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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülşah GEDİK

BRİMONİDİN VE KROSETİN YÜKLÜ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek LisansTezi)

SİNEM KÖKSAL

EDİRNE-2025

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Gülşah GEDİK

BRİMONİDİN VE KROSETİN YÜKLÜ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

SİNEM KÖKSAL

Destekleyen Kurum:

EDİRNE-2025

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ..... **İ**
ETİK BEYAN ..... **İİ**
İTHAF ..... **İİİ**
TEŞEKKÜR ..... **İV**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **V**
ÖZET ..... **Vİİ**
ABSTRACT ..... **İX**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. Gözün Yapısı **2**
2.1.1. Kornea **2**
2.1.2. Konjonktiva **3**
2.1.3. Sklera **4**
2.1.4. Kan-Oküler Bariyeri **4**
2.2. Göz Hastalıkları **5**
2.2.1. Glokom **5**
2.2.2. Kuru Göz **6**
2.3. Oküler İlaç Dağıtımı **6**
2.3.1. Göz Damlası **10**
2.4. Hidrojeller **10**
2.4.1. Hidrojellerin Genel Yapısı **11**
2.4.2. Hidrojel Şişme Mekanizmaları **11**
2.5. Hyaluronik Asit **12**
2.5.1. Hyaluronik Asit Oküler Tedavide Kullanımı **14**
2.6. Brimonidin Tartarat **16**
2.6.1. Brimonidin Tartarat Etki Mekanizması **19**
2.6.2. Brimonidin Tartarat Oküler Tedavide Kullanımı **20**
2.7. Krosetin **21**
2.7.1. Krosetinin Oküler Tedavide Kullanımı **23**
2.7.2. Oküler Tedavide Kullanılan İlaç Formülasyonlarının Özellikleri **24**
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **29**

3.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Analizleri 30
3.1.1. Brimonidin Tartaratın Fizikokimyasal Analizleri 30
3.1.2. Krosetinin Fizikokimyasal Analizleri 31
3.1.3. Krosetin ve Brimonidin Tartaratın Birlikte UV'deki Görünür Bölge Spektrofotometre Analizi 32
3.2. Analitiksel Metot ve Validasyon Çalışmaları 32
3.2.1. Brimonidin Tartarat'ın Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Validasyon Çalışmaları 34
3.2.2. Krosetinin Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Validasyon Çalışmaları 35
3.2.3. Krosetin ve Brimonidin Tartaratın Birlikte Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Validasyon Çalışmaları 37
3.3. Çözünürlük Çalışmaları 37
3.3.1. Brimonidin Tartarata Ait Çözünürlük Çalışmaları 38
3.3.2. Krosetine Ait Çözünürlük Çalışmaları 39
3.4. Göz Damlası Formülasyon Çalışmaları 39
3.4.1. Ön Formülasyon Çalışması 39
3.4.2. Formülasyon Çalışması 40
3.5. Formülasyonun Fizikokimyasal Çalışmaları 46
3.5.1. pH Analizi 46
3.5.2. Viskozite Analizi 46
3.5.3. Damlacık Boyutu Analizi 46
3.5.4. Yoğunluk Analizi 47
3.5.5. Osmolalite Analizi 47
3.5.6. Stabilite Çalışmaları 47
3.6. Antimikrobiyal Etkinlik Analizi 47
3.7. Yetişkin İnsan Kaynaklı Retinal Pigment Epiteli (ARPE-19) Hücreleriyle Brimonidin Tartarat ve Krosetin Etkin Maddelerinin Sitotoksisite Testi 50
3.7.1. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) Metodu ile Hücre Hattına Ekim Yapılacak Ürünlerin Konsantrasyon Belirleme Çalışması 50
3.8. Tavuk Yumurtası Karyoallontoik Membran (HET-CAM) Testi 51
4. BULGULAR 54

4.1. Brimonidin Tartaratin Fizikokimyasal Analizleri Bulguları 54
4.1.1. Brimonidin Tartaratın Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Cihazı Analiz Bulguları 54
4.1.2. Brimonidin Tartaratın Kütle Spektroskopi Cihazı Analiz Bulguları 55
4.2. Brimonidin Tartarat UV Cihazı Metot Validasyonu Bulguları 58
4.3. Krosetin UV Cihazı Metot Validasyonu Bulguları 65
4.4. Krosetin ve Brimonidin Tartaratın Birlikte UV'deki Görünür Bölge Spektrofotometre Analizi Bulguları 73
4.5. Çözünürlük Çalışmaları Bulguları 74
4.5.1. Brimonidin Tartarat Etkin Maddesi Çözünürlük Çalışması Bulguları 74
4.5.2. Krosetin Etkin Maddesi Çözünürlük Çalışması Bulguları 76
4.6. Göz Damlası Formülasyon Çalışmaları Bulguları 78
4.6.1. pH Analizi Bulguları 78
4.6.2. Viskozite Analizi Bulguları 79
4.6.3. Damlacık Boyutu Analizi Bulguları 79
4.6.4. Yoğunluk Analizi Bulguları 80
4.6.5. Osmolalite Analizi Bulguları 80
4.6.6. Stabilite Çalışmaları Bulguları 81
4.7. Antimikrobiyal Etkinlik Testi Analizi Bulguları 82
4.8. Yetişkin İnsan Kaynakli Retinal Pigment Epiteli (ARPE-19) Hücreleriyle Brimonidin Tartarat ve Krosetin Etkin Maddelerinin Sitotoksisite Testi Bulguları 82
4.8.1. F-1 Ürün Formülasyonu Sitotoksisite Bulguları 82
4.8.2. F-2 Brimonidin ve Krosetin İçermeyen Plasebo Sitotoksisite Bulguları 83
4.8.3. F-3 Krosetin İçeren Formülasyonun Sitotoksisite Bulguları 84
4.8.4. F-4 Brimonidin Tartarat İçeren Formülasyonun Sitotoksisite Bulguları 84
4.9. Tavuk Yumurtası Karyoallontoik Membran (HET-CAM) Testi Bulguları 86
5. TARTIŞMA 88
KAYNAKLAR 96
ÖZGEÇMİŞ I
BENZERLİK RAPORU II

ONAY SAYFASI

ETİK BEYAN

"Brimonidin ve Krosetin Yüklü Hidrojellerin Geliştirilmesi" adlı bana ait olan tez çalışmamın bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bütün verileri ve bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, verilerde ve sonuçlarda herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin yazımında yapay zeka yazılımları kullanmadığımı, diğer kaynaklardan elde ettiğim bilgi ve yorumlara tezimde uygun şekilde kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar bölümünde yer verdiğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Adı Soyadı

İmza

İTHAF

“Canım Aileme” ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim hayatım boyunca engin bilgi birikimiyle bana destek olan, her konuda fikrine danışabildiğim ve farmasötik nanoteknoloji alanında farkındalık kazanmamı sağlayan sayın danışmanım Doç. Dr. Gülşah GEDİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sitotoksisite analizleri konusunda projeme en büyük desteği veren ve sıklıkla fikirlerine ihtiyaç duyduğum Dr. Öğr. Üyesi Uğur KARAGÖZ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans projeme desteğini esirgemeyen Fatih GÜLCÜ, Hatice YELTEKİN, Aziz KARATAŞ ve Musa BULUT'a içtenlikle teşekkür ederim.

Laboratuvar analizleri konusunda yolumu aydınlatan sevgili meslektaşlarım Ayşe UZUN, Öykü YILMAZ ÖZAY, Cemil AKINCI ve Esin SEVİL'e teşekkürlerimi iletmek isterim.

SİMGE VE KISALTMALAR

α	: Alfa
Å	: Ångström
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
cP	: Santipuaz
dk	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
kV	: Kilovolt
L	: Litre
LDPE	: Düşük yoğunluklu polietilen
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mmHg	: Milimetre cıva
mOsm	: Milliosmol
mPa	: Milipaskal
nm	: nanometre
µ	: Mikro
µg	: mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
N	: Normalite
R	: Regresyon katsayısı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
w/v	: Kütle/hacim

AET	: Antimikrobiyal etkinlik testi
ARPE-19	: Yetişkin insan kaynakli retinal pigment epiteli
ATCC	: Amerikan tip kültür konsantrasyonu
BN	: Bağıl nem
CFU	: Koloni oluşturan birim
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EP	: Avrupa farmakopesi
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Amerika gıda ve ilaç dairesi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HET-CAM	: Tavuk yumurtası karyoallontoik membran
IC_{50}	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
ICH	: İnsan kullanımı için ilaçların teknik gerekliliklerinin uyumlaştırılması uluslararası konseyi
InChI	: Uluslararası kimyasal tanımlayıcı
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Miktar belirleme limiti
MS	: Kütle spektroskopisi
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
USP	: Amerika Birleşik Devletleri farmakopesi
UV	: Ultraviyole
y.m	: Yeterli miktarda

ÖZET

"Brimonidin ve Krosetin Yüklü Hidrojellerin Geliştirilmesi", Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2025.

Giriş ve Amaç: Krosetin safran bitkisinden elde edilen antioksidan özelliği yüksek doğal yapılı bir maddedir. Glokom tedavilerinde sıklıkla rastlanan seçici α-2 adrenerjik reseptör antogonisti olan brimonidin tartaratın krosetin ile kullanılarak iki etkin maddeli doğal yapılı ve hidrojel formunda bir göz damlası oluşturulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Brimonidin tartarat ve krosetin etkin maddelerinin ayrı ayrı ve beraber olmak üzere UV analizleri yapılarak absorbans verdiği dalga boyları belirlenmiş ve beraber herhangi bir girişim oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Brimonidin tartarat ve krosetin için çözünürlük çalışmaları yapılarak formülasyonun oluşturulmasında kullanılacak çözücüler tespit edilmiştir. Krosetinin formülasyondaki antioksidan özelliğini hangi miktarlarda sağlayabildiği antimikrobiyal etkinlik testi ile belirlenip ürün için etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda ARPE-19 hücre hattı kullanılarak elde edilen formülasyonun sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda HET-CAM testi yapılarak formülasyonun döllenmiş yumurta hücre zarında oluşturacağı herhangi bir tahriş edici özelliği olup olmadığı incelenmiştir.

Bulgular: Yapılan UV analizlerinde brimonidin tartaratın 245 nm'de ve krosetinin 420-440 nm'de absorbans verdiği belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkinlik testinde krosetinin %50 oranına kadar formülasyonu antimikrobiyal olarak koruduğu kanıtlanmıştır. ARPE-19 hücre hattında yapılan taşıyıcı formülasyonun en yüksek etkisinin 96 saat olduğu görülmektedir. Brimonidin tartarat içeren formülasyonun yapılan HET-CAM testiyle hafif tahriş edici özelliğe sahip olduğu ve taşıyıcı formülasyonla beraber plasebolar uygulandığında herhangi bir tahriş edici özelliğinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Sonuç: 150 µg/M konsantrasyonda kullanılan krosetinin oluşturulan formülasyondaki antimikrobiyal özelliğiyle ürünü mikrobiyal olarak koruduğu kanıtlanmış olup %5 oranında metanol içeren formülasyonun toksik etki yaratmadığı yapılan ARPE-19 hücre ve HET-CAM testi ile gözlemlenmiştir. Brimonidin tartarat ve krosetini birlikte içeren bir göz preparatı

bulunmamakta olup oluşturulan formülasyon doğal yapılı göz damlası olarak yeni formülasyonlara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Glokom, brimonidin tartarat, krosetin, hidrojel, göz damlası

ABSTRACT

"Development of Brimonidine and Crocetin-Loaded Hydrogels," Trakya University Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, Master's Thesis, Edirne, 2025.

Background and Aim: Crocetin is a naturally occurring substance with high antioxidant properties derived from the saffron plant. The aim of this study was to create a two-component, naturally occurring, hydrogel-based eye drop by combining brimonidine tartrate, a selective α-2 adrenergic receptor antagonist commonly used in glaucoma treatments, with crocetin.

Materials and Methods: UV analyses were performed on brimonidine tartrate and crocetin separately and together to determine the wavelengths at which they absorb light and to investigate whether they interfere with each other when combined. Solubility studies were conducted for brimonidine tartrate and crocetin to identify the solvents to be used in the formulation. The amount of crocetin required to provide antioxidant properties in the formulation was determined using an antimicrobial activity test, and its effect on the product was investigated. The cytotoxic effect of the formulation obtained using the ARPE-19 cell line was investigated in the studies conducted. At the same time, the HET-CAM test was performed to investigate whether the formulation would cause any irritation to the fertilized egg cell membrane.

Results: UV analysis revealed that brimonidine tartrate absorbed at 245 nm and crocetin absorbed at 420-440 nm. In antimicrobial activity testing, it was demonstrated that crocetin maintained antimicrobial activity up to a 50% concentration. The highest effect of the carrier formulation in the ARPE-19 cell line was observed at 96 hours. The formulation containing brimonidine tartrate was found to have mild irritant properties in the HET-CAM test, and no irritant properties were observed when applied with the carrier formulation and placebo.

Conclusion: It has been proven that 150 µg/M crocetin in the formulation protects the product from microbes with its antimicrobial properties, and it has been observed with the ARPE-19 cell and HET-CAM tests that the formulation containing 5% methanol does not cause any toxic effects. There is no eye preparation containing brimonidine tartrate and

crocetin together and it is thought that the formulation created will shed light on new formulations as naturally structured eye drops.

Keywords: Glaucoma, brimonidine tartrate, crocetin, hydrogel, eye drop

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Göz, insanların görme işlevini yerine getiren önemli bir organdır. Dünya çapında yapılan 2017 yılındaki araştırmalara göre; 253 milyon insanın görme sorunları yaşadığı ve 36 milyon insanın ise kör olduğu tespit edilmiştir. Yaş dağılımına bakıldığında ise 50 yaş ve üzerindeki insanlarda bu durumun daha fazla olduğu görülmektedir (1). Katarakt, glokom, üveit ve retinopati gözün yapısını etkileyen başlıca hastalıklardır. Bu hastalıkların erken teşhis edilmesi ve tedavi yöntemleri büyük bir önem arz etmektedir (2).

Göz kapaklarının koruyucu özelliği ile korunan, küresel bir şekli olan ön ve arka bölümden oluşan insan gözü karmaşık ve hassas bir yapıya sahiptir. Oftalmik ilaç tedavilerinde topikal, intraoküler ve intrakanaliküler yöntemler uygulanmaktadır (3). Yüksek oranda biyoyararlanım elde etmek için uygulanan intraoküler yöntemlerin dezavantajlarında konjonktivada kanama, üvea tabakasının iltihaplanması, batma hissi ve enjeksiyon işleminin tekrarlanması yer almaktadır (4). Topikal uygulamalarda ilacın en fazla %2'lik kısmı gözün ön bölümüne ulaştığı için düşük biyoyararlanım elde edilir. Bu durumlar göz önüne alınarak yeni ilaç formları araştırılmaktadır (5). Oküler sistemlerde biyoyararlanımı artırmak için gözün iç kısımlarına da ulaşabilen hidrojel yapıları kullanılarak araştırmalar yapılmıştır (6).

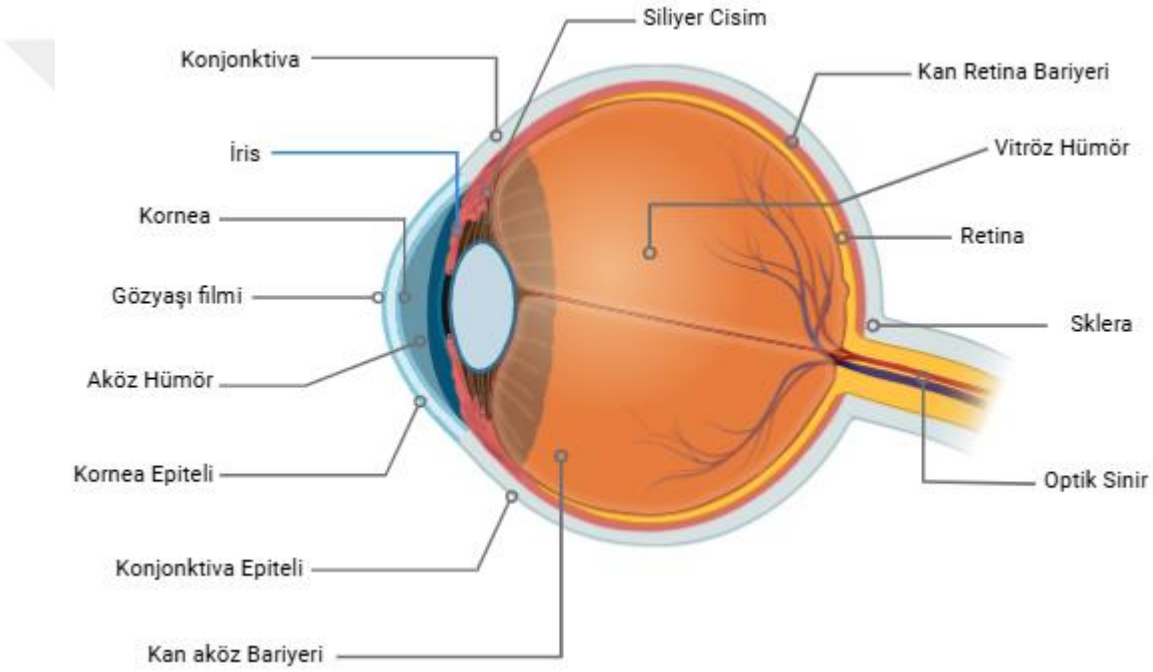
Glokom, göz içi basınç artışıyla beraber oluşan görme kayıplarına kadar giden bir göz hastalığıdır (7). Glokomlu hastalarda tedavi için timolol, latanoprost, brinzolamid ve brimonidin tartarat gibi etkin maddeleri içeren göz damlaları veya süspansiyonlar kullanılmaktadır (8). Göz preparatları genellikle etkin madde ile beraber koruyucu ajan, pH ajanı, tamponlama ajanı, çözücü ve osmolalite ajanlarından oluşan formülasyonlara sahiptir. Benzalkonyum klorür, setalkonyum klorür gibi sentetik koruyucuların (9,10) aksine doğal olarak safran bitkisinden elde edilen hem glokom tedavisinde etkin madde olarak hem de antioksidan özelliği sayesinde koruyucu özelliğiyle bilinen krosetin kullanılması planlanmıştır (11).

Brimonidin tartarat ve krosetin olmak üzere iki etkin madde içeren aynı zamanda antimikrobiyal koruyucu özelliği olan doğal, toksisitesi düşük ve sodyum hyaluronat kullanılarak doğal yapılı pH'a duyarlı bir hidrojel formunda göz damlası preparatının oluşturulması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gözün Yapısı

Göz çok katmanlı tabakadan oluşan hassas bir yapıya sahip olan görme organıdır. Çeşitli dış etmenlere karşı kendini koruyabilen mekanizmaları mevcuttur. Lens, ön sklera, iris, kornea, gözyaşı filmi, konjonktiya, aköz cisim ve siliyer cisim ön kısmı oluşturan tabakalardır. Arka kısmında ise retina, arka sklera, bruch membran, vitreus ve koroid tabakaları mevcuttur (12).

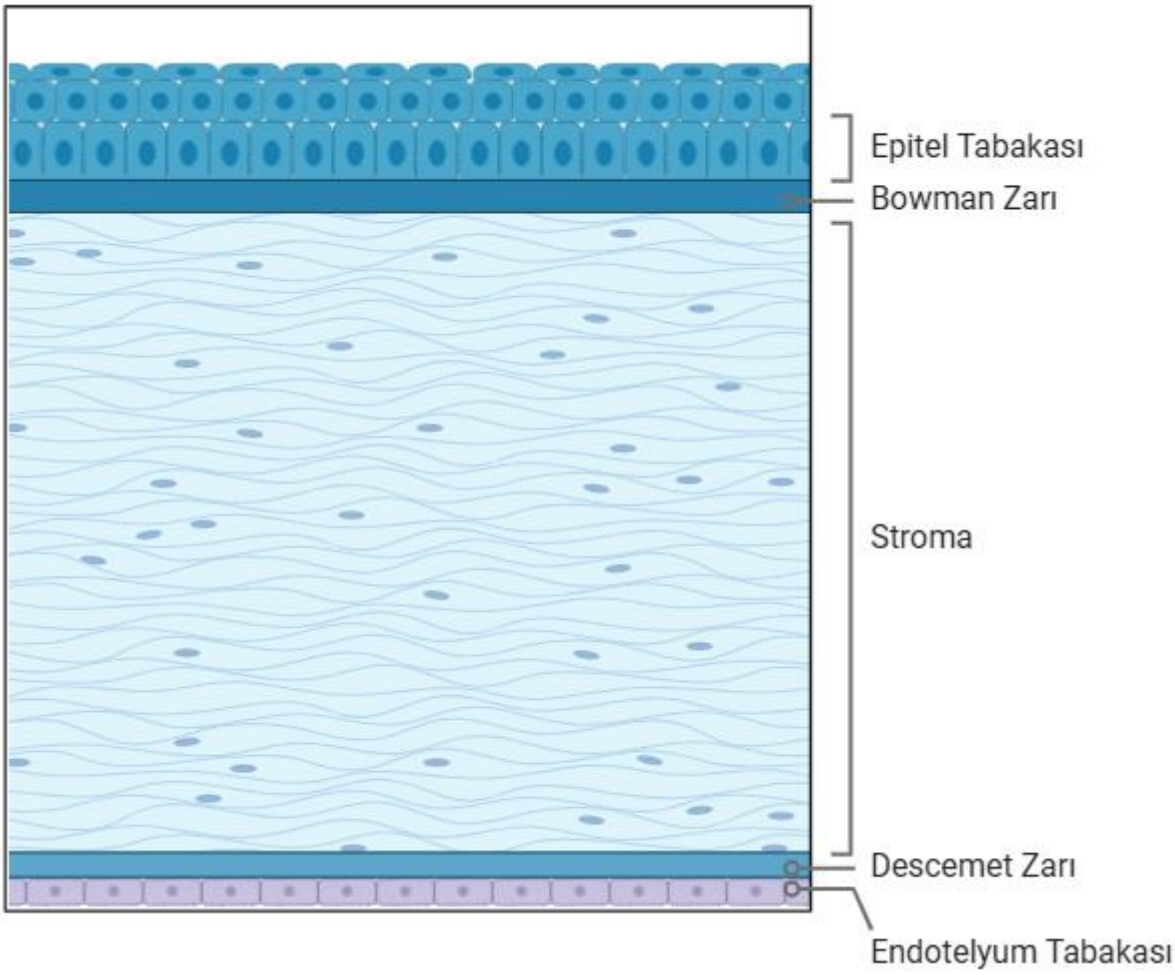


Şekil 2.1. Gözün yapısı

2.1.1. Kornea

Gözü yabancı maddelerden koruyan savunma mekanizmasına sahiptir (13). 11,5 mm dikey ve 12 mm yatay çaplarda, kan damarları ve sinir dokusu içermeyen şeffaf bir yapıdır. 1,38 kırılma indisine sahip korneanın çevresi 0,7 mm kalınlığında, merkezinde ise bu kalınlık 0,5 mm'dir. Arka kısmı endotel, ön kısmı ise epitel katmandan oluşmaktadır. Stroma, bowman zarı ve descemet zarından oluşan ara tabakaları mevcuttur (14).

Epitel tabakası mikrovilli ve hidrofilik bir yapıya sahiptir. Büyük çaplı moleküllerin geçişini engellemektedir. Hidrofilik ve küçük çaplı moleküler ilaçların geçişine olanak sağlar (15).



Şekil 2.2. Korneanın yapısı

2.1.2. Konjonktiva

Göz kapağının altında yer alan şeffaf, kılcal damarlı ve ince yapılı bir zardır. Gözyaşının oluşmasını sağlamaktadır. Yapısındaki stroma tabakasında bulunan konjonktival damarlar ve lenf sistemleri göz önünde bulundurularak formülasyon çalışmaları yapılmalıdır. Bu bölgeye uygulanan ilaçların emilerek kana karışması muhtemeldir (16,17).

Konjonktivanın sırasıyla palpebral, bulbar ve forniks olmak üzere üç ayrı bölgesi mevcuttur (13). Üst üste oluşmuş epitel tabaka ve stromadan oluşan iki katmanlı bir yapısı vardır. Hidrofilik ilaçların emildiği bu bölgede bulunan epitel tabakasındaki mikrovillus yapısı ilaç geçirgenliği için bariyer görevi görmektedir (17,18). Konjonktiva zarı, göze zarar

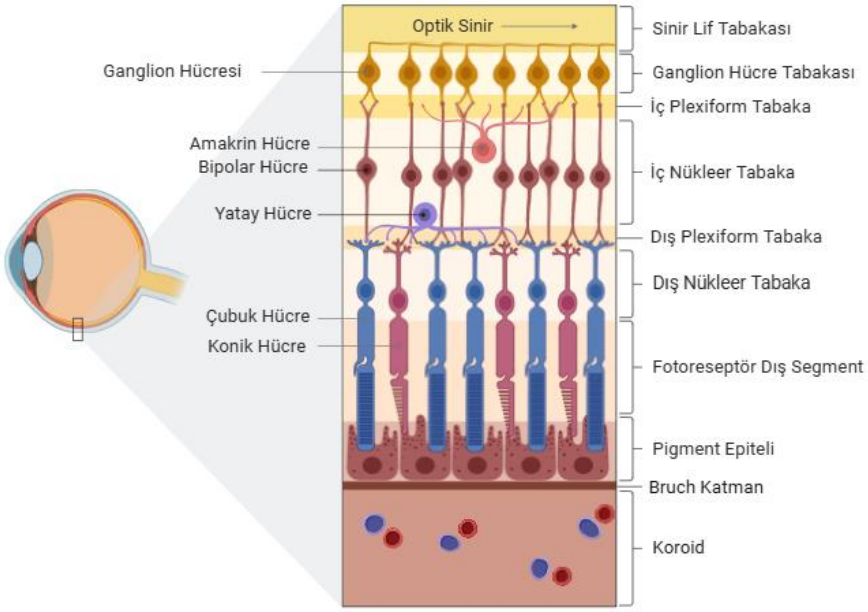
verecek bakterilerin korneadan içeri girmesini engelleyerek kendi üzerinde tutar. Kimyasal salgılar salgılayarak bu bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (19). Konjonktiva epitel bir yapıdan oluşmaktadır. Bu epitel yapı bulunduğu hücreye göre 5 farklı çeşide ayrılmıştır. Tip I, II, III, IV ve V hücreleri sırasıyla; goblet hücreleri, skuamöz hücreler, golgi aparatı, endoplazmik retikulum ve mitokondri bulundurur (18).

2.1.3. Sklera

Gözün dış tabakasında bulunur. Sklera, insanlarda 16.3 cm^2 yüzey alanına sahip opak bir yapıdır. Glikoprotein ve liflerden oluşmaktadır (20,21).

2.1.4. Kan-Oküler Bariyeri

Kan retinal bariyer ve kan sulu bariyer olarak iki temel bariyer sistem mevcuttur. Siliyer cismin bulunduğu, kandan göz içi sıvılara doğru taşınımı sağlayan kısım kan sulu bariyer olarak adlandırılır. Göz içinden kana doğru taşınımın gerçekleştiği kısım ise kan retinal bariyeri olarak adlandırılır. Kan retinal bariyerinde az sayıda belirli moleküllerin göz içerisine girişi mümkündür (15). Müller hücreleri, vasküler hücreler, sinir hücrelerini içeren gözün arka bölümünde koroid ile vitreus arasında kalan kısım retinayı oluşturmaktadır. Her biri farklı özellik taşıyan sekiz katmandan oluşan bir yapısı vardır (22). Kan retina bariyerini oluşturan dokular moleküler taşınımı sağlayabilmek için dinamik bir yapıya sahiptir (23).



Şekil 2.3. Retina pigment tabakası yapısı

Koryokapillaris ile retinanın dış katmanı arasında retina epitel hücreleri yer almaktadır ve hücrelere moleküllerin taşınmasını sağlamaktadır (24). Kan-oküler bariyeri; dış ortamlardan gelebilecek olan mikroorganizmaları gözden uzaklaştırır aynı zamanda göze girebilecek ilaç moleküllerinin geçişini de sınırlandırır, sulu mizah oluşumunu sağlar ve doku-sıvı bütünlüğünü korumakla görevlidir. Gözün ön segmentindeki bariyerler endotel hücrelerin oluşturduğu bir yapıya sahiptir ve hidrofil bazlı ilaçların gözün içerisine girip aköz hümöre ulaşımını engeller. Bariyerin özelliğini kaybetmesi ile her çeşit ilacın aköz hümöre sızmasına neden olacaktır (25). Gözün arka segmentinde bulunan kan retinal bariyeri retinal pigment epiteli ve retinal vasküler endotelyumun birbiri ile bağlı olmasını sağlar (26).

2.2. Göz Hastalıkları

2.2.1. Glokom

Sinsi bir göz rahatsızlığı olarak bilinen glokom, retinadaki ganglion hücrelerinin deformasyonu ve gözde yer alan optik sinir başlarının daralması sonucu oluşmaktadır (27). Glokom genetik faktörler başta olmak üzere göz içi basıncın artmasına bağlı olarak oluşan ve görme kaybına kadar giden bir göz hastalığıdır (7,28). Dünya üzerinde yaklaşık olarak 70 milyon insan glokom sebebiyle körlük yaşamaktadır. Körlüğe neden olan ikinci en önemli etmen olarak görülmektedir (29). Göz içi basıncı 10-21 mmHg olan ve normal olarak kabul edilen hastaların %50'lik kısmında yapılan perimetrik analizlerle glokom hastası oldukları ortaya çıkmıştır (30).

Yaklaşık olarak önümüzdeki 20 yıl içerisinde tüm dünyada 100 milyondan fazla kişiye glokom teşhisi konulacağı ön görülmektedir. Günümüzde yapılan cerrahi işlemler ve lazer tedavilerle birlikte göz içi basıncı düşürmek için farklı farmasötik formlarda ilaçlar geliştirilip yeni oküler tedavi yöntemleri kaydedilmektedir (31). Geliştirilen ilaçlarla beraber erken evrede yer alan glokomlu hastalar için göz içi basıncı %50 oaranında düşürerek tedavi hedeflenmektedir. Farmasötik gelişimler oftalmik damlalar ve oftalmik jeller olarak karşımıza çıkarken cerrahi olarak ise lazer ve intravitreel enjeksiyonlar ile tedaviler yapılmaktadır. Günümüzde kullanılan bu tedavi yöntemleriyle gözün aköz hümör üretimini düşürerek ya da aköz hümör çıkışını iyileştirip fazladan üretmesini engelleyerek göz içi basıncı düşürmek amaçlanmaktadır (32).

Yapılan çalışmalarda glokomlu hastaların tedavi süreçlerinin üzerinden yaklaşık beş yıl geçtikten sonra %75'ten fazla hastanın tekrardan ek tedaviye ihtiyaç duyduğu görülmektedir. Glokom tedavisinde kullanılan ilaçların batma ve yanma hissi, kızarıklık, tahriş ve kuru göz sendromuna sebebiyet vermesiyle hasta uyumu açısından dezavantaj oluşturmaktadır (33). Ayrıca çoklu doz kullanımlarına bağlı olarak yarattığı maliyet ve hastada oluşan yan etkiler istenmeyen bir durumu oluşturmaktadır. Bu sebeple geliştirilen yenilikçi ilaç modelleri kullanılarak oluşturulan ilaçlar sürekli kullanımın azaltılarak düşük dozlarda da etkinliğinin sağlanacağı ön görülmektedir (29). Geleneksel olarak kullanılan göz damlası formülasyonları gözyaşı ile temas ettiği andan itibaren ilacın %1'i ile %3'ü arasında çok düşük bir oranla emildiği tespit edilmiştir (34). Glokom tedavisinde önemli bir gelişme kaydedilmiş olup; etkin maddenin çözünürlüğünü artırma, gözün ön segmentinde gözyaşı gibi herhangi bir sınırlayıcı etmene rağmen emilimin yüksek olmasını sağlama, toksisitesi düşük yardımcı maddeler kullanılarak aynı zamanda bozunmaya karşı da dirençli ilaçların geliştirilmesi için gerekli in vivo ve in vitro çalışmalarla beraber yenilikçi farmasötik dozaj formları geliştirilmiştir (35).

