T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

ÇÖREK OTU YAĞI KAYNAKLI ANTİİNFLAMATUAR ETKİLİ MİKROEMÜLSİYON GÖZ FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Görkem TIRANBEŞLİ

Referans no: 10247003

EDİRNE – 2020

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

ÇÖREK OTU YAĞI KAYNAKLI ANTİİNFLAMATUAR ETKİLİ MİKROEMÜLSİYON GÖZ FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Görkem TIRANBEŞLİ

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/264

Tez No:

EDİRNE – 2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK'e, çalışmalarım süresinde desteğini ve sevgisini esirgemeyen her koşulda yanımda olan babam Hüseyin TIRANBEŞLİ' ye, annem Fatma TIRANBEŞLİ'ye, kardeşim Bilge TIRANBEŞLİ'ye ve Cemre Dilara KURNAZ'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Arş. Gör. Hakan NAZLI, Hakan GEDİK, Önder SARP ve Sedat GEDİK'e, gerekli desteği sağlayan DEVA ve FARMATEK firmalarına ve projemi destekleyen TÜBAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
ÇÖREK OTU HAKKINDA GENEL BİLGİLER 3
ÇÖREK OTU TOHUMUNUN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ 4
ÇÖREK OTU TOHUMU YAĞININ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ 7
TİMOKİNON HAKKINDA GENEL BİLGİLER 7
TİMOKİNON'UN ANTİİNFLAMATUAR ÖZELLİKLERİ 8
TİMOKİNON'UN TOKSİSİTE ÇALIŞMASI 12
GÖZ 15
OKÜLER İLAÇ SALIMINDA ENGELLER 16
OKÜLER İLAÇ UYGULAMA YOLLARI 21
GÖZE ETKİN MADDE SALIMI, KİNETİĞİ VE BİYOYARARLANIMI 26
GÖZE TOPİKAL İLAÇ HEDEFLENDİRİLMESİ 29
OKÜLER YÜZEYE UYGULANAN DOZAJ FORMLARI 30
OKÜLER YÜZEYE UYGULANAN YENİLİKÇİ DOZAJ FORMLARI 32
MİKROEMÜLSİYONLAR 36
KURU GÖZ HASTALIĞI 48
GEREÇ VE YÖNTEMLER 57
BULGULAR 102
TARTIŞMA 175
SONUÇLAR 195
ÖZET 198
SUMMARY 200
KAYNAKLAR 202
ŞEKİLLER LİSTESİ 219
TABLOLAR LİSTESİ 224
ÖZGEÇMİŞ 229

SİMGE VE KISALTMALAR

TQ : Timokinon (Thymoquinone)

DTQ : Ditimokinon (Dithymoquinone)

THQ : Timohidrokinon (Thymohydroquinone)

THY : Timol (Thymol)

Y/S : Su içinde yağ emülsiyonu

S/Y : Yağ içinde su emülsiyonu

NS : Nigella sativa

COX : Siklooksijenaz (Cyclooxygenase)

LOX : Lipooksijenaz (Lipoxygenase)

PG : Prostaglandin

LT : Lökotrien

ROS : Reaktif oksijen türleri

EAE : Deneysel alerjik ensefalomiyelit (Experimental allergic encephalomyelitis)

ALT : Alenin aminotransferaz

AST : Asparat aminotransferaz

LTB4 : Lökotrien B4

LTC4 : Lökotrien C4

BALF : Bronkoalveoller lavaj sıvısı (Bronchoalveolar lavage fluid)

LPS : Lipopolisakkarit

DM : Diabetes Mellitus

IL-1β : İnterlökin-1 beta

TNF-α : Tümör nekröz faktör alfa

RBL : Rat bazofilik lösemi

IFN : İnterferon

NF-Kβ : Nükleer faktör kabba β

MAPK : Mitojenle etkileşen protein kinaz (Mitogen activated protein kinase)

IgE : İmmünglobulin E

MMCP-1 : Mukozal mast hücre proteaz-1 (Mucosal mast cell protease-1)

İP **:** İntrapertoneal

OVA **:** Ovalbumin

AC **:** Alerjik konjonktivit (Allergic conjunctivitis)

GSH **:** Glutatyon (Glutathione)

CAT **:** Katalaz (Catalase)

SOD **:** Süperoksit dismutaz

LPO **:** Lipit peroksit

RA-FLS **:** Romatoid artrit – Fibroblast benzeri sinoviyosit (Rheumatoid arthritis - Fibroblast-like synoviocyte)

LDH **:** Laktat dehidrogenaz

PBS **:** Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate-buffered saline)

Rpm **:** Dakikada dönüş sayısı (Revolutions per minute)

LOQ **:** Tayin alt limit (Limit of quantitation)

LOD : Tespit alt limit (Limit of detection)

LD_{50} **:** Öldürücü doz (Lethal dose)

IC_{50} **:** Hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz (The half maximal inhibitory concentration)

YEM **:** Yüzey etkin madde

YYEM **:** Yardımcı yüzey etkin madde

MCT **:** Orta zincirli trigliseritler (Medium chain triglycerides)

LCT **:** Uzun zincirli trigliseritler (Long chain triglycerides)

MHT **:** Miranol

PIT **:** Faz inversiyon sıcaklığı (Phase inversion temperature)

PDI **:** Polidispersite indeksi

SANS **:** Küçük açılı nötron saçılması (Small angle neutron scattering)

SAXS **:** Küçük açılı X-ışını saçılması (Small angle X-ray scattering)

DLS **:** Dinamik ışık saçılımı (Dynamic light scattering)

TEM **:** Taramalı elektron mikroskobu

HLB **:** Hidrofilik lipolifik denge (Hydrophilic lipophilic balance)

PEG **:** Polietilen glikol

İPA **:** İzopropil alkol

$CDCl_3$ **:** Kloroform

FTIR **:** Furier Taşıyıcılı Infraret Spektrumu

UV **:** Ultraviyole

DSC **:** Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Differential Scanning Calorimeter)

NMR **:** Nükleer Manyetik Rezonans

XRD **:** X-Işını Kırınımı (X-Ray Diffraction)

MS **:** Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)

GC-MS **:** Gaz kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

LC-MS/MS **:** Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi/Kütle Spektroskopisi (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy / Mass Spectroscopy)

HPLC **:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

ESI **:** Elektrosprey iyon kaynağı

SS **:** Standart sapma

BSS **:** Bağıl standart sapma

VK **:** Varyasyon katsayısı

EP **:** Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia)

USP **:** Birleşik Devlerler Farmakopesi (United States Pharmacopeia)

ICH **:** Uluslararası Harmonizasyon Konfederasyonu (The International Council for Harmonisation)

FDA **:** Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (American Food and Drug Administration)

ATCC **:** Amerikan Tip Kültür Koleksiyon (American Type Culture Collection)

RPE **:** Retina pigment epiteli

FBS **:** Fetal Bovine Serum

EMEM **:** Eagle’s Minimum Essential Medium

DMEM **:** Dulbecco’s Modified Eagle Medium

EDTA **:** Etilen diamin tetra asetik asit

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

IS **:** İrritasyon skoru

SNEDDS **:** Kendiliğinden nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler (Self-nanoemulsifying drug delivery systems)

HET-CAM **:** Hen’s Egg Chario-Allontoic-Membran

CAM **:** Karyoallantiok Membran (Chorioallantoic membrane)

EURL-

ECVAM **:** Hayvan Testine Alternatifler için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (The European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing)

ICCVAM **:** Alternatif Yöntemlerin Doğrulanmasına İlişkin Kurumlararası Koordinasyon Komitesi (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)

BCOP **:** Sığır Kornea Opaklığı/Geçirgenliği (Bovine Corneal Opacity / Permeability)

DT **:** Deksketoprofen trometamol

SDS **:** Sodyum dedosil sülfat

GİRİŞ VE AMAÇ

Geleneksel tıpta kullanılan bitkisel kaynaklı ürünler günümüzde farmasötik teknolojinin gelişmesiyle birlikte kullanımı artmıştır. Bu bitkisel kaynaklı ürünlerin içinde çörek otu tohumu da yer almaktadır. Çörek otu tohumu ve yağı beslenmenin yanı sıra sağlığa da faydalı bir gıdadır. İçerdiği etkin bileşenleriyle birlikte antiinflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser gibi birçok farmakolojik etkileri yapılan biyolojik aktivite çalışmaları ile belirlenmiştir. Timokinon (TQ), bu etkin maddelerden birisidir (1).

Çörek otu tohumu ucucu yağının yapısında farmakolojik olarak aktif temel bileşenler arasında başlıca TQ, ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (TMY) yer alır (2). Çörek otu tohumlarından izole edilen TQ'nun inflamasyon sürecini başlatan siklooksijenez (COX) ve lipoksijenaz (LOX) enzim yollarını inhibe ederek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu azaltarak antiinflamatuar etkisinin olduğu bildirilmektedir (3).

Gözde görülen hastalıkların tedavisi genellikle topikal yolla ilaç uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Ancak gözün eşsiz yapısı sayesinde göze topikal ilaç uygulanmasıyla yeterli biyoyararlanım sağlanamamaktadır (4). Göz hacminin ve gözyaşı hacminin küçük olması, göze ilaç uygulandıktan sonra refleks olarak göz kırpma, fazla gözyaşının nazolakrimal drenaja geçmesi ve konjonktivadan emilimle ilacın sistemik dolaşıma geçmesi gibi problemler yüzünden topikal ilaç uygulama yoluyla gözde istenilen ilaç konsantrasyonu elde edilememektedir. Göze uygulanan geleneksel topikal dozaj formlarıyla bu problemler

yüzünden yeterli biyoyararlanım elde edilemediği için oküler biyoyararlanımı arttırmak amacıyla yenilikçi oküler dozaj formları geliştirilmiştir.

Geliştirilen bu dozaj formlarının göz yüzeyi ile temas süresi arttırılması, hastaya uyguladıktan sonra görmede bulanıklık yapmaması ve hasta uyuncunun sağlanması amaçlanmaktadır. Göze uygulanan topikal dozaj formlarının daha etkili olabilmesi için dozaj formunun konjonktiva ile temas süresinin uzatılması, hasta için uygulamasının basit olması, gözde irritasyon yapmaması ve göz için uygun özelliklere sahip olması gerekmektedir (5).

Oftalmik ilaçların oküler absorbsiyonunu arttırmak için yeni ilaç taşıyıcı sistemler olarak mikroemülsiyonlar geliştirilmiştir. Formülasyon stratejilerinin çoğu, kornea ve konjonktival alandaki ilaç kalma süresinin uzatılması ve aynı zamanda prekorneal ilaç kaybının en aza düşürülmesi yoluyla oküler ilaç permeabilitesinin en üst düzeye çıkarılmasını amaçlamaktadır. Mikroemülsiyonlar oftalmik uygulama ile ilgili birçok avantajı olduğundan göz formülasyonları için umut verici dozaj formlarıdır. Mikroemülsiyonlar, ilacın yağ damlacığına yüklenme olasılığı nedeniyle, korneaya hidrofobik ilaçların verilmesinde özellikle ilgi çekmektedir. Y/S (su içinde yağ) mikroemülsiyonları, oküler uygulama için, az çözünen ilaçların çözünmesi, emiliminin arttırılması ve aynı zamanda salım profilinin uzatılması için uygun sistem olarak değerlendirilmiştir (6).

Kuru göz hastalığı, gözyaşı yetersizliğinden ya da aşırı gözyaşı buharlaşmasından kaynaklanan, interpalpebral (kapaklararası) alanda oküler yüzey hasarına ve oküler rahatsızlık semptomlarına yol açan bir gözyaşı filmi bozukluğu olarak tanımlanmıştır. Günümüzde ise bu tanım değişmiş ve kuru göz, lakrimal fonksiyonel ünitenin kompleks inflamatuar bir sendromu olarak tanımlanmaktadır (7). Kuru göz tedavisinde az sayıda topikal ilaç bulunmaktadır. Bu yüzden literatür verileri ile desteklenen çörek otu yağının içerisinde antiinflamatuar özellere sahip temel etkin bileşenlerden yararlanarak ve ek olarak TQ yüklenmesi ile yenilikçi ilaç formlarından olan oküler mikroemülsiyon formüsyonları hazırlanacaktır.

GENEL BİLGİLER

ÇÖREK OTU HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Ülkemiz tarım ve bitki çeşitliliği açısından çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu bitki çeşitliliği arasında *Ranunculacea* (Düğünçiçeğigiller) familyasında bulunan çörek otu bir *Nigella sativa* (NS) türüdür. Siyah tohum, siyah kimyon, bereket tanesi olarak da söylenilmektedir. Ülkemizde 12 *Nigella* türü yetişmektedir ve bunlar arasında *Nigella sativa* L., *Nigella damascena* ve *Nigella arvensis*'in tohumları gıda ve ilaç olarak kullanılmaktadır. *Nigella sativa* L. ülkemizde en yaygın tarımı ve ticareti yapılan türüdür. Çörek otu tıbbi kullanımı çok eski medeniyetlere dayanan bir kültür bitkisidir ve Şekil 1' de gösterilmiştir. Özellikle tohumları hem yiyecek hem de halk ilacı olarak kullanılan çörek otunun son zamanlarda yapılan farmakolojik çalışmalarla tüm dünyada kültürü ve kullanımı gittikçe artmaktadır. Bitkinin etkin bileşenlerinin zengin kaynağı olan tohumlar, Orta ve Uzak Doğu'da uzun süredir geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Astım, bronşit, iltihaplanma, egzama, ateş, grip, hipertansiyon, öksürük, baş ağrısı, baş dönmesi, diyabet, böbrek ve karaciğer fonksiyon bozuklukları, sinir hastalıkları, romatizma, kanser ve gastrointestinal hastalıklarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmıştır. Çörek otu tohumunun içerdiği bileşenlerin farmakolojik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda antiinflamatuar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antikanserojenik, antioksidan ve bağışıklık sistemini güçlendiren etkileri görüldüğü bildirilmiştir (8, 9).



Şekil 1. ***Nigella sativa*** **(Çörek otu) (10)**

Çörek otu tohumu genel olarak sabit yağlar, uçucu yağlar, protein, aminoasit, karbonhidratlar, lifler, alkaloidler, tanenler, saponinler, mineraller, askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit içermektedir. Sabit yağ içinde doymuş yağ asitleri miristik asit, palmitik asit ve stearik asit ve doymamış yağ asitleri oleik asit, linoleik asit, eikozadienoik, araşidonik asit ve linolenik asit içermektedir. Farmakolojik açıdan en önemli temel etkin bileşenleri içeren uçucu yağ içinde TQ, DTQ, THQ ve TMY'nin yanında aynı zamanda yapısında nigellon, karvakrol, *p*-simen, d-limonen, α ve β-pinen bulunur (11).

ÇÖREK OTU TOHUMUNUN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

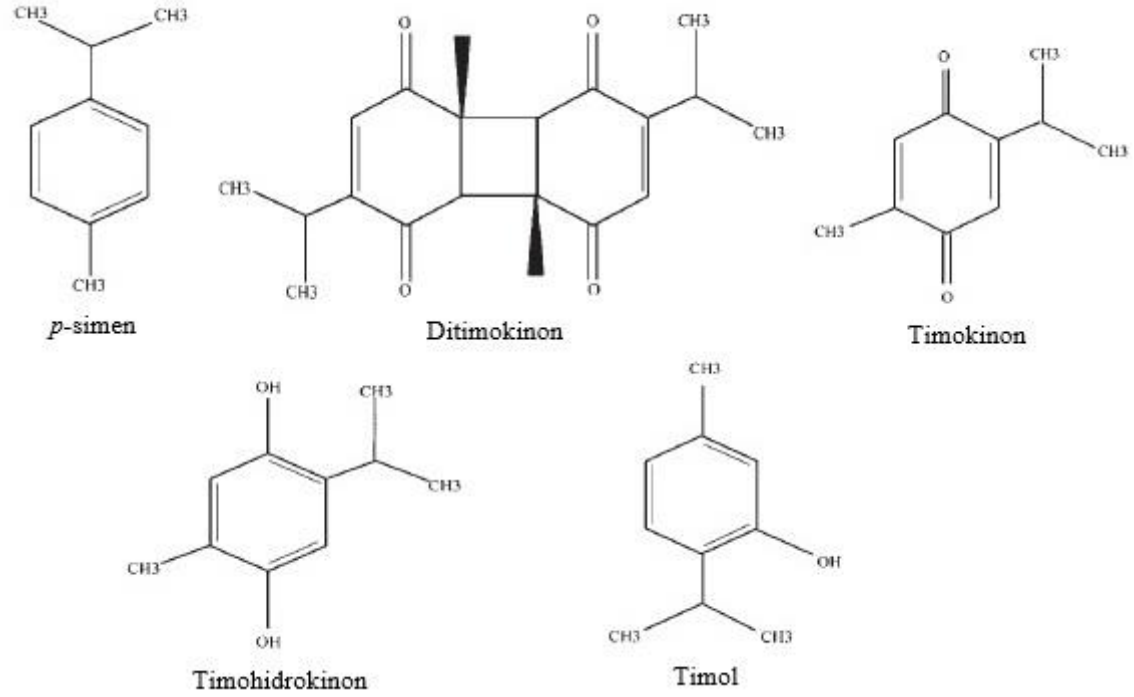
Çörek otu tohumu içeriği Şekil 2'de ve Tablo 1' de gösterildiği gibi %34-39 yağ içerir ve bunun %30'dan fazlasını sabit yağ ve %0,5-1,5 arasında uçucu yağ oluşturmaktadır. TQ, bu uçucu yağın yaklaşık %18-24'lük kısmını oluşturmaktadır. Ayrıca uçucu yağ temel etkin bileşenlerin yanında karvakrol, nigellimin-N-oksit, nigellisin ve nigellidin bulunmaktadır. Çörek otu tohumu aynı zamanda %29-37 oranında karbonhidrat, %20-23 oranında protein ve eser miktarlarda vitamin, mineral ve dokuz esansiyel aminoasit asitten sekiz tanesini içerir.



Şekil 2. Çörek otu tohumu ve içeriği (10)

Çörek otu tohumu uçucu yağında TQ, DTQ, THQ veya nigellon ve THY olmak üzere 4 temel etkin farmakolojik etki gösteren madde olduğu yayınlanmıştır. Bunlardan en önemlisi ve son zamanlarda üzerinde sürekli çalışmaların yapıldığı TQ, 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon yapısına sahip ve molekül formülü $C_{10}H_{12}O_2$'dir (12).

Çörek otu tohumunun uçucu yağlarından çeşitli farmakolojik etkin kimyasal bileşenler izole edilmiştir (Şekil 3); başlıca TQ, DTQ, THQ ve TMY yanı sıra; *p*-simen, d-limonen, α-pinen, β-pinen, trans-anetol, karvakrol ve nigellon yer almaktadır. TQ, *p*-simen, longifolin, karvakrol, α-cubebene, α-pinen, limonen, β-pinen ve sabinen çörek otu tohum uçucu yağının ana bileşenleridir. Linoleik asit, oleik asit, palmitik asit sabit yağdaki ana yağ asitleridir (13).



Şekil 3. Çörek otu tohum yağının etkin bileşenlerinin kimyasal yapısı (14)

Tablo 1. Çörek otu tohumlarının genel kimyasal bileşimi(14)

Bileşenler		**Kimyasal Bileşim**	**% Aralığı (a/a)**
Yağ	Sabit yağ	Linoleik asit (Omega-6), Oleik asit, Palmitoleik asit, Linolenik asit (Omega-3), Miristoleik asit, Dihomo linoleik asit, Stearik asit, Eikosapentaenoik asit, Araşidik asit, Behenik asit, Steroller (β-sitosterol, stigmasterol, kampesterol ve lanosterol), Tokoferoller (α, β ve γ) TQ, Retinol (A vitamini), Karotenoidler (β-karoten)	%32-38
	Uçucu yağ	Timokinon, *p*-simen, Karvakol, α-Pinen, β-pinen, Longifolen, Timol, Timohidrokinon, Ditimokinon (nigellon)	%0.5-1.5
Protein		Glutamik asit, Arjinin, Aspartik asit, Lösin, Glisin, Valin, Lisin, Treonin, Fenilalanin, Histidin, Metiyonin	%20-23
Karbonhidrat		Glikoz, Ramnoz, Ksiloz, Arabinoz	%29-37
Mineraller		Kalsiyum, Potasyum, Demir, Fosfor, Sodyum, Çinko, Magnezyum, Manganez, Bakır, Selenyum	%3.7-7
Saponinler		α-Hederin (melanthin), Hederagenin (melanthigenin)	%0.013
Alkaloidler		Nigellasin, Nigellamin, Nigelladin	%0.01
Vitaminler		A Vitamini, Tiyamin, Riboflavin, Piridoksin, Niasin, Folasin, C vitamini	%1-4

Çörek otu tohumu doymamış yağ asitleri içeriği bakımından oldukça fazladır ve doymamış yağ asidinin büyük çoğunluğunu linolenik asit oluşturur ve bunun yanında oleik asit daha az kısmını oluşturur. Doymuş yağ asitlerini palmitik, stearik, eikosadienoik ve miristik asidi içerir (15).

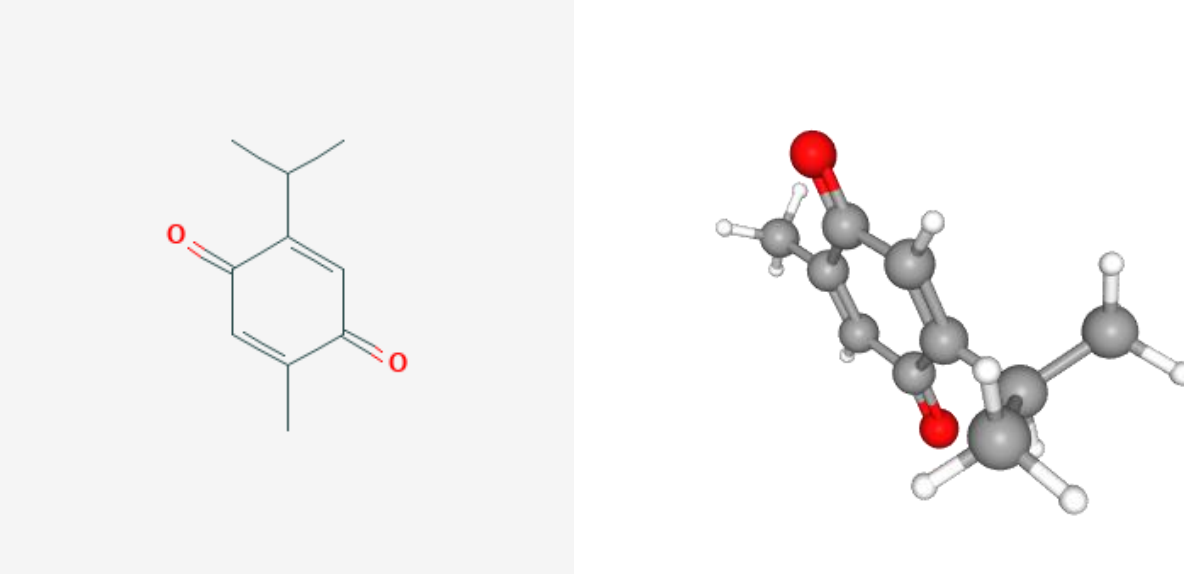
Çörek otu tohumu zengin vitamin ve mineral içeriğine sahiptir. B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niasin), B6 (pridoksin), B9 (folik asit), α ve γ-tokoferol, retinol vitaminlerinin yanında potasyum, demir, bakır, kalsiyum, çinko, fosfor, magnezyum ve selenyum gibi gerekli mineral maddeler de vardır (16).

ÇÖREK OTU TOHUMU YAĞININ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Çörek otu tohumu yağının fizikokimyasal özelliklerinin araştırıldığı birçok çalışmada yağ asidi içeriği, renk, viskozite, termal özellik, oksidatif stabilite parametreli incelenmiştir. UV absorpsiyonunun renk bileşimleri nedeninden dolayı yüksek olduğu ve buna dayanarak güneşten koruyucu etki sağlayabileceği savunulmuştur. Yapısında yüksek miktarda doğal antioksidanlar ve düşük miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden farklı bitkisel yağların yanında ayırt edici bir öncülüğe sahip olmuştur. Soğuk pres yöntemi ile elde edilen çörek otu yağının toplam fenolik bileşen içeriğinin fazla olduğu ve düşük oksidatif stabilitenin gözlemlendiği bildirilmiştir (17).

TİMOKİNON HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Çörek otu tohumunun uçucu yağında %18-24 oranında bulunan ve 164,2 g/mol molekül ağırlığına sahip TQ, ana etkin fenolik bir bileşik olup gösterdiği bazı farmakolojik etkilerle birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. TQ üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında çok yönlü biyolojik aktivite özelliklerine sahip olduğu ve toksikolojik etkilerinin kapsamlı olarak incelendiği görülmüştür. Enol ve keto form yapıları tautomerik formda bulunur ve keto formu farmakolojik özelliğinden sorumludur. TQ hidrofobik bir moleküldür bu yüzden hücre içine pasif difüzyon ile girer. Işığa karşı yüksek hassasiyete sahiptir. Yüksek pH'larda stabilitesi azalır ve asidik pH'larda ise minimum degragasyon görülür (18). TQ'nun kimyasal yapısı ve 3D gösterimi Şekil 4'te gösterilmiştir.



(a) **(b)**

Şekil 4. (a) TQ'un kimyasal yapısı ve (b) TQ'un 3D gösterimi (19)

Sinonim: 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon

2-izopropil-5-metilbenzokinon

2-metil-5-izopropil-p-benzokinon

IUPAC İsmi: 2-metil-5-propan-2-siklohekzan-2,5-dien-1,4-dion

CAS Kayıt Numarası: 490-91-5 (Sigma-Aldrich)

Molekül Formülü: $C_{10}H_{12}O_2$

Molekül Ağırlığı: 164,2 g/mol

Fiziksel Tanım: Katı (toz)

Kaynama Noktası: 232,0 °C

Erime Noktası: 45,5 °C

TİMOKİNON'UN ANTİİNFLAMATUAR ÖZELLİKLERİ

TQ'un farmakolojik özellikleri araştırıldığında birçok etkileri görülmüştür. TQ antiinflamatuar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antikanser, sinir sistemi, solunum sistemi, antidiyabetik, antioksidan gibi tedavi alanında çalışmalar yapılmıştır. Yapacağımız çalışmada çörek otu yağının içerdiği TQ, THQ DTQ, TMY ve bu maddelerin yanında *p*-simen, nigellidin

ve nigellisin gibi farmakolojik özelliklere sahip bu ana bileşenlerin aşağıda antiinflamatuar özellikleri literatürden belirtilmiştir.

İnflamasyon, COX ve LOX olmak üzere başlıca iki enzim tarafından düzenlenmektedir. COX yolağında prostaglandinler (PG) sentezlenir iken, LOX yolağında ise lökotrienler (LT) sentezlenmektedir. TQ, hem COX hem de LOX yollarını inhibe etmektedir. Bu da ROS oluşumunu azaltır (18, 20).

Çörek otu tohumunun antiinflamatuar etkisi birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Asetik asit ve formalin testleri uygulanmış, gaz kromatografisi – kütle spektroskopisi (GC-MS) yöntemi ile yağ analizi yapılmış, yağın içerisinde 20 farklı bileşik tanımlanmış ve elde edilen uçucu yağın antiinflamatuar etkileri araştırılmış, %37,3 ve %13,7 oranlarıyla *p*-simen ve TQ bu etkiden sorumlu bileşikler olduğu bulunmuştur (21).

Çörek otu tohumu sabit yağı ve TQ'nun potansiyel bir antiinflamatuar madde olarak inflamasyon zincirini bazı aşamalarda engellediği, eikozanoid yapımını ve membran lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği Houghton ve ark. (22) yaptığı bir çalışma ile gösterilmiştir. Çörek otu tohumu sabit yağı ve TQ'nun, stimüle edilmiş farelerin akyuvarlarında, kalsiyum iyonofor ile stimüle olan araşidonik asit metabolizmasının COX ve 5-LOX yolaklarını engellediği görülmüştür. Bu sonuçlar, antiinflamatuar etkinin sadece yağın içerisindeki TQ'dan dolayı değil diğer bileşenlerin de özellikle C20:2 yağ asitinin sayesinde olabileceği de gösterilmiştir.

Khan (23) yaptığı bir çalışmada bitki tohumlarının sulu ekstresinin antiinflamatuar etkisini, hayvan modellerinde pençe ödemi üzerindeki inhibitör özelliği ile kanıtlamıştır. Farelerde karregen ile ödem oluşturulmuş olup, oral yoldan verilen çörek otu ekstresinin ödemi kısmen, intraperitoneal yoldan verilmesiyle ise ödemin tamamen yok ettiği görülmüştür. Diğer bir çalışmada ise karragen ile pençelerde ve hint yağı ile kulaklarda ödem oluşturulmuş farelerde çörek otu uçucu yağı ve bunun etkin bileşeni olan TQ'nun, doza bağlı antiinflamatuar etki gösterdiği, ödem ve granülom oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (24).

DTQ, THQ, TMY ve TQ bileşiklerinin antiinflamatuar aktiviteleri *in vitro* ortamda COX-1 ve COX-2 kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar tüm ürünlerin en az bir COX formuna karşı indometazine kıyasla daha anlamlı inhibitör aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu durum DTQ, THQ, TMY ve TQ'nun çörek otunun antiinflamatuar aktivitesine topluca katkıda bulunduklarını göstermekte ve çalışmaların ilerletilmesiyle nonsteroidal antiinflamatuar yeni bir ilaç geliştirilebileceğini göstermektedir (25).

İnflamasyon tedavisi için kullanılan bazı sentetik ilaçlar biyolojik aktivelerin değişimine sebep olmakta ve ters etki yaratmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda TQ'nun sitoprotektif etki gösterdiği kanıtlanmış ve bu etki temel olarak TQ'nun antiinflamatuar etkisi ile ilişkilendirilmiştir (26).

Çörek otu bileşenlerinin, deneysel alerjik ensefalomiyelit (EAE), kolit ve artrit de dahil olmak üzere birçok iltihaplı hastalıkta antiinflamatuar etkisinin olduğu gösterilmiştir. EAE hayvanı TQ aldığında, daha yüksek glutatyon seviyesine, EAE ile tedavi edilmeyen hayvanlara kıyasla hiçbir hastalık semptomu göstermeyen perivasküler inflamasyona sahip olduklarını gösterdiler. Bu veriler EAE modelinde TQ'nun terapötik potansiyelini ortaya koymakta ve insanlarda da multipl skleroz tedavisinde olası etkileri olabileceğini düşündürmektedir (27).

Kapan ve ark. (28), mekanik bağırsak tıkanıklığı tarafından uyarılan bakteriyel translokasyon ve inflamatuar yanıt karşısında TQ etkinliğini araştırdıkları deneysel çalışmada, bağırsak tıkanıklığı yapılan ratlarda TQ verilen grupta inflamatuar sitokinler, oksidatif hasarı ve bakteriyel translokasyon salgılanmasını azalttığı, bağırsak ve karaciğerde inflamatuar değişiklikleri engellediği ve mukozanın yeniden modellenmesinde faydalı olduğu sonucunu elde etmişlerdir. TQ'nun başarıyla bakteriyel translokasyonu kontrol ettiği ve bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirmede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan klinik bir çalışmada romatoid artritli hastaların çörek otu yağı ile 2 ay süre ile 2 g/gün doz tedavisinde hastaların, eritrosit sedimantasyon hızında, plazmada bakır, ürik asit, kreatinin, alanin aminotransferaz (AST) ve asparat aminotransferaz (ALT) değerlerinde düşüş gözlemlenmiş, plazmada çinko, vitamin E ve vitamin C değerlerinde de artış gözlemlenmiş, antiinflamatuar aktivite saptanmıştır (29).

Tablo 2'de TQ'nun antiinflamatuar etki gösterdiği literatür çalışmaları gösterilmiştir.

Tablo 2. TQ'nun antiinflamatuar etkileri (30)

TQ Konsantrasyon	Veriliş Yolu	LD_{50} Değeri	Deneysel Çalışma	Önemli Bulgular	Kay.
1, 3, 10 ve 100 μM	Hücreye enjekte	20 μM	İnsan kan hücrelerinde TQ	İnhibe edilmiş Lökotrien B4 (LTB4) ve Lökotrien C4 (LTC4) formu ve 5-LOX işlevi, ekzojen araşidonik asidin 5-hidroksi eikoatetraenoik aside dönüştürülmesini baskılayarak işlev görür.	(31)

Tablo 2 devamı. TQ'nun antiinflamatuar etkileri (30)

3 mg/kg	İntrapertonea l (İP)	104 mg/kg	Allerjik astımlı fare modelinde TQ	Akciğer hücrelerinde inhibe edilmiş 5-LOX ekspresyonu bronkoalveoler lavaj sıvısı (BALF) ve akciğer dokusunda LTB4, LTC4 ve Th2 hücre sitokin seviyelerini düşürdü.	(32)
10 µM 3mg/kg	Hücreye enjekte, İP	20 µM 57,5 mg/kg	Lipopolisakkarit (LPS)'ye maruz kalan tip 1 ve 2 Diabetes Mellitus (DM) sıçan modelinde TQ	Hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde inflamatuar mediatörlerin İnterlökin-1 beta (IL-1β) ve Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) seviyelerini düşürdü.	(33)
10 µM	Hücreye enjekte	20 µM	LPS ile aktive edilmiş sıçan mast hücrelerinde TQ	GATA transkripsiyon faktörü ekspresyonunu ve promotör bağlanmasını bloke ederek Rat bezofilik lösemi (RBL-2H3) hücrelerinde LPS kaynaklı proinflamatuar sitokin inhibe edildi.	(34)
3mg/kg	İP	-	Ovalbumin (OVA) ile duyarlılaştırılmış gine domuzu üzerinde TQ	Geliştirilmiş akciğer patolojik değişimleri Azalan IL-4 ve Artan İnterferon (İFN-γ) sitokinleri.	(35)
5, 10, 15 µM	Hücreye enjekte	20 µM	İnsan osteoartriti kondrositlerinde TQ	Nükleer faktör kabba b (NF-KB) ve Mitojenle etkileşen protein kinaz (MAPK)'lerin sinyal yollarını inhibe ederek inflamatuar mediatör üretimini önledi.	(36)
% 0.4'lük 5 damla	Burun mukozasında yerleşmiş	-	Allerjik rinit tavşan modelinde TQ	Azalan intraepitelyal inflamasyon Azalan submukazal inflamasyon Azalan goblet hücresi hipertrofisi	(37)

Tablo 2 devamı. TQ'nun antiinflamatuar etkileri (30)

% 0.05, 0.1, 0.5	Göz içine yerleşmiş	-	OVA-allerjik konjonktivit (AC) farelerinde TQ	Eozinofil alınımının yanı sıra sitokin, İmmünglobülin E (IgE) ve histamin düzeylerini azaltarak OVA kaynaklı AC'de oküler semptomları azalttı	(38)
3 mg/kg	İP	104,7 mg/kg	Allerjik hava yolu inflamasyonu gösteren fare modelinde TQ	BALF'da azalmış goblet hücresi hiperplazisi, akciğer eozinofili ve Th2 sitokinleri.	(39)
13 μg/kg	İP	870,9 mg/kg	OVA kaynaklı allerjik ishalin murin modeli üzerinde TQ	Mukozal mast hücre proteaz (MMCP-1) ekspresyonu azalması Bağırsak hücre sayısının azalması Tamamen klinik ishalin derecesini düşürdü.	(40)
5 mg/kg	İP	57,5 mg/kg	Kollajen-artrit sıçan modelinde TQ	Glutatyon (GSH), Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD) ve IL-10 sitokin seviyelerini arttırdı. IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, PG(2), lipit peroksit sevitesi (LPO) seviyelerini düşürdü.	(41)
1.25 – 2.5 μM	Hücreye enjekte	20 μM	LPS'ye maruz bırakılan sıçan primer glial hücrelerinde TQ	İyileştirilmiş oksidatif ve inflamatuar cevaplar.	(42)
0 – 10 μM 5mg/kg	Hücreye enjekte, İP	20 μM 57,5 mg/kg	İnsan Romatiod artrit-Fibroblast benzeri sinoviyositler (RA-FLS) ve RA sıçan modelinde TQ.	P38 mitojenle aktive olan protein kinaz, hücre dışı düzenlenmiş kinazlar ½ ve NF-kβ-p65'in bloke edilmesi yoluyla IL-1, TNFα, MMP-13, COX-2 ve PG (2) seviyelerini düşürdü.	(43)

TİMOKİNON'UN TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

Darakhshan ve ark. (18) TQ üzerine yaptığı çalışmada, TQ'nun tedavi edici etkileri görülmüştür. TQ'nun böbrek, karaciğer, kalp, akciğer ve mide gibi birçok organ sisteminde oluşan oksidatif stres kaynaklı hasarları düzeltebileceği bildirilmiştir. TQ'nun antikarsinojenik,

antiinflamatuar, analjezik, hipoglisemik, bağışıklık sistemini güçlendirici gibi birçok faydalı etkileri ileri sürülmekte ve güvenli olduğu bildirilmektedir. TQ'nun toksik etkileri ancak çok yüksek dozlarında gösterilebilmiştir. TQ yüksek dozlarında seçici sitotoksik etki göstermektedir. TQ'nun; osteoblast, fare böbrek hücreleri, insan akciğer fibroblastları ve vero hücreleri gibi normal hücrelerde sitotoksisite göstermeden tümör hücrelerini etkili bir biçimde öldürebildiği bildirilmiştir. Sıçanlarda TQ'nun 10-100 mg/kg dozlarda oral alımda toksik ve letal etkiler göstermediği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada TQ'nun maksimum tolere edilebilir dozu İP enjeksiyonda erkek sıçanlarda 22,5 mg/kg, dişi sıçanlarda 15 mg/kg, oral alımda ise erkek ve dişi sıçanlarda 250 mg/kg olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada akut toksisite testlerinde, TQ'nun farelerde oral öldürücü doz (LD_{50}) (1,52–3,77 doz aralığında çalışılmıştır) değeri 2,4 g/kg olarak ve sıçanlarda İP LD_{50} değeri 10 mg/kg olarak bildirilmiştir. Ancak, Mansour ve ark. (44) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, TQ'nun 4, 8, 12,5, 25 ve 50 mg/kg İP dozlarda serum ALT ve laktat dehidrogenaz (LDH) biyokimyasal parametreleri değiştirmediği ve 50 mg/kg üzeri dozlarda İP enjeksiyonda toksik etki gösterdiği ve İP LD_{50} değeri 90,3 mg/kg olarak bildirilmiştir.

Khader ve ark. (13) yaptığı çalışmada TQ'nun vücutta biyotransformasyona uğraması sırasında oluşan ROS'ler oksidatif stresi artırabilmektedir. TQ'nun yüksek dozlarında antioksidan enzimleri tüketebilmekte ve hepatositlerde DNA hasarına neden olabilmektedir. B.H. Ali ve ark. (11) çörek otu tohumu ve yağı üzerine yaptığı çalışmada düşük toksisiteye sahip oduğunu bildirmiştir. Uygulama yolunun TQ'nun toksisite sonuçlarını etkilediğini söylemişlerdir. TQ'nun yüksek dozlarının *in vivo* çalışmasında karaciğer hasarına neden olduğu bildirilmektedir. Yüksek dozda TQ akut uygulanması (2 g/kg ve fazlası) hipoaktiviteye ve solunum zorluğuna neden olmuştur.

Abukhader (45) çalışmasında TQ'nun sıçanlarda İP uygulanmasında sistemik dolaşıma geçmesi sonucu akut pankreatite neden olduğunu göstermiştir. TQ'nun erkek ve dişi sıçanlar 20, 30 ve 40 mg/kg tek doz İP enjeksiyonunu takiben 5 gün izlenmiştir. TQ'nun 30 ve 40 mg/kg doz uygulaması sonrası, 72 saat içinde sinirlilik, uykusuzluk, piloereksiyon ve hafif karın şişmesi gibi toksisite belirtileri ortaya çıkmıştır. Deneyin 3. ve 4. günlerinde sıçanların vücut ağırlığında ortalama 17,3 g azalma gözlenmiştir. 20 mg/kg TQ uygulanan dişi sıçanların %25'inde toksisite belirtilerinin görüldüğü, ancak erkek sıçanların hiçbirinde bu toksisite belirtilerinin görülmediği bildirilmiştir. TQ'nun erkek ve dişi sıçanlar 200, 300 ve 500 mg/kg tek oral dozu takiben 5 gün izlenmiştir. Kırk sekiz saat içinde ağırlıkta artış, diyare, hipoaktivite, hafif karın şişliği ve nefes darlığı görülmüştür. Sonrasında, sıçanların ağırlıkları normale

dönmüştür ve toksisite belirtileri deneyin 5. gününe kadar kaybolmuştur. Bir erkek ve dişi sıçanda 500 mg/kg dozda ölüm görülmüştür. Ezzat S. El Daly'nin (46) yaptığı çalışmada çörek otu tohumu ekstresinin (50 mg/kg) farelere 5 gün boyunca IP uygulanmasında böbrek ve karaciğer fonksiyon biyogöstergelerini etkilemediği gösterilmiştir.

Zaoui ve ark. (47) yaptığı bir çalışmada, çörek otunun sabit yağının 10 mL/kg dozda oral uygulanmasında 12 haftaya kadar sıçanlarda mortaliteye veya histopatolojik değişikliklere, ALT, AST ve GSH dahil temel karaciğer enzimlerinde önemli değişmelere neden olmadığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada sıçanlara 12 hafta boyunca 2 mL/kg/gün çörek otu yağının oral dozu verilerek yapılan bir kronik toksisite testinde; histopatolojik modifikasyonlar, ALT, AST ve GSH dahil karaciğer enzim düzeylerinde değişiklikler gözlenmemiştir. Serum kolesterol, trigliserid ve glikoz seviyeleri ve trombosit, lokosit miktarı kontrol değerlere kıyasla önemli derecede düşük bulunmuştur. Hemoglobin ve hematokrit değerleri önemli derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca, kontrol gruptaki hayvanlara kıyasla çörek otu yağı verilen grupta vücut ağırlığı artışında düşme gözlenmiştir.

Gali-Muhtasib ve ark. (48) yaptığı çalışmaya göre, TQ'nun ardışık 20 gün uygulanmasında Balb/c farelerinde ölüme yol açmadığı veya ortalama vücut ağırlığında değişime neden olmadığı ve TQ'nun farelerde iyi tolere edilebildiği bildirilmiştir. Shoji Fukushima ve ark. (49) yaptığı bir çalışmada, 14 hafta boyunca 200 mg/kg/gün çörek otu yağı ile verilen erkek sıçanların karaciğer, böbrek, dalak ve diğer organlarda patolojik değişikliklere neden olmadığı ve kan biyokimyasını etkilemediği ve farelerde çörek otu yağının İP LD_{50} değeri, 2,06 mL/kg ve oral LD_{50} değeri 28,8 mL/kg olarak bildirilmiştir. Al-Ali ve ark. (50) tarafından, TQ'nun farelerdeki IP LD_{50} değeri 104,7 mg/kg ve oral LD_{50} değeri 870,9 mg/kg; sıçanlarda ise İP LD_{50} değeri 57,5 mg/kg ve oral LD_{50} değeri 794,3 mg/kg olarak bildirilmiştir.

Zaki Tubesha ve ark. (51) yaptığı çalışmada, TQ'nun nanoemülsiyon formülasyonunun akut toksisitesi erkek ve dişi sıçanlarda araştırılmıştır. 44,5 mg TQ içeren preparatın oral yoldan tez doz uygulanmasını takiben sıçanlar 14 gün boyunca incelenmiştir. Tüm hayvanlar sağlıklı olarak kaydedilmiştir. Mortalite ve herhangi bir toksisite gözlenmemiştir. Genel davranışlar, vücut ağırlığı, yiyecek ve su tüketimi, organ ağırlığı, hematoloji, histopatoloji ve klinik biyokimyasal parametrelerde değişiklik belirlenmemiştir. 44,5 mg TQ içeren TQ'nun nanoemülsiyon formülasyonunun toksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

İslam SN ve ark. (52) yaptığı çalışmada TQ'nun temas allerjen olduğu bildirilmektedir. 4 hafta, haftada 2 kez, 2,5 µL çörek otu yağına maruz bırakılan sıçanlarda; notrofilleri ve splenositleri düşürdüğü ve periferal lenfosit ve monositleri arttırdığı bildirilmiştir. Khader ve

ark (13) saf çörek otu yağının topikal kullanımından sonra makülopapüler egzama belirtisine sahip 2 allerjik temas dermatit vaka raporu bildirilmiştir. Temas dermatit vakalarının, esansiyel yağ içeren ve marketlerde cilt hastalıklarını tedavi edici diye satılan kozmetik ve parfümlerin kullanımı ile ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bu vakalar topikal kortikosteroid uygulaması ile tedavi edilmiştir (53).

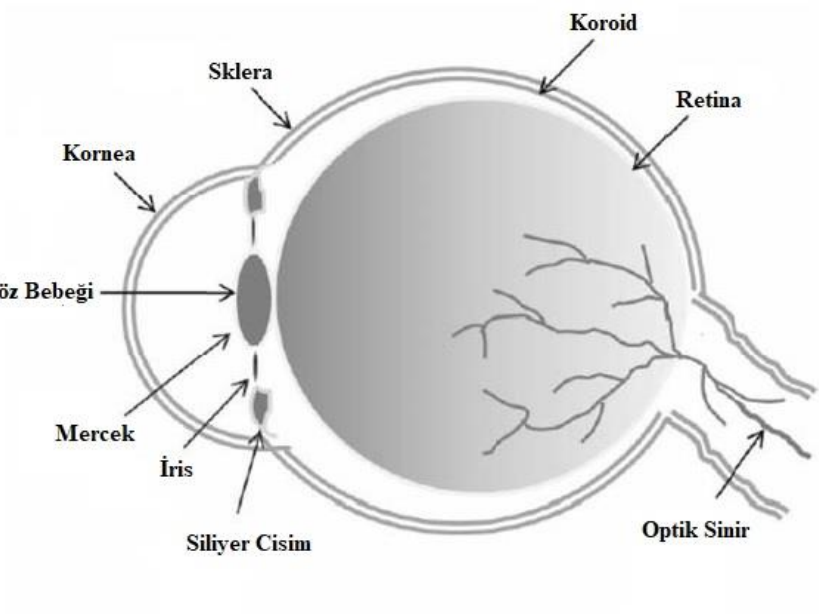
Sıçanlarda üreme toksisitesi yönünden gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz değeri İP 15 mg/kg'dır (45). Oral ve dermal maruziyetinde güvenliliğine dair bilgi olmadığından gebelikte ve emzirme döneminde kullanımı sakıncalıdır. Yi ve ark. (54) TQ'nun antianjiyogenik etkisi nedeni ile gebelikte kullanımının sakıncalı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sıçan ve kobaylarda, uterus düz kas kasılmasını doza bağımlı inhibe ettiği gösterilmiştir.

GÖZ

Göz küçük, karmaşık çok bölümlü bir organdır. Anatomisi, fizyolojisi ve biyokimyası ksenobiyotiklere karşı oldukça dayanıklıdır. Asıl zorluk, gözün bu koruyucu bariyerlerini atlatıp ilacın oftalmik hastalıkları tedavi etmek için bölgeye yeterli miktarda ulaştırmaktır. İnsan gözü, ışığı geçirmeye ve kırmaya elverişli üç tabakadan meydana gelmiştir. Dış tabakaya, sert tabaka veya gözakı denir. Bu tabaka tümsekleşerek saydam tabakayı oluşturur. Beyaz ve tel yapıda olan sert tabaka, gözü koruyan bir zardır. Çok damarlı bir bağ dokusu olan damar tabaka, iki yüzündeki hücre örtüsü ile gözyuvarını tam bir karanlık oda haline getirir. Bunun ön bölümünde, kirpiksi cisim kasları ile kirpiksi bölge yer alır. Kirpiksi bölgenin çok damarlı olan asıcı bağı gergin tutmak için kanla dolan küçük piramitler halindeki çıkıntılara kirpiksi uzantı adı verilir. Kirpiksi bölgenin uzantısı olarak, ön bölümde damar tabaka renk değiştirerek ortası delik (göz bebeği) bir diyafram oluşturur, bu diyaframa iris adı verilir. Rengi insandan insana değişen iris, göz bebeğini büyültüp küçültmeye yarayan kas tellerini kapsar.

Ağ tabaka, gözün üçüncü ve çok ince tabakasını oluşturur. Bunun arka bölümünde bulunan ortası çukur, beyazımsı küçük kabarcık (görme sinir diski) görme sinirinin girdiği yerdir ve kör nokta diye adlandırılır. Kör noktanın biraz ötesinde sarı leke yer alır. Burasıda dıştan gelen görüntülerin en iyi biçimlendiği görme bölgesidir. Gözün arka kutbuna giren görme siniri, damar tabakaya doğru birçok sinir teli halinde yayılır ve üç tabaka halinde dizili nöronlarla sona erer. Birinci tabakadaki nöronlar (çok kutuplu nöronlar) silindir ekseni, görme sinirinde sürer; ön uzantılarıysa, ikinci tabakanın görme nöronlarının silindir eksenlerine bitişir. Bu tabakada, bir ucu ağ tabakanın kırmızı bölümüne giren, koni ve çubuk biçimindeki nöronlar yer alır. Koni ve çubukların serbest uçları damar tabakaya yöneliktir. Damar tabakaya gelen

ışın ışınları kırılır ve ağtabaka hücrelerinin sinir uçlarını etkiler (55). Gözün yapısı ve önemli kısımları Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. İnsan gözü ve onun önemli kısımları (56)

OKÜLER İLAÇ SALIMINDA ENGELLER

Oküler ilaç salımındaki başlıca engeller ve belirleyici faktörler ilacın fizikokimyasal özellikleri, lakrimal sıvıdan atılması, kornea bariyerleri ve kornea dışı emilimdir. Kornea epiteli boyunca ilaç taşınması esasen parasellüler veya transselüler yoluyla yapılır. Hidrofilik ilaçlar öncelikle paraseüler yoldan nüfuz eder, lipofilik ilaçlar transselüler yolu hücreler arası boşluklardan pasif veya kolaylaştırılmış difizyonu tercih ederler. Lipofilik özelliği, çözünürlük, moleküler boyut ve şekil, yük ve iyonizasyon derecesi de korneadaki penetrasyon yolunu ve oranını etkiler. Çözelti, süspansiyon ve lipozom gibi sıvı dozaj formlarının çoğu ya konjonktival keseden nazolakrimal kanala boşaltılır ya da ilaçların zayıf biyoyararlanımıyla sonuçlanan prekorneal alandan temizlenir. İlaçlar esas olarak çözelti drenajı, lakrimasyon ve gözün konjonktivalarına verimsiz emilim yolula prekorneal lakrimal sıvıdan elimine edilir. Bu faktörler ve kornea bariyeri topikal olarak uygulanan ilacın göze nüfuzunu sınırlar ve uygulanan ilacından az kısmı göz içi dokusuna ulaşır. Aşağıda temel göz bariyerlerinin kısa bilgilendirilmesi yapılmıştır (56).

Kornea

Kornea, gözün en ön kısmında yer alan ışığı odaklamak ve gözü dış etkenlerden korumak için özelleşmiş saydam ve eğimli bir dokudur. Korneanın ön yüzeyi, gözün temel kırıcı bileşeni olup diğeri ise lenstir. Kornea ve lens dış ortamdan gelen ışığın etkin bir şekilde retinaya ulaşmasını sağlar. İnsanlarda, kornea gözün dış yüzeyinin 1/6'sını oluşturan oval bir yapıdır. Dışarıdan ölçüldüğünde yatay çapı yaklaşık 12.6 mm, dikey çapı ise yaklaşık 11.7 mm'dir, ortada kalınlığı 0.5 mm, kenarında ise 1.2 mm'dir. Kornea, ışığın net bir şekilde kırınımı için saydam olmak zorundadır. Bu nedenle yapısında kan damarları içermez.

Kornea, ilaç moleküllerinin yolunu sınırlayan mekanik bir bariyer oluşturur. Yüksek lipit içeriğinden dolayı, epitelyum ve endotel, hidrofilik moleküllerin geçişine engel oluşturduğu düşünülmektedir. Dahası, korneal epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların varlığı, parasellüler ilaç nüfuzunu geciktirir, böylece hidrofilik ve iyonize moleküllere korneanın geçirgenliğini sınırlar. Öte yandan, kollajen fibrillerinin tabakalı bir düzeninden oluşan bir hücre dışı matristen oluşan stroma, bu katın lipofilik moleküllerin geçirimsiz olmasını sağlayan yüksek su içeriği ile karakterizedir. Genel olarak, bu üç katmana nüfuz edebilmek için moleküllerin, aynı yapıda hidrofilik ve lipofilik özelliklerin varlığı ile karakterize edilen bir amfifilik doğasına sahip olması gerektiği görünmektedir. Negatif yüklü olan kornea, fizyolojik pH'da anyonlardan çok katyonlara karşı daha geçirgendir.

Kornea ile göz merceği arasındaki odacıkta (ön kamara) saydam bir sıvı bulunur. Sürekli olarak üretilen bu saydam sıvı, kornea ile irisin birleştiği köşedeki açıklıktan Schlemm kanalı ile kana karışır. Bu sıvının basıncı vücudumuz tarafından ayarlanmaktadır. Göz küresinin içi, jelatin kıvamında saydam bir madde (corpus vitreum) ile doludur. Kornea; epitelyum, Bowman tabaka, stroma, Desement membranı ve endotelyum olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır (55, 57).

Kornea epiteli: Kornea embriyolojik olarak saçlar, tırnaklar ve deri gibi ektoderm kökenlidir, bu nedenle sürekli olarak yenilenir. Bu katman korneanın en dış tabakasıdır. Beş kat hücreden oluşur. En altta yer alan hücreler ve korneayı çevreleyen hücreler çoğalır. Bu hücreler yukarı katlara doğru ilerleyerek yaşlı hücrelerin yerini alırlar, böylece kornea epiteli yaklaşık iki haftada bir yenilenir.

Kornea epiteli doğal lipofiliktir ve küçük moleküller için seçici bir membran gibi etki gösterir, aynı zamanda paraselüler yol ile makromoleküllerin difüzyonunu da önlemektedir.

Lipofilik ilaçlar kornea epitelinden transselüler ve hidrofilik ilaçlar paraselüler olarak geçebilmektedirler (55, 57).

Dış sınırlayıcı tabaka (Bowman zarı): Kolajen liflerinin düzensiz olarak sıkışması sonucu meydana gelir. Epitel hücreleri Bowman zarına sıkıca yapışmıştır, korneaya yapısal destek sağlar. Travma ve bakteriyel invazyona karşı koruyucu bir tabakadır. Gerçek bir membran değildir ve epitel hücreleri Bowman zarına sıkıca yapışır ve korneaya destek sağlarlar (55, 57).

Kornea stroması: Kornea kalınlığını oluşturan saydam bir yapıdır. Düzenli bir şekilde sıralanmış kolajen liflerinin oluşturduğu 100 kadar tabakadan oluşur ve yüksek hidrofilik özellik gösterir. İçeriğinde keratosit denilen hücreler seyrek olarak yer alır. Bu tabaka hasar gördüğünde iyileşme genellikle saydamlık kaybına ve/veya kornea eğimi değişikliklerine yol açarak görmeyi olumsuz olarak etkiler. Aynı zamanda korneanın şeffaflığını sağlar (55, 57).

İç sınırlayıcı tabaka (Descement membranı): Kornea endotel hücrelerinin salgıladığı bir bazal zardır. Hasarlanması veya hastalıklanması sonrasında kornea endoteli zarar görerek korneada ödem gelişir (55, 57).

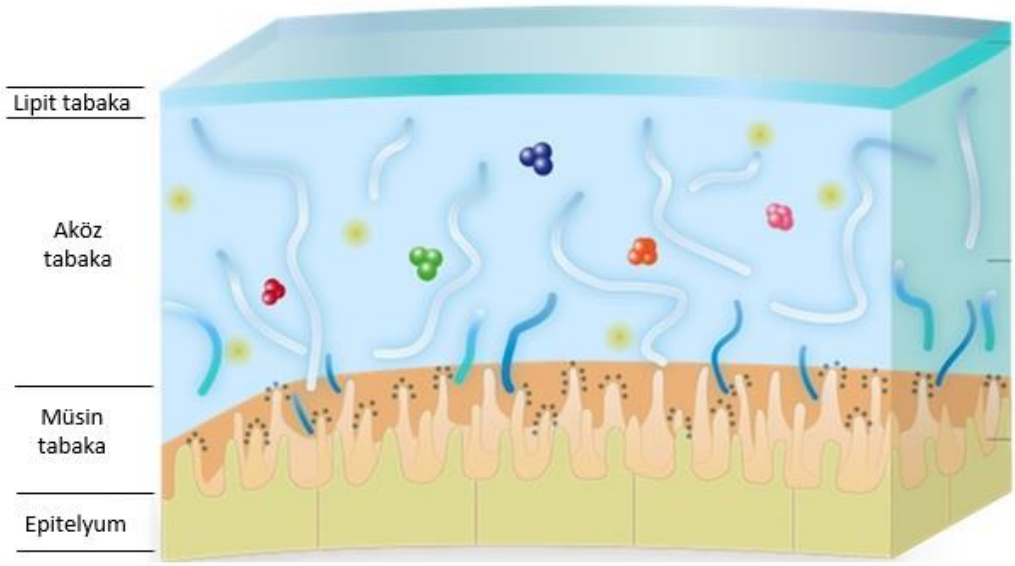
Kornea endoteli: Korneanın en içteki tabakasıdır. Altıgen şeklinde, tek katman olarak sıralanmış hücrelerden oluşur. Hücreler birbirlerine sıkı bağlar ile yapışmıştır. Yarı geçirgen bir zar işlevi görür. Hücrelerin yanal yüzlerinde yer alan pompa enzimleri sayesinde kornea stroması su içeriği sabit tutulur. Bu hücreler kan veya lenf sıvısı ile değil göz içi sıvısı ile temastadır ve embriyolojik köken olarak da damar endotelinden farklı kökenlidir (55, 57).

Gözyaşı

Gözyaşı; kornea ve konjonktiva epitelini örten, göz yüzeyini koruyan, elektrolitler, su, müsin, vitamin A, lizozim-laktoferrin gibi antimikrobiyal proteinler içeren, yaklaşık 7–10 μm kalınlığında ultra ince aköz-müsin jel yapısında bir tabakadır. Görevleri arasında küçük yüzey epitel düzensizliğini ortadan kaldırarak korneayı düzgün optik yüzey haline getirmek, kornea ve konjonktiva hassas yüzey epitelini ıslatıp korumak, mekanik yıkama ve antimikrobiyal aktivite ile mikroorganizmaların üremesini inhibe etmek, korneaya gerekli besleyici maddeleri sağlamak sayılmaktadır.

Gözyaşının fiziksel özellikleri ve içeriği Tablo 3'te gösterilmiştir. Bunlar; pH'sı ortalama 7,35 olup, 5,20 ile 8,35 arasında değişmektedir, osmolaritesi ortalama 302 mosm/L, hacmi 7 µl'dir. Dakikada ortalama 1,2 µl olarak üretilmektedir. Refraktif indeksi 1,136'dır. Kan glukoz ve üresindeki değişiklikler gözyaşına da yansımaktadır. Normal koşullarda gözyaşı izotoniktir (58).

Gözyaşı film tabakası müsin, aköz ve lipit olmak üzere üç tabakadan oluşur (Şekil 6).



Şekil 6. Gözyaşı film tabakası (59)

Müsin tabaka: Gözyaşı film tabakasının, en iç tabakasını oluşturur. Yüzeydeki kornea ve konjonktiva epitel hücrelerinin yüzeyini örter. Kalınlığı yaklaşık 0,5 mikrondur. Müsin tabaka en fazla konjonktivadaki goblet hücreleri olmak üzere, konjonktiva ve kornea epitel hücreleri, çok az miktarda ise Henle kriptleri ve Manz bezleri tarafından salgılanmaktadır. Müsin tabaka fonksiyonları (60);

- Oküler yüzeyin lubrikasyonunu sağlamak, göz kırpma sırasında oluşabilecek travmalardan korumak,
- Hidrofobik olan kornea epitelini hidrofilik hale çevirmek böylece gözyaşının oküler yüzeye dağılmasını sağlamak,
- Yüzey gerilimini lipit tabakasının yardımı ile azaltmak ve bu yolla gözyaşı filminin stabilitesini sağlamak,
- Dökülen epitel hücrelerini, yabancı maddeleri ve bakterileri yakalamaktır.

Aköz tabaka: Gözyaşı film tabakasının orta kısmında yer alır. Kalınlığı en fazla olan tabakadır, yaklaşık 8 mikron kalınlığındadır. Aköz tabakada; elektrolitler, proteinler, büyüme faktörleri, vitaminler, antibakteriyel moleküller, sitokinler, immünglobulinler ve hormonlar bulunmaktadır. Bu içerik oküler yüzeyin beslenmesini ve korunmasını sağlar. Aköz tabakanın fonksiyonları (60);

- Avasküler kornea epiteline oksijen ulaştırmak,
- Epitel sağlığı için gerekli olan uygun elektrolit bileşimini sağlamak,
- Oküler yüzeyi enfeksiyondan korumak,
- Kornea yüzeyindeki anlık düzensizlikleri ortadan kaldırmak,
- Gözyaşında oluşan debrisi yıkamak,
- Kornea ve konjoktiva epitel hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlemek,
- Hücre hareketini sağlayan ortam oluşturmaktır.

Lipit tabaka: Gözyaşının en dış kısmında yer alır ve 1 mikron kalınlığındadır. En önemli görevi aköz tabakanın buharlaşmasına engel olmaktır. Ayrıca gözyaşının cilde yayılmasını önler ve antibakteriyel özelliği olduğu düşünülmektedir. Lipit tabakanın fonksiyonları (60);

- Aköz tabakasının buharlaşmasını engellemek,
- Gözyaşı stabilitesini sağlamak,
- Düzgün oküler yüzey oluşturarak net görmeye katkıda bulunmak,
- Gözyaşının taşmasını engelleyen hidrofobik bariyer oluşturarak cildin gözyaşı ile temasını önlemektir.

Tablo 3. Gözyaşının fiziksel özellikleri, bileşenleri ve gözyaşında bulunan elektrolitler (60)

Fiziksel özellikler	pH	7.4(7.2-7.7)
	Ozmatik basınç	308 mOsm/kg
Gözyaşı bileşenleri	Su	%98.2
	Solidler	%1.8
Elektrolitler	Na	120-170 mmol/L

Tablo 3 devam. Gözyaşının fiziksel özellikleri, bileşenleri ve gözyaşında bulunan elektrolitler (60)

	K	26-42 mmol/L
	Cl	120-135 mmol/L
	HCO_3	26 mmol/L
	Mg	0.5-1.1 mmol/L
	Ca	0.3-2 mmol/L

OKÜLER İLAÇ UYGULAMA YOLLARI

Vücudun diğer bölgelerine ilaç uygulanması ile karşılaştırıldığında, göze ilaç uygulanması, çeşitli oküler bariyerlerin getirdiği önemli zorlukların üstesinden gelmelidir. Gözün benzersiz fizyolojisi ve fizikokimyasal koşulları nedeniyle ilaç hedeflendirilmesinin en narin yollarından biridir. Göze ilaç uygulanmasının yaygın yolları Şekil 7'de gösterildiği gibi topikal, subkonjonktival, intravitreal, retrobulbur ve intrakameraldir (61), ayrıca uygulamardan sonra ilacın oküler dokulara dağılımının akış şeması Şekil 8'de gösterilmiştir. Bu uygulamaların avantaj ve dezavantajları Tablo 4'te bahsedilmiştir.

Topikal Uygulama

Topikal uygulama çoğunlukla göz bölmelerine merhemler, jeller, emülsiyonlar veya süspansiyonlar şeklinde uygulanıp ön segment hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Uygulama kolaylığı ve düşük maliyet nedeniyle topikal uygulama en çok tercih edilen yöntem olmaya devam etmiştir. Topikal olarak uygulanan ilaçların çoğunda etki alanı genellikle kornea, konjunktiva, sklera ve ön segmentin iris ve siliyer cisim gibi diğer dokuların farklı katmanlardır (61).

Sistemik Uygulama

Göz için sistemik ilaç uygulamasında, kan-aköz bariyer ve kan-retinal bariyer, sırasıyla ön segment ve arka segment oküler ilaç hedeflendirilmesinde başlıca engellerdir. İlacı sistemik uygulama yoluyla retinaya vermek ideal olsa da, kan-retina bariyeri nedeniyle hala bir zorluktur; kan retina bariyeri ilacın kandan retinayla geçişini engeller (61).

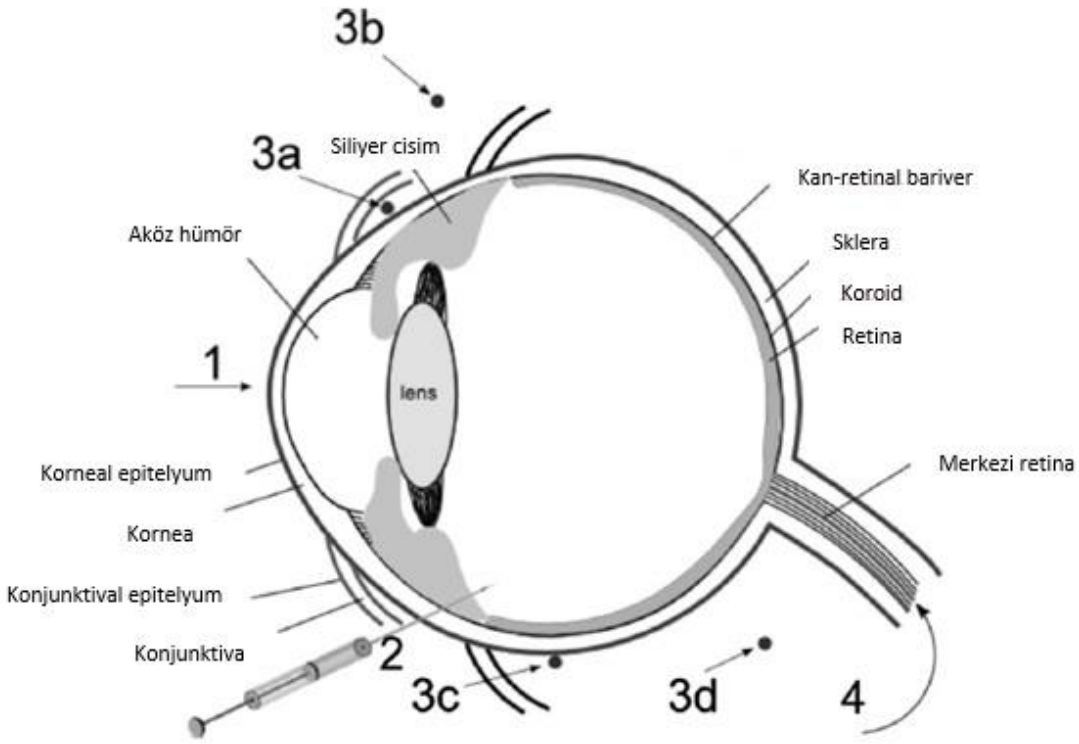
Oral Uygulama

Oral ilaç kullanımı tek başına veya topikal yolla birlikte kullanılması araştırılmış sadece oral ilaç kullanımıyla posteriyor segmentte terapötik ilaç konsantrasyonu elde edilememiştir. Oral ilaç kullanımı, parenteral yoldan karşılaştırıldığında, kronik retinal hastalıkların tedavisinde hasta tarafından tercih edilen bir yoldur. Ancak hedeflenen oküler dokuların birçoğu için sınırlı erişilebilirlik ve istenilen dozda terapötik etkinlik sağlayabilmek için yüksek doz gerekmektedir bu da oral uygulamayı sınırlandırmaktadır. Bu dozlar sistemik yan etkilere, toksik etkilere neden olabilir (61).

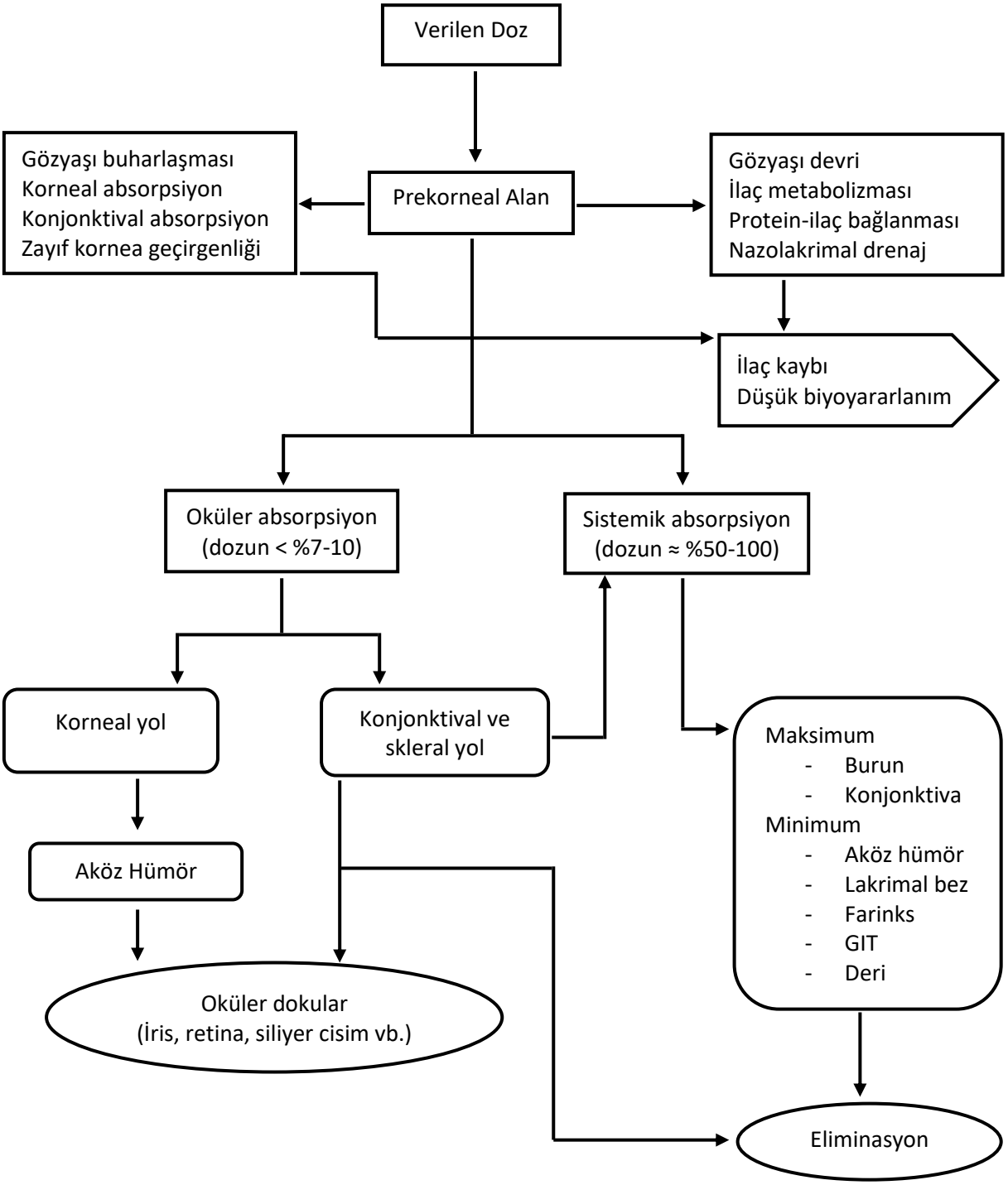
A vitamini, sağlıklı gözlerin gözyaşı filminde doğal olarak bulunan önemli bir besindir. A vitamini, gözyaşı filmi için çok önemli olan gözyaşı filminin en iç kayganlaştırıcı tabakası olan müsin tabakasının üretiminde önemli bir rol oynar. A vitamini eksikliği, müsin tabakası kaybına ve goblet hücresi atrofisine yol açar (62). A vitamini damlaları, gözleri serbest radikallerden, toksinlerden, alerjenlerden ve iltihaplardan korur. Kseroftalmi tedavisinde A vitamini sistemik uygulamasıyla birlikte yapılan topikal retinoik asit tedavisi uygulanmıştır (63). Tek başına etkili bir veya daha fazla retinoid, farmasötik olarak kabul edilebilir bir oftalmik araç içinde dağıtılabilir ve kuru göz hastalığının etkin tedavisi için topikal olarak uygulanabilir.

Günümüzde, göz doktorları tarafından esansiyel yağ asitleriyle oral destek önerilmektedir (64). Esansiyel yağ asitleri eikosanoidlerin öncüleridir, yerel olarak etki gösteren hormonlar, yangılı süreçlerde rol oynamaktadır (65). Esansiyel yağ asitleri, iltihabı azaltarak ve meibom lipitlerinin bileşimini değiştirerek kuru göz hastalığı hastalarına fayda sağlayabilir. Klinisyenler kuru göz hastalığının rahatlamasını sağlamak için omega-3 yağ asidi diyetinin alımını önerirler (66). Özellikle kuru gözler için pazarlanan bazı omega-3 jel kapsülleri örnekleri Thera Tear ve Bio Tears'ı içerir.

