tabaka iç müsin tabakasıdır, gözyaşı filminin oküler yüzey üzerinde düzgün şekilde dağılmasını sağlar ve konjonktival epitelyumun goblet hücreleri tarafından salgılanır. İkinci tabaka ise orta aköz tabaka olarak geçer, ana ve yardımcı gözyaşı bezleri tarafından salgılanır. Son tabaka olan yağlı dış tabaka ise; ağırlıklı olarak pozitif yüklü olup, sulu tabakanın buharlaşmasını önleyerek gözyaşı filminin stabilitesini korur (Tran ve Routledge, 2003; McClure 2018). Bu tabakanın sağlıklı olması durumunda gözyaşları buharlaşır ve bu da göz kuruluğu semptomlarına yol açabilir. Göz daha sonra bu durumu gözyaşını daha da sulandırarak telafi etmeye çalışır (Örge ve Boente 2014).

2.2. Gözde Meydana Gelen İnflamasyonların Patogenezi ve Sınıflandırılması

Gözün yapısı son derece organize ve karmaşıktır. Görme eksen (korneadan, ön kamara ve retina kadar olan kısım) içerisinde meydana gelen herhangi bir iltihaplanma görüşü olumsuz etkileyebilir (Chen ve Sheu 2017). Oküler inflamasyon oftalmolojide gündemde olan bir konu haline gelmiştir, aynı zamanda tıp ve eczacılık ile ilgili alanların (dahiliye, cerrahi, fizyoloji, farmakoloji, mikrobiyoloji ve farmasötik teknoloji) da ilgisini çekmektedir.

Gözde özellikle göz kapakları, oküler yüzey, sklera, uvea, retinal damarlar ve optik sinirler de dahil olmak üzere farklı yerlerde birçok oküler inflamatuvar hastalık meydana gelmektedir. Oküler inflamasyonun etiyojisi, teşhisi ve tedavisinin yönetimi, iyi huylu ve kendi kendini sınırlayan koşullardan organı tehdit eden bozukluklara kadar çeşitli zorlukları içerisinde barındırmaktadır. Bunun yanı sıra, son zamanlarda yaşa bağlı makula dejenerasyonu, diyabetik retinopati ve retina damar tıkanıklığına bağlı makula ödemi gibi inflamatuvar olmadığı öngörülen bazı bozuklukların da, bazı inflamatuvar araçlara bağlı olduğu ve bu nedenle en azından kısmen inflamatuvar olarak tedavi edilmesi gerektiği netlik kazanmıştır (Huerva ve ark. 2015).

Tablo 2-1: Gözde meydana gelen inflamatuvar hastalıklar

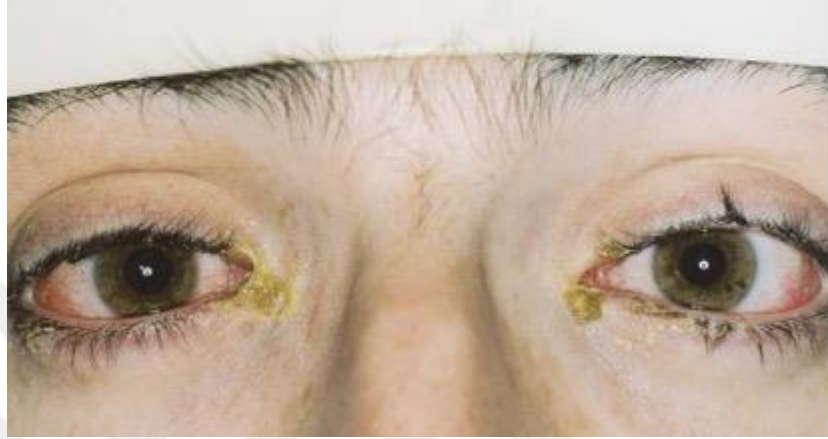
Gözün Kısımları	İnflamatuvar Hastalık
Göz kapağı	Blefarit
Oküler Yüzey (konjonktiva ve kornea)	Konjonktivit, Keratit, Kuru Göz Hastalığı (DED)
Uvea	Uveit
Sklera	Sklerit
Retina	Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (AMD), Diyabetik Retinopati (DR), Retinal Ven Tıkanıklığı (RVO), Retinitis Pigmentosa (RP)
Optik Sinirler	Nöromiyelitis Optika Sendromu (NMO), Optik Nörin (ON), Papillitis

Gözdeki inflamasyonlara gözün kısımları üzerinden bakılacak olursa, öncelikle göz kapağına bağlı gelişen bir hastalık olan blefaritten bahsetmek gerekir. Blefarit, göz kapağı kenarının inflamasyonu ile karakterize ve korneayı da etkileyebilen yaygın bir göz hastalığıdır. Etiyolojisi tam bilinmemekle beraber göz kapaklarında tahriş, kepeklenme, hiperemi ve yabancı cisim hissi ile ilişkili inflamatuvar bir durumdur. Aynı zamanda, seboreik dermatit, rozasea ve egzama dahil olmak üzere çeşitli dermatolojik durumlarla blefaritin ilişkili olduğu görülmüştür. Blefarit, göz kapağı kenarının ön veya arka bölümünü tutması ve klinik bulgularına göre 6 grupta (göz kapak kenarının önü ya da arkası, primer, sekonder, akut ve kronik olarak) incelenmektedir. Blefarit genellikle anatomik yerleşime göre sınıflandırılır. Göz kapak kenarının ön kısmındaki blefarit, hem stafilokokal hem de seboreik blefariti içeren kirpik kenarını etkileyen inflamasyon olarak tanımlanır; ve göz kapak kenarının arka kısmındaki blefarit, meibomian bezi tutulumu olarak tanımlanır. Primer blefaritte, stafilokok toksinlerinin neden olduğu rozasea, sebore ve aşırı duyarlılık görülür. Sekonder blefarit, bakteriyel, viral enfeksiyöz süreçler veya pitiriyazis (bir tür mantar) ve Demodex (bir tür akar) nedeniyle meydana gelmektedir (Putnam 2016). Akut blefaritte, etiyoloji bakteriyel, viral veya parazitik olabilir. Bunun yanında akut ülseratif (genellikle stafilokokal veya herpetik) ve akut nonülseratif (tipik olarak alerjik) olarak da ayrılabilir. Akut blefarite göre daha yaygın şekli olan kronik blefarit hem göz kapağı kenarı hem de göz kapağının enfeksiyonunu kapsamaktadır (Bernardes ve Bonfioli 2010).

Oküler yüzey, konjonktiva ve korneadan meydana gelmektedir. Konjonktiva normal şartlarda hem lenfoid doku hem de gözde bulunan doğal savunma mekanizmaları sayesinde kendisini korumaktadır. Kişilerin bağışıklığının düşmesi veya mikroorganizmaların çeşitli yollarla vücut direncini kırmasıyla konjonktivit meydana gelir.

Konjonktivit, konjonktival dokunun iltihaplanması ve ödemi ile karakterize; kan damarlarının şişmesi, oküler akıntı ve ağrının eşlik ettiği gözün inflamatuvar rahatsızlıklarından biridir (Palamar 2021). Dünya çapında pek çok kişi konjonktivitten etkilenmekte ve oftalmoloji kliniklerini bu nedenle sıklıkla ziyaret etmektedir. Ayrıca tüm akut konjonktivit vakalarının %80'inden fazlasının dahiliye uzmanları, aile hekimleri, çocuk doktorları ve hemşireler de dahil olmak üzere oftalmolog olmayan sağlık çalışanları tarafından teşhis edildiği bildirilmektedir. Konjonktivit; etiyoloji,

kroniklik, şiddet ve çevre doku tutulumunun yaygınlığına göre sınıflandırılabilir. Konjonktivitin etiyojisi enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayabilir. Enfeksiyöz konjonktivitin en sık nedeni viral konjonktivit ve ardından bakteriyel konjonktivit iken, enfeksiyon kaynaklı olmayan konjonktivitler daha çok alerjik ve toksin kaynaklıdır (Azari ve Arabi 2020).



Şekil 2-7: Bilateral konjonktivit (Pokroy ve Marcovich 2003)

Keratit, korneanın iltihaplanmasıdır ve kornea ödemi, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve siliyer tıkanıklığı ile karakterizedir. Bunun yanı sıra sistemik veya oküler yüzeyde lokalize olabilen hem enfeksiyöz hem de enfeksiyöz olmayan hastalıklarla ilişkilidir. İnflamatuvar reaksiyon, kornea epitelinin ve stromanın tamamen erimesiyle sonuçlanarak ülser oluşumuna neden olabilir. Bu sadece kornea berraklığının kaybolmasına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda göz küresinin bütünlüğünü de tehdit eder. Bu gibi durumlar kornea kaynaklı körlüğe neden olabilir. Keratitli hastaların en sık şikayetleri gözde kızarıklık, ağrı, tahriş, fotofobi, görme azalması veya kozmetik kusur olarak gözlemlenmiştir (Upadhyay ve ark. 2015). Kendi içerisinde enfeksiyöz (bakteriyel, protozoal, fungal, viral ve helmentik) ve enfeksiyöz olmayan (lokal, periferik ülseratif keratit, nörotropik korneal ülser ve kseroftalmi-A vitamini eksikliği) şekilde iki alt gruba ayrılır. Keratit türleri arasında enfeksiyöz keratit (özellikle mikrobiyal keratit) çoğunluğu oluşturur (Kheir ve ark. 2015).

Kuru göz hastalığı (DED), diğer ismi ile keratokonjunktivit sicca gözyaşı filmi homeostazının kaybı ile karakterizedir. Gözyaşı filmi instabilitesi, göz yaşı hiperosmolaritesi, oküler yüzey iltihabı, oküler yüzey hasarı ve nörosensoriyel

anormallikler gibi faktörler DED'nin etiyolojisinde rol oynar. (Craig ve ark. 2017). DED, geleneksel olarak iki kategoriye ayrılmıştır: gözyaşı salgısı eksikliği ve gözyaşının buharlaşması. Gözyaşı salgısının eksikliği, Sjogren Sendromu (birincil veya ikincil), gözyaşı kanallarının tıkanıklığı gibi gözyaşı bezi hastalıkları veya gözyaşı üretimini baskılayıcı sistemik ilaçlardan kaynaklı nedenlerle yetersiz gözyaşı üretimi ile karakterizedir. Gözyaşının buharlaşmasından kaynaklı kuru göz sendromu ise, artan gözyaşı filmi buharlaşması ile karakterizedir ve en sık olarak meibomian bez disfonksiyonundan kaynaklanır. Meibomian bezleri, göz kapağı kenarlarını kaplamaktadır. Bu bezler, gözyaşı filminin lipid tabakası haline gelen ve gözyaşlarının buharlaşmasını azaltan yağları salgılar. Gözyaşı buharlaşmasının artmasının diğer önemli nedenleri arasında zayıf göz kırpma (düşük hız, eksik kapak kapanması), kapak açıklığındaki bozukluklar ve çevresel faktörler (düşük nem, yüksek hava akışı) sayılabilir. DED'in ayırt edici özelliği, inflamasyonu tetikleyerek doğrudan veya dolaylı olarak oküler yüzeye zarar verebilen gözyaşı filminin hiperosmolaritesine neden olmasıdır. Gözyaşı filminin hiperosmolaritesi, inflamatuvar mediatörleri serbest bırakıp, gözyaşı filmi stabilitesini daha da azaltabilen oküler yüzeyin hasar görmesine yol açan bir dizi sinyal yolağını başlatır, bu da hastalığın bir 'kısır döngü' içinde kendi kendini sürdürmesine neden olur (Şekil 2-7) (Baudouin ve ark. 2016; Bron ve ark. 2017).



Şekil 2-8: Kuru göz hastalığında oluşan inflamatuvar kısır döngü (Baudouin ve ark. 2016)

Sklerit ise, sistemik bir hastalık veya enfeksiyon ile ilişkili skleranın ağrılı, kronik ve yıkıcı bir hastalığıdır. Skleranın ciddi şekilde iltihaplandığı ve kırmızılaştığı tanı kriterleri olarak kullanılmakla birlikte, immün sistemin aşırı tepki vermesi sonucu olduğu düşünülmektedir (Murthy ve ark. 2020). Sklerit kendi içerisinde enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Enfeksiyon yoluyla meydana gelmeyen skleritlerin yaklaşık %30-50 arası otoimmün hastalık kaynaklı, kalan kısmında ilaca bağlı olarak görüldüğü tespit edilmiştir (Wakefield ve ark. 2013). Sklera normalde esnek, avasküler yapıda, düşük metabolik aktiviteye sahip ve episkleral doku ile kaplanmış bir bölüm olması nedeniyle enfeksiyona karşı daha dirençli kabul edilmektedir. Enfeksiyöz skleritte ise, bu ihlal iki yolla gerçekleşebilir: Eksojen skleritte, travma ve ameliyat sonrası keratit ile ilişkili yayılma olarak meydana gelebilir. Endojen sklerit ise daha az görülmesinin yanı sıra, sistemik enfeksiyonlarla (frengi, tüberküloz gibi) ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır (Murthy ve ark. 2020).

Gözde meydana gelen diğer bir enfeksiyon olan üveit, çeşitli nedenlerle ortaya çıkan göz içi iltihabı ile birlikte görmeyi tehdit eden bir göz hastalığıdır (Chen ve Sheu 2017). Zamanında uygun şekilde tedavi edilmezse geri dönüşü olmayan görme kayıplarına neden olabilir (hastaların yaklaşık %10'unda körlüğe neden olmaktadır). Gözün anatomik tutulumuna göre ön, orta, arka ve panüveit olarak dört sınıfa ayrılmaktadır. Ön kısımda meydana gelen üveit, iris, siliyer cismin ön kısmının veya tamamının iltihaplanmasını içermekle birlikte üveitin en sık görülen tipidir. İyi huylu olarak görünse de uygun olarak tedavi edilmezse sıklıkla ciddi morbiditeye yol açabilir (Agrawal ve ark. 2010). Orta kısımda meydana gelen üveit ise, vitröz kısmın önü, siliyer cisim ve retina periferindeki iltihaplanmayı kapsamaktadır. Genellikle gözün orta kısmında meydana gelen üveit vakalarında, seyirme ve bulanık görme gibi minimal semptomlar görülmektedir. Şiddetli semptomu olan vakalarda ise vitreusta bulanık görmeye neden olan cisimlerin birikmesi veya makula ödemiyle görme kaybı ortaya çıkması söz konusudur (Babu ve Rathinam 2010). Arka kısımda meydana gelen üveitte koroid iltihabı ile birlikte retina, vitröz kısım, optik sinir başı, retinal damarlar gibi komşu yapıları içeren inflamasyon görülmektedir. Enfeksiyöz (toksoplazma, tüberküloz, sifiliz veya viral kaynaklı) ve enfeksiyöz olmayan (nöroretinit, multifokal koroidit, multifokal pigment epitelopati, sarkodiosis vb.) nedenlerden dolayı ortaya çıkmakla birlikte; retinit, koroidit, retinokoroidit ve granüloma ile klinik olarak aynı karakteristik özellikleri taşıyabilir (Sudharshan ve ark. 2010). Son olarak panüveit, sadece uveal yolunun

tamamının değil, aynı zamanda retina ve vitröz kısmı da içeren genel bir inflamasyondur. Panüveit görülen hasta popülasyonunda en yaygın nedenler arasında tüberküloz, Vogt-Koyanagi-Harada sendromu, sempatik oftalmi, Behçet hastalığı ve sarkoidoz bulunmakla birlikte, çok sayıda vaka hala idiyopatik kalmaktadır (Engelhard ve ark. 2015).

Retinada meydana gelen inflamatuvar hastalıklardan yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), retina pigment epitelinin altında ekstrasellüler madde birikimi (drusen) nedeniyle geri dönüşü olmayan görme kaybı ile karakterize koroid neovaskülarizasyondan kaynaklı bir hastalıktır (Şekil 2-9). Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, genetik, çevresel ve metabolik faktörlerin tümünden etkilenmektedir. Yapılan son çalışmalar ise AMD'nin patogenezinde bağışıklık sisteminin daha etkin bir rolü olduğunu desteklemektedir (Engelhard ve ark. 2015). Yaşlanmayla birlikte, okside lipoproteinlerin ve serbest radikallerin retina ve koroid dokularında birikmesine bağlı oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres, inflamastuvar yanıtın düşük olduğu “para-inflamasyon” olarak tanımlanan yanıtın oluşturulduğu bir siklusu tetiklemektedir (Wang ve ark. 2011; Whitcup ve ark. 2013). Sürekli doku harabiyeti veya kronik inflamasyonun, lokal inflamatuvar yanıtta bir dengesizliğe yol açabileceği ve AMD'ye katkıda bulunabileceği de bu şekilde ortaya çıkmıştır (Withcup ve ark. 2013).



Şekil 2-9: Büyük drusenlerin (>125 µm) gözlendiği bir erken evre AMD vakası (Lim ve ark. 2012)

Diyabetik retinopati (DR) ise, diyabetin sık görülen bir komplikasyonudur ve retinanın mikrovasküler yapısının dejenerasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetin doğrudan DR'ye yol açma mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Kronik hiperglisemi, protein kinaz C'nin aktivasyonu, aldoz redüktaz yolağı aracılığı ile poliollerin birikmesi, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin artması ve serbest radikallerin artması gibi birçok biyokimyasal değişikliğe yol açmaktadır. Bu değişiklikler, proinflamatuvar sitokinleri, kemokinleri, lökosit akışını uyaran ve vasküler geçirgenliği değiştiren diğer inflamatuvar araçları arttırmaktadır. Özellikle erken DR'de histolojik olarak gözlenen sakküler mikroanevrizmalar ve dejenere kapiller gibi çeşitli değişimlerin altında inflamatuvar süreçler yatmaktadır (Withcup ve ark. 2013).

Retinal ven tıkanıklığı (RVO), diyabetik retinopatiden sonra görme kaybına neden olan en yaygın ikinci oküler vasküler anormalliktir. Tıkanmanın kaynağı muhtemelen kompresyon ve lokal retinal vasküler hasardan kaynaklanır, bunu staz ve tromboz takip eder. Bazı hastalarda inflamatuvar durumlar, vasküler yaralanmaya ve trombus oluşumuna katkıda bulunabilir. Tıkanmış damardaki vasküler endotel hasarı, düşük dereceli, kronik bir inflamasyona ve ödemi alevlendiren veya uzatan inflamatuvar mediatörlerin üretimine neden olabilir. Yapılan çalışmalarda RVO hastalarında IL-1 α , IL-6, IL-8, MCP-1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve vasküler endotel büyüme faktörü dahil olmak üzere bir dizi inflamatuvar sitokin ve büyüme faktörünün kontrol grubu olarak kullanılan gözlere kıyasla yükseldiği görülmüştür (Koss ve ark. 2012; Lee ve ark. 2012;).

Retinitis pigmentosa (RP), fotoreseptör hücrelerin ölümüne ve ciddi görme kaybına neden olan kalıtsal retinal dejeneratif hastalıkların heterojen bir grubudur. Klinik olarak RP, pigmenter retinopati, optik sinirlerin soluk görünümü, ilerleyici görme alanı kaybı ve niktalopi (loş ışıktaki veya gece görememe) ile karakterize olmakla birlikte, ek klinik bulgular subkapsüler katarkt ve makula ödemi de içerdiğini göstermektedir (Withcup ve ark. 2013). RP hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda, vitröz kısmında vitröz hücrelerin inflamatuvar yapısını daha da karakterize eden lenfositler tespit edilmiştir (Koss ve ark. 2012; Yoshida ve ark. 2013). Yine bu hastalarda ön vitröz kısımda daha fazla inflamasyon olduğu görülmekle birlikte, görme keskinliği testine ait sonuçların daha kötü olduğu görülmüştür. Aynı zamanda yüksek proinflamatuvar belirteçler,

özellikle MCP-1, hem aköz kısımda hem de vitreusta tespit edilmiştir (Yoshida ve ark. 2013).

Nöromiyelitis optika (NMO), sinir sisteminde başlıca omurilik ve optik sinirlerin tutulumu ile giden inflamatuvar demiyelinizan bir hastalıktır. NMO'lu hastaların %80'inde immünoglobulin (Ig) G reaktivitesinin (NMO-IgG) saptanması ve NMO-IgG'nin daha sonra merkezi sinir sisteminde (SSS) en bol bulunan bir su kanalı olan aquaporin-4'ü (AQP4) hedef aldığı gösterilmiştir (Jarius ve ark. 2014). Hastaların %90'ından fazlasında NMO, optik nörit (ON), miyelit veya her ikisinin atakları ile tekrarlayan bir hastalık olarak görülmektedir. Optik nörit ve miyelit atakları genelde yüksek derecede hasar verdiğinden, tedavi edilmezse, MS' den daha kötü sonuçlar meydana gelir ve geri dönüşü olmayan nörolojik sakatlığın hızlı artmasına neden olur (Jarius ve ark. 2012; Jarius ve ark. 2014). Optik nörit, demiyelinizasyon sonucu santral sinir sisteminin iltihaplanması ile karakterize bir hastalıktır. Enfeksiyonlar, travma, vasküler yetmezlik, metastazlar, toksinler veya beslenme eksiklikleri dahil olmak üzere çeşitli durumlar (özellikle MS ve NMO) papillit neden olabilir. Optik nörit sıklıkla genç hastalarda tek taraflı ani görme kaybı şeklinde teşhis edilmektedir. Kadınlarda daha sık görülmekte ve görme kaybına genellikle göz hareketleriyle ağrı eşlik etmektedir (Soelberg ve ark. 2018).

Papillit, ON ve MS gibi bir dizi otoimmün ve enfeksiyöz hastalıkla ilişkili olabilir. Geri kalan vakaların çoğu idiyopatikdir. Papillit genellikle sarkoidoz (pulmoner bulgularla birlikte nedeni bilinmeyen granülomatöz bir hastalıktır) görülen hastalarda meydana gelir. Ağırlıklı olarak akciğer etkilense de, cilt, göz, beyin ve karın gibi organlar da dahil olmak üzere hemen hemen her organ tutulabilir. Sıklıkla, hastalığın ekstrapulmoner belirtileri morbiditenin başlıca nedenidir. Oküler tutulum, sistemik sarkoidozlu hastaların yaklaşık %25-60'ını görme azalması ile karakterize iken, optik disk ödeminin daha az yaygın bir olay olduğu rapor edilmiştir (You ve ark. 2018).

2.2.1. Tedavi

Oküler inflamasyon, oftalmolojide ciddi ve sık karşılaşılan bir problemdir. Nedenleri arasında keratit, kronik yüzeysel keratit (dejeneratif pannus), üveit gibi birincil oküler bozukluklar, mikozlar, otoimmün hastalık, septisemi ve riketsiyal enfeksiyonlar gibi sistemik hastalık süreçleri ile beraber ikincil bozukluklar gösterilebilir. Oküler inflamasyonda başarılı bir tedavi için, oküler anatomi ve fizyoloji iyice anlaşılmalı,

oküler inflamasyon belirtileri tanınabilmeli, mümkünse nedeni belirlenmeli ve uygun tedavi seçmelidir (Huerva ve ark. 2015).

Tablo 2-2: Gözde meydana gelen hastalıklar ve tedavileri

Hastalık	Tedavi
Blefarit	Topikal ve oral antibiyotikler, Topikal steroidler
Konjonktivit	Topikal ve sistemik antibiyotikler (bakteriyel konjonktivit); Topikal ve sistemik antihistaminikler (alerjik konjonktivit); Topikal, ve sistemik antiviraller ve topikal interferonlar, Suni gözyaşı, Topikal ve göz kapağına injekte edilen steroidler, Topikal non-steroidal antiinflamatuvarlar (NSAİİ)
Keratit	Antiseptik ajanlar (amebal keratit ve antiviral keratit); Topikal ve sistemik antibiyotikler (bakteriyel keratit), Topikal ve sistemik antifungaller (fungal keratit), Topikal ve sistemik steroidler, Topikal ve sistemik antiviraller ve N-klorotaurin (viral keratit)
DED	Suni gözyaşı, Topikal NSAİİ'ler, Topikal steroidler, Topikal immunosupresanlar, Topikal ve sistemik antibiyotikler, Topikal ve sistemik omega-3 yağ asitleri
Uveit	Topikal ve sistemik steroidler, Sistemik ve intravitreal immunomodulatorler, Topikal NSAİİ'ler, Topikal sikloplejikler, Oral antiviral ajanlar,
Sklerit	Topikal, subkonjonktival ve sistemik steroidler, Oral NSAİİ'ler, Sistemik ve intravitreal immunomodulatorler, Oral antibiyotik (Dapson)
Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (AMD)	Sistemik, intraoküler ve subkonjonktival immunomodulatorler, Topikal ve intravitreal steroidler, Topikal NSAİİ'ler
Diyabetik Retinopati (DR)	İntravitreal immunomodulatorler, İntravitreal steroidler, Lazer fotokoagülasyon, Sistemik NSAİİ'ler, Sistemik antilipidemik ve antihipertansifler, Gıda takviyeleri
Retina ven tıkanıklığı (RVO)	Sistemik ve lokal antiagreganlar, Vitrektomi, Lazer fotokoagülasyon, İntravitreal steroidler, İntravitreal NSAİİ'ler, İntravitreal immunomodulatorler
Retinitis pigmentosa (RP)	Topikal antiglokoma ajanları, Topikal ve intravitreal steroidler, intravitreal immunomodulatorler, kök

	hücre tedavisi, Retinal protezler, Transkorneal elektrik stimülasyon tedavisi, Valproik asit
Nöromiyelit optika sendromu (NMO), Optik Nörit (ON) ve Papillit	Topikal ve sistemik steroidler, Sistemik immünomodülatörler, Topikal midriyatikler

Blefarit için göz kapağı hijyeni tedavinin temel dayanağı olmakla birlikte, çoğu blefarit vakasının tedavisinde etkilidir. Göz kapağında meydana gelen artıkları, yağları yumuşatmak ve meibomian bezlerini genişletmek için göze 5 ila 10 dakika boyunca ılık, ıslak kompresler uygulanır. Bunu takiben, göz kenarlarındaki kalıntıları gidermek için seyreltilmiş bebek şampuanına batırılmış pamuklu bir aplikatör ile göz kapağı nazikçe yıkanmalıdır. DED' ye sebebiyet vermemek için göz çok fazla sabun ile yıkanmamalıdır (Putnam ve ark. 2016). Tüm akut ve kronik blefarit vakalarında topikal antibiyotikler (genellikle basitrasin, eritromisin, besifloksasin, trimetropim, siklosporin ve tobramisin) kullanılır (Pflugfelder ve ark. 2014). Semptomatik rahatlama ve kapak kenarındaki bakterileri yok etmede faydalı oldukları görülmüştür Basitrasin veya eritromisin gibi topikal antibiyotik kremler 2 ila 8 hafta boyunca göz kapağı kenarına uygulanabilir. Göz kapağı hijyenine yanıt vermeyen veya rozasea ile ilişkili posterior blefariti tedavi etmek için oral tetrasiklinler (tetrasiklin, doksisisiklin ve minasiklin) ve makrolid antibiyotikler (eritromisin ve azitromisin) kullanılabilir. Son klinik deneyler, topikal kortikosteroidlerin (deksametazon, florometalon ve LE) blefarit belirti ve semptomlarında önemli iyileşme sağlayabildiğini göstermiştir (Pleyer ve ark. 2013; Putnam ve ark. 2016). Topikal bir antibiyotik ve bir kortikosteroidin sabit kombinasyonları, hastalığın hem enfeksiyöz hem de enflamatuvar bileşenlerine yönelik etkili ve uygun bir tedavi yöntemi sunar (Pleyer ve ark. 2013; Pflugfelder ve ark. 2014).

Konjonktivit tedavisinde öncelikle hastalık etkeninin (bakteriyel, viral veya alerjik) tanımlanması önem arz etmektedir. Hastalık etkenine bağlı olarak kullanılan ilaç değişiklik göstermektedir. Bakteriyel konjonktivitte topikal olarak tüm geniş spektrumlu antibiyotikler tedavide kullanılmaktadır. Özellikle aminoglikozitler (gentamisin ve tobramisin), flurokinolonlar (besifloksasin, siprofloksasin, gatifloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve oflofloksasin), makrolidler (azitromisin ve eritromisin), sülfanamidler (sülfasetamid) ve kombinasyonları (trimetoprim/ polimiksin B) sıklıkla kullanılmaktadır. Klamidya kaynaklı konjonktivitlerde, oral antibiyotikler (azitromisin ve doksisisiklin) kullanılırken; gonokokal konjonktivitte oral seftriakson (25-50 mg/kg) veya IV/IM sefotaksim (100 mg/kg) kullanılmaktadır (Pak ve ark. 2017; Azari ve Arabi 2020).

Alerjik konjonktivitte ise, yapay gözyaşı bariyer işlevi sağlar çeşitli alerjenleri seyreltir ve oküler yüzeyi birçok inflamatuvar mediatörden temizler. Topikal antihistaminik olarak olopatadin, ketotifen, azelastin ve epinastin kullanılmakta; şiddetli vakalarda oral olarak loratadin, desloratadin, setirizin, levosetirizin, feksofenadin ve terfenadin tedaviye eklenmektedir (Kamegasawa ve ark. 2014; Azari ve Arabi 2020). Kronik ve şiddetli alerjik konjonktivitte topikal kortikosteroid olarak fluometalon ve LE sıklıkla kullanılmakta (Holland ve ark. 2019); bunun yanı sıra genel anestezi altında göz kapağına (supratarsal) 1 ml triamsinolon (20 mg/ml) veya 1 ml triamsinolon (40 mg/ml)/ 1ml betnesol (4 mg/ml) kombinasyonu şeklinde steroid enjeksiyonu da yapılmaktadır (Afshar ve ark. 2010; Costa ve ark. 2017). Herpes kaynaklı viral konjonktivitlerde oral, topikal veya i.v. asiklovir kullanılırken; adenoviral kaynaklı konjonktivitlerde oral, topikal veya i.v. sidofavir, famsiklovirin yanı sıra topikal interferonlar (Interferon- α , Interferon- α 2 ve Interferon- β) kullanılmaktadır (Skevaki ve ark. 2012). Yine herpes kaynaklı konjonktivitte topikal kortikosteroidler semptomları hafifletmekte kullanılırken; özellikle yenidoğanlarda görülen adenoviral kaynaklı konjonktivitlerde %2.5 povidon iyodinin antiseptik etkisiyle semptomların azaldığı görülmüştür (Jhanji ve ark. 2015; Tunay ve ark. 2015). Bunun yanı sıra yine konjonktivitten kaynaklı kaşınma, kızarıklık ve tahrişe yönelik etkilerin azaltılmasında yardımcı olarak topikal NSAİİ'ler (diklofenak, flurbiprofen, indometazin, ketorolak ve suprofen) kullanılmaktadır (Rodrigues ve ark. 2016).

Keratit tedavisi de yine konjonktivitte olduğu gibi povidon-iyodin karışımı antibiyotik verilmeden önce uygulanarak korneal ülserin mikrobiyal yükünü azaltmakta ve antiseptik olarak kullanılmaktadır. Kontakt lens kullanımından kaynaklı amebal keratit tedavisinde topikal antiseptik özellikte propamidin, heksamidin, poliheksametilen biguanid (PHMB) ve klorheksidin kullanılmaktadır. Bakteriyal keratitte (genellikle *P. aeruginosa*) ise genellikle topikal sefalosporin (sefazolin, sefuroksim ve seftazidim) ve aminoglikozid (amikasin, gentamisin ve eritromisin) veya her iki grup birlikte kullanılmakta; eğer tedaviye yanıt alınmazsa bu antibiyotiklerin oral/ IV kombinasyonu ile florokinolonların (gatifloksasin, moksifloksasin ve siprofloksasin) tedaviye eklenmesi gündeme gelmektedir (Makdoui ve ark. 2010). Fungal keratitte ise yine topikal (natamisin, itrakonazol ve ekonazol) ve oral/ IV (ketokonazol, amfoterisin B ve flukonazol) antifungal ajanlar kullanılmakta; şiddetli fungal keratitlerde amfoterisin B (5 μ g/0.1 ml) korneal enjeksiyon ve flukonazol (%2'lik çözeltiden 0.5-1 ml)

subkonjonktival injeksiyon şeklinde uygulanmaktadır (Thomas ve ark. 2007; Ansari ve ark. 2013). Viral keratitte, herpes kaynaklı ise yine oral, topikal veya IV asiklovir ilk tercih olurken; gansiklovir de tercih edilmekte; Adenoviral keratitlerde topikal N-klorotaurin kullanılmaktadır (Thomas ve ark. 2007; Uchio ve ark. 2010). Yine enfeksiyona bağlı tüm keratitlerde topikal ve oral (prednizolon) steroidler inflamasyonu azaltarak, böylece skarlaşmayı, neovaskülarizasyonu ve stromal erimeyi azalttığı için tedavide diğer ajanlarla birlikte kullanılmaktadır (Austin ve ark 2017).

Kuru göz hastalığının tedavisi, hastalığın ciddiyetine bağlı olarak basamaklı bir tedavi yaklaşımını içermektedir ve bununla ilişkili olarak meibomian bezi disfonksiyonu, oküler yüzeyin iltihabı ve/veya ilişkili sistemik hastalıklar hesaba katılmalıdır (Şimşek ve ark. 2018). Suni gözyaşları, DED tedavisinin temel dayanağını oluşturmakla birlikte piyasada bulunan birçok farklı suni gözyaşı ürününü değerlendirmek için büyük, randomize ve kontrollü bir çalışma yapılmamıştır. Suni gözyaşlarının ruhsatlandırılmasında kullanılan küçük randomize klinik çalışmalar ise, suni gözyaşlarının gözyaşı film stabilitesini arttırdığını, oküler yüzey stresini azalttığını ve yaşam kalitesini arttırabileceğini göstermiştir (Barabino ve ark. 2014).

NSAİİ'ler (ketorolak, ibuprofen, diklofenak, meloksikam ve amfenak) de DED tedavisinde analjezik ve inflamasyonu azaltıcı etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (Colligris ve ark. 2014; Li ve ark. 2019).

Topikal kortikosteroidlerin (LE, fluometalon, prednizolon ve deksametazon) özellikle antiinflamatuvar etkiyi azaltmada büyük rolleri olduğu görülmüştür (Favre ve ark. 2020). Yapılan bir çalışmada günde 4 kez 4 hafta boyunca uygulanan %0.5 LE'nin kontrol grubuna kıyasla alt tarsal ve bubar konjonktival hiperemide belirgin bir iyileşmeye neden olduğu görülmüştür (Pflugfelder ve ark. 2004).

Bağışıklık sistemini baskılayıcı çeşitli ajanlar (siklosporin A, takrolimus ve pikrolimus) IL-2 gibi davranarak T-hücrelerini aktive eden sitokinlerin üretimini azaltarak antiinflamatuvar etkileri nedeniyle DED tedavisinde kullanılmaktadır.

Oral olarak tetrasiklin (minosiklin ve doksisisiklin) ve topikal kullanılan makrolid (azitromisin) grubu antibiyotikler bakteriyostatik ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (Messmer 2015).

Son olarak DED için omega-3 yağ asitleri oküler yüzeyin homeostazı için gereklidir, özellikle proinflatuvar nötrofilleri bloke etmesi ve sonuç olarak antiinflatuvar etkileri hem topikal hem oral preparatları çeşitli çalışmalarla (Rashid ve ark. 2008; Deinema ve ark. 2017) kanıtlanmış ve aktif olarak piyasada bulunmaktadır (Messmer 2015).

Üveit tedavisi için, özellikle enfeksiyöz olmayan oküler inflamatuvar bir oluşum söz konusuysa, kortikosteroidler ucuz, güçlü ve hızlı etki ettiğinden ilk tedavi seçeneğidir. Topikal (deksametazon, betametazon, prednizolon, fluometalon ve LE), perioküler enjeksiyonlar (deksametazon sodyum fosfat, triamkinolon ve betametazon), intravitreal (flukinolon asetonid ve deksametazon) veya sistemik olarak (prednizon 0.5-1 mg/kg/gün) uygulanabilirler (Babu ve Mahendradas 2013).

Kortizol kullanımıyla yanıt alınamayan hastalarda immünomodülatör kullanımına geçilmekte, bunun için bağışıklık sistemi baskılayıcı olan antimetabolitler (metotreksat, azatioprin ve mikofenolat), T-hücresi inhibitörleri (siklosporin, takrolimus, sirolimus ve voklosporin) ve alkilleyici ajanlar (siklofosamid ve klorambusil) sistemik kortikosteroidlerle birlikte kronik üveitin tedavisinde kullanılmaktadır (Servat ve ark. 2012). Bunun yanı sıra TNF- α ve IFN- α , üveit patogeneğinde rol oynayan anahtar sitokinler olduklarından TNF- α inhibitörleri (etanercept, infliximab ve adalimumab) ve IFN- α da proinflatuvar sitokin üretiminin azalması ve fagositik aktiviteyi arttırıcı etkileri nedeniyle tedavide önemli bir yere sahiptir. Yine kronik üveitte bağışıklık sisteminin etkisini arttırmak için 2-4 haftada bir IV Ig verilmekte, non-enfeksiyöz üveitte de özellikle görmeyi tehdit eden üveitte subkutan yolla IL-2 reseptör antagonisti (daklizumab) tedavide kullanılmaktadır (Babu ve Mahendradas 2013).

Üveitin semptomatik etkilerinin (özellikle antiinflatuvar ve oküler ağrıyı azaltıcı etkileri) azaltılması nedeniyle topikal NSAİİ'ler (bromfenak ve nepafenak) kullanılmaktadır (Petrushkin ve ark. 2017).

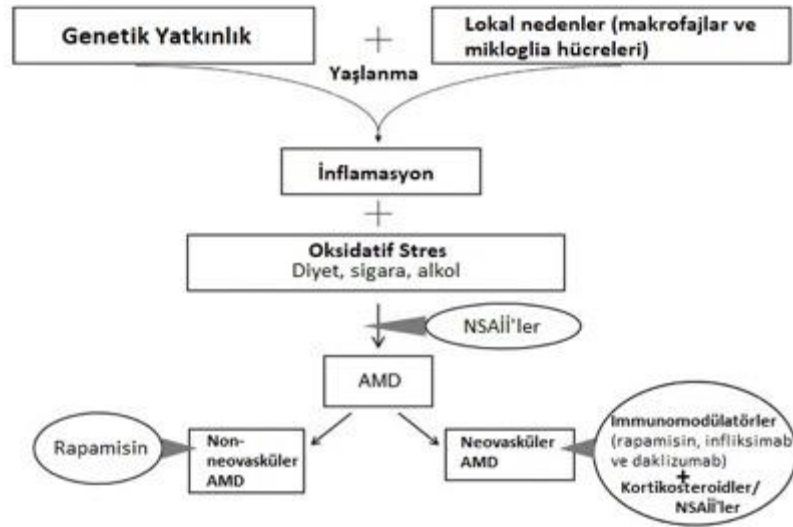
Son olarak uveitin nüks etmemesi, oküler ağrı ve rahatlamanın semptomatik tedavisi için sikloplejik ajanlar (tropikamit, siklopentonat, homatropin ve atropin) kullanılmaktadır (Babu ve Mahendradas 2013).

Enfeksiyöz olan üveitin viral kaynaklı olan tipinde ise genellikle oral antiviral ajan (asiklovir 400-800 mg/gün) ile birlikte rahatlama sağlamak için topikal kortikosteroid ve sikloplejik ajanlar tedavide yer almaktadır.

Bakteriyel kaynaklı üveitlerde ise, özellikle spiroketal kaynaklı ise IV penisilin G, azitromisin veya doksisisiklin ile birlikte sistemik kortikosteroidler; mikobakteriyel kaynaklı ise oral yoldan rifampin, pirazinamid, izoniazid, etambutol, florokinolon veya aminoglikozitler (streptomisini, kanamisin ve neomisin) kullanılmaktadır (Lin 2015).

Sklerit enfeksiyöz olmayan ve enfeksiyöz olarak ikiye ayrılmaktadır. Enfeksiyöz olmayan skleritte başlangıçta topikal kortikosteroidler (fluometalon, prednizolon asetat ve LE) ve sistemik NSAİİ'ler (genellikle indometazin) tedavide kullanılmaktadır. Nekrotizan enfeksiyöz olmayan skleritte ise oral kortikosteroidler (genellikle prednizolon) ile tedaviye başlanır (Rachitskaya ve ark. 2010). Lokal ödemi ve ağrıyı azaltmak için subkonjonktival olarak kortikosteroid (triamnisolon) uygulanmaktadır. Enfeksiyöz olmayan skleritte hasta bir ay içinde tedaviye cevap vermezse genellikle immunomodulator tedaviye başlanır. Bu amaçla yine antimetabolitler (metotreksat, azatioprin ve mikofenolat mofetil) alkileyici maddeler (klorambusil ve siklofosfamid), T hücreleri inhibitörleri (siklosporin ve takrolimus), TNF- α inhibitörleri (infliximab veya adalimumab) ve monoklonal antikor olarak rituximab kullanılmaktadır (Beardsley ve ark. 2013).

Enfeksiyöz sklerit genellikle cerrahi operasyon sonrası ortaya çıkmaktadır ve tedavisi oldukça zordur. Semptomatik tedavide yine oral ve topikal kortikosteroidler kullanılırken, bakteriyel oluşuma karşı oral antibiyotik olarak dapson kullanılmaktadır (Beardsley ve ark. 2013; Ramenaden ve Raiji 2013). Dapsonun kortikosteroidler ile birlikte özellikle diffüz skleriti tedavide ve inflamasyonu azaltmada etkili olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Wong ve ark. 2007; De la Maza ve ark. 2012).



Şekil 2-10: AMD tedavi protokolü (Wang ve ark. 2010)

Yaşa bağlı makula dejenerasyonunun (AMD) tedavisinde izlenecek yol için, AMD' nin neovasküler veya non-neovasküler olması büyük önem arz etmektedir. Eğer non-neovasküler bir durum söz konusuysa oral, subkonjonktival veya intraoküler rapamisin, infliksimab ve daklizumab gibi immunomodülatör ajanlar verilerek tedavi mümkündür. Neovasküler AMD tedavisinde ise, immunomodülatör tedavi (rapamisin, infliksimab ve daklizumab) ile birlikte intravitreal kortikosteridler (deksametazon, triamkinolon asetonit ve LE) birlikte verilirken, topikal NSAİİ'lerin (diklofenak ve nepafenak) de neovaskülerizasyonu azaltması nedeniyle tedaviye eklenmesi söz konusudur (Wang ve ark. 2011; Hirani ve ark. 2015). Bunun yanı sıra özellikle antioksidan içerik yönünden zengin (zeaksantin, lutein, omega-3 ve vitamin B) gıda takviyelerinin alınmasının AMD'yi tedavi etmese bile ilerlemesini yavaşlattığı bildirilmiştir (Krishnadev ve ark. 2010).

Diyabetik retinopatide, ise en önemli sorun diyabetik makular ödem gelişmesidir. Bunun tedavisi lazer fotokoagülasyon, intravitreal immünomodülatör ilaçlar (ranibizumab ve bevacizumab) ve kortikosteroidler (triamkinolon, deksametazon, fluosinolon ve LE) ile mümkündür (Osaadon ve ark. 2014; Stewart ve ark. 2016; Stitt ve ark. 2016). Proliferatif DR'yi önlemek için ise lazer fotokoagülasyon ve intravitreal cerrahi dışında yine immünomodülatör ilaçlar (ranibizumab, pegaptanib, aflibersept, etanersept ve infliksimab) denenmektedir (Osaadon ve ark. 2014). Bunun yanı sıra yine semptomatik ağrıyı azaltmak amacıyla NSAİİ'ler (aspirin ve salisilat türevleri)

kullanılmaktadır (Zhang ve ark. 2011; Osaadon ve ark. 2014). DR'yi tamamen önlemek ve ilerleyiş hızını azaltmak amaçlı ise antihipertansif (Kaptopril, telmisartan, olmesartan, kandesartan ve enalapril) ve antilipidemik ilaçlar (apostinin ve statinler) ile antioksidan içerikli gıda takviyeleri (vitamin C ve E) tedaviye eklenmektedir (Zhang ve ark. 2011; Stitt ve ark. 2016).

Retinal ven obstrüksiyonu (RVO) tedavisinde ise, vende meydana gelen tıkanıklığı açmak için sistemik veya lokal antiagregan ajanlar (asetil salisilik asit, heparin ve tiklopidin) ve izovolemik hemodilüsyon (heparin veya nişastanın hidroksietil türevi) uygulaması yapılmaktadır. Cerrahi tedavi yöntemi olarak vitrektomi ve lazer fotokoagülasyon ile tıkanık arterler uzaklaştırılarak kan akışı düzenlenmektedir (Chatziralli ve ark. 2013). Bunun yanı sıra, intravitreal NSAİİ'ler (diklofenak), sistemik ve intravitreal yolla uygulanan kortikosteroidler (deksametazon ve triamkinolon asetonid) ve immünomodülatör ajanlar (ranibizumab ve pegaptanib) tedavide yer almaktadır (Chatziralli ve ark. 2013; Iida-Miwa ve ark. 2019).

Retinitis pigmentosa (RP) tedavisinde ise yine ilerlemeyi önlemeye yönelik tedavide vitamin A, lütein ve omega-3 içeren gıda takviyeleri kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra makular ödemin tedavisi için, glokomda kullanılan topikal anhidraz inhibitörleri (asetazolamid ve dorzolamid), topikal ve intravitreal steroidler (triamkinolon asetonid, deksametazon ve LE) immünomodülatör ajanlar (bevacizumab ve ranibizumab) kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kök hücre tedavisi, retinal protezler ve transkorneal elektrik stimülasyonu da tedavide etkin olarak kullanılmaktadır (Cho ve Madu 2009; Wang ve ark. 2019). Son yıllarda valproik asidin (antiepileptik ajan) RP'de meydana gelen mutant rodopsin hücrelerinin üretimini arttırarak inflamatuvar yanıtı inhibe ettiğini gösteren çalışmalarda kullanımı da mevcuttur (Todd ve Zelinka 2017).

Nöromiyelitis optika sendromu (NMO), ON ve papillit görme sinirleri üzerinde meydana gelen benzer sorunlar olduklarından tedavileri de birbirine yakındır. Akut atakları kontrol altına almak için tek başına veya bir immunomodulator (genellikle Ig) ile birlikte sistemik steroid (metilprednizolon) tedavi protokolü mevcuttur. Uzun süreli tedavide genellikle sistemik immunomodülatör ajanlar (mikofenolat mofetil, azatiopirin, mitoksantron, anti-IL6, Ig'ler ve natalizumab) tercih edilmektedir (Trebst ve ark. 2014). Bunun yanında özellikle ON'nin şiddetli görüldüğü vakalarda infüzyon yoluyla eritropoetin verilirken, ek olarak steroid (prednizolon veya metilprednizolon)

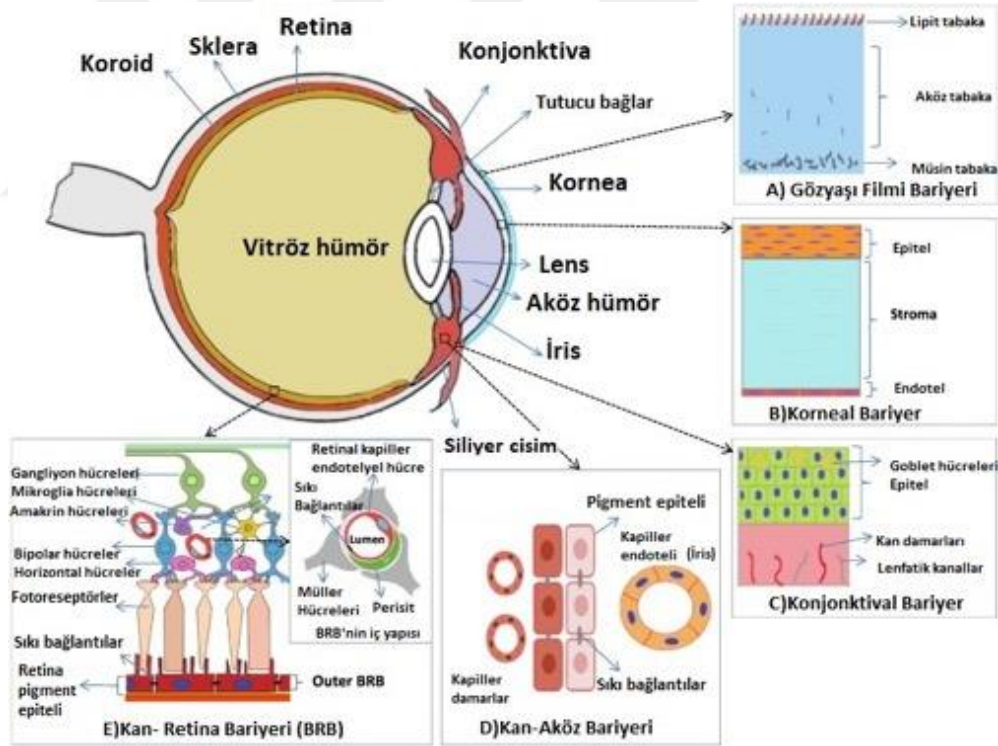
uygulanmaktadır (Bennet ve ark. 2015). Yine özellikle metastatik kanser patogeneziyle oluşan papillit ve ON' nin kontrol altına alınmasında topikal midriyatik ajanlar (atropin ve fenilefrin), topikal ve sistemik kortikosteroidler ile birlikte pembrolizumab kullanılmaktadır (Navarro-Perea ve ark. 2019).

2.3. Göze İlaç Uygulanması

Göz, ön ve arka segmente sahip, hassas ve çok karmaşık bir organdır. Ön segment, göz küresinin lensi ve lensin önündeki kornea, konjonktiva, iris, siliyer cisim ve skleranın ön kısmından oluşmaktadır (Şekil 2-11) (Janagam ve ark. 2017). Gözün arka segmenti ise, vitreus hümmör, retina, koroid ve optik sinir dahil olmak üzere gözün arka üçte ikisini oluşturur. Ön segmentte meydana gelen bozukluk/ hastalıklar katarakt, kuru göz, doğumsal ve gelişimsel anormallikler, inflamatuvar hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları, kalıtsal ve dejeneratif hastalıklar, glokom, tümör, yaralanma, travma ve sistemik hastalıkların oküler belirtilerini içermektedir. Arka segmentte meydana gelen bozukluklar ise değişen derecelerde görme bozukluğu ve tedavi edilmezse körlüğe neden olan glokom, AMD ve DR olarak belirtilmiştir (Janagam ve ark. 2017; Varela-Fernandez ve ark. 2020).

Son yirmi yılda, oküler dokulara ilaç verilmesi ve bu dokularda etkili ilaç seviyelerinin korunması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Cholkar ve ark. 2013). Özellikle ön oküler dokuların inflamasyonu iki yoldan gerçekleşmektedir. İlk yol bu dokuların sürekli dış ortama maruz kalıp, toz, bakteri, virüs, mantar ve parazitler gibi hastalık yapıcı çeşitli etkenlerle sürekli temas halinde olmasından kaynaklıdır. Diğer diğer yol ise, proteinlerin ve hücrelerin periferik dolaşımdan penetrasyonudur. Sağlıklı bir gözde inflamasyonu kan-aköz bariyeri ile beraber bağışıklık hücreleri ve aracı moleküllerin yanıtı engellerken; oküler inflamasyon ve cerrahi girişimler kan-aköz bariyeri bozarak oküler dokularda bağışıklık hücrelerinin birikmesiyle ağrı, kaşıntı, kızarıklık ve şişliğe neden olur (Cholkar ve ark. 2013). Klinik olarak, söz konusu ön segment bozuklukları daha çok göz damlaları veya merhemler kullanılarak tedavi edilirken; AMD ve DR gibi arka segment bozukluklarının tedavisinde standart prosedür, enjekte edilen ilaçların intravitreal uygulaması olmasının yanında, topikal ve sistemik uygulama da etkin olarak kullanılmaktadır (Janagam ve ark. 2017; Varela-Fernandez ve ark. 2020). Ancak göz damlası ve merhem gibi preparatlarla tedavi etkinliği, kornea ve oküler yüzeyi kaplayan konjonktival bariyerler gibi oküler bariyerlerin ve gözyaşı

drenajının varlığı nedeniyle düşüktür (Şekil 2-11). Bununla birlikte, topikal ve perioküler uygulamalar yoluyla lokal tedavi, oküler hastalıkların takibi için oral ve intravenöz uygulamalar gibi sistemik uygulama yoluyla yapılan tedavilere göre daha uygundur. Bunun birinci nedeni, gözde tüm vücuda kıyasla daha az kan damarı ve daha az kan akışı vardır, bu nedenle göze lokal uygulama sonrası atılacak ilaç miktarı ve oranı, sistemik uygulamaya göre çok daha azdır. İkinci neden ise, sistemik dolaşımdan gözün ön segmentine ilaç penetrasyonunu sınırlandıran kan-aköz bariyerin varlığından dolayı sistemik verilecek ilacın gözde beklenen tedavi edici etkisi düşük olacaktır (Bachu ve ark. 2018; Janagam ve ark. 2017). Topikal uygulamalarda da bariyerler nedeniyle tüm ilacın yaklaşık %90-95'inin kaybolduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Boddu ve ark. 2010; Cholkar ve ark. 2013; Bachu ve ark. 2018). Bu nedenle etkin bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesine ihtiyaç vardır



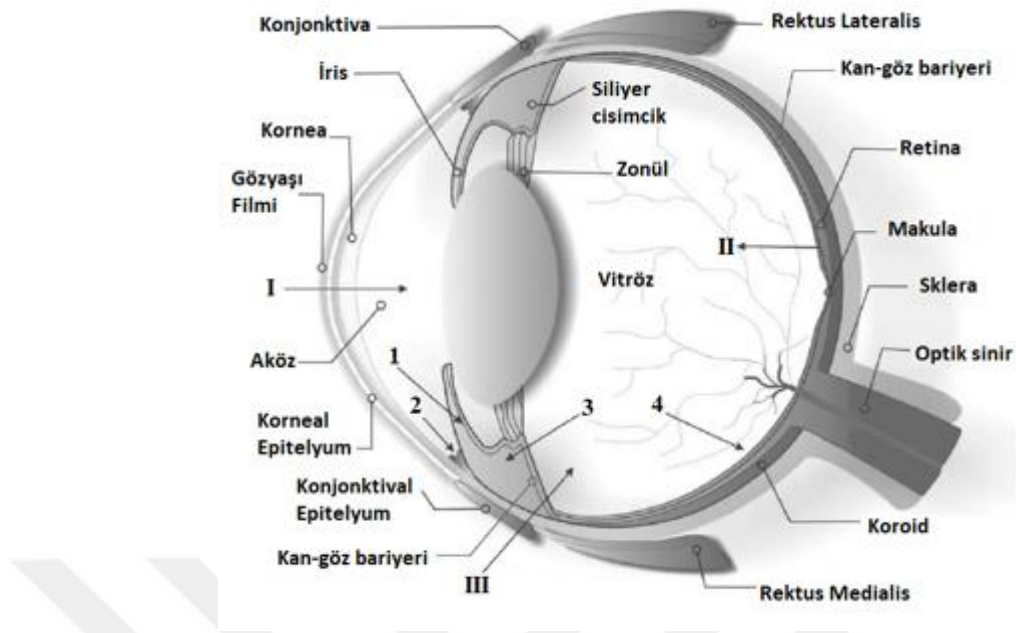
Şekil 2-11: Gözün ön segmentinin yapısı ve oküler bariyerler (Janagam ve ark. 2017)

2.3.1. Korneadan Geçişte İlaç Kaybı Mekanizmaları

Topikal yolla gözün ön segmentine uygulanan, piyasadaki oftalmik ilaçların yaklaşık %90'ı solüsyonlar (%62,4), süspansiyonlar (%8,7) ve merhemler (%17,4) gibi geleneksel dozaj şekillerinden meydana gelmektedir. Bununla birlikte, topikal ilaç uygulanması lakrimal direnaja nedeniyle korneada kalış süresinin düşmesine, kornea epiteli boyunca geçirgenliğin azalmasına ve bu da düşük oküler biyoyararlanıma (<%5) neden olur (Bachu ve ark. 2018). Gözyaşı salgısıyla meydana gelen gözyaşı döngüsü, ilaç kaybındaki bu mekanizmanın çoğuna katkıda bulunur. Yaklaşık 7-9 µL gözyaşı hacmine sahip sağlıklı bir gözde devir hızı 0.5-2.2 µL/dk'dır. Topikal uygulama sırasında, ana formülasyonların ortalama hacmi yaklaşık 35-56 µL'dir ve fazla ilaç nazolakrimal kanal yoluyla sistemik dolaşıma katılır (Boddu ve ark. 2010). Bunun yanı sıra gözde bulunan diğer bariyerlerin (Şekil 2-11) yüksek oranda ilaç kaybına neden olduğu görülmektedir.

Gözyaşı film bariyeri, yabancı cisimlerin kornea ve konjonktivaya ulaşmasına karşı koruyucu bir bariyer görevine sahip olup; müsin, su ve lipidden oluşmaktadır. Korneal bariyer, epitel (birbirine yığılmış çok sayıda tabaka), stroma ve endotel (tek tabaka) olmak üzere damarsız üç ana tabakadan oluşur. Topikal uygulamadan sonra lakrimal sıvıdan ön kamaraya ilaç emilimini engelleyen bir bariyer görevi görür. Kanaköz bariyeri, irisdeki kılcıl damar endotelinden ve sıkı bağlantılar içeren siliyer epitelden oluşur. Ancak küçük moleküller, siliyer cisimde bulunan pencereci kılcıl damarlardan geçerek aköz hümöre ulaşabilir. Bu kısma kadar geleneksel kullanılan dozaj şekillerinde %95'lik bir ilaç kaybının görüldüğü rapor edilmiştir (Boddu ve ark. 2010). Bu aşamadan sonra ilacın karşılaştığı bir diğer bariyer, retina pigment epiteli (dış BRB) ve retina kan damarlarının endotel membranı (iç BRB) tarafından oluşturulan kan-retina bariyeridir (BRB) ve yapısında sıkı bağlantılar bulunmaktadır. Bu sıkı bağlantılar ilaçların kandan (sistemik) retina/aköz hümöre girişini kısıtlar (Janagam ve ark. 2017).

Şekil 2-12'de I ile gösterilen kornea, ilacın gözün ön segmentine taşınmasının ana yoludur. Retina pigment epiteli ve retinal kapiller endotel olarak belirtilen II numaralı kısım, sistemik olarak uygulanan ilaçlar için ana engeli oluşturmaktadır.



Şekil 2-12: Gözün yapısı ve ana bariyerler (Willoughby ve ark. 2010)

Bunun dışında III ile gösterilen vitreus, intravitreal injeksiyon için kullanılmaktadır (Agrahari ve ark. 2016; Willoughby ve ark. 2010). Kısaca topikal uygulanan bir ilacın seyrine bakılacak olursa, ilaç 1 ile gösterilen kısımda ön kamaradan ya iris yüzeyi boyunca dağıldıktan sonra venöz kan akımıyla ya da 2 ile gösterilen aköz hümör ile taşınır. Daha sonra 3 ile gösterilen ön kamaradan difüzyonla veya 4 ile gösterilen kan-retina bariyeri ile vitreustan uzaklaştırılabilmektedir (Şekil 2-12) (Willoughby ve ark. 2010).

2.3.2. Korneadan Geçişte İlaç Kaybının Önlenmesine Yönelik Yaklaşımlar

Piyasada bulunan formülasyonların çoğunun (>%90), %60-70 oranında prekorneal klirens uğraması nedeniyle sınırlı biyoyararlanıma, kısa etki süresine sahip olması nedeniyle sık uygulama gerektirdiği bildirilmiştir (Bachu ve ark. 2018; Singh ve ark. 2020). Bundan dolayı, yürütülen çalışmalar daha yüksek prekorneal retansiyona sahip ve sürekli salım yapabilen nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik olarak yürütülmektedir. Bu tür sistemlerin, ilaçların oküler biyoyararlanımını artırarak hasta uyuncunu artırma potansiyeli yüksektir (Kim ve ark. 2015; Bachu ve ark. 2018). Lipozomlar, miseller, mikroemülsiyonlar, nanoemülsiyonlar, niozomlar, lipid nanopartiküller (SLN/ NLT), polimerik nanopartiküller, nanosüngerler, mikroiğneler ve

dendrimer hidrojeller gibi nanotaşıyıcılar, özellikle glokom ve DED tedavisinde ilaçları sürekli salım yetenekleri açısından araştırılmıştır (Gaafar ve ark. 2014; Natarajan ve ark. 2014; Çetinel 2015; Thakur ve ark. 2016; Bachu ve ark. 2018; Singh ve ark. 2020). Yine bu nanopartiküllere yüklenen ilaçların prekorneal retansiyonu, partiküllerin polietilen glikol (PEG), kitosan ve hyaluronik asit gibi mukoadhezif polimerlerle kaplanması veya bunların pH, termosensitif ve iyonsensitif hidrojeller gibi hidrojeller içinde dağıtılmasıyla iyileştirilmiştir (Bachu ve ark. 2018).

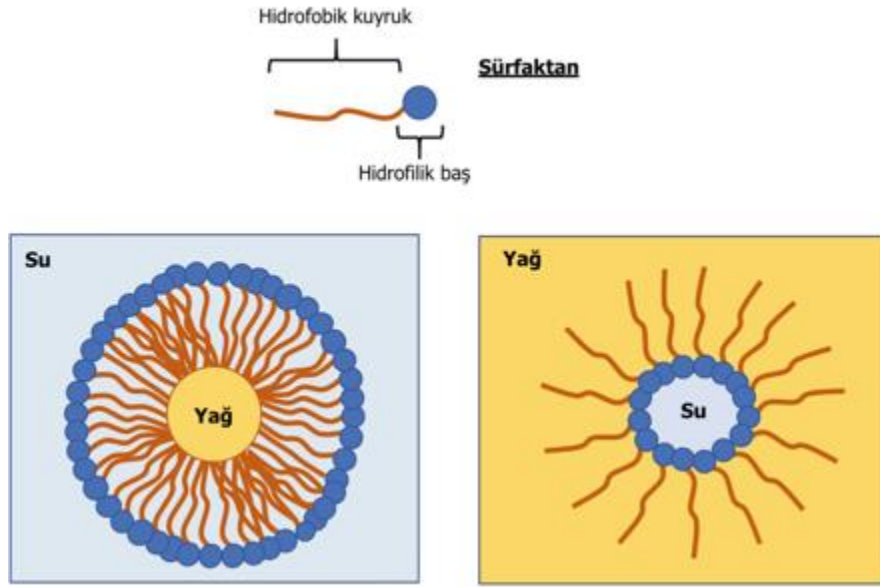
Bu sistemler dışında kortikosteroid ve NSAİİ'lerin yüklendiği nanosüspansiyon ve kübozomlar özellikle oküler cerrahi sonrası meydana gelecek enfeksiyonu ve ödemi önleme amacıyla çalışılmıştır (Gaballa ve ark. 2020; Popov 2020). Bunun yanı sıra oküler ilaç taşınmasında kullanılmak üzere lipozomlar, lipit koloidal sistemler, polimerik nanopartiküller ve metal nanopartiküllerin hidrojeller/ hidrojel yapılı kontakt lenslerin matrisi içerisinde dağıtılarak nanopartikül yüklü cihazları geliştirilmiştir (Bachu ve ark. 2018). Son olarak, özellikle DED tedavisinde kullanılmak üzere yapılarında metil selüloz/ karboksi metil selüloz bulunan ve nanoplaka (nanowafer) denilen ilaç yüklü nano boyutta rezervuarlardan oluşan yüksek mukoadhezif özelliğe sahip taşıyıcı sistemler de araştırılmıştır (Coursey ve ark. 2015).

2.4. KLN, NLT ve NE Hakkında Genel Bilgiler

Özellikle hidrofobik özelliğe sahip etkin maddeler için formülasyonların geliştirilmesi, son yıllarda en zorlu araştırma alanlarından biri haline gelmiştir. Bu tür ilaçların salımını modifiye etmek ve yan etkileri azaltmak için alternatif sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Carvajal-Vidal ve ark. 2019; Liu ve ark. 2021). Topikal uygulanmak üzere geliştirilen lipozomlar, nanokapsüller, nanosüngerler ve polimerik nanopartiküller gibi koloidal taşıyıcı sistemlerde fiziksel ve kimyasal kararlılığın kısıtlı olması, büyük ölçekli üretim yöntemlerine ihtiyaç duyulması, ilacın taşıyıcı sistemden hızlı salımı, stabilite zorlukları ve polimerden kaynaklanan toksisite gibi dezavantajlar mevcuttur (Selvamuthukumar ve Velmurugan 2012). Chen ve arkadaşları, likobetain yüklü lipozom ve nanoemülsiyon formülasyonu hazırlayarak yaptıkları bir çalışmada, NE (%95.33) ve lipozomların (%94.55) enkapsülasyon etkinliklerinde istatistiksel açıdan belirgin bir fark görülmemesine rağmen ($p > 0,05$); partikül boyutu açısından karşılaştırıldığında lipozom formülasyonlarının partikül boyutunun (210,97 nm) nanoemülsiyon formülasyonlarına ait partikül boyutuna (180,17 nm) göre istatistiksel

açından farklı olduğunu ($p \leq 0,05$) bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2018). Yine Bonaccorso ve arkadaşlarının kurkuminin polimerik nanopartiküllerini ve KLN'lerini hazırladıkları bir çalışmada; kurkumin yüklü polimerik nanopartiküllerin boyutunun (338,20 nm), KLN'lerin boyutlarına (127,10 nm) göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüş ($p \leq 0,05$); enkapsülasyon etkinlikleri de KLN'lerin (%90,49) polimerik nanopartiküllere (%78,04) göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir ($p \leq 0,05$) (Bonaccorso ve ark. 2021). Bu çalışmalar ve bahsedilen dezavantajlar göz önüne alındığında, lipozomlar, nanokapsüller, nanosüngerler ve polimerik nanopartiküllerin IKLN, NLT ve NE'lara göre optimal farmasötik taşıyıcı sistem olarak görülmesi fikrinden uzaklaşmaktadır.

Mumlar veya yağlar gibi lipofilik bileşenlerden meydana gelen KLNr, ilaçların topikal uygulama da dahil olmak üzere farklı yollardan verilmesi için ilgi gören kolloidal taşıyıcı sistemler arasındadır (Üner 2006, 2019). KLN, NLT ve NE'lar özellikle hidrofobik ilaçların taşınmasında tercih edilmektedirler. İlacın stabilitesini arttırmalarının yanı sıra, ilacı hedeflenen bölgeye taşıyarak biyoyararlanımını da arttırmaları (Liu ve ark. 2021). Bunun yanı sıra kontrollü ilaç salımı sağlarlar ve ilacın dokuda tutulumunu arttırmaları (Göppert ve Müller 2005). Özellikle yan etki profili yüksek olan etkin maddelerin (kortikosteroidler, siklosporin, verapamil, artemisinin, GG918 gibi antikanser ajanlar) (Selvamuthukumar ve Velmurugan 2012; Charlie-Silva ve ark. 2018; Carvajal-Vidal ve ark. 2019) taşınmasında daha fazla tercih edilseler de, bunun dışında oklüzif, penetrasyonu ve cilt hidrasyonunu arttırıcı etkilerinden dolayı hem kozmetikte (nemlendirici, rahatlatıcı, yaşlanma karşıtı ve güneş koruyucu gibi ürünler) hem de farmasötik alanda aktif olarak kullanılmaktadırlar (Üner ve ark. 2005; Souto ve Müller 2008; Pardeike ve ark. 2009; Lopez-Garcia ve Ganem-Randero 2015). Bunun dışında özellikle lokal etki beklenen inflamatuvar hastalıkların tedavisinde NSAİİ'lerin (diklofenak sodyum, flurbiprofen, ibuprofen, indometazin ve lornoksikam) taşınmasında ve glokom tedavisinde dokuda tutulumları yüksek olduklarından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (Lombardi Borgia ve ark. 2005; Souto ve ark. 2010; Carmelo ve ark. 2015; Gönüllü ve ark. 2015; Balguri ve ark. 2016).

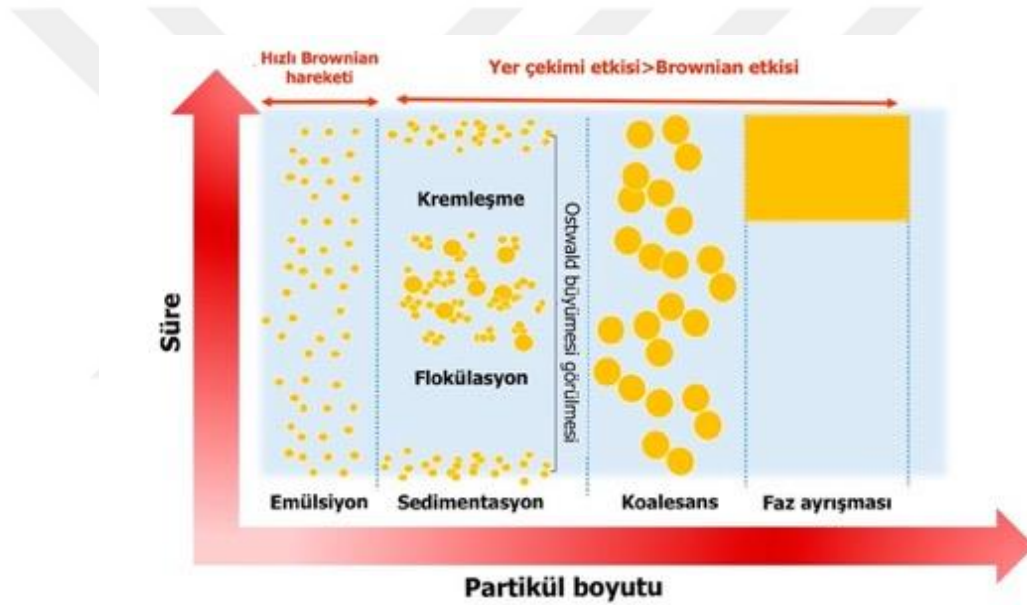


Şekil 2-13: S/Y veya Y/S tipi NE (Barradas ve Holanda 2020)

Lipit nanotaşıyıcı sistemlerin ilk üyelerinden olan NE, süpfaktanlarla stabilize edilmiş hidrofobik yağ veya su bazlı bir çekirdekten oluşan 10-1000 nm arası damlacık boyutuna sahip veziküler sistemlerdir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları enkapsüle ederek, çözünürlüklerini artırır ve oral, transdermal, oküler veya parenteral uygulama için kimyasal ve fiziksel etkilere karşı ilacı korurlar (Sanchez-Rubio ve ark. 2020). Damlacıkları sulu bir fazda dağıtmak ve sistemi stabilize etmek için yağ ve su dışında emülgatörler (süpfaktanlar) kullanılır. Emülgatörler, kendilerini apolar sıvılara hapsedme eğiliminde olan hidrofobik bikarbonat kuyruklar ve polar baş kısmından oluştukları için birbiriyle karışmayan iki faz arasındaki arayüzey gerilimini düşüren amfifilik bileşiklerdir (Şekil 2-13) (Sanchez-Lopez ve ark. 2019). Tek fazlı NE bileşimlerine bağlı olarak kendi içlerinde 3'e ayrılmaktadır. Y/S NE'da sürekli faz olarak su ve dağılmış faz olarak yağ bulunmakta ve süpfaktanları genellikle su fazında çözünmektedir. S/Y emülsiyonlarında ise sürekli faz olarak yağ bulunmakta ve yüzey aktif madde genellikle yağ fazında çözünmektedir (Şekil 2-13). Üçüncü olarak ise, yağ ve suyun mikro alanlarında sistem içinde birbirine dağıldığı iki tabakalı nanoemülsiyonlar. Her üç nanoemülsiyon tipinde arayüz, uygun bir yüzey aktif madde ve/veya yardımcı yüzey aktif madde kombinasyonu ile stabilize edilmektedir (Mason ve ark. 2006). Tek fazlı nanoemülsiyonların yanı sıra çok fazlı nanoemülsiyon modelleri de vardır. Bu sistemler, büyük su damlacığı içerisinde disperse olan yağ damlacıkları (Y/S/Y) veya büyük yağ damlacığı içerisinde disperse olan su damlacıkları (S/Y/S) olarak

karşımıza çıkmaktadır. Bu formülasyonlarda stabiliteyi sağlamak için klasik nanoemülsiyonlardan daha fazla oranda sürfaktan kullanıldığı görülmektedir (Soriano-Ruiz ve ark. 2018; Galvez-Vergara ve ark. 2020).

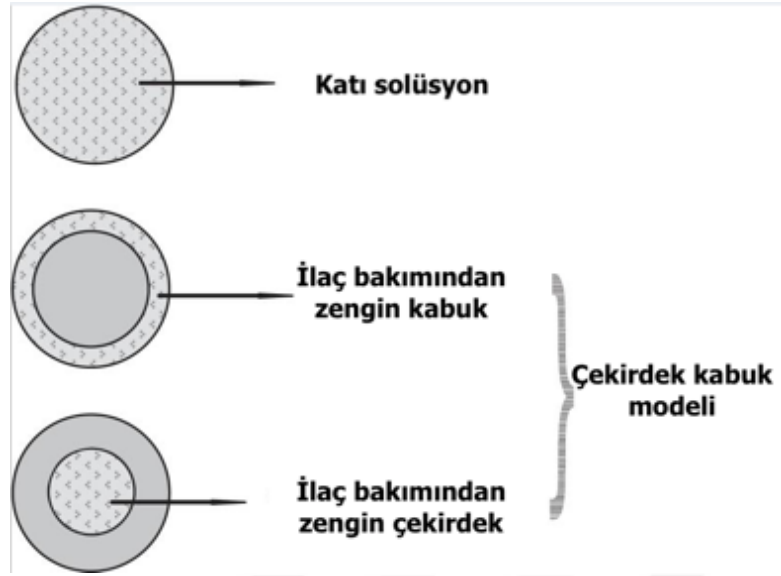
NE'ların küçük damlacık boyutuna sahip olmaları, onlara berrak/ bulanık bir görünüm verebilir; bu emülsiyon veya mikroemülsiyonla ilişkili süt beyazı (mikron boyutundaki damlacıklar çoklu ışık saçılımına katılır) renginden farklıdır. Bazı NE'ların damlacık boyutu, mikroemülsiyonlar ile aynı aralığa sahip olmalarına rağmen, yapısal özellikler ve uzun vadeli termodinamik kararlılıkları açısından büyük farklar göstermektedir (Singh ve ark. 2017).



Şekil 2-14: Saklama süresinin bir fonksiyonu olarak kararsız NE'un damlacık büyüklüğünün artışı (Mustafa ve Hussein 2020) (kremalaşma olacak)

Özellikle kolloidal dispersiyonlarda stabilite üzerine etki eden Brownian hareketi, bir akışkandaki parçacıkların sürekli olarak diğer moleküllerle çarpışırken rastgele, kontrolsüz hareketidir. NE'ların Brownian hareketi yerçekimi/ viskoziteden kaynaklanan kinetik kararsızlığı dengelemek için yeterince güçlüdür. Bunun yanı sıra NE'ların uzun vadedeki fiziksel kararlılıkları kremalaşma, çökelme ve agregasyon gibi kararsızlığı ortaya koyan çeşitli durumlarla belirlenmektedir (Şekil 3-14) (Singh ve ark. 2017; Mustafa ve Hussein 2020). Yine kolloidal dispersiyonlarda görülen bir başka değişim Ostwald olgunlaşmasıdır. Ostwald olgunlaşması, genellikle S/Y formundaki

dispersiyonların termodinamik olarak daha kararlı bir duruma ulaşmak için NE'ların yüzey/alan oranını en aza indirerek daha büyük parçacıklar üzerinde birikmesiyle meydana gelen bir değişimdir (Şekil 2-15) (Trujillo-Cayado ve ark. 2020). NE'larda yağ fazı sistemde çözünmeden dağıldığı için, bu durum Ostwald olgunlaşmasına kinetik bir bariyer sağlayarak nanoemülsiyonun stabilitesini de arttırmaktadır. Ostwald olgunlaşmasının genellikle NE'un hazırlanmasından 5-10 gün sonra meydana geldiği ve içeriğindeki yağın oranına/ cinsine bağlı olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Guan ve ark. 2018; Koroleva ve ark. 2018). Özellikle esansiyel yağların (limon, kekik ve okaliptus gibi) NE'larda Ostwald olgunlaşmasını arttırdığı görülmüştür (Rao ve McClements 2012; Caputo ve ark. 2020; Trujillo-Cayado ve ark. 2020). NE'larını içerisinde kullanılan çeşitli sürfaktan veya sürfaktan karışımları değiştirilerek Ostwald olgunlaşmasının önüne geçilebildiği görülmüştür (Trujillo-Cayado ve ark. 2020). Bunun yanı sıra sıcaklık artışının, NE'larda yüzey etkin maddenin su içinde çözünmesiyle partiküllerin agregasyonuna neden olarak dispersiyonun kararsızlığına yol açabileceğini düşünülmektedir (Koroleva ve ark. 2018). Nanoemülsiyonlar etkin maddelerin biyoyararlanımını arttırma, toksik ve tahriş edici bileşenlerden oluşmama, küçük boyutları sayesinde yüzey alanlarını arttırarak absorpsiyonu arttırma ve lipofilik ilaçların çözünmelerine yardımcı olma gibi avantajları sağlamasına rağmen (Jaiswal ve ark. 2014); Ostwald olgunlaşmasından kaynaklı yüksek oranda sürfaktan kullanımı gerektirmeleri, sıcaklıktan çok fazla etkilendiklerinden dolayı uzun süre stabiliteyi koruyamamaları ve yüklenen etkin maddenin karakteristik özelliklerinden çok fazla etkilenmeleri nedeniyle alternatif lipit nanopartiküler sistemler araştırılmıştır (Lippacher ve ark. 2002; Basha ve ark. 2019).



Şekil 2-15: KLN içerisine etkin madde hapsedme modelleri (homojen katı çözelti matrisi (üst), etkin madde bakımından zengin kabuk içeren çekirdek kabuk modeli (orta), etkin madde bakımından zengin çekirdek içeren çekirdek kabuk modeli (alt)) (Üner ve Yener 2007)

KLN'ler, 90'lı yılların başında emülsiyonlar, NE'lar, lipozomlar ve polimerik nanopartiküller gibi geleneksel taşıyıcı sistemlere alternatif olarak ortaya çıkmış boyutları 40 ile 1000 nm arası değişen nanopartiküler taşıyıcılardır (Şekil 2-15). KLN'lerde NE'lerden farklı olarak sıvı lipidin yerine, hem vücut sıcaklığı hem de oda sıcaklığında katı halde bulunan lipidler kullanılmakta ve etkin madde genellikle bu matris yapı içerisinde dağıldığı için kontrollü bir salım sağlanabilmektedir (Souto ve ark. 2004; Pardeike ve ark. 2009; Borges ve ark. 2020).