2.2.2. Kuru Göz

Birçok insanın muzdarip olduğu ve göz muayenelerinde en sık rastlanan bir durum olan kuru göz sendromu, hastaların hayat kalitesini düşürmektedir (29). Kuru göz sendromu; %50 oranla en çok karşılaşılan bir durum olan gözyaşı tabakasının buharlaşarak kuruması ve %14 oranla en az sıklıkla karşılaşılan bir durum olan bu tabakanın aköz salgılamamasına bağlı iki çeşit olarak görülmektedir. %36'lık grupta ise iki çeşit hastalık bir arada görülmektedir. Antihistaminik ilaçlara bağlı gelişen endikasyonlar, depresyon gibi birçok sistemi etkileyen hastalıklar ve hormonlarda oluşan sorunlar kuru göz sendromuna da sebep olabilmektedir (30). Tedavi yöntemleri olarak yapay gözyaşı, antiinflamatuar ve kortikosteroidler ilaçlar kullanılmaktadır (31) .

2.3. Oküler İlaç Dağıtımı

Günümüzde göz hastalıkları görme fonksiyonunun etkilenmesine bağlı olarak yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen ve Dünya çapında neredeyse 250 milyondan fazla insanın etkilendiği hastalıkları kapsamaktadır (36). Dünya Sağlık Örgütü 2023 yılı verilerine göre 2,2 milyar insanda görme bozukluklarına rastlanmaktadır ve yaklaşık yarısında bu durum

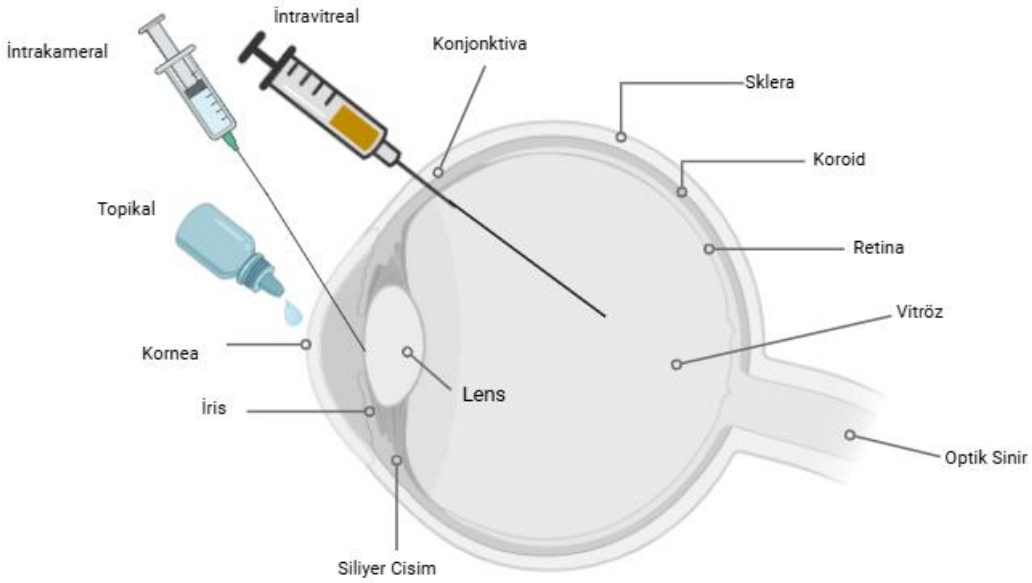
önlenebilmektedir (37). Gerçekleştirilen istatistiksel çalışmalarda ise görme bozukluğu yaşayan milyonlarca insanın 2050 yılına görme kaybı yaşayacağı tahmin edilmektedir (36). İnsan bedeninin en önemli duyusal organı olarak kabul edilen göz, oldukça karmaşık ve iyi izole edilmiş yapısıyla duyusal verilerin %80'ini oluşturur (38). Çok sayıda bariyer ve mekanizma sayesinde gözün sahip olduğu bu izolasyon, ona dışarıdan yabancı madde girişini engelleme özelliği kazandırır (39). Gözün, savunma amaçlı sahip olduğu kırpma refleksi, kan-retina bariyeri, kan-aköz bariyeri ve nazolakrimal drenaj sistemi aynı zamanda göz hastalıklarında kullanılan farmasötiklerin etki alanını kısıtlayarak ilaç hedeflenmesini zorlaştırır. Bununla birlikte birçok oküler ilacın sınırlı veya düşük etkinlik göstermesi göz fizyolojisi ve anatomisi ile doğrudan ilişkilidir (39,40)

Gözün yapısı incelendiğinde ön kısmında, iris damarları ve pigmentsiz siliyer epitel yapıdan oluşan kan-aköz bariyeri, gözün ön kısmına erişimi büyük ölçüde kısıtlar ve göz içi ortamına terapötik girişi bloke eder. Gözün arka kısmında yer alan retina kapiller endotel hücreleri ve retina pigment epitel hücrelerinden oluşan kan-retina bariyeri ise terapötiklerin kan dolaşımı ile arka kısma girmesini engeller (41). Bu fizyolojik engellerdeki darboğazların aşılmasına yardımcı olacak şekilde ilaçların gözün hem ön hem de arka segmentlerine uygulanması gerekir. Göz karmaşık ve hassas yapıda bir organdır. Retina bölgesine gelen ışınlar elektrik sinyallerine dönüştürülerek sinir hücreleri ile beyne iletilmektedir. İnsan, beyne iletilen bu sinyalller vasıtasıyla görme özelliğine sahip olur (42). Göz yapısal olarak yabancı maddelere duyarlı bir organ olduğundan bilim insanları oftalmik ilaç formülasyonları geliştirirken zorlu süreçlerle karşılaşmışlardır ve son yıllarda biyoyararlanımı yüksek tedavi yöntemleri araştırmaktadırlar (43).

Gözün katmanlı, kompleks yapısı ve savuma mekanizması dolayısıyla göze uygulanan klasik oküler dozaj formlarının biyoyararlanımı düşüktür. Piyasada halihazırda bulunan oftalmik farmasötiklerin yaklaşık %90'ı göz damlası şeklinde bulunarak gözün ön segmentinde meydana gelen hastalıkları hedeflemektedir (44). Topikal olarak kullanılan geleneksel göz damlaları ilk olarak gözyaşı ile temas ederek seyrelmektedir. Daha sonrasında göz kırpmasına da bağlı olarak korneada kalma süresi azalmaktadır. Böylelikle ilacın emilim yüzdesi düşüktür (45). Aynı zamanda göze uygulanan oküler dozaj formlarının, gözün ön segmentinde olduğu gibi arka segmentinde de oluşabilecek herhangi bir hastalığı da tedavi edebilmesi gerekmektedir (46). Göz damlaları gibi oftalmik dozaj formlarının gözün arka

segmentine ulaşabilmesi de oldukça zordur. Transelüler veya paraselüler olarak ya da her iki yöntemin birleşimi ile emilimi mümkündür (47).

Olası diğer formülasyonlar ise uygulama sırasında jelleşen sistemleri ve kontakt lensleri içermektedir (44). Dezavantaj olarak ilaçların geleneksel alışkanlıklarla topikal olarak verilmesi, gözün arka segmentine ulaşmasını zorlaştırmakta ve göz damlaları, merhemler gibi formülasyonların, gözyaşı akışı ve nazal drenaj nedeniyle göz bölgesinden hızla silindiği bilinmektedir. İlacın çoğu miktarının drene edilmesi ve sadece küçük bir kısmının etki bölgesine ulaşmasından dolayı daha iyi bir terapötik etki elde etmek için daha sık dozajlama gerektirir (48). Diğer taraftan gözün arka kısmında bulunan retinal kapiller endotel hücreleri ve retina pigment epitel hücrelerinden oluşan kan retina bariyer yapısı, terapötik bileşenlerin kan dolaşımından arka segmente ulaşmasını zorlaştırdığı için ilaç formülasyonu, uygulama yollarının terapötik stratejilere göre yeniden uyarlanarak bazı sınırlamaların üstesinden gelinmesi ve yeterli biyoyararlanımın sağlanması gerekir (41). Terapötik etkinliğe sahip bir ilaç sistemin tasarlanabilmesi için hedeflenen farmasötiğin hedeflenen bölgede optimum konsantrasyonu sağlaması ve yüksek etkinliğe sahip olması gerekir (44). Bu sayede oküler ilaç uygulama sistemlerindeki zorluklar, farklı uygulama yöntemlerinin (Şekil 2.4) geliştirilmesi ve bu alanda kazanılan bilgi birikimlerinin de artmasıyla yıllar içinde aşılarak ticari ölçekli olarak üretilebilen ilaçlar geniş kullanım alanı bulabilmiştir (49).



Şekil 2.4. Oküler ilaç uygulama yöntemleri

Göze uygulanan ilaçların ilk emilim noktası prekorneal bölgedir. Kornea dokusundan emilim için ilacın bu bölgede kalış süresinin uzun olması gerekmektedir. Yapılan formülasyon çalışmalarında; ilacın gözde kalış süresi, korneal bölgeden emilimi, reflekslere rağmen gözde tutunabilmesi ve hastalara kullanım kolaylığı sağlaması gibi faktörler göz önüne alınmıştır (50). Geliştirilen ilaçlar genel olarak göz damlası, emülsiyon, süspansiyon ve oftalmik jel formundadır (48). Piyasada bulunan oftalmik ilaçların yaklaşık %90'ı bu dozaj formlarından oluşturmaktadır ve etki alanı kısıtlı olup genel olarak gözün ön segmentine fayda sağlamaktadır (51).

Gözyaşında bulunan ilaç derişimine bakıldığında hızlı düşüşün olması korneal tabakadan ilaç emiliminin minimum olduğunun göstergesidir. Kornea lipofilik yapıdaki endotel ve epitel hücreleri ile %90'ını kaplayan hidrofilik yapıdaki stromadan oluşmaktadır. Yapısında bulunan epitel tabakanın katmanlarından dolayı bu bölge ilaç emilimi için sınırlayıcıdır. Tasarlanan ilacın fiziksel ve kimyasal özelliğine bakıldığında yağ oranının fazla olduğu ilaçlarda lipofilik tabakalar tarafından ayrışma sağlanırken stroma tarafından da emilimin sınırlandığı görülmektedir. Peptit moleküllerinin emiliminde ise hız sınırlayıcı faktör yüktür. Kornea negatif yüklenmiş moleküllere emilim kolaylığı sağlarken pozitif yüklü moleküllere hız sınırlayıcı olarak direnç göstermektedir (50).

Günümüzde, sağlıklı doku bütünlüğüne zarar vermeden yalnızca hedeflenen göz dokusuna iletilmek istenen oküler ilaç sistemlerinde;

- Oküler bariyerin üstesinden gelmek,
- Tedavi etkinliğini ve ilaç stabilitesini artırmak,
- İlaç alıkonma süresini uzatmak ve dozajlama sıklığını azaltmak,
- Çoklu ilaç kombinasyonlarının kullanımını mümkün hale getirmek,
- İlaca bağlı yan etkileri azaltmak,

ilkeleri benimsenerek farmasötik tasarımlar yapılmakta ve göz ilaçları üretilebilmektedir (38).

Çeşitli fizyolojik ve anatomik bariyerler nedeniyle uygulanan ilaç dozunun oldukça az bir bölümü göz içi dokulara ulaşıyor olsa da topikal dozaj formunun daha yüksek temas süresi ile lipofiliklik ve hidrofobiklik arasında kurulan iyi bir denge sayesinde ilaçtan alınan biyoyararlanım artırılabilir. Gözün ön segmentini kapsayan ilaç iletim sistemlerine örnek olarak oküler insertler, korneal kalkanlar ve kontak lensler, ilacın göze yenilikçi yaklaşımlarıyla göz damlaları ve oftalmik jeller de yaygın kullanıma sahiptir (52).

2.3.1. Göz Damlası

Göz fizyolojisi ve bariyerler nedeniyle her ne kadar biyoyararlanımı düşük ve terapötik etkileri büyük ölçüde sınırlı olsa da göz damlaları birçok hastalık için en yaygın ve en kullanışlı tedavi seçeneğidir (53). Sistemik ilaçlar, önlenemeyen yan etkileri ve sınırlı etki nedeniyle genellikle daha ciddi hastalıklarda kullanılırken, göz damlaları birçok göz hastalığı için tercih edilen bir form haline gelmiştir. Ancak klasik göz damlaları, göz yapısının anatomik bariyerlerinden dolayı düşük biyoyararlanım, ilacın kalış süresinin düşük olması, tedavi etkinliğinin azalması ve azalan hasta uyumu gibi birçok etki nedeniyle bazı dezavantajlara sahiptir. Bunların üstesinden gelebilmek için son yıllarda yenilikçi farmasötik teknoloji ile oküler ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmektedir (54). Oküler yüzeyde tutunma süresi, hedefe yönelik dağıtım ve artan biyoyararlanım sayesinde geliştirilen göz damlaları avantajlı bir hal almıştır (55). Gözün sahip olduğu fizyolojik bariyerlerinin aşılması ve bu sayede ilaç geçirgenliğinin artırılması ise çalışılan başka bir farmakolojik strateji olarak karşımıza çıkmaktadır (56).

2.4. Hidrojeller

İlacın doku veya farmakokinetik dağılımı ilaç dağıtım sistemleri sayesinde gerçekleşmektedir (57). Farklı kimyasal yapıdaki ilaçların üretim maliyetleri arttığı için biyoyararlanımı yüksek, yan etkileri az yeni taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Son yıllarda hastalara uyumlu farklı farmasötik dozaj formlarındaki ilaçlara ilgi artmıştır. Hidrojeller, diğer farmasötik dozaj formlarından farklı olarak üretimi basit ve maliyeti düşük, hastalara uyumlu ve yan etkisi az, biyoyararlanımı yüksek, sürekli ilaç salımı ile yüksek doz maruziyetinin ve uygulama sıklığının azalması gibi önemli ölçüde avantajları bulunmaktadır (58).

Hidrojeller, fiziksel ve kimyasal yapıları sayesinde içerisine su moleküllerini hapsederek şişebilme yeteneğine sahip üç boyutlu polimerlerdir (59). Geleneksel malzemeler ile kıyaslandığında biyouyumluluk, işlevsellik, mekanik yapıları ve biyobozunurlukları göz önüne alındığında uygulanabilirliği yüksek olduğundan ilaç salım sistemleri, biyosensörler ve doku mühendisliği alanlarındaki hidrojel araştırmaları son zamanlarda artmaktadır. Biyomedikal alanındaki yeri 1950 yılında kontak lensler için malzeme araştırılırken keşfedilmiştir (60,61).

Fiziksel dayanıklılıkları düşük olduğundan kırılgan olmayan yapıdaki hidrojellerin geliştirilmesi gerekmektedir. Doğal malzemeler kullanılarak üretilen hidrojellerin yerine

yapılan araştırma geliştirme çalışmaları ile sentetik malzemeler kullanılarak istenilen kimyasal yapıyı oluşturup kötü koşullara dayanıklı hidrojeller üretilmesi amaçlanmaktadır (62,63). Çapraz bağlanma özelliği sayesinde, hidrojellerin kimyasal yapıları istenilen özelliklere göre oluşturularak farklı türlerde hidrojeller üretilebilmektedir (59,64).

2.4.1. Hidrojellerin Genel Yapısı

Hidrojellerde bulunan su, jelin iç kısmına besin içerikli maddeleri dış kısmına ise hücre kaynaklı ürünlerin etkileşerek bütünleşmesinde rol oynar. İçerisinde su bulunmayan hidrojeller, su molekülleri ile etkileşmeye başladığında içeriye giren polar su molekülleri birincil bağlı su oluşturur ve yapısındaki hidrofil grupları sulu bir yapıya dönüşür. Yapısında bulunan hidrofobik gruplar ise bu polar molekül gruplarının su molekülleri ile etkileşimi sonucu ikincil bağlı su oluşur. Oluşan su bağları toplam bağlı su olarak isimlendirilir.

Hidrofobik ve polar kısımlar etkileşmenin devamlılığı ile zincir yapıları seyreldikçe osmotik basınç sebebiyle sürekli olarak su moleküllerini emerek şişmeye başlar. Fiziksel veya kovalent bağlar bu etkileşime karşı bir çekme kuvveti oluştururlar. Hidrofobik ve polar kısımların doygun hale gelmesiyle ortada kalan serbest su, gözenek boşluklarına veya zincir yapılarının aralarındaki boşluklara dolmaktadır (59,63).

2.4.2. Hidrojel Şişme Mekanizmaları

Hidrojeller hidratlı yapılara sahiptir. Bu yapıları sayesinde bulundukları sulu ortamlarda suyu içerisine hapsederek şişme özelliği gösterirler. Doku ve biyomedikal mühendisliğinde en çok tercih edilen farmasötiklerdir (65). Hidrojeller üç boyutlu polimer lifli matrisleri sayesinde oluşabilecek yeni hücre yapılarını bir arada tutma yeteneğine sahiplerdir (66). Genellikle sıcaklığa duyarlı hidrojeller kullanılarak hidrojelin şişme ve jelleşme mekanizmasını değişen sıcaklık parametreleriyle ayarlamak daha ilgi çekici bir hal almıştır. Böylelikle çözelti içerisinde sıvı halde verilen hidrojeller vücut ısısında katılaşarak in situ hidrojel oluşturur (67). Esnek doku hücreleri ile mekanik bir uyum içerisinde olup vücuttaki fizyolojik sıvılarla etkileşime girdiğinde boyut olarak stabil olmaları gerekmektedir. Hidrojellerin yapısındaki fazla miktardaki şişme ya da büzülme eğilimi üç boyutlu matris yapılarını etkileyerek temas halindeki diğer doku ve hücreleri sıkıştırarak deforme olmasına sebep olabilmektedir. Bu yüzden hidrojellerin şişme mekanizmalarının gerekli hesaplamalarla tespit edilip kapasitelerinin belirlenmesi önemlidir (66).

Hidrojelin yığın yapısına bağlı olarak özellikleri de değişmektedir. Hidrojeller sentezlenirken çözeltiler kullanılarak kovalent çapraz bağların oluşması sağlanmaktadır (68). Hidrojeller karakterize edilirken çapraz bağlanarak oluşturdukları polimer zincirlerinin moleküler ağırlıkları bağlanma derecesini, ağ yapılarının su moleküllerini içerisine hapsederek şişmiş haldeki hacmi ise absorbe ettiği sıvı miktarını belirlediği için bu parametreler esas alınmaktadır (69).

2.5. Hyaluronik Asit

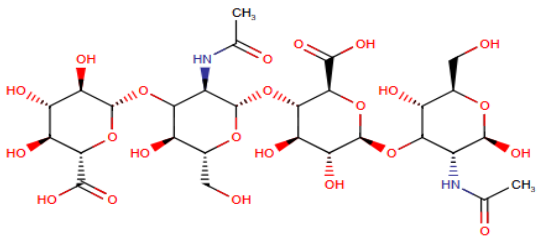
Alman biyokimyacı Karl Meyer ve birlikte çalıştığı asistanı John Palmer ile beraber ineklerin göz yapılarında detaylı incelemeler yaptıklarında, göz şeklinin oluşmasını sağlayan retina zarından gözün arka kısmına kadar olan hacmi kaplayan jel yapısındaki sıvı vitröz bölgeden kimyasal bir madde izole etmişlerdir (70). Bu kimyasalın yapısında şeker ve üronik asit bulunduğunu kanıtlamışlardır. Yunanca *hyalos* kelimesinin karşılığı olan camsı üronik asit yapısındaki kimyasala hyaluronik asit denilmesine karar verilmiştir. 1934'te keşfedilen hyaluronik asitin yapısı ve özelliklerinin 1950'li yıllara kadar tam olarak farkına varılamamıştır (71). Günümüzde biyokimya, tıp ve biyomühendislik alanlarında kullanılan hayvansal yapılardan elde edilen hyaluronik asit, biyouyumluluğu yüksek doğal bir polimerdir (72). Hidroksil ve karboksil gibi hidrofilik grupları çoklu olarak yapısında bulundurur. 1979'lu yılların başında horozların taraklarında ve insan göbek kordonunda bulunan yapılardan saflaştırılarak elde edilen hyaluronik asit böbrek, kas, beyin, deri ve akciğer gibi doku ve organlarda tuz formu hyaluronat olarak fazla miktarda bulunmaktadır (73). Hyaluronik asit sodyum ve potasyum tuzları olmak üzere moleküler ağırlıklarına göre farklı yapılarda bulunmaktadırlar. Hayvan deneyleriyle beraber herhangi bir toksisitesi kanıtlanmamıştır (74).

Glikozaminoglikan sınıfında olan hyaluronik asit doğrusal yapılı polisakkarit olup çoklu moleküler ağırlıklara sahip formları mevcuttur. Yaraların iyileşmesi, eklem rahatsızlıkları, kanser hastalıkları, sıklıkla karşılaşılan göz kuruluğu ve glokom gibi göz hastalıklarında tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Dokuların yenilenmesi ve kolajen üretimi için günümüz estetik uygulamalarda hyaluronik asit kullanımı oldukça yaygındır. Moleküler ağırlık belirlenirken biyouyumluluk, taşıyıcı sistemlerle ilaç dağıtımının optimum olması, etkin madde-polimer birleşimi ve reseptörlerin tanınması durumları göz önüne alınarak uygun şekillerde tasarlanmaktadır (75).

Hyaluronik asitin moleküler ağırlığına göre yarılanma ömrü değişiklik göstermektedir. Moleküler ağırlığının yüksek olduğu formülasyon çalışmalarında yarılanma ömrü daha uzunken moleküler ağırlığı düşük olan formülasyonlarda daha kısa olmaktadır. İntraartiküler enjeksiyon yöntemiyle uygulandığında 17 saat ile 36 saat arasında bir yarılanma ömrüne sahip olduğu görülmektedir. Hayvan deneylerine göre yarılanma ömrünün 27 saat olduğu koyunlarda hyaluronik asit karaciğer ve kandan atılmaktadır (76). Oftalmik damla olarak kullanılan uygulamalarda yarılanma ömrü 5 dakika olarak tespit edilmiştir (77).

Hyaluronik asit ve türevlerinin betaksolol içeren antiglokom ilaçlarında, gentamisin içeren antibiyotiklerde, bağışıklık siteminin güçlenmesinde görev yapan sitokin proteinleri ve trombin gibi enzimlerde etkin maddelerin farmasötik bileşimlerinde optimize edilmesi için kullanıldığı in vivo ve in vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır (78). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylı olarak oral, enjekte edilebilir ve topikal olmak üzere birçok mevcut formda ilaçlar mevcuttur (74). Hyaluronik aside ait fizikokimyasal özellikler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Hyaluronik asidin fizikokimyasal özellikleri (70,76)

Görünüş	Beyaz renkli toz
Moleküler Formülü	$C_{28}H_{44}N_2O_{23}$
Moleküler Ağırlığı	776,6486 g/mol
Kimyasal Yapısı	
Cas Numarası	9004-61-9
logP	-6.62
logS	3-4
pKa	2.87 (asidik) -3.9 (bazik)

Tablo 2.1.(Devam) Hyaluronik asidin fizikokimyasal özellikleri (70,76)

Erime Noktası	241-247 °C
Kaynama Noktası	1274,4± 65,0°C
Suda Çözünürlüğü	5 mg/mL

2.5.1. Hyaluronik Asit Oküler Tedavide Kullanımı

Glokom tedavilerinde hyaluronik asitin kullanımı detaylı olarak incelenmiştir (71). Oluşturulan formülasyonlarda genellikle povidon, selüloz türevleri, polivinil alkol ve hyaluronik asit kombinasyonları kullanılmaktadır (79). Glokoma bağlı olarak oluşan kızarıklık, fotofobi ve batma gibi semptomları gözyaşı filminde oluşan dengesizliği gidererek gözün yüzey tabakasındaki stresi azaltarak iyileşme sağlar. Bu formülasyonların beraber kullanımıyla gözyaşı filminde oluşan değişimlerin önüne geçtiği stabil bir ortam yarattığı görülmüştür (80). Hyaluronik asit kayganlaştırma ve suyu tutabilme kabiliyeti sayesinde ilgili formülasyonların glokom hastalarında uygulandığında oküler yüzeyi kayganlaştırarak viskoz ve elastik özellikler göstererek tedavi ettiği görülmektedir (79,81). Aynı zamanda suni gözyaşı formülasyonlarında da sodyum hyaluronat kullanılmaktadır (71). Tablo 2.2.'de hyaluronik asit etkin madde olarak kullanıldığında genellikle kuru göz sendromu yaşayan hastalarda gözde oluşan yanma, batma, kuruluk ve tahrişleri gidermektedir. Bunun yanı sıra suni gözyaşı olarak kullanılan viskoz yapılı göz preparatları bulunmaktadır.

Tablo 2.2. Hyaluronik asit içeren göz preparatları

Ürün Adı	**Dozaj Formu**	**Etkin Madde**	**Koruyucu Madde**	**Etkin Madde Miktarı**	**Koruyucu Miktarı**	**Yardımcı Maddeler**	**Kullanım Amacı**	**Üretici Firma**
Hylo Gel	Oftalmik Çözelti	Sodyum Hyaluronat	-	2 mg/mL	-	-Susuz Sitrik Asit -Sodyum Sitrat -Sorbitol -Enjeksiyonluk Su	-Göz kuruluğu -Cerrahi müdahale sonrası oluşan kuruluk	Ursapharm (82)

Tablo 2.2. (Devam) Hyaluronik asit içeren göz preparatları

Hyalein	Oftalmik Çözelti	Sodyum Hyaluronat	Klorheksidin Glukonat	3 mg/mL	0,01 mg/mL	-Sodyum Klorür -Propilen Glikol -Sodyum Edetat Hidrat -Aminokaproik Asit -Sodyum Hidroksit/Hidroklorik Asit -Enjeksiyonluk Su	-Göz kuruluğu -Steven Johnson sendromu	Santen (83)
Eyestil	Göz Damlası, Çözelti	Sodyum Hyaluronat	-	1,5 mg/mL	-	-Disdoyum Fosfat Dodekahidrat -Sodyum Fosfat Monobazik-Sodyum Klorür -Enjeksiyonluk Su	-Göz kuruluğu	Sıfi S.PA. (84)
Fermavisc SafeDrop	Göz Damlası, Çözelti	Sodyum Hyaluronat	-	1,0 mg/mL	-	-Sorbitol -Sodyum Klorür -Sodyum Sitrat -Sitrik Asit -Enjeksiyonluk Su	-Göz kuruluğu, yanma hissi	OmniVision GmbH(85)
Fermavisc SafeDrop Gel	Göz Damlası	Sodyum Hyaluronat	-	3,0 mg/mL	-	-Sodyum Klorür -Sodyum Sitrat -Sitrik Asit -Enjeksiyonluk Su	-Kronik göz kuruluğu	OmniVision GmbH(86)
Fermavisc SafeDrop Lipocur	Göz Damlası	Sodyum Hyaluronat	Disodyum Edetat (EDTA)	1,0 mg/mL	-	-Hint Yağı -Gliserol -Tiloksapol -Polisorbat 80 -Ploloksamer 188 -EDTA - α-tokoferil Asetat -Trometamin -Taurin -Sodyum Hidroksit	- Kronik göz kuruluğu, kontak lens nemlendirilmesi	OmniVision GmbH(87)

Tablo 2.2. (Devam) Hyaluronik asit içeren göz preparatları

						/Hidroklorik Asit -Enjeksiyonluk Su		
Hylo-Vision Sine	Göz Damlası	Sodyum Hyaluronat	-	1,0 mg/mL	-	-Sodyum Klorür -Sodyum Monohidrojen Fosfat -Sodyum Dihidrojen Fosfat -Enjeksiyonluk Su	- Göz kuruluğu, tahriş	OmniVision GmbH(88)
Xailin HA	Göz Damlası	Sodyum Hyaluronat	Sodyum Perborat	2,0 mg/mL	-	-Enjeksiyonluk Su	-Orta şiddetli göz kuruluğu	Visu Pharma (89)
hydraSense®	Göz Damlası	Sodyum Hyaluronat	-	1,5 mg/mL	-	-Sodyum Klorür -Sodyum Sitrat Dihidrat -Sitrik Asit -Enjeksiyonluk Su	-Göz Kuruluğu	Bayer (90)
hydraSense® Gel Drops	Göz Damlası	Sodyum Hyaluronat	-	3,0 mg/mL	-	-Sodyum Klorür -Sodyum Sitrat Dihidrat -Sitrik Asit -Enjeksiyonluk Su	-Göz Kuruluğu	Bayer (91)

2.6. Brimonidin Tartarat

Glokom, görme kaybına kadar gidebilen dünya üzerinde birçok insanı etkileyen göz içi basıncın artmasına bağlı olarak oluşan ve göz sinirlerinde tedavi edilemeyen hasarlara yol açan bir göz hastalığıdır (92). 2010 yılı için yapılan araştırmalara göre dünya üzerindeki glokom hastalarının 60,5 milyonu primer açı kapanması ve primer açık açılı glokom hastalığından etkilenerek hayat kalitelerinin düştüğü görülmüştür. Yaklaşık 30 yıl sonrası için glokom hastalarının sayısının 110 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (93). Yapılan klinik araştırmalar glokoma neden olan çeşitli risk etmenlerinin mevcut olmasıyla beraber göz içi basınç değerlerinin azaltılması için birçok tedavi yönteminin de var olduğunu öne

sürmektedir. Erken tespit edilen açık açılı glokom hastalıklarında topikal olarak kullanılan ilaçların %20 oranında göz içi basıncı düşürdüğü gözlemlenmiştir (94).

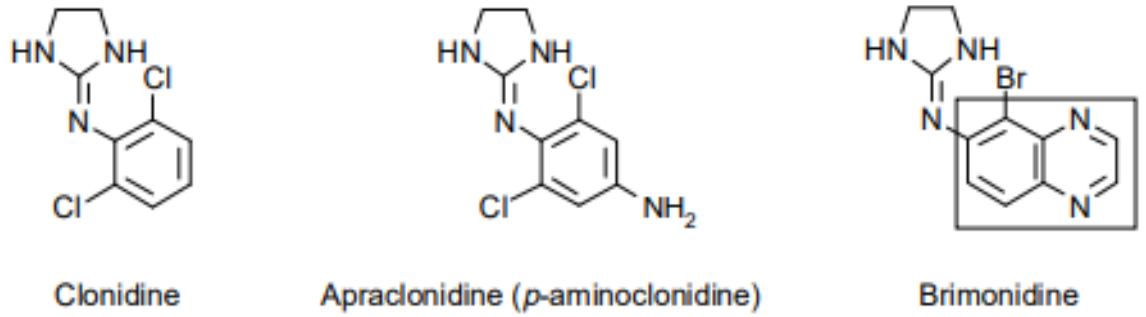
Gözün yapısında bulunan optik sinirlerin hasar görmesi sonucu oluşan glokomatöz optik nöropati hastalığı, geç kalınmış bir tedavi sürecindeyse ciddi görme kayıplarına yol açmaktadır (95). Göz içi basıncın yükselmesi ve düşük oküler kan akışı retinal optik nöropati hastalığını tetiklediği için glokom tedavisinde kullanılan ilaçların glokomatöz optik nöropatiye sahip hastalarda da tedavi yöntemi olarak kullanıldığı görülmektedir (96). Gözün bir bölümü olan lamina kribrosa, ağımsı yapısı sayesinde optik sinirleri koruyarak skleral boşluktan geçerken aynı zamanda retinal ganglion hücrelerini de koruduğu bilinmektedir (97). Glokom hastalarında göz içi basıncın artmasıyla, gözün lamina karibrosa bölgesi hasar alır ve gözenekli yapıya sahip olan lamina karibrosadan geçen retinal ganglion hücrelerininin de bu bölgede sıkışarak ölmesine sebebiyet verir (98). Lamina karibrosa bölgesi glokomlu hastalarda ince bir tabaka halindedir (99).