Rasid ve ark. (67) Massachusetts Göz Araştırma Enstitüsünde ilk kez, belirli bir yağ asidinin topikal olarak uygulanmasının, kuru göz hastalığı belirtilerinin tedavisinde yararlı olduğunu göstermiştir. Topikal α-linolenik asit tedavisinin hem göz hem de moleküler seviyelerde kuru göz ve iltihaplanma değişiklikerini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Bu nedenle, α-linolenik asitin topikal uygulaması, kuru göz hastalığındaki klinik bulguları ve yangılı değişiklikleri tedavi etmek için yeni bir tedavi yöntemi olabilir.



Şekil 7. Çeşitli öküler bariyerleri ve ilaç verme mekanizmalarını gösteren göz anatomisi: (1) topikal uygulama, (2) intravitreal enjeksiyon, (3) periyodik enjeksiyonlar [(3a) subkonjunktival, (3b) peribulbar, (3c) subtenon, (3d) retrobulbar] ve (4) sistemik uygulama (68)



Şekil 8. Oküler ilaç salımından sonra ilacın oküler dokularda hareket ve dağılımının akış şeması ve ilacın farklı oküler bölmelerde emilimini etkileyen faktörler

Periokulüler ve İntravitreal Uygulama

Hastaların tercih ettiği yol olmasa da, bu yollarla arka segmentte topikal ve sistemik uygulamanın yetersizliğinin giderilmesi için kullanılır. Perioküler yol, subkonjunktival, subtenonlar, retrobulbar ve peribulbar uygulamasını içerir ve intravitreal yola kıyasla daha az

invazivtir. Subkonjunktival enjeksiyonda, suda çözünür ilaçların geçirgenliği için hız sınırlayıcı bir bariyer olan konjonktival epitel bariyer geçilerek ilaç uygulanır. İlaç solüsyonları, skleraya yakın bir yere uygulanır ve yüksek retinal ve vitreal konsantrasyonlar elde edilir. Perioküler enjeksiyonların aksine, intravitreal enjeksiyon, moleküller doğrudan vitreusa uygulandığından farklı avantajlar sunar. Diğer yollardan farklı olarak, intravitreal enjeksiyon vitreus ve retina için daha yüksek ilaç konsantrasyonları sağlanır (61).

Tablo 4. Göze ilaç uygulama yollarının bazı avantaj ve dezavantajları (69)

Uygulama Yolu	Avantajları	Dezavantajları
Topikal	İlaç salımı için uygun ve hasta uyuncunun iyi olduğu uygulama yolu	Arka segment için yetersiz salım, nazolakrimal drenaj ve ilacın oküler yüzeyde kısa temas süresi
Sistemik	Göz damlasına göre fazla miktarda salım yapmak için uygulama yolu	İlacın retinada kötü biyoyararlanımı ve sistemik absorbsiyon
İntravitreal	İlaç doğrudan enjeksiyonlar ve implantlar şeklinde vitröz ve retinaya uygulama yolu	Katarakt, endoftalmi ve kanama gibi sorunlar yan etki olarak ortaya çıkabilir
Subkonjunktival	Gözün hem ön hem de arka segmentine ilaç salımını sağlar ve depo formülasyonlarının kullanılmasıda elverişli uygulama yolu	Konjunktival ve koroidal dolaşım bu uygulama için kısıtlayıcı föktör olabilir
Retrobulber	Arka segment hastalıklarının tedavisi için ilaç verilir, yüksek dozda anestezik ilaç uygulamasına imkan sağlayan uygulama	Kanama, göz küresiperforasyonu ve solunum durması gibi sorunlara yol açabilir
İntrakameral	Ön segmentte yüksek ilaç konsantrasyonu ile göz damlalarının kullanılmasına gerek duyulmaz ve topikal steroid tedavisinde kornea ve sistemik yan etkileri azaltan uygulama	Toksik arka segment sendromuna sebep olabilir ve toksik endotel hücre yıkımı sendromuna sebep olabilir

Tablo 4 devam. Göze ilaç uygulama yollarının bazı avantaj ve dezavantajları (69)

Subtenon	Vitröz hümörde yüksek ilaç konsantrasyonu sağlar	Subkonjunktival kanama ve kemozis bu uygulama için kasıtlayıcı faktördür

GÖZE ETKİN MADDE SALIMI, KİNETİĞİ VE BİYOYARARLANIMI

Etkin maddeler oküler dokulara, kornea veya kornea dışı yoldan girerler. Korneal yol, inflamasyon, enfeksiyon ve glokom gibi atrerior segmenti etkileyen hastalıklarda önemli rol oynar. Kornea epiteli hız sınırlayıcı bariyer olarak davranır. Pasterior segmentte ise kan-retina bariyeri, etkin maddenin kandan çıkıp retina gibi dokulara ulaşmasını engeller. Bu bariyer, retina pigment epiteli ve retinal duvarlardan oluşur.

Gözyaşından diğer dokulara etkin madde taşınması başlıca iki faktörden etkilenir; taşıyıcı sistemin kornea ile temas zamanı ve korneanın etkin madde geçirgenliği. Korneadan etkin madde, pasif difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon veya aktif taşıma ile geçer. Pasif difüzyon taşıyıcılara bağlı değildir. Daha çok partisyonu belirleyen fizikokimyasal özelliklerden etkilenir. Kornea çok sıkı bir bariyerdir ve geçirgenlik hızı 10^{-7}-10^{-5} cm/sn'dir. Topikal uygulanan etkin maddelerin biyoyararlanımı küçük moleküller için bile %5'i geçemez. Ancak, yüksek lipofilik maddeler (log P>3); log P'si (lipit-su partisyon katsayısı) 2-3 olan maddelerden daha zor geçerler. Çünkü lipofilik epitelden geçişleri, hidrofilik stromaya gelince yavaşlar. Kornea geçirgenliği, pasif difüzyon ve aktif taşımanın bileşimidir. Aktif taşıma özellikle hidrofilik bileşiklerde önemli rol oynar (70).

Göz çalışmalarının insanda yürütülmesi zordur. Bu yüzden tavşan ve domuzlarda *in vivo* çalışmalar yürütülmektedir. Bu modellerin insana benzer yönleri olduğu kadar, göz kırpma sıkşığı gibi çeşitli farklılıkları da vardır. Siklosporin A ile yapılan bir çalışmada insan ile tavşan arasında kornea geçirgenliği açısından bir farklılık gözlenmemiştir (71).

Göze uygulanan etkin maddelerin tek ve iki kompartmanlı olmak üzere iki temel kinetik modeli olduğu saptanmıştır. Tek kompartmanlı modelde uzun süreli tayinlerde, bir takım sapmalar gözlenmiştir. Bu modelde etkin madde korneaya çok hızlı bir şekilde penetre oluyor gibi gözükür. Gözün iki temel kompartmandan oluştuğu kabul edilen modele göre, ilk kompartman prekorneal alandır, ikinici kompartman ise aköz hümördür. Göze uygulanan bir etkin madde önce gözyaşı ile karşılaşmakta daha sonra korneadan penetre olmaktadır. Tavşan gözünde yapılan bir çalışmada, pilokarpinin prekorneal alandaki davranışı aşağıdaki gibi açıklanmıştır:

1. Korneal alan
2. Prekorneal alan
    - Drenaj
    - Normal gözyaşı devri
    - İlaç-protein etkileşimi
    - Konjonktival emilim
    - Gözyaşı buharlaşması

Bu faktörler, etkin maddelerin gözdeki biyoyararlanımını etkileyip, korneadan emilim ile yarışmaktadırlar. İlacın korneaya geçişi, prekorneal konsantrasyon, korneadaki konsantrasyonun altına düştüğünde kesilmektedir. Drenaj, hem dozu kontrol etmekte hem de kornea epitelinde etkin maddenin tepe konsantrasyona ulaşmasına engel olmaktadır. Yapılan çalışmalar etkin madde uygulanmasını takip eden ilk beş dakikanın çok önemli olduğunu göstermiştir (72).

Göz preparatlarında biyoyararlanım, etkin maddenin emilim hız ve derecesine bağlıdır ve bunu dört ana faktör belirler;

1. Uygulamaya ilişkin etkenler
2. Fizyolojik etkenler
3. Etkin maddeye ait etkenler
4. Formülasyona ait etkenler

Uygulamaya İlişkin Etkenler

Kısa aralıklarla çok uygulamanın, gözyaşı filmindeki etkin etkin madde konsantrasyonunu arttırmasına rağmen, lakrimal drenajla ortamdan uzaklaştırılıyor olması avantajını ortadan kaldırmaktadır. Alışılmış göz preparatları olan çözelti, süspansiyon ve merhemler göze uygulandığında göz, savunma mekanizmalarını harekete geçirerek kendisini korumaya çalışmaktadır. İnsan gözünün normal koşullarda 10 µL sıvı tutabildiği belirtilmiştir. Genel olarak göz damlalarında kullanılan damlalık, ortama 50 ila 75 µL sıvı damlatmaktadır. Oysa gözün, gözyaşı hacminden fazla sıvı tutma yeteneği sınırlıdır. Böylece gözyaşındaki etkin madde konsantrasyonunu, göze damlatılan miktarın ortalama dörtte birine düşmekte ve etkin maddenin önemli bir kısmı gözden atılmaktadır. Ayrıca, merhem tipi bir preparat uygulanıyorsa görmede bulanıklık olmaktadır. Sonuç olarak, göze topikal olarak uygulanan maddelerden % 1-10 civarında bir biyoyararlanım sağlanır ki, bu oldukça düşük bir seviyedir ve etkin tedavi

için hasta sık etkin madde uygulamak zorunda kalmaktadır. Hasta uyuncu açısından zor olan bu durum, aynı zamanda yan ve toksik etkilerin de ortaya çıkmaya sebep olmaktadır (73, 74).

Fizyolojik Etkenler

İnsanda gözyaşı sıvısı 6 dakika bir yenilenmektedir. İnflamasyon, ülserasyon, yanıklar gibi çeşitli travmalar korneanın bütünlüğünü bozar. Bunun sonucu olarak göz, mikroorganizmalara karşı savunmasız bir hal almakta ve bütünlüğü bozulmuş korneadan ekin maddelerin geçişleri de değişmektedir.

Proteine bağlanan etkin maddeler; protein-etkin madde kompleksin büyüklüğü sebebiyle kornea epitelinden geçememekte ve böylelikle emilimleri de gerçekleşmemektedir.

Bazı etkin maddeler de prekorneal alanda metabolizasyona uğrayabilmektedirler. Diğer bazı biyolojik sıvılarda olduğu gibi gözyaşında da lizozomal enzimler bulunur ve etkin maddenin parçalanmasına sebep olabilmektedirler (75).

Etkin Maddeye Ait Etkenler

Çözünürlük ve partisyon katsayısı: Gözden emilimi etkileyen en önemli faktörlerden birinin etkin maddenin yağda veya sudaki çözünürlüğü olduğu bilinmektedir. Yağdaki çözünürlüğü fazla olan bir madde için stroma, suda çözünürlüğü fazla bir madde için ise kornea epiteli, hız sınırlayıcı bir membran gibi davranmaktadır. Dolayısıyla lipofilik olan maddeler, kornea epitelini kolayca geçmekte ancak hidrofilik olanlara karşı direnç gözlenmektedir. Kısmen lipofilik maddelere karşı kornea epiteli %50, stroma ve endotelyum %25 direnç göstermektedir (75).

Molekül ağırlığı ve etkin maddenin kimyasal şekli: Genel olarak 500 g/mol'den büyük bileşiklerin gözden az absorplandığı belirlenmiştir. Molekül ağırlığı daha büyük olanların, biyoyararlanım üzerinde önemli etkilerinin olmadığı belirtilmiştir. Kimyasal şeklin değişmesi örneğin baz, tuz veya ester şekline dönüştürülmesi çözünürlüğü ve dolayısıyla biyoyararlanımı etkilemektedir. Ön ilaç yaklaşımı bu prensibi temel almaktadır (76).

Formülasyona bağlı etkenler: Göz preparatlarının geniş bir pH aralığında hazırlanmaları mümkün değildir. Fizyolojik pH değerlerinden uzaklaştıkça gözyaşı salgılanması artmakta ve etkin madde kaybı görülmektedir. Bütün göz preparatlarının pH'sının

nötre yakın olması istenmektedir. pH aside doğru kayarsa gözyaşı salgısı artmaktadır. pH 7,4' de pek çok zayıf bazik etkin madde non-iyonize haldedir, dolayısıyla emilimleri fazladır.

Formülasyondaki yardımcı maddeler, gözde kalış süresinin arttırarak veya kimyasal modifikasyonlara sebep olarak ya da polar olmayan etkin maddelerin yüzey gerilimlerini düşürerek daha iyi absorplanmasını sağlamaktadırlar. Bu yardımcı maddelerin bir kısmı kornea epitelinin bütünlüğünü de etkilemektedir. Oküler formülasyonlarda istenilen özellikler (77);

1. Etkin maddenin gözde kalış süresini uzataraki etkisini arttırmak ve istenen biyoyararlanımı sağlamak
2. Oküler doku ve sıvılardaki etkin madde konsantrasyonunda büyük oynamaları önlemek
3. Yan etkileri engellemek
4. Uygulama sayısını azaltmak
5. Hastaya kolaylık sağlamak ve yaşam kalitesini arttırmaktadır.

GÖZE TOPİKAL İLAÇ HEDEFLENDİRİLMESİ

Göze topikal ilaç hedeflendirilmesi, çeşitli göz hastalıklarının tedavisinde oftalmik ilaçların uygulanması için uygun bir zemin ayarlar ve bu nedenle topikal uygulama en popüler ve erişilebilir uygulama yoludur. Göze topikal ilaç uygulamasının birçok avantajı olmasına rağmen, ilaç hedeflendirilmesinde, gözü korumak için mevcut olan göze ilaçlarının girişini sınırlayan birçok anatomik, fizyolojik ve biyolojik faktörler nedeniyle düşük biyoyararlanım dezavantajı bulunmaktadır. Göz kapasitesi ancak sınırlı hacimde kalabilir. Hem normal olarak üretilen hem de harici olarak verilen fazla sıvı, göz tarafından hızla boşaltılır (78).

Genel olarak hasta uyuncu için, tercih edilen topikal oküler ilaç uygulama sistemlerinin bulanık görme ve tahrişe neden olmadan göz damlası formunda olabileceği düşünülmektedir (79). Göz damlası gibi geleneksel oküler ilaç uygulama sistemlerinin biyoyararlanımı çok zayıftır çünkü göz, gözün hedef bölgesi içindeki etkin bir ilaç konsantrasyonunun elde edilmesini zorlaştıran bir dizi karmaşık savunma mekanizması tarafından korunmaktadır. Göze uygulanan ilaç formülasyonlarının viskozitesinin artırılmasıyla, verimsiz absorpsiyonun giderilmesi sağlanabilir. Artan viskozite drenaj oranını düşürebilir, prekorneal alanda kalma süresini uzatabilir ve gözdeki absorbsiyonu artırabilir (80).

İlaç geçişi açısından, gözün dört hedef bölgeye sahip olduğu kabul edilebilir (78);

- Gözün ön-göz yapıları, örneğin konjunktiva ve göz kapakları

- Kornea
- Ön ve arka kamarayla ilgili dokular
- Vitröz boşluk

Göz önüne topikal uygulama ön oküler, kornea ve anterior / posterior bölgelere farmakolojik ajanların verilmesinde kullanılabilmektedir. Gözün ön yapılarının bozukluklarını tedavi etmek için topikal oküler uygulama, diğer ilaç uygulama yollarına göre dört ana avantaj sunmaktadır:

- İlaç etkileri lokalizedir ve sistemik dolaşıma daha az ilaç geçişi olur
- Sistemik uygulama ile ulaşılması zor olan göz içine ilaç hedeflendirilmesini kolaylaştırır
- Hepatik ilk geçiş metabolizmasını önler
- Nispeten kullanışlı, basit ve ağrısız bir yöntemdir.

Göze topikal ilaç uygulamaları konjonktivadan emilim yüzünden noninvaziv bir yol olarak kabul edilir çünkü konjunktiva içine giren ilaç göz içi segmentlerden ziyade genel kan dolaşımına erişmektedir. Konjunktivaya ek olarak, nazolakrimal kanalın ilacın sistemik emilimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Sistemik absorpsiyon, posterior segment hedeflendirilmesi için bir engel oluşturmadığı için elde edilen intraoküler ilaç miktarı genellikle etkin konsantrasyonun altında olmaktadır (81).

OKÜLER YÜZEYE UYGULANAN DOZAJ FORMLARI

Çözeltiler

Oftalmik çözeltiler göze damlatma ile uygulanan steril çözeltilerdir. Aynı zamanda bu dozaj formlarında antimikrobiyal ajan ihtiyacı, ozmolarite, tamponlama, viskozite ve uygun ambalajlama gibi diğer farmasötik faktörler dikkatle incelenmektedir. Polimeler çözeltiler, etkin madde çözeltisine polimer ilave edilince çözeltinin viskozitesi artar bundan dolayı biyolojik membranlardan geçemezler ve gözde uzun süre kalabildikleri için etkin maddenin kornea ile temas zamanını uzatarak biyoyararlanımını arttırırlar. Polimerin cinsine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişik çözelti tipi sistemler hazırlanabilir. Bunlar başlıca, viskoz çözeltiler, biyoadezif hidrojeller ve in situ jelleşen sistemlerdir (82).

Emülsiyonlar

Oküler emülsiyonlar genellikle etkin maddenin bir yağ fazında çözülmesi ya da dağıtılması, yüzey etkin madde eklenmesi ve su ile karıştırılarak su içinde yağ emülsiyonu

oluşturulmasıyla hazırlanmaktadır. Etkin madde emülsiyon üretim sürecinin başlangıcında çözünebildiği faza ilave edilebilir veya emülsiyon uygun bir dispersiyon işlemi ile hazırlandıktan sonra formülasyona eklenebilmektedir (83).

Süspansiyonlar

Etkin maddenin istenen çözücü içerisinde çözünmediği veya çözeltisinin stabil olmadığı durumda oftalmik süspansiyonlar kullanılmaktadır. Ancak süspansiyonların bir dezavantajı ilacın konsantrasyonu, çözücüde dağıldığı için uygun dozlama yapılamaması durumu söz konusu olabilmektedir. Süpansiyonlarda ki çözünmeyen etkin maddenin, kornea tahrişine veya çizilmesine neden olmaması için mikronize bir formda olması gerekmektedir. Süspansiyonlar, yaygın olarak, uygun bir sulu çözücüde mikronize ilaç tozu (10 µm'den küçük çapta) dağıtılarak formüle edilmektedir. Çapı 10 µm üzerinde partikül boyutuna sahip süspansiyonlar göze uygulandıktan sonra gözde yabancı bir vücut hissi ile sonuçlanarak refleks gözyaşı oluşumuna, göz dokusunda hasara neden olabilir. Parçacık boyutunda azalma genel olarak hasta konforunu ve süspansiyon formülasyonlarının kabul edilebilirliğini arttırır (83).

Merhemler

Oftalmik merhemler birçok oftalmik çözeltiye kıyasla ilacın göz yüzeyiyle temas süresini uzatmaktır, fakat oftalmik merhemlerin görmede bulanıklığa ve göz kapaklarının matlaştırılmasına neden olan dezavantajları bulunmaktadır. Oftalmik merhemler kısmen sterilize edilebilirler veya alternatif olarak aseptik ortamda steril içerik maddelerden üretilmeleri gerekir. Uygun bir membran ya da kuru ısıyla sterilizasyon yoluyla filtrasyon sıklıkla kullanılır (84).

Jeller

Oftalmik jeller, etkin maddenin göze lokal olarak verilmesini sağlayan mukoadhezif polimerlerden oluşur. Bu polimerler, ilacın biyolojik dokularla temas süresini uzatabilir ve böylece oküler biyoyararlanımı geliştirebilir. Polimerin seçimi, ilacın dozaj formundan salınım kinetiğinde kritik bir rol oynamaktadır. Karboksimetilselüloz, karbopol, polikarbofil ve sodyum aljinat örnek olarak verilebilir (83).

İnsertler

Oftalmik insertler, konjonktival fornikse, lakrimal punktuma veya korneaya yerleştirilen uygun boyut ve şekle sahip katı dozaj formlarıdır. Bu katı dozaj formu aşınabilir (çözünen) ve aşınamayan (çözünmez) olarak sınıflandırılabilir. İnsertler göze uygulanan ilaç dozunun doğru bir şekilde verilmesini sağlar ve gözdeki biyoyararlanımı önemli ölçüde artırabilmektedir (85).

Kontakt Lensler

Geleneksel olarak kullanılan kontakt lensler, birkaç saat boyunca bir ilaç salınımı sağlar. Konvansiyonel hidrojel yumuşak kontakt lensler, ilacı absorbe edebilme yeteneğine sahiptir ve ilacın lakrimal sıvı içine geçişiyle ya da konjonktiva yoluyla absorbsiyonunu en aza indirir (86).

İmplantlar

İmplantlar, özellikle posteriordaki oküler sıvılar ve dokulardaki ilaçların yayılımını uzatmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. İmplantlar parçalanma özelliklerine göre biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak parçalanmaz olmak üzere genel olarak iki kategoriye ayrılır (86).

OKÜLER YÜZEYE UYGULANAN YENİLİKÇİ DOZAJ FORMLARI

Hidrojeller

Hidrojeller hazırlanmasında polimerlerin kullanıldığı sistemlerdir. Polivinil alkol, polivinil pirolidon, polietilen glikol (PEG), poliakrilik asit gibi sentetik polimerler fizyolojik uyumluluğu ve fizikokimyasal özelliklerinden ötürü viskozite arttırıcı maddeler olarak kullanılmaktadır. Hazırlanan formülasyonun göze kolay uygulanması ve viskoelastik özelliklerinin bir sonucu olarak gözde uzun süreli kalması sağlanmaktadır. Bu sistemler in situ jelleşen sistemler olarak adlandırılır. İn situ jeller göze uygulandığında, göz ortamındaki sıcaklık, pH, iyonik içerik ve gözyaşı sıvısı gibi dış etkenlere karşı duyarlı olan polimerlerin konformasyonunda değişiklik gerçekleşmektedir, bunun sonucu olarak formülasyonun viskozitesi değişmektedir. Ancak, mukozaya yapışan formülasyonların bulanık görme ve hoş olmayan yapışma hissi gibi dezavantajları bulunmaktadır ve hastaların tedaviye uyumu zor olabilmektedir (82).

Kolloidal Sistemler

Kolloidal sistem dozaj formları arasında, lipozomlar, nanoparçacıklar, mikroemülsiyonlar, nanoemülsiyonlar vb. bulunmaktadır. Kolloidal dozaj formlarının, ilacın hedeflenen bölgede sürdürülebilir ve kontrollü salımının sağlaması, ilacın uygulama sıklığının azaltması ve kan-oküler bariyerlerinin üstesinden gelme gibi avantajları bulunmaktadır. İlaçların bu kolloidal taşıyıcılarla kapsüllenmesi hedeflenen bölgede geçirgenliği önemli ölçüde arttırmaktadır ve oküler enzimler tarafından parçalanmayı önlemektedir (82, 86).

Nanosüspansiyonlar, yüzey etkin maddeler tarafından stabilize edilmiş uygun bir dispersiyon ortamı içine asılı suda az çözünür ilaçtan oluşan mikron altı koloidal sistemlerdir. İlacın çözünürlüğünü arttırma ve dolayısıyla biyoyararlanımının arttırılmasında etkilidirler. Nanosüspensiyonların içerisinde bulunan nanoparçacıkların yüzeyindeki yük, korneaya yapışmasını kolaylaştırır (86). Nanopartiküller, çeşitli biyolojik olarak parçalanabilir/parçalanmayan polimerler, lipitler, fosfolipitler ya da metaller içeren, 1 μm'den daha düşük bir çapa sahip parçacıklardır (86).

Lipozomlar, doğal toksik olmayan fosfolipitler ve kolesterolden üretilebilen küçük suni veziküller olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, boyutları, amfifilik özellikleri ve biyouyumluluk özelliklerinden ötürü, oküler ilaç hedeflendirmede gelecek vaat eden sistemlerdir (87). Niozomlar, topikal hedeflendirilmede diğer veziküler sistemlere göre daha çok tercih edilmektedir, çünkü lipozomlarla karşılaştırıldığında kimyasal olarak daha kararlıdır. Hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçları taşıyabilir aynı zamanda iyonik olmadıkları için düşük toksisiteye sahiptirler (86).

Dendrimerler, makromoleküler bileşikler olup iç çekirdek etrafında bir dizi daldan oluşmaktadır. Nanometre boyut aralıkları, hazırlanma ve işlevsellik kolaylığı ve biyolojik tanıma işlemleri için yüzey gruplarının birden fazla kopyasını görüntüleme yeteneği nedeniyle ilaç hedeflendirmede kullanılmaktadır (88). Tablo 5 ve Şekil 9'da göze uygulanan oküler sistemlerin avantajları ve dezavantajları gösterilmiştir.

Tablo 5. Oküler sistemlerin avantajları ve dezavantajları (56)

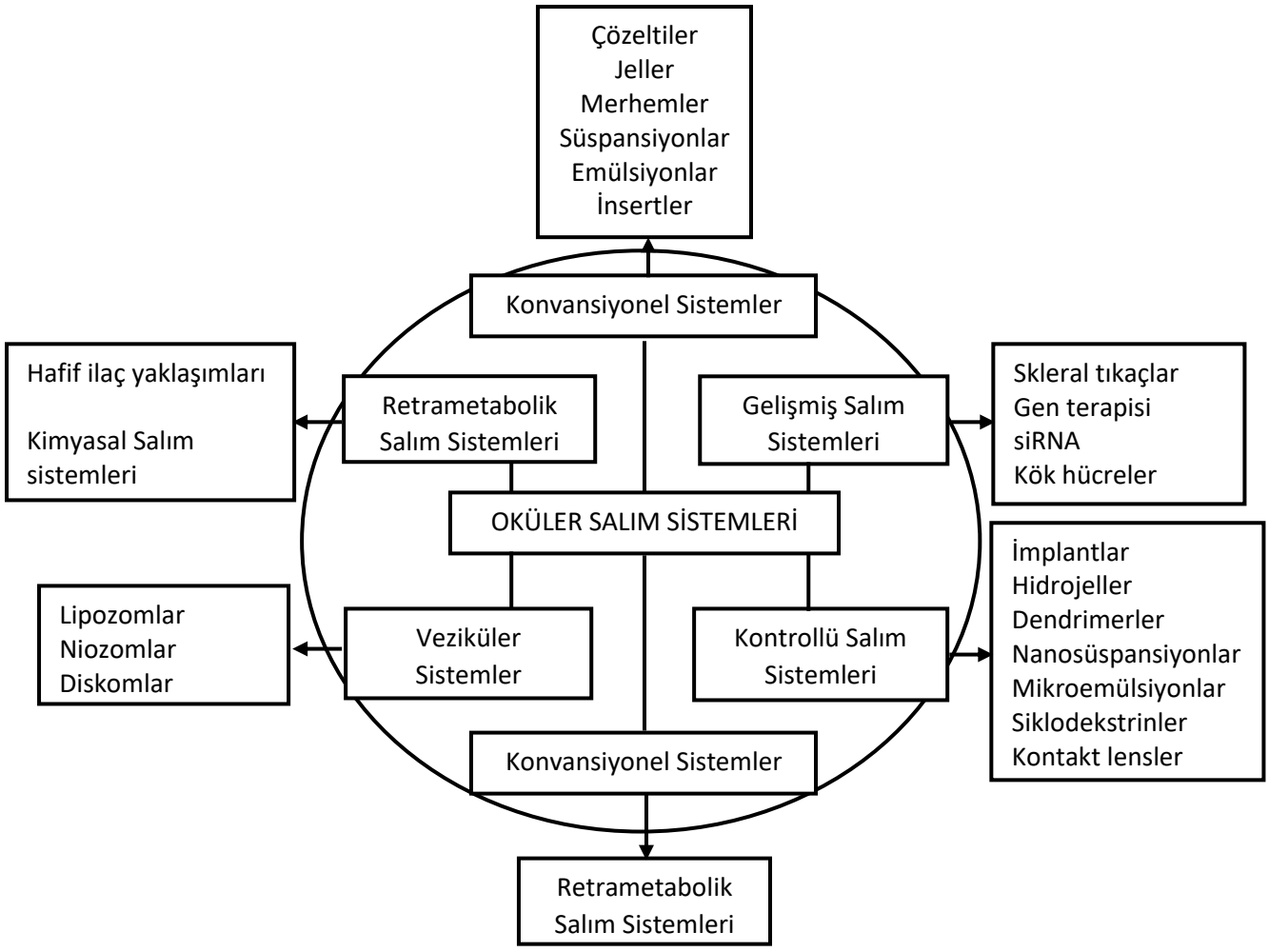
Oküler Sistemler	Avantajları	Dezavantajları
Çözeltiler	Ekonomik ve hasta uyuncu açısından uygun	Düşük drenaj ve biyoyararlanım, gözyaşı ile ilaç kaybı ve sık ilaç kullanımı

Tablo 5 devam. Oküler sistemlerin avantajları ve dezavantajları (56)

Süspansiyonlar	Göz yüzeyinde uzun temas süresi ve hasta uyuncu açısından uygun	Partikül boyutundan dolayı irritasyon sebebi ve ilaç kaybı
Merhemler	Uzun temas süresi, gözyaşı dilüsyonu olmaması, iyi stabilite ve biyoyararlanım	Düşük hasta uyunca ve bulanık görme
İnsertler	Kullanım rahatlığı ve düşük doz sıklığı ile uzun süreli ilaç salımı	İnsertleri kullanırken yerleştirilmesi ve çıkarılması için özel beceri gerektirmesi
İmplanlar	Biyoçözünür özellikte olması ve toksik olmaması	Cerrahi uygulama
Lipozamlar	Uygun stabilite ve biyoyararlanım, kontrollü ilaç salımı ve düşük dozlama sıklığı	Stabilite problemleri, tekrarlanabilir olmaması, hızlı atılım ve konjunktival hücrelerden alım
Niozomlar	Uygun stabilite, kontrollü ilaç salımı ve düşük dozlama sıklığı	Konjunktival hücrelerden alındığı için biyoyararlanımı düşük
Nanopartiküller	Yüksek oranda stabilite ve biyoyararlanım, küçük boyut, uzun raf ömrü ve düşük dozlama sıklığı	Partikül kontaminasyonu
Mikropartiküller	Uygun stabilite ve biyoyararlanım ve düşük dozlama sıklığı	İrritasyon oluşumu ve partikül büyüklüğü
Penetrasyon arttırıcılar	İlaçların penetrasyonunu teşvik etmek ve uygun biyoyararlanım	Toksik etki ve irritasyon oluşumu ve yüksek konsantrasyon
Ön ilaçlar	Uzun süreli alıkonma süresi ve düşük dozlama sıklığı	Metabolizma problemleri
Hidrojeller	Göz yüzeyinde uzun temas süresi ve biyoyararlanımda artış	Isı, pH ve iyonik yük yarafından etkilenmesi
Dendrimerler	Göz yüzeyinde uzun temas süresi, küçük boyut, düşük dozlama sıklığı ve iyileştirilmiş biyoyararlanım	Bulanık görüş ve ekonomi

Tablo 5 devam. Oküler sistemlerin avantajları ve dezavantajları (56)

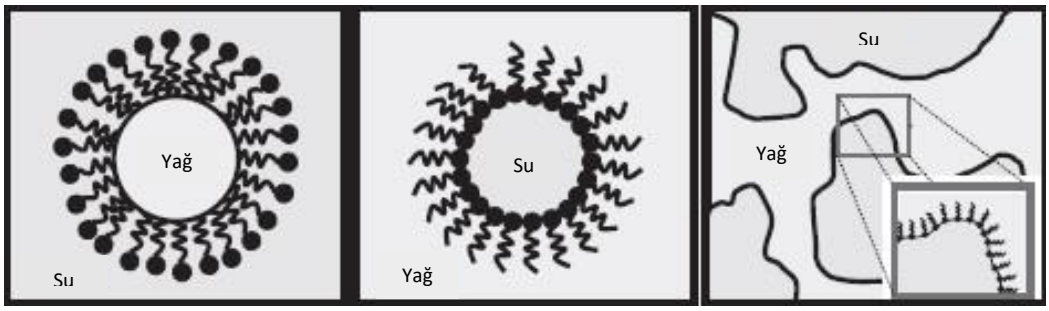
Mikroemülsiyonlar	İyileştirilmiş çözünürlük ve biyoyararlanım, uygun stabilite ve düşük dozlama sıklığı	Yüksek konsantrasyonda surfaktandan dolayı toksisite ve surfaktan ve organik faz seçiminin stabiliteyi etkilemesi
Nanoemülsiyonlar	İyileştirilmiş çözünürlük ve biyoyararlanım, uygun stabilite ve göz yüzeyinde uzun temas süresi	Az çözünür ilaçlar için kullanılması



Şekil 9. Oküler tedavi için kullanılan farklı salım sistemleri

MİKROEMÜLSİYONLAR

Mikroemülsiyon terimi ilk olarak 1940'lı yıllarda Hoar tarafından kullanılmıştır. Daha sonra J.H. Schulman 1959 senesinde yaptığı bir çalışmada sütlü bir emülsiyonu hekzanol ile titre ederek tek fazlı sistem elde etmiş ve bu sistem için 'mikroemülsiyon' terimini kullanımıştır (89). Mikroemülsiyonlar yağ, su ve yüzey etkin madde (YEM) ve bazı mikroemülsiyonlarda ayrıca yardımcı yüzey etkin madde (YYEM) kullanılarak oluşan optik olarak izotropik ve termodinamik olarak kararlı kolloidal sistemlerdir. Mikroemülsiyonların yapı olarak üç farklı türü vardır (Şekil 10); yağ içinde su (S/Y), su içinde yağ (Y/S) ve sürekli/geçişli yapılardır (90).



Şekil 10. Mikroemülsiyonların üç farklı tipte mikro gösterimi (90)

Mikroemülsiyonlar küçük damlacık boyutuna sahip, termodinamik olarak stabil, saydam ve etkin madde biyoyararlanımını arttıran sistelerdir. Çözünürlüğü az biyoyararlanım problemi olan etkin maddelerin emilimini ve klinik etkilerini arttırarak toksisite problemlerinin de üstesinden gelir. Endüstriyel üretim ve sterilizasyonu basit ve ucuzdur, kullanılan lipofilik faza bağlı olan çözünür lipofilik ilaçlar için kolaylık sağlayan mikroemülsiyonlar etkin madde çözünürlüğünü arttırma, hazırlama ve uygulama kolaylıkları ve uzun raf ömürleri ile tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Mikroemülsiyonlar düşük viskoziteli, damlacık boyutu misel yapıdan daha büyük ve iç faz damlacıklarının yarıçapı 10 ve 100 nm arasında değişmektedir. Mikroemülsiyon hazırlarken kullanılacak maddelerin belirlendikten sonra görsel gözlem ve üçgen faz diyagramı yardımıyla su fazı, yağ fazı, YEM ve YYEM karışımları ile belirlenebilir.

YEM ve YYEM sisteme birlikte eklenmesi ile birlikte ara yüzey geriliminin düşük olması sağlanır. YYEM kullanılmadan oluşan mikroemülsiyonlara kendiliğinden emülsifiye olan (self-emulsifying) mikroemülsiyonlar denir. Kendiliğinden mikroemülsiyon oluşturan sistemler ilaç, yağ ve yüzey etkin maddeden oluşan; çoğunlukla bir veya birden fazla yardımcı yüzey etkin madde içeren biyouyumlu sistemlerdir. Genellikle bu sistemlerde etkin maddenin lipofilik özelliği sulu ve yağlı fazla arasında dağılmakta olup dağılım katsayısı salım hızına etki etmektedir. Kendiliğinden mikro/nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemleri, çözünürlük

ve biyoyararlanım sorunu olan ilaçlarda ilacın çözünürlüğünün ve absorpsiyonunun iyileştirilmesinde etkili sistemlerdir. Hidrofobik yapıdaki ilaçlar bu sistemler içinde çözünebilirler. Mikroemülsiyonlar sıvı sistemlerde olması istenen uzun süre bozulmadan kalabilme (termodinamik kararlılık), yüzeyler arası gerilimin az olması ve neredeyse kendiliğinden oluşabilme, düşük viskoziteye sahip olmalarından dolayı Newtonion akış özelliği göstermeleri, yüksek çözündürme kapasitesi ve küçük damlacık boyutu ile tüm olası gereksinimleri sağlamaktadır (90, 91).

Mikroemülsiyonların Yapısı

Organik faz: Mikroemülsiyonlar için yağ seçimi, hem mikroemülsiyon stabilitesini önemli ölçüde etkilediği hem de verilmesi gereken büyük ölçüdeki lipofilik ilacı çözündürmek için gerekli olduğu için önemlidir. Bununla birlikte genellikle her iki koşulu da mükemmel bir şekilde karşılayan basit bir yağ seçimi yoktur. Organik faz sadece lipolifik ilacı çözündürmekle kalmamaktadır, aynı zamanda lipofilik ilacın hedeflenen bölgeden emilmesini de arttırdığı çeşitli avantajlara sahiptir. Tipik olarak aşırı uzun hidrokarbon zincirlerine sahip yapılar mikroemülsiyonlar oluşumuna engel olurlar. Çünkü bu zincir yapın arayüzey filmine nüfuz etmesini engeller. Daha kısa zincirli yağlar yüzey etkin maddelerin hidrofobik kuyruklarının daha derinine nüfuz edebilir ve böylece mikroemülsiyon oluşumu için gerekli olan daha stabil bir arayüzey filmi oluşturur. Fakat organik faz ile çözünme kapasitesi zincirin uzunluğu ile artar. Bu nedenle belirli bir yüzey etkin madde ve ilaç çifti için mikroemülsiyon oluşumunu sağlamada en uygun yağı seçmek dikkatli bir optimizasyon gerektirir. Stabilite ve çözünme sorunlarına ek olarak, yağların oküler toksisitesinin de formülasyon aşamasında dikkatlice değerlendirilmesi gerekir. Yine de bazı durumlarda, yağ fazı etkin bileşen olarak görev yapabilir.

İlaçların daha iyi çözünürlüğüne bağlı olarak polar olmayan yağlar yerine orta ya da uzun zincirli trigliseritler (MCT, LCT) gibi polar yağlar da tercih edilir. Ek olarak, organik fazlar çok kutuplu olmamalıdır çünkü mikroemülsiyon oluşumunu önlerler. LCT'den daha fazla suda çözünür olan MCT, sıklıkla yüksek konsantrasyonlarda lipofilik ilaçların çözünmesini sağladıkları için tercih edilir. En sık kullanılan dış fazlar, soya yağı, hintyağı yağı (Evitts ve diğerleri, 1991), yağ asitlerinin %95'inin 8-10 karbon atomundan yapıldığı trigliseritler, Migliyol 812s (gliserol denemeleri, kaprilikler ve kaprilik asitler), izopropil miristat, oleik asit gibi yağ asitleri ve sakkarozun mono-, di- veya tri-palmitatları gibi sakkaroz esterleri bulunur. Bu yardımcı maddeler göz tarafından iyi tolere edildiklerinden, potansiyel olarak tahriş edici

maddelerle kirlenmeyi önlemek için saflık derecelerinin yüksek olması gerekir (89, 92). Tablo 6'da oftalmik preparatlarda tercih edilen yağ grupları gösterilmiştir.

Tablo 6. Oftalmik Preparatlarda Tercih Edilen Yağ Grupları (93)

Yağlar	**Örnekler**
Yağ asitleri esterleri	Etil oleat, izopropil meristat ve izopropil pilmitat
Tekli doymamış yağ asitleri	Oleik asit
Doymuş Yağ asitleri / Düşük molekül ağırlıklı trigliseritler	Kaprik-Kaprilik trigliserit, oktanoik asit

Sulu faz: Su, mikroemülsiyon oluşumunda temel bileşendir. Y/S tipi mikroemülsiyonlarda, sürekli faz olarak işlev görür ve yağla olan karışmazlığının aksine YEM ve YYEM'le hidrojen bağı yapmasıyla yağ damlacıklarının oluşumu gerçekleşir ve su içinde yağ tipi mikroemülsiyon oluşturulur.

Sulu faz tamponlar, mikroemülsiyon sistemlerini hazırlama sırasındaki zorlukları en aza indirmek ve ayrıca mikroemülsiyon stabilitesini en üst seviyeye çıkarmak için seçilmelidir. Tipik olarak mikroemülsiyonlar antibakteriyel ve izotonik ajanlar gibi birkaç katkı maddesi içermelidir. Mikroemülsiyonların mevcut alanını etkileyebilir ve bu nedenle mikroemülsiyonların diğer bileşenlerinin varlığında incelenmelidirler. Tuzluluk, iyonik yüzey etkin maddeler eklendiğinde faz diyagramlarını etkiler ve iyonik olmayan yüzey etkin maddelerin faz inversiyon sıcaklığını (PIT) azaltır. Mikroemülsiyonların hazırlanması, eğer PIT çalışma koşullarına yakınsa sıcaklığa çok duyarlıdır. Fosfolipitlerin ve trigliseritlerin hidrolizini, mikroemülsiyonun pH'ını azaltabilecek yağ asitlerine indirgemek için başlangıç pH'sinin 7-8'de ayarlanması da önemlidir. Genellikle göz damlası formülasyonlarında kullanılan koruyucular, mikroemülsiyonlara dahil edilemez. Yüzey etkin maddelerle etkileşime girmemeli ve komplekslerle sonuçlanmamalı, bazlardaki bakteri aktivitesini önemli ölçüde azaltacak olan nanodamlacıklarda absorbe edilmemelidir. % 0.01-0.2 konsantrasyonlarında tiyomersal ve klorobütanol kullanılabilir; kombinasyonları özelliklerini arttırır (92).

Yüzey etkin madde (YEM): YEM'ler sulu ve yağlı fazlar arasında gerilimi azaltarak emülsiyonların oluşmasını sağlarlar. YEM'in tercih edilen adsorpsiyonu, amfifilik doğası nedeniyle arayüzeyin fizikokimyasal özelliklerinde değişiklik yapılmasını sağlar. YEM

konsantrasyonu emülsiyonlarda ağırlıkça %0,1 iken, sulu ve yağlı faz arasındaki arayüzey alanın artmasından dolayı mikroemülsiyonlarda en %10'dur. Bu yüksek YEM konsantrasyonu oküler toksisiteye neden olabilir. Bu nedenle YEM miktarını azaltmak ve kendiliğinden emülsifiye olmayan bir hazırlama işleme seçmek daha iyi olabilir. Genellikle oküler uygulama için iyonik YEM'ler kullanılmayacak kadar toksiktir. Dolayısıyla iyonik olmayan YEM'ler tercih edilmelidir. Bu YEM'ler eter fonksiyonel gruplarının varlığı nedeniyle suda kolayca çözünür. Mikroemülsiyomların hazırlanmasında en çok kullanılan YEM'ler, poloksamerler, polisorbatlar, polietilen glikol ve tiloksapol (tylaxapol)'dür.

PEG arasında en düşük viskozitesinden dolayı PEG 200 tercih edilir. Poloksamerlere gelince, polioksietilen glikol blokları hidrofilik iken polioksipropilen bloklar hidrofobiktir. En yüksek miktarda oksietilen poloksamer 188' de bulunuru (a/a 82). Sonuç olarak, poloksamer grubunda hidrofilik lipofilik denge (HLB) değeri en yüksektir (HLB=29) ve Y/S emülsiyonların hazırlanmasında tercih edilir. Son olarak, polisorbat 80, hem yüksek HLB (HLB=15) değerine hem de en düşük viskoziteye sahip olan yüzey etkin maddedir. Lesitin gibi amfoterik YEM'ler düşük toksisitesi nedeniyle ilgi çekicidir. Kullanılmadan önce bu bileşiğin kaynağı ayrıca fosfolipitlerin fiziksel özellikleri, bileşimleri ve konsantrasyonları gibi saflaştırma derecesini (yağ asitleri içeriğinin değişimi) belirtmek zorunludur. Dolayısıyla örneğin yumurta sarısından elde edilen lesitin %32 fosfatidilkolin, %22 fosfatidiletanolamin ve %19 fosfadilinositol içerir. Bir başka amfoterik YEM olaran Miranol (MHT) göz formülasyonlarında iyi tolere edilir. Ayrıca stearilamin gibi katyonik YEM'ler yağ damalalarının epitele bağlanması yoluyla kalma süresindeki potansiyel artış nedeniyle yararlıdır (90, 92). Tablo 7'de oftalmik preparatlarda kullanılabilecek YEM'lerden bahsedilmiştir.

Tablo 7. Oftalmik Preparatlarda Kullanılabilecek Yüzey Etkin Maddeler (93)

Genel Sınıflandırma	**Örnekler**
Lesitin ve lesitin türevleri	Saf Fosfolipitleri (Örn, soya fosfatidil kolin) ve karışık fosfolipitler, sodyum kolat Hidroksillenmiş fosfolipitler/lesitin
Gliserol yağ asidi esterleri	Poligliserol yağ asidi esterleri Poligliserol polirisinolat Propilen glikol yağ asidi esterleri (Örn, Polioksietilengliserol, cremophor EL)

Tablo 7 devam. Oftalmik Preparatlarda Kullanılabilecek Yüzey Etkin Maddeler (93)

Sorbitan yağ asidi esterleri	Span 20 (sorbitan monolaurat) Span 80 (sorbitan monooleat)
Polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri	Tween 20 (polietilen glikol sorbitan monolaurat) Tween 80 (polietilen glikol sorbitan monooleat)
Diğerleri (Potansiyel YYEM'ler)	Propilen glikol PEG 200

Yardımcı yüzey etkin madde (YYEM): YYEM'lerin mikroemülsiyon oluşumunda üç işlevi vardır; (a) mikroemülsiyonların oluşumu ve termodinamik kararlılıkları için gerekli çok düşük arayüzey gerilimi sağlama, (b) apolar grupların göreceli önemine bağlı olarak arayüzeyin eğriliğini değiştirebilmeleri ve (c) arayüzey filminin akışkanlığına etki ederler. Arayüzey filmi çok sert ise mikroemülsiyon oluşumunu önler ve daha viskoz çift kırılgan bir faza neden olur. YYEM ilavesi akışkanlık sağlar ve dallanmış bir YEM'ye eşdeğerdir. Aynı zamanda formülasyonlarda daha az konsantrasyonda YEM kullanılmasına olanak sağlar. YEM'lerin hidrokarbon zinciri üzerindeki doymamış sınırların varlığı, filmin akışkanlığını eşit şekilde arttırır. Kullanılan YYEM'leri genellikle düşük molekül ağırlığı olan alkoller, C_2 ve C_{10} arasında değişen karbon zincirlerinin uzunluğuna sahip glikoller gibi küçük moleküllerden oluşur. Pentanol ve hekzanol gibi bazı alkoller, aşırı tahriş edici doğası nedeniyle farmasötik uygulamalarda kullanılmaz. Kısa zincirli aminler YYEM olarak da kullanılabilir (92, 93). Tablo 8'de oftalmik preparatlarda kullanılabilecek YYEM'lerden bahsedilmiştir.

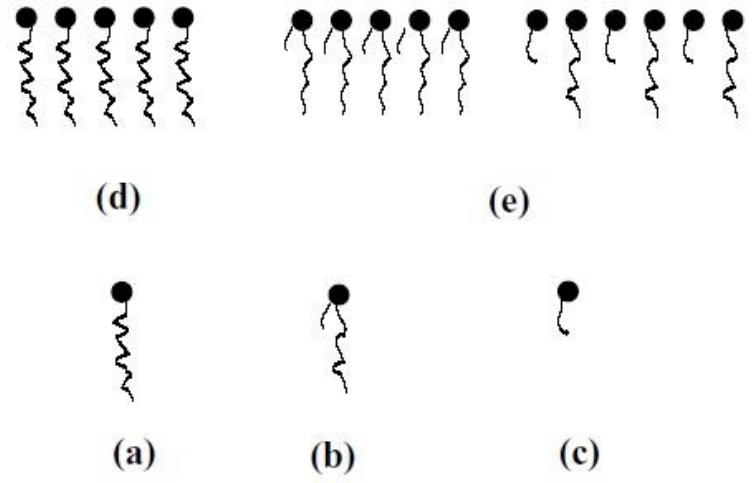
Tablo 8. Oftalmik Preparatlarda Kullanılabilecek Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler (93)

Sınıflar	**Örnekler**
Alkanol	Etanol, propanol ve 1-bütanol
Alken-diol	1,2-Propen diol, 1,2-Büten diol
Alken-polioller	Gliserol, glusitol ve polietilen glikol

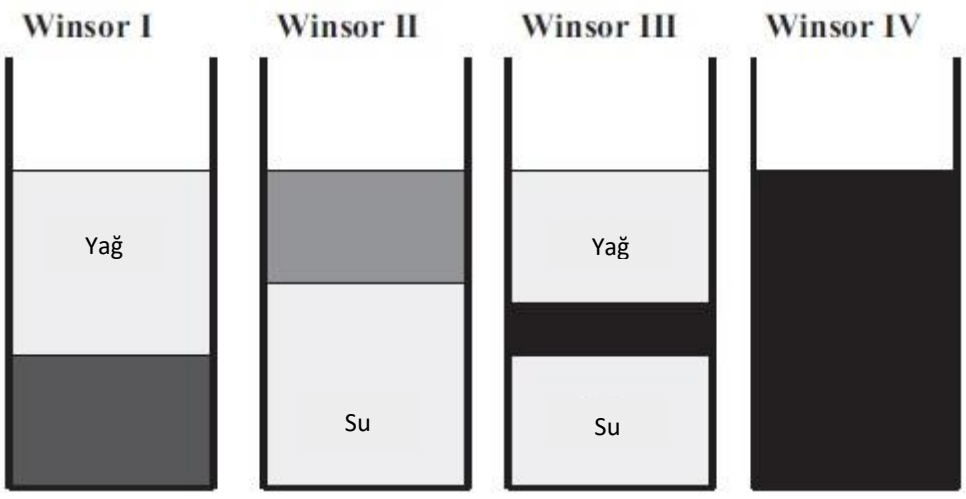
Mikroemülsiyonların Faz Çalışmaları

Emülsiyonları denge durumlarına göre sınıflandırmak için yaygın olarak kabul gören bir tanım Winsor tarafından 1947'de önerildi ve Şekil 12'de gösterildi. Emülsiyonların Winsor I, Winsor II, Winsor III ve Winsor IV olmak üzere dört tipi mevcuttur. Winsor I diye

adlandırılan fazda emülsiyon ve yağ olmak üzere iki faz vardır. Bu fazın üst kısmında atık fazla yağ bulunur, alt kısmında emülsiyon oluşur. Winsor II'de de su ve emülsiyon olmak üzere 2 faz vardır, burada üst kısımda emülsiyon oluşup, alt kısımda atık olan su bulunmaktadır. Winsor III'de ise 3 faz mevcuttur, bu fazlar S/Y, Y/S ve geçişli emülsiyon fazıdır. Burada ise emülsiyon orta kısımda oluşmaktadır. Winsor IV tipinde, yağ, su ve YEM'in homojen olarak karışması ile elde edilen sadece bir faz vardır. YEM'ler arayüzey filminin akışkanlığı üzerinedeki etkilerinin davranışları Şekil 11'de göstermiştir (90).

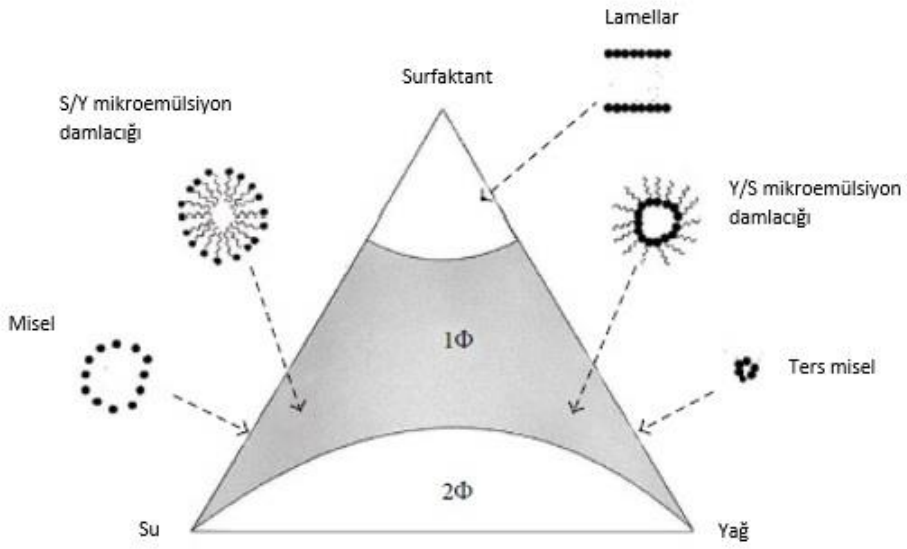


Şekil 11. Yardımcı yüzey etkin maddelerin arayüzey filminin akışkanlığı üzerindeki etkisi. (a) doğrusal yüzey etkin madde, (b) dallanmış yüzey etkin madde, (c) yardımcı yüzey etkin madde, (d) sert film ve (e) akışkan film (92)



Şekil 12. Winsor tarafından önerilen denge durumlarına dayanarak emülsiyon sınıflandırılmasının şematik gösterimi (90)

Üçgen faz diyagramı kararlılık alanlarını içeren şekil aşağıda verilmiştir. Emülsiyon sistemlerinde YEM/YYEM-Yağ-Su sisteminin en uygun ve en dayanıklı emülsiyon verdiği konsantrasyonlar üçgen faz diyagramları ile belirlenir. Üçgen faz diyagramının uygun mikroemülsiyon alanının, formülasyondaki bileşenlerin miktarının hesaplanabilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca stabilite sorunlarının incelenmesine ve önlenmesine yardımcı olur. Sistemde üçten fazla bileşen olduğunda bileşenlerden bir ya da birkaçı sabit bir oranda tutularak değişken sayısı üçe indirilebilir. Diyagram, S/Y emülsiyonu, lamellar veya hegzagonal sıvı kristaller, S/Y mikroemülsiyonu, Y/S emülsiyonu ve Y/S mikroemülsiyonunun dengesinden oluşur (93). Şekil 13'te mikroemülsiyonların farklı alanlarda oluşturduğu üçgen faz diyagramındaki gösterimi verilmiştir.



Şekil 13. Üçgen faz diyagramında farklı alanlarda mikroemülsiyon tiplerinin gösterimi (93)

Y/S ve S/Y tipi mikroemülsiyonların damlacıkları, YEM ve YYEM moleküllerinden oluşan film ile çevrilmiştir. Dış fazı yağ olan (S/Y) mikroemülsiyonunda amfifilik molekülün hidrofobik kısmı dış faza, hidrofilik kısmı ise su damlacığının içine yönelmiş durumdadır. Bu tip mikroemülsiyonlar ters miseller olarak adlandırılmaktadır. Dış fazı su olan (Y/S) mikroemülsiyonunda amfifilik molekülün hidrofobik kısmı yağ damlacığının içine yönelmiş, hidrofilik kısımları ise dış faza yönelmiş halde bulunmaktadır. Geçişli mikroemülsiyonlarda ise su, yağ ve YEM oranı eşittir. Bu tip mikroemülsiyon, çok köşeli olup, yağ ve su fazları, amfifili çok olan bir tabaka ile ayrılmıştır. Geçişli mikroemülsiyonlar tek tabakalı olarak YEM'in su ve yağda dağılması ile oluşmaktadırlar (91, 92).

Mikroemülsiyon ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonunda ilk işlem, üçgen faz diyagramlarının çizilmesidir. Çizilen diyagramda, mikroemülsiyon formülasyonundaki sulu faz, yağlı faz, YEM ve YYEM uygun şekilde karıştırılır ve en uygun mikroemülsiyon alanı belirlendikten sonra formülasyondaki bileşenler saptanabilir. Bileşenlerin çözünürlüğü ile yakından ilişkili olan faz diyagramlarının çizilmesi için en yaygın ve kolay yöntem titrasyondur.

Non-iyonik surfaktanlarla hazırlanmış olan mikroemülsiyonların karakteristik özelliklerinden biri yapılarının sıcaklık değişimine karşı hassas olmalarıdır. Her bir sistem dar bir sıcaklık değişimi ile karakterizedir ve maddelerin emülsiyon yapıcı özelliklerinin sıcaklıkla değiştiği bilindiği için, HLB sisteminin yanı sıra, Faz İnversiyon Sıcaklığı (PIT) sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde, emülsiyon yapıcılar, hangi sıcaklıkta Y/S emülsiyonunun, S/Y emülsiyonuna dönüştürdüklerine göre derecelendirilmiştir. Literatürde PIT'a dayanan bir HLB sıcaklığını tanımlamanın tercih edilebilir olduğu ileri sürülmektedir. Bu sıcaklık, YEM-yağ-su faz diyagramının bir özelliğidir. Non-iyonik YEM'ler için PIT bir sıcaklıktır ve bu sıcaklığın altında bir YEM, tercihen su fazı içine yağda şişen miseller olarak parçalanır ve bu sıcaklığın üstünde, tercihen yağ fazı içine suda şişen invert miseller olarak parçalanır (92, 93).

Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB)

1949 yılında Griffin tarafından geliştirilen hidrofilik-lipofilik balans sistemi YEM seçiminde kullanılmaktadır. Oluşan emülsiyon tipi HLB değerine bağlıdır. YEM ve YYEM'lerin HLB değerleri 0 ile 20 arasında değişmektedir (Tablo 9). Bu değer 20'ye yaklaştıkça emülgatör hidrofilik özellik kazanır. HLB değeri 8' den küçük olan emülgatörler lipofilik, büyük olanlar ise hidrofilik özelliğindedir.

Tablo 9. HLB değerlerine göre YEM'lerin kullanım amaçları (94)

HLB	**Suda Dağılım**	**Uyguluma**
1-4	Yok	Köpük kırıcı
3-6	Zayıf	S/Y Emülgatör
6-8	Çalkalama ile sütsü dağılım	Islatma ajanı
8-10	Dayanıklı sütsü dağılım	Islatma ajanı, Y/S Emülgatör
10-13	Yarısaydam-Berrak Dağılım	Y/S Emülgatör
>13	Berrak çözelti	Y/S Emülgatör, Çözündürme ajanı, Peptizan

İki farklı emülgatörün karıştırılması ile de HLB değeri hesaplanabilir. Karışım YEM'lerinin HLB değerleri aşağıdaki eşitlikte gösterilmiştir (94).

$$HLB = HLB_a \, x\left(\frac{Wa}{Wa+Wb}\right) + HLB_b \, x\left(\frac{Wb}{Wa+Wb}\right) \quad \text{.....Eşitlik 1}$$

HLB_a: Birinci emülgatörün HLB değeri

HLB_b: İkinci emülgatörün HLB değeri

W_a: Birinci emülgatörün emülsiyondaki miktarı

W_b: İkinci emülgatörün emülsiyondaki miktarı

Mikroemülsiyon Hazırlama Yöntemleri

Mikroemülsiyon formülasyonunda, sulu faz, yağlı faz, YEM ve YYEM uygun şekilde karıştırılır; oluşan sistem Y/S mikroemülsiyonu, S/Y mikroemülsiyonu, Y/S makroemülsiyonu, S/Y makroemülsiyonu, lameller veya hekzagonal kristal yapılı sıvı olabilir (95).

Mikroemülsiyon hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden birisi, yüksek basınçlı homojenizasyondur. Yöntemde, önceden hazırlanan makroemülsiyonlar yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek, saydam mikroemülsiyonlar elde edilmektedir (95, 96).

Bir diğer yöntemde ise, PIT kullanılır. Yöntemde, Y/S mikroemülsiyonu hazırlamak için uygun bileşenlerle 59-80°C'da S/Y emülsiyonu hazırlanır, oluşan emülsiyon oda sıcaklığına soğutulduğunda faz ayrımı oluşmakta ve faz ayrımının olduğu bu sıcaklık faz ayrım sıcaklığı olarak adlandırılmaktadır. Faz ayrımı aşamasından sonra sisteme YYEM eklenmesi ile mikroemülsiyon elde edilebilmektedir. YYEM'siz hazırlanan sistemlerin yüksek basınç homojenizatörü kullanılarak da mikroemülsiyonları oluşturulabilmektedir (95).

Mikroemülsiyonlar için en uygun su miktarı, titrasyon yöntemi veya deneme-yanılma yöntemi ile belirlenebilmektedir. Deneme-yanılma yöntemi aşırı madde kaybı ve ampirik bir yöntem olması nedeniyle çok tercih edilmemektedir (97).

Mikroemülsiyon bileşenlerinin seçiminde, bileşenlerin birbirleri ile etkileşiminin amaç doğrultusunda olmasına dikkat edilmelidir. Mikroemülsiyonların hazırlanmasındaki en önemli konu ise, sistemi oluşturan maddelerin, özellikle yüksek oranda içerdikleri YEM'lerin (ortalama % 20) toksik ve irritan etki göstermemeleridir (98).

Mikroemülsiyonların Karakterizasyonu

Optik özellikler: Mikroemülsiyonlar, damlacık büyüklükleri ufak olduğundan saydamdırlar ve görünür ışığın dalga boyunu geçirirler. S/Y sistemlerde az miktar YEM ile saydamlık sağlanırken, Y/S mikroemülsiyonlarında gerekli olan YEM miktarı daha yüksektir (99). Mikroemülsiyon kararlılığının bozulması, fiziksel görünümde meydana gelen değişikliklerin gözlenmesi ile kolaylıkla anlaşılır. Buna bağlı olarak, camsı yapı oluşturan mikroemülsiyonların optik incelemeleri, taramalı elektron mikroskobu (TEM)ile doğrudan görüntüleme ile sınırlı da olsa yapılabilmiştir (100).

Damlacık büyüklüğü tayini: Mikroemülsiyonların damlacık büyüklüğünü ölçmek için elektron mikroskobu ve ışık saçınımı (SANS ve SAXS) ile dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemleri gibi farklı yöntemler kullanılabilmektedir. SAXS ve SANS gibi ışık saçınım tekniklerinde, örneğe belli bir açı ile gönderilen dalgalar, örneğin içinde birbirlerini etkileyerek sonradan örneğin görünümünü oluşturacak modeli meydana getirmek üzere tüm yönlere saçılırlar. SANS yöntemi ile ayrıca yapısal özellikler de ortaya konmaktadır (101). Yapısal bilgiler açısından, yöntemin, agregatların çaplarını da ölçebilecek kapasitede olması gerekmektedir. Misel ve mikroemülsiyon damlacıkları için, nötron ve X ışınları (dalgaboyu <1.0 nm) kullanılabilmektedir. Dar açılı saçınım yönteminde ölçülen yoğunluk, saçınıma neden olan maddelerin yoğunluğu, damlacıklar arası oluşumlar, damlacıklar arası yapısal farklılıklar ile orantılı olarak, damlacığın yapısal korelasyonu ve parçacık büyüklüğü verilerini etkilemektedir (102).

DLS yönteminde ise, gönderilen ışın demeti kolloidal parçacıkla *Brown* hareketi ile etkileşir. Korelasyon fonksiyonunun yoğunluğu, ışını dağıtan parçacıkların difüzyon katsayılarını ve buradan hareketle de mikroemülsiyon damlacıklarının çaplarını Stokes-Einstein eşitliğine göre vermektedir (103).

$$R_h = \frac{k\,T}{6\,\pi\,\eta\,D} \quad \text{……Eşitlik 2}$$

Burada R_h: Hidrodinamik çap; k: Boltzman sabiti; T: Sıcaklık; η: Dış faz viskozitesi; D: Difüzyon katsayısıdır.

Zeta potansiyel analiz: Mikroemülsiyon sistemlerinde zeta potansiyel analizleri de gerçekleştirilmektedir. Küçük damlacıklı Y/S tip emülsiyonlar düşük direnç gösterirken, S/Y tipi emülsiyonlarda damlacık koagülasyonu görüldüğünde iletkenlik izlenmektedir. Direncin zamanla artması, agregasyonun, yani dayanıksızlığın belirtisidir (104). Sistem, 50 µS.cm-1 iletkenliğe sahip bidistile suda seyreltilerek analizler Helmholtz–Smoluchowski eşitliğine göre değerlendirilir (105).

$$Z = \frac{4\,\pi\,\eta\,(9.10^4)}{D}\;x\;\frac{V}{E}$$ .....Eşitlik 3

Burada, Z: Zeta potansiyel; V/E: Elektroforetik hareketlilik; η: Viskozluk, D: Ortamın dielektrik sabitidir.

Oküler olarak kullanılan mikroemülsüyonlarda, iç faz damlacıklarının yükleri oküler absorbsiyonlarını etkilemektedir. Negatif yüke sahip olan korneaya uygulanan pozitif yüklü damlacıklar, dokulara tutunmuş, gözde kalış süresinin artması ile mikroemülsiyonun salımında da artış sağlamıştır (92).

Reolojik özellikler: Mikroemülsiyonların kullanım kolaylıkları ve biyoyararlanımın artması açısından sistemin viskozitesi büyük önem taşır. Viskozitenin ölçümünde tek nokta viskozimetreleri ve çok nokta viskozimetreleri kullanılmaktadır. Reolojik analizler için, çok nokta viskozimetrelerinden koni-tabla yöntemini kullanan rotasyon tipi reometreler sıklıkla kullanılmaktadır. Makroemülsiyonlar genellikle psödo-plastik akış gösterirken, mikroemülsiyonlar Newtonian akış göstermektedir. Mikroemülsiyon formülasyonunun, özellikle topik uygulamada belli reolojik özellikleri taşıması gerekmektedir (100).

Mikroemülsiyonların Oküler Kullanımı

Oftalmik ilaçların oküler absorbsiyonunu arttırmak için yeni ilaç taşıyıcı sistemler olarak mikroemülsiyonlar geliştirilmiştir. Formülasyon stratejilerinin çoğu, kornea ve konjonktival alandaki ilaç kalma süresinin uzatılması ve aynı zamanda prekorneal ilaç kaybının asgariye düşürülmesi yoluyla oküler ilaç permeabilitesinin en üst düzeye çıkarılmasını amaçlamaktadır. Mikroemülsiyonlar oftalmik uygulama ile ilgili birçok avantajı olduğu için göz kullanımı için umut verici dozaj formlarıdır (106).

Mikroemülsiyonlar, ilacın yağ partikülüne yüklenme olasılığı nedeniyle, korneaya hidrofobik ilaçların verilmesinde özellikle ilgi çekmektedir. Y/S mikroemülsiyonları, oküler

uygulama için, az çözünen ilaçların çözünmesi, emiliminin arttırılması ve aynı zamanda salım profilinin uzatılması için uygun sistem olarak değerlendirilmiştir (107).

Mikroemülsiyonların damlacık boyutu çok küçük (genellikle 150 nm'nin altında) olmasından dolayı bu sistemler, ilacı kontrollü salarak ve gözün daha derin katmanlarına ilacın daha fazla penetrasyonunu sağlamaktadır. Mikroemülsiyonların mükemmel avantajları olmasına rağmen, YEM/YYEM seçimindeki sınırlamalar ve YEM/YYEM daha yüksek konsantrasyonlarıyla bağlantılı potansiyel toksisite sıklıkla mikroemülsiyonların kullanımını kısıtlamaktadır (92). Bazı oküler mikroemülsiyon çalışmaları ve TQ içeren emülsiyon çalışmaları oluşturma metotları ve içeriklerine göre Tablo 10 ve Tablo 11'de bahsedilmiştir.

Son yıllarda mikroemülsiyonların oküler hedeflendirmedeki potansiyelleri çeşitli araştırma ekipleri tarafından incelenmiştir. Kumar ve ark. (107) 2014 yılında vorikonazol yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonu geliştirmiştir ve geliştirdikleri formülasyonla geleneksel olan formülasyonu *in vitro* salım ve *ex vivo* geçiş çalışmalarında değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda geliştirilen mikroemülsiyonun geleneksel olan formülasyondan daha üstün özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Fialho ve ark. (106) 2004 yılında yapmış oldukları çalışmayla mikroemülsiyon formülasyonuna deksametazon yüklemişlerdir. Deksametazon yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonlarında stabilite, kinetik, oküler irritasyon testi çalışmalarını yapmışlardır ve elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda geliştirdikleri sistemin geleneksel sistemlerden daha üstün olduğunu kanıtlamışlardır.

Tablo 10. Bazı oküler mikroemülsiyon çalışmaları

Emülsiyon Tipi	Metot	İlaç	Yağ Fazı	YEM	YYEM	Sıvı Faz	Kaynak
Mikroemülsiyon (su içinde yağ)	Titrasyon metodu	Diklofenak	IPM*	Tw-80*	Gliserin	Tampon*	(108)
Mikroemülsiyon	Titrasyon metodu	Everolimus	Triasetin	P 184*	PG*	Su	(109)
Mikroemülsiyon	Titrasyon metodu	Pilokarpin hidroklorür	Etil oleat	Crill 1/ Crilet 4	X*	Su	(110)
Mikroemülsiyon	Titrasyon metodu	Deksametazon	IPM*	Tw-80*	PG*	Su	(111)
Mikroemülsiyon	Titrasyon metodu	Kolorafenikol	IPM*	Sp-20* + Tw-20	n-bütnaol	Su	(112)

Tablo 10 devam. Bazı oküler mikroemülsiyon çalışmaları

Mikroemülsiyon	Titrasyon metodu	Deksametazon	IPM*	Cremophor EL	PG*	Su	(106)

IPM*: İzopropil meristat, Tampon*: pH 7,4 PBS tamponu, P 184: Poloksamer 184,Tw-80*: Tween 80, PG: Propilen glikol, Sp-20: Span 20, X*: Yok

Tablo 11. TQ içeren emülsiyon çalışmaları

Emülsiyon Tipi	Metot	İlaç	Yağ Fazı	YEM	YYEM	Sıvı Faz	Kaynak
Nanoemülsiyon (su içinde yağ)	Yüksek basınçlı homojenizasyon	TQ	Triolein	Tw-80	X	Su	(113)
Nanoemülsiyon (su içinde yağ)	Titrasyon metodu	TQ	Oleik asit	Tw-20* ve Labrasol	Karbitol	Su	(114)
Nanoemülsiyon (su içinde yağ)	SNEDDS*	TQ	Kapriol-90	Tw-20*	İPA*	Su	(115)
Nanoemülsiyon (su içinde yağ)	SNEDDS*	Kur*/ TQ	Çörek otu yağı	I988*	PG* ve PEG-30	Su	(116)

Tw-20*: Tween 20, Cur*: Kurkumin, I988*: Imwitor 988, SNEDDS: Self-nanoemulsifying drug delivery systems (Kendiliğinden nanoefülsifiye olan sistemler), İPA: İzopropil akolkol

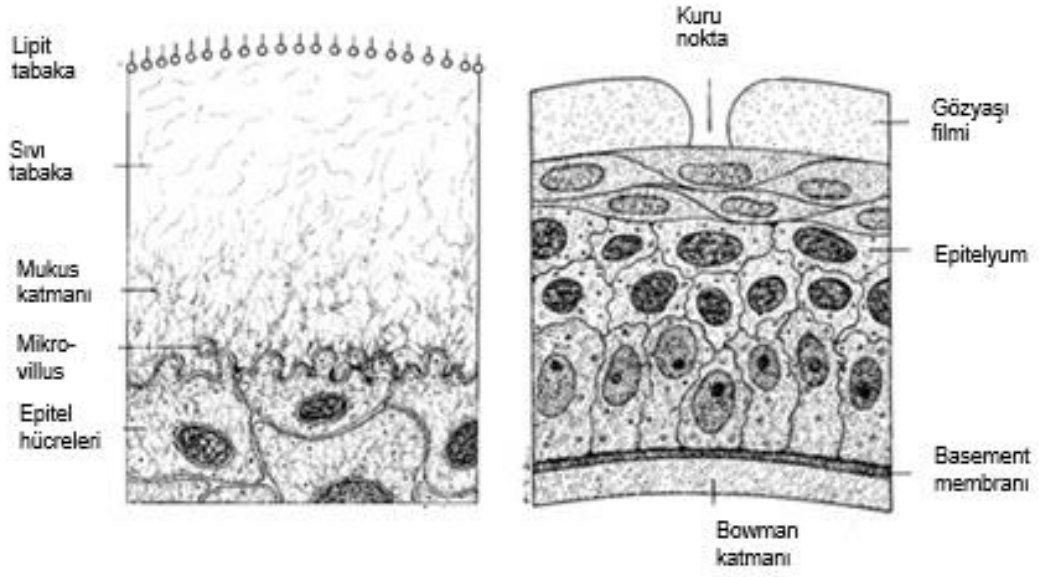
KURU GÖZ HASTALIĞI

Daha önce kuru göz, gözyaşı yetersizliğinden ya da aşırı gözyaşı buharlaşmasından kaynaklanan, interpalpebral alanda oküler yüzey hasarına ve oküler rahatsızlık semptomlarına yol açan bir gözyaşı filmi bozukluğu olarak tanımlanmıştır (117). Günümüzde ise bu tanım değişmiş ve kuru göz, lakrimal fonksiyonel ünitenin kompleks inflamatuar bir sendromu olarak tanımlanmaktadır. "Disfonksiyonel gözyaşı sendromu" veya "lakrimal keratokonjunktivit" terimlerinin de kullanılabildiği kuru göz sendromunda oküler yüzeyde klinik ya da subklinik bir inflamasyonun bulunmasından bahsedilmektedir (118).