Etkin maddenin KLN'de tutulduğu bölüme göre üç farklı model bulunmaktadır (Şekil 2-15). Katı çözelti matris modelinde, ilaç lipid matris içinde moleküler olarak dağılmış ve lipid ile güçlü etkileşimlere sahiptir (genellikle bu modelde sürfaktan kullanılmaz ve soğukta homojenizasyon tekniği kullanılarak üretim yapılır) (Montenegro 2017). Etkin madde bakımında zengin kabuk modelinde, lipid kristalleşme sıcaklığına tekrar ulaşıncı katı lipid bir çekirdek oluşur. Dispersiyonun sıcaklığı düşürüldüğünde, etkin madde KLN'ün hareketsiz sıvı dış kabuğunda yoğunlaşır. Son olarak etkin madde bakımından zengin çekirdek modelinde, erimiş halde bulunan lipid içinde doymunluk çözünürlüğünde/ doymunluğa yakın olduğunda, bu model ortaya çıkmaktadır (Müller ve ark. 2005).

KLN ciltteki okluzif etkilerinden dolayı artan hidrasyon nedeniyle ilaçların özellikle topikal uygulamaları için tercih edilselerde oral, parenteral, rektal ve oküler olarak da sıklıkla çalışılmaktadırlar (Üner ve Yener 2007; Silva ve ark. 2011; Clares ve ark. 2014). Oklüzif etkilerinden dolayı diğer kolloidal sistemlere sağladıkları avantajların yanı sıra, daha yüksek ilaç stabilitesi, hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları taşıyabilmeleri, toksisite risklerinin bulunmaması, kolay büyük ölçekli üretimleri ve liyofilize edilebilmeleri gibi çeşitli avantajlar da sunmaktadırlar. KLN'lerde ilaç yükleme kapasitesi NE'lara kıyasla yüksek olsa da, yükleme kapasitesi: lipit matriks içinde ilacın çözünürlüğü, ilaç-lipit karışabilirliği, katı matrisin lipidin kimyasal/ fiziksel yapısı ve lipit materyalin polimorfik yapısına bağlı olarak değişmektedir. Özellikle ilacın çözünürlüğü ile ilaç tutma kapasitesi arasında ters bir ilişki vardır ve ilacın sudaki çözünürlüğünün artışı ilaç tutma kapasitesinde düşüşe yol açmaktadır (Üner ve Yener 2007; Sanchez-Lopez ve ark. 2017).

KLN'lerin çeşitli avantajlarının yanı sıra, öngörülemeyen jelleşme eğilimi, katı lipitlerin yapısından kaynaklı polimorfik geçişler ve depolama sırasında etkin maddenin dışarı sızması gibi çeşitli sorunlar görülmesinden dolayı, katı lipit yapısına sıvı lipit eklenmesiyle eski nesil KLN'lerin dezavantajlarının üstesinden gelecek yeni taşıyıcı sistemler olan, nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT) ortaya çıkmıştır (Poonia ve ark. 2016). Müller ve arkadaşları NLT'ları, özellikle yükleme kapasitesini arttırmak ve depolama sırasında ilaç ikamesini arttırıp sızmasını önleyen özel yapıdaki taşıyıcı sistemler olarak tanımlamıştır (Lippacher ve ark. 2002; Müller ve ark. 2002).



Şekil 2-16: KLN, NLT ve NE'un yapısı(Kharat ve McClements 2019)

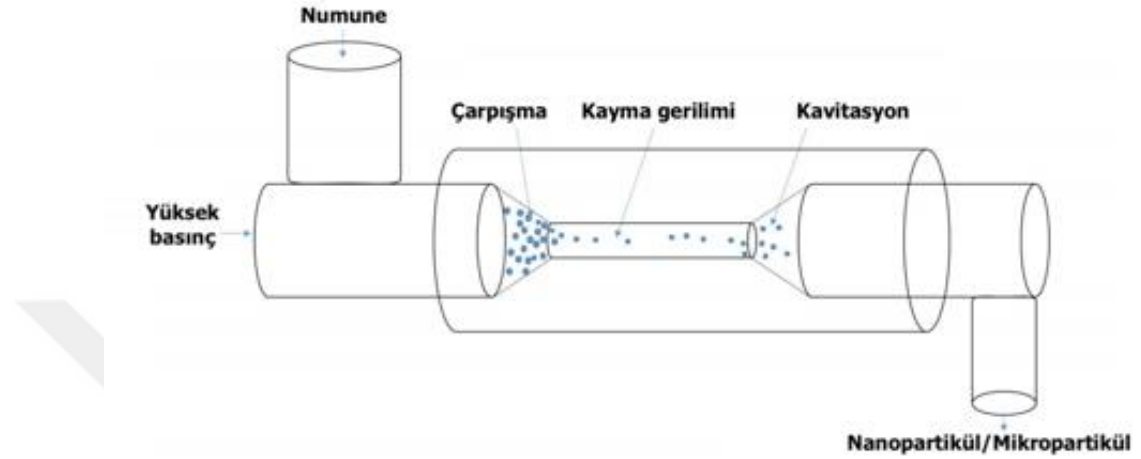
NLT'lar, içeriklerinde sıvı lipitlerin bulunması nedeniyle bu durumun çeşitli kusurlardan meydana gelen bir lipit fazın oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Müller ve ark. 2000). Lipit moleküller daha düzensiz paketlenmesi için bu durum partikül morfolojisinin değişmesi ve etkin madde sızmasını önlemektedir. Bu durum hem su içinde yağ (Y/S) formunda NE'ların hem de KLN'in avantajlarını birleştirmek ve eksikliklerini ortadan kaldırmaktadır (Şekil 2-16) (Müller ve ark. 2002; Santos ve ark. 2019). Zhang ve arkadaşlarının β -karoten yükleyerek hazırladığı NLT ve NE formülasyonlarında, β -karoten bozunmasının NLT'larda yalnızca %47,3 iken nanoemülsiyonlarda ise %94,8 olduğu göstermiş ve bunun istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu bildirmişlerdir ($p \leq 0,05$) (Zhang ve ark. 2013). Gönüllü ve arkadaşlarının lornoksikam yükleyerek hazırladığı KLN, NLT ve NE formülasyonlarında, lipit fazına eklenen oleik asidin NLT formülasyonlarının hapsedme kapasitesini (%97.89), KLN formülasyonlarına göre (%93.22) istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görülürken ($p \leq 0,05$); Compritol® 888 ATO ile hazırlanan KLN ve NLT'lar değişik sıcaklıklarda stabilizeye bırakıldıkları 6 ay boyunca boyutlarında belirgin bir fark görülmediği tespit edilmiştir ($p > 0,05$). NE formülasyonlarında ise partikül boyutunun (168-205 nm arası) istatistiksel olarak anlamlı derecede değiştiği görülmüştür ($p \leq 0,05$) (Gönüllü ve ark. 2015). Sonuç olarak, hem KLN'ler hem de NLT'lar, güvenli olarak kabul edilen (GRAS) statüde hem biyolojik hemde fizyolojik olarak parçalanabilen lipit malzemeler kullanılarak hazırlanmalarının yanı sıra; ilaç hapsedme kapasiteleri, stabiliteleri ve oklüzif etkileri yüksek olan popüler lipit koloidal sistemlerdir (Müller ve ark. 2002; Kasongo ve ark. 2011).

2.4.1. KLN, NLT ve NE'ları Hazırlama Yöntemleri

KLN, NLT ve NE formülasyonlarına ait sıvı/katı lipit kullanım durumu farklı olsa da üretim yöntemleri aynıdır. Tüm lipit koloidal sistemler yüksek enerjili, düşük enerjili veya her ikisinin kombinasyonları kullanılarak hazırlanmaktadır (Koroleva ve ark. 2012). KLN, NLT ve NE'lar ile yapılan ilk çalışmalarda araştırmacıların genellikle yüksek enerjili karıştırma ve ultrasonik emülsifikasyon yöntemini sıklıkla kullandıkları görülsede; mikroemülsiyon yöntemi de çoğu araştırmacı tarafından benimsenen bir yöntem olarak yerini almıştır (Cavalli ve ark. 2002; Souto ve ark. 2004). Yine, yüksek basınçlı homojenizasyon metodu da tek adımda ve hızlı üretime olanak vermesinin yanı

sıra organik solvan kullanımı gerektirmemesi nedeniyle sık kullanılan teknikler arasındadır (Souto ve ark. 2006).

2.4.1.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon



Şekil 2-17: Yüksek basınçlı homojenizatör ve üretim aşamaları (Rajendran ve ark. 2016)

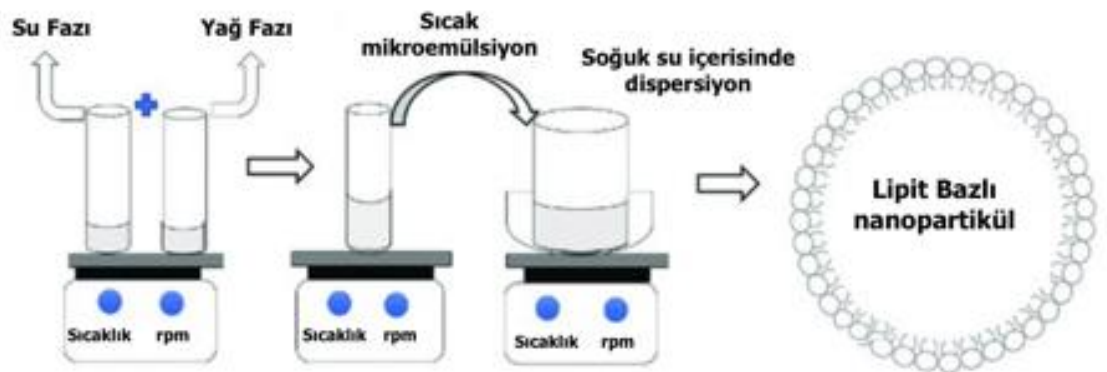
Müller ve Lucks tarafından KLN, NLT ve NE'ların yüksek basınçlı homojenizasyon ile hazırlanması önerilerek, bu teknik patentlenmiştir (Müller ve Lucks 1996). Yüksek basınçlı homojenizatörlerin, sıvıyı mikron genişliğine sahip bir delikten, yaklaşık 100- 2000 bara sahip bir basınçla itmesiyle; partiküller, kısa mesafede 1000 km/saat üzeri bir hıza ulaşır. Bu sırada partiküllerin sahip olduğu yüksek kayma gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri, onların nanometre boyutuna parçalanması ile sonuçlanır (Jenning ve ark. 2002). Yüksek basınçlı homojenizasyon da yine kendi içerisinde sıcak ve soğukta olmak üzere 2 şekilde gerçekleşmektedir. Sıcakta/ soğukta üretim yönteminin hangisinin uygun olduğu lipid kolloidal sistemlerin sıvı/ katı lipid içermeleri ve etkin maddelerin sıcaklığa duyarlı olup olmamalarına göre tercih edilmektedir (Müller ve ark. 2004).

Sıcak homojenizasyon, içeriğindeki katı lipidlerden dolayı daha çok KLN ve NLT'lar için tercih edilen ve genellikle bileşimlerinde bulunan katı lipidlerin erime noktasının üstündeki sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Etkin madde, erime noktasının bir miktar üzerinde (yaklaşık 10 °C) bir sıcaklıkta eriyik halde bulunan olan lipid içerisinde çözünür/ disperse edilir. Daha sonra etkin madde içeren lipid dispersiyonu, aynı

sıcaklıktaki su ile sürfaktan çözeltisi içinde hızı yüksek bir şekilde karıştırılarak disperse edilir. Elde edilen sıcak haldeki emülsiyon oluşum öncesi karışım homojenizatör içerisinde geçirilerek oluşan sıcak haldeki Y/S nanoemülsiyonu oda sıcaklığına soğutulur ve lipit koloidal sistemler elde edilir (Lippacher ve ark. 2002; Bummer 2004; Üner ve ark. 2014). Kısa zincirli yağ asitleri veya oda sıcaklığına yakın erime noktasına sahip olan lipitlerle bu teknik uygulanacaksa, nanoemülsiyonlar düşük sıcaklıklara soğutulmalıdır (Müller ve ark. 2000). Sıcakta homojenizasyonun en büyük dezavantajları arasında etkin madde ne kadar dayanıklı olursa olsun bozulma ihtimali ve fazla ısı nedeniyle üretimin düşük olmasıdır (Sharma ve ark. 2013).

Soğuk homojenizasyonda ise, etkin maddenin içinde disperse edildiği lipit, kuru buz/ sıvı nitrojen kullanılarak hızla soğutulur. Daha sonra etkin maddeyi içeren lipit, 100 µm boyutundaki lipit mikropartiküllere öğütülür ve soğuk formda bulunan sürfaktan içerisinde çözülür. Elde edilen pre-emülsiyon, oda sıcaklığında yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek lipit koloidal sistemler elde edilir (Pardeike ve ark. 2009; Kasongo ve ark. 2011). Soğuk homojenizasyon yöntemi, etkin maddenin bozulması, su fazında etkin madde dispersiyonu, lipit rekristalizasyonunun güçlüğü gibi sıcakta homojenizasyonda yaşanan problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir (Wissing ve ark. 2004). İki yöntem de formülasyonlarında %40'a kadar lipit içeren düşük boyutta partikül üretimi için uygundur (Müller ve ark. 2000).

2.4.1.2. Mikroemülsiyon Yöntemi

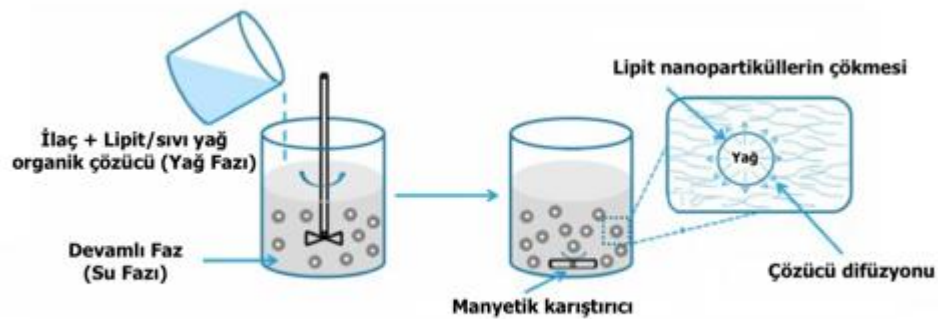


Şekil 2-18: Mikroemülsiyon yönteminin aşamaları (Shrestha ve ark. 2021)

Mikroemülsiyonların dilüsyonuna dayanan bu yöntemde önce, KLN/ NLT üretimi yapılacaksa lipit (yağ asitleri veya gliseridler) eritilir, NE için ise sıvı yağ su fazı ile aynı sıcaklığa gelinceye kadar ısıtılır. Su, sürfaktan ve kosürfaktan karışımı, lipit/ sıvı yağ ile aynı sıcaklıkta olacak şekilde ısıtıldıktan sonra ve erimiş lipide/ sıvı yağa eklenerek karıştırılır. Bu maddeler, mikroemülsiyon oluşumu için gerekli oranlarda karıştırıldığında, transparan ve termodinamik olarak stabil bir sistem elde edilir. Oluşan ılık mikroemülsiyon, termostatlı bir şırınga kullanılarak, 2–3 °C' de içerisinde karıştırıcı bulunan soğuk suya damla damla ilave edilir. Sıcak mikroemülsiyon : soğuk su hacim oranı, 1:25 ile 1:50 arasında değişebilmektedir. Suyun fazlası, filtrasyon/ liyofilizasyon ile uzaklaştırılır (Müller ve ark. 2000; Shrestha ve ark. 2021).

2.4.1.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi

Çözücü emülsifikasyon-evaporasyon yönteminde; lipit/ sıvı yağ, su ile karışmayan organik bir çözücünde (etanol, metanol, toluen, kloroform vb) çözülür ve daha sonra sulu faz içinde emülsifiye edilir. Çözücünün vakum altında buharlaştırılmasıyla, KLN, NLT ve NE'lar oluşarak çöker. Bu yöntem özellikle ısıya duyarlı etkin maddeler için, hazırlama sırasında ısı uygulanmamasından dolayı tercih edilmektedir (Müller ve ark. 2000). Diğer yandan, bu yöntemde organik çözücü kullanılması dezavantaj olarak sayılabilmektedir. Aynı zamanda, bu yöntem ile üretimde ölçek büyütme işleminin göz önüne alındığında çeşitli problemler ortaya çıkmaktadır. Bu yöntem ile elde edilen ürünün ortalama partikül büyüklüğü, organik fazdaki lipidin konsantrasyonuna bağlıdır (Leimann ve ark. 2013).

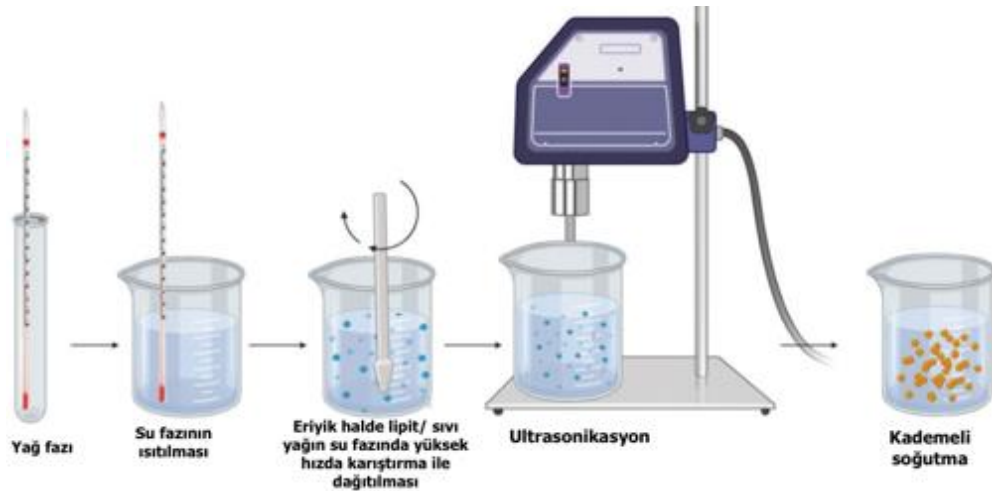


Şekil 2-19: Çözücü difüzyon yöntemi ile KLN, NLT ve NE'ların hazırlanması (Wang ve ark. 2016)

Çözücü difüzyon yöntemindeyse, su ile karışabilen çözücüler (benzil alkol, etil format vb) kullanılmaktadır. Lipit, suya ilave edilen çözücüde çözülür ve yüksek sıcaklıktaki, çözücü ile doyurulmuş sürfaktan çözeltisi de eklenerek emülsiyon meydana gelir. 1:5 – 1:10 arası değişen oranlarda su eklenip, çözücünün emülsiyon damlacıklarından devamlı faza difüzyonu nedeniyle nanopartiküller çöker. Oldukça seyreltik olan dispersiyon, ultrafiltrasyon veya liyofilize edilerek konsantre hale getirilmektedir (Wissing ve ark. 2004; Azmi ve ark. 2019).

2.4.1.4. Yüksek Hızda Karıştırma ve Ultrasonikasyon Yöntemi

Bu yöntemler çoğu makalede birlikte kullanılmakta ve belli bir süre boyunca yüksek sıcaklık uygulanmaktadır. Yüksek hızda karıştırma yönteminde, polidispersite indeksinin yüksek olması (mikrometre boyutuna varabilen), formülasyonun saklanması sırasında partikül büyümesi gibi problemlere sebep verdiği için en önemli dezavantajı bu olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra, ultrasonikasyon yöntemindeyse metal parçacık kontaminasyonu riskinin göz ardı edilmemesi gerektiği bildirilmiştir (Wissing ve ark. 2004; Rosa ve ark. 2016).



Şekil 2-20: Yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon tekniği (Sistra ve ark. 2020)

Hou ve arkadaşlarının, KLN, NLT ve NE'ların üretiminde, hem yüksek hızda homojenizasyon hem de ultrason yönteminin birlikte kullanıldığı modifiye bir yöntem kullanmışlardır. Bu yöntemin, organik çözücüye ihtiyaç olmadan yüksek kalitede lipit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılabilecek, basit, uygun ve etkin bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Hou ve ark. 2003).

2.4.2. KLN, NLT ve NE'ların Karakterizasyonu

KLN, NLT ve NE'ların partikül büyüklükleri, dağılımları ve zeta potansiyelleri ile formülasyonların viskozitesi, salım özellikleri gibi parametrelere etki ederken aynı zamanda formülasyonların *in vitro/ in vivo* performansına da etki etmektedir (Garud ve ark. 2012; Ganta ve ark. 2014). Özellikle KLN, NLT ve NE'ların yüzey/ hacim oranlarının büyümesi ve buna bağlı olarak partikül büyüklük dağılımlarının değişmesi, kimyasal, elektriksel ve mekanik özellikler gibi boyuta bağlı birçok değişikliğe neden olur (Üner 2006). Zeta potansiyel ve viskozite özellikle formülasyonların stabiliteleri açısından önemli olurken; viskoziteleri uygulama anında nanopartiküllerin yüzeye tutunabilmeleri ve içerdiği formülasyonun kontrollü bir salım yapması açısından önemlidir (Freitas ve Müller 1998; Rauverdink ve Weaver 2010; Silva ve ark. 2011).

2.4.2.1. Partikül Büyüklüğü Tayini

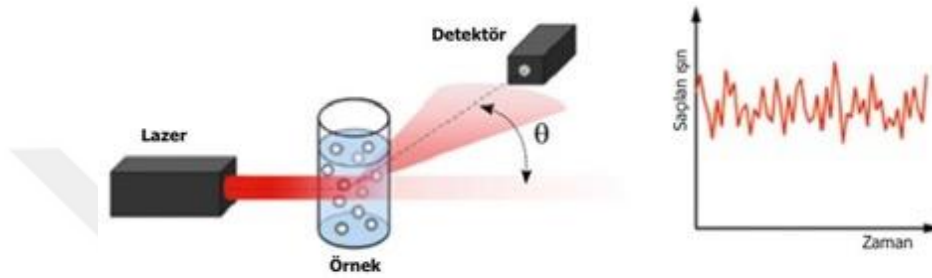
KLN, NLT ve NE'ların partikül/damlacık büyüklüklerinin tayininde DLS hızlı ve güvenilir bir partikül büyüklüğü tayini sağlaması açısından yaygın olarak kullanılsa da, 2000'li yılların başından beri özellikle nanometre büyüklüğündeki partiküllerin büyüklüğünün ölçümünde güvenli, hızlı ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlayan lazer ışık saçılımı yöntemi de kullanılmaktadır (Ma ve ark. 2000; Clares ve ark. 2014; Üner 2016).

Dinamik Işık Saçılımı

DLS, Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ya da yarı-elastik ışık saçılımı (Quasi-elastic light scattering, QELS) olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntem KLN, NLT ve NE'lerin partikül büyüklüklerinin tayininde kullanılmaktadır (Clares ve ark. 2014; Üner 2016).

Bu yöntemde deneysel olarak, dilüsyon yapılan numuneyi içeren küvet, partikül boyutuna bağlı olarak her yöne saçılma sinyaline yol açan polarize bir lazer ışınımına maruz kalır (Şekil 2-21). Parçacıkların Brownian hareketi, belirli bir açıda kaydedilen

saçılan yoğunluğun zamansal varyasyonlarını indükler ve Stokes – Einstein eşitliği (Eşitlik 2-1) yardımı ile ortalama damlacık büyüklüğü hesaplaması yapılır. Bunun yanı sıra parçacık boyutu dağılımına dair bilgi elde etmek için, cihaza ait otomatik korelasyon fonksiyonu da kullanılarak sinyalin yoğun olduğu bölgeler dikkate alınarak polidispersite indeksi (PI) de hesaplanmaktadır (Naiim ve ark. 2015; Üner 2016).



Şekil 2-21:PCS ölçüm sistemine ait temel yapı

Stokes-Einstein eşitliği,

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{Eşitlik 2-1})$$

D : Difüzyon katsayısı

k : Boltzman değişmezi

η : Viskozite

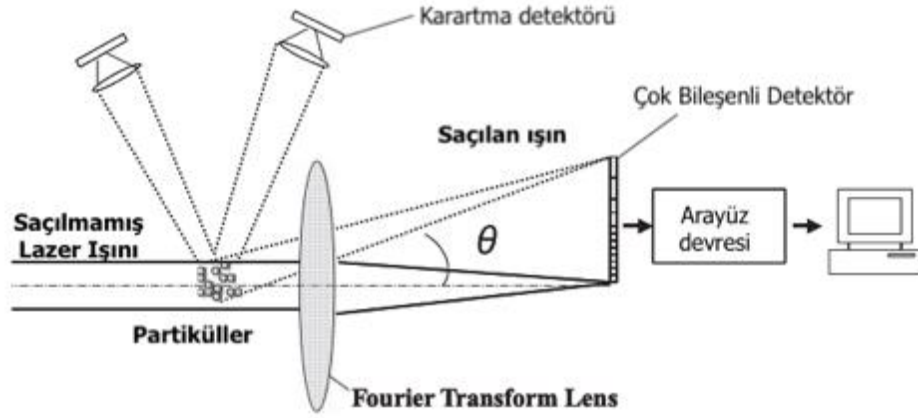
R_H : Küresel hidrodinamik yarıçap

T : Sıcaklık (Kelvin)

Lazer Işık Saçılımı Yöntemi

Dar açılı lazer ışık saçılımı (Low angle laser light scattering, LALLS) veya LD, bir küvet içerisinde bulunan partiküllerin ışık saçılımı ilkelerini kullanarak parçacıkların geometrik boyutunu küçük partiküllerin lazer ışınını geniş açılarda kırması; büyük partiküllerin ışığı daha küçük açılarda dağıtması kuralına dayanarak ölçen optik bir

yöntemidir (Üner 2016 ; Rawal ve Patel 2018). Partikül boyutu ve her bir açıdaki ışığın saçılma yoğunluğu arasındaki ilişki LD sayesinde ifade edilir (Igushi ve Yoshida 2011).

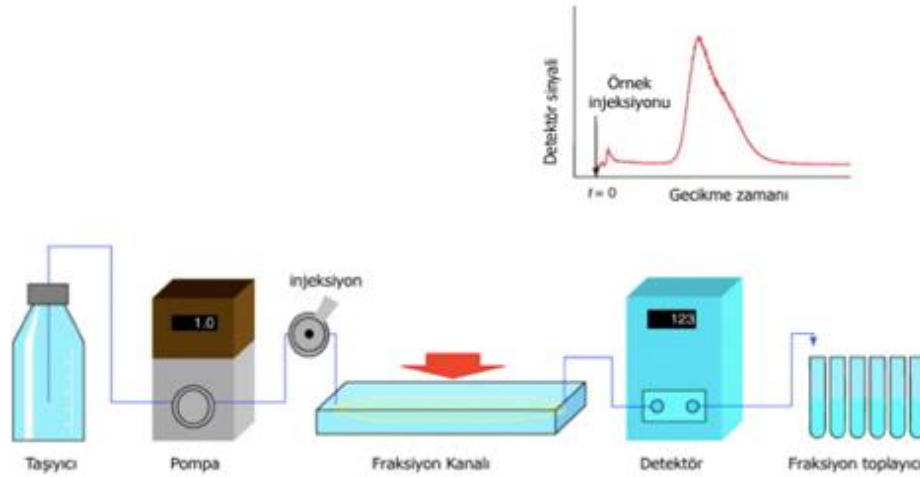


Şekil 2-22: LD cihazının çalışma mekanizması (Igushi ve Yoshida 2011)

PCS'ye göre daha geniş bir aralıkta (50nm-3500µm) ölçüm yapılabilen bu yöntem ile hem kuru numunelerin hem de dispersiyon halindeki numunelerin partikül büyüklüğünün ölçümü yapılabilmektedir (Üner 2016).

Alan Akışı Fraksiyonlama Yöntemi

Bu yöntem ile partiküller Stoke yarıçaplarındaki farka göre ayrılır. Alan akışı fraksiyonlama cihazı, nanodispersiyon sıvısının akış yönüne dik elektrik alanı uygulayarak nanopartikülleri boyutlarına göre ayırır .

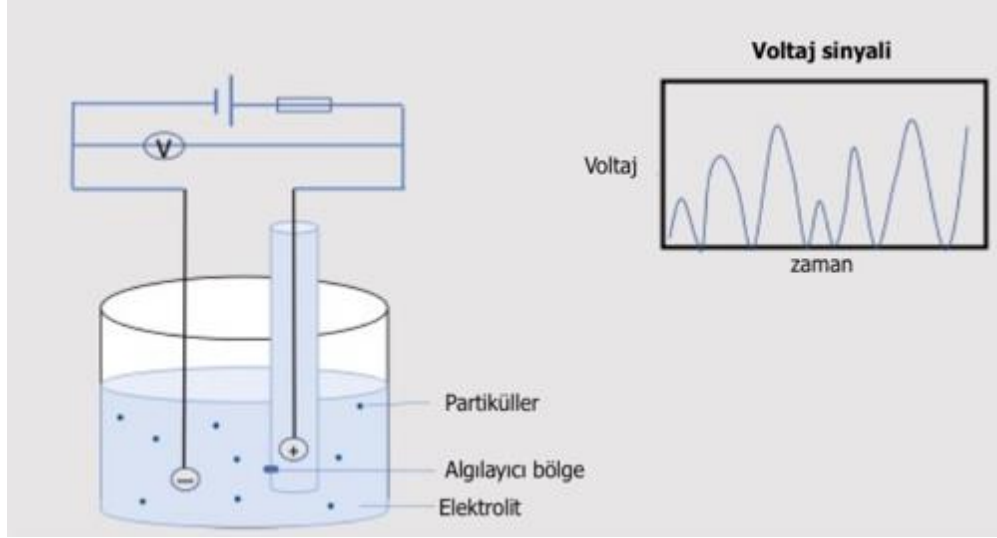


Şekil 2-23: Alan akışı fraksiyonlama cihazı (Rawal ve Patel 2018)

Bu yöntemin, çok küçük partikül boyut farklılıklarını analiz etme ve partiküllerin ölçümünden önce boyutlarına göre ayrılması gibi bazı belirgin avantajları olsa da (Müller ve ark. 2000); en büyük dezavantajı numunenin cihaza yüklenirken çok fazla seyreltilmesinden dolayı nanopartiküllerin içerdiği yüzey aktif madde ve stabilizatörlerin yapısında değişikliğe yol açabilme ihtimalidir (Rawal ve Patel 2018).

Coulter Sayacı Yöntemi

Bu yöntem 1998'de partiküllerin mutlak sayısını ölçmek için Freitas ve Müller tarafından partikül boyutunu ölçmek için kullanılmıştır. Bu yöntemde mikropartiküllerin içerisinde sadece küçük çaplı partiküllerin sabit boyutta bir açıklıktan elektrik algılama bölgesine geçmesine izin verilerek partiküllerin geçişinde oluşan direnç ölçülür.

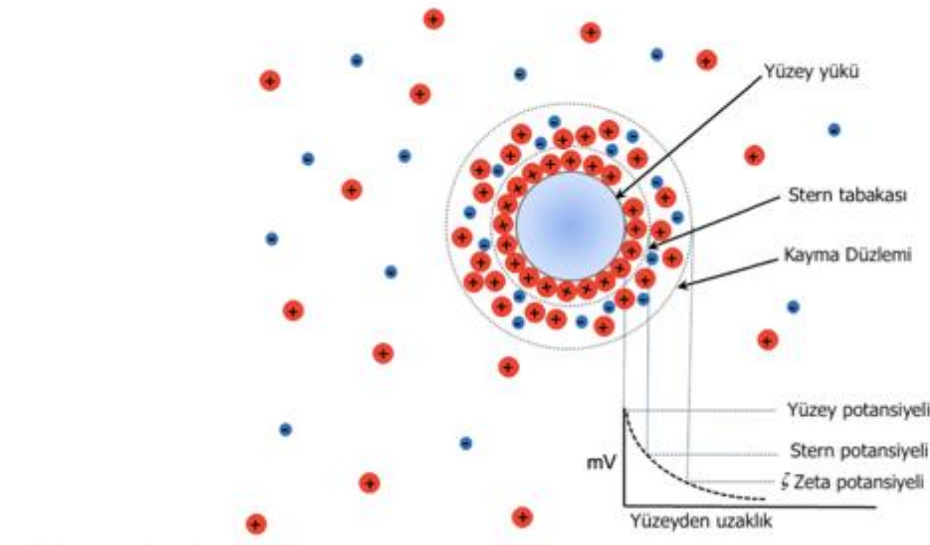


Şekil 2-24: Coulter Sayacı

Bu yöntemin dezavantajı, numuneler ancak normal salin gibi fizyolojik solüsyonlarla seyreltilerek hazırlanır, bu da nanopartiküllerin sahip olduğu elektriksel çifte tabakayı kararsızlaştırarak ölçümleri tutarsızlaştırabilmektedir (Freitas ve Müller 1998).

2.4.2.2. Partiküllerin Elektriksel Yükünün (Zeta Potansiyel) Tayini

KLN, NLT ve NE'lerin kolloidal davranışlarını ve *in vivo* performanslarını etkileyen özelliklerden biri de yüzey potansiyelleridir. Nanodispersiyon içerisindeki partiküller üzerindeki net yük ya da potansiyel (zeta potansiyel) çeşitli yöntemlerle ölçülebilmektedir (Üner 2016; Rawal ve Patel 2018).



Şekil 2-25: Zeta potansiyel diyagramı (Pate ve Safier 2016)

Yüklü bir partikülün yüzeyi etrafındaki elektriksel durum, elektriksel çift tabaka olarak adlandırılır ve iyonların uzaysal dağılımı ile belirlenir. Elektriksel çift tabakanın, partiküle sıkıca bağlı olan sabit bir tabaka ve yüklü yüzeyle temas halinde olan çözeltide dağılmış bir dağınık tabaka olarak iki tabakadan oluştuğu varsayılmaktadır (Şekil 2-25) (Pate ve Safier 2016). Su moleküllerinin bağlı halden serbest duruma dönüştüğü kayma düzeliminin potansiyeli ise, elektriksel çift tabaka ile partikül yüzeyi arasında zeta potansiyeli (ζ) olarak adlandırılan kayma düzlemi potansiyelinden biraz daha yüksek / eşdeğer potansiyel olarak bilinmektedir (Üner 2016; Rawal ve Patel 2018). KLN, NLT ve NE'lar arasındaki elektrostatik itme veya çekim miktarında, nanopartiküllerin ve dispersiyon ortamının ara yüzeyinde mevcut olan elektriksel potansiyel etkili olurken, zeta potansiyel aynı zamanda partiküllerin stabilizasyonunda da etkilidir.

Zeta potansiyelin hesaplanması Henry (Eşitlik 2-2) ve Helmholtz – Smoluchowski eşitliği (Eşitlik 2-3) olmak üzere iki ayrı eşitlikten yararlanılmaktadır. Bu eşitlikler sayesinde partikül üzerindeki net yükün hesaplanmaktadır (Pate ve Safier 2016; Üner 2016; Rawal ve Patel 2018).

Henry eşitliği,

$$\mu = \frac{2\varepsilon\zeta f(k\alpha)}{3\eta} \quad (\text{Eşitlik 2-2})$$

Helmholtz- Smoluchowski eşitliği,

$$\mu = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (\text{Eşitlik 2-3})$$

μ : Elektroforetik hareket

ζ : Zeta potansiyel

$f(k\alpha)$: Henry fonksiyonu

ε : Dielektrik sabiti

η : Viskozite

2.4.2.3. Görüntüleme Yöntemleri

KLN, NLT ve NE'ların yüzey morfolojileri ve dış yapıları, ilaç salımı, enkapsülasyon etkinliği ve stabiliteleri gibi özellikleri değerlendirmede büyük öneme sahiptir. Küresel partiküller, hem en düşük partikül hacmini sunarken hemde spesifik yüzey alanları sayesinde enkapsüle edilen etkin maddenin salımını difüzyonel olarak en kontrollü şekilde sağlayan sistemlerdir. DLS ve LD gibi yöntemler de parçatüküllerin genel yapısı ve dağılımını ölçmek için kullanılırken; partikül şeklinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi çeşitli mikroskobik yöntemler kullanılmaktadır (Rawal ve Patel 2018).

SEM, partikül boyutu, partikül şeklinin belirlenmesi ve yüzey analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Del Curto ve diğerleri, 2003). SEM analizi için numuneler genellikle dondurularak kurutulur ve ardından püskürtme adı verilen bir yöntemle altın, gümüş veya karbon ile kaplanır. Özellikle CryoSEM gibi tekniklerde, dondurarak kurutma veya vakum uygulaması nedeniyle yapısal değişikliğin ve elektrolit tuzlanmalarının önüne geçmek için dondurma işlemi çok hızlı yapılmaktadır. SEM'de görüntüler, elektron demetinin kaplanan malzeme ile olan etkileşiminden ortaya çıkan ışımlar veya geri yansıyan elektronların sayılmasıyla oluşturulur (Üner 2016; Rawal ve Patel 2018). Yine son yıllarda partikül yapısına ait dağılımı gözlemlemek için sıklıkla

kullanılan değiştirilmiş başka bir yöntem, kriyo alan emisyon taramalı elektron mikroskopudur (kriyo-FESEM) (Shah ve ark. 2015).

TEM'de, nanopartikül örneğinin görüntüsünü yansıtmak için elektronlar ışık yerine kaynak olarak kullanır. Formavar® (termoplastik reçineler - polivinil formal deriveleri) kaplı bakır ızgara üzerine yerleştirilen nanopartiküllere ait numune kurutulduktan sonra, elektron ışınları numune üzerine gönderilerek görüntüleme yapılır (Friedrich ve ark. 2010; Üner 2016). TEM görüntülemesi öncesi numune hazırlama için yaygın olarak kullanılan üç yöntem şunlardır: negatif boyama, dondurup kırma ve daldırmalı dondurma ile vitrifikasyon. Bunun dışında CryoTEM, TEM'de kullanılan diğer numune hazırlama ve boyama yöntemlerinin dezavantajlarını gideren en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Bunjes ve Siekmann 2005). TEM, yine SEM'de olduğu gibi morfolojinin yanı sıra partikül boyutunu, şeklini, yapısını ve diğer kolloidal taşıyıcıların varlığını görselleştirmek için kullanılırken; SEM'den avantajı ince yüzeylerde ya da kristallografik analizlerde üç boyutlu görüntülemenin yanı sıra hassas iki boyutlu görüntülemeye olanak tanınmasıdır (Üner 2016).

AFM'de ise, prob yardımıyla nanopartiküllerin morfolojisi gözlemlenirken aynı zamanda nanopartiküllerin yüksek çözünürlüklü görüntüleri elde edilmektedir (Sitterberg ve ark. 2010; Alex ve ark. 2011). Temassız modda çalışıldığında, partikül yüzeyi ile probun ucu arasında etki eden kuvvet, görüntülerin yaklaşık 2 nm'ye kadar görüntülenmesine yardımcı olurken; Prob ile temaslı modda çalışıldığında, nanometre ile angstrom aralığında yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilebilir. Bu yöntem görüntüleme öncesi numune hazırlama için karmaşık metodlar gerektirmezken; prob-numune etkileşimi nedeniyle bozuk görüntü elde edilebilmesi gibi bir dezavantaja sahiptir (Rawal ve Patel 2018).

KLN, NLT ve NE'ların yüzey morfolojilerinin tayini için en çok kullanılan yöntemler SEM, TEM ve AFM olmasının yanı sıra bu sistemlere alternatif sistemler de kullanılmaktadır. X-ışını kırınım yöntemi (XRD) ve Dar açılı X-ışını saçılım yöntemi (SAXS) bu alternatif sistemler arasındadır (Severino ve ark. 2014).

KLN, NLT ve NE'ların karakterizasyonunda damlacık büyüklüğü, elektriksel yük ve yüzey morfolojisi gibi özelliklerin yanı sıra viskozitesi, in vitro ve in vivo performansı da değerlendirilir. Böylece, nanopartiküllerin performansına etki edebilecek değişkenler önceden kontrol edilerek ortaya stabil ve güvenilir bir dozaj şekli ortaya çıkmaktadır.

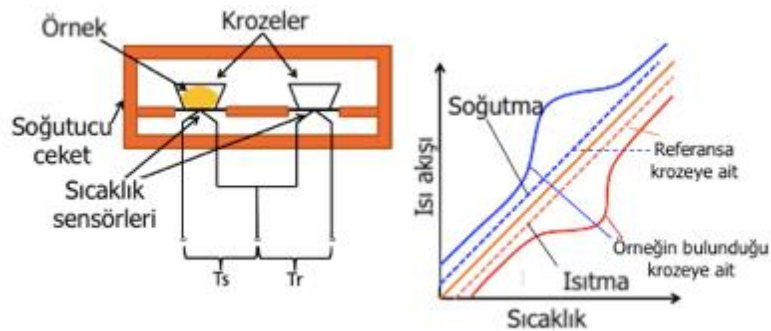
2.4.2.4. Termal Özelliklerin Tayini

KLN, NLT ve NE'lardan etkin maddenin salım özellikleri esasen partiküllerin katı durumuna bağlıdır. Özellikle KLN ve NLT'lar için bahsi geçen üretim tekniklerinin çoğu, lipid matrisinin erime noktasının üzerinde ısıtılmasını gerektirmekte ve yağ fazının su fazında dağıldıktan sonra katılaşmasıyla karakterize sıcak bir mikroemülsiyondan oluşmaktadır (Shah ve ark. 2015). KLN, NLT ve NE'ların modifiye salım özellikleri, kullanılan lipidlerin kristal yapısından önemli ölçüde etkilendiğinden, yeni tekniklerle hazırlanan nanopartiküllerin kristalinitesini incelemek önemlidir. Kristalize katı partiküllerin görülmesi, ancak kolloidal emülsiyon damlacıkları lipidin kritik kristalleşme sıcaklığının altına soğutulduğunda elde edilir. Her lipidin kritik kristalizasyon sıcaklığı kendine özgüdür ve formülasyonda bulunan diğer bileşenlerden etkilenebilmektedir (Ali ve ark. 2010; Shah ve ark. 2015).

DSC ve XRD yöntemi KLN ve NLT'da bulunan katı lipidin kristal yapısı ve polimorfik geçişlerinin karakterizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemler olmasına rağmen, SAXS yöntemi de bu amaçla kullanılmaktadır (Shah ve ark. 2015).

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Yöntemi

DSC, özellikle lipidlerin kristalizasyonlarının tespitinde kullanılan çok hassas termoanalitik bir tekniktir. Nanopartiküllerde kullanılan lipidlerin polimorfik yapılarının tespiti ancak dolaylı olarak geçiş sıcaklıklarının ve erime entalpilerinin dikkatli bir şekilde araştırılmasıyla tespit edilebilir. DSC'de kontrollü bir sıcaklık artışı sırasında numuneye gelen ve numuneden alınan ısı akışı izlenir ve inert bir referansla karşılaştırılır (Şekil 2-26)(Giron 2013).



Şekil 2-26: DSC cihazının çalışma prensibi (Lazaro ve ark. 2013)

DSC'de numunenin gramı başına ısı akışı uygulanmasıyla sıcaklığın bir fonksiyonu olarak geçiş sıcaklıklarında elde edilen eğrilerden entalpi değerleri elde edilerek, bu sayede kristalleşme yüzdeleri ve polimorfik geçişler değerlendirilebilmektedir (Freitas ve Müller 1998; Giron 2013). Rekristalizasyon indeksinin (CI) veya kristallik derecesinin belirlenmesi Gibbs-Thomson eşitliği kullanılarak DSC verilerinden hesaplanabilmektedir (Eşitlik 2-4) (Kovacevic 2011; Lazaro ve ark. 2013; Üner 2016).

Gibbs-Thomson eşitliği,

$$CI(\%) = \frac{\Delta H_{\text{örnek}}}{\Delta H_{\text{lipit}} \times C_{\text{lipit faz}}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2-4})$$

CI : Kristalizasyon indeksi

$\Delta H_{\text{örnek}}$: Lipit kolloidal sistemlere ait erime entalpisi

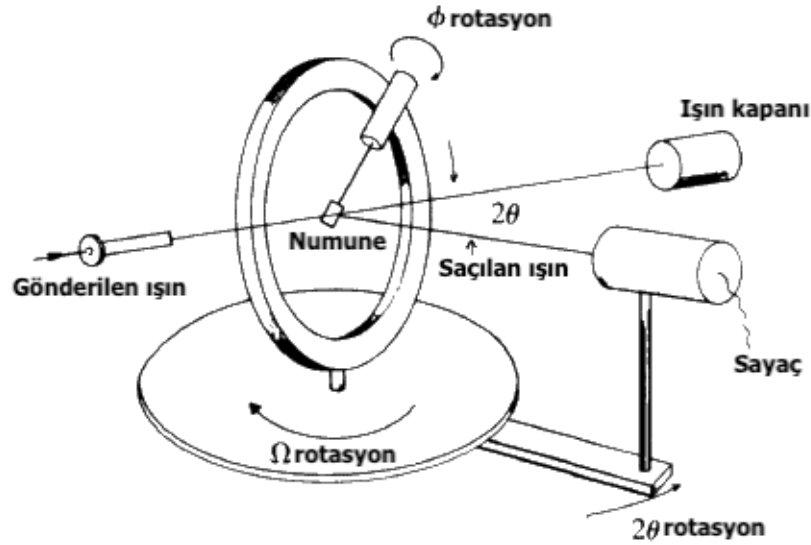
ΔH_{lipit} : Lipit karışıma ait erime entalpisi

$C_{\text{lipit faz}}$: Formülasyondaki lipit faz konsantrasyonu

DSC ile etkin maddenin lipit ile etkileşimi de gözlemlenebilmektedir. Erime geçişlerinde meydana gelen kaymalar, eklenen etkin madde veya sıvı lipidlerin ötektik davranışından kaynaklanabilir. Bu etkileşimler, erime entalpisine de yansıyabilmektedir (Shah ve ark. 2015).

X-ışını Kırınımı Yöntemi (XRD)

XRD, her bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınlarının karakteristik olarak bir düzen içerisinde kırılması esasına dayanır. Elde edilen kırınım grafiği, gelen X-ışını ışınlarının açısıl konumuna göre yansıyan X-ışınlarının yoğunluğunu gösterir (Şekil 2-27). Difraktogram, formülasyonların içerdiği lipit yapılarının polimorfik formlarının tanımlamasında veya farklılaşmasında kullanılırken, eğer varsa araştırılmakta olan belirli bir kristal yapı için karakteristik bir XRD modeli sağlamaktadır (Salunkhe ve ark. 2013).



Şekil 2-27: XRD cihazının çalışma prensibi

XRD, partiküllerin katı, kristal yapısını doğrulamak ve hazırlandıktan sonra lipit matrisinin polimorfik formunu tanımlamak için lipit ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Shah ve ar. 2015).

Dar Açılı X Işını Saçılımı Yöntemi (SAXS)

SAXS, çeşitli fazlardan oluşan nanopartiküllerin analizinde PCS gibi tekniklerden gelen verileri desteklemek için termal özelliklerin tayininde kullanılabilecek önemli tekniklerden biridir. SAXS, etkin madde yüklü lipit koloidal sistemlerin lipit-etkin madde etkileşiminin anlaşılmasına yardımcı olabilir. Çalışma prensibi olarak küçük dairesel ya da eliptik kesite sahip ışınlar ile çalışır. İncelenecek numunenin sadece küçük bir noktası X-Işınları ile aydınlatılır. Bu sebeple, saçılma şiddeti küçüktür. Bu da zayıf çözünürlüğe sebep olur. Çözünürlük örnek dedektör arası mesafenin artırılması ile de geliştirilebilir. Genellikle DSC ile birlikte SAXS, lipit koloidal sistemlerin polimorfik formlarını (ve/veya kristalliğini) tespit etmede yardımcı olabilir (Souza ve ark. 2012).

SAXS sonuçlarının dikkatli bir şekilde incelenmesi (piklerin varlığı), KLN ve NLT'ların kristal veya amorf bölgesindeki kapsüllenmiş herhangi bir ilacın ayrıntıları hakkında bilgi verebilir ve bu nedenle sistemin stabilitesini tahmin etmek için kullanılabilir (Shah ve ark. 2015).

2.4.3. KLN, NLT ve NE'ların Stabilitesi

KLN, NLT ve NE'ların karakteristik nanoyapıları, yüzey alanı/hacim oranında önemli bir artış sağlamaktadır. Enkapsüle edilen etkin maddenin dış biyolojik ortamdan korunması, KLN, NLT ve NE'ların kullanılmasının en büyük faydalarından biridir. Uygulama yolu ve diğer bileşenlerden kaynaklanan kimyasal ve biyolojik bozunma, taşıyıcının stabilitesini olumsuz etkileyebilir (Müller ve Keck 2004; Shah ve ark. 2015). Stabilitate, formülasyonun raf ömrü süresinde fizikokimyasal özelliklerinin aynı kalması olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle stabilite, ilaç güvenliği ve etkinliğini sağlayan kritik bir parametredir. Stabilitate sorunları, depolama (sedimentasyon, aglomerasyon, partikül büyümesi) veya nakliye sırasında da ortaya çıkabilir.

Lipitler, yüzey etkin maddeler, etkin maddeler ve su, KLN, NLT ve NE'ların stabilitesini etkileyebilecek ana bileşenlerdir. KLN, NLT ve NE'ların kullanıldığı çeşitli dozaj şekilleri (oral, parenteral, oküler vb.) içerisindeki etkileri birbirlerinden farklı olmasına rağmen; partiküllerin çökmesi, partiküllerin agregasyonu ve kristal büyümesi gibi stabilite sorunları ortaktır (Shah ve ark. 2015).

KLN, NLT ve NE'ların kararlılıklarının sürekliliğinin sağlanması için farklı parametrelerin dikkate alınması gerekir. Bu sistemlerin üretimi aşamasında ara ürün olan sıcak emülsiyondaki sıvı lipit damlacıkların stabilitesi büyük ölçüde yüzey etkin madde seçimi ile belirlenirken, soğutma aşamasında iç fazın stabilitesinin Deraguin Landau Verwey Overbeek (DLVO) teorisi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Gambinossi ve ark. 2014; Shah ve ark. 2015). Dispersiyon ortamında bulunan partikül/damlacıklar rastgele hareket denilen Brownian Hareketi yapmaktadırlar ve bu nedenle sık sık çarpışırlar. Çarpışma sırasında birbirlerine yapışırlarsa, sistemin toplam yüzey alanı azalacak, bu da serbest enerjiyi azaltan bir sürece dönüşüp termodinamik olarak kararsız bir sistem ortaya çıkacaktır. Bu nedenle KLN, NLT ve NE'ları içeren dispersiyonların kararlılığı agregasyonun/damlacık büyüklüğünde artışın engellenmesine bağlıdır ve bu aşamada çeşitli kuvvetler (Van der Waals, elektrostatik, solvasyon kuvvetleri) devreye girmektedir (Scheler 2012).

Elektrostatik Stabilizasyon

Kolloidal nanopartiküllerin kararlılığı, partiküller arası itme ve çekme kuvvetlerinin toplam etkisinden kaynaklandığını varsayan DLVO teorisi ile açıklanmaktadır. DLVO teorisine göre partiküller arası çekim kuvveti van der Waals'ten

kaynaklanırken, itme kuvveti, dispersiyon ortamında birbirine yaklaşan partiküllerin sahip olduğu elektriksel tabakaların çakışmasından kaynaklanır (Eşitlik 2-5; Eşitlik 2-6).

İki partikül arası çekim enerjisi (V_α),

$$V_\alpha = -\frac{Ar}{12D} \quad (\text{Eşitlik 2-5})$$

V_α : Van der Waals çekim enerjisi

A : Hamakar sabiti

r : Partiküllerin yarıçapı

D : Partiküller arası uzaklık

İki partikül arası itme enerjisi (V_r),

$$V_r = \frac{32\pi r \epsilon k^2 T^2 \gamma^2}{z^2 e^2} e^{-\kappa D} \quad (\text{Eşitlik 2-6})$$

V_r : Elektrostatik itme enerjisi

ϵ : Dispersiyon fazının geçirgenlik sabiti

k : Boltzmann sabiti

T : Mutlak sıcaklık

γ : Partikülün yüzey enerjisi

z : Partiküllere ait iyonik yük

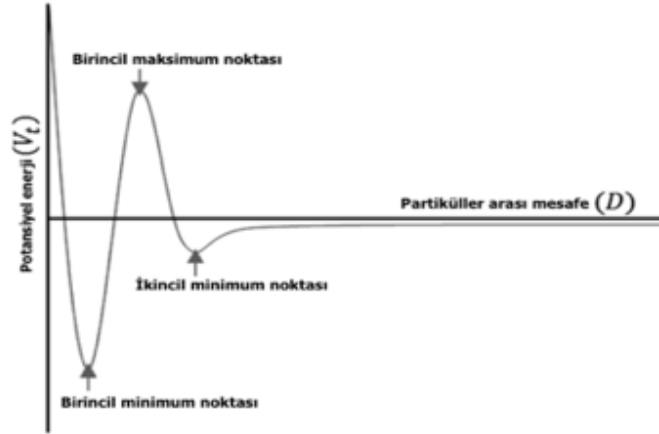
e : Elektronlar üzerindeki yük

κ : Elektriksel çift katmanın kalınlığı

D : Partiküller arası uzaklık

Partiküle ait toplam potansiyel enerji (V_t), van der Waals ve elektrostatik kuvvetlerinden kaynaklanan çekme (V_α) ve itme (V_r) enerjilerinin toplamıdır. Potansiyel enerji- partiküller arası mesafe eğrisine bakıldığında, van der Waals çekim kuvvetlerinin iki partikül arası mesafe ile ters orantılı olduğu görülmektedir (Şekil 2-28) (Freitas ve Müller 1998; Nutan ve Reddy 2009). Van der Waals kuvvetleri, aynı özellikte partiküller

arasında oluşan, aralarındaki mesafenin azalmasıyla artan ve molekülleri bir arada tutan kuvvettir. Bu çekim kuvvetlerinin belirli iki mesafede (sisteme bağlı olarak) baskın olduğu ve bunların birincil ve ikincil minimumlarla gösterildiği şekilde görülmektedir.



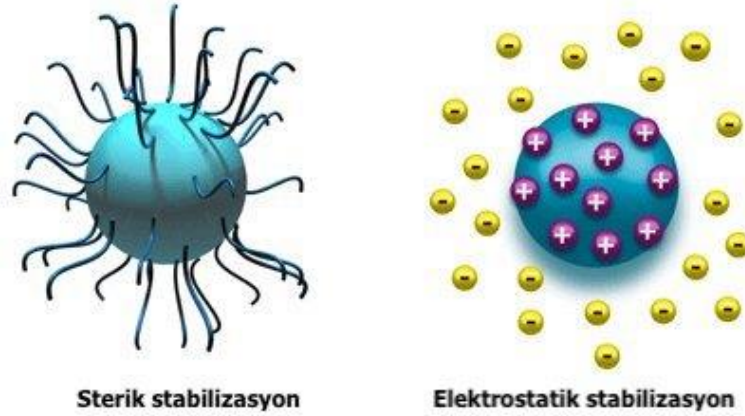
Şekil 2-28: Potansiyel enerjiye karşı partiküller arası mesafeyi gösteren eğri (Shah ve ark. 2015)

Partiküller birbirine çok yakınlaşırsa, potansiyel enerji negatif olur ve birincil minimum noktası oluşur. Bu noktada partiküller çöker ve birbirine sıkı tutunur (Şekil 2-28). Çekim kuvvetlerinin baskın olduğu birincil minimumda partiküller birbirinden ayıramaz. Bu tür değişiklikler genellikle sistemde partiküllerin kristalleşmesi gibi geri dönüşü olmayan değişikliklere neden olur (Gönül 2000; Shah ve ark. 2015). Diğer yandan aynı cins yüklü partiküllerin birbirine uyguladıkları elektrostatik itme kuvveti uzaklık arttıkça baskın bir hale gelerek itme enerjisini de yükseltir ve bir noktada en yüksek değere ulaşarak birincil maksimum noktasını oluşturur (Şekil 2-28). İtme enerjisinin çok yüksek olması, partiküllerin çarpışmasını da engelleyerek geri dönüşümsüz bir çökme meydana getirebilir. Partiküllerin termal enerjileri birincil maksimumdan çok daha yüksekse, partiküller dağınık halde kalır (Missana ve Adell 2000). İkincil minimum ise, nispeten büyük mesafelerde meydana gelir ve mekanik çalkalama ile kolayca dispersiyon haline getirilebilen partiküllerin flokülasyonuna neden olur. Partiküllerin termal enerjisi ikincil minimumdan daha büyükse parçacıklar birbirini iter ve agregasyon önlenmiş olur (Missana ve Adell 2000; Wei ve Huaqing 2012; Shah ve ark. 2015).

DLVO teorisinin anlaşılması elektrostatik stabilizasyon için önem arz etmektedir. Kısaca özetlenecek olursa; van der Waals çekim enerjisi Hamaker sabitinin artmasıyla (lipit veya sürfaktanın değiştirilmesi mümkündür) yükselecektir bu durum stabiliteyi düşürecektir. Yüklü lipit nanopartiküllerde (Zeta potansiyeli >60 mV üzerinde ise partiküller çok iyi seviyede kararlıdır, $>20-30$ mV arasında ise kararlıdır) elektriksel itme nedeniyle partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha az olmakla birlikte nanopartiküller bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve agreste olup çökme eğilimindedirler. Son olarak, eğer elektrolit konsantrasyonu çok fazla arttırılırsa zeta potansiyelini azalacak, dolayısıyla bu da stabiliteyi azaltacaktır (Wei ve Huaqing 2012; Shah ve ark. 2015).

Sterik Stabilizasyon

Genellikle büyük moleküler boyuta sahip iyonik olmayan emülgatörlerin sisteme ilavesiyle sterik stabilizasyon meydana gelmektedir. Nanopartikül dispersiyonlarına suda çözünür iyonik olmayan emülgatörlerin eklenmesiyle, bu emülgatörler nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olarak onları stabilize edebilmektedir (Olbrich ve Müller 1999; Kovacevic ve ark. 2014).



Şekil 2-29: KLN, NLT ve NE’larda stabilizasyon mekanizmaları (Kong ve ark. 2017)

Nanopartiküllerin dış amfifilik özellikte iyonik olmayan bir emülgatör bulunduğundan dolayı, partiküllerin birbirine yaklaşmasıyla stabilize edici segmentler iç içe geçemez ve bu durum partikülleri birbirlerinden ayrı tutarak stabilizasyon ile sonuçlanır (Şekil 2-29) (Shah ve ark. 2015; Kong ve ark. 2017).

2.4.3.1. Stabilite Sorunları

Bir dispersiyondaki KLN, NLT ve NE'ların davranışsal özellikleri genellikle ya zamana bağlı ya da hazırlanma tekniğine bağlı olarak değişmektedir ve formülasyonun kararsızlaşma mekanizmasında temel olarak bu değişimlerin sorumlu olduğu görülmüştür. Bu taşıyıcı sistemlerin stabilite problemlerine neden olan mekanizmaların anlaşılması, dispersiyonun kararsızlaşmasının önüne geçmekte önemli bir yere sahiptir. KLN, NLT ve NE'larda meydana gelen stabilite problemleri fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılmaktadır (Tablo 2-3) (Freitas ve Müller 1998; Helgason ve ark. 2009; Mitri ve ark. 2011).

Fiziksel Stabilite Sorunları

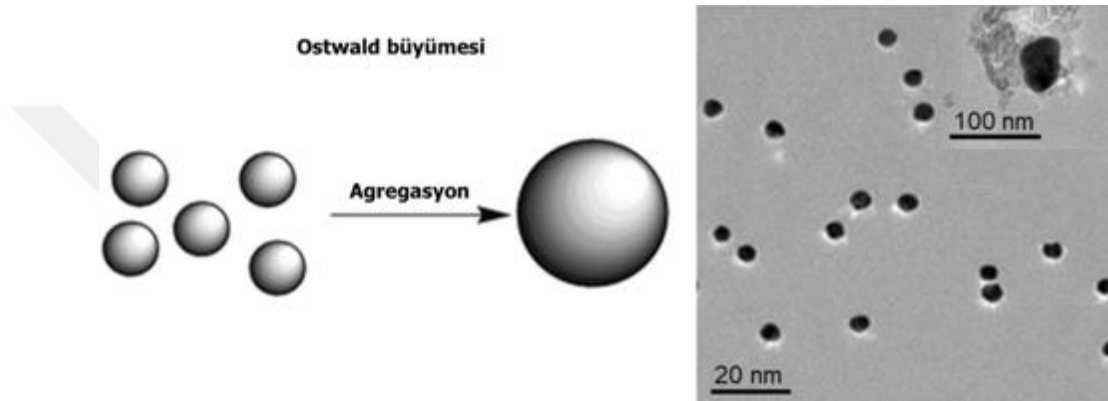
KLN, NLT ve NE'larda iki fazının kendiliğinden tersine döndüğü oluşuma faz inversiyonu denir ve kritik bir sıcaklık, basınç veya konsantrasyonda meydana gelebilir. Bu destabilizasyon mekanizmasının ancak formülasyonun hazırlanması sırasında (sıcak emülsiyonda) görüldüğü ve formülasyonun soğutulduktan sonra meydana gelmeyeceği unutulmamalıdır (Hatagekimana ve ark. 2015).

Tablo 2-3: KLN, NLT ve NE'larda meydana gelen stabilite sorunları

KLN, NLT ve NE'ların Stabilite Sorunları
Fiziksel Stabilite Sorunları - Dispersiyonda meydana gelen stabilite sorunları (Faz inversiyonu, Ostwald olgunlaşması, koalesans, kremalaşma ve sedimentasyon, flokülasyon ve koagülasyon) - Lipidlerde meydana gelen stabilite sorunları (Kristalizasyon, polimorfizm ve jelleşme)
Kimyasal Stabilite Sorunları -Etkin madde ve lipit yapısında meydana gelen stabilite sorunları

Bunun yanı sıra, yine sürekli içerisindeki küçük partiküllerin daha büyük partiküllere moleküler difüzyonu/ agregasyonu, partikül boyutu ve boyut dağılımındaki değişikliklerden sorumlu olabilir. Bu türde bir akı, partikül büyümesine veya Ostwald olgunlaşmasına yol açabilir. Ostwald olgunlaşmasında küçük partiküller daha da

küçülerek yok olurken, büyük partiküllerin büyüklüğü giderek artar (Şekil 2-20) (Üner 2006; Souto ve ark. 2010; Ndolomingo ve ark. 2020). Daha çok nanoemülsiyonlarda görülen koalesans sorunu ise, iki partikülün çarpışması ve ara yüzey geriliminin bozulmasıyla meydana gelmektedir. Bu bozulma sonucunda partiküller birleşerek faz ayrılması meydana gelmektedir. Koalesans Ostwald olgunlaşmasından farklı olsa da iki oluşumda geri dönüşümsüzdür ve genellikle Ostwald olgunlaşmasının ilk aşamaları koalesans ile karıştırılabilmektedir (Mitri ve ark. 2011; Shah ve ark. 2015).



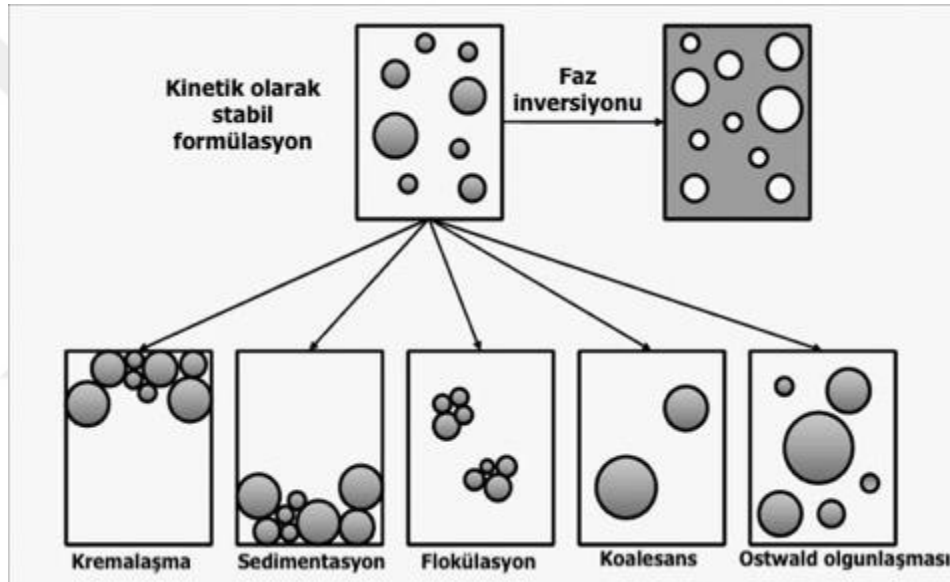
Şekil 2-30: Ostwald büyümesi (Ndolomingo ve ark. 2020)

Kremalaşma ve sedimentasyon, Stokes eşitliği ile ilgili olan stabilite problemleridir (Eşitlik 2-7). Bu eşitliğe bakılırsa, KLN, NLT ve NE'ları içeren dispersiyon fazı sürekli fazdan düşük yoğunluğa sahip olursa partikülleri üstte veya yüksek yoğunluktaysa çöker ve altta toplanır (Şekil 2-30). Hareketler birbirini etkiler ve partiküller deforme olur. Stokes eşitliğinde de görüldüğü gibi, kremalaşma hızı viskozite ile ters orantılı iken sedimentasyon hızı ile doğru orantılıdır. Her ikiside geri dönüşümlü bir sorun olduğundan, sürekli fazın viskozitesi artırılarak/azaltılarak formülasyonun fiziksel stabilite tekrar sağlanabilir (Buzsello ve ark. 2000; Gu ve ark. 2005; Shah ve ark. 2015).

Stokes eşitliği,

$$V = \frac{d^2(\rho_1 - \rho_2)g}{18\eta} \quad (\text{Eşitlik 2-7})$$

- V : Sedimentasyon hızı
 d : Partikül yarıçapı
 ρ_1 : Partikülün dansitesi
 ρ_2 : Dispersiyon ortamının dansitesi
 g : Yerçekimi sabiti
 η : Dispersiyon ortamının viskozitesi

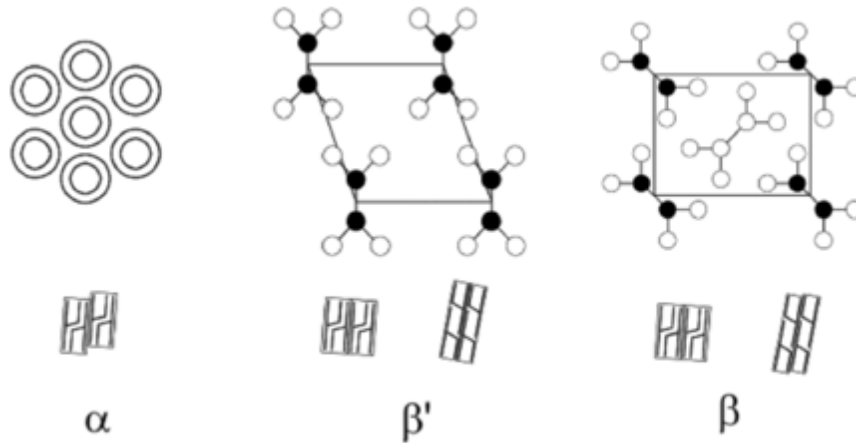


Şekil 2-31: KLN, NLT ve NE’lerde görülen stabilite sorunları (Gu ve ark. 2005)

Partiküllerin flokülasyonu, kremalaşma/ sedimentasyon öncesi, sırasında veya daha sonra meydana gelen, partiküllerin geri dönüşümlü agregasyonu olarak tanımlanan stabilite problemlerindendir. Partiküllerin yüzey yüklerinden dolayı bu sorun ortaya çıkabilmektedir. Yüzey aktif madde miktarı yeterli değilse, nanopartiküller topaklanırlar ardından uğrarlar (Şekil 2-31). Flokülasyonun koalesanstan farkı, arayüzey filminin ve partiküllerin herbirinin bireyselliğini koruması ve bundan dolayı geri dönüşümlü olmasıdır (Im-Emsap ve Siepmann 2002; Kovacevic ve ark. 2014).

Yapılan çalışmalar KLN, NLT ve NE’lerin dispersiyonlarının, diğer lipit kolloidal taşıyıcı sistemlere kıyasla daha kararlı olduğunu göstermektedir (Aroujo ve ark. 2009;

Wong ve ark. 2012). Katı lipid/ lipid karışımının yavaş kristalleşme kinetiği ve polimorfizmi, dispersiyonlara ilave stabilite verebilmektedir. Bu nedenle, özellikle sıcakta homojenizasyon ve mikroemülsiyon tekniği kullanılarak üretilen KLN ve NLT'ların kristalliği ve polimorfizmleri çok önemlidir (Müller ve ark. 2002). KLN ve NLT'ların üretiminde yaygın olarak kullanılan gliseritler, artan kararlılık sırasına göre üç polimorfik formda bulunmaktadır: α , β' ve β (Şekil 2-32). En kararsız form olan α -formu, daha iyi enkapsülasyon kapasitesine sahip yarı kararlı yapıdaki bir β' -formuna dönüşme eğilimindedir. β -formu, mevcut en kararlı gliserit formudur. α 'dan β' 'ye konformasyonel geçiş ve bunun sonucunda β -formuna geçiş, gliseritlerin optimal enkapsülasyonu için tercih edilen yoldur (Souto ve ark. 2010; Sanchez-Lopez ve ark. 2017). Kristalize lipidde, kristal kafes pek çok farklı modifikasyonda bulunurken; termodinamik olarak stabil olmayan polimorfları halinde bulunduklarında ise daha yüksek bir hareketliliğe sahiptirler. Bu polimorfların, etkin maddeleri hapsedme kapasiteleri yükseltse de stabilite problemi olarak etkin maddenin nanopartiküllerden dışarı sızmasına sebep olabilir (Üner 2006; Numanoglu ve Tarımcı 2006). Bundan dolayı özellikle sıcakta homojenizasyon ve mikroemülsiyon yöntemleri kullanılarak hazırlanan KLN ve NLT'lar içerdikleri katı lipidler nedeniyle, polimorfizm ile direkt ilişkilidir (Shah ve ark. 2015; Rogers 2017).



Şekil 2-32: Yarı kararlı α , β' ve kararlı β polimorfları (Rogers 2017)

KLN, NLT ve NE'larda görülen diğer bir sorunu ise viskoz bir jele dönüşme potansiyelleridir. Jelleşme adı verilen süreç, çok hızlı ve öngörülemeyen bir olaydır.

Jelleşmeden önce, kolloidal partiküllerin stabiliteelerini kaybetmelerinin bir sonucu olarak partikül agregasyonu meydana gelebilir. Genellikle geri dönüşümsüz olan jelleşme sıcaklık, ışığa maruziyet, mekanik stres, lipid oranının yüksek olması, lipidin polimorfik geçişleri ve iyonik kuvvetler ile artmaktadır (Freitas ve Müller 1998; Shah ve ark. 2015).

Kimyasal Stabilité Sorunları

Etkin maddenin kimyasal yapısı ve reaksiyon mekanizması, formülasyonun stabilitesini belirlemede ana etkenlerden biridir. Ester veya amit grubu içeren etkin maddeler hidrolitik bozunmaya uğrarken, amino gruplarına sahip etkin maddeler oksidatif bozunmaya karşı hassastırlar (Garad ve ark. 2010; Wu ve ark. 2011). Bunun yanı sıra lipidin polimorfik özelliği de, ilacın çözünürlüğü, stabilitesi, çözünme hızı ve etkinliğini belirleyen kritik parametrelerden biridir (Shah ve ark. 2015).

Etkin maddenin yanı sıra lipidlerin bozunması da ilacın stabilitesinde önemli bir yere sahiptir. Lipidlerin bozunmasında en çok karşılaşılan mekanizma hidrolizdir. Rodomska-Soukharev tarafından KLN, NLT ve NE'ların içerdiği lipidlerin ve diğer bileşenlerin stabilitesini araştırmak için gerçekleştirilen çalışmada, kullanılan lipidler ve yüzey aktif maddeleri içeren çeşitli formülasyonlar hazırlanmış ve 2 yıl süreyle saklanmıştır. Trigliseritlerle hazırlanan formülasyonların, mono ve digliseritlerle hazırlananlardan daha stabil olduğu görülmüştür (Rodomska-Soukharev 2007).

KLN, NLT ve NE'ların stabiliteelerinin tayin edilmesi için, formülasyonlar çeşitli sıcaklıklarda kısa ve uzun süreli stabilite testlerine tabi tutulmaktadır. Formülasyonlar genellikle düşük sıcaklık (genellikle 5 °C), oda sıcaklığında (genellikle 25 °C) ve yüksek sıcaklıklarda (40 °C) stabiliteye bırakılır. Stabilite testleri sırasında belirli zaman aralıklarında örnekler alınıp, formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon kapasitesi, zeta potansiyeli ve viskozitesi gibi fizikokimyasal özellikleri tayin edilir (Silva ve ark. 2012; Shah ve ark. 2015; Moreno-Sastre ve ark. 2016).

2.4.4. KLN, NLT ve NE'ların Uygulama Yolları

KLN, NLT ve NE'ların ilk üyesi olan NE'lar ilaç piyasasında aktif olarak kullanılmaktadır. Özellikle lipofilik ilaçların parenteral, oral ve topikal yollarla uygulanmasına olanak sağlarlar (Ganta ve ark. 2014). Diğer yandan KLN ve NLT'ların cilde yüksek oranda penetre olmaları ve oklüzif etkilerinden dolayı hidrasyon sağlayarak cildi nemlendirmeleri gibi özellikleri sayesinde 2005 yılından itibaren aktif olarak

kozmetik ve dermokozmetik alanında kullanıldıkları görülmektedir (Severino ve ark. 2012; Souto ve ark. 2020). Ayrıca KLN ve NLT'ların kozmetik ve dermokozmetik piyasası dışında, ilacı kontrollü salımı, yüksek enkapsülasyon kapasitesi ve toksik olmayan yardımcı maddelerden oluşmaları gibi özellikleri göz önünde bulundurularak başta topikal olmak üzere, oral, parenteral, oküler gibi alternatif uygulama yolları da denenmektedir (Müller ve ark. 2011; Garud ve ark. 2012; Souto ve ark. 2020).

2.4.4.1. Transdermal

Cilde uygulanan etkin maddeler genellikle lipofilik özelliktedir ve birçok cilt bozukluğunun (Psöriazis, dermatit ve cildin diğer inflamasyonlu rahatsızlıkları) tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır (Shafer-Korting ve ark. 2007; Qi ve ark. 2017; Shrotriya ve ark. 2017). KLN, NLT ve NE'ler deri tarafından iyi tolere edilebilen bileşenlerden oluşmaları, partikül boyutlarının küçük olması, benzer taşıyıcı sistemlere (polimerik nanopartiküller) kıyasla yan etkilerinin düşük olması ve lipozomlara kıyasla daha düşük maliyetle üretildiklerinden topikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Souto ve ark. 2005; Müller ve ark. 2011). Bunun yanı sıra KLN ve NLT'lar, deri üzerinde film tabakası oluşturarak transepidermal su kaybını azaltıcı oklüzif bir etki oluştur, bu sayede çeşitli hastalıklarla (sıklıkla atopik egzama ve kontakt dermatit) dehidrate olmuş derinin, su içeriği artırılarak cildin sağlıklı görünümüne kavuşması sağlanabilmektedir (Pardeike ve ark. 2009; Üner ve ark. 2014). Bunun yanı sıra vitiligo ve psöriasis gibi pigmentasyon bozukluklarından kaynaklanan dermatolojik hastalıkların tedavisi için yapılan çalışmalarda da, KLN, NLT ve NE'ların geleneksel formülasyonlara göre üstünlük sağladığı belirtilmiştir (Pardeike ve ark. 2009; Jain ve ark. 2019).

Atopik egzama, kontakt dermatit, rozasea ve ürtiker gibi derinin çeşitli hastalıklarında kullanılan kortikosteroid grubu ilaçlar KLN, NLT ve NE'lara yüklenmiş, gerçekleşen çalışmalar sonucunda nanopartiküllere yüklenen ilaçların yan etki profillerinin (özellikle iritasyon, kuruluk ve ödem) piyasa ürünlerine (krem ve merhem) kıyasla azaldığı rapor edilmiştir (Madan ve ark. 2014; Landriscina ve ark. 2015).

2.4.4.2. Oral

Son yıllarda, özellikle GİS'te emilim düşük olan etkin maddelerin çözünürlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanımını arttırmayı amaçlayan, proteinler, polisakaritler ve lipidler de dahil olmak üzere doğal biyomateryallerden üretilen nanometre boyutunda ve kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Elzoghby ve ark. 2012;

Luo ve Wang 2013; Luo ve Wang 2014). Bu taşıyıcılar arasında KLN, NLT ve NE'ların, biyopolimer bazlı kolloidal nanopartiküllere göre üstün özellikleri ve avantajları nedeniyle son yıllarda artan bir ilgi görmekte ve oral yoldan, sulu dispersiyonları veya alternatif olarak tabletler, peletler, kapsüller (Severino ve ark. 2011) veya şaşeler gibi geleneksel dozaj formlarına dönüştürülerek uygulanabilmektedir (Souto ve ark. 2010). Oral yoldan verilmek üzere geleneksel dozaj formlarında kullanılan tüm lipidler ve yüzey aktif maddeler kullanılabilmektedir (Müller ve ark. 2011; Souto ve ark. 2020).

Oral yolla uygulanan KLN, NLT ve NE'ların, kanser (Ganta ve ark. 2014; Fofaria ve ark. 2016), psikoz (Silva ve ark. 2011), kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde (Rao ve ark. 2014; Özdemir ve ark. 2018) kullanılırken; yine çeşitli antibiyotikler yüklenerek sistemik enfeksiyonların (Dong ve ark. 2011) ve paraziter hastalıkların (Qi ve ark. 2012) tedavisinde de kullanılmaktadır. Ayrıca insülin gibi büyük protein yapılı etkin maddelerin oral biyoyararlanımının artırılması için lipit kolloidal sistemlere yüklenerek verilmesi üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur (Fangueiro ve ark. 2011).