Brimonidin tartarat göz içinde var olan sıvı kısmın üretimini azaltarak göz içi basıncın düşmesini sağlayan bir alfa-adrenerjik agonist ve 2-imidazolin türevi etkin maddedir (100). 1996 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), tarafından onaylanan oftalmik çözelti, ALPHAGAN® adıyla ortaya çıkarak oküler hipertansiyon ve glokom hastalıklarının tedavisinde göz içi basıncı düşürmek için kullanılmaktadır (101). Göz içi damarlarının daralmasını sağlayarak sulu hümör üretimini azaltır. Böylelikle göz içi basıncın azaltılmasını sağlamaktadır (100). Oftalmik tedavilerde göz damlası olarak kullanımında yarılanma ömrü 3 saat olarak tespit edilmiştir (101).

Adrenerjik reseptörler α ve β olmak üzere seçici olmayan ve α_2 olmak üzere seçici olan adrenerjik agonist ajanlar mevcuttur. Dipivefrin ve epinefrin etkin maddeleri seçici olmayan adrenerjik agonist ajanlar olup brimonidin, apraklonidin ve klonidin seçici olan adrenerjik agonist ajanlardır. Aköz hümör gözün ön segmentinde bulunan sıvı kısımdır ve sürekli olarak üretilerek trabeküler olarak adlandırılan ağsı yapı üzerinden akarak gözden dışarı gider (102). Dipivefrin agonist ajanı gözün ön segmentinde aktif olmamakla beraber korneadaki emilim ve biyoyararlanımı artırarak epinefrine dönüşmektedir. Epinefrin etkin maddesi göz içi sıvının trabeküler üzerinden çıkışını artıran agonist ajandır (103).

Klonidin etkin maddesi topikal uygulanarak glokom tedavisinde kullanılan lipofilik yapıya sahip, seçici olan bir α_2-adrenerjik agonisttir. Kan beyin bariyerini geçtiği için kalp

yetmezliğine sahip hastalarda göz ardı edilemeyecek yan etkiler oluşturabilmektedir (104). Diğer bir α_2-adrenerjik agonist olan apraklonidin etkin maddesi glokom tedavisinde herhangi bir sonuç alınamayan hastalarda kullanılmaktadır (105). Hidrofilik yapıya sahip olan apraklonidinin klonidine göre kan-beyin bariyerini geçmesi zor olduğu için yan etkileri de az olmakla beraber oküler olarak alerjiye neden olması sebebiyle klinik araştırmalarda sınırlı kullanıma sahiptir (106). Daha sonrasında seçiciliği çok yüksek olan brimonidin α_2-adrenerjik agonist ajanı kullanılmaya başlanmıştır. Brimonidin, göz içi sıvı üretimini azaltarak trabeküler üzerinden çıkışı artıran ve böylelikle göz içi basıncın düşmesini sağlayarak glokom tedavisinde kullanılan bir etkin maddedir (107). Brimonidin, glokom tedavisinde 2000 ve üzeri hastada yapılan klinik araştırmalarla Birleşik Krallık ve Brezilya tarafından ALPHAGAN® adıyla 1997'de ruhsat almıştır (102). Seçici adrenerjik agonist ajanların kimyasal yapıları Şekil 2.5.'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Seçici olan adrenerjik agonist ajanların kimyasal yapıları (102)

Brimonidin Tartarat etkin maddesine ait fizikokimyasal özellikler Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Brimonidin tartaratın fizikokimyasal özellikleri (100,101,108)

Görünüş	Beyaza yakın hafif sarı toz
Moleküler Formülü	$C_{15}H_{16}BrN_5O_6$
Moleküler Ağırlığı	442,221g/mol
Cas Numarası	70359-46-5
IUPAC Adı	(2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioic acid; 5-bromo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)quinoxalin-6-amine

Tablo 2.3. (Devam) Brimonidin tartaratın fizikokimyasal özellikleri (100,101,108)

InChI	InChI=1S/C11H10BrN5.C4H6O6/c12-9-7(17-11-15-5-6-16-11)1-2-8-10(9)14-4-3-13-8;5-1(3(7)8)2(6)4(9)10/h1-4H,5-6H2,(H2,15,16,17);1-2,5-6H,(H,7,8)(H,9,10)/t;1-,2-/m.1/s1
Kimyasal Bileşenleri	CID 444305 (L-Tartarik asit) CID 2435 (Brimonidin)
logP	1,27
logS	-3,3
pKa	8,32
Kutupsal Yüzey Alanı	62,2 $Å^2$
Polarize Edilebilirlik	25,79 $Å^3$
Erime Noktası	207,5 °C
Suda Çözünürlüğü	0,154 mg/mL

2.6.1. Brimonidin Tartarat Etki Mekanizması

Glokom tedavilerinde kullanılan adrenerjik reseptörler, g-protein sınıfı ile ilişkili hücre zarında bulunan reseptörlerdir. α-adrenerjik reseptörleri gözün konjonktiva bölgesinde yer alan göz damarlarında, siliyer ve göz içi sıvısının çıkış bölgesinde bulunmaktadır (109). α-adrenerjik yapıya sahip etkin maddeler konjonktivadaki kan damarlarını daraltarak göz içi sıvısını azaltır ve böylelikle göz içi basıncı düşürerek glokomlu bireylerde başarılı tedaviyi amaçlamaktadır (110). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla beraber brimonidin tartaratın etki mekanizması tam olarak bilinmese de, α_2-adrenerjik agonisti olarak α_1-adrenerjik agonistlere göre seçiciliği 1780 kat daha yüksektir (111). Brimonidin tartarat, siliyer cismin epitel yüzeyindeki aköz hümör salgılanmasını azaltmaktadır. Brimonidin tedavisinde topikal olarak uygulamadan sonra ilk 1 saat içerisinde göz içindeki basıncın düşmesi sağlanırken, en iyi biyoyararlanım noktası 2 ile 3 saat arasında ve en zayıf etkileşim ise 10 ile 14 saat sonrasında gözlemlenmiştir. Brimonidin tartarat kullanımına bağlı olarak; gözün iris

bölgesinde bulunan α-adrenerjik reseptörleri aktive edilmesi sonucunda göz bebeklerinde boyut değişikliği gözlemlenmektedir (112).

2.6.2. Brimonidin Tartarat Oküler Tedavide Kullanımı

Günümüzde oküler tedaviler için kullanılan göz damlaları ve süspansiyonlarda brimonidin tartarat etkin maddesine orijinal ürünlerde ya da bu ürünler referans alınarak üretilen jenerik ilaçlarda sıkça rastlanmaktadır. Tablo 2.4. ve Tablo 2.5.'te brimonidin tartarat etkin maddesi kullanılarak göz içi basıncı düşürmek amaçlanıp glokom hastalarında kullanılan ilaçlar hakkında bilgiler verilmiştir.

Tablo 2.4. Brimonidin tartarat içeren göz preparatları (113)

Ürün Adı	Dozaj Formu	Etkin Madde	Koruyucu Madde	Etkin Madde Miktarı	Koruyucu Miktarı	Yardımcı Maddeler	Kullanım Amacı	Üretici Firma
ALPHAGAN® P %0,15 (Brimonidin Tartarat Oftalmik Çözelti)	Oftalmik Çözelti	Brimonidin Tartarat	Purite	1,5 mg/mL	0,05 mg/mL	-Borik Asit -Kalsiyum Klorür -Magnezyum Klorür -Potasyum Klorür -Sodyum Klorür -Sodyum Borat -Sodyum Karboksimetilselüloz -Hidroklorik Asit / Sodyum Hidroksit -Enjeksiyonluk Su	Göz içi basıncı düşürmek	ALLERGAN
ALPHAGAN® %0,5 (Brimonidin Tartarat Oftalmik Çözelti)	Oftalmik Çözelti	Brimonidin Tartarat	Benzalkonyum Klorür	5 mg/ml	0,05 mg/mL	-Sitrik Asit -Polivinil Alkol -Sodyum Klorür -Sodyum Sitrat -Hidroklorik Asit / Sodyum Hidroksit -Enjeksiyonluk Su	Göz içi basıncı düşürmek	ALLERGAN
Combigan Oftalmik Çözelti	Oftalmik Çözelti	Brimonidin Tartarat Timolol	Benzalkonyum Klorür	2 mg/mL 5 mg/mL	0,05 mg/mL	-Dibazik Sodyum Fosfat -Hidroklorik Asit / Sodyum Hidroksit -Enjeksiyonluk Su	Göz içi basıncı düşürmek	ALLERGAN

Tablo 2.4. (Devam) Brimonidin tartarat içeren göz preparatları (113)

SIMBRINZA Göz Damlası, Süspansiyon	Süspansiyon	Brimonidin Tartarat Brinzolamid	Benzalkonyum Klorür	2 mg/mL 10 mg/mL	0,03 mg/mL	-Propilen Glikol -Karbomer 974 P -Borik Asit -Mannitol -Tiloksapol -Sodyum Klorür -Hidroklorik Asit / Sodyum Hidroksit -Enjeksiyonluk Su	Göz içi basıncı düşürmek	NOVARTIS

Tablo 2.5. Brimonidin tartarat içeren göz preparatlarının pH ve osmolalite değerleri (113)

Ürün Adı	**pH**	**Osmolalite**
ALPHAGAN® P %0,15 (Brimonidin Tartarat Oftalmik Çözelti)	6,6-7,4	250-350 mOsmol/kg
ALPHAGAN® %0.5 (Brimonidin Tartarat Oftalmik Çözelti)	5,5-6,6	280-330 mOsmol/kg
Combigan Oftalmik Çözelti	6,5-7,3	260-330 mOsmol/kg
SIMBRINZA Göz Damlası, Süspansiyon	6,5	-

2.7. Krosetin

Latince *Crocus sativus* olarak da bilinen bitki ailesinden gelen safranın %80'i İran olmak üzere Akdeniz ülkeleriyle beraber Hindistan'da da yetiştirilmektedir (114,115) Bitkinin stigma kısmının kurutulmasıyla elde edilen safran; krosetin, krosin, likopen, α-karoten gibi karatenoid yapıları, safranal ve pikrokrosinden oluşan monoterpen aldehit yapıları, flavonoidler ve izoforon yapılarından oluşmaktadır (115,116). Krosetin ve krosin esas alınarak iki temel bileşenden oluştuğu kabul edilmektedir (114). Antioksidan görevi gören

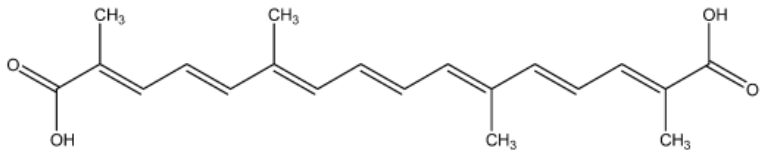
safran, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücreleri korur ve bağışıklık güçlendirici olarak kullanılır. Beyin ve sinir hücrelerinde oluşan hasarları azaltır, çok yönlü biyolojik etkilere sahip bir antiinflamatuar olarak da kullanılmaktadır (116). Antiproliferatif etki göstererek hücre çoğalmasının önüne geçmek için kanser tedavilerinde yapılan çalışmaları mevcuttur (117). 0,4 µmol krosetin kullanılarak yapılan in vivo çalışmalarda oftalmik intravenöz tedavi yöntemlerindeki kullanımında yarılanma ömrünün yaklaşık olarak 4 saat olduğu tespit edilmiştir. Göz damlası şeklinde herhangi bir uygulama veya araştırma mevcut değildir (118).

Krosetin, krosinin hidroliz olmasıyla ortaya çıkan ve krosin aglikonu da denilen bir biyoaktif metabolit olan karatoneid grubuna ait bir maddedir (119). Uçlarında iki adet karboksilik grup bulunduran simetrik zincir yapısına sahiptir. Dört adet metil grupları, trans ve cis yapıları ile beraber yedi adet konjuge yapılı çift bağ formuna sahiptir (120). Trans yapıları cis yapılarına göre daha kararlı olmakla beraber su ve organik çözücülerde çözünürlüğü çok düşüktür (121). Sıcaklık, pH ve ışığa karşı yapıları hassastır, oksidasyona uğrayabilirler. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda oksijen taşınmasında ve oksijenin yayılma hızının artmasında önemli rol oynadığı görülmüştür. Bu özelliği sayesinde damar sertleşmesi tedavilerinde, akciğerlerde bulunan alveol yapılarına yeterli oksijenin taşınması ve kana karışmasında, kanser, artrit ve fermentasyon tedavilerinde kullanımının faydalı olacağı ön görülmüştür (114). Krosetinin kullanımını yaygınlaştırmak ve kozmetik, ilaç, boya, gıda gibi çeşitli alanlarda yaratacağı başarıları ortaya çıkarmak için çeşitli araştırmalar mevcuttur. Sağlık sektöründe ise; antidepresan, hafıza güçlendirici ajan, antidiyabetik, antiviral ve antikanser özelliklerine sahip bu mucizevi maddenin doğada bulanabilir ve tedavi edici yapısı sayesinde kullanılabilirliğinin artırılması konusunda araştırılmalar yapılmaktadır (119). Tablo 2.6.'da krosetine ait fizikokimyasal özellikler yer almaktadır.

Tablo 2.6. Krosetinin fizikokimyasal özellikleri (2,122,123)

Görünüş	Koyu kırmızı ya da kahverengimsi toz
Moleküler Formülü	$C_{20}H_{24}O_4$
Moleküler Ağırlığı	328,4 g/mol

Tablo 2.6. (Devam) Krosetinin fizikokimyasal özellikleri (2,122,123)

Kimyasal Yapısı (14)	
Cas Numarası	27876-94-4
IUPAC Adı	(2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E)-2,6,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaenedioic acid
InChI	InChI=1S/C20H24O4/c1-15(11-7-13-17(3)19(21)22)9-5-6-10-16(2)12-8-14-18(4)20(23)24/h5-14H,1-4H3,(H,21,22)(H,23,24)/b6-5+,11-7+,12-8+,15-9+,16-10+,17-13+,18-14+
XLogP3-AA	5,4
logP	4,54
logS	-4,8
pKa	4,41
Erime Noktası	285℃
Sudaki Çözünürlüğü	0,00558 mg/mL

2.7.1. Krosetinin Oküler Tedavide Kullanımı

Krosetinin oküler tedavilerde miyop, glokom, yaşa bağlı oluşan retina hücrelerinin dejenerasyonu, diyabet hastalarında oluşan retinopat ve retinada ödem oluşması gibi hastalıklarda kullanımı için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

İn vitro çalışmalarda kullanılan insan retinasının epitel hücrelerinden elde edilen yetişkin insan kaynaklı retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerine uygulanan krosetinin bu hücrelerde oluşan yatay ya da dikey olarak yer değiştirme durumunu durdurduğu, aynı zamanda kontrolsüz hücre çoğalmasının önüne geçtiği görülmüştür. İn vivo çalışma olarak da proliferatif vitreus hastalığına sahip tavşan retinasına intravitreal olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası 7. günde yapılan kontrollerde retinada herhangi bir enflamasyon, ödem, hemoraji ya da atrofi saptanmadığı görülmüştür (124).

Yapılan bir diğer çalışmada yaşlanmayla beraber dejenere olan retina hücrelerinin görme kaybına kadar giden sorununu ele alınmıştır. İn vitro çalışma ortamında 3 µmol krosetin kullanımına bağlı olarak retinada bulunan ganglion hücre hasarının azaltıldığı gözlemlenmiştir. İn vivo yapılan çalışmalara deneklerin kilosuna bağlı olarak kg başına 100 mg oral olarak verilmiş olup incelenen sonuçlarda retinada oluşan dejenerasyon ve işlev bozukluğunun önüne geçilerek azaltıldığı görülmüştür (125). 20 mg/kg dozunda oral yolla uygulanan krosetin farelerde oksidasyonu düşürerek retina hasarının önüne geçtiğini göstermiştir (126). İn vitro çalışmalardan bir diğerinde ise retinada bulunan ışığa duyarlı pigment hücre hattında glukoz seviyeleri artırılarak diyabetik retinopati oluşturulmuş ve krosetin ile tedavisi sağlanmıştır. Hücrelerde biriken parçalanamayan protein seviyelerindeki artışın bu tedavi ile beraber düşürüldüğü görülmüştür (119).

Glokom hastalıklarında retinada bulunan ganglion hücrelerinin seçiciliği zamanla kaybolur. Nöroprotektif ilaçlar kullanılarak sinir hücrelerinde oluşan hasarların önüne geçmek amaçlanmaktadır. İn vitro ortamda glokomlu retina hücrelerinde krosetin kullanılarak ganglion hücrelerindeki hasarı önlediğini ve göz içi basıncın yüksek olmasına bağlı oluşan nöroinflamasyonu da azalttığı gözlemlenmiştir (127).

2.7.2. Oküler Tedavide Kullanılan İlaç Formülasyonlarının Özellikleri

Oftalmik formülasyonlarda bulunan yardımcı maddelerin etkin maddelerle beraber oluşturulan kullanım oranları, ürünün stabilite koşullarında ve raf ömrü boyunca sağladığı görünüş, renk, berraklık, viskozite, partikül boyutu, yoğunluk, pH, sterilite ve osmolalite gibi parametrelerinin belirli spesifikasyon limitleri içerisinde olmalıdır. Bu parametrelerin spesifikasyon limitleri, insan gözünün özellikleri esas alınarak aynı zamanda ürünü raf ömrü boyunca koruyabilecek şekilde oluşturulmaktadır. Formülasyonlarda bulunan yardımcı maddelerin kullanım oranları, FDA yardımcı madde veritabanına dayanarak yapılan çalışmalar ve referans ürünlerin içeriği doğrultusunda belirlenmektedir. Dünyada yer alan referans ürünlerin seçimiyle ilgili formülasyonlar oluşturulup birçok jenerik ürün piyasaya bu şekilde çıkmaktadır (128,129).

Kullanılan yardımcı maddeler özelliklerine göre şu şekilde sıralanmıştır:

Antimikrobiyal koruyucu ajanlar: İyi üretim uygumaları koşullarında üretilen oftalmik ürünlerin raf ömrü boyunca antimikrobiyal olarak etkinliğini devam ettirebilmesi ve özelliğini sürdürebilmesi için ürünü mikroorganizmalara karşı koruyarak koruyucu olarak kullanılan

yardımcı maddelerdir (130,131). Farmakopeler doğrultusunda tanımlanan antimikrobiyal etkinlik testleri (AET) koruyucusu olan göz ürünlerinde mutlaka yapılmaktadır. Kullanılan bu yardımcı maddelerin raf ömrü boyunca stabilitesi takip edilirken belirli periyotlarda ve farklı stabilite koşullarında üründe bulunan antimikrobiyal koruyucu ajanın miktar tayini analizleri yapılmaktadır. Elde edilen sonuçlarda yaşanan düşüşler raf ömrü boyunca belirleyici, spesifikasyon limitleri içerisinde olmalı ve AET ile de desteklenmelidir (128). Benzalkonyum klorür ve setalkonyum klorür maddeleri en çok kullanılan antimikrobiyal ajanlardır (9,10).

Antimikrobiyal koruyucu ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve göz ürünlerindeki kullanım yüzdeleri Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Tablo 2.7. Antimikrobiyal koruyucu ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım yüzdesi (129,132)

Yardımcı Madde	**Fonksiyonu**	**Kullanım Yüzdesi (132)**	**Kullanım Yüzdesi (129)**
Benzalkonyum Klorür	Antimikrobiyal Koruyucu Ajan	%0,02	%2
Setalkonyum Klorür	Antimikrobiyal Koruyucu Ajan	%0,1	-

Tonisite ve osmolalite ajanları: Osmolalite kg başına denk gelen çözünen madde konsantrasyonunu ifade eder. Tonisite ise çözünen bu maddelerin geçirgenlik durumuna bağlı olarak oluşmaktadır. Yarı geçirgen membran yapısından geçen maddeler tonisiteyi etkilemezken farklı çözünme yapılarına sahip maddeler ortamın konsntrasyonunu dengelemek için osmotik bir basınç uygularlar. Elektrolit olarak çözünen maddelerin ayrışma dereceleri ve konsantrasyonları önemlidir. %0,9 sodyum klorür çözletisinin tonikliğine eşit olan göz damlaları izotonik olarak kabul edilmektedir. Göz yapısal olarak %0,5-1,8 sodyum klorür çözeltilerinin sahip olduğu tonisite değerlerine karşı gelen çözeltilerin kullanılması için uygundur (133,134).

Gözyaşı 295-310 mOsm/L osmotik konsantrasyona sahiptir. Belirli göz hastalıklarına sahip olan insanlarda ya da yaşa bağlı olarak gelişen keratokonjunktivitis belirtilerinde osmolalite değerlerinin 315 mOsm/L değerinden büyük olduğu görülmektedir (135).

Osmolalite ve tonisite ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve göz damlalarındaki kullanım yüzdeleri Tablo 2.8.'de verilmiştir.

Tablo 2.8. Tonisite ve osmolalite ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım yüzdesi (129)

Yardımcı Madde	**Kullanım Amacı**	**Kullanım Yüzdesi**
Sodyum Klorür	Tonisite Ajanı	%5
Gliserol	Tonisite Ajanı	%6
Mannitol	Osmolalite Ajanı	%4,7

pH ajanları: İlaçların hedeflenen organ ya da dokuya bağlı olarak aynı zamanda stabilitede de bozulmasını engellemek için belirli pH değer aralıklarında olması gerekmektedir. Göz için istenilen pH değerlerinin 4-8 aralığında olması ilacın emilimi ve gözde tahribat yaratmamak için ideal değerlerdir. Korneanın ön katmanında ince bir lipit tabakası bulunmaktadır. İyonize olan ilaçların bu lipit tabakadan geçişi zor olduğu için pH değerleri ve izoelektrik noktaları esas alındığında oluşan formülasyon çalışmalarında ilaç emiliminin artırılması hedeflenmektedir. Ön kornea filmi olarak adlandırılan bu yapı 3,2 değerinde bir izoelektirk noktasına sahiptir (136).

pH'sı izoelektrik değeri altındaki ilaçlar ön kornea epitelinden geçerken ortamı asidik hale getirerek tahribata neden olmaktadır. Bu yüzden pH değerleri ve izoelektrik noktaları formülasyon çalışmaları sırasında göz önüne alınması gereken parametrelerdendir. pH ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler zayıf baz yapılarının tuzları olarak karşımıza çıkmaktadır. Gözyaşının pH değeri 7,3 olmakla beraber kullanılan ilaçların raf ömrü boyunca pH değerleri asidik olsa da tamponlama kapasiteleriyle göze temas ettiği anda gözyaşı tarafından 7,3 değerine gelmektedir (137,138). Bu yüzden kullanılan pH ajanlarının tamponlama kapasitesi kullanım konsantrasyonlarına da bağlı olarak gözyaşının bu değeri ayarlaması için direnmeye düşük olmalıdır.

pH ve tamponlama ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve göz damlalarındaki kullanım yüzdeleri Tablo 2.9.'da verilmiştir.

Tablo 2.9. pH ve tamponlama ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım yüzdesi (129)

Yardımcı Madde	**Kullanım Amacı**	**Kullanım Yüzdesi**
Borik Asit	Tamponlama Ajanı	%1
Sitrik Asit	Tamponlama Ajanı	%0,09
Sodyum Sitrat Dihidrat	Tamponlama Ajanı	%0,45
Dibazik Sodyum Fosfat Dodekahidrat	Tamponlama Ajanı	%1,21
Sodyum Fosfat Monobazik	Tamponlama Ajanı	%0,81
Hidroklorik Asit	pH Ajanı	%0,31
Sodyum Hidroksit	pH Ajanı	%0,08

Viskozite ajanları: Prekorneal korteks ve gözyaşı ilaç emilimini zorlaştırarak göz damlaları için bariyer oluşturan yapılardandır. Yeterli doz alımının sağlanabilmesi için damlatma sıklığını artırmak gerekebilmektedir. Bu durum ise fazla miktarda doz alımına bağlı olarak etkin maddenin gözde toksik etki ve tahriş oluşturma sorunlarına neden olmaktadır. İlacın göz üzerinde uzun süreli kalmasını sağlayan maddelerin miktarları artırılarak etkin madde ile temas süresi de artmaktadır. Viskozite değerleri göz damlaları için 15–30 mPa.s arasında uygun bulunmuştur (13,139). Göz damlaları gibi çözelti ilaç ürünlerinde selüloz yapıları ile viskozite sağlanırken emülsiyon, süspansiyon gibi ilaç ürünlerinde ise karbomerler viskozite ajanı olarak kullanılmaktadır.

Viskozite ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve göz damlalarındaki kullanım yüzdeleri Tablo 2.10.'da verilmiştir.

Tablo 2.10. Viskozite ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım yüzdesi (129)

Yardımcı Madde	Kullanım Yüzdesi
Polivinil Alkol	%1,4
Hidroksipropil Metilselüloz	%0,5
Karbomer	%0,45

Yüzey aktif maddeler: İlaç emiliminde yaşanan zorlukların üstesinden gelmek için geliştirilen ve göze uygulanan birçok ilaç preparatlarında etkili ilaç konsantrasyonunu sağlamak için yüzey aktif maddeler kullanılmaktadır. Yüzey aktif maddeler apolar yapılı kuyruk ve polar yapılı baş kısmından oluşmaktadır. Formülasyon çalışmaları belirlenirken yapılan literatür araştırmalarıyla beraber yüzey aktif maddeler hidrofilik lipofilik denge katsayıları dikkat alınarak seçilmelidir. Bu denge değerleri yüksek olan yüzey aktif maddelerinin sudaki çözünürlükleri fazla iken düşük değerlere sahip yüzey aktif maddelerinin yağdaki çözünürlükleri daha yüksektir (140).

Göz için kullanılan emülsiyonların formülasyon çalışmalarında su/yağ emülsiyonları için hidrofilik lipofilik denge katsayıları yüksek yüzey aktif maddeler tercih edilirken yağ/su emülsiyonlarında hidrofilik lipofilik denge katsayıları düşük yüzek aktif maddeler seçilmektedir (141). Yüzey aktif madde olarak kullanılan yardımcı maddeler ve göz damlalarındaki kullanım yüzdeleri Tablo 2.11.'de verilmiştir.

Tablo 2.11. Yüzey aktif madde olarak kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım yüzdesi (129)

Yardımcı Madde	Kullanım Yüzdesi
Poloksamer 407	%0,2
Polisorbat 80	%0,05
Polietilen Glikol	%1
Tiloksapol	%0,3

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kimyasal Malzemeler

Metanol	: J.T.Baker-Türkiye
Brimonidin tartarat	: Farmak-Çekya
Krosetin	: Sigma Aldrich-Türkiye
Sodyum hyaluronat	: Merck-Türkiye
Disodyum fosfat dodekahidrat	: Merck-Türkiye
Sodyum fosfat monobazik	: Merck-Türkiye
Sodyum klorür	: Merck-Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck-Almanya
Hidroklorik asit	: Merck-Almanya
ARPE-19 hücre hattı	:Crl-2302 (ATCC)-Amerika
MTT	: Roth-Almanya
DMSO	: Merck-Türkiye
FBS	: BioShop-Amerika
Tripsin-EDTA	: Sigma Aldrich-Amerika
Difco™ mikrobiyal test agarı	: BD-Fransa
Difco™ D/E nötralize edici çözelti	: BD-Fransa
DMEM/F-12 besiyeri	: Sigma Aldrich-Türkiye

Araç ve Gereçler

Hassas terazi	: Mettler Toledo-Türkiye
Mikro terazi	: Sartorius-Almanya
Ultrasonik banyo	: Bandelin-Almanya
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	: JKI-Çin
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	: IKA-Türkiye,
Mikropipet	: Thermoscientific-Türkiye
Osmometre	: Osmotech-İngiltere
Yoğunluk cihazı	: Mettler Toledo-Türkiye
Viskozimetre	: Brookfield-Amerika
pH metre	: Mettler Toledo-Türkiye

UV spektrofotometre	: Agilent-İsveç
FTIR cihazı	: Shimadzu-Japonya
MS cihazı	: Thermo Fisher Scientific-Amerika
İklim ve test kabini	: DAIHAN WiseCub WGC-Kore
İklim ve test kabini	: İldam-Türkiye
Stabilite kabini	: Onat-Türkiye
Kamera	: Samsung S24-Türkiye
Biyogüvenlik kabini (Class II BSC)	: Thermo Fisher Scientific Inc., Amerika
Mikroplaka okuyucu	: Multiskan-go Thermo Fisher Scientific-Türkiye

3.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Analizleri

Brimonidin tartarat ve krosetin etkin maddelerinin fizikokimyasal analizleri yapılmıştır.

3.1.1. Brimonidin Tartaratın Fizikokimyasal Analizleri

Brimonidin tartarat etkin maddesini standardize etmek ve saflığını kanıtlamak için ultraviyole görünür bölge spektroskopi (UV) analizi, kütle spektrum (MS) analizi, ve fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) analizi yapılmıştır.

- **Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometre Analizi**

Çözeltide bulunan brimonidin tartarat konsantrasyonunu tespit edebilmek ve moleküler yapısından dolayı hangi dalga boyları arasında absorbans vereceğini belirleyebilmek için UV cihazı kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyon yapılmıştır. Brimonidin tartarat çözeltisi ile UV cihazı optimize edilmiştir. Referans çözelti olarak metanol kullanılmış olup cihazın şartlaması yapılmıştır. 50 µg/mL brimonidin tartarat etkin maddesi metanol ortamında çözülür, sonrasında ultraviyole görünür bölge spektrofotometre cihazında taramalı bütün dalga boyları arasında absorbans ölçülür. Yedi farklı konsantrasyon hazırlanıp optimum şartlar sağlanarak absorbans ölçümleri yapılmıştır. Bu işlemler üç tekrar olarak yapılmıştır.

- **Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi**

Brimonidin tartarat etkin maddesine ait spesifik fizikokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) cihazındaki analizine bakıldığında

infrared ışınlar ile etkin maddenin moleküllerinin titreşimiyle absorblanır. Elde edilen veriler moleküller ve bağ gruplarının dalga sayıları hakkında bilgi vermektedir. Analiz üç tekrar yapılmıştır.

- **Kütle Spektrum Analizi**

Brimonidin tartarat etkin maddesine ait moleküler yapıyı ve molekül ağırlığını belirlemek için MS analizi yapılır. LCQ Finnigan Mat markalı MS cihazında analizlenmiştir. Analiz üç tekrar yapılmıştır. Tablo 3.1.'deki parametreler doğrultusunda elektrosprey yöntemi ile belirli iyonlar %25 çarpışma enerjisiyle parçalanmıştır. Etkin maddeye ait bağıl miktar-kütle/yük oranı grafikleri elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Elektrosprey parametreleri

Parametreler	Miktar
Numune	10 µg/mL
Elektrosprey Akış Hızı	5 µL/dk
Kaynak Voltajı	5.60 kV
Gaz Akışı	30
Kılcal Sıcaklık	250 ℃
Kılcal Voltajı	4.0 kV

3.1.2. Krosetinin Fizikokimyasal Analizleri

Krosetin etkin maddesini standardize etmek ve saflığını kanıtlamak için ultraviyole görünür bölge analizi yapılmıştır.

- **Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometre Analizi**

Çözeltide bulunan krosetin konsantrasyonunu tespit edebilmek ve moleküler yapısından dolayı hangi dalga boyları arasında absorbans vereceğini belirleyebilmek için UV cihazı kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyon yapılmıştır. Krosetin çözeltisi ile UV cihazı

optimize edilmiştir. Referans çözelti olarak metanol kullanılmış olup cihazın şartlaması yapılmıştır. 50 µg/mL brimonidin tartarat etkin maddesi metanol ortamında çözülür, sonrasında ultraviyole görünür bölge spektrofotometre cihazında taramalı bütün dalga boyları arasında absorbans ölçülür. Yedi farklı konsantrasyon hazırlanıp optimum şartlar sağlanarak absorbans ölçümleri yapılmıştır. Bu işlemler üç tekrar olarak yapılmıştır.