2007 yılında Uluslararası Kuru Göz Çalışma Komitesi tarafından kuru göz için kapsamlı bir sınıflama sistemini de içeren yeni bir tanımlama bildirilmiştir. Komitede üç bölümlü bir klasifikasyon sistemi yayınlanmıştır. İlk bölüm etyopatogeneze yöneliktir ve kuru gözün çoklu nedenlerini tanımlar. Bu grupta kuru göz başlıca iki kategoriye ayrılmıştır; aköz yetersizlik (Sjögren veya non-Sjögren ilişkili) ve evaporatif bozukluklar. İkinci bölüm mekanizmaya aittir ve her bir nedenin, ortak bir yolak boyunca etki ettiğini göstermektedir (gözyaşı hiperosmolarite ve gözyaşı film instabilitesi). Üçüncü bölüm hastalığın şiddetine dayanmaktadır (görme bozuklukları, konjonktival enjeksiyon, konjonktival boyanma, korneal boyanma, göz kapağı

bulguları, gözyaşı kırılma zamanı, Schirmer testi ve tedavi için rasyonel bir temel sağlamaktadır (119).

Kuru göz oluşumundaki mekanizmalar; gözyaşı hiperozmolaritesi, gözyaşı film instabilitesi ve inflamasyondur. Gözyaşı hiperozmolaritesi, artmış buharlaşma ya da azalmış aköz sekresyona bağlı oluşabilir. Protein ve elektrolit konsantrasyonundaki artış, başlangıçta oküler yüzeyde irritasyona ve ileriki aşamalarda inflamasyona yol açan gözyaşı hacminde azalmaya neden olur. Göz kuruluğu zamanının azalması ile tanısı konulan gözyaşı filmi instabilitesi de artmış buharlaşma ile ilgilidir (120). Şekil 14'te normal gözyaşı filmi ve göz kuruluğu sonra oluşan gözyaşı filmi göstermiştir.



Şekil 14. Kuru göz öncesi (a) ve sonrası (b) gözyaşı film tabakasının gösterimi (121)

Kuru göz, oftalmoloji kliniğinde sık rastlanan bir durumdur. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, kuru göz prevelansının çeşitli yaş gruplarında %5-30 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 40 yaş üzerinde 7,1 milyon kişinin kuru göz sendromuna bağlı oküler rahatsızlık yaşadığı belirtilirken, prevelansla ilgili yapılan diğer çalışmalarda ise 40 yaş üzerindeki popülasyonun %6'sı ve 65 yaş üzerindeki popülasyonun %15'inde kuru göz olduğu bildirilmiştir. Kuru göz sıklığı yaşla birlikte artar ve özellikle de kadınlarda anlamlı olarak daha sık görülür. Ayrıca çeşitli sistemik hastalıklarda kuru göz görülme sıklığı belirgin olarak artmaktadır (122).

Kuru Göz Etiyolojisi

Etiyolojide değişik ve birbirleriyle ilişkili olabilen faktörler rol oynayabilmektedir. Gözyaşının miktarındaki azalma, gözyaşının oküler yüzey üzerinde dağılımındaki bozukluk, kornea epitelindeki düzensizlik ve gözyaşı lipitlerindeki patolojilere bağlı olarak gelişebilmektedir. Tablo 12'de kuru gözün etiyolojik sınıflandırılması görülmektedir. Aköz gözyaşı yetmezliği, gözyaşı bezinin yeterince gözyaşı salgılayamamasına bağlı gelişmektedir. Gözyaşı miktarı azalır, osmolaritesinde artış meydana gelir ve hiperosmolarite inflamasyonu tetikleyerek kuru gözün şiddetini arttırır. Sjögren sendromunda, gözyaşı ve tükrük bezlerinde lenfosit infiltrasyonu sonucu bez yapılarında harabiyet yapan otoimmün bir neden mevcuttur. Bunun sonucunda gözyaşı ve tükrük salgılanması azalır. Sjögren sendromuna bağlı olmayan aköz yetmezlik ise yaşlanma ile oluşan aköz yetmezlik, doğumsal gözyaşı bezi yokluğu (Konjenital Alakrima), gözyaşı bezinin sempatik ve parasempatik innervasyonunda oluşan bozulmalar, gözyaşı bezinin infiltrasyonu, ablasyonu gibi nedenlere bağlı oluşabilmektedir.

Buharlaşma fazlalığına bağlı kuru gözde, gözyaşı bezinden gözyaşı salınımı normaldir fakat oküler yüzeyden buharlaşma sonucu kuru göz kliniği gelişir. Meibomius bezi disfonksiyonu (Posterior blefarit), iki göz kırpma arasındaki sürenin uzaması, ortamdaki nem oranının düşük olması, alerjik konjonktivit, kontakt lens kullanımı, oküler yüzeye toksik ilaçlar gibi sebepler özellikle lipit tabaka da bozulma, lipit bileşenlerinde değişiklik yaparak kuru göze neden olurlar (123).

Tablo 12. Kuru göz etiyolojik sınıflandırılması (119)

	Kuru Göz	
ÇEVRESEL FAKTÖRLER İÇ ÇEVRESEL FAKTÖRLER Göz kırpma oranının azalması	AKÖZ GÖZYAŞI YETMEZLİĞİ 1)Sjogren Sendromuna bağlı olan aköz yetmezlik 2)Sjogren sendromuna bağlı olmayan aköz yetmezlik	BUHARLAŞMAYA BAĞLI OLUŞAN KURU GÖZ (EVAPORATİF KURU GÖZ) 1)Hastaya Ait Sebepler A) Meibomius bezi disfonksiyonu

Tablo 12 devam. Kuru göz etiyolojik sınıflandırılması (119)

Göz kapağı aralığının artması Düşük androjen, yüksek östrojen seviyesi Yaşa bağlı oluşan fizyolojik değişimler DIS ÇEVRESEL FAKTÖRLER Ortamdaki nem oranının düşük olması Rüzgârlı hava Bilgisayar başında uzun süre çalışmak	A) Primer Gözyası Yetmezligi • Yaşa Bağlı Kuru Göz • Doğumsal Gözyaşı Bezi Yokluğu (Konjenital Alakrima) • Familyal disotonomi (Riley Day Sendromu) B) Sekonder Gözyaşı Yetmezliği • Gözyası Bezinin infiltrasyonu: Sarkoidoz, lenfoma, AIDS, greft versus host. • Gözyaşı Bezinin Ablasyonu • Gözyaşı Bezinin Denervasyonu C) Gözyaşı Bezi Kanallarının Obstrüksiyonu • Trahom • Skatrisyel Pemfigoid • Eritema Multiforme • Kimyasal ve Termal Yanıklar D)Refleks Hiposekresyon (Refleks sekresyonda azalma) • Refleks Duyusal Blok: Kontakt lens kullanımı, Diabetes Mellitus, nörotrofik keratit • Refleks Motor Blok	B) Gözkapağı açıklığının ve gözkapağı-göz küresiuygunluğunun bozulması C) Göz kırpma oranının düşük olması 2)Ekstrensek Sebepler A) Oküler yüzey bozuklukları B)Kontakt lens kullanımı C)Allerjik konjonktivit

Kuru Göz Mekanizması

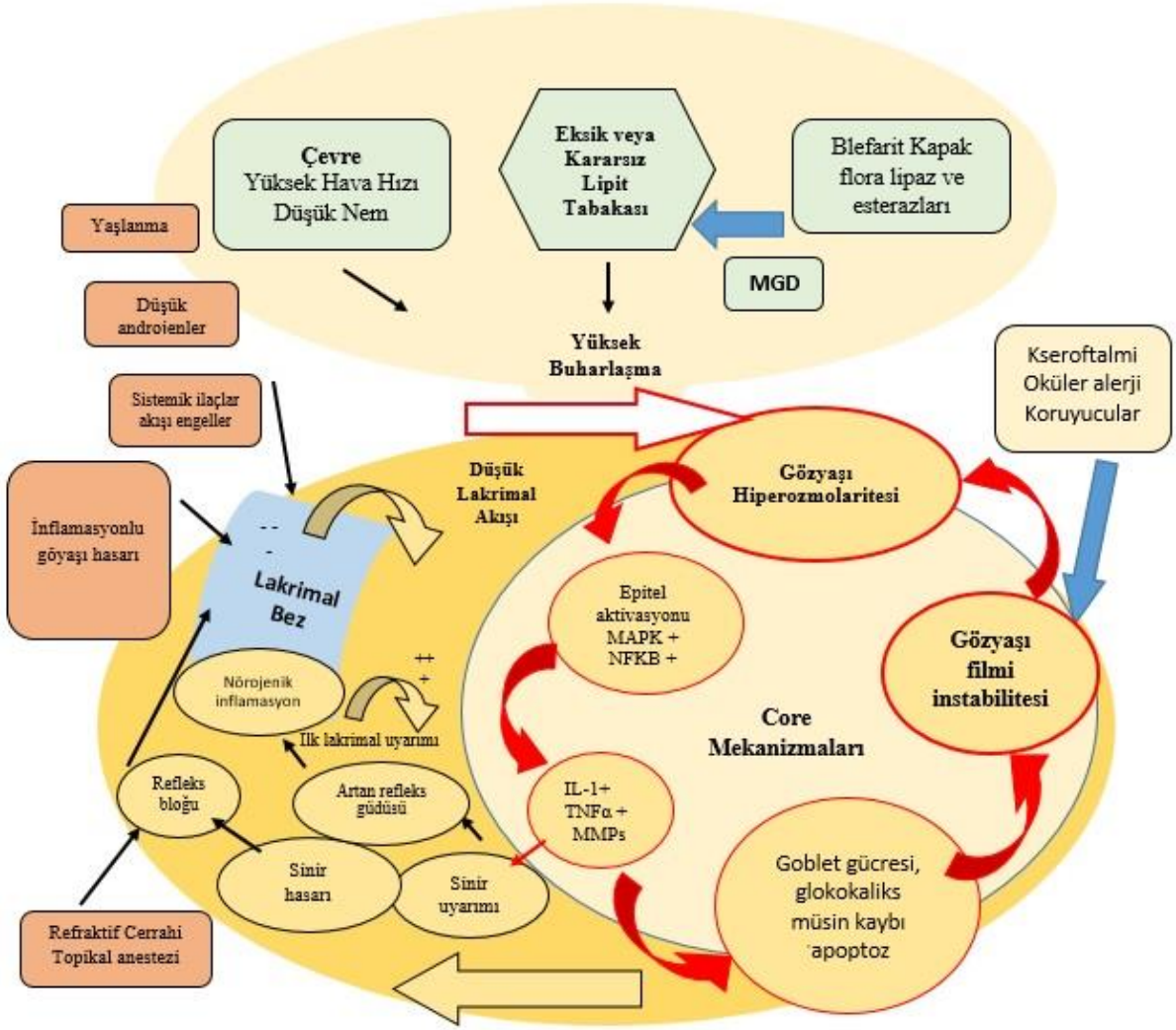
Kuru gözün temel mekanizmaları, gözyaşı hiperozmolaritesi ve gözyaşı filmi kararsızlığı tarafından yönlendirilir. Olayların döngüsü Şekil 15'te gösterilir. Gözyaşı hiperozmolaritesi, oküler yüzeyde bir dizi inflamatuar olayı aktif hale getirir ve inflamatuar mediatörlerin gözyaşına salınmasıyla yüzey epiteline zarar verir. Epitel hasarı, apoptoz ile hücre ölümü, goblet hüclerinin kaybını ve müsin ekspresyonunun bozulmasını içerir ve bu da gözyaşı filmi instabilitesine yol açar. Bu dengesizlik oküler yüzey hiperozmolaritesini şiddetlendirir ve kısır döngüyü tamamlar. Gözyaşı filmi instabilitesi, gözyaşı hiperozmolaritesinden önce kseroftalmi, oküler alerji, topikal koruyucu kullanımı ve kontakt lens aşınması dahil olmak üzere çeşitli etiyolojiler tarafından başlatılabilir.

Kuru gözün neden olduğu epitel hasarı, kornea sinir uçlarını uyarır, artan gözü açma ve kapamadan dolayı telafi edici refleks lakrimal gözyaşı sekresyonuna yol açar. Oküler yüzeyde normal müsin eksikliği göz kapakları ve göz küresini arasındaki sürtünme direncini arttırarak semtomlara katkıda bulunur. Bu dönemdeki yüksek refleks girişine bez içindeki nörojenik bir inflamasyonun temeli olarak ortaya atılmıştır.

Gözyaşı hiperozmolaritesinin başlıca nedenleri, lakrimal yetmezlik ve/veya gözyaşı filminden artan buharlaşma sonucu oluşan sulu gözyaşı akışıdır. Bu durum şeklin üst orta kısmındaki okla gösterilir. Artan buharlaşma sonucu kayıp, düşük nem ve yüksek hava akışının çevresel koşulları tarafından tercih edilir ve klinik olarak özellikle kararsız bir gözyaşı filmi lipit tabakasına yol açan muibom bezi disfonksiyonundan kaynaklanabilir. Kapak lipit kalitesi, blefarit (göz kapağının iltihabı, arpacık) sayıları artan normal kapak ürünlerinde salınan esteraz ve lipaz enzimlerinin etkisiyle değiştirebilir. Azalan sulu gözyaşı akışı, lakrimal sıvının konjonktival kese içine bozulmuş iletiminden kaynaklanmaktadır. Bunun normal yaşlanmanın bir özelliği olup olmadığı belirsizdir. Ancak antihistaminikler ve antimuskarinik ajanlar gibi bazı sistemik ilaçlar tarafından indüklenebilir. En yaygın neden, Sjögren sendromu gibi otoimmün bozukluklarda ve ayrına Sjögren sendromu olmayan kuru gözde görülen inflamatuar lakrimal hasardır. İnflamasyon hem doku yıkımına hem de potansiyel olarak geri dönüşümlü bir nöro-salgılayıcı bloğa neden olur. Bir reseptör bloğuna, antikorların M3 reseptörüne dolaşımı da neden olabilir. İnflamasyon düşük doku androjen seviyeleri tarafından tercih edilir.

Gözyaşı iletimi sikatrisyel konjonktival çizik ile engellenebilir veya oküler yüzeyden likrimal bezine duyusal refleks güdüsü kaybı ile azaltılabilir. Sonunda kuru gözün kronik yüzey hasarı kornea duyarlılığında bir düşüşe ve refleks gözyaşı sekresyonunda bir azalmaya yol açar. Çeşitli etiyolojiler en azından kısmen refraktif salgı bloğunun mekanizması ile kuru göz

sendromuna neden olabilir: refraktif cerrahi, kontakt lens aşınması ve topikal anesteziklerin kronik kötüye kullanımı olarak açıklanır (124).



Şekil 15. Kuru göz mekanizması (124)

Kuru Gözde Tedavi

Kuru gözün tedavisinde ilk yapılması gerekenler; altta yatan nedenlerin ortaya çıkarılarak tedavi edilmesi, semptomların giderilmesi, gözyaşı osmolaritesinin azaltılması, gözyaşı tabakasının stabilitesinin düzeltilmesi ve göz yüzeyi harabiyetinin geri çevrilmesidir.

Kuru göz sendromunun nedeni ne olursa olsun hasta mutlaka tedavi hakkında bilgilendirilmelidir. Tedavi ile semptomların iyileşmesi, oküler yüzeyin bütünlüğünün sağlanması ve komplikasyonların önlenmesi amaçlanmalıdır. Kuru göze sebep olan sistemik bir hastalık varsa tedavi edilmelidir. Kuru göz tedavisinin kronik, genelde dirençli ve kesin

tedavisi oldukça güç olabilen bir hastalık olduğu her zaman akılda tutulmalıdır. Kuru göz semptomları çok geniş bir yelpazede bulunduğu ve birçok oftalmojik hastalıkta ortak seyrettiği için, kuru göz tedavisinde yanılgılar olabilmektedir. Son yıllarda bu hastalığın inflamatuar bir sendrom olduğu yönünde çalışmalar olduğu için tedavi protokolleri, artık antiinflamatuar ve immün modülatör alanlara kaymaya başlamıştır (125).

Kuru Göz Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Aşağıdaki ilaç listesi, bir şekilde bu durumla ilgilidir veya bu durumun tedavisinde kullanılır (126).

Kuru göz hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlar ikiye ayrılır. Bunlar;

- Oftalmik Antiinflamatuar Ajanlar
- Oftalmik Lubrikantlar

Oftalmik antiinflamatuar ajanlar: Oftalmik antiinflamatuar ajanlar, gözlere uygulanarak ağrıyıcı azaltacak veya iltihabı tedavi edecek şekilde formüle edilmiş ürünlerdir. Antiinflamatuar ajanlar, iltihaplanmaya neden olan ve gözlerde tahriş ve şişmeyi azaltan bir veya daha fazla mediyatöre karşı etki eder. Ayrıca antiinflamatuar göz damlaları ameliyattan sonra ağrıyı hafifletmek için de kullanılır.

- **Restasis® Oftalmik Emülsiyon**

Restasis oftalmik emülsiyonu etkin madde olarak %0,05 siklosporin, yardımcı madde olarak hint yağı, gliserin, polisorbat 80, karbomer, su ve sodyum hidroksit içerir. Restasis göz damlası, bir immünosupresif ilaç olan Siklosporin içerir. Siklosporin, gözlerdeki iltihaplanma ile azaltılmış gözyaşı üretimini arttırabilir. Restasis göz damlaları, iltihaptan kaynaklanabilecek kronik kuru gözü tedavi etmek için kullanılır. Tablo 13'te Restasis'in Türkiye müstahzarları gösterilir.

Tablo 13. Restasis'in Türkiye'deki müstahzarları

ÜRÜN ADI/FİRMASI	DOZAJ ŞEKLİ	ETKİN MADDE	KULLANILAN YARDIMCI MADDELER
DEPORES® /DEVA	GÖZ DAMLASI EMÜLSİYON	Siklosiporin %0,05	Gliserin Hint Yağı Polisorbat 80 Karbomer Su Sodyum Hidroksit
DEPORES X®/DEVA	GÖZ DAMLASI EMÜLSİYON	Siklosiporin %0,1	Gliserin Hint Yağı Polisorbat 80 Karbomer Su Sodyum Hidroksit
TEARON®/SEBA İLAÇ	GÖZ DAMLASI EMÜLSİYON	Siklosiporin %0,05	Gliserin Hint Yağı Polisorbat 80 Karbomer Su Sodyum Hidroksit
EPOSTİN®/VEM İLAÇ	GÖZ DAMLASI EMÜLSİYON	Siklosiporin %0,05	Gliserin Hint Yağı Polisorbat 80 Karbomer Su Sodyum Hidroksit

- **Xiidra® Oftalmik Solüsyon**

Xiidra oftalmik solüsyon etkin madde olarak %5 liftegrast, yardımcı madde olarak sodyum klorit, sodyum fosfat, sodyum tiyosülfat, sodyum hidroksit, hidroklorik asit ve su içerir. Xiidra, vücudumuzdaki hücrelerin yüzeyinde belirli bir proteini bloke ederek çalışır. Bu protein gözlerinizin yeterince gözyaşı üretmemesine veya gözlerinizi sağlıklı tutmak için doğru kıvamda olmayan gözyaşları üretmesine neden olabilir. Xiidra göz damlaları kuru göz hastalığı semptomlarını tedavi etmek için kullanılır.

Oftalmik lubrikantlar: Oftalmik lubrikantlar kuru ve tahriş olmuş gözleri tedavi etmek için kullanılır. Kullanılan bu ürünler Tablo 14'te bahsedilir.

Tablo 14. Oftalmik lubrikant ürünleri

ÜRÜN ADI/FİRMASI	DOZAJ ŞEKLİ	YARDIMCI MADDE
SYSTANE LUBRİKANT®/ NOVARTİS	STERİL GÖZ DAMLASI	POLİETİLEN GLİKOL 400, PROPİLEN GLİKOL
LUBTANE LUBRİKANT®/DEVA	STERİL GÖZ DAMLASI	POLİETİLEN GLİKOL 400, PROPİLEN GLİKOL
AKWA TEARS®/AKORN	OFTALMİK MERHEM	BEYAZ VAZELİN MİNERAL YAĞ LANOLİN
FRESHKOTE®	OFTALMİK MERHEM	POLİVİNİL ALKOL POVİDON
LACRİSERT®	OFTALMİK İNSERT	HİDROKSİPROPİL SELÜLOZ
REFRESH TEARS®/ALLERGAN	GÖZ DAMLASI	SODYUM KARBOKSİMETİL SELÜLOZ
GONAK®/AKORN	OFTALMİK İNSERT	HİDROKSİPROPİL METİL SELÜLOZ

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER

Kimyasal Malzemeler

- Timokinon (Sigma Aldrich – Almanya)
- Çörek otu yağı (Naturlife – Türkiye)
- Tween 20 (Merck – Almanya)
- Tween 80 (Merck – Almanya)
- Cremophor ELP (BASF – ABD)
- Cremophor RH40 (BASF – ABD)
- Propilen Glikol (BASF – Almanya)
- Gliserol Monolinoleat (Maisine 35-1) (Gattefosse – Fransa)
- Dötere kloroform (Sigma Aldrich, ABD)
- PEG 400 (Merck – Almanya)
- N-oktanol (Merck – Almanya)
- Metanol (Merck – Almanya)
- Asetonitril (Merck – Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat (Merck – Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck – Almanya)
- Sodyum klorür (Tekkim – Türkiye)

- Hidroklorik asit (Sigma Aldrich - Almanya)
- Sodyum hidroksit (Merck – Almanya)
- ARPE-19 Hücre hattı (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) – Amerika)
- FBS (MULTICELL FBS-I1-11A – Amerika)
- Penisilin (MUTICELL – Amerika)
- Streptomisin (MULTICELL 450+201-Z1 – Amerika)
- L-glutamin (MULTICELL 609-065-E2 – Amerika)
- EMEM:DMEM HAMS F12 (MULTICELL – Amerika)
- Tripsin-EDTA (MULTICELL 352-524-EL – Amerika)
- DMSO (MERCK 67-68-15 – Almanya)
- MTT (Biomatik – Amerika)

Araç ve Gereçler

- Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı (Daihan Scientific – Güney Kore)
- Yüksek devirli homojenizatör (Daihan Scientific – Güney Kore)
- Stabilite kabini (Daihan Scientific – Güney Kore)
- Viskozimetre (AND – Japonya)
- pH metre (Matter Toledo – ABD)
- UV-vis spektrofotometre (Shimadzu – Japonya)
- Hassas terazi (Shimadzu – Japonya)
- Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) (Varian 300 MHz, ABD)
- Fourier Transformed Infrared (FT-IR) (Shimadzu Corporation, Japonya)
- Zeta Boyut ve Potansiyel Ölçüm Cihazı (Nano-ZS) (Malvern Panalytical, ABD)
- Likid Kromatografi – Kütle / Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) (Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS)
- Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) (DSC-60, Shimadzu, Japonya)
- X-Işını Difraktometresi (Lab X XRD-6100) (Shimadzu Corporation, Japonya)
- Laminer kabin (Safe Fast Elite EN 12469 2000 – İtalya)
- İnvert mikroskop (OLYMPUS – Japonya)
- Satrifüj (HERMLE – Almanya)
- Dondurucu (PANASONİC – Japonya)
- Mikroplaka okuyucu spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go – Amerika)

TİMOKİNON'UN FİZİKOKİMYASAL ANALİZLERİ

TQ'nun standardizasyonunu ve saflığını sağlamak için çalışmalar, Fourier Dönüşümlü İnfrared spektroskopisi (FT-IR) analizi, Nükleer Manyetik Rezonans analizi (NMR), Ultraviyole (UV) analizi, Kütle Spektrum (MS) analizi, Erime noktası analizi, Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi ve X-ışınımı kırınımı (XRD) analizi yapıldı. Yapılan analiz çalışmalarına ait detaylar aşağıda verildi.

Timokinon'un Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi

TQ FT-IR spektrometre cihazı kristalinin üzerine konuldu ve TQ'nun FT-IR spektrometre cihazında 4000-500 cm^{-1} aralığında taranıp pik verdiği dalga boyları belirlendi ve IR spektrumu çizildi.

Timokinon'un Ultraviyole Spektrofotometre Analizi

0,4 mg/mL TQ, PBS ortamında çözündürüldükten sonra bu stok çözeltisi UV-vis spektrofotometre cihazında 200-400 nm dalga boyları arasında maksimum absorbans verdiği dalga boyu (λ_{max}) saptandı.

Timokinon'un Kütle Spektrum Analizi

2 µg/mL TQ, metanol ile çözündürültükten sonra bu stok çözelti MS analizi için 60 V fragmantör voltajında LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi – Kütle spektoskopisi/Kütle spektroskopisi) cihazına uygun koşullarda enjekte edildi ve kütle/elektriksel yük oranına (m/z) göre en yüksek bağıl bolluğu saptandı.

Timokinon'un Termal Analizi

TQ'nun DSC ile termogramları elde edildi. Yaklaşık 2-5 mg tartılan numune kapaklı alüminyum pan içine konulup preslenerek kapatılması sağlandı. Maddenin DSC termogramı azot gazı geçirilerek 30 °C ile 80 °C sıcaklık aralığında 3 °C/dk sıcaklık artışı hızında ölçülerek elde edildi.

Timokinon'un Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

TQ'nun ^{1}H ve ^{13}C değerlendirmesi NMR ile yapıldı. Çözücü olarak kloroform ($CDCl_3$) kullanıldı.

Timokinon'un X-ışınımı Kırınımı Analizi

TQ'nun XRD analizi 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2Θ: 3-40° aralığında, 0,02°/dk tarama hızında yapıldı ve XRD difraktogramı elde edildi.

TİMOKİNON İLE ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRME VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI

İlaç analiz yöntemleri için, Avrupa Farmakopesi (EP) (127), Birleşik Devletler Farmakopesi (USP) (128), Uluslarası Harmonizasyon Konfederasyonu (ICH) (129) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) (130) verdiği talimatlar doğrultusunda validasyonlar gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda analitin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek kullanılacak olan dedektör ve çalışılacak olan cihaz analiz parametreleri valide edilmektedir. Optimum spektroskopik ve kromatografik şartlar, hem sistem uygunluk testleri hem de yöntem validasyonu analizleri ile belirlenmektedir.

Tez kapsamında, TQ'nun miktar tayini çalışmaları için LC-MS/MS (Şekil 16) ve UV-vis spektrofotometre (Şekil 19) cihazları ile geliştirilen yöntemler kullanıldı. Kullanılan yöntemlerin validasyon çalışmaları yapılarak, özgün, kesin, doğru, duyarlı, sağlam ve doğrusal bir yöntem elde etmek amacıyla uygun spektroskopik ve kromatografik şartlar belirlendi. Belirlenen parametreler aşağıda özetlendi.

ICH'a göre analitik validasyonun kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametreleri;

Doğrusallık (Linearity)

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonuna karşı cihaz cevabının (pik alanı, absorbans vb.) grafiğe geçirilmesi ile elde edilen eğriye kalibrasyon eğrisi denir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür. Kalibrasyon eğrisinde, eğrinin doğrusal olduğu düşük konsantrasyon ile en yüksek konsantrasyon aralığı yöntemin doğrusallığı olarak ifade edilir.

Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik (Accuracy and Recovery)

Doğruluk, elde edilen deneysel değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu saptamak amacıyla yapılır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır. Bu hesaplamada

yöntemin doğruluğu % geri kazanım değerlerinin ortalaması hesaplanarak, onaylanır. Standart sapma (SS) veya varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilir. Geri kazanım değeri Eşitlik 4 yardımı ile hesaplanır.

% Geri Kazanım = (K_{pratik} / K_{teorik}) x 100 ……... Eşitlik 4

K_{pratik}: Etkin maddelerin kalibrasyon eşitliğinden elde edilen konsantrasyon değeri
K_{teorik}: Etkin maddenin konsantrasyon değeri

Kesinlik (Precision)

Kesinlik analitik yöntemin normal çalışma koşullarında tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecesinin ölçüsüdür. İstatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda olmak üzere aynı konsantrasyondaki örnekler ölçülerek aritmetik ortalama, SS ve VK hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. VK'nın % 2'den küçük olması yöntemin kesinliğinin sağlandığını ifade eder.

- **Tekrar edilebilirlik (repeatability)**

Kalibrasyon eşitliği oluşturmak için hazırlanan stok çözeltisinden bir konsantrasyon seçilip ve iki farklı günde hazırlanan bu konsantrasyondaki çözeltiler cihaza verilir. Cihazın verdiği cevaba karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, SS ve VK hesaplanır. Varyasyon katsayısının % 2'den az olması yöntemin tekraredilebilir olduğunu göstermektedir.

- **Tekrar elde edilebilirlik (reproducibility)**

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle hazırlanan belirli sayıda aynı konsantrasyondaki çözeltinin cihazın verdiği cevabın 2 farklı analist tarafından test edilmesi ve elde edilen değerlerin ortalama, SS ve VK hesaplanmasıdır. Bulunan varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

Seçicilik (Specificity)

Etkin maddenin cihazda verdiği cevabın boş formülasyonu oluşturan maddelerin verdiği cevap ile çakışmaması için yapılan kontroldür.

Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD and LOQ)

Teşhis sınırı (limit of detection: LOD) analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikle tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondur. Tayin sınırı

(limit of quantitation: LOQ) analizi yapılan maddenin saptanabileceği en düşük konsantrasyondur. Bu sınırlar düşük konsantrasyona sahip bir seri örneğin analiz edilmesiyle belirlenir. Kalibrasyon eşitliğinde en düşük değere karşılık gelen alanların standart sapma değerleri hesaplanır ve bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünür. Bu değer Eşitlik 5 ve Eşitlik 6'da gösterildiği gibi 3,3 ile çarpılarak saptama sınırı ve 10 ile çarpılarak tayin sınırı belirlenmiştir.

LOD = 3,3 x SD/m……...Eşitlik 5

LOQ = 10 x SD/m…….Eşitlik 6

SD: Kalibasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$ ……...Eşitlik 7

y_i = Ortalama yanıt (alan değeri / absorbans)

$\acute{y}_i$ = Derişimi bilinen maddenin doğru denkleminde karşılık gelen ortalama yanıtı

n = Kalibrasyon grafiğinde belirtilen konsantrasyon sayısı

Stabilite (Stability)

Hazırlanan standart çözeltilerin farklı ortam koşullarında bekletilerek ve farklı zaman aralıklarında cihaza verilip cihaz cevabında herhangi bir değişiklik olup olmadığı saptanır.



Şekil 16. LC-MS/MS cihaz gösterimi

Cihazın LC ile ilgili parametreleri:

Tablo 15. Cihazın LC ile ilgili parametreleri

Analiz Parametresi	**Koşul**
Mobil Faz A	% 0,1'lik Formik asitli Ultra saf su
Mobil Faz B	% 0,1'lik Formik asitli Asetonitril
Kolon Sıcaklığı	35 °C
Örnekleyici Sıcaklığı	4 °C
Kolon	Poroshell EC C_{18} (5µm, 150 x 3 mm)
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Analiz Süresi	14.00 dk
Akış Hızı	0,600 mL/dk

LC akış gradienti parametreleri:

Tablo 16. LC Akış Gradienti Parametreleri

	Zaman (dk)	**Mobil Faz A (%)**	**Mobil Faz B (%)**
Akış gradienti	1.00	90.0	10.0
	4.00	2.0	98.0
	7.00	2.0	98.0
	7.10	0.0	100.0
	9.00	0.0	100.0
	9.00	90.0	10.0

Cihazın MS/MS ile ilgili parametreleri:

Tablo 17. Cihazın MS/MS ile ilgili parametreleri

Analiz Parametresi	**Koşul**
İyon Kaynağı	Elektrospray İyonizasyon (ESI)
İyonlaştırma Türü	Pozitif
Kapiler Voltajı	2500 V
Source Sıcaklığı	375 °C
Azot Gaz Sıcaklığı	300 °C
Azot Gaz Akışı	10 L/dk
Delta EMV (+)	0 V

MS/MS MRM parametreleri:

Tablo 18. TQ Optimizasyon Çalışmaları MS/MS Parametreleri

Bileşik	**Prekürsör İyon**	**Ürün İyon**	**Fragmentor (V)**	**Dwell (s)**	**CE (V)**
TQ	165	165	60	200	0

Metot validasyon parametreleri:

1- Stok çözeltilerinin hazırlanması:

- TQ Ana Stok Çözeltisinin Hazırlanması
  10,044 mg TQ 10,044 mL metanolde çözüldü ve 1000 ppm stok çözelti hazırlandı.
- Mobil Faz A Hazırlanması
  500 mL ultra saf su içine 500 µL formik asit ilave edildi.
- Mobil Faz B Hazırlanması
  500 mL asetonitril içine 500 µL formik asit ilave edildi.
- Numune Ön Hazırlık İşlemleri

Her biri 1000 ppm olan F3-1 (Tween 20 içeren formülasyon) ve F7-9 (Cremophor RH40 içeren formülasyon) numuneleri 5 ppm olacak şekilde hazırlandı ve enjeksiyon için cam viallere alındı. Seyreltme faktörü: 200

2- Doğrusal aralık ve kalibrasyon eğrisi: Çalışmamızda 1000 ppm TQ stok çözeltisinden F3-1 ve F7-9 numunelerinden katım yapılarak 0,5-10 µg/mL artan konsantrasyon aralığında altı noktalı kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Hazırlanan tüm konsantrasyonlar cihaza üç kez enjekte edildi.

3- Gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ): Belirlenen deney koşullarında saptanabilen en düşük konsantrasyondur. Bir sınır değeri olup, madde konsantrasyonunun belirli bir değerin altında veya üstünde olup olmadığı saptanır. Bu sınır, saptama sınırında hazırlanmış uygun sayıda örneğin analizi ile gerçekleşir.

4- Doğruluk ve geri kazanım: Analitik geri kazanım için 4 µg/mL ve 8 µg/mL standartları TQ çözeltisine F3-1 ve F7-9 numuneleri içerisine TQ stok çözeltisinden katım yapılarak hazırlandı.

UV-vis Spektrofotometre Validasyon Çalışması

pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinin (PBS) hazırlanması:

Disodyum hidrojen fosfat	2,38g
Potasyum dihidrojen fosfat	0,19g
Sodyum klorür	8,0g
Distile su	y.m.
	1000 mL

Avrupa farmakopesine göre (131) hazırlanacak PBS için 250 mL olacak şekilde belirlendi. 250 mL'lik balon jojenin içine bir miktar saf su koyuldu. İlk olarak disodyum hidrojen fosfat 0,595 g tartıltı ve balon jojenin içine aktarıldı. Balon joje ultrasonik su banyosuna alınıp maddenin iyice çözünmesi sağlandı. Sırasıyla potasyum dihidrojen fosfat 0,0475 g ve sodyum klorür 2,0 g tartılarak aynı şekilde hazırlandı. Çözelti balon jojedeki çizgisine kadar 250 mL'ye saf su ile tamamlandı. Tampon çözeltinin hepsi bir beher içine dökülüp pH metre kullanılarak pH'ı ölçüldü. pH 6,4 olacak şekilde 0,1M HCl çözeltisi ile ayarlandı.

Analitik yöntem validasyonu:

1- Özgünlük (Seçicilik): TQ'nun, ortamda bulunan diğer maddelerden ayırt edilebilmesi için formülasyonda bulunan YEM ve YYEM maddeleri 200-400 dalga boyları arasında UV-vis spektrofotometre ile tarandı.

2- Doğrusallık: TQ'nun kalibrasyon doğrusunu hazırlamak üzere TQ 0,4 mg/mL ana stok çözeltisi pH 7,4 PBS ile çözündürülmesiyle hazırlandı. Bu stok çözeltiden yola çıkarak uygun seyreltmeler yapılarak, standart çözeltiler 13; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1 ve 0,5 µg/mL konsantrasyonlarda elde edilecek şekilde elde edildi. Elde edilen standart çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Hazırlanan konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu çizildi. Gerçekleştirilecek tüm analizde kullanılmak üzere doğru denklemi (y=mx+n) elde edildi. Geliştirilen analitik yöntem ile derişime karşı ölçülen analitik cevabın doğru orantılı olarak arttığının ispatı için, TQ konsantrasyonunun korelasyonu incelendi. Bu sebeple 0,5-13 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık çalışmaları yapıldı. En küçük kareler yöntemi kullanılarak basit doğrusal regresyon istatistikleri analizi uygulandı ve *t* testi ile regresyon katsayısı ve interseptin anlamlılığı test edildi.

3- Doğruluk ve geri elde: Elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini test edebilmek amacıyla üç ayrı konsantrasyonda (0,5; 6 ve 13 µg/mL) TQ standart çözeltileri üçer defa hazırlandı. Elde edilen ortalama değerlerin gerçek değerlerden sapma oranı, doğruluk parametresinin ölçüsüdür. Doğruluk parametresi için validasyon sonuçları geri elde (%) olarak belirtildi.

4- Kesinlik: Üç farklı konsantrasyonda (1, 7 ve 10 µg/mL) üç paralel örneğin absorbansları ölçüldü. Absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarı kalibrasyon eşitlğinde yerine konularak hesaplandı. Analitik metodun kesinliği normal koşullar altında tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür. Yöntemin tekrarlanabilirliği (aynı analizci, aynı yöntem, aynı laboratuvar koşulları, aynı cihaz vb.) gün içi ve günler arası kesinlik çalışması yapılarak ispatlandı. Yöntemin günler arasındaki değişkenliğinin analizi için, aynı prosedür üç ardışık gün boyunca tekrarlandı. Bu üç gün kendi içerisinde, kesinlik ve tekrarlanabilirlik olarak değerlendirilirken, üç günün toplamında elde edilen sonuçlar ara kesinlik olarak değerlendirildi. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik parametreleri, her bir konsantrasyon düzeyi için, ayrı ayrı günler içerisinde elde edilen sonuçların yüzde varyasyon katsayısı (% VK) olarak ifade edildi. Ara kesinlik parametreleri ise, her bir konsantrasyon düzeyi için, üç ardışık gün içerisinde elde edilen bütün sonuçlar %VK olarak ifade edilmiştir.

5- Tayin alt limiti (LOQ) ve tespit alt limiti (LOD): Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılığının değerlendirilebilmesi için, tayin alt limiti (*limit of quantitation,* LOQ) ve tespit alt limiti (*limit of detection*, LOD) değerleri hesaplandı.

6- Stabilite: TQ'nun stok çözeltisinden 9 µg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlandı, oda sıcaklığında (25 °C ± 2), buz dolabında (4 °C ± 2) ve derin dondurucuda (-20 °C ± 2)' da 48 saat bekletilerek belirli zaman aralıklarında miktar tayini çalışmaları yapıldı. %VK değerlerlerinin %2'den küçük olması, etkin madde stabilitesinin sürdürülebilirliğini göstermektedir.

TİMOKİNON'UN LİPİT/SU PARTİSYON KAYSAYISI

TQ'un lipit/su partisyon katsayısının analizi amacıyla, n-oktanol fazı, distile su ile deneyden 24 saat önce doyuruldu. N-oktanol ile TQ'un 0,03 M çözeltisi hazırlandı ve başlangıçtaki TQ konsantrasyonu UV-vis spektrofotometre ile tayin edildi. Bu çözeltinin 2 mL'si 10 mL'lik tüpe alınarak üzerine 2 mL saf su eklendi. Tüplerin ağzı kapatılarak 24 saat oda sıcaklığında yatay çalkalayıcı ile çalkalandı ve ardından 3500 rpm (dakikada dönüş sayısı)'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra n-oktanol fazındaki TQ konsantrasyonu UV-vis spektrofotometre ile tayin edildi. Distile su fazındaki TQ konsantrasyonu, n-oktanol fazındadaki başlangıç ve son konsantrasyon arasındaki fark hesaplanarak bulundu. TQ'un lipit/su partisyon katsayısı Eşitlik 8 ile hesaplandı. TQ'un lipit/su partisyon katsayısı 2 paralel örnek ile çalışılarak hesaplandı. Her örnek UV-vis spektrofotometre' de 3 kere ölçülerek değerlendirildi.

Log P = Log [Mn/Ms]…….Eşitlik 8

Mn = n-oktanolde çözünen etkin madde miktarı
Ms = sulu fazda çözünen etkin madde miktarı

TİMOKİNON'UN ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMASI

TQ'nun çözünürlük çalışmalarında Çörek otu yağı, Tween 20, Tween 80, Cremophor RH40, Cremophor ELP, Propilen glikol, PEG 400, Gliserol, Distile su ve pH 7,4 PBS ortamları kullanıldı. Eppendorf tüplerine ortamlardan 0,3 mL konuldu ve üzerine TQ'un çözünürlüğü doygunluğa ulaşana kadar TQ ilave edilerek süspande edildi. 24 saat oda sıcaklığında

çalkalamalı su banyosunda karıştırıldı. 24 saat sonunda çökmüş TQ maddesinin çözünüp çözünmediği kontrol edildi. TQ maddesinin çözündüğü ortamlara bir miktar daha TQ eklendi ve 24 saat daha çalkalayıcıda karıştırıldı. Çözünen TQ miktarları belirlenmeden önce, çözünmemiş TQ'un uzaklaştırılması için hazırlanan karışımlar 13.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ile gerekli seyreltmeler yapılarak UV-vis spektrofotometre'de analiz edildi. Her örnek UV-vis spektrofotometre'de 3 kere ölçülerek değerlendirildi.

MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI

Mikroemülsiyon Ön Formülasyon Çalışmaları

Oküler mikroemülsiyon ön formülasyon çalışmaları 2 metot kullanılarak geliştirildi (92). İlk olarak faz titrasyon yöntemi kullanılarak mikroemülsiyon formülasyonları oluşturuldu. Burada belirli oranlarda yağ, YEM ve YYEM kullanılıp distile su ile bulanma noktalarına kadar titre edildi. Elde edilen veriler üçgen faz diyagramına geçirilip en fazla su tutan mikroemülsiyon formülasyonu tespit edildi. İkinci metot olarak yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılarak mikroemülsiyonlar hazırlandı.

Faz titrasyon metodu ile hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları: Oküler mikroemülsiyon formülasyon çalışmalarında farklı YEM ve YYEM'ler kullanıldı. Yağ fazı sabit olup çörek otu yağı; YEM olarak Tween 20, Tween 80, Cremophor ELP ve Cremophor RH40; YYEM olarak Gliserin, Propilen glikol ve polietilen glikol 400 (PEG 400) ve su fazı olarak distile su kullanıldı.

1- Hazırlama parametreleri: Oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının tasarımında YEM'lerle YYEM'ler 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1 oranlarında karıştırıldı. S_{mix}* ve yağ fazı oranları 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 ve 5:5 olarak hazırlandı. Formülasyonlar bir beher içerisinde manyetik karıştırıcıda 400 rpm'de ve 40-50 °C' de karıştırılırken, bulanma noktalarına kadar distile su ile titre edildi ve bulanma noktaları tespit edildi. Formülasyon çalışmaları Tablo 19 – Tablo 35'te gösterildi.

*S_{mix}: YEM/YYEM oranı.

2- Üçgen faz diyagramlarının çizimi: Oküler mikroemülsiyon formülasyon çalışmalarında elde edilen veriler ile Triplot programı yardımıyla her bir S_{mix} oranı için üçgen faz diyagramları çizildi. Emülsiyon oluşumları programda bir alan içerisinde gösterildi. En yüksek alan değerini veren formülasyonlar ideal formülasyon olarak seçildi.

Tablo 19. YEM olarak Cremophor EL, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Cremophor ELP	Distile su
MEF - 1	1:0	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 1.30
		4	6	0.00 - 0.32
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 20. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Cremophor ELP / Gliserin	Distile su
MEF - 2	1:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.64
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.16
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 3	2:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 4	3:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.64
		4	6	0.00 - 0.08
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 5	4:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.16
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 20 devam. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF – 6	5:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.64
		4	6	0.00 - 0.16
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 21. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor ELP / PEG 400	Distile su
MEF - 7	1:1	1	9	0.00 - 0.64
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 8	2:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 9	3:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.64
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 10	4:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.64
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 11	5:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.64
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 22. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Cremophor ELP / Propilen glikol	Distile su
MEF - 12	1:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 13	2:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 14	3:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 15	4:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 16	5:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 23. YEM olarak Tween 20, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 20	Distile su
MEF - 17	1:0	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 24. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 20 / Gliserin	Distile su
MEF - 18	1:1	1	9	0.00 - 0.64
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 19	2:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 20	3:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 21	4:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 22	5:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 25. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 20 / PEG 400	Distile su
MEF - 23	1:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.04
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 25 devam. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF - 24	2:1	1	9	0.00 - 0.64
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 25	3:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 26	4:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 28	5:1	1	9	0.00 - 0.64
		2	8	0.00 - 0.08
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 26. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Tween 20 / Propilen glikol	Distile su
MEF - 29	1:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 30	2:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 26 devam. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF - 31	3:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 32	4:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 33	5:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 27. YEM olarak Cremophor RH40, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor RH40	Distile su
MEF - 34	1:0	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 5.20
		4	6	0.00 - 0.16
		5	5	0.00 - 0.08

Tablo 28. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor RH40 / Gliserin	Distile su
MEF - 35	1:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 28 devam. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF – 36	2:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 100
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 37	3:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 38	4:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.08
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 39	5:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.32
		4	6	0.00 - 0.08
		5	5	0.00 - 0.08

Tablo 29. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor RH40 / PEG 400	Distile su
MEF - 40	1:1	1	9	0.00 - 0.32
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 41	2:1	1	9	0.00 - 2.60
		2	8	0.00 - 0.32
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 29 devam. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF - 42	3:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 1.30
		3	7	0.00 - 0.32
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 43	4:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 2.60
		4	6	0.00 - 0.16
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 44	5:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 2.60
		4	6	0.00 - 0.16
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 30. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor RH40 / Propilen glikol	Distile su
MEF - 45	1:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 46	2:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 47	3:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 30 devam. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF - 48	4:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 49	5:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 31. YEM olarak Tween 80, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Tween 80	Distile su
MEF - 50	1:0	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.08
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 32. YEM olarak Tween 80, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Tween 80	Distile su
MEF - 50	1:0	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.08
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 33. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 80 / Gliserin	Distile su
MEF - 51	1:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.32
		3	7	0.00 - 0.04
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 52	2:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.04
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 53	3:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.32
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 54	4:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.16
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 55	5:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 100
		3	7	0.00 - 0.32
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 34. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 80 / PEG 400	Distile su
MEF - 56	1:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.16
		3	7	0.00 - 0.04
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 34 devam. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF - 57	2:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.32
		3	7	0.00 - 0.04
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 58	3:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.32
		3	7	0.00 - 0.04
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 59	4:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.32
		3	7	0.00 - 0.08
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 60	5:1	1	9	0.00 - 100
		2	8	0.00 - 0.64
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

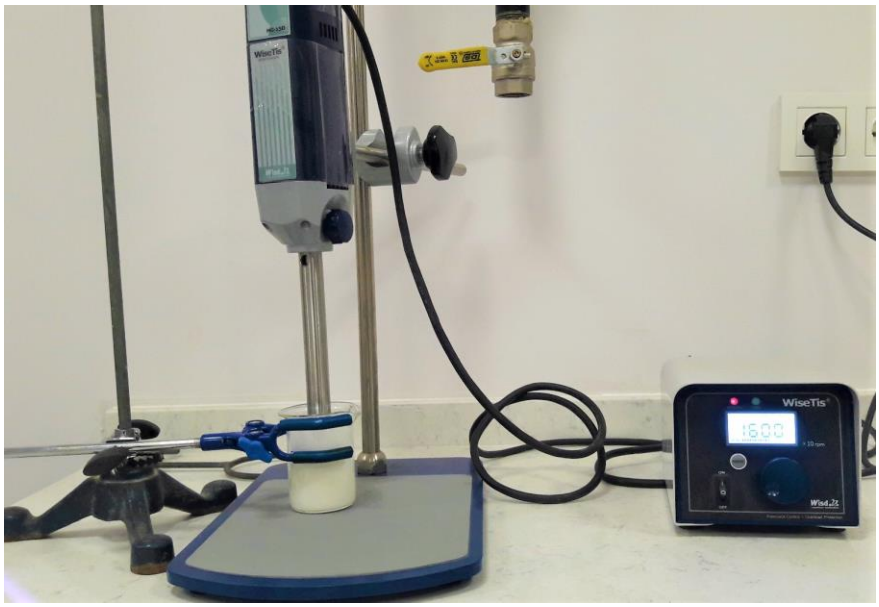
Tablo 35. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Tween 80 / Propilen glikol	Distile su
MEF - 61	1:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 62	2:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Tablo 35 devam. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

MEF - 63	3:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 64	4:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00
MEF - 65	5:1	1	9	0.00 - 0.00
		2	8	0.00 - 0.00
		3	7	0.00 - 0.00
		4	6	0.00 - 0.00
		5	5	0.00 - 0.00

Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları: Yüksek devirli homojenizasyon yöntem ile hazırlanmasında yüksek devirli homojenizatör (Daihan Scientific) cihazı kullanıldı (Şekil 17). Hazırlanan oküler mikroemülsiyon formülasyonları için yağ fazı sabit olup çörek otu yağı; YEM olarak Tween 20, Cremophor ELP ve Cremophor RH40; YYEM olarak Gliserin ve Propilen glikol ve su fazı olarak distile su kullanıldı.



Şekil 17. Yüksek devirli homojenizatör gösterimi

Mikroemülsiyon ön formülasyon çalışmaları yüksek devirli homojenzasyon yöntemi kullanılarak 10 mL olacak şekilde hazırlandı. Tablo 36'da genel formülasyon kodları ve içerikleri verildi. Tablo 37 ila Tablo 47'de formülasyonu oluşturan maddelerin oranları verildi. Homojenizatör şartları 30 saniye 4000 rpm, 30 saniye 8000 rpm ve 3 dakika 16000 rpm' de toplamda 4 dakika karıştırıldı. Tüm formülasyonlar oda sıcaklığında hazırlandı. Formülasyonlar sırasıyla;

Tablo 36. Yüksek devirli homojenizatör ile hazırlanan formülasyon kodları ve içerikleri

Formülasyon Kodu	İçerik	Formülasyon Kodu	İçerik	Formülasyon Kodu	İçerik
F1	Tween 20 - Gliserin	F4	Cremophor ELP	F7	Cremophor RH40
F2	Tween 20 – Propilen glikol	F5	Cremophor ELP - Gliserin	F8	Cremophor RH40 - Gliserin
F3	Tween-20	F6	Cremophor ELP – Propilen glikol	F9	Cremophor RH40 – Propilen glikol

Tablo 37. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 20 - Gliserin	Distile su
F1-1	1:1	2	2	94
F1-2	2:1	2	4	90
F1-3	1:1	3	3	91
F1-4	2:1	3	6	85
F1-5	1:1	4	4	88
F1-6	2:1	4	8	80
F1-7	1:1	5	5	85
F1-8	2:1	5	10	75
F1-9	1:1	6	6	82
F1-10	2:1	6	12	70
F1-11	1:1	7	7	79
F1-12	2:1	7	14	65
F1-13	1:1	8	8	76
F1-14	2:1	8	16	60

Tablo 38. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Tween 20 – Propilen glikol	Distile su
F2-1	1:1	2	2	94
F2-2	2:1	2	4	90
F2-3	1:1	3	3	91
F2-4	2:1	3	6	85
F2-5	1:1	4	4	88
F2-6	2:1	4	8	80
F2-7	1:1	5	5	85
F2-8	2:1	5	10	75
F2-9	1:1	6	6	82
F2-10	2:1	6	12	70
F2-11	1:1	7	7	79
F2-12	2:1	7	14	65
F2-13	1:1	8	8	76
F2-14	2:1	8	16	60

Tablo 39. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	Yağ	YEM	Su
	Çökek otu yağı	Tween 20	Distile su
F3-1	2	2	96
F3-2	2	4	94
F3-3	3	3	94
F3-4	3	6	91
F3-5	4	4	92
F3-6	4	8	88
F3-7	5	5	90
F3-8	5	10	85
F3-9	6	6	88
F3-10	6	12	82
F3-11	7	7	86
F3-12	7	14	79

Tablo 39 devam. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

F3-13	8	8	84
F3-14	8	16	76

Tablo 40. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor ELP, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**Yağ**	**YEM**	**Su**
	Çökek otu yağı	Cremophor ELP	Distile su
F4-1	2	2	96
F4-2	2	4	94
F4-3	3	3	94
F4-4	3	6	91
F4-5	4	4	92
F4-6	4	8	88
F4-7	5	5	90
F4-8	5	10	85
F4-9	6	6	88
F4-10	6	12	82
F4-11	7	7	86
F4-12	7	14	79
F4-13	8	8	84
F4-14	8	16	76

Tablo 41. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM Cremophor ELP, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor ELP - Gliserin	Distile su
F5-1	1:1	2	2	94
F5-2	2:1	2	4	90
F5-3	1:1	3	3	91
F5-4	2:1	3	6	85
F5-5	1:1	4	4	88

Tablo 41 devam. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM Cremophor ELP, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

F5-6	2:1	4	8	80
F5-7	1:1	5	5	85
F5-8	2:1	5	10	75
F5-9	1:1	6	6	82
F5-10	2:1	6	12	70
F5-11	1:1	7	7	79
F5-12	2:1	7	14	65
F5-13	1:1	8	8	76
F5-14	2:1	8	16	60

Tablo 42. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor ELP, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor ELP – Propilen glikol	Distile su
F6-1	1:1	2	2	94
F6-2	2:1	2	4	90
F6-3	1:1	3	3	91
F6-4	2:1	3	6	85
F6-5	1:1	4	4	88
F6-6	2:1	4	8	80
F6-7	1:1	5	5	85
F6-8	2:1	5	10	75
F6-9	1:1	6	6	82
F6-10	2:1	6	12	70
F6-11	1:1	7	7	79
F6-12	2:1	7	14	65
F6-13	1:1	8	8	76
F6-14	2:1	8	16	60

Tablo 43. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	Yağ	YEM	Su
	Çökek otu yağı	Cremophor RH 40	Distile su
F7-1	2	2	96
F7-2	2	4	94
F7-3	3	3	94
F7-4	3	6	91
F7-5	4	4	92
F7-6	4	8	88
F7-7	5	5	90
F7-8	5	10	85
F7-9	6	6	88
F7-10	6	12	82
F7-11	7	7	86
F7-12	7	14	79
F7-13	8	8	84
F7-14	8	16	76

Tablo 44. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	YEM:YYEM Oranı	Yağ	YEM/YYEM	Su
		Çökek otu yağı	Cremophor RH 40 - Gliserin	Distile su
F8-1	1:1	2	2	94
F8-2	2:1	2	4	90
F8-3	1:1	3	3	91
F8-4	2:1	3	6	85
F8-5	1:1	4	4	88
F8-6	2:1	4	8	80
F8-7	1:1	5	5	85
F8-8	2:1	5	10	75
F8-9	1:1	6	6	82
F8-10	2:1	6	12	70
F8-11	1:1	7	7	79
F8-12	2:1	7	14	65

Tablo 44 devam. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

F8-13	1:1	8	8	76
F8-14	2:1	8	16	60

Tablo 45. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları

Formülasyon kodu	**YEM:YYEM Oranı**	**Yağ**	**YEM/YYEM**	**Su**
		Çökek otu yağı	Cremophor RH 40 – Propilen glikol	Distile su
F9-1	1:1	2	2	94
F9-2	2:1	2	4	90
F9-3	1:1	3	3	91
F9-4	2:1	3	6	85
F9-5	1:1	4	4	88
F9-6	2:1	4	8	80
F9-7	1:1	5	5	85
F9-8	2:1	5	10	75
F9-9	1:1	6	6	82
F9-10	2:1	6	12	70
F9-11	1:1	7	7	79
F9-12	2:1	7	14	65
F9-13	1:1	8	8	76
F9-14	2:1	8	16	60

F3, F4 ve F7 formülasyonları sadece YEM, distile su ve çörek otu kullanılarak hazırlandı. Yağ ve YEM oranı 1:1 ve 1:2 olacak şekilde belirlendi. F1, F2, F5, F6, F8 ve F9 formülasyonları YEM, YYEM, distile su ve çörek otu yağı kullanılarak hazırlandı. S_{mix} 1:1 olacak şekilde belirlenip, yağ oranı ve S_{mix} 1:2 ve 1:4 olacak şekilde belirlendi. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra hızlandırılmış stabilite şartlarında stabilite kabininde bekletildi. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra faz ayrımı oluşumunun olup olmayacağı gözlemlendi. F1 ve F3 formülasyonlarında faz ayrımı gözlendiği için belirlenen miktarda YEM ilavesi yapılarak tekrar oluşturuldu. Diğer formülasyonlarda faz ayrımı gözlenmediği için YEM eklemesi yapılmadı. Aşağıda YEM ekleme oranları verilmiştir.

Tablo 46. F1 formülasyonu ekleme miktarları

Formülasyon kodu	Yağ	YEM	YYEM	Su
	Çörek otu yağı	Tw 20	Gly	Distile su
F1-1	2	2 + 1	2	94
F1-2	2	4 + 2	4	90
F1-3	3	3 + 1,5	3	91
F1-4	3	6 + 3	6	85
F1-5	4	4 + 2	4	88
F1-6	4	8 + 4	8	80
F1-7	5	5 + 2,5	5	85
F1-8	5	10 + 5	10	75
F1-9	6	6 + 3	6	82
F1-10	6	12 + 6	12	70
F1-11	7	7 + 3,5	7	79
F1-12	7	14 + 7	14	65
F1-13	8	8 + 4	8	76
F1-14	8	16 + 8	16	60

Tablo 47. F3 formülasyonu ekleme miktarları

Formülasyon kodu	Yağ	YEM	Su
	Çökek otu yağı	Tw 20	Distile su
F3-1	2	2 + 1	96
F3-2	2	4 + 2	94
F3-3	3	3 + 1,5	94
F3-4	3	6 + 3	91
F3-5	4	4 + 2	92
F3-6	4	8 + 4	88
F3-7	5	5 + 2,5	90
F3-8	5	10 + 5	85
F3-9	6	6 + 3	88
F3-10	6	12 + 6	82
F3-11	7	7 + 3,5	86
F3-12	7	14 + 7	79
F3-13	8	8 + 4	84
F3-14	8	16 + 8	76

Mikroemülsiyon formülasyonlarının seçimi: Hazırlanan ön formülasyonlar ilk olarak gözlemlenip daha sonra stabilite kabinine (hızlandırılmış stabilite koşulunda 40 °C; %75 Nem)

koyuldu. 3 ay bekletilen numunler tekrar gözlemlendi ve zetasizer cihazı ile damlacık boyutu, PDI (polidispersite indeks) ve zeta potansiyel değerlerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda mikroemülsiyon formülasyonları seçildi.

Hazırlanan Mikroemülsiyonlar İçin Metot Seçimi

İki farklı metoda göre hazırlanan mikroemülsiyon ön formülasyonların hangi metoda göre hazırlanacağının seçimi içeriklerine göre değerlendirilecektir. Bilidindiği üzere oküler formülasyonlarda YEM'lerin irritan özelliğinden dolayı içeriklerinin az olması gerekmektedir (92).

Mikroemülsiyonlara Etkin Madde Eklenmesi

Ön formülasyon çalışmalarından sonra belirlenen optimum formülasyonu için yağ fazının %5'i oranında TQ eklendi (132).

MİKROEMÜLSİYONLARIN FİZİKOKİMYASAL ÇALIŞMALARI

İdeal mikroemülsiyon formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla, mikroemülsiyon hazırlama aşamalarından gelebilecek olumsuzlukları ve etkin madde ile taşıyıcılar arasındaki etkileşim ve geçimsizlikleri tespit etmek için bir seri analiz yapıldı. Bu analiz çalışmaları için mikroemülsiyon formülasyonlarının organoleptik değerlendirmesi, pH'sı, viskozitesi, kırılma indisi, damlacık boyutu, polidispersite indeksi, zetapotansiyeli, etkin madde içeriği ve stabilitesi incelendi. Tüm parametreler için üç paralel ölçüm yapıldı ve bu ölçümlerin ortalaması alınıp SS değerleri hesaplandı.

Mikroemülsiyonların Organoleptik Değerlendirmeleri

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonların organoleptik değerlendirmesi koku, renk, görünüş, faz ayrımı ve köpük oluşumu parametreleri ile belirlenmiştir.

Mikroemülsiyonların pH Çalışmaları

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının pH değeri oda sıcaklığında pH-metre (Mettler Toledo Seven Campact pH/İon S220) ile ölçüldü. pH ayarlaması gereken formülasyonlar için 1 N NaOH çözeltisi kullanıldı.

Mikroemülsiyonların Viskozite Çalışmaları

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının viskozitesi oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) viskozimetre (AND Vibro Viscometer-SV-10) kullanılarak ölçüldü.

Mikroemülsiyonların Kırılma İndisi Çalışmaları

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının kırılma indisi ölçümü refraktometre (SCHMIDT HAENSCH ATR-F) ile yapılmıştır.

Mikroemülsiyonların Damlacık Boyutu, Polidispersite İndeksi Çalışmaları

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutu Malvern Zeta Sizer Nano ZS aleti kullanılarak 173°'lik bir açıyla, oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ölçüldü.

Mikroemülsiyonların Zeta Potansiyel Çalışmaları

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyelleri 78,5 dielektrik sabitinde, Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) ölçüldü.

Mikroemülsiyonların Yoğunluk Ölçümleri

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının yoğunluğu balon joje kullanılarak oda sıcaklığında ölçüldü. Önce balon joje boş iken darası alındı daha sonra balon joje su ile doldurulup tartıldı. Ardından etanol ile çalkalanarak etüvde kurutulmaya bırakıldı. Son olarak ise kuruyan balon joje mikroemülsiyon formülasyonu ile doldurulup tartıldı. Eşitlik 9'da verilen eşitlik yardımıyla hesaplanma yapıldı.

$$d = (A3 - A1) / (A2 - A1) \quad \text{Eşitlik 9}$$

d = yoğunluk

A1 = Balon joje ile tartılan distile suyun ağırlığı

A2 = Dara

A3 = Balon joje ile tartılan mikroemülsiyonun ağırlığı

Mikroemülsiyonların Santrifüj ile Faz Ayrımı Çalışması

Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonları literatürde verildiği gibi 13000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda mikroemülsiyonlarda herhangi bir faz ayrışması olup olmadığı incelendi.

Mikroemülsiyonların Stabilite Çalışmaları

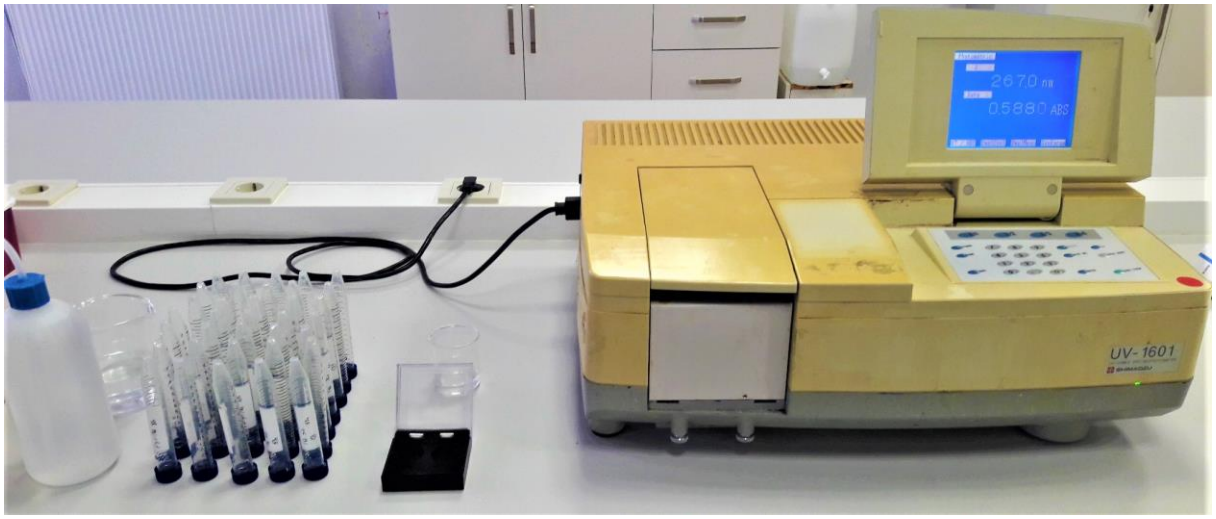
Yeni hazırlanan formülasyonlarının ve TQ içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının stabilite çalışmaları stabilite kabininde hızlandırılmış stabilete şartlarında (40 °C ve %70 nem) 1,2 ve 3 ay bekletildi. Formülasyonların fiziksel görünümü, pH, viskozitesi, damlacık büyüklüğü ve zeta potansitel gibi özellikleri ve formülasyonlardaki etkin miktarının aylara göre değişimi incelendi.

TİMOKİNON İÇEREN İDEAL MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONUNUN *İN VİTRO* SALIM ÇALIŞMALARI

Salım çalışmasında, diyaliz membran yöntemi ve salım ortamı olarak pH 7.4 PBS kullanıldı. 32 ± 0.5 °C'de, sink koşullarını sağlayan 1000 µL TQ süspansiyonu kontrol olarak kullanıldı, karakterizasyon çalışmaları sonrasında ideal olarak seçilen F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonları 8-10 kDa molekül ağırlığına kadar geçirgen olan diyaliz membran içine iki ucu kapatılarak yerleştirildi. Membran kullanılmadan önce pH 7,4 PBS içinde 30 dk bekletildi. Bu diyaliz membran 80 mL pH 7.4 PBS içine daldırıldı. Bu sistem çalkalamalı su banyosu ile 50 dev/dk'da 72 saat karıştırıldı. 5, 15, 30 dk, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 ve 72 saatlerde örnekler alındı ve gerekli seyreltmeler yapılarak UV-vis spektrofotometre ile miktar tayini yapıldı. Her örnek 2 kez tekrarlandı.



Şekil 18. *İn vitro* salım çalışmasında kullanılan çalkalamalı su banyosu ve numuneler



Şekil 19. *İn vitro* salım çalışmasında kullanılan UV-vis spektrofotometre

TİMOKİNON İÇEREN İDEAL MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONUNUN KİNETİK ÇALIŞMALARI

Kinetik çalışmaların belirlenmesinde çeşitli matematiksel modellerden yararlanılmaktadır. Salım verileri bu modeller kullanılarak grafiğe geçirilir ve grafiğin lineer regresyon katsayısına (R^2) göre salımın hangi modele uyduğu belirlenir.

Sıfırıncı Derece Kinetik

Sıfırıncı dereceden salım hızı matematiksel olarak Eşitlik 10'daki formül ile ifade edilmektedir.

$Q_t=Q_0+K_0t$……..Eşitlik 10

Q_0 = başlangıçtaki ilaç miktarı
Q_t = t süre sonunda salınan kümülatif ilaç miktarı
K_0 = sıfırıncı derece salım hız sabiti

Sıfırıncı derece salım kinetiği zamanla yüzey alanı değişmeyen ve ilacı yavaş salan sistemler için uygundur. Bu sistemlere örnek olarak deriye yapıştırılan bantlar, matris tabletler ve osmotik sistemler verilebilir. Bu kinetiğe göre birim zamanda salınan ilaç miktarı konsantrasyondan bağımsız olup hep sabit kalmaktadır (133).

Birinci Derece Kinetik

Birinci dereceden salım kinetiği, salım hızının konsantrasyona bağlı olduğu durumlarda görülmektedir ve matematiksel olarak Eşitlik 11'deki formül ile ifade edilmektedir.

$\log Q_t = \log Q_0 + K_1t$…….Eşitlik 11

K_1 = birinci derece salım hız sabiti

Bu salım kinetiğinde çözeltiye geçen ilaç miktarı matris içerisinde kalan ilaç miktarına bağlı olarak zamanla azalmaktadır. Klasik ilaç sistemlerinin çoğu ve uzatılmış etkili salım yapan sistemler bu tür salım kinetiğine uymaktadırlar (134).

Higuchi modeli

Etkin madde salımı değiştirilmiş sistemlerin çoğu matris sistemi şeklindedir. Higuchi, kontrollü salım yapan katı matrisler içerisinde disperse edilmiş etkin maddenin salım hızlarını belirleyen matematiksel ilişkileri teorik olarak incelemiştir. Bu salım kinetiği Eşitlk 12'deki formül ile ifade edilmektedir.

$Q_t = Q_0 + K_Ht^{1/2}$……Eşitlik 12

K_H = Higuchi salım hız sabiti

Salınan etkin madde miktarına karşılık zamanın karekökü grafiği çizildiğinde, eğer salım difüzyon kontollü ise eğimi Higuchi salım hız sabitine eşit olan bir doğru elde edilmektedir (135).

Hixson-Crowell modeli

Bu salım kinetiği salım sırasında yüzey alanında ve çapında değişim olan sistemler için kullanılmaktadır. 'Küpkök kanunu' olarak da bilinen salım kinetiği Eşitlik 13'teki formül ile gösterilmektedir.

$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC}t$……...Eşitlik 13

K_{HC} = Hixson-Crowell salım hız sabiti

Tabletler gibi çözünmenin yüzeye paralel gerçekleştiği ve geometrik şeklin bozulmadan tüm yüzeyin orantılı bir şekilde küçülüp homojen bir şekilde erozyona uğradığı sistemlerde iyi sonuç vermektedir. Bu modelde ilaç salım hızını polimerik matristen difüzyonunun değil, ilaç moleküllerinin çözünme hızının belirlediği kabul edilmektedir (136).

Korsmeyer-Peppas modeli

Polimerik sistemlerden etkin maddenin kontrollü salım mekanizmasını inceleyen modellerin çoğu Fick difüzyon eşitliğine dayanmaktadır. Ancak, deneysel koşullarda salım mekanizması Fick eşitliğinden sapma gösterebilmektedir. Bu nedenle, değişik geometrik şekillerdeki polimerik sistemlerin kontrollü salım verilerinin değerlendirilmesinde Korsmeyer-Peppas tarafından önerilen Eşitlik 14'deki formülden yararlanılmaktadır.

$\log(\frac{Mt}{M\infty}) = \log k + n\log t$……...Eşitşil 14

Mt = t zamanında salınan etkin madde miktarı

$M\infty$ = ∞ zamanda salınacak etkin madde miktarı

k = salım sisteminin yapısal ve geometrik özelliklerini ifade eden kinetik sabit

n = salım mekanizmasını gösteren difüzyonel sabit

Bu model, salım mekanizmasının tam olarak bilinmediği veya birden fazla salım mekanizmasının geçerli olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Korsmeyer-Peppas eşitliği sink koşul altında yani salım ortamının sürekli olarak tazelendiği durumda ve sistemden etkin madde salımının ilk %60'lık ($M_t/M_\infty \leq 60$) kısmı için geçerlidir. Peppas tarafından önerilen "n" değerlerinin farklı geometrik şekildeki sistemler için salım mekanizmasına göre değişimi Tablo 48'de verilmiştir (137).

Tablo 48. Farklı geometrik şekildeki salım sistemleri için "n" parametresinin değerleri ve salım mekanizmaları

İnce Film	Silindir	Küre	Salım mekanizması
0,5	0,45	0,43	Fick'e uygun difüzyon (Durum 1)
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Fick'e uymayan (Anormal geçiş)
1	0,89	0,85	Durum 2
$n > 1$			Süper-durum 2 geçiş

Hazırlanan oküler mikroemülsiyon formülasyonlarından etkin madde salımı; etkin maddenin ilaç taşıyıcı sistem içindeki difüzyonu, taşıyıcının degradasyonu veya erozyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Salımı etkileyen parametreler ise; formülasyonun tipi, hazırlama yöntemi, partikül şekli ve büyüklüğü, etkin maddenin özellikleri, kullanılan polimer ve yardımcı maddelerin özellikleri olup, salım mekanizması kinetik modeller ile belirlenmektedir.

Bu amaçla tez kapsamında, kinetik çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda salım sonuçlarına beş farklı kinetik model (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi modeli, Hixson-Crowell modeli ve Korsmeyer-Peppas modeli) uygulandı ve formülasyonların salım mekanizmaları değerlendirildi.