2.4.4.3. Parenteral

Parenteral uygulamalar için ilk denenen lipit kolloidal sistemler oral yolla beslenemeyen hastalar için geliştirilen gıda desteği verme amaçlı nanoemülsiyonlardır. Daha sonra KLN ve NLT'ların üretim tekniklerinin geliştirilmesiyle nanoemülsiyonların ve polimerik nanopartiküllerin kullanıldığı bütün parenteral uygulamalarda, katı lipit taşıyan nanopartiküllerin de kullanılabildiği görülmüştür (Müller ve ark. 2011). Bunun yanı sıra Pathfinder® teknolojisi, lipit kolloidal sistemlerin modifikasyonu ile hedefe yönelik tedavide parenteral olarak kullanılabilmektedir (Joshi ve Müller 2009). Parenteral uygulanan lipit kolloidal sistemlerde sıvı yağ olarak setil palmitat, soya yağı ve oleik asit gibi yağlar tercih edilirken (Chinsriwonkul ve ark. 2012), katı lipit olarak orta zincir uzunluğundaki trigliseritler ve lesitin türevleri tercih edilirken; emülgatör olarak genellikle Tween® 80, poloksamer® 188, sodyum glikokolat kullanılmaktadır (Joshi ve Müller 2009).

Özellikle KLN, NLT ve NE'ların pasif hedeflendirilmesinde, hedeflendirilecek nanopartikülün büyüklüğü ve yükünün yanı sıra partikül yüzeyinin hidrofilik/ lipofilikliği önem arz etmektedir. Oponizasyona uğramadan sistemik dolaşımda uzun süre ilaç salımı sağlamak lipitlerin yüzeyinin PEG ya da POE gibi hidrofilik moleküller ile modifikasyonu sağlanmalıdır (Joshi ve Müller 2009; Müller ve ark. 2011).

Şimdiye kadar enjeksiyonluk uygulanan KLN, NLT ve NE'lar ile yapılan çalışmaların daha çok, antikanser ajanlar, görüntüleme ajanları, anti-parkinson ajanlar, antiHIV ajanları, antipsikotikler, anti-romatoid artritlik ajanlar, antiparaziterler, antihipertansifler ve antibiyotiklerle yapıldığı görülmektedir (Joshi ve Müller 2009).

2.4.4.4. Oküler

KLN, NLT ve NE'ların oküler yoldan uygulanması, etkin madde ve gen aktarımı, tanı veya görüntüleme gibi farklı uygulamalarıyla son on yılda ciddi oranda artmıştır (Shen ve ark. 2009; Puglia ve ark. 2015). Lipit bir iç faza sahip olmaları ve bu fazın sulu dispersiyon içerisinde yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilmesi sayesinde hem lipofilik hem de hidrofilik ilaç moleküllerini taşıyabilen bir yapıya sahip olmalarından dolayı; polimerik nanopartiküller, emülsiyonlar, lipozomlar ve niozomlar gibi diğer kolloidal taşıyıcıların avantajlarını barındırırken dezavantajlarından kaçınılmaktadır (Sanchez-Lopez ve ark. 2017).

Genel olarak, KLN, NLT ve NE'ların bileşenleri (özellikle lipidler ve yüzey aktif maddeler) ürün kalitesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olmakta ve bunların seçimi, ilacın fizikokimyasal özellikleri ve öngörülen uygulama yolu ile ilgili olmaktadır. Yüksek oranda kristalize olan lipidlerin etkin maddenin taşıyıcı sistemden sızarak enkapsülasyonu düşürdüğü (Seyfoddin ve ark. 2010), farklı uzunluklarda yağ asidi zincirleri içeren karmaşık yapılara sahip lipidlerin enkapsülasyonu arttırıp etkin madde kaybını önleyerek uzun vadeli stabiliteyi arttırdığı görülmüştür (Puglia ve ark. 2015). Bundan dolayı hem enkapsülasyonu arttırmak hem de partiküllerin ortalama boyutunu azaltmak için lipit kolloidal sistemlerin formülasyonlarında uzun ve kısa zincirli yağ asitlerinin kombinasyonları kullanılmaktadır (Cavalli ve ark. 2002; Sanchez-Lopez ve ark. 2017) . En çok tercih edilen lipitler, trigliseritler (trilaurin, trpalmitin ve tristearin), kaprilik trigliseridler (Mglyol®), digliseridler, monogliseridler, gliseril palmitostearatlar (Precirol ® ATO), alifatik alkoller (setil alkol ve stearyl alkol) ve polialkollerin esterleridir (Puglia ve ark. 2015; Sanchez-Lopez ve ark. 2017).

Oküler uygulanacak KLN, NLT ve NE'larda lipidlerin yanı sıra yüzey etkin maddelerin seçimi de önem teşkil etmektedir. Genelde non-iyonik, oküler tahrişe neden olmayan ve biyolojik olarak uyumlu yüzey etkin maddeler tercih edilse de; kornea epiteli ile etkileşimi arttırmak için katyonik ve anyonik yüzey etkin maddeler de kullanılmaktadır (Leonardi ve ark. 2014). En çok kullanılan yüzey aktif maddeler

biyolojik membran lipidlerini (saf fosfolipidler), safra tuzları (sodyum taurokolat), biyoyumlu iyonik olmayan molekülleri (örneğin etilen oksit/propilen oksit kopolimerleri, sorbitan esterleri, yağ asidi etoksilatları) ve karışımlarını içermektedir (Seyfoddin ve ark. 2010; Puglia ve ark. 2015).

KLN, NLT ve NE'ların biyoyumlulukları, mukoadezif özellikleri, oküler mukoza ile etkileşimlerinin yüksek olması nedeniyle etkin maddenin korneal kalış süresinin uzaması, oküler biyoyararlanımının artmasına ve hem lokal hem de sistemik yan etkilerin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır. Bundan dolayı KLN, NLT ve NE'lar özellikle, yaygın oküler inflamasyonlu durum veya enfeksiyonları (Başaran ve ark. 2010; Seyfoddin ve Al-Kassas 2013; Mohanty ve ark. 2014; Üstandağ-Okur ve ark. 2014), kuru göz sendromunu (Bang ve ark. 2019; Jurisic Dukovski ve ark. 2020), glokomu (Ammar ve ark. 2009; Leonardi ve ark. 2015) ve gözün arka yapılarını etkileyen hastalıkları (katarakt, retinitis pigmentosa ve diğerleri) (Stretto ve ark. 2010; Hao ve ark. 2014; Chen ve ark. 2019) tedavi etmek için çalışılmıştır.

2.4.4.5. Diğer Uygulama Yolları

KLN, NLT ve NE'lar oral, transdermal, parenteral ve oküler yollar dışında intranazal ve pulmoner yolla da uygulanabilmektedir. Partikül büyüklüklerinin sağladığı avantajlar ve lokal olarak uzatılmış etki göstermeleri sayesinde intranazal uygulamalar için de sıklıkla çalışılan taşıyıcı sistemler haline gelmişlerdir (Singh ve ark. 2012; Sood ve ark. 2014). Özellikle Alzheimer, Parkinson ve migren gibi serebral hastalıkların tedavisinde nanopartiküllerin nazal mukozadaki koku bölgesinden beyine ulaşması mümkündür. Bunun yanı sıra yanı sıra nazal mukozanın diğer bölgelere nazaran enzimatik aktivitesinin neredeyse olmaması ve epitel dokunun geçirgenliğinin yüksek olması da intranazal uygulamanın önemini arttırmıştır (Cacciatore ve ark. 2016; Costa ve ark. 2021).

2.5. İlaçta Kalite Tasarımı (Quality by Design- QbD)

Farmasötik gelişimin amacı, ürünün amaçlanan performansını tutarlı bir şekilde sunmak için kaliteli bir ürün ve üretim sürecini tasarlamaktır. Bir ilacın kalitesi, farmasötik bir ürünü oluşturan özelliklerin (etkin maddeler, yardımcı maddeler, üretim, ambalajlama ve depolama gibi) proseslere uygunluğu veya final farmasötik ürünün istenilen kullanıma uygunluğudur (Chicca ve ark. 2007; ICH Q9). İlaç sektöründe yeni teknolojilerin ve yaklaşımların kullanılabilmesi, risk analizi, uyum ve denetim gibi

faaliyetlerde tutarlılık sağlanması amacıyla Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından ilaç üreticileri için iki ayrı dönemde (2004 ve 2007) "21. yüzyılda güncel iyi üretim uygulamaları (cGMP)" isimli raporlar yayınlanmış ve son revizyonu 21/09/2020 tarihi olmak üzere belirli dönemlerde güncellenmektedirler (cGMP 2004; cGMP 2007). Yine FDA tarafından 2004 yılında İşlem Analiz Teknolojileri (Process Analysis Technologies, PAT) kılavuzu da yayınlanmıştır. Bu paradigma sayesinde üretim metodu optimize edilerek, arttırılmış verimle, yüksek kaliteye sahip iyileştirilmiş bir proses kontrolü sağlamak mümkün hale gelmiştir (PAT 2004).

PAT teknolojisinden önce çevresel bileşen ara bağlantıları (Peripheral Component Interconnect, PCI) (akış, basınç, sıcaklık ve nem ölçer gibi) denilen ve sadece ölçmeye dayalı bir analiz sistemi bulunmaktaydı, bu durum hem harcanacak numuneyi hem de zamanı arttırmaktaydı (Chicca ve ark. 2007). PAT teknolojisi sayesinde tek bir analizde birden fazla veriyi işleyen sensör teknolojisi devreye girerek bu durumun önüne geçilmiştir (PAT 2004).

İlaç sektöründe meydana gelen gereksinimlerin birbirleriyle büyük oranda uyum göstermesi için, 1990 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health organization, WHO) tarafından düzenlenen konferansta Avrupa, Japonya ve Amerika Birleşik Devleti otoriteleri Uluslararası Harmonizasyon Konseyini (International Conference on Harmonization, ICH) oluşturmuşlardır (Singh 2015). ICH tarafından yayınlanan kılavuzlar, bilimsel tabanlı ve kalite risk değerlendirmelerini de içine alan sistematik bir kalite anlayışından hayvan deneylerinin tekrarlanmasını önlemeye; yeni ilaç uygulamaları için ruhsatlandırma süreçlerini kolaylaştırırken formülasyon geliştirme süreçlerini kısaltarak kaynakları optimize etmeye gibi çok çeşitli alanlarda rehber olmuşlardır (Branch 2005; Singh 2015). Kalite, güvenlik, etkinlik ve multidisipliner alanlarda yayınlanan bu kılavuzlardan özellikle Q8 – Farmasötik Gelişim (2005), Q9 – Kalite Risk Yönetimi (2005), Q10 – Farmasötik Kalite Sistemi (2008) kılavuzlarında, farmasötik ürünün yaşam döngüsü boyunca ürünün kalitesinin devam ettirilmesi amacıyla risk değerlendirme tabanlı bir kontrol stratejisinin geliştirilmesinden bahsedilmektedir (Q-IWG, 2012).

“Tasarımla Kalite” (Quality by Design, QbD) kavramı, Q8- Farmasötik Gelişim kılavuzunda, deney tasarım (DoE) aşamasındaki kritik süreç ve ürün niteliklerine ait

özelliklerin bilimsel olarak daha iyi kavranması, ürün geliştirme aşamasında bilimsel tabanlı kontrol ve testlerin tasarlanması ve elde edilen bilgileri kendi sistematiği içerisinde geliştirmeye dayalı bir paradigma olarak tanımlanmaktadır (ICH Q8). QbD, öngörülen ürün kalitesini korumak için formülasyonun tasarımı, geliştirilmesi ve üretim süreçlerini kapsayan yeni bir farmasötik geliştirme yaklaşımını tanımlamaktadır. Ürün ile ilgili verileri tek başına veya birbiriyle bağlantılı olarak kullanılmak için çeşitli matematiksel modellerden yararlanmaktadır (Mishra ve ark. 2018). QbD, farmasötik alanda çeşitli fırsatlar sunmaktadır:

- Değişimin yönetimine yönelik olarak daha geçiş süreçlerinde daha gelişmiş düzeyde yaklaşımlar ile iyileştirme ve teknolojik yeniliğin sürekliliğinin sağlanmasının kolaylaştırılması.
- Endüstriyel ve düzenleyici otoritelere yönelik kaynakların daha etkin kullanılarak zaman ve maliyetten tasarruf edilmesi.
- Geliştirilen yöntemin ürünün yaşam döngüsü boyunca minimum değişkenlerle tekrar edilebilir ve güvenilir olması.
- Analitik yöntemin performansı ile ilgili araştırmanın indirgenmesi.
- Gelişmiş analitik yöntem anlayışının yanı sıra bilgi yönetiminin geliştirilmesinin bir sonucu olarak, yöntem bilgisinin daha doğru ve kesin sonuç verecek şekilde aktarılması (Beg ve ark. 2019).

Kalite risk yönetimine ve bilimselliğe dayalı olan QbD, önceden tanımlanmış hedeflerle ürünün kalite sürekliliğinin geliştirilmesi ve hastanın kullandığı son ürünün kalitesini en düzeyde tutulmasına yardımcı olurken, farklı uluslararası otoriteler arası değişkenliği minimuma indirmeye yardımcı olmaktadır (ICH Q8; Mishra ve ark. 2018).

2.5.1. İlaçta Kalite Tasarımına Ait Kılavuzlar

ICH kılavuzları, klinik testler ve güvenlik takibi, klinik öncesi ve sonrası toksisite, kalite açısından ilaçların geliştirilmesi ve spesifikasyonlarının değerlendirilmesi ve ICH'ye ait tıbbi terimlerin terminolojisi (MedDRA), ortak teknik belge (CTD) ve çeşitli düzenleyici bilgilerin transferinin geliştirilmesini içeren çeşitli konulardan oluşmaktadır (Branch 2005).

Farmasötik Gelişim Kılavuzu (ICH- Q8)

Farmasötik ürün geliştirme için tasarım ilkelerine göre kaliteyi özetleyen Q8 - Farmasötik Gelişim Kılavuzu, Tasarım Alanı (Design Space, DS) kavramını tanıtmıştır. DS paradigması, giriş değişkenlerinin (örneğin malzeme özellikleri) ve kalite güvenceyi sağladığı kanıtlanmış süreç parametrelerinin çok boyutlu kombinasyonu ve etkileşimi olarak tanımlanmaktadır. DS içinde çalışmak bir değişiklik olarak görülmemekte, DS paradigmasının dışına çıkmak bir değişiklik olarak kabul edilir ve normal süreç içerisinde düzenleyici otoriteden bir onay alındıktan sonrası değişiklik süreci başlatılır. Bir üretim süreci için DS'nin oluşturulması, ilaç şirketlerine yalnızca tasarım alanında düzenleyici onay olmaksızın değişiklik yapma fırsatı sunmakla kalmaz, aynı zamanda bir üretim sürecini daha da iyileştirmeye yardımcı olabilecek daha fazla deney imkanı ve sonuçları doğrulama için fırsatlar sunmaktadır (ICH Q8; Peterson 2008).

Q8 kılavuzunda değinilen diğer noktalardan biri ise PAT'ın PCI'nın yerini alarak DS paradigmasına girmesinden dolayı sağladığı yararlarıdır. Sağladığı yararlar genel olarak, minimal bir yaklaşımın yanı sıra sistematik yaklaşım sayesinde sürekli işlem kontrolü mümkün olabilmekte, risk tabanlı bir paradigma olduğu için son ürün test ve analizlere tabi tutularak kontrol stratejisinin hakim olduğu bir üretim söz konusu ve en önemlisi kalite kontrol genel prosesin bir parçası olduğundan ürün performansına dayalı bir sistem mevcuttur (ICH Q8)

Kalite Risk Yönetimi Kılavuzu (ICH- Q9)

Q9 kılavuzuna göre, kalite risk yönetiminde (QRM) ilaç endüstrisi ve düzenleyici otoritelerin iki önemli noktaya odaklanması gerekmektedir. Bunlardan birincisi kalitenin hasta güvenliği ile bağlantılı olan bilimsel bir dayanağının olması ve QRM sürecinin başarı kriteri ve dokümantasyonunun risk düzeyi ile orantılı olması gerektiğidir. Diğer nokta ise etkili bir QRM süreci için, farmasötik ürünün geliştirilmesi ve ticarileştirilmesi sırasında ortaya çıkabilecek olası sorunların proaktif olarak tanımlanması ve kontrolü için kilit bir mekanizmanın sağlanmasıdır. QRM, tabloda gösterildiği şekilde tanımlanabilir (Tablo 2-4) (ICH Q9; Elder ve Teasdale 2017).

Tablo 2-4: Kalite risk yönetimi için tanımlar (Elder ve Teasdale 2017)

Parametre	Tanım
Kalite	Bir etkin madde veya ilacın, üretim süreci ve herhangi diğer yardımcı süreçler ile bağlantılı olarak, amaçlanan kullanımını sağlamak için gerekli önceden belirlenmiş kriterleri yerine getirme derecesidir.
Risk	Zararın meydana gelme (veya istenmeyen sonucun) olasılığı ile bu zararın ciddiyetinin birleşimidir.
Yönetim	Ürünün yaşam döngüsü boyunca (farmasötik ürün geliştirme ve sonraki üretim prosesleri boyunca) etkin maddenin veya ilacın kalitesine yönelik risklerin değerlendirilmesi, kontrolü, iletişimi (kuruluş içinde ve dışında) ve tekrarlanabilir olarak gözden geçirilmesi için sistematik prosedürlerin oluşturulması

Q9 kılavuzu, kalite yönetimindeki risklere ilişkin değerlendirmenin bilimsel bilgiye dayanması gerektiğini ve ortaya çıkan sürecin risk yönetimi ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Bu risk yönetim sürecini de; risk değerlendirmesi (tanımlama ve değerlendirme dahil), risk kontrolü, riskin azaltılması, riskin kabulü, risk iletişimi ve risk incelemesi olarak ayrı ayrı incelemiştir.

Q9 kılavuzunda yer alan ek dökümanlar ise, risk tabanlı sürecin bir parçası olarak kullanılabilecek uygun QRM araçlarının bir listesini de bulundurmaktadır. Bu araçlar, kullanıcıya risk yönetiminin geliştirilmesi ve kontrol altına alınmasında faydalı olabilecek niteliksel, yarı niceliksel veya niceliksel veriler sağlamayı amaçlar. Bu QRM araçlarından elde edilen veriler nihai ürünün kalitesini ve bütünlüğünü garanti etmekte, ürünlerin başarılı bir şekilde geliştirilmesinde QRM araçlarının kullanımının faydasını ortaya koyarken bu tür araçların neden genel kalite ve tasarım odaklı geliştirme sürecinin

ayrılmaz bir parçasını oluşturduğunu göstermeye hizmet etmektedirler (ICH Q9; White 2009).

Farmasötik Kalite Sistemi Kılavuzu (ICH- Q10)

Farmasötik Kalite Sistemi- Q10 kılavuzunda, özellikle ilaç endüstrisinde etkili bir kalite yönetim sistemi için kapsamlı bir model tanımlamaktadır. Bu model, yüksek kalitede farmasötik ürünleri hastaya sunabilen bir sistem kurulması, uygulanması ve sürdürülmesini amaçlamaktadır. Bunun yanı sıra proses performansını ve ürün kalitesini arttırmak için etkin bir takibin gerekliliğini savunularak, kalite kontrol sistemlerinin geliştirilmesi ve kullanılması teşvik edilmektedir. Bu sayede ürünün yaşam döngüsü boyunca gerekli kalite ihtiyaçlarının tutarlı bir şekilde karşılanması için eksiklerin tespit edilerek, erken önlem alınabilmesi mümkün olmaktadır (ICH Q10; Calnan ve ark. 2013).

Q10, tüm dünya genelinde ilaçların kalitesini ve bulunabilirliğini artırmak için etkili bir farmasötik kalite sistemine endüstri ve düzenleyici otoritelerin desteğini göstermektedir. İlaç içerisinde bulunan etkin maddenin üretiminden son ürünün hastaya sunumuna kadar Q10'un uygulanması, inovasyon ve sürekli iyileştirmeyi kolaylaştırarak, farmasötik veya biyoteknolojik ürün geliştirilmesi ile üretim faaliyetleri arasındaki bağı güçlendirecektir. Bu kılavuz, Uluslararası Standartlar Örgütü'nün (ISO) kalite kavramlarına dayanmakta ve güncel İyi Üretim Uygulamaları (cGMP) düzenlemelerini içermekle birlikte, öncesinde yayınlanan Q8 ve Q9 kılavuzlarını yönergelerini tamamlayıcı özelliktedir (ICH Q10).

2.5.2. Kalite Tasarımı (QbD) Uygulamaları

Kalite kontrol uzmanı Joseph Moses Juran, "Kalite planlanabilir bir olgudur ve kalite eksikliklerinin çoğu, sürecin planlanma ve geliştirilme biçiminde ortaya çıkar" ifadesiyle QbD ile ilgili ilk kavramı ortaya koymuştur. Bu ifade, ilaç endüstrisinde kalitenin önemi ile ilgili temel kavramların entegrasyonunun yanı sıra, mevcut yaklaşımın (kalite testinden kaliteyi mümkün kılan sistemler) değişimi için dünya çapındaki yetkili otoritelerce büyük ilgi görmüştür (Javed ve ark. 2019). QbD' nin, ürünlerin özellikleri hakkında önceden tanımlanmış hedeflere ulaşmak için riske dayalı bütünsel bir yaklaşım sunarak, yeni geliştirilen formülasyonun da bu sayede istenen kalite niteliklerini garanti ederek üretilmesinde etkisi büyüktür.

QbD'ye ait parametrelerin kritik olarak nitelendirilmesi, klinik açıdan hasta memnuniyetine dayanmakta ve bu karakteristik verilerin işlenerek ürünlerin fiziksel özellikleriyle ilişkilendirilmektedir. QbD'ye ait süreç, ya tek başına (ana etkiler) ya da nihai formülasyonlar üzerindeki diğer faktörlerin (etkileşim verileri) varlığında tahmin edilebilmektedir. Böylece önceden belirlenen parametre düzeyinde/ aralıklarında, istenilen profilde ve kontrol edilebilir kalite özelliklerine sahip ürünleri üretmek mümkün olmaktadır (Negi ve ark. 2016). QbD tabanlı yaklaşımın nihai hedefi, değişkenlerin kapsamlı araştırılması ve DoE paradigmasıyla uygun tasarımın seçilmesiyle prosese ait her basamak kontrol edilerek üretim süreci tasarlanması, böylece üründe istenen ve belirlenen kalite, nihai ürünlerle güvence altına alınabilmesidir. Bu nedenle FDA, gönüllü ilaç firmalarının katılımıyla QbD ilkelerinin düzenleyici kılavuzlar ve yasal direktifler biçiminde entegrasyonuna vurgu yapan dosya yönetim süreci veya yeni ilaç molekülünün tasarımı, formülasyonu ve üretimini kapsayan tüm prosese yönelik rapor gönderilmesini kolaylaştırmak için özel pilot bir program başlatmıştır (Beg ve ark. 2017).

Özetlenecek olursa, QbD odaklı üretim aşağıdaki belirtilen dört temel unsuru içerir:

- Hedeflenen ürün kalite profilinin tanımlanması
- Ürünlerin istenen kritik kalite özelliklerinin (CQA) belirlenmesi
- Ürün değişkenliğinin sebepleri göz önünde bulundurularak, temel süreç parametrelerinin taranması
- Ürüne ait temel nitelikleri etkileyen parametrelerde sürecin rolü ve etkisinin tahmin edilmesi

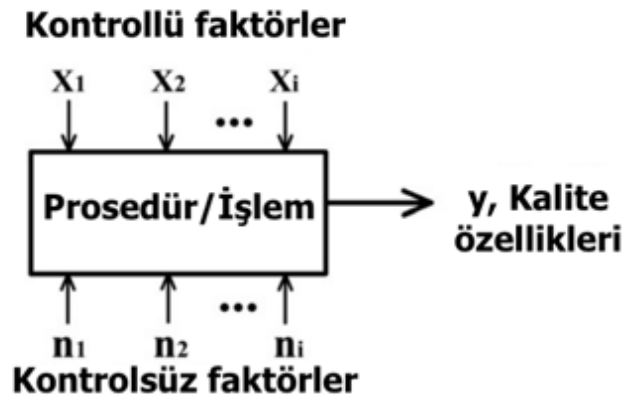
QbD'ye entegre edilen formülasyonların tasarımında tüm süreç, CQA'ların tanımlanması, kritik proses parametrelerinin (CPP) taranması, DoE'yi belirlemek, sistematik deneysel planlama ve deney analizinde varyasyonu en aza indirmek için farklı araçların seçilmesi gibi birden fazla adımı içermektedir (Raman ve ark. 2015).

2.5.3. Deneysel Tasarım (DoE)

Deneysel tasarımı (DOE), optimum değerler için reaksiyon alanını taranması amacıyla, aynı anda farklı faktörlerin varyasyonuna izin veren, reaksiyon ve proses optimizasyonuna yönelik istatistiksel bir yaklaşımdır. Belirlenen tasarım alanında uygun formülasyonun geliştirilmesi amacıyla DoE tarafından süreci etkileyen farklı

parametreler taranırken, CQA'lar ve CPP'ler belirlenerek üretimde varyasyonun minimuma indirilmesi, maliyetin düşürülmesi ve geliştirilen formülasyonun güvenlik ve kalitesini iyileştirmesi mümkün olmaktadır (Politis ve ark. 2017).

Formülasyon geliştirmede QbD ve PAT konsepti içinde DoE dışında çok sayıda matematiksel modelleme tekniği bulunmaktadır. Örnek olarak, geçmiş verilere odaklanan çok değişkenli veri analizi (MVDA) yöntemi hem tek başına hemde DoE ile birlikte tasarlanmış ve tasarlanmamış faktörleri analiz etmek için kullanılmaktadır. Ancak QbD'nin proaktif kültürü (bilinçli/ bilinçsiz veya olumlu/ olumsuz olarak ortaya çıkan mevcut hatayı ya da durumu düzeltmek amaçlı alınan aksiyonlar) göz önünde bulundurulduğunda, DoE farmasötik ürün geliştirmenin başlangıç noktasındaki istatistiksel düşüncenin uygulanmasını gerektiren temel sistematik yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Byrene ve Vikström 2013; Politis ve ark. 2017).



Şekil 2-33: DoE'nin temeli (Montgomery 2013)

DoE, yanıtların ürün üzerindeki etkilerini belirlemek için sürecin kontrollü/ kontrolsüz girdi faktörlerinin sistematik ve amaçlı olarak değiştirildiği bir yaklaşımdır. Genel olarak, Şekil 2-33'de açıklandığı gibi CPP'lerin ($x_1, x_2, \dots, x_i$) CQA'lar (y_i) ile matematiksel fonksiyonlar $y = f(x)$ aracılığıyla bağlantısıdır (Montgomery 2013). DoE'nin sistematigi sayesinde, gelişime neden olan optimum faktör ayarlarının belirlenerek ürün performansı ve içinde yatan CQA değerlerinin güvence altına alınmasının yanı sıra, her faktörün bağımsız olarak incelendiği geleneksel yöneteme göre (bir seferde tek faktör,

One-Factor-At-a-Time, OFAT) faktörler arası etkileşimin aydınlatılması mümkün olabilmektedir (Politis ve ark. 2017).

DoE'nin OFAT'a kıyasla sunduğu avantajlar şu şekilde sıralanabilir (Lewis ve ark. 1999; Montgomery 2013):

- Kaynaklar minimum kullanılarak süreç bilgisi en üst düzeye çıkarılabilir.
- Doğru bilgiyi en verimli şekilde sağlamak mümkündür.
- Faktörler arası etkileşimler tanımlanabilir.
- Göreceli olarak her bir faktörün önemi karakterize edilebilir.
- Tasarım alanı içerisinde işlem/ prosedüre ait davranış tahmini yapılabilir.
- CPP'ler ve CQA'lar arasında sağlam bir neden sonuç ilişkisi kurulabilir.
- Uygun CPP seçimi ile CQA'lar optimize edilir, bu sayede kabul edilebilir aralık tespit edilerek bu aralıkta çalıştırılan bir proses parametresinin karakterize edilmesiyle kalite kriterlerini karşılayan bir ürün ortaya çıkacaktır.
- Çoklu yanıt optimizasyonuna izin verilebilir (Farmasötik ürünler birden fazla CQA sergilediğinden, sonrakiler eşzamanlı optimizasyon gerektirir).
- Ürün veya süreç daha sağlam hale getirilebilir (işlem/ prosedür, harici ve kontrol edilemeyen faktörlere karşı nispeten duyarsız hale getirilerek).

DoE ile değişkenliği minimize edilmiş spesifikasyonlara sahip CQA'lar elde edildiği için, son ürünün güvenliği ve etkinliği dikkate alınarak kalite hedefli ürün profiline (QTTP) uygun kalite özelliklerine sahip bir farmasötik ürünün elde edilebilmesini mümkün olmaktadır (Politis ve ark. 2017).

2.5.3.1. Deneysel Tasarım (DoE) Aşamaları

Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (The National Institute of Standards and Technology, NIST) ve Montgomery ve arkadaşlarına göre DoE'nin yürütülmesi için yedi farklı aşama gerekmektedir (Montgomery ve ark. 2013; NIST 2016) (Tablo 2-5).

Tablo 2-5: DoE'nin aşamaları (NIST 2016)

Aşama	Kapsamı
1) Sağlam hedeflerin belirlenmesi	Literatürlerden ve deneyimlerden elde edilen veriler ışığında QTTP'ler tanımlanmalıdır (ICH Q9).
2) İşlem/ prosedür değişkenleri	Tüm tasarımın yürütülebilir olmasını ve kapsamının karşılanmaya uygun olmasını sağlaması için uygun sayısal veya kategorik faktör tipleri ve değerleri seçilmelidir.
3) Deneysel tasarımın seçimi	Proses ve formülasyonun taranması, karakterizasyonu veya optimizasyonu için faktöriyel veya karışım olarak çeşitli tasarım türleri seçilebilir. Rastgeleleştirme, engelleme ve replikasyonlara ilişkin kararlar da bu aşamada ele alınmalıdır.
4) Tasarımın yürütülmesi	Oluşturulan matris dizaynı, tasarıma dahil olmayan parametrelerin tanımlandığından emin olunarak doğru bir şekilde yürütülmelidir.
5) Verilerin deneysel varsayımlarla tutarlılığı	Daha önce de belirtildiği gibi, DoE'ler kötü yürütülen potansiyel denemelerden kaynaklanan aykırı değerlerin belirlenmesinde son derece etkilidir.
6) Sonuçların analizi	ANOVA ve grafiksel araçlar, önemli faktörlerin ve faktörler arası etkileşimlerin ana nedenlerini belirlemede çok yardımcı olur. Sonuçlar sadece istatistiksel olarak değerlendirilmekle kalmaz, aynı zamanda yerleşik teorilere karşı da değerlendirilir ve üretim süreci ile ilgili pratik bilgi akışı sağlar.
7) Sonuçların kullanılıp yorumlanması	Bu adımda, DoE sonucunun değerlendirilmesiyle, doğrulayıcı çalışmaların yürütülmesi, tasarım alanlarının genişletilmesi, ölçek büyütme ve teknoloji transfer faaliyetlerine devam edilmesi gibi eylemlerde bilimsel açıdan sağlıklı karar verme desteklenebilir.

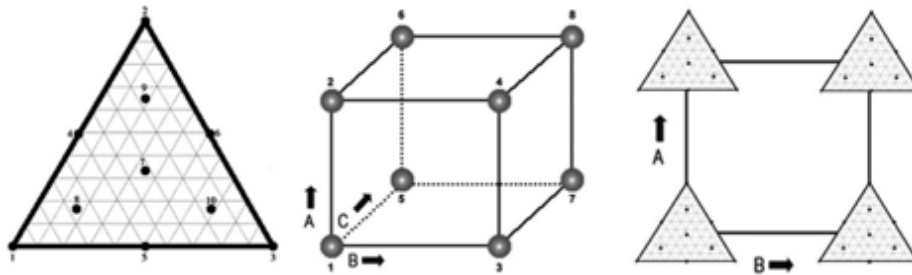
Bu yedi adımın başarısının, DoE'nin sorunsuz yürütülmesini destekleyebilecek uygun bir ortamın oluşturulmasına bağlı olduğu açıktır. Bundan dolayı NIST araştırmacılar için birkaç ipucunu özetlemiştir (NIST 2016):

- Önce göstergelerin/ölçüm cihazlarının performansı kontrol edilmelidir.
- Deney olabildiğince basit tutularak, hızlı bitirilmelidir.
- Planlanan tüm çalışmaların uygulanabilir olduğu kontrol edilmelidir.
- Çalışma sırasında proseslerdeki kaymalara dikkat edilmelidir.
- Beklenmeyen durumlar için zaman ayrılmalıdır (malzemeler yedeklenmelidir).
- Tüm ham veriler korunmalıdır (sadece ortalamaların özeti tutulmamalıdır)
- Yapılan herşey kayıt altına alınmalıdır.
- Deneyden sonra kullanılan ekipman orjinal ayarlarına sıfırlanmalıdır.

DoE'nin genel yapısı için, farmasötik ürün geliştirmede kalite sistemi, süreç bilgisi ve risk yönetiminin birlikte yürütülmesini sağlayan ve bu aşamada ICH tarafından yayınlanan üç kılavuzun (ICH-Q8,Q9 vd Q10) birbirini tamamlayıcı özelliklerinden yararlanarak, ürün yaşam döngüsü boyunca birleşik bir sistem yaklaşımında uygulandığı bir paradigma olduğu rahatlıkla söylenebilir (Montgomery 2013; Politis ve ark. 2017).

2.5.3.2. Deneysel Tasarım (DoE) Kategorileri

DoE'nin incelenen parametrenin türüne bağlı olarak üç ana kategorisi vardır (Şekil 2-34) (Smith 2005; Politis ve ark. 2017).



Şekil 2-34: Ana DoE kategorileri: karışımlar (solda), faktöriyel tasarımlar (ortada) ve karışım-faktöriyel tasarımlar (sağda) (Politis ve ark. 2017)

Çoğunlukla formülasyonların karakterizasyonu için karışım ve faktöriyel tasarımlar kullanılır. Optimizasyon, bir bileşimin toplam miktarı tanımlandığında

uygulanır. Kapsamları, her bir bileşenin kullanımını ve formülasyondaki oranını rasyonelleştirmektedir. Bu tasarımlarda bileşen oranlarının birbirinden bağımsız olduğu açıktır. Karışım tasarımlardan (Eşitlik 2-8) farklı olarak, faktöriyel tasarımda birbirinden bağımsız olarak ayarlanabilen parametreler (sıcaklık, sıkıştırma kuvveti ve püskürtme hızı gibi) bulunmakta, alınan cevaplar faktör seviyelerinin fonksiyonlarını göstermektedir (Eşitlik 2-9) (Smith 2005).

Karışım tasarımlarda kullanılan eşitlik,

$$\text{Yanıtlar} = f(\text{bileşen oranları}) \quad (\text{Eşitlik 2-8})$$

Faktöriyel tasarımlarda kullanılan eşitlik,

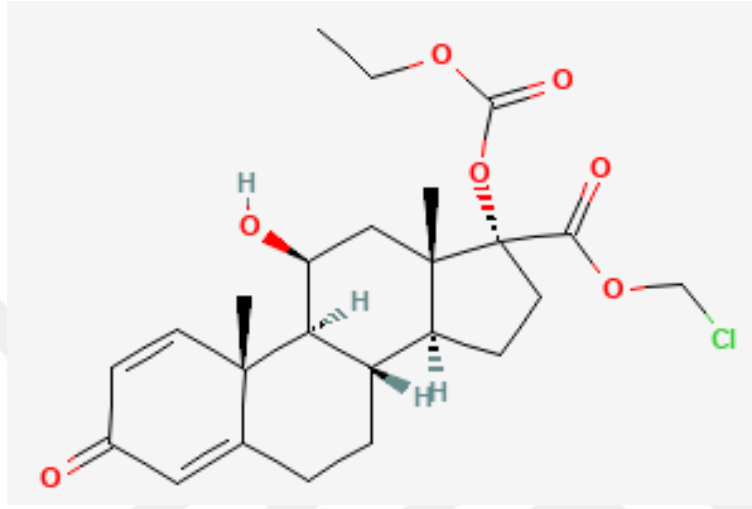
$$\text{Yanıtlar} = f(\text{faktör seviyeleri}) \quad (\text{Eşitlik 2-9})$$

Faktöriyel tasarımda, süreç parametreleri, önceden belirlenmiş faktör seviye kombinasyon matrisine göre kasıtlı ve eşzamanlı olarak değiştirilir. Karışım tasarımlardan temel farkı, her bir faktörün diğerlerinden bağımsız olarak ayarlanabilmesidir. DoE' nin kapsamı faktörlerin kendilerine veya yanıtlarına bağlı olarak ilişkilendirildikleri matematiksel modelleri geliştirmektir. Bu kapsamda faktörün ana etkisinin cevapta meydana gelen ortalama değişim olduğu, yüksek faktör seviyesindeki ortalama tepki ile aynı faktörün düşük seviyesindeki ortalama tepki arasındaki fark olarak faktöriyel tasarımda tahmin edilebilmektedir (Gabrielsson ve ark. 2004; Politis ve ark. 2017).

Formülasyon ve proses değişkenleri (farklı sıcaklıklar, karıştırma hızları veya sonikasyon süreleri gibi) arası etkileşimleri araştırmak gerektiğinde karışım-faktöriyel tasarımlar kullanılır. Elde edilen yanıtlar bileşen oranlarının, faktör seviyelerinin ve bunların etkileşiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Karışım-faktöriyel tasarımlar, her deneye ait farklı ayarlamalar içermeleri ve çok fazla sayıda deney gerektirmeleri nedeniyle nadiren kullanılırlar (Politis ve ark. 2017).

2.6. Etkin Madde ile İlgili Genel Bilgiler

Kimyasal ismi: klorometil 17 α - [(etoksikarbonil)oksi]- 11 β - hidroksi - 3 - oksoandrosta -1,4 -dien - 17 β -karboksilat (Şekil 2-35) (Noble ve Goa 1998; Pirouzian ve Craven 2014).



Şekil 2-35: LE'nin kimyasal yapısı

CAS no : 82034-46-6

Genel formülü : C₂₄H₃₁ClO₇

Moleküler ağırlığı : 466,90 g/mol

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri

LE, yapısal olarak kortikosteroid grubunda yer alan prednizolon ile benzerlik gösteren katı kristalize bir yapıda karbonik anhidraz inhibitörüdür. Biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde (Biopharmaceutical Classification System, BCS) sınıf II ilaç grubunda yer almaktadır (Shoaeba ve ark. 2021). Erime derecesi 220 – 260 °C arası olan lotepndol etabonatın, organik solvanlardaki (dimetil formamit, DMSO, metanol ve etanol gibi) çözünürlüğünün iyi olmasına karşın suda çözünürlüğü düşük ve çözünürlük pH bağımlı değildir (Noble ve Goa 1998; Dinnendahl ve Fricke 2008; Pirouzian ve Craven 2014).

LE'nin diğer kortikosteroidlerle (hidrokortizon ve deksametazon) lipofilitesini karşılaştırma amaçlı yapılan çalışmalarda, içlerinden en yüksek Log P değerine LE'nin (3,04) sahip olduğu görülmüştür (Alberth ve ark. 1991). LE'nin farklı çözücülerde (distile su, fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2), etanol ve fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2):etanol) çözünürlük değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan başka bir çalışmada ise, en yüksek çözünürlük değerleri sırasıyla etanol (0,422 mg/ml) ve fosfat tampon çözeltisi:etanol (1:1) (0,2 mg/ml) karışımına ait iken; en düşük değerlerin sırasıyla fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2) (0,00108 mg/ml) ve distile suya (0,00336 mg/ml) ait olduğu görülmüştür (Bodor ve ark. 2000).

LE, C-20 konumunda bulunan ester grubunun hidrolize uğramasıyla glukokortikoid aktiviteden yoksun ve asidik özellikte Δ^1 -kortienik asit etabonat ve daha sonra Δ^1 -kortienik aside metabolize edildiği tespit edilmiştir. Beyaz floresan ışığının ise bu metabolizasyon sürecini hızlandırdığı da belirtilmiştir (Yasueda ve ark. 2004).

2.6.2. Farmakolojik Özellikleri

LE'nin genel olarak kabul edilen etki mekanizmasına ait yolak belirli olmamasına rağmen, fosfolipaz A2 inhibitör proteinlerini (lipokortinler) indükleyerek etki ettikleri düşünülmektedir. İnhibitör proteinler, araşidonik asidin açığa çıkmasını membran fosfolipidleri üzerinden engelleyerek çeşitli biyomediyatörlerin (prostoglandin, interlökin vb.) sentezini kontrol eder böylece inflamasyonun ortaya çıkması engellenir (Pirouzian ve Craven 2014). Yeni tür kortikosteroidler grubunda yer alan LE etki göstereceği bölgeye yönelik olarak antiinflamatuvar aktivitesi güçlü olacak biçimde tasarlandığından, antiinflamatuvar etkisi sıklıkla kullanılan diğer kortikosteroidlerle benzer düzeydeyken, en sık görülen yan etkilerden biri olan intraoküler basıncı artırma etkisi çok daha düşük seviyededir (Fong ve ark. 2019).

LE'nin ülkemizde %0,5 LE içeren süspansiyonları (Lotemax[®], Dolte[®] ve Loteforte[®]) mevcuttur. Bunun yanı sıra dünya pazarında çeşitli isimlerde (Alrex[®], Eysuvis[®], Inveltys[®] ve Lotemax[®] SM) ve çeşitli oranlarda (%0,2, 0,25, 0,38, 0,5 ve %1) süspansiyon, jel ve merhemleri de mevcuttur. LE, palpebral ve bulbar konjonktivit, kornea ve gözün ön segmentinin kortikosteroide yanıt veren inflamatuvar durumlarının (kuru göz hastalığı, mevsimsel ve alerjik konjonktivit) tedavisi ve katarakt cerrahisini takiben ağrı ve inflamasyon tedavisi için günde 4 defa 2 damlaya kadar endikedir (Rajpal ve ark. 2011; Schopf ve ark. 2014; Bausch & Lomb KÜB. 2018).

Farmakodinamik ve Farmakokinetik

LE'nin oral yolla uygulandıktan sonra etkisinin 2 saat içinde başladığı kaydedilmiş ve terapötik dozu minimal düzeyde olduğundan, kronik oftalmik uygulamalarda bile plazmaya çok düşük oranda (1 ng/ml) geçtiği rapor edilmiştir (Sheppard ve ark. 2016) . LE'nin iki kompartmanlı modele göre dağılım gösterdiği ve terminal yarılanma ömrünün 2,6 saat olduğu görülmüştür. Öncelikle korneada dağılarak, daha sonra sırasıyla iris, siliyer cisim ve aköz hümore geçtiği gözlemlenmiştir (Loftsson ve Bodor 1994; Sheppard ve ark. 2016). Son aşama olan metabolizma ve eliminasyonu ise, öncelikle korneada kornea esterazları tarafından inaktif karboksilik asit metabolitlerine metabolize edilir ve bu aşamada glukokortikoid reseptörü aktive edildiğinde, LE hızla metabolizmaya uğrar ve yan etkileri en aza indirilerek sistemden elimine edilmiş olur (Noble ve Goa 1998; Bausch & Lomb KÜB. 2018).

2.6.3. Miktar Tayini

LE'nin miktar tayininde en çok kullanılan yöntemler arasında ultraviyole (UV) spektroskopisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yer alırken (Joshi ve ark. 2013; Hirani ve ark. 2014); daha az sıklıkta kullanılan kütle spektroskopisi yöntemi de sıvı kromatografisi ile birlikte kullanılmaktadır (LC/MS ve LC/MS/MS) (Rajpal ve ark. 2013; Schopf ve ark. 2014).

Genellikle taşıyıcı sistem içerisine yüklenen formülasyonların miktar tayininde UV spektroskopisinden yararlanılırken (Hirani ve ark. 2014); *in vitro*, *in vivo* veya *ex vivo* çalışmalarda teşhis limiti (Limit of Detection, LOD) ve miktar tayin limitinin (Limit of Quantification, LOQ) hesaplanmasının hassasiyeti açısından HPLC ve kütle spektroskopisi tercih edilmektedir (Schopf ve ark. 2014; Shah ve ark. 2015; TÜRKAK 2019).

2.6.3.1. Spektrofotometrik Miktar Tayini

Sah ve arkadaşları tarafından LE'nin dozaj şekli içerisindeki miktarının tayini için geliştirilen bir yöntemde UV spektroskopisi kullanılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen supernatanttan 1 mL alınarak aseton:su (4:1) içerisinde çözündürülmüş 200-400 nm arası analiz edilerek, 272 nm'de absorbans verdiği bildirilmiştir. Tutulmayan etkin madde miktarı tayin edilerek, ilave edilen toplam LE miktarından çıkarılıp EE değeri hesaplanmıştır (Sah ve ark. 2017).

Hirani ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada polimerik nanopartiküller içerisine yüklenen LE oranının tespit edilmesi için UV spektroskopisi kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyon metanol içerisinde çözündürülerek 273 nm'de absorpsiyon verdiği gözlemlenmiş ve formülasyonlara yüklenen ilaç miktarı bu şekilde hesaplanmıştır (Hirani ve ark. 2014).

2.6.3.2. Kromatografik Miktar Tayini

LE'nin dozaj şeklinden miktarının tayini için HPLC kullanılarak geliştirilen yöntemde, C-18 kolon ve mobil faz olarak 60:40 oranında fosfat (pH 5,5) tamponu: asetonitril karışımı kullanılmış ve UV dedektörü ile 243 nm'de analiz yapılmıştır (Pappula ve ark. 2020). Hem LE hem de LE'nin bozunma ürünlerinin (Asit ve alkali hidrolizi, oksidasyon, fotoliz ve ısı uygulanarak ortaya çıkan ürünler) analizinin yapıldığı başka bir HPLC miktar tayini yönteminde, C18 kolon ve mobil faz olarak su:asetonitril:asetik asit karışımı (34,5:65:0,5, h:h:h) kullanılmış ve 280 nm'de ölçüm gerçekleştirilmiştir. LOD değerleri 20-33 ng/ml arası değişirken; LOQ değerleri 62-95 ng/ml olduğu bildirilmiş ve 0,05-50 µg/ml doğrusal bir aralık olduğu tespit edilmiştir (Han ve Segall 2015).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada LE içeren formülasyonlar intravenöz olarak uygulanmıştır, 5., 40. ve 150. dk'larda belirlenen gruplara ait sıçanlar kurban edilerek, kan örnekleriyle birlikte, beyin, karaciğer, böbrek ve akciğer doku örnekleri alınıp homojenize edilmiştir (%5 dimetil formamid içeren asetonitril solüsyonunda). Bunun yanı sıra kurban edilen sıçanlara ait deriler kullanılarak *ex vivo* deriden geçiş çalışması da yapılmış ve kullanılan deri ve geçiş sırasında alınan örnekler de dahil olmak üzere, içerdikleri LE miktarı C18 kolon ve fosfat tamponu (pH 6,0): asetonitril karışımı (35:65, h:h) kullanılarak HPLC'de analiz edilmiştir (Bodor ve ark. 1992).

HPLC ve LC/MS/MS'nin kullanıldığı bir çalışmada, LE içeren formülasyonlar oküler yoldan uygulanmış ve *in vivo* tavşan çalışması sonucu toplanan aköz hümeur ve çeşitli göz dokularından LE'nin analizi HPLC'de gerçekleştirilirken; plazma örneklerinin analizi LC/MS/MS kullanılarak elde edilmiştir. (Schopf ve ark. 2014).

2.6.4. Toksikite ve Güvenlik Profili

LE hidrokortizonun inaktif metabolitlerden biri olan kortienik asit etabonate kullanılarak sentezlenmiştir ve LE ile yürütülen hayvan çalışmalarında, glukokortikoid

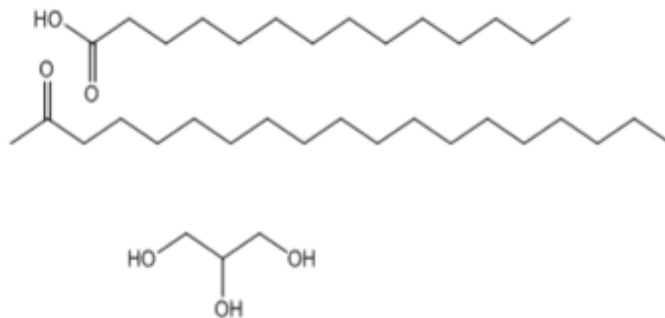
reseptörlerine bağlanma afinitesinin deksametazona kıyasla 4,3 kat daha fazla olduğu kanıtlanmış ve bu sayede steroid sınıfındaki biyoaktif moleküllerin, bunların kimyasal yapılarının ve vücuttaki enzimatik yollarının bilinmesi nedeniyle *in vivo* transformasyon yoluyla non-toksik maddelere dönüşeceği tahmin edilebilmiştir (Lacizka-Galecka ve ark. 2017; Bausch & Lomb KÜB. 2018).

Tavşanlar ile yapılan toksisite çalışmalarında, maksimum günlük dozun 35 kat fazlası oral olarak uygulanmış ve embriyotoksik veya teratojenik etki (gecikmiş osifikasyon, meningesel insidansında artış, anormal sol karotid arter ve kol-bacakta değişim) gözlemlenmiştir. Sıçanlarda ise maksimum günlük dozun 60 kat fazlası oral olarak uygulanmış ve embriyotoksik veya teratojenik etki (fötal vucut ağırlığında ve iskeletin kemikleşmesinde düşüş, arter yoksunluğu, yarık dudak-damak, kasık fıtığı) gözlemlenmiştir (Bodor ve ark. 1992; Lacizka-Galecka ve ark. 2017). Bunun yanı sıra tavşanlara oküler olarak akut ve çok doz uygulama yapılması sonrası, hafif oküler iritasyon gözlenmiştir (Lyseng-Williamson 2013).

2.7. Çalışmada Kullanılan Yardımcı Maddeler Hakkında Genel Bilgiler

2.7.1. Precirol® ATO 5

Precirol® ATO 5 (Gliseril/ Gliserol palmitostearat), hafif bir kokuya sahip ve ince beyaz toz formda negatif yüklü bir lipiddir. Palmitik (C_{16}) ve stearik (C_{18}) yağ asitlerinin mono-, di- ve trigliseritlerinin kombinasyonu olmakla birlikte, diester özellikler baskındır.



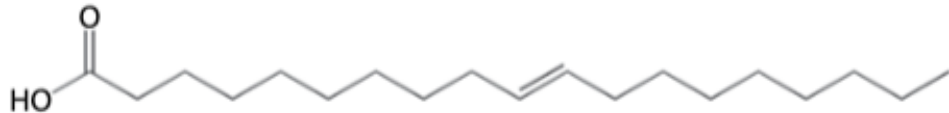
Şekil 2-36: Precirol® ATO 5 (Devi ve Agarwal 2019)

Kimyasal Formülü	:C ₃ H ₇₆ O ₇
Ortalama molekül ağırlığı	: 633.008g/mol
Erime derecesi	: 62-68 °C (Devi ve Agarwal 2019)

Precirol® ATO 5 genellikle lubrikant olarak katı oral dozaj şekillerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kontrollü salım sağlamak amaçlı lipofilik bir matris olarak kullanılmakta ve son yıllarda katı lipid nanopartiküller başta olmak üzere diğer nanofarmasötik dozaj şekillerinde de kullanılmaktadır (Müller ve ark. 2000; Hamdani ve ark. 2003).

2.7.2. Oleik Asit

Oleik asit (cis-9-oktadekenoik asit), çeşitli hayvansal, bitkisel katı ve sıvı yağlarda doğal olarak bulunan negatif yüklü bir yağ asididir. Ticari ürünler sarımsı renkli olarak piyasada bulunsalar da, kokusuz, renksiz bir yağdır. Kimyasal olarak, oleik asit, tekli doymamış bir omega-9 yağ asidi olarak sınıflandırılır (Kaneko ve ark. 1997; Salentinig ve ark. 2010).



Şekil 2-37: Oleik asit (Baishya ve ark. 2017)

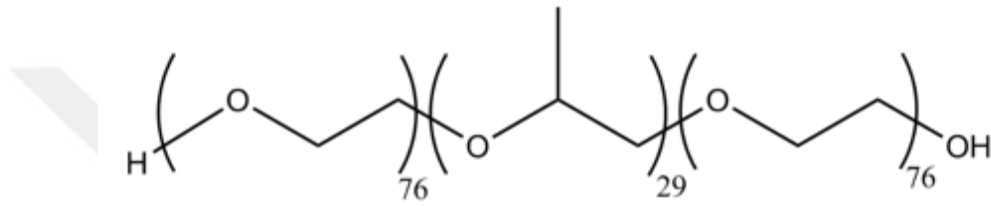
Kimyasal formülü	: C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ortalama molekül ağırlığı	: 282.47 g/mol

Topikal preparatların içerisinde nemlendirme, viskozite artırma ve penetrayonu artırma özelliklerinden dolayı kullanılmalarının yanı sıra, dağıtıcı ve taşıyıcı ajan olarak kullanılmaktadır. İlaç taşıyıcı olarak %2-8 arasında kullanıldıkları belirtilmiştir. (Salentinig ve ark. 2010). Topikal özelliklerinin yanı sıra kan basıncını ve pıhtılaşmayı düzenleyici etkileriyle birlikte bağışıklık sistemine katkı sağlamaktadırlar, bundan dolayı

oral olarak kullanıma sunulan yumuşak kapsül preparatları mevcuttur (Baishya ve ark. 2017).

2.7.3. Pluronic F68® (Poloxamer®188)

Pluronic® F68 (Poloxamer® 188), beyaz renkli, kokusuz ve granül şeklinde olan genellikle süspansiyon ve emülsiyonlarda kayma kuvvetini kontrol altına almak için kullanılan iyonik olmayan kopolimer (polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit, PEO-PPO-PEO) bir yüzey aktif maddedir (Guzniczak ve ark. 2018).



Şekil 2-38: Pluronic® F68 (Wei ve ark. 2015)

Ortalama molekül ağırlığı	: 8400-8540 g/mol
Erime noktası	: 60-65 °C
HLB değeri	: 27-29

Pluronic® F68, yüzey aktif madde olarak kullanılmasının yanı sıra, hücre kültürü çalışmalarında da hücre zarını onarıcı/ iyileştirici etkisinden dolayı kullanılmaktadır. Pluronic® F68' in, çalışıldığı konsantrasyon aralığı genellikle %0.1- 10 arasındır (Guzniczak ve ark. 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Asetik Asit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Asetonitril	(Sigma Aldrich, Almanya)
Boncuk parafin	(Fisher Scientific, İngiltere)
Dimetil dikloro silan	(Merck, Almanya)
Disodyum hidrojen fosfat	(Fluka, ABD)
Eosin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Etanol	(Macron Chemicals, ABD)
Formaldehit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Hematoksilin	(Bio-Optica, ABD)
Hidroklorik asit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Ksilen	(Sigma Aldrich, Almanya)
Karboksi metilselüloz	(Sigma Aldrich, Almanya)
Loteprednol Etabonat	(Cayman Chemicals, ABD)
Metanol	(J.T.Baker, ABD)
Oleik asit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Pluronic® F68	(Sigma Aldrich, Almanya)
Precirol® ATO 5	(Gattefosse, Fransa)
Sodyum dihidrojen fosfat	(Fluka, ABD)
Sodyum hidroksit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Sodyum klorür	(Sigma Aldrich, Almanya)
Susuz potasyum bromür	(Sigma Aldrich, Almanya)

3.1.2. Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

1, 5 mL ve 2 mL'lik kapaklı tüpler	(Eppendorf, Almanya)
15 mL ve 50 mL'lik kapaklı tüpler	(IsoLab, Almanya)
Beherler ve Erlenler	(IsoLab, Almanya)
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	(Arçelik, Türkiye)
Buzdolabı (-80 °C)	(New Brunswick Scientific, Almanya)
Cerrahi bistüri, makas ve pens	(Biologie, Almanya)
Dana Gözleri	(Elif Et Kombinasi, Türkiye)
Desikatör (11 L)	(IsoLab, Almanya)
Diferansiyel taramalı kalorimetre	(Setaram Solution, Fransa)
Distile su cihazı	(Merck Millipore, Almanya)
Doku homojenizatörü ve uçları	(Heidolph, Almanya)
Enjektör (1, 2 ve 5 mL)	(Setinject, Türkiye)
Etüv	(Binder, Almanya)
Flakon tıparları	(IsoLab, Almanya)
Flakonlar	(IsoLab, Almanya)
Floresan mikroskop (DM6000)	(Leica, Almanya)
Franz difüzyon hücresi	(Permegear, ABD)
FT-IR spektroskopisi (Nicolet)	(Thermo Scientific, ABD)
Hassas terazi	(Ohaus, ABD)
HPLC flakonları	(Agilent, ABD)
HPLC kolonu (C-18, Hypersil)	(Thermo Fisher, ABD)
Isı düzenleyici ceket	(Lauda, Almanya)
Isı kontrollü yatay çalkalayıcı	(Heidolph, Almanya)
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	(Heidolph, Almanya)
Işık mikroskobu	(Leica, Almanya)

İklimlemlendirme kabini	(Binder, Almanya)
Kornea kesim ekipmanları	(Rumex, İngiltere)
Lam ve lameller	(IsoLab, Almanya)
Liyofilizatör	(Martin Christ, Almanya)
Manyetik balık	(IsoLab, Almanya)
Membran Filtreler (0,2 ve 0,45 µm)	(Chrom-fill, ABD)
Mikropipetler ve uçları	(Eppendorf, Almanya)
Mikrotom (RM2245)	(Leica, Almanya)
Numune kaplama cihazı	(Leica, Almanya)
Parafilm	(Bemis, Almanya)
Pastör pipeti (2 ve 4 mL)	(IsoLab, Almanya)
Petri kabı (6 cm çaplı)	(IsoLab, Almanya)
pH metre	(Mettler Toledo, ABD)
Rota evaporatör	(Heidolph, Almanya)
Santrifüj	(Spectrafuge, ABD)
Selüloz asetat membran (3,5 kDa)	(Spectrum Labs, ABD)
Selobant (12 mm x 10 m)	(Ve-Ge, Türkiye)
Taramalı elektron mikroskobu (EVO 40)	(Zeiss, Almanya)
Ultrasonik banyo (22 L)	(IsoLab, Almanya)
Ultrasonik prob (Sonorex)	(Bandelin, Almanya)
UV Spektrofotometre	(Agilent 8453, Almanya)
Vakum pompası	(İlmvac, Almanya)
Viskozimetre (DV-1)	(Brookfield, ABD)
Vorteks	(IKA, Almanya)
Yüksek basınçlı sıvıkromatografisi	(Agilent 1100, ABD)
Yüksek kaymalı homojenizatör	(Heidolph, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

5 mg LE 500 mg susuz potasyum bromür ile kuvarz havanda karıştırıldı. Toz karışıma 150 N kuvvet uygulanarak tabletler basıldı. Tabletler, FT-IR spektrofotometre de 4000 – 650 cm⁻¹ dalga boyu arasında, % transmisyon modunda çalışılarak spektrumları alındı.

3.2.1.2. Ultraviyole (UV) Spektrumu

LE'nin UV spektrumu metanoldeki çözeltisinde UV spektrofotometre kullanılarak elde edildi. Bunun için, 2,5 mg LE tartıldı ve metanol ile balon jojede 50 mL'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlara sahip kalibrasyon çözeltileri oluşturuldu. UV spektrofotometrede 200 –400 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans verdiği dalga boyu saptandı (Schopf ve ark. 2014).

3.2.1.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Spektrumu

LE'nin HPLC ile yapılan miktar tayini yönteminde, mobil faz olarak su:asetonitril:asetik asit karışımı (34.5:65:0.5, h:h:h) kullanıldı. Akış hızı 1.2 mL/dk olarak ayarlandı. 4,6 x 250 mm uzunluğunda 5 µm partikül büyüklüğüne sahip kolon (Thermo Scientific, BDS Hypersil, C18) kullanıldı. Çalışma süresince kolon sıcaklığı 35 °C'de tutuldu. 10 µL enjeksiyon hacmi ile tayin 280 nm dalga boyunda yapıldı. LE'nin mobil fazıda 1 µg/mL konsantrasyonda fosfat tamponu çözeltisi (pH 6.8) ile hazırlandıktan sonra HPLC kromatogramı elde edildi. Tutulma zamanı tespit edildikten sonra 2,5 mg LE'nin 50 mL PBS (pH 6.8) içerisinde stok çözeltisi hazırlandı ve stok çözeltiden 25 ng/mL, 50 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL, 1200 ng/mL, 2000 ng/mL, 3500 ng/mL ve 5000 ng/mL konsantrasyonlarda çözeltiler elde edilerek kalibrasyon eğrisi çizildi (Han ve Segall 2015).

3.2.1.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi

Etkin maddenin yüzey morfolojisini incelemek için SEM kullanıldı. SEM yöntemi ile elektronlar numunedeki atomlarla etkileşerek numune yüzeyindeki topografi ve kompozisyon hakkında bilgiler içeren farklı sinyaller üretilir, elektron demetleri yüzeyi tarar ve demetin konumu, algılanan sinyal ile eşleştirilerek görüntü oluşturulur. Bu

amaçla, toz haldeki LE 30 sn süresince 10 nm kalınlığında altın ile kaplandı. Kaplanan numunelerin SEM cihazında vakum altında görüntüleri elde edilirken, 2500x ve 5000x büyütme oranları ile çalışıldı.

3.2.1.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

LE'in termal davranışlarının belirlenmesi için DSC kullanılarak yapılan termogravimetrik analizde, formülasyonlar alüminyum tavalara tartılarak (8-10 mg) 20 – 300 °C arası sıcaklıkta değerlendirildi. Referans olarak, alüminyum boş tavalar kullanıldı. 10 °C/dk sıcaklık artışı, 20 mL/dk azot akış hızında numunelere ait termogramlar elde edildi. 3 defa tekrar edilen deneyde, maddeye ait pik üzerinden erime derecesi ve erime entalpisi tayin edildi.

3.2.2. Etkin Maddenin Miktar Tayini Yöntemleri

LE'in su, metanol ve pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisindeki çözünürlüklerinin tayini, KLN, NLT ve NE formülasyonlarından EE'nin ve YK'nın tayini UV spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilirken; *in vivo* ve *ex vivo* geçiş, bant sıyırma ve korneanın homojenizasyonu çalışmasında LE'in tayini HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

UV spektroskopisi ve HPLC ile yapılan analiz çalışmalarında analitik yöntemin doğrulanması için ICH Q2 (R1) kılavuzundaki talimatlar kullanılarak, analitik yönteme ait seçicilik, doğrusallık, çalışma aralığı, doğruluk, kesinlik ve teşhis (LOD)/miktar tayini limiti (LOQ) sırasıyla belirlendi (ICH Q2).

3.2.2.1. UV Spektroskopisi Yöntemi ile Miktar Tayini ve Miktar Tayininin Validasyonu

Kullanılacak katı/ sıvı lipidlere ait lipit görüntüleme çalışması, yüzey etkin maddelerle yapılan görüntüleme çalışması ve lipit nanotaşıyıcıların enkapsülasyon etkinliklerinin tayininde UV spektroskopisi kullanılmıştır (De Souza ve ark. 2012; Shah ve Agrawal 2013).

Doğrusallık

Analitik bir yönteme ait doğrusallık analizi, etkin maddenin belirlenmiş konsantrasyon aralığındaki analiz bulgularının, etkin madde miktarı ile doğru orantılı olmasını gerektirir (ICH Q2). LE'in metanol içerisinde 100µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL,

8 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere ait absorban değerleri 200-400 nm aralığında tayin edildi ve bu işlem 6'şar kere tekrar edildi. Çözeltilere ait absorban değerleri ve konsantrasyonları içeren kalibrasyon eğrisi çizilerek korelasyon (r) ve determinasyon (r^2) değerleri hesaplandı.

Çalışma aralığı doğrusallık, doğruluk ve kesinlikte kullanılan konsantrasyonların aralığı olduğundan (ICH Q2); UV spektroskopisi'nde kullanılan konsantrasyonlara ait aralık, çalışma aralığı olarak seçilmiştir.

Doğruluk

Analiz sonucu elde edilen verilerin gerçeğe yakınlık ölçüsü doğruluk parametresi ile belirlenmekte ve bu da % geri kazanma oranı ile ilişkilendirilmektedir (ICH Q2). LE'nin metanol ile hazırlanan 4 µg/mL, 15 µg/mL ve 25 µg/mL üç çözelti analiz edildi (n=6) ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem sayesinde konsantrasyonları hesaplanarak % geri kazanma değerleri belirlendi.

Kesinlik

Kesinlik parametresi, yapılan miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğini ve saptanan çalışma koşullarında elde edilen ölçümler arası uyumu göstermektedir. SD (% RSD) değeri ile ifade edilir ve kesinlik parametresini sağlaması için bu değer %2'nin altında olmalıdır. Bu kavram gün içi ve günler arası olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir (Cinquina ve ark. 2003; ICH Q2). Gün içi kesinlik için LE'a ait 40 µg/mL, 200 µg/mL ve 800 µg/mL çözeltiler hazırlanarak 200-400 nm absorbansta ölçümler alındı (n=6). Günler arası kesinlik için de ilk gün yapılan çalışmanın tekrarı yapılarak RSD değerleri hesaplandı.

Seçicilik

Miktar tayini sırasında, etkin maddeye ait pike etki müdahale edebilme ihtimali bulunan diğer maddelerin varlığında etkin maddeye ait pikin tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini seçicilik parametresiyle mümkündür (ICH Q2). Lipit çözeltileri, LE içeren çözelti (1 µg/mL) ve sadece mobil faz kullanılarak 200-400 nm'de 6 defa tekrarlı ölçüm alındı.

Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ)

Teşhis limiti (LOD), numuneden tespitin muhtemel ve mümkün olduğu en düşük analit konsantrasyonudur. Miktar tayini limiti (LOQ) ise analite ait kesinlik, doğruluk ve doğrusallık parametrelerinin tespit edilebildiği en düşük konsantrasyon liimitidir. Bu parametrelerin hesaplanmasında, kalibrasyon grafiği çizilirken elde edilen doğrunun eğimine ait denklemden yararlanılır (ICH Q2) (Eşitlik 3-1 ve 3-2).

$$\text{Teşhis limiti} = \frac{3.3\delta}{S} \quad (\text{Eşitlik 3-1})$$

$$\text{Miktar Tayini Limiti} = \frac{10\delta}{S} \quad (\text{Eşitlik 3-2})$$

S : Ortalama eğim

δ : Standart sapma

Stabilite

Analitik yöntemde kullanılan çözeltilerin, validasyon çalışması süresince stabilitelerinin garanti altına alınmaları açısından belirli zaman aralıklarında tayin yapılması güvenilirlik açısından önem arz etmektedir (ICH Q2). Buna yönelik olarak LE'ın 4 µg/mL, 15 µg/mL ve 25 µg/mL çözeltileri hazırlanarak 2., 4., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde absorbansları ölçülüp stabiliteyi değerlendirildi.

3.2.2.2. HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini ve Miktar Tayininin Validasyonu

KLN, NLT ve NE'ların *in vivo* ve *ex vivo* Franz hücresinde gerçekleştirilen geçiş çalışmasında salım ortamı olarak gözün fizyolojik pH'ı ile uyum göstermesi ve benzer çalışmalarda kullanılması nedeniyle, pH 6.8 fosfat tampon çözeltisi kullanıldı (Seyfoddin ve Al-Kassas 2013; Zhu ve ark. 2018). Fosfat tampon çözeltisinin (0,05 M pH 6,8) hazırlanması için 2,5 g NaH₂PO₄, 2,523 g Na₂HPO₄ ve 8,2 g sodyum klorür önce 900 mL distile su içerisinde çözündürüldü. Gerekliyse hidroklorik asit (2N) ve/ veya sodyum

hidroksit (2N) kullanılarak pH ayarlaması yapıldıktan sonra 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı (Hu 2004).

Doğrusallık

Doğrusallık parametresini teyit etme amacıyla LE'nin 100 µg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti pH 6.8 fosfat tamponu çözeltisi ile seyreltilerek LE'nin 25 ng/mL, 50 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL, 1200 ng/mL, 2000 ng/mL, 3500 ng/mL ve 5000 ng/mL konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler 0,45 µm'lik PTFE filtrelerden süzüldü. Hazırlanan standart çözeltiler bölüm 3.2.1.3'te kullanılan HPLC koşullarında 6 kere çalışıldı. Çözeltilere ait kromatogramlar elde edilip, kromatogram altında kalan alan hesaplandı ve konsantrasyon- absorbens grafiği çizildi. Eğriye ait doğru denkleminin, r ve r^2 değerleri hesaplandı.

Doğrusallık parametresi için yapılan çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlara sahip çözeltiler, HPLC'deki çalışma aralığı olarak seçildi.

Doğruluk

LE'nin pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisindeki miktar tayini yönteminde 200 ng/mL, 1200 ng/mL ve 3500 ng/mL konsantrasyonlardaki 4 örnek analiz edildi. 6 defa tekrar edilen çalışmada sonuçlara ait doğruluğun tespiti % geri kazanma değerleri ile belirlendi.

Keskinlik

Keskinlik parametresi bölüm 3.2.2.1'de açıklandığı şekildedir. Gün içi keskinlik için 200 ng/mL, 1200 ng/mL ve 3500 ng/mL olacak şekilde 3 farklı çözelti hazırlanarak ölçümler alındı ve 6 kere tekrarlandı. Günler arası keskinlik için ise birinci gün yapılan çalışmanın tekrarı yapılarak RSD değerleri hesaplandı.

Seçicilik

Mobil fazın ve lipit nanotaşıyıcı formülasyonlara giren diğer bileşenlerin kromatogramlarında ortaya çıkabilecek piklerin LE'nin pikine etki edip etmediğinin tespit edilmesi amacıyla, etkin madde içeren, içermeyen formülasyonlar ve 1000 ng/mL LE çözeltisi distile su (1:20) ile seyreltildikten sonra 0,22 µm por açıklığına sahip PTFE filtreden süzülerek, HPLC kromatogramları elde edildi.

Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ)

Bölüm 3.2.2.1’de anlatıldığı gibi teşhis limiti (LOD) ve miktar tayini limiti (LOQ) tespit edildi.

Stabilite

Stabilite parametresinin sağlanması amacıyla pH 6.8 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan çözeltilerin (200 ng/mL, 1200 ng/mL ve 3500 ng/mL) 2., 4., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde absorbansları ölçülerek stabiliteleri değerlendirildi.

Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluğunun incelenmesi LE’nin 1000ng/mL konsantrasyonundaki çözeltisinin analizi ile gerçekleşti (n=6). HPLC analizinde tutulma zamanı (Rt), pik alanı ve pik yüksekliğinin % RSD cinsinden kesinliği ($RSD \leq 1\%$) hesaplandı. Pik ayrımı (Rs), kuyruklanma faktörü ve kapasite faktörü parametreleri de sistem uygunluk çalışmaları dahilinde incelendi.

3.2.3. Etkin Maddenin Çözünürlüğünün Tayini

LE yüklü KLN, NLT ve NE’larda yapılan *in vitro* ve *ex vivo* çalışmada salım ortamı olarak reseptör fazda pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisi, ilaç hapsetme kapasitesi tayini ve lipit çözünürlük çalışmaları sırasında da metanol kullanılmaktadır. Bu amaçla çözünürlük değerleri saf su dışında, pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisi ve metanol içerisinde de tespit edildi.

LE, 10 mL çözünme ortamına çözündüğünden daha fazla miktarda ilave edilerek yatay çalkalayıcıya konuldu. Erlenler yatay çalkalayıcı su banyosunda oda sıcaklığında (25 °C) 200 rpm çalkalama hızında 24 saat tutuldu. Erlenlerin içeriği 0,45 µm Politetrafloroetilen (PTFE) filtreden süzülerek, süzüntüden alınan 100 µL çözelti mobil faz ile 2mL’ye seyreltildi. Çözeltiden elde edilen LE miktarı Bölüm 3.2.1.3’de bahsedilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek çözünürlük tayini yapıldı. Çözünürlük çalışması 4'er defa tekrarlandı.

3.2.4. Ön Çalışmalar

KLN, NLT ve NE’larda kullanılacak olan katı ve sıvı lipitlerin seçimi lipit görüntüleme çalışması ile yapıldı. LE’nin flakonlarda katı lipitler ve sıvı lipitler ile 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 oranlarda karışımları hazırlandı. Çalışmada katı lipit olarak 1-

tetradecanol, Compritol® E ATO, Compritol® 888 ATO, Cutina® CP, Geleol™, Gelucire® 50/13, Imwitor® 491, Imwitor® 900 K, Lanette® 16, Nacol® 16-98, Preciol® ATO 5, setil palmitat, setostearil alkol, Softisan® 141 ve Softisan® 601 katı lipidler) kullanıldı. Sıvı lipid olarak hint yağı, isopropil miristat, kaprilik trigliserit, oleik asit, susam yağı ve zeytinyağı kullanıldı. Karışımlar 80 ± 1 °C sıcaklıkta bir gün boyunca bekletilerek 2., 4., 12. ve 24. saatlerde karışımlar bir lup altında incelendi (De Souza ve ark. 2011; Üner ve ark. 2019). İlaç kristalleri ya da bulanıklık gözlenen karışımlar elenerek LE'in homojen karışımlarının tespit edildiği lipidlerde çözünürlüğü tayin edildi. Bu amaçla, lipid ve ilaç karışımından 100 µL alınarak 2 mL metanolde çözündürüldü. Çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzöldükten sonra 1 mL alınarak 10 mL'lik balonjojede metanol ile hacmine tamamlandı. LE miktarı 280 nm'de UV spektroskopisi ile tayin edildi. (Pardeike ve ark. 2011)

Formülasyonlarda kullanılacak yüzey etkin maddeler (Cremephor® EL, Cremephor® RH40, Pluronic® F68, Labrasol®, Tween® 80 ve Pluronic® F127) ile aynı koşullar altında görüntüleme çalışması yapıldı. Bu amaçla, flakonlarda LE ve yüzey etkin maddelerin 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 oranlarda karışımı hazırlandı. İlaç kristalleri ya da bulanıklık gözlenen karışımlar elenerek LE'in homojen karışımlarının tespit edildiği yüzey etkin maddeler ile LE ile geçimli lipidler kullanılarak kaba emülsiyonlar hazırlandı. Kaba emülsiyonlar sırayla %4, %3 ve %93 (a/a) oranında lipid, yüzey etkin madde ve su ile hazırlandı. Bu amaçla, 80 °C'ye ısıtılan yüzey etkin maddenin sudaki çözeltisi aynı sıcaklıktaki lipide ilave edilerek 20000 rpm'de 45 saniye homojenize edildi. Elde edilen emülsiyonlar kıvamları ve faz ayrışma durumları göz önünde bulundurularak çalışmada denenecek yüzey etkin maddelerin seçimi yapıldı.

DoE yazılımı kullanılarak hazırlanacak formülasyonların oranlarının belirlenme aşamasından önce, ultrasonikasyon süresi ve amplitüt (genlik) gibi parametreleri saptandı. Lipit ve yüzey etkin madde görüntüleme çalışması sonrasında çalışılacak lipidler ve yüzey etkin madde ile emülsiyonlar hazırlandı. Bu amaçla emülsiyonlar 80 ± 5 °C'de % 60, %75 ve %90 amplitüt değerleri ve döngüler 3, 5 ve 7 olarak kullanılıp; süre olarak da 5, 7 ve 10 dakika denenerek sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan formülasyonlar flakonlara aktarılarak tıpalari sıkıca kapatıldı ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Bu formülasyonlardan 10 µL'lik örnekler 1:10 oranına seyreltilerek partikül/damlacık büyüklüğü tayin edildi.

3.2.5. KLN, NLT ve NE'ların DoE Yazılımı ile Tasarımı

Partikül/damlacık büyüklüğü 80-140 nm olan KLN, NLT ve NE formülasyonlarının hazırlanması için amaçlandı. Partikül büyüklüğünün yanı sıra formülasyonlarda zeta potansiyel ve ilaç tutma kapasitesi de bağımlı değişken olarak değerlendirildi. Buna yönelik olarak Design Expert® 13 yazılımı kullanılarak deney tasarımı yapıldı.

LE miktarı 5 mg/mL olacak şekilde yapılan DoE tasarımında, KLN formülasyonları için katı lipid olarak Precirol® ATO 5 ve yüzey etkin madde olarak Pluronic® F68; NLT formülasyonları için katı lipid olarak Precirol® ATO 5, sıvı lipid olarak oleik asit ve yüzey etkin madde olarak Pluronic® F68 ve nanoemülsiyon formülasyonları için sıvı lipid olarak oleik asit ve yüzey etkin madde olarak Pluronic® F68'in farklı konsantrasyonlarda kullanılması ile bağımlı değişkenler (başta partikül boyutu olmak üzere, polidispersite indeksleri, zeta potansiyeli ve ilaç hapsedme kapasitesi) üzerinde meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesi için DoE programına oranlar girildi (toplam lipid miktarı % 4 – 8 aralığı, su fazı (%1 oranında gliserol içeren) için %87 – 93 aralığı, yüzey etkin madde için % 3 – 5 aralığı). NLT formülasyonları için toplam lipidin 1/3 ü sıvı lipid olacak şekilde (%1.3-2.6) oranlar girildi.

Karışım (D-optimal, optimal dizayn) modeli kullanılarak yapılan dizayn sonucunda minimum deney serisi belirlenerek (toplam 45 adet, her taşıyıcı sistem için 15 adet), LE yağ faza ilave edilip 5mL metanol eklenerek fazın çözünmesi sağlandı. Organik solvanı uçurma amaçlı evaporasyon işlemi uygulandıktan sonra, yağ-etkin madde karışımı 80 °C'ye ısıtılarak üzerine yüzey etkin maddenin 80 °C'deki çözeltisi eklendi. 12000 rpm'de 10 dakika homojenizasyona maruz bırakılan karışım, emülsiyon haline geldikten sonra amplitüt %75 ve döngü 5 olarak girilip, 7 dakika ultrasonikasyon işlemine bırakıldı. Formülasyonlar hazırlanıp silanlanmış flakonlara aktarıldıktan sonra, tıpa ve parafilm ile sıkıca tepeleri kapatıldı.

Hazırlanan deney serilerine ait formülasyonların sıcaklığı oda sıcaklığına geldiğinde bağımlı değişkenlere (boyut, dağılım, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği) ait ölçümler yapılarak üç boyutlu tasarım alanı oluşturuldu. Ölçümler sonucunda, KLN, NLT ve NE'lara ait 1'er adet optimal formülasyon belirlendi.