3.1.3. Krosetin ve Brimonidin Tartaratın Birlikte UV'deki Görünür Bölge Spektrofotometre Analizi

Krosetin ve brimonidin tartarat içeren çözeltideki iki etkin maddenin birbiriyle girişim göstermediğini kanıtlamak ve standardize etmek için ultraviyole görünür bölge spektroskopi analizi yapılmıştır. Referans çözelti olarak metanol kullanılmış olup cihazın şartlaması yapılmıştır. Krosetin ve brimonidine tartarat etkin maddesi metanol ortamında çözündürülüp 1 mg/mL yüksek konsantrasyonlu stok çözelti hazırlanmıştır. 1 mg/mL ve 0,5 mg/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyon hazırlanıp optimum şartlar sağlanarak absorbans ölçümleri yapılmıştır. Bu işlemler üç tekrar olarak yapılmıştır.

3.2. Analitiksel Metot ve Validasyon Çalışmaları

Ürünlerin analiz metotları geliştirilirken Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Uluslararası Harmonizasyon Konfederasyonu (ICH), Amerikan Farmakopesi (USP) ve Avrupa Farmakopesi (EP) kılavuzları eşliğinde validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kılavuzların esas alınan ilgili bölümleri ICH Q2(R2), ICH Q14, USP <1225>, USP <857> ve EP 2.2.25'tir. Yapılan validasyon çalışmalarında UV cihazı kullanılmış olup her bir parametre için üç tekrar yapılarak veriler elde edilmiştir.

Kılavuzlara göre parametreler şu şekildedir:

Doğrusallık: Hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltiler için konsantrasyona karşılık gelen cihazlardan elde edilen sonuçların y=mx+n kalibrasyon eğrisi oluşturularak grafikleştirilmesidir. Elde edilen doğrunun eğimi doğrusallığı ifade eder.

Seçicilik: Etkin madde içeren çözeltiler cihaza yüklenir. Cihazdan elde edilen sonuçların üst üste gelmediği ispatlanır.

Tekrarlanabilirlik: Konsantrasyonu yüksek stok çözeltisi iki ayrı günde tekrar hazırlanır ve cihaza yüklenir. Elde edilen sonuçlar ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanır. %2'den düşük olan varyasyon katsayısı değeri tekrarlanabilirliği ifade etmektedir.

Tekrar elde edilebilirilik: Konsantrasyonu yüksek stok çözeltisi iki ayrı kişi tarafından hazırlanır ve cihaza yüklenir. Elde edilen sonuçlar ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanır. %2'den düşük olan varyasyon katsayısı değeri tekrar elde edilebilirliği ifade etmektedir.

Kesinlik: Kullanılan analitik metodun tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametrelerinin ölçüsüdür. En az üç adet aynı konsantrasyonda oluşturulan analitler cihaza yüklenir. Elde edilen sonuçların ortalaması, standard sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanır. Varyasyon katsayının %2'den küçük olması oluşturulan metodun kesinliğini doğrular.

Doğruluk ve geri kazanım: Doğruluk, yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların gerçek sonuçlara yakınlığını tespit etmek için kullanılır. Metodun doğruluğunu kanıtlamak için de % cinsinden geri kazanıma bakılır.

% Geri Kazanım= (Deneysel Konsantrasyon / Teorik Konsantrasyon) x 100

Tespit limiti ve miktar belirleme limiti: Miktar belirleme limiti (LOQ) analitin tespit edilen en küçük konsantrasyonudur. Tespit limiti (LOD) ise tespit edilen en küçük konsantrasyonun doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini ifade eder. En küçük konsantrasyondaki birkaç kez hazırlanan analitin analiziyle bu değerler belirlenmektedir.

Tespit limiti (LOD) = 3,3xSD/m

Miktar belirleme limiti (LOQ) = 10xSD/m

m: Doğrunun eğimi
SD: Doğrunun y ekseni ile kesiştiği yerin standart sapması

$$\text{Ortalama Standar Sapma} = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} s_i^2}$$

Şekil 3.1. Ortalama standart sapma formülü

Stabilite: Analiz edilecek çözeltilerin uygun stabilite koşullarında bekletilip belirli periyotlarda cihazlarda analizlenip elde edilen sonuçlardaki farklılıkların belirlenmesi için yapılmaktadır.

3.2.1. Brimonidin Tartarat'ın Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Validasyon Çalışmaları

Brimonidin Tartarat	2,5 mg
Metanol	y.m 50 mL

EP monografı esas alınarak; 50 mL'lik balon joje içerisine bir miktar metanol konuldu. 2.5 mg brimonidin tartarat tartılıp balon jojenin içerisine aktarıldı. Ultrasonik su banyosunda brimonidin tartarat çözünene kadar bekletildi. Çözelti hacmine tamamlanarak tekrardan ultrasonik su banyosunda 5 dakika boyunca çözünene kadar karışması sağlandı. Analitik metot validasyonu her bir parametre için üç tekrar yapılarak veriler elde edilmiştir.

Analitik Metot Validasyonu:

- **Seçicilik:** Brimonidin tartarat etkin maddesini belirlemek için 200-800 nm dalga boyu aralığında UV cihazıyla tam tarama yapıldı.
- **Doğrusallık:** Brimonidin tartarata ait bir kalibrasyon doğrusu oluşturmak için 50 µg/mL yüksek konsantrasyonlu stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti kullanılarak çoklu seyreltmeler yapıldı. 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere 7 farklı konsantrasyon elde edildi. Hazırlanan konsantrasyonlarda 200-800 nm dalga boyları arasında taramalı olarak absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiği çizilerek y=mx+n kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Oluşturulan analitik metot ile 7 farklı

konsantrasyona karşı elde edilen absorbans değerlerinin doğru orantılı olarak arttığı görüldü. Yapılan doğrusallık çalışmalarında belirlilik katsayısı R^2'nin 1'e yaklaşmasıyla analitik metodun doğrusallığı kanıtlandı.

- **Doğruluk ve geri kazanım:** Tekrarlanabilirlik testi için 5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL brimonidin tartarat çözeltisi konsantrasyonları üç tekrar hazırlandı. Doğruluk; ortalama olarak elde edilen verilerin gerçek verilerden sapmaya oranıdır. Doğruluk verilerinin validasyonu için % cinsinden geri elde olarak kanıtlandı.

- **Kesinlik:** 5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere farklı üç adet konsantrasyonun absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyona karşılık absorbans değerleri grafiği çizilip elde edilen eşitlikte yerine yazılarak hesaplamalar yapıldı. Validasyonların kesinlik parametresi uygulanan metodun aynı koşullar altında tekrarlanabilirliğini kanıtlamaktadır. Üç gün tekrarlanan metodun tekrarlanabilir olduğu ve kesinliği ayrı ayrı derişimler için değerlendirilip yüzde varyasyon katsayı olarak hesaplanmıştır. Ara kesinlik değeri ise üç gün toplamında elde edilen tüm sonuçların yüzde varyasyon katsayısını vermektedir.

- **Tespit limiti ve miktar belirleme limiti:** LOD ve LOQ değerleri metodun hassasiyetini belirlemek için hesaplanmıştır.

- **Stabilite:** Stok brimonidin tartarat çözeltisinden hazırlanan 40 µg/mL derişime sahip çözelti 40°C ± 2, 25°C ± 2 ve 5°C ± 3 stabilite kabinlerine kaldırılarak belirli periyotlarda absorbans ölçümleri yapıldı. Varyasyon katsayısının %2 değerinden küçük olduğu etkin maddenin stabil kaldığını göstermektedir.

3.2.2. Krosetinin Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Validasyon Çalışmaları

Krosetin	2,5 mg
Metanol	y.m 50 mL

EP monografı esas alınarak; 50 mL'lik balon joje içerisine bir miktar metanol konuldu. 2,5 mg krosetin tartılıp balon jojenin içerisine aktarıldı. Ultrasonik su banyosunda krosetin çözünene kadar bekletildi. Çözelti hacmine tamamlanarak tekrardan ultrasonik su banyosunda

5 dakika boyunca çözünene kadar karışması sağlandı. Analitik metot validasyonu her bir parametre için üç tekrar yapılarak veriler elde edilmiştir.

Analitik Metot Validasyonu:

- **Seçicilik:** Krosetin etkin maddesini belirlemek için 200-800 nm dalga boyu aralığında UV cihazıyla tam tarama yapıldı.

- **Doğrusallık:** Krosetin'e ait bir kalibrasyon doğrusu oluşturmak için 50 µg/mL yüksek konsantrasyonlu stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti kullanılarak çoklu seyreltmeler yapıldı. 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 40 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere 7 farklı konsantrasyon elde edildi. Hazırlanan konsantrasyonlarda 200-800 nm dalga boyları arasında taramalı olarak absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiği çizilerek y=mx+n kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Oluşturulan analitik metot ile 7 farklı konsantrasyona karşı elde edilen absorbans değerlerinin doğru orantılı olarak arttığı görüldü. Yapılan doğrusallık çalışmalarında belirlilik katsayısı R^2'nin 1'e yaklaşmasıyla analitik metodun doğrusallığı kanıtlandı.

- **Doğruluk ve geri kazanım:** Tekrarlanabilirlik testi için 5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL krosetin çözeltisi konsantrasyonları üç tekrar hazırlandı. Doğruluk; ortalama olarak elde edilen verilerin gerçek verilerden sapmaya oranıdır. Doğruluk verilerinin validasyonu için % cinsinden geri elde olarak kanıtlandı.

- **Kesinlik:** 5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere farklı üç adet konsantrasyonun absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyona karşılık absorbans değerleri grafiği çizilip elde edilen eşitlikte yerine yazılarak hesaplamalar yapıldı. Validasyonların kesinlik parametresi uygulanan metodun aynı koşullar altında tekrarlanabilirliğini kanıtlamaktadır. Üç gün tekrarlanan metodun tekrarlanabilir olduğu ve kesinliği ayrı ayrı derişimler için değerlendirilip yüzde varyasyon katsayı olarak hesaplanmıştır. Ara kesinlik değeri ise üç gün toplamında elde edilen tüm sonuçların yüzde varyasyon katsayısını vermektedir.

- **Tespit limiti ve miktar belirleme limiti:** LOD ve LOQ değerleri metodun hassasiyetini belirlemek için hesaplanmıştır.

- **Stabilite:** Stok krosetin çözeltisinden hazırlanan 40 µg/mL derişime sahip çözelti 40 °C ± 2, 25 °C ± 2, 5°C ± 3 ve -20°C ± 5°C stabilite kabinlerine kaldırılarak belirli periyotlarda absorbans ölçümleri yapıldı. Varyasyon katsayısının %2 değerinden küçük olduğu etkin maddenin stabil kaldığını göstermektedir.

3.2.3. Krosetin ve Brimonidin Tartaratın Birlikte Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Validasyon Çalışmaları

Krosetin	2,5 mg
Brimonidin Tartarat	2,5 mg
Metanol	y.m 50 mL

EP monografı esas alınarak; 50 mL'lik balon joje içerisine bir miktar metanol konuldu. 2,5 mg krosetin tartılıp balon jojenin içerisine aktarıldı. Ultrasonik su banyosunda krosetin çözünene kadar bekletildi. Çözelti hacmine tamamlanarak tekrardan ultrasonik su banyosunda 5 dakika boyunca çözünene kadar karışması sağlandı. Üç tekrar yapılarak UV cihazında absorbans ölçüldü.

3.3. Çözünürlük Çalışmaları

Brimonidin tartarat ve krosetin etkin maddelerinin distile su ve metanol çözücü ortamlarında çözünürlük çalışmaları yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak çözünürlük konsantrasyonları UV cihazında absorbans ölçülerek hesaplanmıştır. Brimonidin tartarat ve krosetin etkin maddelerine ait hazırlanan çözünürlük formülasyon çalışmalarının özeti Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çözünürlük çalışmaları özet tablosu

Çalışma Numarası	**Çözücü Ortamı**	**Brimonidin Tartarat**				**Krosetin**			
		1	**2**	**3**	**4**	**1**	**2**	**3**	**4**
Ç1 Çalışması	**Distile Su**	% 7,50	% 8,00	% 8,50	% 9,00	-	-	-	-
Ç2 Çalışması	**Metanol**	% 0,75	% 0,80	% 0,85	% 0,90	-	-	-	-

Tablo 3.2. (Devam) Çözünürlük çalışmaları özet tablosu

Ç3 Çalışması	**Distile Su**	-	-	-	-	%0,0003	%0,0004	%0,0005	%0,0006
Ç4 Çalışması	**Metanol**	-	-	-	-	% 0,05	% 0,07	% 0,10	% 0,15

3.3.1. Brimonidin Tartarata Ait Çözünürlük Çalışmaları

Brimonidin tartaratın çözünürlük çalışmalarında distile su ve metanol kullanılmıştır. Cam behere çözücüler ayrı ayrı alındı ve brimonidin tartarat eklendi. Çözeltiler doygunluğa erişene kadar brimonidin tartarat miktarı artırıldı. Karıştırıcı balık ile 3 saat boyunca karıştırılıp çözünüp çözünmediği görünüşüne bakılarak kontrol edildi. Daha sonra çözeltilerin üç tekrar olmak üzere UV cihazında konsantrasyonları ölçüldü. Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'te 100 mL olarak hazırlanan brimonidin tartarata ait farklı çözücü ortamlarındaki çözünürlük çalışmaları için formülasyonlar verilmiştir.

Tablo 3.3. Brimonidin tartarat- distile su çözünürlük çalışması formülasyonu

		Konsantrasyon %w/v			
Ç1 Çalışması	**Ham Maddeler**	**Ç1-1 Formülasyonu**	**Ç1-2 Formülasyonu**	**Ç1-3 Formülasyonu**	**Ç1-4 Formülasyonu**
	Brimonidin Tartarat	% 7,50	% 8,00	% 8,50	% 9,00
	Distile Su	% 92,50	% 92,00	% 91,50	% 91,00

Tablo 3.4. Brimonidin tartarat- metanol çözünürlük çalışması formülasyonu

		Konsantrasyon %w/v			
Ç2 Çalışması	**Ham Maddeler**	**Ç2-1 Formülasyonu**	**Ç2-2 Formülasyonu**	**Ç2-3 Formülasyonu**	**Ç2-4 Formülasyonu**
	Brimonidin Tartarat	% 0,75	% 0,80	% 0,85	% 0,90
	Metanol	% 99,25	% 99,20	% 99,15	% 99,10

3.3.2. Krosetine Ait Çözünürlük Çalışmaları

Krosetinin çözünürlük çalışmalarında distile su ve metanol kullanılmıştır. Cam behere çözücüler ayrı ayrı alındı ve krosetin eklendi. Çözeltiler doygunluğa erişene kadar krosetin miktarı artırıldı. Karıştırıcı balık ile 3 saat boyunca karıştırılıp çözünüp çözünmediği görünüşüne bakılarak kontrol edildi. Daha sonra çözeltilerin üç tekrar olmak üzere UV cihazında konsantrasyonları ölçüldü. Tablo 3.5. ve Tablo 3.6.'da 100 mL olarak hazırlanan krosetine ait farklı çözücü ortamlarındaki çözünürlük çalışmaları için formülasyonlar verilmiştir.

Tablo 3.5. Krosetin- distile su çözünürlük çalışması formülasyonu

		Konsantrasyon %w/v			
Ç3 Çalışması	**Ham Maddeler**	**Ç3-1 Formülasyonu**	**Ç1-2 Formülasyonu**	**Ç1-3 Formülasyonu**	**Ç1-4 Formülasyonu**
	Krosetin	% 0,0003	% 0,0004	% 0,0005	% 0,0006
	Distile Su	% 99,9997	% 99,9996	% 99,9995	% 99,9994

Tablo 3.6. Krosetin- metanol çözünürlük çalışması formülasyonu

		Konsantrasyon %w/v			
Ç4 Çalışması	**Ham Maddeler**	**Ç4-1 Formülasyonu**	**Ç4-2 Formülasyonu**	**Ç4-3 Formülasyonu**	**Ç4-4 Formülasyonu**
	Krosetin	% 0,05	% 0,07	% 0,10	% 0,15
	Metanol	% 99,95	% 99,93	% 99,90	% 99,85

3.4. Göz Damlası Formülasyon Çalışmaları

3.4.1. Ön Formülasyon Çalışması

Brimonidin tartaratın kullanım oranlarına bakıldığında %0,15 oranında düşük miktarda glokom tedavisinde kullanıldığı görülmüştür. Krosetinin glokom tedavisinde göz damlası formunda kullanımı bulunmamakla beraber oral dozaj formunda glokom tedavisi için yapılan çalışmalarında 100 - 200 µg/M konsantrasyonun hücre canlılığını sağladığı fakat 200 µg/M konsantrasyonun üzerinde çalışıldığında hücre inhibasyonuna sebebiyet verdiği araştırılmıştır.

Bu yüzden krosetin miktarının 150 µg/M değerinde çalışılmasına karar verilmiştir. Disodyum fosfat dodekahidrat ve sodyum fosfat monobazik tamponlama, sodyum hidroksit pH ve sodyum klorür osmolalite ajanı olarak göz damlalarındaki kullanım miktarlarına göre karar verilip formülasyon çalışması oluşturulmuştur. Jelleştirici ajan olarak ise pH'a duyarlı hidrojel sınıfında doğal yapılı olarak var olan hyaluronik asit tercih edilmiştir. Hyaluronik asit miktarı %0,15 olarak belirlenmiş ve formülasyona eklenirken yaklaşık 1 saat boyunca 55°C'de karıştırılarak çözünmektedir. Tablo 3.7.'de yapılan formülasyon çalışmalarının özeti verilmiştir. Oluşturulan plasebo ve formülasyonlar düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) şişelere dolum hacmi 5 mL olacak şekilde doldurulmuştur.

Tablo 3.7. Formülasyon çalışmaları özeti

Çalışma Numarası	**Çalışmanın İçeriği**
F-1	Ürün Formülasyonu
F-2	Brimonidin ve krosetin içermeyen plasebo
F-3	Krosetin içeren formülasyon
F-4	Brimonidin tartarat içeren formülasyon

3.4.2. Formülasyon Çalışması

Ham maddelerin günlük alım dozu, piyasada bulunan göz damlalarında kullanılan ham madde miktarları ve fonksiyonları (Tablo 3.8.) göz önüne alınarak yapılan ön formülasyon çalışmalarının ardından elde edilen bulgularla formülasyon çalışmasının hazırlanış yöntemine, ham maddelere ve kullanılacak olan miktarlarına göre birim formül oluşturulmuştur. Tablo 3.9.-Tablo 3.12.'de yapılan formülasyon ve plasebo çalışmalarının birim formülü, LDPE içeriği ve seri formülü verilmiştir. Şekil 3.9'da ise ürün formülasyonunun üretim yöntemine ait görseller adım adım yer almaktadır.

Tablo 3.8. Formülasyonda kullanılan ham maddeler ve fonksiyonları

Ham Maddeler	**Kullanım Amacı**
Brimonidin Tartarat	Etkin Madde
Krosetin	Etkin Madde / Antimikrobiyal Ajan
Sodyum Hyaluronat	Jelleştirici Ajan
Disodyum Fosfat Dodekahidrat	Tamponlama Ajanı
Sodyum Fosfat Monobazik	Tamponlama Ajanı
Sodyum Klorür	Osmolalite Ajanı
Sodyum Hidroksit	pH Ajanı
Enjeksiyonluk Su	Çözücü
Metanol	Çözücü

F-1: Formülasyonun Hazırlanması

Taşıyıcı formülasyona ait birim formül Tablo 3.9.'da üretim aşaması ise Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.9. Formülasyon birim formül

Ham Maddeler	**Birim Formül**	**LDPE İçeriği**	**Seri Boyutu**
Brimonidin Tartarat	1,50 mg (1 mg brimonidine eş değer)	7,50 mg (5 mg brimonidine eş değer)	150 mg
Krosetin*	0,05 mg	0,25 mg	5 mg
Sodyum Hyaluronat	1,50 mg	7,50 mg	150 mg
Disodyum Fosfat Dodekahidrat	0,56 mg	2,80 mg	56 mg
Sodyum Fosfat Monobazik	0,04 mg	0,20 mg	4 mg

Tablo 3.9. (Devam) Formülasyon birim formül

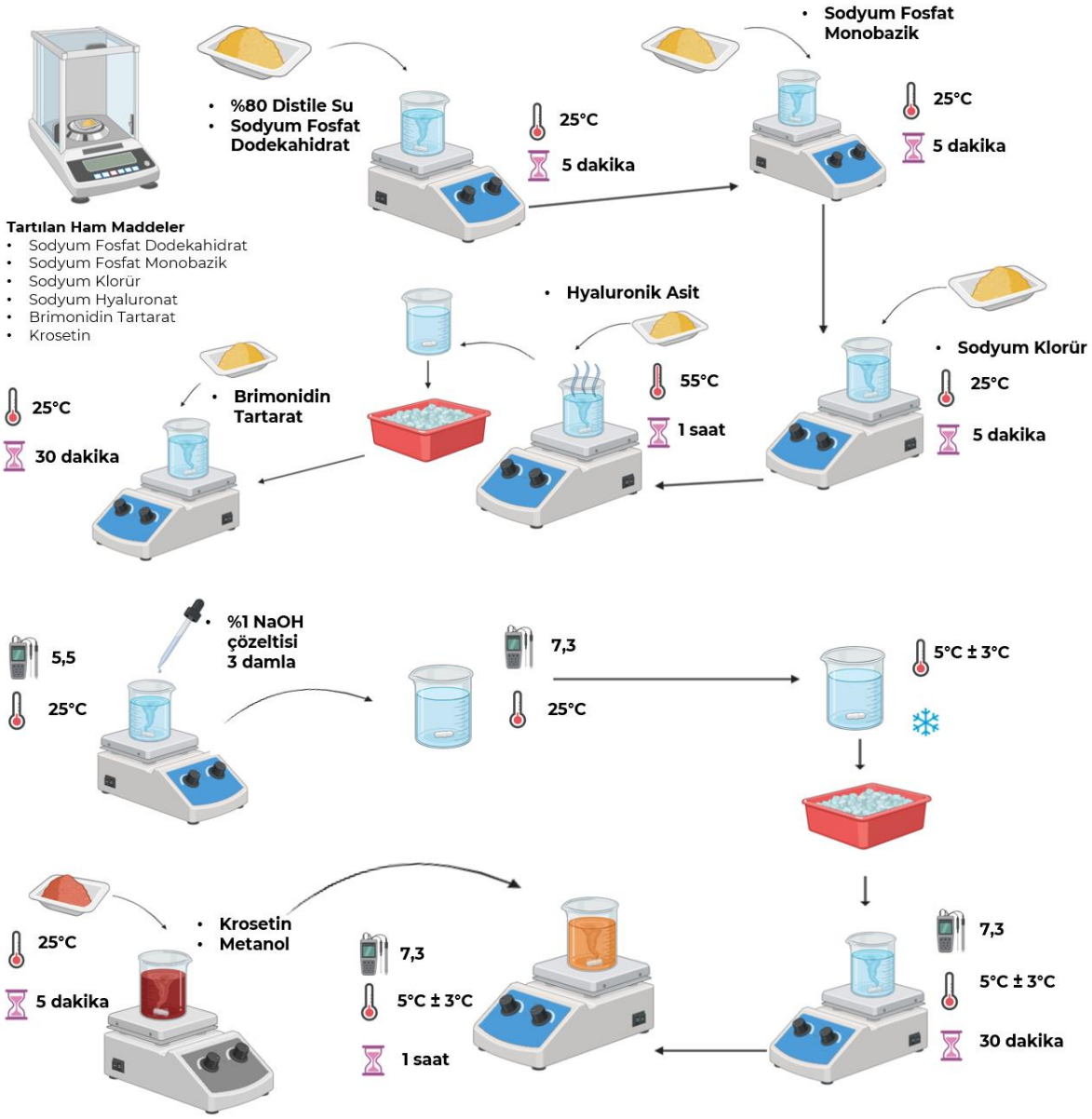
Sodyum Klorür	6,80 mg	34,00 mg	680 mg
Sodyum Hidroksit**	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30
Enjeksiyonluk Su	1,0 mL	5,0 mL	100,0 mL

*%5 metanol içeren krosetin çözeltisi

** %1'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 3 damla kullanılmıştır. Yaklaşık %1'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 0,075 g.

Formülasyonun üretim aşaması:

- %80 distile su alındı.
- Disodyum fosfat dodekahidrat eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum fosfat monobazik eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum klorür eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sıcaklık 55°C 'ye yükseltildi. Sodyum hyaluronat eklendi ve 1 saat karıştırıldı.
- Sıcaklık 25°C'ye getirildi. Brimonidin tartarat eklendi ve 30 dakika karıştırıldı.
- pH kontrol edildi ve hedef pH 7,30 değerine ayarlandı.
- Sıcaklık 5°C ± 3'e getirildi ve krosetin eklendi. 1 saat karıştırıldı.
- Hedef pH 7,30 kontrol edildi.
- Solüsyon enjeksiyonluk su ile hacmine tamamlandı ve son pH kontrol edildi.



Şekil 3.2. Formülasyonun üretim aşamaları

F-2: Brimonidin Tartarat ve Krosetin İçermeyen Plasebonun Hazırlanması

Brimonidin tartarat ve krosetin içermeyen plasebo formülasyonuna ait birim formül Tablo 3.10.'da verilmiştir.

Tablo 3.10. Brimonidin tartarat ve krosetin içermeyen plasebo birim formülü

Ham Maddeler	Birim Formül	LDPE İçeriği	Seri Boyutu
Sodyum Hyaluronat	1,50 mg	7,50 mg	150 mg
Disodyum Fosfat Dodekahidrat	0,56 mg	2,80 mg	56 mg
Sodyum Fosfat Monobazik	0,04 mg	0,20 mg	4 mg
Sodyum Klorür	6,80 mg	34,00 mg	680 mg
Enjeksiyonluk Su	1,0 mL	5,0 mL	100,0 mL

Formülasyonun üretim aşaması:

- %80 distile su alındı.
- Disodyum fosfat dodekahidrat eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum fosfat monobazik eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum klorür eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sıcaklık 55°C'ye yükseltildi. Sodyum hyalüronat eklendi ve 1 saat karıştırıldı.
- Sıcaklık 25°C'ye getirildi. Hedef pH 7,30 kontrol edildi.
- Sıcaklık 5°C ± 3'e getirildi. Hedef pH 7,30 kontrol edildi.
- Solüsyon enjeksiyonluk su ile hacmine tamamlandı ve son pH kontrol edildi.

F-3: Krosetin İçeren Formülasyonun Hazırlanması

Krosetin içeren formülasyona ait birim formül Tablo 3.11.'de verilmiştir.

Tablo 3.11. Krosetin içeren formülasyonun birim formülü

Ham Maddeler	Birim Formül	LDPE İçeriği	Seri Boyutu
Krosetin*	0,05 mg	0,25 mg	5 mg
Sodyum Hyaluronat	1,50 mg	7,50 mg	150 mg
Disodyum Fosfat Dodekahidrat	0,56 mg	2,80 mg	56 mg
Sodyum Fosfat Monobazik	0,04 mg	0,20 mg	4 mg
Sodyum Klorür	6,80 mg	34,00 mg	680 mg

Tablo 3.11. (Devam) Krosetin içeren formülasyonun birim formülü

Enjeksiyonluk Su	1,0 mL	5,0 mL	100,0 mL

*%5 metanol içeren krosetin çözeltisi

Formülasyonun üretim aşaması:

- %80 distile su alındı.
- Disodyum fosfat dodekahidrat eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum fosfat monobazik eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum klorür eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sıcaklık 55°C'ye yükseltildi. Sodyum hyaluronat eklendi ve 1 saat karıştırıldı.
- Sıcaklık 25°C'ye getirildi. Hedef pH 7,30 kontrol edildi.
- Sıcaklık 5°C ± 3'e getirildi ve krosetin eklendi. 1 saat karıştırıldı. Hedef pH 7,30 kontrol edildi.
- Solüsyon enjeksiyonluk su ile hacmine tamamlandı ve son pH kontrol edildi.

F-4: Brimonidin Tartarat İçeren Formülasyonun Hazırlanması

Brimonidin tartarat içeren formülasyona ait birim formül Tablo 3.12.'de verilmiştir.

Tablo 3.12. Brimonidin tartarat içeren formülasyonun birim formülü

Ham Maddeler	**Birim Formül**	**LDPE İçeriği**	**Seri Boyutu**
Brimonidin Tartarat	1,50 mg (1 mg brimonidine eş değer)	7,50 mg (1 mg brimonidine eş değer)	150 mg
Sodyum Hyaluronat	1,50 mg	7,50 mg	150 mg
Disodyum Fosfat Dodekahidrat	0,56 mg	2,80 mg	56 mg
Sodyum Fosfat Monobazik	0,04 mg	0,20 mg	4 mg
Sodyum Klorür	6,80 mg	34,00 mg	680 mg
Sodyum Hidroksit*	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30
Enjeksiyonluk Su	1.0 mL	5.0 mL	100.0 mL

* %1'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 3 damla kullanılmıştır. Yaklaşık %1'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 0,075 g.

Formülasyonun üretim aşaması:

- %80 distile su alındı.
- Disodyum fosfat dodekahidrat eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum fosfat monobazik eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum klorür eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sıcaklık 55°C'ye yükseltildi. Sodyum hyaluronat eklendi ve 1 saat karıştırıldı.
- Sıcaklık 25°C'ye getirildi. Brimonidin tartarat eklendi ve 30 dakika karıştırıldı.
- pH kontrol edildi ve hedef pH 7,30 değerine ayarlandı.
- Sıcaklık 5°C ± 3'e getirildi. Hedef pH 7,30 kontrol edildi.
- Solüsyon enjeksiyonluk su ile hacmine tamamlandı ve son pH kontrol edildi.

3.5. Formülasyonun Fizikokimyasal Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonun pH, viskozite, damlacık boyutu, yoğunluk ve osmolalite analizleri yapılmış olup stabilite süresi boyunca da üç tekrar olarak analizlenmiştir.

3.5.1. pH Analizi

Formülasyonun oda sıcaklığında pH ölçümleri yapılarak 7,3 değerine ayarlanmıştır.

3.5.2. Viskozite Analizi

Hazırlanan formülasyonun oda sıcaklığında spindle 02 kullanılarak 50 rpm de viskoziteleri ölçülmüştür.

3.5.3. Damlacık Boyutu Analizi

Formülasyon 5 mL LDPE şişenin 30 µm çapına sahip yüksek yoğunluklu polietilen damlalığından 10 defa damlatılır. Her bir damlanın ağırlığının tartımı alınır. Elde edilen damla ağırlıklarının ortalaması ve standart sapması hesaplanarak damlacık boyutu analizi gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Yoğunluk Analizi

Hazırlanan formülasyonun oda sıcaklığındaki yoğunluğu, yoğunluk analiz cihazında ölçülmüştür.

3.5.5. Osmolalite Analizi

Hazırlanan formülasyonun oda sıcaklığında osmolalite değerleri osmometrede ölçülmüştür.

3.5.6. Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan formülasyon çalışmalarının hızlandırılmış olarak 3 ay boyunca, 5°C ± 3 ve 25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN stabilite koşullarında başlangıç, 1. ay, 2. ay ve 3. ay zaman dilimlerinde stabilite çalışmaları yapılmıştır.

3.6. Antimikrobiyal Etkinlik Analizi

Antimikrobiyal ajan olarak kullanılan aynı zamanda etkin madde görevinde kullanılan krosetinin %50, %60, %70, %80, %90 ve %100 oranlarda oluşturulan formülasyonlarının, (Tablo 3.13.) ürünü mikrobiyolojik açıdan koruduğunu kanıtlamak için 100 mL olmak üzere formülasyonlar hazırlanmıştır. AET için gerekli olan ortam oluşturulmuş ve formülasyonlar ayrı ayrı analize alınmıştır.