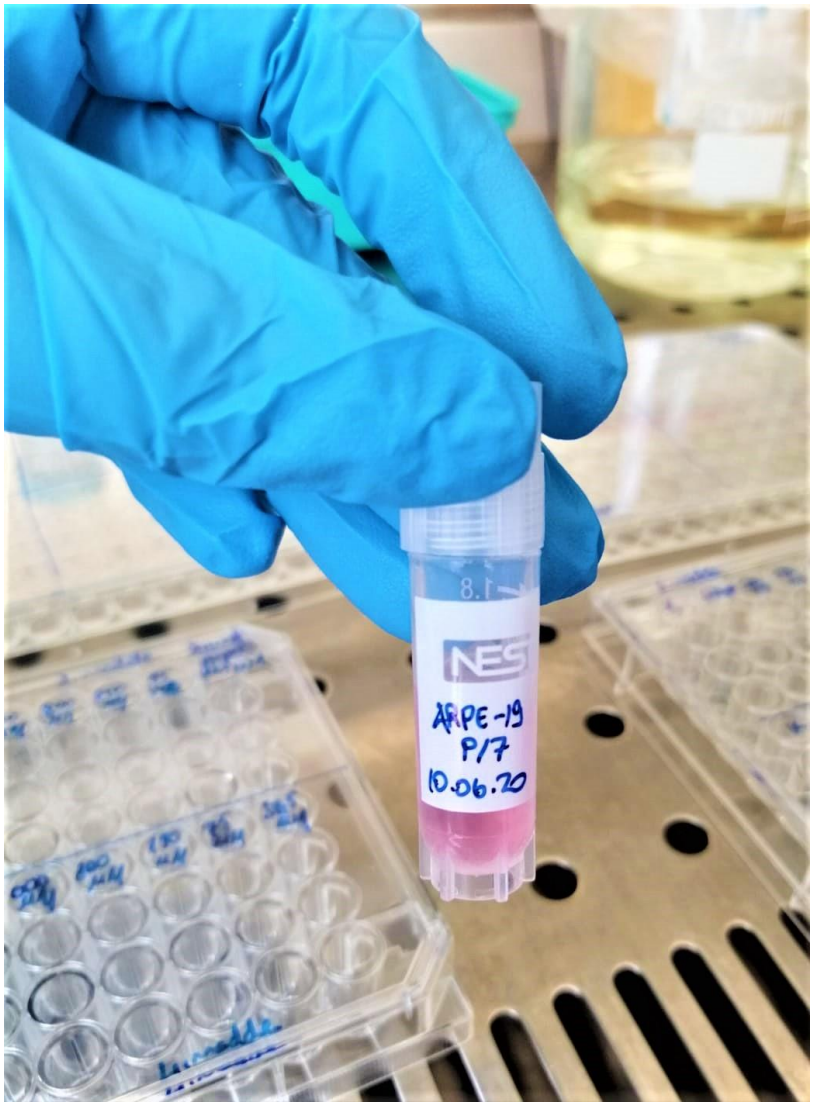
MTT YÖNTEMİ İLE TİMOKİNON ETKİN MADDESİNİN SİTOTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

İnsan retinal pigmentli epitel (ARPE-19; ATCC® CRL-2302™) hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınmış, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nden temin edilmiştir. ARPE-19, 1986 yılında bir motorlu taşıt kazasında kafa travmasından ölen 19 yaşındaki bir erkeğin normal gözlerinden Amy Aotaki-Keen tarafından türetilen, kendiliğinden ortaya çıkan retina pigment epitel (RPE) hücre hattıdır. Tablo 49'da ARPE-19 hüresine ait bilgiler verildi.

Tablo 49. ARPE-19 Hücre hattına ait bilgiler

Hücre adı	ARPE-19
Organizma	İnsan
Tipi	Epitel
Elde Edildiği Doku	Göz
Kültür Özellikleri	Yapışkan
Pasaj Sayısı	7



Şekil 20. ARPE-19 hücresinin dondurulması sonrası çözünmüş gösterimi

Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması

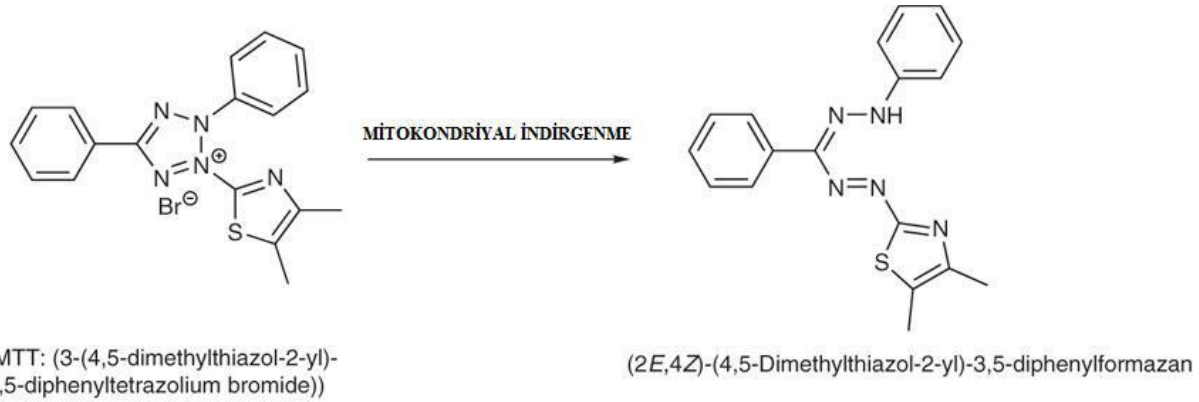
Çalışmada kullanılan hücre hattının kültüre alınması, pasajlanması ve kültür devamlılığı işlemlerinin tümü steril kültür odasında ve laminar kabin içerisinde yapıldı. Hücreler temin edildikten sonra %5 yeni doğan sığır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin ve %1 L-glutamin içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium): DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): HAMS F12 besin ortamı flasklara ekilerek 37 °C de %95 nem ve %5 CO_2 içeren etüve alındı. Hücrelerin yapışması ve diğer özellikleri invert mikroskop ile belirli zaman aralıklarında kontrol edilerek kültür devamlılığı sağlandı. Flask tabanına yapışan, sağlıklı bir şekilde çoğalan hücreler üç günde bir pasajlandı. Pasajlama işlemi için flaskta bulunan besiyeri uzaklaştırılarak içerisine 37 °C sıcaklığa getirilmiş olan tripsin-EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) eklendi ve 5 dakika süre ile hücrelerin flask tabanından

kalkması beklendi. Mikroskop ile tabandan kalktığı belirlenen hücre tripsin karışımı 15 mL'lik santrifüj tüplerine alındı. Bu tüpler daha sonra 2500 rpm' de 2.30 dakika santrifüj edilerek santrifüj sonunda tripsin uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler besiyeri ile karıştırılarak yeni flasklara ekildi.

Hücrelerin gerekli olduğu takdirde yeniden kullanılmak üzere dondurulması işleminde hücreler tripsin ile kaldırılarak santrifüj edildikten sonra %5 dimetil-sülfoksit (DMSO) içerecek şekilde hücre besiyeri karışımı eklendi ve -150 °C' de muhafaza edildi. Dondurulan hücreler yeniden kullanılacağı zaman ise 37 °C' de etüvde çözündürülüp önce santrifüj tüplerine alındı ve santrifüj işlemi ile içerisinde bulunan DMSO uzaklaştırıldı. Yeni besin ortamı eklenmesinden sonra hücre kültürü flasklarına ekilerek uygun şartlar altında inkübe edildi ve kültür devam ettirildi.

MTT Yöntemi ile Hücre Hatlarına Uygulanacak Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

MTT yöntemi, canlı hücrelerin mitokondri enzimleri tarafından indirgenen sarı renkli, MTT maddesi mor renkli suda çözünmeyen kristallere dönüşmektedir (Şekil 21). Meydana gelen kristallerin üzerine DMSO eklenmekte ve 492 nm'de absorbanslar belirlenmektedir. Belirlenen absorbanslara göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz (IC_{50}) değerleri hesaplanmaktadır.



Şekil 21. MTT'nin formazana dönüşümü (138)

Bu çalışma kapsamında TQ'un, TQ içermeyen formülasyonların (F3-1 ve F7-9) ve TQ içeren formülasyonlarının (F3-1-TQ ve F7-9-TQ) ARPE-19 hücre hattı üzerindeki etkinliğinin

belirlenmesi amacı ile MTT yöntemi uygulandı. Tablo 50'de verilen grupların MTT testleri yapıldı.

Tablo 50. Çalışmada kullanılan uygulama grupları

Uygulama Grubu	Grup İsimleri	Dozlar				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**
1. grup	Kontrol	x	x	x	x	x
2. grup	TQ (6000 µM)	600 µM	300 µM	150 µM	75 µM	37,5 µM
3. grup	F3-1	20 µL	10 µL	5 µL	2,5 µL	1,25 µL
4. grup	F7-9	20 µL	10 µL	5 µL	2,5 µL	1,25 µL
5. grup	F3-1-TQ (6640,24 µM)	664 µM	332 µM	166 µM	83 µM	41,5 µM
6. grup	F7-9-TQ (6703,72 µM)	670 µM	335 µM	168 µM	84 µM	42 µM

ARPE-19 Hücre Hattına Uygulanan TQ ve Formülasyonların IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak tüm maddelerin IC_{50} değerlerinin belirlenmesi için hücreler her bir kuyucukta $1x10^5$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 180 µL ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakılarak hücrelerin plakalara yapışması beklendi. Hücrelerin yapışmasının ardından maddeler uygulanarak IC_{50} değerleri belirlendi.

TQ, içerisinde %1 DMSO olacak şekilde steril suda çözüldü. Ardından son konsantrasyonlar 600 µM, 300 µM, 150 µM, 75 µM ve 37,5 µM olacak şekilde her bir kuyucuğa 20 µL uygulandı. F3-1 ve F7-9 her bir kuyucuğa 20 µL, 10 µL, 5 µL, 2,5 µL ve 1,25 µL olacak şekilde uygulandı. F3-1-TQ formülasyonunun TQ konsantrasyonu 6640,24 µM'dır. Son konsantrasyon olarak 664,024 µM, 332,012 µM, 166,006 µM, 83,003 µM ve 41,5015 µM olacak şekilde her bir kuyucuğa 20 µL uygulandı. F7-9-TQ formülasyonunun TQ konsantrasyonu 6703,72 µM'dır. Son konsantrasyon olarak 670,372 µM, 335,366 µM, 167,683 µM; 83,8415 µM ve 41,921 µM olacak şekilde her bir kuyucuğa 20 µL uygulandı. Böylece TQ içeren formülasyonlar aynı seyreltme oranıyla (1:10) hücre hattına uygulandı.

TQ ve formülasyonların uygulamalarından 24 ve 48 saat sonra her bir kuyuya 20 µL MTT solüsyonu (5 mg/mL) eklendi 2-4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda plakalardaki sıvı uzaklaştırılıp plakanın her bir kuyusuna 200 µL DMSO eklenerek mikroplaka okuyucu cihazda 492 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlendi. Belirlenen

absorbans değerlerine göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin % 50'sinin canlı kaldığı doz (IC_{50}) değeri Eşitlik 15'teki formüle göre hesaplandı.

$$\%\ Hücre\ Canlılığı = \frac{Örnek\ Absorbans\ Değeri}{Kontrol\ Absorbans\ Değeri}\ x\ 100 \quad \text{.....Eşitlik 15}$$

Hen's Egg Chario-Allontioc-Membran (HET-CAM) Testi

Karyoallontoik Membran (CAM) üzerinde Hen'in Yumurta Testi, embriyolu tavuk yumurtasının karyoallontoik membranını kullanarak aşındırıcı ve/veya şiddetli oküler tahriş edicilerin tahliline yönelik hayvan deneyleri için başka bir alternatif yöntemdir. Bu test, konjonktivanın potansiyel tahrişini belirlemek için bu membrana verilen hasarı değerlendirir. Test maddesinin, zarın yumuşak dokusunun küçük damarları ve proteinleri üzerindeki akut etkilerinin, tavşanların gözlerindeki maddelerin neden olduğu etkilere benzer olduğu varsayılmaktadır.

HET-CAM, Luepke tarafından 1985 yılında tahriş edici/aşındırıcı potansiyeli test etmek için tanımlandı ve test maddesinin embriyolu tavuk yumurtasının zarındaki katılar veya sıvılar üzerindeki ani etkilerinin araştırılmasına izin verdi. Bu yöntem uluslararası geçerliliğe sahiptir. Karyoallantoik Membran, arterler, damarlar ve kılcal damarlar içeren eksiksiz bir dokudur ve teknik olarak incelenmesi kolaydır. CAM, tavşanların gözlerinin konjonktival dokusunda gözlenene benzer bir inflamatuar süreçle yaralanmaya yanıt verir (Draize testi). İyi gelişmiş vaskülarizasyonu oküler tahriş çalışmaları için ideal bir model sağlar. Yöntemin prensibi, döllenmiş yumurtaların karyoallantoik membranındaki (7 ila 8 günlük gelişim) test maddesine (katı, 0.3 g ve sıvı, 0.1 ila 0.3 mL) dayanır ve sonuçlar tahriş tipine (lizis, kanama veya pıhtılaşma) (139).

HET-CAM testi, EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) tarafından oküler irritasyon *in vitro* çalışması için sunulan alternatiflerden metotlardan biridir.

Test, ICCVAM (Alternatif Yöntemlerin Doğrulanmasına İlişkin Kurumlararası Koordinasyon Komitesi) test yöntemine göre yapıldı (140). HET-CAM testi, test edilecek maddenin irritasyon potansiyelini sınıflandırmaya dayalı, farklı analiz yöntemleri ile hesaplanan bir Irritasyon Skoruna (IS) dayanmaktadır. IS analiz yöntemi, test maddesinin uygulanmasından sonra 0.5, 2 ve 5 dakikada belirtilen zaman noktalarında gözlemlenmesi ile gerçekleştirilir. Oküler mikroemülsiyonların irritasyon etkisini değerlendirmek için yumurta

çiftliğinden (Tekirdağ) temin edilen döllenmiş yumurtalar 8 gün boyunca 37°C sıcaklığında ve %60 ± 2 nem oranında inkübe edildi (Şekil 22). İnkübasyonun ardından embriyolu yumurtalarda embriyonun varlığını tespit etmek için ışık ile kontrol yapıldı ve yumurta kabukları %70'lik alkol ile temizlenerek koryoallantoik mebranı görünür hale getirmek için kabukta 2 cm çapında bir pencere açıldı. Kabuktaki pencereler açıldıktan sonra koriyoallantoik membrana numuneler uygulandı ve makro çekimli fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi. Embriyolu yumurtalar negatif kontrol (%0.9 NaCl), pozitif kontrol (0.1 N NaOH) ve F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonları test maddesi olarak 0.3 mL olarak uygulandı. Maddelerin etkisini belirlemek için koriyoallantoik membranlar 0.5dk, 2 dk ve 5 dk sürelerle değerlendirildi. Maddenin etkisi belirlenerek skorlama yapıldı. Maddelerin irritasyon skorları kanama (damarlardan kanama), vasküler lizis (kan damarları parçalanması) ve pıhtılaşma (damar içi ve damar dışı protein denatürasyonu) bakımından Tablo 51, Tablo 52 ve Tablo 53'teki gibi değerlendirildi ve Eşitlik 16 ile hesaplandı (139, 140). Her bir numune CAM'a 5 kez uygulandı.



Şekil 22. Embriyolu yumurtaların inkübasyona hazırlanması

Tablo 51. İrritasyon skor tablosu (140)

Etki	Skor		
	0.5 dakika	2 dakika	5 dakika
Lizis	5	3	1
Kanama	7	5	3
Pıhtılaşma	9	7	5

$\left(\frac{301-Kanama\ Süresi}{300}\ x\ 7\right)+\left(\frac{301-Lizis\ Süresi}{300}\ x\ 5\right)+\left(\frac{301-Pıhtılaşma\ Süresi}{300}\ x\ 9\right)$ .Eşitlik 16 (139)

Tablo 52. Vasküler etkileri gözlemin tanımı ile karşılaştıran puanlar (139)

Vasküler Etkiler	Skor	Açıklama
0	0	Hiçbir reaksiyon gözlemlenmedi, CAM normal
Hayalet damarlar	1	Kan akışından yoksun, net görünen damarlar

Tablo 52 devam. Vasküler etkileri gözlemin tanımı ile karşılaştıran puanlar (139)

Kılcallaşma	2	CAM'ın küçük kan damarlarında hiperime veta artmış kan akışı
Minimal kanama	3	Halka alanının %25'inden fazlasını kaplayan kanama potansiyeli
Hafif kanama	4	Halka alanının %25-50'sini kaplayan kanama potansiyeli
Orta derece kanama	5	Halka alanının %50-75'ini kaplayan kanama potansiyeli
Şiddetli kanama	6	Halka içindeki alanın >%75'i kan havuzlarıyla kaplıdır, karanlık alanlar kabuk olarak oluşabilir

Tablo 53. Skorların tahriş kategorisi ile ilişkisi (139)

Skor	Tahriş Kategorileri
0-0,9	Tahriş edici olmayan
1-4,9	Zayıf veya hafif tahriş
5-8,9 / 5-9,9	Orta derece tahriş
9-21 / 10-21	Güçlü veya şiddetli tahriş

İstatistiksel Analizler

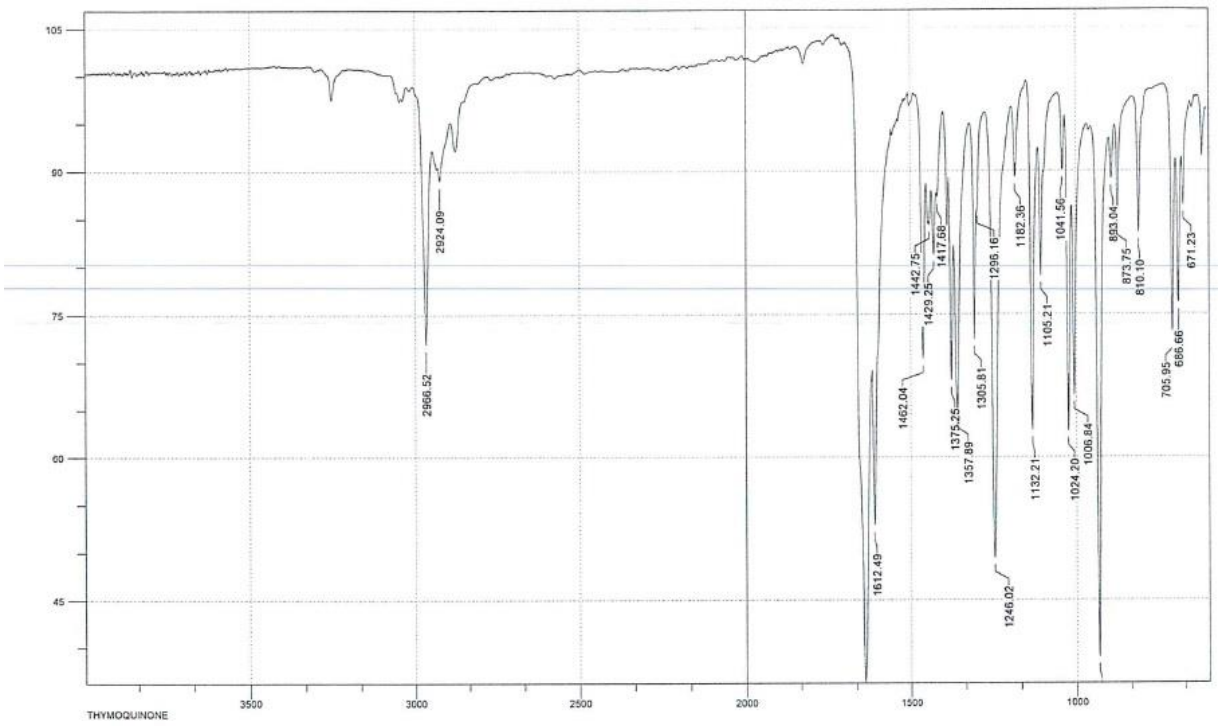
Tüm anatilik metot geliştirme ve validasyon çalışmalarında, *in vitro* ve *ex vivo* deneylerin istatistiksel analizleri SPSS istatistik programı kullanılarak, tek yönlü ANOVA testi yapıldı ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ile yapılarak değerlerin kontrol grupları ile karşılaştırılarak anlamlılık değerleri hesaplandı.

BULGULAR

TİMOKİNON'UN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BULGULARI

Timokinon'un İnfrared Spektrumu Analizi Bulguları

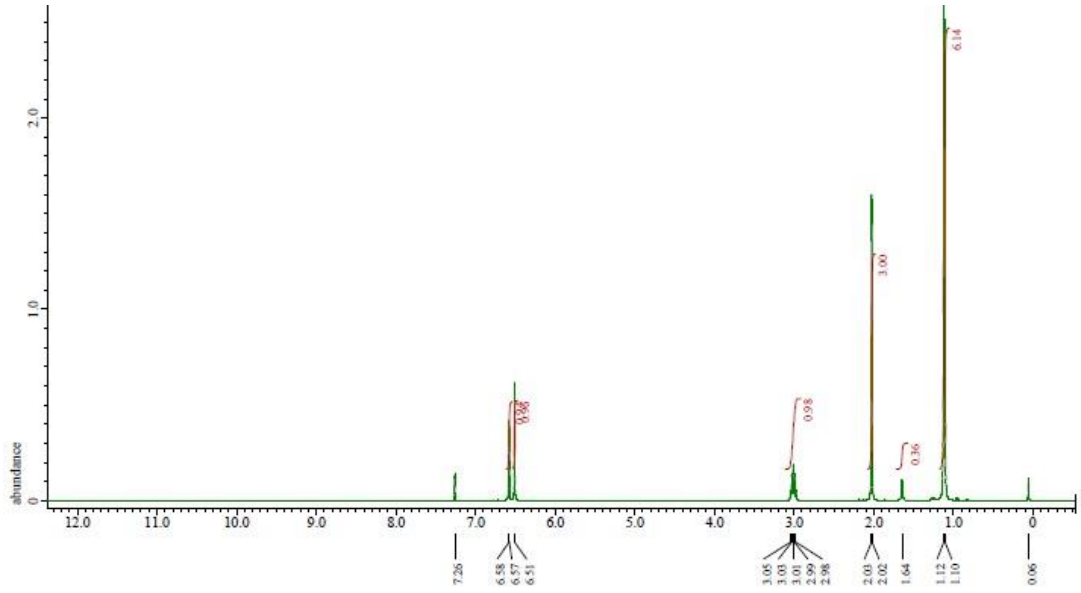
TQ'nun Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi çalışıldı. Elde edilen IR spektrumunun gösterdiği absorpsiyon bantları 2966,52; 2924,09; 1641,42; 1612,49; 1462,04; 1442,75; 1429,25; 1417,68; 1375,25; 1357,89; 1305,81; 1246,02; 1182,36; 1132,21; 1105,21; 1006,84; 897,04; 873,75; 810,10; 705,95; 686,66 ve 671,23 cm^{-1} olarak bulundu. Bu değerler literatürde TQ için verilen IR bantlarıyla uyumlu bulundu (141). TQ'ya ait IR spektrumu Şekil 23'te görülmektedir.



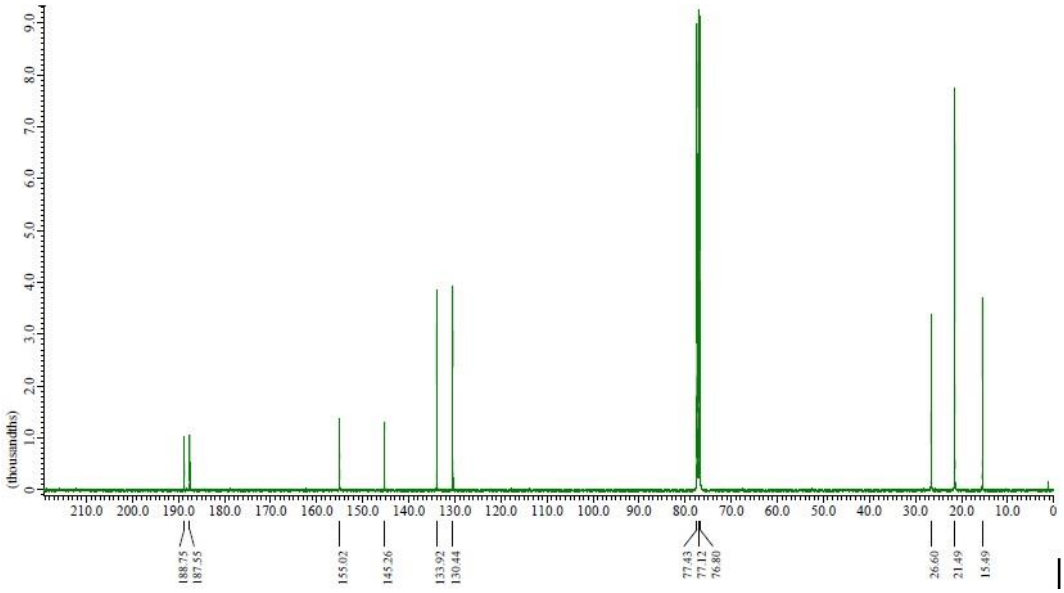
Şekil 23. TQ'nun IR spektrumu

Timokinon'un Nükleer Manyetik Rezonans Analizi Bulguları

TQ'nun NMR analizi çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. TQ'nun ^{1}H NMR grafiği Şekil 24 ve ^{13}C NMR grafiği Şekil 25'te gösterildi. Bu değerler literatürde TQ için verilen NMR bantlarıyla uyulu olduğu belirlendi (142).



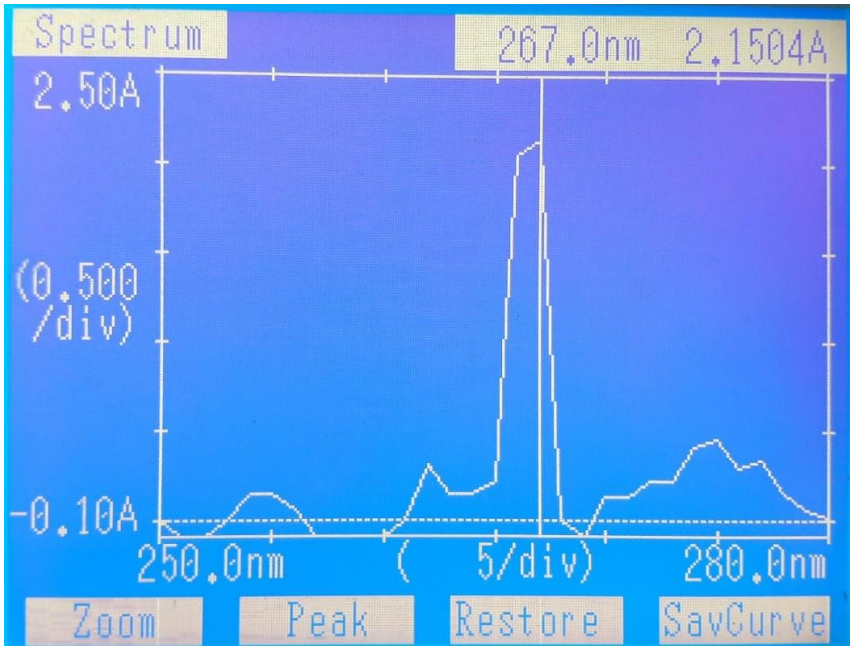
Şekil 24. TQ'nun 1H NMR analizi grafiği



Şekil 25. TQ'nun 13C analizi grafiği

Timokinon'un Ultraviyole Spektrofotometre Analizi Bulguları

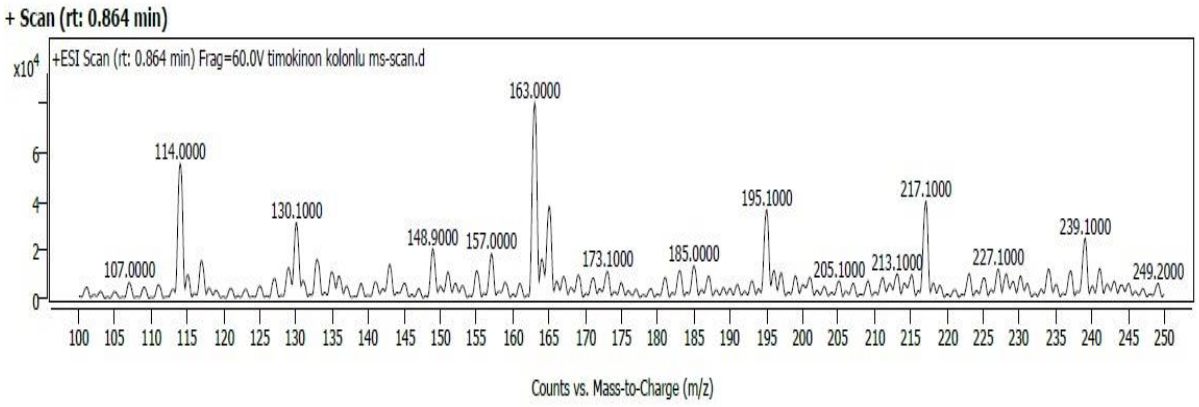
TQ'nun UV spektrumu Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. TQ'nun pH 7,4 PBS ile seyreltilmesiyle 0,002M (0,4 mg/mL) konsantrasyonda, maksimum absorbans 2,1504 A, gösterdiği maksimum dalga boyu (λ_{max}) 267 nm olarak bulundu. Bulunan değerin literatürdeki verilere yakın olduğu gösterildi (143). Şekil 26'da TQ'nun elde edilen UV spektrumu gösterildi.



Şekil 26. TQ'nun UV spektrumu

Timokinon'un Kütle Spektrum Analizi Bulguları

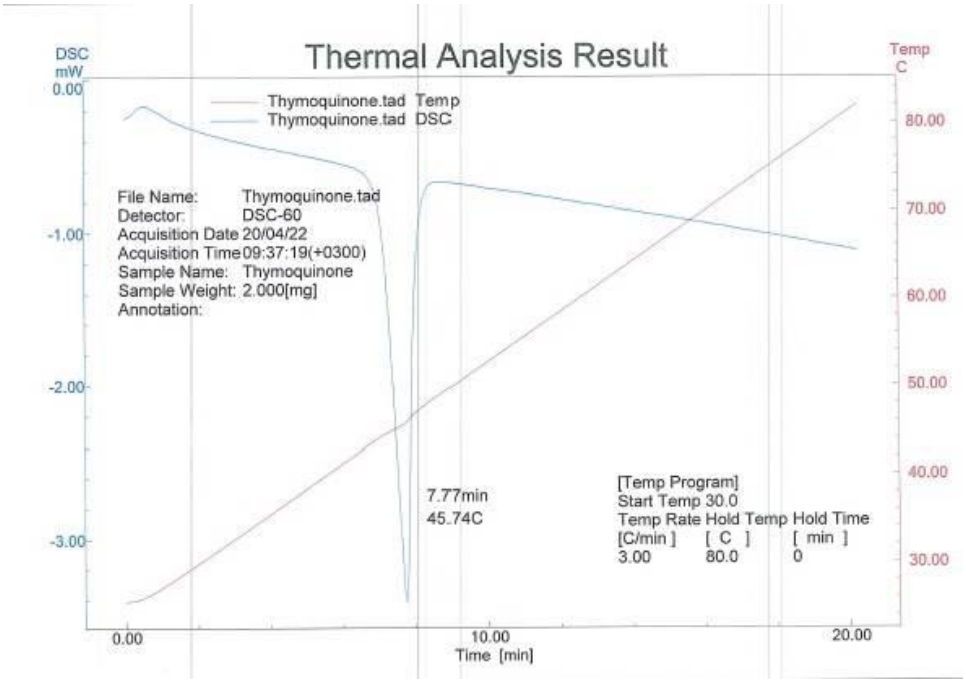
Konsantrasyonu bilinen (2 µg/mL) TQ etkin madde çözeltisi kütle spektrum analizi için 60 V fragmantör voltajında LC-MS/MS cihazına uygun koşullarda enjekte edildi ve kütle/elektriksel yük oranına (m/z) göre en yüksek bağıl bolluğu saptandı. Şekil 27'de TQ'nun elde edilen kütle spektrumu gösterildi. Elde edilen spektrumun literatür ile uyumlu olduğu belirlendi (144).



Şekil 27. TQ'a ait 60 V fragmentör voltaj altında elde edilen MS/MS spektrumu

Timokinon'un Termal Analizi Bulguları

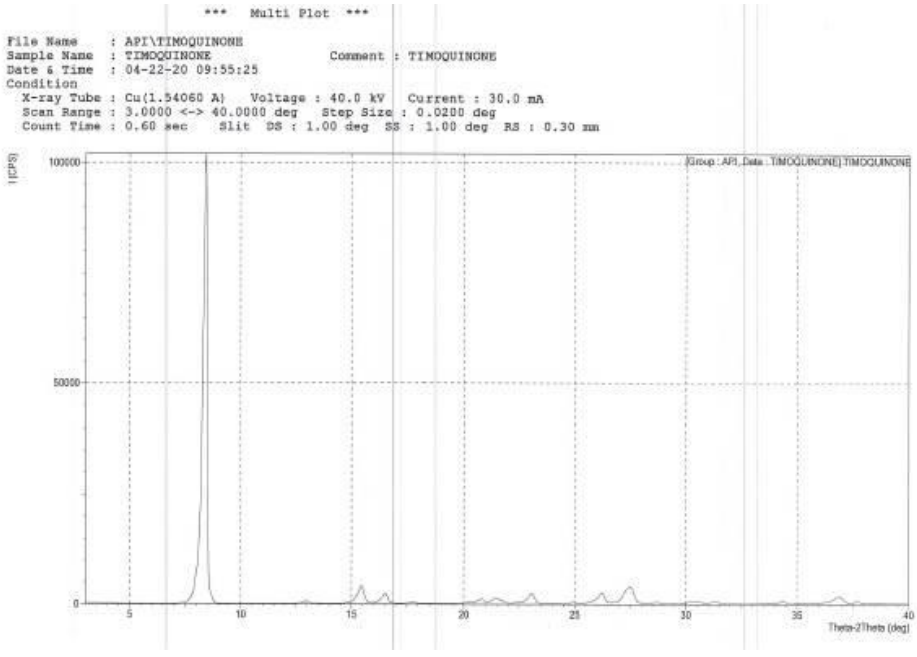
TQ'nun termal analizi çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. TQ'nun termal analiz grafiği Şekil 28'de gösterildi. TQ'nun erime derecesi 45,74 °C olarak bulundu. Elde edilen sonucun literatür ile uyumlu olduğu gösterildi (141).



Şekil 28. TQ'nun DSC ile elde edilen termal analiz grafiği

Timokinon'un X-ışını Kırınımı Analizi Bulguları

TQ'nun XRD analizi çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. TQ'nun XRD grafiği Şekil 29'da gösterildi. Elde edilen değer literatür ile uyumlu olduğu gösterildi (141).



Şekil 29. TQ'nun XRD grafiği

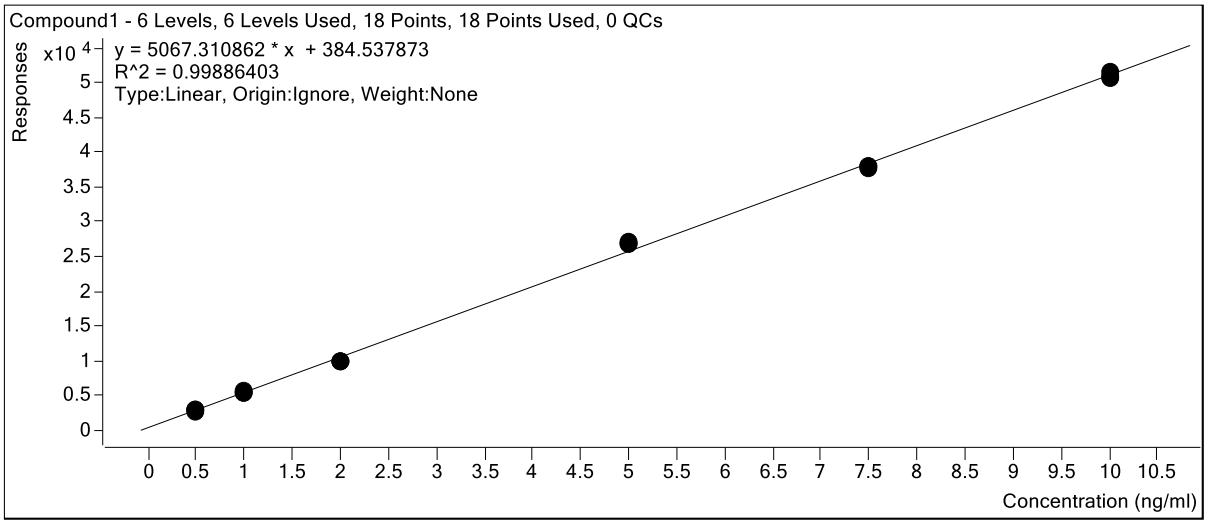
TİMOKİNON'UN YÖNTEM VALİDASYONLARI BULGULARI

LC-MS/MS Yönten Validasyon Çalışmaları Bulguları

LC-MS/MS analiz koşulları bulguları: Cihazla ilgili ölçüm parametreleri TQ standart çözeltisi ile optimize edildi. TQ maddesinin analizinde iyon kaynağı olarak elektrospray iyonlaşma, iyon modu olarak pozitif mod ve kolon olarak Poroshell EC C_{18} (5µm, 150 x 3 mm) 10 µL'lik enjeksiyon hacminde 0,6 mL/dk akış hızı ile çalışıldı. Kütle spektrometresi analizleri Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler, manuel integrasyonla elde edilen pik alanları esas alınarak gerçekleştirildi. Metot optimizasyon aşamasında, hareketli faz seçimi için metanol ve asetonitril karşılaştırıldı ve asetonitril daha avantajlı olduğu görülmüştür. Geliştirilecek yöntem için en iyi ayrımın sağlanması amacıyla optimum koşullar saptandı.

Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi Bulguları

Yöntemde belirtildiği gibi hazırlanan altı farklı konsantrasyon aralığında (0,5 – 10 µg/mL) kalibrasyon eğrisi çizildi ve her standart cihaza üç kez enjekte edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisi ile doğru denklemi, regresyon katsayısı ve eğim hesaplandı. Doğru denklemi y = 5067,311x + 384,538, regresyon katsayısı 0,9989 değerin bulunup lineer olduğu ispatlandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 30'da gösterilmiştir.



Şekil 30. TQ'nun LC-MS/MS için hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) Bulguları

TQ'nun LC-MS/MS ile analizi yönteminde gözlenebilme sınırı (LOD) 0,854 µg/mL ve tayin alt sınırı (LOQ) 2,846 µg/mL olarak bulundu. Tablo 54'te veriler verildi.

Tablo 54. TQ'nun LOD ve LOQ hesaplamaları için kullanılan veriler

Stadartlar	$\acute{y}_i$	Yanıt	y_i	n	SS	LOD	LOQ
0,5 µg/mL	2912	2845	2829	3	1442,2	0,854 µg/mL	2,846 µg/mL
		2825					
		2818					
1 µg/mL	5448	5513	5537				
		5596					
		5501					
2 µg/mL	10543	9924	9966				
		9990					
		9984					
5 µg/mL	25702	27062	26888				
		26748					
		26853					
7,5 µg/mL	38395	37827	37826				
		37704					
		37948					
10 µg/mL	51060	50733	51003				
		50790					
		51485					

Doğruluk ve Gün İçi Tekrarlanabilirlik Sonuçları

TQ standart çözeltilerinin oluşturduğu doğruluk parametreleri bulguları Tablo 55'te verildi. Her standart cihaza üç kez enjekte edildi ve yöntemin gün içi tekrarlanabilirliği gösterildi. %VK değerleri % 0,13 – 0,82 arasında bulundu ve yöntemin doğruluğu ispatlandı.

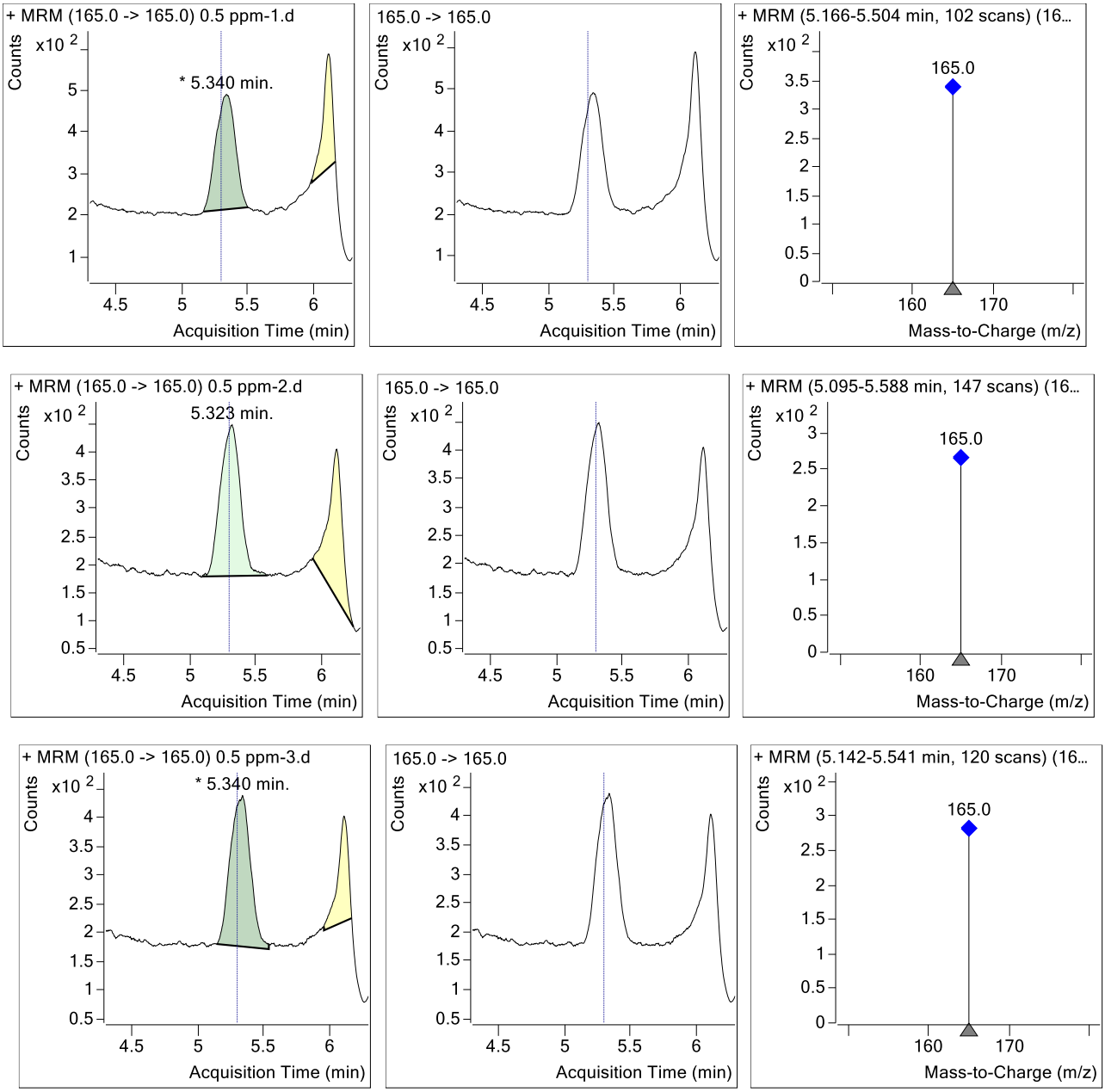
Tablo 55. TQ standart çözeltilerinin yöntemdeki doğruluk değerleri

Konsantrasyon	Beklenen Kons.	Final Kons.	Doğruluk	Ortalama Doğruluk	SS	VK(%)
0,5 µg/mL standardı	0,5000	0,4861	97,22	96,57	0,46483	0,48134
0,5 µg/mL standardı	0,5000	0,4823	96,33			
0,5 µg/mL standardı	0,5000	0,4808	96,16			

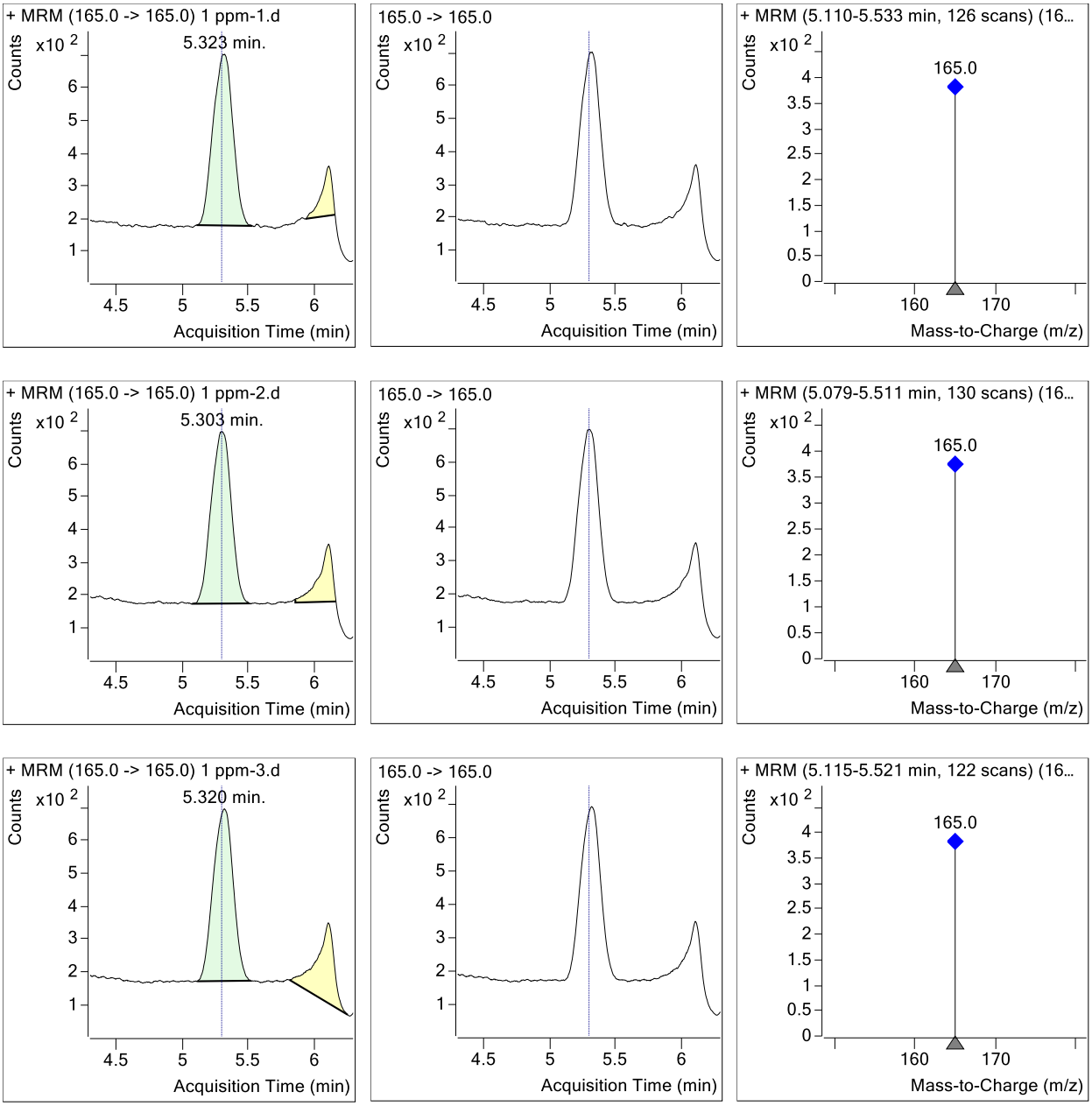
Tablo 55 devam. TQ standart çözeltilerinin yöntemdeki doğruluk değerleri

1 µg/mL standardı	1,0000	1,0120	101,2	101,68	0,83452	0,82073
1 µg/mL standardı	1,0000	1,0285	102,85			
1 µg/mL standardı	1,0000	1,0098	100,98			
2 µg/mL standardı	2,0000	1,8825	94,14	94,55	0,2886	0,30523
2 µg/mL standardı	2,0000	1,8956	94,78			
2 µg/mL standardı	2,0000	1,8945	94,72			
5 µg/mL standardı	5,0000	5,2645	105,29	104,6	0,51493	0,49229
5 µg/mL standardı	5,0000	5,2027	104,05			
5 µg/mL standardı	5,0000	5,2233	104,47			
7,5 µg/mL standardı	7,5000	7,3890	98,52	98,35	0,13098	0,13318
7,5 µg/mL standardı	7,5000	7,4129	98,2			
7,5 µg/mL standardı	7,5000	7,4129	98,34			
10 µg/mL standardı	10,0000	9,9359	99,36	99,89	0,67325	0,67399
10 µg/mL standardı	10,0000	9,9472	99,47			
10 µg/mL standardı	10,0000	10,0844	100,84			

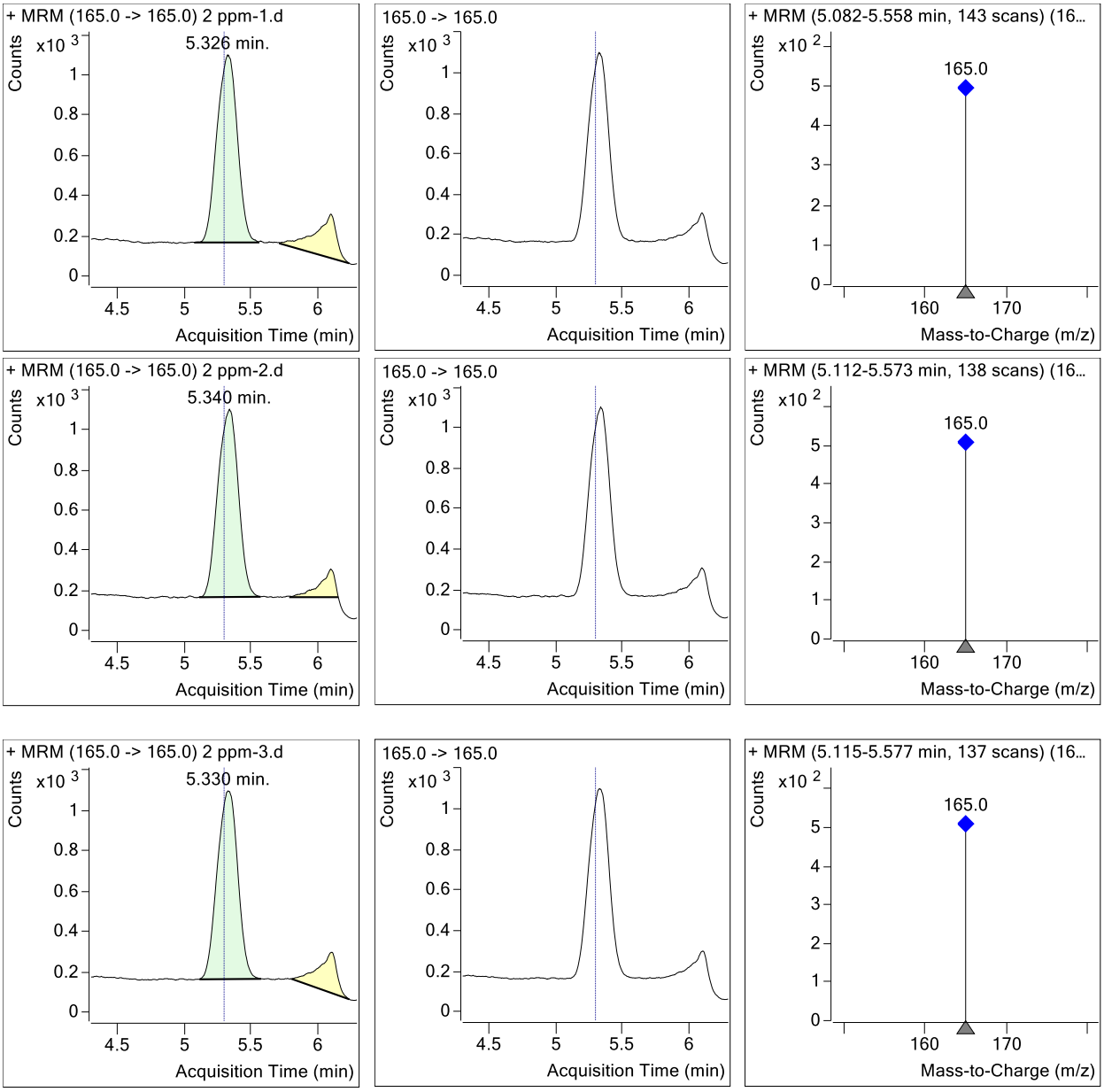
Aşağıda Şekil 31 ila Şekil 36'da kalibrasyon eğrisini oluşturan standartlar için kromatogramları verildi. Her bir standart üç kez tekrarlandı ve metotta tekrarlanabilirliğini gösterildi.



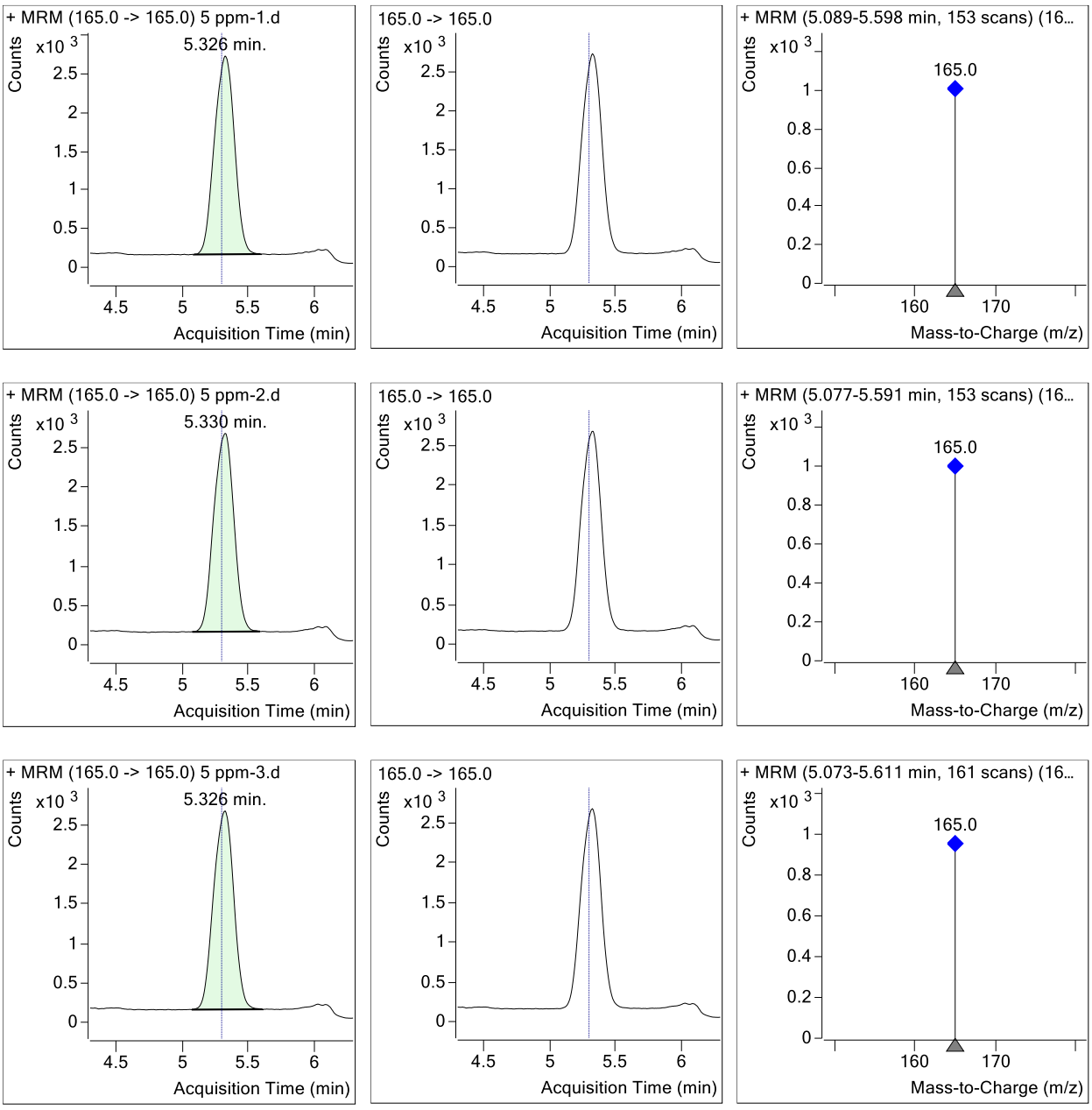
Şekil 31. 0,5 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



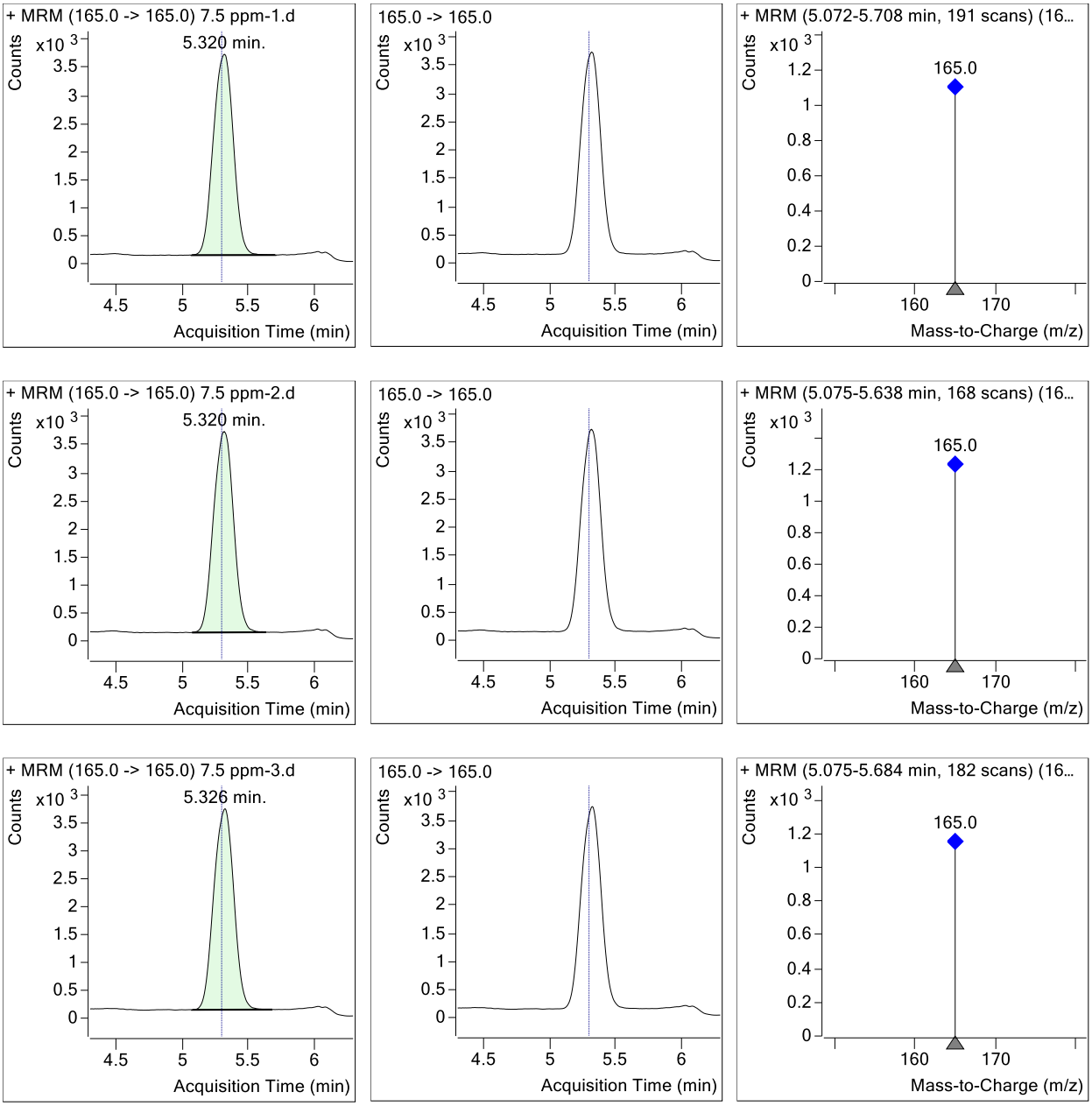
Şekil 32. 1,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



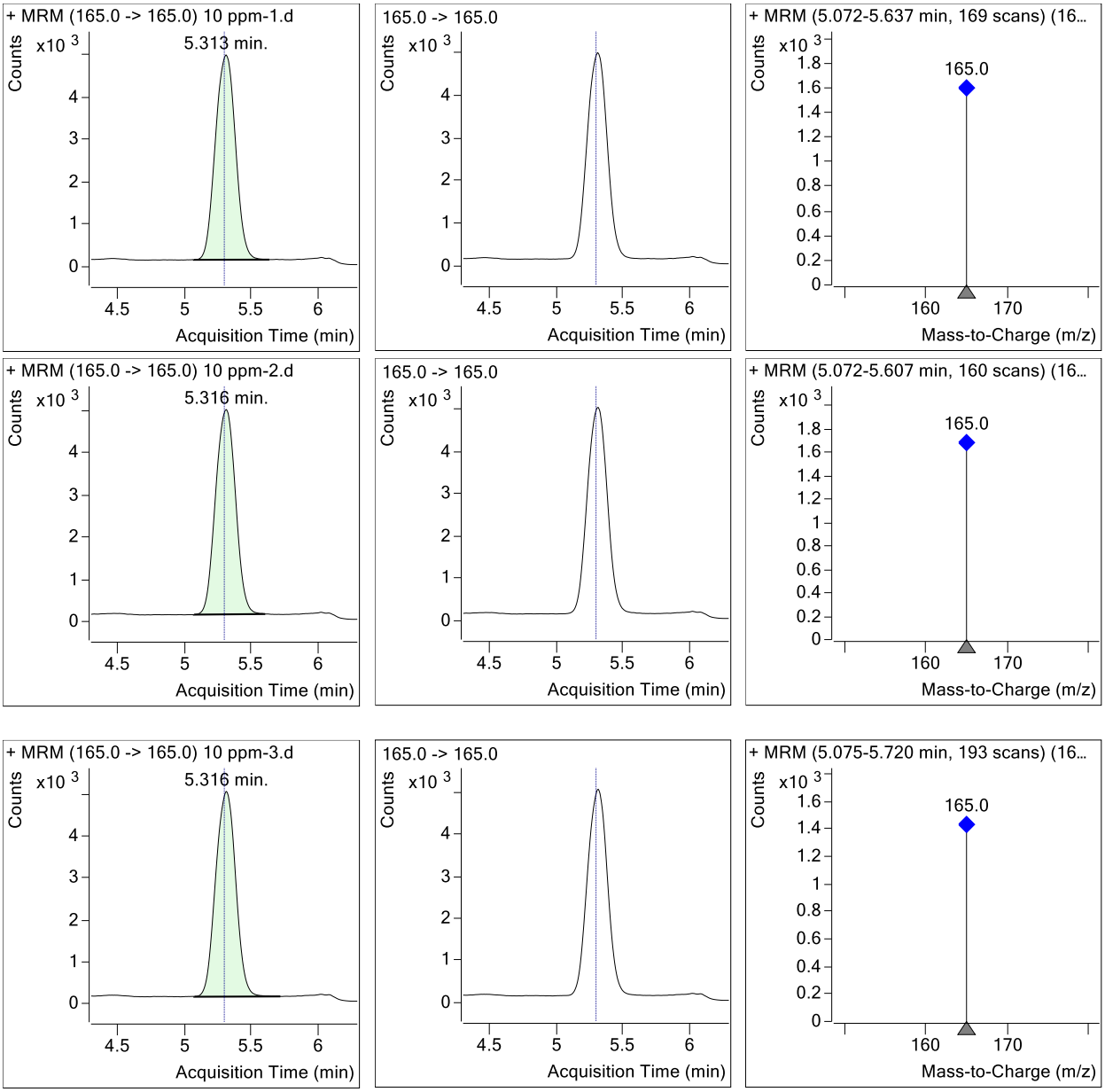
Şekil 33. 2,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



Şekil 34. 5,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



Şekil 35. 7,5 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



Şekil 36. 10,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu

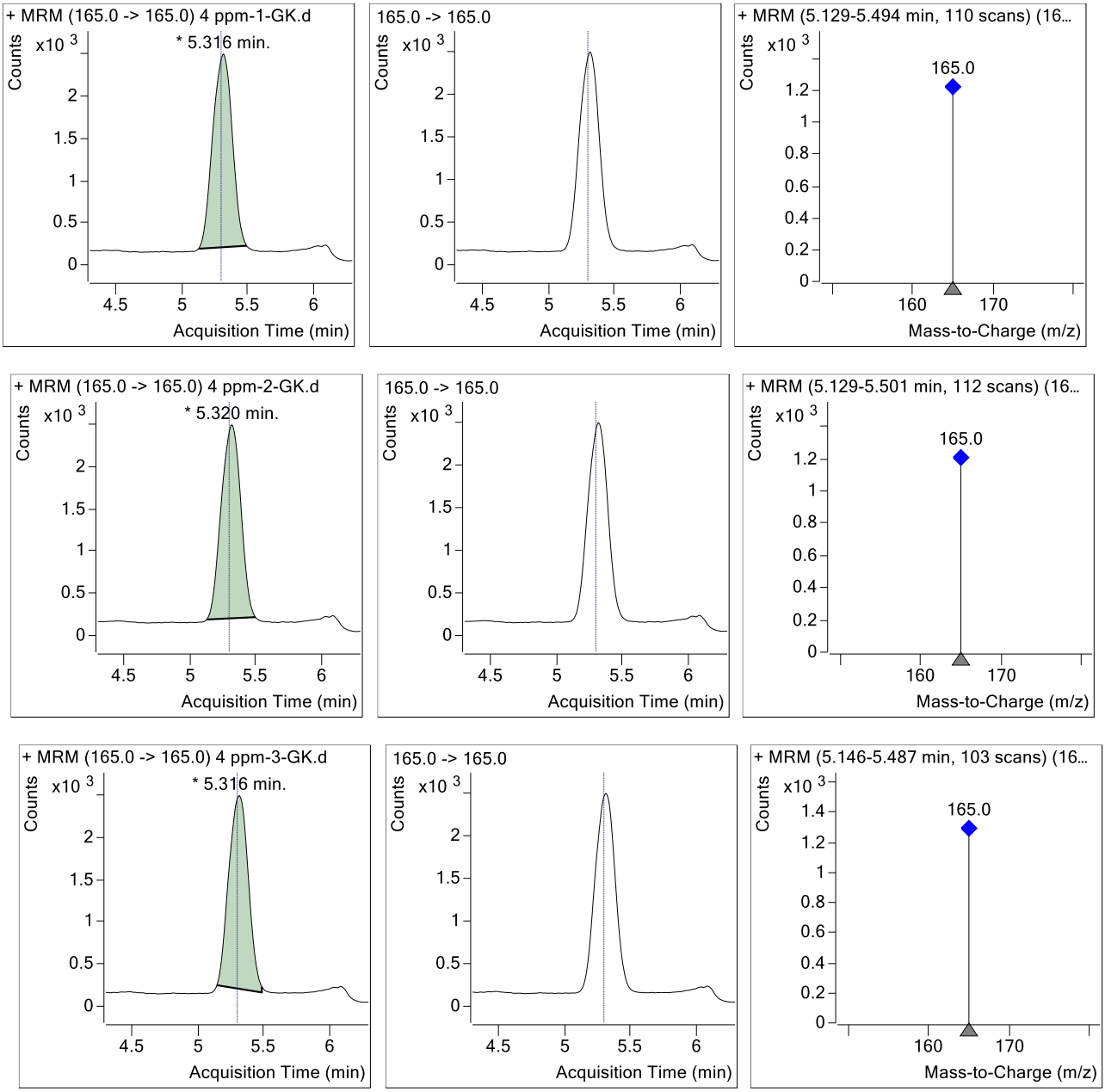
Analitik Geri Kazanım

Analitik geri kazanım için 4 µg/mL ve 8 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan TQ standart çözeltilerinin geri kazanım sonuçları aşağıda Tablo 56'da gösterildi.

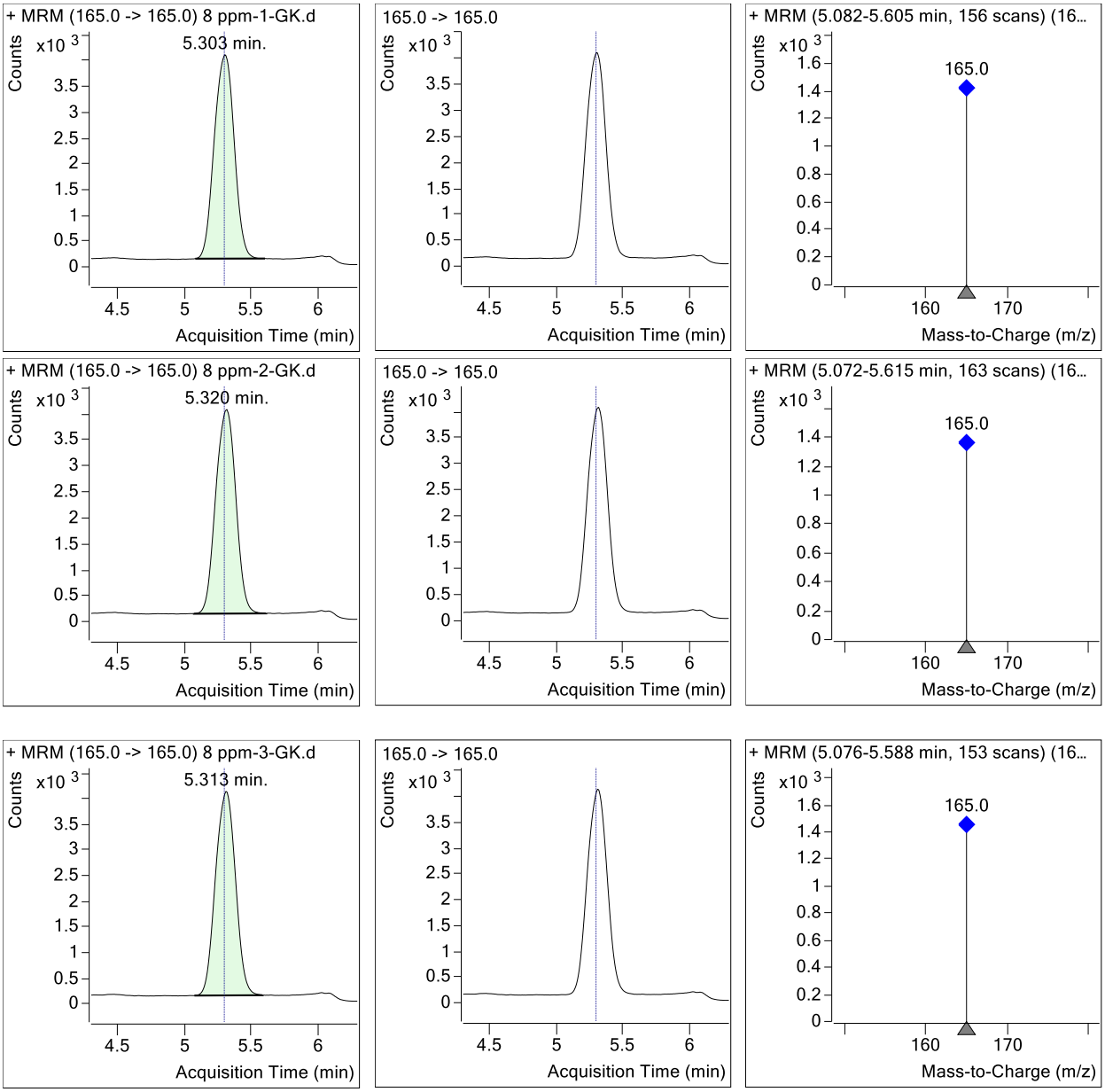
Tablo 56. TQ'nun analitik yönteme ilişkin geri kazanım sonuçarı

Konsantrasyon	Beklenen Kons.	Final Kons.	Geri Kazanım (%)	Ortalama GK (%)	SS	VK(%)
4 µg/mL standardı	4,0000	4,5469	113,6725	113,87	0,25785	0,22644
4 µg/mL standardı	4,0000	4,5694	114,235			
4 µg/mL standardı	4,0000	4,5482	113,705			
8 µg/mL standardı	8,0000	8,0241	100,3	100,72	0,44289	0,43973
8 µg/mL standardı	8,0000	8,0416	100,52			
8 µg/mL standardı	8,0000	8,1061	101,33			

Aşağıda Şekil 37 ve Şekil 38'de geri kazanım için oluşturulan standartlar için kromatogramları verildi. Her bir standart üç kez tekrarlandı ve metotta tekrarlanabilirliğini gösterildi.



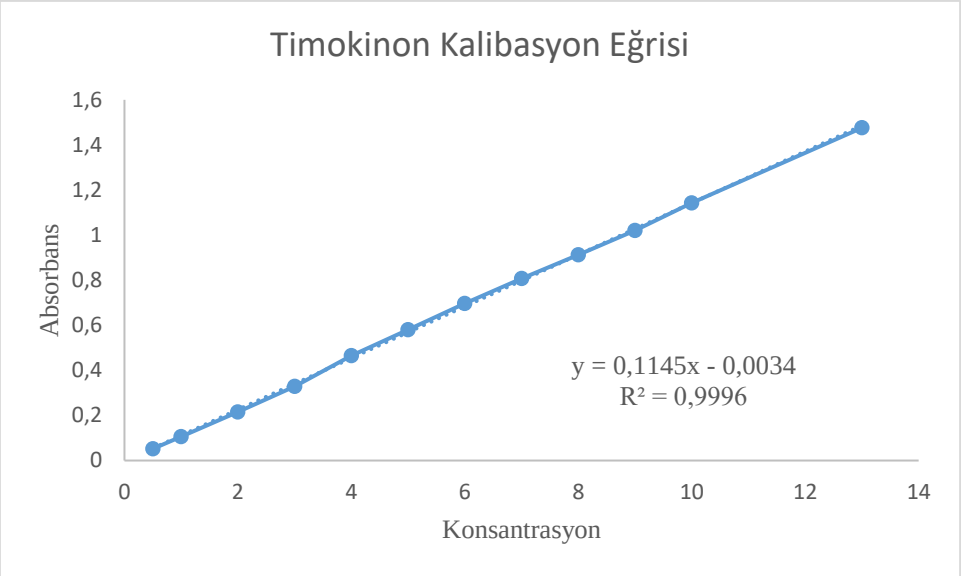
Şekil 37. 4,0 µg/mL TQ geri kazanım standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



Şekil 38. 8,0 µg/mL TQ geri kazanım standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu

UV-vis Spektrofotometre Validasyon Çalışmaları Bulguları

UV-vis spektrofotometre için standart eğri çizimi bulguları: TQ' nun *in vitro* salım çalışmaları için pH 7,4 PBS ile kalibrasyon eğrisi deneysel yöntem bölümünde anlatıldığı gibi çalışılarak çizildi. Kalibrasyon eğrisi Şekil 39'da gösterilmiştir.