3.2.6. KLN, NLT ve NE’larda Yapılan Tayinler

3.2.6.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini

Tasarımı tamamlanan KLN, NLT ve NE formülasyonları ve LE’in partikül/damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel üzerine etkisini incelemek amacıyla bu formülasyonların etkin madde yüklü olmayan formülasyonları 1:20 oranında distile su ile seyreltilerek, polistiren küvetlere koyuldu. Formülasyonların partikül/damlacık büyüklüğü ve dağılımlarının tayini DLS cihazı kullanılarak yapıldı (0,01 absorbans, 1,339 refraktif indeks) (Souto ve ark. 2004). Formülasyonlarda zeta potansiyel tayini aynı cihazın zetasizer modunda aynı şartlar altında elektrot küvet kullanılarak yapıldı. Her tayin 3 kez yapıldı.

3.2.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Formülasyonlara ait partiküller/damlacıkların morfolojik değerlendirmesinin yapılması amacıyla SEM kullanıldı. Liyofilizatörde kurutulan KLN, NLT ve NE formülasyonları, 30 saniye boyunca 10 nm kalınlığında altın ile kaplandı. Kaplı numuneler cihaza koyularak vakum altında ve 10 kV voltaj uygulanarak görüntülendi.

3.2.6.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Tayini

KLN, NLT ve NE formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitelerinin (YK) tayin edilmesi için formülasyonlardan 1 mL örnek alınarak 4300 rpm’de 20 dakika santrifüje tabi tutuldu. Bu işlemde nanopartiküller/damlacıklar çökerken, nanopartiküller/damlacıklarda tutulmayan serbest süzüntüde kalan LE miktarının tayini için süzüntüden 100 µL örnek alınarak eppendorf içerisine alındı ve metanol ile 2mL’ye tamamlanıp 1 dk vorteks ile homojenize edildikten sonra 280 nm’de UV spektroskopisi ile tayin yapıldı. Nanopartiküller ve damlacıklara yüklenmeyen ilaç miktarı toplam ilaç miktarından çıkarılarak yüklenen ilaç miktarı tespit edildi (De Souza ve ark. 2011; Hirani ve ark. 2014). Bu tayin üç kez tekrar edildi.

KLN, NLT ve NE formülasyonlarına yüklenen etkin madde miktarı hesaplandıktan sonra EE ve YK değerleri Eşitlik 3-9 ve 3-10 kullanılarak hesaplandı.

$$EE (\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3-9})$$

$$YK (\%) = \frac{A}{B+C} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3-10})$$

A: Nanopartilüller/damlacıklara yüklenen etkin madde miktarı

B: KLN, NLT ve NE'lar hazırlanmasında kullanılan etkin madde miktarı

C: KLN, NLT ve NE'lar hazırlanmasında kullanılan toplam lipid miktarı

3.2.6.4. DSC Analizi

Formülasyonlar otomatik pipetler ile alüminyum tavalara (8-10 mg lipid içeriğine denk olacak şekilde) aktarıldı. Analiz 10 °C/dk sıcaklık artışı hızı ile 20 °C – 300 °C sıcaklık akışı altında değerlendirildi. Referans olarak, boş alüminyum tavalarda kullanıldı. Numunelere ait termogramlar 20 mL/dk azot akış hızında elde edildi. Termogramlarda elde edilen pikler ile formülasyonlardaki katı lipidin erime derecesi ve erime entalpisi tayin edildi. Bölüm 2.4.2.4.'de anlatılan Gibbs-Thomson eşitliği (Eşitlik 2-4) kullanılarak formülasyonlardaki katı lipidin kristalizasyon derecesi hesaplandı (Üner 2016). Çalışma her formülasyon için 3 kez tekrar edildi.

3.2.6.5. FT-IR Analizi

Liyofilize edilen formülasyonlar 500 mg susuz potasyum bromür ile kuvartz havanda karıştırıldı. Toz karışıma 150 N kuvvet uygulanarak tabletler basıldı. Tabletler, FT-IR spektrofotometre de 4000 – 400 cm⁻¹ dalga boyu arasında, % transmisyon modunda çalışılarak spektrumları alındı.

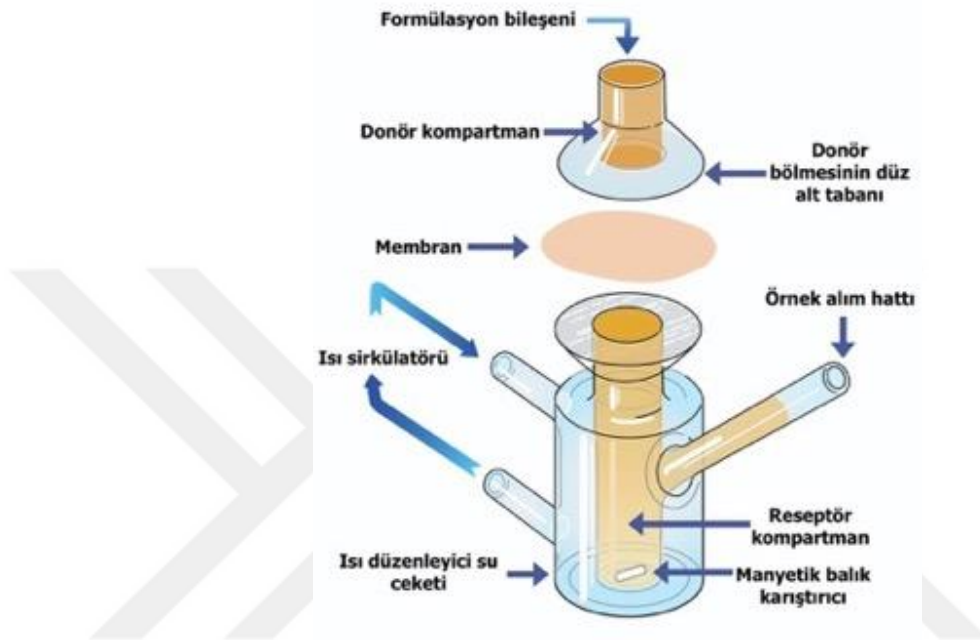
3.2.6.6. Viskozite ve pH Analizi

Formülasyonların viskoziteleri cihazın küvetine aktarıldıktan sonra 100 cm⁻¹ kayma hızına sahip viskozimetrede 7 numaralı mil kullanılarak üçer defa tekrarlanacak şekilde gerçekleşti. Formülasyonların pH ölçümleri ise formülasyonlar 10 mL'lik beherlere aktarıldıktan sonra, dijital pH metre yardımıyla üçer defa tekrarlanacak şekilde tamamlandı.

3.2.6.7. *In vitro* Salım Çalışması

KLN, NLT ve NE formülasyonlarına ait *in vitro* salım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Franz difüzyon hücresi (Şekil 3-1) kullanılarak salım çalışması yapıldı. 2,88 cm² difüzyon alanına ve 20 mL alıcı faz hacmine sahip Franz hücrelerinin kullanıldığı

çalışmada, yapay membran olarak selüloz asetat membran ve alıcı faz olarak fosfat tamponu (pH 6.8) kullanıldı. Alıcı faza geçen etkin maddenin homojen dağılmasını sağlamak amacıyla, manyetik karıştırıcı 200 rpm'de çalıştırıldı (Wagh ve ark. 2014). Formülasyonlar eklenmeden önce reseptör ortamda herhangi bir kabarcık varsa enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı.



Şekil 3-1: Franz difüzyon hücresi

Franz difüzyon hücrelerinin verici faz bölümüne otomatik pipet yardımıyla 2 mL numune kondu. KLN, NLT ve NE formülasyonları ile birlikte kontrol amacıyla LE'nin %0,5'lik (a/a) karboksi metil selülozun sulu çözeltisindeki %0,5'lik (5 mg/ml) çözeltisi hazırlandı. Ayrıca, LE'nin bir piyasa preparatı da kontrol amacıyla çalışmaya eklendi. Çalışma $37 \pm 0,5$ °C'de yürütüldü. Franz difüzyon hücrelerinin alıcı fazından 0,25., 0,5., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. saatlerde 0,7 mL örnek alındı ve deney sırasında sink koşulunun sağlanmasına dikkat edilerek alınan örnekler kadar geriye alıcı faz ilavesi yapıldı. Toplanan örnekler 0,45 µm por açıklığına sahip filtreden geçirildikten sonra Bölüm 3.2.1.3'te anlatılan yönteme göre HPLC ile LE'nin miktar tayini yapıldı. Çalışma her formülasyon için 6 kez tekrar edildi.

Çalışma esnasında toplanan veriler ile formülasyonların salım profilleri elde edildi. Salım kinetikleri 0. derece, 1. derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas eşitlikleri kullanılarak değerlendirildi.

Difüzyon alanından geçen etkin madde miktarının zamana karşı grafiği çizilerek, doğrunun eğiminden denge durumundaki akı değeri (J_{ss}) hesaplandı. Bu değer alıcı ve reseptör faz arasındaki etkin madde farkına bölünmesi ile geçirgenlik katsayısı (P) elde edildi (Eşitlik 3-11) (Fangueiro ve ark. 2016).

$$J_{ss} = P (C_0 - C) \quad (\text{Eşitlik 3-11})$$

J_{ss} : Denge durumundaki akı ($\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{saat}$)

P : Geçirgenlik katsayısı (cm/saat)

C_0 : Reseptör fazdaki ilaç konsantrasyonu (mg/cm^3)

C : Donör fazdaki ilaç konsantrasyonu (mg/cm^3)

3.2.6.8. *Ex vivo* Korneadan Geçiş Çalışması

Hazırlanan KLN, NLT ve NE formülasyonlarının korneadan geçişlerinin tayininde dana gözüne ait kornealar kullanıldı. Korneal eksizyon aşamasına kadar -20°C 'de muhafaza edilen gözler, kesim yapılacak gün öncesi $+5^\circ\text{C}$ 'ye bırakıldı.

Korneal eksizyon işlemi, korneanın zarar görmeyeceği şekilde makas ve pens yardımıyla gerçekleştirildi. Kornealar çıkarıldıktan sonra fosfat tamponu ($\text{pH } 6.8$) içeren 50 mL 'lik eppendorf tüplerin içerisine alındı. Bütün korneaların çapları (30 adet) bir kumpas yardımıyla ölçüldü (Kompella ve ark. 2006).

Kornealar ile yapılan geçiş çalışmasında, Bölüm 3.2.6.6'da bahsedilen çalışma koşullarında Franz hücreleri ve reseptör ortamı kullanıldı (Şekil 3-1) ($n=3$). KLN, NLT ve NE formülasyonları ile birlikte kontrol amacıyla LE'nin $\%0,5$ 'lik (a/a) karboksi metil selülozun sulu çözeltisindeki $\%5$ 'lik (5 mg/mL) çözeltisi hazırlandı. Ayrıca, LE'nin bir piyasa ürünü de kontrol amacıyla çalışmaya eklendi. Belirlenen zaman aralıklarında (0,25., 0,5., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. saat) reseptör fazdan $0,7$ 'şer mL örnek alındı.

Ardından alınan hacimde ve sıcaklıkta reseptör faz sink koşulunu sağlamak amacıyla Franz difüzyon hücresine eklendi. Alınan örnekler 0,45 µm filtreden geçirildikten sonra Bölüm 3.2.1.3'te anlatılan yöntemle göre HPLC' de LE'in miktar tayini yapılarak, determinasyon katsayısı, salım kinetiği, akı (Jss) ve P (permeasyon katsayısı) değeri hesaplandı (Eşitlik 3-11) (Fangueiro ve ark. 2016).

3.2.6.9. İlaç Salım Kinetiklerinin Tayini

Kinetik modellerin tayin edilmesinde, ilaç salım profilini tanımlayan farklı matematiksel modeller kullanılmaktadır. Uygun bir fonksiyon seçildikten sonra, türetilmiş model parametrelerine bağlı olarak ilaç salım profilleri değerlendirilmektedir (Arhewoh ve ark. 2004). In vitro ve ex vivo çalışma sonucunda elde edilen zamana karşı etkin madde konsantrasyonlarının, her salım kinetiğine ait kendi eşitlikleri kullanılarak r^2 değerleri hesaplandı. Bu şekilde hangi salım kinetiğine girdiği tespit edildi.

Sıfırıncı Derece Salım Kinetiği

Etkin maddenin nanopartiküler sistemden salımı sabittir ve ilaç salımı ortamdaki etkin madde miktarına bağımlı olmadan yürür (Eşitlik 3-3) (Dashi ve ark. 2010; Bruschi 2015).

$$C_t = C_0 - k_0 t \quad (\text{Eşitlik 3-3})$$

C_t : t zamanındaki etkin madde miktarı

C_0 : Başlangıç anındaki etkin madde miktarı

k_0 : Sıfırıncı derece kinetik sabiti (% mg/saat)

t : Zaman (saat)

Birinci Derece Salım Kinetiği

Zamana bağlı olarak etkin madde salımının üssel olarak değişmesiyle karakterize kinetik salım modelidir (Eşitlik 3-4) (Dashi ve ark. 2010).

$$\log C_t = \log C_0 + (k_1 t / 2,303) \quad (\text{Eşitlik 3-4})$$

C_t : t zamanındaki etkin madde miktarı

C_0 : Başlangıç anındaki etkin madde miktarı

k_1 : Birinci derece kinetik sabiti (saat⁻¹)

t : Zaman (saat)

Higuchi Salım Kinetiği

Etkin maddenin kontrollü salımının yapıldığı matrik sistemler için, matematiksel olarak Higuchi kinetiği salım hızını iki şekilde açıklamıştır (Eşitlik 3-4 - 3-6) (Higuchi 1961).

Homojen matrikse sahip sistemlerde,

$$Q = \sqrt{D(2C - C_s) C_s t} \quad (\text{Eşitlik 3-4})$$

Heterojen matrikse sahip sistemlerde,

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau} (2C - \varepsilon C_s) C_s t} \quad (\text{Eşitlik 3-5})$$

Sadeleştirilmiş Higuchi salım kinetiği,

$$Q = k_h \sqrt{t} \quad (\text{Eşitlik 3-6})$$

Q : Birim yüzeyden t zamanda salınan etkin madde konsantrasyonu

D : Difüzyon katsayısı

C : Salım öncesi dozaj şeklindeki etkin madde miktarı

C_s : Matriks ortamında etkin maddenin çözünürlüğü

ε : Matriks porozitesi

- τ : Matriksin bükümlülük katsayısı
- t : Zaman (saat)
- k_h : Higuchi salım hızı sabiti

Hixson - Crowell Salım Kinetiği

Hixson - Crowell salım kinetiğinde ilacın salımı, ilacın çözünme hızı ile orantılı olarak gerçekleşir. Bu kinetikte, dozaj şeklinden ilaç salımı sırasında yüzey alanı azalırken, dozaj şeklinin yapısı (geometrik olarak) korunmaktadır (Eşitlik 3-7) (Hixson ve Crowell 1931; Dashi ve ark. 2010).

$$\sqrt[3]{W_0} = \sqrt[3]{W_t} + k_{hc}t \quad (\text{Eşitlik 3-7})$$

- W_0 : Başlangıç anındaki etkin madde konsantrasyonu
- W_t : t anında salım yapılan etkin madde konsantrasyonu
- k_{hc} : Hixson - Crowell salım sabiti
- t : Zaman (saat)

Korsmeyer-Peppas Salım Kinetiği

Matriks sistemlerden ilaç salımı sırasında hem aşınma yoluyla hem de hidrasyonla şişme sonucu ilaç salımı yapan sistemlerin kinetik modellerinin açıklanmasında yetersiz kalındığında, Korsmeyer - Peppas eşitliğinden yararlanılmaktadır (Eşitlik 3-8) (Korsmeyer ve ark. 1983). Eşitlikte yer alan üs değeri (n), farklı salım mekanizmalarını karakterize etmek için kullanılmaktadır. Elde edilen n değeri 0,45'e eşit veya daha küçük ise ($n \leq 0,45$) sistemin Fick yasasına göre (case I) difüzyon ile ilaç salımı yaptığını açıklarken, n değerinin 0,45 ile 0,85 arasında olması ($0,45 \leq n \leq 0,85$) Fick yasasına uygun olmayan (anomalous, non-Fickian) ilaç salımı yaptığını işaret etmektedir (Korsmeyer ve ark. 1983; Özdemir ve ark. 2018). Bunun yanı sıra n değerinin 0.85 ile 1 aralığında olduğu durumda ($0,85 \leq n \leq 1,00$) case II transport mekanizması ile salım yapıldığı anlaşılırken, n değerinin 1'den büyük olduğu durumda ($n > 1,00$) supercase II transport mekanizması ile salım yapıldığı anlaşılmaktadır. Case II

transport genellikle çözücünün yüksek aktiviteye sahip olduğu, polimer/ çözücü sistemlerde sıklıkla görülür; supercase II transport genellikle hidrofilik polimer oranının yüksek olduğu silindirik matriks tabletlerde daha sık görülmektedir (Costa ve Lobo 2001; Meka ve ark. 2008).

$$\frac{M_t}{M} = k_{kp} t^n \quad (\text{Eşitlik 3-8})$$

M_t : t anındaki. salım yapılan etkin madde miktarı

M : Başlangıçtaki etkin madde miktarı

k_{kp} : Korsmeyer - Peppas salım sabiti

t : Zaman (saat)

n : İlaç salımına bağlı katsayı

3.2.6.10. Bant Sıyırma Testi ve Korneada İlaç Tutma Tayini

Ex vivo salım çalışması sonrasında kornealar bant sıyırma testi yapılmak üzere beyaz strafor köpükler üzerine alınarak iğnelendi. Korneaların yüzey nemi pamuk yardımıyla 3 saniye hafifçe bastırılarak alındı ve 2,2 mm x 2,2 mm boyutunda kesilen yapıştırıcı bant parçaları kornea yüzeyine yapıştırılarak çekildi. İlk yapıştırılıp çekilen bant çalışma dışı bırakıldı. On beş adet bant hazırlanan 10 mL asetonitril:fosfat tamponu (pH 6.8) (70:30, h:h) içeren beher içerisine alındıktan sonra bir yatay çalkalayıcıda 130 rpm hızda karıştırılarak oda sıcaklığında 1 gün bekletildi. Ertesi gün bantlar 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü ve süzütünün çözücüsü rota evaporatörde uçuruldu. Elde edilen bakiye 2mL fosfat tamponunda (pH6.8) çözündürüldükten sonra, 5 dakika boyunca vorteks ile homojenize edildi (Houston ve ark. 2017; Fishman ve ark. 2020). Çözelti 0,45 µm açıklığa sahip membran filtreden geçirilerek Bölüm 3.2.1.3’de belirtilen HPLC yöntemiyle etkin madde miktar tayini yapıldı.

Bant sıyırma çalışması sonrası homojenize etmek için kornealar küçük parçalara ayrılarak 10 mL asetonitril:fosfat tamponu (pH 6.8) (70:30, h:h) içeren doku homojenizatör tüpüne konuldu. Yedi numaralı prob kullanılarak 45 saniye 10.000 rpm

homojenizasyon 15 saniye bekleme süresi olacak şekilde 3 döngü olarak tekrarlandı. Doku homojenizasyonu sonrası 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilen dispersiyon 10 dakika 4500 rpm’de santrifüj edildi. Süzüntüden 1 mL alınarak Bölüm 3.2.1.3’de tarif edilen HPLC yöntemiyle etkin madde miktar tayini yapıldı (Raposo ve ark. 2015; Heikkinen ve ark. 2018).

3.2.6.11. Korneaların Histopatolojik Açıdan İncelenmesi

Formülasyonların zararlılığını araştırmak amacıyla formülasyonlarla muamele edilen korneaların histopatolojik incelenmesi Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yapıldı. Bu amaçla, çıkartılan kornealar 6 cm çapındaki petri kutularına alındı. Kornealar ayrı petri kutularında KLN, NLT, NE formülasyonları ve piyasa preparatı ile muamele edildi. Petri kutuları 1 saat boyunca üstü kapatılarak 35 °C’de etüve bırakıldı. Sürenin sonunda fosfat tamponu (pH 6.8) ile yıkanan kornealar ile kontrol grubu olan kornealar, içerisinde fiksator (%10’luk formaldehit solüsyonu) bulunan 50 mL’lik kapaklı tüplere alınarak 24 saat bekletildi (Mittal ve Kaur 2019). Kornealar fiksatorde bekletildikten sonra şeffaflaştırılmak üzere ksilen ile muamele edildi. Bu işlem sonrasında sıvı parafin içerisinde konulan kornealar 5 saat boyunca 60 °C ’de inkübe edildi. Blok haline getirilmiş dokulardan mikrotom yardımı ile 5 µm’lik kesitler alınarak parafinin dokulardan uzaklaştırılması için dokular ksilen ile tekrar muamele edildi. Sırayla %99,6, %90, %80 ve %70’lik (h/h) etanol ve distile su ile yıkandı. Dokular morfolojik analiz için sırasıyla nükleus hematoksin ve sitoplazma eosin ile boyandı. Boyanın fazlasının uzaklaştırılması için doku kesiti sırayla %70, %80, %90 ve %99,6’lık etanol ile yıkanarak 20 dakika 60 °C’de ksilende bekletildi. Ksilen ile muamele edilen lam kornea dokuları konulduktan sonra, lamel ile kapatılarak floresan mikroskop altında incelendi (Li ve ark. 2019; Mittal ve Kaur 2019). Bu çalışma her formülasyon için 3 kez tekrar edildi.

3.2.6.12. Stabilité Çalışmaları

KLN, NLT ve NE’ların stabilitesi 5 °C, 25 °C (%60 BN ± %5) ve 40 °C’ de (%75 BN ± %5) iklimlendirme kabinlerinde (karanlıkta) bekletilerek tayin edildi. Silanlanmış flakonlarda bekletilen formülasyonlardan 0., 7., 14., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. günlerde örnekler alınarak pH, viskozite, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği tayin edildi (Özdemir ve ark. 2018; Üner ve ark. 2019). Sıfırncı, 90. ve 180. günlerde nanopartiküllerdeki katı lipidin termal davranışlarının ve

kristalizasyon derecesinin tayini için DSC cihazı kullanıldı. Formülasyonların 0. gün ve 6. ay SEM görüntüleri alındı.

3.2.7. İstatiksel Analizler

Çalışmalardan elde edilen analiz ve deney bulguları, GraphPad Prism 8.0.2 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile anlamlılık derecesi (p) 0,05 kabul edilerek istatiksel olarak değerlendirildi.

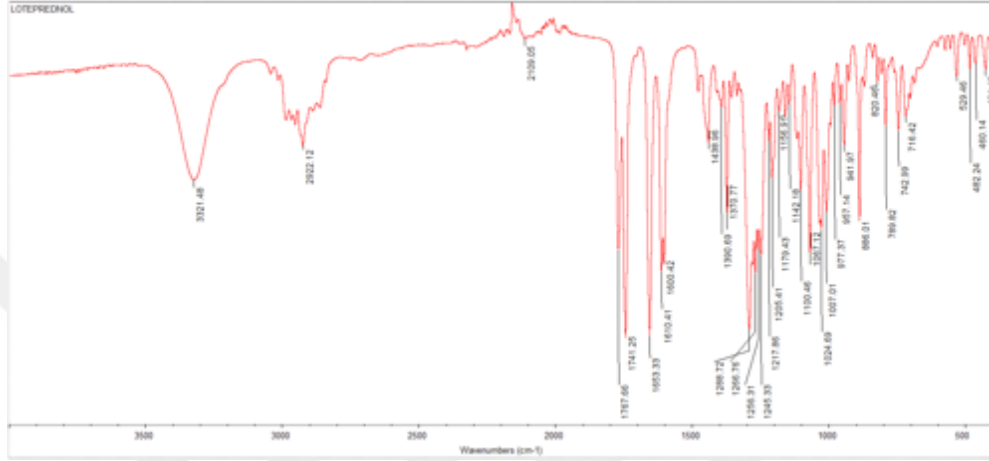


4. BULGULAR

4.1. LE Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

4.1.1. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

Bölüm 3.2.1.1'de açıklandığı şekilde LE'nin FT-IR spektrumu alındı (Şekil 4-1).



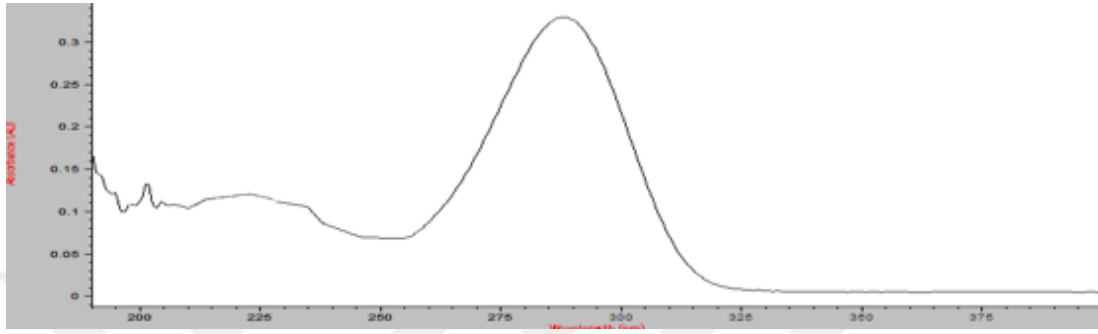
Şekil 4-1: LE'nin FT-IR spektrumu

LE'nin FT-IR spektrumunda elde edilen transmisyon bantları;

3321,48 cm ⁻¹	: -OH grubu gerilme bandı
2921,11 cm ⁻¹	: Aromatik C-H gerilme bandı
2109,05 cm ⁻¹	: Alifatik C-H gerilme bandı
1767,66 cm ⁻¹	: 17β -karboksilat C=O gerilme bandı
1741,25 cm ⁻¹	: Aromatik C=O gerilme bandı
1653,33 - 1600,42 cm ⁻¹	: Asetil C-O gerilme bandı
1438,96 cm ⁻¹	: Asimetrik -CH ₂ grubuna ait gerilme bandı
1390,69 - 1370,77 cm ⁻¹	: Alifatik C-O gerilme bandı

4.1.2. UV Spektrumu

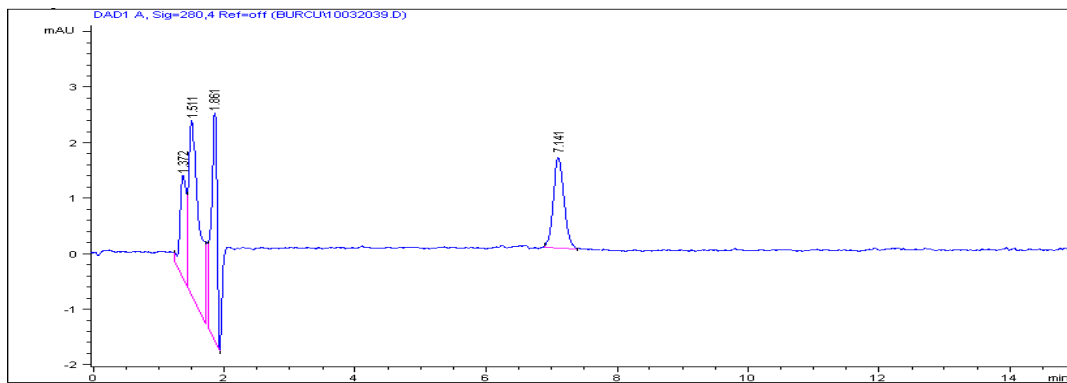
LE'a ait UV spektrumunun analizinde bölüm 3.2.1.2'de bahsedilen metod kullanıldı. UV spektrumunda LE'nin en yüksek pik verdiği nokta 280 nm olarak tespit edildi. (Şekil 4-2)



Şekil 4-2: LE'ye ait spektrogram

4.1.3. HPLC Analizine Ait Bulgular

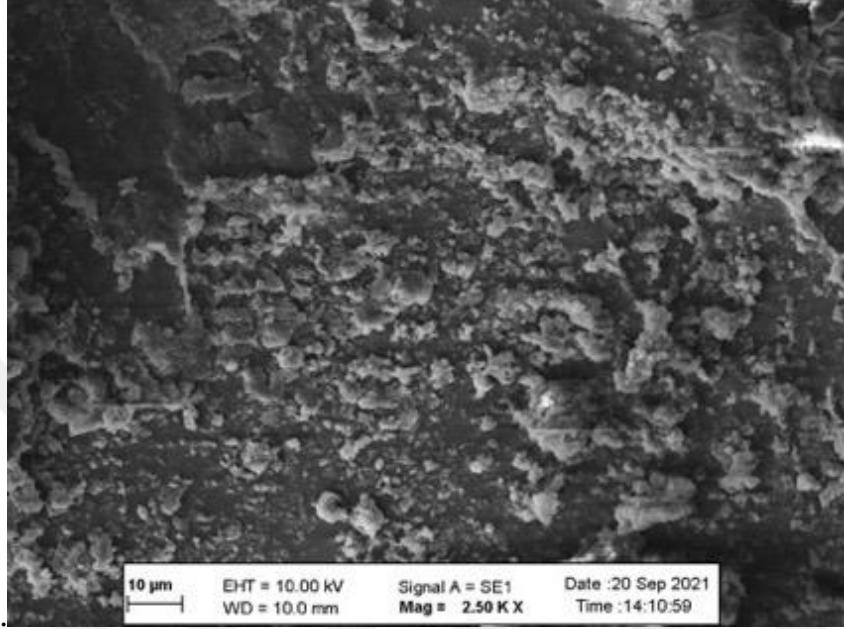
LE'in HPLC kromatogramı Bölüm 3.2.2'de anlatılan yöntemle göre yapılan çalışmalarda elde edildi (Şekil 4-3). Kromatogramda LE'nin mobil fazdaki 1 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin verdiği pik alanının $135205 \pm 788,345$, maddenin tutulma zamanının $7,14 \pm 0,03$ dakika olduğu tespit edildi.



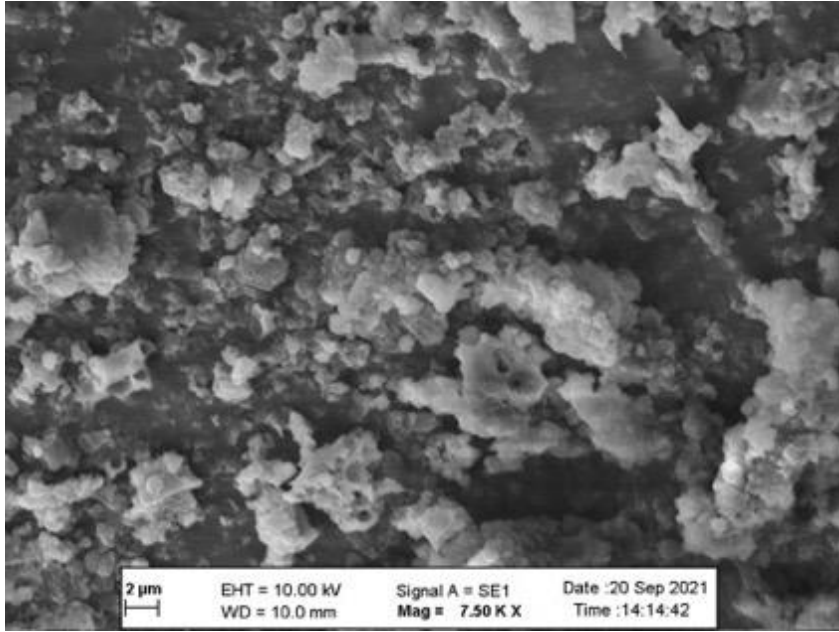
Şekil 4-3: LE'nin HPLC kromatogramı

4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizine Ait Bulgular

LE'nin morfolojik olarak incelenmesi Bölüm 3.2.1.4'de anlatıldığı şekilde yapıldı (Şekil 4-4 ve 4-5).



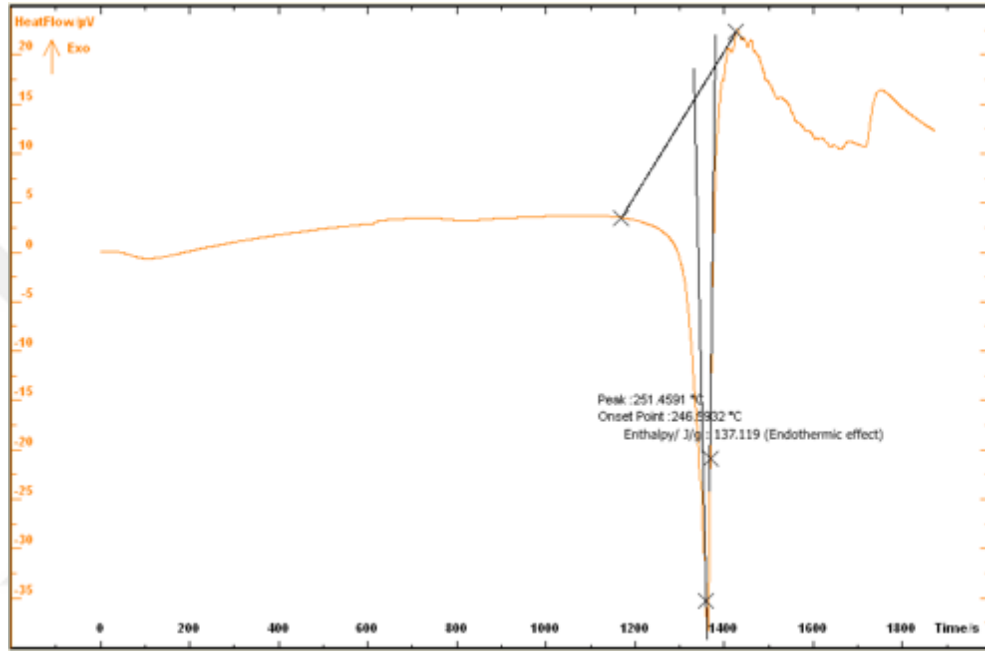
Şekil 4-4: LE'nin SEM görüntüsü (2500x büyütme)



Şekil 4-5: LE'nin SEM görüntüsü (7500x büyütme)

4.1.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.5'de bahsedildiği gibi gerçekleştirilen çalışma sonucunda LE'a ait DSC termogramı elde edildi (Şekil 4-6). LE'nin erimeye başladığı sıcaklığın 246,59 °C olduğu ve erime derecesinin 251,46 °C olduğu belirlenirken, erime entalpisi de 137,12 J/g olarak ölçüldü.



Şekil 4-6: LE'a ait DSC termogramı

4.2. LE'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Validasyonuna Ait Bulgular

4.2.1. UV Spektroskopisi Yöntemi ile Miktar Tayini ve Miktar Tayinin Validasyonuna Ait Bulgular

Doğrusallık

LE'nin Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan çözeltiler yardımıyla kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 4-7). Kalibrasyon doğrusu çizilirken elde edilen ortalama absorbans, standart sapma (SD) ve rölatif standart sapma (%RSD) değerleri tabloda gösterilmektedir (Tablo 4-1).

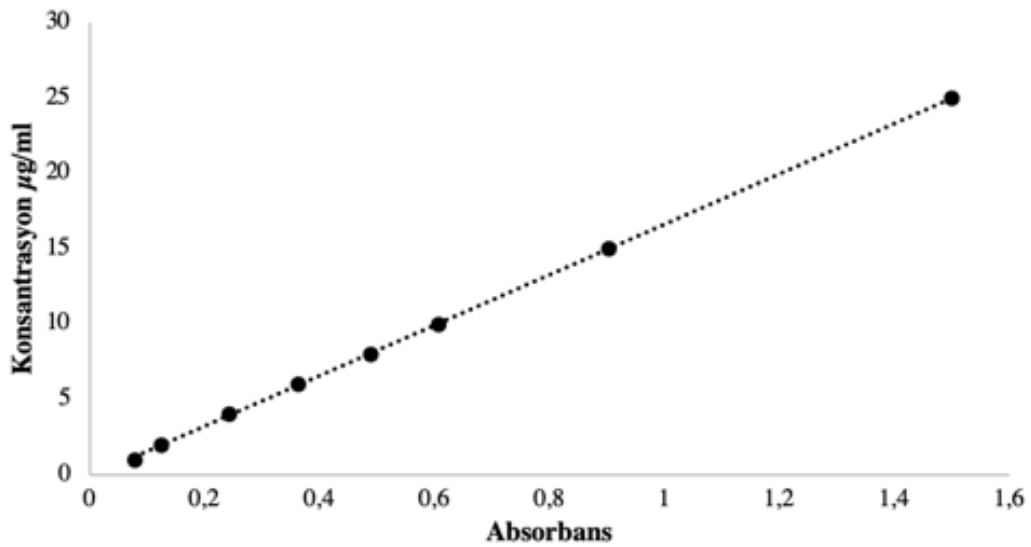
Tablo 4-1: LE'in metanol içerisinde UV spektroskopisi yöntemi ile çizilen standart eğrisine ait bulgular (n=6)

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans	SD (±)	RSD (%)
1	0,079	0,001	1,277
2	0,124	0,002	1,613
4	0,242	0,002	0,826
6	0,362	0,005	1,381
8	0,489	0,004	0,817
10	0,607	0,009	1,483
15	0,904	0,005	0,553
25	1,501	0,008	0,533

Kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı;

$$y=16,764x - 0,1566 \quad r^2: 0,9992$$

y: konsantrasyon (µg/ml) x: absorbans r^2 : determinasyon katsayısı



Şekil 4-7: LE'in UV spektroskopisi ile çizilen kalibrasyon eğrisi

Doğruluk

LE'ın metanol ile yapılan miktar tayini yönteminin doğruluğunun tespiti Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Belirlenen konsantrasyonlar için bağıl standart sapma ve standart sapma değerleri hesaplanıp, % geri kazanım şeklinde ifade edildi (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: LE'ın UV spektroskopisi ile yapılan doğruluğuna ait bulgular (n=6)

Konsantrasyon (µg/ml)	Geri Kazanma (µg/ml)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	RSD (%)
4	4,039	100,975	0,066	1,634
15	15,067	100,446	0,073	0,485
25	25,233	100,932	0,096	0,380

Kesinlik

LE'ın metanol içerisinde yapılan miktar tayini yöntemine ait kesinliğinin bulguları Bölüm 3.2.2.1'de anlatılan yöntem kullanılarak yapıldı. Çalışma sonrası gün içi bulgular Tablo 4-3'te, günler arası çalışmaya ait bulgular Tablo 4-4'te gösterilmektedir.

Tablo 4-3: LE'ın UV spektroskopisi ile yapılan gün içi kesinliğine ait bulgular (n=6)

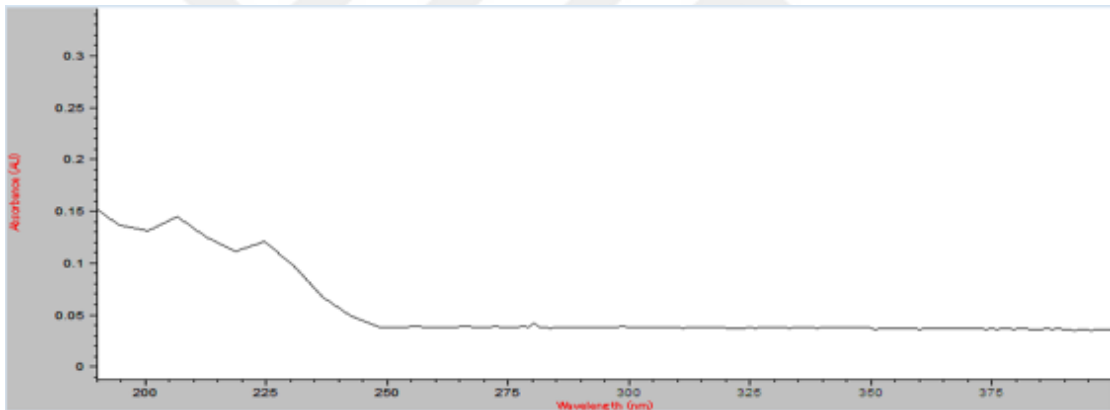
Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	SD (±)	RSD (%)
4	0,247	0,002	0,809
15	0,899	0,006	0,667
25	1,506	0,011	0,449

Tablo 4-4: LE'in UV spektroskopisi ile yapılan günler arası kesinliğine ait bulgular (n=6)

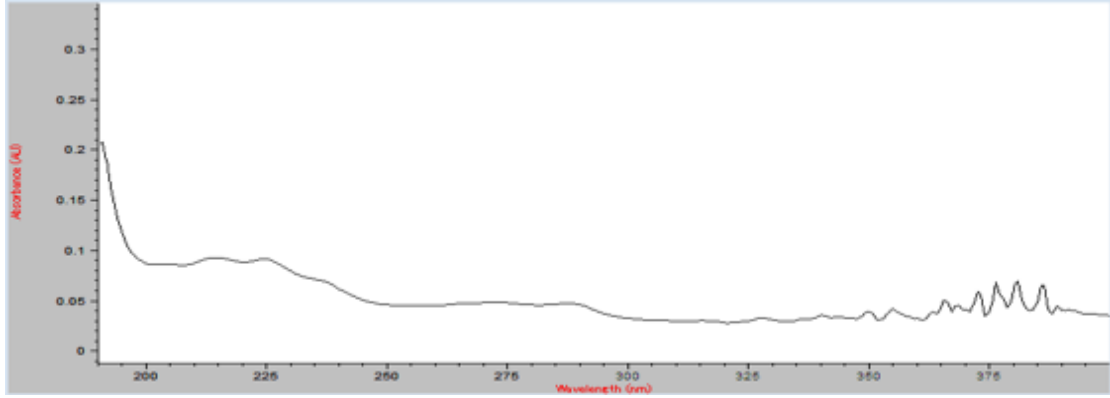
Konsantrasyon (µg/ml)	1. gün	2. gün	3. gün	Ortalama Absorbans	SD (±)	RSD (%)
4	0,242	0,246	0,242	0,244	0,002	0,819
15	0,903	0,899	0,904	0,902	0,007	0,776
25	1,506	1,501	1,511	1,506	0,005	0,332

Seçicilik

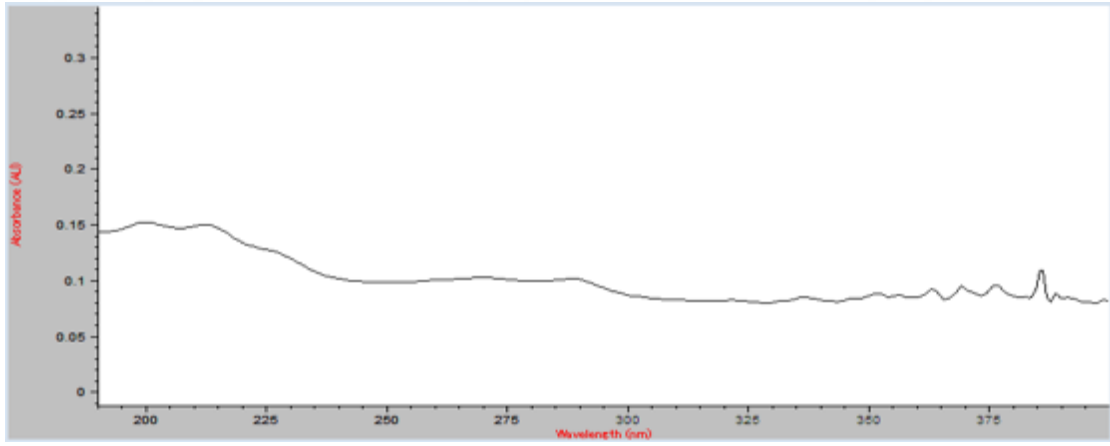
Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda mobil fazın 280 nm dalga boyunda absorbans göstermediği tespit edildi (Şekil 4-8).

**Şekil 4-8: Mobil fazın UV spektrumu**

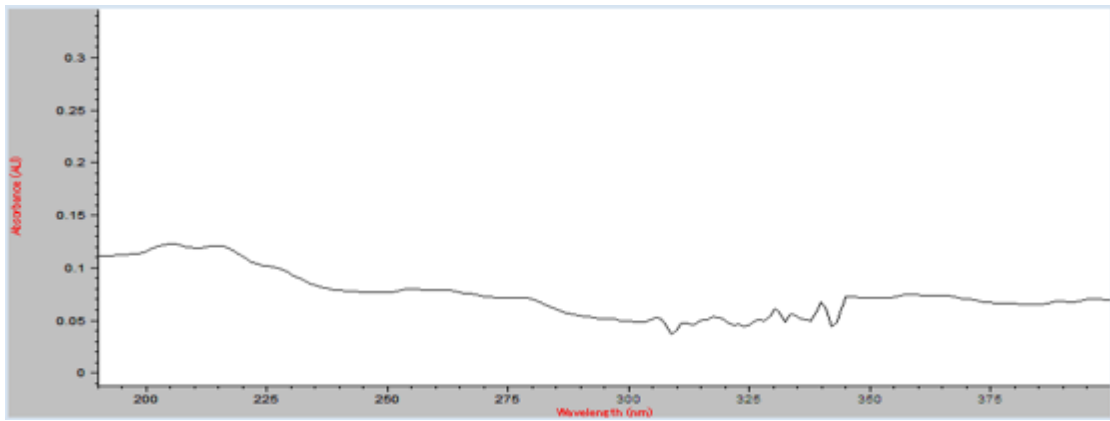
Bölüm 3.2.2.1'de bahsedildiği gibi yapılan çalışmada formülasyonlara giren diğer bileşenlerin 280 nm dalga boyunda absorbans göstermediği tespit edildi (Şekil 4-9 - 4-11).



Şekil 4-9: Boş-KLN505 formülasyonuna ait UV spektrumu



Şekil 4-10: Boş-NLT532 formülasyonuna UV spektrumu



Şekil 4-11: Boş-NE550 formülasyonuna ait UV spektrumu

Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ)

LE'nin LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için Bölüm 3.2.2.1'de bahsedilen yöntem kullanılarak, teşhis limiti 0,0507 µg/ml ve miktar tayini limiti 0,1690 µg/ml olarak tayin edildi.

Stabilite

Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi LE'nin metanol içerisinde 48 saat boyunca stabilitesi incelendi. Elde edilen analiz sonuçlarının %RSD değerlerinin % 2 nin altında olmasından dolayı LE'nin 48 saat boyunca stabil olduğu tespit edildi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: LE'nin metanol içerisindeki stabilitesine ait bulgular

Konsantrasyon (µg/ml)	2. saat	4. saat	6. saat	12.saat	24.saat	48.saat	RSD (%)
4	4,083	4,027	4,055	4,027	4,049	4,082	0,617
15	15,029	15,103	15,094	15,018	15,101	15,077	0,252
25	25,101	25,088	25,114	25,096	25,102	25,033	0,166

4.2.2. HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini ve Miktar Tayininin Validasyonuna Ait Bulgular

Doğrusallık

LE'nin Bölüm 3.2.2.2.'de şekilde belirtilen konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 4-12). Kalibrasyon doğrusu çizilirken elde edilen ortalama pik alanları, standart sapma (SD) ve rölatif standart sapma (%RSD) değerleri tabloda gösterilmektedir (Tablo 4-6).

Kalibrasyon eğrisine ait doğru denklemi ve determinasyon katsayısı;

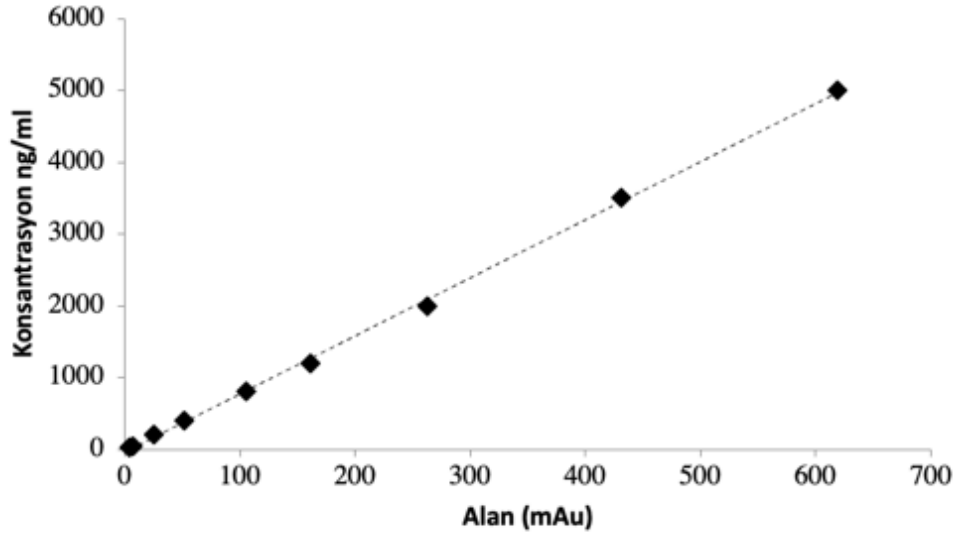
$$y=8,0897x -32,68$$

$$r^2: 0,9992$$

y: konsantrasyon (ng/ml)

x: pik alanı

r^2 : determinasyon katsayısı



Şekil 4-12: LE'nin HPLC yöntemi ile çizilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 4-6: LE'nin pH 6.8 fosfat tamponunda HPLC yöntemi ile doğrusalılığına ait bulgular (n=6)

Konsantrasyon (ng/ml)	Ortalama Pik Alanı	SD (±)	RSD (%)
25	3314	7,925	0,239
50	6417	19,541	0,305
200	25018	74,616	0,298
400	51569	93,207	0,181
800	105288	395,562	0,376
1200	161045	801,019	0,497
2000	262318	1492,735	0,569
3500	430668	1726,347	0,401
5000	619326	1912,908	0,309

Doğruluk

Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi pH 6.8 fosfat tamponu kullanılarak LE'nin miktar tayini yönteminin doğruluğunun tespiti yapıldı. Belirlenen konsantrasyonlar için bağıl standart sapma ve standart sapma değerleri hesaplanıp, % geri kazanım şeklinde ifade edildi (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: LE'nin HPLC yöntemi ile yapılan doğruluk çalışmasına ait sonuçlar (n=6)

Konsantrasyon (ng/ml)	Geri Kazanma (ng/ml)	Geri Kazanma (%)	SD (±)	RSD (%)
200	207,313	103,657	2,205	1,064
1200	1205,261	100,438	9,329	0,774
3500	3523,510	100,672	10,037	0,285

Keskinlik

Bölüm 3.2.2.2'de anlatılan yöntem kullanılarak LE'nin pH 6.8 fosfat tamponu ile yapılan miktar tayini yönteminin keskinliğine ait bulgular tespit edildi. Çalışma sonrası gün içi bulgular Tablo 4-8'te, günler arası çalışmaya ait bulgular Tablo 4-9'da gösterilmektedir.

Tablo 4-8: LE'nin HPLC yöntemi ile gün içi keskinlik çalışmasına ait sonuçlar (n=6)

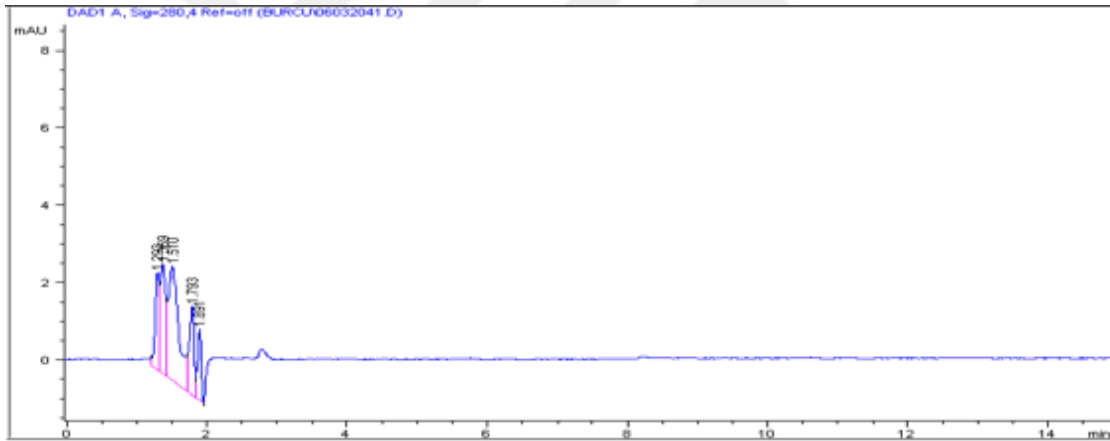
Konsantrasyon (ng/ml)	Pik Alanı Ortalaması	SD (±)	RSD (%)
200	25325	121,303	0,479
1200	167379	999,121	0,597
3500	428079	1902,053	0,444

Tablo 4-9: LE'in HPLC yöntemi ile günler arası kesinlik çalışmasına ait sonuçlar (n=6)

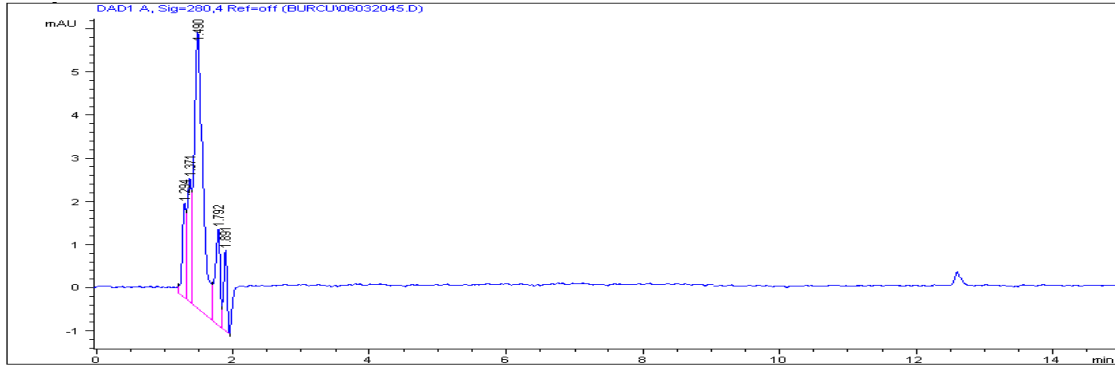
Konsantrasyon (ng/ml)	1. gün	2. gün	3. gün	Pik Alanı Ortalaması	SD (±)	RSD (%)
200	24683	25249	24566	24832	365,270	1,461
1200	165744	163325	162036	163701	1882,478	1,149
3500	425960	429217	431814	428997	2933,194	0,684

Seçicilik

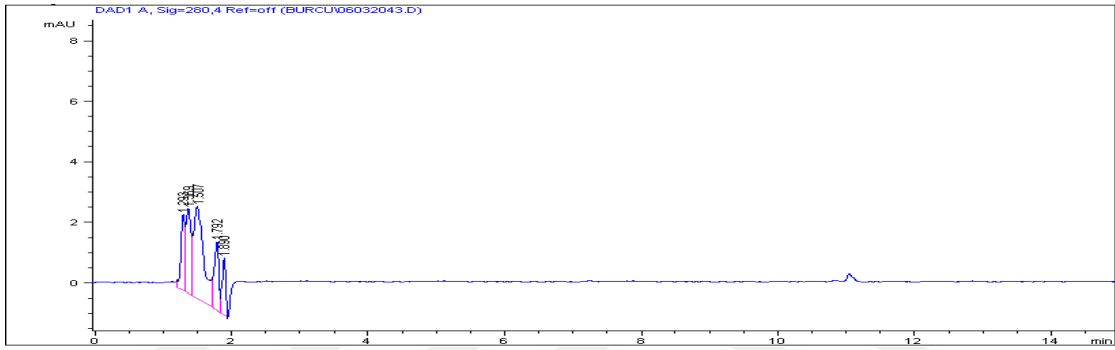
Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı gibi HPLC analizi sırasında 280 nm dalga boyunda mobil faza ait pikin, LE'a ait pik ile girişim göstermediği tespit edildi (Şekil 4-13).

**Şekil 4-13: Mobil fazın HPLC kromotogramı**

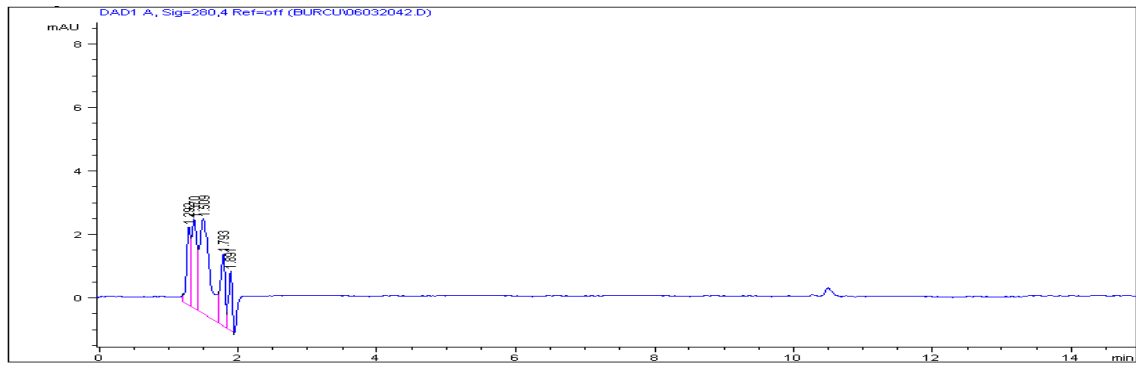
Bölüm 3.2.2.2'de açıklandığı gibi yapılan çalışmada formülasyonlara giren diğer bileşenlerin HPLC piklerinin, LE'a ait pik ile girişimi olmadığı tespit edildi (Şekil 4-14 - 4-16).



Şekil 4-14: KLN505 kodlu boş formülasyona ait HPLC kromotogramı



Şekil 4-15: NLT532 kodlu boş formülasyona ait HPLC kromotogramı



Şekil 4-16: NE550 kodlu boş formülasyona ait HPLC kromotogramı

Teşhis Limiti (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ)

LE'ın pH 6.8 tampon çözeltisindeki miktar tayini yönteminin LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için Bölüm 3.2.2.2'de bahsedilen yöntem kullanılarak analiz, teşhis limiti 2,823 ng/ml ve miktar tayini limiti 9,411 ng/ml olarak tayin edildi.

Stabilite

LE'ın Bölüm 3.2.2.2'de bahsedildiği gibi pH 6.8 tampon çözeltisinde 48 saat boyunca stabilitesi incelendi. Elde edilen stabilite sonuçlarının %RSD değerlerinin % 2 nin altında olmasından dolayı LE'ın 48 saat boyunca stabil olduğu tespit edildi (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: LE'ın pH 6.8 fosfat tampon çözeltisindeki stabilitesine ait sonuçlar

Konsantrasyon (ng/ml)	2. saat	4. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat	RSD (%)
200	201,673	200,402	202,319	200,038	203,115	201,409	0,573
1200	1202,093	1199,762	1200,558	1203,204	1197,878	1201,355	0,155
3500	3499,114	3496,902	3503,188	3500,679	3502,917	3503,014	0,073

Sistem Uygunluk Testleri

Bölüm 3.2.2.2'de belirtilen parametrelerin tespit edilmesi için LE'ın pH 6,8 fosfat tamponu içerisindeki sistem uygunluk testleri yapıldı. Tablo 4-12'deki sonuçlar, validasyon için sistemin uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 4-11:LE’ın HPLC yöntemindeki uygunluk parametreleri

Değişkenler	Kabul Ölçütü	pH 6.8 Fosfat Tamponu çözeltisi
Tutulma zamanının kesinliği	$RSD \leq \%1$	0,322
Pik alanının kesinliği (%RSD)	$RSD \leq \%1$	0,419
Pik yüksekliğinin kesinliği (%RSD)	$RSD \leq \%1$	0,939
Pik ayrışması (R_s)	$R_s \geq 2$	-
USP kuyruklanma katsayısı (T)	$T \leq \%2$	0,037
Teorik plaka sayısı (N)	$N \geq 2000$	5794
Kapasite faktörü (k)	$k \geq 2$	7,311
Pik simetri büyüklüğü	≤ 2	0,580

4.3. LE’ın Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular

LE’ın oda sıcaklığındaki su, pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisi ve metanoldeki çözünürlüğünün tayini Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi gerçekleşti. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-13’de verilmektedir.

Tablo 4-12: LE’ın çözünürlüğü

Çözünme Ortamı	Çözünürlük ($\mu\text{g/mL}$)	SD ($\pm$)
Distile su	0,703	0,017
pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisi	6,024	0,408
Metanol	573,018	1,127

4.4. Ön Çalışmalara Ait Bulgular

KLN, NLT ve NE’larda kullanılacak sıvı ve katı lipidleri belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.4’te anlatılan metoda göre gerçekleştirilen çalışmada katı lipit olarak Precirol

ATO 5 (Tablo 4-13) ve sıvı lipit olarak oleik asidin (Tablo 4-14) kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4-13: Lipit görüntüleme çalışması

Katı lipit	Katı lipit : Etkin madde oranı				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
1 - tetradecanol	(+)	-	-	-	-
Compritol® E ATO	+	+	(+)	-	-
Compritol® 888 ATO	+	+	+	(+)	-
Cutina® CP	+	(+)	-	-	-
Geleol™	+	+	-	-	-
Gelucire® 50/13	+	-	-	-	-
Imwitor® 491	+	(+)	-	-	-
Imwitor® 900 K	+	-	-	-	-
Lanette® 16	(+)	-	-	-	-
Nacol® 16-98	+	(+)	-	-	-
Preciol® ATO 5	+	+	+	+	+
Setil palmitat	+	(+)	-	-	-
Setostearil alkol	+	+	+	(+)	-
Softisan® 141	+	(+)	-	-	-
Softisan® 601	+	-	-	-	-

+

: LE'nin 80 °C'de 24 saat içerisinde çözündüğünü göstermektedir

-

: LE'nin 24 saat içerisinde çözünmediğini göstermektedir.

(+)

: LE'nin 80 °C'de 24 saat içerisinde çözündüğünü oda sıcaklığında kristalize hale geldiğini göstermektedir

Tablo 4-14: Sıvı lipidlerde yapılan lipit görüntüleme çalışması

Sıvı lipit	Sıvı lipit : Etkin madde oranı				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
Hint yağı	+	+	-	-	-
İsopropil miristat	+	+	+	-	-
Kaprilik trigliserit	+	+	-	-	-
Oleik asit	+	+	+	+	+
Susam yağı	+	+	-	-	-
Zeytinyağı	+	+	-	-	-

+ : LE'nin 80 °C'de 24 saat içerisinde çözündüğünü göstermektedir

- : LE'nin 24 saat içerisinde çözünmediğini göstermektedir.

LE miktarının kantitatif olarak elde edilmesi amacıyla Bölüm 3.2.4'te bahsedilen yöntem kullanılarak analizleri yapıldı (Tablo 4-15 - 4-16).

Tablo 4-15: LE’ın katı lipidlerdeki çözünürlüğü

Katı lipid	Çözünen etkin madde miktarı (mg/ml)	SD (±)
1 - tetradecanol	0,040	0,001
Compritol® E ATO	0,071	0,001
Compritol® 888 ATO	0,114*	0,002
Cutina® CP	0,047	0,001
Geleol™	0,048	0,001
Gelucire® 50/13	0,043	0,002
Imwitor® 491	0,048	0,002
Imwitor® 900 K	0,046	0,001
Lanette® 16	0,034	0,001
Nacol® 16-98	0,044	0,002
Preciol® ATO 5	0,121*	0,003
Setil palmitat	0,048	0,002
Setostearil alkol	0,103*	0,002
Softisan® 141	0,047	0,002
Softisan® 601	0,043	0,002

* : İstatiksel açıdan diğer katı lipidlerdeki çözünürlüklerine göre anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir $p \leq 0,05$.

Tablo 4-16: LE'nin sıvı lipidlerdeki çözünürlüğü

Sıvı lipid	Çözünen etkin madde miktarı (mg/ml)	SD (±)
Hint yağı	0,058	0,002
İsopropil miristat	0,069	0,002
Kaprilik trigliserit	0,055	0,001
Oleik asit	0,102*	0,001
Susam yağı	0,053	0,002
Zeytinyağı	0,053	0,002

* : İstatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir $p < 0.05$

Katı ve sıvı lipidlerin seçiminden sonra formülasyonlarda kullanılacak yüzey etkin maddenin tespit edilmesi için, Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yüzey etkin madde görüntüleme çalışması yapıldı (Tablo 4-17). Çalışma sonrasında ise Bölüm 3.2.2.1'de bahsedilen miktar tayini metodu kullanıldı (Tablo 4-18).

Tablo 4-17: Yüzey etkin madde görüntüleme çalışması

Yüzey etkin madde	Yüzey etkin madde : Etkin madde oranı							
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8
Cremephor EL®	+	+	+	+	+	-	-	-
Cremephor® RH 40	+	+	+	+	+	-	-	-
Labrasol®	+	+	+	+	+	+	-	-
Pluronic® F68	+	+	+	+	+	+	+	+
Pluronic® F127	+	+	+	+	+	+	-	-
Tween® 80	+	+	+	+	+	-	-	-

+

: LE'nin 80 °C'de 24 saat içerisinde çözündüğünü göstermektedir

-

: LE'nin 24 saat içerisinde çözünmediğini göstermektedir.

Tablo 4-18: LE'in yüzey etkin maddelerdeki çözünürlüğü

Sıvı lipit	Çözünen etkin madde miktarı (mg/ml)	SD (±)
Cremephor EL®	0,091	0,001
Cremephor® RH 40	0,099	0,002
Labrasol®	0,120	0,002
Pluronic® F68	0,163	0,002
Pluronic® F127	0,112	0,001
Tween® 80	0.101	0,002

Yüzey etkin madde görüntüleme çalışması sonrası yüzey etkin maddelerde çözünen LE miktarı kantitatif olarak elde edildi. Uygun yüzey etkin maddenin klasik emülsiyonları oluşturularak da morfolojik olarak değerlendirilmesi için Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi çalışılarak, sonuçları tablolarda gösterilmektedir (Tablo 4-19 - 4-21).

Tablo 4-19: KLN formülasyonları için yüzey etkin madde seçimi için gerçekleştirilen tarama çalışmasına ait sonuçlar

Yüzey etkin madde	Formülasyon	Görünüş	Uygunluk durumu
Cremephor EL®	KLN	Faz ayrışması	-
Cremephor® RH 40	KLN	Faz ayrışması	-
Labrasol®	KLN	Koyu kıvamlı	-
Pluronic® F68	KLN	Akışkan kıvamlı	+
Pluronic® F127	KLN	Koyu Kıvamlı	-
Tween® 80	KLN	Faz ayrışması	-

Tablo 4-20: NLT formülasyonları için yüzey etkin madde seçimi için gerçekleştirilen tarama çalışmasına ait sonuçlar

Yüzey etkin madde	Formülasyon	Görünüş	Uygunluk durumu
Cremephor EL®	NLT	Faz ayrışması	-
Cremephor® RH 40	NLT	Faz ayrışması	-
Labrasol®	NLT	Faz ayrışması	-
Pluronic® F68	NLT	Akışkan kıvamlı	+
Pluronic® F127	NLT	Koyu kıvamlı	-
Tween® 80	NLT	Faz ayrışması	-

Tablo 4-21: NE formülasyonları için yüzey etkin madde seçimi için gerçekleştirilen tarama çalışmasına ait sonuçlar

Yüzey etkin madde	Formülasyon	Görünüş	Uygunluk durumu
Cremephor EL®	NE	Koyu kıvamlı	-
Cremephor® RH 40	NE	Koyu kıvamlı	-
Labrasol®	NE	Faz ayrışması	-
Pluronic® F68	NE	Akışkan kıvamlı	+
Pluronic® F127	NE	Faz ayrışması	-
Tween® 80	NE	Faz ayrışması	-

Elde edilen bulgulardan yola çıkılarak formülasyonların hazırlanması için ultrasonikasyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle ait parametrelerin tespiti için Bölüm 3.2.4'te bahsedilen yöntem kullanıldı. Bulgular Tablo 4-22 - 4-24'de gösterilmektedir.

Tablo 4-22: Compritol® 888 ATO ile amplitüdün ve ultrasonikasyon süresinin tespitine yönelik çalışma sonuçları

Taşıyıcı sistem	İçerik	Süre (dk)	% 50 amplitüt		% 75 amplitüt		%90 amplitüt	
			Boyut (nm)	PI	Boyut (nm)	PI	Boyut (nm)	PI
KLN	C888 : Pluronic® F68:Su (4 : 3 : 93)	5	157,5	0,242	155,4	0,228	156,3	0,170
		7	147,1	0,237	143,9	0,217	145,8	0,244
		10	146,7	0,224	144,3	0,201	145,4	0,216
NLT	C888 :Oleik Asit: Pluronic® F68:Su (3,7: 1,3 :3 :93)	5	154,6	0,183	151,8	0,155	153,2	0,191
		7	144,9	0,152	141,4	0,094	142,7	0,135
		10	143,7	0,255	142,9	0,203	143,4	0,239

* Su fazı %1 oranında gliserol içermektedir.

C888: Compritol® 888 ATO

Tablo 4-23: Setostearil alkol ile amplitüdün ve ultrasonikasyon süresinin tespitine yönelik çalışma sonuçları

Taşıyıcı sistem	İçerik	Süre (dk)	% 50 amplitüt		% 75 amplitüt		%90 amplitüt	
			Boyut (nm)	PI	Boyut (nm)	PI	Boyut (nm)	PI
KLN	SA: pluronic® F68:Su (4 : 3 : 923)	5	161,2	0,275	158,5	0,196	159,4	0,201
		7	151,3	0,177	145,9	0,123	150,8	0,145
		10	150,3	0,191	146,8	0,218	151,4	0,233
NLT	SA:Oleik Asit: Pluronic® F68:Su (3,7: 1,3 : 3 : 93)	5	156,7	0,228	155,3	0,195	152,8	0,199
		7	146,8	0,159	144,3	0,181	147,4	0,203
		10	146,1	0,185	145,4	0,229	148,1	0,217

* Su fazı %1 oranında gliserol içermektedir.

SA: Setostearil alkol

Compritol® 888 ATO ve setostearil alkol kullanılarak hazırlanan formülasyonlarla 80-140 nm aralığında KLN, NLT ve NE'lar elde edilemediğinden dolayı, bu lipidler çalışma dışı bırakılıp uygun formülasyonlar ile deriden geçiş çalışması yapıldı.

Tablo 4-24: Precirol® ATO 5 ile amplitüdün ve ultrasonikasyon süresinin tespitine yönelik çalışma sonuçları

Taşıyıcı sistem	İçerik	Süre (dk)	% 50 amplitüt		% 75 amplitüt		%90 amplitüt	
			Boyut (nm)	PI	Boyut (nm)	PI	Boyut (nm)	PI
KLN	Precirol® ATO5: Pluronic® F68:Su (4 : 3 : 923)	5	97,3	0,277	94,3	0,235	95,8	0,226
		7	92,6	0,201	89,2	0,178	90,6	0,199
		10	92,4	0,322	88,5	0,255	89,6	0,283
NLT	Precirol® ATO5: Oleik Asit: Pluronic® F68:Su (3,7: 1,3 : 3 : 93)	5	91,5	0,259	88,6	0,217	90,3	0,201
		7	86,7	0,228	83,9	0,155	85,1	0,203
		10	85,1	0,291	82,7	0,305	84,8	0,346
NE	Oleik Asit: Pluronic® F68:Su (4 : 3 : 93)	5	137,9	0,266	135,5	0,202	139,3	0,254
		7	136,6	0,245	133,1	0,193	135,8	0,268
		10	135,2	0,301	134,9	0,281	135,1	0,290

* Su fazı %1 oranında gliserol içermektedir.

Korneadan *ex vivo* geçişte hazırlanacak KLN, NLT ve NE'larda katı lipid olarak Precirol® ATO 5, sıvı lipid olarak oleik asit ve yüzey etkin madde olarak Pluronic® F68 kullanılmasına, amplitüdün %75 ve sürenin 7 dakika olmasına karar verildi.

4.5. KLN, NLT ve NE'ların Sistemlerin Bilgisayar Programı ile Tasarımına Ait Bulgular

Bölüm 4.4'te seçilen yüzey etkin madde kullanılarak, Bölüm 3.2.5'da bahsedilen yöntem ile hazırlanan KLN, NLT ve NE'lara ait sonuçlar Tablo 4-25 – 4-27'de verilmiştir.

Tablo 4-25: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan KLN formülasyonları

Formülasyon	LE	Pluronic® F68 (%)	Precirol® ATO 5 (%)	Su* (%)
KLN304	5 mg/mL	3,25	4,40	92,35
KLN305	5 mg/mL	3,17	4,90	91,93
KLN306	5 mg/mL	3,35	5,75	90,90
KLN307	5 mg/mL	3,45	6,62	89,93
KLN308	5 mg/mL	3,00	7,820	89,18
KLN404	5 mg/mL	3,80	4,10	92,10
KLN405	5 mg/mL	4,33	5,42	90,24
KLN406	5 mg/mL	4,15	6,10	89,75
KLN407	5 mg/mL	4,25	7,25	88,50
KLN408	5 mg/mL	4,00	8,00	88,00
KLN504	5 mg/mL	4,70	4,32	90,03
KLN505	5 mg/mL	5,00	5,00	90,00
KLN506	5 mg/mL	4,00	5,87	88,13
KLN507	5 mg/mL	4,77	7,05	88,18
KLN508	5 mg/mL	4,96	7,81	87,23

* Su fazı %1 oranında gliserol içermektedir.

Tablo 4-26: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonları

Formülasyon	LE	Pluronic® F68 (%)	Precirol® ATO 5 (%)	Oleik asit (%)	Su* (%)
NLT331	5 mg/mL	3,11	2,81	1,32	92,76
NLT332	5 mg/mL	3,25	3,43	1,61	91,71
NLT342	5 mg/mL	3,05	4,00	2,22	91,91
NLT352	5 mg/mL	3,45	5,17	2,03	89,16
NLT353	5 mg/mL	3,00	5,05	2,90	89,05
NLT431	5 mg/mL	4,00	2,70	1,30	92,00
NLT432	5 mg/mL	4,15	3,40	2,35	90,10
NLT442	5 mg/mL	4,33	4,00	2,00	89,77
NLT452	5 mg/mL	4,00	4,75	2,05	89,20
NLT453	5 mg/mL	5,00	4,70	3,17	87,13
NLT531	5 mg/mL	4,79	2,95	1,15	91,11
NLT532	5 mg/mL	5,00	3,40	1,60	90,00
NLT542	5 mg/mL	4,96	4,29	2,00	88,75
NLT552	5 mg/mL	4,97	5,25	2,33	87,45
NLT553	5 mg/mL	5,00	4,86	3,10	87,04

* Su fazı %1 oranında gliserol içermektedir.

Tablo 4-27: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NE formülasyonları

Formülasyon	LE	Pluronic® F68 (%)	Oleik asit (%)	Su* (%)
NE340	5 mg/mL	3,25	3,90	92,85
NE350	5 mg/mL	3,00	4,75	92,25
NE360	5 mg/mL	3,45	6,00	90,55
NE370	5 mg/mL	3,10	6,87	90,03
NE380	5 mg/mL	3,36	7,84	88,80
NE440	5 mg/mL	4,00	4,00	92,00
NE450	5 mg/mL	4,28	5,30	90,42
NE460	5 mg/mL	3,91	6,25	89,84
NE470	5 mg/mL	4,20	7,00	88,80
NE480	5 mg/mL	4,00	7,91	88,09
NE540	5 mg/mL	4,80	3,90	91,30
NE550	5 mg/mL	5,00	5,00	90,00
NE560	5 mg/mL	4,95	6,00	89,05
NE570	5 mg/mL	5,00	7,33	87,67
NE580	5 mg/mL	4,84	8,00	87,16

* Su fazı %1 oranında gliserol içermektedir.

Tüm formülasyonlar yazılımın verdiği değerlere göre hazırlandıktan sonra hepsine ait boyut, PI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinlikleri ölçülerek bağımlı değişken olarak alınan bu sonuçlar tablolarda gösterilemektedir (Tablo 4-28 - 4-30).