Tablo 3.13. Antimikrobiyal etkinlik testi formülasyonları

	A-1	**A-2**	**A-3**	**A-4**	**A-5**	**A-6**
Ham Maddeler	**%50 Oranında Krosetin İçeren**	**%60 Oranında Krosetin İçeren**	**%70 Oranında Krosetin İçeren**	**%80 Oranında Krosetin İçeren**	**%90 Oranında Krosetin İçeren**	**%100 Oranında Krosetin İçeren**
Brimonidin Tartarat	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg
Krosetin*	0,025 mg	0,03	0,035	0,04	0,045	0,05 mg

Tablo 3.13. (Devam) Antimikrobiyal etkinlik testi formülasyonları

Sodyum Hyaluronat	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg	1,50 mg
Disodyum Fosfat	0,56 mg	0,56 mg	0,56 mg	0,56 mg	0,56 mg	0,56 mg
Sodyum Fosfat Monobazik	0,04 mg	0,04 mg	0,04 mg	0,04 mg	0,04 mg	0,04 mg
Sodyum Klorür	6,80 mg	6,80 mg	6,80 mg	6,80 mg	6,80 mg	6,80 mg
Sodyum Hidroksit**	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30	y.m pH 7,30
Enjeksiyonluk Su	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

*%5 metanol içeren krosetin çözeltisi

**%1'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 3 damla kullanılmıştır. Yaklaşık %1'lik sodyum hidroksit çözeltisinden 0,075 g.

Formülasyonların hazırlanması:

- %80 distile su alındı.
- Disodyum fosfat dodekahidrat eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum fosfat monobazik eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sodyum klorür eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- Sıcaklık 55°C'ye yükseltildi. Sodyum hyaluronat eklendi ve 1 saat karıştırıldı.
- Sıcaklık 25°C'ye getirildi. Brimonidin tartarat eklendi ve 30 dakika karıştırıldı.
- pH kontrol edildi ve hedef pH 7,30 değerine ayarlandı.
- Sıcaklık 2-8°C'ye getirildi ve farklı miktarlardaki krosetinler eklendi. 1 saat karıştırıldı.
- Hedef pH 7,30 her bir formülasyon için kontrol edildi.
- Solüsyon enjeksiyonluk su ile hacmine tamamlandı ve son pH kontrol edildi.

Kültür ortamının hazırlanması için, EP esas alınarak *Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* ve *Aspergillus niger* ortamlarında antimikrobiyal etkinlik testi gerçekleştirilir. Nötralize sıvı besiyeri kullanılarak kültür ortamı oluşturulmuştur.

Besiyeri ortamının hazırlanması:

- **Bakteri süspansiyonu:** Eğimli agar besiyerinden bir miktar alınarak sıvı halde besiyeri bulunan kaplara eklenir. 30℃'de 24 saat boyunca inkübe edilir. Bu işlem toplam 4 kez tekrarlanarak 4. kademe alt kültür ortamı oluşturulmuştur.

- **Maya ve küf süspansiyonu:** Mantarlar ve mayalar için fungal mikroorganizmaların yaşamasını sağlayan sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyeri üzerine eğimli agar besiyeri eklenmiştir. Küf mantar türü olan *Aspergillus niger* 25℃'de 7 gün, fungus mantar türü olan *Candida albicans* için 25℃ 2 gün boyunca inkübasyon yapılmıştır. Oluşturulan kültürlerin miselleri çıkartılıp sporları santrifüj edilerek ayrılmıştır.

Oluşturulan kültür ortamından test tüpüne 9 mL alınmıştır. Üzerine 1 mL mikroorganizma süspansiyonu eklenmiştir. Daha sonra bu tüp içerisinden 1 mL alınıp başka bir tüpe aktarılarak seyreltme işlemi yapılmıştır. Bu işlem 8 defa tekrarlanmıştır. Her bir tüpten 0,1 mL alınarak petri kaplarında bulunan SDA besiyeri üzerine eklenmiştir. 25℃'de 1. gün, 2. gün ve 7. gün olmak üzere inkübasyon yapılmış ve oluşturulan hücrelerin kültür ortamı başına düşen miktarı referans olarak CFU/mL cinsinden hesaplanır.

Nötralizasyon Testi

EP' ye göre toksik olmayan nötralize edici maddeler kullanılarak antimikrobiyal etkinliği test etmek amacıyla inkübasyon yapılmıştır. Böylelikle mikroorganizmaların ilaçlı ve ilaçsız ortamda yaşayıp yaşamadığı test edilmiştir. Nötralizasyon çözeltisinden 8mL içeren petri kabına 1 mL ilaç eklenmiştir. Üzerine seyreltilmiş mikroorganizma ortamından 25℃ oda koşullarında 10 dakika inkübasyon yapılır. Petri kaplarına 0,1 mL sabouraud dekstroz agar besiyeri eklenir. *Aspergillus niger* 25℃'de 7 gün, *Candida albicans* için 25℃ 3 gün boyunca inkübasyon yapılır. Referans olarak mikroorganizma sayısı CFU/mL birimi olarak hesaplanır.

3.7. Yetişkin İnsan Kaynaklı Retinal Pigment Epiteli (ARPE-19) Hücreleriyle Brimonidin Tartarat ve Krosetin Etkin Maddelerinin Sitotoksisite Testi

İnsan gözüne benzer retina hücre hattı (ARPE-19) Trakya Üniversitesi Eczacilik Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı' ndan temin edilmiştir.

ARPE-19 Hücreleri için Kültüre Alma ve Pasajlanma İşlemleri

ARPE-19 hücre çalışmalarında sınıf II biyogüvenlik kabini, laminar bir kabinin içerisinde kültüre alınma ve pasajlanma için gerekli işlemler yapılmıştır. Analizler üç tekrar halinde çalışılmıştır.

Hücre	:	ARPE-19 İnsan Retina Epitel Hücresi
Pasaj Sayısı	:	14
Kuyucuk Başına Hücre Sayısı	:	5000 hücre

2 mM L-glutamin ve %5 fetal sığır serumu (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient: HAMS F-12 besiyeri plate adı verilen kaplara ekilerek 37°C %95 BN koşulunda %5 karbondioksit gazı içeren etüv ortamında bekletilmiştir. Hücreler arasında herhangi bir yapışma durumu olmaması adına mikroskop ile sürekli kontrol edilmiş ve kültürün devamlılık koşulu sağlanmıştır. Plakaların taban kısmında biriken ve çoğaldığı gözlemlenen hücreler üç günde bir olmak üzere pasajlanmıştır. Bu aşamada plaklarda bulunan besiyeri dökülerek 37°C tripsin etilen diamin tetra asetik asit eklenip 5 dakika beklenmiştir. Mikroskop altında gözlemlenen platelerde taban kısmından kalktığı gözlemlenen tripsin EDTA-hücre kombinasyonu santrifüj tüplerine aktarılarak 2500 rpm hızda 2,5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde kalan hücreler ile besiyeri karıştırılıp yeni plaklara ekim yapılmıştır.

3.7.1. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) Metodu ile Hücre Hattına Ekim Yapılacak Ürünlerin Konsantrasyon Belirleme Çalışması

Hücre canlılığını ve sitotoksik özelliğini gösteren dehidrogenaz enzimleriyle canlı hücrelerde var olan mitokondrilerin tetrazolyum tuzu metoduyla kantitatif olarak kanıtlayan bir çalışmadır. Canlı hücrelerin yaşamsal faaliyetlerinin tetrazolyum tuzundan formazana dönüşürken oluşan mor renge göre ayırt edilmesini sağlayan bir metottur. Hücre mitokondrilerinde bulunan enzimler sarı renkli olan MTT'yi mor renge dönüştürerek canlılığı

kanıtlar. Plakalar bir okuyucuda 500-600 nm dalga boyunda absorbans ölçülür. Hücrelerin %50'sinin canlılığını koruduğu (IC_{50}) doz belirlenip diğer absorbans değerlerine geçerek de % hücre canlılığı hesaplanır.

Kuyucuk başına 5000 hücre olarak 96 tane kuyucuğa sahip hücre kültürlerin bulunduğu plakalara 150 µL ekim yapılmıştır. 24 saat, inkübasyona bırakılıp hücrelerin plakanın tabanına tutunması beklenmiştir. Daha sonrasında ürünler plakalara belirli µL'lerde ekim yapılarak IC_{50} verileri belirlenmiştir.

2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 ve 35 µL dozlarında 3 tekrar olacak şekilde 24 saat inkübasyona bırakılan hücrelere formülasyon ve plasebolar eklenmiştir. Kuyucuklara ürün eklendikten sonra 37°C %95 BN koşulunda %5 karbondioksit gazı içeren etüv ortamında 72 ve 96 saat periyotlarda bekletilen plakalar, 5 mg/mL konsantrasyona sahip MTT çözeltisinden 25 µL olmak üzere her bir kuyucuğa eklenmiştir. MTT eklenmesinden sonra plakalar 2 ile 4 saat aralığında tekrardan etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 3. saatte plakalarda bulunan çözelti uzaklaştırıldıktan sonra 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisi eklenmiştir. Plakalar, plaka okuyucuya yerleştirilip 500-600 nm dalga boyu arasında absorbans değerleri belirlenmiştir. Son olarak elde edilen absorbans değerlerinden % hücre canlılığı ve IC_{50} parametreleri hesaplanmıştır.

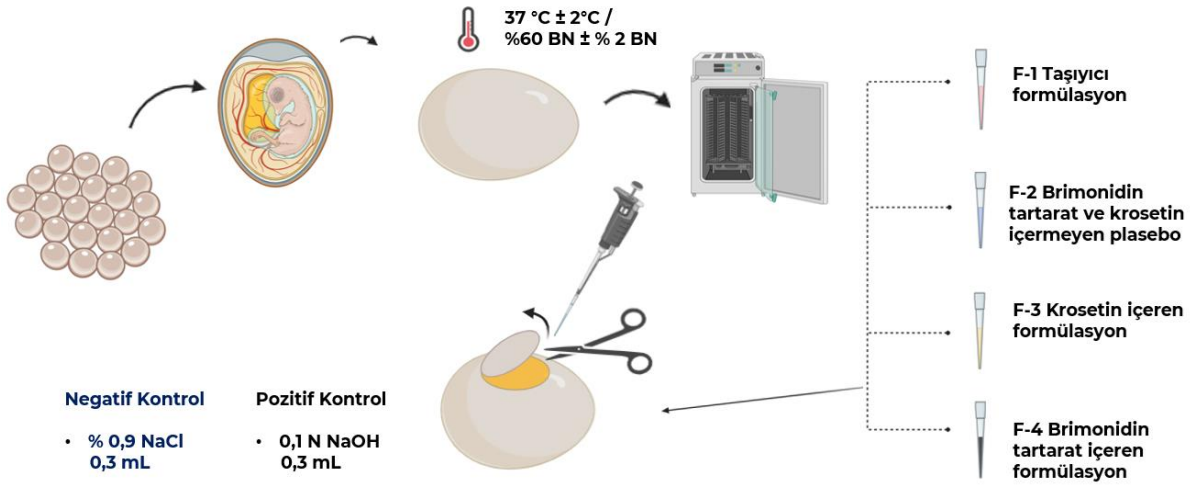
% Hücre Canlılığı= (Örnek Absorbans Değeri)/(Kontrol Absorbans Değeri) x100

3.8. Tavuk Yumurtası Karyoallontoik Membran (HET-CAM) Testi

Karyoallontoik membran üzerinde yapılan Tavuk Yumurtası Testi (HET-CAM), embriyolu tavuk yumurtalarının karyoallontoik membranı (CAM) kullanılarak aşındırıcı veya şiddetli göz tahriş edici maddelerin ve anti-enflamatuar etkilerin hayvan deneyleri için alternatif bir yöntemdir. Yöntemin prensibi, döllenmiş yumurtaların CAM'ındaki test maddesine dayanır ve sonuçlar, işlemden sonraki tahriş türüne (lizis, kanama veya pıhtılaşma) bağlıdır.

50 döllenmiş yumurta, 37°C ve %60 ± 2 nemde 8 gün boyunca inkübe edildi (DAIHAN WiseCub WGC). İnkübasyondan sonra, yumurtalardaki embriyonun varlığını tespit etmek için ışık kontrolü yapıldı ve CAM'ı görünür hale getirmek için kabukta 2 cm çapında bir pencere neşterle açıldı. Negatif kontrol (%0,9 NaCl) ve pozitif kontrol (0,1 N NaOH) 0,3 mL olarak CAM'a uygulandı ve Samsung S24 Ultra telefon kamerası ile fotoğrafları çekildi. HET-CAM testinin uygulama aşamaları Şekil 3.3.'te verilmiştir.

CAM'lar, formülasyonların ve etkilerini belirlemek için 0,5, 2 ve 5 dakikalık sürelerle değerlendirildi. Maddelerin tahriş skorları değerlendirildi. Tablo 3.14. ve Tablo 3.15.'te gösterilmiş olup Şekil 3.4. (ICCVAM 2003) ile hesaplanmıştır. Her numune CAM'a 5 kez uygulandı.



Şekil 3.3. HET-CAM testi uygulama aşamaları

Tablo 3.14. Tahriş skoru

Etki	**Skor**		
	0,5 dakika	**2 dakika**	**5 dakika**
Lizis	5	3	1
Kanama	7	5	3
Pıhtılaşma	9	7	5

Tablo 3.15. Puanlara göre tahriş kategorileri

Skor	**Tahriş Kategorileri**
0-0,9	Tahriş edici değil
1-4,9	Hafif tahriş
5-8,9 / 5-9,9	Orta derecede tahriş
9-21 / 10-21	Şiddetli veya şiddetli tahriş

$$\left(\frac{301-\text{Kanama Zamanı}}{300}\text{x7}\right)+\left(\frac{301-\text{Liziz Zmanı}}{300}\text{x5}\right)+\left(\frac{301-\text{Pıhtılaşma Zamanı}}{300}\text{x9}\right)$$

Şekil 3.4. HET-CAM tahriş skoru hesaplaması

4. BULGULAR

4.1. Brimonidin Tartaratin Fizikokimyasal Analizleri Bulguları

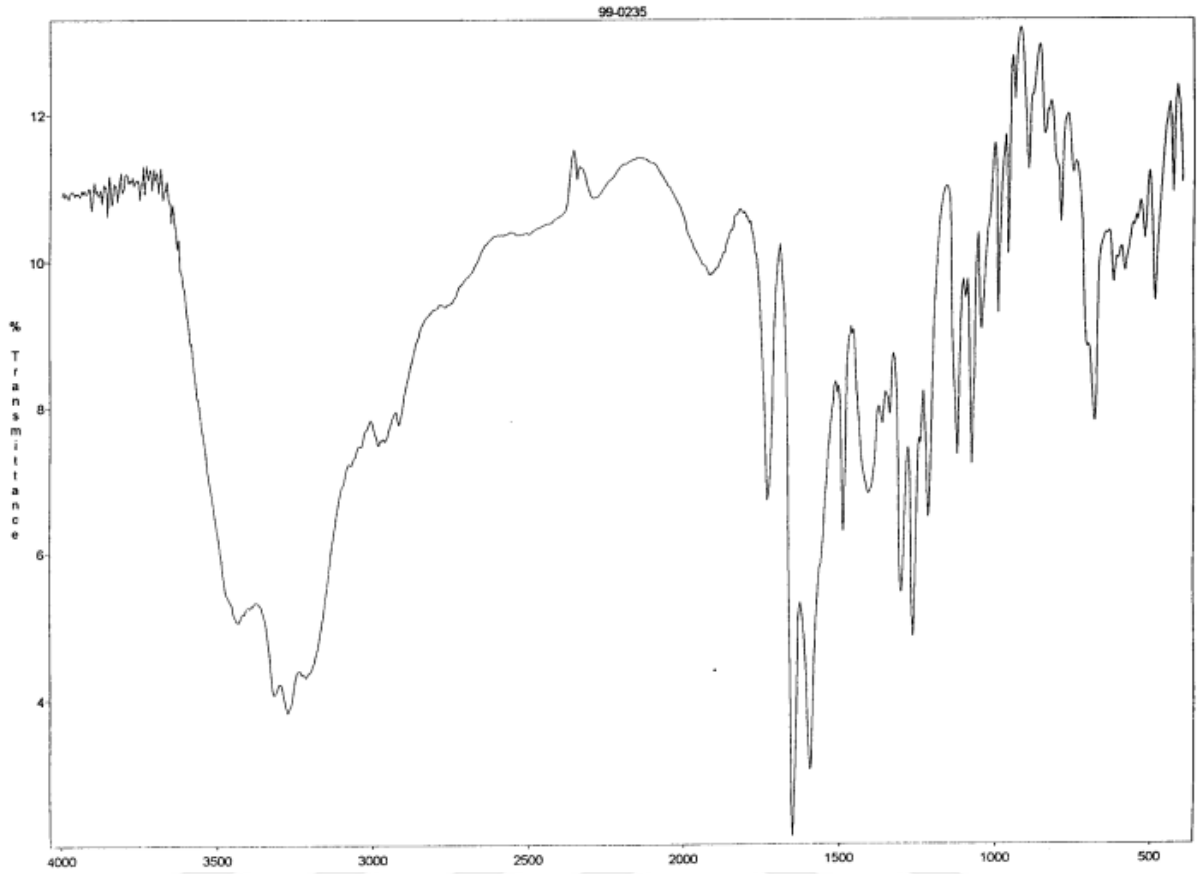
Brimonidin tartarat etkin maddesinin FTIR ve MS cihazında fizikokimyasal analizlerle karakterizasyonuna ait bulgular ve UV cihazında yapılan validasyon çalışmaları sonucu elde edilen bulgular sırasıyla verilmiştir.

4.1.1. Brimonidin Tartaratın Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Cihazı Analiz Bulguları

Brimonidin tartarat moleküllerinin titreşimiyle Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.'de N-H, O-H, C-H, C=O ve C=C moleküler bağ grupları ve bunlara karşılık gelen dalga sayıları elde edilmiştir

Tablo 4.1. Moleküler bağ grupları-dalga sayısı

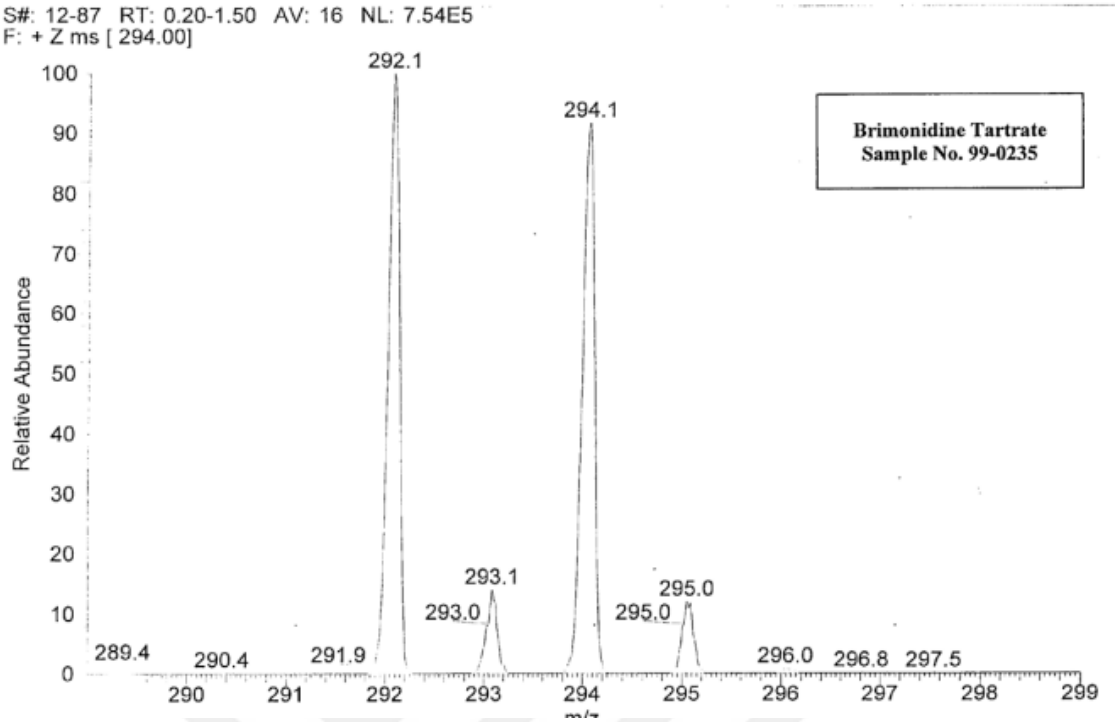
Moleküler Bağ Grupları	**Dalga Sayısı (cm^{-1})**
N-H	3432, 3274
O-H	3317, 3217
C-H	2920
C=O	1734
C=C	1649



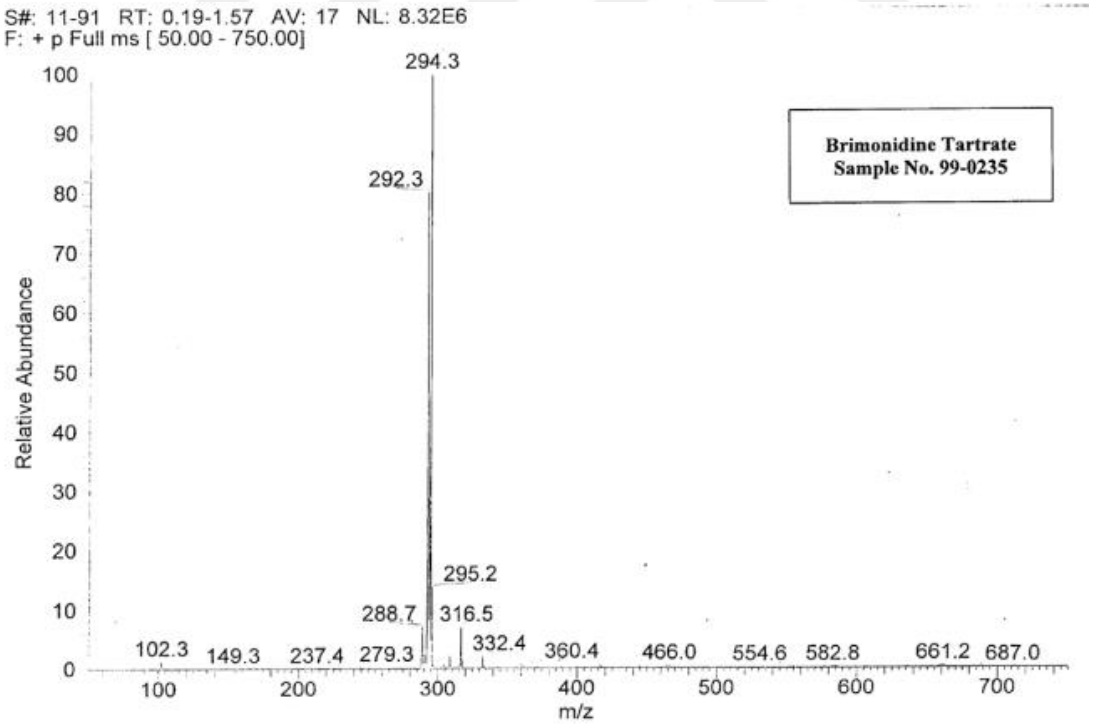
Şekil 4.1. Infrared ışık geçirgenliği-dalga sayısı grafiği

4.1.2. Brimonidin Tartaratın Kütle Spektroskopi Cihazı Analiz Bulguları

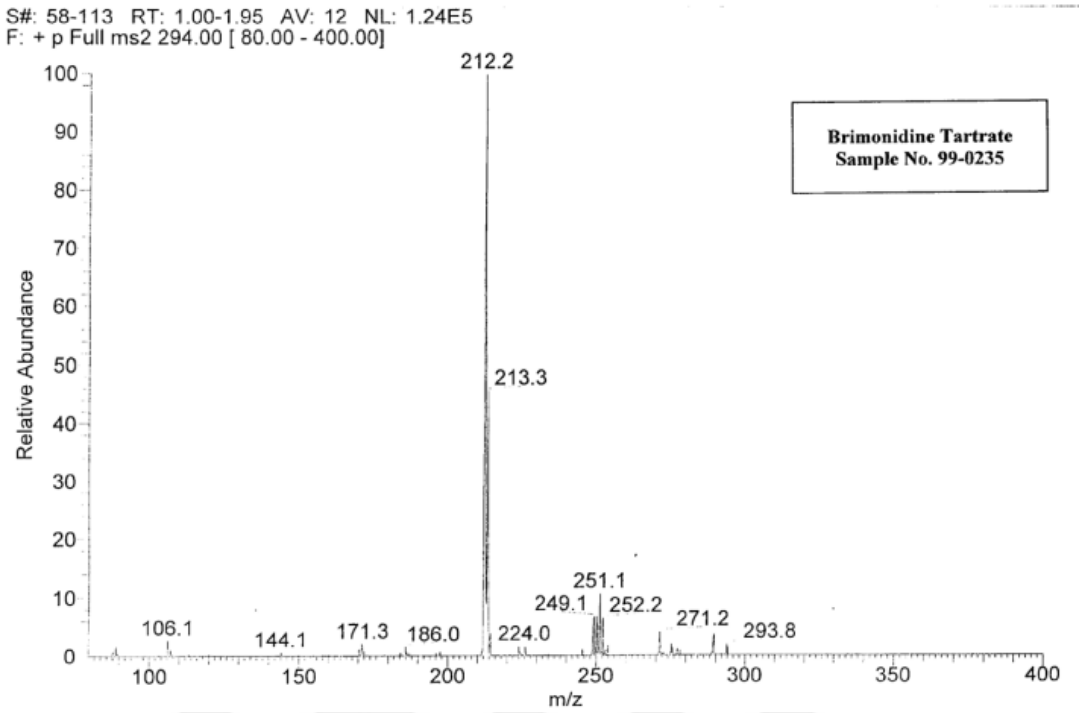
Elektrosprey yöntemi ile belirli iyonlar %25 çarpışma enerjisiyle parçalanarak brimonidin tartarat etkin maddesine ait MS cihazındaki kütle/yük değerleri için Şekil 4.2. ve Şekil 4.3. incelendiğinde 292'deki sinyalin ana iyonlara karşılık geldiği görülmektedir. Tartaratlı yapıda oluşan kayıp %25 çarpışma enerjisi altında kolay ayrılma sergilediği ve 150-250 aralığında bir sinyal ürettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.). Ayrıca halojenli aromatik yapıların 140-160 aralığında sinyal verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



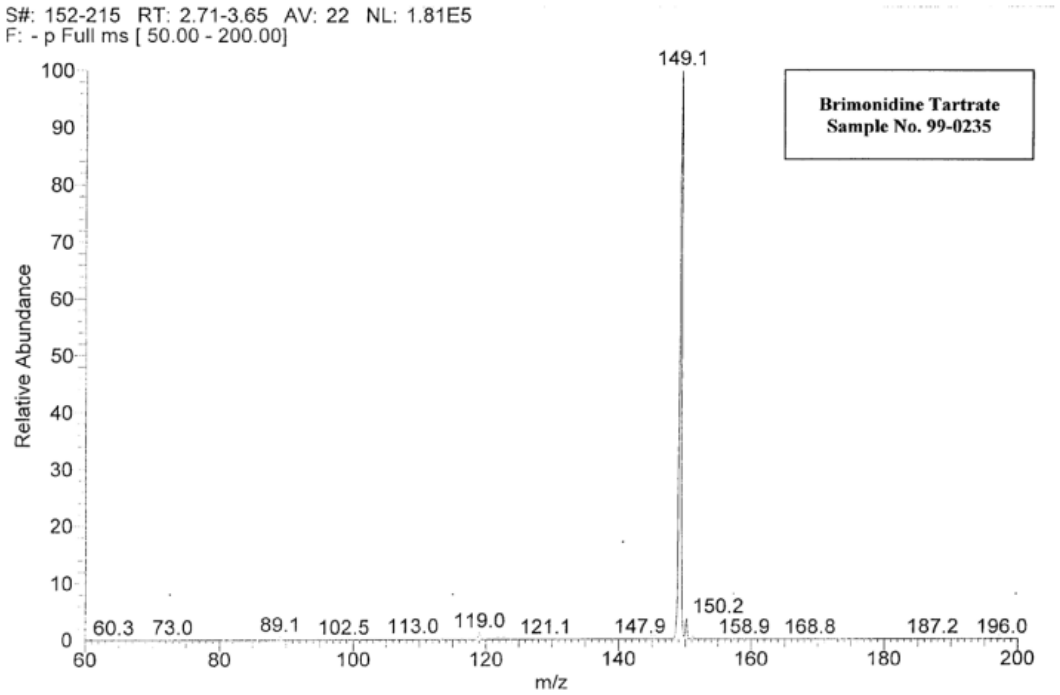
Şekil 4.2. Brimonidin tartarat MS cihazındaki bağıl miktar-kütle/yük oranı grafiği



Şekil 4.3. Brimonidin Tartarat MS Cihazındaki Bağıl Miktar-Kütle/Yük Oranı Grafiği



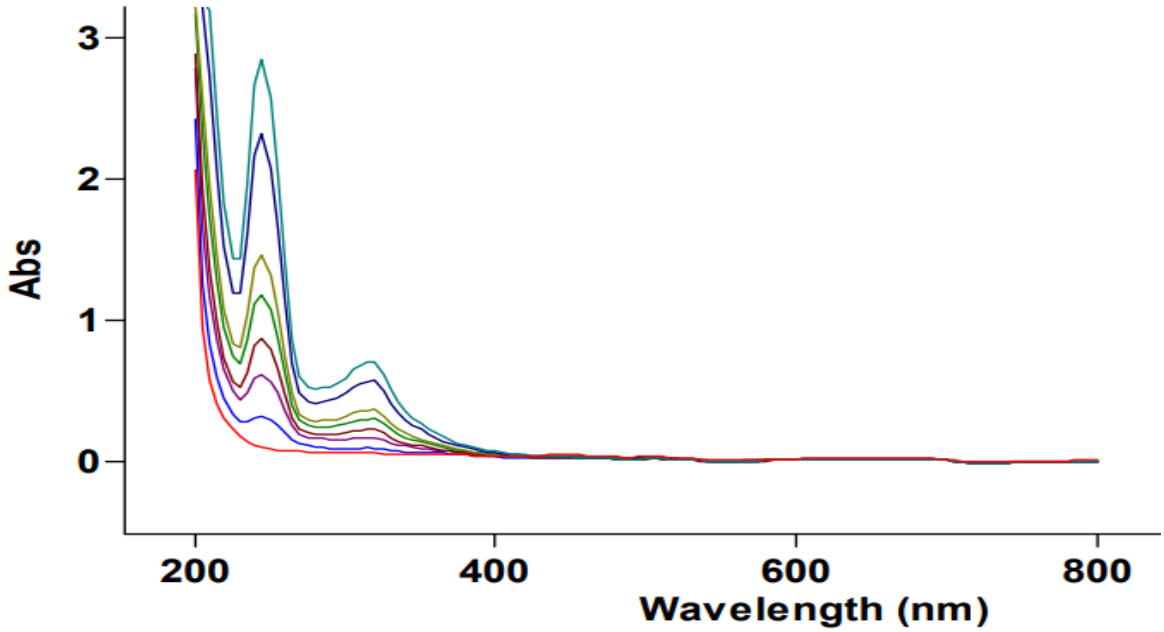
Şekil 4.4. Brimonidin tartarat MS cihazındaki bağıl miktar-kütle/yük oranı grafiği



Şekil 4.5. Brimonidin Tartarat MS Cihazındaki Bağıl Miktar-Kütle/Yük Oranı Grafiği

4.2. Brimonidin Tartarat UV Cihazı Metot Validasyonu Bulguları

200-800 nm dalga boyu aralığında UV cihazıyla tam tarama yapılarak yedi farklı konsantrasyonlardaki brimonidin tartarat çözeltilerinin uygun absorbans değerleri ölçülmüştür. En yüksek absorbans değerini 245 nm dalga boyunda verdiği Şekil 4.6.'da gözlemlenmiştir.