Şekil 39. TQ kalibrasyon eğrisi

Analitik yöntem bulguları:

1- Özgünlük bulguları: *İn vitro* salım sonucunda bulunan absorbans değerlerinin etkin maddeye ait olduğunu kanıtlamak için formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler ile absorbansların benzer olup olmadığı kontrol edildi.

2- Doğrusallık bulguları: Basit doğrusal regresyon analiziyle analitik yöntemin doğrusallığı değerlendirildi. 0,5-13 µg/mL konsantrasyon aralığında TQ için yöntemin doğrusal olduğu belirlendi.

Regresyon doğrusunun denklemi grafik üzerinde belirtildi, regresyon katsayısı R^2 = 0,9996; kesişim 0,0034 ve eğim 0,1145 bulundu. Yapılan *t*-testiyle kesişimin sıfırdan farksız $p_{kesişim} = 0.0003$, dolayısıyla anlamlı ($p < 0.05$), eğimin sıfırdan farklı $p_{eğim}$ = 0,0001, dolayısıyla anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulgusu elde edildi. Regresyon analizi sonucunda kalibrasyon eşitliği elde edildi ve TQ'nun miktar tayini hesaplamaları bu eşitliğe göre yapıldı.

3- Doğruluk ve geri elde bulguları: Analitik yöntemin doğruluk parametresi, her bir konsantrasyon için yüzde geri kazanım olarak Tablo 57'de gösterildi.

Tablo 57. TQ'un analitik yöntemine ilişkin geri kazanım sonuçları

Doğruluk Çözeltisi	**TQ miktarı (µg)**	**Hesaplanan TQ miktarı (µg)**	**Geri Kazanım (%)**	**Ortalama Geri Kazanım (%)**	**SS**	**VK (%)**
Doğruluk Çözeltisi (a) - 1	0,5	0,50	100,00	100	0,00	0,00
Doğruluk Çözeltisi (a) - 2	0,5	0,50	100,00			
Doğruluk Çözeltisi (a) - 3	0,5	0,50	100,00			
Doğruluk Çözeltisi (b) - 1	6	5,98	99,67	100,06	0,42	0,42
Doğruluk Çözeltisi (b) - 2	6	6,03	100,50			
Doğruluk Çözeltisi (b) - 3	6	6,00	100,00			
Doğruluk Çözeltisi (c) - 1	13	13,02	100,15	100,08	0,08	0,07
Doğruluk Çözeltisi (c) - 2	13	13,00	100,00			
Doğruluk Çözeltisi (c) - 3	13	13,01	100,08			

*: Standart Sapma
**: Varyasyon katsayısı (Bağıl standart sapma)

Yapılan doğruluk analizleri sonucunda her bir konsantrasyon düzeyi için elde edilen yüzde geri kazanım sonuçlarının % 100'e yakın bulundu, %VK değerleri % 0,00 – 0,42 arasındadır, elde edilen sonuçlar doğrultusunda analitik yöntemin doğruluğu kanıtlandı.

4- Kesinlik/Ara kesinlik bulguları: Kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olarak değerlendirildi. Tekrarlanabilirlik; her bir konsantrasyon için, gün içerisinde elde edilen sonuçların %VK değerleri 2.0'den büyük değildir. Yapılan kesinlik çalışmalarına ilişkin sonuçlar Tablo 58 ila Tablo 61'de verildi.

Tablo 58. TQ için birinci gün elde edilen kesinlik sonuçları

Kesinlik Çözeltisi	Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Ort.	SS	VK(%)
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) - 1	1	1,01	1,01	0,0000	0,0000
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) - 2	1	1,01			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) - 3	1	1,01			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) - 1	7	6,99	6,99	0,0000	0,0000
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) - 2	7	6,99			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) - 3	7	6,99			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) - 1	10	9,98	9,99	0,0115	0,1156
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) - 2	10	10,00			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) - 3	10	10,00			

Tablo 59. TQ için ikinci gün elde edilen kesinlik sonuçları

Kesinlik Çözeltisi	Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Ort.	SS	VK(%)
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (a) - 1	1	0,96	0,96	0,0000	0,0000
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (a) - 2	1	0,96			
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (a) - 3	1	0,96			
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (b) - 1	7	6,83	6,83	0,0058	0,0845
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (b) - 2	7	6,82			
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (b) - 3	7	6,83			
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (c) - 1	10	9,98	9,98	0,0000	0,0000
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (c) - 2	10	9,98			
Kesinlik 2. gün Çözeltisi (c) - 3	10	9,98			

Tablo 60. TQ için üçüncü gün elde edilen kesinlik sonuçları

Kesinlik Çözeltisi	Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Ort.	SS	VK(%)
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (a) - 1	1	0,94	0,93	0,0058	0,6208
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (a) - 2	1	0,93			
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (a) - 3	1	0,93			
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (b) - 1	7	6,81	6,82	0,0115	0,1693
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (b) - 2	7	6,83			
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (b) - 3	7	6,81			
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (c) - 1	10	9,98	9,98	0,0000	0,0000
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (c) - 2	10	9,98			
Kesinlik 3. gün Çözeltisi (c) - 3	10	9,98			

Tablo 61. TQ için üç gün boyunca elde edilen ortalama kesinlik sonuçları

Kesinlik Çözeltileri	Birinci güne ait ortalama sonuçlar (µg/mL)	İkinci güne ait ortalama sonuçlar (µg/mL)	Üçüncü güne ait ortalama sonuçlar (µg/mL)	Günler arası ortalama sonuçlar (µg/mL)	Günler arası SS	Günler arası VK (%)
Kesinlik Çözeltisi (a)	1,01	0,98	0,98	0,99	0,0173	1,7495
Kesinlik Çözeltisi (b)	6,99	6,83	6,82	6,88	0,0954	1,3865
Kesinlik Çözeltisi (c)	9,99	9,90	9,87	9,92	0,0624	0,6295

5- LOD ve LOQ bulguları: TQ için LOQ = 0,1109 µg/mL ve LOD = 0,0330 µg/mL olarak bulundu.

6- Stabilite bulguları: 9 µg/mL hazırlanan standart çözelti oda sıcaklığında, buz dolabında ve derin dondurucuda 48 saat boyunca bekletilerek konsantrasyon değerlerinde değişme olup olmadığı tespit edildi. Konsantrasyon değerleri arasındaki uyum oda sıcaklığında %85,56, buz dolabında %97,78 ve derin dondurucuda %96.67 olarak bulundu. Buradaki sonuçlar doğrultusunda TQ çözeltisinin buzdolabında saklanmasının ideal olduğu kanıtlandı. Sonuçlar Tablo 62'de gösterildi.

Tablo 62. TQ stabilite sonuçları

Saat	Konsantrasyon (25 °C ± 2) (µg/mL)	Konsantrasyon (4 °C ± 2)(µg/mL)	Konsantrasyon (-20 °C ± 2)(µg/mL)	Uyum (%)		
				(25 °C ± 2)	(4 °C ± 2)	(-20 °C ± 2)
t = 0	9	9	9	85,56	97,78	96,67
t = 24	7,19	8,72	8,59			
t = 48	6,91	8,67	8,51			

TİMOKİNON ETKİN MADDESİNİN LİPİT/SU PARTİSYON KAYSAYISI BULGULARI

TQ'nun lipit/su partisyon katsayısı çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. Bir maddenin birbiri içinde karışmayan iki faz yani sulu ve yağlı faz arasındaki dağılımının kantitatif ölçüsüne partisyon katsayısı denir. Yağ fazı olarak vücudun yağlı dokularıyla büyük benzerlik gösteren n-oktanol kullanıldı. Bu katsayı genellikle log P yağ/su olarak gösterildi. Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi TQ'ya ait Eşitlik 8 ile hesaplanan log P değeri 2,3499 ± 0,1146 olarak bulundu.

TİMOKİNON ETKİN MADDESİNİN ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMASI BULGULARI

TQ'nun çözünürlük çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi saptanan çözünürlük sonuçları aşağıda Tablo 63'te gösterildi. TQ ile oluşturulan mikroemülsiyon bileşenleri Çörek otu yağı, Tween 20, Tween 80, Cremophor RH40, Cremophor ELP, Propilen glikol, PEG 400, Gliserin, Distile su ve pH 7,4 PBS'deki çözünürlük sonuçları ve grafiği gösterildi. En yüksek çözünürlük çörek otu yağında 331,16 ± 2,35 mg/mL olarak tespit edildi.

Tablo 63. TQ etkin maddesine ait çözünürlük çalışması sonuçları

Bileşen	Çözünürlük (mg/mL)
Çörek otu yağı	331,16 ± 2,35
Tween 20	130,85 ± 0,64
Tween 80	135,93 ± 0,06
Cremophor RH40	X
Cremophor ELP	143,28 ± 0,75
Propilen glikol	36,36 ± 0,37

Tablo 63 devam. TQ etkin maddesine ait çözünürlük çalışması sonuçları

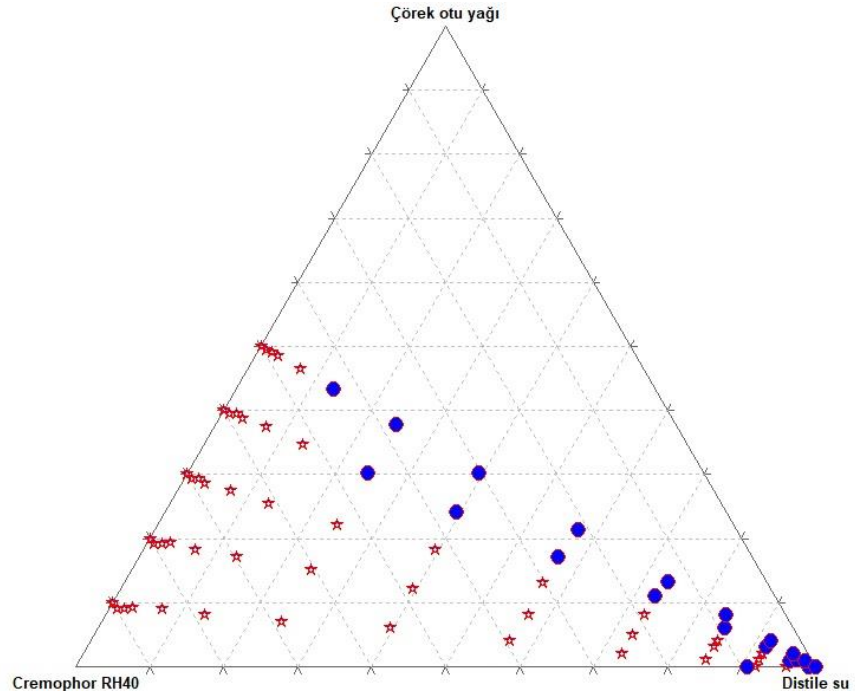
PEG 400	103,42 ± 0,53
Gliserin	1,9 ± 0,13
D. Su	0,759 ± 0,02
pH 7,4 PBS	0,911 ± 0,01

MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI BULGULARI

Faz Titrasyon Metodu ile Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Üçgen Faz Diyagramı Bulguları

Oküler mikroemülsiyon formülasyonları için Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen değerler ile üçgen faz diyagramları çizildi. Formülasyonların aldıkları su miktarına göre ana formülasyon belirlendi. Bu doğrultuda tek başına YEM kullanılan formülasyonlarda su miktarının fazla olduğu tespit edildi ancak Tween 20 aynı sonucu gösteremedi. YYEM olarak kullanılan maddelerden gliserinli olan formülasyonlar iyi sonuçlar gösterirken PEG 400 biraz daha duyarlı kaldı. Propilen glikol kullanılan formülasyonların her biri su miktarı aldığı gibi bulanıklaştığı için formülasyonlar başarısız oldu.

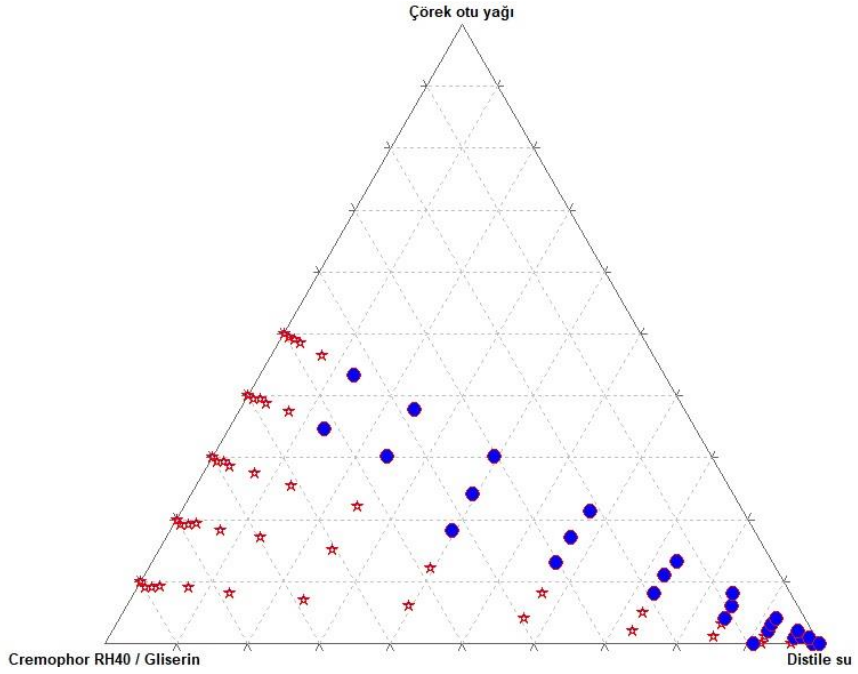
İdeal mikroemülsiyon formülasyonlarının belirlenmesi amacıyla üçgen faz diyagramları ile mikroemülsiyon oluşumu gözlenen formülasyonların verileriyle elde edilen nokta sayıları incelendi ve bu veriler doğrultusunda üçgen faz diyagramında en yüksek alana sahip olan formülasyonlar formülasyonları olarak belirlendi. Bu sebeple sadece YEM olarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarında en fazda alan Cremophor RH40 ile hazırlanan formülasyon (MEF-34) seçildi. YYEM olarak kullanılan gliserin ile hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarında en fazla alan Cremophor RH40-Gliserin ile hazırlanan formülasyon (MEF-39) seçildi. Yine YYEM olarak kullanılan PEG 400 ile hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarında en fazla alan Cremophor RH40 - PEG400 ile hazırlanan formülasyon (MEF-43 / MEF-44) seçildi. İdeal olduğuna karar verilen mikroemülsyon formülasyonlarının üçgen faz diyagramları Şekil 40, Şekil 41 ve Şekil 42'de gösterildi.



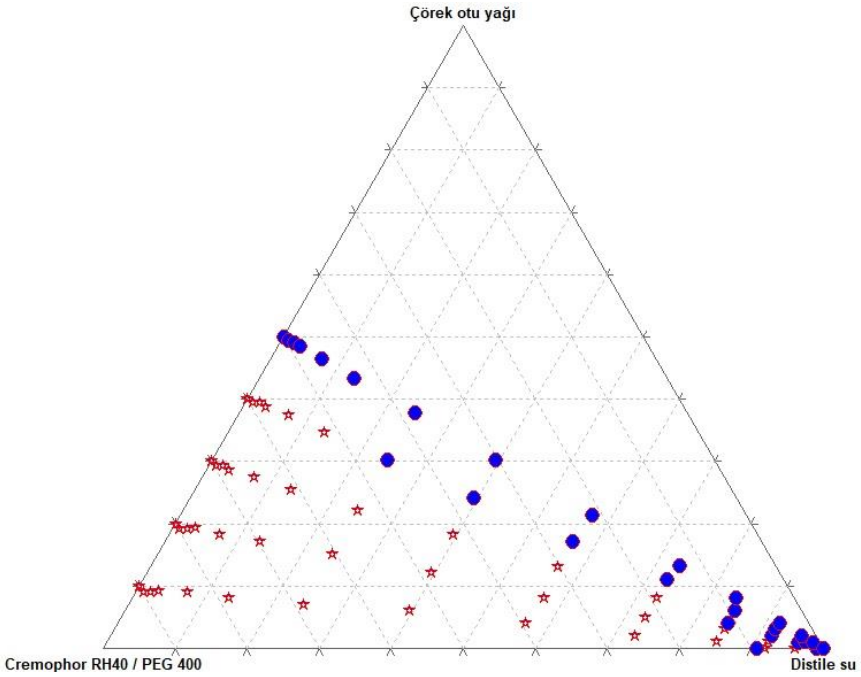
Şekil 40. YEM olarak Cremophor RH40, yağ olarak Çörek otu ve su kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun (MEF-34) üçgen faz diyagramı

= Su alan noktalar

= Bulanıklaşan noktalar



Şekil 41. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu ve su kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun (MEF-39) üçgen faz diyagramı



Şekil 42. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu ve su kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun (MEF-43/44) üçgen faz diyagramı

Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi ile Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Bulguları

Hazırlanan mikroemülsiyonlar hızlandırılmış stabilite koşullarında bekletildi. Daha sonra faz ayrımı olup olmadığı kontrol edildi. Zamanla faz ayrımı görülen formülasyonlar elendi. Faz ayrımı görülmeyen mikroeümülsiyon formülasyonların aynı zamanda zetasizer ile PDI değerleri ve damlacık büyüklüğü ölçüldü (Tablo 64). F1-1, F3-1 ve F7-9 en iyi formülasyon olarak seçildi.

Tablo 64. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyon bulguları

Formülasyon kodu	Damlacık boyutu (nm)	PDI
F1-1	142,6 ± 4,7	0,203 ± 0,007
F3-1	128,3 ± 2,6	0,242 ± 0,004
F7-9	191,2 ± 2,9	0,392 ± 0,011

Mikroemülsiyon Hazırlama Metodunun Seçilmesi Bulguları

Farklı metotlara göre hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının seçimi içerdiği YEM miktarının oranına göre belirleneceği Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldı. Sonuçlara göre yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının beklenen sonuçlara daha yakın olduğu görüldü. Bu yüzden yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan F1-1, F3-1 ve F7-9 formülasyonlarını seçilip ve ilerleyen çalışmalarda bu formülasyonlar ile çalışılacaktır. Tablo 65'te metotlara göre hazırlanan formülasyonların içerikleri gösterilmektedir.

Tablo 65. İki yönteme göre hazırlanan formülasyonlar ve içerikleri

Yüksek Devirli Homojenizasyon Yöntemi			**Faz Titrasyon Yöntemi**		
F1-1 Formülasyonu			MEF 39 Formülasyonu		
Bileşen	Miktar (g)	Yüzde (%)	Bileşen	Miktar (g)	Yüzde (%)
Yağ	0,2	1,98	Yağ	0,2	2
Tw 20	0	2,97	RH40	0,67	6,7
Gly	0,2	1,98	Gly	0,13	1,3
D.su	9,4	93,07	D.su	9	90
F3-1 Formümasyonu			MEF 34 Formülasyonu		
Bileşen	Miktar (g)	Yüzde (%)	Bileşen	Miktar (g)	Yüzde (%)
Yağ	0,2	1,98	Yağ	0,2	2
Tw 20	0,3	2,97	RH40	0,8	8
D.su	9,6	95,05	D.su	9	90
F7-9 Formülasyon			MEF 42 Formülasyonu		
Bileşen	Miktar (g)	Yüzde (%)	Bileşen	Miktar (g)	Yüzde (%)
Yağ	0,2	2	Yağ	0,2	2
RH 40	0,6	6	RH40	0,64	6,4
D.su	9,2	92	PEG 400	0,16	1,6
			D.su	9	90

Mikroemülsiyon Formülasyonlarına TQ Etkin Maddesinin Yüklenmesi Bulguları

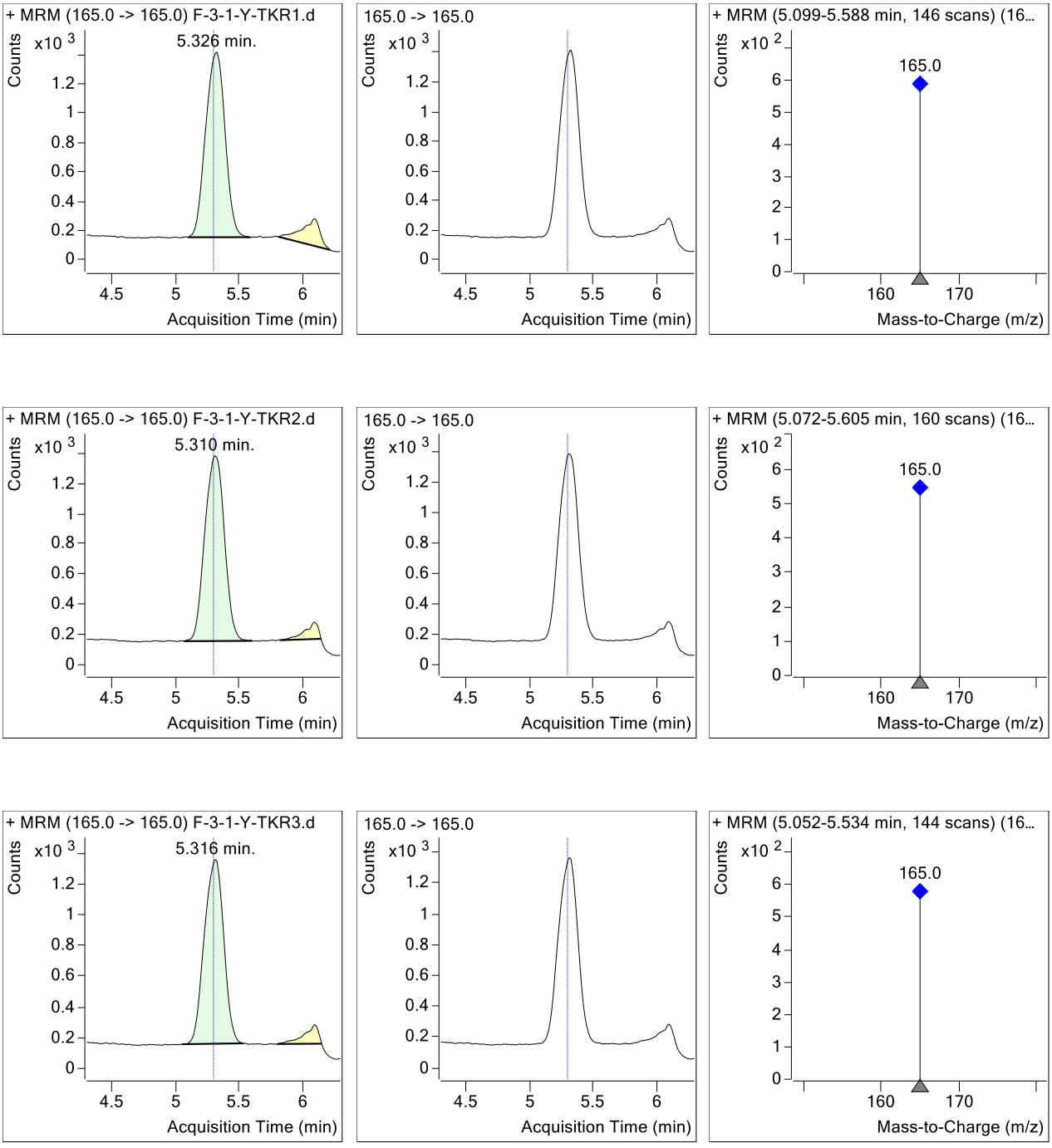
Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde çalışıldı. Hiroyuki ve ark. (145) yaptığı çalışmada yeni bir Vitrigel-göz irritasyon testi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem iki

bölümden oluşur, bir kolajen vitrigel membran odasında insan korneal epitel modelinin oluşturulması ve insan korneal epitel modeline bir kimyasalı maruz bıraktıktan sonra üç dakika boyunca transepitelyal elektrik direnci değerlerinin zamana bağlı profili analiz edilerek göz irritasyon tahmini yapmışlardır. Bu yöntemin performansını toplam 118 kimyasalı test edilerek tahmin etmişlerdir. Yöntemin çok hafif tahriş edici kimyasallar da dahil olmak üzere yaygın göz tahrişini değerlendirmek için mükemmel tahmin performansı sağlayabiliceğini savunmuşlardır. Yöntem kapsamında göz irritasyon testi için tezimizde kullandığımız Tween 20 ve Gliserin maddelerinin testi yapılmış olup, Tween 20 irritasyonu olmayan ancak Gliserin'in irritasyona sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla seçtiğimiz üç formülasyonlarından (F1-1, F3-1 ve F7-9) F1-1 formülasyonu gliserin içerdiğinden dolayı bu formulasyonu çıkarma kararı aldık ve F3-1 ve F7-9 formülasyonları ile devam edip etkin madde olan TQ bu formülasyonlara yüklendi. F3-1-TQ formülasyonuna 9,9 mg ve F7-9-TQ formülasyonuna 10 mg eklendi. Eklenen TQ miktarlarının miktar tayini ölçüm sonuçları Tablo 66'da verildi.

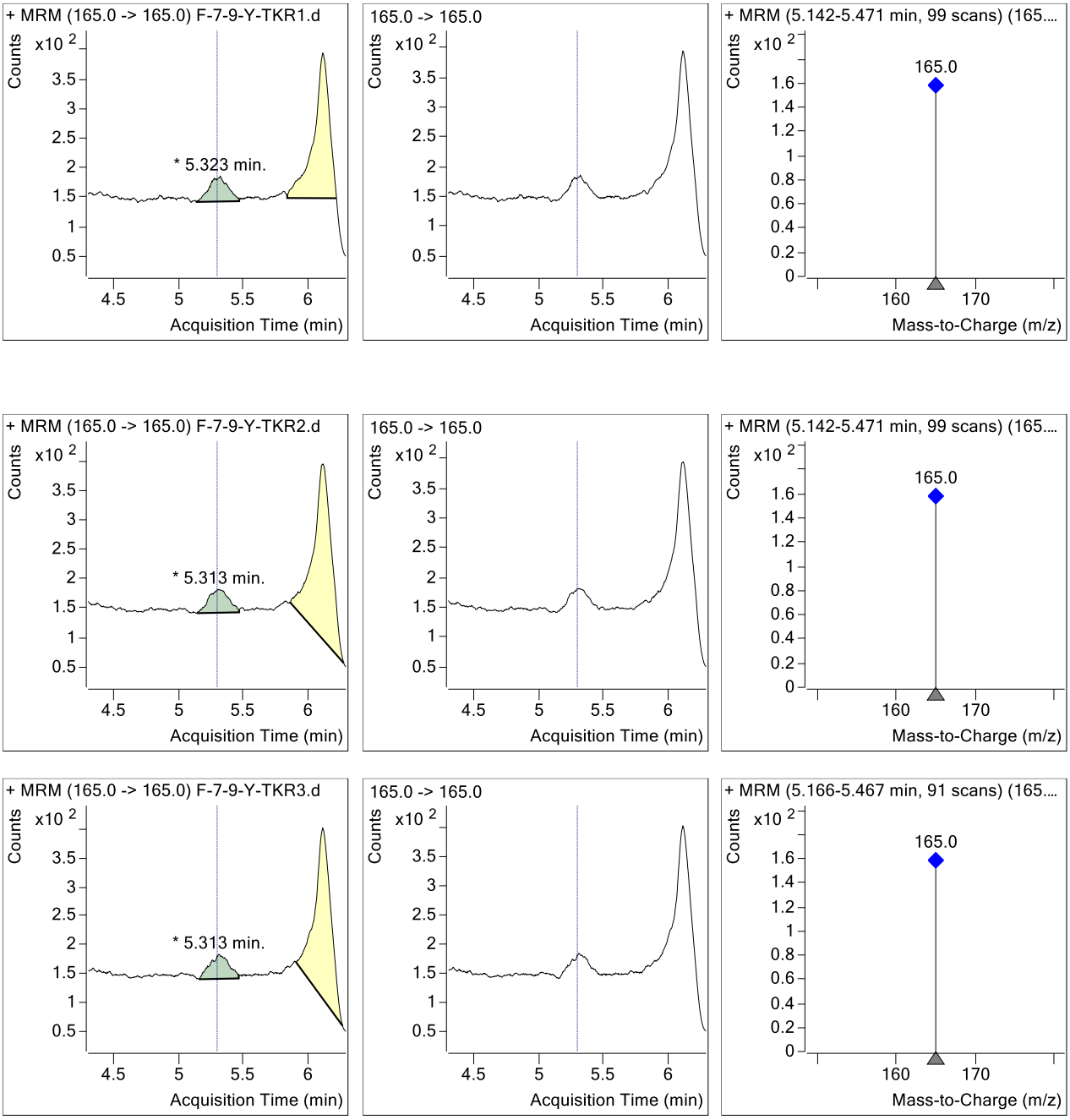
Tablo 66. F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının TQ içerik miktarları

Formülasyonlar	İçerik Miktarı (µg/mL)	Ortalama (µg/mL)	SS
F3-1	514,3929	505,1057	9,5996
	509,0375		
	491,8866		
F7-9	955,2159	959,5922	6,2818
	955,0849		
	968,4757		

Aşağıda Şekil 43 ve Şekil 44'te F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumları verildi.



Şekil 43. F3-1 formülasyonunun TQ içerik miktarını gösteren MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu



Şekil 44. F7-9 formülasyonunun TQ içerik miktarını gösteren MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu

MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Mikroemülsiyonların Organoleptik Değerlendirme Bulguları

Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile taze hazırlanan TQ yüklü ve yüklü olmayan formülasyonların koku, renk, görünüş, faz ayrımı ve köpük oluşumu parametreleri Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi değerlendirildi (Tablo 67). Formülasyonlarda çörek otu

yağı karakteristik kokusu gözlendi. F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının renkleri beyaz iken formülasyonlara TQ eklenmesi ile birlikte F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonlarının rengi sarıya dönmüştür. Formülasyonların tümünün görünüşü bulanık olarak bulundu. Formülasyonlar yüksek devirli homojenizatörde oluştuktan sonra herhangi bir faz ayrımı görülmedi.

Tablo 67. Formülasyonların organoleptik değerlendirilmesi sonuçları

Formülasyon Kodu	Koku (Çörek otu yağı karakteristik koku)	Renk	Görünüş	Faz Ayrımı (Başlangıçta)	Köpük Oluşumu (Başlangıçta)
F3-1	+	Beyaz	Bulanık	Yok	Var
F7-9	+	Beyaz	Bulanık	Yok	Var
F3-1-TQ	+	Sarı	Bulanık	Yok	Var
F7-9-TQ	+	Sarı	Bulanık	Yok	Var

Mikroemülsiyonların pH Çalışmaları Bulguları

TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların pH ölçümü Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Göze uygulanabilirlik açısından pH değerleri uygun olmayan formülasyonlar 1 N NaOH çözeltisi ile pH'ı 7 olacak şekilde ayarlandı. Ölçüm sonuçları Tablo 70'te verildi. TQ ilavesi ile formülasyonların pH değerinde biraz artış gözlemlenmedi.

Mikroemülsiyonların Viskozite Çalışmaları Bulguları

TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların viskozite ölçümü Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Viskozite değeri Centipoise (cP) olarak bulundu. Ölçüm sonuçları Tablo 70'te verildi.

Mikroemülsiyonların Kırılma İndisi Çalışmaları Bulguları

TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların kırılma indisi ölçümü Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 70'te verildi.

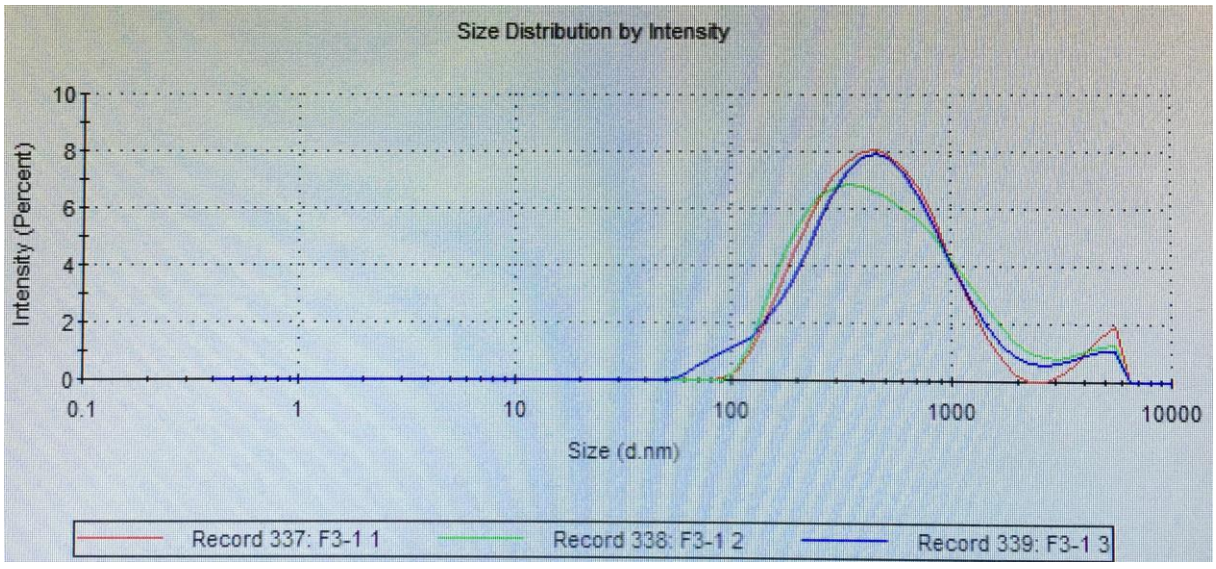
Mikroemülsiyonların Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi Çalışmaları Bulguları

Belirlenen en iyi formülasyonların damlacık büyüklüğü Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçümü yapılan TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonlara ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri Tablo 68'de verildi. Bu formülasyonlara ait boyut grafikleri Şekil 45, Şekil 46, Şekil 47 ve Şekil 48'de verildi.

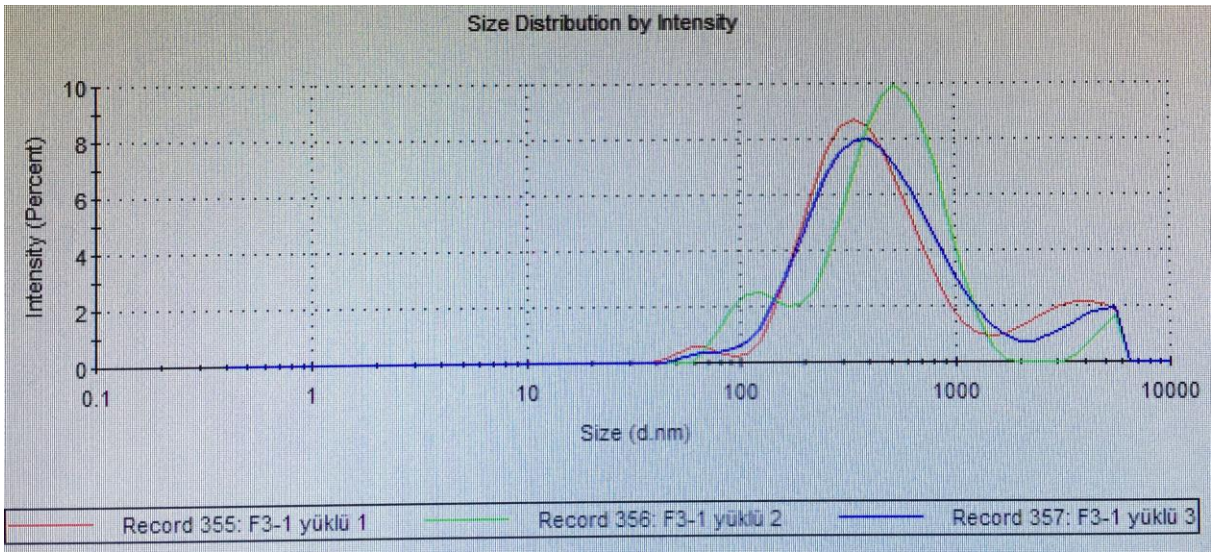
PDI damlacık büyüklüğü dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Formülasyonların PDI 0,5 nın altında bulunmuş olup, bu durum damlacıkların homojen dağıldığını göstermektedir.

Tablo 68. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri (t=0 anında)

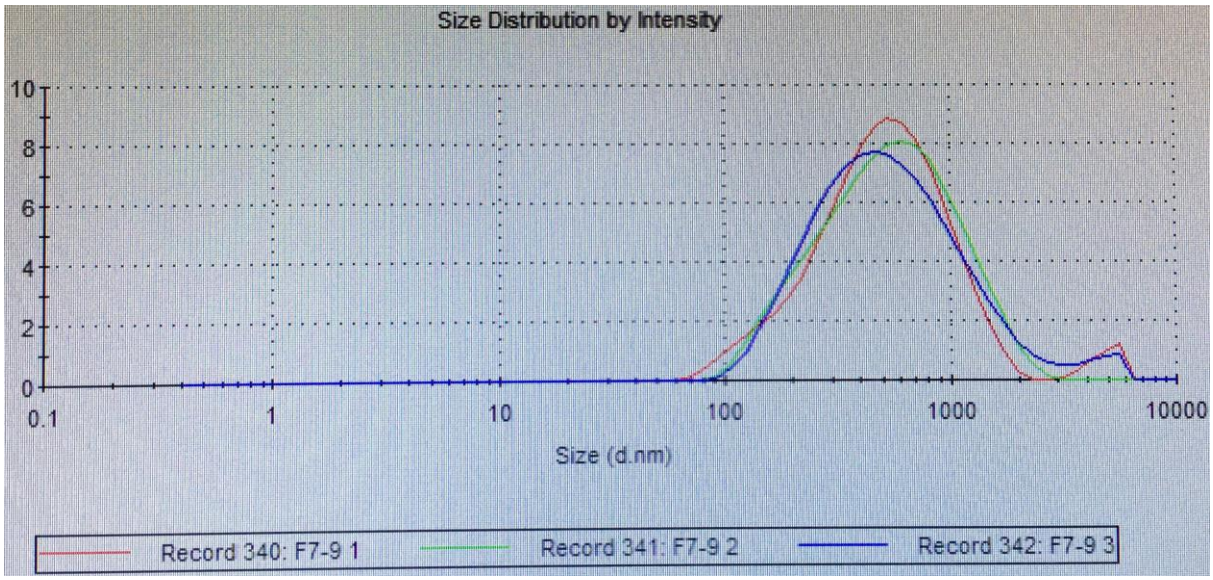
Formülasyon Kodu	Damlacık Büyüklüğü (nm)	PDI
F3-1	384,9 ± 4,7	0,407 ± 0,006
F7-9	414,9 ± 2,3	0,367 ± 0,013
F3-1-TQ	374,6 ± 4,6	0,418 ± 0,013
F7-9-TQ	356,9 ±0,6	0,359 ± 0,001



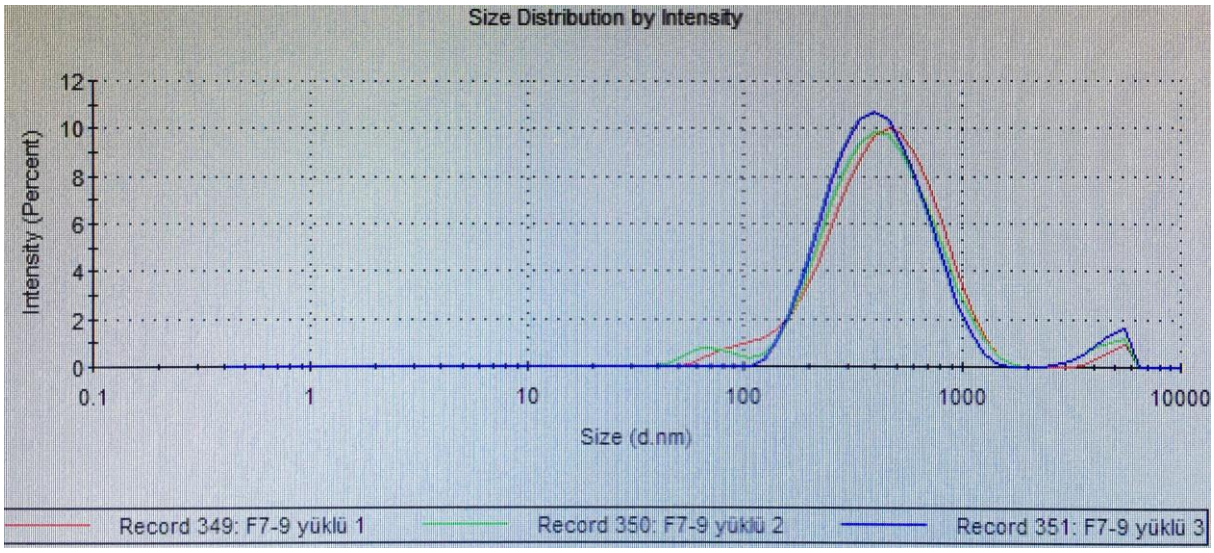
Şekil 45. F3-1 formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı



Şekil 46. F3-1-TQ formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı



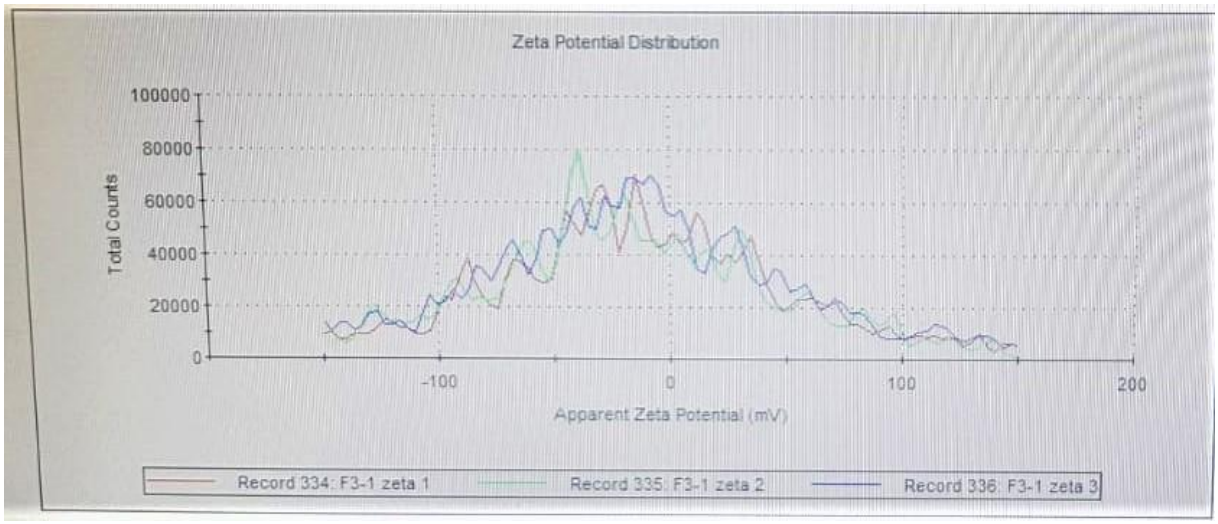
Şekil 47. F7-9 formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı



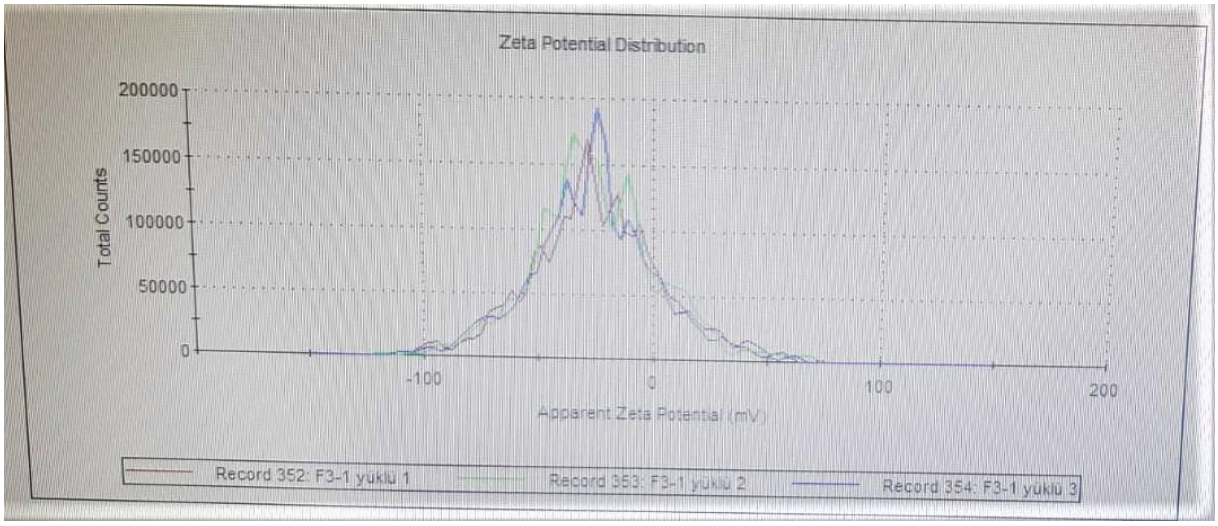
Şekil 48. F7-9-TQ formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı

Mikroemülsiyonların Zeta Potansiyel Analiz Bulguları

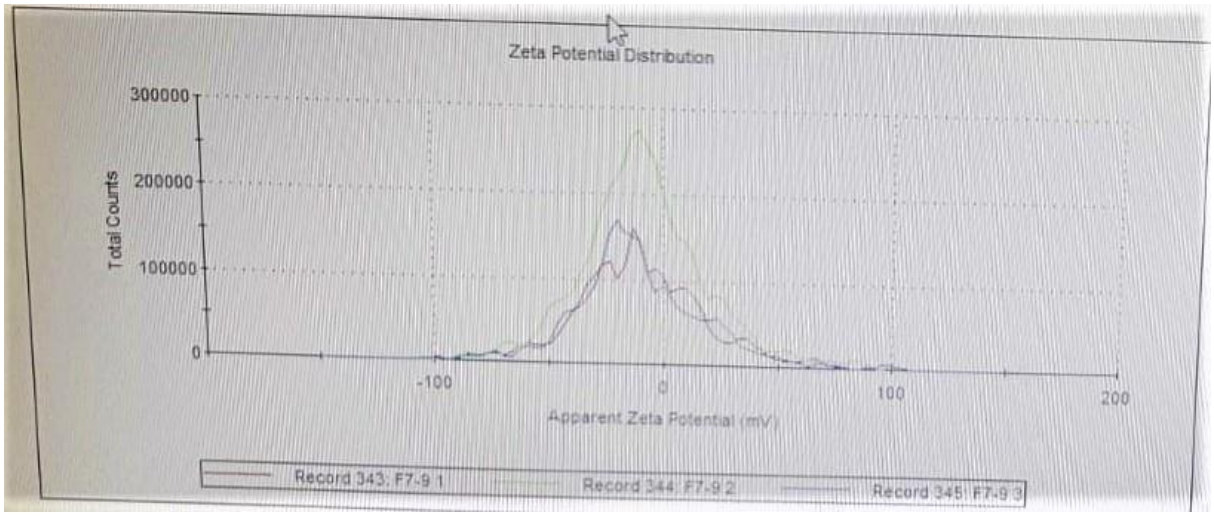
Belirlenen en iyi formülasyonların zeta potansiyelleri Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçümü yapılan TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonlara ait, zeta potansiyel değerleri Tablo 69'da verildi. Bu formülasyonlara ait boyut grafikleri Şekil 49, Şekil 50, Şekil 51 ve Şekil 52'de verildi.



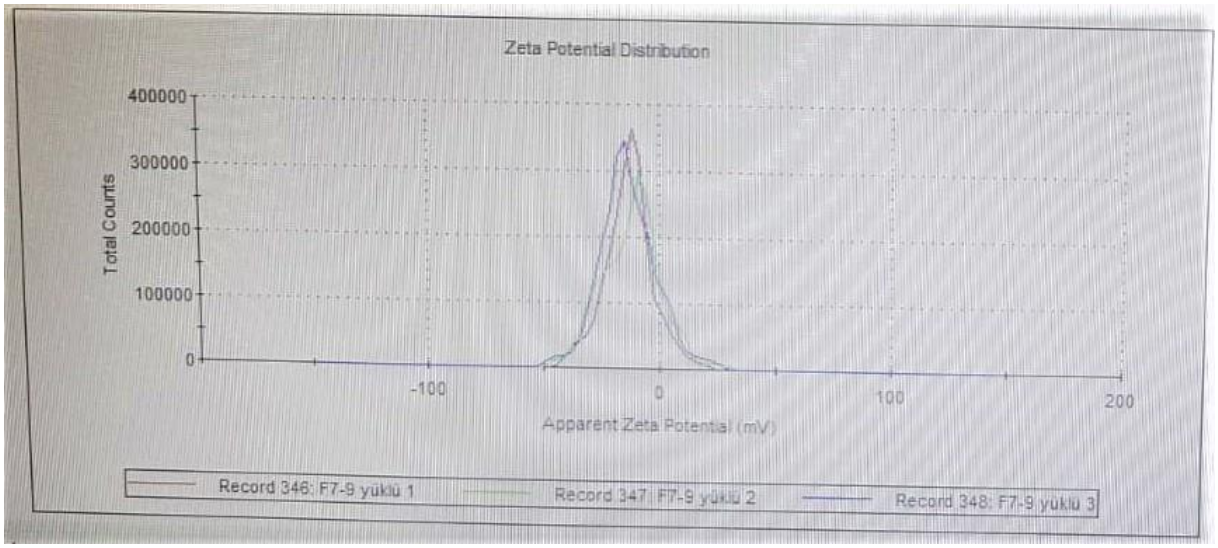
Şekil 49. F3-1 formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı



Şekil 50. F3-1-TQ formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı



Şekil 51. F7-9 formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı



Şekil 52. F7-9-TQ formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı

Tablo 69. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri değerleri (t=0 anında)

Formülasyon Kodu	Zeta Potansiyel (mV)
F3-1	-18,2 ± 1,4
F7-9	-9,7 ± 0,8
F3-1-TQ	-24,7 ± 0,2
F7-9-TQ	-12,9 ± 0,5

Mikroemülsiyonların Yoğunluk Ölçümleri Bulguları

TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların yoğunluk ölçümleri Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 70'te verildi.

Tablo 70. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının pH, viskozite ve yoğunluk ölçümüne ait veriler (t=0 anında)

Formülasyon Kodu	pH	Viskozite (cP)	Yoğunluk (g/mL)	Kırılma İndisi
F3-1	7,02 ± 0,01	2,19 ± 0,02	0,0166 ± 0,0003	1,3394 ± 0,0000
F7-9	7,02 ± 0,00	2,70 ± 0,01	0,0272 ± 0,0004	1,3440 ± 0,0000
F3-1-TQ	7,06 ± 0,01	2,20 ± 0,00	0,0171 ± 0,0001	1,3387 ± 0,0000

Tablo 70 devam. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının pH, viskozite ve yoğunluk ölçümüne ait veriler (t=0 anında)

F7-9-TQ	7,08 ± 0,00	2,72 ± 0,01	0,0279 ± 0,0003	1,3433 ± 0,0000

Mikroemülsiyonların Santrifüj ile Faz Ayrımı Bulguları

Faz ayrımı çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların tamamı 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda herhangi bir faz ayrışması veya görünüşünde değişiklik olmadığı tespit edildi.

Mikroemülsiyonların Stabilite Bulguları

Stabilite çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı. TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların stabilite incelemesi amacıyla formülasyonlar 40 °C sıcaklık ve %70 nem ortamında 2 ay boyunca saklandı. Formülasyonların fiziksel görünümünü incelendiğinde F3-1-TQ formülasyonu aynı açık sarı renginde ve faz ayrışması gibi bir bozunmanın görünmediği, F7-9-TQ formülasyonunda ise renginin koyulaştığı ve faz ayrışmasının gözlemlenmedi görüldü. Damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerlerinin zamanla arttığı; pH, viskozite, yoğunluk ve kırılma indisi değerlerinde zamanla anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edildi. Formülasyonların stabilite sonuçları Tablo 71, Tablo 72, Tablo 73 ve Tablo 74'te gösterildi.

Tablo 71. F3-1 formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)

Ölçülen Parametre	**40 °C / %70 Nem**		
	t=0 (Başlangıç)	**1. Ay**	**2. Ay**
Damlacık büyüklüğü (nm)	384,9 ± 4,7	483,13 ± 8,1	428,2 ± 2,4
PDI	0,407 ± 0,006	0,434 ± 0,013	0,723 ± 0,002
Zeta potansiyel (mV)	-18,2 ± 1,4	-12,17 ± 0,3	-1,94 ± 0,6

Tablo 71 devam. F3-1 formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)

pH	7,02 ± 0,01	7,01 ± 0,02	7,01 ± 0,01
Viskozite (cP)	2,19 ± 0,02	2,19 ± 0,01	2,19 ± 0,01
Yoğunluk (g/mL)	0,0166 ± 0,0003	0,0165 ± 0,0005	0,0165 ± 0,0002
Kırılma İndisi	1,3394 ± 0,0000	1,3394 ± 0,0000	1,3395 ± 0,0000

Tablo 72. F7-9 formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)

Ölçülen Parametre	**40 °C / %70 Nem**		
	t=0 (Başlangıç)	**1. Ay**	**2. Ay**
Damlacık büyüklüğü (nm)	414,9 ± 2,3	449,13 ± 6,4	441,1 ± 3,6
PDI	0,367 ±0,013	0,434 ± 0,013	0,432 ± 0,009
Zeta potansiyel (mV)	-9,7 ± 0,8	-6,29 ± 0,8	-13,4 ± 0,4
pH	7,02 ± 0,00	7,02 ± 0,02	7,02 ± 0,01
Viskozite (cP)	2,70 ± 0,01	2,71 ± 0,02	2,72 ± 0,00
Yoğunluk (g/mL)	0,0272 ± 0,0004	0,0272 ± 0,0001	0,0275 ± 0,0001
Kırılma İndisi	1,3440 ± 0,0000	1,3440 ± 0,0000	1,3441 ± 0,0000

Tablo 73. F3-1-TQ formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)

Ölçülen Parametre	40 °C / %70 Nem		
	t=0 (Başlangıç)	1. Ay	2. Ay
Damlacık büyüklüğü (nm)	374,6 ± 4,6	551,43 ± 6,1	595,5 ± 1,6
PDI	0,418 ± 0,013	0,747 ± 0,027	0,639 ± 0,011
Zeta potansiyel (mV)	-24,7 ± 0,2	-15,7 ± 0,6	-3,9 ± 0,6
pH	7,06 ± 0,01	7,05 ± 0,02	7,05 ± 0,00
Viskozite (cP)	2,20 ± 0,00	2,21 ± 0,01	2,21 ± 0,01
Yoğunluk (g/mL)	0,0171 ± 0,0001	0,0173 ± 0,0004	0,0173 ± 0,0001
Kırılma İndisi	1,3387 ± 0,0000	1,3387 ± 0,0002	1,3387 ± 0,0000
TQ miktarı	505,1057 ± 9,5996	418,8038 ± 2,0909	332,3836 ± 2,7013

Tablo 74. F7-9-TQ formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)

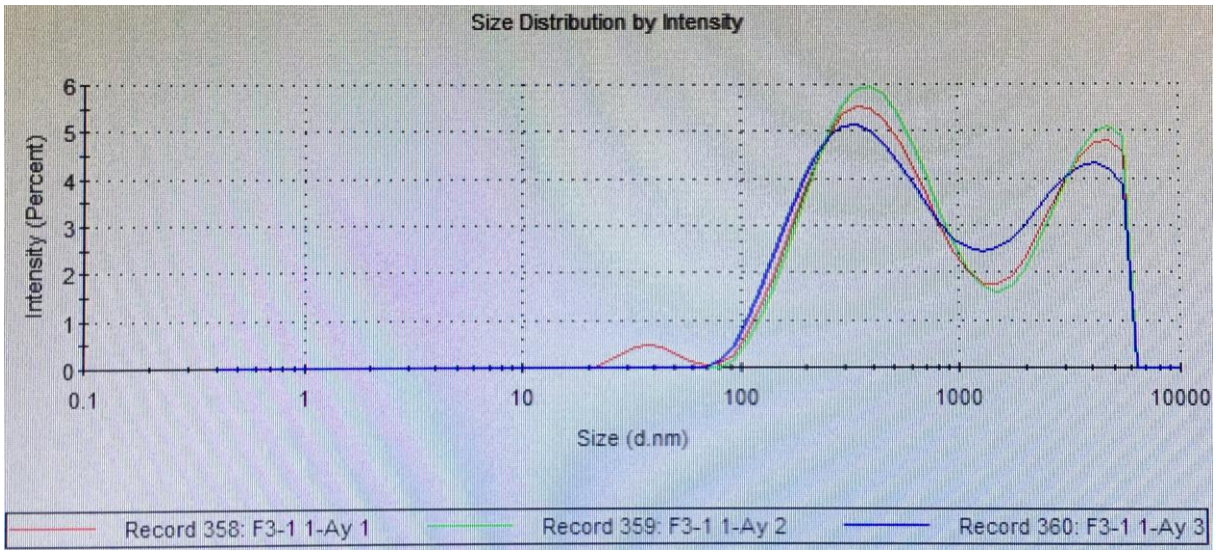
Ölçülen Parametre	40 °C / %70 Nem		
	t=0 (Başlangıç)	1. Ay	2. Ay
Damlacık büyüklüğü (nm)	356,9 ± 0,6	595,4 ± 8,8	630,6 ± 3,4
PDI	0,359 ± 0,001	0,688 ± 0,024	0,706 ± 0,001

Tablo 74 devam. F7-9-TQ formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)

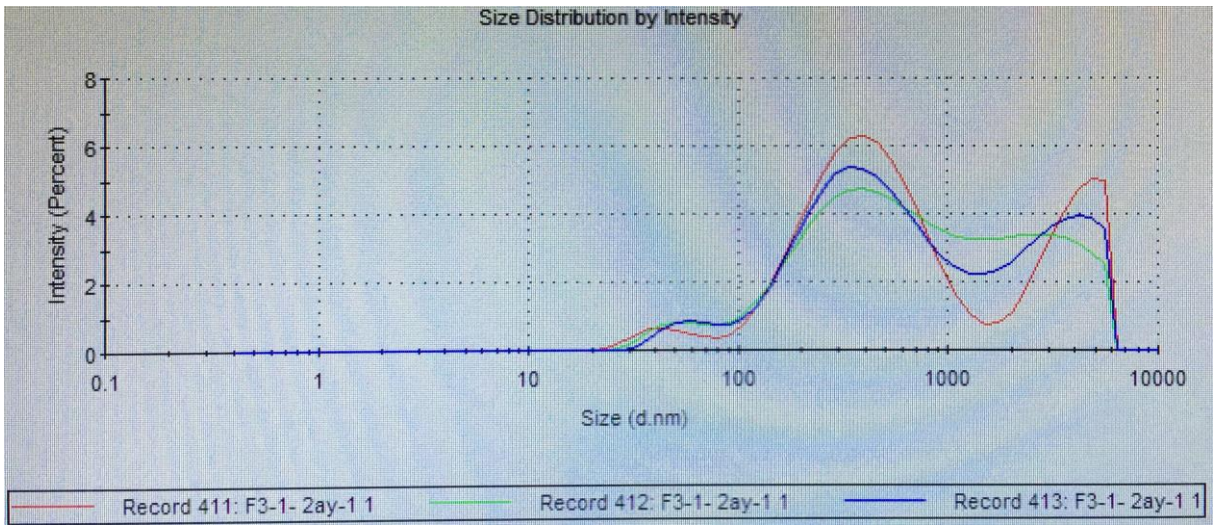
Zeta potansiyel (mV)	-12,9 ± 0,5	-11,2 ± 0,2	-8,26 ± 0,3
pH	7,08 ± 0,00	7,08 ± 0,01	7,08 ± 0,00
Viskozite (cP)	2,72 ± 0,01	2,73 ± 0,00	2,78 ± 0,01
Yoğunluk (g/mL)	0,0279 ± 0,0003	0,0279 ± 0,0001	0,0287 ± 0,0005
Kırılma İndisi	1,3433 ± 0,0000	1,3434 ± 0,0002	1,3432 ± 0,0000
% TQ miktarı	959,5922 ± 6,2818	951,1069 ± 1,5459	852,1639 ± 14,227

TQ yüklü ve yüklenmemiş formülasyonların 1 ay ve 2 aylık stabilite işleminden sonra damlacık boyutu dağılı ve zeta potansiyel yükü dağılımı grafikleri Şekil 53 ila Şekil 60'ta gösterildi.