Tablo 4-28: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımlı değişkenlerine ait sonuçlar (n=3)

Formülasyon	Boyut (nm) $\pm$ SD	PI $\pm$ SD	Zeta potansiyeli (mV) $\pm$ SD	%EE $\pm$ SD
KLN304	89,8 $\pm$ 1,11	0,127 $\pm$ 0,04	-21,5 $\pm$ 1,09	78,21 $\pm$ 0,94
KLN305	100,7 $\pm$ 2,78	0,228 $\pm$ 0,05	-19,9 $\pm$ 3,15	73,49 $\pm$ 1,42
KLN306	126,9 $\pm$ 1,22	0,235 $\pm$ 0,04	-20,8 $\pm$ 2,06	69,55 $\pm$ 1,87
KLN307	129,9 $\pm$ 1,07	0,288 $\pm$ 0,05	-21,9 $\pm$ 1,99	67,48 $\pm$ 1,64
KLN308	188,6 $\pm$ 2,59	0,304 $\pm$ 0,07	-24,8 $\pm$ 3,02	62,94 $\pm$ 2,11
KLN404	115,3 $\pm$ 3,71	0,211 $\pm$ 0,02	-22,4 $\pm$ 1,03	85,52 $\pm$ 1,17
KLN405	104,5 $\pm$ 2,06	0,209 $\pm$ 0,04	-22,9 $\pm$ 0,96	81,29 $\pm$ 0,39
KLN406	106,9 $\pm$ 1,35	0,225 $\pm$ 0,05	-24,1 $\pm$ 2,37	75,31 $\pm$ 1,03
KLN407	130,7 $\pm$ 3,18	0,204 $\pm$ 0,03	-24,9 $\pm$ 2,29	71,86 $\pm$ 1,83
KLN408	129,9 $\pm$ 2,84	0,183 $\pm$ 0,05	-22,1 $\pm$ 1,18	70,06 $\pm$ 2,04
KLN504	111,3 $\pm$ 1,28	0,109 $\pm$ 0,03	-23,4 $\pm$ 2,91	80,29 $\pm$ 1,78
KLN505*	86,07 $\pm$ 1,16	0,135 $\pm$ 0,04	-24,2 $\pm$ 1,77	91,07 $\pm$ 1,95
KLN506	115,5 $\pm$ 1,73	0,224 $\pm$ 0,08	-24,8 $\pm$ 2,90	78,66 $\pm$ 1,66
KLN507	130,8 $\pm$ 0,96	0,171 $\pm$ 0,09	-25,4 $\pm$ 1,72	74,21 $\pm$ 1,28
KLN508	133,4 $\pm$ 1,80	0,128 $\pm$ 0,08	-25,9 $\pm$ 1,09	73,82 $\pm$ 2,09

* Deneye devam edilen formülasyon

Tablo 4-29: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımlı değişkenlerine ait sonuçlar (n=3)

Formülasyon	Boyut (nm) $\pm$ SD	PI $\pm$ SD	Zeta potansiyeli (mV) $\pm$ SD	%EE $\pm$ SD
NLT331	89,23 $\pm$ 1,25	0,194 $\pm$ 0,09	-21,5 $\pm$ 1,46	75,08 $\pm$ 1,87
NLT332	95,12 $\pm$ 1,11	0,221 $\pm$ 0,11	-23,2 $\pm$ 2,13	79,73 $\pm$ 2,49
NLT342	105,1 $\pm$ 1,32	0,149 $\pm$ 0,06	-23,8 $\pm$ 2,47	76,20 $\pm$ 2,15
NLT352	117,6 $\pm$ 2,02	0,224 $\pm$ 0,09	-23,6 $\pm$ 1,08	72,86 $\pm$ 1,63
NLT353	125,2 $\pm$ 1,83	0,178 $\pm$ 0,07	-24,8 $\pm$ 2,82	70,02 $\pm$ 1,07
NLT431	97,98 $\pm$ 2,77	0,239 $\pm$ 0,11	-25 $\pm$ 1,83	79,29 $\pm$ 2,41
NLT432	90,95 $\pm$ 1,28	0,192 $\pm$ 0,08	-24,6 $\pm$ 2,24	86,42 $\pm$ 1,66
NLT442	100,3 $\pm$ 1,03	0,171 $\pm$ 0,07	-24,8 $\pm$ 1,14	84,31 $\pm$ 2,88
NLT452	104,5 $\pm$ 2,63	0,219 $\pm$ 0,10	-25,1 $\pm$ 2,10	74,65 $\pm$ 3,02
NLT453	114,7 $\pm$ 2,20	0,234 $\pm$ 0,09	-25,1 $\pm$ 1,55	71,88 $\pm$ 1,06
NLT531	91,72 $\pm$ 1,35	0,272 $\pm$ 0,11	-24,4 $\pm$ 2,36	81,70 $\pm$ 2,03
NLT532*	82,90 $\pm$ 1,03	0,192 $\pm$ 0,08	-25,8 $\pm$ 1,14	92,23 $\pm$ 1,48
NLT542	86,55 $\pm$ 2,88	0,183 $\pm$ 0,09	-24,3 $\pm$ 1,75	86,28 $\pm$ 2,13
NLT552	99,41 $\pm$ 1,02	0,261 $\pm$ 0,11	-26,4 $\pm$ 1,93	79,54 $\pm$ 3,19
NLT553	101,10 $\pm$ 1,26	0,206 $\pm$ 0,09	-26,7 $\pm$ 1,79	76,40 $\pm$ 2,84

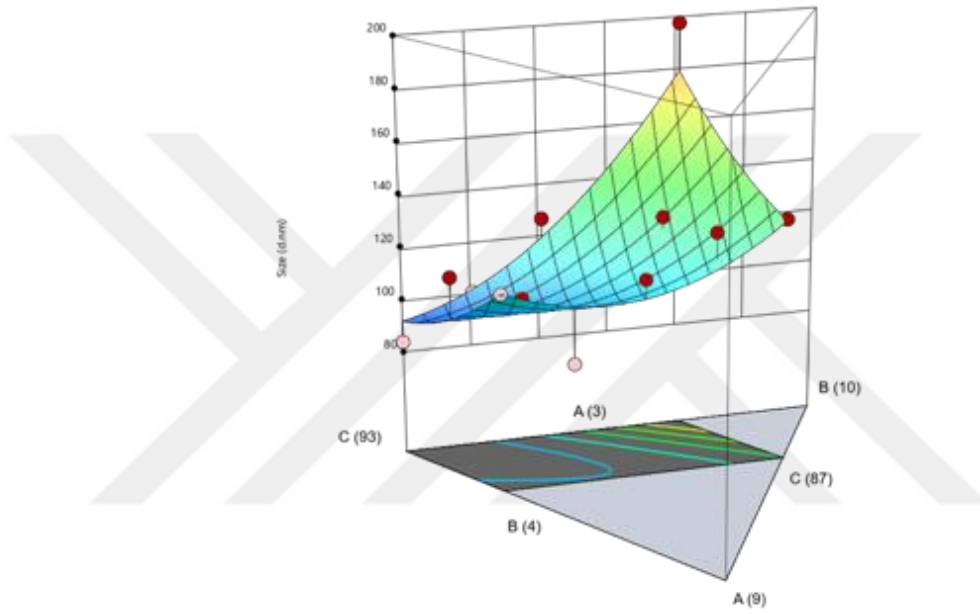
* Deneye devam edilen formülasyon

Tablo 4-30: Design Expert® 13 yazılımının verdiği miktarlar kullanılarak hazırlanan NE formülasyonlarının bağımlı değişkenlerine ait sonuçlar (n=3)

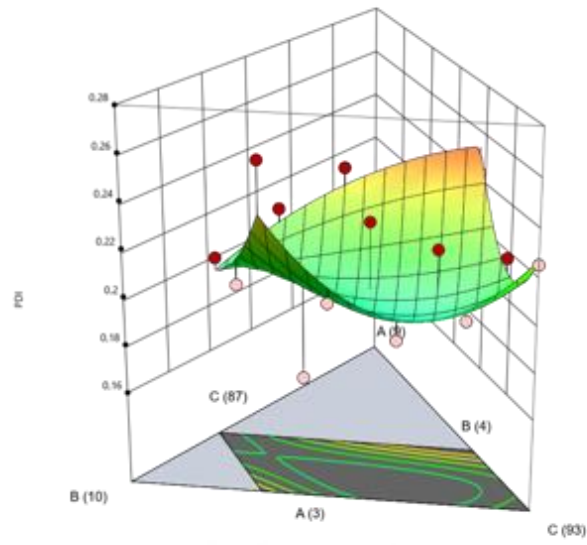
Formülasyon	Boyut (nm) $\pm$ SD	PI $\pm$ SD	Zeta potansiyeli (mV) $\pm$ SD	%EE $\pm$ SD
NE340	133,82 $\pm$ 1,73	0,236 $\pm$ 0,08	-20,3 $\pm$ 1,22	75,67 $\pm$ 2,77
NE350	140,46 $\pm$ 1,20	0,093 $\pm$ 0,01	-20,2 $\pm$ 2,46	75,02 $\pm$ 2,09
NE360	182,53 $\pm$ 1,95	0,114 $\pm$ 0,03	-21,2 $\pm$ 2,39	71,19 $\pm$ 1,01
NE370	200,77 $\pm$ 2,34	0,195 $\pm$ 0,07	-21,7 $\pm$ 1,82	70,05 $\pm$ 2,58
NE380	223,69 $\pm$ 2,01	0,185 $\pm$ 0,06	-22,4 $\pm$ 1,46	67,41 $\pm$ 1,04
NE440	174,25 $\pm$ 1,36	0,179 $\pm$ 0,04	-20,9 $\pm$ 1,28	78,56 $\pm$ 1,55
NE450	134,57 $\pm$ 1,42	0,171 $\pm$ 0,07	-20,3 $\pm$ 1,33	79,01 $\pm$ 1,09
NE460	140,40 $\pm$ 1,25	0,199 $\pm$ 0,05	-21,7 $\pm$ 2,80	73,13 $\pm$ 1,64
NE470	143,52 $\pm$ 1,03	0,191 $\pm$ 0,02	-21,8 $\pm$ 1,57	71,87 $\pm$ 1,28
NE480	148,11 $\pm$ 1,33	0,195 $\pm$ 0,04	-21,7 $\pm$ 1,51	70,22 $\pm$ 1,84
NE540	130,99 $\pm$ 1,18	0,223 $\pm$ 0,08	-20,2 $\pm$ 2,33	80,32 $\pm$ 2,24
NE550*	126,54 $\pm$ 1,05	0,174 $\pm$ 0,02	-20,2 $\pm$ 1,37	89,17 $\pm$ 1,37
NE560	133,43 $\pm$ 1,12	0,115 $\pm$ 0,01	-21,8 $\pm$ 1,42	80,01 $\pm$ 1,03
NE570	140,85 $\pm$ 2,24	0,129 $\pm$ 0,01	-22,1 $\pm$ 2,58	79,88 $\pm$ 2,55
NE580	168,67 $\pm$ 2,19	0,136 $\pm$ 0,05	-22,9 $\pm$ 1,31	77,16 $\pm$ 1,16

* Deneye devam edilen formülasyon

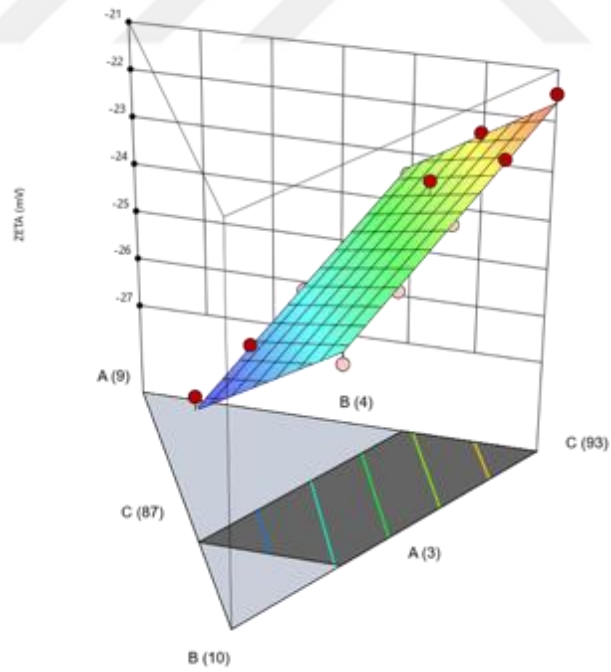
Formülasyonlara ait bağımlı değişkenler elde edildikten sonra Bölüm 3.2.5'te bahsedildiği gibi KLN, NLT ve NE'ların değişken lipit (%4 - %8) ve yüzey etkin madde (%3 - %5) oranının nanopartiküllerin büyüklüğü, dağılımı, yükleri ve enkapsülasyon etkinliklerine olan etkilerini gösteren 3 boyutlu tasarım alanları elde edildi (Şekil 4-17 - 4-28).



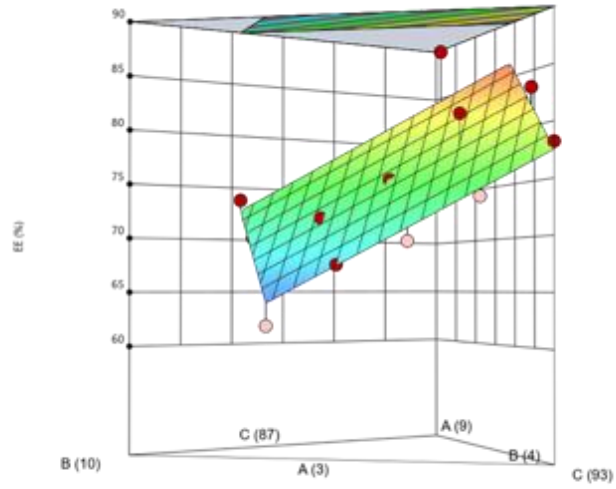
Şekil 4-17: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



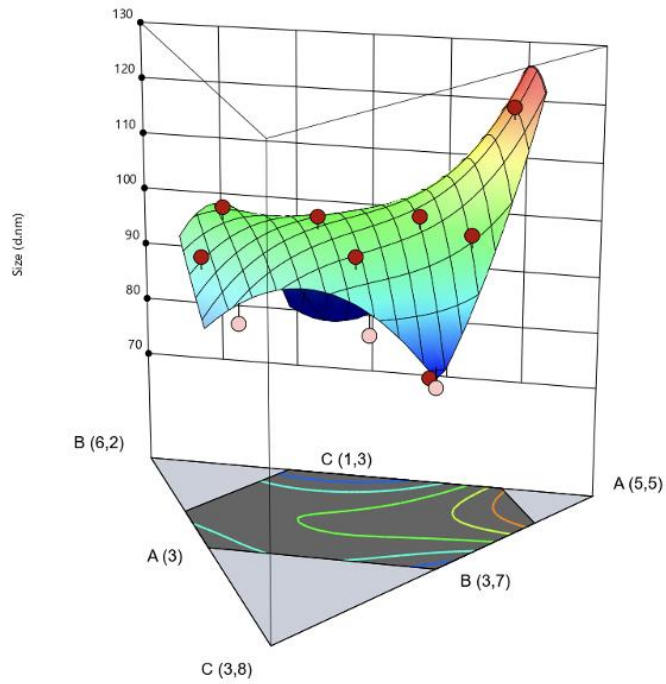
Şekil 4-18: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü dağılımı (PI) üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



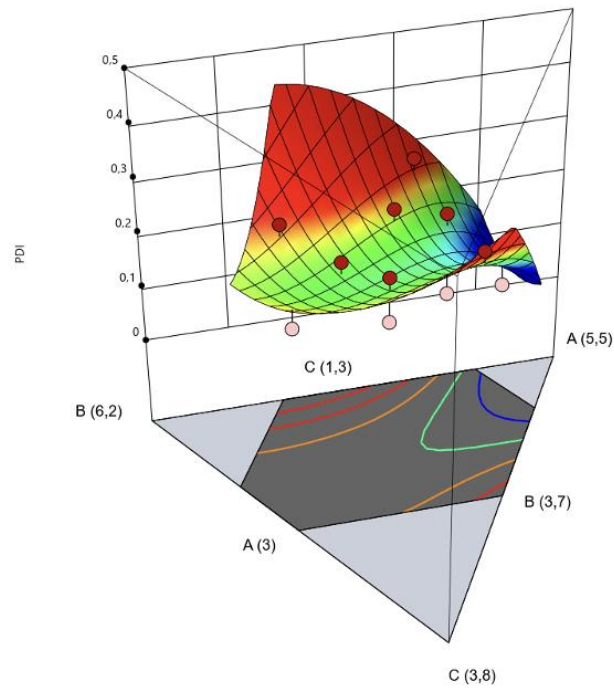
Şekil 4-19: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



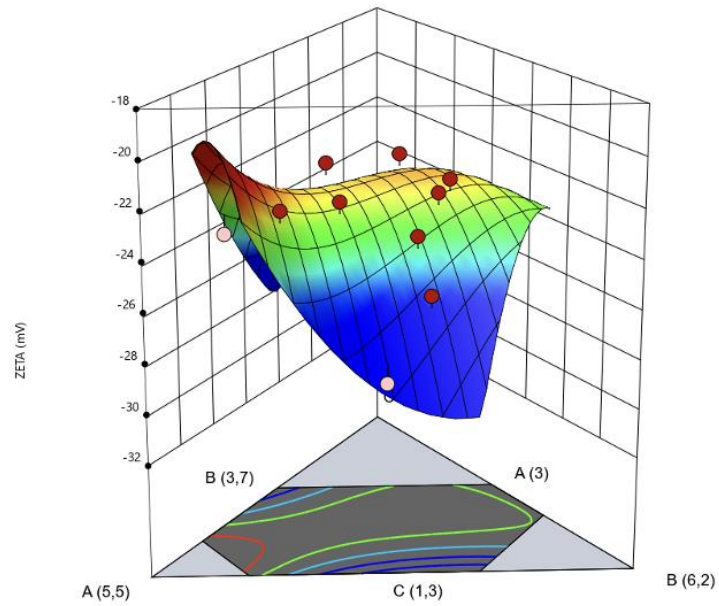
Şekil 4-20: Hazırlanan KLN formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



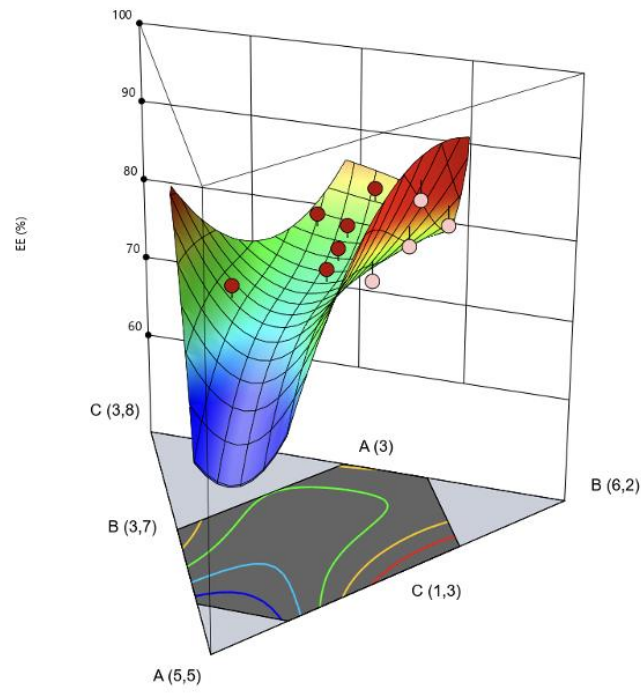
Şekil 4-21: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



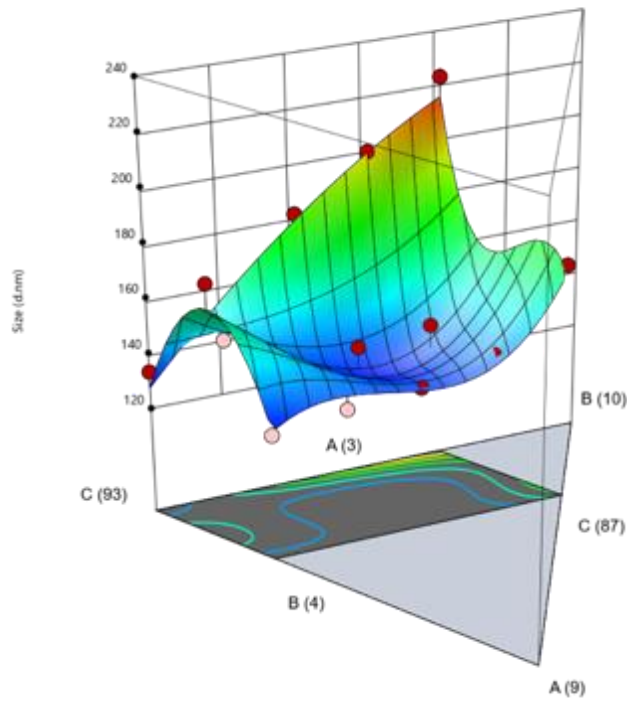
Şekil 4-22: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü dağılımı üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



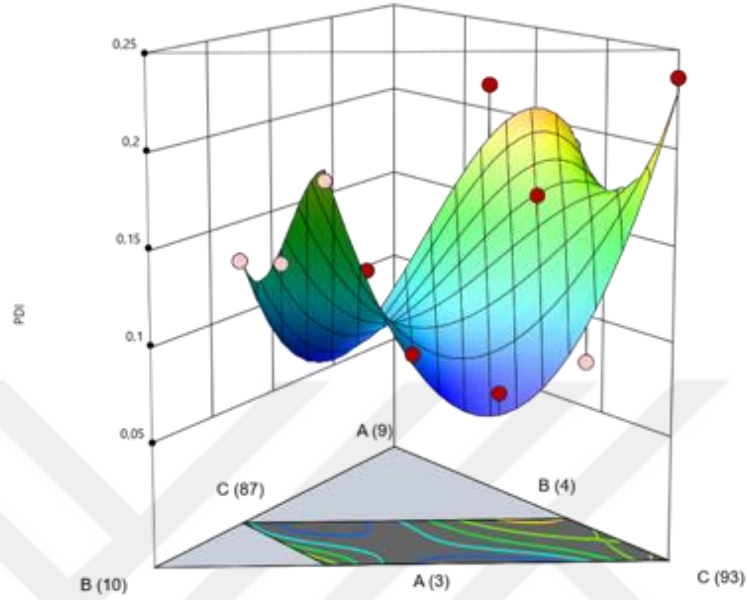
Şekil 4-23: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



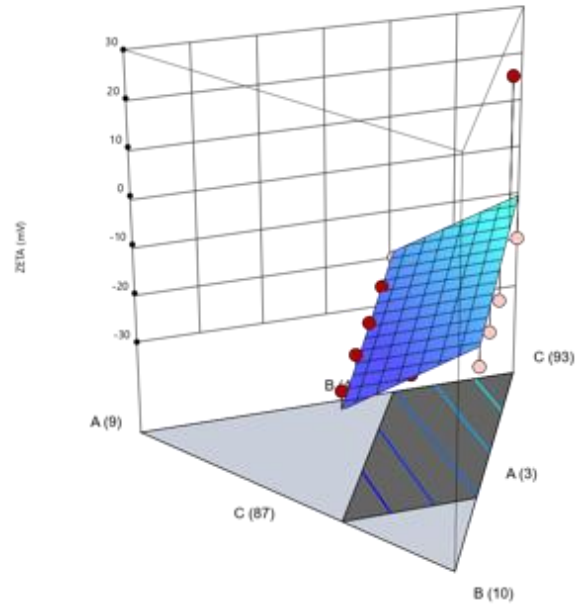
Şekil 4-24: Hazırlanan NLT formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



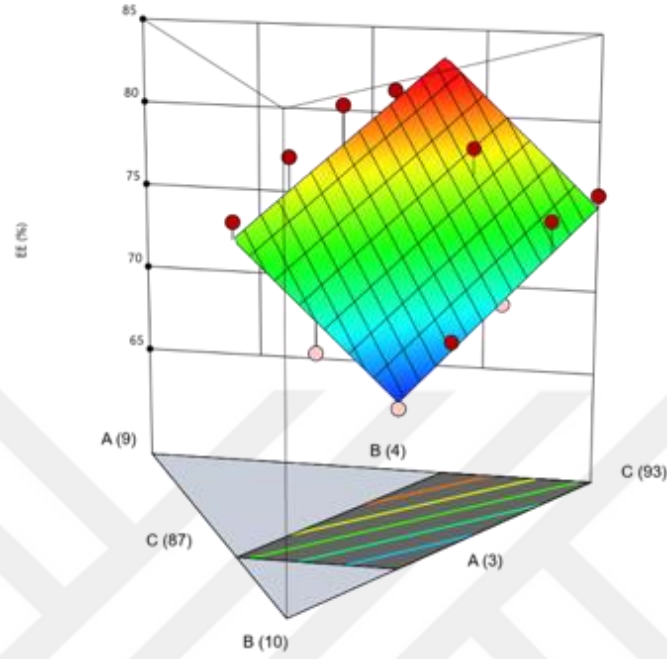
Şekil 4-25: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



Şekil 4-26: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin partikül büyüklüğü dağılımı üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



Şekil 4-27: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı



Şekil 4-28: Hazırlanan NE formülasyonlarının bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu tasarım alanı

Bölüm 3.2.5'te anlatılan yöntem kullanılıp, tasarımı tamamlanan KLN, NLT ve NE'lara ait formülasyonlar (in vitro ve ex vivo çalışmalarda kullanılacak olan formülasyonlar) KLN505, NLT532 ve NE550 olarak belirlendi (Tablo 4-31).

Tablo 4-31: Tasarımı tamamlanan formülasyonlar

Formülasyon	Boyut (nm) $\pm$ SD	PI $\pm$ SD	Zeta potansiyeli (mV) $\pm$ SD	%EE $\pm$ SD
KLN505	86,07 $\pm$ 1,16	0,135 $\pm$ 0,014	-24,25 $\pm$ 1,73	87,53 $\pm$ 1,95
NLT532	82,90 $\pm$ 1,03	0,192 $\pm$ 0,018	-25,83 $\pm$ 1,16	88,93 $\pm$ 1,48
NE550	126,54 $\pm$ 1,05	0,174 $\pm$ 0,012	-20,28 $\pm$ 1,37	82,15 $\pm$ 1,37

4.6. KLN, NLT ve NE’larda Yapılan Tayinlere Ait Bulgular

4.6.1. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelinin Tayinine Ait Bulgular

KLN, NLT ve NE’ların partikül büyüklüğü ve dağılımlarının analizi Bölüm 3.2.6.1’de bahsedildiği şekilde yapıldı. KLN formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve dağılımına ait sonuçlar Tablo 4-32’de gösterilmektedir.

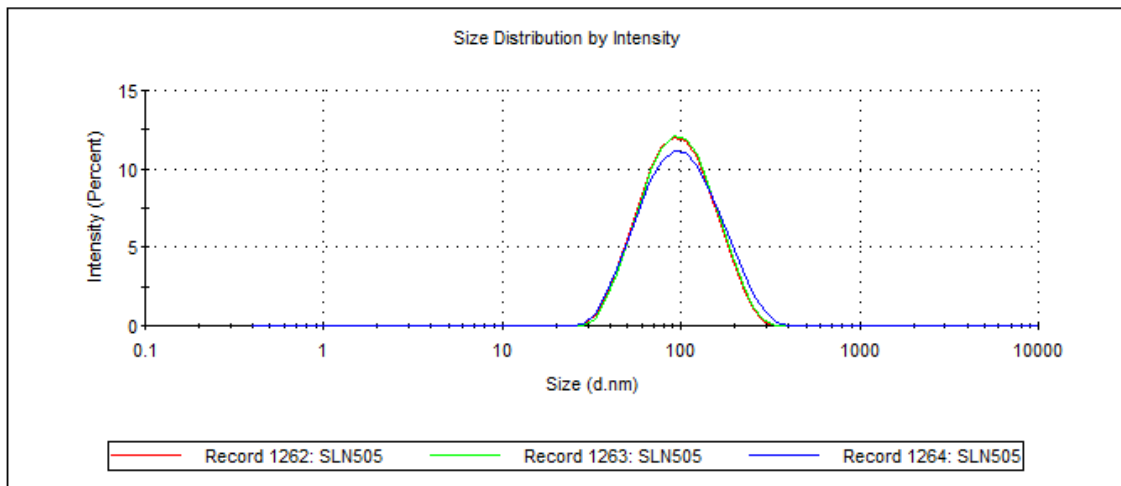
Tablo 4-32: KLN formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve dağılımı (n=3)

	Partikül Büyüklüğü (nm)		PI	
	Ortalama	SD (±)	Ortalama	SD (±)
KLN505	86,19	0,95	0,135	0,04
Boş-KLN505*	84,28	1,19	0,141	0,04

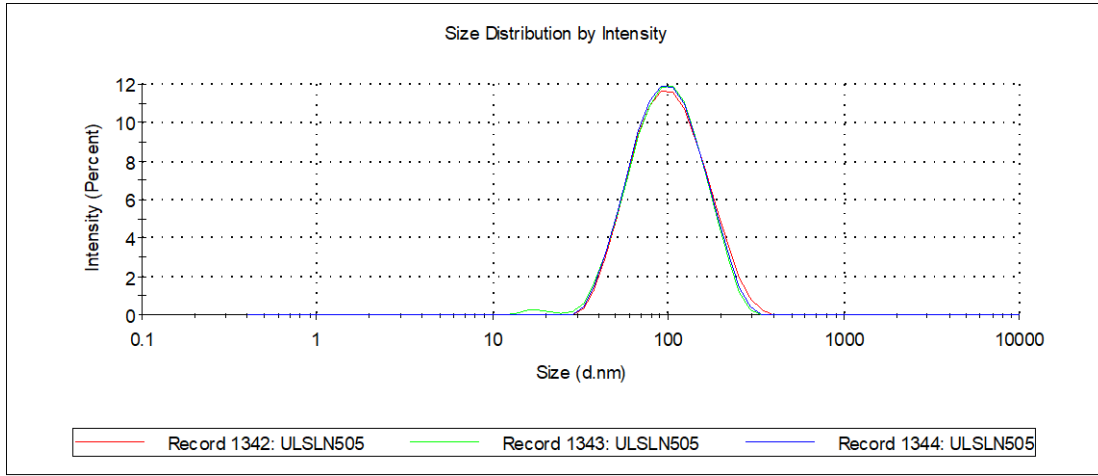
* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve PI değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$)

KLN formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği Şekil 4-29 ve Şekil 4-30’da verilmektedir.



Şekil 4-29: KLN505 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı



Şekil 4-30: Boş-KLN505 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı

NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ölçümlerine ait veriler Tablo 4-33'de verilmiştir.

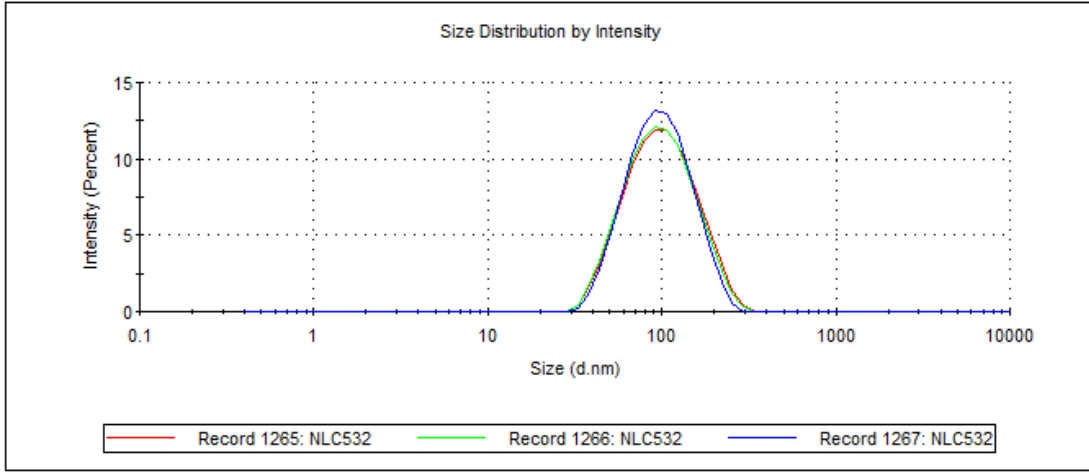
Tablo 4-33: NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve dağılımı (n=3)

	Partikül Büyüklüğü (nm)		PI	
	Ortalama	SD (±)	Ortalama	SD (±)
NLT532	82,38	1,09	0,166	0,03
Boş-NLT532*	81,25	1,46	0,185	0,01

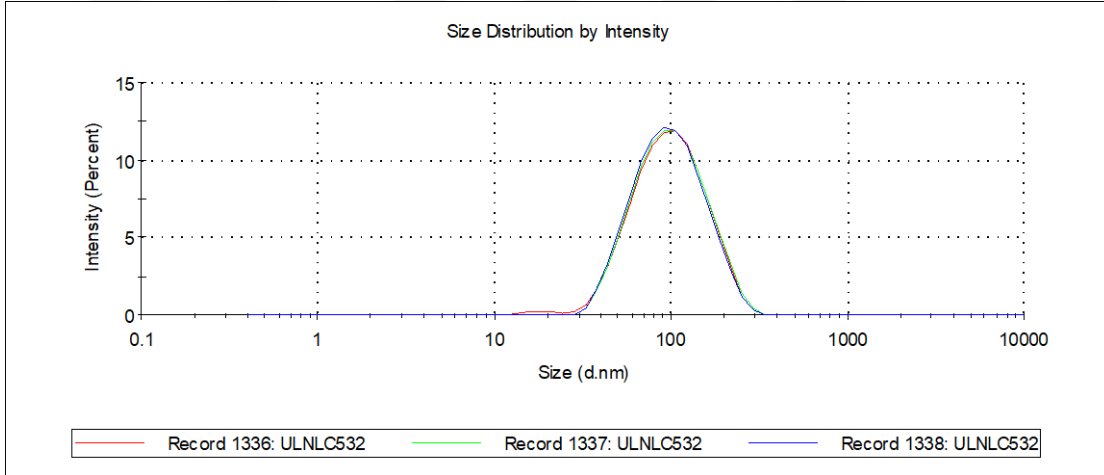
* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve PI değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$)

NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği Şekil 4-31 ve Şekil 4-32'de gösterilmektedir.



Şekil 4-31: NLT532 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı



Şekil 4-32: Boş-NLT532 kodlu formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımı

NE formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ölçümlerine ait veriler Tablo 4-34'de gösterilmiştir.

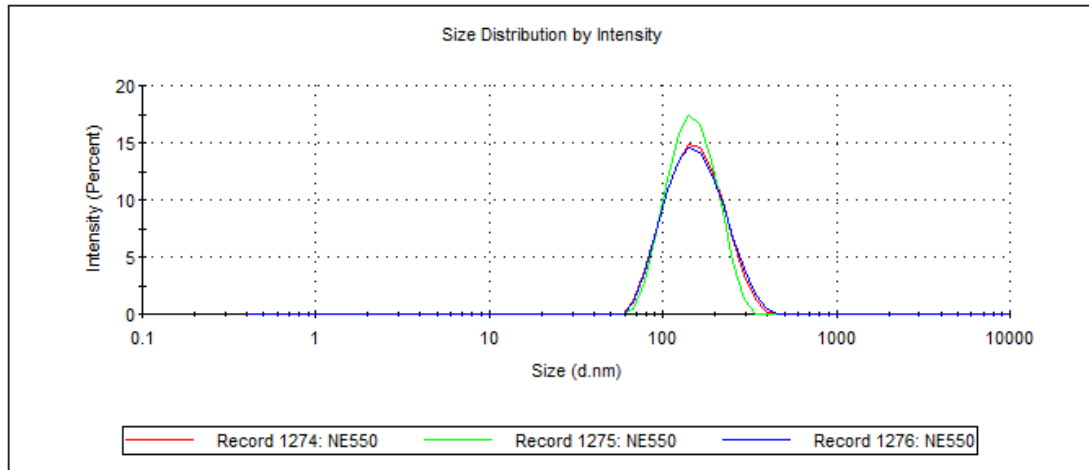
Tablo 4-34: NE formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü ve dağılımı (n=3)

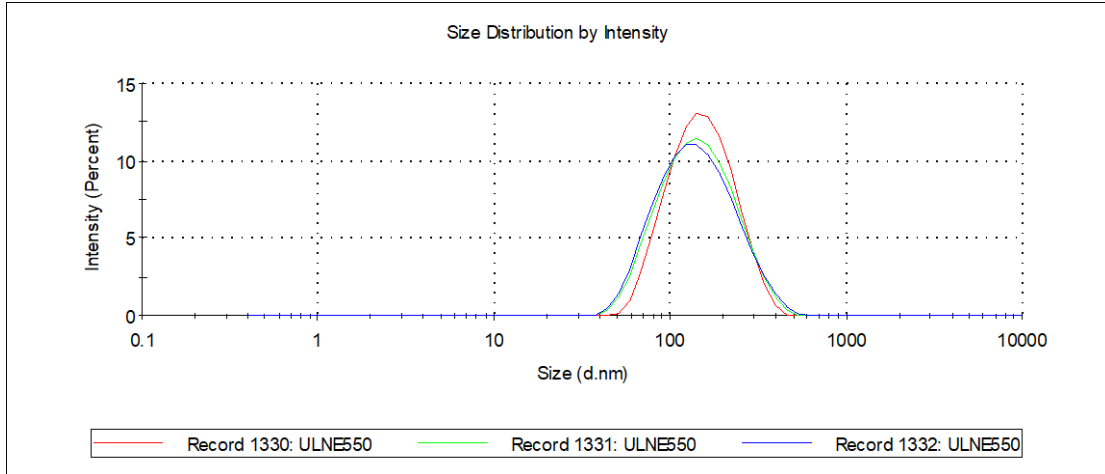
	Damlacık Büyüklüğü (nm)		PI	
	Ortalama	SD ($\pm$)	Ortalama	SD ($\pm$)
NE550	126,35	1,39	0,177	0,01
Boş-NE550*	124,17	2,82	0,179	0,04

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.

Formülasyonların damlacık büyüklüğü ve PI değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$)

NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği Şekil 4-33 ve Şekil 4-33'de verilmiştir.

**Şekil 4-33: NE550 kodlu formülasyonun damlacık büyüklüğü dağılımı**



Şekil 4-34: Boş-NE550 kodlu formülasyonun damlacık büyüklüğü dağılımı

Etkin madde yüklü ve yüklü olmayan formülasyonlara ait zeta potansiyel değerlerinin analizi için Bölüm 3.2.6.1'de açıklanan metoda göre gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen bulgular tabloda verilmektedir (Tablo 4-35).

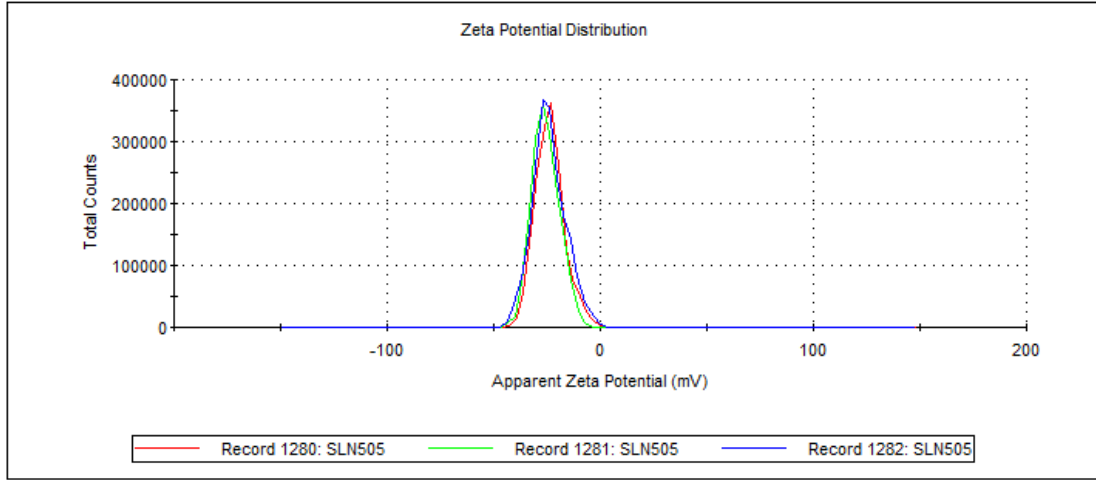
Tablo 4-35: Formülasyonların zeta potansiyeli (n=3)

Formülasyon	Zeta Potansiyel	SD (±)
KLN505	-24,12	2,46
Boş-KLN505*	-23,94	1,94
NLT532	-25,75	0,75
Boş-NLT532*	-25,28	2,57
NE550	-21,83	1,68
Boş-NE550*	-21,39	0,93

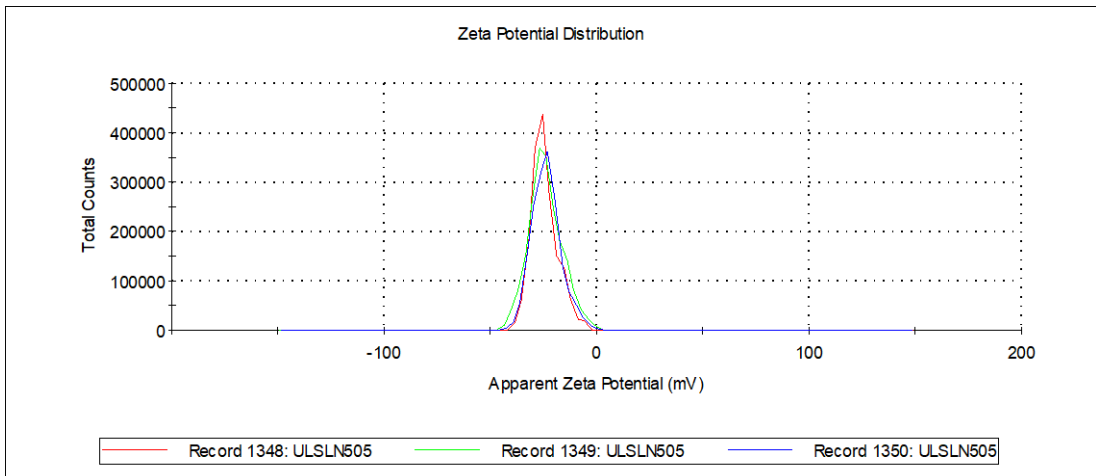
* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.

Formülasyonların zeta potansiyelleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$)

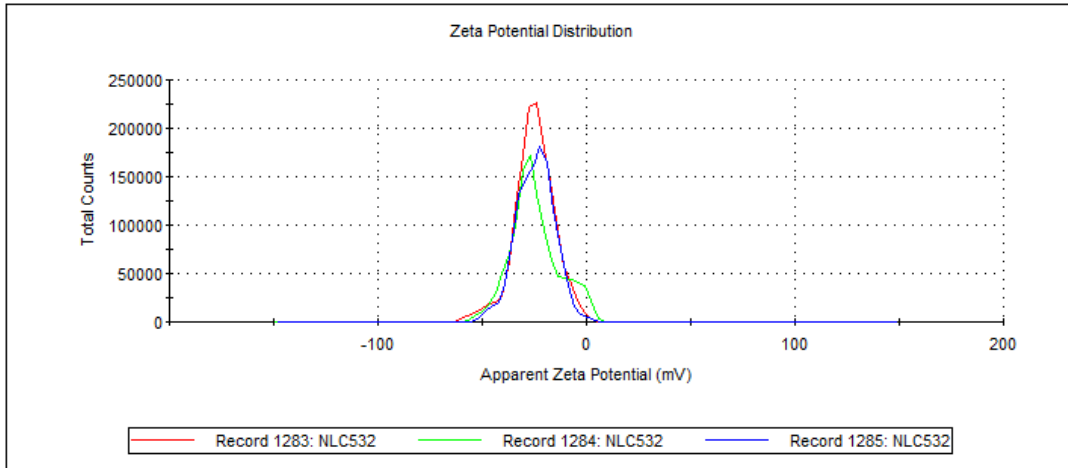
Formülasyonlara ait zeta potansiyellerini gösteren grafikler gösterilmektedir (Şekil 4-35 - 4-40).



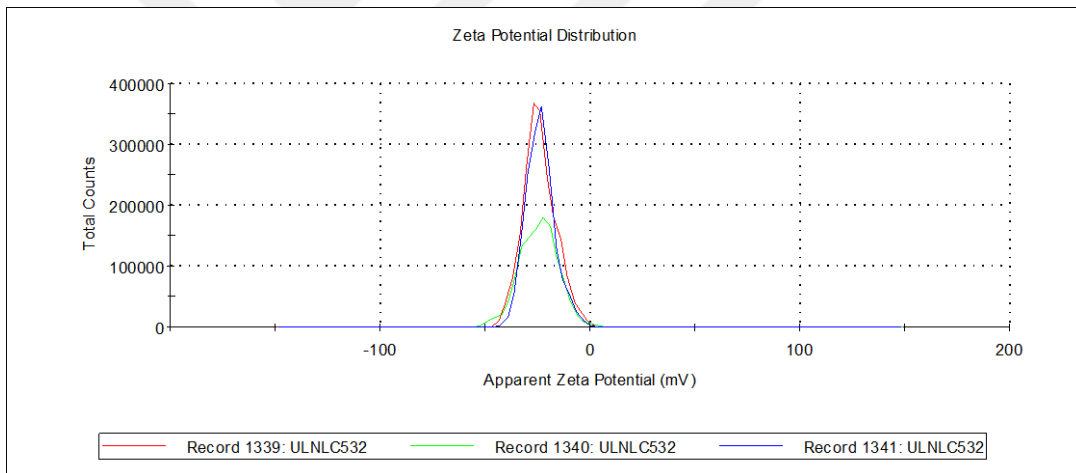
Şekil 4-35: KLN505 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli



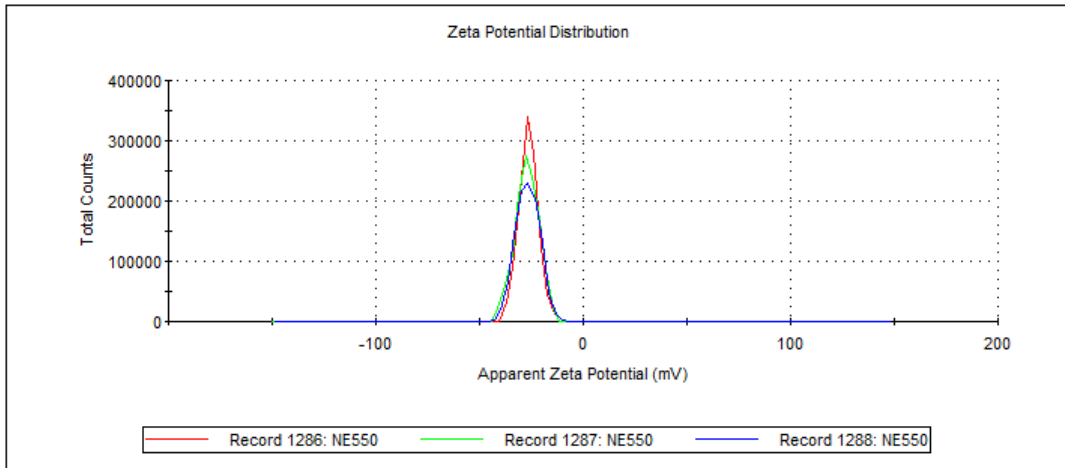
Şekil 4-36: Boş-KLN505 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli



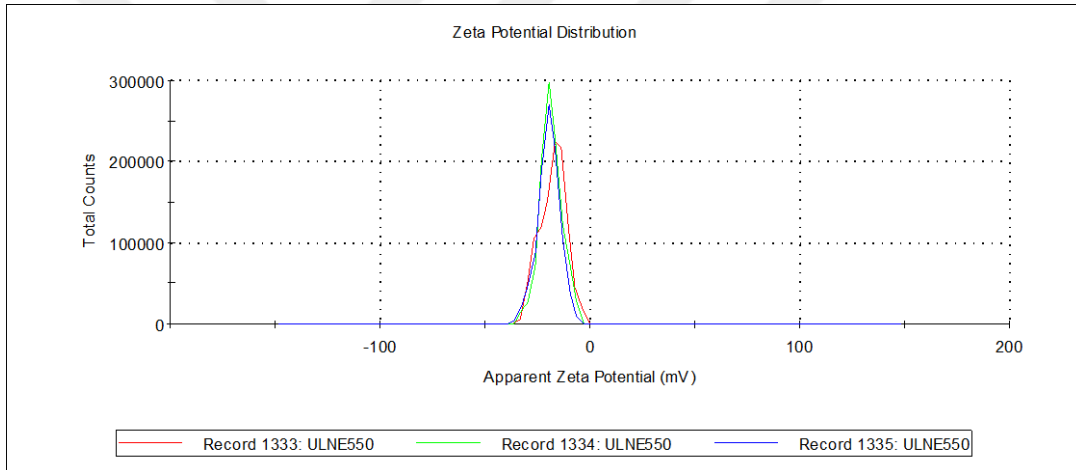
Şekil 4-37: NLT532 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli



Şekil 4-38: Boş-NLT532 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli



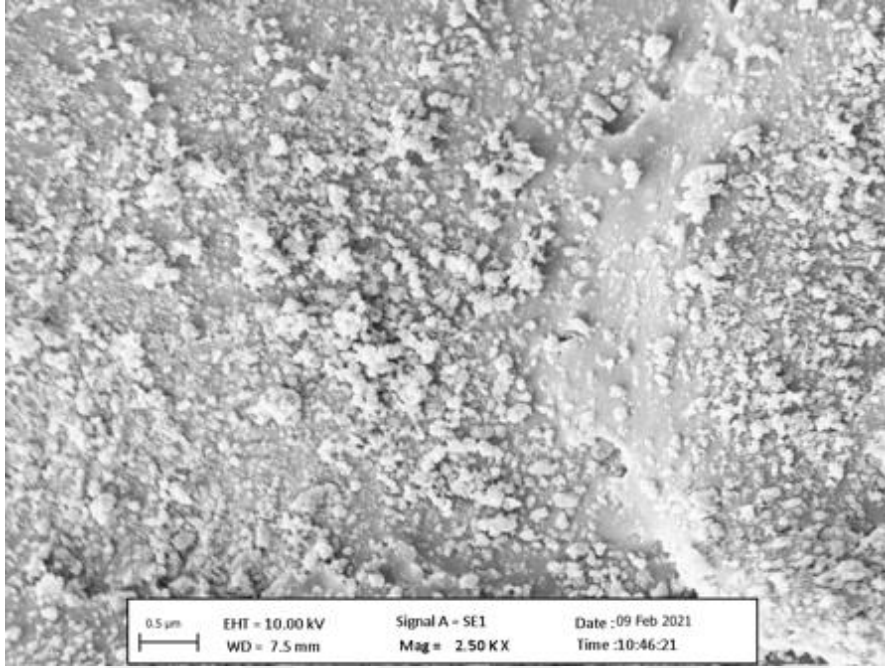
Şekil 4-39: NE550 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli



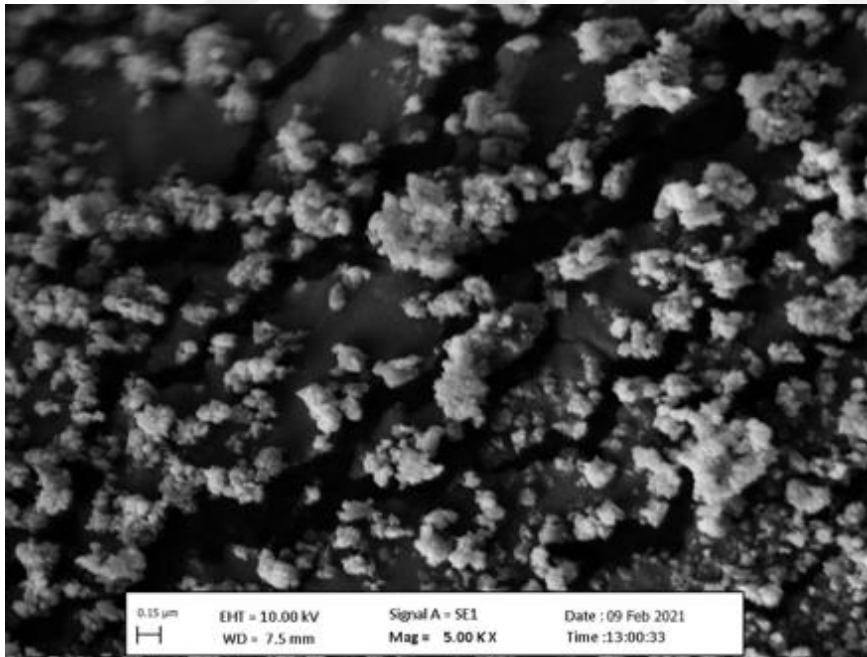
Şekil 4-40: Boş-NE550 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli

4.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.6.2'de anlatıldığı gibi KLN, NLT ve NE'ların taramalı elektron mikroskobu ile çalışıldı. KLN formülasyonlarına ait görüntüler Şekil 4-41 ve Şekil 4-42'de gösterilmektedir.

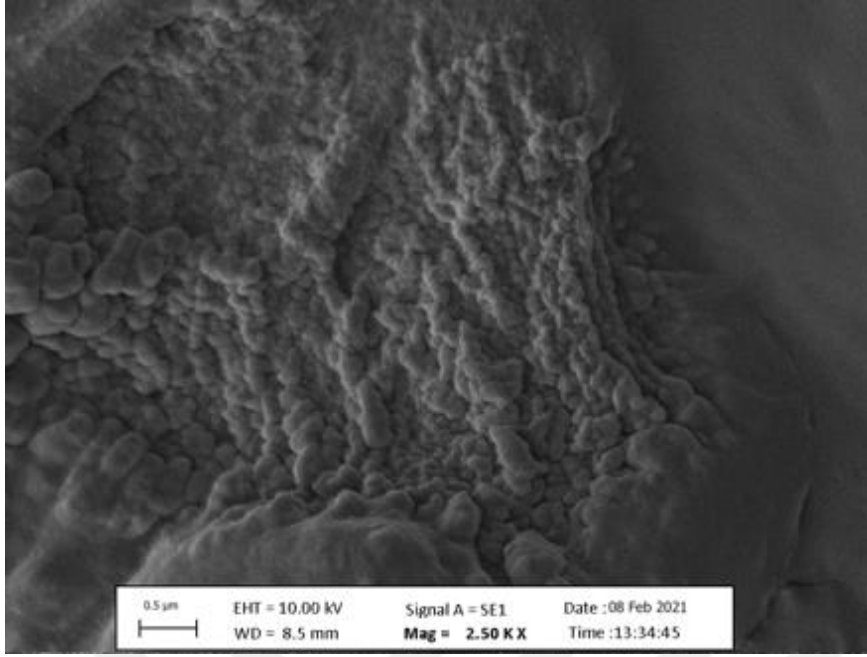


Şekil 4-41: KLN505 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (2500x)

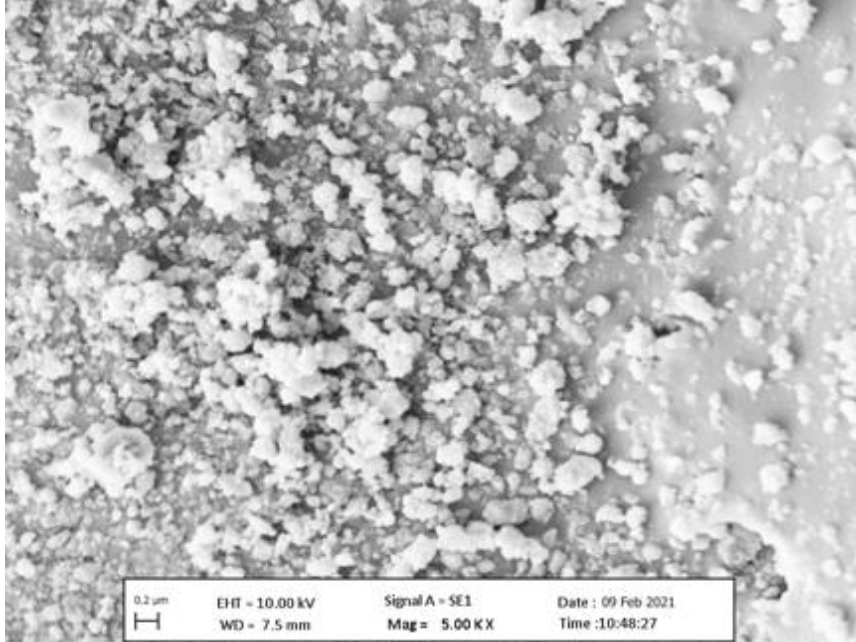


Şekil 4-42: KLN505 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (5000x)

NLT formülasyonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4-43 ve Şekil 4-44'de gösterilmektedir.

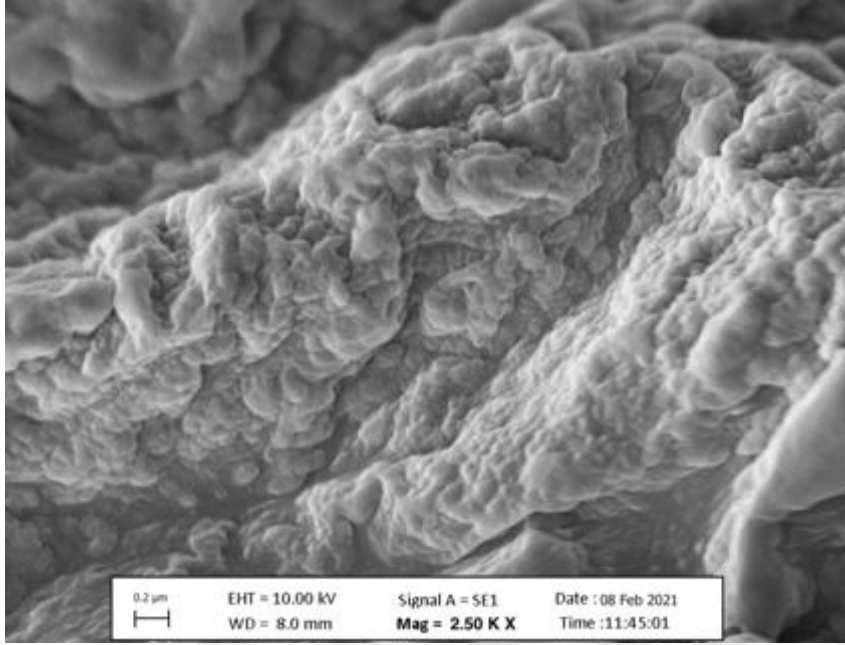


Şekil 4-43: NLT532 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (2500x)

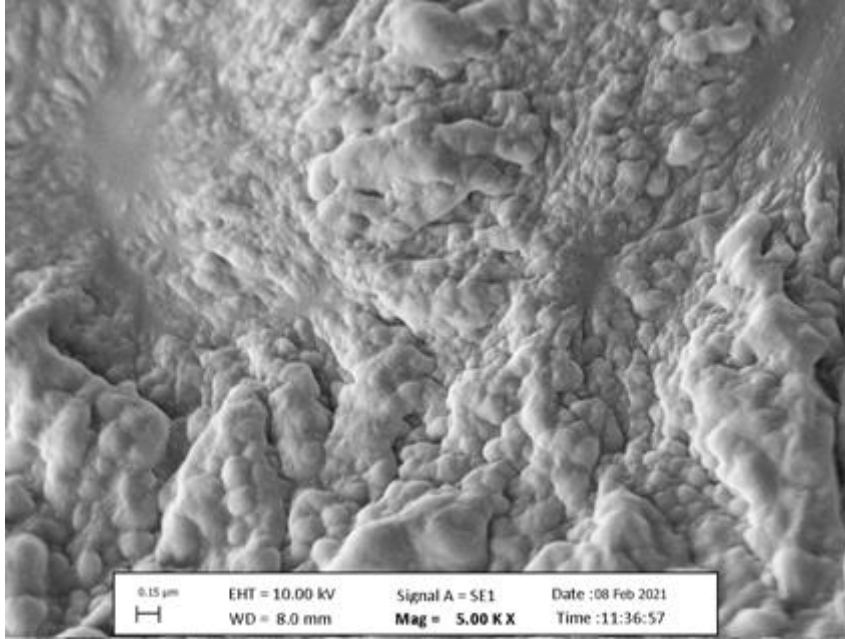


Şekil 4-44: NLT532 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (5000x)

NE formülasyonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4-45 ve Şekil 4-46'da gösterilmektedir.



Şekil 4-45: NE550 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (2500x)



Şekil 4-46: NE550 kodlu formülasyonun SEM görüntüsü (5000x)

4.6.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi Tayinine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.6.3'de anlatıldığı gibi çalışılarak, KLN, NLT ve NE'lara ait formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesi (YK) tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-36'da verilmektedir.

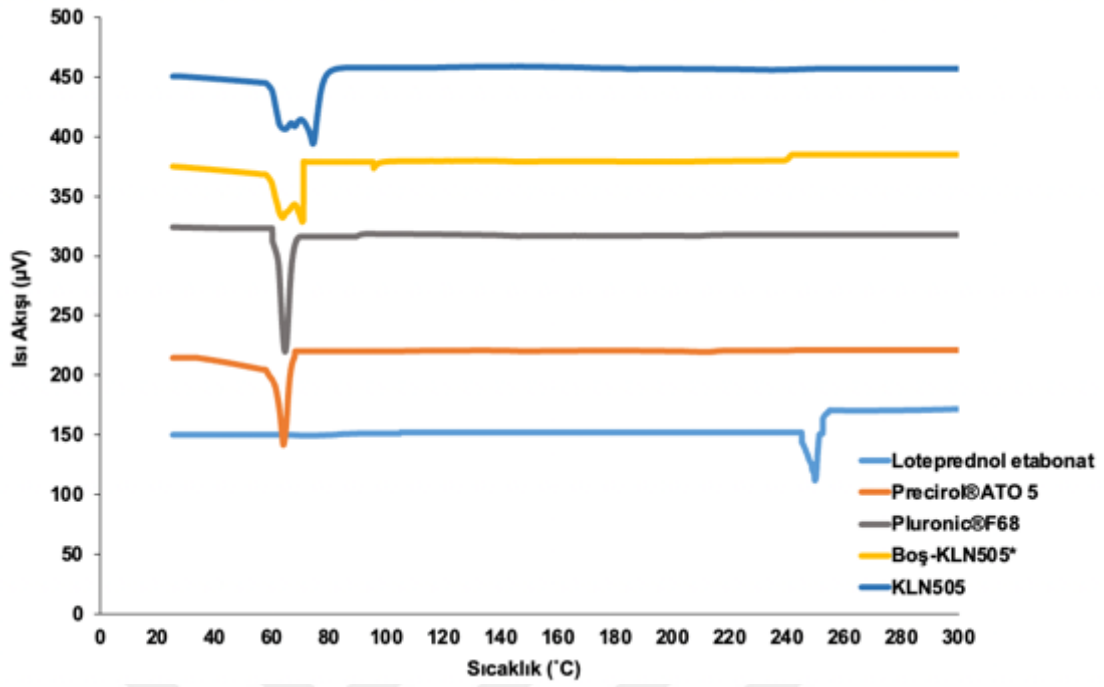
Tablo 4-36: Formülasyonların EE ve YK değerleri (n=3)

Formülasyon	EE (%)	SD (±)	RSD (%)	YK (%)	SD (±)	RSD (%)
KLN505	91,07	0,939	1,031	8,281	0,005	0,237
NLT532	92,23	1,182	1,281	8,384	0,005	0,233
NE550	89,17	1,170	1,312	8,106	0,001	0,054

Formülasyonların EE (%) ve YK (%) değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$)

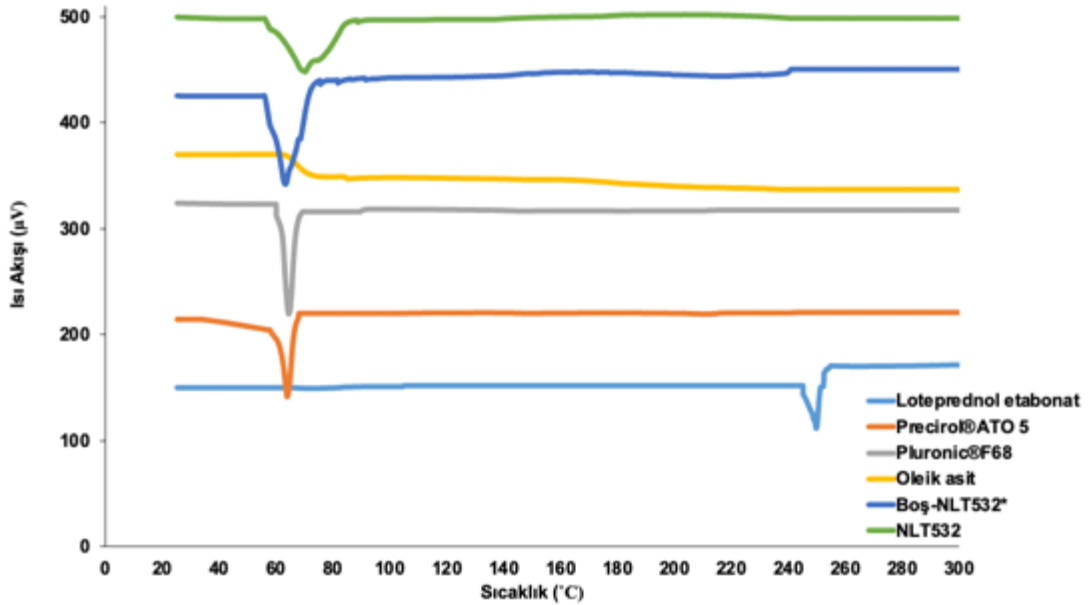
4.6.4. DSC Analizine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.6.4'de açıklandığı gibi yapılan çalışmaya ait elde edilen yüzey etkin madde, lipidler ve formülasyonların termogramları Şekil 4-47 - 4-49'da gösterilmektedir.



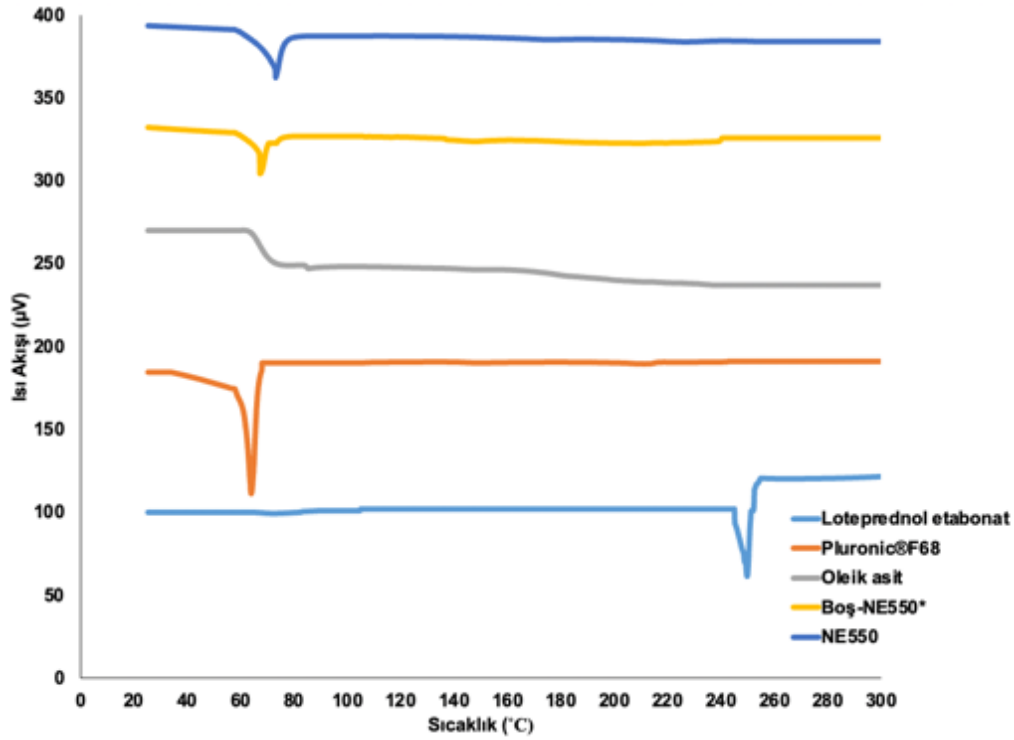
Şekil 4-47: KLN505 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait termogram

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.



Şekil 4-48: NLT532 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait termogram

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.



Şekil 4-49: NE550 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait termogram

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonu göstermektedir.

Formülasyonlara ait termogramlar ve erime entalpileri (ΔH) elde edildikten sonra, katı lipid ve katı lipid içeren formülasyonların (KLN505, Boş-KLN505, NLT532 ve Boş-NLT532) kristalizasyon dereceleri (%CI) Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı gibi hesaplanmış ve tabloda gösterilmektedir (Tablo 4-37).

Tablo 4-37: Katı lipid ve katı lipid içeren formülasyonların ΔH , erime derecesi ve %CI değerleri

Formülasyon	Sıcaklık (°C)	ΔH (J/g) $\pm SD$	Erime derecesi (°C) $\pm SD$	% CI $\pm SD$
Precirol® ATO 5	-	243,29 $\pm$ 2,46	63,16 $\pm$ 1,03	-
	5	19,19 $\pm$ 0,27	62,64 $\pm$ 0,29	49,13 $\pm$ 0,35
Boş-KLN505*	25	18,71 $\pm$ 0,83	62,41 $\pm$ 0,88	47,65 $\pm$ 1,01
	40	17,09 $\pm$ 0,16	62,23 $\pm$ 0,45	42,75 $\pm$ 0,29
	5	22,75 $\pm$ 0,96	64,32 $\pm$ 1,19	52,99 $\pm$ 1,04
KLN505	25	22,12 $\pm$ 0,58	64,19 $\pm$ 0,77	51,85 $\pm$ 0,69
	40	18,89 $\pm$ 0,85	64,06 $\pm$ 1,24	45,37 $\pm$ 1,06
	5	15,18 $\pm$ 0,36	59,89 $\pm$ 0,4	38,61 $\pm$ 0,53
Boş-NLT532*	25	15,06 $\pm$ 0,43	59,32 $\pm$ 1,16	38,29 $\pm$ 0,66
	40	12,23 $\pm$ 0,17	59,74 $\pm$ 1,47	30,53 $\pm$ 0,41
	5	15,56 $\pm$ 0,88	60,54 $\pm$ 1,72	39,81 $\pm$ 1,02
NLT532	25	15,27 $\pm$ 0,51	60,43 $\pm$ 0,99	39,05 $\pm$ 0,79
	40	12,81 $\pm$ 0,95	60,12 $\pm$ 1,22	32,75 $\pm$ 1,15

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonları göstermektedir.

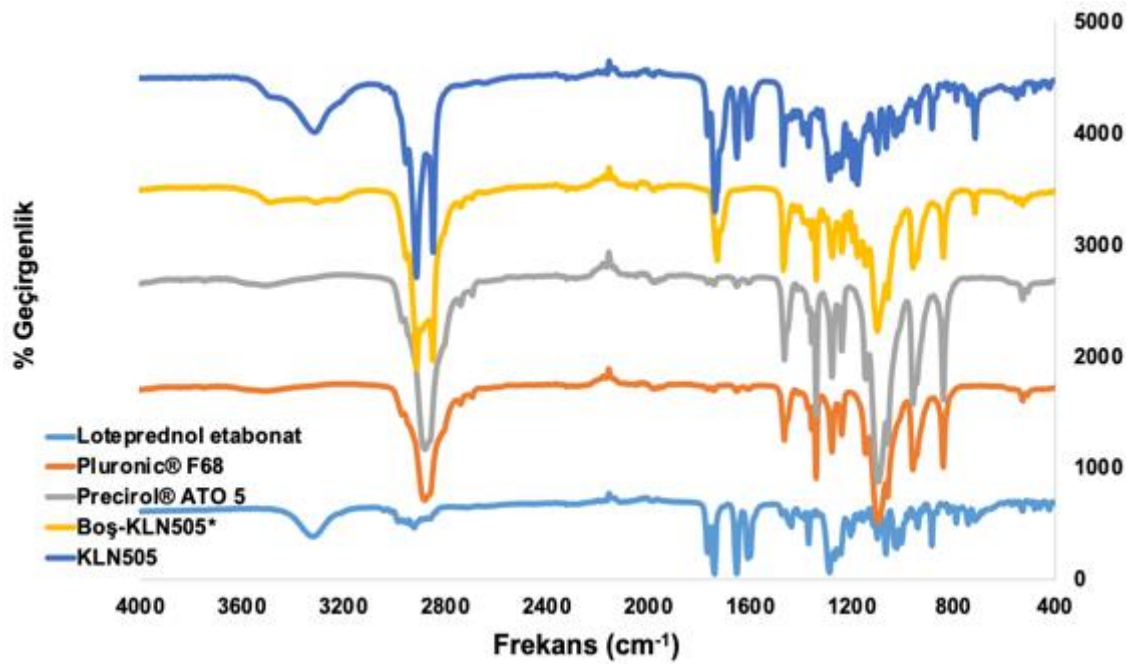
Tablo 4-38: KLN ve NLT formülasyonlarının kristalizasyonlarının (%CI) istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Formülasyonlar	Anlamlılık
5°C	Boş-KLN505* - KLN505	$p > 0,05$
	Boş-KLN505* - Boş-NLT532*	$p \leq 0,05$
	Boş-KLN505* - NLT532	$p > 0,05$
	KLN505 - Boş-NLT532*	$p \leq 0,05$
	KLN505 - NLT532	$p \leq 0,05$
25°C	Boş-NLT532* - NLT532	$p > 0,05$
	Boş-KLN505* - KLN505	$p > 0,05$
	BOŞ-KLN505* - Boş-NLT532*	$p \leq 0,05$
	Boş-KLN505* - NLT532	$p > 0,05$
	KLN505 - Boş-NLT532*	$p \leq 0,05$
40°C	KLN505 - NLT532	$p \leq 0,05$
	Boş-NLT532* - NLT532	$p > 0,05$
	Boş-KLN505* - KLN505	$p > 0,05$
	Boş-KLN505* - Boş-NLT532*	$p \leq 0,05$
	BOŞ-KLN505* - NLT532	$p > 0,05$
	KLN505 - Boş-NLT532*	$p \leq 0,05$
	KLN505 - NLT532	$p \leq 0,05$
	Boş-NLT532* - NLT532	$p > 0,05$

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonları göstermektedir.

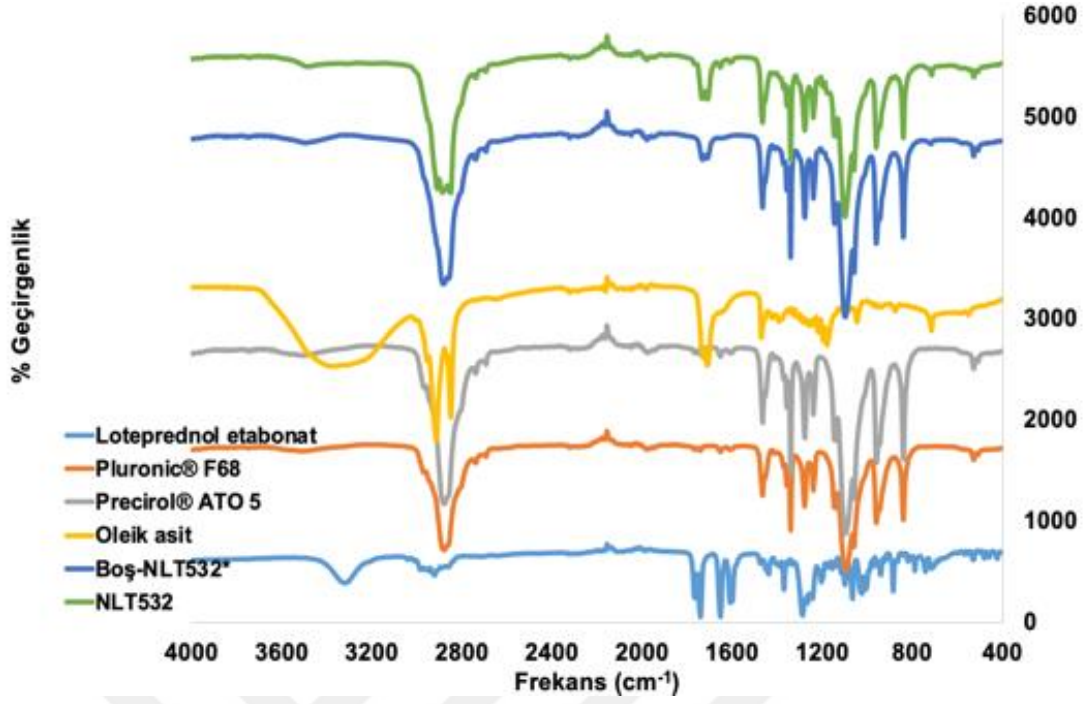
4.6.5. FT-IR Analizi

Seçilen formülasyonlar ve bileşenlerine ait FT-IR analizleri Bölüm 3.2.6.5'te anlatıldığı gibi yapılmış, spektrumları içeren sonuçlar Şekil 4-50 - 4-52'de gösterilmektedir.



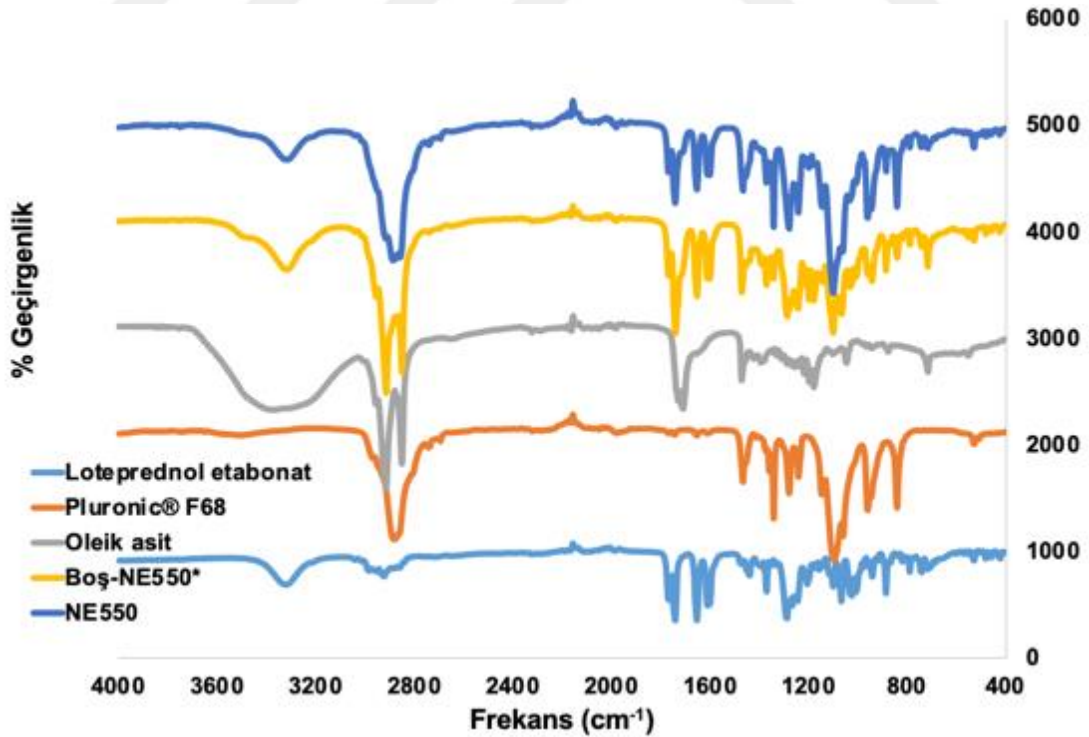
Şekil 4-50: KLN505 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait spektrum

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonları göstermektedir.



Şekil 4-51: NLT532 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait spektrum

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonları göstermektedir



Şekil 4-52: NE550 kodlu formülasyon ve bileşenlerine ait spektrum

* LE yüklü olmadan hazırlanan formülasyonları göstermektedir.

4.6.6. Viskozite ve pH Analizine Ait Bulgular

KLN505, NLT532, NE550, hazırlanan kontrol grubu formülasyonu ve piyasa preparatına ait viskozite ve pH ölçümleri Bölüm 3.2.6.6’da bahsedildiği şekilde yapıldı ve çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4-39’da verilmektedir.

Tablo 4-39: Formülasyonlara ait viskozite ve pH ölçüm sonuçları (n=3)

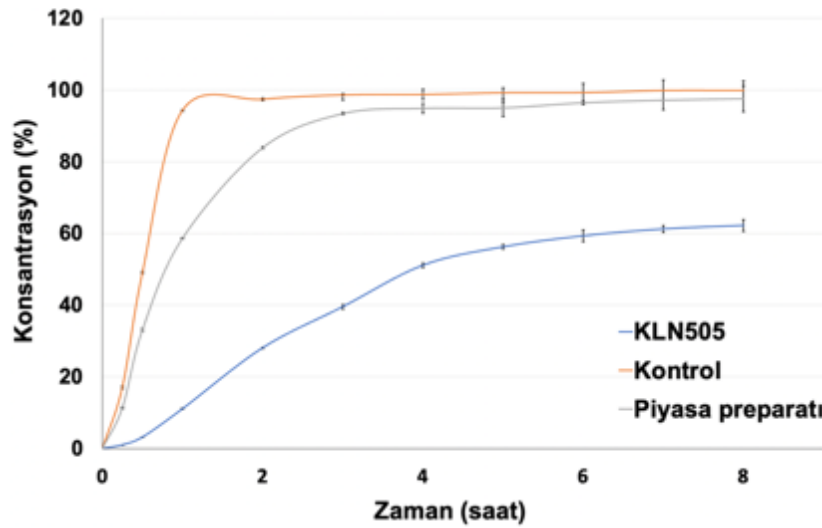
	Viskozite (cP)	SD (±)	pH	SD (±)
KLN505	18,299	0,015	6,903	0,073
NLT532	17,228	0,008	6,799	0,039
NE550	17,117	0,023	6,836	0,102
Kontrol	18,241	0,019	6,927	0,005
Piyasa preparatı	19,016	0,028	6,819	0,036

4.6.7. *İn vitro* Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Seçilen formülasyonların (KLN505, NLT532 ve NE550) *in vitro* salım çalışması Bölüm 3.2.6.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleşti. Kontrol grubu, piyasa preparatı ve formülasyon KLN505’den salınan % LE miktarı Tablo 4-40 ve Şekil 4-53’de verilmektedir.