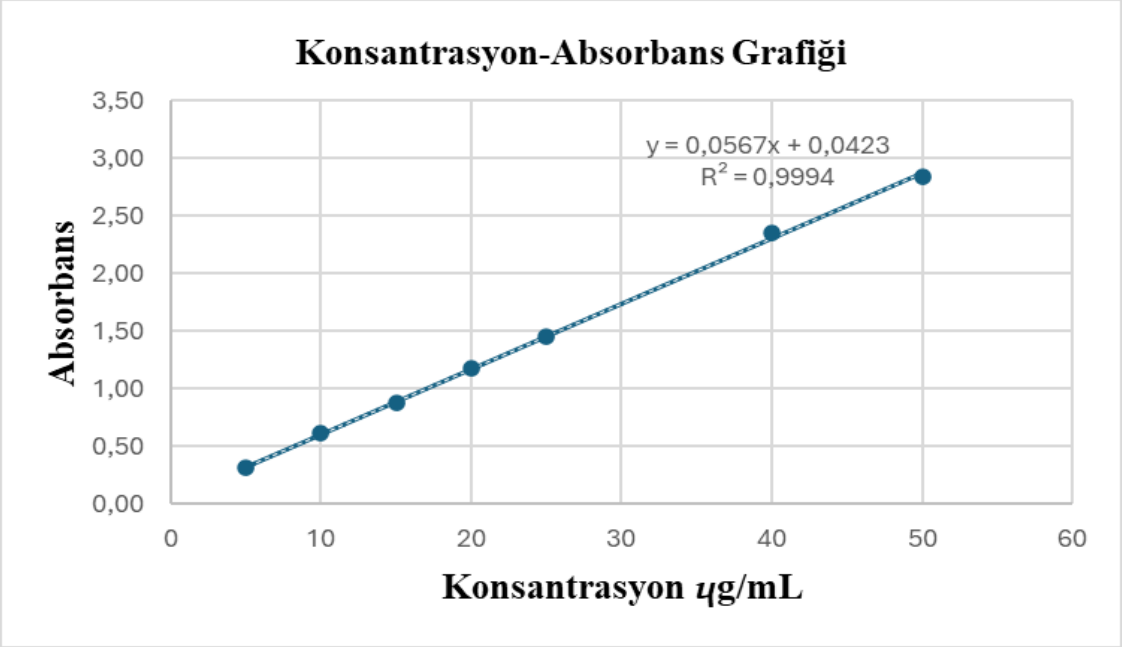
Şekil 4.6. Brimonidin tartarat dalga boyu-absorbans değerleri

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusal Aralık Bulguları

UV metodunda belirtildiği üzere yedi farklı konsantrasyondaki (5-50 µg/mL) Brimonidin tartarat çözeltileri üç tekrar olmak üzere ölçülen absorbans değerlerinin y=mx+n kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin doğru denklemi, eğimi ve regresyon katsayı değeri hesaplanmıştır. Doğru denklemi y = 0.0567x + 0.0473, eğimi 0.0567 ve regresyon katsayısı 0.9994'tür. Regresyon katsayısının 1'e yakın olması elde edilen doğrunun lineer olduğunu ve analitik metodun doğrusallığını göstermektedir. Tablo 4.2.'de konsantrasyon-absorbans değerleri, Şekil 4.7.'de kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

Tablo 4.2. Konsantrasyon-absorbans değeri

Konsantrasyon	Absorbans Değeri	Ortalama Absorbans	Standart Sapma	Ortalama Standart Sapma
5 µg/mL	0,33	0,32	0,0208	0,015
	0,30			
	0,34			
10 µg/mL	0,62	0,62	0,0153	
	0,61			
	0,64			
15 ųg/mL	0,88	0,87	0,0153	
	0,85			
	0,87			
20 µg/mL	1,19	1,18	0,0100	
	1,18			
	1,17			
25 µg/mL	1,47	1,46	0,0115	
	1,45			
	1,47			
40 µg/mL	2,33	2,35	0,0153	
	2,36			
	2,35			
50 µg/mL	2,86	2,85	0,0115	
	2,86			
	2,84			



Şekil 4.7. Brimonidin tartarat konsantrasyon-absorbans grafiği

Seçicilik Bulguları

Brimonidin tartarat etkin maddesini belirlemek için UV cihazıyla tam tarama yapılarak 245 nm dalga boyunda en yüksek absorbansı verdiği teorik olarak araştırılan değer ile benzer olduğu görülmüştür.

Doğruluk ve Geri Kazanım

5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL brimonidin tartarat çözeltisi konsantrasyonları üç tekrar olarak hazırlanmış olup elde edilen doğruluk parametresi konsantrasyonlarının geri kazanım değerleri % olarak Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Brimonidin tartaratın UV metodu bağlı geri kazanım değerleri

Doğruluk Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Geri Kazanım %**	**Geri Kazanım Ortalama Değer %**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL	%100,20			

Tablo 4.3. (Devam) Brimonidin tartaratın UV metodu bağlı geri kazanım değerleri

5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,00 µg/mL	%100,00	%100,00	0,20	%0,20
	5,00 µg/mL	4,99 µg/mL	% 99,80			
25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,08 µg/mL	% 100,30	%100,19	0,09	%0,09
	25,00 µg/mL	25,04 µg/mL	% 100,16			
	25,00 µg/mL	25,03 µg/mL	% 100,12			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,00 µg/mL	%100,00	%100,09	0,08	%0,08
	50,00 µg/mL	50,06 µg/mL	%100,12			
	50,00 µg/mL	50,07 µg/mL	%100,14			

Geri kazanım yaklaşık olarak %100 değerine yakın olmakla beraber varyasyon katsayısı %0,08-0,20 değerleri arasındadır.

Kesinlik ve Ara Kesinlik Bulguları

Tekrarlanabilirlik parametresinin bir ifadesi olan kesinlik ve ara kesinlik bulguları 5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere farklı üç adet konsantrasyon için üç farklı günde üç tekrar olarak yapılan ölçümlerle tekrarlanabilirliği kanıtlanmıştır (Tablo 4.4.-Tablo 4.7.) Elde edilen sonuçların tutarlı ve varyasyon katsayısı değerlerinin %2'den küçük olduğu görülmektedir.

Tablo 4.4. Brimonidin tartaratın UV metodu birinci gün kesinlik değerleri

Birinci Gün Kesinlik Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Ortalama Değer (µg/mL)**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,02 µg/mL	5,01 µg/mL	0,0058	%0,1158
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			

Tablo 4.4. (Devam) Brimonidin tartaratın UV metodu birinci gün kesinlik değerleri

25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,03 µg/mL	25,01 µg/mL	0,0153	%0,0612
	25,00 µg/mL	25,01 µg/mL			
	25,00 µg/mL	25,00 µg/mL			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,00 µg/mL	50,01 µg/mL	0,0115	%0,0230
	50,00 µg/mL	50,00 µg/mL			
	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL			

Tablo 4.5. Brimonidin tartaratın UV metodu ikinci gün kesinlik değerleri

İkinci Gün Kesinlik Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Ortalama Değer (µg/mL)**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,00 µg/mL	5,00 µg/mL	0,0100	%0,2000
	5,00 µg/mL	4,99 µg/mL			
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			
25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,00 µg/mL	24,99 µg/mL	0,0100	%0,0400
	25,00 µg/mL	24,99 µg/mL			
	25,00 µg/mL	24,98 µg/mL			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,00 µg/mL	50,01 µg/mL	0,0100	%0,0200
	50,00 µg/mL	50,01 µg/mL			
	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL			

Tablo 4.6. Brimonidin tartaratın UV metodu üçüncü gün kesinlik değerleri

Üçüncü Gün Kesinlik Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Ortalama Değer (µg/mL)**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**

Tablo 4.6. (Devam) Brimonidin tartaratın UV metodu üçüncü gün kesinlik değerleri

5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL	0,0058	%0,1158
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			
25 µg/mL	25,00 µg/mL	24,99 µg/mL	25,00 µg/mL	0,0100	%0,0400
	25,00 µg/mL	25,00 µg/mL			
	25,00 µg/mL	25,01 µg/mL			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,03 µg/mL	50,02 µg/mL	0,0058	%0,0116
	50,00 µg/mL	50,02µg/mL			
	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL			

Tablo 4.7. Brimonidin tartaratın UV metodu üç günlük kesinlik değerleri

Hazırlanan Çözeltiler	**Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)**			**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
	Birinci Gün Kesinlik Çözeltileri	**İkinci Gün Kesinlik Çözeltileri**	**Üçüncü Gün Kesinlik Çözeltileri**		
5 µg/mL	5,01 µg/mL	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL	0,0058	%0,1158
25 µg/mL	25,01 µg/mL	24,99 µg/mL	25,00 µg/mL	0,0100	%0,0400
50 µg/mL	50,01 µg/mL	50,02 µg/mL	50,02 µg/mL	0,0058	%0,0116

Tespit Limiti LOD ve Miktar Belirleme Limiti LOQ Bulguları

Brimonidin tartarat içeren farklı konsantrasyonlara ait çözeltilerin validasyon çalışmalarında LOD değeri 0,873 ve LOQ değeri 2,646 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. LOD ve LOQ değer hesabı parametreleri

Konsantrasyon	**Absorbans Değeri**	**Standart Sapma**	**Ortalama Standart**	**Eğim (m)**	**LOD**	**LOQ**

Tablo 4.8. (Devam) LOD ve LOQ değer hesabı parametreleri

	(Yanıt)		Sapma (SD)			
5 µg/mL	0,33	0,0208				
	0,30					
	0,34					
10 µg/mL	0,62	0,0153				
	0,61					
	0,64					
15 µg/mL	0,88	0,0153				
	0,85					
	0,87					
20 µg/mL	1,19	0,0100	0,015	0,0567	0,873	2,646
	1,18					
	1,17					
25 µg/mL	1,47	0,0115				
	1,45					
	1,47					
40 µg/mL	2,33	0,0153				
	2,36					
	2,35					
50 µg/mL	2,86	0,0115				
	2,86					
	2,84					

Stabilite Bulguları

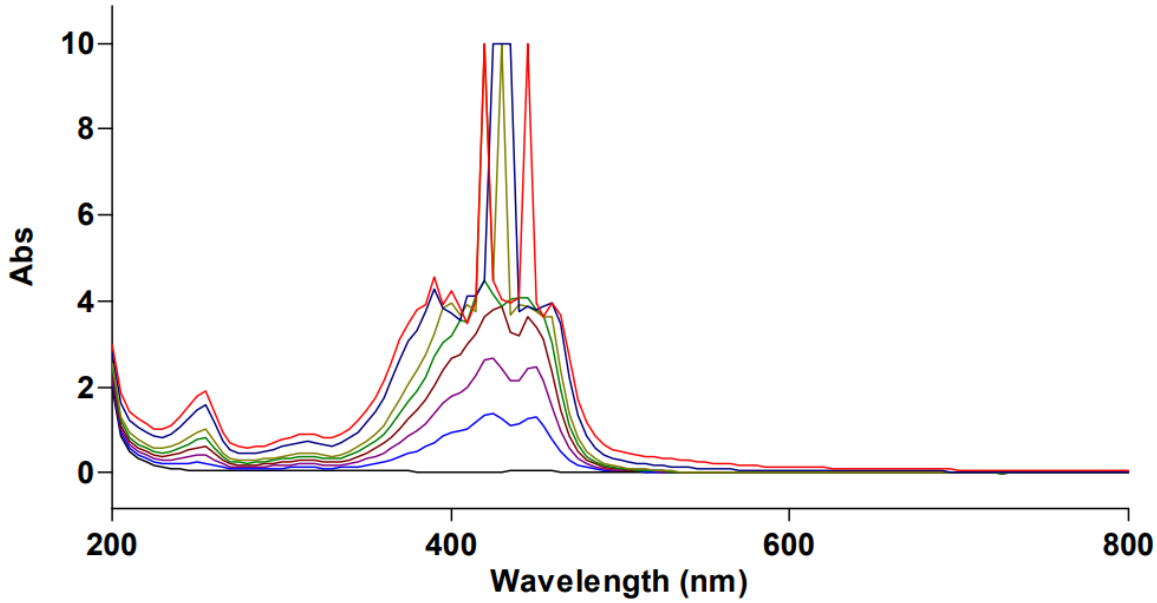
40 µg/mL derişime sahip brimonidin tartarat çözeltisi 40°C ± 2, 25°C ± 2, 5°C ± 3 ve - 20°C ± 5°C stabilite kabinlerine kaldırılarak belirli periyotlarda absorbans ölçümleri yapılmış olup konsantrasyondaki değişimler hesaplanmıştır (Tablo 4.9.). 48 saat boyunca belirli periyotlarla bakılan analiz sonuçlarına göre brimonidin tartarat içeren çözeltilerin saklama koşulunun 25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN veya 5°C ± 3 olabileceği belirlenmiştir.

Tablo 4.9. Brimonidin tartarat çözeltisi stabilite konsantrasyon sonuçları

Zaman	**Konsantrasyon (µg/mL)**			**Konsantrasyon Değişimi**		
	40°C ± 2°C / %75 BN ± %5 BN	**25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN**	**5°C ± 3°C**	**40°C ± 2°C / %75 BN ± %5 BN**	**25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN**	**5°C ± 3°C**
Başlangıç	40,00 µg/mL	40,00 µg/mL	40,00 µg/mL			
24 Saat	39,87 µg/mL	39,95 µg/mL	40,00 µg/mL	% 99,72	% 99,92	% 99,98
48 Saat	39,80 µg/mL	39,95 µg/mL	39,98 µg/mL			

4.3. Krosetin UV Cihazı Metot Validasyonu Bulguları

200-800 nm dalga boyu aralığında UV cihazıyla tam tarama yapılarak yedi farklı konsantrasyonlardaki krosetin çözeltilerinin uygun absorbans değerleri ölçülmüştür. En yüksek absorbans değerini 420-440 nm dalga boyunda verdiği (Şekil 4.8.) gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. Krosetin dalga boyu-absorbans değerleri

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusal Aralık Bulguları

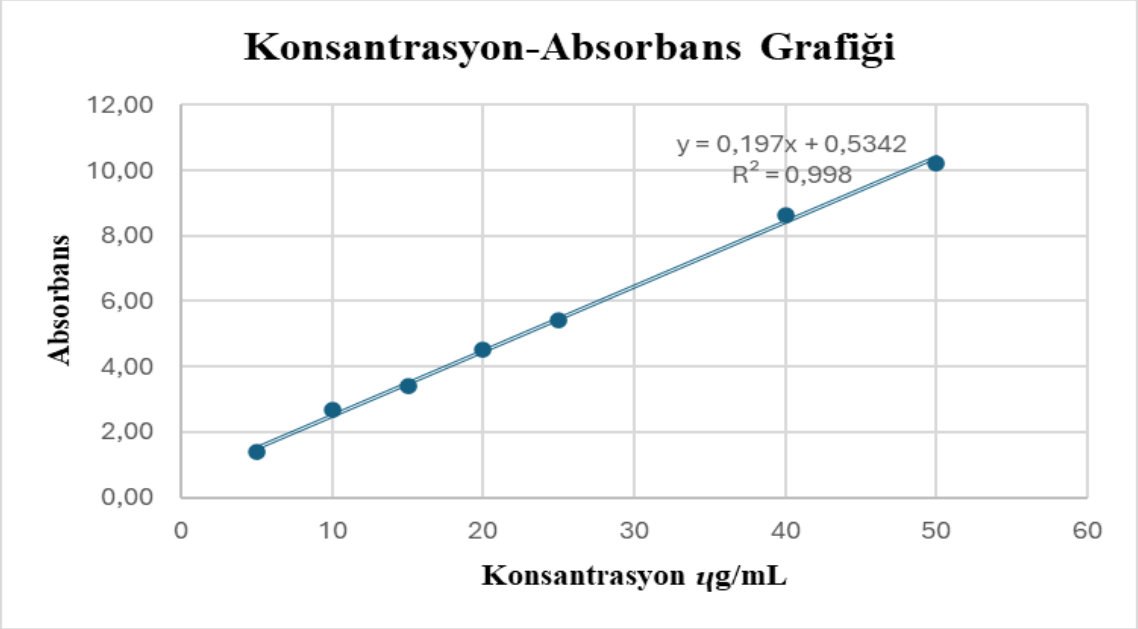
UV metodunda belirtildiği üzere yedi farklı konsantrasyondaki (5-50 µg/mL) Krosetin çözeltileri üç tekrar olmak üzere ölçülen absorbans değerlerinin y=mx+n kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin doğru denklemi, eğimi ve regresyon katsayı değeri hesaplanmıştır. Doğru denklemi y = 0.197x + 0.5342, eğimi 0.197 ve regresyon katsayısı 0.998'dir. Regresyon katsayısının 1'e yakın olması elde edilen doğrunun lineer olduğunu ve analitik metodun doğrusallığını göstermektedir. Tablo 4.10.'da Konsantrasyon-absorbans değerleri Şekil 4.9.'da kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

Tablo 4.10. Konsantrasyon-absorbans değeri

Konsantrasyon	Absorbans Değeri	Ortalama Absorbans	Standart Sapma	Ortalama Standart Sapma
5 µg/mL	1,43	1,38	0,0416	0,031
	1,37			
	1,35			

Tablo 4.10. (Devam) Konsantrasyon-absorbans değeri

10 µg/mL	2,69	2,68	0,0208	
	2,70			
	2,66			
15 µg/mL	3,45	3,40	0,0416	
	3,37			
	3,39			
20 µg/mL	4,53	4,50	0,0252	
	4,58			
	4,50			
25 µg/mL	5,48	5,44	0,0404	
	5,40			
	5,43			
40 µg/mL	8,63	8,61	0,0208	
	8,62			
	8,59			
50 µg/mL	10,22	10,23	0,0208	
	10,26			
	10,24			



Şekil 4.9. Krosetin konsantrasyon-absorbans grafiği

Seçicilik Bulguları

Krosetin etkin maddesini belirlemek için UV cihazıyla tam tarama yapılarak 420-440 nm dalga boyunda en yüksek absorbansı verdiği teorik olarak araştırılan değer ile benzer olduğu görülmüştür.

Doğruluk ve Geri Kazanım Bulguları

5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL krosetin çözeltisi konsantrasyonları üç tekrar olarak hazırlanmış olup elde edilen doğruluk parametresi konsantrasyonlarının geri kazanım değerleri % olarak Tablo 4.11.'de verilmiştir.

Tablo 4.11. Krosetin'in UV metodu bağlı geri kazanım değerleri

Doğruluk Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Geri Kazanım %**	**Geri Kazanım Ortalama Değer %**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL	%100,20			

Tablo 4.11. (Devam) Krosetinin UV metodu bağlı geri kazanım değerleri

5 µg/mL	5,00 µg/mL	4,99 µg/mL	%99,80	%100,07	0,23	%0,23
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL	%100,20			
25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,03 µg/mL	%100,12	%100,05	0,06	%0,06
	25,00 µg/mL	25,01 µg/mL	%100,04			
	25,00 µg/mL	25,00 µg/mL	%100,00			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,01 µg/mL	%100,02	%100,01	0,04	%0,04
	50,00 µg/mL	49,98 µg/mL	%99,96			
	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL	%100,04			

Geri kazanım yaklaşık olarak %100 değerine yakın olmakla beraber varyasyon katsayısı %0,04-0,23 değerleri arasındadır. Sonuçların UV metodunun doğruluğunu kanıtladığı görülmektedir.

Kesinlik ve Ara Kesinlik Bulguları

Tekrarlanabilirlik parametresinin bir ifadesi olan kesinlik ve ara kesinlik bulguları 5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL olmak üzere farklı üç adet konsantrasyon için üç farklı günde üç tekrar olarak yapılan ölçümlerle tekrarlanabilirliği kanıtlanmıştır. Tablo 4.12.-Tablo 4.15.'te ilgili sonuçlar yer verilmiş olup varyasyon katsayısı değerlerinin %2'den küçük olduğu görülmektedir.

Tablo 4.12. Krosetinin UV metodu birinci gün kesinlik değerleri

Birinci Gün Kesinlik Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Ortalama Değer (µg/mL)**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,06 µg/mL	5,03 µg/mL	0,0252	%0,5010
	5,00 µg/mL	5,03 µg/mL			
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			
	25,00 µg/mL	25,02 µg/mL			

Tablo 4.12. (Devam) Krosetinin UV metodu birinci gün kesinlik değerleri

25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,06 µg/mL	25,04 µg/mL	0,0200	%0,0799
	25,00 µg/mL	25,04 µg/mL			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL	50,02 µg/mL	0,0115	%0,0230
	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL			
	50,00 µg/mL	50,04 µg/mL			

Tablo 4.13. Krosetinin UV metodu ikinci gün kesinlik değerleri

İkinci Gün Kesinlik Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Ortalama Değer (µg/mL)**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,05 µg/mL	5,03 µg/mL	0,0200	%0,3976
	5,00 µg/mL	5,03 µg/mL			
	5,00 µg/mL	5,01 µg/mL			
25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,04 µg/mL	25,01 µg/mL	0,0252	%0,1008
	25,00 µg/mL	24,99 µg/mL			
	25,00 µg/mL	25,01 µg/mL			
50 µg/mL	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL	50,01 µg/mL	0,0115	%0,0230
	50,00 µg/mL	50,02 µg/mL			
	50,00 µg/mL	50,00 µg/mL			

Tablo 4.14. Krosetinin UV metodu üçüncü gün kesinlik değerleri

Üçüncü Gün Kesinlik Çözeltileri	**Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)**	**Ortalama Değer (µg/mL)**	**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
5 µg/mL	5,00 µg/mL	5,08 µg/mL	5,06 µg/mL	0,0208	%0,4111
	5,00 µg/mL	5,04 µg/mL			
	5,00 µg/mL	5,05 µg/mL			

Tablo 4.14. (Devam) Krosetinin UV metodu üçüncü gün kesinlik değerleri

25 µg/mL	25,00 µg/mL	25,03 µg/mL	25,03 µg/mL	0,0200	%0,0799
	25,00 µg/mL	25,05 µg/mL			
	25,00 µg/mL	25,01 µg/mL			
50 µg/mL	50,0 µg/mL	50,02 µg/mL	50,04 µg/mL	0,0208	%0,4157
	50,00 µg/mL	50,06 µg/mL			
	50,00 µg/mL	50,03 µg/mL			

Tablo 4.15. Krosetinin UV metodu üç günlük kesinlik değerleri

Hazırlanan Çözeltiler	**Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)**			**Standart Sapma**	**Varyasyon Katsayısı %**
	Birinci Gün Kesinlik Çözeltileri	**İkinci Gün Kesinlik Çözeltileri**	**Üçüncü Gün Kesinlik Çözeltileri**		
5 µg/mL	5,03 µg/mL	5,03 µg/mL	5,06 µg/mL	0,0173	%0,1158
25 µg/mL	25,01 µg/mL	24,99 µg/mL	25,00 µg/mL	0,0100	%0,0400
50 µg/mL	50,01 µg/mL	50,02 µg/mL	50,02 µg/mL	0,0058	%0,0058

Tespit Limiti LOD ve Miktar Belirleme Limiti LOQ Bulguları

Krosetin içeren farklı konsantrasyonlara ait çözeltilerin validasyon çalışmalarında LOD değeri 0,519 ve LOQ değeri 1,574 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.16.).

Tablo 4.16. LOD ve LOQ değer hesabı parametreleri

Konsantrasyon	**Absorbans Değeri**	**Standart Sapma**	**Ortalama Standart**	**Eğim (m)**	**LOD**	**LOQ**

Tablo 4.16. (Devam) LOD ve LOQ değer hesabı parametreleri

	(Yanıt)		Sapma (SD)			
5 µg/mL	1,43	0,0416	0,031	0,197	0,519	1,574
	1,37					
	1,35					
10 µg/mL	2,69	0,0208				
	2,70					
	2,66					
15 µg/mL	3,45	0,0416				
	3,37					
	3,39					
20 µg/mL	4,53	0,0252				
	4,58					
	4,50					
25 µg/mL	5,48	0,0404				
	5,40					
	5,43					
40 µg/mL	8,63	0,0208				
	8,62					
	8,59					
50 µg/mL	10,22	0,0208				
	10,26					
	10,24					

Stabilite Bulguları

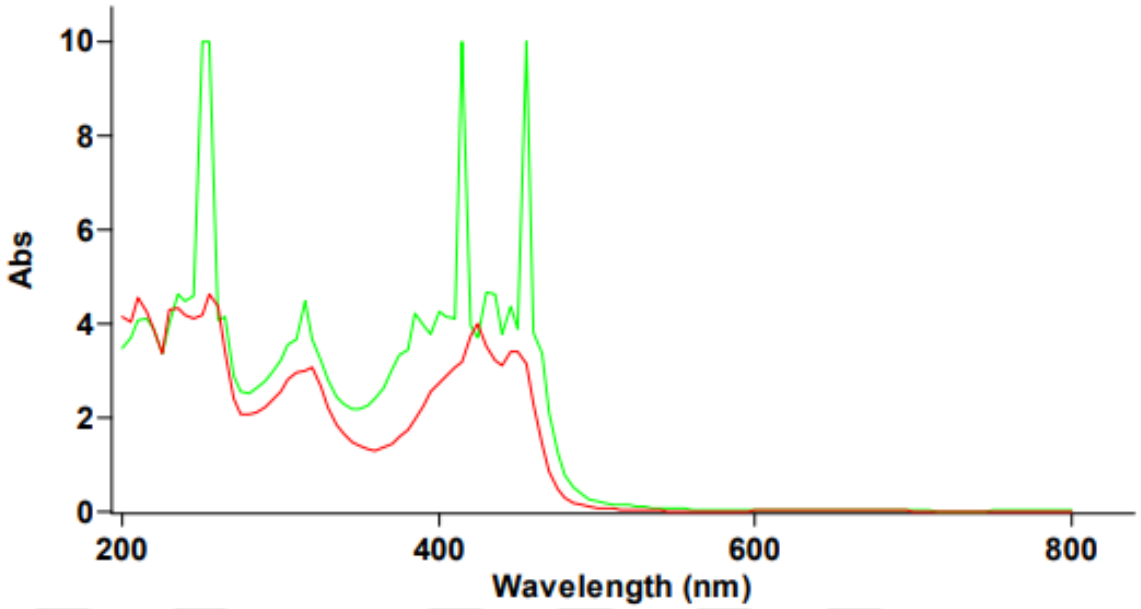
40 µg/mL derişime sahip Krosetin çözeltisi 40°C ± 2, 25°C ± 2, 5°C ± 3 ve - 20°C ± 5°C stabilite kabinlerine kaldırılarak belirli periyotlarda absorbans ölçümleri yapılmış olup konsantrasyondaki değişimler hesaplanmıştır (Tablo 4.17.). Krosetin içeren çözeltilerin saklama koşulunun 5°C ± 3°C'de yapılan analiz sonuçlarına göre uygun olduğu görülmüştür. Oluşturulacak formülasyonun saklama koşulunda belirleyici bir parametre olmaktadır.

Tablo 4.17. Krosetin çözeltisi stabilite konsantrasyon sonuçları

Zaman	**Konsantrasyon (µg/mL)**				**Konsantrasyon Değişimi (µg/mL)**			
	40°C ± 2°C / %75 BN ± %5 BN	**25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN**	**5°C ± 3°C**	**- 20°C ± 5°C**	**40°C ± 2°C / %75 BN ± %5 BN**	**25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN**	**5°C ± 3°C**	**- 20°C ± 5°C**
Başlangıç	40,00 µg/mL	40,00 µg/mL	40,00 µg/mL	40,00 µg/mL				
24 Saat	35,82 µg/mL	39,85 µg/mL	40,00 µg/mL	40,00 µg/mL	% 91,81	% 99,57	% 99,97	% 99,98
48 Saat	34,35 µg/mL	39,63 µg/mL	39,96 µg/mL	39,97 µg/mL				

4.4. Krosetin ve Brimonidin Tartaratın Birlikte UV'deki Görünür Bölge Spektrofotometre Analizi Bulguları

200-800 nm dalga boyu aralığında UV cihazıyla tam tarama yapılarak iki farklı konsantrasyonlardaki krosetin ve brimonidin tartaratı birlikte içeren çözeltilerin uygun absorbans değerleri ölçülmüştür. Brimonidin tartarat 245 nm, krosetinin 420-440 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değerini verdiği, iki etkin maddenin birbirleriyle herhangi bir girişim göstermediği Şekil 4.10.'da gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. Krosetin ve brimonidin tartarat dalga boyu-absorbans değerleri

4.5. Çözünürlük Çalışmaları Bulguları

Brimonidin tartarat ve krosetin için distile su, metanol çözücü ortamlarındaki çözünürlük verileri Tablo 4.18.- Tablo 4.23.'te verilmiştir.

4.5.1. Brimonidin Tartarat Etkin Maddesi Çözünürlük Çalışması Bulguları

Brimonidin tartarat için distile su ve metanol çözücü ortamlarında her bir farklı brimonidin tartarat çözeltileri için dört farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlara göre UV cihazında absorbans ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ve buna karşılık gelen konsantrasyonlar Tablo 4.18. ve Tablo 4.19.'da verilmiştir. Çözündürme çalışmalarına ait elde edilen veriler Tablo 4.20.'de verilmiştir. Brimonidin tartaratın sudaki çözünürlüğü metanoldeki çözünürlüğüne göre on kat fazladır. Her iki çözücü ortamında belirli konsantrasyonlarda çözündüğü tespit edilmiştir. Çözünürlük çalışması üç tekrar halinde yapılmıştır.

Tablo 4.18. Brimonidin tartarat-distile su çözünürlük verileri

Çalışma Numarası	Hazırlanan Çözeltiler	Görünüş	Ölçülen Absorbans Değerleri	Hesaplanan Konsantrasyon (mg/mL)	Çözünürlük	Ortalama Değer (mg/mL)	Standart Sapma
Ç1-1	75 mg/mL	Berrak, renksiz çözelti	4,2988	75,06 mg/mL	Çözünür	75,06 mg/mL	0,0153
			4,2982	75,07 mg/mL			
			4,2971	75,04 mg/mL			
Ç1-2	80 mg/mL	Berrak renksiz çözelti	4,5811	80,05 mg/mL	Çözünür	80,04 mg/mL	0,0100
			4,5806	80,04 mg/mL			
			4,5800	80,03 mg/mL			
Ç1-3	85 mg/mL	Berrak renksiz çözelti	4,5800	80,03 mg/mL	Çözünmez	80,01 mg/mL	0,0153
			4,5789	80,01 mg/mL			
			4,5783	80,00 mg/mL			
Ç1-4	90 mg/mL	Çözünmeyen partiküller içeren çözelti	4,5794	80,02 mg/mL	Çözünmez	80,04 mg/mL	0,0153
			4,5806	80,04 mg/mL			
			4,5811	80,05 mg/mL			

Tablo 4.19. Brimonidin tartarat-metanol çözünürlük verileri

Çalışma Numarası	Hazırlanan Çözeltiler	Görünüş	Ölçülen Absorbans Değerleri	Hesaplanan Konsantrasyon (mg/mL)	Çözünürlük	Ortalama Değer (mg/mL)	Standart Sapma
Ç2-1	0,75 mg/mL	Berrak, renksiz çözelti	0,0851	0,755 mg/mL	Çözünür	0,753 mg/mL	0,0021
			0,0849	0,752 mg/mL			
			0,0849	0,751 mg/mL			
	0,80	Berrak	0,0878	0,802 mg/mL			

Tablo 4.19. (Devam) Brimonidin tartarat-metanol çözünürlük verileri

Ç2-2	mg/mL	renksiz çözelti	0,0878	0,803 mg/mL	Çözünür	0,802 mg/mL	0,0015
			0,0877	0,800 mg/mL			
Ç2-3	0,85 mg/mL	Berrak renksiz çözelti	0,0877	0,801 mg/mL	Çözünmez	0,802 mg/mL	0,0012
			0,0877	0,801 mg/mL			
			0,0878	0,803 mg/mL			
Ç2-4	0,90 mg/mL	Berrak renksiz çözelti	0,0878	0,802 mg/mL	Çözünmez	0,801 mg/mL	0,0012
			0,0878	0,802 mg/mL			
			0,0877	0,800 mg/mL			

Tablo 4.20. Brimonidin tartarat çözünürlük çalışması verileri

Çözücü Ortamı	**Görünüş**	**Çözünürlük Miktarı (mg/mL)**
Distile Su	Berrak, renksiz çözelti	80 mg/mL
Metanol	Berrak, renksiz çözelti	8 mg/mL

4.5.2. Krosetin Etkin Maddesi Çözünürlük Çalışması Bulguları

Krosetin için distile su ve metanol çözücü ortamlarında her bir farklı krosetin çözeltileri için dört farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlara göre UV cihazında absorbans ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ve buna karşılık gelen konsantrasyonlar Tablo 4.21. ve Tablo 4.22.'de verilmiştir. Çözündürme çalışmalarına ait elde edilen veriler Tablo 4.23.'te verilmiştir. Krosetinin sudaki çözünürlüğünün çok çok düşük seviyerlerde olup metanolde de düşük konsantrasyonlarda çözündüğü tespit edilmiştir. Çözünürlük çalışmaları üç tekrar halinde yapılmıştır.