1. Ay

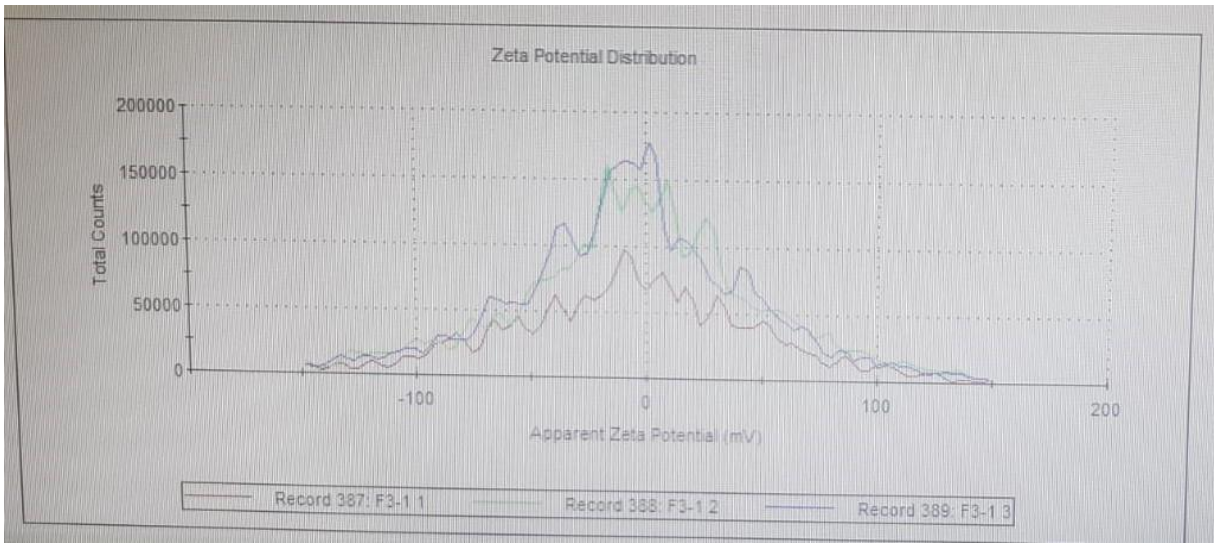


2. Ay

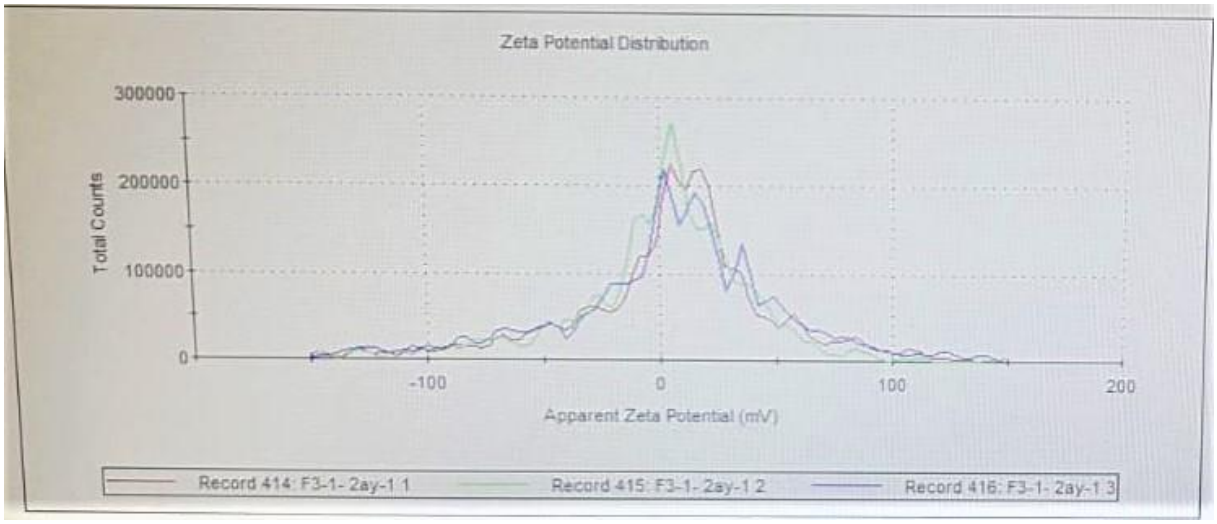


Şekil 53. F3-1 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi

1. Ay

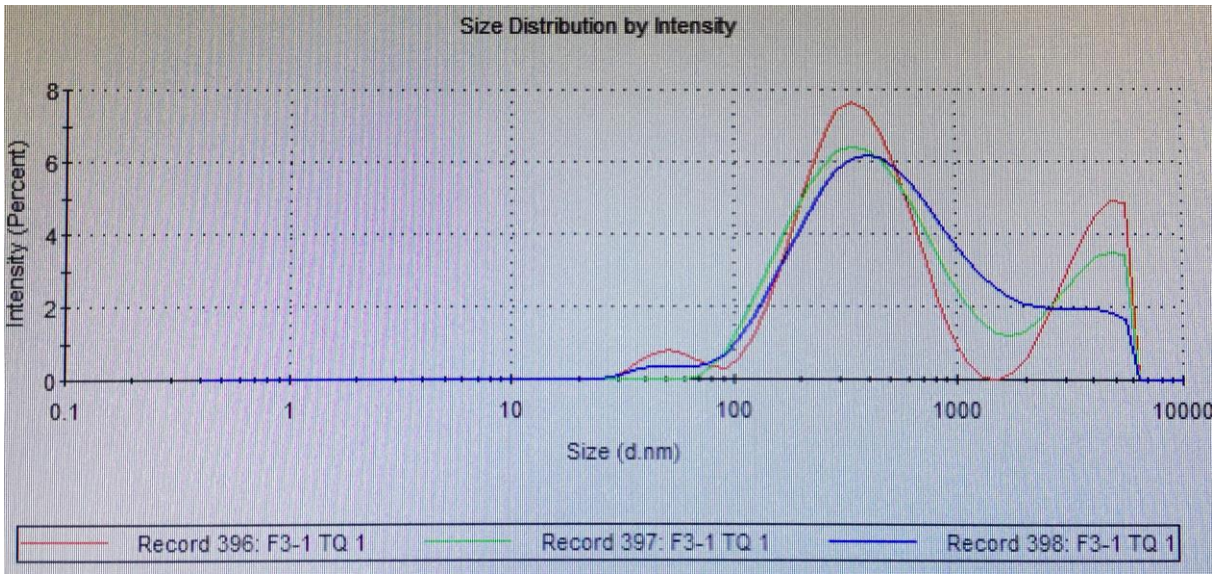


2. Ay

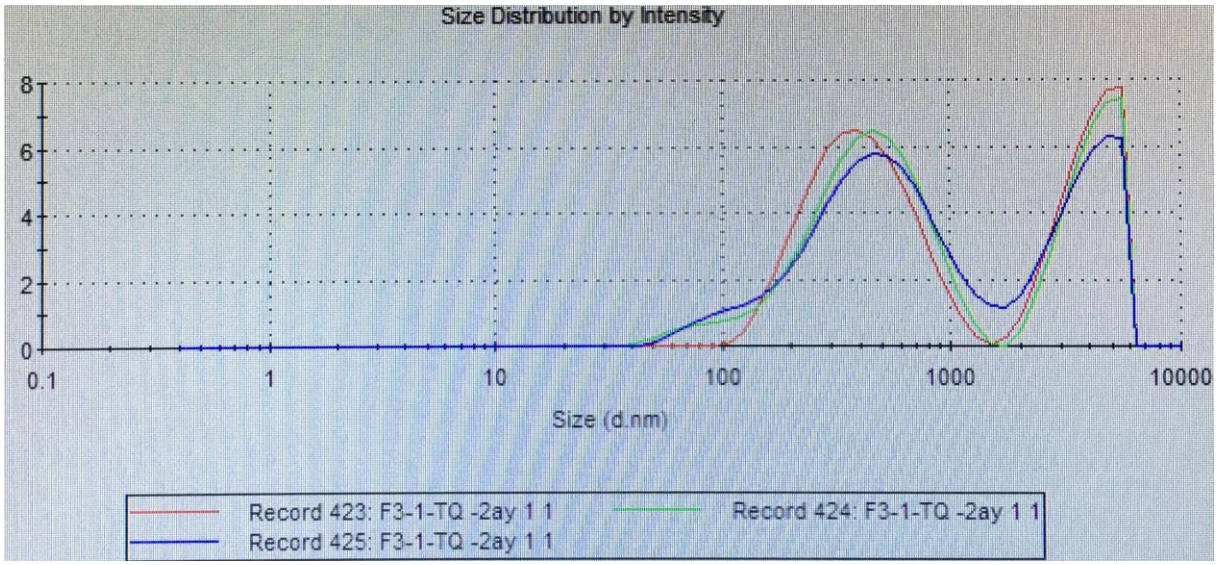


Şekil 54. F3-1 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi

1. Ay

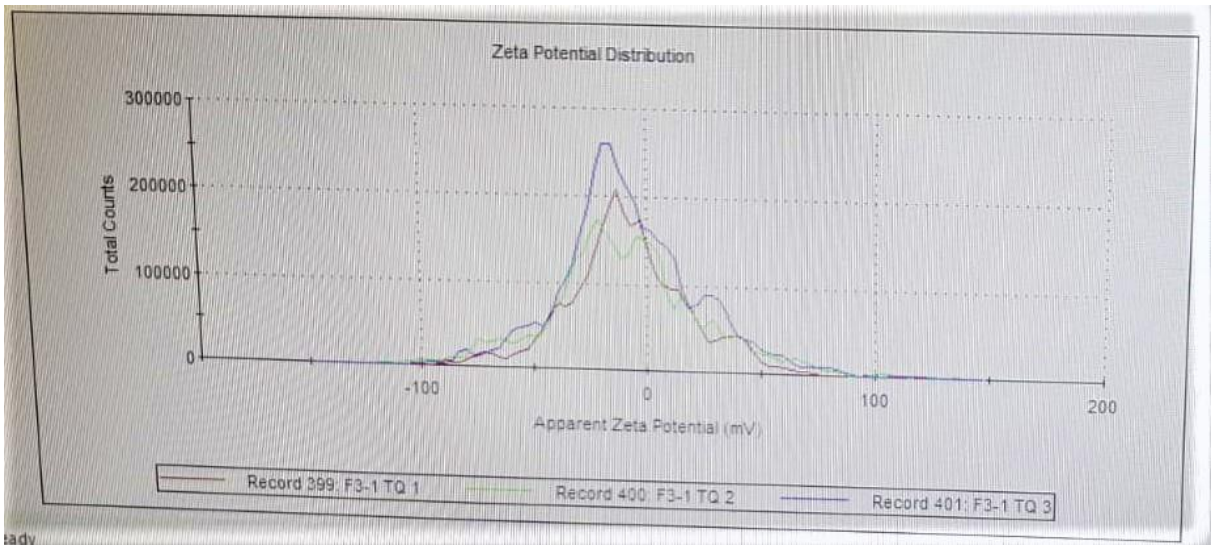


2. Ay

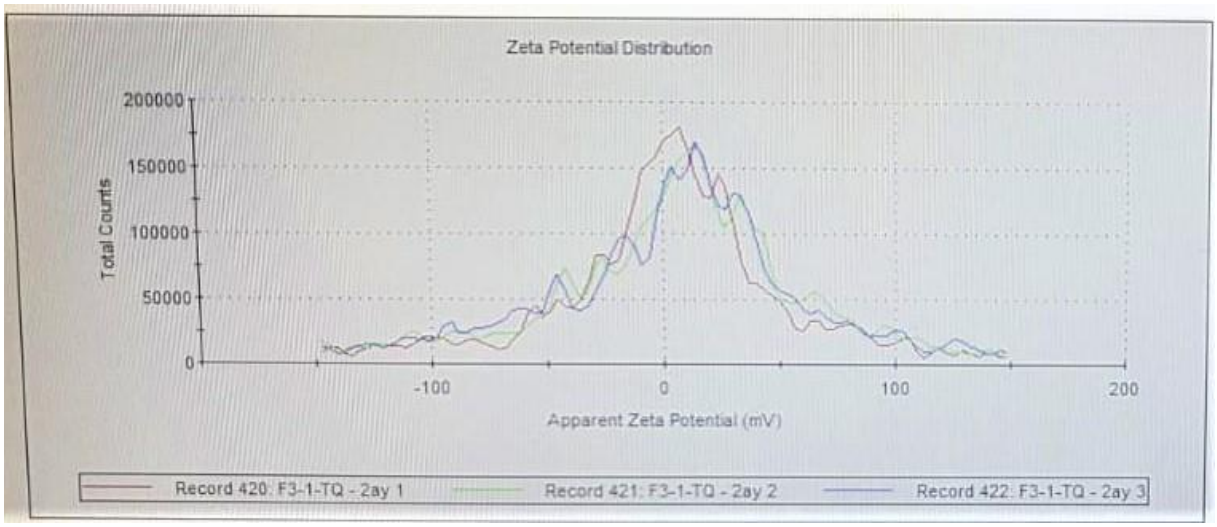


Şekil 55. F3-1-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi

1. Ay

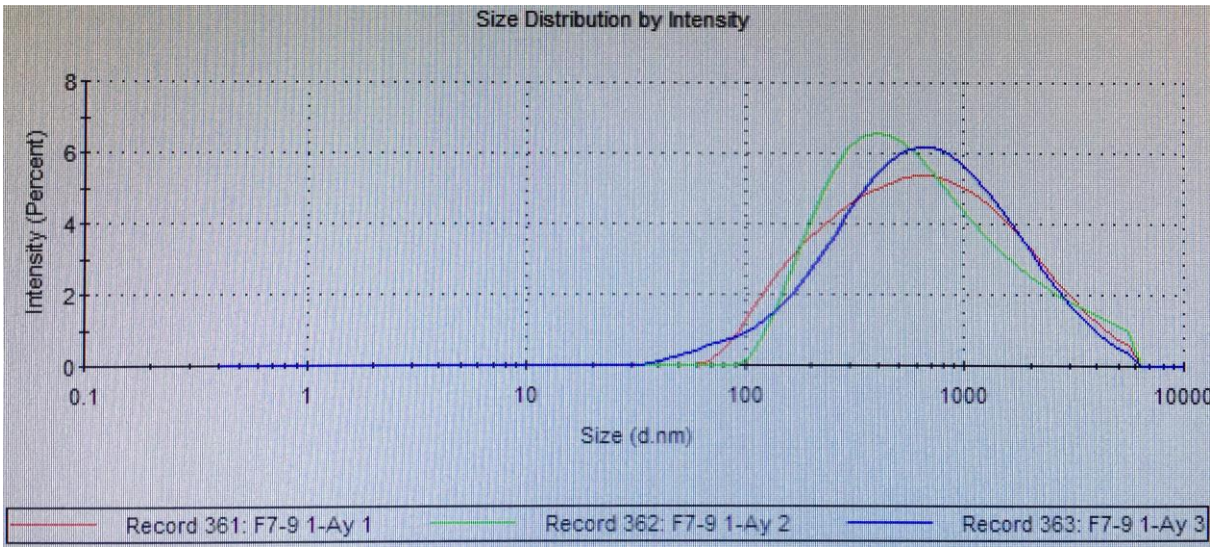


2. Ay

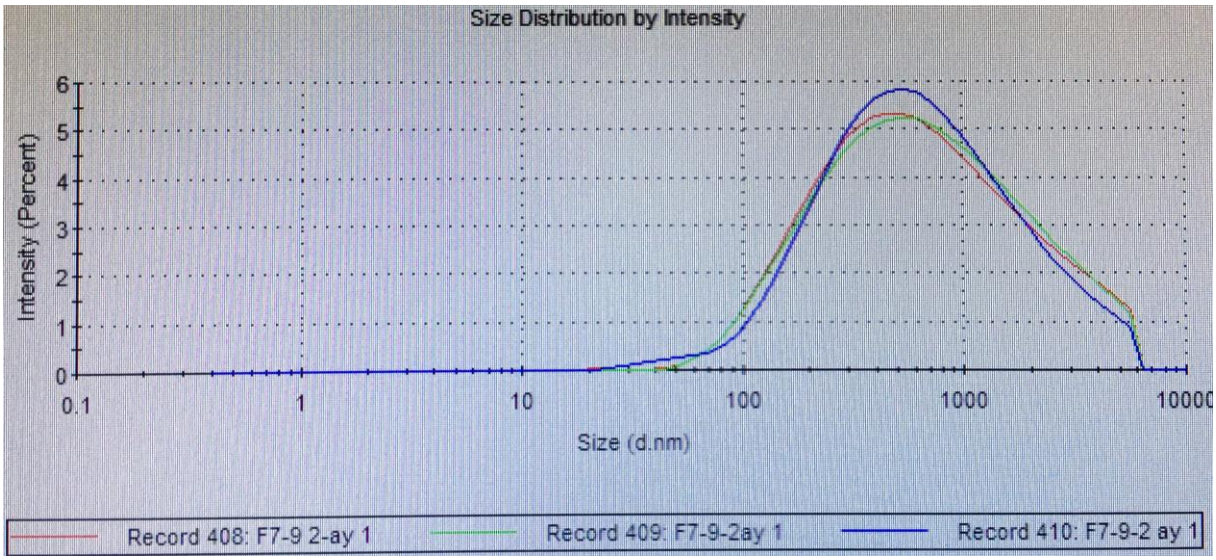


Şekil 56. F3-1-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi

1. Ay

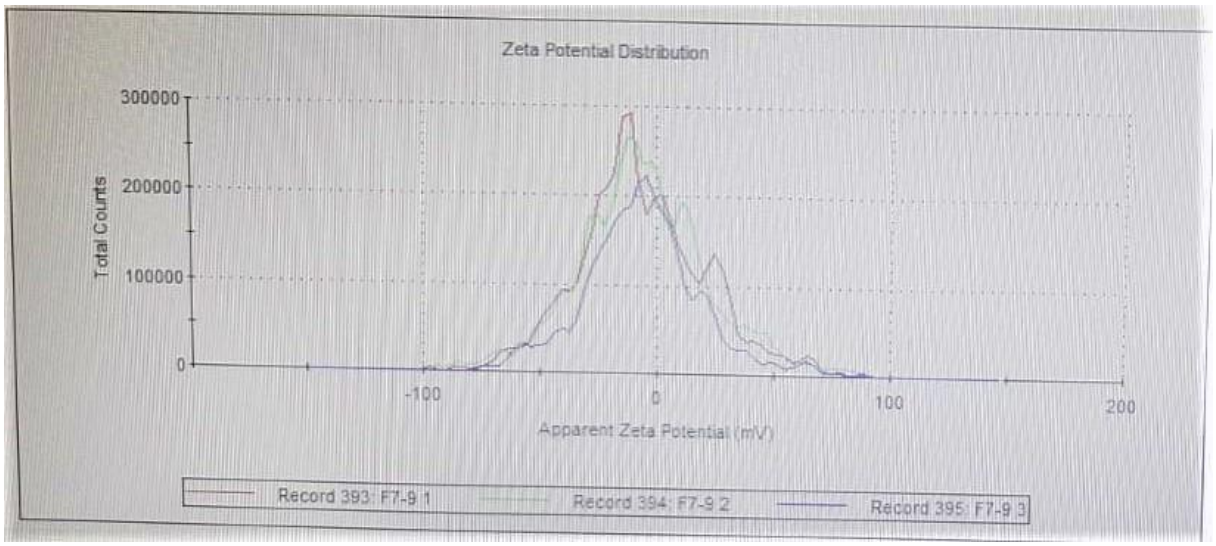


2. Ay

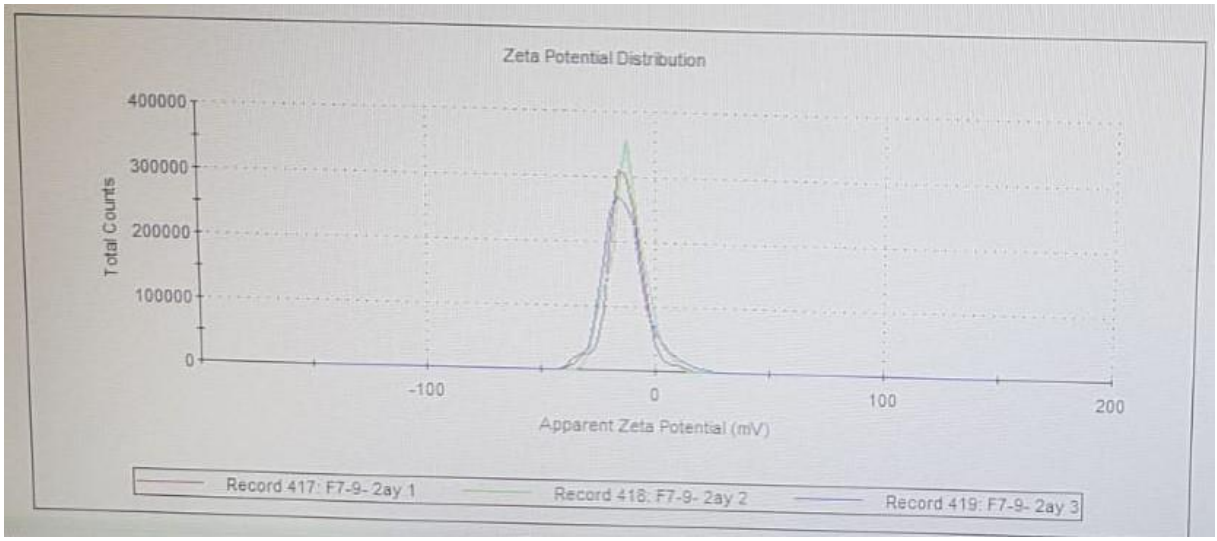


Şekil 57. F7-9 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi

1. Ay

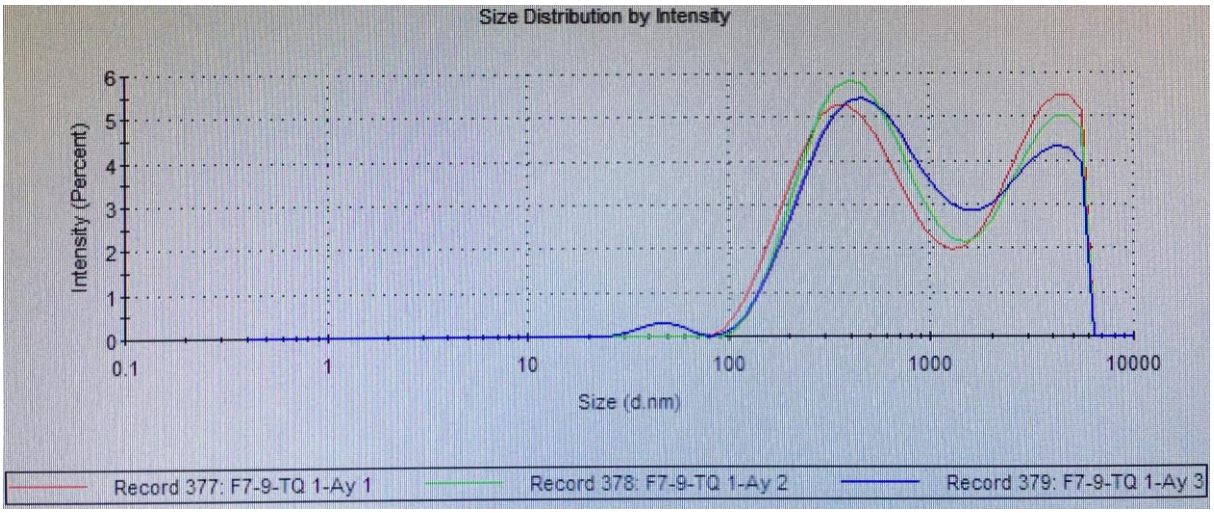


2. Ay

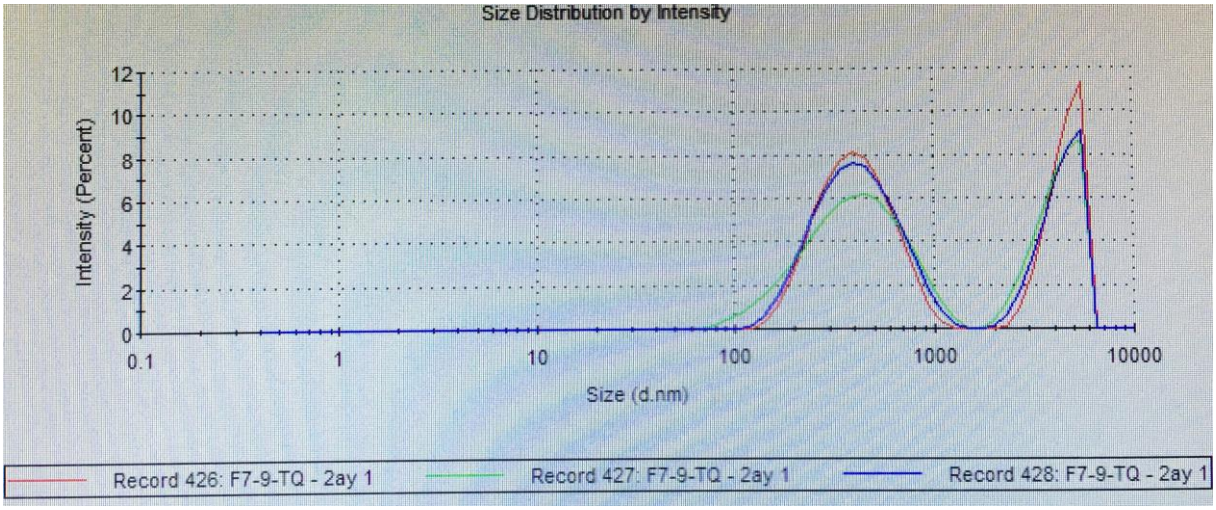


Şekil 58. F7-9 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi

1. Ay

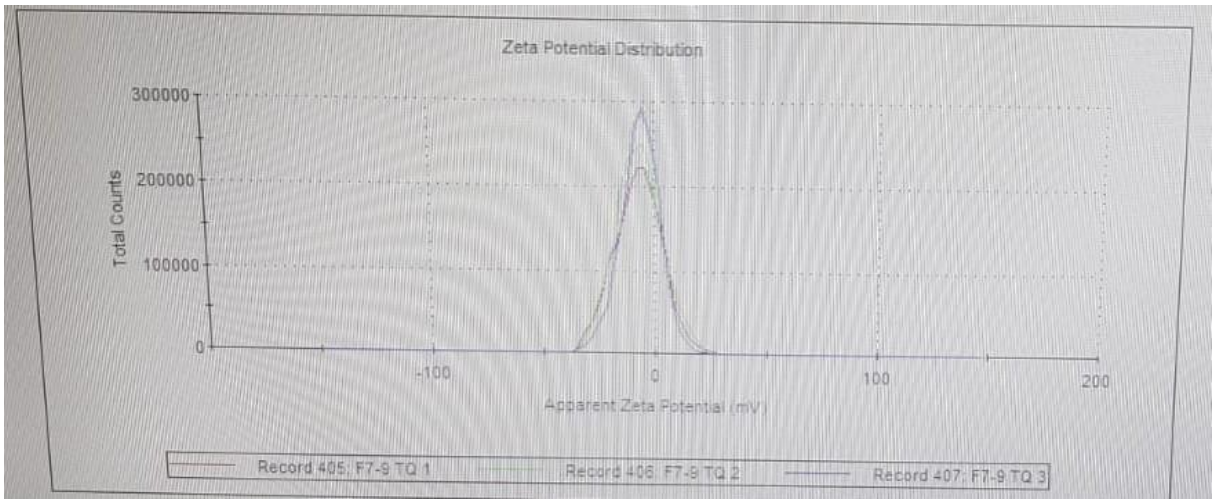


2. Ay

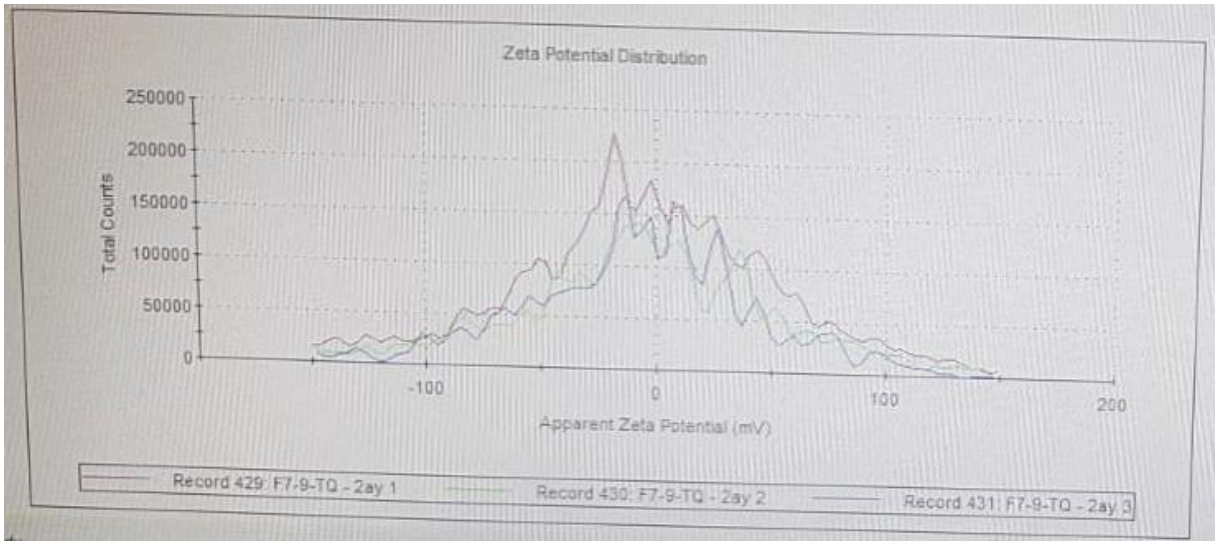


Şekil 59. F7-9-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi

1. Ay



2. Ay

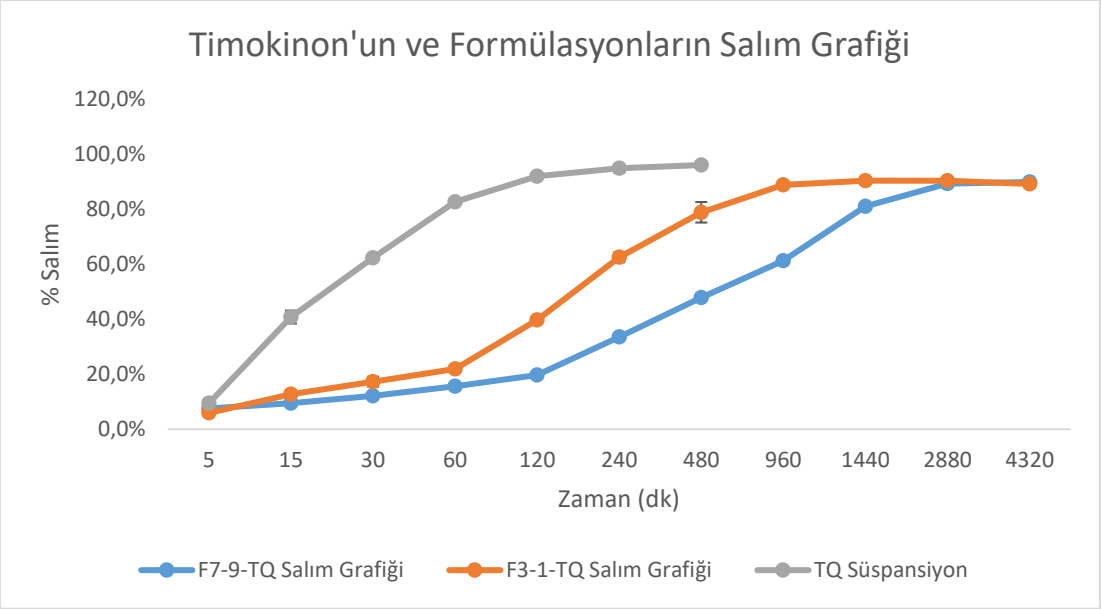


Şekil 60. F7-9-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi

İDEAL OKÜLER MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ *İN VİTRO* SALIM ÇALIŞMALARI BULGULARI

Oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* salım çalışması Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. 0, 15, 30dk, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 ve 72. saatte ortamdaki TQ miktarları belirlendi. Oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* salım çalışması sonuçları Şekil 61'de gösterildi. Formülasyonların 24-48 saat sonunda maksimum konstansantrasyonda ortama ilaç saldığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlarıyla kontollü salım sağlanabilmektedir. F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonları zamana bağlı doğrusal olarak artan ilaç salım profiline sahip olduğu görüldü. F3-1-TQ formülasyonu 1. saate kadar kontrollü salım yapıp, 2. ve 4. saate gelindiğinde

neredeyse ortamdaki ilaç konsantrasyonunu iki kat arttırdığı görüldü. 12. saatten sonra 24, 48 ve 72. saatlerde ilaç konsantrasyonu sabit kalıp, 12. saatten sonra ortamdaki ilaç salım yüzdeleri sırasıyla %88,8; %90,3; %90,3 ve %89,2 olarak bulundu. F7-9-TQ formülasyonu, F3-1-TQ formülasyonuna nazaran 8. saate kadar nispeten kontrollü salımını gerçekleştirip 12. saatte ortamdaki ilaç konsantrasyonunun arttığı görüldü. 12. ve 24. saatten sonra 48 ve 72. saatlerde ilaç konsantrasyonları sabitlenip ortamdaki ilaç salım yüzdeleri sırasıyla %89,3 ve %89,8 olarak bulundu. Aynı zamanda kontrol çalışması olarak diyaliz membran içerisine distile su ile hazırlanan TQ süspansiyonu hazırlanıp, salım profilide gözlendi. Oluşturulan her iki formülasyonda gözyaşı ortamında birbirine yakın salım profili gösterdi.

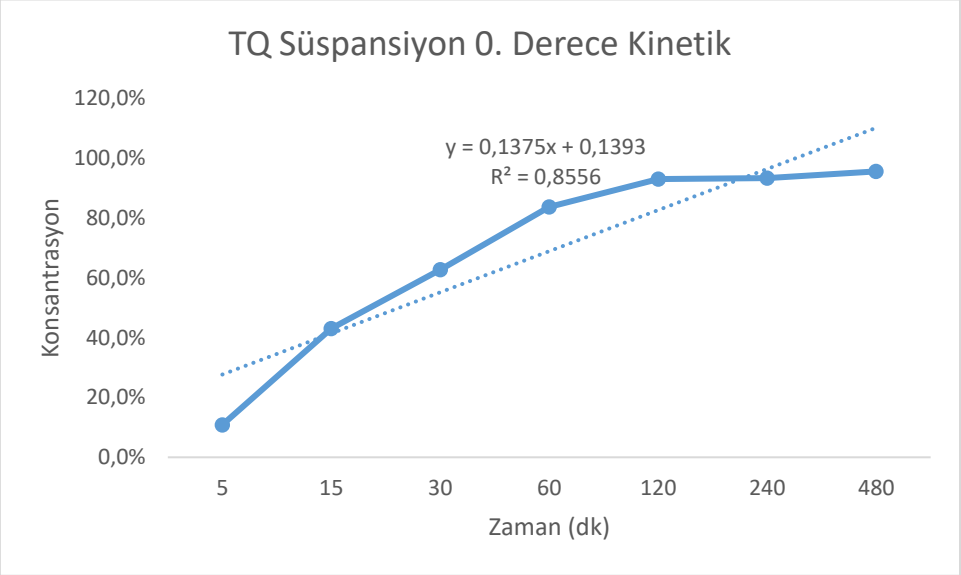


Şekil 61. TQ süspansiyonu ve formülasyonların zamana karşı % salım grafiği

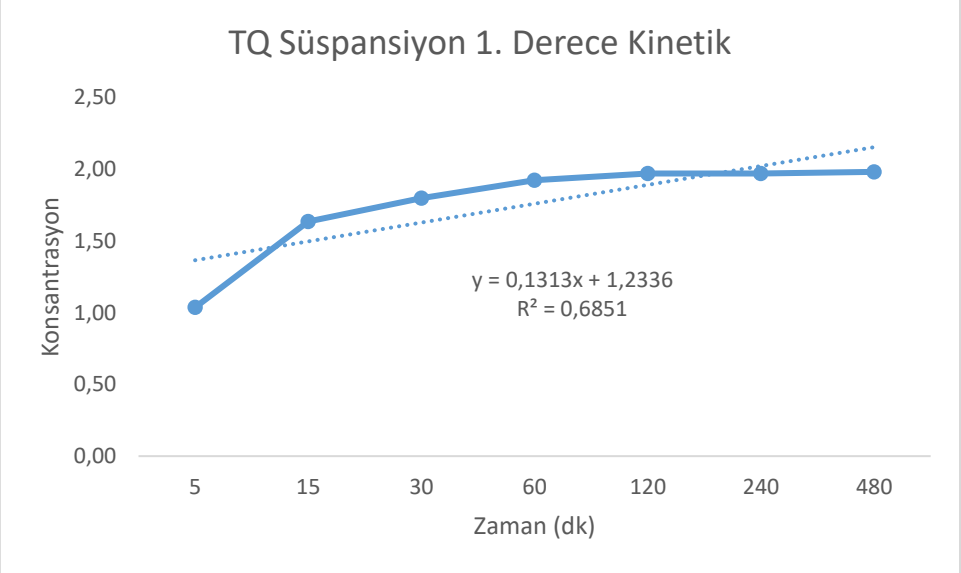
İDEAL OKÜLER MİKROEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ KİNETİK ÇALIŞMALARI BULGULARI

Kinetik değerlendirmeler kapsamında formülasyonlardan etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla salım sonuçlarına beş farklı kinetik model (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi modeli, Hixson-Crowell modeli ve Korsmeyer-Peppas modeli) uygulandı ve hem R^2 (regresyon katsayısı) hem de k (salım hız sabiti) değerleri hesaplandı. Oküler mikroemülsiyonların salım sonuçlarına göre hesaplanan kinetik modellerin grafiği Şekil 62 ila Şekil 76'da gösterildi ve sonuçlardan elde edilen R^2 ve k değerleri sonuçları Tablo 75'te verildi. En yüksek R^2 TQ süspansiyonu için 0,9195 olarak Higuchi modeli olarak bulundu. F3-1-TQ formülasyonunda ise en yüksek R^2 değeri 0,9127 olarak bulunup 0. derece

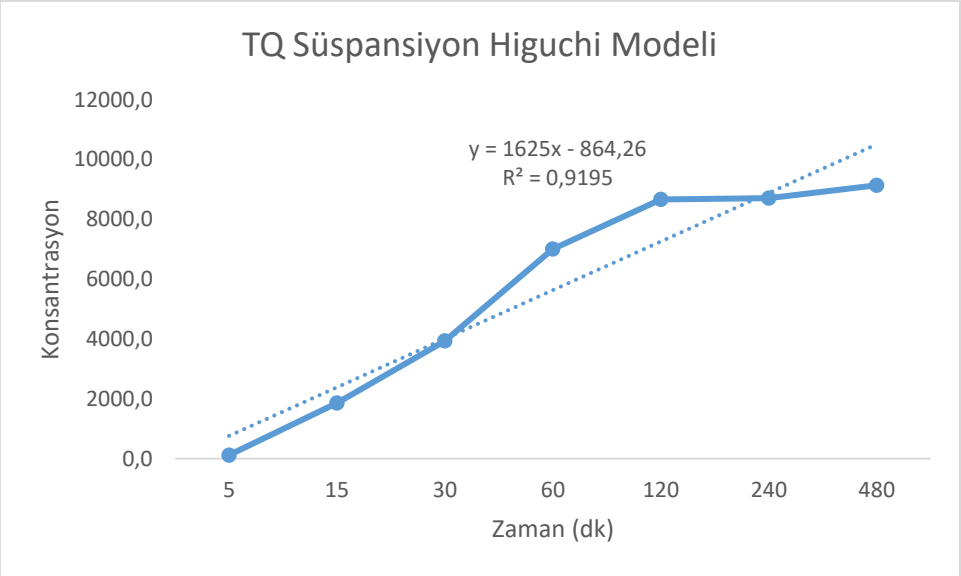
ve Hixson-Crowell modeli olarak bulundu. Son olarak F7-9-TQ formülasyonunda en yüksek R^2 değeri 0,9770 olarak bulunup 1. derece kinetik ve Korsmeyer-Peppas modeli olarak bulundu.



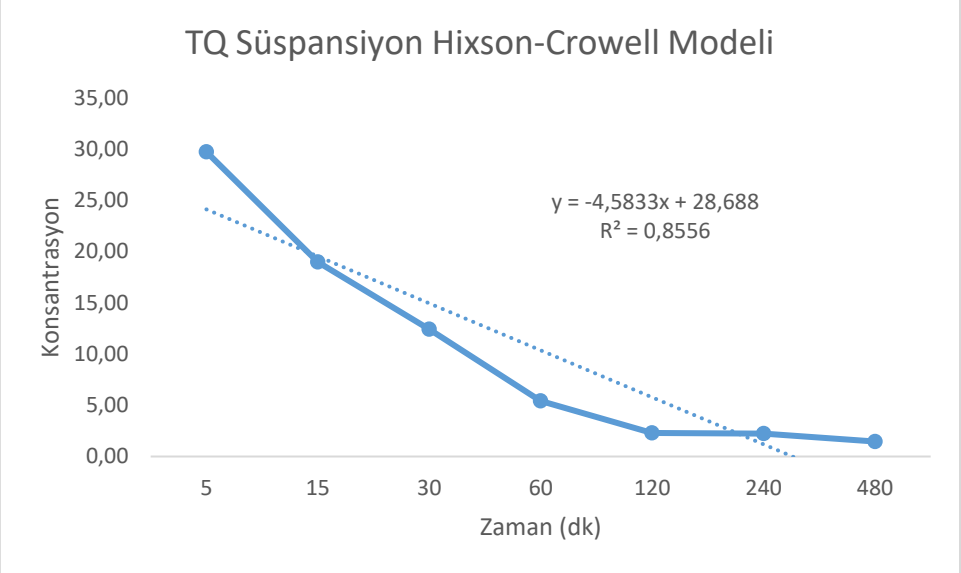
Şekil 62. TQ süspansiyonunun 0. derece kinetik çalışması grafiği



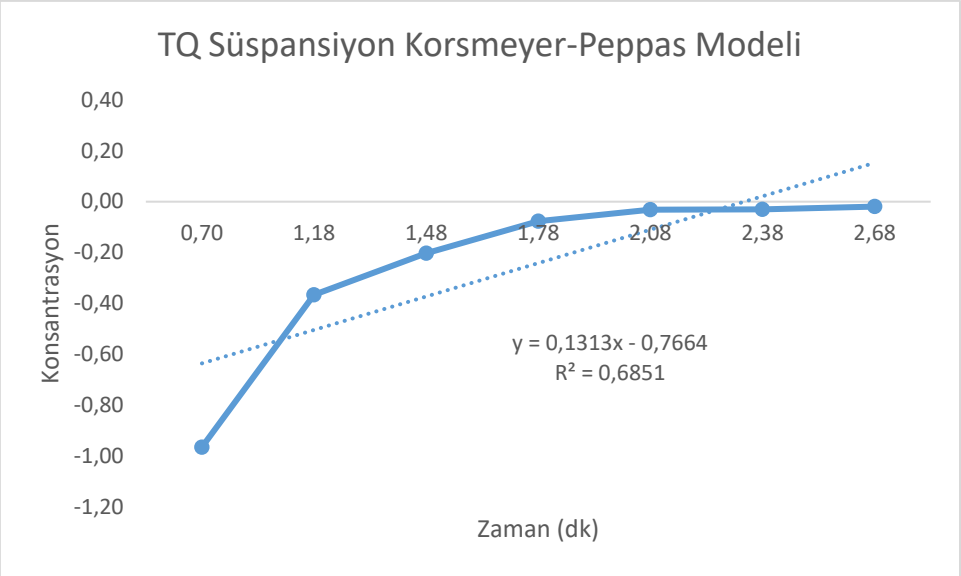
Şekil 63. TQ süspansiyonunun 1. derece kinetik çalışması grafiği



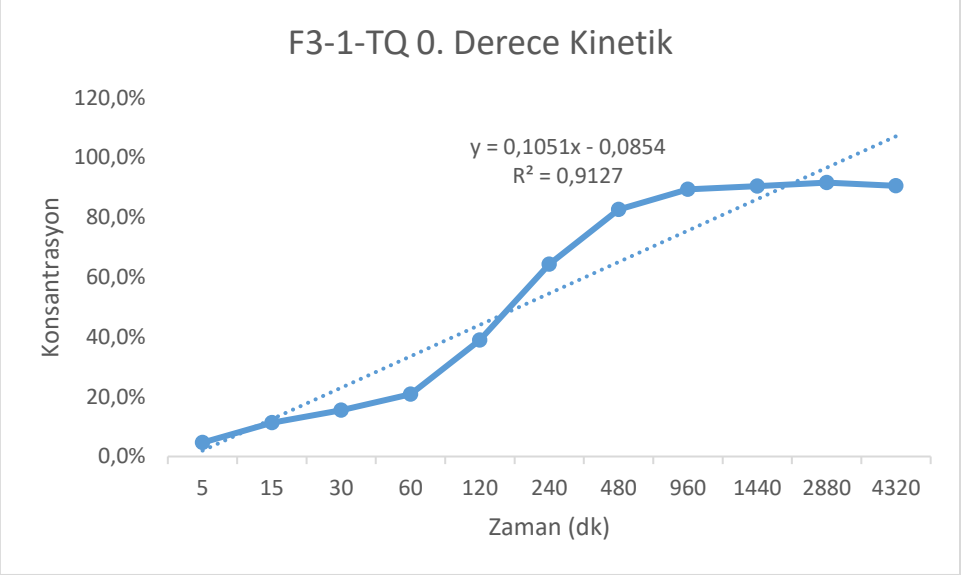
Şekil 64. TQ süspansiyonunun Higuchi modeli kinetik çalışması grafiği



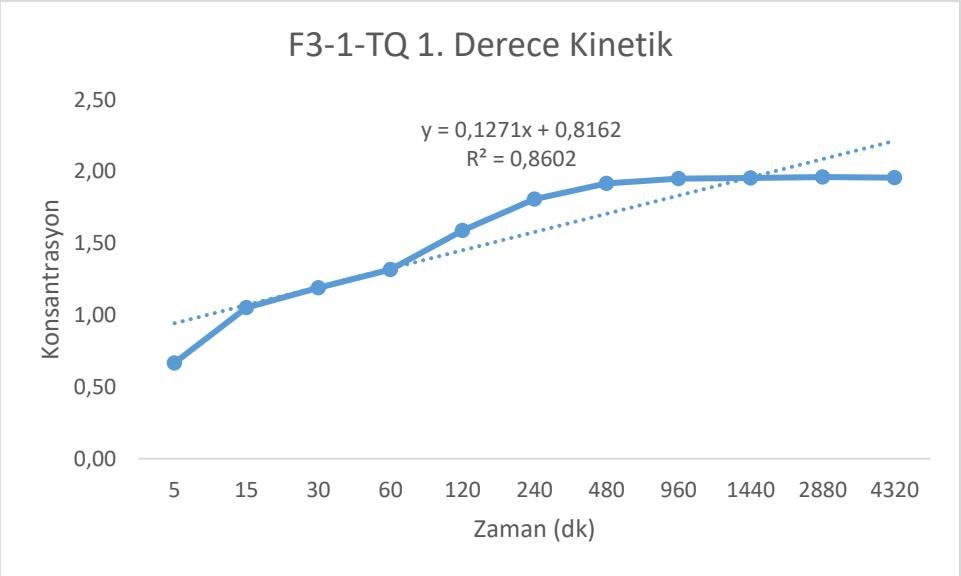
Şekil 65. TQ süspansiyonunun Hixson-Crowell modeli kinetik çalışması grafiği



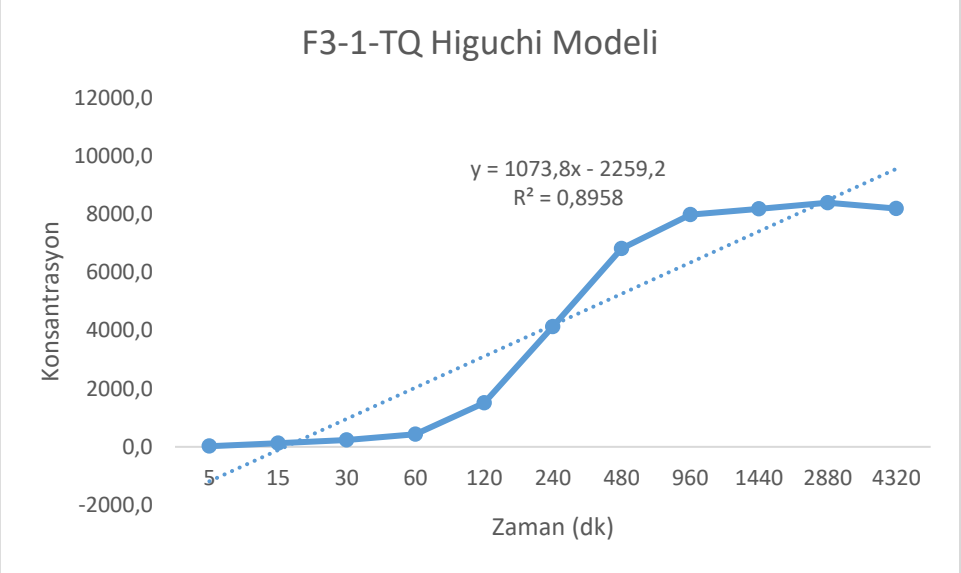
Şekil 66. TQ süspansiyonunun Korsmeyer-Peppas modeli kinetik çalışması grafiği



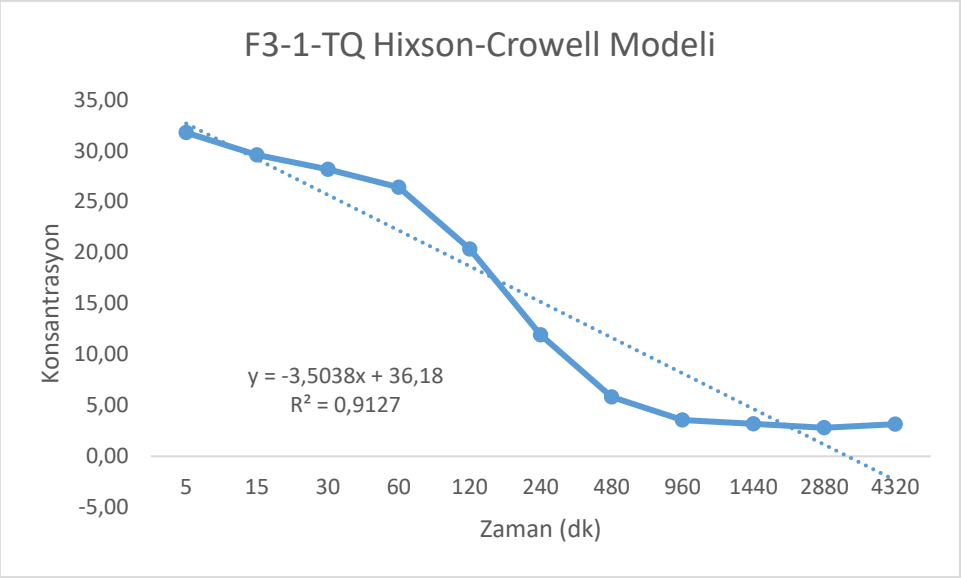
Şekil 67. F3-1-TQ formülasyonunun 0. derece kinetik çalışması grafiği



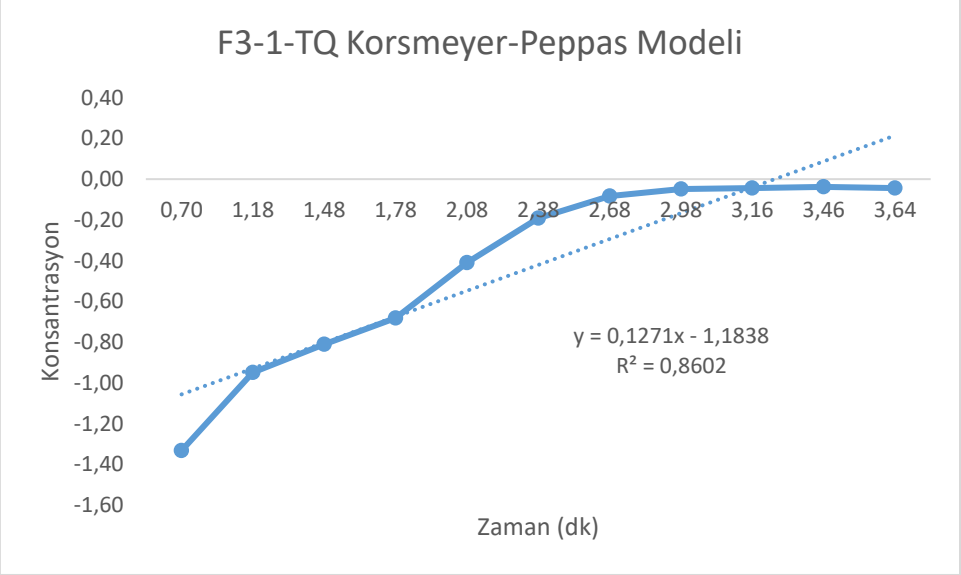
Şekil 68. F3-1-TQ formülasyonunun 1. derece kinetik çalışması grafiği



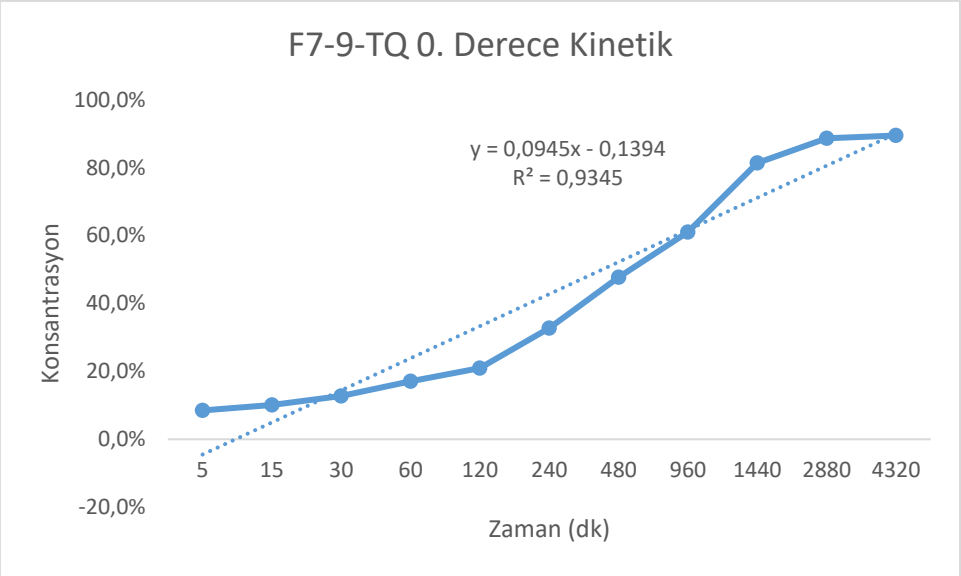
Şekil 69. F3-1-TQ formülasyonunun Higuchi modeli kinetik çalışması grafiği



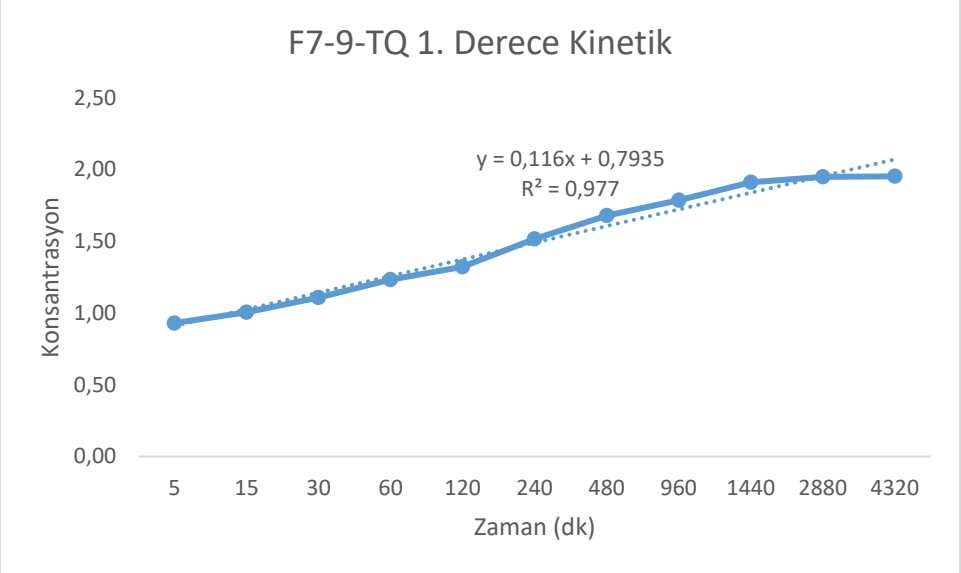
Şekil 70. F3-1-TQ formülasyonunun Hixson-Crowell modeli kinetik çalışması grafiği



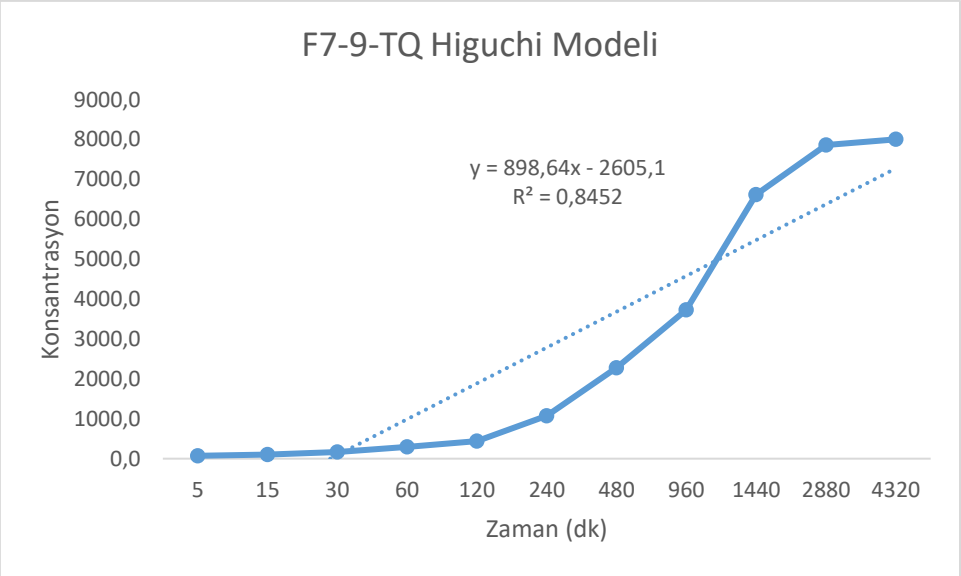
Şekil 71. F3-1-TQ formülasyonunun Korsmeyer-Peppas modeli kinetik çalışması grafiği



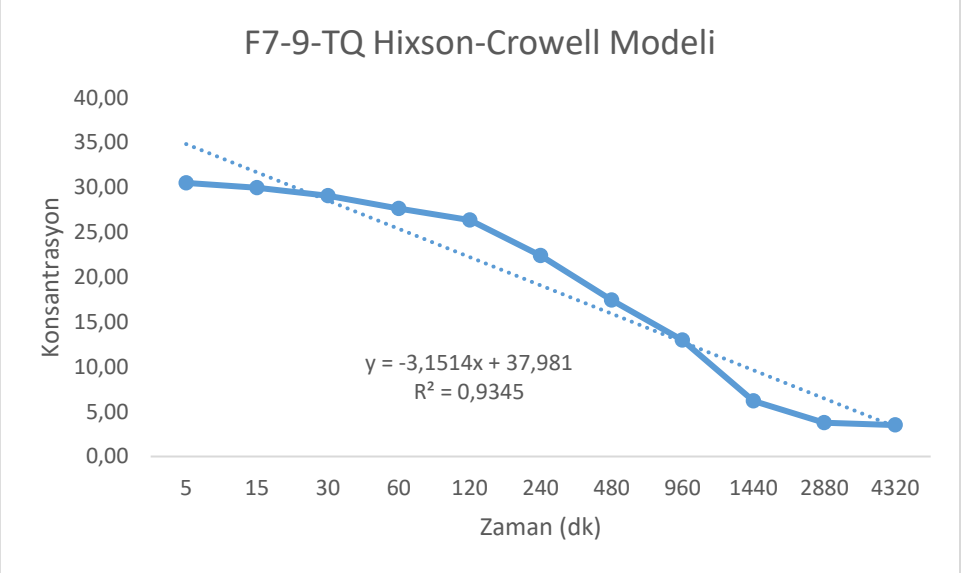
Şekil 72. F7-9-TQ formülasyonunun 0. derece kinetik çalışması grafiği



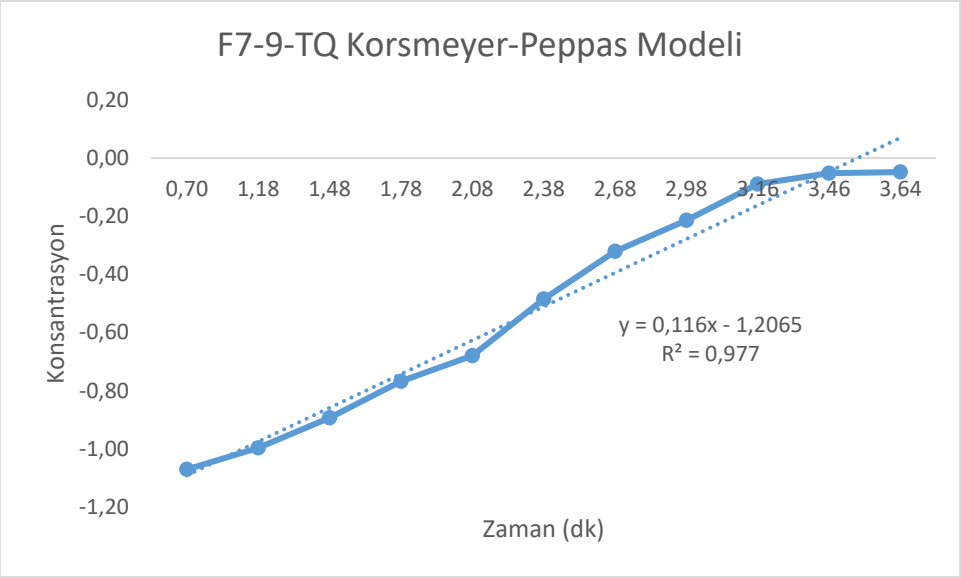
Şekil 73. F7-9-TQ formülasyonunun 1. derece kinetik çalışması grafiği



Şekil 74. F7-9-TQ formülasyonunun Higuchi modeli kinetik çalışması grafiği



Şekil 75. F7-9-TQ formülasyonunun Hixson-Crowell modeli kinetik çalışması grafiği



Şekil 76. F7-9-TQ formülasyonunun Korsmeyer-Peppas modeli kinetik çalışmasının grafiği

Tablo 75. TQ süspansiyonu ve formülasyonlarının kinetik çalışmaları sonucu elde edilen R^2 ve k değeri sonuçları

		0. Derece Kinetik	1. Derece Kinetik	Higuchi Modeli	Hixson-Crowell Modeli	Korsmeyer-Peppas Modeli
TQ Süspansiyon	R^2	0,8586	0,6851	0,9195	0,8586	0,6851
	k	0,1375	0,1313	1625	-4,5833	0,1313
F3-1-TQ	R^2	0,9127	0,8602	0,8958	0,9127	0,8602
	k	0,1051	0,1271	1073,8	-3,5038	0,1271
F7-9-TQ	R^2	0,9345	0,977	0,8452	0,9345	0,977
	k	0,0945	0,116	868,64	-3,1514	0,116

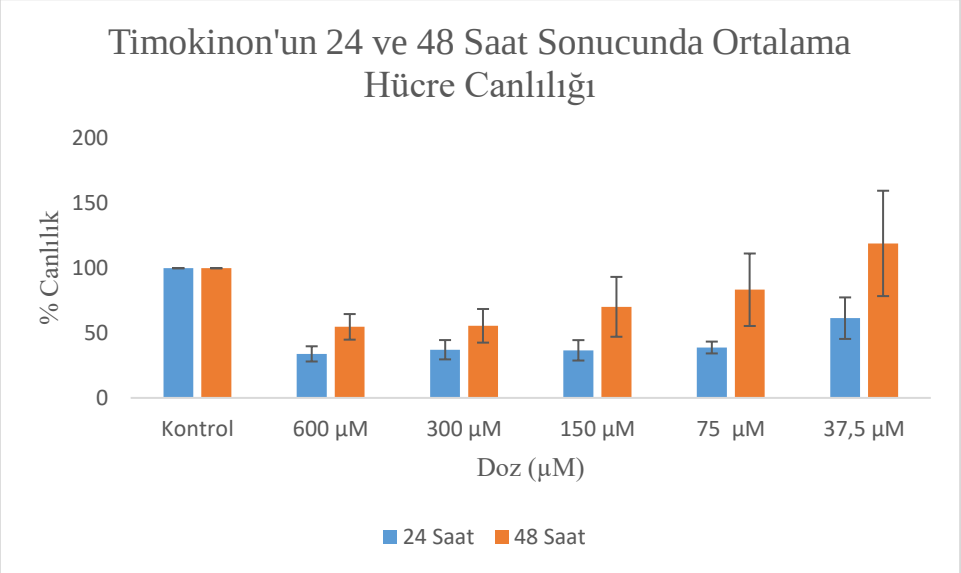
MTT YÖNTEMİ SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

ARPE-19 Hücre Hattına Uygulanan TQ ve Formülasyonların IC_{50} Değerleri

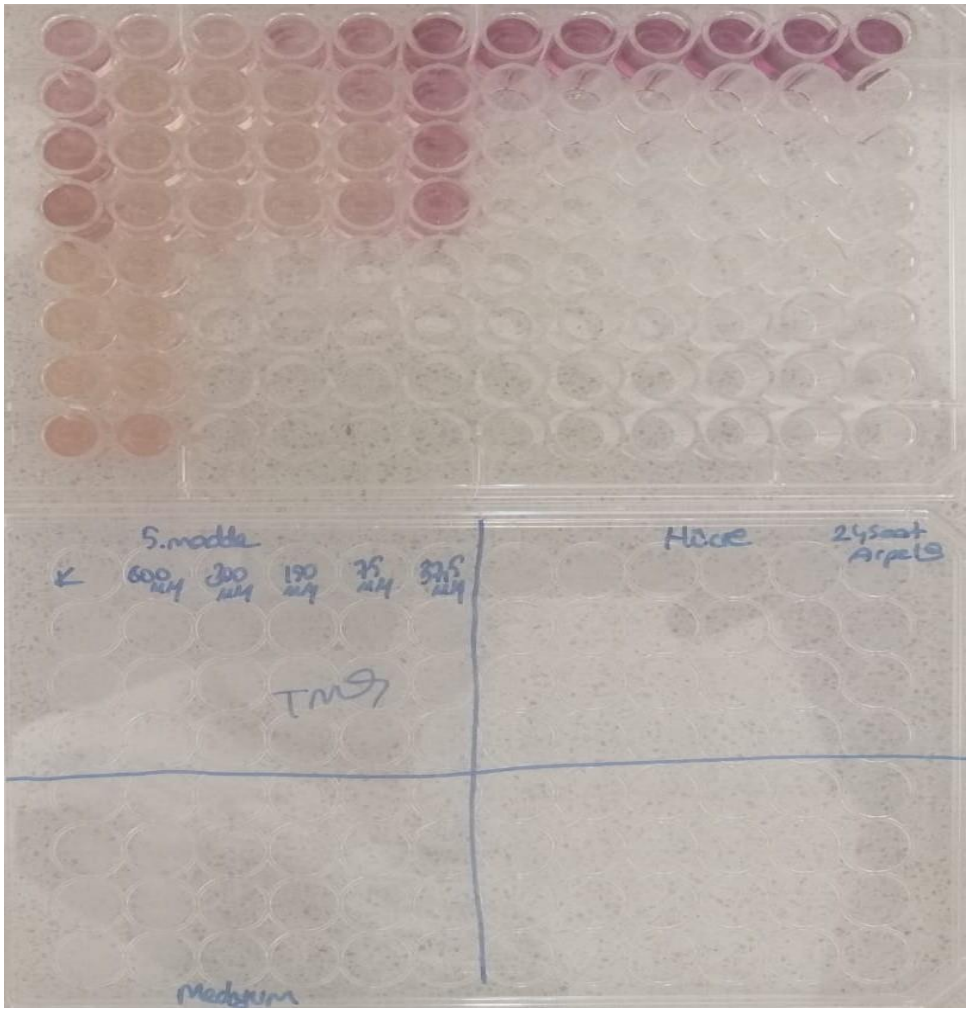
Çalışma kapsamında ARPE-19 hücre hatlarında TQ ve formülasyonların farklı dozlarda uygulanmasının 24 ve 48 saatlerde hücre canlılığı üzerine etkisi Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde MTT testi ile saptandı.

Timokinon: Saf TQ'nun ARPE-19 hücrelerine belirli dozlarla 24 ve 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi incelendi.

TQ uygulamasından 24 ve 48 saat sonra ARPE-19 hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu belirlendi ($p<0.0001$). 24 saatlik verilerle yapılan çalışmada ARPE-19 hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 600 µM dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %33,9411 ± 5,8587 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 37,5 µM dozunda %61,4711 ± 16,0032 olduğu belirlendi. 48 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 600 µM dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %55,58075 ± 12,96632 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 37,5 µM dozununda %119,1156 ± 40,62683 olduğu belirlendi. Şekil 80'de TQ'nun 24 ve 48 saat içindeki hücre canlılığı verileri verildi. TQ'nun ARPE-19 hücre hattına 24 ve 48 saat uygulandığı MTT plağı Şekil 78 ve Şekil 79'da verildi.



Şekil 77. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 37,5 µM ile 600 µM dozlarında TQ uygulamasının hücre canlılığına etkisi

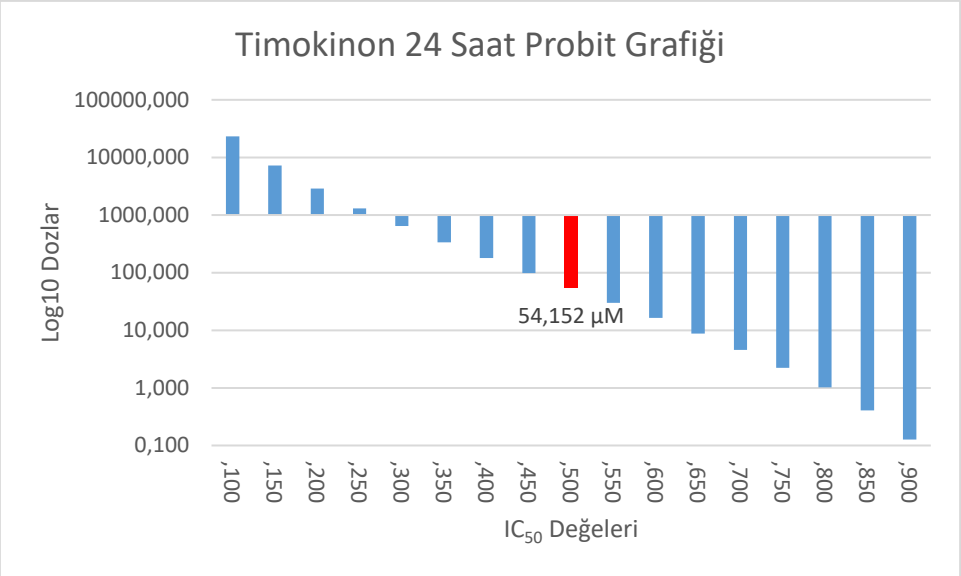


Şekil 78. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süreyle TQ'nun uygulandığı MTT testi plağı

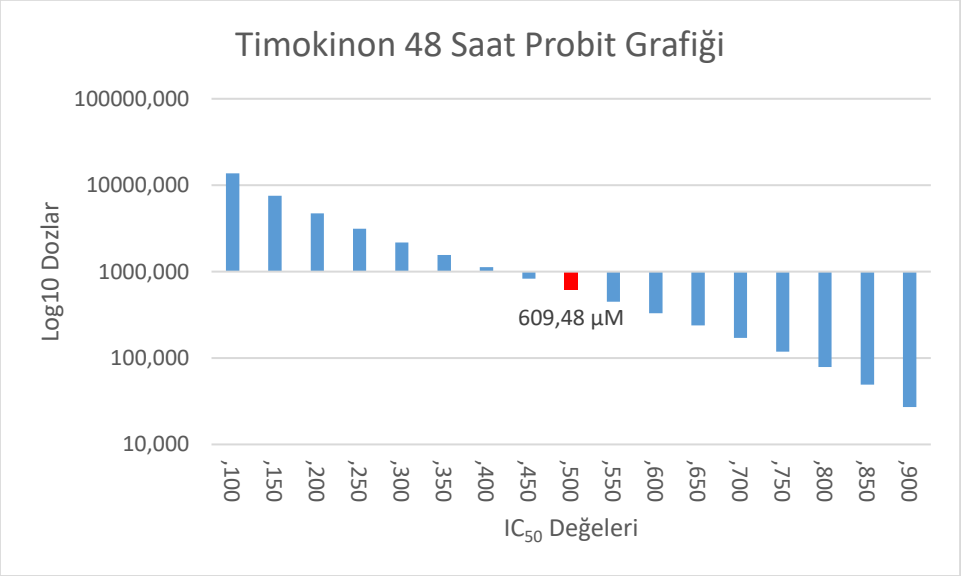


Şekil 79. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süreyle TQ'nun uygulandığı MTT testi plağı

Çalışmada farklı dozlarda TQ uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. ve 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değerleri sırasıyla 54,152 µM ve 609,48 µM olarak hesaplandı (Şekil 80 ve Şekil 81).



Şekil 80. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile TQ uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri

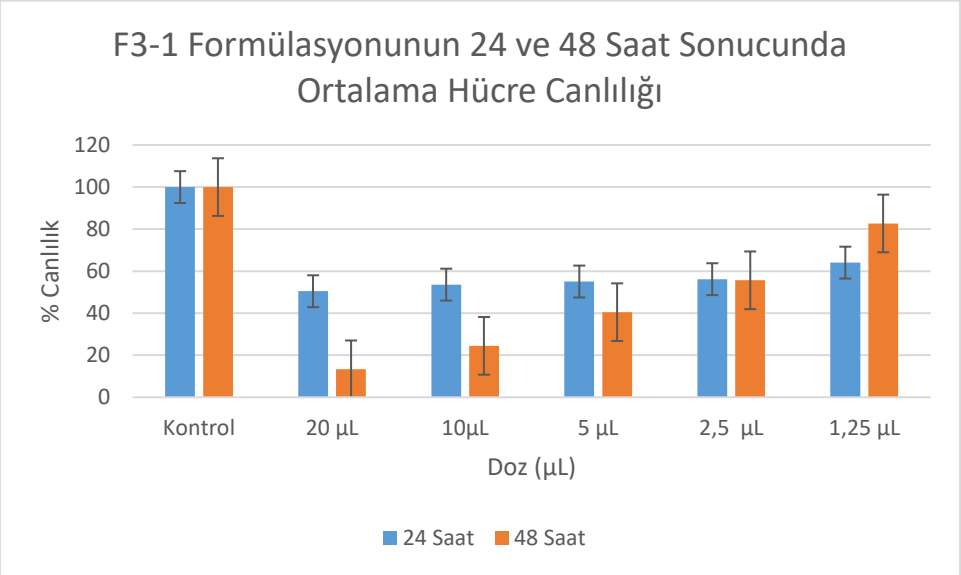


Şekil 81. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile TQ uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri

F3-1 ve F7-9 formülasyonları: F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ARPE-19 hücrelerine belirli dozlarla 24 ve 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi incelendi.

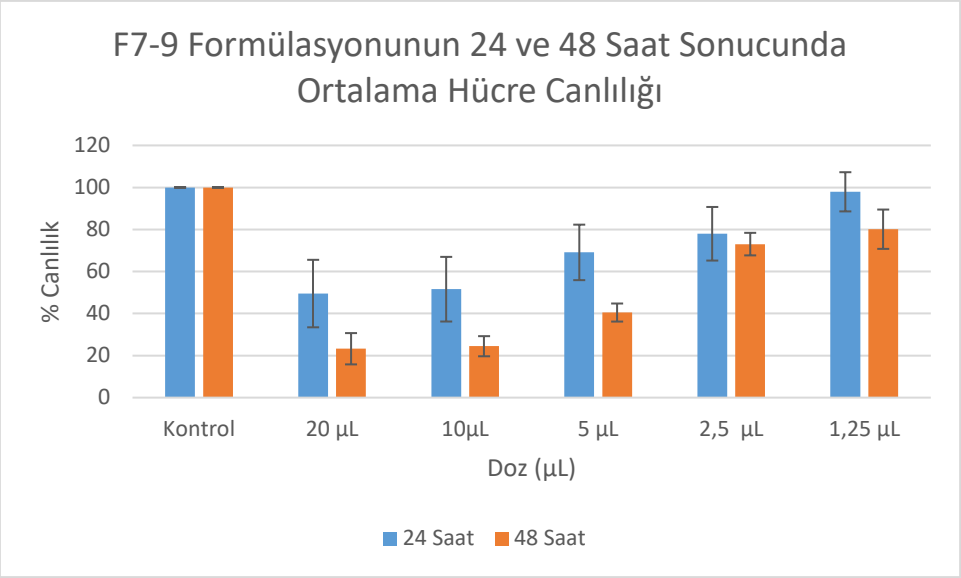
F3-1 formülasyonunun uygulamasından 24 ve 48 saat sonra ARPE-19 hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu belirlendi ($p<0.0001$). 24 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 20 µL dozunda

olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %50,4501 ± 5,3872 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 1,25 µL dozunda %64,0666 ± 6,3897 olduğu belirlendi. 48 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 20 µL dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %13,3023 ± 1,9788 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 1,25 µL dozunda %82,7000 ± 30,6475 olduğu belirlendi. Şekil 82'de F3-1 formülasyonunun 24 ve 48 saat içindeki hücre canlılığı verileri verildi.



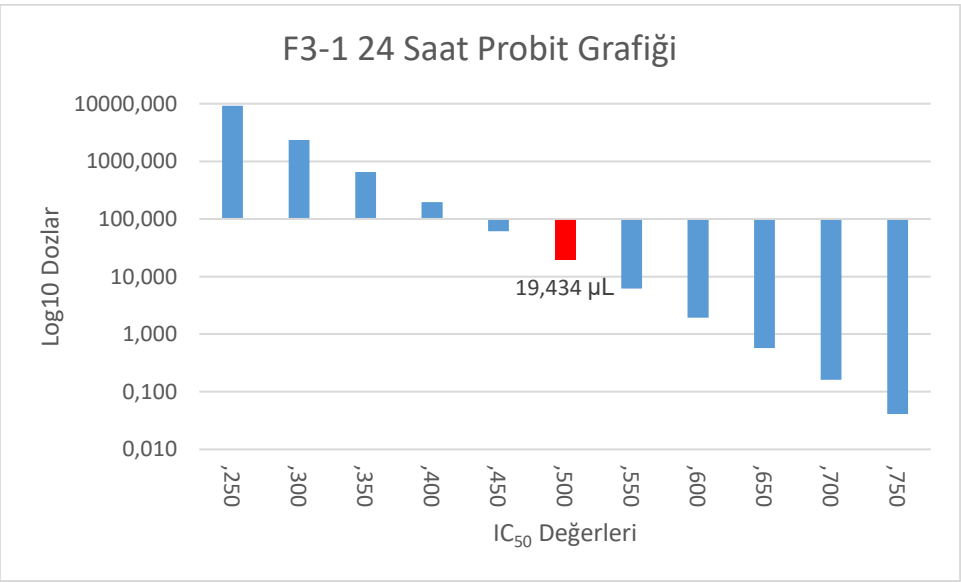
Şekil 82. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi

F7-9 formülasyonunun uygulamasından 24 ve 48 saat sonra ARPE-19 hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu belirlendi ($p<0.0001$). 24 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 20 µL dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %49,51393 ± 16,0546 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 1,25 µL dozunda %97,9361 ± 9,3261 olduğu belirlendi. 48 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 20 µL dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %23,2618 ± 7,4400 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 1,25 µL dozunda %80,1314 ± 9,3505 olduğu belirlendi. Şekil 83'te F7-9 formülasyonunun 24 ve 48 saat içindeki hücre canlılığı verileri verildi.

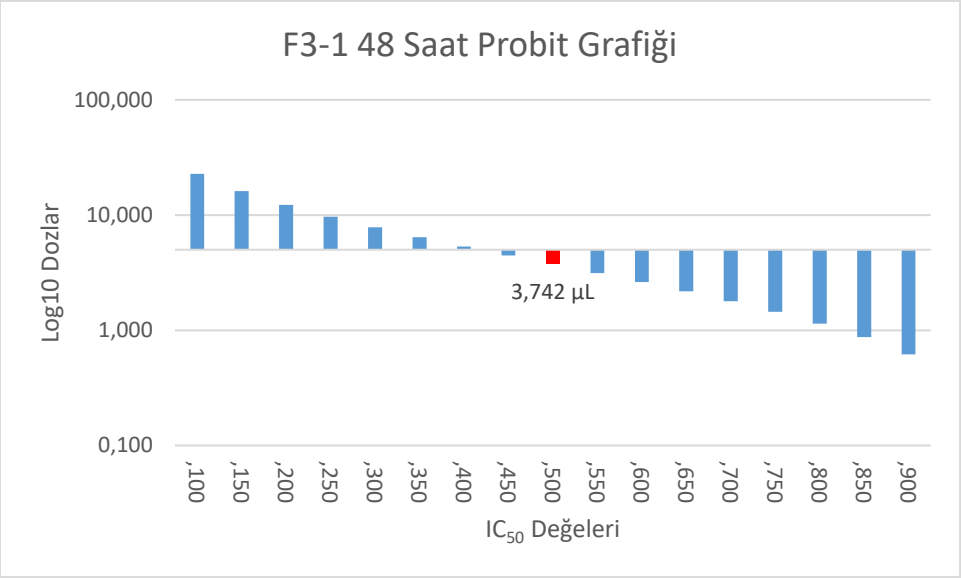


Şekil 83. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F7-9 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Çalışmada farklı dozlarda F3-1 formülasyonu uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. ve 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değerleri sırasıyla 19,431 µL ve 3,742 µL olarak hesaplandı (Şekil 84 ve Şekil 85).

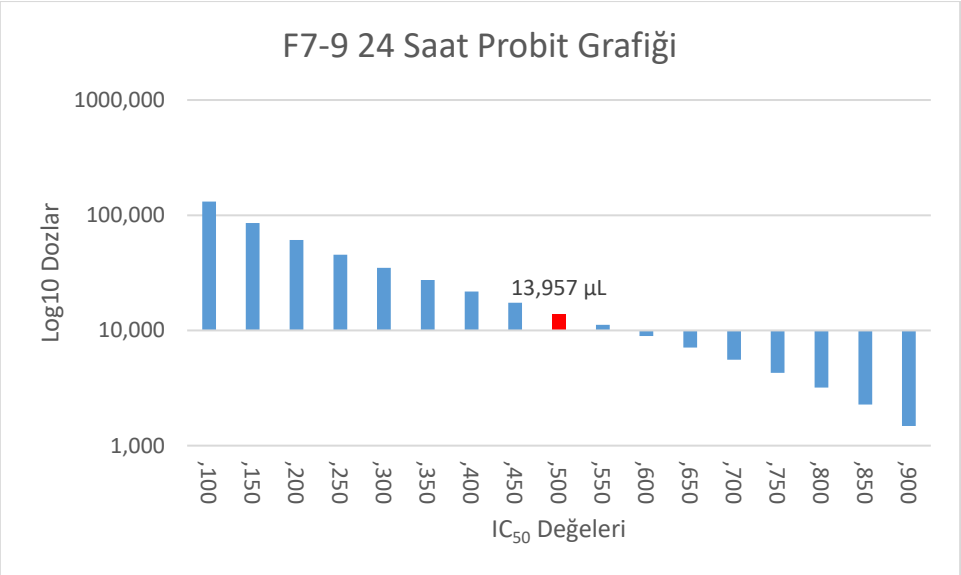


Şekil 84. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F3-1 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri

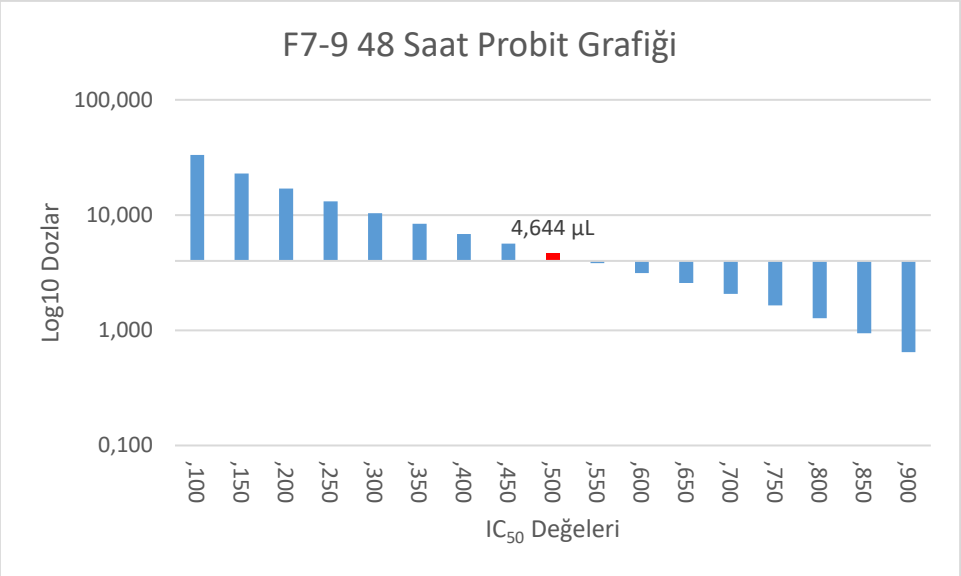


Şekil 85. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri

Çalışmada farklı dozlarda F7-9 formülasyonu uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. ve 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değerleri sırasıyla 13,957 µL ve 4,644 µL olarak hesaplandı (Şekil 86 ve Şekil 87).