Tablo 4-40: KLN505 kodlu formülasyondan LE'in salımı (n=6)

Zaman (saat)	Kontrol grubu		Piyasa preparatı		KLN505	
	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Konsantrasyon (%)	SD (±)
0,25	17,104	0,225	11,328	0,107	1,044	0,152
0,5	49,001	0,351	33,074	0,041	3,187	0,354
1	94,348	0,177	58,635	0,153	11,08	0,177
2	97,401	0,314	83,901	0,269	28,076	0,314
3	98,6	0,366	93,41	0,4	39,533	0,366
4	98,728	1,395	94,882	1,576	51,101	0,995
5	99,19	1,452	95,013	2,607	56,218	0,452
6	99,247	2,537	96,442	0,648	59,288	1,537
7	99,839	2,663	97,159	2,634	61,203	0,963
8	99,845	2,609	97,553	3,55	62,199	1,609

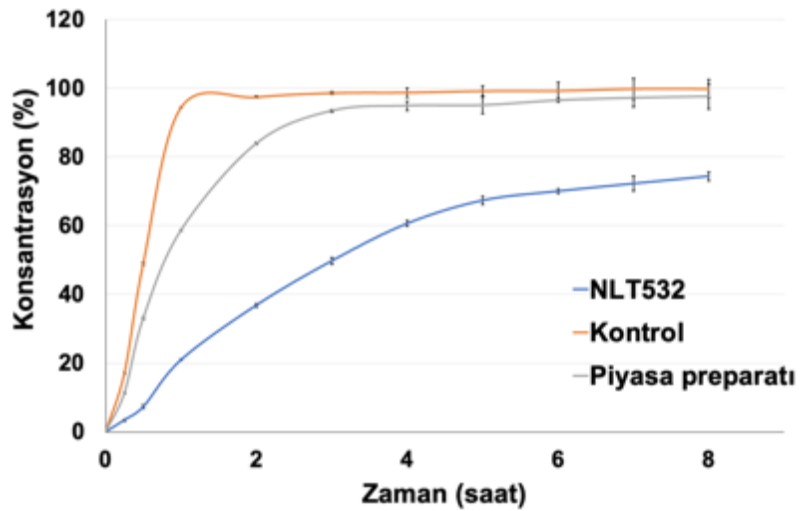


Şekil 4-53: KLN505 kodlu formülasyona ait salım profili

NLT532, Kontrol grubu ve piyasa preparatından salınan % LE miktarı Tablo 4-41 ve Şekil 4-54'de verilmektedir.

Tablo 4-41: NLT532 kodlu formülasyondan LE'nin salımı (n=6)

Zaman (saat)	Kontrol grubu		Piyasa preparatı		NLT532	
	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Konsantrasyon (%)	SD (±)
0,25	17,104	0,225	11,328	0,107	3,469	0,311
0,5	49,001	0,351	33,074	0,041	7,302	0,544
1	94,348	0,177	58,635	0,153	20,935	0,228
2	97,401	0,314	83,901	0,269	36,851	0,558
3	98,6	0,366	93,41	0,4	49,744	1,039
4	98,728	1,395	94,882	1,576	60,607	0,803
5	99,19	1,452	95,013	2,607	67,319	1,206
6	99,247	2,537	96,442	0,648	70,013	0,689
7	99,839	2,663	97,159	2,634	72,221	2,117
8	99,845	2,609	97,553	3,55	74,366	1,325G

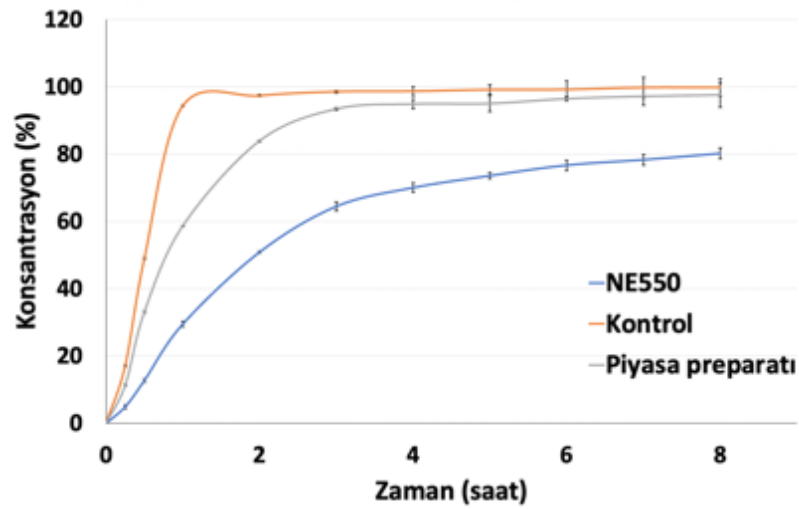


Şekil 4-54: NLT532 kodlu formülasyona ait salım profili

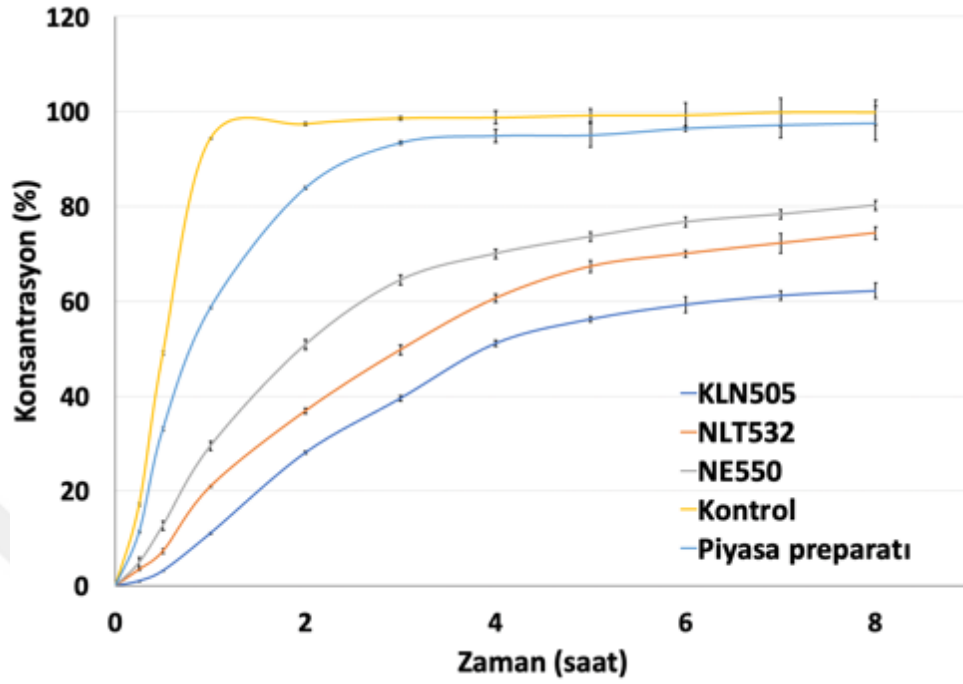
Kontrol grubu, piyasa preparatı ve NE550'den salınan % LE miktarı Tablo 4-42 ve Şekil 4-55'de verilmektedir.

Tablo 4-42: NE550 kodlu formülasyonundan LE'in salımı (n=6)

Zaman (saat)	Kontrol grubu		Piyasa preparatı		NE550	
	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Konsantrasyon (%)	SD (±)
0,25	17,104	0,225	11,328	0,107	4,926	0,552
0,5	49,001	0,351	33,074	0,041	12,709	0,504
1	94,348	0,177	58,635	0,153	29,464	0,768
2	97,401	0,314	83,901	0,269	50,581	0,314
3	98,6	0,366	93,41	0,4	64,459	1,366
4	98,728	1,395	94,882	1,576	70,018	1,394
5	99,19	1,452	95,013	2,607	73,577	0,995
6	99,247	2,537	96,442	0,648	76,704	1,536
7	99,839	2,663	97,159	2,634	78,316	1,662
8	99,845	2,609	97,553	3,55	80,208	1,611



Şekil 4-55: NE550 kodlu formülasyonuna ait salım profili



Şekil 4-56: Formülasyonlara ait *in vitro* salım profili

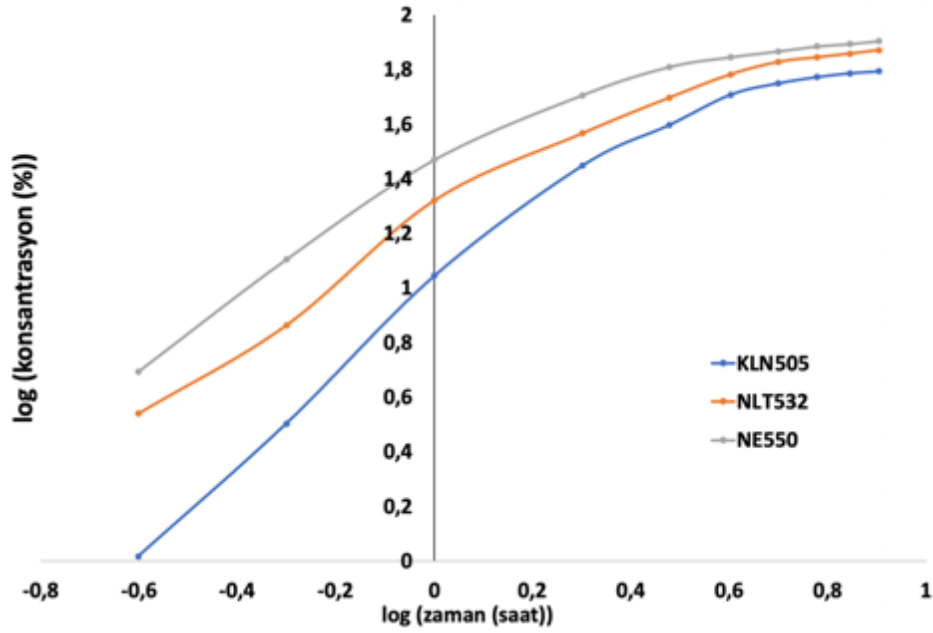
Tablo 4-43: Formülasyonların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

Formülasyon	Anlamlılık	Formülasyon	Anlamlılık
KLN505 - NLT532	$p \leq 0.05$	NLT532 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - NE550	$p \leq 0.05$	NLT532 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
KLN505 - Kontrol	$p \leq 0.05$	NE550 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$	NE550 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
NLT532 - NE550	$p \leq 0.05$	Kontrol - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$

Salım modellerine ait hesaplamalar Bölüm 3.2.6.9'da verilen denklemler kullanılarak Tablo 4-44'de ve salım kinetiğine ait grafik Şekil 4-57'de verilmektedir.

Tablo 4-44: *In vitro* salım çalışması sonuçlarına göre formülasyonların salım kinetikleri

Kinetik model		Formülasyonlar				
		KLN505	NLT532	NE550	Kontrol	Piyasa preparatı
Sıfırıncı derece	k_0	9,4393	8,3437	9,2581	8,9763	6,6684
	r^2	0,9001	0,8932	0,8167	0,6385	0,4182
Birinci derece	k_1	0,4681	0,5254	0,5479	0,4857	0,5863
	r^2	0,9548	0,9734	0,9858	0,7646	0,9387
Higuchi	D	29,5971	32,9374	33,4654	26,4182	33,9092
	r^2	0,9718	0,9742	0,9339	0,5766	0,7996
Hixson Crowell	k_h	2,8128	3,1144	3,0861	2,9921	2,2227
	r^2	0,9001	0,8932	0,8167	0,6385	0,4182
Korsmeyer peppas	n	0,7481	0,6906	0,3882	0,4016	0,5444
	r^2	0,9741	0,9819	0,9882	0,6918	0,8363

Şekil 4-57: LE'ın KLN505, NLT532 ve NE550'den Korsmeyer Peppas eşitliğine göre *in vitro* salım profili

Bölüm 3.2.6.7.'de anlatıldığı gibi *in vitro* salım çalışması yapılan formülasyonların 8. saate kadar reseptör faza geçen etkin madde konsantrasyonu hesaplandı ve 15. dakikaya kadar olan süre "gecikme zamanı" olarak tespit edildi. 15.dakika da dahil olmak üzere 2. saate kadar olan değerler hesaba katılıp denge durumundaki akı (Jss) ve geçirgenlik katsayısına (P) ait bulgular Tablo 4-45'de verilmektedir.

Tablo 4-45: *İn vitro* salım çalışmasına ait akı ve permeasyon katsayısına ait sonuçlar (n=6)

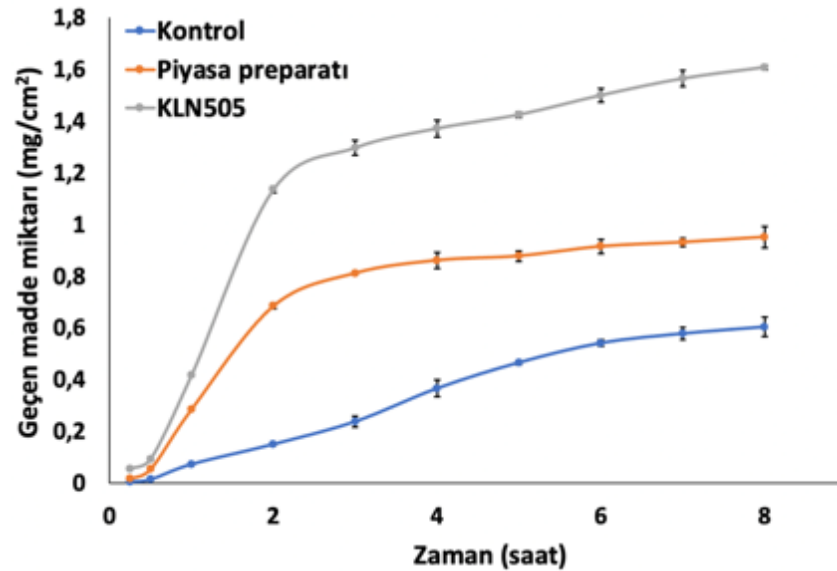
Formülasyon	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Jss (mg/cm ² .saat)	SD (±)	P (cm/saat)	SD (±)
KLN505	62,199	1,019	0,279	0,021	0,1085	0,0027
NLT532	74,366	0,861	0,311	0,005	0,1388	0,0053
NE550	80,208	0,703	0,318	0,012	0,1676	0,0092
Kontrol	99,845	1,719	0,379	0,048	0,8756	0,0224
Piyasa preparatı	97,553	1,515	0,324	0,027	0,7417	0,0101

4.6.8. *Ex vivo* Korneadan Geçiş Çalışmasına Ait Bulgular

Çapları ortalama $2.191 \pm 0,073$ cm olarak ölçülen kornealarla, Bölüm 3.2.6.8'de anlatıldığı gibi çalışılarak formülasyonların (KLN505, NLT532 ve NE550) *ex vivo* korneadan geçiş çalışmaları yapıldı. Kontrol grubu, piyasa preparatı ve formülasyon KLN505'den salınan kümülatif LE miktarı Tablo 4-46 ve Şekil 4-58'de verilmektedir.

Tablo 4-46: KLN505 kodlu formülasyondan LE'in salımı (n=3)

Zaman (saat)	Kontrol grubu		Piyasa preparatı		KLN505	
	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)
0,25	0,0015	0,0003	0,0026	0,0004	0,0089	0,0011
0,5	0,0068	0,0009	0,0112	0,0006	0,0237	0,0068
1	0,0246	0,0014	0,0563	0,0049	0,0896	0,0064
2	0,0609	0,0027	0,1644	0,0112	0,2686	0,0115
3	0,1206	0,0203	0,2924	0,0076	0,4731	0,0282
4	0,2008	0,0334	0,4283	0,0315	0,6893	0,0327
5	0,2964	0,0092	0,5668	0,0202	0,9139	0,0103
6	0,4034	0,0119	0,7111	0,0283	1,1503	0,0259
7	0,5199	0,0228	0,8596	0,0155	1,3971	0,0319
8	0,6426	0,0382	1,0128	0,0407	1,6505	0,0088

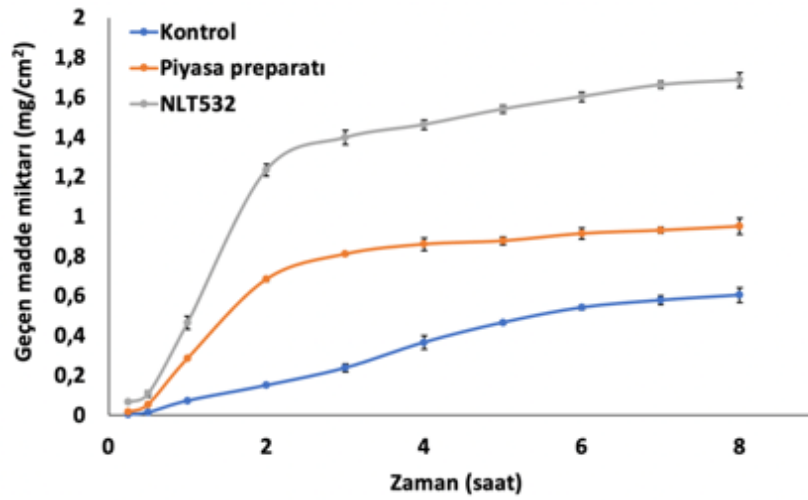


Şekil 4-58: KLN505 kodlu formülasyona ait ex vivo salım profili

Kontrol grubu, piyasa preparatı ve formülasyon NLT532'den salınan kümülatif LE miktarı Tablo 4-47 ve Şekil 4-59'da verilmektedir.

Tablo 4-47: NLT532 kodlu formülasyondan LE'in salımı (n=3)

Zaman (saat)	Kontrol grubu		Piyasa preparatı		NLT532	
	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)
0,25	0,0015	0,0003	0,0026	0,0004	0,0681	0,0012
0,5	0,0068	0,0009	0,0112	0,0006	0,1084	0,0016
1	0,0246	0,0014	0,0563	0,0049	0,4659	0,0322
2	0,0609	0,0027	0,1644	0,0112	1,2349	0,0297
3	0,1206	0,0203	0,2924	0,0076	1,3981	0,0352
4	0,2008	0,0334	0,4283	0,0315	1,4632	0,0245
5	0,2964	0,0092	0,5668	0,0202	1,5414	0,0196
6	0,4034	0,0119	0,7111	0,0283	1,6037	0,0238
7	0,5199	0,0228	0,8596	0,0155	1,6632	0,0181
8	0,6426	0,0382	1,0128	0,0407	1,6875	0,0365

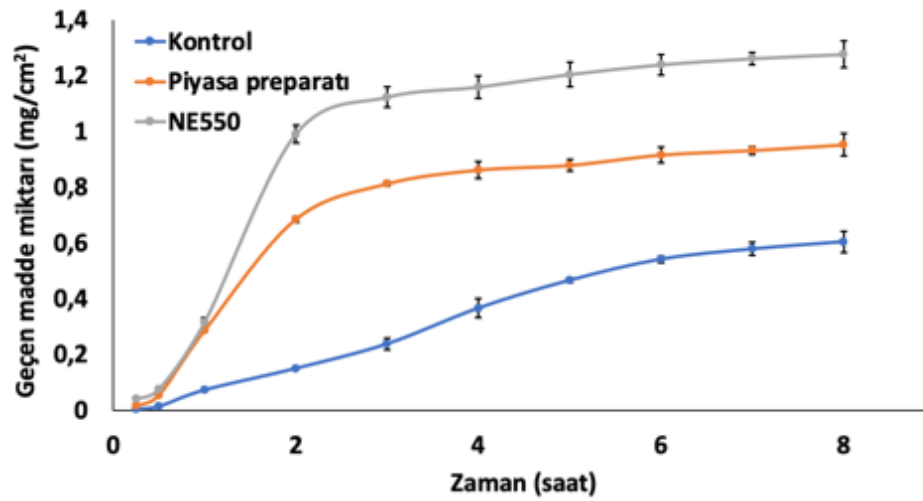


Şekil 4-59: NLT532 kodlu formülasyonun ait ex vivo salım profili

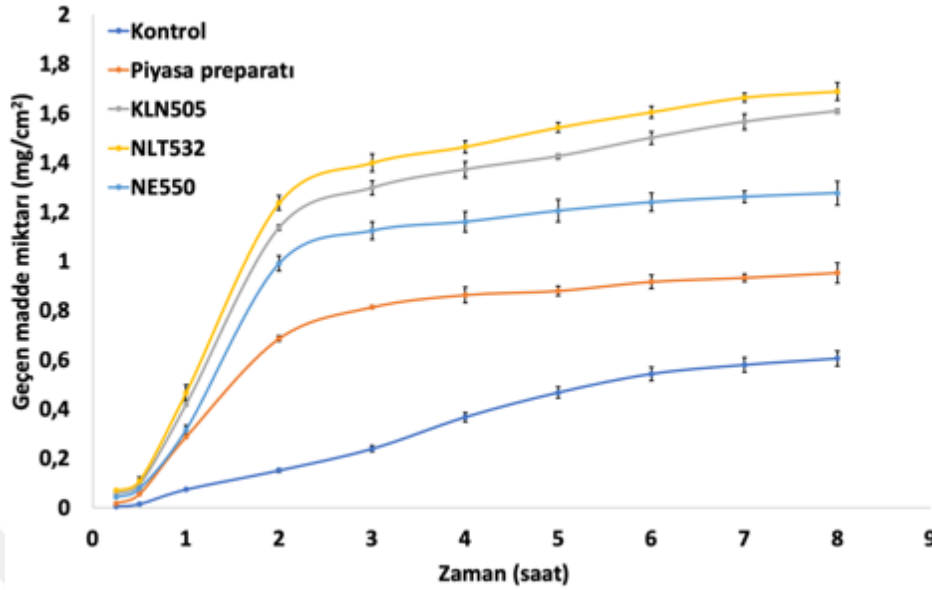
Kontrol grubu, piyasa preparatı ve formülasyon NE550'den salınan kümülatif LE miktarı Tablo 4-48 ve Şekil 4-60'da verilmektedir.

Tablo 4-48: NE550 kodlu formülasyondan LE'ın salımı (n=3)

Zaman (saat)	Kontrol grubu		Piyasa preparatı		NE550	
	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)	Konsantrasyon (mg/cm ²)	SD (±)
0,25	0,0015	0,0003	0,0026	0,0004	0,0414	0,0009
0,5	0,0068	0,0009	0,0112	0,0006	0,0764	0,0014
1	0,0246	0,0014	0,0563	0,0049	0,3159	0,0168
2	0,0609	0,0027	0,1644	0,0112	0,9901	0,0314
3	0,1206	0,0203	0,2924	0,0076	1,1228	0,0366
4	0,2008	0,0334	0,4283	0,0315	1,1589	0,0411
5	0,2964	0,0092	0,5668	0,0202	1,2037	0,0452
6	0,4034	0,0119	0,7111	0,0283	1,2385	0,0368
7	0,5199	0,0228	0,8596	0,0155	1,2604	0,0232
8	0,6426	0,0382	1,0128	0,0407	1,2756	0,0482



Şekil 4-60: NE550 kodlu formülasyonun ait ex vivo salım profili



Şekil 4-61: KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonların *ex vivo* salım profili

Tablo 4-49: Formülasyonların *ex vivo* salım sonuçlarının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

Formülasyon	Anlamlılık	Formülasyon	Anlamlılık
KLN505 - NLT532	$p \leq 0.05$	NLT532 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - NE550	$p \leq 0.05$	NLT532 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
KLN505 - Kontrol	$p \leq 0.05$	NE550 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$	NE550 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
NLT532 - NE550	$p \leq 0.05$	Kontrol -Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$

Kolloidal lipit taşı ait formülasyonların (KLN505, NLT532 ve NE550) 20. dakikaya kadar geçen süre "gecikme zamanı (lag time)" olarak tespit edilmiş ve 20. dakika da dahil olmak üzere 2. saate kadar olan değerler alınarak, determinasyon katsayısı (r^2), akı (flux), permeasyon katsayısı ve 8. saate kadar geçen kümülatif etkin madde konsantrasyonuna ait sonuçlar Tablo 4-50'de verilmektedir. *Ex vivo* salım modellerine ait hesaplamalar Tablo 4-51'de ve salım kinetiğine ait grafik Şekil 4-62'de gösterilmektedir.

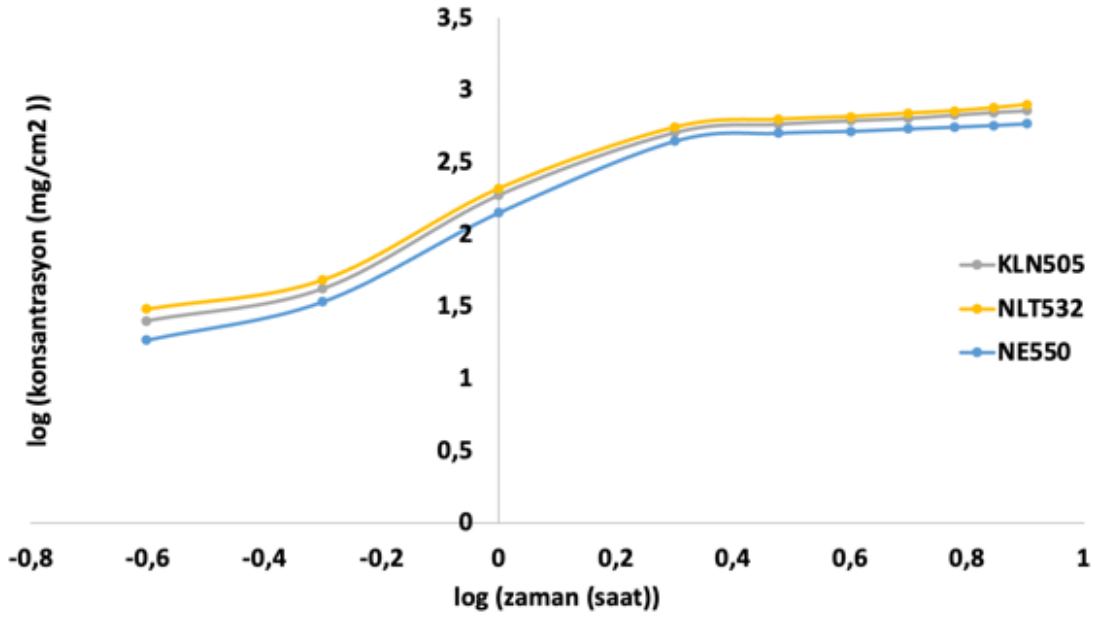
Tablo 4-50: Ex vivo salım çalışmasına ait akı ve permeasyon katsayısına ait sonuçlar (n=3)

Formülasyon	Konsantrasyon (%)	SD (±)	Jss (mg/cm ² .saat)	SD (±)	P (cm/saat)	SD (±)
KLN505	39,402	0,103	0,196	0,004	0,0643	0,0087
NLT532	54,141	0,411	0,206	0,001	0,0684	0,0029
NE550	50,778	0,482	0,158	0,003	0,0635	0,0068
Kontrol	18,704	0,202	0,085	0,001	0,0255	0,0006
Piyasa preparatı	28,692	0,769	0,117	0,004	0,0419	0,0025

Salım modellerine ait hesaplamalar Bölüm 3.2.6.8'de verilen denklemler kullanılarak Tablo 4-49'da ve salım kinetiğine ait grafik Şekil 4-61'de verilmektedir.

Tablo 4-51: Ex vivo salım çalışması sonuçlarına göre formülasyonların salım kinetikleri

Kinetik model		Formülasyonlar				
		KLN505	NLT532	NE550	Kontrol	Piyasa preparatı
Sıfırıncı derece	k ₀	0,8764	0,9459	0,7147	0,4699	0,5298
	r ²	0,7866	0,7931	0,7439	0,9809	0,7666
Birinci derece	k ₁	0,5211	0,5605	0,4327	0,4522	0,3195
	r ²	0,9584	0,9598	0,9397	0,9134	0,9611
Higuchi	D	3,4865	3,7554	2,8706	1,5994	1,9317
	r ²	0,9052	0,9091	0,8728	0,9893	0,8944
Hixson Crowell	k _h	0,3464	0,3209	0,2617	0,1567	0,1766
	r ²	0,7931	0,7864	0,7439	0,9632	0,7666
Korsmeyer peppas	n	0,7155	0,7002	0,4378	0,2491	0,5663
	r ²	0,9718	0,9884	0,9665	0,9638	0,8883



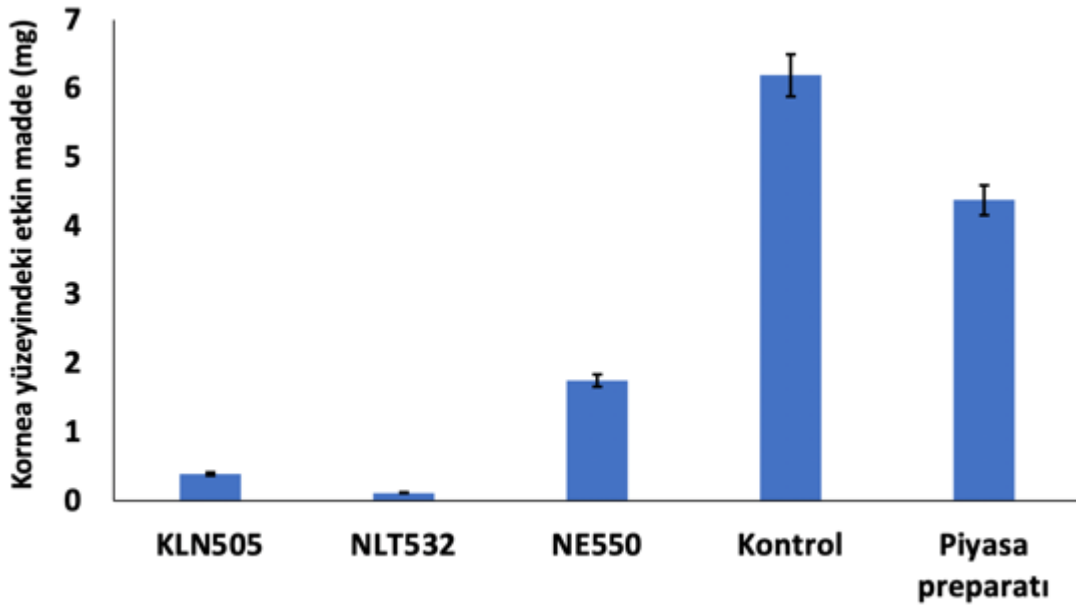
Şekil 4-62: LE'nin KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonlardan Korsmeyer Peppas eşitliğine göre ex vivo salımı

4.6.9. Bant Sıyırma Testi ve Korneada İlaç Tutma Tayinine Ait Bulgular

Ex vivo deriden geçiş çalışması sonrası Bölüm 3.2.6.10'da anlatıldığı gibi Bant sıyırma testi ile elde edilen etkin madde miktarına ait bulgular Tablo 4-52'de ve grafik Şekil 4-63'de gösterilmektedir.

Tablo 4-52: Bant sıyırma testi sonrası tespit edilen LE miktarı (n=3)

	KLN505	NLT532	NE550	Kontrol	Piyasa preparatı
Madde miktarı (mg)	0,3913	0,1146	1,7573	6,1944	4,3815
SD (±)	0,0107	0,0093	0,0388	0,0759	0,0447



Şekil 4-63: Bant sıyırma testi sonrası tespit edilen LE miktarı

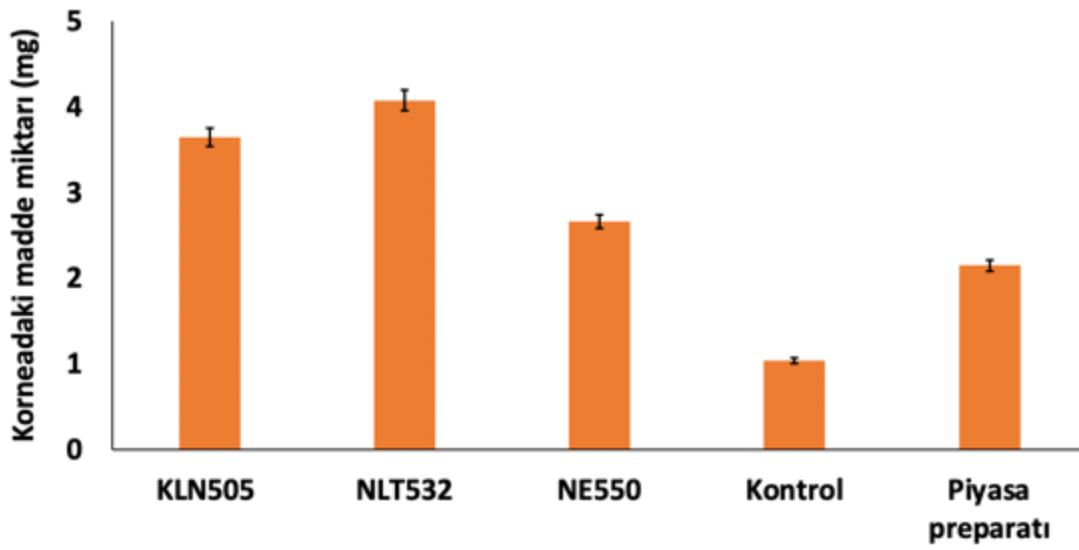
Tablo 4-53: Bant sıyırma testi sonrası formülasyonlar arası anlamlılık derecesine ait sonuçlar

Formülasyonlar	Anlamlılık	Formülasyonlar	Anlamlılık
KLN505 - NLT532	$p \leq 0.05$	NLT532 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - NE550	$p \leq 0.05$	NLT532 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
KLN505 - Kontrol	$p \leq 0.05$	NE550 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$	NE550 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
NLT532 - NE550	$p \leq 0.05$	Kontrol - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$

Bant sıyırma çalışması sonrası Bölüm 3.2.6.10’da anlatıldığı gibi korneada ilaç tutma tayini ile elde edilen etkin madde miktarına ait bulgular Tablo 4-54’de ve grafik Şekil 4-64’de gösterilmektedir

Tablo 4-54: Korneanın homojenizasyonu çalışması sonrası korneada tespit edilen LE miktarı

	KLN505	NLT532	NE550	Kontrol	Piyasa preparatı
Madde miktarı (mg)	3,6483	4,0772	2,6653	1,0341	2,1488
SD (±)	0,0401	0,0259	0,0202	0,0102	0,0339



Şekil 4-64: Korneada tutulan LE miktarı

Tablo 4-55: Korneada tutulan LE miktarlarına göre formülasyonlar arası anlamlılık derecesine ait sonuçlar

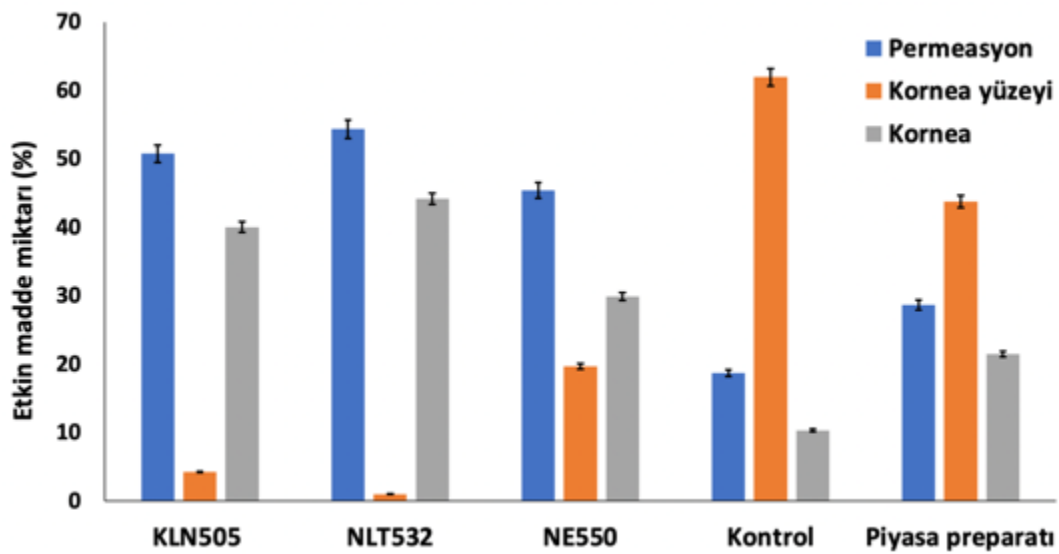
Formülasyon	Anlamlılık	Formülasyon	Anlamlılık
KLN505 - NLT532	$p > 0.05$	NLT532 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - NE550	$p \leq 0.05$	NLT532 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$
KLN505 - Kontrol	$p \leq 0.05$	NE550 - Kontrol	$p \leq 0.05$
KLN505 - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$	NE550 - Piyasa preparatı	$p > 0.05$
NLT532 - NE550	$p \leq 0.05$	Kontrol - Piyasa preparatı	$p \leq 0.05$

Ex vivo geçiş, bant sıyırma ve korneanın homojenizasyonu çalışmaları sonucunda formölasyonlara ait LE miktarlarının % cinsinden dağılım sonuçları Tablo 4-56’de ve grafik şekil 4-65’de gösterilmektedir.

Tablo 4-56: Formölasyonlardan salımı yapılan LE miktarının dağılımına ait sonuçlar

	Permeasyon* (%)	SD (±)	Kornea yüzeyi (%)	SD (±)	Kornea (%)	SD (±)
KLN505	50,777	0,068	4,288	0,129	40,061	0,157
NLT532	54,382	0,177	1,027	0,038	44,205	0,103
NE550	45,401	0,109	19,711	0,192	29,899	0,205
Kontrol	18,704	0,095	61,965	0,049	10,341	0,059
Piyasa preparatı	28,690	0,115	43,811	0,225	21,482	0,173

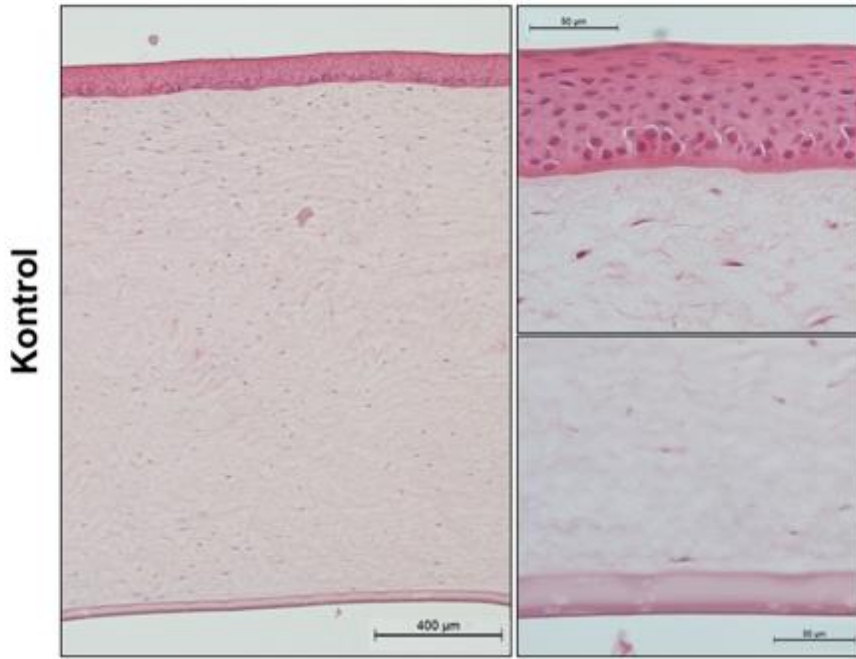
**Ex vivo* alışma sonrası reseptör faza geçen kümölatif etkin madde miktarını ifade etmektedir.



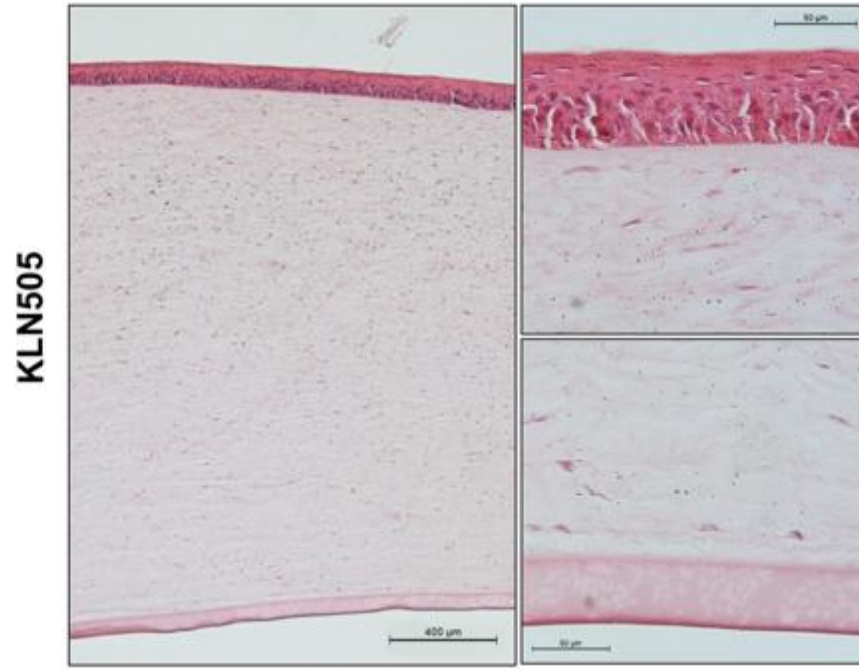
şekil 4-65: LE miktarının % olarak dağılımı

4.6.10. Korneaların Histopatolojik İncelenmesine Ait Bulgular

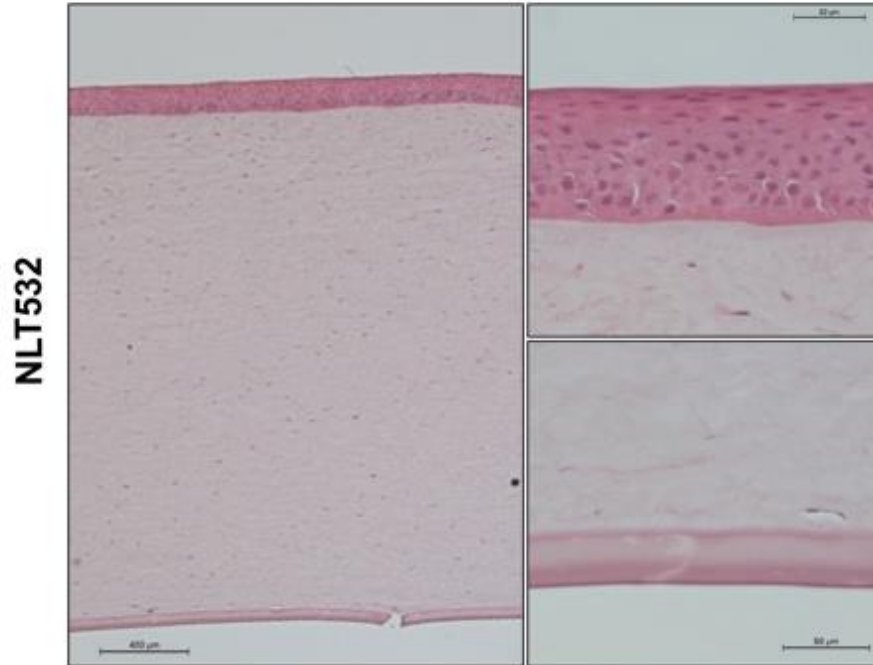
Korneaların histopatolojik açıdan incelenmesi Bölüm 3.2.6.11’de belirtildiği şekilde yapıldı. İncelemeye ait mikroskop görüntüleri Şekil 4-66 - 4-70 arasında gösterilmektedir.



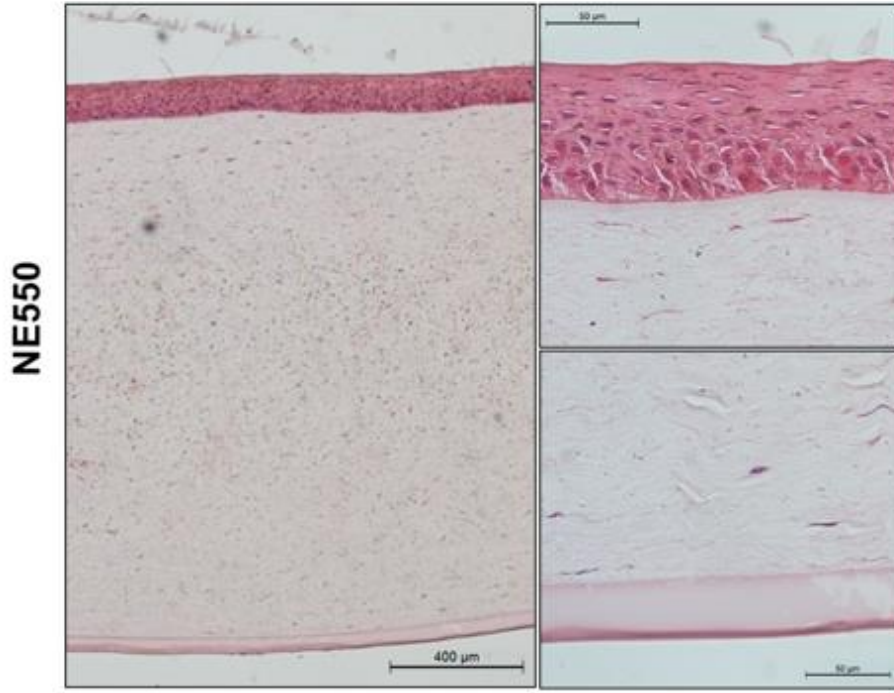
Şekil 4-66: Kontrol grubundaki korneaya ait mikroskop görüntüsü



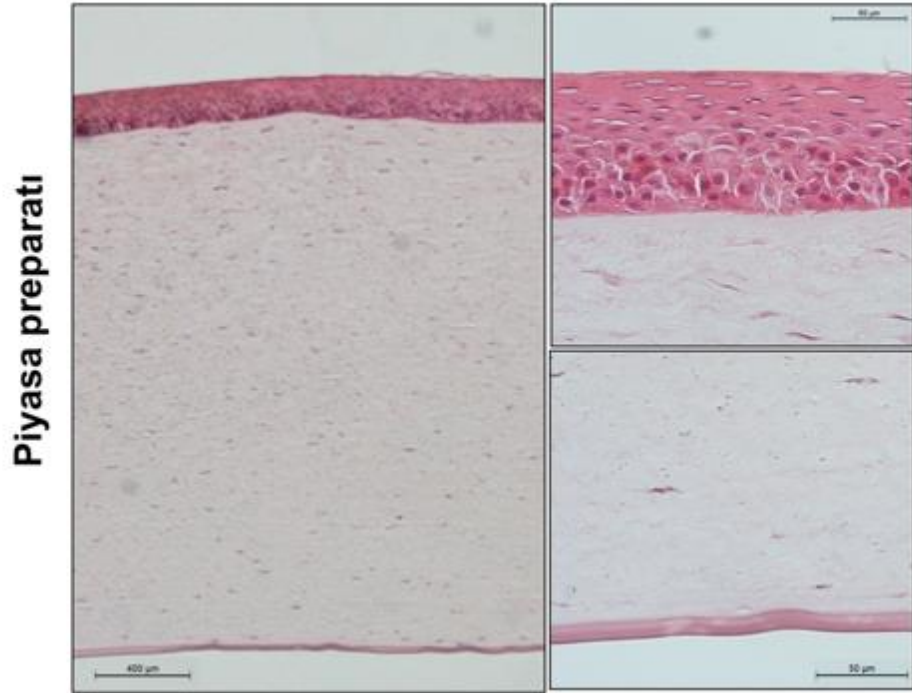
Şekil 4-67: KLN505 kodlu formülasyon ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü



Şekil 4-68: NLT532 kodlu formülasyon ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü



Şekil 4-69: NE550 kodlu formülasyon ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü



Şekil 4-70: Piyasa preparatı ile muamele edilen korneaya ait mikroskop görüntüsü

4.6.11. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

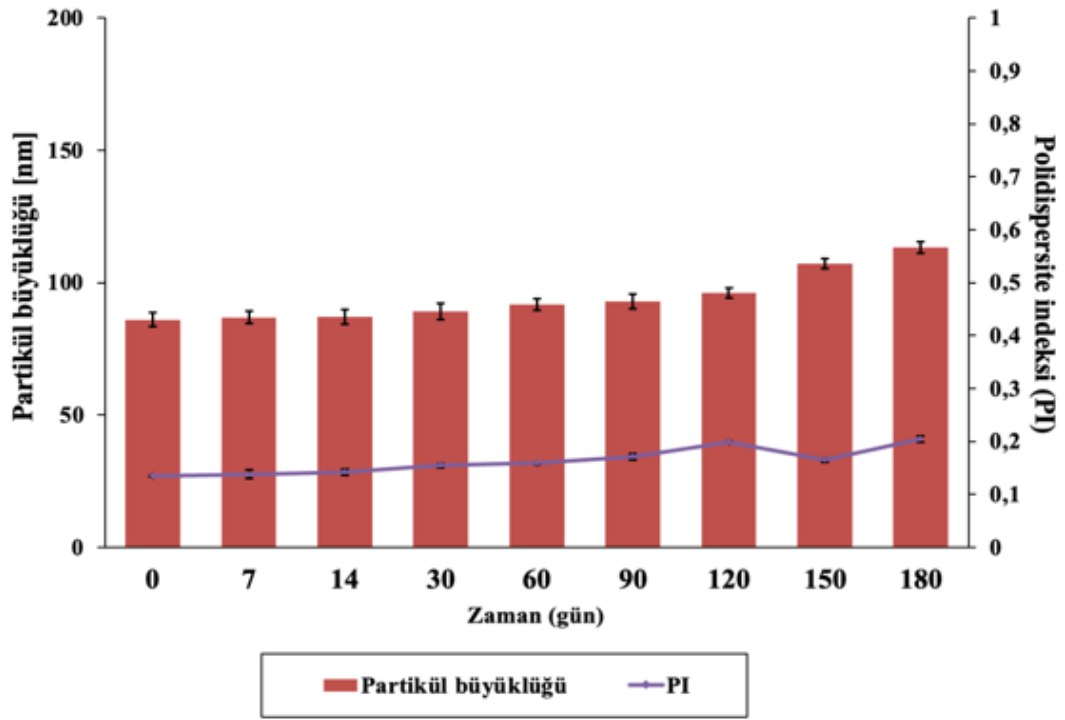
KLN, NLT ve NE'ların fiziksel stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.6.12'de açıklanan yöntemle göre gerçekleştirildi.

Partikül Büyüklüğü

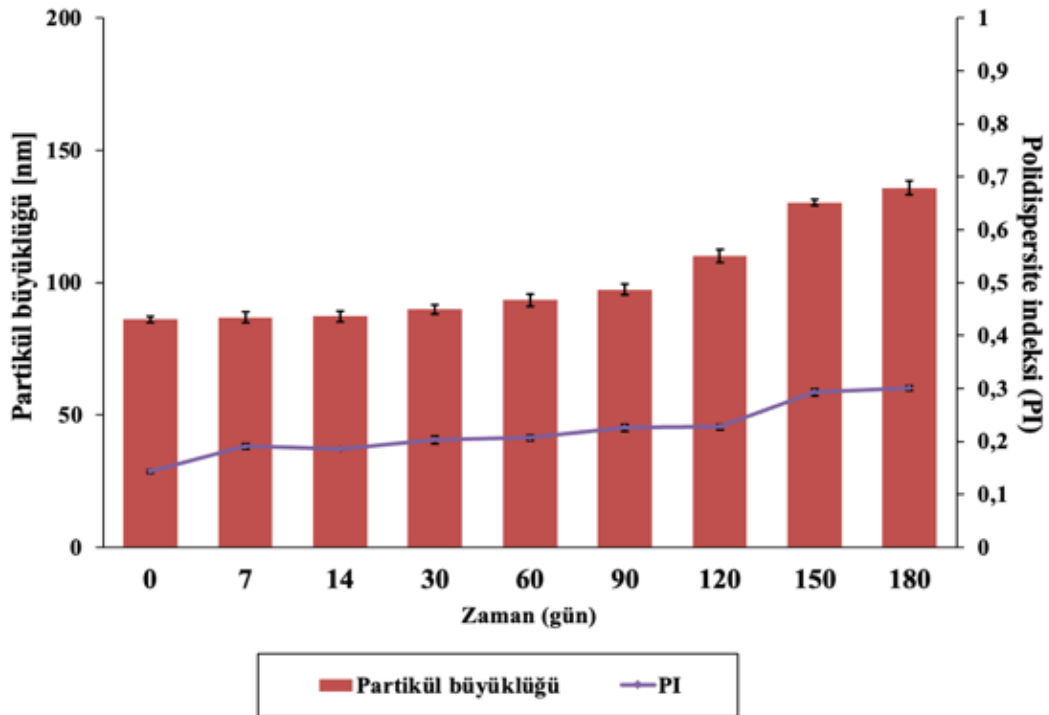
KLN505 formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C' deki damlacık büyüklüğü ve PI değerleri Tablo 4-57'de ve stabilite çalışmasına ait grafikler Şekil 4-71 – 4-73'de gösterilmektedir.

Tablo 4-57: KLN505 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C'deki partikül büyüklüğü ve PI değerleri

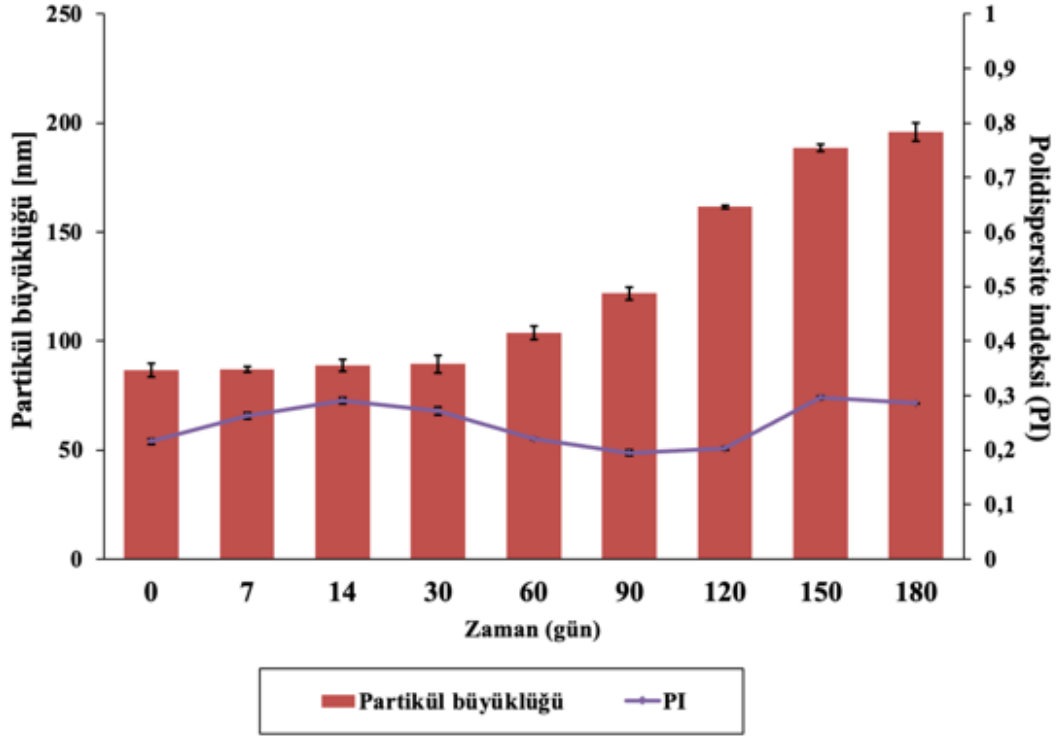
Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Boyut (nm) ± SD	PI	Boyut (nm) ± SD	PI	Boyut (nm) ± SD	PI
0	86,08 ± 2,62	0,135	86,19 ± 1,17	0,144	86,83 ± 0,216	0,216
7	86,89 ± 2,33	0,138	86,95 ± 2,06	0,191	87,14 ± 1,18	0,263
14	87,18 ± 2,83	0,142	87,28 ± 1,98	0,186	88,82 ± 2,75	0,291
30	89,24 ± 3,01	0,155	89,93 ± 1,65	0,203	89,43 ± 0,272	0,272
60	91,67 ± 2,19	0,159	93,46 ± 2,29	0,207	103,82 ± 3,11	0,221
90	92,85 ± 2,77	0,171	97,46 ± 2,04	0,226	121,86 ± 3,02	0,195
120	96,17 ± 2,03	0,199	110,15 ± 2,58	0,228	161,59 ± 0,83	0,204
150	107,19 ± 1,98	0,165	130,32 ± 1,15	0,293	188,73 ± 1,66	0,297
180	113,34 ± 2,18	0,205	135,86 ± 2,63	0,301	195,92 ± 4,19	0,286



Şekil 4-71: KLN505 kodlu formülasyonunun 5°C’deki stabilitesi



Şekil 4-72: KLN505 kodlu formülasyonunun 25°C’deki stabilitesi

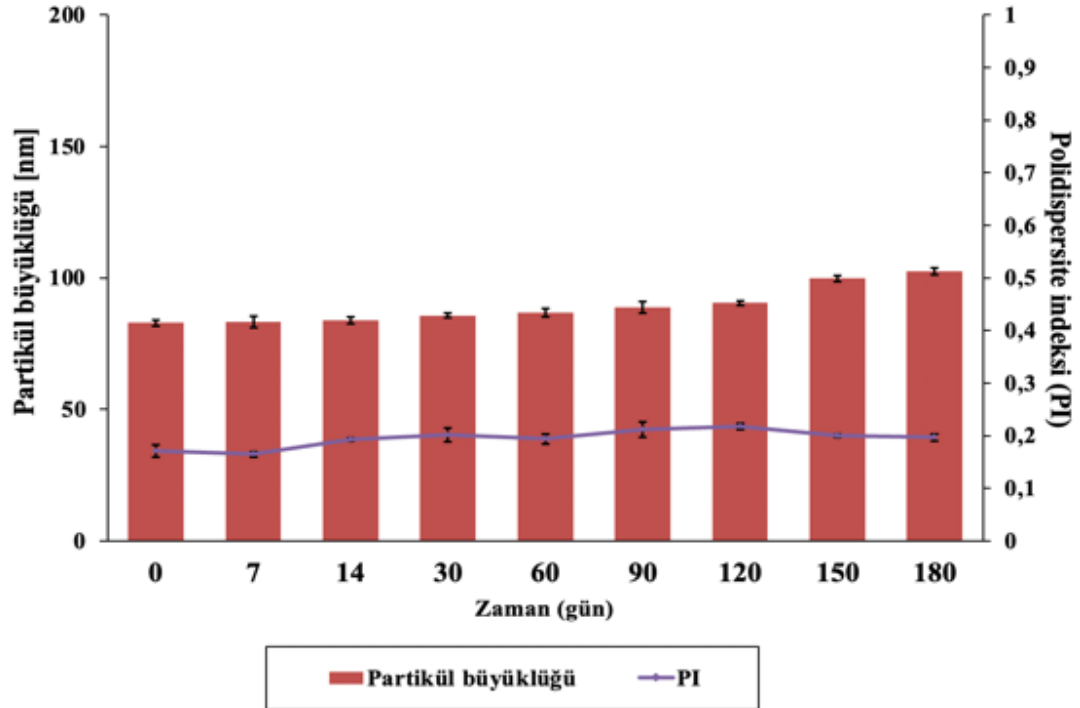


Şekil 4-73: KLN505 kodlu formülasyonunun 40°C'deki stabilitesi

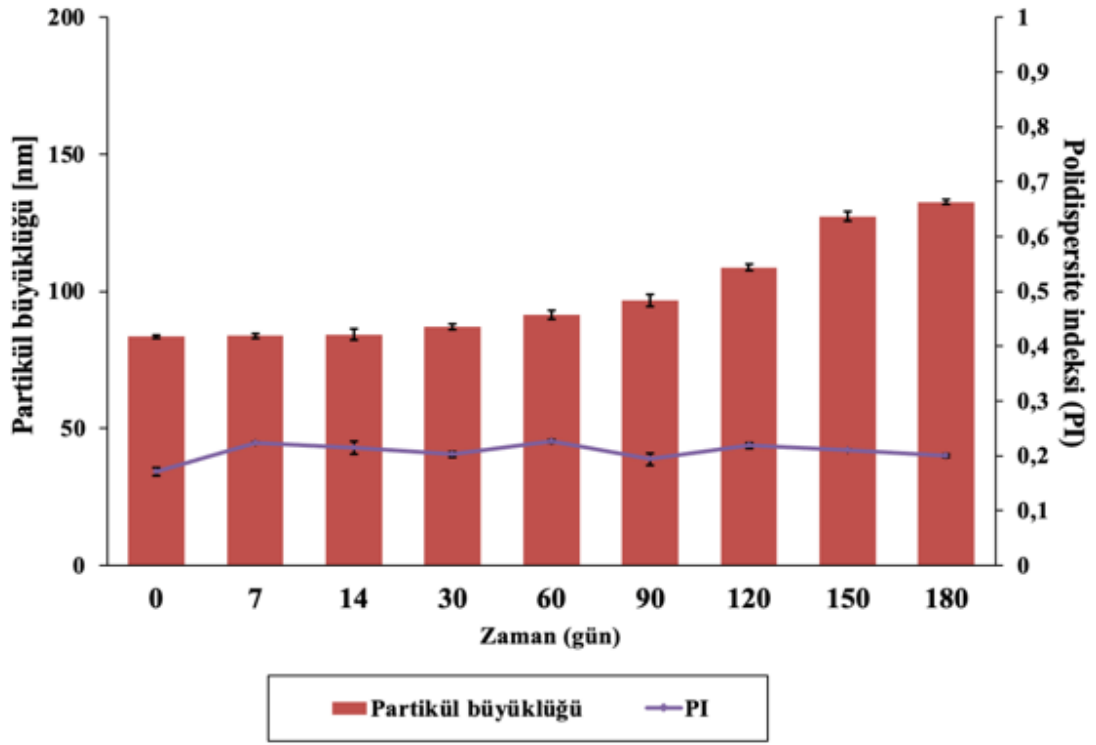
NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C' deki damlacık büyüklüğü ve PI değerleri Tablo 4-58'de ve stabilite çalışmasına ait grafikler Şekil 4-74 – 4-76'da gösterilmektedir.

Tablo 4-58: NLT532 kodlu formülasyonunun 5, 25 ve 40 °C’deki partikül büyüklüğü ve PI değerleri

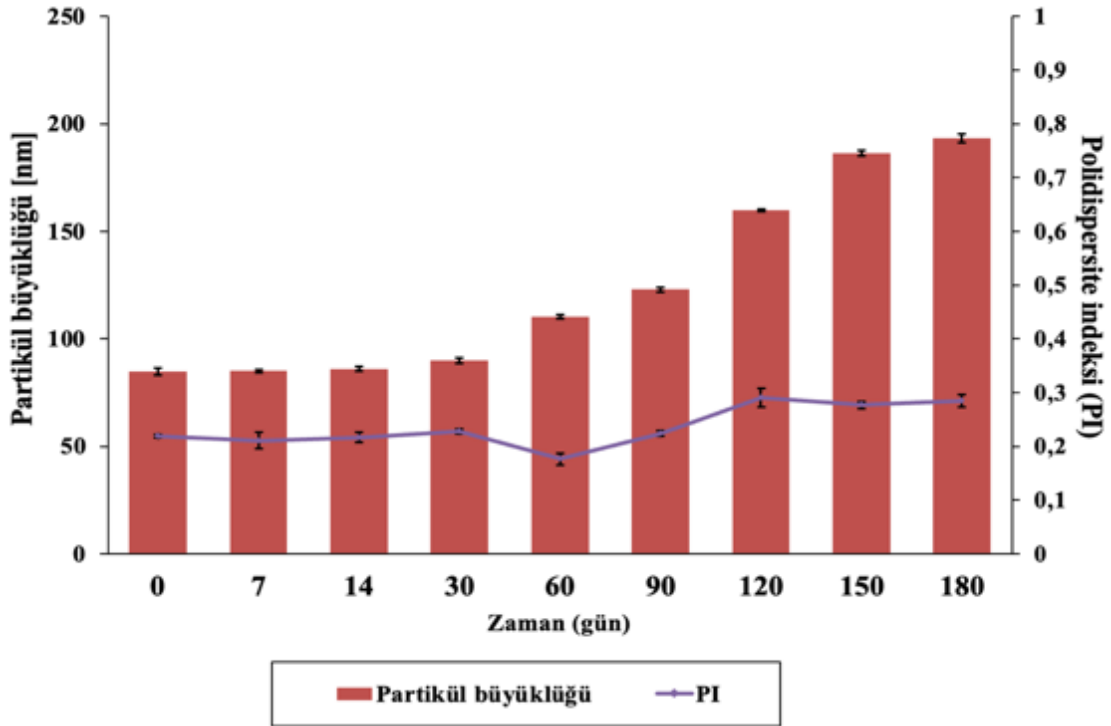
Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Boyut (nm) ± SD	PI	Boyut (nm) ± SD	PI	Boyut (nm) ± SD	PI
0	82,93 ± 1,19	0,171	83,59 ± 0,63	0,171	84,93 ± 1,65	0,219
7	83,25 ± 2,15	0,165	83,85 ± 0,92	0,224	85,16 ± 0,72	0,211
14	83,96 ± 1,42	0,193	84,27 ± 2,07	0,215	86,09 ± 1,07	0,217
30	85,77 ± 0,89	0,202	87,11 ± 1,13	0,203	89,93 ± 1,36	0,228
60	86,87 ± 1,56	0,194	91,53 ± 1,68	0,227	110,52 ± 0,94	0,177
90	88,95 ± 2,17	0,212	96,81 ± 2,17	0,194	122,93 ± 1,25	0,224
120	90,58 ± 0,83	0,218	108,79 ± 1,16	0,219	159,87 ± 0,56	0,291
150	99,81 ± 1,05	0,201	127,43 ± 1,73	0,211	186,39 ± 1,23	0,277
180	102,59 ± 1,27	0,197	132,66 ± 0,84	0,201	193,48 ± 2,06	0,285



Şekil 4-74: NLT532 kodlu formülasyonunun 5°C’deki stabilitesi



Şekil 4-75: NLT532 kodlu formülasyonunun 25°C'deki stabilitesi

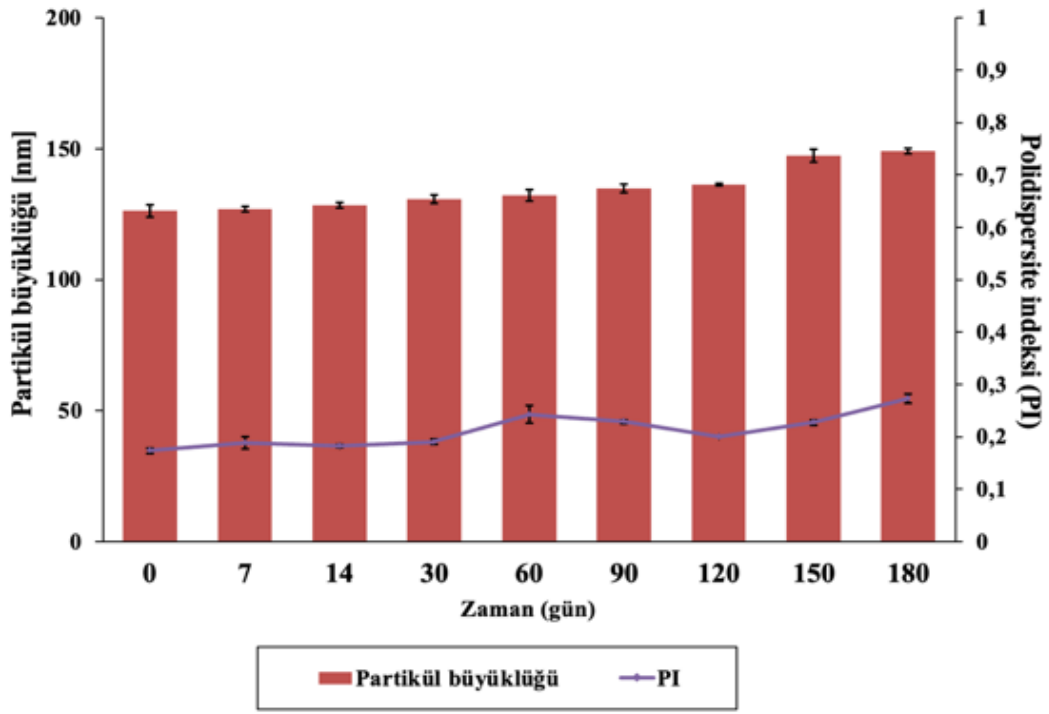


Şekil 4-76: NLT532 kodlu formülasyonunun 40°C'deki stabilitesi

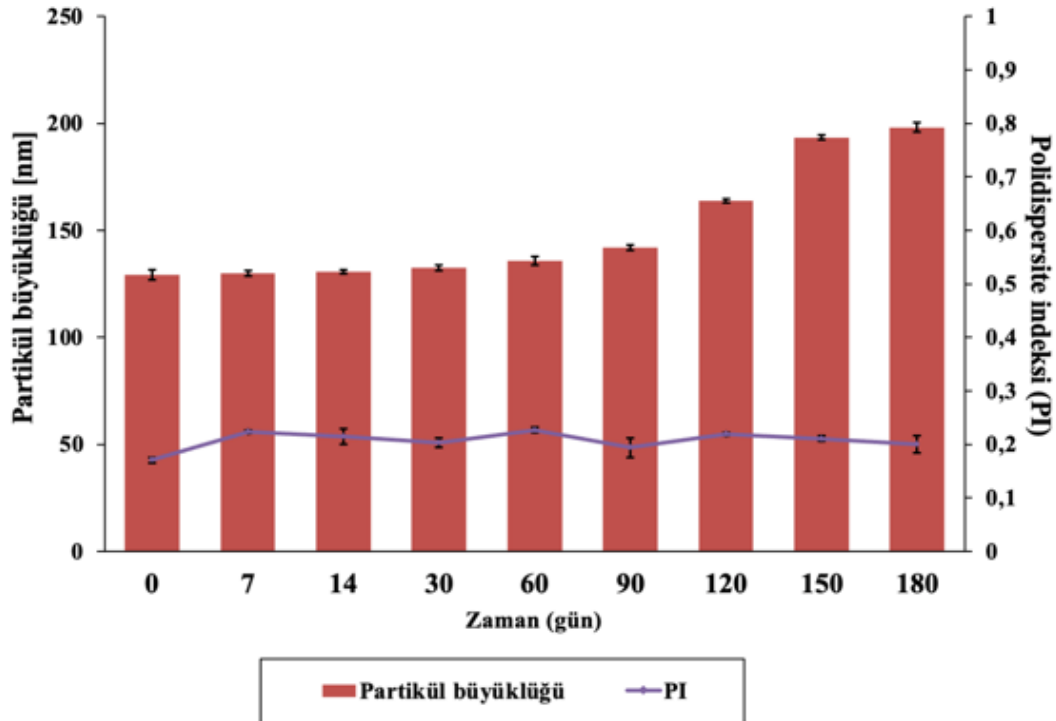
NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki damlacık büyüklüğü ve PI değerleri Tablo 4-59’da ve stabilite çalışmasına ait grafikler Şekil 4-77 – 4-79’da gösterilmektedir.

Tablo 4-59: NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki partikül büyüklüğü ve PI değerleri

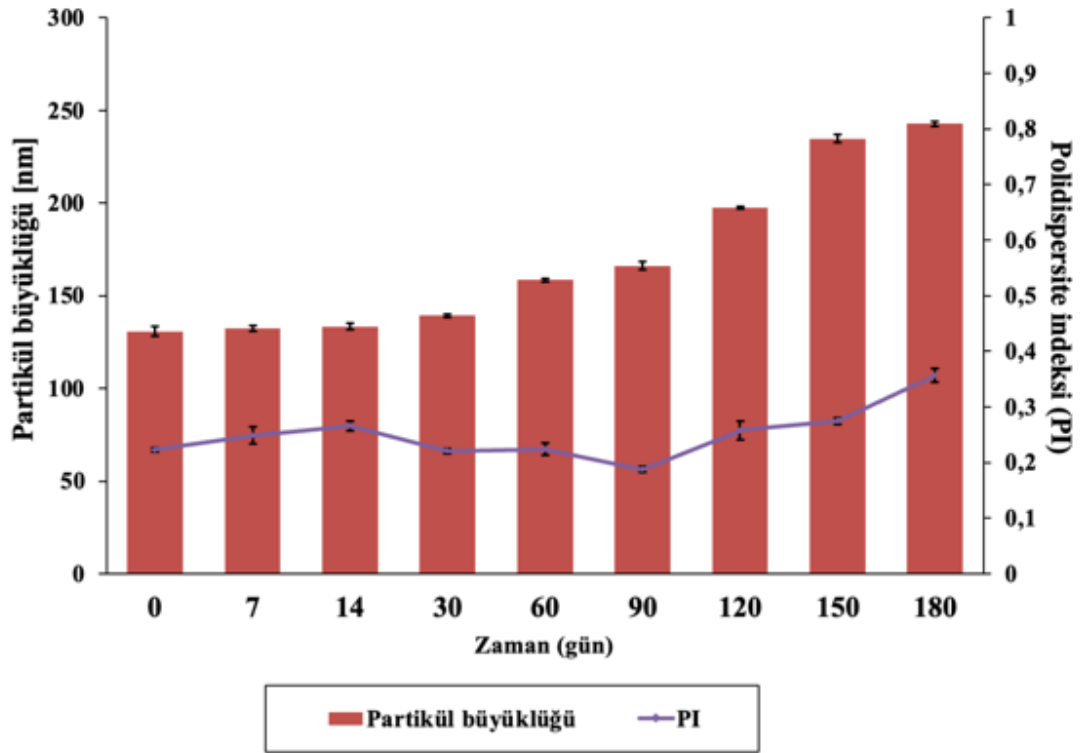
Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Boyut (nm) ± SD	PI	Boyut (nm) ± SD	PI	Boyut (nm) ± SD	PI
0	126,38 ± 2,27	0,174	129,45 ± 2,36	0,171	130,89 ± 2,65	0,223
7	127,13 ± 1,05	0,189	130,02 ± 1,28	0,224	132,25 ± 1,52	0,249
14	128,44 ± 0,93	0,183	130,73 ± 0,83	0,215	133,49 ± 1,68	0,266
30	130,83 ± 1,47	0,191	132,58 ± 1,18	0,203	139,28 ± 0,99	0,221
60	132,28 ± 2,09	0,243	135,84 ± 2,04	0,227	158,46 ± 1,06	0,224
90	134,85 ± 1,66	0,229	141,97 ± 1,22	0,194	166,27 ± 2,11	0,188
120	136,37 ± 0,39	0,201	163,88 ± 0,79	0,219	197,55 ± 0,84	0,258
150	147,29 ± 2,48	0,228	193,46 ± 1,06	0,211	234,81 ± 2,17	0,275
180	149,18 ± 0,96	0,273	198,29 ± 2,31	0,201	242,78 ± 1,46	0,357



Şekil 4-77: NE550 kodlu formülasyonun 5°C'deki stabilite sonuçları



Şekil 4-78: NE550 kodlu formülasyonun 25°C'deki stabilite sonuçları



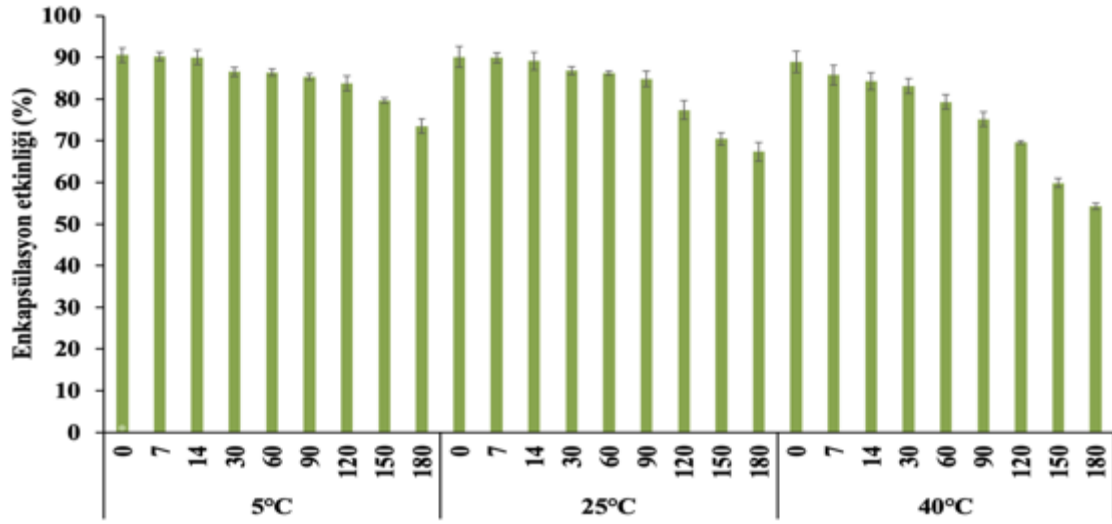
Şekil 4-79: NE550 kodlu formülasyonun 40°C'deki stabilite sonuçları

Enkapsülasyon Etkinliğine Ait Stabilite Sonuçları

KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C' deki enkapsülasyon etkinliklerine (EE) ait bulgular Tablo 4-60 ve Şekil 4-80'de gösterilmektedir.