Tablo 4.21. Krosetin-distile su çözünürlük verileri

Çalışma Numarası	**Hazırlanan Çözeltiler**	**Görünüş**	**Ölçülen**	**Hesaplanan Konsantrasyon**	**Çözünürlük**	**Ortalama Değer**	**Standart Sapma**

Tablo 4.21. (Devam) Krosetin-distile su çözünürlük verileri

			Absorbans Değerleri	**(µg/mL)**		**(µg/mL)**	
Ç3-1	3,00 µg/mL	Berrak, kırmızımsı çözelti	1,1351	3,05 µg/mL	Çözünür	3,09 µg/mL	0,0361
			1,1449	3,10 µg/mL			
			1,1488	3,12 µg/mL			
Ç3-2	4,00 µg/mL	Berrak, kırmızımsı çözelti	1,3419	4,10 µg/mL	Çözünür	4,08 µg/mL	0,0153
			1,3380	4,08 µg/mL			
			1,3360	4,07 µg/mL			
Ç3-3	5,00 µg/mL	Berrak, kırmızımsı çözelti	1,5330	5,07 µg/mL	Çözünür	5,06 µg/mL	0,0115
			1,5291	5,05 µg/mL			
			1,5291	5,05 µg/mL			
Ç3-4	6,00 µg/mL	Çözünmeyen partiküller içeren kırmızımsı çözelti	1,5330	5,07 µg/mL	Çözünmez	5.06 µg/mL	0,0100
			1,5291	5,05 µg/mL			
			1,5310	5,06 µg/mL			

Tablo 4.22. Krosetin-metanol çözünürlük verileri

Çalışma Numarası	**Hazırlanan Çözeltiler**	**Görünüş**	**Ölçülen Absorbans Değerleri**	**Hesaplanan Konsantrasyon (mg/mL)**	**Çözünürlük**	**Ortalama Değer (mg/mL)**	**Standart Sapma**
Ç4-1	0,50 mg/mL	Berrak kırmızımsı çözelti	0,6355	0,515 mg/mL	Çözünür	0,514 mg/mL	0,0015
			0,6351	0,512 mg/mL			
			0,6355	0,514 mg/mL			
		Berrak	0,6743	0,711 mg/mL		0,712	0,0031

Tablo 4.22. (Devam) Krosetin-metanol çözünürlük verileri

Ç4-2	0,70 mg/mL	kırmızımsı çözelti	0,6751	0,715 mg/mL	Çözünür	mg/mL	
			0,6739	0,709 mg/mL			
Ç4-3	1,00 mg/mL	Berrak kırmızımsı çözelti	0,7472	1,081 mg/mL	Çözünür	1,074 mg/mL	0,0180
			0,7460	1,075 mg/mL			
			0,7420	1,055 mg/mL			
Ç4-4	1,50 mg/mL	Çözünmeyen partiküller içeren kırmızımsı çözelti	0,7397	1,043 mg/mL	Çözünmez	1,048 mg/mL	0,0056
			0,7418	1,054 mg/mL			
			0,7405	1,047 mg/mL			

Tablo 4.23. Krosetin çözünürlük çalışması verileri

Çözücü Ortamı	**Görünüş**	**Çözünürlük Miktarı**
Distile Su	Berrak, kırmızımsı çözelti	5,00 µg/mL
Metanol	Berrak, kırmızımsı çözelti	1 mg/mL

4.6. Göz Damlası Formülasyon Çalışmaları Bulguları

4.6.1. pH Analizi Bulguları

Hazırlanan formülasyonun üç tekrar olarak pH ölçümleri yapılarak Tablo 4.24.'te verilmiştir.

Tablo 4.24. Formülasyon pH değerleri

	pH	**Ortalama**	**Standart Sapma**
Formülasyon	7,30	7,30 ± 0,01	0,01
	7,31		
	7,30		

4.6.2. Viskozite Analizi Bulguları

Hazırlanan formülasyonun üç tekrar olarak ölçülen viskozite değerleri Tablo 4.25.'te verilmiştir.

Tablo 4.25. Formülasyon viskozite değerleri

	Vizkozite (cP)	**Ortalama**	**Standart Sapma**
Formülasyon	22,5 cP	22,4 ± 0.10	0,10
	22,3 cP		
	22,4 cP		

4.6.3. Damlacık Boyutu Analizi Bulguları

Formülasyon 5 ml LDPE şişeden üç tekrar olmak üzere on defa damlatma işlemi yapılarak elde edilen sonuçlar Tablo 4.28'de verilmiştir. Elde edilen her bir damlacık ağırlıkları standart sapmalarına bakıldığında tutarlılıklarını koruduğu tespit edilmiş ve varyasyon katsayısı değerinin %2'den küçük olduğu üç defa teyit edilmiştir. Primer malzemenin damlacık boyutunun ve formülasyon yoğunluğunun birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

Tablo 4.26. LDPE şişeden damlatılan bir damlanın ağırlık sonuçları

Örnek	**D-1 Çalışması**	**D-2 Çalışması**	**D-3 Çalışması**
	1 damla ağırlığı (mg)	**1 damla ağırlığı (mg)**	**1 damla ağırlığı (mg)**
1.Damlatma	30,06	30,07	30,09
2. Damlatma	30,05	30,05	30,04
3.Damlatma	30,06	30,08	30,09
4.Damlatma	30,04	30,04	30,03
5.Damlatma	30,05	30,09	30,08
6.Damlatma	30,06	30,03	30,07

Tablo 4.26. (Devam) LDPE şişeden damlatılan bir damlanın ağırlık sonuçları

7.Damlatma	30,00	30,06	30,08
8.Damlatma	30,04	30.03	30,06
9.Damlatma	30,05	30.09	30,06
10.Damlatma	30,04	30.07	30,08
Ortalama	30,045	30.061	30,068
Standart Sapma	0,02	0,02	0,02
Varyasyon Katsayısı	%0,059	%0,076	%0,068

4.6.4. Yoğunluk Analizi Bulguları

Hazırlanan formülasyonun üç tekrar olarak ölçülen yoğunluk değerleri Tablo 4.27.'de verilmiştir.

Tablo 4.27. Formülasyon yoğunluk değerleri

	Yoğunluk (g/mL)	**Ortalama**	**Standart Sapma (%)**
Formülasyon	1.0026	1.0029 ± 0.0003	0,0003
	1.0029		
	1.0031		

4.6.5. Osmolalite Analizi Bulguları

Hazırlanan formülasyonun üç tekrar olarak ölçülen osmolalite değerleri Tablo 4.28.'de verilmiştir.

Tablo 4.28. Formülasyon osmolalite değerleri

	Osmolalite (mOsm/kg)	Ortalama	Standart Sapma
Formülasyon	288	286 ± 2	2
	284		
	287		

4.6.6. Stabilite Çalışmaları Bulguları

Saklama koşulu 5°C ± 3°C olmasına karar verilen formülasyon çalışmalarının hem kendi saklama koşulunda hem de kötü koşul olarak kabul edilen hızlandırılmış 25°C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN stabilite koşulunda 3 ay boyunca ICH Q6A kılavuzuna uygun başlangıç, 1. Ay, 2. Ay ve 3. Ay zaman dilimlerinde oftalmik formülasyonlarda kullanılan USP<771> monografına bağlı kalarak stabilite çalışmaları analizlenmiştir. Tablo 4.29.'da 3 aylık periyoda ait analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.29. Stabilite koşulunda 3 aylık analiz sonuçları

Test	Spesifikasyon	Metot	Başlangıç	25 °C ± 2°C / %60 BN ± %5 BN			5°C ± 3°C		
				1.Ay	2.Ay	3.Ay	1.Ay	2.Ay	3.Ay
Görünüş	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Görsel	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti	Berrak, hafif kırmızımsı çözelti
pH	7,0-8,0	USP <771>	7,31	7,31	7,30	7,30	7,30	7,31	7,30
Viskozite	15-30 cP	USP <771>	22,5 cP	22,5 cP	22,5 cP	22,4 cP	22,4 cP	22,5 cP	22,4 cP
Yoğunluk	Bilgi amaçlıdır	ICH Q6A	1,0032 g/mL	1,0031 g/mL	1,0028 g/mL	1,0029 g/mL	1,0032 g/mL	1,0030 g/mL	1,0030 g/mL
Osmolalite	250-300	USP	287	287	285	287	288	287	288

Tablo 4.29. (Devam) Stabilite koşullarında 3 aylık analiz sonuçları

	mOsm/kg	<771>	mOsm/kg	mOsm/kg	mOsm/kg	mOsm/kg	mOsm/kg	mOsm/kg	mOsm/kg
Miktar Tayini Brimonidin Tartarat	1,500 mg/mL 1,350-1,650 mg/mL (%90,00-%110,00)	ICH Q6A	1,505 mg/mL %100,33	1,505 mg/mL %100,33	1,504 mg/mL %100,26	1,503 mg/mL %100,21	1,505 mg/mL %100,35	1,505 mg/mL %100,33	1,505 mg/mL %100,33
Miktar Tayini Krosetin	0,0500 mg/mL 0,0450-0,0550 mg/mL (%90,00-%110,00)	ICH Q6A	0,0503 mg/mL %100,55	0,0503 mg/ml %100,53	0,0502 mg/mL %100,37	0,0501 mg/mL %100,26	0,0503 mg/mL %100,61	0,0503 mg/mL %100,57	0,0503 mg/mL %100,57

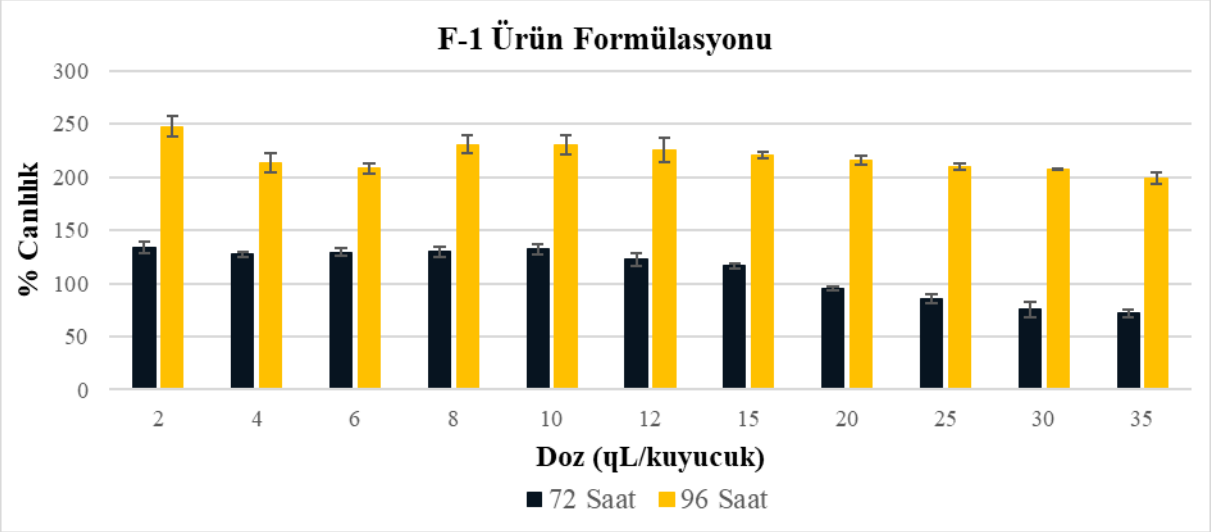
4.7. Antimikrobiyal Etkinlik Testi Analizi Bulguları

%50, %60, %70, %80, %90 ve %100 oranlarda krosetin bulunan formülasyonlar için yapılan AET sonuçlarında mikrobiyal olarak üreme olmadığı tespit edilmiştir. Oluşturulan formülasyonun içerisinde bulunan farklı konsantrasyonlardaki antimikrobiyal koruyucu olarak görev yapan krosetinin ilacı çeşitli mikroorganizmalara karşı koruduğu tespit edilmiştir.

4.8. Yetişkin İnsan Kaynakli Retinal Pigment Epiteli (ARPE-19) Hücreleriyle Brimonidin Tartarat ve Krosetin Etkin Maddelerinin Sitotoksisite Testi Bulguları

4.8.1. F-1 Ürün Formülasyonu Sitotoksisite Bulguları

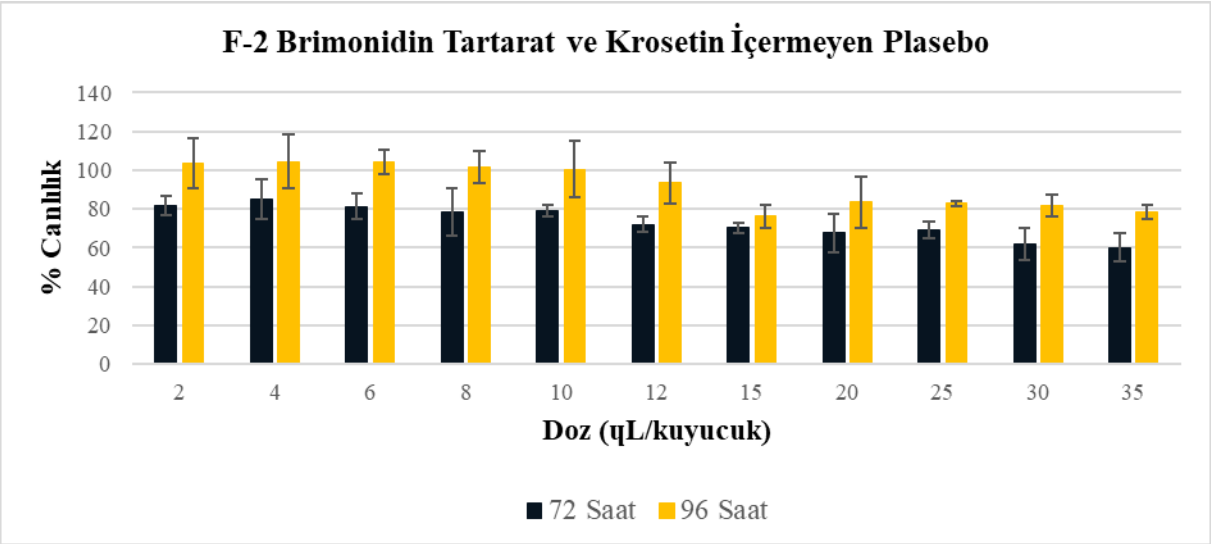
Taşıyıcı formülasyona ait 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 ve 35 µL/kuyucuk dozlarında 72 ve 96 saatlik zamanlarda ARPE-19 hücreleri üzerinde uygulanan toksisite çalışması sonucu kullanılan doz-%canlılık değerleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. Oluşturulan formülasyonun kullanılan dozlardan bağımsız olarak proliferik etki yaptığını gösterir.



Şekil 4.11. F-1 formülasyonunun ARPE-19 hücreleri kullanılarak 72 ve 96 saatlik sitotoksisite testi çalışması

4.8.2. F-2 Brimonidin ve Krosetin İçermeyen Plasebo Sitotoksisite Bulguları

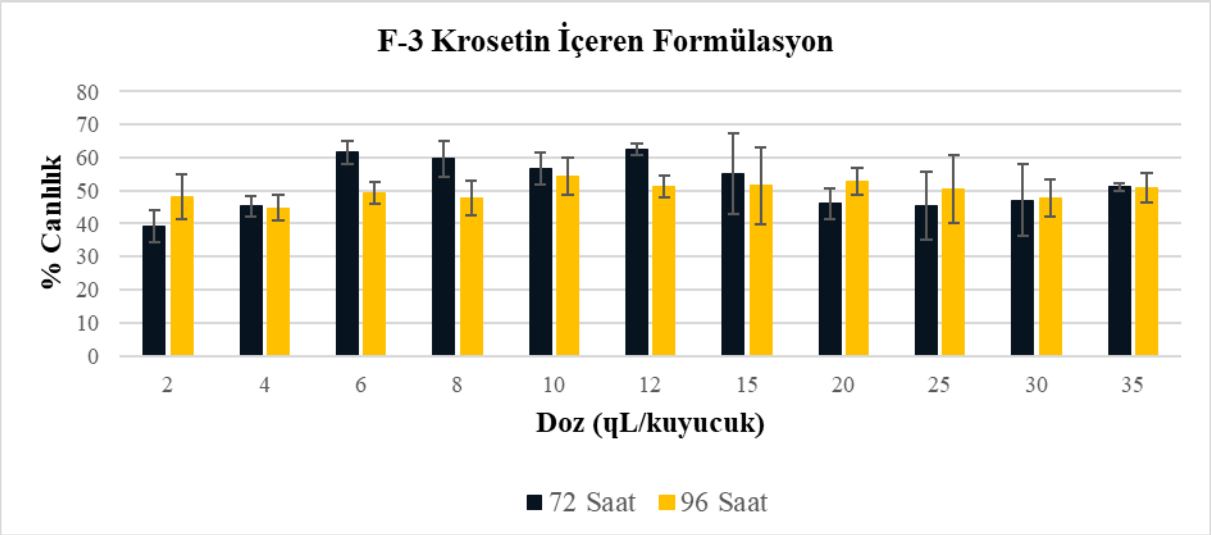
Taşıyıcı formülasyona ait 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 ve 35 µL/kuyucuk dozlarında 72 ve 96 saatlik zamanlarda ARPE-19 hücreleri üzerinde uygulanan toksisite çalışması sonucu kullanılan doz-%canlılık değerleri Şekil 4.12.'de verilmiştir. Plasebo içerisinde bulunan yardımcı maddeler herhangi bir toksik etki oluşturmamaktadır.



Şekil 4.12. F-2 plasebosunun ARPE-19 hücreleri kullanılarak 72 ve 96 saatlik sitotoksisite testi çalışması

4.8.3. F-3 Krosetin İçeren Formülasyonun Sitotoksisite Bulguları

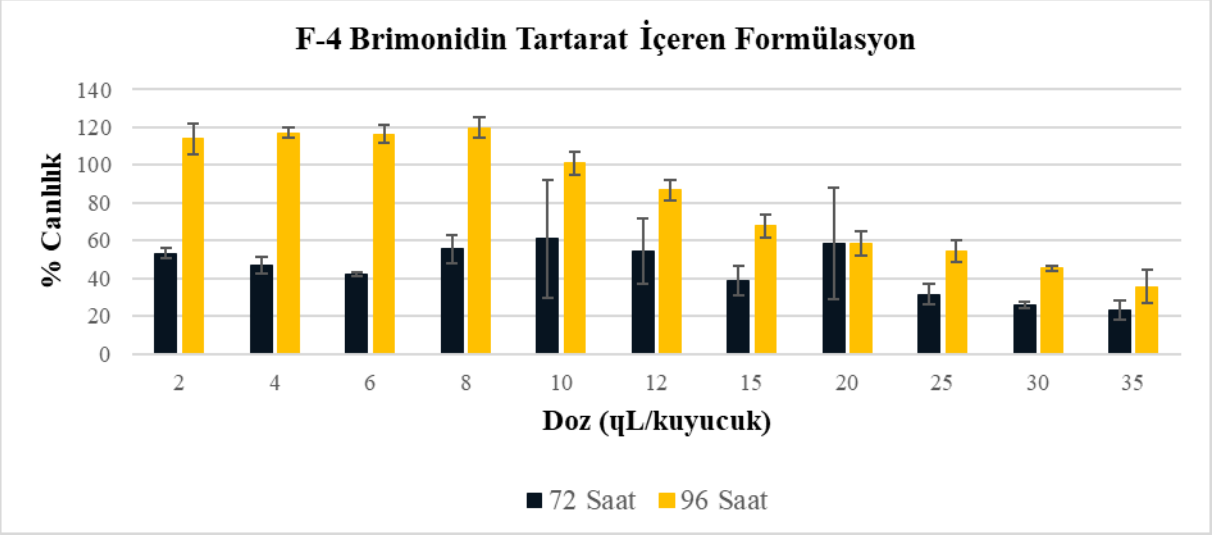
Krosetin içeren formülasyona ait 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 ve 35 µL/kuyucuk dozlarında 72 ve 96 saatlik zamanlarda ARPE-19 hücreleri üzerinde uygulanan toksisite çalışması sonucu kullanılan doz-%canlılık değerleri Şekil 4.13.'te verilmiştir. Etkin maddelerden sadece krosetini içeren ve çözücüsü olan metanolün varlığının toksik etkisinin de incelendiği formülasyonda zaman periyotları arasında hücre canlılığı üzerinde toksik bir etki oluşturmamaktadır. Krosetin antimikrobiyal olarak ürünü korumuş ve herhangi bir mikrobiyal üreme yaşanmamıştır.



Şekil 4.13. F-3 formülasyonunun ARPE-19 hücreleri kullanılarak 72 ve 96 saatlik sitotoksisite testi çalışması

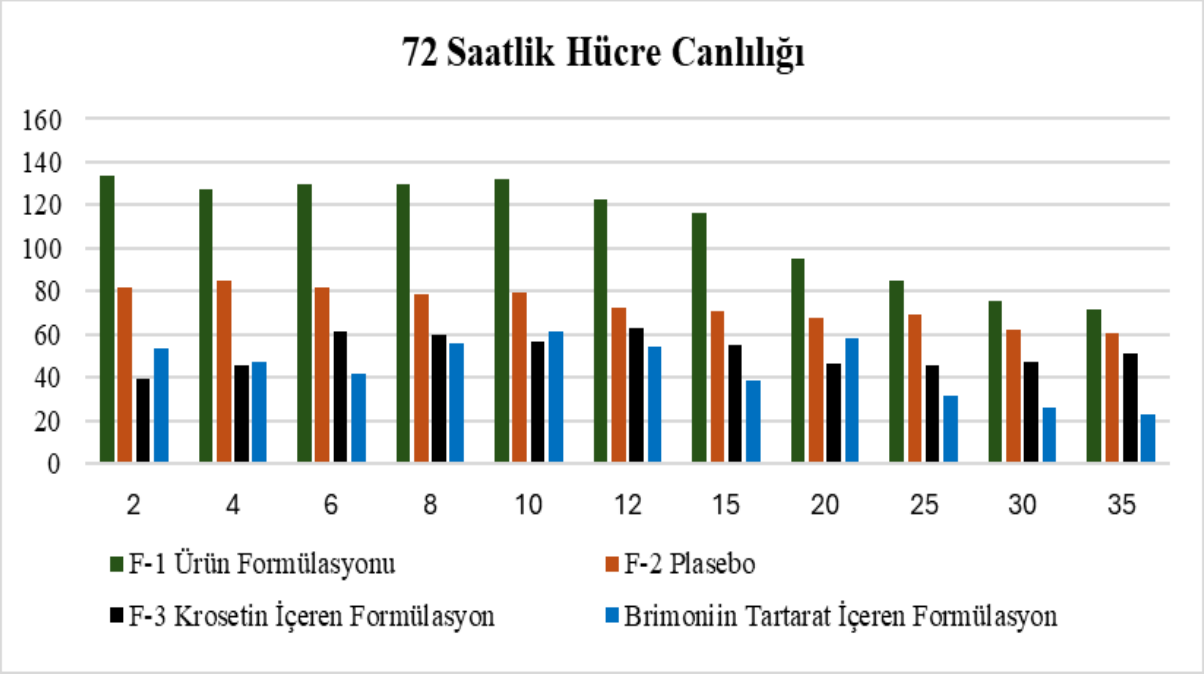
4.8.4. F-4 Brimonidin Tartarat İçeren Formülasyonun Sitotoksisite Bulguları

Brimonidin tartarat içeren formülasyona ait 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 ve 35 µL/kuyucuk dozlarında 72 ve 96 saatlik zamanlarda ARPE-19 hücreleri üzerinde uygulanan toksisite çalışması sonucu kullanılan doz-%canlılık değerleri Şekil 4.14.'te verilmiştir. Brimonidin tartarat içeren formülasyon, antimikrobiyal koruyucu içermediğinden dolayı ürünün bozunduğu ve mikrobiyal olarak uygun olmadığından üreme yaparak toksik etkilere sebebiyet verdiği görülmektedir. Belirgin bir şekilde hücre canlılığında azalma mevcuttur.

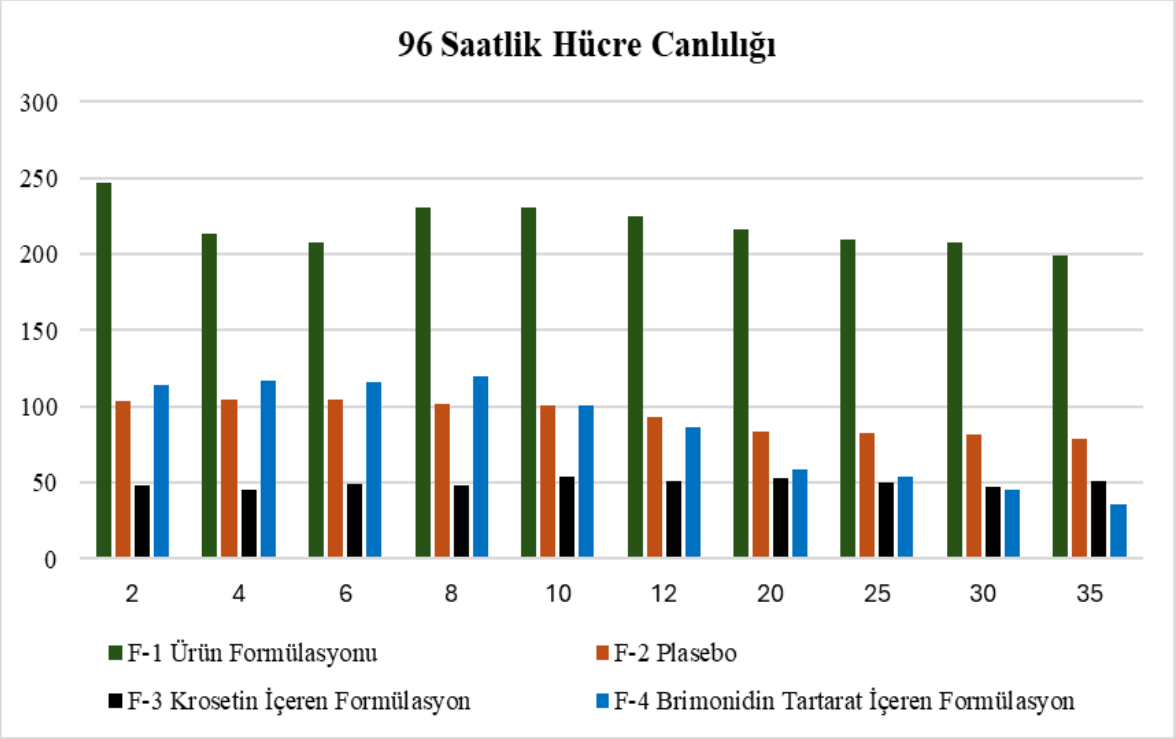


Şekil 4.14. F-4 formülasyonunun ARPE-19 hücreleri kullanılarak 72 ve 96 saatlik sitotoksisite testi çalışması

F-1, F-2, F-3 ve F-4 formülasyonlarına ait 72 ve 96 saatlik sitotoksisite çalışmaları Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'de verilmiştir.



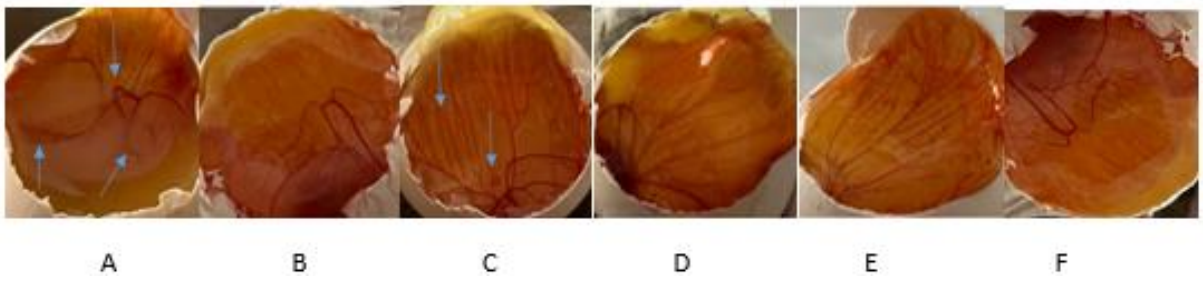
Şekil 4.15. F-1, F-2, F-3 ve F-4 formülasyonlarının ARPE-19 hücreleri kullanılarak 72 saatlik sitotoksisite testi çalışması



Şekil 4.16. F-1, F-2, F-3 ve F-4 formülasyonlarının ARPE-19 hücreleri kullanılarak 96 saatlik sitotoksisite testi çalışması

4.9. Tavuk Yumurtası Karyoallontoik Membran (HET-CAM) Testi Bulguları

Formülasyonların tahriş etkisi puanlama sistemleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 2,3). Negatif kontrol (% 0,9 Sodyum Klorür) ve pozitif kontrol (0,1 N Sodyum Hidroksit) elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Brimonidin tartarat içeren formülasyon korioallantoik membrana uygulandığında 299,7 ± 0,01 saniye sonra vasküler lizis gözlendi ve tahriş skoru 1,3 ± 0,1 ve hafif tahriş edici olarak bulunmuştur. Krosetin, brimonidin tartarat ve plasebo formülasyonlar uygulandığında kanama, vasküler lizis ve pıhtılaşma gözlenmedi ve herhangi bir tahrişe neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. HET-CAM test sonuçlarının fotoğrafları (300 dakika sonunda). Oklar değişiklikleri göstermektedir. A) Pozitif kontrol grubu, B) Negatif kontrol grubu, C) Brimonidin tartarat içeren formülasyon, D) Brimonidin tartarat ve krosetin içermeyen plasebo E) Krosetin içeren formülasyon F) Taşıyıcı formülasyonu.

5. TARTIŞMA

Göz içi basıncın artmasına bağlı olarak ganglion hücrelerindeki deformasyonla oluşan glokom hastalığı dünya üzerinde 2020'nin başlarıyla beraber 76 milyon insanda görülmüş olup, tedavisi için kullanılan göz preparatlarına bakıldığında göz içi basıncı düşürmek için kullanılan prostaglandin analog grupları, beta blokerler ve alfa-2 adrenerjik agonist grubu etkin maddelerle bunların kombinasyonlarının bulunduğu formülasyonlar yaygın olarak kullanılmaktadır (143-45). Alfa-2 adrenerjik agonist grubu arasında seçiciliği yüksek ve düşük yan etkilere sahip olan brimonidin tartarat etkin maddesinin göz içi basıncını büyük ölçüde düşürdüğü yapılan klinik çalışmalar sonucu doğrulanmıştır (146,147). Bu preparatların içerikleri incelendiğinde etkin madde ile antimikrobiyal koruyucu ajanların, tamponlama ajanlarının, pH ayarlama çözeltilerinin ve çözücülerinin kullanıldığı görülmektedir. Antimikrobiyal ajan olarak genellikle benzalkonyum klorür maddesi tercih ediliyor olmasına rağmen yapılan son çalışmalar, bu koruyucunun göz hastalıkları tedavisinde toksik bir etki yarattığını göstermiştir (113,148,149).