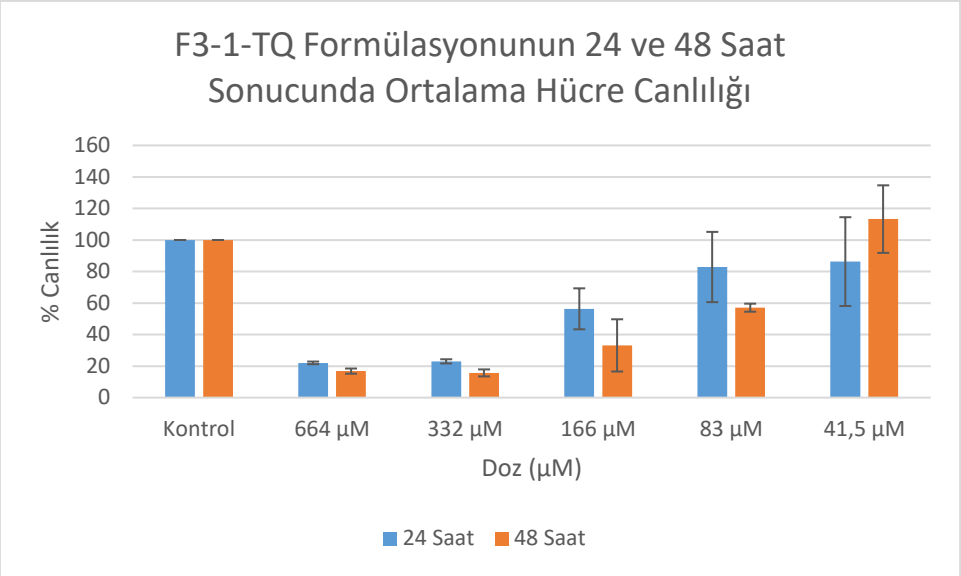
Şekil 86. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F7-9 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri



Şekil 87. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri

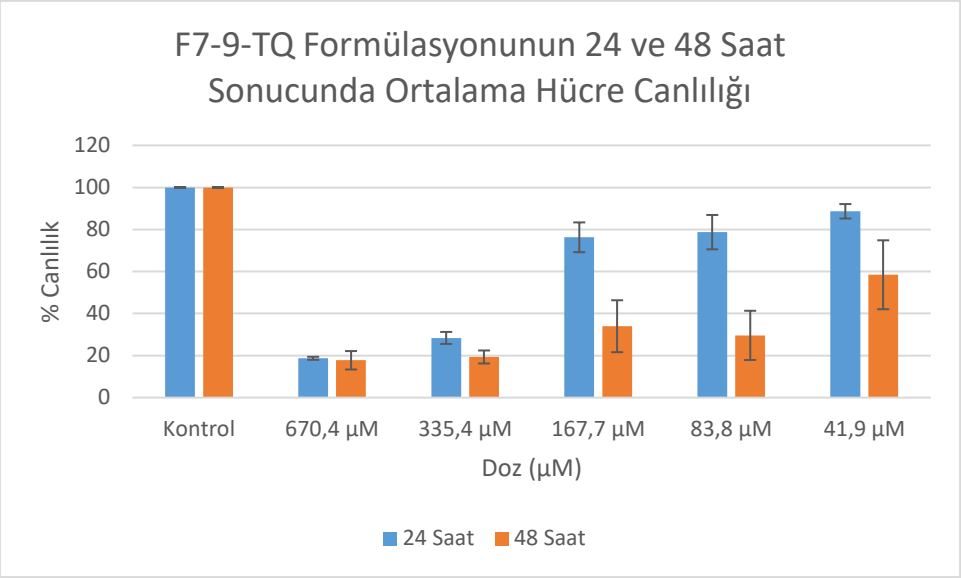
F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonları: F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonlarının ARPE-19 hücrelerine belirli dozlarla uygulanıp 24 ve 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi incelendi.

F3-1-TQ formülasyonunun uygulamasından 24 ve 48 saat sonra ARPE-19 hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu belirlendi ($p<0.0001$). 24 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 664 µM dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %22,0460 ± 0,8425 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 41,5 µM dozunda %86,2893 ± 28,1768 olduğu belirlendi. 48 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 664 µM dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %16,8294 ± 1,6453 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 41,5 µM dozunda %113,2524 ± 21,4242 olduğu belirlendi. Şekil 88'de F3-1-TQ formülasyonunun 24 ve 48 saat içindeki hücre canlılığı verileri verildi.



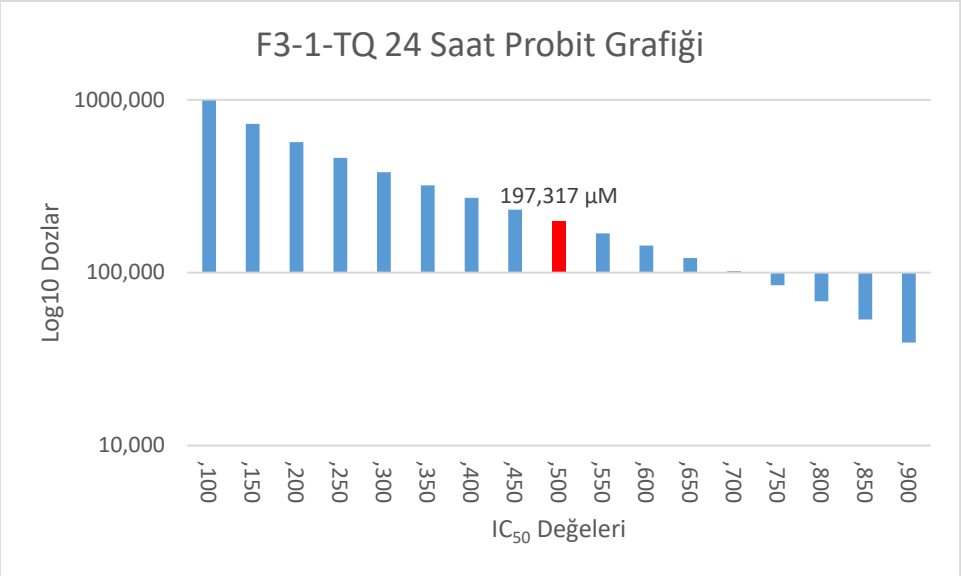
Şekil 88. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi

F7-9-TQ formülasyonunun uygulamasından 24 ve 48 saat sonra ARPE-19 hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu belirlendi ($p<0.0001$). 24 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 670,4 µM dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %18,7149 ± 0,7191 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 41,9 µM dozunda %88,6581 ± 3,4409 olduğu belirlendi. 48 saatlik veriler ile yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 670,4 µM dozunda olduğu ve bu dozda ortamdaki hücrelerin sadece %17,7795 ± 4,3849 olduğu saptandı. En yüksek hücre canlılığının ise 41,9 µM dozunda %58,4548 ± 16,3996 olduğu belirlendi. Şekil 89'da F7-9-TQ formülasyonunun 24 ve 48 saat içindeki hücre canlılığı verileri verildi.

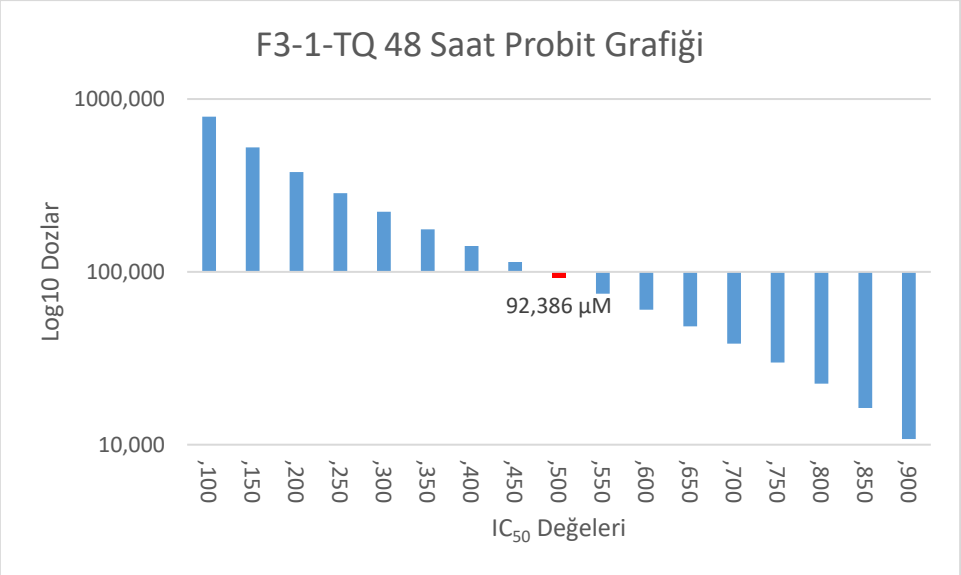


Şekil 89. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F7-9-TQ formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Çalışmada farklı dozlarda F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 197,32 µM olarak hesaplandı. Çalışmada farklı dozlarda F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 92,386 µM olarak hesaplandı (Şekil 90 ve Şekil 91).



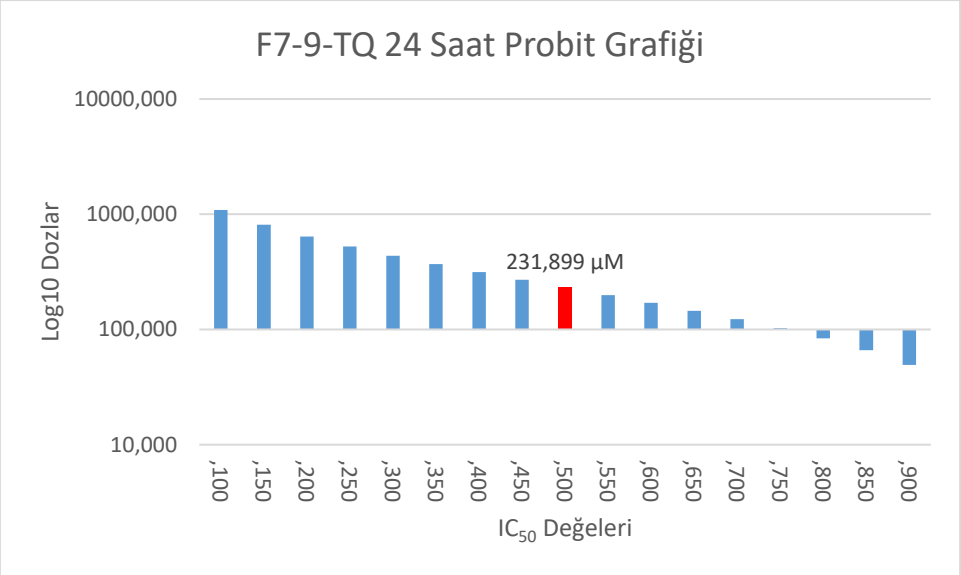
Şekil 90. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri



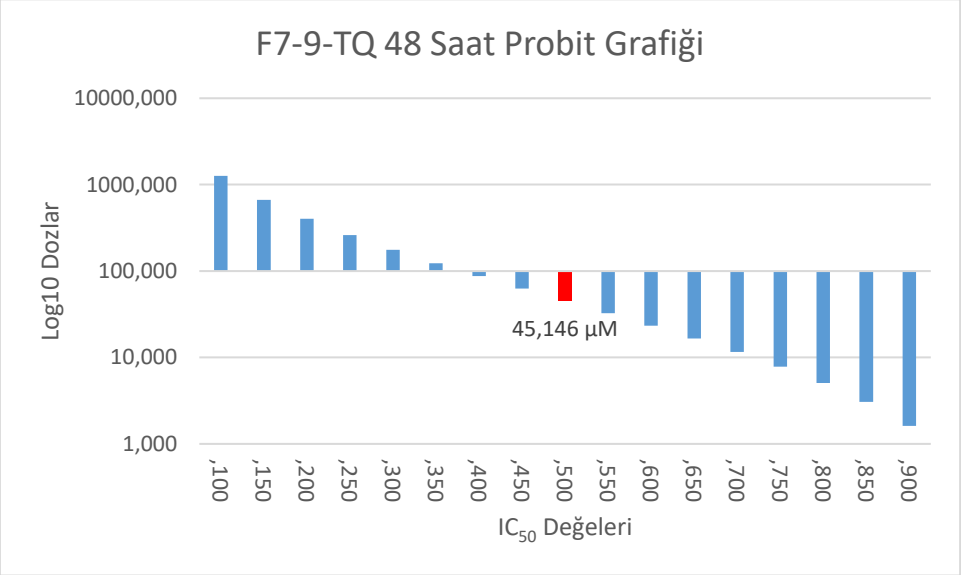
Şekil 91. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri

Çalışmada farklı dozlarda F7-9-TQ formülasyonu uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 231,90 µM olarak hesaplandı. Çalışmada farklı dozlarda F7-9-TQ formülasyonu uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 45,15

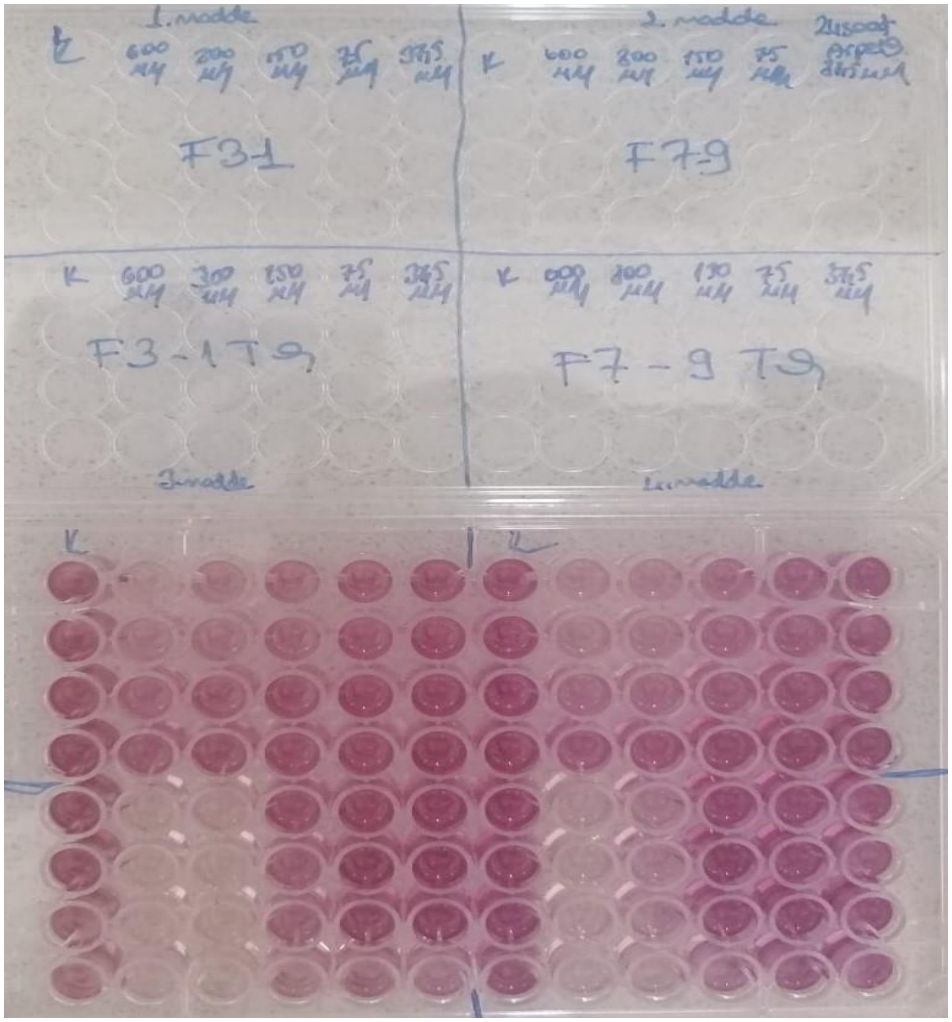
µM olarak hesaplandı (Şekil 92 ve Şekil 93). F3-1, F3-1-TQ, F7-9 ve F7-9-TQ formülasyonlarının ARPE-19 hücre hattına 24 ve 48 saat uygulandığı MTT plağı Şekil 94 ve Şekil 95'te verildi.



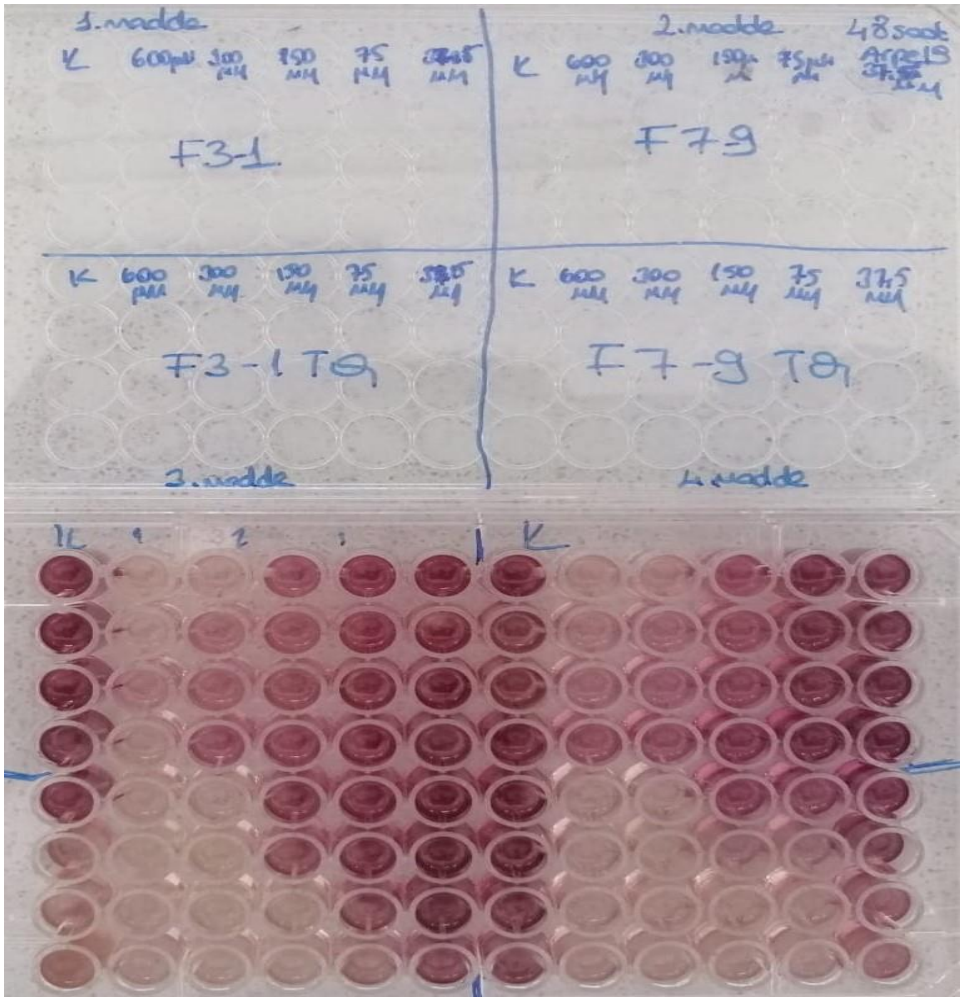
Şekil 92. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F7-9-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri



Şekil 93. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri



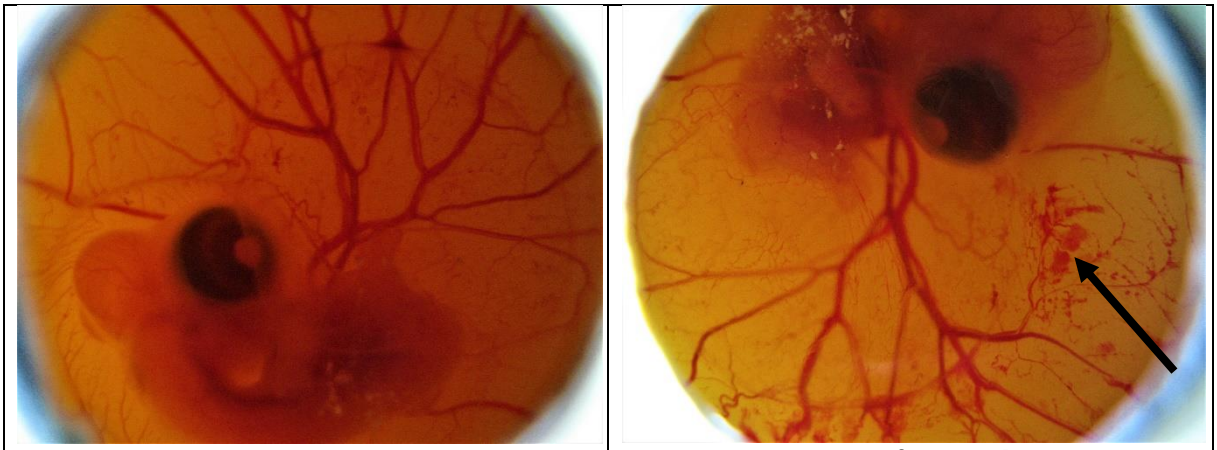
Şekil 94. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı (F3-1, F7-9, F3-1-TQ, F7-9-TQ), veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma



Şekil 95. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı (F3-1, F7-9, F3-1-TQ, F7-9-TQ), veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma

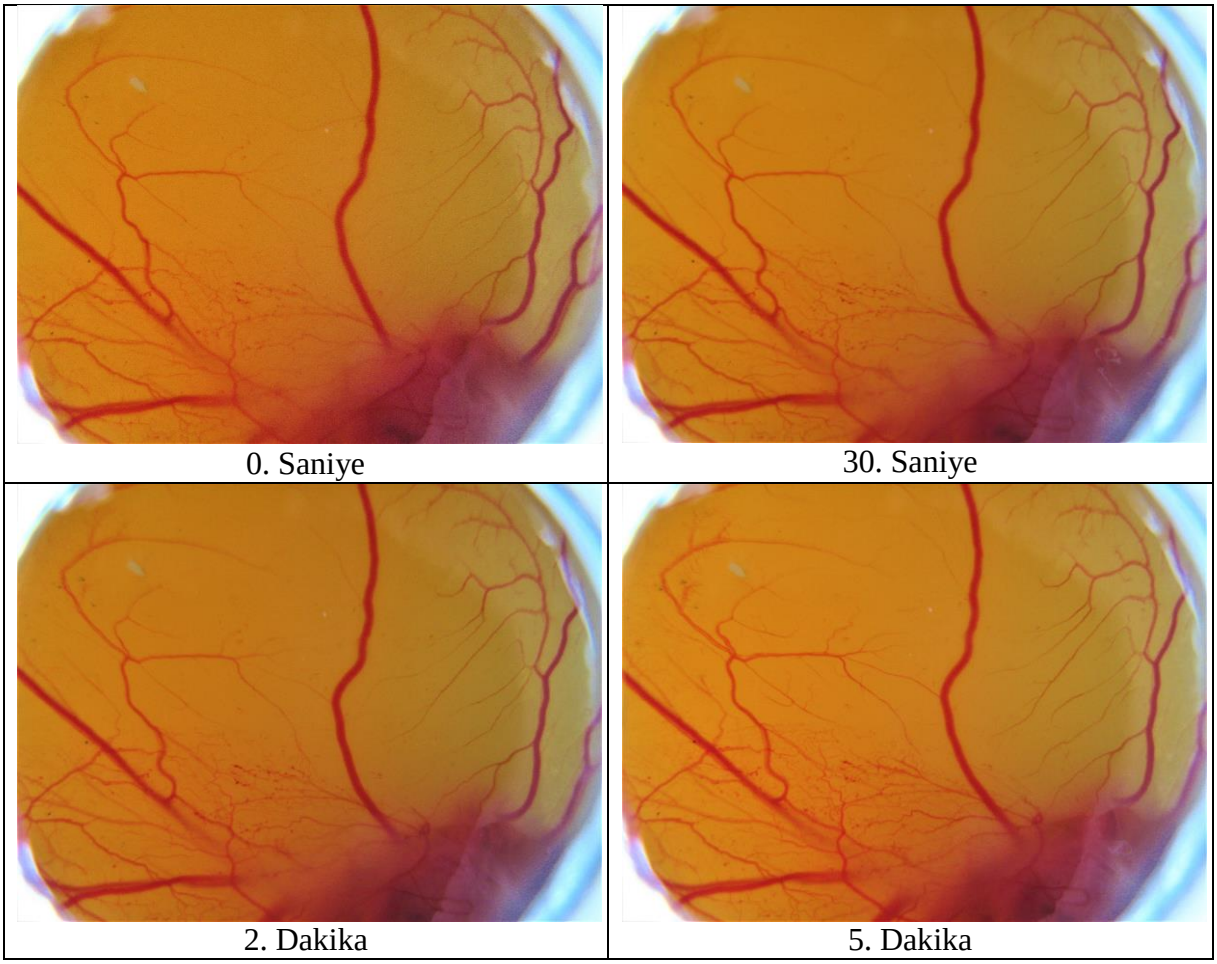
HET-CAM testi bulguları

Yapılan HET-CAM testi ile CAM üzerinde damarlanma, lizis ve pıhtılaşma bakımından değerlendirmeler yapıldı ve fotoğraflandı. Çalışmada pozitif kontrol olarak 0,1N NaOH, negatif kontrol olarak normal salin (%0,9 NaCl) kullanıldı. TQ yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonları (F3-1-TQ ve F7-9-TQ) 0,3 mL olacak şekilde uygulandı. Deney her bir numune için 5 kez tekrar edildi. Test sonucunda uygulanan formülasyonlarda herhangi bir irritasyona neden olmadı (Şekil 96, Şekil 97 ve Şekil 98).



Pozitif Kontrol | Negatif Kontrol

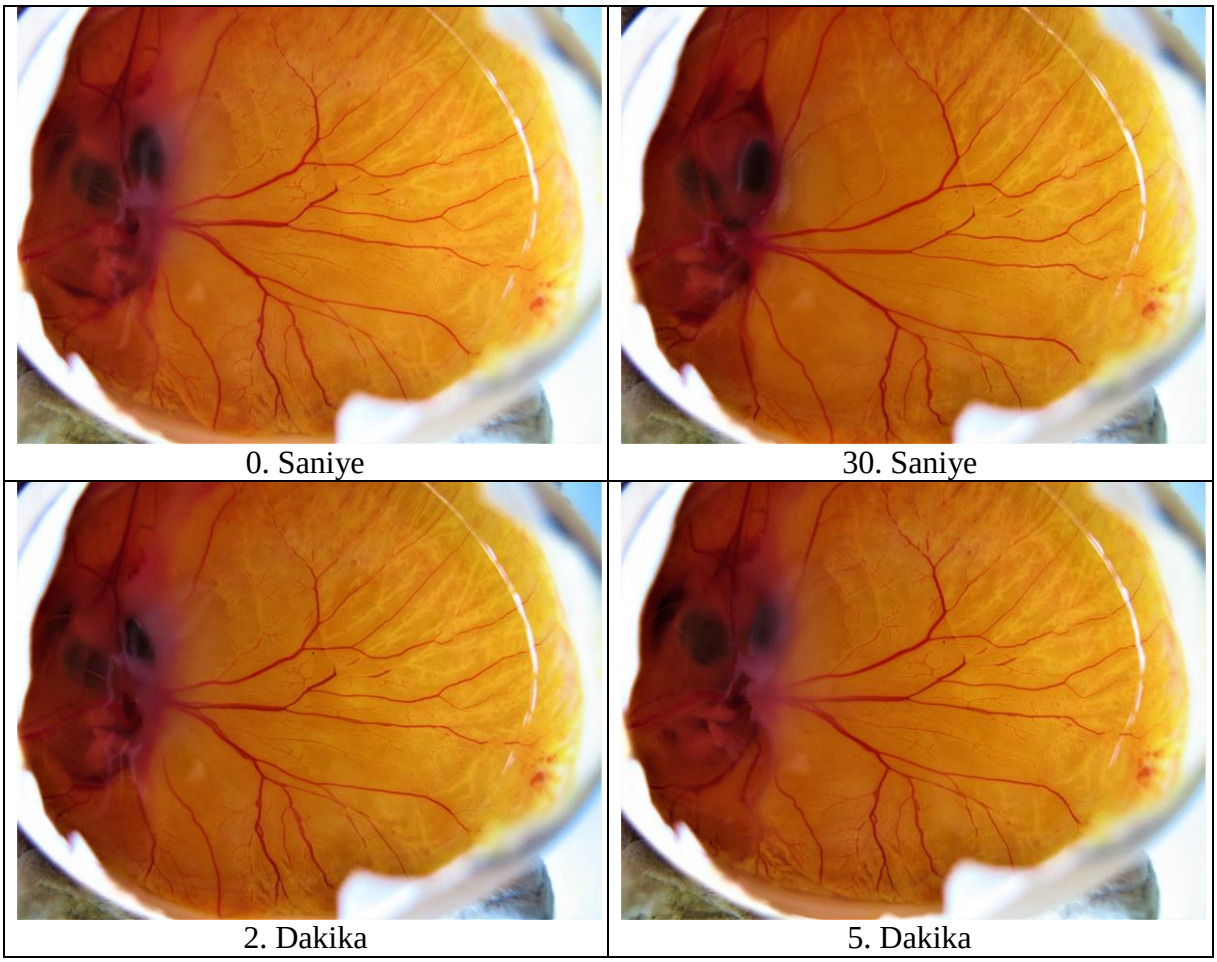
Şekil 96. HET-CAM testi Pozitif Kontrol ve Negatif Kontrol Grubu



0. Saniye | 30. Saniye

2. Dakika | 5. Dakika

Şekil 97. HET-CAM testi, F3-1-TQ formülasyon grubu



0. Saniye | 30. Saniye

2. Dakika | 5. Dakika

Şekil 98. HET-CAM testi, F7-9-TQ formülasyon grubu

Hesaplamalar:

- F3-1-TQ Formülasyonu

Kanama = Yok

Vasküler Lizis = 266,4 saniye

Pıhtılaşma = Yok

$$\left(\frac{301-266{,}4}{300}\ x\ 5\right)+\left(\frac{301-301}{300}\ x\ 7\right)+\left(\frac{301-301}{300}\ x\ 9\right)$$

Skor Sonucu = 0,346 = Tahriş edici olmayan

- F7-9-TQ Formülasyonu

Kanama = Yok

Vasküler Lizis = Yok

Pıhtılaşma = Yok

$$\left(\frac{301-301}{300}\ x\ 5\right)+\left(\frac{301-301}{300}\ x\ 7\right)+\left(\frac{301-301}{300}\ x\ 9\right)$$

Skor Sonucu = 0 = Tahriş edici olmayan

TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı kuru göz hastalığı tedavisine yönelik TQ yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının oküler kullanım açısından geliştirilmesi ve etkinliklerinin kendi aralarında *in vitro* ve *ex vivo* çalışmaları ile karşılaştırarak daha etkin bir tedavi sağlayacak formülasyon alternatifi önerebilmektir. Aynı zamanda geliştirilen oküler mikroemülsiyonların yağ fazının çörek otu yağı ile oluşturulması ile TQ'nun yanında, içerisinde bulunan diğer antiinflamatuar maddelerin kuru göz tedavisine yönelik yardımcı olabileceğini düşünerek tercih ettik.

Kuru göz hastalığı, lakrimal fonksiyonel ünitenin kompleks inflamatuar bir sendromu olarak tanımlanmıştır. Oluşumundaki mekanizmalar; gözyaşı hiperozmolaritesi, gözyaşı film instabilitesi ve inflamasyondur (118). Aköz gözyaşı yetmezliği, gözyaşı bezinin yeterince gözyaşı salgılayamamasına bağlı gelişmektedir. Gözyaşı miktarı azalır, osmolaritesinde artış meydana gelir ve hiperosmolarite inflamasyonu tetikleyerek kuru gözün şiddetini arttırır (123). Dolayısıyla, son yıllarda bu hastalığın inflamatuar bir sendrom olduğu yönünde çalışmalar olduğu için tedavi protokolleri, artık antiinflamatuar ve immün modülatör alanlara kaymaya başlamıştır. Çörek otu yağı ve TQ'un antiinflamatuar özellikleri literatür ile desteklenmiştir (30). İnflamasyon mekanizması hücre düzeyinde COX ve LOX olmak üzere iki enzim sistemi üzerinden etkili olmaktadır. COX yolağında ile PG'ler sentezlenirken LOX yolağında ile LT

sentezlenir ve bunlar inflamasyonda görev alır. TQ bu iki enzim sisteminin zamana ve doza bağımlı olarak inhibisyonu ile antiinflamatuar etki gösterdiği bildirilmiştir (18, 20). Aynı zamanda geliştirilen mikromülsiyonlar çörek otu kaynaklı olduğu için çörek otu yağında bulunan TQ ile birlikte THQ, DTQ, TMY, p-simen, nigellidin ve nigellisin gibi maddeler antiinflamatuar özellikleri göstermektedir.

Göze topikal ilaç uygulamasına yönelik yaklaşım, oküler semptomların özel tedavisi için daha etkili olduğunu göstermektedir. Göze ilaç uygulandığında gözlemlenen refleks olarak göz kırpması, gözyaşı oluşması, gözyaşı miktarının artmasıyla fazlalığın nazolakrimal kanala geçmesi gibi problemlerle karşılaşılmaktadır. Karşılaşılan bu problemler yüzünden geleneksel oküler sistemlerin göze topikal uygulanmasıyla gözde istenen düzeyde ilaç konsantrasyonu sağlanamamakta ve dolayısıyla istenilen sürede istenilen etki görülmemektedir. Bu nedenle araştırmacılar oküler ilaç uygulaası için yeni ilaç sistemleri geliştirmişlerdir. Geleneksel oftalmik dozaj şekillerinin gözde kalış sürelerinin düşük olması, biyoyararlanımlarının yeterli terapötik dozu sağlamadan uzak olması ve görüşü etkilemeleri nedeni ile uzun süreli tedavilerde başarılı olamamaktadır. Yeni geliştirilen oküler sistemlerde amaç ilacın terapötik etkinliğini artırmak için göz yüzeyinde ilacın kalış süresinin uzatılması, gözde ilaç emiliminin en üst düzeye çıkarılması, hedeflendirme sisteminden ilacın yavaş salımı ve prekonneal ilaç kaybını en aza indirmektir. Göze uygulanacak olan optimum dozaj formunun, gözde bulanık görme veya irritasyon yapmayacak, daha az yan etkilere sahip olması ve gün içerisinde sık dozlamaya gerek duyulmadan hastanın kolayca uygulayabileceği sistem olması istenmektedir.

Mikroemülsiyonlar küçük damlacık boyutuna sahip, termodinamik olarak stabil, saydam ve etkin madde biyoyararlanımını arttıran sistelerdir. Çözünürlüğü az biyoyararlanım problemi olan etkin maddelerin emilimini ve klinik etkilerini arttırarak toksisite problemlerinin de üstesinden gelir. Endüstriyel üretim ve sterilizasyonu basit ve ucuzdur, kullanılan lipofilik faza bağlı olan çözünür lipofilik ilaçlar için kolaylık sağlayan mikroemülsiyonlar etkin madde çözünürlüğünü arttırma, hazırlama ve uygulama kolaylıkları ve uzun raf ömürleri ile tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir (90, 91). Aynı zamanda mikroemülsiyonlar, göze uygulanan bir ilacın sürekli salımını ve konvansiyonel sistemlere göre ilacın oküler yapıya, aköz hümöre daha derin nüfuz etmesini sağlar. Mikroemülsiyon sistemleri, düşük viskozite, ilaç uygulamada daha iyi emilim gibi özellikler olmak üzere avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, mikroemülsiyonlarla ilacın uzatılmış salım yapabilmeleri, bu sistemlerin oküler uygulama için tercih edilmesini sağlar ve göz damlası uygulama sıklığını büyük ölçüde azaltmaktadır.

Formülasyon geliştirme çalışmalarımıza başlamadan önce, TQ etkin maddesinin fizikokimyasal özellikleri çeşitli spektral yöntemler, DSC ve XRD ile incelendi ve sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılarak karakterizasyon çalışmaları tamamlandı. TQ'un FT-IR, NMR, MS, UV, DSC ve XRD analizlerinin yapılmasındaki amaç maddenin saf olduğunun kanıtlanmasıdır.

FT-IR spektrumunda kimyasal yapıya bağlı olan karakteristik pikler, maddenin saf olduğunu göstermektedir (Şekil 23). Çalışmamızda 2966,52 dalga boyunda bulunan yoğun bant, alifatik gruplarının C-H gerilmesine karşılık geldiğini gösterdi ve 1641,42 cm^{-1} dalga boyunda şiddetli pik gözlemlendi ve bu da karbonil grubunun (C=O) karakteristik pikini verdi. Karbonil grubu asimetrik ve simetrik gerilme yaparak 2 şiddetli pik verdi ve bu da molekül formunda karbonil grubunun 2 tane olduğu sonucunu verdi. TQ molekül yapısında çift bağlar (C=C) simetrik olduğu için çift bağda sinyal gözükmez yani dipol momenti yoktur. S. Pagola ve ark. (141) yaptığı çalışmada TQ'nun kızılötesi spektrumu FT-IR cihazı ile incelemişlerdir. Bir sikloheksadienin karbonil grubunun karakteristik güçlü germe bandı 1650 cm^{-1} dalga numarasında gözlenir ve bu TQ için çalışmada 1648 cm^{-1} olarak ve 1,4 benzokinon için 1661 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Aynı zamanda 2967 cm^{-1} dalga boyu C-H gerilmesine karşılık geldiğini göstermiştir. Bu veriler kapsamında bulduğumuz sonuçların literatür verileriyle uyumlu olduğu gösterildi.

^{1}H NMR ve ^{13}C NMR sonuçları Şekil 24 ve Şekil 25'te gösterildi. ^{1}H NMR sonuçları için benzokinon halkasının metilen protonları için bulunan kimyasal kayma değerleri 6,51; 6,57 ve 6,58 olarak bulundu. Metil grubunun metil protonları için 2,02 ve 2,03 değerleri bulundu. İzopropil grubunun metilen protonu için 2,98; 2,99; 3,01; 3,02 ve 3,03 olarak bulundu. İzopropil grubunun metil protonları 1,10 ve 1,12 kimyasal değerlerinde bulundu. ^{13}C NMR sonuçları için kimyasal kayma değerine karşılık karbon sayıları sırasıyla 21,49 ve 26,6 ppm'de C_8 ve C_7 izoproil grubu, 15,49 ppm'de C_9 metil grubu, 130,44; 133,92; 145,26 ve 155,02 ppm'de C_6, C_5, C_4 ve C_3 benzokinon halkası, 187,55 ve 188,75 ppm'de C_2 ve C_1 karbonil karbonu bulundu. Alaa A. Salem ve ark. (142) yaptığı çalışmada TQ'nun NMR cihazı ile ^{1}H ve ^{13}C spektrumlarını incelemiştir. Bulduğumuz sonuçların literatür verileriyle uyumlu olduğu gösterildi.

TQ'un pH 7,4 PBS içerisinde UV spektrumları 200-400 nm dalga boyu arasında incelendi λ_{max} değeri 267 nm olarak bulundu (Şekil 26). UV-vis spektrofotometre cihazıyla yapılacak analitik yöntem geliştirme ve miktar tayini yönteminde bu veri kullanıldı. M. Salmani ve ark. (143) yaptığı çalışmada, TQ'nun UV-vis spektrofotometre ile dalga boyunu

saptamışlardır. TQ'nun etanol içerisinde 10 µg/mL spektrumu incelenmiş ve TQ spektrumları 254-257 nm'de bir belirgin pikin (λ_{max}) varlığı ile karakterize edilir, kinonlar için analog hidrokinonundan ayırt edilici bir pik olarak kabul edilir, ikincisi 290 nm'ye yakın pik gösterir. Çalışmada TQ'nun 254-257 nm'de belirgin pik vermesine rağmen çalışmamızda bu pik aralığında belirgin pik görülmedi ve λ_{max} değeri 267 nm olarak bulundu. Bunun nedeni farklı çözücü kullandığımız içindir.

TQ'nun kütle spekturumu için LC-MS/MS cihazı kullanıldı ve (+) ESI kaynığında doğrudan enjeksiyondan sonra TQ standardının MS/MS ürünü iyon spektrumunda kütle/elektriksel yük oranı 165 m/z olarak bulundu (Şekil 27). Rabab M. Soliman ve ark (144) yaptığı çalışmada TQ'nun LC-MS/MS ile analizi yapılmıştır. Standart TQ çözeltisi ESI kaynağında pozitif iyon tarama modunda doğrudan enjekte edilmiş ve TQ'nun m/z oranı 165,46 protonlanmış moleküler iyonu tespit etmişlerdir. Böylece çalışmamızda bulduğumuz sonuç literatür ile desteklendi. İlaçların gözün yapısına geçişini etkileyen faktörler arasında ilacın molekül ağırlığı gelmektedir. Fluorokinolonlar ile yapılan bir çalışmada molekül ağırlığının kornea penetrasyonu üzerine etkisi olduğunu tespit etmişlerdir fakat korneadan geçişin sadece molekül ağırlığına bağlı olmadığını çözünürlük ve lipit su partisyon katsayısı gibi daha birçok faktörün de etkili olduğunu söylemişlerdir (146).

DSC ile yapılan erime derecesi tayininde, literatüre uygun şekilde erimenin başlangıcı 30 °C ve 80 °C arasında yapılıp erime derecesi 45,74 °C olarak bulundu (Şekil 28). XRD difraktogramı Şekil 29'da verildi ve TQ'nun (amorf/kristal) yapıda olduğu bulundu. S. Pagola ve ark. (141) yaptığı çalışmada TQ'nun DSC ile yapılan erime derecesi tayininde erime derecesini 43,55 °C değerinde bulmuşlardır ve XRD ile TQ'nun kristal yapısını inceleyip kristal yapıda olduğunu tespit etmişlerdir. Bulunan sonuçlar literatür ile benzerlik gösterdi.

TQ'nun analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları LC-MS/MS ve UV-vis spektrofotometre cihazı ile ICH kriterlerine göre gerçekleştirildi.

LC-MS/MS yöntem validasyonunda, LC parametreleri, akış gradient parametreleri, MS/MS parametreleri ve metot validasyon parametreleri verildi. Metot validasyon parametreleri doğrusal aralık ve kalibrasoyon eğrisi, LOD ve LOQ, doğruluk ve gün için tekrarlanabilirlik ve analitik geri kazanım olmak üzere dört başlık altında incelendi. İlk olarak stok çözeltilerinin, mobil fazların ve numune ön hazırlık işlemleri anlatıldı. İkinci olarak TQ'nun ana stok çözeltisinden etkin madde içermeyen F3-1 ve F7-9 numunelerinde katım yapılarak gerekli seyreltmeler sonucunda 0,5-10 µg/mL artan konsantrasyon aralığında altı

noktalı kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 30). Hazırlanan tüm konsantrasyonlar cihaza üç kez enjekte edildi. Böylece kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve doğrusal aralık belirlendi. R^2 = 0,9989 değerinde bulunarak yöntemin doğrusal olduğu ispatlandı. Yapılan çalışmada LOD ve LOQ değerlerini belirlemede Eşitlik 5, Eşitlik 6 ve Eşitlik 7 kullanılarak hesaplandı. LOD 0,854 µg/mL ve LOQ 2,846 µg/mL olarak bulundu ve Tablo 54'te veriler verildi. Doğruluk ve tekrarlanabilirlik sonuçları için hazırlanan TQ standart çözeltileri cihaza üç kez enjekte edildi. Üç kez enjekte edilen standartların doğruluk değeri hesaplandı ve %VK değeri 2 nin altında bulundu (Tablo 55). Standartların kromatogramları Şekil 31 ila Şekil 36'da verildi. Bu da geliştirilen analitik yöntemin doğruluğunu ve gün içi tekrarlanabilirliğini ispatlamaktadır. Kalibrasyon eğrisini oluşturan standartlardan bağımsız 4 µg/mL ve 8 µg/mL iki standart hazırlandı ve geri kazanımları değerlendirildi. Cihaza enjekte edilen standartlardan elde edilen değerin teorik değer ile kıyaslanması sonucunda geri kazanımları hesaplandı ve %VK değeri 2'nin altında bulundu (Tablo 56). Geri kazanımda kullanılan standartların kromatogramları Şekil 37 ve Şekil 38'de verildi.

UV-vis spektrofotometre ile yapılan validasyon çalışmasında ilk olarak özgünlük çalışmasında formülasyonu oluşturan yardımcı maddelerin (YEM'ler, YYEM'ler, pH 7,4 PBS ve distile su) 267 nm dalga boyunda absorbans verip vermediği araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre yardımcı maddelerin hiçbiri 267 nm dalga boyunda absorbans vermediği tespit edildi. Yapılan doğrusallık çalışmaları için 13; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1 ve 0,5 µg/mL konsantrasyonlarda kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 39). Basit doğrusal regresyon analizi ile yöntem doğrusallığı değerlendirilip 0,5-13 µg/mL konsantrasyon aralığında TQ için yöntemin doğrusal olduğu ispatlandı. Çizilen standart eğriye ait denklem (y = 0,1145x – 0,0034) etkin maddenin miktar tayininde güvenle kullanılabileceğini R^2 = 0,9996 olması nedeniyle göstermiştir. Doğruluk ve geri elde çalışmaları 0,5; 6 ve 13 µg/mL konsantrasyonlarında çalışıldı. Analitik yöntemin doğruluk parametresi her bir konsantrasyon için yüzde geri kazanım olarak hesaplandı. Doğruluk analizi her bir konsantrasyon için % 100'e yakın bulunup, %VK değerli 2'den büyük değildir (Tablo 57). Bu da geliştirilen analitik yöntemin doğruluğunu ispatlamaktadır. Yapılan kesinlik çalışmaları tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olarak değerlendirilip 1, 7 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında çalışıldı. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçları %VK değerleri 2'den büyük çıkmamıştır (Tablo 58, Tablo 59, Tablo 60 ve Tablo 61). Bu da geliştirilen analitik yöntemin kesinliğini ispatlamaktadır. Teşhis ve tayin sınırları etkin maddenin çok düşük konsantrasyonlarının UV-vis spektrofotometre ile ölçümünün sağlanabilirliğini göstermektedir. Yapılan çalışmada teşhis ve

tayin sınırı olarak çok düşük değerler elde edildi (LOD=0,0330 µg/mL, LOQ=0,1109 µg/mL) ve elde edilen sonuçlarla geliştirilen metodun TQ'un çok düşük konsantrasyonlarının ölçülebileceği görülmüştür. Son olarak yapılan stabilite çalışmasında 9 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan TQ standardı kullanıldı. Oda sıcaklığında (25 °C), buz dolabı sıcaklığında (4 °C) ve derin dondurucu sıcaklığında (-20 °C) 24 ve 48 saatlik stabilite çalışmaları yapıldı (Tablo 62). Elde edilen sonuçlara göre en iyi kararlılık gösterdiği sıcaklık değerinin buz dolabı sıcaklığı (4 °C) olduğu tespit edildi.

TQ'un lipit/su partisyon katsayısı çalışması etkin maddenin yağ fazında ve su fazında çözünürlüğü belirlemek için yapıldı. N-oktanol yağ fazı olarak, su fazı olarak distile su kullanıldı. Eşitlik 7 kullanılarak TQ etkin maddesinin lipit/su partisyon katsıyısı hesaplandı ve 2,3499 ± 0,1146 olarak bulundu. Yağda çözünürlüğü yüksek olan TQ etkin maddesinin Log P değerinin 2,3499 ± 0,1146 çıkması beklenilen bir sonuç olup maddenin yağa göre kıyaslandığında suda çözünmediğini göstermektedir. Göze uygulanan ilaç şekli olarak mikroemülsiyon seçmemizin bir nedeni de lipofilik özellikte olan TQ'un iç fazı lipofilik olan bir taşıyıcı ile gözde kuru göz hastalığı tedavisinde daha etkili olmaktır. TQ'un lipit/su partisyon katsayısı için literatür araştırması yaptığımızda bu çalışmanın yapılmadığını gördük. Pubchem'de TQ için oktanol/su partisyon katsayısı değerini 2,2 olarak verilmiştir (19). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı'nda TQ için bulduğumuz partisyon katsayısı verileri deneysel olarak 2,2 olduğu ve ön görülen değerler 1,95 ve 3,27 arasında olduğunu söylemektedir (147). Çalışmamızda bulunan partisyon katsayısı değeri literatür ile uyum göstermektedir.

TQ etkin maddesinin çözünürlük çalışmasında, etkin maddenin farklı ortamlarda çözünürlükleri incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 63'te gösterildi. TQ çözünürlüğünün en fazla olduğu ortam çörek otu yağı ortamı ve bu ortamda çözünen madde miktarı 331,16 ± 2,35 olarak belirlendi. TQ'un çözünürlüğünün yağ fazında yüksek olması ve göze uygulanan formülasyonun kontrollü olarak salınması istenildiği için hazırlanacak olan mikroemülsiyon formülasyonlarının tipi Y/S olarak belirlendi. TQ'nun çözünürlük çalışmasında aynı zamanda Cremophor RH40'ta bozunduğunu tespit ettik. Seçtiğimiz ana formülasyonun içinde Cremophor RH40 içerdiğinden (F7-9-TQ) TQ yükledikten sonra ve 2 aylık stabilite çalışmalarından sonra formülasyonda miktar tayini yapılarak ve organoleptik değerlendirme yapılarak incelendi ve formülasyon içerisinde herhangi bir bozunmaya sebebiyet vermediği tespit edildi.

Mohd Abul Kalam ve ark. (115) yaptığı çalışmada kendi kedine nanoemülsifiye edici ilaç salım sistemi geliştirerek TQ'un oral biyoyararlanım artışı ve hepatoprotektif etkileri üzerine çalışmışlardır. Kendiliğinden nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında uygun bileşenleri seçmek için, ilaç molekülünün farklı bileşenlerdeki çözünürlüğü en önemli adımlardan birisidir. Bu nedenle TQ'un yağlar, yüzey aktif maddeler ve yardımcı yüzey aktif maddeler üzerindeki çözünürlükleri ölçülmüştür. 1 mL numuneye TQ doyurulmuş ve 48 saat boyunca 25 ± 1 °C'de çalkalayıcı su banyosunda çözünme işlemi gerçekleştirilmiş. Daha sonra 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilmiş ve 254 nm dalga boyunda TQ konsantrasyonları Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'de bakılmıştır. Çalışmada TQ'un çözünürlük çalışmaları Capryol-90, Tween 20 ve izopropil alkol (İPA)'de gerçekleştirilmiş ve sırasıyla 503,01 mg/mL, 125,25 mg/mL ve 165,54 mg/mL olarak bulunmuştur. En iyi çözünürlüğü Capryol-90'da vermiştir. Bu sonuç TQ'un yağ fazındaki çözünürlüğünün fazla olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda Tween 20'deki TQ çözünürlüğü 130,85 ± 0,64 mg/mL değerinde bulunup ve literatüre yakın değerde olduğu gösterildi.

TQ'un sulu çözünürlüğü ve bozunma kinetiği ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada distile su ve farklı pH ortamlarında çalışılmıştır. Çalışma 24, 48 ve 72 saatlerde kademeli olarak yapılmış ve zaman göre çözünürlükleri karşılaştırılmıştır. Distile su; 0,1N HCl; pH 5 tampon çözeltisi; pH 7,4 tampon çözeltisi ve pH 9 tampon çözeltisi ortamlarında yapılan çözünürlük çalışmasında 24. saatte en iyi çözünürlüğü distile suda (669,13 ± 5,4 µg/mL), 48 saatte en iyi çözünürlüğü pH 9 tampon ortamında (727,57 ± 4,69 µg/mL) ve 72. saatte en iyi çözünürlüğü distile suda (740,63 ± 5 µg/mL) vermiştir. Çalışmanın yanında TQ'un farklı pH değerlerine sahip sulu çözeltilerindeki stabilitesini değerlendirmek için distile su, salin, 0,1N HCl ve üç fosfat tampon çözeltisi (pH 5; 7,4 ve 9) kullanılmıştır ve 96 saat çözünürlükleri incelenmiştir. Sonuca göre zamanla TQ bozunduğu tespit edilmiş, asidik pH'taki bozunma hızı diğer çözeltilere kıyasla en düşük çıkmıştır (143). Çalışmamızda distile su ve pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde 24. saatlik çözünürlük çalışması yapıldı ve sırasıyla 0,759 ± 0,02 mg/mL ve 0,911 ± 0,01 mg/mL olarak bulunup ve literatüre yakın sonucu göstermektedir.

Niyaz Ahmad ve ark. (114) yaptığı nanoemülsiyon formülasyon çalışmasında, formülasyon çalışmalarına başlamadan önce farklı yağlarda çözünürlük çalışmasına dayanarak, oleik asitte (245,5 mg/mL) maksimum çözünürlüğün olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece yağ fazı olarak oleik asit seçilmiştir.

Mikroemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılacak maddelere karar verilmesinde mikroemülsiyon formülasyonunun göze uygulanacak olması göz önünde bulunduruldu. Handbook Pharmaceutical Excipients, USP ve EP monografları incelenerek madde seçimi için karar verildi. Mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesinin sebebi, piyasada bulunan kolloidal şekildeki göz damlasında (siklosporin A içeren RESTASİS) bu formülasyonun kullanılmasıdır.

Oküler formülasyonların hazırlanmasında öncelikle önformülasyon çalışmaları yapıldı. Önformülasyon çalışmaları literatürde belirlenen 2 metoda göre hazırlandı. Bunlar, faz titrasyon yöntemi ve yüksek devirli homojenizasyon yöntemidir (92). İlk olarak faz titrasyon yöntemi için önformülasyon çalışmalarında yağ fazı olarak çörek otu yağı, YEM olarak Tween 20, Tween 80, Cremophor ELP, Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, Propilen glikol ve Polietilen glikol ve formülasyonlar bulanma noktalarına kadar distile su ile titre edildi. MEF-1, MEF-17, MEF-34 ve MEF-50 formülasyonunda YYEM kullanılmadan yalnızca YEM olarak sırasıyla Cremophor ELP, Tween 20, Cremophor RH40 ve Tween 80 kullanıldı. Su ile titre edilip mikroemülsiyon oluşturulmasında aldıkları su yüzdesine göre üçgen faz diyagramında hesaplanarak en uygun sistemi Cremophor RH40 ile hazırlanan MEF-34 formülasyonu oluşturdu. YEM olarak Cremophor ELP kullanılarak hazırlanan formülasyonlara YYEM eklenmesi ile hazırlanan formülasyonlarda MEF-2 ila MEF-6 arasındaki formülasyonları Gliserin, MEF-7 ila MEF-11 formülasyonlarında PEG 400 ve MEF-12 ila MEF-16 formülasyonlarında Propilen glikol YYEM olarak kullanılarak hazırlanan formülasyonların su ile titre edildikten sonra en çok su tutan formülasyon Gliserin ile hazırlanan MEF-6 formülasyonu seçildi. YEM olarak Tween 20 kullanılarak hazırlanan formülasyonlara YYEM eklenmesi ile hazırlanan formülasyonlara MEF-18 ila MEF-22 formülasyonlarında Gliserin, MEF-22 ila MEF-28 formülasyonlarında PEG-400 ve MEF-29 ila MEF-33 formülasyonlarında Propilen glikol YYEM olarak kullanılarak hazırlandı. Tween 20'nin YYEM'ler ile iyi uyum göstermeyip az miktarda su ile titre edilmesi ile hemen bulanıklaşma görüldüğü tespit edildi. YEM olarak Cremophor RH40 kullanılarak hazırlanan formülasyonlara YYEM eklenmesi ile hazırlanan formülasyonlarda MEF-35 ila MEF-39 formülasyonlarında Gliserin, MEF-40 ila MEF-44 formülasyonlarında PEG 400 ve MEF-45 ila MEF-49 formülasyonlarında Propilen glikol YYEM olarak kullanılarak hazırlandı. Su ile titre edildiklerinden sonra en iyi su tutan formülasyon MEF-39 formülasyonu oldu. YEM olarak Tween 80 ile hazırlanan formülasyonlara YYEM eklenmesi ile hazırlanan formülasyonlara MEF-51 ila MEF-55 formülasyonlarında Gliserin, MEF-56 ila MEF-60 formülasyonu ve MEF-61 ila MEF-65

formülasyonlarına Propilen Glikol YYEM olarak kullanılarak hazırlandı. Su ile titre edildikten sonra yine kısa süre sonra formülasyonlarda bulanıklaşma tespit edildi. Dolayısıyla Tween 80'in aynı Tween 20'de olduğu gibi YYEM'ler ile uyum gösteremediği tespit edildi. Genel olarak YYEM olarak Propilen glikol olan formülasyonlar su ile titre edilmeden kendiliğinden bulanıklaştığı tespit edildi. Propilen glikolün çörek otu yağı ile mikroemülsiyon formülasyonu oluşumu için birbirleri arasında uyum sağlayamadığı görüldü.

Yapılan önformülasyon çalışmaları ile elde edilen veriler doğrultusunda oküler formülasyonlar seçildi. İdeal mikroemülsiyonların belirlenmesinde Triplot bilgisayar programı kullanıldı. Bilgisayar programı yardımıyla mikroemülsiyon oluşumu gözlenen hem YEM hem de YEM/YYEM oranı içeren formülasyonlar için üçgen faz diyagramı çizilmiştir (Şekil 40, Şekil 41 ve Şekil 42) ve çizilen bu faz diyagramlarında elde edilen alan değerleri incelendi. Üçgen faz diyagramları çiziminden elde edilen alan değerlerinden, büyük alan değerine sahip ve kısa sürede faz ayrışması görülmeyen formülasyonlar ideal formülasyon olarak kabul edildi. En iyi alan değerine sahip olan 3 formülasyonun üçgen faz diyagramı çizildi (MEF-34, MEF-39 ve MEF-43/44).

Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre mikroemülsiyon ön formülasyonları belirlenen içerikte Tablo 36'da gösterildi. Önformülasyon çalışmalarında yağ fazı olarak çörek otu yağı, YEM olarak Tween 20, Cremophor RH40 ve Cremophor ELP, YYEM olarak Gliserin ve Propilen glikol kullanıldı. Belirlenen hazırlama parametrelerine göre hazırlanan mikroemülsiyon ön formülasyonları Tablo 37 ila Tablo 47'de gösterildi ve stabilite kabinine hızlandırılmış stabilite şartlarında 3 ay süre zarfında bekletildi. Mikroemülsiyonların faz kararlılıkları değerlendirildi. Faz ayrımı görülen formülasyonlara belirlenen oranda YEM ilavesi yapıldı ve tekrar stabilite kabininde bekletildi. Hazırlanan mikroemülsiyonların damlacık büyüklükleri ve polidispersite indeksi taze olarak bakıldı (t=0). İdeal mikroemülsiyon formülasyonlarının seçiminde hızlandırılmış stabilite şartlarındaki faz kararlıkları, damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksinden yararlanarak belirlendi. İdeal mikroemülsiyon formülasyonları F1-1, F3-1 ve F7-9 olarak belirlendi.

Hazırlanan formülasyonların metot karşılaştırılması ise içeriklerine göre belirlendi (Tablo 65). Mikroemülsiyon oluşumunda kullanılan YEM'lerin yüksek miktardaki konsantrasyonları toksisiteye yol açabilmektedir ve ayrıca göze uygulandığında irritasyona yol açabilmektedir. Bu durum oküler olarak uygulanan mikroemülsiyonlar için çok önemlidir. Bununla birlikte yapılan birçok çalışmada non-iyonik YEM'ler ile hazırlanan

mikroemülsiyonların uygulama sonrası korneada herhangi bir irritasyon etkisi oluşmadığı gösterilmiştir (90-92). Dolayısıyla formülasyonların içeriğindeki YEM miktarına göre metot seçimi yapıldı. Aynı zamanda formülasyonu oluşturan yağ fazı içerisinde de eser miktarda TQ içerdiğinden yağ miktarının da fazla olduğu mikroemülsyon formülasyonu göz önüne alındı. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan mikroemülsiyon ön formülasyonları YEM değerlerinin daha az olması nedeniyle ideal mikroemülsiyonlar olarak seçildi.

İdeal olarak seçilen mikroemülsiyon formülasyonlarına TQ yükleme işlemi, TQ'un mikroemülsiyonun yağ fazında çözülüp formülasyona dahil edilmesiyle gerçekleştirildi.

Formülasyonların miktar tayini çalışmasında LC-MS/MS cihazı kullanıldı. F3-1-TQ formülasyonu için ölçülen değer 5,05 mg ve F7-9-TQ formülasyonu için ölçülen değer 9,60 mg bulundu. Formülasyonların cihazda miktar tayini ölçümünde plasebo formülasyonları (F3-1 ve F7-9) baskınlık gösterip TQ ölçümünü sınırlandırdı. Dolayısıyla diğer *in vitro* çalışmaların miktar tayini ölçümünde UV-vis spektrofotometre cihazı kullanıldı.

Mikroemülsiyonların göze uygulanabilir formülasyonlar olduklarının değerlendirilmesi amacıyla fizikokimyasal özellikleri belirlendi. Bu amaçla organoleptik değerlendirme, pH değerleri, viskoziteleri, kırılma indisi, yoğunluk, damlacık büyüklükleri, PDI değerleri, zeta potansiyelleri, santrifüj edilmeleri ve stabilite parametreleri değerlendirildi. Mikroemülsiyonların organoleptik değerlendirmeleri kapsamında fiziksel görünüş, koku ve faz ayrımı parametreleri incelendi ve sonuçlar Tablo 67'de verildi. Mikroemülsiyonların fiziksel görüşünü beyaz, bulanık haldedir. Bu durum göze uygulandıktan sonra gözde bulanık görmeye sebep olabilir. Göze uygulanabilirlik açısından önemli bir parametre de pH'dır. Gözyaşının pH'sı ortalama 7,35 olup, 5,20 ile 8,35 arasında değişerek tolere eder (58). TQ yüklü olmayan/yüklü mikroemülsiyonların pH değerini gözyaşı pH değerine getirmek için 1N NaOH çözeltisi kullanıldı ve pH ölçüm sonuçları 7,02-7,08 arasında ayarlandı (Tablo 70). Hazırlanan TQ yüklü olmayan/yüklü mikroemülsiyonların pH değeri gözyaşı pH değerine yakın ve tolere edilecek değerdedir. Bu yüzden mikroemülsiyon formülasyonları göze uygulanacak olan sistemlerde istenilen pH aralığını sağlamaktadır. Mikroemülsiyon formülasyonlarının kırılma indisi ölçümü yapıldı. TQ yüklü olmayan mikroemülsiyonların (F3-1 ve F7-9) kırılma indisleri sonuçları 1,3394 ve 1,3440 nD, TQ yüklü mikroemülsiyonların kırılma indisleri sonuçları 1,3387 ve 1,3433 nD olarak bulundu (Tablo 70). Formülasyonlara TQ yüklenmesinin kırılma indisini etkilemediği tespit edildi. Bununla birlikte formülasyonların yoğunluklarının göze uygulanabilirlik açısından uygun yoğunluk değerine sahip olduğu görüldü (Tablo 70).

Mikroemülsiyonların göze uygunluğunu ölçmek için viskoziteleri ölçüldü. TQ yüklü olmayan mikroemülsiyonların (F3-1 ve F7-9) viskozite sonuçları 2,19 ± 0,02 ve 2,70 ± 0,01 cP, TQ yüklü mikroemülsiyonların viskozite sonuçları 2,20 ± 0,00 ve 2,72 ± 0,01 cP olarak bulundu (Tablo 70). Mikroemülsiyonlara TQ yüklenmesiyle viskozite değerlerinde önemli bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Mikroemülsiyon formülasyonlarının viskoziteleri, hastanın ilacı göze kolay uygulanabilirlik açısından uygun bulundu.

Mikroemülsiyonların karakterizasyon çalışmaları dahilinde damlacık boyutu ölçüldü (Tablo 68). Oftalmik uygulama için partikül boyutu çizilmeyi ve yabancı cisim hissini önlemek için 10 mikron geçmemelidir (92). TQ yüklü olmayan mikroemülsiyonların (F3-1 ve F7-9) damlacık boyutu 384,9 ± 4,7 ve 414,9 ± 2,3 nm ve TQ yüklü mikroemülsiyonların damlacık boyutu 374,6 ± 4,6 ve 356,9 ± 0,6 nm arasında değişmektedir. Mikroemülsiyon formülasyonlarına TQ etkin maddesinin ilavesiyle formülasyonların damlacık boyutunda belirgin bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Mikroemülsiyonların damlacık homojenitesini değerlendirmek için PDI değerleri ölçüldü (Tablo 68). TQ yüklü olmayan mikroemülsiyonların (F3-1 ve F7-9) PDI ölçüm sonuçları 0,407 ± 0,006 ve 0,367 ± 0,013 bulundu. TQ yüklü mikroemülsiyonların PDI ölçüm sonuçları 0,418 ± 0,013 ve 0,359 ± 0,001 olarak bulundu. Mikroemülsiyon formülasyonlarına TQ ilavesiyle, formülasyonların PDI değerlerinde belirgin bir değişiklik olmadığı görüldü. Mikroemülsiyonların PDI ölçüm sonuçları literatürlere uygun olarak 0,5'in altında bulundu (92). TQ yüklü olmayan mikroemülsiyonların (F3-1 ve F7-9) zeta potansiyel ölçüm sonuçları -18,2 ± 1,4 mV ve -9,7 ± 0,8 değerinde ve TQ yüklü mikroemülsiyonların (F3-1-TQ ve F7-9-TQ) zeta potansiyel ölçüm sonuçları -24,7 ± 0,2 ve -12,9 ± 0,5 mV değerinde bulundu (Tablo 69). Mikroemülsiyon formülasyonlarına TQ yüklenmesiyle, formülasyonların zeta potansiyelinde belirgin bir değişiklik olmadığı görüldü. Zeta potansiyeli, bir kolloidal sistemin toplam elektrik yükü anlamına gelmektedir (92). Geliştirilen TQ yüklü/yüklü olmayan oküler mikroemülsiyon formülasyonları stabilite çalışmaları için formülasyonları +40°C ve %75 nemde iki ay boyunca bekletildi. Formülasyonların stabiliteleri t=0, t=1.ay ve t=2. ayda faz ayrışması, pH, viskoziteleri, kırılma indisleri, yoğunlukları, damlacık büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve PDI özelliklerinin incelenmesiyle gerçekleştirildi (Tablo 71, Tablo 72, Tablo 73 ve Tablo 74). Hazırlanan mikroemülsiyonlarda santrifüj edilmiş ve gerçekleştirilen işlem sonunda faz ayrışması gözlenmemiştir bu da hazırlanan mikroemülsiyonların termodinamik olarak kararlı yapıya sahip olduklarını göstermektedir.

Niyaz Ahmad ve ark. (114) yaptığı çalışmada serebral iskemi tedavisinde kullanılacak TQ yüklü mukoadezif nanoemülsiyon formülasyonları geliştirmişlerdir. Nanoemülsiyonlar titrasyon metoduna göre hazırlanmıştır. Yağ fazı olarak oleik asit, yardımcı yüzey etkin madde olarak karbitol ve yüzey etkin madde olarak Tween 20/Labrasol/Cremophore EL kullanarak sürekli fazı su olan nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonlara TQ'un eklenmesi yağ fazına farklı konsantrasyonlarda (%2,5; %5 ve %7,5) olarak belirlenmiştir. 70'ten fazla nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanarak sadece 4 tane TQ yüklü formülasyon seçilmiş (TNE2, TNE27, TNE46 ve TNE58) ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Damlacık boyutu çalışmaları sonucu 94,8 -139,3 nm arasında, PDI çalışmaları sonucu 0,172 – 0,299 arasında, zeta potansiyel çalışmaları sonucu -13,5 / -31,1 mV arasında, pH çalışmaları sonucu 5,4 – 6,4 arasında, viskozite çalışmaları sonucu 105 – 133 cP arasında, ilaç yükleme çalışmaları sonucu %97,39 - %99,86 arasında bulunmuştur.

Zaki Tubesha ve ark. (113) yaptığı çalışmada yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılarak TQ yüklü nanoemülsiyon formülasyonları hazırlamışlardır. Su içinde yağ nanoemülsiyon çalışmasında formülasyonun %5'ini oluşturan yağ fazı olarak Triolein kullanılmış ve TQ yağ fazının %4,45'i kadar eklenmiştir. %95 olan sıvı faz (%93 Distile su, %2 Tween 80) iki farklı homojenizasyon metodu ile hazırlanmıştır. İlk metot olarak 13000 rpm de 3 dakika boyunca karıştırılarak konvansiyonel nanoemülsiyonlar elde edilmiştir. İkinci metotta ise hazırlanan konvansiyonel emülsiyonları 800 barlık yüksek basıncı homojenizasyona sokarak nanoemülsiyon oluşturma işlemini tamamlamışlardır. Hem konvansiyonel nanoemülsiyon hem de nanoemülsiyon karakterizasyon çalışmalarında damlacık büyüklüğü, PDI, zeta potansitel ve refraktif indeks değerlerine bakılmış ve bu değerler 180 gün boyunca 3 farklı sıcaklıkta (4, 25 ve 40 °C) stabilite değerlendirmesi yapılmıştır. İlk ölçüm sonuçlarında sırasıyla TQ yüklü/yüklü olmayan konvansiyonel nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon formülasyonları için damlacık boyutu 571,8 nm - 119,6 nm/511,8 nm – 119,5 nm; PDI 0,570 - 0,194/0,542 – 0,191; sadece nanoemülsiyon zeta potansiyeli -30,5 mV/-28,8 mV ve refraktif indekleri 1,339 / 1,339 olarak bulunmuştur.

Norsharina Ismail ve ark. (132) yaptığı çalışmada TQ içeren nano ve konvansiyonel emülsiyonları geliştirerek yüksek yağ-kolesterol diyetine bağlı sıçanlarda hafıza eksikliği, lipit peroksidasyonu, toplam antioksidan durumu, antioksidan gen ekspresyonu ve çözünür Aβ seviyeleri üzerindeki yararlı etkileri üzerine çalışmışlardır. Emülsiyonların hazırlanması iki aşamalı homojenizasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. Formülasyon, %'5 ini oluşturan yüksek fraksiyonlu TQ yağı (süperkritik sıvı ekstraksiyonu kullanılarak çörek otu

tahumlarından elde edilen çörek otu yağı) ile formülasyon oluşturulmuş (TQRFNE) ve yağ içerisine yağın %5'i kadar TQ eklenmiş, sıvı fazın %93'ü distile su ve %2 si Tween 80 ile (TQNE) formülasyonları oluşturulmuştur. Formülasyonlar ilk olarak yüksek devirli homojenizatör ile 13000 rpm'de konvansiyonel emülsiyonlar (TQRFCE - TQCE) daha sonra yüksek basıncı homojenizatör ile 800 bar basınçta nanoemülsiyonlar (TQRDNE – TQNE) hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların değerlendirilmesinde damlacık boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerlerine bakarak karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. TQRFNE ve TQRFCE formülasyonlarının ortamala damlacık boyutu sonuçları 72,15/1556,33 nm; TQNE ve TQCE formülasyonlarının ise 92,17/2193 nm olarak bulunmuş. TQRFNE ve TQRFCE formülasyonlarının ortamala zeta potansiyel sonuçları -30,40/-29,17 mV; TQNE ve TQCE formülasyonlarının ise -14,10/-17,77 mV olarak bulunmuş. Son olarak TQRFNE ve TQRFCE formülasyonlarının ortamala PDI sonuçları 0,26/0,9; TQNE ve TQCE formülasyonlarının ise 0,16/1,00 olarak bulunmuş.

Mohd Abul Kalam ve ark. (115) yaptığı çalışmada kendiliğinden nanoemülsifiye edici ilaç salım sistemi geliştirerek TQ'un oral biyoyararlanım artışı ve hepatoprotektif etkileri üzerine çalışmışlardır. Titrasyon yöntemine göre hazırlanan nanoemülsiyon çalışmalarında yağ fazı olarak Capryol 90, yüzey etkin madde olarak Tween 20 ve yardımcı yüzey etkin madde olarak izoproil alkol (İPA) kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanoemülsiyonlar su ile tire edilerek sonuçları üçgen faz diyagramı kullanılarak belirlenmiştir. TQ'un çözünürlük çalışmalarında en iyi çözünürlüğü Capryol 90 verdiği için 10,1 mg TQ Capryol 90 içine yüklenmiştir. TQ yüklü nanoformülasyonların karakterizasyon çalışmaları adı altında damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyel, viskozite ve refraktif indeks değerlerine bakılmıştır. Damlacık boyutu sonuçları 54,25 – 87,62 nm arasında, PDI değeri sonuçları 0,125 – 0,325 arasında, viskozite sonuçları 18,25 – 55,75 cP arasında ve refraktif indeks sonuçları 1,343 – 1,348 arasında bulunmuştur. Formülasyondaki TQ içeriği HPLC cihazında 254 nm dalga boyunda yapılmıştır.