Tablo 4-60: KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki EE (%) değerleri

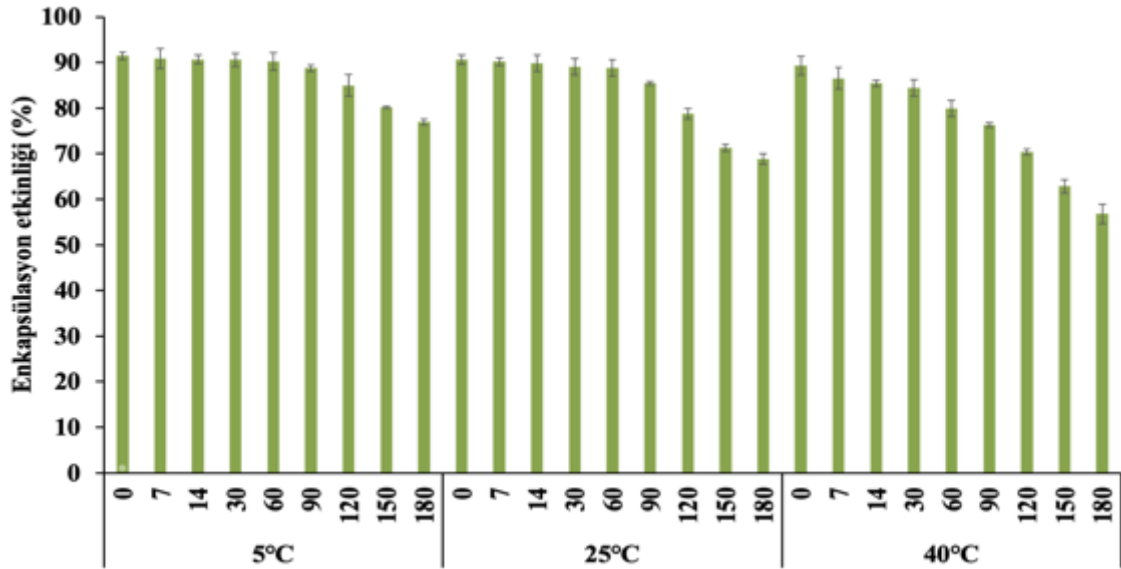
Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	EE (%)	± SD	EE (%)	± SD	EE (%)	± SD
0	90,53	1,69	90,12	2,55	88,91	2,65
7	90,18	1,01	89,92	1,21	85,77	2,42
14	90,01	1,78	89,13	2,14	84,29	2,06
30	86,54	1,15	86,83	0,95	83,13	1,82
60	86,38	0,85	86,24	0,48	79,31	1,78
90	85,29	0,79	84,81	1,87	75,17	1,76
120	83,79	1,83	77,35	2,29	69,61	0,37
150	79,65	0,68	70,43	1,53	59,86	1,11
180	73,48	1,75	67,38	2,27	54,27	0,82

**Şekil 4-80: KLN505 kodlu formülasyonun EE (%) değerleri**

NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki enkapsülasyon etkinliklerine (EE) ait bulgular Tablo 4-61 ve Şekil 4-81’de gösterilmektedir.

Tablo 4-61: NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki EE (%) değerleri

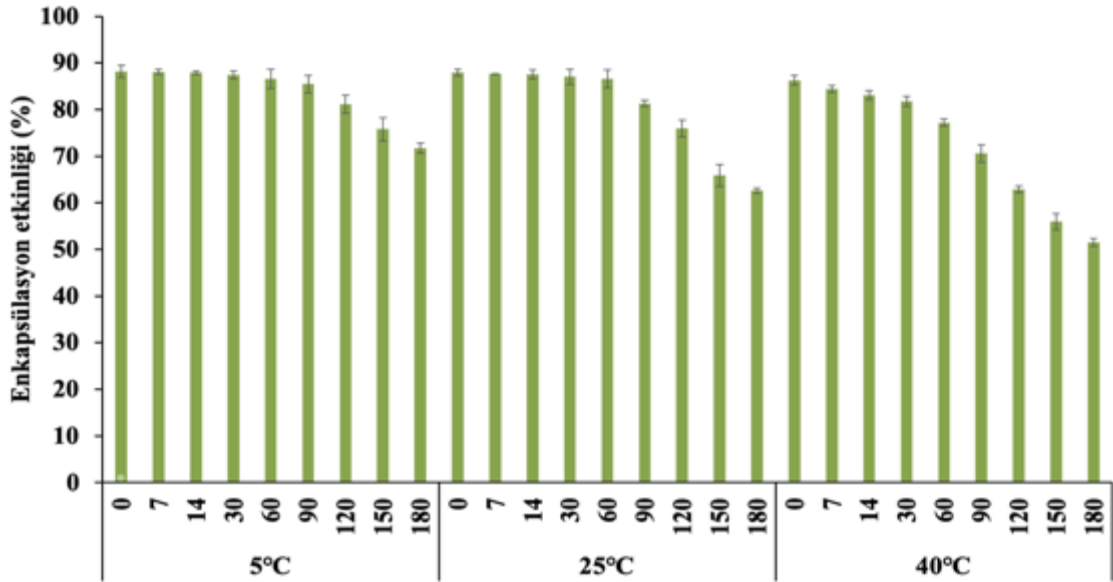
Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	EE (%)	± SD	EE (%)	± SD	EE (%)	± SD
0	91,48	0,83	90,59	1,04	89,28	2,07
7	90,85	2,17	90,15	0,87	86,52	2,36
14	90,63	0,99	89,87	1,82	85,39	0,73
30	90,57	1,48	89,03	1,78	84,45	1,82
60	90,18	1,93	88,81	1,76	79,88	1,78
90	88,73	0,67	85,47	0,37	76,28	0,56
120	84,96	2,36	78,75	1,11	70,37	0,69
150	80,17	0,27	71,28	0,82	62,84	1,45
180	76,89	0,65	68,83	1,13	56,79	2,14

**Şekil 4-81: NLT532 kodlu formülasyonun EE (%) değerleri**

NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki enkapsülasyon etkinliklerine (EE) ait bulgular Tablo 4-62 ve Şekil 4-82’de gösterilmektedir.

Tablo 4-62: NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki EE (%) değerleri

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	EE (%)	± SD	EE (%)	± SD	EE (%)	± SD
0	88,15	1,37	87,93	0,73	86,25	1,03
7	88,04	0,55	87,61	0,09	84,36	0,74
14	87,93	0,39	87,58	0,96	83,05	0,99
30	87,41	0,82	87,02	1,66	81,73	1,11
60	86,59	2,04	86,63	1,93	77,19	0,79
90	85,46	1,88	81,29	0,67	70,57	1,83
120	81,11	1,94	75,91	1,79	62,88	0,68
150	75,79	2,48	65,84	2,36	55,93	1,75
180	71,65	1,07	62,59	0,58	51,48	0,87



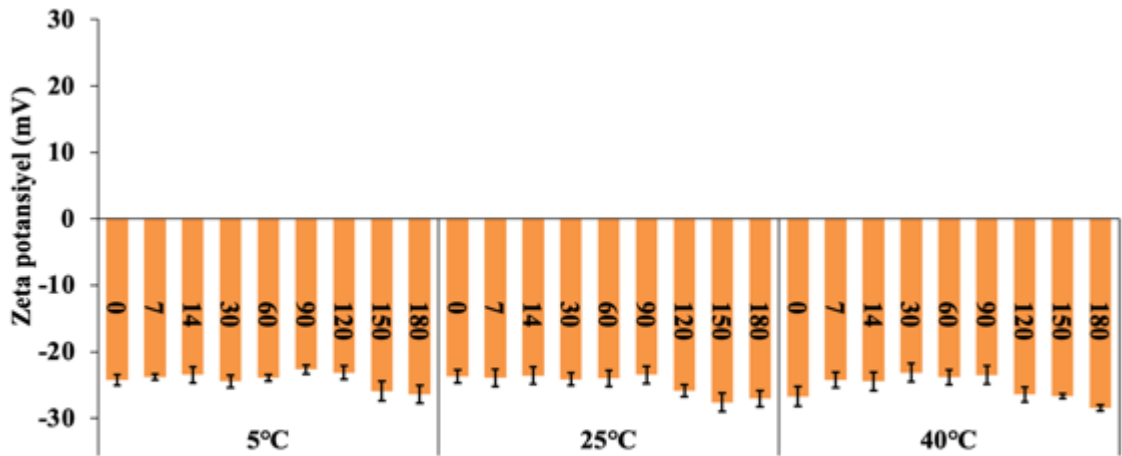
Şekil 4-82: NE550 kodlu formülasyonun EE (%) değerleri

Zeta Potansiyellerine Ait Bulgular

KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki zeta potansiyeline ait bulgular Tablo 4-63 ve Şekil 4-83’de gösterilmektedir.

Tablo 4-63: KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki zeta potansiyeli

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Yük (mV)	±SD	Yük (mV)	±SD	Yük (mV)	±SD
0	-24,25	0,82	-23,67	0,99	-26,73	1,46
7	-23,76	0,45	-23,93	1,27	-24,25	1,15
14	-23,48	1,17	-23,58	1,29	-24,47	1,36
30	-24,45	0,92	-24,13	0,93	-23,14	1,41
60	-23,92	0,47	-24,02	1,17	-23,83	1,19
90	-22,68	0,68	-23,45	1,29	-23,49	1,37
120	-23,16	1,04	-25,82	0,89	-26,41	1,04
150	-25,91	1,46	-27,62	1,39	-26,68	0,37
180	-26,38	1,37	-27,05	1,23	-28,42	0,44

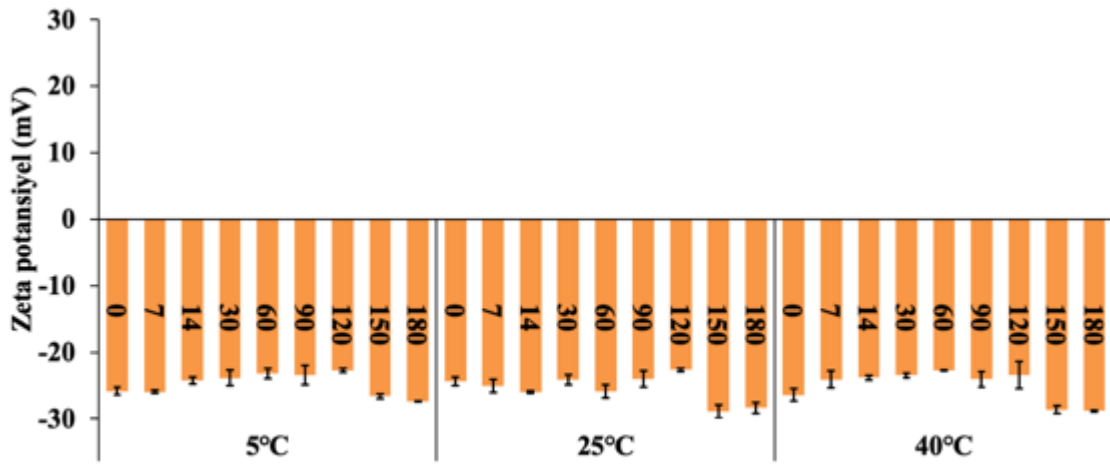


Şekil 4-83: KLN505 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda zeta potansiyelleri

NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki zeta potansiyeline ait bulgular Tablo 4-64 ve Şekil 4-84’de gösterilmektedir.

Tablo 4-64: NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki zeta potansiyeli

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Yük (mV)	±SD	Yük (mV)	±SD	Yük (mV)	±SD
0	-25,83	0,61	-24,36	0,59	-24,61	0,93
7	-25,97	0,23	-25,07	1,03	-24,09	1,28
14	-24,19	0,53	-25,94	0,18	-23,81	0,36
30	-23,86	1,15	-24,13	0,72	-23,48	0,31
60	-23,18	0,79	-25,82	0,99	-22,73	0,05
90	-23,45	1,46	-24,01	1,25	-24,06	1,19
120	-22,71	0,28	-22,65	0,26	-23,44	2,01
150	-26,58	0,34	-28,93	1,01	-28,61	0,57
180	-27,31	0,02	-28,37	0,84	-28,83	0,13

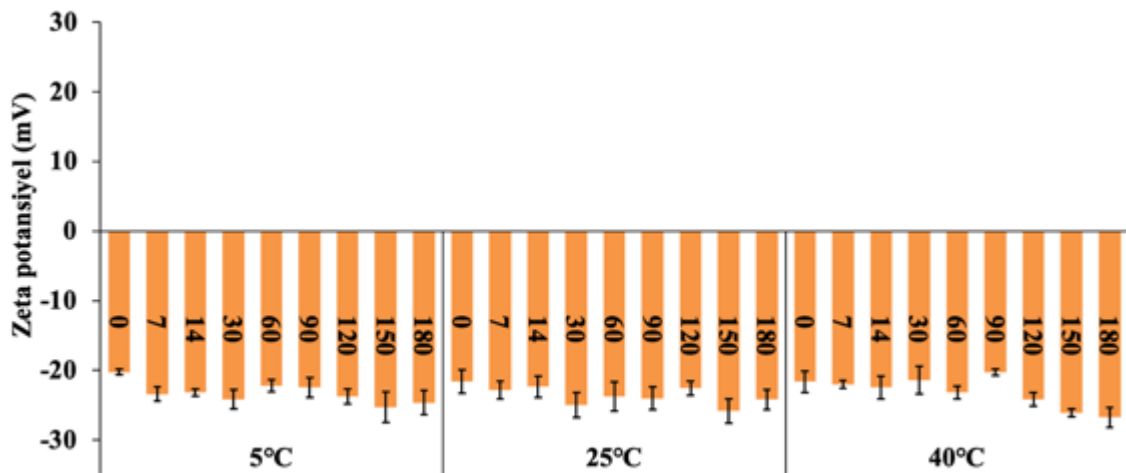


Şekil 4-84: NLT532 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda zeta potansiyelleri

NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki zeta potansiyeline ait bulgular Tablo 4-65 ve Şekil 4-85’de gösterilmektedir.

Tablo 4-65: NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki zeta potansiyeli

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Yük (mV)	±SD	Yük (mV)	±SD	Yük (mV)	±SD
0	-20,23	0,39	-21,57	1,26	-21,63	1,56
7	-23,38	1,02	-22,84	1,69	-21,96	0,55
14	-23,14	0,51	-22,35	1,58	-22,45	1,64
30	-24,12	1,37	-24,96	1,89	-21,39	1,98
60	-22,19	0,86	-23,72	2,07	-23,17	0,89
90	-22,45	1,45	-23,99	1,63	-20,28	0,45
120	-23,72	1,05	-22,57	0,98	-24,15	1,01
150	-25,26	2,19	-25,82	1,77	-26,04	0,57
180	-24,63	1,74	-24,16	1,45	-26,72	1,44



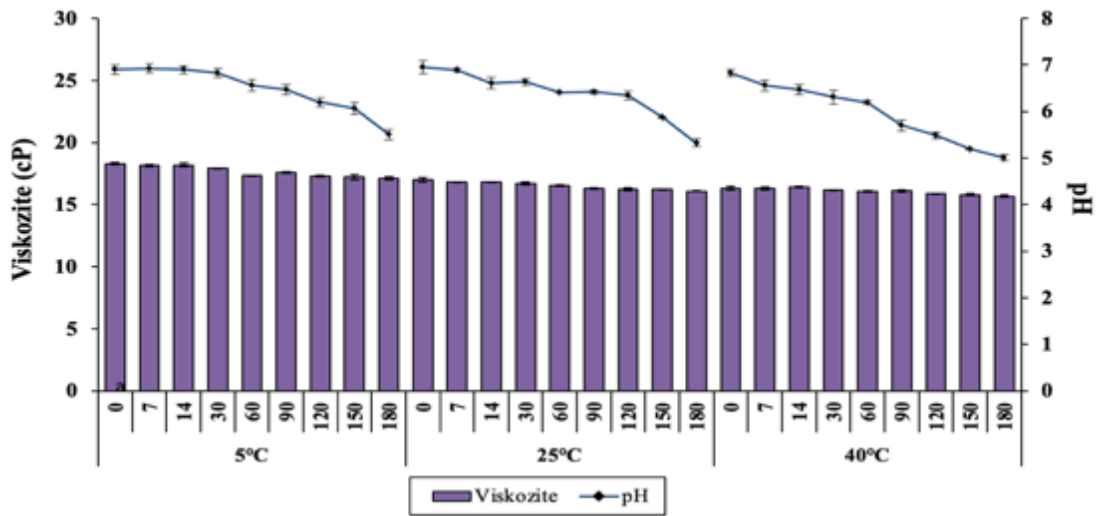
Şekil 4-85: NE550 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda zeta potansiyelleri

Viskozite ve pH Değerlerine Ait Bulgular

KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki viskozite ve pH değerlerine ait bulgular Tablo 4-66 ve Şekil 4-86’da gösterilmektedir.

Tablo 4-66: KLN505 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki viskozite ve pH değerleri

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Viskozite (cP) ± SD	pH	Viskozite (cP) ± SD	pH	Viskozite (cP) ± SD	pH
0	18,299 ± 0,092	6,901	16,991 ± 0,171	6,954	16,328 ± 0,138	6,827
7	18,154 ± 0,099	6,925	16,808 ± 0,026	6,893	16,312 ± 0,122	6,559
14	18,193 ± 0,131	6,906	16,819 ± 0,033	6,608	16,408 ± 0,065	6,474
30	17,932 ± 0,012	6,829	16,702 ± 0,104	6,636	16,219 ± 0,003	6,311
60	17,328 ± 0,019	6,553	16,558 ± 0,047	6,411	16,077 ± 0,037	6,196
90	17,584 ± 0,073	6,471	16,306 ± 0,052	6,417	16,128 ± 0,088	5,703
120	17,305 ± 0,039	6,199	16,268 ± 0,109	6,349	15,895 ± 0,004	5,488
150	17,226 ± 0,198	6,065	16,233 ± 0,005	5,875	15,803 ± 0,084	5,193
180	17,134 ± 0,118	5,505	16,101 ± 0,018	5,328	15,688 ± 0,077	5,006

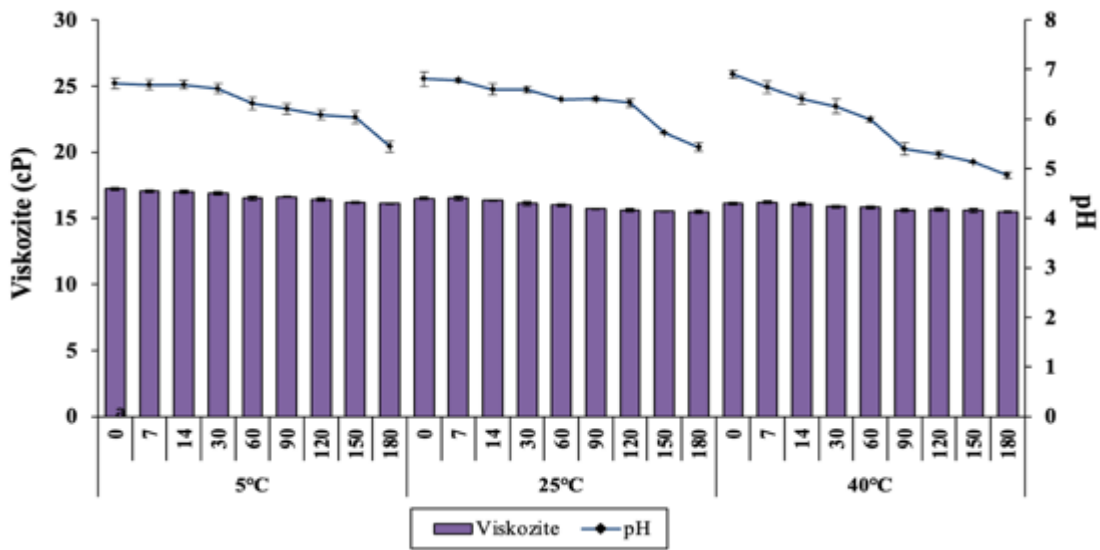


Şekil 4-86: KLN505 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda viskozite ve pH değerleri

NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki viskozite ve pH değerlerine ait bulgular Tablo 4-67 ve Şekil 4-87’de gösterilmektedir.

Tablo 4-67: NLT532 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki viskozite ve pH değerleri

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Viskozite (cP) ± SD	pH	Viskozite (cP) ± SD	pH	Viskozite (cP) ± SD	pH
0	17,228 ± 0,084	6,721	16,508 ± 0,109	6,808	16,115 ± 0,086	6,904
7	17,056 ± 0,077	6,693	16,519 ± 0,145	6,786	16,203 ± 0,097	6,643
14	17,003 ± 0,121	6,695	16,337 ± 0,043	6,603	16,086 ± 0,125	6,409
30	16,908 ± 0,109	6,618	16,108 ± 0,122	6,595	15,879 ± 0,106	6,258
60	16,527 ± 0,145	6,322	15,989 ± 0,068	6,399	15,814 ± 0,102	5,993
90	16,619 ± 0,043	6,205	15,713 ± 0,003	6,402	15,601 ± 0,128	5,402
120	16,449 ± 0,122	6,086	15,604 ± 0,101	6,325	15,668 ± 0,109	5,286
150	16,207 ± 0,068	6,035	15,553 ± 0,005	5,718	15,595 ± 0,145	5,131
180	16,115 ± 0,003	5,439	15,496 ± 0,112	5,433	15,487 ± 0,043	4,865

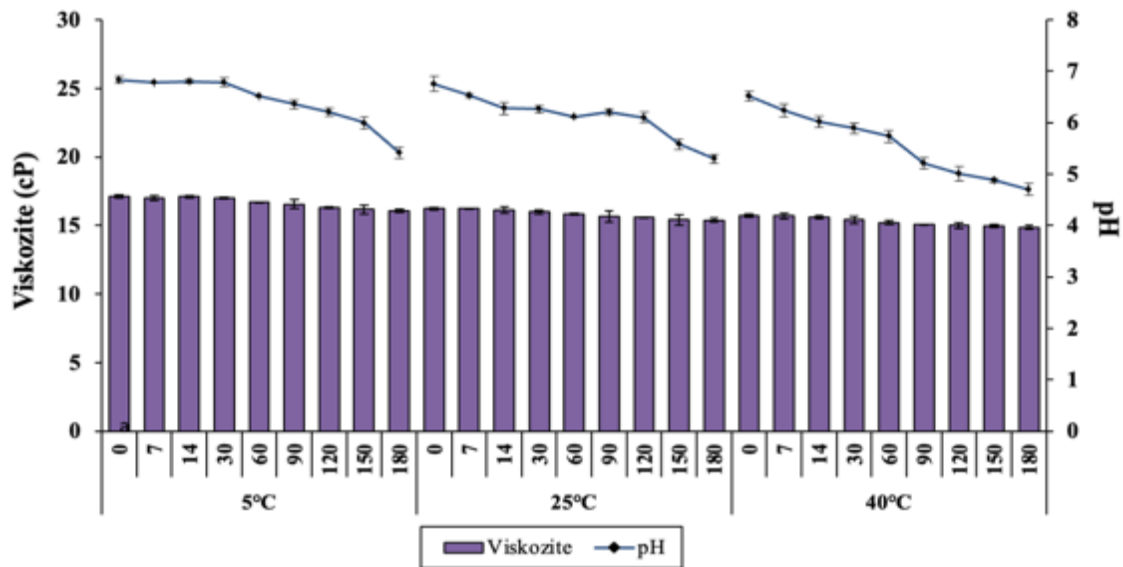


Şekil 4-87: NLT532 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda viskozite ve pH değerleri

NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’ deki viskozite ve pH değerlerine ait bulgular Tablo 4-68 ve Şekil 4-88’de gösterilmektedir.

Tablo 4-68: NE550 kodlu formülasyonun 5, 25 ve 40 °C’deki viskozite ve pH değerleri

Zaman (gün)	5°C		25 °C		40 °C	
	Viskozite (cP) ± SD	pH	Viskozite (cP) ± SD	pH	Viskozite (cP) ± SD	pH
0	17,117 ± 0,136	6,836	16,225 ± 0,105	6,755	15,727 ± 0,139	6,519
7	17,009 ± 0,203	6,779	16,239 ± 0,005	6,528	15,703 ± 0,213	6,244
14	17,105 ± 0,076	6,803	16,128 ± 0,253	6,279	15,615 ± 0,096	6,018
30	16,999 ± 0,048	6,786	15,996 ± 0,166	6,265	15,418 ± 0,279	5,889
60	16,703 ± 0,035	6,511	15,821 ± 0,058	6,117	15,229 ± 0,121	5,736
90	16,558 ± 0,323	6,355	15,658 ± 0,402	6,204	15,103 ± 0,004	5,217
120	16,329 ± 0,065	6,209	15,595 ± 0,019	6,101	14,996 ± 0,228	5,008
150	16,191 ± 0,319	5,997	15,419 ± 0,364	5,582	14,984 ± 0,111	4,879
180	16,102 ± 0,116	5,416	15,387 ± 0,145	5,299	14,872 ± 0,165	4,706



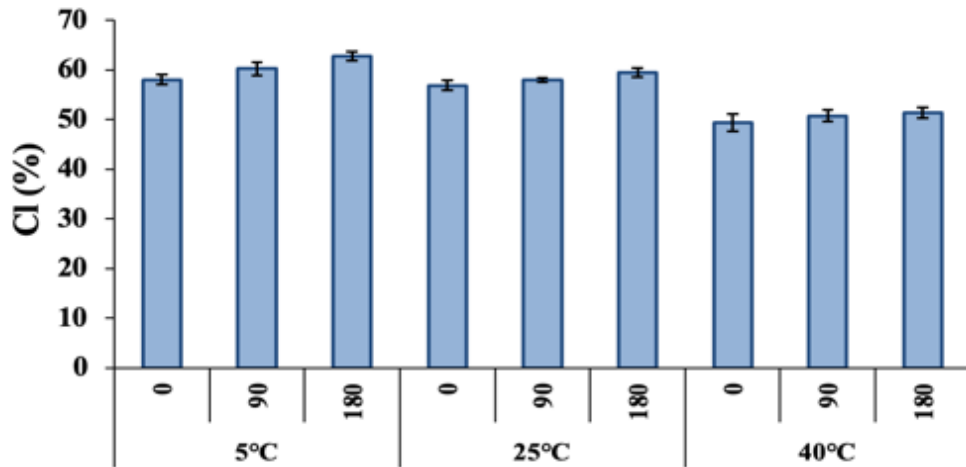
Şekil 4-88: NE550 kodlu formülasyonun belirlenen sıcaklıklarda viskozite ve pH değerleri

Kristalizasyon İndeksleri ve Erime Derecelerine Ait Bulgular

0. gün, 90. gün ve 180. günlerde katı lipid içeren KLN505 ve NLT532 kodlu formülasyonların kristalizasyon dereceleri (%CI) Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. KLN505 kodlu formülasyona ait erime sıcaklıkları, erime entalpileri ve kristalizasyon dereceleri Tablo 4-69 ve Şekil 4-89'da verilmektedir.

Tablo 4-69: KLN505 kodlu formülasyonlara ait ΔH , erime derecesi ve % CI değerleri

Zaman (gün)	Sıcaklık (°C)	ΔH (J/g)	$\pm$ SD	Erime derecesi (°C)	$\pm$ SD	% CI
0	5	22,753	0,398	64,32	0,92	57,99
	25	22,119	0,064	64,19	0,84	56,85
	40	18,899	0,103	64,06	0,29	49,37
90	5	23,688	0,407	64,28	1,03	60,17
	25	23,107	0,874	64,36	0,76	57,91
	40	19,017	0,059	64,18	0,88	50,73
180	5	24,556	0,046	64,04	0,54	62,74
	25	23,899	0,226	64,77	1,01	59,43
	40	20,760	0,115	64,13	0,96	51,28

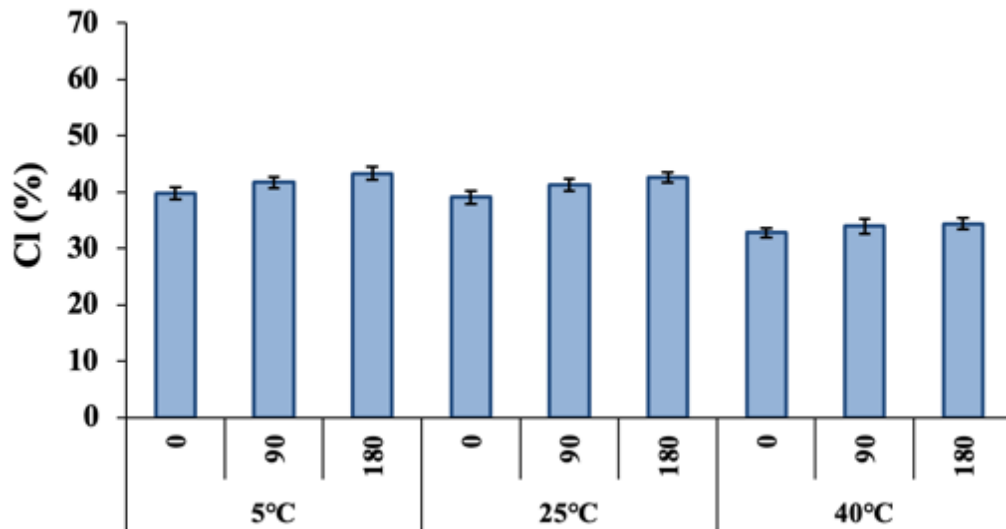


Şekil 4-89: KLN505 kodlu formülasyonun sıcaklık ve günlere bağlı % CI değerleri

NLT532 kodlu formülasyona ait erime sıcaklıkları, erime entalpileri ve kristalizasyon dereceleri Tablo 4-70 ve Şekil 4-90'da verilmektedir.

Tablo 4-70: NLT532 kodlu formülasyonlara ait ΔH , erime derecesi ve % CI değerleri

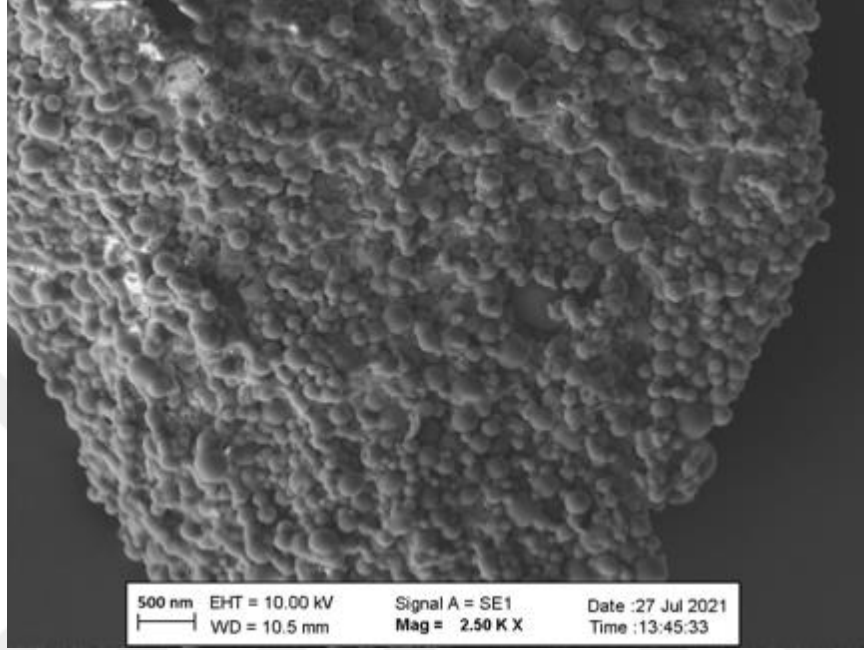
Zaman (gün)	Sıcaklık (°C)	ΔH (J/g)	$\pm$ SD	Erime derecesi (°C)	$\pm$ SD	% CI
0	5	15,184	0,113	60,54	0,49	39,81
	25	15,059	0,908	60,43	0,25	39,05
	40	12,226	0,225	60,12	0,17	32,75
90	5	16,113	0,037	60,35	0,56	41,69
	25	15,928	0,016	60,27	0,73	41,25
	40	12,988	0,359	59,93	0,09	33,91
180	5	17,549	0,117	60,28	0,22	43,27
	25	17,227	0,508	60,11	0,29	42,59
	40	14,582	0,066	59,07	0,31	34,36



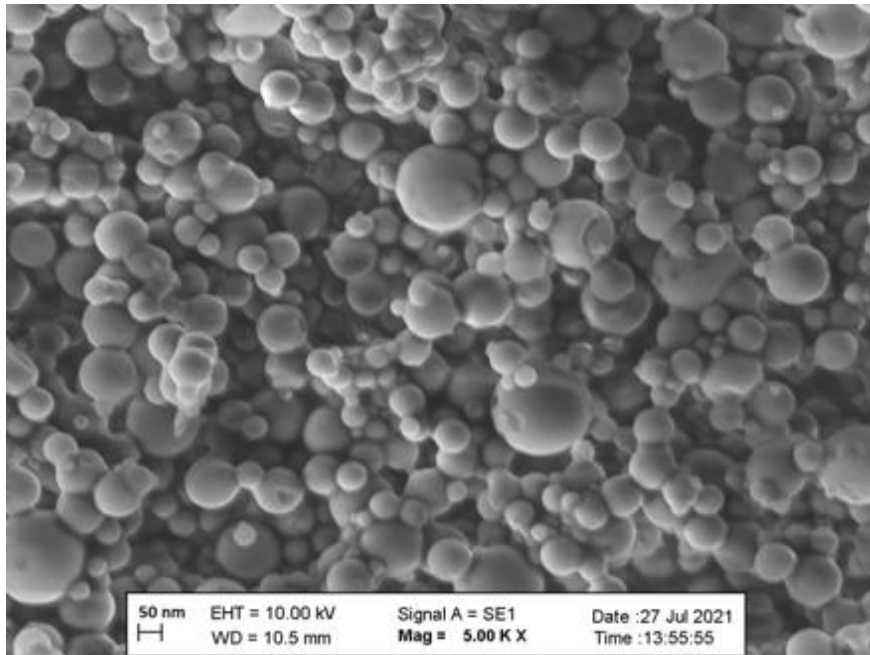
Şekil 4-90: NLT532 kodlu formülasyonun sıcaklık ve günlere bağlı %CI değerleri

SEM Görüntülerine Ait Bulgular

KLN505 formülasyonuna ait 6. ay taramalı elektron mikroskobuna ait görüntüler Şekil 4-91 ve 4-92’de verilmektedir.

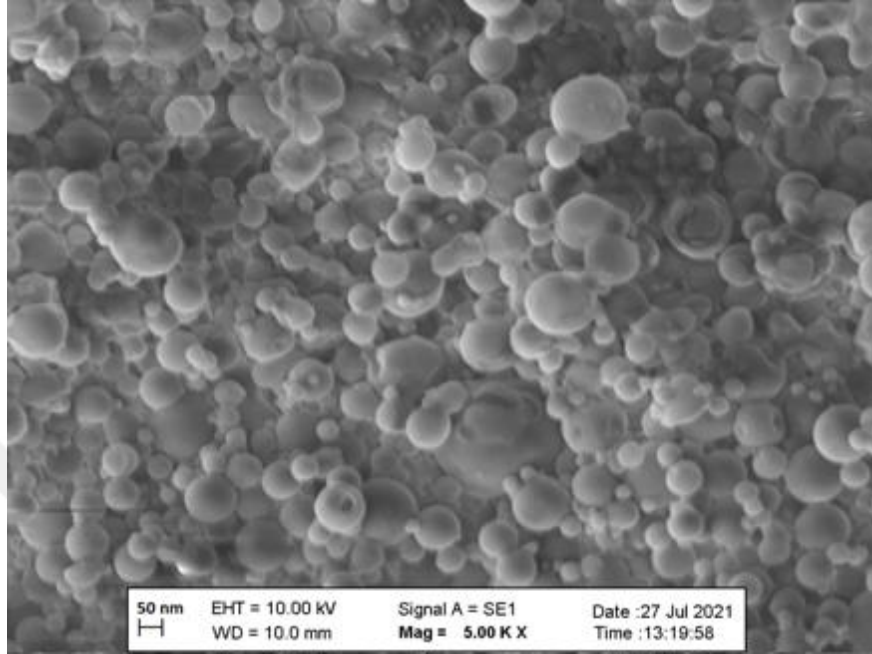


Şekil 4-91: KLN505 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (2500x)

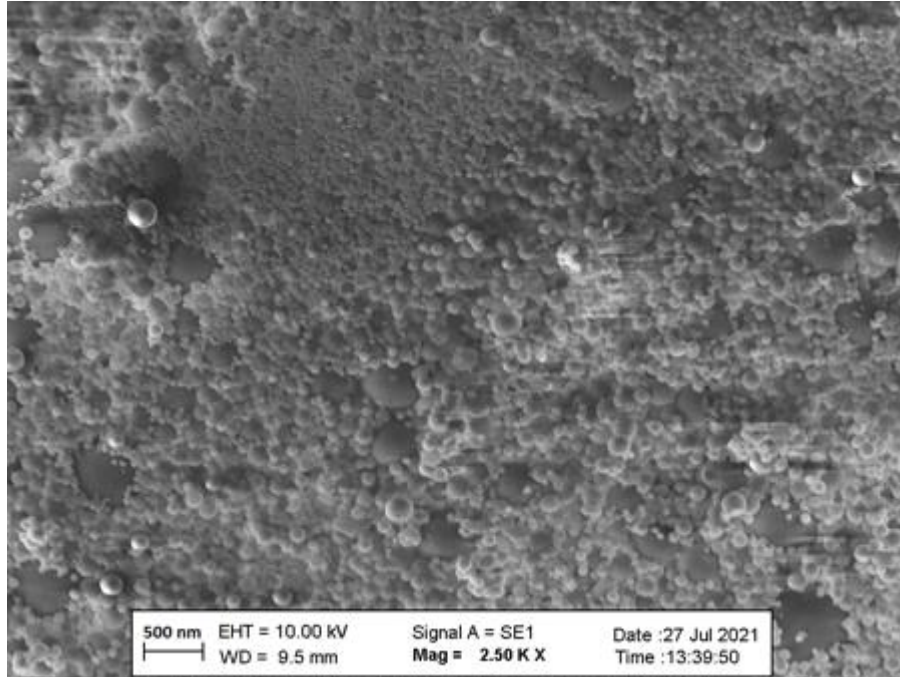


Şekil 4-92: KLN505 kodlu formülasyona ait 6.ay SEM görüntüsü (5000x büyütme)

NLT532 formülasyonuna ait 6. ay taramalı elektron mikroskobuna ait görüntüler Şekil 4-93ve 4-94’de verilmektedir.

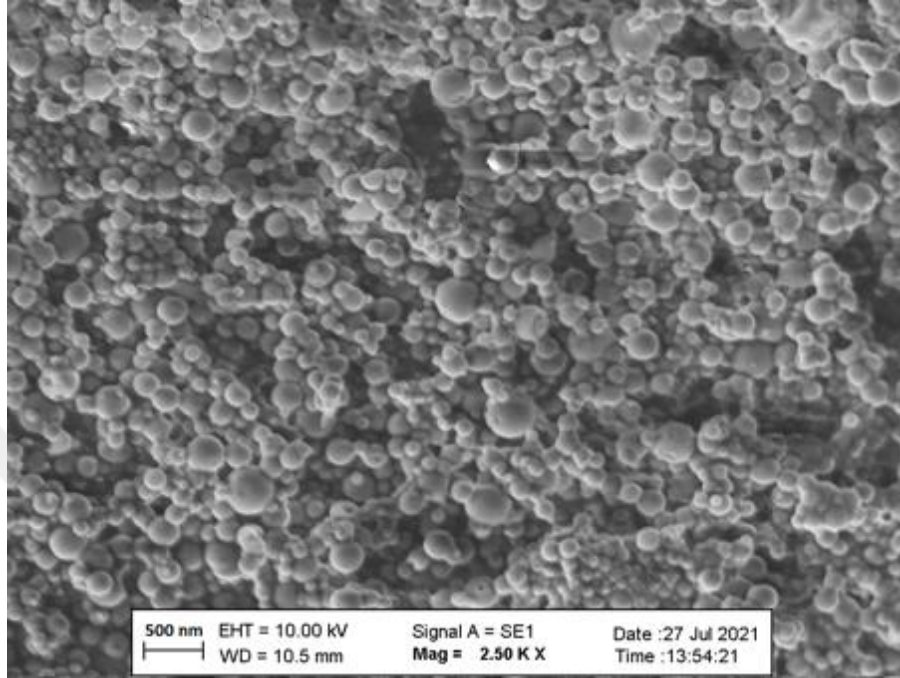


Şekil 4-93: NLT532 kodlu formülasyona 6. ay SEM görüntüsü (5000x)

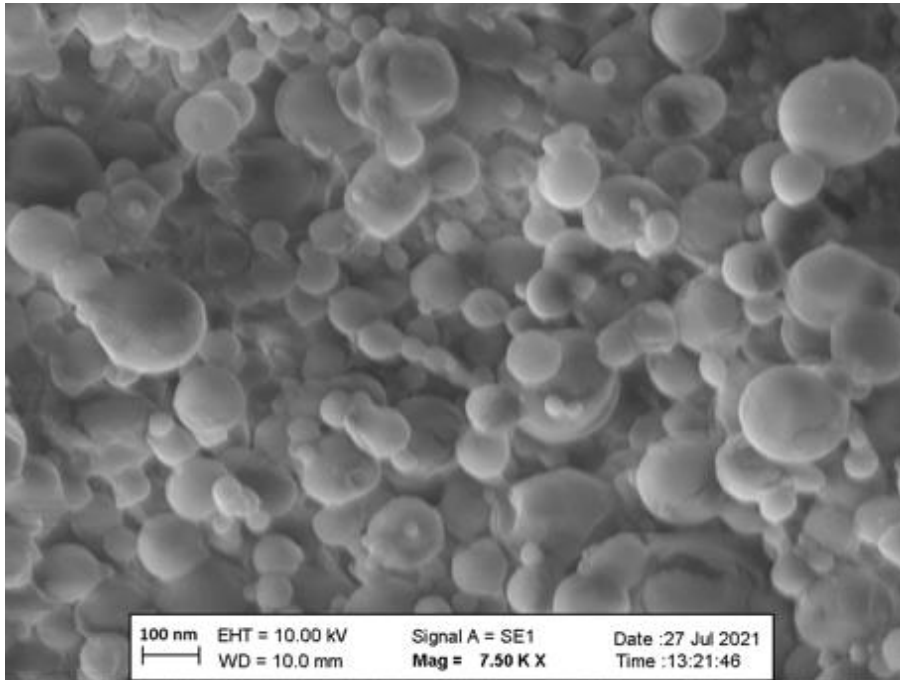


Şekil 4-94: NLT532 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (5000x)

NE550 formülasyonuna ait 6. ay taramalı elektron mikroskobuna ait görüntüler Şekil 4-95 ve 4-96’da verilmektedir.



Şekil 4-95: NE550 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (2500x)



Şekil 4-96: NE550 kodlu formülasyona ait 6. ay SEM görüntüsü (7500x)

5. TARTIŞMA

LE, birinci kuşak kortikosteroidlerden olan prednizolonun modifikasyonu ile tasarlanan ve göze uygulanan topikal bir kortikosteroiddir (Fong ve ark. 2019). Gözün alerjik reaksiyonları, inflamasyonunda ve gözün ameliyat sonrası oluşan inflamasyonunun tedavisinde kullanılmaktadır (Holland ve ark. 2019). LE suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle BCS, sınıf II ilaçlar arasında yer almaktadır (Noble ve Goa 1998; Dinnendahl ve Fricke 2008; Shoaeba ve ark. 2021). Suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların etkinliğinin artırılabilmesi lipit nanotaşıyıcı sistemlerle mümkün olabilmektedir (De souza ve ark. 2012). Yeni kuşak kortikosteroidlerden biri olan LE'nin diğer kortikosteroidlerde sıklıkla görülen intraoküler basıncı arttırıcı yan etkisi çok daha düşük seviyededir. Bununla birlikte, görme bulanıklığı, yaşarma, kaşıntı ve ışığa hassasiyet gibi yan etkiler diğer kortikosteroidlerle aynı derecede görülmektedir (Fong ve ark. 2019).

Bu çalışmada LE'nin daha düşük dozda uygulanması ile yan etkilerinin en aza indirilmesi, ilacın dokulardaki korneadan permeasyonunun arttırılarak dokularda dağılımının arttırılması için KLN, NLT ve NE formülasyonlarının tasarımı amaçlanmıştır. Böylece, gözün alerjik ve inflamasyonlu durumlarının giderilmesinde daha etkin bir tedavi sağlamak mümkün olabilecektir (Costa ve ark. 2021). Bu amaçla, 80-140 nm arası partikül/damlacık büyüklüğüne sahip formülasyonların tasarımı yapıldı. Yapılan çalışmalarda gözün anatomik bariyerlerinden geçiş amacıyla kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler için en fazla 140 nm partikül/damlacık büyüklüğünün sağlanması gerektiği, 80 nm'den düşük olan partikül/damlacık büyüklüğünün ise korneadan çok yüksek oranda geçerek tutulamadığı bildirilmektedir (Khames ve ark. 2019; Mobaraki ve ark. 2020).

Seyfoddin ve arkadaşları tarafından ibuprofen yüklü 83,9 nm, 71,8 nm ve 143,9 nm partikül/damlacık büyüklüğüne sahip KLN, NLT ve NE formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonlarla yapılan *ex vivo* korneadan geçiş çalışmasında alıcı fazda tespit edilen ibuprofen miktarının NLT (%63,8) formülasyonunda istatistiksel açıdan KLN (%41,7) ve NE (%36,7) formülasyonlarından farklı olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). Geçiş sonrası yapılan bant sıyırma çalışması ile NE formülasyonları (%39,8) ile elde edilen ibuprofen miktarının KLN (%12,4) ve NLT'ya (%6,9) göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bildirilmiş ($p \leq 0,05$). Korneanın homojenizasyon çalışması sonrası

KLN'nin (%46,3) istatistiksel açıdan NLT (%30,7) ve NE'a (%27,3) göre daha yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir ($p \leq 0,05$) (Seyfoddin et al. 2010). Başaran ve arkadaşlarının siklosporin-A yükleyerek hazırladığı KLN (89,4 nm) ve NLT (83,7 nm) formülasyonlarının *ex vivo* korneadan geçiş çalışması sonrası korneada NLT (%55,8) formülasyonunun KLN (%40,9) formülasyonuna göre istatistiksel açıdan daha yüksek oranda tutulduğu bildirilmiştir (Başaran ve ark. 2010). Bu çalışmalar göz önüne alındığında korneadan geçiş ve bunu takiben korneada tutulum için uygun partikül/damlacık büyüklüğünün 80-140 nm olmasına karar verildi.

Planlanan partikül büyüklüğüne sahip formülasyonların tasarımında deneysel tasarım (DoE) programı kullanılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda sıcakta homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemi (80 °C, %75 amplitüt) ile plasebo ve LE yüklü KLN, NLT ve NE formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonların partikül/damlacık büyüklüğü ve dağılımı ile elektriksel yükü (zeta potansiyel) dinamik ışık saçılımı yöntemi ile tayin edildi. Formülasyonlara ait morfolojik özellikleri SEM ile tayin edildi. EE tayini ise UV spektroskopisi yöntemi ile yapıldı. 180 gün süresince 5 °C, 25 °C (%60 BN) ve 40 °C (%75 BN) koşulları uygulanarak formülasyonların fiziksel stabilitesi tayin edildi. Stabilitate çalışmasında 0., 7., 14., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. Günlerde alınan numunelerde partikül/damlacık büyüklüğü ve dağılımı ile elektriksel yükü, EE, viskozite ve pH tayinleri yapıldı. Kararlı olduğu tespit edilen formülasyonlarla Franz difüzyon hücreleri kullanılarak *in vitro* salım çalışması yapıldı. Uygun formülasyonlar ayrıca *ex vivo* korneadan geçiş çalışması yapılarak korneadan permeasyon ve korneada kalış özellikleri değerlendirilmiştir.

Çalışmanın başında LE'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri tayin edildi. Bu amaçla LE'nin FT-IR ve UV spektrumları ile HPLC kromatogramı, SEM görüntüleri ve DSC termogramı elde edildi.

FT-IR spektrumu incelendiğinde LE'nin fonksiyonel gruplarına ait karakteristik pikler elde edildi. 3321,48 cm^{-1} 'de -OH gerilme bandı, 2921,11 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilme bandı görülürken; 2109,05 cm^{-1} 'de C-H gerilme bandı ve C=O grubunun titreşimlerinden kaynaklı 1767,66 cm^{-1} 'de karbonil gerilme bandı saptandı. Bunun yanı sıra 1653,33 - 1600,42 cm^{-1} 'de asetil C-O gerilme bandı, 1438,96 cm^{-1} 'de asimetrik -CH₂ grubuna ait gerilme bandı ve 1390,69 - 1370,77 cm^{-1} 'de alifatik C-O gerilme bandı tespit edildi (Şekil 4-1). LE'nin metanol (100µg/mL) kullanılarak elde edilen UV

spektrumunda 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-2). Elde edilen verilerin LE'nin FT-IR ve UV spektrumlarının elde edilerek değerlendirildiği daha önce yapılan çalışmalar ile elde edilen verilerle uyumlu olduğu tespit edildi (Hiranı ve ark. 2014; Sah ve ark. 2017).

LE'nin HPLC ile yapılan miktar tayini yönteminde mobil fazdaki 1 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin verdiği pik alanının $135205 \pm 788,345$ ve maddenin tutulma zamanının $7,14 \pm 0,03$ dakika olduğu tespit edildi (Şekil 4-3). Elde edilen sonuçların daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile uyumlu olduğu görüldü (Han ve ark. 2014; Sah ve ark. 2017).

LE'nin SEM görüntülerinde ise amorf yapıda bir toz olduğu görüldü (Şekil 4-4 ve 4-5).

DSC analizi ile elde edilen termogramda, LE'nin erimeye başladığı sıcaklığın 246,59 °C, erime derecesinin 251,46 °C ve erime entalpisinin 137,12 J/g olduğu tayin edildi (Şekil 4-6). LE'nin termal davranışlarının değerlendirildiği daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçların elde edildiği görüldü (Noble ve Goa 1998; Dinnendahl ve Fricke 2008).

LE' nin lipit görüntüleme çalışmaları ve enkapsülasyon etkinliğinin analizinde etkin madde miktarını tayin edebilmek için analiz yöntemi olarak UV spektroskopisi kullanıldı Cavalli ve arkadaşlarının, tobramisin yüklü KLN formülasyonlarının EE değerlerinin ölçümünde mobil faz olarak etanol kullanırken, analiz yöntemi olarak UV spektroskopisi kullandıklarını rapor etmişlerdir (Cavalli ve ark. 2002). Alex ve arkadaşlarının, lopinavir yükledikleri KLN ve NLT formülasyonlarının ölçümlerinde ise metanol olarak mobil faz kullandıkları ve yine analiz yöntemi olarak UV spektroskopisinde yararlanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmalar göz önünde bulundurularak yapacağımız analizler için yeterli hassasiye sahip olması ve hızlı bir teknik olması nedeniyle böyle bir karar alındı. Franz difüzyon hücrelerinden *in vitro* salım, korneadan *ex vivo* geçiş, bant sıyırma ve korneanın homojenizasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere analiz yöntemi olarak HPLC'nin kullanılmasına karar verildi. (Raposo ve ark. 2015; Houston ve ark. 2017; Borges ve ark. 2020). Hem UV spektroskopisi hem de HPLC kromatografisi yöntemi için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, teşhis ile miktar tayin limitleri ve stabilite parametreleri kullanılarak validasyonu yapıldı (ICH Q2). HPLC

validasyon çalışmasında ise, bu parametrelere ilaveten sistem uygunluk parametresi olan doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, stabilite ve LOD/LOQ değerleri de belirlendi.

UV spektroskopisi ile miktar tayini yönteminin validasyonunda doğrusallık çalışması için 8 noktalı bir kalibrasyon eğrisi 1 µg/ml - 25 µg/mL aralığında oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinin determinasyon katsayısı (r^2) 0,9992 olarak bulundu. Her bir konsantrasyon için elde edilen RSD değerinin %2'nin altında olduğu tespit edilerek referans kılavuza göre doğrusallık kanıtlanmış oldu (ICH Q2). Doğruluğun tayini amacıyla yapılan çalışmada RSD değerinin %2'nin altında olduğu ve % geri kazanımın %100,446 - %100,975 olduğu tespit edildi (Tablo 4-2). Kesinlik parametresi tayin edilmesinde Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi 40 µg/mL, 200 µg/mL ve 800 µg/mL çözeltilerle analiz yapılarak, RSD değerlerinin %2'nin altında olduğu tespit edildi (Tablo 4-4). Seçiciliğin değerlendirilmesinde, Bölüm 3.2.2.1'de belirtildiği analiz yapılarak DoE çalışması sonrası formülasyonda kullanılmak üzere karar verilen katı lipid, sıvı lipid ve yüzey etkin maddeye ait ölçümlerde LE'nin en yüksek absorbans verdiği 280 nm'deki pik ile çakışmadığı görüldü (Şekil 4-8 - 4-11). Teşhis ve miktar tayin limitleri ise değerlerinin Bölüm 3.2.2.1'de bahsedilen yöntem kullanılarak, sırasıyla 0,0507 µg/ml ve 0,1690 µg/ml olarak elde edildi. Spektroskopik analiz validasyonunun son basamağı olan stabilitenin tayininde Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi RSD'nin % 2'nin altında olduğu ve etkin maddenin metanol içerisinde 48 saat boyunca kararlılığını koruduğu görüldü (Tablo 4-5).

LE'nin HPLC ile miktar tayininin validasyonunda tüm parametrelerin eldesi için Bölüm 3.2.2.2'de bahsedildiği gibi çalışıldı. Validasyon basamaklarında elde edilen parametrelere uygunluk için elde edilen sonuç ortalamalarının RSD değerlerinin %2'nin altında olduğu görüldü. Seçicilik parametresinin değerlendirilmesinde, DoE çalışması sonrası formülasyonda kullanılmasına karar verilen bileşenlere ait pikler ve bu piklerin tutulma zamanlarının LE'nin tutulma zamanından (7,14 dakika) farklı olduğu ve LE'nin piki ile girişim yapmadığı tespit edildi (Şekil 4-13 – 4-16). LE'nin teşhis ve miktar tayini limitleri 2,823 ng/ml ve 9,411 ng/ml olarak tespit edildi. HPLC için son validasyon kriteri olarak sistem uygunluk testlerindeki değişkenlerin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu tespit edildi (ICH Q2).

Miktar tayin yöntemlerinin validasyonu tamamlandıktan sonra LE'nin 25 ± 1 °C'de distile su, fosfat tamponu çözeltisi (pH 6,8) ve metanoldeki çözünürlüklerinin sırasıyla $0,703 \pm 0,017$ µg/mL, $6,024 \pm 0,408$ µg/mL ve $573,018 \pm 1,127$ µg/mL olduğu tayin

edildi. Elde edilen değerlerin daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen değerler ile aynı aralıkta olduğu kanıtlandı (Noble ve Goa 1998; Bodor ve ark. 2000).

KLN, NLT ve NE formülasyonlarının hazırlanmasında formülasyonlarda kullanılacak katı lipit, sıvı lipit ve yüzey etkin maddeyi belirlemek amacıyla Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi çalışıldı. Lipit görüntüleme çalışmaları sonucunda LE'in en fazla Compritol® 888 ATO ($0,114 \pm 0,002$ mg/mL), Precirol® ATO 5 ($0,121 \pm 0,003$ mg/mL), setostearil alkol ($0,103 \pm 0,002$ mg/mL) ve oleik asitte ($0,102 \pm 0,001$ mg/mL) çözündüğü tespit edildi. Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi LE'in en fazla Pluronic® F68'de ($0,163 \pm 0,002$ mg/mL) çözündüğü tayin edildi. Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi yüzey etkin madde seçimi yapılırken hem çözünürlük hem de kaba emülsiyonlara ait özellikler dikkate alındığından, kaba emülsiyonlar oluşturulup yine en uygun yüzey etkin maddenin faz ayrışması görülmeyen Pluronic® F68 olduğu görüldü.

Formülasyonların hazırlanmasında kullanılacak katı lipidler, sıvı lipit ve yüzey etkin madde belirlendikten sonra uygun ultrasonikasyon koşullarını belirlemek amacıyla KLN ve NLT'ler hazırlandı. Çalışma sonrasında Compritol® 888 ATO ve setostearil alkol ile hazırlanan nanopartiküllerin 140 nm altına düşmediği görüldüğünden (sırasıyla 141,4 - 157,5 nm ve 144,3 - 161,2 nm arasında), bu taşıyıcı sistemler *ex vivo* deriden geçiş çalışması yapılmak üzere korneal geçişte çalışma dışı bırakıldı. Korneadan geçiş çalışmasında katı lipit olarak Precirol® ATO 5 kullanılmasına ve ultrasonikasyonun %75 amplitüt ve sürenin 7 dakika olmasına karar verildi.

LE miktarının sabit olduğu (5 mg/mL), toplam lipit oranının % 4 - 8 (NLT formülasyonlarında toplam lipidin 1/3 ü olacak şekilde), yüzey etkin madde oranının % 3 - 5 ve su oranının % 87 - 93 (%1 gliserol içeren) olduğu bağımsız değişkenler programa girildi. Partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve enkapsülasyon kapasitesi bağımlı değişkenler olarak girildi. DoE yazılımının verdiği sonuçlara göre formülasyonlar hazırlandı ve analiz sonuçlarına göre bağımlı değişkenler elde edilip 3 boyutlu faz diyagramları oluşturuldu (Şekil 4-17 - 4-28). Çalışma sonucunda uygun formülasyonlara ait oranlar belirlendi, *in vitro* ve *ex vivo* çalışmalarda kullanılacak formülasyonlar oluşturuldu (Tablo 4-31).

Korneadan geçiş ve tutulum için kullanılacak 80-140 nm aralığına sahip KLN505 ($86,07 \pm 1,16$ nm), NLT532 ($82,9 \pm 1,03$ nm) ve NE550 ($126,54 \pm 1,05$ nm) kodlu formülasyonlarla çalışmaya devam edildi. KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu

formülasyonlara ait partikül büyüklüğü dağılımları sırasıyla $0,135 \pm 0,014$, $0,192 \pm 0,018$ ve $0,174 \pm 0,012$ olarak bulunurken, enkapsülasyon etkinlikleri (% EE) $91,07 \pm 1,95$, $92,23 \pm 1,48$ ve $88,15 \pm 1,37$ olarak tespit edildi.

KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonlara ait zeta potansiyel değerlerinin sırasıyla $-24,25 \pm 1,73$, $-25,83 \pm 1,16$ ve $-20,28 \pm 1,37$ olduğu tayin edildi (Tablo 4-35). Bunun nedeninin formülasyonlar içerisinde bulunan oleik asit ve Precirol® ATO 5'in negatif yüklü olmasından kaynaklandığı düşünüldüğü, benzer çalışmalarla bu görüş desteklendi (Kaneko ve ark. 1997; Müller ve ark. 2000; Devi ve Agarwal 2019). Freitas ve Müller' in zeta potansiyelin lipit kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin stabilitesi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada ± 20 -30 mV arası yüke sahip nanopartiküllerin kararlı stabilizeye sahip olduğu bildirilmiştir (Freitas ve Müller 1998). Radomska-Soukharev'in yaptığı bir diğer çalışmada çeşitli katı lipitler kullanarak (Compritol® 888 ATO, Dynasan 112, Imwitor® 900 ve Precirol® ATO 5) hazırlanan KLN'lerin ± 0 -10 ve ± 10 -20 mV yüke sahip formülasyonların sırasıyla stabil olmayan ve düşük stabilize gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada ± 20 -30 mV yüke sahip olan formülasyonların iyi stabilize gösterdiği belirtilmiştir (Radomska-Soukharev 2007). Korneadan geçiş açısından incelenecek olursa, önceki yıllarda uygulanan ana yaklaşımın kornea yüzeyinin negatif olmasından dolayı biyoyararlanımın artırılması için katyonik taşıyıcı sistemlerin tercih edilmesi üzerine olduğu görülmekteydi. Boddu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada göze uygulanmak üzere hidrokortizon yüklü nanoemülsiyonlar hazırlanmış ve katyonik ajan olarak stearylamin kullanılarak taşıyıcı sistemler pozitif yüklenmiş (+ 25,4 mv) ve yüklü olmayan NE formülasyonlarına göre geçişi istatistiksel olarak arttırdığı tayin edilmiştir ($p \leq 0,05$) (Boddu ve ark. 2010). De Campos ve arkadaşları, polikaprolakton kullanılarak hazırladıkları polimerik nanopartikülleri kitozan ile kaplayarak katyonik sistemler (+ 17,8 mV) elde etmiş ve kitozan ile kaplamadıkları nanopartiküllere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede korneal geçişi arttırdıklarını rapor etmişlerdir ($p \leq 0,05$) (De Campos ve ark. 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise kornea epitel hücrelerinde bulunan monokarboksilat taşıma sistemindeki proton/ Na^+ laktat pompalarının anyonik sistemlerin geçişini artırarak biyoyararlanım üzerinde katyonik taşıyıcı sistemler kadar katkı sağladığını göstermektedir. Seyfoddin ve Al-Kassas tarafından hazırlanan asiklovir yüklü KLN ve NLT formülasyonlarının yükleri sırasıyla - 24,8 mV ve -23,7 mV olarak rapor edilmiş ve katyonik formülasyonlarla (+ 23,8 mV) kıyaslandığında kornea geçişinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı farkın bulunmadığı bildirilmiştir ($p > 0,05$)

(Seyfoddin ve Al-Kassas 2013). Balguri ve arkadaşlarının, indometazin KLN ve NLT formülasyonlarının anyonik yüklü olduğu bildirilmiş (sırasıyla - 27,5 mV ve - 24,3 mV) ve katyonik formülasyonlarla kıyaslandığı geçiş çalışmasında %5,3 oranında korneadan geçişi arttırdıkları belirtilmiştir (Balguri ve ark. 2016). Bu çalışmalar göz önünde bulundurularak hazırlanan formülasyonların anyonik olmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.

Hem etkin maddenin yük ve boyut dağılımı üzerindeki etkisini incelemek hem de yapılacak karakterizasyon çalışmalarında (FT-IR, DSC ve kristalizasyon tayini) etkin maddenin formülasyonda meydana getirdiği değişimleri gözlemlemek amacıyla KLN505, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonların LE yüklü olmayan boş formülasyonları da hazırlandı (Boş-KLN505, Boş-NLT532 ve Boş-NE550). İlaç yüklü ve yüklü olmayan formülasyonlar arasında partikül boyutu, PI değeri ve zeta potansiyeli bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$) (Tablo 4-32 - 4-35) (Şekil 4-29 - 4-34).

Hazırlanan KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlara ait SEM görüntülerinin partikül büyüklüğü verilerini desteklediği kanıtlandı (Şekil 4-41 - 4-46).

Formülasyonların (etkin madde yüklü ve yüklü olmayan), Precirol® ATO 5, Pluronic® F68 ve LE'a ait DSC termogramları incelendi (Şekil 4-47 - 4-49)(Tablo 4-37). Her bileşen ve formülasyonun tek bir endotermik pik verdiği görüldü. LE'a ait erimeye başlama derecesinin 250,14 °C olduğu, erime derecesinin 251,46 °C olduğu ve erime entalpisinin (ΔH) 137,12 J/g olduğu görüldü ve referanslarla uyumlu olduğu kanıtlandı (Noble ve Goa 1998; Dinnendahl ve Fricke 2008). Katı lipit olarak kullanılan Precirol® ATO 5'in erimeye başlama derecesinin 62,95 °C ve erime derecesinin 63,16 °C olduğu görülürken, ΔH değerinin 243,29 J/g olduğu görüldü. Cavalli ve arkadaşlarının, hazırladıkları KLN formülasyonlarında katı lipit olarak Precirol® ATO 5'in kullanıldığı ve termal analiz sonucunda erime derecesinin 63,78 °C olarak ölçüldüğü rapor edilmiştir (Cavalli ve ark. 2002). Yine Hamdani ve arkadaşlarının oküler uygulanmak üzere hazırladığı NLT formülasyonlarında Precirol® ATO 5 katı lipit olarak kullanılmış DSC termogramlarına göre erime derecesi 63,03 °C ve ΔH değerinin 241,28 J/g olarak ölçüldüğü rapor edilmiştir (Hamdani ve ark. 2003). Yüzey etkin madde olarak kullanılan Pluronic® F68'in erimeye başlama derecesinin 62,03°C ve erime derecesinin 62,46 °C olduğu görülürken ΔH değerinin 123,59 J/g olarak tespit edildi. Guźniczak ve

arkadaşlarının Pluronic® F68 karakterizasyon özelliklerinin tespiti için yaptığı bir çalışmada, DSC termogramına göre Pluronic® F68'in erimeye başladığı derece 61,92 °C ve erime derecesi 62,28 °C olarak tespit edilirken; ΔH değeri 118,24 J/g olarak belirtilmiştir (Guzniczak ve ark. 2018). Elde edilen DSC analiz sonuçlarının referanslar kıyaslandığında uyumlu oldukları kanıtlandı.

Etkin madde yüklü olmayan KLN formülasyonunun (Boş-KLN505) erimeye başlama derecesinin 62,17 °C ve erime derecesinin 62,41 °C olduğu görülürken, ΔH değeri ise 18,71 J/g olarak tespit edildi. KLN505 formülasyonunun erimeye başlama derecesi 63,87 °C ve erime derecesi 64,19 °C olarak bulunurken, ΔH değerinin 22,12 J/g olduğu tespit edildi. NLT formülasyonları için, etkin madde yüklü olmayan NLT formülasyonunun (Boş-NLT532) erimeye başlama derecesi 59,05 °C ve erime derecesi 59,32 °C olarak tespit edilirken, ΔH değeri 15,06 J/g olarak bulundu. NLT532 formülasyonunun erimeye başlama derecesi 60,09 °C ve erime derecesi 60,43 °C olarak bulunurken, ΔH değeri 15,27 J/g olarak tespit edildi. NE formülasyonları için, etkin madde yüklü olmayan NE formülasyonunun (Boş-NE550) erimeye başlama derecesi 52,11 °C ve erime derecesi 52,19 °C olarak tespit edilirken, ΔH değeri 9,17 J/g olarak bulundu. NE550 formülasyonunun erimeye başlama derecesi 54,23 °C ve erime derecesi 54,58 °C olarak bulunurken, ΔH değeri 9,39 J/g olarak tespit edildi.

Formülasyonlara ait entalpilerin, saf bileşenlerin entalpilerine göre daha düşük değere sahip olma nedeninin KLN550, NLT532 ve NE550 kodlu formülasyonlarda bu bileşenlerin çok daha düşük oranlarda bulunması nedeniyle olduğu sonucuna varıldı. Bunun yanı sıra etkin madde bulunan tüm formülasyonlarda (KLN550, NLT532 ve NE550) LE'nin lipit karışım içerisinde dağıtılarak nanopartiküllerin hazırlanması nedeniyle erime sıcaklığında ve ΔH değerinde saf LE'e kıyasla düşüş olduğu tespit edildi. NLT532 ve NE550 formülasyonlarının erime derecelerinde meydana gelen düşüşün, içeriklerinde bulunan oleik asit nedeniyle olduğu sonucuna varıldı. Gönüllü ve arkadaşları transdermal uygulamak üzere lornoksikam yüklü KLN ve NLT formülasyonları hazırlamışlardır. NLT formülasyonlarında sıvı lipit olarak oleik asit kullanılmış ve DSC termogramları karşılaştırıldığından KLN formülasyonlarına ait erime derecesinin NLT formülasyonlarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Gönüllü ve ark. 2015). Costa ve arkadaşları nazal yoldan uygulanmak üzere kurkumin yüklü KLN ve NLT formülasyonları hazırlamışlardır. Oleik asidin sıvı lipit olarak

kullanıldığı NLT formülasyonlarına ait erime derecelerinin KLN formülasyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu rapor edilmiştir ($p \leq 0,05$) (Costa ve ark. 2021). Bu çalışma LE'nin diğer formülasyon bileşenleriyle herhangi bir kimyasal etkileşime girmeden bir formülasyon oluşturulduğunu gösterdi.

Kristalizasyon yüzdeleri (%CI), Bölüm 2.4.2.4'de verilen Gibbs-Thomson eşitliği kullanılarak hesaplandı. Kristalizasyonlar 5°C, 25°C ve 40°C'de sırasıyla Boş-KLN505 formülasyonu için %49,13, %47,65 ve %42,75; KLN505 formülasyonu için %57,99, %56,85 ve %48,37; UL NLT532 formülasyonu için %38,61, %38,29 ve %30,53 ve NLT532 formülasyonu için %39,81, %39,05 ve %32,75 olarak tespit edildi. Kristalizasyon yüzdelерinin tüm formülasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu sıcaklık 5°C'de olarak tespit edildi ($p \leq 0,05$). KLN formülasyonlarının kristalizasyon yüzdelерinin NLT formülasyonlarından istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p \leq 0,05$); bunun yanı sıra formülasyonlara etkin madde ilavesinin istatistiksel açıdan anlamlı değişikliğe neden olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Clares ve arkadaşları retinil palmitatın KLN ve NLT formülasyonlarını hazırlamışlardır. Boş ve ilaç yüklü formülasyonlara ait %CI değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ($p > 0,05$), bunun yanı sıra KLN formülasyonlarının (%49,5) %CI oranlarının NLT formülasyonlarına (%33,8) kıyasla istatistiksel açıdan farklı olduğunu bildirmişlerdir (Clares ve ark. 2014). Sastri ve arkadaşlarının valproik asit yükleyerek hazırladıkları KLN ve NLT formülasyonlarında, 5°C'de elde edilen kristalizasyon değerlerinin (sırasıyla %51,7 ve %44,8), 40°C'de elde edilen değerlere (sırasıyla %36,9 ve %25,4) kıyasla aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$) (Sastri ve ark. 2020). Referans çalışmalarla elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülerek, kristalizasyonun sıcaklığın azalmasıyla arttığı kanıtlandı.

Formülasyonların (etkin madde yüklü ve yüklü olmayan), Precirol® ATO 5, Pluronic® F68 ve LE'a ait FT-IR spektrumları incelendi. Yüklü olan formülasyonlarda LE'a ait 1390,69 - 1370,77 cm⁻¹ arasında görülen alifatik C-O gerilme bandı ve 1438,96 - 1465,81 cm⁻¹'de asimetrik -CH₂ grubuna ait gerilme bantları tespit edildi (Şekil 4-50 - 4-52). Piklerin saf LE'a ait pikler ile aynı yerde görülmesinin formülasyonlara ait diğer bileşenler arasında etkileşim olmadığını göstermektedir (Hirani ve ark. 2014; Sah ve ark. 2016). LE'a ait piklerin daha kısa çıkmış olması, formülasyona giren diğer bileşenler (katı lipid, yüzey etkin madde ve sıvı lipid) ile fiziksel olarak etkileşimini göstermektedir

(Gönüllü ve ark. 2015; Üner 2007). Bunun yanı sıra hem yüklü hem yüklü olmayan formülasyonlarda Pluronic® F68'in eter grubunda bulunan asimetrik C-O gruplarının titreşimlerine $1111,3 - 1002,8 \text{ cm}^{-1}$ arasında görülen gerilme bandı tespit edildi (Guznciczak ve ark. 2018). Precirol® ATO 5 içeren formülasyonlarda lipidin içerdiği alifatik $-\text{CH}_2$ gruplarından kaynaklı gerilme bantları $899,3 - 909,7 \text{ cm}^{-1}$ aralığında tespit edildi (Müller ve ark. 2000; Hamdani ve ark. 2003). Oleik asit içeren formülasyonlarda ise asimetrik C=O gerilme bantları $1308,5 - 1285,7 \text{ cm}^{-1}$ aralığında görüldü (Kaneko ve ark. 1997).

KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının viskozitelerinin sırasıyla, 18,299 cP, 17,228 cP ve 17,117 cP olduğu görülürken; pH değerlerinin ise 6,903, 6,799 ve 6,836 olduğu tespit edildi. Formülasyonların hem viskozite hem de pH değerleri açısından kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenirken ($p > 0,05$), pH değerlerinin göze uygulanabilecek aralıkta (pH 4 - 8) olduğu görüldü (Leonardi ve ark. 2014; Craig ve ark. 2017). Attama ve arkadaşlarının dikofenak sodyum yükleyerek hazırladıkları KLN ve NLT formülasyonlarının viskozite ölçümleri sırasıyla 19,043 cP ve 18,117 cP çıkmış, pH değerleri ise 6,573 ve 6,901 olduğu tespit edilmiştir (Attama ve ark. 2008). Başka bir çalışmada Gökçe ve arkadaşlarının hazırladığı siklosporin-A yüklü KLN formülasyonunun viskozite değeri 17,893 cP ve pH değeri 6,619 çıkmıştır (Gökçe ve ark. 2009). Elde edilen verilerin yapılan referans çalışmalarla uyumlu olduğu kanıtlandı.

Hazırlanan formülasyonların fiziksel karakterizasyonuna Franz hücresi kullanılarak yapılan *in vitro* salım çalışması ile devam edildi. Çalışma, ilacın yarılanma ömrünün (2,6 saat) en az üç katı kadar sürdürülmesi gerektiğinden 8 saat yapıldı (Pardeike ve ark. 2009; Das ve ark. 2011). Hazırlanan KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının içeriklerini 8. saatin sonunda sırasıyla %62,199, %74,366 ve %80,208 olarak kontrollü olarak salım yaptığı (Şekil 4-53 - 4-55); kontrol grubu ve piyasa preparatının ise 2 saat içerisinde ani salım (burst release) yaparak içeriklerinin yaklaşık %90'ını salıverdikleri tespit edildi (Şekil 4-56). Salım açısından kontrol grubu ve piyasa preparatının kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı ($p > 0,05$) görülürken; KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarında ise hem kendi aralarında hem de kontrol grubu ve piyasa preparatına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p \leq 0,05$). Formülasyonlara ait akı (Jss) değerlerinin ise en yüksek kontrol

grubu (0,379 mg/cm².saat) ve piyasa preparatının (0,324 mg/cm².saat) olduğu görülürken; KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının sırasıyla 0,279 mg/cm².saat , 0,317 mg/cm².saat ve 0,314 mg/cm².saat olduğu tespit edildi. KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarında kontrollü bir salım gözlemlenmesinin nedeninin katı ve sıvı lipid içerisinde dağılmış halde bulunan LE'ın aşınma yoluyla yavaş yavaş parçalanmasından dolayı olduğu sonucuna varıldı. KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonları arasındaki partikül büyüklüğü farkının *in vitro* salım profili üzerinde etkisinin olmadığı görüldü. Kinetik salım profili olarak incelendiğinde, KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının referans çalışmalarda da görüldüğü gibi Korsmeyer-Peppas kinetiğine uygun olarak salım yaptığı görüldü (Tablo 4-44) (Şekil 4-57). Bunun yanı sıra KLN505 (0,7482) ve NLT532'ye (0,6906) ait elde edilen n değerlerinin $0,45 \leq n \leq 0,85$ aralığında bulunurken, NE550'ye (0,3882) ait n değerinin ise $n < 0,45$ 'ten düşük olduğu tespit edildi. KLN505 ve NLT532 formülasyonlarının non-Fickian salıma uygun olarak aşınma yoluyla salım yaparken; NE550 formülasyonunun Fickian salıma uygun olarak difüzyonel salım yaptığı görüldü. Üner ve arkadaşları transdermal uygulamak üzere loratadin yüklü KLN, NLT ve NE formülasyonları hazırlamışlardır. Formülasyonlarla *in vitro* geçiş çalışması ve *in vivo* sıçan derisinden geçiş çalışması yapılmış, her üç formülasyonunda en yüksek r² değerlerinin Korsmeyer-Peppas kinetiğinde tespit edildiği raporlanmıştır. Bunun yanı sıra elde edilen n değerlerinin KLN ve NLT için sırasıyla 0,528 ve 0,482 olarak non-Fickian olarak salıma uygun olduğu, NE formülasyonunun ise 0,436 olarak Fickian salıma uygun olduğu belirtilmiştir. Formülasyonlara ait salım hızlarının ise sırasıyla yüksekten düşüğe NE, NLT ve KLN formülasyonlarında gözlemlendiği bildirilmiştir (Üner ve ark. 2014). Özdemir ve arkadaşlarının eplerenon yükleyerek hazırladığı NE formülasyonlarıyla gerçekleştirdiği *in vitro* salım çalışması sonrası, NE formülasyonlarının kontrollü salım yaparak Korsmeyer-Peppas kinetiği ile uyumlu salım yaptığı belirtilmiştir. Hazırlanan formülasyonlara ait n değerlerinin 0,33 - 0,45 aralığında olduğu tespit edilerek non-Fickian salım ile uyumlu olarak ilacı salıverdiği bildirilmiştir (Özdemir ve ark. 2018). *In vitro* salım çalışması ile elde edilen salım sonuçlarının, benzer çalışmalarla uyumlu olduğu kanıtlandı.

Dana gözüne ait kornealar ile gerçekleştirilen *ex vivo* salım çalışmasında Bölüm 3.2.6.8'de bahsedilen yöntem kullanıldı. İlk 2 saat içerisinde en yüksek akı hızının NLT532'ye (0,206 mg/cm².saat) ait olduğu görülürken, en düşük akı hızının kontrol

grubuna ($0,085 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{saat}$) ait olduğu görüldü (Tablo 4-50) (Şekil 4-61). Kontrol grubu ve piyasa preparatının, KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarına göre kümülatif geçen etkin madde miktarları sırasıyla $0,629 \text{ mg/cm}^2$ ve $0,996 \text{ mg/cm}^2$ olarak bulunurken; KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının sırasıyla $1,605 \text{ mg/cm}^2$, $1,755 \text{ mg/cm}^2$ ve $1,405 \text{ mg/cm}^2$ olduğu tespit edildi. Tüm formülasyonlara ait salım oranlarının birbirlerinden istatistiksel açıdan farklı olduğu görüldü ($p \leq 0,05$). *In vitro* salım çalışması ile kıyaslandığında NE550 formülasyonunun korneadan geçiş oranının KLN505 ve NLT532'ye kıyasla düşük olmasının nedeninin damlacık büyüklüğünden kaynaklandığı sonucuna varıldı. Formülasyonların *in vitro* çalışmada olduğu gibi depo etki ile kontrollü bir salım gösterdiği tespit edildi. Puglia ve arkadaşları oküler uygulamak üzere prednizolon yükleyerek NLT ve NE formülasyonlarını hazırlayarak, *in vitro* geçiş çalışması ve *ex vivo* korneadan geçiş çalışması yapmışlardır. Çalışma sonrası, Korsmeyer-Peppas kinetiğine uygun salım yaptıkları ve n değerlerinin sırasıyla 0,534 ve 0,401 olarak tespit edilmiştir. *In vitro* çalışma sonrası salım hızı en yüksek NE formülasyonu görülürken, *ex vivo* çalışma sonrası en yüksek salımın NLT olduğu rapor edilmiştir. Bunun nedeninin NE'un damlacık büyüklüğünün ($136,9 \text{ nm}$) NLT'ya ($95,4 \text{ nm}$) kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Puglia ve ark. 2015). Balguri ve arkadaşlarının, indometazin yükleyerek hazırladıkları KLN ve NLT formülasyonlarında, her iki formülasyonun *in vitro* ve *in vivo* geçişinde Korsmeyer-Peppas kinetiği ile uyumlu salım yaptıkları bildirilmiştir. *In vivo* tavşan korneasında yapılan geçiş çalışmasında NLT'ya ($93,9 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{saat}$) ait akı değerinin KLN'e ($63,2 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{saat}$) kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğu bildirilmiştir (Balguri ve ark. 2016). Elde edilen sonuçların yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu tespit edildi.