TQ yüklü oküler mikroemülsiyoların diyaliz membran kullanılarak *in vitro* salım çalışması gerçekleştirildi (Şekil 61). Formülasyonların 24-48 saatlerde ortama maksimum konsantrasyonda ilaç saldığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre formülasyonlarında gözyaşı ortamında kontrollü salım yaptığı tespit edildi. F3-1-TQ formülasyonunu incelediğimizde 1. saate kadar kontrollü salım yapıp 2. ve 4. saate gelindiğinde ortamdaki ilaç konsantrasyonunu iki kat arttığı görüldü. 12. saate gelindiğinde maksimum konsantrasyonda ortama ilaç saldığı (%88,8) ve kalan sürelerde salımın sabit olarak devam ettiği görüldü. F7-9-

TQ formülasyonu incelendiğinde ise gözyaşı ortamında 8. saate kadar kontrollü bir salımın görüldüğü 12. saatte ilaç konsantrasyonunun arttığı gözlemlendi. 12. Saatten sonra formülasyonun ortama maksimum konsantrasyonda ilaç saldığı (%89,3) sonrasında sabit olarak devam ettiği tespit edildi. Dolayısıyla formülasyonların ortamlardaki salım davranışları karşılaştırıldığında F7-9-TQ formülasyonunuda daha kontrollü bir salım yaptığını söyleyebiliriz. Bunun nedeni F7-9-TQ formülasyonun PDI (0,359) ve damlacık büyüklüğü değerleri (356,9 nm) F3-1-TQ formülasyonunun PDI (0,418) ve damlacık büyüklüğü (374,6 nm) değerlerinden daha stabil olduğu için etkin maddeyi ortama daha kontrollü bir şekilde saldığını söyleyebiliriz. Bunun yanı sıra F7-9-TQ formülasyonunun viskozitesi (2,72 cP) F3-1-TQ formülasyonunun viskozitesinden (2,20 cP) daha yüksek olduğu için göz de kalış süresi daha fazla olabileceği düşüncesinden salım performansı açısından biyoyararlanımı daha iyi olacaktır. Aynı zamanda TQ süspansiyonu hazırlanarak kontrol çalışması diyaliz membrandan yapıldı. Formülasyona göre ortama salım konsantrasyonu incelendiğinde kontrol çalışmasının ortamın ilaç konsantrasyonunun kısa sürede arttırdığı görüldü. Bu sebeple kolloidal sistelerin oküler uygulamada doğru dozlarla tedavi edilebileceği ve aynı zamanda etkin maddeyi yüksek konsantrasyonda ortama vermeyip toksisite problemlerininde önüne geçilebileceği görülür.

TQ süspansiyonu ve TQ yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmaları verileri kullanılarak kinetik çalışmaları yapıldı. Kinetik çalışmaları için; 0. derece, 1. derece, Higuchi modeli, Hixson Crowell modeli ve Korsmeyer Peppas modeli kullanıldı. Şekil 62 ila Şekil 76'da modellere göre formülasyonların grafikleri verildi ve Tablo 75'te sonuçlar verildi. Kinetik çalışmalar ile formülasyonların matematiksel modellemeleri de değerlendirilmiş oldu. Bu sebeple F3-1-TQ formülasyonu 0. derece ve Hixson-Crowell modeli kinetik gösterdiği görüldü. Bu da zamanla yüzey alanı değişmeyen ve ilacı yavaş sistemler için uygun olduğu fakat zamanla ilaç konstanrasyonunun ortamda doğrusal olarak değilde doğrusal olmayan (non-linear) salım yaptığını söylemektedir. F7-9-TQ formülasyonu 1. derece ve Korsmeyer-Peppas modeli kinetik gösterdiği görüldü. Bu modele göre formülasyonlar uzatılmış etkili salım yapan sistemler ve ilacın ortam düzeyinde zamanda doğrusal olarak arttığı çalışma modelleri için yorumlanır. Kontrol çalışması olarak TQ süspansiyonu ise Higuchi modeli kinetik göstermiş olup buna göre difüzyon kontrollü sistemlerin salım hızları için matemetiksel ifade ettiği söylenebilir. Formülasyonların iki farklı kinetik modele göre sonuç vermesi ortamdaki stabilite ve salım davranışı hakkında geniş bir bilgi verdiğini söyleyebiliriz.

Habib ve ark. (108) sentetik, nonsteroit antiinflamatuar ve analjezik etki gösteren diklofenak etkin maddesini kullanarak oküler mikroemülsiyon formülasyonları üzerinde

çalışmışlardır. Kararlaştırılan diklofenak yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* ilaç salımı çalışması için yöntem olarak diyaliz membran difüzyonu kullanmışlardır. 100 mL'lik beher içerisine 40 mL pH 7,4 ortam koyulmuş ve membran ortama daldırılmıştır. Sistem 32 °C sıcaklık ve 50 rpm hızda sıcak plakalı manyetik bir karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 4, 6, 12 ve 24 saat) belirli hacimde numune alınıp ve eşit hacimde ortamdan ilave edilmiştir. Çalışmada 1mg/mL diklofenak süspansiyonu hazırlanıp kontrol olarak kullanılmıştır. 24 saatlik süren salım çalışmasında en yüksek ilaç salımı %82 olarak bulunmuştur. Formülasyonların kinetik çalışmalarıda yapılmış olup en yüksek korelasyon katsayısı değeri, kümülatif salım ve zamanın karekök arasında doğrusal bir ilişki gösterdiği yani Higuchi modeli olduğu bulunmuştur. Kontrol süspansiyonunun ise sıfırıncı derece kinetiği izlediği bulunmuştur.

Mohd Abul Kalam ve ark. (115) yaptığı çalışmada TQ yüklü nanoemülsiyonlar hazırlanmıştır. *İn vitro* salım çalışmaları diyaliz membran yöntemine göre pH 6,8 fosfat tamponu ortamında (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 saatlik) sürede gerçekleştirilmiştir. Çalışma 37 °C sıcaklık ve 50 rpm hızda sıcak plakalı manyetik bir karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. En iyi sonucu NE3 kodlu formülasyon vermiştir (içeriği; 10,1 mg TQ, 5,00 g Captyol 90, 10,00 g Tween 20, 10 g İPA ve 75,00 g distile su) ve 24 saatlik çalışma sonunda ilaç salımı %98,45 olarak bulunmuştur. Çalışmada 5mg/mL TQ süspansiyonu hazırlanıp kontrol olarak belirlenmiştir.

Niyaz Ahmad ve ark. (114) yaptığı çalışmada TQ yüklü mukoadezif nanoemülsiyon formülasyonları geliştirmişlerdir. *İn vitro* salım çalışması 32 °C sıcaklık ve 50 rpm hızda sıcak plakalı manyetik bir karıştırıcı üzerinde pH 7,4 PBS ortam içerisinde diyaliz membran kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmaları nazal mukozal membran ile seçilen dört formülasyonla yapılarak 4 saat içinde ilaç salımının %75'inden fazlası salınmış ve en iyi salım performansını TNE2 formülasyonu vermiştir.

TQ ve formülasyonların ARPE-19 hücre hattında MTT yöntemi ile sitotoksisite çalışması yapıldı ve IC_{50} değerleri belirlendi. İlk olarak TQ, ARPE-19 hücrelerine farklı dozlarda ve farklı zamanlarda uygulandı ve elde edilen veriler doğrultusunda hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz IC_{50} değeri 24. saatte 54,152 µM ve 48. saatte 609,48 µM olarak bulundu. 24. ve 48. saatlerde düşük dozlara bağlı olarak hücre canlılığı arttığı gözlemlendi. 24. saat sonucunda TQ'un 600 µM, 300 µM, 150 µM ve 75 µM dozlarında hücre canlılığı birbirine çok yakın seyretti. 37,5 µM TQ dozunda hücre canlılığının neredeyse iki katına çıktığı

gözlemlendi. 48. saatte TQ'un hücre canlılığı üzerindeki etkisi arttığı gözlemlendi ve 37,5 µM TQ dozunda hücre canlılığının %119,1156 olduğu görülüp TQ'un en düşük dozunda hücre üremesini arttırdığı tespit edildi.

TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonları ARPE-19 hücrelerine farklı dozlarda ve farklı zamanlarda uygulandı. Elde edilen veriler doğrultusunda hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz F3-1 formülasyonu için IC_{50} değeri 24. saatte 19,434 µL ve 48. saatte 3,742 µL olarak bulundu. F7-9 formülasyonu için IC_{50} değeri 24. saatte 13,957 µL ve 48. saatte 4,644 µL olarak bulundu. F3-1 formülasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi 20 µL, 10 µL, 5 µL ve 2,5 µL dozlarda 24. saatte daha fazla olduğu 48. saatte aynı dozlarda hücre canlılığının azaldığı tespit edildi. Ancak, en düşük dozda 1,25 µL hücre canlılığı 48. saatte daha fazla arttığı görüldü. F7-9 formülasyonu için ise hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24. ve 48. saatlerde de azalan doza göre artış görüldü. 24. saatte hücre canlılığı 48. saatteki hücre canlılığından tüm dozlara göre daha fazla olduğu tespit edildi. Dolayısıyla F7-9 formülasyonu için 24. saat verileri esas alındı. Sonuç olarak her iki formülasyonunun 24. saatteki hücre canlılığı daha fazladır. F3-1 formülasyonunun 20 µL ve 10 µL dozlarında F7-9 formülasyonundan az da olsa hücre canlılığı fazla; 5 µL, 2,5 µL ve 1,25 µL dozlarında F7-9 formülasyonun hücre canlılığının daha fazla olduğu görülmektedir. IC_{50} değeri en yüksek olan formülasyon F3-1 olduğundan tercih edilebilir.

TQ içeren F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonları ARPE-19 hücrelerine farklı dozlarda ve farklı zamanlarda uygulandı. Elde edilen veriler doğrultusunda hücrelerin %50'sinin canlı kaldığı doz F3-1-TQ formülasyonu için IC_{50} değeri 24. saatte 197,32 µM ve 48. saatte 92,386 µM olarak bulundu. F7-9-TQ formülasyonu için IC_{50} değeri 24. saatte 231,90 µM ve 48. saatte 45,15 µM olarak bulundu. F3-1-TQ formülasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi 664 µM, 332 µM, 166 µM ve 83 µM dozlarında 24. saatte daha fazla olduğu 48. saatte aynı dozlarda hücre canlılığının azaldığı tespit edildi. Ancak, en düşük dozda 41,5 µM hücre canlılığı 48. saatte daha fazla arttığı görüldü. F7-9-TQ formülasyonu için ise hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24. saatte azalan doza göre artış görüldü. 48. saatte 670,4 µM, 335,4 µM ve 167,7 µM azalan doza göre hücre canlılığı artmış fakat 83,8 µM dozda hücre canlılığı azaldı daha sonra 41,9 µM dozda tekrar hücre canlılığı arttığı gözlemlendi. 24. saatte hücre canlılığı 48. saatteki hücre canlılığından tüm dozlara göre daha fazla olduğu tespit edildi. Dolayısıyla F7-9-TQ formülasyonu için 24. saat verileri esas alındı. Sonuç olarak her iki formülasyonunun 24. saatteki hücre canlılığı daha fazladır. IC_{50} değeri en yüksek formülasyon F7-9-TQ olduğundan tercih edilebilir.

TQ yüklü formülasyonların hücre canlılığı ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için sitotoksisite çalışması yapıldı ve en iyi IC_{50} değeri sonucunu veren formülasyon F7-9-TQ formülasyonu olarak bulundu. Bunun sebebi F7-9-TQ formülasyonunun salım çalışmasındaki sonuçlarını incelediğimizde F3-1-TQ formülasyonuna göre daha kontrollü salım yaptığı buna bağlı olarak damlacık büyüklüğü ve PDI değerlerini karşılaştırıp sonuçlarının daha kararlığı olduğunu aynı zamanda viskozitesinin yüksek olup ortamda kalış süresinin daha fazla olabileceği yorumunu söyledik. Bu veriler ile kinetik çalışması sonucu 1. derece ve Korsmeyer-Peppas modellerine uyarak doğrusal olarak uzatılmış salım yapabileceği yorumunu değerlendirdik. Dolayısıyla F7-9-TQ'nun *in vitro* sonuçları değerlendirildiğinde hücre hatlarında ilk zamanlarda yavaş, etkili ve kontrollü salım yaparak hücre canlılığını arttırıp zamanla bu etkinin azalıp hücre canlılığının azaldığını kanıtlamaktadır.

Xin Hu ve ark. (148) yaptığı çalışmada TQ'nun antioksidan özelliğinden faydalanıp ARPE-19 hücre hattında hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkisini incelemişlerdir. TQ'nun H_2O_2'de hücre canlılığını ve apoptozu iyileştirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca H_2O_2 ile indüklenen reaktif oksijen türleri ve malondialdehit seviyelerinin TQ'nun ön muamelesi ile önemli ölçüde zayıflattığını tespit etmişlerdir. TQ'nun hücre hattına 0, 5, 10, 20 ve 40 µM konsantrasyonlarında uygulandığı ve artan TQ konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığını arttırdığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak H_2O_2'ye maruz kalmanın sitotoksisiteye ve oksidatif hasara neden olduğu ve ARPE-19 hücrelerinde apoptoza yol açtığı ve buna karşılık TQ'nun ön tedavisi bu etkiyi koruduğunu göstermişlerdir.

Serviks kanser hücre hattında TQ'un sisplatin sitotoksisitesine etkilerini inceleyen çalışmada HeLa hücre hattı kullanılmıştır. Sitotoksisitesinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. Hücre hatlarında geniş konsantrasyon aralığında sisplatin ve TQ tek başlarına 24 ve 48 saat maruziyeti sonucunda sitotoksisiteleri belirlenmiştir. Sisplatin konsantrasyonları 0,49-250 µM arasında ve TQ konsantrasyonları 1,95-1000 µM arasındaki dozlar kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda HeLa hücrelerinde TQ'un 1,95-31,25 µM doz aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 62,5 µM ve üzerindeki dozlara bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. TQ'un HeLa hücrelerindeki IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 143,7 µM bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyon sonucunda HeLa hücrelerinde TQ'un 1,95-15,62 µM doz aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı anca 31,25 µM ve üzerindeki dozlara bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmüştür. TQ'un HeLa hücrelerindeki IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 67,5 µM bulunmuştur (149).

TQ'un meme kanseri hücresi üzerine etkisi yapılan çalışmada, MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksisitenin belirlenmesi için gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi yöntemi kullanılmıştır. TQ dozları (5, 25, 50 ve 100 µM) ile 152 saat boyunca hücre sayısındaki değişiklikler gözlemlendi. Hücre proliferasyonu ile her plakada toplam hücre sayısı 10 000 olarak bulunmuştur. TQ'un MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi 152 saat boyunca incelendiğinde 64. saate kadar MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu etkilememiş olsa da 64. saatten sonra inhibitör etkisini göstermeye başlamış. 88. saatte doz grupları arasında en yüksek değeri 50 µM doz grubu, en düşük değeri 100 µM doz grubu göstermiştir. TQ verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiğinde IC_{50} değeri hesaplanmış ve 11,6 µM olarak bulunmuştur (150).

TQ'un sitotoksisitesinin ve genotoksik özelliklerinin *in vitro* değerlendirilmesi çalışmasında V79, HeLa ve HepG2 hücre hatlarında MTT yöntemi ile TQ'un sitotoksisitesi belirlenmiştir. TQ hücre hatlarına 1,95-1000 µM doz aralığında uygulanmıştır.V79 hücre hatlarına TQ dozları uygulanıp 24 saatlik inkübasyondan sonra MTT yöntemi ile hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. 1,95-62,5 µM doz aralığında sitotoksik etki oluşmadığı ancak 125 µM ve üzeri dozlarda doza bağlı hücre canlılığının azalması görülmüştür. TQ'un 24 saatlik maruziyetinde IC_{50} değeri 102 µM olarak bulunmuştur. HeLa hücre hatlarına uygulanan TQ dozları 24 saatlik inkibasyon sonrası MTT yöntemi ile hücre canlılığı incelenmiş, 1,95-250 µM doz aralığında sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 500 µM ve üzeri dozlarda doza bağlı hücre canlılığının azaldığı görülmüş. TQ'un 24 saatlik maruziyetinde IC_{50} değeri 461 µM olarak bulunmuştur. HepG2 hücre hatlarına uygulanan TQ dozları 24 saatlik inkibasyon sonrası MTT yöntemi ile hücre canlılığı incelenmiş, 1,95-125 µM doz aralığında sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 250 µM ve üzeri dozlarda doza bağlı hücre canlılığının azaldığı görülmüş. TQ'un 24 saatlik maruziyetinde IC_{50} değeri 364 µM olarak bulunmuştur (151).

TQ yüklü folik asit – kitosan nanopartikülerinin yumurtalık kanseri hücrelerine (Caco-2 ve SKOV-3) MTT yöntemi ile sitotoksisitesi ve IC_{50} değeri incelenmiştir. Hücre ekimi 96 kuyucuklu plakalara yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. TQ (TQ), TQ-kitosan (TQCS) ve Folik asit-TQ-kitosan (FATQCS) numuneleri hücrelere 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL, 3,13 µg/mL ve 1,25 µg/mL dozları uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. Numunelerin sitotoksisitesi MTT çözeltisi eklenerek değerlendirildi. TQ, TQCS ve FATQCS her iki hücre hattında da düşük IC_{50} değerleri ile çok sitotoksik bulunmuştur. SKOV-3 hücreleri üzerinde 48 saat boyunca IC_{50} değeri sırasıyla 12,64; 12,60 ve 7,55 µg/mL olarak belirlenmiştir. Caco-2 hücreleri üzerinde 48 saat boyunca IC_{50} değeri sırasıyla 14,66; 13,99 ve 13,82 µg/mL olarak belirlenmiştir (152).

Çalışmada geliştirilen oküler mikroemülsiyonların toksisite/irritasyon denemeleri HET-CAM testi kullanılarak değerlendirildi. Tavşan Draize testine alternatif olarak kullanılan hızlı, hassas ve ucuz bir test yöntemi olup madde irritasyon ve antiinflamatuar etkisi bakımından test edilir. Embriyonun koryoallantoik zarı, damarları, arterleri ve kılcalları içeren bir dokudur ve teknik olarak incelenmesi çok kolaydır (153). TQ yüklü oküler mikroemülsyon formülasyonları bu yöntem kullanılarak test edildi ve kontrol olarak %0,9 NaCl çözeltisi elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. F3-1-TQ ve F7-9-TQ formülasyonlarının uygulanmasında kanama, vasküler lizis ve pıhtılaşma oluşumu gözlemlendi. F3-1-TQ formülasyonu koryoallantoik zara uygulandığında 266,4 saniye sonra vasküler lizis oluşumu gözlemledi ve İS 0,346 olarak bulundu. İS değerlendirildiğinde formülasyonunun tahriş edici olmadığı saptandı. F7-9-TQ formülasoynu koryoallantoik zara uygulandığında kanama, vasküler lizis ve pıhtılaşma hiçbir şekilde görülmedi, herhangi bir irritasyona neden olmadı. Sonuç olarak hazırlanan TQ yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonları oküler uygulama için güvenli olduğu gösterildi.

Gabriela Mojeiko ve ark. (154) meme kanserinin kemoprevansiyonunda potansiyel uygulama için selekoksib topikal iletimi için mikroiğne ve mikroemülsiyon kombinasyonu üzerine çalışmışlardır. Mikroemülsiyonların irritasyon potansiyelleri HET-CAM testi uygulanarak gerçekleştirilmiş. Döllenmiş tavuk yumurtaları 9 gün boyunca 37 °C sıcaklık ve %55 nem değerinde inkübatörde bekletilmiş. Her iki saatte bir yumurtalar otomatik olarak döndürülmüş. Mikroemülsiyon formülasyonları 200 mg olacak şekilde koryoallantoik membran üzerine uygulanmıştır. Negatif kontrol PBS ve pozitif kontrol olarak 0,1M NaOH kullanılmıştır. En az irritasyon skoru gösteren mikroemülsiyon formülasyonuna selekoksib (%1) eklenerek ilaç birleşmesinin irritasyonu etkileyip etkilemeyeceği ve topikal kullanımını engelleyip engellemeyeceğini değerlendirmek için incelenmiştir. Yüklü ve yüksük mikroemülsüyon benzer değişiklikleri gösterdi ve benzer bir skor aldı (2,4 puan; zayif veya hafif tahriş).

Mohammad Mehdi Mahboobian ve ark. (155) brinzolamid yüklü nanoemülsiyonların *ex vivo* transkorneal geçirgenlik, hücre canlılığı ve oküler irritasyon testleri üzerine çalışmışlardır. Oküler irritasyon testi olarak HET-CAM ve BCOP testi uygulamışlardır. HET-CAM testinde, döllenmiş tavuk yumurtaları 3 gün boyunca 37 °C sıcaklık ve %66 ± 5 nem değerinde inkibatörde bekletilerek günde iki kez döndürülmüş. 3. günde yumurta kabukları açılmiş bir membran ile kapatılarak tekrar aynı inkübasyon şartlarında bekletilmiştir. Toplam 10 gün bekletilen yumurtalara 200 µL nanoemülsiyonlar uygulanmıştır. Pozitif kontrolde güçlü tahriş edici olarak 0,5M NaoH, orta derece tahriş edici olarak aseton ve hafif tahriş edici olarak

propilen glikol kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak %0,9 NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Her numune uygulandıktan sonra damarlanma, vasküler lizis ve pıhtılaşma 0,5; 2 ve 5 dakika boyunca incelenerek skorlanmıştır. 2 formülasyonun skoru tahriş edici olmayan veya hafif tahriş edici olarak sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda bu formülasyonlar BCOP testinde sığır kornealarına uygulandığında da herhangi bir toksik etki göstermemiştir.

Alper Öztürk ve Tuba Kıyan (156) oksidatif stres kaynaklı ağrı ve inflamasyonun deksketoprofen trometamol (DT) yüklü farklı moleküler ağırlıklı kitosan nanopartikül formülasyonları oluşturup HET-CAM testi kullanılarak antiinflamatuar aktivitelerine bakmışlardır. Döllenmiş yumurtalar 3 gün boyunca 36,5 °C sıcaklık ve %80 nem değerinde inkibatörde bekletilmiştir. 3. günün sonunda yumurtalar açılmış ve ayrıca 10-15 mL albümin aspire edilmiştir. Bir membran ile kapatılan yumurtalar tekrar aynı inkübasyon şartlarında 3 gün daha bekletilmiştir. Her numune için 10-15 adet yumurta kullanılmış ve deney her numune testi için 3 kez tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol olarak (antiinflamatuar etki) sodyum dedosil sülfat (SDS) 50 µg/mL, negatif kontrol olarak agar %2,5 (a/h) kullanılmıştır. Antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesi için yarı kantitatif bir skor sistemi kullanılmıştır. Stereomikroskop ile incelenen koryoallantoik membranlar, test edilen örneklerin tüm konsantrasyonlarında hiçbir embriyotoksik etki göstermemiştir. Antiinflamatuar etki değerlendirmesinde düşük DT konsantrasyonunda bile (50 µg/mL) iyi antiinflamatuar etki sonuçları bulmuşlar, aynı zamanda CAM üzerinde emilim ve penetrasyon düşük dozda iyi antiinflamatuar etki bıraktığını ispatlamışlardır.

SONUÇLAR

Farklı yüzey etkin maddeler kullanılarak ve farklı metotlarda oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonu, ideal olarak belirlenen mikroemülsiyon formülasyonlarına TQ yüklenmesi, karakterizasyonu, *in vitro* salım çalışmaları ve kinetiği, ARPE-19 hücre hattında formülasyonların sitotoksistesi ve HET-CAM testi yapılarak formülasyonların irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi yapıldı.

TQ'nun saflığının belirlenmesi için fizikokimyasal analizleri yapıldı. FTIR, NMR, UV ve MS gibi spektral yöntemler kullanıldı ve ek olarak DSC ile erime tayini ve XRD ile molekülün kristal yapısı incelendi. Yapılan test sonuçları literatür ile karşılaştırıldı ve literatüre uyumlu olduğu ispat edildi.

TQ'nun lipit/su partisyon katsayısı hesaplandı ve literatür ile karşılaştırıldığında benzer olduğu ispatlandı. TQ'nun çöznürlük çalışmaları, mikroemülsyon formülasyonlarını oluşturan yağ fazı, yüzey etkin maddeler, yardımcı yüzey etkin maddeler, distile su ve *in vitro* salım ortamı olan pH 7,4 PBS ortamında gerçekleştirikdi. En iyi çözünürlük yağ fazında gerçekleşti ve daha önce formülasyonun yağ fazına etkin madde yüklemesi kararlaştırıldığı için bu sonucun çalışmamızdaki etkin madde miktarı yüklemesinde geniş bir aralığı olduğunu ispatladı.

TQ'nun miktar tayini analizi için iki farklı cihaz kullanıldı. Bunlar LC-MS/MS ve UV-vis spektrofotometredir. Etkin maddenin gerekli standartları hazırlanarak cihazlarda metot geliştirildi ve validasyon çalışmaları yapıldı. Yapılan tüm çalışmalar ICH kriterine göre yapıldı.

Oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesinde faz titrasyon yöntemi ve yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Yöntemlere göre hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları içeriklerine göre değerlendirildi ve en az yüzey etkin madde içeren formülasyonlar seçildi. Buna göre metot olarak yüksek devirli homojenizasyon yöntemi tercih edilmiş oldu.

Belirlenen oküler mikroemülsiyonlara TQ yüklemesi, daha önce TQ yüklü oküler bir formülasyon çalışması literatürde olmadığı için benzer TQ yüklü emülsiyon çalışmaları ve ticari göz formülasyonları incelenip ön fikir oluşturuldu. TQ formülasyonun yağ fazına eklendi. Formülasyondaki etkin madde yüklemesi yapıldıktan sonar LC-MS/MS'te etkin madde miktarı tayini yapıldı.

TQ yüklü ve yüklenmemiş oküler mikroemülsiyonlara çeşitli karakterizasyon çalışmaları uygulandı. Organoleptik değerlendirme ile formülasyonların fiziksel davranışı incelendi, pH, viskozite, damlacık büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel, kırılma indisi, içerik miktarı, yoğunluk ve faz ayrımı çalışması yapıldı. Yapılan bu çalışmaları hızlandırılmış stabilite şartlarında (40°C ve %70 nem) 2 ay bekleterek değişimleri gözlemlendi.

TQ yüklü oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmaları diyaliz membran yöntemi kullanılarak yapıldı. Ortam olarak suni gözyaşı olan pH 7,4 PBS kullanıldı. TQ süpansiyonu distile su içinde hazırlandı ve membran içine koyuldu ve sonuçları kontrol olarak değerlendirildi. TQ yüklü formülasyonlar membran içine koyuldu ve çalkalamalı su banyosu içinde gözyaşı sıcaklığı olan 32 °C'de 50 dev/dk'da 72 saat karıştırıldı ve belirli zaman periyotlarında numuneler alınıp, alınan miktar kadar ortamdan ilave edilerek sink koşul sağlandı. Numuneler UV-vis spektrofotometre cihazında ölçülerek değerlendirildi. Her iki formülasyonda birbirine yakın salım performansı gösterdiği görüldü.

MTT yöntemi ile TQ ve formülasyonların sitotoksisite değerlendirilmesi ARPE-19 hücresinde yapıldı. Hücrelerin kültüre alınması, pasajlanması ve dondurulmasından sonra numuneleri uygulaya hazır hale getirildi. Belirlenen konsantrasyon aralıklarında TQ ve formülasyonlar hücre hattına uygulandı ve UV-vis spektrofotometre cihazı kullanılarak hücre canlılığı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre TQ çözeltisinin ve formülasyonların artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görüldü.

TQ yüklü formülasyonların irritasyon potansitelini belirlemek için HET-CAM testi yapıldı. Test metodu ICCVAM kriterlerine göre gerçekleştirildi. Embriyolu tavuk yumurtaları

temin edildikten sonra laboratuvar ortamında stabilite kabinine koyularak belirli şartlarda bekletildi. Daha sonra yumurtaların kabukları açıldı. Pozitif kontrol olarak 0,1N NaOH ve negatif kontrol olarak %0,9 NaCl çözeltisi hazırlandı. Formülasyonlar taze bir şekilde hazırlandıktan sonra belirlenen hacimde CAM üzerine uygulandı ve 0,5; 2 ve 5. dakikalarda gözlemler yapılarak skorlama yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre formülasyonların göze uygulanabilirlik açısından herhangi bir irritasyon etkisi olmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak, tez kapsamında oküler mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilip ve antiinflamauar etki kazandırak için bu formülasyonlara etkin madde TQ yüklemesi yapıldı. Kuru göz hastalığını tedavisinde son zamanlarda bilim insanları antiinflamatuar etki gösteren etkin madde ve formülasyonlar üzerinde çalışmışlardır. Bizde geliştirdiğimiz antiinflamatuar etki gösteren oküler mikroemülsiyon formülasyonları literatüre katkıda bulunmak ve hastalığın tedavisini kolaylaştırmak için amaçladığımız çalışmamızı sunuyoruz. Bu veriler ile *in vivo* ve insan faz çalışmaları yapılarak daha kapsamlı sonuçlar elde edilip piyasaya sürülebilir bir formülasyon elde edilebilir. Formülasyonun piyasa formu için önerilerimiz, TQ'nun ışığa karşı hassasiyetinden dolayı ambalaj tasarımı ona göre yapılmalı ve bu preparatı kullanacak hastaların gece kullanması tavsiye edilmelidir.

ÖZET

Oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi, geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlara gerekli kontroller yapılarak ideal mikroemülsiyonların seçilmesi, ideal mikroemülsiyonlara antiinflamatuar etkili Timokinon etkin maddesinin yüklenmesi ve Timokinon yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarının oküler kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi için karakterizasyon, *in vitro* salım çalışması, sitotoksisite ve irritasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Geliştirilen oküler mikroemülsiyonların kuru göz hastalığı tedavisinde kullanılması hedeflenmiştir.

Oküler mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilmesinde iki metot kullanılmıştır. İlk olarak faz titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Yağ fazı olarak Çörek otu yağı, yüzey etkin madde olarak Tween 20, Tween 80, Cremophor ELP, Cremophor RH40, yardımcı yüzey etkin madde olarak Gliserin, Propilen glikol ve Polietilen glikol 400 kullanılarak su ile titre edilmiştir. Üçgen faz diyagramı kullanılarak en yüksek alan değerini veren formülasyonlar belirlenmiştir. Diğer yöntem olarak yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Yağ fazı olarak Çörek otu yağı, yüzey etkin madde olarak Tween 20, Cremophor ELP, Cremophor RH40, yardımcı yüzey etkin madde olarak Gliserin ve Propilen glikol kullanılmıştır. Homojenizatör kullanılarak belirli oranlarda formülasyonlar hazırlanıp daha sonra hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C sıcaklık ve %75 nem) stabilite kabininde 3 ay bekletilmiştir. Geçen süre zarfından sonra formülasyonların fiziksel görünümleri, damlacık büyüklüğü ve PDI değerleri belirlenerek en

iyi formülasyonlar belirlenmiştir. Her iki metoda göre hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının seçimi içeriklerine göre belirlenmiş ve yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar seçilmiştir. Belirlenen formülasyonların yağ fazına Timokinon yüklemesi yapılmıştır ve Timokinon yüklü ve yüklü olmayan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları yapışmıştır. Timokinon yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarının göze uygulanabilirlik açısından karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* salım çalışmaları ve kinetik çalışmaları, ARPE-19 hücre hattında sitotoksisite çalışmaları ve irritasyon potansiyelini belirlemek için HET-CAM testleri yapılmıştır.

Belirlenen oküler mikroemülsiyon formülasyonlarının oküler kullanıma uygunluğu için yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucu formülasyonların göze uygulanabilir özellikte oldukları görülmüştür. Ayrıca yapılan *in vitro* salım çalışmaları ve kinetik çalışmaları, sitotoksisite ve irritasyon potansiyeli belirleme çalışmaları da mikroemülsiyon formülasyonlarının göze uygulanabilir olduğunu ispatlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu yağı, timokinon, antiinflamatuar, oküler mikroemülsiyon, kuru göz hastalığı, ARPE-19, sitotoksisite, HET-CAM

PREPARATION AND EVALUATION OF MICROEMULSION EYE FORMULATIONS WITH ANTI-INFLAMMATORY EFFECT FROM BLACK SEED OIL

SUMMARY

It was aimed to develop ocular microemulsion formulations, to select the ideal microemulsion purification by making the necessary controls on the developed microemulsion formulations, to load the anti-inflammatory active ingredient Thymoquinone into ideal microemulsions, and to conduct characterization, *in vitro* release study, cytotoxicity and irritation studies, in order to evaluate the suitability of Thymoquinone loaded microemulsion formulations for ocular use. Ocular microemulsions developed are aimed to be used in the treatment of dry eye disease.

Two methods have been used in the development of ocular microemulsion formulations. First, the phase titration method was used. It was titrated with water using Black seed oil as the oil phase, Tween 20, Tween 80, Cremophor ELP, Cremophor RH40 as the surfactant, Glycerin, Propylene glycol, and Polyethylene glycol 400 as the co-surfactant. Using the triangle phase diagram, the formulations giving the highest area value were determined. A high-speed homogenization method was used as the other method. Black seed oil was used as oil phase, Tween 20, Cremophor ELP, Cremophor RH40 as the surfactant, Glycerine and Propylene glycol as co-surfactants. Formulations were prepared in certain proportions by using a homogenizer and then kept in the stability cabinet under accelerated stability conditions (40 °

C temperature and 75% humidity) for 3 months. The best formulations were determined by determining the physical appearance, droplet size, and PDI values of the formulations after the elapsed time. The selection of microemulsion formulations prepared according to both methods was determined according to their content and formulations prepared by the high-speed homogenization method were selected. The oil phase of the identified formulations was loaded with Thymoquinone and the characterization studies of the formulations with and without Thymoquinone be done. Characterization studies, *in vitro* release studies and kinetic studies, cytotoxicity studies in the ARPE-19 cell line, and HET-CAM tests were conducted to determine the irritation potential of microemulsion formulations loaded with thymoquinone.

As a result of the characterization studies carried out for the suitability of the determined ocular microemulsion formulations for ocular use, it has been observed that the formulations are applied to the eye. In addition, *in vitro* release studies and kinetic studies, cytotoxicity, and irritation potential studies have proved that microemulsion formulations are applicable to the eye.

Key words: Black seed oil, thymoquinone, anti-inflammatory, ocular microemulsion, dry eye disease, ARPE-19, cytotoxicity, HET-CAM

KAYNAKLAR

1. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of black seed (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone. Journal of pharmacopuncture. 2017;20(3):179.

2. Sabira Sultana HMA, Naheed Akhtar, Asif Iqbal, Haleema Nazar, Riaz Ur Rehman. Nigella Sativa: Monograph. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2015;4(4):103-6.

3. Majdalawieh AF, Fayyad MW. Immunomodulatory and anti-inflammatory action of Nigella sativa and thymoquinone: A comprehensive review. International immunopharmacology. 2015;28(1):295-304.

4. Grass GM, Robinson JR. Mechanisms of corneal drug penetration I: *in vivo* and *in vitro* kinetics. Journal of pharmaceutical sciences. 1988;77(1):3-14.

5. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Development of nanotechnology in ocular drug delivery systems. Drug discovery today. 2009;13(3-4):144-51.

6. Järvinen K, Järvinen T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. Advanced drug delivery reviews. 1995;16(1):3-19.

7. Gipson IK, Argüeso P, Beuerman R, Bonini S, Butovich I, Dana R, et al. Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). Ocular Surface. 2007;5(2):179-93.

8. Bacak GE, Avci G. Thymoquinone: the Bioactive Component of Nigella Sativa. Kocatepe Veterinary Journal. 2013;6(1):51-61.

9. Ramadan MF. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (Nigella sativa L.): an overview. International Journal of Food Science & Technology. 2007;42(10):1208-18.

10. Rızaoğlu T. Effects of ozonated oils (sesame oil, nigella sativaoil and hypericum perforatum oil) on wound healing process in rats (tez). Elazığ: Fırat University The Institute of Health Sciences Department of Surgery; 2018.

11. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res. 2003;17(4):299-305.

12. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L.). J Pharm Biomed Anal. 1999;19(5):757-62.

13. Khader M, Bresgen N, Eckl PM. *In vitro* toxicological properties of thymoquinone. Food Chem Toxicol. 2009;47(1):129-33.

14. Amin B, Hosseinzadeh H. Black Cumin (Nigella sativa) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. Planta Med. 2016;82(1-2):8-16.

15. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L. from Iran. Z Naturforsch C J Biosci. 2003;58(9-10):629-31.

16. Al-Saleh IA, Billedo G, El-Doush II. Levels of selenium, dl-α-tocopherol, dl-γ-tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of Nigella sativa seeds. Journal of Food Composition and Analysis. 2006;19(2-3):167-75.

17. Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Nigella sativa L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. Food Chemistry. 2007;101(2):673-81.

18. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. Pharmacol Res. 2015;95-96:138-58.

19. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymoquinone (30/08/2020)

20. Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. The protective effect of Nigella sativa against liver injury: a review. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(12):958-66.

21. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytother Res. 2004;18(3):195-9.

22. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR. Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. Planta Med. 1995;61(1):33-6.

23. Khan MA. Chemical composition and medicinal properties of Nigella sativa Linn. Inflammopharmacology. 1999;7(1):15-35.

24. Ali Z, Ferreira D, Carvalho P, Avery MA, Khan IA. Nigellidine-4-O-sulfite, the first sulfated indazole-type alkaloid from the seeds of Nigella sativa. J Nat Prod. 2008;71(6):1111-2.

25. Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. *In vitro* inhibitory effects of thymol and quinones of Nigella sativa seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. Planta Med. 2005;71(8):739-42.

26. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. Pharmacol Res. 2000;41(3):283-9.

27. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. Int Immunopharmacol. 2005;5(13-14):1749-70.

28. Kapan M, Tekin R, Onder A, Firat U, Evliyaoglu O, Taskesen F, et al. Thymoquinone ameliorates bacterial translocation and inflammatory response in rats with intestinal obstruction. Int J Surg. 2012;10(9):484-8.

29. Al-Okbi SY, Ammar NM, Soroor KA, Mohammed DA. Impact of natural oils supplements on disease activity and antioxidant state of Egyptian patients with rheumatiod arthritis. Medical Journal of Islamic Academy of Sciences. 2000;13(4):161-71.

30. Shaterzadeh-Yazdi H, Noorbakhsh MF, Hayati F, Samarghandian S, Farkhondeh T. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2018;18(1):52-60.

31. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. J Enzyme Inhib Med Chem. 2004;19(5):431-6.

32. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2006;1760(7):1088-95.

33. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, Nikami H, Takewaki T. Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: effect of thymoquinone. Acta Diabetol. 2005;42(1):23-30.

34. El Gazzar MA. Thymoquinone suppressses *in vitro* production of IL-5 and IL-13 by mast cells in response to lipopolysaccharide stimulation. Inflamm Res. 2007;56(8):345-51.

35. Keyhanmanesh R, Pejman L, Omrani H, Mirzamohammadi Z, Shahbazfar AA. The effect of single dose of thymoquinone, the main constituents of Nigella sativa, in guinea pig model of asthma. Bioimpacts. 2014;4(2):75-81.

36. Wang D, Qiao J, Zhao X, Chen T, Guan D. Thymoquinone Inhibits IL-1beta-Induced Inflammation in Human Osteoarthritis Chondrocytes by Suppressing NF-kappaB and MAPKs Signaling Pathway. Inflammation. 2015;38(6):2235-41.

37. Yurttas V, Sereflican M, Erkocoglu M, Dagli M, Terzi EH, Firat T, et al. Comparison of Histopathological Effects of Thymoquinone and Local Nasal Corticosteroids in Allergic Rhinitis in a Rabbit Model. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2016;78(1):55-60.

38. Hayat K, Asim MB, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N. Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. Curr Eye Res. 2011;36(7):591-8.

39. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. Immunol Lett. 2006;106(1):72-81.

40. Duncker SC, Philippe D, Martin-Paschoud C, Moser M, Mercenier A, Nutten S. Nigella sativa (black cumin) seed extract alleviates symptoms of allergic diarrhea in mice, involving opioid receptors. PLoS One. 2012;7(6):e39841.

41. Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. Chem Biol Interact. 2012;197(1):40-6.

42. Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of Nigella sativa L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. AAPS PharmSciTech. 2013;14(1):160-7.

43. Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M. Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. J Cell Biochem. 2011;112(1):107-17.

44. Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of Nigella sativa on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2001;110(3-4):239-51.

45. AbuKhader MM, Khater SH, Al-Matubsi HY. Acute effects of thymoquinone on the pregnant rat and embryo-fetal development. Drug Chem Toxicol. 2013;36(1):27-34.

46. Daly ESE. Protective effect of cysteine and vitamin E, Crocus sativus and Nigella sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. J Pharm Belg. 1998;53(2):87-93.

47. Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of Nigella sativa fixed oil. Phytomedicine. 2002;9(1):69-74.

48. Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, et al. Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. J Cell Mol Med. 2008;12(1):330-42.

49. Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (Nigella sativa L.) seeds against rat colon carcinogenesis. Nutr Cancer. 2003;45(2):195-202.

50. Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2008;20(2):25-7.

51. Tubesha Z, Imam MU, Mahmud R, Ismail M. Study on the potential toxicity of a thymoquinone-rich fraction nanoemulsion in Sprague Dawley rats. Molecules. 2013;18(7):7460-72.

52. Islam SN, Begum P, Ahsan T, Huque S, Ahsan M. Immunosuppressive and cytotoxic properties of Nigella sativa. Phytother Res. 2004;18(5):395-8.

53. Zedlitz S KR, Boehncke WH. Allergic contact dermatits from black cumin (Nigella sativa) oil-containing ointment. Contact Dermatittis. 2002;46(3):188.

54. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, et al. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. Mol Cancer Ther. 2008;7(7):1789-96.

55. Lee VHL RJ. Review: Topical Ocular Drug Delivery: Recent Developments and Future Challenges. Journal of Ocular Pharmacology. 1986;2:67-108.

56. Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal SR, Vyas SP. Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review. Curr Pharm Des. 2009;15(23):2724-50.

57. Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58(11):1136-63.

58. Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, Andrieu V. Recent advances in ocular drug delivery. Drug Dev Ind Pharm. 2013;39(11):1599-617.

59. https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/novaliq-to-develop-innovative-eye-drop-products (30/08/2020)

60. Dieckoto J, Argüeso P. Ocular Surface Anatomy and Physiology, Disorders and Therapeutic Care. Herranz RM, Herran RMC (Eds.). The Human Tear Film: Taylor & Francis Group. New York, 2012. p.22-31.

61. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. AAPS J. 2010;12(3):348-60.

62. Bron AJ, Mengher LS. The ocular surface in keratoconjunctivitis sicca. Eye (Lond). 1989;3 (Pt 4):428-37.

63. Sommer A, Emran N. Topical Retinoic Acid in the Treatment of Corneal Xerophthalmia. American Journal of Ophthalmology. 1978;86(5):615-7.

64. Al Mahmood AM, Al-Swailem SA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye syndrome: A myth or reality? Saudi J Ophthalmol. 2014;28(3):195-7.

65. Rosenberg ES, Asbell PA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye. Ocul Surf. 2010;8(1):18-28.

66. Miljanovic B TK, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. National Institutes of Health (NIH), 2010; 82(4): 887-893.

67. Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, Barabino S, Schaumberg DA, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. Arch Ophthalmol. 2008;126(2):219-25.

68. Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for ocular drug delivery. Macromol Biosci. 2012;12(5):608-20.

69. Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. Prog Retin Eye Res. 2010;29(6):596-609.

70. Chung YB, Han K, Nishiura A, Lee VH. Ocular absorption of Pz-peptide and its effect on the ocular and systemic pharmacokinetics of topically applied drugs in the rabbit. Pharm Res. 1998;15(12):1882-7.

71. Van Der Bijl P, Engelbrecht AH, Van Eyk AD, Meyer D. Comparative permeability of human and rabbit corneas to cyclosporin and tritiated water. J Ocul Pharmacol Ther. 2002;18(5):419-27.

72. Ünlü N, Şumnu M, Hıncal AA. Göz preparatlarında biyoyararlılık ve kinetik 1. FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi. 1988; 13:522-535.

73. Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, Behar-Cohen F, Gurny R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. Eur J Pharm Biopharm. 2003;56(3):307-18.

74. Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. Advanced drug delivery reviews. 2005;57(11):1595-639.

75. Baeyens V, Gurny R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. Pharm Acta Helv. 1997;72(4):191-202.

76. Lee VH, Robinson JR. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. J Ocul Pharmacol. 1986;2(1):67-108.

77. Higashiyama M, Inada K, Ohtori A, Tojo K. Improvement of the ocular bioavailability of timolol by sorbic acid. Int J Pharm. 2004;272(1-2):91-8.

78. Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27(7):558-62.

79. Li N, Zhuang C, Wang M, Sun X, Nie S, Pan W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. Int J Pharm. 2009;379(1):131-8.

80. Sultana Y, Jain R, Aqil M, Ali A. Review of ocular drug delivery. Curr Drug Deliv. 2006;3(2):207-17.

81. Yellepeddi VK, Palakurthi S. Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery. J Ocul Pharmacol Ther. 2016;32(2):67-82.

82. Gürsoy AZ. Kontrollü Salım Sistemleri. Gürsoy AZ (Editör). Oküler Sistemler. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2014. s.197-212.

83. Ali Y, Lehmussaari K. Industrial perspective in ocular drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58(11):1258-68.

84. Allen L, Ansel HC. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. In: Howes S (Ed). Liquid Dosage Forms. Philadelphia: PA 19103. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. 2013. p.396-445.

85. Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, Tabata Y. Drug delivery from ocular implants. Expert Opin Drug Deliv. 2006;3(2):261-73.

86. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. Pharm Res. 2009;26(5):1197-216.

87. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug Discov Today. 2008;13(3-4):144-51.

88. Ihre HR, Padilla De Jesus OL, Szoka FC, Jr., Frechet JM. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: design, synthesis, and characterization. Bioconjug Chem. 2002;13(3):443-52.

89. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews. 2012;64:175-93.

90. Peng CC, Bengani LC, Jung HJ, Leclerc J, Gupta C, Chauhan A. Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2011;21(1):111-21.

91. Grampurohit N, Ravikumar P, Mallya R. Microemulsions for topical use–a review. Ind J Pharm Edu Res. 2011;45(1):100-7.

92. Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. Progress in retinal and eye research. 2002;21(1):15-34.

93. Hegde RR, Verma A, Ghosh A. Microemulsion: new insights into the ocular drug delivery. ISRN Pharm. 2013;2013:826798.

94. Armağan V. Antitümöral ilaç içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi ve antitümöral etkinliğinin araştırılması üzerine çalışmalar (tez). İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2006.

95. Warisnoicharoen W, Lansley A, Lawrence M. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. International journal of pharmaceutics. 2000;198(1):7-27.

96. Hwang SR, Lim S-J, Park J-S, Kim C-K. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. International journal of pharmaceutics. 2004;276(1-2):175-83.

97. Bhargava H, Narurkar A, Lieb L. Using microemulsions for drug delivery. Pharm Technol. 1987;11(3):46-54.

98. Lv FF, Li N, Zheng LQ, Tung CH. Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2006;62(3):288-94.

99. Von Corswant C, Thorén P, Engström S. Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances. Journal of pharmaceutical sciences. 1998;87(2):200-8.

100. Ayannides C, Ktistis G. A rheological study on microemulsion gels of isopropyl myristate, polysorbate 80, glycerol, and water. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 1999;50(1):1-7.

101. Tomšič M, Podlogar F, Gašperlin M, Bešter-Rogač M, Jamnik A. Water–Tween 40®/Imwitor 308®–isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: Small-angle X-ray scattering study. International journal of pharmaceutics. 2006;327(1-2):170-7.

102. Moulik SP, Paul BK. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. Advances in Colloid and Interface science. 1998;78(2):99-195.

103. Goddeeris C, Cuppo F, Reynaers H, Bouwman W, Van den Mooter G. Light scattering measurements on microemulsions: estimation of droplet sizes. International journal of pharmaceutics. 2006;312(1-2):187-95.

104. Swafford S, Bergmann W, Migliorese K, Lichtin J, Sakr A. Characterization of swollen micelles containing linoleic acid in a microemulsion system. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 1991;42(4):235-47.

105. Mei Z, Chen H, Weng T, Yang Y, Yang X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2003;56(2):189-96.

106. Fialho SL, Da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. Clinical & experimental ophthalmology. 2004;32(6):626-32.

107. Sharma AK, Garg T, Goyal AK, Rath G. Role of microemuslsions in advanced drug delivery. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2016;44(4):1177-85.

108. Habib F, El-Mahdy M, Maher S. Microemulsions for ocular delivery: evaluation and characterization. Journal of drug delivery science and technology. 2011;21(6):485-9.

109. Baspinar Y, Bertelmann E, Pleyer U, Buech G, Siebenbrodt I, Borchert H-H. Corneal permeation studies of everolimus microemulsion. Journal of ocular pharmacology and therapeutics. 2008;24(4):399-402.

110. Chan J, El Maghraby GM, Craig JP, Alany RG. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: *in vitro* and *in vivo* evaluation. International journal of pharmaceutics. 2007;328(1):65-71.

111. Kesavan K, Kant S, Singh PN, Pandit JK. Mucoadhesive chitosan-coated cationic microemulsion of dexamethasone for ocular delivery: *in vitro* and *in vivo* evaluation. Current eye research. 2013;38(3):342-52.

112. Lv FF, Zheng LQ, Tung CH. Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system. International journal of pharmaceutics. 2005;301(1-2):237-46.

113. Tubesha Z, Abu Bakar Z, Ismail M. Characterization and stability evaluation of thymoquinone nanoemulsions prepared by high-pressure homogenization. Journal of Nanomaterials. 2013;2013.

114. Ahmad N, Ahmad R, Alam MA, Samim M, Iqbal Z, Ahmad FJ. Quantification and evaluation of thymoquinone loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischemia. International journal of biological macromolecules. 2016;88:320-32.

115. Kalam MA, Raish M, Ahmed A, Alkharfy KM, Mohsin K, Alshamsan A, et al. Oral bioavailability enhancement and hepatoprotective effects of thymoquinone by self-nanoemulsifying drug delivery system. Materials Science and Engineering: C. 2017;76:319-29.

116. Alwadei M, Kazi M, Alanazi FK. Novel oral dosage regimen based on self-nanoemulsifying drug delivery systems for codelivery of phytochemicals–Curcumin and thymoquinone. Saudi Pharmaceutical Journal. 2019;27(6):866-76.

117. Lemp A. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on clinical trials in dry eyes. Eye & Contact Lens. 1995;21(4):221-32.

118. Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. American Journal of Ophthalmology. 2004;137(2):337-342.

119. Lemp MA, Foulks GN. The definition and classification of dry eye disease. Ocul Surf. 2007;5(2):75-92.

120. McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of dry eye. Survey of ophthalmology. 2012;57(4):293-316.

121. http://www.biemilac.com/htmldocs/biem/tedavi_alanlari/47/1.html (30/08/2020)

122. Moss SE, Klein R, Klein BE. Long-term incidence of dry eye in an older population. Optometry and Vision Science. 2008;85(8):668-74.

123. Li D-Q, Chen Z, Song XJ, Luo L, Pflugfelder SC. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. Investigative ophthalmology & visual science. 2004;45(12):4302-11.

124. Bron AJ. The definition and classification of dry eye disease. The Ocular Surface. 2007;5(2):75-92.

125. Calonge M. The treatment of dry eye. Survey of ophthalmology. 2001;45:S227-S39.

126. https://www.drugs.com/condition/dry-eye-disease.html?category id=160&include rx=true&include_otc=true&show_off_label=true&submitted=true (30/08/2020)

127. Commission EP, The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Healthcare. European pharmacopoeia: Council of Europe; 2010.

128. Pharmacopeia USP, editor National Formulary (USP-25/NF-20). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2000.

129. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1:1-15.

130. Food and Drug Administration (FDA). Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. Guidance for Industry. 2015.

131. Pharmacopoeia EP. European Pharmacopoeia: Supplement: Council of Europe; 1998.

132. Ismail N, Ismail M, Azmi NH, Bakar MFA, Yida Z, Stanslas J, et al. Beneficial effects of TQRF and TQ nano-and conventional emulsions on memory deficit, lipid peroxidation, total antioxidant status, antioxidants genes expression and soluble Aβ levels in high fat-cholesterol diet-induced rats. Chemico-Biological Interactions. 2017;275:61-73.

133. GautamSinghvi MS. Review: *In vitro* Drug Release Characterization Models. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research. 2011;2(1):77-84.

134. Shoaib MH, Tazeen J, Merchant HA, Yousuf RI. Evaluation of drug release kinetics from ibuprofen matrix tablets using HPMC. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. 2006;19(2):119-24.

135. Higuchi T. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. J Pharm Sci. 1963;52(12):1145-9.

136. Hixson A, Crowell J. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. Industrial & Engineering Chemistry. 1931;23(8):923-31.

137. Korsmeyer R, Peppas N. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. Controlled release delivery systems. 1983;1983(77-90):83.

138. Ebada SS, Edrada RA, Lin W, Proksch P. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. Nature protocols. 2008;3(12):1820.

139. Cazedey ECL, Carvalho FC, Fiorentino FAM, Gremião MPD, Salgado HRN. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;45(4):759-66.

140. ICCVAM. ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods. Research Triangle Park: National Toxicology Program; 2003.

141. Pagola S, Benavente A, Raschi A, Romano E, Molina M, Stephens P. Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution X-ray powder diffraction. AAPS PharmSciTech. 2004;5(2):24-31.

142. Salem AA, El Haty IA, Abdou IM, Mu Y. Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: a possible mechanism for thymoquinone anticancer effect. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2015;1850(2):329-42.

143. Salmani JMM, Asghar S, Lv H, Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light. Molecules. 2014;19(5):5925-39.

144. Soliman RM, Salam RAA, Eid BG, Khayyat A, Neamatallah T, Mesbah MK, et al. Stability study of thymoquinone, carvacrol and thymol using HPLC-UV and LC-ESI-MS. Acta Pharmaceutica. 2020;70(3):325-42.

145. Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T. Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals. Journal of Applied Toxicology. 2016;36(8):1025-37.

146. Robertson SM, Curtis MA, Schlech BA, Rusinko A, Owen GR, Dembinska O, et al. Ocular pharmacokinetics of moxifloxacin after topical treatment of animals and humans. Survey of ophthalmology. 2005;50(6):S32-S45.

147. https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID9060079#properties (30/08/2020)

148. Hu X, Liang Y, Zhao B, Wang Y. Thymoquinone protects human retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis. Journal of cellular biochemistry. 2019;120(3):4514-22.

149. Yılmaz S. Serviks Kanser Hücre Hattında Timokinonun Sisplatin Sitotoksisitesine Etkilerinin İncelenmesi (tez). Ankara: Haceteppe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2018.

150. Vatansev H. Timokinon'un meme kanseri hücresine etkisi (tez). Konya: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2014.

151. Güzelsoy P. Timokinonun sitotoksisitesinin ve genotoksik özeliklerinin değerlendirilmesi (tez). Ankara: Haceteppe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2016.

152. İnce İ, Yıldırım Y, Güler G, Medine Eİ, Ballıca G, Kuşdemir BC, et al. Synthesis and characterization of folic acid-chitosan nanoparticles loaded with thymoquinone to target ovarian cancer cells. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2020;324:71-85.

153. Gupta H, Jain S, Mathur R, Mishra P, Mishra AK, Velpandian T. Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel system. Drug delivery. 2007;14(8):507-15.

154. Mojeiko G, de Brito M, Salata GC, Lopes LB. Combination of microneedles and microemulsions to increase celecoxib topical delivery for potential application in chemoprevention of breast cancer. International journal of pharmaceutics. 2019;560:365-76.

155. Mahboobian MM, Seyfoddin A, Aboofazeli R, Foroutan SM, Rupenthal ID. Brinzolamide–loaded nanoemulsions: *ex vivo* transcorneal permeation, cell viability and ocular irritation tests. Pharmaceutical development and technology. 2019;24(5):600-6.

156. Öztürk AA, Kıyan HT. Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using *in vivo* HET-CAM assay. Microvascular Research. 2020;128:103961.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Nigella sativa (Çörek otu) (10) 4
Şekil 2. Çörek otu tohumu ve içeriği (10) 5
Şekil 3. Çörek otu tohum yağının etkin bileşenlerinin kimyasal yapısı (14) 6
Şekil 4. (a) TQ'un kimyasal yapısı ve (b) TQ'un 3D gösterimi (19) 8
Şekil 5. İnsan gözü ve onun önemli kısımları (56) 16
Şekil 6. Gözyaşı film tabakası (59) 19
Şekil 7. Çeşitli öküler bariyerleri ve ilaç verme mekanizmalarını gösteren göz anatomisi: (1) topikal uygulama, (2) intravitreal enjeksiyon, (3) periyodik enjeksiyonlar [(3a) subkonjunktival, (3b) peribulbar, (3c) subtenon, (3d) retrobulbar] ve (4) sistemik uygulama (68) 23
Şekil 8. Oküler ilaç salımından sonra ilacın oküler dokularda hareket ve dağılımının akış şeması ve ilacın farklı oküler bölmelerde emilimini etkileyen faktörler 24
Şekil 9. Oküler tedavi için kullanılan farklı salım sistemleri 35
Şekil 10. Mikroemülsiyonların üç farklı tipte mikro gösterimi (90) 36
Şekil 11. Yardımcı yüzey etkin maddelerin arayüzey filminin akışkanlığı üzerindeki etkisi (a) doğrusal yüzey etkin madde, (b) dallanmış yüzey etkin madde, (c) yardımcı yüzey etkin madde, (d) sert film ve (e) akışkan film (92) 41
Şekil 12. Winsor tarafından önerilen denge durumlarına dayanarak emülsiyon sınıflandırılmasının şematik gösterimi (90) 41

Şekil 13. Üçgen faz diyagramında farklı alanlarda mikroemülsiyon tiplerinin gösterimi (93) 42
Şekil 14. Kuru göz öncesi (a) ve sonrası (b) gözyaşı film tabakasının gösterimi (121) 49
Şekil 15. Kuru göz mekanizması (124) 53
Şekil 16. LC-MS/MS cihaz gösterimi 63
Şekil 17. Yüksek devirli homojenizatör gösterimi 80
Şekil 18. İn vitro salım çalışmasında kullanılan çalkalamalı su banyosu ve numuneler 91
Şekil 19. İn vitro salım çalışmasında kullanılan UV-vis spektrofotometre 91
Şekil 20. ARPE-19 hücresinin dondurulması sonrası çözünmüş gösterimi 96
Şekil 21. MTT'nin formazana dönüşümü (138) 97
Şekil 22. Embriyolu yumurtaların inkübasyona hazırlanması 100
Şekil 23. TQ'nun IR spektrumu 103
Şekil 24. TQ'nun 1H NMR analizi grafiği 103
Şekil 25. TQ'nun 13C analizi grafiği 104
Şekil 26. TQ'nun UV spektrumu 104
Şekil 27. TQ'a ait 60 V fragmentör voltaj altında elde edilen MS/MS spektrumu 105
Şekil 28. TQ'nun DSC ile elde edilen termal analiz grafiği 106
Şekil 29. TQ'nun XRD grafiği 106
Şekil 30. TQ'nun LC-MS/MS için hazırlanan kalibrasyon eğrisi 107
Şekil 31. 0,5 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 110
Şekil 32. 1,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 111
Şekil 33. 2,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 112
Şekil 34. 5,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 113
Şekil 35. 7,5 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 114
Şekil 36. 10,0 µg/mL TQ standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 115
Şekil 37. 4,0 µg/mL TQ geri kazanım standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 117

Şekil 38. 8,0 µg/mL TQ geri kazanım standart çözeltisinin MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 118
Şekil 39. TQ kalibrasyon eğrisi 119
Şekil 40. YEM olarak Cremophor RH40, yağ olarak Çörek otu ve su kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun (MEF-34) üçgen faz diyagramı 125
Şekil 41. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu ve su kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun (MEF-39) üçgen faz diyagramı 125
Şekil 42. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu ve su kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonunun (MEF-43/44) üçgen faz diyagramı 126
Şekil 43. F3-1 formülasyonunun TQ içerik miktarını gösteren MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 129
Şekil 44. F7-9 formülasyonunun TQ içerik miktarını gösteren MS/MS kromatogramları ve kütle spektrumu 130
Şekil 45. F3-1 formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı 132
Şekil 46. F3-1-TQ formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı 133
Şekil 47. F7-9 formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı 133
Şekil 48. F7-9-TQ formülasyonunun damlacık büyüklüğü dağılımı 134
Şekil 49. F3-1 formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı 134
Şekil 50. F3-1-TQ formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı 135
Şekil 51. F7-9 formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı 135
Şekil 52. F7-9-TQ formülasyonunun zeta potansiyel yükü dağılımı 136
Şekil 53. F3-1 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi 141
Şekil 54. F3-1 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi 142
Şekil 55. F3-1-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi .. 143
Şekil 56. F3-1-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi .. 144
Şekil 57. F7-9 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi 145
Şekil 58. F7-9 formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi 146
Şekil 59. F7-9-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki damlacık büyüklüğü değişimi .. 147
Şekil 60. F7-9-TQ formülasyonunun 1 ve 2. aylardaki zeta potansiyel yükü değişimi .. 148
Şekil 61. TQ süspansiyonu ve formülasyonların zamana karşı % salım grafiği 149
Şekil 62. TQ süspansiyonunun 0. derece kinetik çalışması grafiği 150

Şekil 63. TQ süspansiyonunun 1. derece kinetik çalışması grafiği 150
Şekil 64. TQ süspansiyonunun Higuchi modeli kinetik çalışması grafiği 151
Şekil 65. TQ süspansiyonunun Hixson-Crowell modeli kinetik çalışması grafiği.....151
Şekil 66. TQ süspansiyonunun Korsmeyer-Peppas modeli kinetik çalışması grafiği 152
Şekil 67. F3-1-TQ formülasyonunun 0. derece kinetik çalışması grafiği 152
Şekil 68. F3-1-TQ formülasyonunun 1. derece kinetik çalışması grafiği 153
Şekil 69. F3-1-TQ formülasyonunun Higuchi modeli kinetik çalışması grafiği 153
Şekil 70. F3-1-TQ formülasyonunun Hixson-Crowell modeli kinetik çalışması grafiği 154
Şekil 71. F3-1-TQ formülasyonunun Korsmeyer-Peppas modeli kinetik çalışması grafiği 154
Şekil 72. F7-9-TQ formülasyonunun 0. derece kinetik çalışması grafiği 155
Şekil 73. F7-9-TQ formülasyonunun 1. derece kinetik çalışması grafiği 155
Şekil 74. F7-9-TQ formülasyonunun Higuchi modeli kinetik çalışması grafiği 156
Şekil 75. F7-9-TQ formülasyonunun Hixson-Crowell modeli kinetik çalışması grafiği 156
Şekil 76. F7-9-TQ formülasyonunun Korsmeyer-Peppas modeli kinetik çalışmasının grafiği.....157
Şekil 77. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 37,5 µM ile 600 µM dozlarında TQ uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....158
Şekil 78. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süreyle TQ'nun uygulandığı MTT testi plağı 159
Şekil 79. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süreyle TQ'nun uygulandığı MTT testi plağı 160
Şekil 80. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile TQ uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 161
Şekil 81. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile TQ uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 161
Şekil 82. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....162
Şekil 83. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F7-9 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....163
Şekil 84. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F3-1 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 163

Şekil 85. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 164
Şekil 86. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F7-9 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 164
Şekil 87. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1 formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 165
Şekil 88. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi 166
Şekil 89. ARPE-19 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F7-9-TQ formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi 167
Şekil 90. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 168
Şekil 91. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 168
Şekil 92. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süre ile F7-9-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 169
Şekil 93. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süre ile F3-1-TQ formülasyonu uygulamasının MTT testi sonuçları kullanarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri 169
Şekil 94. ARPE-19 hücre hattında 24 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı (F3-1, F7- 9, F3-1-TQ, F7-9-TQ), veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma 170
Şekil 95. ARPE-19 hücre hattında 48 saat süreyle 1,25 µL ile 20 µL dozlarında F3-1 formülasyonu uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı (F3-1, F7- 9, F3-1-TQ, F7-9-TQ), veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma 171
Şekil 96. HET-CAM testi Pozitif Kontrol ve Negatif Kontrol Grubu 172
Şekil 97. HET-CAM testi, F3-1-TQ formülasyon grubu 172
Şekil 98. HET-CAM testi, F7-9-TQ formülasyon grubu 173

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çörek otu tohumlarının genel kimyasal bileşimi (14) 6
Tablo 2. TQ'nun antiinflamatuar etkileri (30) 10
Tablo 3. Gözyaşının fiziksel özellikleri, bileşenleri ve gözyaşında bulunan elektrolitler (60) 20
Tablo 4. Göze ilaç uygulama yollarının bazı avantaj ve dezavantajları (69) 25
Tablo 5. Oküler sistemlerin avantajları ve dezavantajları (56) 33
Tablo 6. Oftalmik Preparatlarda Tercih Edilen Yağ Grupları (93) 38
Tablo 7. Oftalmik Preparatlarda Kullanılabilecek Yüzey Etkin Maddeler (93) 39
Tablo 8. Oftalmik Preparatlarda Kullanılabilecek Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler (93) 40
Tablo 9. HLB değerlerine göre YEM'lerin kullanım amaçları (94) 43
Tablo 10. Bazı oküler mikroemülsiyon çalışmaları 47
Tablo 11. TQ içeren emülsiyon çalışmaları 48
Tablo 12. Kuru göz etiyolojik sınıflandırılması (119) 50
Tablo 13. Restasis'in Türkiye'deki müstahzarları 55
Tablo 14. Oftalmik lubrikant ürünleri 56
Tablo 15. Cihazın LC ile ilgili parametreleri 63
Tablo 16. LC Akış Gradienti Parametreleri 63
Tablo 17. Cihazın MS/MS ile ilgili parametreleri 64

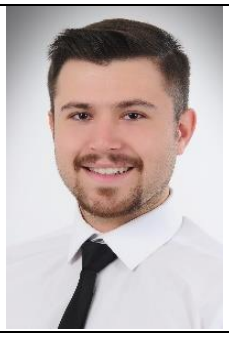
Tablo 18. TQ Optimizasyon Çalışmaları MS/MS Parametreleri 64
Tablo 19. YEM olarak Cremophor EL, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……69
Tablo 20. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……69
Tablo 21. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……70
Tablo 22. YEM olarak Cremophor EL, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……..71
Tablo 23. YEM olarak Tween 20, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...71
Tablo 24. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları…….72
Tablo 25. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları 72
Tablo 26. YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları 73
Tablo 27. YEM olarak Cremophor RH40, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları.....74
Tablo 28. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları 74
Tablo 29. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek out yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……75
Tablo 30. YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……..76
Tablo 31. YEM olarak Tween 80, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...77
Tablo 32. YEM olarak Tween 80, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...77
Tablo 33. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları…….78
Tablo 34. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak PEG 400, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları…….78

Tablo 35. YEM olarak Tween 80, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek out yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……79
Tablo 36. Yüksek devirli homojenizatör ile hazırlanan formülasyon kodları ve içerikleri 81
Tablo 37. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...81
Tablo 38. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……82
Tablo 39. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Tween 20, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...82
Tablo 40. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor ELP, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...83
Tablo 41. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM Cremophor ELP, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...83
Tablo 42. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor ELP, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……..84
Tablo 43. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……...85
Tablo 44. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Gliserin, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……85
Tablo 45. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemine göre hazırlanan, YEM olarak Cremophor RH40, YYEM olarak Propilen glikol, yağ olarak Çörek otu yağı ve su kullanılarak geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonları……..86
Tablo 46. F1 formülasyonu ekleme miktarları 87
Tablo 47. F3 formülasyonu ekleme miktarları 87

Tablo 48. Farklı geometrik şekildeki salım sistemleri için "n" parametresinin değerleri ve salım mekanizmaları……...94
Tablo 49. ARPE-19 Hücre hattına ait bilgiler 95
Tablo 50. Çalışmada kullanılan uygulama grupları 98
Tablo 51. İrritasyon skor tablosu (140) 100
Tablo 52. Vasküler etkileri gözlemin tanımı ile karşılaştıran puanlar (139) 101
Tablo 53. Skorların tahriş kategorisi ile ilişkisi (139) 101
Tablo 54. TQ'nun LOD ve LOQ hesaplamaları için kullanılan veriler 108
Tablo 55. TQ standart çözeltilerinin yöntemdeki doğruluk değerleri.....108
Tablo 56. TQ'nun analitik yönteme ilişkin geri kazanım sonuçarı 116
Tablo 57. TQ'un analitik yöntemine ilişkin geri kazanım sonuçları 120
Tablo 58. TQ için birinci gün elde edilen kesinlik sonuçları 121
Tablo 59. TQ için ikinci gün elde edilen kesinlik sonuçları.....121
Tablo 60. TQ için üçüncü gün elde edilen kesinlik sonuçları 122
Tablo 61. TQ için üç gün boyunca elde edilen ortalama kesinlik sonuçları 122
Tablo 62. TQ stabilite sonuçları 123
Tablo 63. TQ etkin maddesine ait çözünürlük çalışması sonuçları 123
Tablo 64. Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyon bulguları 126
Tablo 65. İki yönteme göre hazırlanan formülasyonlar ve içerikleri 127
Tablo 66. F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının TQ içerik miktarları 128
Tablo 67. Formülasyonların organoleptik değerlendirilmesi sonuçları 131
Tablo 68. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri (t=0 anında)……132
Tablo 69. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri değerleri (t=0 anında)……136
Tablo 70. TQ içermeyen F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının ve TQ içeren F3-1 ve F7-9 formülasyonlarının pH, viskozite ve yoğunluk ölçümüne ait veriler (t=0 anında)……..136
Tablo 71. F3-1 formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)……...137

Tablo 72. F7-9 formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)……...138
Tablo 73. F3-1-TQ formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)……...139
Tablo 74. F7-9-TQ formülasyonunun t=0 anındaki hızlandırılmış stabilite şartlarında (40 °C / %70 Nem) yapılan başlangıçta (t=0), 1 ve 2 aya ait stabilite çalışmaları ve standart sapma değerleri (± SS)……...139
Tablo 75. TQ süspansiyonu ve formülasyonlarının kinetik çalışmaları sonucu elde edilen R^2 ve k değeri sonuçları……157

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler		
	**Adı**	Görkem
	Soyadı	Tıranbeşli
	Ünvanı	Yüksek Kimya Mühendisi
	Doğum yeri	Tekirdağ
	Doğum tarihi	28.09.1995
	Askerlik durumu	Yapıldı
	Medeni hali	Bekar
	Sürücü belgesi	B sınıfı
İletişim Bilgileri		
E-mail	gorkem.tiranbesli@hotmail.com	
Tel	+905416336929	
Eğitim Bilgileri		
Lise	Hacı Rafet Gümüş Lisesi	
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi - Mühendislik Fakültesi - Kimya Mühendisliği	
Yüksek lisans	Trakya Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Enstitüsü - Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı	
Yer Aldığım Projeler		
Lisans bitirme tezi	Fosfolipid Kaplı Mezogözenekli Silika Nanopartiküllerin Sentezi ve İlaç Salımında Kullanımı	

Yüksek lisans bitirme tezi	Çörek Otu Yağı Kaynaklı Antiinflamatuar Etkili Mikroemülsiyon Göz Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi			
Proje	Uzun Süreli Salım Gösteren Anti-VEGF İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi: Ön Çalışma			
Staj ve İş Tecrübeleri				
Staj (07-09.2015)	Paşabahçe Kırklareli Cam Sanayi - Üretim Stajı			
Staj (07-09.2016)	Reka Bitkisel Yağ Sanayi A.Ş. - Laboratuvar Stajı			
İş (06-10.2017) / (06-10.2019)	Reka Bitkisel Yağ Sanayi A.Ş. - Kalite Kontrol Laboratuvar Analisti			
Kullanabildiğim Bilgisayar Programları				
Microsoft Office, Autocad, CAD/CAM, MATLAB, EndNote, GraphPad Prism 8, IBM SPSS				
Yabancı Dil				
İngilizce	Okuma	Dinleme	Yazma	Konuşma
	İyi	İyi	İyi	iyi
Yetkinliklerim				
Laboratuvarda kullanabildiğim cihazlar	UV-vis spektrofotometre			
	LC-MS/MS (Agilent Technologies)			
	HPLC (Agilent Technologies)			
	Malvern Zetasizer			
	GC (Agilent Technologies)			
Teorik beceriler	FTIR grafik okuma ve yorumlama			
	NMR grafik okuma ve yorumlama			
	MS grafik okuma ve yorumlama			
	UV-vis spektrofotometre grafik okuma ve yorumlama			
	USP ve EP okuma ve yorumlama			
Pratik beceriler	Etkin madde ile anatilik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları oluşturma			
	Nanopartiküler sistemler üzerine formülasyon geliştirme çalışmaları			
	Emülsiyon sistemler üzerine formülasyon geliştirme çalışmaları			
	İn vitro salım çalışmaları ve kinetik hesaplamalar			

	Hücre kültürü pasajlama ve sitotoksisite testleri
	OECD ve ICCVAM yöntemlerine göre *in vivo* çalışmaları (HET-CAM, BCOP ve ICE testi)
Dökümantasyon	Laboratuvardaki cihazların standart operasyon prosedürlerini (SOP) hazırlama
	İn vivo test çalışmaları prosedürlerinin akış şemasını oluşturma
Referanslar	
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK	Trakya Üniversitesi - Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı - +905058003072
Arş. Grv. Nazan YILMAZ	Afyon Kocatepe Üniversitesi - Kimya Mühendisliği Bölümü - +905548297018