Salım kinetikleri açısından incelendiğinde *in vitro* çalışmada olduğu gibi KLN, NLT ve NE'ların Korsmeyer-Peppas kinetiğine göre difüzyon yoluyla salım yaptığı görülürken (Tablo 4-51) (Şekil 4-62); KLN505 ($0,7155$) ve NLT532'ye ($0,7002$) ait elde edilen n değerlerinin $0,45 \leq n \leq 0,85$ aralığında bulunduğu, NE550'ye ($0,4378$) ait n değerinin ise $n < 0,45$ 'den düşük olduğu tespit edildi. KLN505 ve NLT532 formülasyonlarının non-Fickian salıma uygun olarak aşınma yoluyla salım yaparken, NE550 formülasyonunun Fickian salıma uygun olarak difüzyon ile salım yaptığı görüldü. Bonaccorso ve arkadaşlarının oküler uygulamak üzere kurkumin yükleyerek hazırladığı KLN, NLT ve NE formülasyonlarının *ex vivo* korneadan geçiş çalışması sonrası her üç formülasyonunda Korsmeyer-Peppas kinetiğine uygun olarak salım gösterdiği tespit

edildi. KLN ve NLT formülasyonlarına ait n değerleri ise sırasıyla 0,655 ve 0,591 olarak non-Fickian salıma uygun, NE formülasyonuna ait n değerinin ise 0,429 olarak Fickian salıma uygun ilacı salıverdiği tespit edildi (Bonaccorso ve ark. 2021). *Ex vivo* salım kinetiğine ait sonuçların referans çalışma ile uyum içerisinde olduğu kanıtlandı.

Korneadan *ex vivo* geçiş çalışması sonrası bant sıyırma çalışması Bölüm 3.2.6.10'da belirtildiği şekilde gerçekleşti. Analiz sonrası kornea yüzeyinde en fazla bulunan LE miktarının kontrol grubu (6,196 mg) kullanılarak yapılan çalışmadan elde edilirken; daha sonra sırasıyla piyasa preparatı (4,381 mg), NE550 (1,757 mg), KLN505 (0,3913 mg) ve NLT532 (0,1146 mg) ile elde edildiği görüldü (Tablo 4-52) (Şekil 4-63). Her formülasyonun kendi içerisinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p \leq 0,05$) (Tablo 4-53). NE550 formülasyonunun korneadan bir miktar geçse de damlacık büyüklüğü (126,54 nm) nedeniyle KLN505 ve NLT532 formülasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede korneada kaldığı tespit edildi ($p \leq 0,05$), Bant sıyırma çalışmasını takiben yapılan korneanın homojenizasyonu çalışması sonrası elde edilen verilere göre korneada tutulan LE miktarı en yüksek oranda NLT532 (4,077 mg) kodlu formülasyon ile elde edilirken, bunu takiben sırasıyla KLN505 (3,648 mg), NE550 (2,665 mg), piyasa preparatının (2,148 mg) ve kontrol grubu (1,034 mg) formülasyonu ile elde edildi (Tablo 4-54) (Şekil 4-64). Korneada bulunan ilaç miktarına göre her formülasyonların birbirleriyle arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p \leq 0,05$) (Tablo 4-55). Bunun yanı sıra KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının korneada bulunan ilaç miktarını, kontrol grubu ve piyasa preparatına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi ($p \leq 0,05$). Tian ve arkadaşları, rodamin yükleyerek hazırladıkları KLN ve NLT formülasyonları ile korneadan *ex vivo* geçiş çalışmasını takiben bant sıyırma çalışması ve korneanın homojenizasyon çalışmasını yapmışlardır. Korneada tutulan rodamin miktarı NLT'da %42,9 olarak bulunurken , KLN'de %36,4 olarak tespit edilerek istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir ($p \leq 0,05$). Yine aynı çalışmada kornea yüzeyinde tespit edilen madde miktarı açısından ise KLN'ün (%19,7) NLT'ya (%9,3) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$) (Tian ve ark. 2013). Başka bir çalışmada Teixeira ve arkadaşları KLN, NLT ve NE formülasyonlarına asiklofenak yüklemişlerdir. Bant sıyırma çalışması sonrası NE'un (%26,3), KLN (%16,8) ve NLT'ya (%11,5) kıyasla kornea yüzeyinde istatistiksel açıdan yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (Teixeira ve

ark. 2017). Elde edilen sonuçların KLN, NLT ve NE'lar kullanılarak yapılan çalışmalarla benzer olduğu görüldü. Bunun yanı sıra bant sıyırma çalışması ve korneanın homojenizasyonu çalışması sonrası, lipofilik özellikte bir madde olan LE'in korneadan geçişinin arttırılmasında KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının iyi birer alternatif olabileceği sonucuna varıldı.

Korneanın homojenizasyonu sonrası elde edilen veriler, KLN, NLT ve NE'ların hem korneadan geçişi arttırdıklarını hem de korneada yüksek oranda tutulmaları nedeniyle korneada meydana gelen inflamasyonlu durumların tedavisinde kullanılabilecek alternatif sistemler olduğunu kanıtladı. KLN505 (%50,777), NLT532 (%54,382) ve NE550 (%45,401) formülasyonlarının korneadan geçiş oranlarının kontrol grubu (%18,704) ve piyasa preparatına (%28,690) göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p \leq 0,05$). Kornea yüzeyinde ise, kontrol grubu (%61,965) ve piyasa preparatının (%21,482), KLN505 (%4,288), NLT532 (%44,205) ve NE550 (%19,711) formülasyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek olduğu ($p \leq 0,05$) ve KLN505 (%40,061), NLT532 (%1,027) ve NE550 (%29,899) formülasyonlarının korneada tutulma oranlarının kontrol grubu (%10,340) ve piyasa preparatına (%21,482) göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olduğu ($p \leq 0,05$) tespit edildi. Bu nedenle KLN, NLT ve NE'ların gözün ön segmentinde (kornea, lens, iris ve sklera) meydana gelen inflamasyonlu durumların tedavisine ek olarak korneadan geçiş oranının yüksek olması nedeniyle gözün arka segmentine (koroid tabaka, optik sinir ve retinal sinir) ait inflamasyonlu durumların tedavisinde de kullanılabilecek uygun taşıyıcı sistemler olduğu sonucuna varıldı.

Korneanın homojenizasyon çalışması sonrası korneaların histopatolojik açıdan incelenmesi Bölüm 3.2.6.11'de belirtildiği şekilde yapıldı. Parafin içerisine gömülen dokular, hemotoksilen ve eozin ile boyanıp ksilende bekletildikten sonra floresan mikroskop altında incelendi. İnceleme sonucunda, kontrol grubuna kıyasla KLN505, NLT532, NE550 ve piyasa preparatı ile muamele edilen korneaların hem dış epitellerinde hem de iç epitellerinde herhangi bir harabiyet olmadığı tespit edildi (Şekil 4-66 - 4-70). Tüm deney gruplarına ait kornealarda benzer morfolojiler gözlemlendi ve konfokal mikroskop altında incelenen korneaların epitel yapısında herhangi bir nekrotik durum tespit edilmeden normal epitel yüzeye sahip olduğu doğrulandı. Bu nedenle, KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonun oküler tahribata neden olmadan, oküler uygulama için

güvenli olduğu sonucuna varıldı. Bu sonuca göre formülasyonların içeriğinde yer alan bileşenlerin (oleik asit, Pluronic® F68 ve Precirol® ATO 5) referanslarda belirtildiği gibi güvenli materyal olduğu (Müller ve ark. 2000; Salentinig ve ark. 2010; Guźniczak ve ark. 2018), Precirol® ATO 5'in de güvenli olarak kabul edilen (GRAS) statüde bir katı lipit olduğu kanıtlandı (Hamdani ve ark. 2003). Bunun yanı sıra LE'tan kaynaklanan herhangi korneal harabiyet riskinin olmadığı da belirlendi. Ayrıca histopatoloji sonuçlarına göre KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan metanole ait korneada yıkıcı/ tahrip edici etkiye neden olacak düzeyde herhangi bir kalıntı olmadığı da doğrulandı.

KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonları üzerinde yapılan hızlandırılmış fiziksel stabilite testlerinde, belirli zaman aralıklarında formülasyonlardan alınan örneklerle partikül/damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi (PI), zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği (%EE) değerleri tayin edildi. Stabilite boyunca hiçbir sıcaklıkta faz ayrımı gözlemlenmedi. Formülasyonların partikül büyüklüklerindeki artışın en fazla 40°C'de olduğu görülürken, en düşük artışın 5°C'de olduğu gözlemlendi. Sıfırıncı günde NE550 formülasyonunun damlacık büyüklüğünün 126,38 nm iken 242,78 nm'ye çıkarak damlacık büyüklük artışının KLN505 ve NLT532 ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($p \leq 0,05$). Tüm formülasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı değişikliğin 5°C'de 180. günde başladığı görülürken; 25°C 120. günden itibaren ve 40°C'de 60. günden itibaren başladığı görüldü ($p \leq 0,05$). KLN505, NLT532 ve NE550 formülasyonlarına ait PI ve zeta değerlerinde ise 180 gün boyunca herhangi bir anlamlı değişiklik gözlemlenmedi ($p > 0,05$). Souto ve arkadaşlarının klotrimazol yükleyerek hazırladığı KLN, NLT ve NE formülasyonlarının 6 aylık stabilite sonuçlarına göre 40°C'de partikül büyüklüğünün diğer sıcaklıklara göre (5°C ve 25°C) istatistiksel olarak anlamlı derecede değişiklik olduğu bildirilmiştir ($p \leq 0,05$) (Souto ve ark. 2004). Yine Sharif ve arkadaşlarının propranolol yükleyerek hazırladığı KLN ve NLT formülasyonların 6 ay boyunca stabiliteleri izlenmiştir. Stabilite sonuçlarına göre zeta potansiyeli ve PI değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiş ($p > 0,05$) ve 5 °C'de bekletilen formülasyonların en stabil formülasyonlar olduğu belirtilmiştir (Sharif ve ark. 2018). Elde edilen sonuçların yapılan çalışmalarla benzer olduğu tespit edildi.

Enkapsülasyon etkinlikleri açısından değerlendirildiğinde formülasyonlarda meydana gelen enkapsülasyondaki düşüşün en yüksek 40°C’de olduğu görülürken, en düşük 5°C’de olduğu tespit edildi. Bunun nedeninin 40°C’de bulunan lipidin yağ asidi zincirlerinin gevşemesinden dolayı, amorf kümeler ile aradaki mesafenin açılmasına bağlı olarak etkin maddenin sızması nedeniyle olduğu düşünüldü. Cavalli ve arkadaşlarının oküler uygulamak üzere tobramisin yükleyerek hazırladıkları KLN ve NLT formülasyonlarına ait EE değerlerinin en yüksek olduğu sıcaklığın 5°C’, en düşük olduğu sıcaklığın ise 40 °C olduğu bildirilmiştir (Cavalli ve ark. 2002). Chinsriwongkul ve arkadaşlarının retinoik asit yükleyerek hazırladıkları NLT ve NE formülasyonlarında, en fazla 40 °C’de EE değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş görüldüğü belirtilmiştir ($p \leq 0,05$) (Chinsriwongkul ve ark. 2012). Tüm formülasyonlarda %EE değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliğin 5°C’de 150. günde başladığı görülürken; 25°C 120. günden itibaren ve 40°C’de 60. günden itibaren başladığı görüldü ($p \leq 0,05$). Elde edilen sonuçların referans çalışmalarla uyumlu olduğu kanıtlandı.

Formülasyonlar 180 gün boyunca viskozite ve pH değerleri açısından incelendi. Viskozitelerde meydana gelen değişimlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görülürken ($p > 0,05$); pH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliğin 5°C’de 180. günde, 25°C’de 150. günde ve 40°C’de 90. günden itibaren anlamlı değişikliğin başlayarak asidik özelliğin arttığı görüldü ($p \leq 0,05$). Formülasyonun asidik özelliğindeki artışın nedeninin, LE’nin içerdiği karboksilat grubunun zamanla karboksilik aside dönüşerek ortamı asidik özelliğe yaklaştırması ile bağlantılı olduğu düşünüldü. Alberth ve arkadaşlarının LE ile gerçekleştirdiği bir çalışmada, LE’nin süspansiyonları (%0,5) hazırlanmış ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Formülasyonlara ait pH değerlerinin zaman içerisinde (0-160 gün aralığında) pH 4,5 civarına yaklaştığı görülerek, bunun LE içerisinde bulunan karboksilat grubunun karboksilik aside dönüşmesine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir (Alberth ve ark. 1991). Yine Bodor ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, LE’a ait süspansiyonlar (%0,5) hazırlanarak viskoziteleri ve pH değerleri incelenmiş ve viskozitede anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken, pH’ların 150. günden itibaren asidik pH’a kaydığı rapor edilmiştir (Bodor ve ark. 2000). Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda elde edilen sonuçların, bu çalışmalarla uyumlu olduğu kanıtlandı.

KLN505 ve NLT532 formülasyonları kristalizasyon indeksleri (%CI) açısından 90. ve 180. günlerde karşılaştırıldı. Belirtilen sürelerde %CI değerlerinde anlamlı

değişiklik olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Katı lipit olarak kullanılan Precirol® ATO 5'in zaman/ sıcaklığa bağlı olarak formülasyonlarda kristalizasyon artışına neden olmadığı ve mevcut amorf yapıyı korumaya devam ettiği görüldü. Fang ve arkadaşlarının Precirol® ATO 5 kullanarak hazırladıkları psorolen yüklü KLN ve NLT formülasyonları oda sıcaklığında 180 gün boyunca incelenmiştir. Elde edilen %CI değerlerine bakıldığında NLT formülasyonlarındaki değişiklik (%1,33) ve KLN formülasyonlarındaki değişikliğin (%2,91) istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$) (Fang ve ark. 2008). Yine Kasongo ve arkadaşlarının KLN nanopartiküllerinde Precirol® ATO 5 kullanarak yaptığı başka bir çalışmada, 90 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilen KLN formülasyonlarının %CI değerlerindeki artışın %2,08 olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı rapor edilmiştir (Kasongo ve ark. 2011). Bu çalışmalara bakılarak, elde edilen sonuçlarla bu çalışmaların uyum gösterdiği kanıtlandı.

KLN505, NLT532 ve NE550'ye ait 180. gün SEM görüntüleri incelendiğinde, 180. gün partikül büyüklük ve dağılım sonuçlarını desteklediği görüldü (Şekil 4-91 - 4-96).

Bu çalışmada ayrıca ön formülasyon aşamasında Compritol® 888 ve setostearil alkol kullanılarak hazırlanan KLN ve NLT formülasyonları ile *in vitro* Franz hücresinden geçiş, *ex vivo* domuz derisinden geçiş ve bunu takiben bant sıyırma ile doku homojenizasyon çalışması yapıldı. Kontrol grubuna kıyasla KLN ve NLT formülasyonlarının hem deriden geçişinin hem de deride tutulan LE miktarlarının istatistiksel açıdan farklı olduğu görüldü ($p \leq 0,05$).

Sonuç olarak, korneada meydana gelen inflamasyonlu durumların tedavisinde LE'nin yan etki profilinin en aza indirilmiş yeni formülasyonları tasarlanmıştır. Bu formülasyonlar sayesinde uygulanan doz miktarı azaltılarak hasta uyuncu arttırılabilecektir. Hazırlanan sistemlerin korneada bulunan oküler bariyerleri (gözyaşı filmi bariyeri ve korneal bariyer) piyasa ürününe göre yüksek oranda aştığı görülerek biyoyararlanımı arttırdığı kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra uygulanan KLN, NLT ve NE'ların oklüzif etkileri sayesinde korneal epitelde bulunan gözenekleri tıkayarak su kaybına izin vermeden daha etkili bir tedavi mümkün olabilecektir. KLN, NLT ve NE'ların filtrasyon ile sterilizasyonunun yapılabilmesi ve içeriklerinde bulunan bileşenlerin güvenli olması nedeniyle hazırlanan formülasyonlar diğer kolloidal ilaç

taşıyıcı sistemlerden (mikroemülsiyonlar, lipozomlar, niozomlar ve polimerik nanopartiküller) avantajlıdır.



KAYNAKLAR

Afshar, M. F., Clifford, L. Tappin, A. Evans T. (2010). Supratarsal Steroid Injection for Allergic Conjunctivitis in Children. *Investigative. Ophthalmology & Visual Science*, **51**, 1930.

Agrahari, V., Mandal, A., Agrahari, V. ve ark. (2016). A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. *Drug Delivery and Translational Research*, **6**, 735-754.

Agrawal, R.V., Murthy, S., Sangwan, V., Biswas, J. (2010). Current approach in diagnosis and management of anterior uveitis. *Indian journal of ophthalmology*, **58**, 11–19.

Aksu, B., Mesut. B.(2015). Quality by design (QbD) for pharmaceutical area. *İstanbul Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **45**, 233-251.

Alex, A.M.R., Chacko, A.J., Jose, S. ve ark. (2011). Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **42**, 11-18.

Alberth, M., Wu, W.M., Winwood, D., Bodor, N. (1991). Lipophilicity, solubility and permeability of loteprednol etabonate: a novel, soft anti-inflammatory steroid. *Journal of Biopharmaceutical Sciences*, **2**, 115-125.

Ali, H., El-Sayed, K., Sylvester, P., Nazzal, S. (2010). Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: evidence studies by differential scanning calorimetry (DSC) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (1H NMR). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **77**, 286–297

Ali, M.J., Schicht, M., Paulsen, F. (2018). Morphology and morphometry of lacrimal drainage system in relation to bony landmarks in Caucasian adults: a cadaveric study. *International Ophthalmology*, **38**, 2463-2469.

Ammar, H.O., Salama, H.A., Ghorab, M. ve ark. (2009). Nanoemulsion as a Potential Ophthalmic Delivery System for Dorzolamide Hydrochloride. *AAPS PharmSciTech*, **10**, 808.

Andley, U.P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*, **26**, 78-98.

Ansari, Z., Miller, D., Galor, A. (2013). Current Thoughts in Fungal Keratitis: Diagnosis and Treatment. *Current Fungal Infection Reports*, **7**, 209–218.

Arhewoh, I. M., Okhamafe, A. O. (2004). An overview of site-specific delivery of orally administered proteins/peptides and modelling considerations. *Journal of Medicine and Biomedical Research*, **3**, 7-20.

Attama, A.A., Reichl, S., Müller-Goymann, C.C. (2008). Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *International journal of pharmaceutics*, **355**, 307-313.

Austin, A., Lietman, T., Rose-Nussbaumer, J. (2017). Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*, **124**, 1678–1689.

Azari, A.A., Arabi, A. (2020). Conjunctivitis: A Systematic Review. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, **15**, 372-395.

Babu, B.M., Rathinam, S.R. (2010). Intermediate uveitis. *Indian Journal of Ophthalmology*, **58**, 21-27.

Bachu, R.D., Chowdhury, P., Al-Saedi, Z., Karla, P.K., Boddu, S. (2018). Ocular Drug Delivery Barriers-Role of Nanocarriers in the Treatment of Anterior Segment Ocular Diseases. *Pharmaceutics*, **10**, 1-31.

Balguri, S.P., Adelli, G.R., Majumdar, S. (2016). Topical ophthalmic lipid nanoparticle formulations (SLN, NLC) of indomethacin for delivery to the posterior segment ocular tissues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **109**, 224–235.

Babu, K., Mahendradas, P. (2013). Medical Management of Uveitis – Current Trends. *Indian Journal of Ophthalmology*, **61**, 277-283.

Baishya, P., Mandal, M., Gogoi, P., Maji, T.K. (2017). Natural Polymer-Based Nanocomposites: A Greener Approach for the Future. *Handbook of Composites from Renewable Materials*, 433–459.

Bang, S.P., Yeon, C.Y., Adhikari, N., Neupane, S., Kim, H., Lee, D.C., Jun, J.H. (2019). Cyclosporine A eyedrops with self-nanoemulsifying drug delivery systems have improved physicochemical properties and efficacy against dry eye disease in a murine dry eye model. *PLOS ONE*, **14**, e0224805.

Barabino, S., Rolando, M., Nardi, M. ve ark. (2014). The effect of an artificial tear combining hyaluronic acid and tamarind seeds polysaccharide in patients with moderate dry eye syndrome: a new treatment for dry eye. *European Journal of Ophthalmology*, **24**, 173–178.

Barradas, T.N., De Holanda, E., Silva, K.G. (2020). Nanoemulsions as Optimized Vehicles for Essential Oils. İçinde A. Saneja, A. Panda, E. Lichtfouse (Eds.), *Sustainable Agriculture Reviews 44*, Springer: Cham; 115-167.

Basha, S.K., Muzammil, M.S., Dhandayuthabani, R., Kumari, V.S., Kaviyarasu, K. (2019). Nanoemulsion as Oral Drug Delivery – A Review. *Current Drug Research Reviews*, **11**, 4-15.

Başaran, E., Demirel, M., Sırmagül, B., Yazan, Y. (2010). Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Journal of Microencapsulation*, **27**, 37–47.

Baudouin, E.M., Messmer, A., Aragona, P. Revisiting the vicious circle of dry eye disease: a focus on the pathophysiology of meibomian gland dysfunction, *British Journal of Ophthalmology*, **100**, 300-306.

Bausch & Lomb Lotemax KÜB. (2018). LOTEMAX 5 mg/ml göz damlası süspansiyonunun Kısa Ürün Bilgisi,. Bausch & Lomb İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti. Erişim 28.09.2021, https://www.bausch.com.tr/fileadmin/media/urunler/Lotemax_KUB_10-2-2018.pdf

Beardsley, R.M., Suhler, E.B., Rosenbaum, J.T., Lin, P. (2013). Pharmacotherapy of scleritis: current paradigms and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **14**, 411–424.

Beg, S., Akhter, S., Rahman, M., Rahman, Z. (2017). Perspectives of quality by design approach in nanomedicines development. *Current Nanomedicine*, **7**, 191–197.

Beg, S., Rahman, M., Kohli, K. (2019). Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of nanopharmaceutical products. *Drug Discovery Today*, **24**, 717-725.

Bennett, J.L., Nickerson, M., Costello, F. ve ark. (2015). Re-evaluating the treatment of acute optic neuritis. *Journal of Neurology*, **86**, 799-808.

Bernardes, T.F., Bonfioli, A.A. (2010). Blepharitis. *Seminars in Ophthalmology*, **25**, 79-83.

Boddu, S.H.S., Gunda, S., Earla, R., Mitra, A.K. (2010). Ocular microdialysis: A continuous sampling technique to study pharmacokinetics and pharmacodynamics in the eye. *Bioanalysis*, **2**, 487–507.

Bodor, N., Loftsson, T., Wu, W. (1992). Metabolism, distribution, and transdermal permeability of a soft corticosteroid, loteprednol etabonate. *Pharmaceutical Research*, **9**, 1275–1278.

Bodor, N., Drustrup, J., Wu, W. (2000). Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of a novel soft corticosteroid, loteprednol etabonate. *Die Pharmazie*, **55**, 206-209.

Bonaccorso, A., Pellitteri, R., Ruozi, B., Puglia, C., Santonocito, D., Pignatello, R., Musumeci, T. (2021). Curcumin Loaded Polymeric vs. Lipid Nanoparticles: Antioxidant Effect on Normal and Hypoxic Olfactory Ensheathing Cells. *Nanomaterials*, **11**, 1-21.

Borges, A., De Freitas, V., Mateus, N. Fernandes, I., Oliveira, J. (2020). Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. *Antioxidants*, **9**, 1-24.

Branch, S.K. (2005). Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **38**, 798–805.

Bron, A.J., De Paiva, C.S., Chauhan, S.K., Bonini, S., Gabison, E.E., Jain, S. ve ark. (2017). TFOS DEWS II pathophysiology report. *The Ocular Surface*, **15**, 438-510.

Bummer, P.M. (2004). Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery- solid lipid nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **21**, 1-19.

Bruschi, M.L. (2015). Mathematical models of drug release. İçinde, M.L. Bruschi (Ed.) *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Woodhead Publishing Limited; 63-86.

Bunjes, H., Siekmann, B. (2005). Manufacture, Characterization, and Applications of Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems.

Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, **17**, 213-268.

Byrne, T., Vikström, C. (2013). Process Analytical Technology (pat) and Quality by Design (qbd). İçinde, L. Eriksson, T. Byrne, E. Johansson, J. Trygg, C. Vikström (Eds.) *Multi-and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications*, Sweden : MKS Umetrics; 4-63.

Cacciatore, I., Ciulla, M., Fornasari, E., Marinelli, L., Di Stefano, A. (2016). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **13**, 1121–1131.

Calnan, N., O'Donnell, K., Greene, A. (2013). Enabling ICH Q10 Implementation--Part 1. Striving for Excellence by Embracing ICH Q8 and ICH Q9. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **67**, 581–600.

Caputo, L., Smeriglio, A., Trombetta, D., Cornara, L., Trevena, G., Valussi, M. ve ark. (2020). Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils of *Leptospermum petersonii* and *Eucalyptus gunnii*. *Frontiers in Microbiology*, **11**, 1-15.

Carvajal-Vidal, P., Fábrega, M., Espina, M., Calpena, A. C., García, M. L. (2019). Development of Halobetasol-loaded nanostructured lipid carrier for dermal administration: Optimization, physicochemical and biopharmaceutical behavior, and therapeutic efficacy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **20**, 1-10.

Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S., Saettone, M.F. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *International Journal of Pharmaceutics*, **238**, 241-245.

Cetinel, S., Montemagno, C. (2015). Nanotechnology for the prevention and treatment of cataract. *The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, **4**, 381–387.

Charlie-Silva, I., Fraceto, L.F., De Melo, M.F.S. (2018). Progress in nano-drug delivery of artemisinin and its derivatives: towards to use in immunomodulatory approaches. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, **46**, 611-620.

Chatziralli, I.P., Jaulim, A., Peponis, V.G., Mitropoulos, P.G., Moschos, M.M. (2013). Branch Retinal Vein Occlusion: Treatment Modalities: An Update of the Literature. *Seminars in Ophthalmology*, **29**, 85–107.

Chen, J., Li, Z., Zhang, L. ve ark. (2017). Descemet's Membrane Supports Corneal Endothelial Cell Regeneration in Rabbits. *Scientific Reports*, **7**, 1-13.

Chen, S.C., Sheu, S.J. (2017). Recent advances in managing and understanding uveitis. *F1000 Research*, **6**, 1-9.

Chen, T., Gong, T., Zhao, T., Fu, Y., Zhang, Z., Gong, T. (2018). A comparison study between lycobetaine-loaded nanoemulsion and liposome using nRGD as therapeutic adjuvant for lung cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **111**, 293–302.

Chen, B., Stephen Inbaraj, B. (2019). Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. *Nutrients*, **11**, 1-21.

Chicca, E., Whatley, A.M., Lichtsteiner, P., Dante, V., Delbruck, T., Del Giudice, P. ve ark. (2007). A Multichip Pulse-Based Neuromorphic Infrastructure and Its Application to a Model of Orientation Selectivity. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers*, **54**, 981–993.

Chinsriwongkul, A., Chareanputtakhun, P., Ngawhirunpat, T. ve ark. (2012). Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Parenteral Delivery of an Anticancer Drug. *AAPS PharmSciTech*, **13**, 150–158.

Cho, H., Madu, A. (2009). Etiology and treatment of the inflammatory causes of cystoid macular edema. *Journal of Inflammation Research*, **2**, 37-43.

Cinquina, A.L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., Cozzani, R. (2003). Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *Journal of chromatography A*, **987**, 227-233.

Clares, B., Calpena, A.C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Fanguero, J.F., ve ark. (2014). Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, **473**, 591–598.

Colligris, B., Alkozi, H.A., & Pintor, J. (2014). Recent developments on dry eye disease treatment compounds. *Saudi Journal of Ophthalmology*, **28**, 19–30.

Costa, C.P., Barreiro, S., Moreira, J. N., Silva, R., Almeida, H., Sousa Lobo, J. M. ve ark. (2021). In Vitro Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *Pharmaceuticals*, **14**, 711.

Costa, P., Sousa Lobo, J.M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13**, 123–133.

Costa, A.X. ve ark. (2017). Supratarsal injection of triamcinolone for severe vernal keratoconjunctivitis in children. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, **80**, 186-188.

Coursey, T.G., Henriksson, J.T., Marcano, D.C., Shin, C.S., Isenhardt, L.C., Ahmed, F. ve ark. (2015). Dexamethasone nanowafer as an effective therapy for dry eye disease. *Journal of Controlled Release*, **213**, 168–174.

Craig, J.P., Nichols, K.K., Akpek, E.K., Caffery, B., Dua, H.S., Joo, C.K. ve ark. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The Ocular Surfaces*, **15**, 276-283.

Dartt, D.A., Willcox, P. (2013). Complexity of the tear film: importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Experimental eye research*, **117**, 1-3.

Das, S., Ng, W.K., Kanaujia, P., Kim, S., Tan, R.B. (2011). Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **88**, 483-489.

Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **67**, 217-223.

Deinema, L.A., Vingrys, A.J., Wong, C.Y., Jackson, D.C., Chinnery, H.R., Downie, L.E. (2017). A Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Clinical Trial of Two Forms of Omega-3 Supplements for Treating Dry Eye Disease. *Ophthalmology*, **124**, 43–52.

De la Maza M.S., Tauber J., Foster C.S. (2012). *Treatment of Episcleritis and Scleritis*. In: *The Sclera*. Springer: Boston, MA.

Del Curto, M.D., Chicco, D., D'Antonio, M., Ciolli, V., Dannan, H., D'Urso, S. ve ark. (2003). Lipid microparticles as sustained release system for a GnRH antagonist (Antide). *Journal of Controlled Release*, **89**, 297–310.

Deli, G., Hatziantoniou, S., Nikas, Y., Demetzos, C. (2009). Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions containing ceramides: Preparation and physicochemical characterization. *Journal of Liposome Research*, **19**, 180–188.

De Souza, A.L.R., Andreani, T., Nunes, F.M., Cassimiro, D.L., de Almeida, A. E., Ribeiro, C.A. ve ark. (2012). Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles: studies by DSC and SAXS. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, **108**, 353-360.

Dinnendahl, V., Fricke, U. *Arzneistoff-Profile (in German)*. 6 (22nd ed.). Eschborn, Germany: Govi Pharmazeutischer Verlag.

Dong, Z., Xie, S., Zhu, L., Wang, Y., Wang, X., Zhou, W. (2011). Preparation and in vitro, in vivo evaluations of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery. *Drug Delivery*, **18**, 441–450.

Elder, D., Teasdale, A. (2017). ICH Q9 Quality Risk Management. *ICH Quality Guidelines*, 579–610.

Elzoghby, A.O., Samy, W.M., Elgindy, N.A. (2012). Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, **161**, 38–49.

Engelhard, S., Patel, V., Reddy, A. (2015). Intermediate uveitis, posterior uveitis, and panuveitis in the Mid-Atlantic USA. *Clinical Ophthalmology*, **9**, 1549-1555.

Ericson-Neilsen, W., Kaye, A.D. (2014). Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Ochsner Journal*, **14**, 203-207.

Fang, J.Y., Fang, C.L., Liu, C.H., Su, Y.H. (2008). Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**, 633-640.

Fangueiro, J.F., Gonzalez-Mira, E., Martins-Lopes, P., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, S.B. ve ark. (2011). A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production,

characterization and toxicity testing. *Pharmaceutical Development and Technology*, **18**, 545–549.

Fangueiro, J.F., Calpena, A.C., Clares, B., Andreani, T., Egea, M.A., Veiga, F.J., Souto, E.B. (2016). Biopharmaceutical evaluation of epigallocatechin gallate-loaded cationic lipid nanoparticles (EGCG-LNs): In vivo, in vitro and ex vivo studies. *International journal of pharmaceutics*, **502**, 161-169.

Fishman, H., Mansbridge, J., Morhenn, V. (2020). Tape Stripping: A Novel Noninvasive Method Using RNA Sequences for Diagnosing Ocular Surface Diseases of the Eye and Eyelid. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **61**, 380-392.

Fofaria, N.M., Qhattal, H.S., Liu, X., Srivastava, S.K. (2016). Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine-Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **498**, 12-22.

Fong, R., Cavet, M.E., DeCory, H.H., Vittitow, J.L. (2019). Loteprednol etabonate (submicron) ophthalmic gel 0.38% dosed three times daily following cataract surgery: integrated analysis of two Phase III clinical studies. *Clinical Ophtalmology*, **13**, 1427-1438.

Freitas, C., Müller, R.H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, **168**, 221–229.

Friedrich, H., Frederik, P.M., De With, G., Sommerdijk, N.A. (2010). Imaging of Self-Assembled Structures: Interpretation of TEM and Cryo-TEM Images. *Angewandte Chemie International Edition*, **49**, 7850–7858.

Gaafar, P.M., Abdallah, O.Y., Farid, R.M., Abdelkader, H. (2014). Preparation, characterization and evaluation of novel elastic nano-sized niosomes (ethoniosomes) for ocular delivery of prednisolone. *Journal of Liposome Research*, **24**, 204–215.

Gabrielsson, J., Lindberg, N.O., Pålsson, M., Nicklasson, F., Sjöström, M., Lundstedt, T. (2004). Multivariate methods in the development of a new tablet formulation: optimization and validation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **30**, 1037-1049.

Galvez-Vergara, A., Fresco-Cala, B., Cárdenas, S. (2020). Switchable Pickering emulsions stabilized by polystyrene-modified magnetic nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **606**, 1-26.

Ganta, S., Talekar, M., Singh, A., Coleman, T.P., Amiji, M.M. (2014). Nanoemulsions in translational research-opportunities and challenges in targeted cancer therapy. *AAPS PharmSciTech*, **15**, 694-708.

Garad, S., Wang, J., Joshi, Y., Panicucci, R. (2010). Preclinical development for suspensions. İçinde A. Kulshreshth, O. Singh, G. Wall (Eds.), *Pharmaceutical suspensions—from pharmaceutical development to manufacturing*. Springer: New York, 127–176.

Garud, A., Singh, D., Garud, N. (2012). Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *International Current Pharmaceutical Journal*, **11**, 384–393.

Giron, D. (2013). Thermal analysis of drugs and drug products. İçinde J. Swarbrick, J. Boylan (Eds.) *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Taylor & Francis:New York, 3726–3751.

Gorantla, S., Rapalli, V.K., Waghule, T., Singh, P.P., Dubey, S.K., Saha, R.N. ve ark. (2020). Nanocarriers for ocular drug delivery: current status and translational opportunity. *RSC Advances*, **10**, 27835–27855.

Gökçe, E.H., Sandri, G., Eğrilmez, S., Bonferoni, M.C., Güneri, T., Caramella, C. (2009). Cyclosporine A-loaded solid lipid nanoparticles: ocular tolerance and in vivo drug release in rabbit eyes. *Current eye research*, **34**, 996-1003.

Gönül, N. (2000). *Çok Fazlı Sistemler 1: Yüzey Kimyası ve Kolloidler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.

Gönüllü, Ü., Üner, M., Yener, G., Karaman, E.F., Aydoğmuş, Z. (2015). Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery. *Acta Pharmaceutica*, **65**, 1–13.

Göppert, T.M., Müller, R.H. (2005). Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, **302**, 172–86.

Guan, W., Tang, L., Wang, Y., Cui, H. (2018). Fabrication of an Effective Avermectin Nanoemulsion Using a Cleavable Succinic Ester Emulsifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 7568–7576.

Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. Administration USFaD, 2004.

Guzniczak, E., Jimenez, M., Irwin, M., Otto, O., Willoughby, N., Bridle, H. (2018). Impact of poloxamer 188 (Pluronic F-68) additive on cell mechanical properties, quantification by real-time deformability cytometry. *Biomechanics*, **12**, 1-13.

Hamdani, J., Moes, A.J., Amighi, K. (2003). Physical and thermal characterization of precirol and compritol as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled release matrix pellets. *International Journal of Pharmaceutics*, **260**, 47–57.

Han, Y.K., Segall, A.I. (2014). A Validated Specific Stability-Indicating RP-HPLC Assay Method for the Determination of Loteprednol Etabonate in Eye Drops. *Journal of Chromatographic Science*, **53**, 761–766.

Hao, J., Wang, X., Bi, Y., Teng, Y., Wang, J., Li, F. et al. (2014). Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **114**, 111–120.

Hategekimana, J., Chamba, M.V.M., Shoemaker, C.F., Majeed, H., Zhong, F. (2015). Vitamin E nanoemulsions by emulsion phase inversion: Effect of environmental stress and long-term storage on stability and degradation in different carrier oil types. *Colloid Surface A*, **483**, 70-80.

Heikkinen, E.M., Del Amo E.M., Ranta V.P., Urtti A., Vellonen K.S., Ruponen M. (2018). Esterase activity in porcine and albino rabbit ocular tissues. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **15**, 106-110.

Helgason, T., Awad, T., Kristbergsson, K., McClements, D., Weiss, J. (2009). Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science*, **334**, 75–81

Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **50**, 874-875.

Hirani, A., Yong, W.L., Yashwant, P., Vijaykumar, S. (2014). Efficacy of Loteprednol Etabonate Drug Delivery System in Suppression of in vitro Retinal Pigment Epithelium Activation. *Pharmaceutical Nanotechnology*, **2**, 208-216.

Hirani, A., Yong, W.L., Vijaykumar, S., Yashwant, P. (2015). Loteprednol Drug Delivery System for Treatment of Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**.

Hixson, A.W., Crowell, J.H. (1931). Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial & Engineering Chemistry*, **23**, 923-931.

Holds, J.B., Chang, W.J., Durairaj, V.D. ve ark. (2012). Development, anatomy, and physiology of the lacrimal secretory and drainage systems and abnormalities of the lacrimal secretory and drainage systems. İçinde G.L. Skuta, L.B. Cantor, J.S. Weiss (Eds.). *Basic and clinical science course (BCSC) section 7: orbit, eyelids, and lacrimal system*. San Francisco (CA): American Academy of Ophthalmology (AAO), 243–278.

Holland, E.J., Fingeret, M.O.D, Mah, F.S. (2019). Use of Topical Steroids in Conjunctivitis: A Review of the Evidence, *Cornea*, **38**, 1062-1067.

Hou, D-Z., Xie, C-S., Huang, K-J., Zhu, C-H. (2003). The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, **24**, 1781-1785.

Houston, D.M., Bugert, J., Denyer, S.P., Heard, C.M. (2017). Anti-inflammatory activity of *Punica granatum L.* (Pomegranate) rind extracts applied topically to *ex vivo* skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **112**, 30-37.

Hu, F. (2004). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, **273**, 29–35.

Huerva, V., Ascaso, F.J., Grzybowski, A. (2015). Ocular inflammation. *Mediators Inflammation*, **2015**, 1-2.

ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Harmonization ICo, Editor, 2005.

ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Development Q8 (R2). Harmonisation ICo, Editor, 2009.

ICH Harmonised Tripartite Guideline: Quality Risk Management Q9. Harmonisation ICo, Editor, 2005.

ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Quality System Q10. Harmonisation ICo, Editor, 2008.

ICH Quality IWG Points to consider for ICH Q8/Q9/Q10 guidelines, Harmonisation ICo, Editor, 2012.

Igushi, T., Yoshida, H. (2011). Investigation of low-angle laser light scattering patterns using the modified Twomey iterative method for particle sizing. *Review of Scientific Instruments*, **82**, 1-11.

Iida-Miwa, Y., Muraoka, Y., Iida, Y. ve ark. (2019). Branch Retinal Vein Occlusion: Treatment Outcomes According to the Retinal Nonperfusion Area, Clinical Subtype, and Crossing Pattern. *Scientific Reports* 9, 1-12.

Jain, S., Addan, R., Kushwah, V., Harde, H., Mahajan, R.R. (2019). Comparative assessment of efficacy and safety potential of multifarious lipid based Tacrolimus loaded nanoformulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **562**, 96–104.

Jaiswal, M., Dudhe, R., Sharma, P.K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, **5**, 123–127.

Janagam, D.R., Wu, L., Lowe, T. L. (2017). Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **122**, 31–64.

Jarius, S., Ruprecht, K., Wildemann, B. ve ark (2012). Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: a multicentre study of 175 patients. *Journal of Neuroinflammation*, **9**, 1-17.

Jarius, S., Wildemann, B., Paul, F. (2014). Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. *Clinical & Experimental Immunology*, **176**, 149-164.

Javed, M.N., Alam, M.S., Waziri, A., Pottoo, F.H., Yadav, A.K., Hasnain, M.S. ve ark. (2019). QbD Applications for the Development of Nanopharmaceutical Products. *Pharmaceutical Quality by Design*, **17**, 229–253.

Jenning, V., Lippacher, A., Gohla, S. H. (2002). Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *Journal of Microencapsulation*, **19**, 1–10.

Jhanji, V., Chan, T.C., Li, E.Y., Agarwal, K., Vajpayee, R.B. (2015). Adenoviral keratoconjunctivitis. *Survey of Ophthalmology*, **60**, 435-43.

Jones, O. (2021). *The Eyeball*. Teach me Anatomy. Erişim 07.07.2021, <https://teachmeanatomy.info/head/organs/eye/eyeball/>

Joshi, M.D., Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **71**, 161–172.

Jurišić Dukovski, B., Juretić, M., Bračko, D., Randjelović, D., Savić, S., Crespo M. ve ark. (2020). Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, **576**, 1-13.

Kamegasawa, A., Chaoul, M.M., El Dib, R. (2014). Oral antihistamines for seasonal allergic conjunctivitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **4**, 1-9.

Kaneko, F., Yamazaki, K., Kitagawa, K., Kikyo, T., Kobayashi, M., Kitagawa, Y. ve ark. (1997). Structure and Crystallization Behavior of the β Phase of Oleic Acid. *The Journal of Physical Chemistry B*, **101**, 1803–1809.

Kasongo, K. W., Müller, R. H., & Walker, R. B. (2011). The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients. *Pharmaceutical Development and Technology*, **17**(3), 353–362.

Kaş, H.S. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri, İçinde A.Z. Gürsoy (Ed.), *İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler*, Ankara: Kontrollü Salım Sistemleri, 65-102.

Khames, A., Khaleel, M.A., El-Badawy, M.F., El-Nezhawy, A.O. (2019). Natamycin solid lipid nanoparticles–sustained ocular delivery system of higher corneal

penetration against deep fungal keratitis: preparation and optimization. *International journal of nanomedicine*, **14**, 2515.

Kharat, M., McClements, D.J. (2019). Fabrication and characterization of nanostructured lipid carriers (NLC) using a plant-based emulsifier: Quillaja saponin. *Food Research International*, **126**, 1-11.

Kheir, W.J., Sheheitli, H., Abdul Fattah M., Hamam R.N. (2015). Nontuberculous Mycobacterial Ocular Infections: A Systematic Review of the Literature. *BioMed Research International*, **2015**, 1-18.

Kim, H.M., Woo, S.J. (2021). Ocular Drug Delivery to the Retina: Current Innovations and Future Perspectives. *Pharmaceutics*, **13**, 108.

Kivelä T., Messmer E.M., Rymgayłło-Jankowska B. (2015) Cornea. İçinde S. Heegaard, H. Grossniklaus (Eds.), *Eye Pathology*. Berlin, Springer: Heidelberg; 79-154.

Kompella, U. B., Sundaram, S., Raghava, S., Escobar, E.R. (2006). Luteinizing hormone-releasing hormone agonist and transferrin functionalizations enhance nanoparticle delivery in a novel bovine ex vivo eye model. *Molecular Vision*, **12**, 1185-98.

Koroleva, M., Nagovitsina, T., Yurtov, E. (2018). Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: Stability and degradation mechanisms. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **20**, 10369–10377.

Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, **15**, 25–35.

Koss, M.J., Pfister, M., Rothweiler, F. ve ark. (2012). Comparison of cytokine levels from undiluted vitreous of untreated patients with retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmologica*, **90**, 98-103.

Kovačević, A.B., Müller, R.H., Savić, S.D., Vuleta, G.M., Keck, C.M. (2014). Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **444**, 15–25.

Krishnadev, N., Meleth, A.D., Chew, E.Y. (2010). Nutritional supplements for age-related macular degeneration. *Current Opinion in Ophthalmology*, **21**, 184-189.

Lazicka-Galecka, M., Galecki, T., Szaflik, J. (2017). Safety and efficacy of loteprednol etabonate in treatment of ocular inflammatory diseases. *Klinika Oczna / Acta Ophthalmologica Polonica*, **119**, 239-244.

Landriscina, A., Rosen, J., Friedman, A.J. (2015). Nanotechnology, Inflammation and the Skin Barrier: Innovative Approaches for Skin Health and Cosmesis. *Cosmetics*, **2**, 177-186.

Lazaro, A., Peñalosa, C., Solé, A., Diarce, G., Haussmann, T., Fois, M. ve ark. (2013). Intercomparative tests on phase change materials characterisation with differential scanning calorimeter. *Applied Energy*, **109**, 415–420.

Lee, W.J., Kang, M.H., Seong, M., Cho, H.Y. (2012). Comparison of aqueous concentrations of angiogenic and inflammatory cytokines in diabetic macular oedema and macular oedema due to branch retinal vein occlusion. *British Journal of Ophthalmology*, **96**, 1426–1430.

Leimann, F.V., Cardozo Filho, L., Sayer, C., Araújo, P.H.H. (2013). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by a miniemulsion/solvent evaporation technique: effect of phbv molar mass and concentration. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **30**, 369–377.

Leonardi, A., Bucolo, C., Romano, G.L., Platania, C.B.M., Drago, F., Puglisi, G. ve ark. (2014). Influence of different surfactants on the technological properties and in vivo ocular tolerability of lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **470**, 133–140.

Leonardi, A., Bucolo, C., Drago, F., Salomone, S., Pignatello, R. (2015). Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *International Journal of Pharmaceutics*, **478**, 180–186.

Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R. (1999). *Pharmaceutical experimental design*. New York: Marcel Dekker.

Li, F., Wen, Y., Zhang, Y., Zheng, K., Ban, J., Xie, Q. ve ark. (2019). Characterisation of 2-HP- β -cyclodextrin-PLGA nanoparticle complexes for potential use

as ocular drug delivery vehicles. *Artificial cells, nanomedicine and biotechnology*, **47**, 4097-4108.

Li, Y.-J., Luo, L.-J., Harroun, S.G., Wei, S., Unnikrishnan, B., Chang, H.-T. ve ark. (2019). Synergistically dual-functional nano eye-drops for simultaneously anti-inflammatory and anti-oxidative treatment of dry eye disease. *Nanoscale*, **12**, 5580-5594.

Lin, P. (2015). Infectious Uveitis. *Current Ophthalmology Reports*, **3**, 170-183.

Lim, L.S., Mitchell, P., Seddon, J.M., Holz, F.G., Wong, T.Y. (2012). Age-related macular degeneration. *The Lancet*, **379**, 1728–1738.

Lippacher, A., Müller, R., Mäder, K. (2002). Semisolid SLN™ dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **53**, 155–160.

Liu, M., Wang, F., Pu, C., Tang, W., Sun, Q. (2021). Nanoencapsulation of lutein within lipid-based delivery systems: Characterization and comparison of zein peptide stabilized nano-emulsion, solid lipid nanoparticle and nano-structured lipid carrier. *Food Chemistry*, **358**, 1-12.

Loftsson, T., Bodor, N. (1994). The pharmacokinetics and transdermal delivery of loteprednol etabonate and related soft steroids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **14**, 293–299.

López-García, R., Ganem-Rondero, A. (2015). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Ability. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, **5**, 62-72.

Loret, B., Simões, F.M.F. (2010). Effects of the pH on the mechanical behavior of articular cartilage and corneal stroma. *International Journal of Solids and Structures*, **47**, 2201–2214.

Luo, Y., Wang, Q. (2013). Recent advances of chitosan and its derivatives for novel applications in food science. *Journal of Food Processing and Beverages*, **1**, 1-13.

Luo Y., Wang Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (16) (2014), p. 40696

Lyseng-Williamson, K.A. (2013). Loteprednol Etabonate Ophthalmic Gel 0.5 %: A Review of Its Use in Post-Operative Inflammation and Pain Following Ocular Surgery. *Drugs*, **73**, 949–958.

Ma, Z., Merkus, H.G., de Smet, J.G.A. , Heffels, C., Scarlett, B. (2000). New developments in particle characterization by laser diffraction: size and shape. *Powder Technology*, **111**, 66–78.

Madan, J.R., Khude, P.A., Dua, K. (2014). Development and evaluation of solid lipid nanoparticles of mometasone furoate for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, **4**, 60-64.

Makdoumi, K., Mortensen, J., Crafoord, S. (2010). Infectious Keratitis Treated With Corneal Crosslinking. *Cornea*, **29**, 1353-1358.

Mantelli, F., Mauris, J., Argüeso, P. (2013). The ocular surface epithelial barrier and other mechanisms of mucosal protection: from allergy to infectious diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **13**, 563–568.

Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C. B., Graves, S.M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **18**, R635–R666.

McClure, K.A. (2018). *Tear Film Dynamics Associated with Contact Lens Wear*. The Ohio State University, Vision Science, Master Thesis.

McDermott, A.M. (2009). The role of antimicrobial peptides at the ocular surface. *Ophthalmic Research*, **41**, 60-75.

Messmer, E.M. (2015). The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Deutsches Ärzteblatt international*, **112**, 71-82.

McDougal, D.H., Gamlin, P.D. (2015). Autonomic control of the eye. *Comprehensive Physiology*, **5**, 439–473.

Meka, L., Kesavan, B., Chinnala, K.M. ve ark. (2008). Preparation of a Matrix Type Multiple-Unit Gastro Retentive Floating Drug Delivery System for Captopril Based on Gas Formation Technique: In Vitro Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, **9**, 612-619.

Mikkelsen, L.H. (2020). Molecular biology in conjunctival melanoma and the relationship to mucosal melanoma. *Acta Ophthalmol*, **98**, 1-27.

Mishra, V., Thakur, S., Patil, A., Shukla, A. (2018). Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **15**, 737–758.

Missana, T., Adell, A. (2000). On the Applicability of DLVO Theory to the Prediction of Clay Colloids Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, **230**, 150–156.

Mitri, K., Shegokar, R., Gohla, S., Anselmi, C., Müller, R.H. (2011). Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*, **414**, 267–275.

Mittal, N., Kaur, G. (2019). Investigations on Polymeric Nanoparticles for Ocular Delivery. *Advances in Polymer Technology*, **2019**, 1–14.

Mobaraki, M., Soltani, M., Zare Harofte, S., Zoudani, E., Daliri, R., Aghamirsalim, M. ve ark. (2020). Biodegradable nanoparticle for cornea drug delivery: Focus review. *Pharmaceutics*, **12**, 1232.

Mohanty, B., Majumdar, D.K., Mishra, S.K., Panda, A.K., Patnaik, S. (2014). Development and characterization of itraconazole-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, **20**, 458–464.

Montgomery, D.C. (2013). *Design and analysis of experiments*. (8th edn.) New York: John Wiley Sons, Inc.

Moreno-Sastre M., Pastor, A.M., Esquisabel, E.S., Viñas M., Bachiller, D., Pedraz, J. (2016). Stability study of sodium colistimethate-loaded lipid nanoparticles, *Journal of Microencapsulation*, **33**, 636–645.

Moiseev, R.V., Morrison, P., Steele, F., Khutoryanskiy, V.V. (2019). Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutics*, **11**, 1–33.

Montenegro, L. (2017). Lipid-Based Nanoparticles as Carriers for Dermal Delivery of Antioxidants. *Current Drug Metabolism*, **18**, 469–480.

Murray, P.M., Bellany, F., Benhamou, L., Bučar, D.-K., Tabor, A.B., Sheppard, T. D. (2016). The application of design of experiments (DoE) reaction optimisation and solvent selection in the development of new synthetic chemistry. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **14**, 2373–2384.

Murthy, S., Sabhapandit, S., Balamurugan, S., Subramaniam, P., Sainz-de-la-Maza, M. ve ark. (2020). Scleritis. *Indian Journal of Ophthalmology*, **68**, 1818-1828.

Mustafa, I.F., Hussein, M.Z. (2020). Synthesis and Technology of Nanoemulsion-Based Pesticide Formulation. *Nanomaterial*, **10**, 1-26.

Müller, R., Keck, C. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, **113**, 151–170.

Müller, R.H., Lucks, J.S. (1996). Arzneisto fftraeger aus festen Lipidteilchen-Feste Lipid Nanosphaeren (SLN). European patent, EP0605497B1.

Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 161-177.

Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A. (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, **242**, 121–128.

Müller, R.H., Shegokar, R., Keck, C. (2011). 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. *Current Drug Discovery Technologies*, **8**, 207–227.

Nag, T.C., Kumari, C. (2017). Electron microscopy of the human choroid. İçinde J. Chhablani, J. Ruiz-Medrano (Eds.), *Choroidal Disorders*. (1st ed.) Academic Press; Cambridge, MA, USA: 7–20.

Naiim, M., Boualem, A., Ferre, C., Jabloun, M., Jalocha, A., Ravier, P. (2015). Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter*, **11**, 28–32.

Natarajan, J.V., Darwitan, A., Barathi, V.A., Ang, M., Htoon, H.M., Boey, F. ve ark. (2014). Sustained drug release in nanomedicine: A long-acting nanocarrier-based formulation for glaucoma. *ACS Nano*, **8**, 419–429.

Navarro-Perea, C., Garcia-Gonzalez, J., Perez-Blazquez, E. (2019). Case report: Bilateral uveitis and papillitis secondary to treatment with pembrolizumab. *Indian Journal of Ophthalmology*, **67**, 2075-2077.

Ndolomingo, M.J. Ndzondelelo, B., Reinout, M. (2020). Review of supported metal nanoparticles: synthesis methodologies, advantages and application as catalysts. *Journal of Materials Science*, **2020**, 1-47.

Negi, P., Singh, B., Sharma, G., Beg, S., Raza, K., Katore, O.P. (2016). Phospholipid microemulsionbased hydrogel for enhanced topical delivery of lidocaine and prilocaine: QbD-based development and evaluation. *Drug Delivery*, **23**, 941–957.

NIST Engineering statistics handbook 5. Process improvement, Available from: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section1/pri1.htm> [Son erişim tarihi 26 Sep 2021]

Noble, S., Goa, K. L. (1998). Loteprednol Etabonate. *BioDrugs*, **10**, 329–339.

Numanoğlu, U., Tarımcı, N. (2006). Characterization of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and their pharmaceutical and cosmetic applications. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, **35**, 211-235.

Nutan, M., Reddy, I. (2009). General Principles of Suspensions. İçinde A. Kulshreshtha, O. Singh, G. Walls (Eds.), *Pharmaceutical suspensions—from pharmaceutical development to manufacturing*. New York, Springer:AAPS; 328.

Olbrich, C., Müller, R. (1999). Enzymatic degradation of SLN—effect of surfactant and surfactant mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, **180**, 31–39.

Osaadon, P., Fagan, X., Lifshitz, T. ve ark. (2014). A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye*, **28**, 510–520.

Örge, F.H., Boente, C. S. (2014). The Lacrimal System. *Pediatric Clinics of North America*, **61**, 529–539.

Özdemir, S., Çelik, B., Üner, M. (2019). Properties and therapeutic potential of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as promising colloidal drug delivery systems. *Materials for Biomedical Engineering: Nanomaterials-based Drug Delivery*, **2019**, 457–505.

Özdemir, S., Çelik, B., Türköz Acar, E., Duman, G., Üner, M. (2018). Eplerenone nanoemulsions for treatment of hypertension. Part I: Experimental design for optimization of formulations and physical characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **45**, 357–366.

Palamar, M. (2021). Differential diagnosis of red eye - ocular surface causes. *Ege Tıp Dergisi*, **60**, 56-60.

Pan, Q., Xu, Q., Boylan, N.J., Lamb, N.W., Emmert, D., Yang, J.-C. ve ark. (2015). Corticosteroid-loaded biodegradable nanoparticles for prevention of corneal allograft rejection in rats. *Journal of Controlled Release*, **201**, 32–40.

Pappula, N., Palaparthi, K.K., Govindu, A., Suneetha, M. (2020). Novel stability indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of tobramycin and loteprednol in pharmaceutical dosage forms. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, **10**, 073-080.

Pardeike, J., Hommoss, A., Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, **366**, 170–184.

Pate, K., Safier, P. (2016). Chemical metrology methods for CMP quality. *Advances in Chemical Mechanical Planarization*, 299–325.

Peterson, J.J. (2008). A Bayesian Approach to the ICH Q8 Definition of Design Space. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, **18**, 959-975.

Petrushkin, H., Rogers, D., Pavesio, C. (2017). The Use of Topical Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs for Uveitic Cystoid Macular Edema. *Ocular Immunology and Inflammation*, **26**, 795–797.

Pflugfelder, S.C., Maskin, S.L., Anderson, B., Chodosh, J., Holland, E.J., De Paiva, C.S. ve ark. (2004). A randomized, double-masked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5%, and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *American Journal of Ophthalmology*, **138**, 444–57.

Pflugfelder, S.C., Karpecki, P.M., Perez, V.L. (2014). Treatment of blepharitis: recent clinical trials. *Ocul Surface*, **12**, 273-84.

Pharmaceutical cGMPs for the 21 st Century: A Risk Based Approach Final Report. Administration USFaD, Editor. September 2004.

Pharmaceutical cGMPs for the 21 st Century: A Risk Based Approach Final Report. Administration USFaD, Editor. June 2007.

Pirouzian, A., Craven, E.R. (2014). Critical appraisal of loteprednol ointment, gel, and suspension in the treatment of postoperative inflammation and pain following ocular and corneal transplant surgery. *Clinical ophthalmology*, **8**, 379–387.

Pleyer, U., Ursell, P.G., Rama, P. (2013). Intraocular pressure effects of common topical steroids for post-cataract inflammation: are they the same?. *Ophthalmology and Theraphy*, **2**, 55-72.

Pokroy, R., Marcovich, A. (2003). Self-inflicted (factitious) conjunctivitis. *Ophthalmology*, **110**, 790–795.

Politis, N.S., Colombo, P., Colombo, G., Rekkas, D. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **43**, 889–901.

Poonia, N., Kharb, R., Lather, V., Pandita, D. (2016). Nanostructured lipid carriers: versatile oral delivery vehicle. *Future Science OA*, **2**, 1-24.

Pradeep, T., Mehra, D., Le, P.H. (2021). *Histology, Eye*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Puglia, C., Offerta, A., Carbone, C., Bonina, F., Pignatello, R., Puglisi, G. (2015). Lipid Nanocarriers (LNC) and their Applications in Ocular Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, **22**, 1589-1602(14)

Putnam, C.M. (2016). Diagnosis and management of blepharitis: an optometrist's perspective. *Clinical Optometry*, **8**, 71-78.

Qi, J., Lu, Y., Wu, W. (2012). Absorption, Disposition and Pharmacokinetics of Solid Lipid Nanoparticles. *Current Drug Metabolism*, **13**, 418–428.

Qi, J., Zhuang, J., Lu, Y., Dong, X., Zhao, W., Wu, W. (2017). In vivo fate of lipid-based nanoparticles. *Drug Discovery Today*, **22**, 166–172.

Rachitskaya, A., Mandelcorn, E.D., Albini, T.A. (2010). An update on the cause and treatment of scleritis. *Current Opinion in Ophthalmology*, **21**, 463-467.

Rajendran, S.R.C.K., Udenigwe, C.C., Yada, R.Y. (2016). Nanochemistry of Protein-Based Delivery Agents. *Frontiers in Chemistry*, **4**, 1-9.

Rajpal, R.K., Digby, D., D'Aversa, G., Mah, F., Hollander, D.A., Conway, T. (2011). Intraocular Pressure Elevations with Loteprednol Etabonate: A Retrospective Chart Review. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **27**, 305–308.

Raman, V.V.S.S.N., Useni Reddy, M., Arunkanth, K.N., Maheshwar R.M., Hanimi, R.B. (2015). Quality improvement with scientific approaches (QbD, AQbD and PAT) in generic drug substance development: Review. *International Journal of - Science and Research*, **4**, 2278-0238.

Ramenaden, E.R., Raiji, V.R. (2013). Clinical characteristics and visual outcomes in infectious scleritis: a review. *Clinical Ophthalmology*, **7**, 2113-2122.

Rao, J., McClements, D.J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, **29**, 326–334.

Raposo, S., Tavares, R., Gonçalves, L., Simões, S., Urbano, M., Ribeiro, H.M. (2015). Mometasone furoate-loaded cold processed oil-in-water emulsions: *in vitro* and *in vivo* studies. *Drug Delivery*, **22**, 562–572.

Rashid, S., Jin, Y., Ecoiffier, T., Barabino, S., Schaumberg, D.A., Dana, M.R. (2008). Topical Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids for Treatment of Dry Eye. *Archives of Ophthalmology*, **126**, 219–225.

Rawal, S.U., Patel, M.M. (2018). Lipid nanoparticulate systems. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, **49**, 138-143.

Rauwerdink, A.M., Weaver, J.B. (2010). Viscous effects on nanoparticle magnetization harmonics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **322**, 609–613.

Read, S., Alonso-Caneiro, D., Vincent, S. ve ark. (2016). Anterior eye tissue morphology: Scleral and conjunctival thickness in children and young adults. *Scientific Reports*, **6**, 1-10.

Reddy, R., Kim, S. (2011). Critical appraisal of ophthalmic ketorolac in treatment of pain and inflammation following cataract surgery. *Clinical ophthalmology*, **5**, 751-758.

Radomska-Soukharev, A. (2007). Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, 411–418.

Rodrigues, E.B., Farah, M.E., Mantovani, J., Bom Aggio, F. ve ark. (2016). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Retinal Diseases. *Retinal Pharmacotherapeutics*, **55**, 212–220.

Rogers, M.A. (2017). Crystallization of Fats and Fatty Acids in Edible Oils and Structure Determination. *Fatty Acids*, 541–559.

Sah, A.K., Suresh, P.K., Verma, V.K. (2017). PLGA nanoparticles for ocular delivery of loteprednol etabonate: a corneal penetration study. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, **45**, 1156-1164.

Salentinig, S., Sagalowicz, L., Glatter, O. (2010). Self-Assembled Structures and pKa Value of Oleic Acid in Systems of Biological Relevance. *Langmuir*, **26**, 11670–11679.

Salunkhe, S., Bhatia, N., Pokharkar, V., Thorat, J., Bhatia, M. (2013). Topical delivery of Idebenone using nanostructured lipid carriers: evaluations of sun-protection and anti-oxidant effects. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **43**, 287–303.

Sanchez-Rubio, F., Soria-Meneses, P.J., Jurado-Campos, A., Bartolomé-García, J., Gómez-Rubio, V., Soler, A.J. ve ark. (2020). Nanotechnology in reproduction: Vitamin E nanoemulsions for reducing oxidative stress in sperm cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **10**, 1-20.

Sanchez-Lopez, E., Espina, M., Doktorovova, S., Souto, E.B., García, M.L. (2017). Lipid nanoparticles (SLN and NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part II - Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **110**, 58–69.

Santos, V.S, Braz, B.B., Silva, A.Á., Cardoso, L.P., Ribeiro, A.P.B., Santana, M.H.A. (2019). Nanostructured lipid carriers loaded with free phytosterols for food applications. *Food chemistry*, **298**, 125053.

Sastri, K.T., Radha, G.V., Pidikiti, S., Vajjhala, P. (2020). Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **10**, 126-141.

Schachat, A.P., Wilkinson, C.P., Hinton, D.R., Sadda, S.V.R., Wiedemann, P. (2017). *Ryan's Retina*. (6th ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Health Sciences.

Schafer-Korting, M., Mehnert, W., Korting, H. (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**, 427–443.

Scheler, S. (2012). Micro- and nano-sizing of poorly soluble drugs by grinding techniques. İçinde D. Douroumis, A. Fahr (Eds), *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-soluble Drugs*. West Sussex: Wiley; 403-416.

Schopf, L., Enlow, E., Popov, A., Bourassa, J., Chen, H. (2014). Ocular Pharmacokinetics of a Novel Loteprednol Etabonate 0.4% Ophthalmic Formulation. *Ophthalmology and Therapy*, **3**, 63-72.

Selvamuthukumar, S., Velmurugan, R. (2012). Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids in Health and Disease*, **11**, 1-8.

Servat, J.J., Mears, K.A., Black, E.H., Huang, J.J. (2012). Biological agents for the treatment of uveitis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **12**, 311–328.

Severino, P., Andreani, T., Macedo, A.S., Fanguiero, J.F., Santana, M.H.A., Silva, A.M. ve ark. (2012). Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, **2012**, 1–10.

Severino, P., Andreani, T., Jäger, A., Chaud, M.V., Santana, M.H.A., Silva, A.M. ve ark. (2014). Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). *European Journal of Medicinal Chemistry*, **81**, 28–34.

Seyfoddin, A., Shaw, J., Al-Kassas, R. (2010). Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Delivery*, **17**, 467–489.

Seyfoddin, A., Al-Kassas, R. (2013). Development of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for improving ocular delivery of acyclovir. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **39**, 508–519.

Shah, M., Agrawal, Y. (2013). High throughput screening: an in silico solubility parameter approach for lipids and solvents in SLN preparations. *Pharmaceutical development and technology*, **18**, 582-590.

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., Harding, I. (2015). Lipid Nanoparticle: Production, Characterization and Stability. *Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development*, **5**, 1-93.

Sharif, M.Z.B., Niro, H., Rahim, F., Esfahani, G. (2018). Ocular delivery system for propranolol hydrochloride based on nanostructured lipid carrier. *Scientia pharmaceutica*, **86**, 16.

Sharma, N., Mishra, S., Sharma, S., Deshpande, R.D., Kumar Sharma, R. (2013). Preparation and Optimization of Nanoemulsions for targeting Drug Delivery. *International Journal of Drug Delivery and Research*, **5**, 37–48.

Shen, J., Sun, M., Ping, Q., Ying, Z., Liu, W. (2009). Incorporation of liquid lipid in lipid nanoparticles for ocular drug delivery enhancement. *Nanotechnology*, **21**, 1-11.

Sheppard, J.D., Comstock, T.L., Cavet, M.E. (2016). Impact of the topical ophthalmic corticosteroid loteprednol etabonate on intraocular pressure. *Advances in Therapy*, **33**, 532-552.

Shimazaki, J., Iseda, A., Satake, Y., Shimazaki-Den, S. (2012). Efficacy and safety of longterm corticosteroid eye drops after penetrating keratoplasty: A prospective, randomized, clinical trial. *Ophtalmology*, **119**, 668-673.

Shrestha, S., Ghebremeskel, K., White, K., Minelli, C., Tewfik, I., Thapa, P. ve ark. (2021). Formulation and Characterization of Phytostanol Ester Solid Lipid Nanoparticles for the Management of Hypercholesterolemia: An ex vivo Study. *International Journal of Nanomedicine*, **16**, 1977-1992.

Shoaeba, S., Sharav, D., Jain, H., Sahu, A., Meshram, D.B. (2021). Formulation and evaluation of in situ ophthalmic gel of loteprednol etabonate. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*, **9**, 25-29.

Shrotriya, S., Ranpise, N., Satpute, P., Vidhate, B. (2017). Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, **46**, 1471–1482.

Silva, A.C., González-Mira, E., García, M.L., Egea, M.A., Fonseca, J., Silva, R. ve ark. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-

loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **86**, 158–165.

Silva, A.C., Kumar, A., Wild, W., Ferreira, D., Santos, D., Forbes, B. (2012). Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **436**, 798–805.

Singh, A.P., Saraf, S.K., Saraf, S.A. (2012). SLN approach for nose-to-brain delivery of alprazolam. *Drug Delivery and Translational Research*, **2**, 498–507.

Singh, M., Bharadwaj, S., Lee, K.E., Kang, S.G. (2020). Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **10**, 895–916.

Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K. ve ark. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **252**, 28–49.

Sitterberg, J., Özçetin, A., Ehrhardt, C., Bakowsky, U. (2010). Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **74**, 2–13.

Skevaki, C.L., Galani, I.E., Pararas, M.V. ve ark. (2011). Treatment of Viral Conjunctivitis with Antiviral Drugs. *Drugs*, **71**, 331–347.

Smith, W.F. (2005). *Experimental design for formulation*. New York: ASA-SIAM Series on Statistics and Applied Probability.

Soelberg, K., Nilsson, A.C., Nielsen, C., Jarius, S., Reindl, M., Wildemann, B. ve ark. (2018). Autoimmune and immunogenetic profile of patients with optic neuritis in a population-based cohort. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, **21**, 97–102.

Sood, S., Jain, K., Gowthamarajan, K. (2014). Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **113**, 330–337.

Soriano-Ruiz, J.L., Suñer-Carbó, J., Calpena-Capmany, A.C., Bozal-de Febrer, N., Halbaut-Bellowa, L., Boix-Montañés, A. ve ark. (2018). Clotrimazole multiple

W/O/W emulsion as anticandidal agent: Characterization and evaluation on skin and mucosae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **1**, 166-174.

Souto, E., Wissing, S., Barbosa, C., Müller, R.H. (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **278**, 71–77.

Souto, E.B., Müller R.H. (2006). Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization, *Journal of Microencapsulation*, **23**, 377-388.

Souto, E.B., Müller, R.H. (2008). Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®). *International Journal of Cosmetic Science*, **30**, 157-165.

Souto, E.B., Slavomira, D., Gonzalez-Mira, E., Egea, M.A., Garcia, M.L. (2010). Feasibility of Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery of Anti-Inflammatory Drugs. *Current Eye Research*, **35**, 537-552.

Souto, E.B., Baldim, I., Wanderley P.O., Rekha R., Nitesh, Y., Gama, F.M. ve ark. (2020). SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **17**, 357-377.

Souza, A., Andreani, T., Nunes, F., Cassimiro, D., de Almeida, A., Ribeiro, C. ve ark. (2012). Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles: Studies by DSC and SAXS. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **108**, 353–360.

Souza, J.P.E., Alves, J.M., Damiani, J.H.S., Silva, M.B. (2013). Design of experiments: Its importance in the efficient project management. *22nd International Conference on Production Research*, 1-5.

Sridhar, M.S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian Journal of Ophthalmology*, **66**, 190-194.

Stewart, M.W., Flynn, H.W., Schwartz, S.G., Scott, I.U. (2016). Extended duration strategies for the pharmacologic treatment of diabetic retinopathy: current status and future prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **13**, 1277–1287.

Stitt, A.W., Curtis, T.M., Chen, M., Medina, R.J., McKay, G.J., Jenkins, A. ve ark. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, **51**, 156–186.

Strettoi, E., Gargini, C., Novelli, E., Sala, G., Piano, I., Gasco, P. ve ark. (2010). Inhibition of ceramide biosynthesis preserves photoreceptor structure and function in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 18706–18711.

Sudharshan, S., Ganesh, S.K., Biswas, J. (2010). Current approach in the diagnosis and management of posterior uveitis. *Indian Journal of Ophthalmology*, **58**, 29-43.

Şimşek, C., Doğru, M., Kojima, T., Tsubota, K. (2018). Current Management and Treatment of Dry Eye Disease. *Turkish Journal of Ophthalmology*, **48**, 309-313.

Teixeira, M.C., Carbone, C., Souto, E.B. (2017). Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery. *Progress in lipid research*, **68**, 1-11.

Thakur Singh, R.R., Tekko, I., McAvoy, K., McMillan, H., Jones, D., Donnelly, R. F. (2016). Minimally invasive microneedles for ocular drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **14**, 525–537.

Thomas, P.A., Geraldine, P. (2007). Infectious keratitis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **20**, 129-141.

Tian, B.C., Zhang, W.J., Xu, H.M., Hao, M.X., Liu, Y.B., Yang, X.G. et al. (2013). Further investigation of nanostructured lipid carriers as an ocular delivery system: in vivo transcorneal mechanism and in vitro release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **102**, 251-256.

Timothy L.C., Sheppard, J.D. (2018). Loteprednol etabonate for inflammatory conditions of the anterior segment of the eye: twenty years of clinical experience with a retrometabolically designed corticosteroid. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **19**, 337-353.

Todd, L., Zelinka, C. (2017). Valproic acid for a treatment of retinitis pigmentosa: reasons for optimism and caution. *Journal of Neuroscience*, **37**, 5215–5217.

Tran, C.H., Routledge, C., Miller, J., Miller, F., Hodson, S.A. (2003). Examination of Murine Tear Film. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **44**, 3520-3525.

Trebst, C., Jarius, S., Berthele, A. ve ark. (2014). Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: Recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). *Journal of Neurology*, 261, 1–16.

Trujillo-Cayado, L.A., Santos, J., Calero, N., Alfaro-Rodríguez, M.C., Muñoz, J. (2020). Strategies for reducing Ostwald ripening phenomenon in nanoemulsions based on thyme essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**, 1671-1677.

Tunay, Z.Ö., Özdemir, O., Petricli, I.S. (2015). Povidone iodine in the treatment of adenoviral conjunctivitis in infants. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, **34**, 12-15.

Türkiye Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK). Metodun geçerli kılınması ve bilgilendirme kılavuzu doğrulanması için bilgilendirme kılavuzu, 2019. Erişim tarihi: 28.09.2021.

Upadhyay, M.P., Srinivasan, M., Whitcher, J.P. (2015). Diagnosing and managing microbial keratitis. *Community Eye Health*, **28**, 3-6.

Üner, M., Damgalı, Ş., Özdemir, S., Çelik, B. (2017). Therapeutic potential of drug delivery by means of lipid nanoparticles: Reality or illusion? *Current Pharmaceutical Design*, **23**, 6573–6591.

Üner, M., Karaman, E.F., Aydoğmuş, Z. (2014). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of loratadine for topical application: Physicochemical stability and drug penetration through rat skin. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **13**, 653-660.

Üner, M., Wissing, S.A., Yener, G., Müller, R.H. (2005). Skin moisturizing effect and skin penetration of ascorbyl palmitate entrapped in solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) incorporated into hydrogel. *Pharmazie*, **60**, 751-755.

Üner, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems, *Pharmazie*, **61**, 375–386.

Üner, M. (2016). Characterization and Imaging of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. İçinde M. Aliofkhazraei (Ed.), *Handbook of Nanoparticles*. Switzerland: Springer International Publishing; 117-141.

Üner, M., Yener, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, **2**, 289-300.

Üstündağ-Okur, N., Gökçe, E.H., Bozbıyık, D.İ., Eğrilmez, S., Özer, Ö., Ertan, G. (2014). Preparation and in vitro–in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nano structured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **63**, 204–215.

Varela-Fernández, R., Díaz-Tomé, V., Luaces-Rodríguez, A. ve ark. (2020). Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye: Biopharmaceutic and Pharmacokinetic Considerations. *Pharmaceutics*, **12**, 1-39.

Wagh, V.D., Apar, D.U. (2014). Cyclosporine A Loaded PLGA Nanoparticles for Dry Eye Disease: In Vitro Characterization Studies. *Journal of Nanotechnology*, **2014**, 1–10.

Wakefield, D., Girolamo, N.D., Thureau, S., Wildner, G., McCluskey, P. (2013). Scleritis: Immunopathogenesis and molecular basis for therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*, **35**, 44-62.

Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh Tran, T., Zhang, J., Kong, L. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*, **6**, 1-26.

Wang, Y., Wang, V., Chan, C.C. (2011). The role of anti-inflammatory agents in age-related macular degeneration (AMD) treatment. *Eye*, **25**, 127–139.

Wang, A.L., Knight, D.K., Vu, T.T., Mehta, Mitul C. (2019). Retinitis Pigmentosa: Review of Current Treatment, *International Ophthalmology Clinics: Winter*, **59**, 263-280.

Wei, Y., Huaqing, X. (2012). A Review on Nanofluids: Preparation, Stability Mechanisms, and Applications. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, 1-17.

Wei, Z., Bilbulian, S., Li, J., Pandey, R., O'Connor, E., Casas-Finet, J., ve ark. (2015). Universal method for the determination of nonionic surfactant content in the presence of protein. *Journal of Separation Science*, **38**, 1318–1325.

White, E. (2009). Risk management for aseptic processing. *Journal of Validation Technology*, **2009**, 25–33.

Whitcup, S.M., Nussenblatt, R.B., Lightman, S.L., Hollander, D.A. (2013). Inflammation in retinal disease. *International Journal of Inflammation*, **2013**, 1-5.

Willcox, M.D.P., Argüeso, P., Georgiev, G.A., Holopainen, J.M., Laurie, G.W., Millar, T.J. ve ark. (2010). TFOS DEWS II Tear Film Report. *The Ocular Surface*, **15**, 366-403.

Willoughby, C.E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K., Omid, Y. (2010). Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, **38**, 2-11.

Wong, M.H.Y., Su, D.H.W., Loh, R.S.K. (2007). Nodular scleritis and Sweet's syndrome. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, **35**, 858–860.

Wong, H., Wu, X., Bendayan, R. (2012). Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 686–700

Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **63**, 456–469.

Yasueda, S., Higashiyama, M., Shirasaki, Y., Inada, K., & Ohtori, A. (2004). An HPLC method to evaluate purity of a steroidal drug, loteprednol etabonate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**, 309–316.

Yoshida N., Ikeda, S.N. ve ark. (2013). Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, **120**, 100–105.

You, C., Ma, L., Anesi, S.D. (2018). Bilateral papillitis and vitritis as the initial ophthalmologic finding in a patient with complex medical history, leading to diagnosis of multisystem sarcoidosis. *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, **13**, 122-126.

Zhang, W., Liu, H., Rojas, M., Caldwell, R. W., Caldwell, R.B. (2011). Anti-inflammatory therapy for diabetic retinopathy. *Immunotherapy*, **3**, 609–628.

Zhu, J., Zhang, E., Del Rio-Tsonis, K. (2012). *Eye Anatomy*. USA, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Zhu, Q., Liu, C., Sun, Z., Zhang, X., Liang, N., Mao, S. (2018). Inner layer-embedded contact lenses for pH-triggered controlled ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **128**, 220-229.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GÖZE UYGULANMAK ÜZERE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN TASARIMI HAKKINDA ÇALIŞMALAR

ORJİNALLİK RAPORU

% 5	% 5	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	dergiler.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	sbk2017.org İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.deva.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	repositorio.unicamp.br İnternet Kaynağı	<% 1
9	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1