Günümüz ilaçlarının içeriğinde bulunan doğal bitki bazlı bileşenler yaklaşık olarak %25'lik bir dilimi oluşturmaktadır. İlaçların %75'lik kısmını ise mevcutta bulunan ve ilaç sektörleri tarafından yaygın olarak kullanılan kimyasal bileşenler oluşturmaktadır (150). Bitki esaslı doğal bileşenler farklı moleküler yapıya sahip oldukları için çeşitliliği fazla, toksisitesi düşük ve kendilerine özgü biyolojik ya da kimyasal özellikler sergilemektedir (151). Doğal tabanlı ürünler üretebilmek için kullanılması planlanan bileşenlerin doğada bulunan yapıların kimyasal özelliklerinin taklit edilmesiyle sentetik açıdan uygun tasarımlara ilgi doğmuştur (152). Tedavilerde oluşabilecek istenmeyen bir toksisite durumunun önüne geçmek için sentetik ürünler doğal ürünlerle beraber kullanılmaktadır (153). Formülasyon çalışması için antimikrobiyal ajan belirlenirken yapılan klinik araştırmalar göz önüne alındığında etkin maddenin aktivitesini ve formülasyonun bütünlüğünü korumak için doğal olarak elde edilebilecek alternatif koruyucular araştırılmıştır. Antioksidan özelliğe sahip olan ve doğal olarak safran bitkisinden elde edilen krosetin maddesi ile ilgili yapılan in vitro çalışmalarda göz epitel hücrelerindeki kontrolsüz çoğalmanın önüne geçildiği, retina hücrelerinde oluşan hasarları azalttığı ve diyabetik retinopati tedavilerinde de fayda sağladığı tespit edilmiştir. (119,121,125). Glokomlu hastaların retinalarındaki ganglion hücrelerinin seçiciliği zaman içerisinde kaybolmaktadır. Krosetinin glokom tedavisinde oral olarak kullanılmasına bağlı

olarak retina epitelindeki hücre hasarını önlemekte ve göz içi basıncın düşürülmesinde aktif rol oynamaktadır (127). Benzalkonyum klorüre alternatif olabilecek krosetin, oluşturulan formülasyonda hem etkin madde hem de antimikrobiyal koruyucu ajan olarak rol oynamaktadır. Aynı zamanda hidrojel yapısında göz damlası oluşturabilmek için glokom tedavilerinde ve göz kuruluğunda sıklıkla tercih edilen, aynı zamanda biyoyararlanımı yüksek ve pH'a duyarlı doğal kaynaklı hyaluronik asit kullanımı hedeflenmiştir.

Literatür verileri doğrultusunda, hidrojel formunda bir oftalmik formülasyonun geliştirilmesinin, göz damlalarının biyoyararlanımını artırmak ve oküler yüzeyle temas süresini uzatmak için etkili bir yaklaşım olacağı önerilmiştir (55,56). Kimyasal uyaranlara yanıt olarak oluşan hidrojeller, polimer zinciri ve çözücü arasındaki etkileşimler ve iyonik reaksiyonlar nedeniyle şişerek veya büzülerek reaksiyon gösterir (154). Formülasyon için hyaluronik asit seçimi, pH ortamına yanıt olarak yapısal değişikliklere uğradığı ve şişerek veya büzülerek etki gösterdiği varsayımına dayanmaktadır. Bu değişiklikler asidik veya bazik fonksiyonel grupların varlığına atfedilmektedir.

Formülasyonda kullanılmasına karar verilen brimonidin tartarat için yapılan fizikokimyasal karakterizasyon çalışmalarında FTIR cihazı kullanılarak N-H, O-H, C-H, C=O ve C=C moleküler bağ grupları saptanmış ve bunlara karşılık gelen dalga sayıları elde edilmiştir (Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.). Literatür verilerine bakıldığında brimonidin tartarat FTIR cihazında yapılan analizi sonucunda N-H bağ grubu 3438 cm^{-1}, C-N bağ grubu 1600 cm^{-1} ve C=O bağ grubu ise 1732 cm^{-1} bantlarında elde edilmiş olup yaptığımız analizler ile araştırılan veriler brimonidin tartarata ait bağ gruplarının benzer dalga boylarında örtüştüğü görülmektedir (155). MS cihazındaki kütle/yük değerleri için Şekil 4.2. ve Şekil 4.3. incelendiğinde 292'deki sinyalin ana iyonlara karşılık geldiği görülmektedir. Tartaratlı yapıda oluşan kayıp %25 çarpışma enerjisi altında kolay ayrılma sergilediği ve 150-250 aralığında yoğun bir sinyal ürettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.). Ayrıca halojenli aromatik yapıların 140-160 aralığında sinyal verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5.). Literatür verilerine bakıldığında en yoğun olarak 212 ve 249'da sinyal verdiği analiz sonucuyla ortaya konulmuş olup brimonidin tartarat molekülüne ait kütle/yük oranını vermektedir (156).

Brimonidin tartarat için yapılan araştırmalarda ölçülen absorbans değerlerinin fosfat tamponunda 247 nm ve borat tamponunda 257 nm dalga boyunda en yüksek absorbansı verdiği bildirilmiştir (157,158). Bu çalışmada brimonidin tartarat metanolde çözülmüş olup 5, 10, 15, 20, 25, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanarak UV cihazında

analizlenmiştir. En yüksek absorbansı 245 nm'de verdiği Şekil 4.6.'da belirlenmiştir. Doğru denklemi y = 0,0567x + 0,0473, eğimi 0,0567 ve regresyon katsayısı 0,9994 elde edilmiştir. R^2'nin 1'e yakınlığı elde edilen verilerin doğrusallığını ifade etmektedir. Validasyon çalışmaları kalite açısından incelendiğinde Tablo 4.3.'te geri kazanımın %100'e yakın ve varyasyon katsayısının da %2'den küçük olmasıyla beraber kesinlik ve ara kesinlik bulguları da Tablo 4.7.'de incelendiğinde absorbans ölçümlerinin tutarlılığını ifade etmektedir. LOD, LOQ değerleri sırasıyla 0,873 ve 2,646 olarak hesaplanmıştır. 40 µg/mL konsantrasyonlu brimonidin tartarat çözeltilerinin stabilitesi başlangıçta, 24 saatte ve 48 saatte belirlenmiştir. Çözeltiler, 40°C ± 2, 25°C ± 2, 5°C ± 3 ve -20°C ± 5°C'deki stabilite kabinlerinde saklanmıştır. Tablo 4.9'da gösterildiği gibi, veriler dört farklı stabilite ortamının saklama koşulları için uygun olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. 25°C ± 2'de %99,92 ve 5°C ± 3'te %99,98 konsantrasyon değişimi elde edilmiş ve bu iki koşul altında stabilitenin izlenmesi tercih edilmiştir.

Araştırmalar krosetinin UV cihazı kullanılarak analizlendiğinde borat tamponunda 433-441 nm dalga boyunda en yüksek absorbansı verdiği çalışmalarda belirtilmiştir (159). Yaptığımız UV çalışmasında Şekil 4.8'de gösterildiği gibi metanolde çözülmüş krosetinin 5, 10, 15, 20, 25, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında ölçülen en yüksek absorbansın 420-440 nm olduğu bulunmuştur. Doğru denklemi y = 0,197x + 0,5342, eğimi 0,197 ve regresyon katsayısı 0,998 elde edilmiştir. R2'nin 1'e yakın olması elde edilen verilerin doğrusallığının bir parametresidir. Tablo 4.11.'de gösterildiği gibi, geri kazanım %100'e yaklaşır ve varyasyon katsayısı %2'den azdır. Kesinlik ve ara kesinlik bulguları da Tablo 4.15.'te incelendiğinde absorbans ölçümlerinin tutarlılığını ifade etmektedir. LOD, LOQ değerleri sırasıyla 0,519 ve 1,574 olarak hesaplanmıştır. 40 µg/mL konsantrasyonlu krosetin çözeltileri, 40°C ± 2°C, 25°C ± 2°C, 5°C ± 3°C ve -20°C ± 5°C sıcaklıklarındaki stabilite kabinlerine kaldırılarak, başlangıç, 24 saat ve 48 saatlik periyotları dikkate alınmış olup Tablo 4.17'de gösterildiği gibi, elde edilen verilere dayanarak 5°C ± 3°C saklama koşulu optimum seçenek olarak belirlenmiştir.

Brimonidin tartarat ve krosetin içeren metanol çözeltileri hazırlanmıştır. Brimonidin taratın 245 nm, krosetinin 420-440 nm olmak üzere farklı dalga boyunda absorbans verdikleri Şekil 4.10.'da görülmüş olup birbiri ile herhangi bir girişim yapmadığı bulgusuna varılabileceği ve iki etkin maddenin de formülasyonun içerisinde kullanıldığında kolaylıkla ayırt edilebileceği düşünülmektedir. Her iki etkin madde için ayrı ayrı yürütülen stabilite

çalışmalarının 5°C ± 3 saklama koşulu altında formülasyon için uygun olabileceği varsayılmaktadır ve yapılacak stabilite analizleriyle desteklenmiştir.

Yapılan çözünürlük çalışmaları kapsamında brimonidin tartaratın en yüksek çözünürlüğü Tablo 4.20.'de verildiği üzere distile suda %8,0 ve metanolde %0,80 konsantrasyonunda elde edilmiştir. Krosetin için çözücü ortamını belirlemek ve ilgili formülasyonu oluşturabilmek için distile suda en yüksek %0,0003 konsantrasyonda çözünebildiği Tablo 4.21.'de görülmüş olup sudaki çok düşük çözünürlüğüyle açıklanabilir. Metanol ortamında ise en yüksek %0,10 konsantrasyonunda çözünebileceği Tablo 4.22.'de ölçülen absorbans değerleriyle de desteklenmiştir. Metanolün göz ürünlerinde toksik etki yaratacağı bilinse de yapılan ARPE-19 hücre hattı sitotoksisite ve HETCAM çalışmalarıyla irrite etmeden kullanılabilirliğini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir.

Formülasyon çalışması oluşturulurken Tablo 2.4. incelendiğinde brimonidin tartarat etkin maddesinin mevcut preparatlarda 1,5-2 mg/mL konsantrasyon aralığında bulunduğu gözlemlenmiş olup en düşük doz olarak 1,5 mg/mL kullanılması tercih edilmiştir. Krosetin miktarı belirlenirken yapılmış olan çalışmalar doğrultusunda insan gözünde bulunan koroid tabakasında oluşan damarlanmanın sebebiyet verdiği gözdeki hücre ölümünün körlüğe kadar gitmesine istinaden 100-400 µg/M konsantrasyon aralığında test edilmiş olup 100-200 µg/M konsantrasyonlarında hücre canlılığının sağlandığı fakat 200 µg/M konsantrasyonun üzerinde çalışıldığında hücre inhibasyonuna sebebiyet verdiği bildirilmiştir (160). Bu durumda orta düzeyde bir konsantrasyon değeri olarak 150 µg/M krosetin kullanılarak formülasyon tasarlanmıştır. Tablo 2.2'de görüldüğü gibi hidrojel formunun sağlanabilmesi için pH'a duyarlı hyaluronik asidin optimum konsantrasyonu 1,5 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Glokom tedavisinde kullanılan oküler preparatları Tablo 2.4.'te yer alan yardımcı madde içeriklerinin ayrıntılı olarak incelenmesi sonucunda tonisite ajanı olarak 6,80 mg/mL sodyum klorür kullanılacağı ve böylece ozmotik stabilitenin sağlanacağı düşünülmüştür. Ayrıca optimum pH seviyelerini korumak için tampon ajan olarak 0,56 mg/mL disodyum fosfat dodekahidrat ve 0,04 mg/mL sodyum fosfat monobazik belirlenmiştir. Formülasyon çalışmaları sırasında brimonidin tartaratın sudaki pH'ının 3,0 olduğu ve ürünün de pH'sının tartarat tarafından düşürüldüğü farkedilmiştir. Optimum pH koşullarını belirlemek amacıyla formülasyonun 100 mL'ine 0,075 g %1'lik sodyum hidroksit çözeltisi eklenmesinin pH değerini 7,3'e ayarlamak için uygun olduğu belirlenmiştir.

Oftalmik formülasyonların başlangıç ve stabilite periyotlarında gerçekleştirilen kalite testleri USP<771> monografı ve klinik çalışmalara dayanarak geliştirilmiştir. Görünüş, pH, viskozite, yoğunluk, osmolalite ve miktar tayini testleri için spesifikasyon limitleri Tablo 4.29.'da verilmiştir. Bitmiş ürün stabilite test koşulları Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından belirlenen kılavuza uygun olarak gerçekleştirilmiştir (161,162). Oluşturulan formülasyonun;

- pH değeri 7,3'e ayarlanmış ve ölçümler yapılmıştır. Tablo 4.24.'te 7,30 ± 0,01 değeri elde edilmiştir. Klinik araştırmalar incelendiğinde insan gözü için 6,0-7,4 aralığı tolere edilebilir bir değerdir. Bu limitler hasta için herhangi bir olumsuz durum içermeyip göz için kullanıma uygun olup ilacın etkinliğini ve stabilitesini etkilememektedir (163). Güncel kullanılan göz preparatlarına bakıldığında ise pH 5,5 değerine sahip brimonidin tartarat içeren göz damlasının olduğu görülmüştür (112,113).
- Viskozimetre ile ölçülen viskozite değerleri Tablo 4.25'te 22,4 ± 0,10 cP olarak elde edilmiştir. Literatür araştırmalarına göre normal insan göz yaşının vizkositesi 1-10 cP aralığındadır. Glokomlu hastalarda bu değer 25-35 cP arasında değişiklik göstermektedir (164). Hafif viskoz ve içerisinde jelleştirici ajan bulunan göz damlası preparatlarının viskozitesi 10-30 cP aralığındadır (165). %0.1 veya %0,15 Brimonidin tartarat içeren ve glokomlu hastalarda kullanılan göz damlalarının viskozite değerleri ise göz yaşına yakın olmakla beraber 3-4 cP'dur (166). %0,15 Hyaluronik asit içeren göz damlalarının viskozite değerleri için 20-40 cP aralığındadır (167).
- Yoğunluk analizi sonuçları Tablo 4.27'de gösterildiği gibi 1,0029 ± 0,0003 g/mL olarak ölçülmüştür. Oftalmik formülasyonlara yapılan başlangıç ve stabilite periyotları boyunca da takip edilen yoğunluk analizi ICH Q6A'ya göre üretici tarafından ürünün özelliği baz alınarak bilgi amaçlı bakılabilmektedir. Göz damlaları için herhangi bir spesifikasyona gerek olmadığı belirtilmiştir (168).
- Osmolalite bulgularının incelenmesinde kullanılan tonisite ajanlarının etkinliğinin göz önünde bulundurulması önemlidir. Tablo 4.28'de 286 ± 2 mOsm/kg değerinin ölçülmesiyle sonuçlanmıştır. Göz içi osmolalite değerinin 280-300 mOsm/kg olduğu bilinmektedir (163,169). Güncel kullanılan göz preparatlarına bakıldığında ise osmolalite 250-350 mOsm/kg spesifikasyonlarına sahip brimonidin tartarat içeren göz damlasının olduğu görülmüştür (113).

- Stabilite analizleri boyunca, UV cihazı kullanılarak belirlenen miktar tayini analizinde brimonidin tartarat ve krosetin etkin maddeleri için spesifikasyonları ICH Q6A kılavuzu doğrultusunda aksi belirtilmedikçe %90,0'dan az olmamalıdır. Bu yüzden miktar tayini limit aralıkları %10'luk bir değişimle alt ve üst limit olarak belirlenmiştir (168).

Damlacık boyutu analizi, ürünün LDPE şişenin damlalığından çıkan her bir damlanın ağırlığının tutarlı olup olmadığını belirleme yöntemidir (170). Çalışmamızda üç tekrar olarak ölçülen ve on farklı damladan alınan ağırlıkların ortalama değerleri 30 ± 0,02 mg olarak elde edilmiştir. Her damlacık için farklı ağırlık değerleri elde edilmesi, hastaya uygulanan dozda değişikliklere yol açma potansiyeline sahiptir ve bu da istenmeyen bir durumdur. İlacın kalitesine yönelik, tutarlı, homojen ve berrak bir çözelti elde etmek üzere tasarlanan hedefli analizlere uygun olarak, her damlacığın ağırlığı da tutarlı olmalıdır (171).

Antimikrobiyal etkinlik testleri FDA tarafından oftalmik formülasyonlar için istenen, gerçek kullanım koşullarını taklit eden bir ortamda yapılan çok amaçlı koruyucu testlerinin bir kategorisini temsil eder (131). Stabilite takibi boyunca değişen stabilite koşullarında formülasyonda yaşanabilecek koruyucu madde miktarındaki azalmanın olması muhtemeldir. Bu yüzden yapılan antimikrobiyal etkinlik testi sonuçlarına göre analizlenmiş olan %50, %60, %70, %80 ve %90 oranlarında krosetin içeren formülasyonların içerdikleri krosetin miktarlarının %100'den düşük olmasına rağmen ürünü çeşitli mikroorganizmalara karşı koruduklarını belirtilmiştir. Bu bulgu krosetinin mikrobiyal açıdan oluşabilecek kontaminasyonlara karşı koruyucu bir rol oynadığını ve güvenilirlik açısından üründe düşük konsantrasyonlarda bulunma oranlarının uygun olduğunu göstermektedir.

Göz retina epitel hücrelerine benzer yapıya sahip olan ARPE-19 hücre hattı kullanılarak sitotoksisite çalışmaları yapılmaktadır. Bu hücre hattında bulunan hücrelerin iki katına çıkması için en az 3 gün boyunca inkübe edilmesi gerekmektedir (172,173). Literatür verileri ışığında sitotoksisite çalışmalarında sadece brimonidin tartarat kullanılan çözeltideki hücre canlılığının %96,5 olduğu görülmüş olup brimonidin tartaratın toksik bir etki yaratmadığı grafiklerle gösterilmiştir (174). Krosetin için yer alan sitotoksisite çalışmalarında ise oksidatif hasar oluşturulan ARPE-19 hücre hattına uygulandığında hücre canlılığını artırdığı ve reaktif oksijen seviyesini azalttığını belirtmiştir (175,176). Oluşturulan plasebo ve formülasyonların ARPE-19 hücre hattında 72 ve 96 saatlik sitotoksisite çalışmaları bu doğrultuda yapılmıştır. Şekil 4.11. incelendiğinde F-1 formülasyonu 72 ve 96 saatlik toksisite

çalışmasında hücre canlılığının %100'ün üzerinde olduğu görülmektedir. 96 saatlik çalışma sonunda ise canlılık yaklaşık 2 katına kadar çıkmaktadır. F-1 formülasyonunun, kullanılan dozlardan bağımsız olarak proliferik etki yarattığı gözlemlenmiştir. 25 µL/kuyucuk ve üzerindeki dozlarda ise kuyucuk hacminin 1/6'sını geçmesine rağmen herhangi bir toksisite oluşturmamıştır. Krosetinin formülasyonu antimikrobiyal olarak koruduğu ve ürünün bozulmadığı tahmin edilmekle beraber içerisinde bulunan metanolün de göz damlalarında toksik etki yarattığı bilinmesine rağmen oluşturulan formülasyonun hücre canlılığını azaltmadığı ve toksik olmadığı tespit edilmiştir. F-2 iki etkin maddeyi içermeyen plasebonun ekiminin yapıldığı hücrelerde 72 ve 96. saat periyotlarında %60-100 aralığında hücre canlılığı görülmektedir (Şekil 4.12.). Plasebo içerisinde bulunan yardımcı maddelerin herhangi bir toksik etkisi gözlenmemiştir. Bu durum oluşturulan ürün formülasyonundaki etkin maddelerin hücre canlılığı üzerinde bir düşüş yaratmadığını ifade etmektedir. Krosetin içeren F-3 formülasyonunda 72 ve 96 saatlik zaman diliminde 2-35 µL/kuyucuk dozlarında hücre canlılığı %40-60 aralığında değişmektedir (Şekil 4.13.). Etkin maddelerden sadece krosetini içeren ve çözücüsü olan metanolün varlığının toksik etkisinin de incelendiği formülasyonda zaman periyotları arasında hücre canlılığı üzerinde toksik bir etki görülmemektedir. Bu durum krosetin için, oluşturulan formülasyonu antimikrobiyal olarak bir kez daha koruduğunu düşündürmektedir. Brimonidin tartarat içeren F-4 formülasyonunda durum farklı olup toksik etki oluşmaktadır (Şekil 4.14). Krosetin içermediği için içerisinde metanol olmamasına rağmen hücre canlılığının 2- 35 µL/kuyucuk dozlarında 72 saatte %20–60, 96 saatte %30–120 aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum formülasyonun antimikrobiyal koruyucu içermediğinden dolayı ürünün bozulduğu ve mikrobiyal olarak uygun olmadığından üreme yaparak toksik etkilere sebebiyet verdiğini işaret etmektedir. Belirgin bir şekilde hücre canlılığında azalma mevcuttur. 72 ve 96 saatlik sitotoksisite çalışmasında nihai formülasyonun toksik etki yaratmadığı Şekil 4.15 ve 4.16'da tekrardan vurgulanmıştır.

Formülasyonun oküler yüzeyde oluşturabileceği herhangi bir tahriş durumunu tespit edebilmek için embriyolu tavuk yumurtaları kullanılarak içerisinde bulunan karyoallantoik membran (CAM) üzerinde yapılan ve özel olarak alınan yumurtalarda bulunan zarın yapısındaki damarların tavşanların göz epitel damarlarına benzediği bilinen HET-CAM testinde hazırlanan brimonidin tartarat ve krosetin içeren formülasyonun oküler uygulama için güvenli olduğu gösterilmiştir. Kuru göz hastalığı ve CNP tedavisinde, bilim insanları son zamanlarda aktif maddeleri ve formülasyonları ve bunların toksisitesini, tahriş gücünü ve

oküler toleransını incelemiştir. Yapılan bir çalışmada timolol maleat bazlı in-situ jelin oküler tahrişinin CAM üzerinde değerlendirildiği bildirilmiştir (177). Brinzolamid nanoemülsiyonlarının oküler tahrişi, in vivo HET-CAM testi kullanılarak araştırılmıştır (178). Vorikonazol katı lipit NP'nin CAM üzerindeki tahriş gücü daha önce bildirilmiştir (179). Kuru göz hastalığının tedavisi için etkili, daha az toksik ve tahriş edici ilaçlara olan ilgi artmakta ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde HET-CAM testi ile brimonidin tartarat ve krosetin içeren formülasyonun üzerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle sonuçlarımızın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Formülasyon %0,15 brimonidin tartarat, %0,005 krosetin etkin maddesi ve %0,15 hyaluronik asit yardımcı maddesi ile pH'a duyarlı bir göz damlası potansiyeli taşımaktadır. Yapılan UV validasyon testleri, iki etkin maddenin de farklı bölgelerdeki dalga boylarında absorbans verdiğini ve birbirleriyle etkileşime girmediğini göstermiştir. Brimonidin tartarat ve krosetinin glokom hastalarındaki terapötik özelliklerini ve krosetinin doğal bir antimikrobiyal koruyucu özelliğini kullanarak oluşturulan formülasyonun, günümüz göz preparatlarında bulunan toksik etkili koruyucular kullanılmadan ürünü koruduğu yapılan AET'lerle desteklenmiştir. Formülasyonun sitotoksisite ve biyouyumluluk çalışmaları için göz epitel hücrelerine benzer ARPE-19 hücreleri kullanılarak hücre canlılığının 72. saatte başladığını ve bu süre sonrasında yapılan MTT testiyle canlılığın sürdürüldüğü tespit edilmiştir. Bu durum kullanılan etkin ve yardımcı maddeler göz epitel hücreleri üzerinde toksik bir etki yaratmadığını göstererek hedeflenen biyouyumluluğu sağlayabileceği değerlendirilebilir.

Sitotoksisite çalışmaları neticesinde; oluşturulan nihai formülasyonun içerisinde bulunan etkin ve yardımcı maddelerin göz için kullanımında herhangi bir toksik etki yaratmadığı ortaya konulmuştur. Formülasyonda yer alan çözücü olarak kullanılan metanolün, ARPE-19 ve HET-CAM sitotoksisite çalışmalarıyla göz damlalarında %5 kullanım oranının toksik etki yaratmadığına kanaat getirmekle beraber klinik araştırmalar için yol gösterici, sürdürülebilir bir çalışma olabileceği ve mutlaka klinik çalışmalarının yapılmadan kullanımının mümkün olmadığının belirtilmesi önem arz etmektedir.

Brimonidin tartarat ve krosetini birlikte içeren bir göz preparatı bulunmamakta olup oluşturulan formülasyon doğal yapılı göz damlası olarak yeni formülasyonlara ışık tutacağı düşünülmektedir. Yeşil mutabakata bağlı kalınarak doğal içeriklerin eklenmesiyle konvansiyonel ilaç dozunun düşürülmesi ve daha az dozda ama etkin, yan etkileri az formülasyonların oluşturulması amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, et al. Vision Loss Expert Group. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health. 2017 Sep;5(9):e888-e897. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30293-0. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28779882.

2. Novack GD, Asbell P, Barabino S, Bergamini MVW, Ciolino JB, Foulks GN, et al. TFOS DEWS II Clinical Trial Design Report. Ocul Surf. 2017 Jul;15(3):629-649. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.009. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28736344; PMCID: PMC8557254.

3. Bachu RD, Chowdhury P, Al-Saedi ZHF, Karla PK, Boddu SHS. Ocular Drug Delivery Barriers-Role of Nanocarriers in the Treatment of Anterior Segment Ocular Diseases. Pharmaceutics. 2018 Feb 27;10(1):28. doi: 10.3390/pharmaceutics10010028. PMID: 29495528; PMCID: PMC5874841.

4. Rodrigues EB, Grumann A Jr, Penha FM, Shiroma H, Rossi E, Meyer CH, et al. Effect of needle type and injection technique on pain level and vitreal reflux in intravitreal injection. J Ocul Pharmacol Ther. 2011 Apr;27(2):197-203. doi: 10.1089/jop.2010.0082. Epub 2011 Feb 12. PMID: 21314588.

5. Guzman-Aranguez A, Colligris B, Pintor J. Contact lenses: promising devices for ocular drug delivery. J Ocul Pharmacol Ther. 2013 Mar;29(2):189-99. doi: 10.1089/jop.2012.0212. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23215541.

6. Torres-Luna C, Fan X, Domszy R, Hu N, Wang NS, Yang A. Hydrogel-based ocular drug delivery systems for hydrophobic drugs. Eur J Pharm Sci. 2020 Nov 1;154:105503. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105503. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32745587.

7. Onugwu AL, Nwagwu CS, Onugwu OS, Echezona AC, Agbo CP, Ihim SA, Emeh P, Nnamani PO, Attama AA, Khutoryanskiy VV. Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. J Control

Release. 2023 Feb;354:465-488. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.01.018. Epub 2023 Jan 19. PMID: 36642250.

8. Steven DW, Alaghband P, Lim KS. Preservatives in glaucoma medication. Br J Ophthalmol. 2018 Nov;102(11):1497-1503. doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-311544. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29973365; PMCID: PMC6241623.

9. National Library of Medicine (Online Database), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Patent Summary for US-9220694-B2, Emulsion compositions containing cetalkonium chloride; [cited 2025 July 14]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-9220694-B2

10. Halder A, Khopade AJ. Physiochemical Properties and Cytotoxicity of a Benzalkonium Chloride-Free, Micellar Emulsion Ophthalmic Formulation of Latanoprost. Clin Ophthalmol. 2020 Oct 7;14:3057-3064. doi: 10.2147/OPTH.S266453. PMID: 33116357; PMCID: PMC7548341.

11. José Bagur M, Alonso Salinas GL, Jiménez-Monreal AM, Chaouqi S, Llorens S, Martínez-Tomé M, Alonso GL. Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food. Molecules. 2017 Dec 23;23(1):30. doi: 10.3390/molecules23010030. PMID: 29295497; PMCID: PMC5943931.,

12. Lynch C, Kondiah PPD, Choonara YE, du Toit LC, Ally N, Pillay V. Advances in Biodegradable Nano-Sized Polymer-Based Ocular Drug Delivery. Polymers (Basel). 2019 Aug 20;11(8):1371. doi: 10.3390/polym11081371. PMID: 31434273; PMCID: PMC6722735.

13. Akpek EK, Gottsch JD. Immune defense at the ocular surface. Eye (Lond). 2003 Nov;17(8):949-56. doi: 10.1038/sj.eye.6700617. PMID: 14631402.

14. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. Exp Eye Res. 2003 May;76(5):521-42. doi: 10.1016/s0014-4835(03)00050-2. Erratum in: Exp Eye Res. 2003 Aug;77(2):253. PMID: 12697417.

15. Ramsay E, Del Amo EM, Toropainen E, Tengvall-Unadike U, Ranta VP, Urtti A, et al. Corneal and conjunctival drug permeability: Systematic comparison and

pharmacokinetic impact in the eye. Eur J Pharm Sci. 2018 Jul 1;119:83-89. doi: 10.1016/j.ejps.2018.03.034. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29625211.

16. Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, Andrieu V. Recent advances in ocular drug delivery. Drug Dev Ind Pharm. 2013 Nov;39(11):1599-617. doi: 10.3109/03639045.2012.736515. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23153114.

17. Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. Eur J Pharm Biopharm. 2005 Jul;60(2):227-40. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.12.007. PMID: 15939235.

18. Dartt DA. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. Prog Retin Eye Res. 2002 Nov;21(6):555-76. doi: 10.1016/s1350-9462(02)00038-1. PMID: 12433377.

19. Sthapit, Purnima Rajkarnikar, and Nhuchhe Ratna Tuladhar. Conjunctival Flora of Normal Human Eye. JSM Ophthalmol 2.2 (2014): 1021.

20. Swetledge S, Jung JP, Carter R, Sabliov C. Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: implications in ocular disease therapy. J Nanobiotechnology. 2021 Jan 7;19(1):10. doi: 10.1186/s12951-020-00745-9. PMID: 33413421; PMCID: PMC7789499.

21. Huang D, Chen YS, Rupenthal ID. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. Adv Drug Deliv Rev. 2018 Feb 15;126:96-112. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.008. Epub 2017 Sep 12. Erratum in: Adv Drug Deliv Rev. 2019 Jan 15;139:157. doi: 10.1016/j.addr.2019.05.006. PMID: 28916492.

22. Runkle EA, Antonetti DA. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. Methods Mol Biol. 2011;686:133-48. doi: 10.1007/978-1-60761-938-3_5. PMID: 21082369.

23. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. Prog Retin Eye Res. 2008 May;27(3):284-330. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.02.002. Epub 2008 Feb 23. PMID: 18448380.

24. Rizzolo LJ. Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. Histol Histopathol. 1997 Oct;12(4):1057-67. PMID: 9302567.

25. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Nov 15;58(11):1131-5. doi: 10.1016/j.addr.2006.07.027. Epub 2006 Sep 26. PMID: 17097758.

26. Thrimawithana TR, Young S, Bunt CR, Green C, Alany RG. Drug delivery to the posterior segment of the eye. Drug Discov Today. 2011 Mar;16(5-6):270-7. doi: 10.1016/j.drudis.2010.12.004. Epub 2010 Dec 15. PMID: 21167306.

27. Garg P, Venuganti VVK, Roy A, Roy G. Novel drug delivery methods for the treatment of keratitis: moving away from surgical intervention. Expert Opin Drug Deliv. 2019 Dec;16(12):1381-1391. doi: 10.1080/17425247.2019.1690451. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31701781.

28. Rietveld RP, van Weert HC, ter Riet G, Bindels PJ. Diagnostic impact of signs and symptoms in acute infectious conjunctivitis: systematic literature search. BMJ. 2003 Oct 4;327(7418):789. doi: 10.1136/bmj.327.7418.789. PMID: 14525879; PMCID: PMC214099.

29. Roda M, Corazza I, Bacchi Reggiani ML, Pellegrini M, Taroni L, Giannaccare G, et al. Dry Eye Disease and Tear Cytokine Levels-A Meta-Analysis. Int J Mol Sci. 2020 Apr 28;21(9):3111. doi: 10.3390/ijms21093111. PMID: 32354090; PMCID: PMC7246678.

30. Lollett IV, Galor A. Dry eye syndrome: developments and lifitegrast in perspective. Clin Ophthalmol. 2018 Jan 15;12:125-139. doi: 10.2147/OPTH.S126668. PMID: 29391773; PMCID: PMC5774475.

31. Alemayehu W, Melese M, Bejiga A, Worku A, Kebede W, Fantaye D. Surgery for trichiasis by ophthalmologists versus integrated eye care workers: a randomized trial. Ophthalmology. 2004 Mar;111(3):578-84. doi: 10.1016/j.ophtha.2003.06.030. PMID: 15019339.

32. Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonis VF, Siganos C. Treatment of chronic dry eye: focus on cyclosporine. Clin Ophthalmol. 2008 Dec;2(4):829-36. doi: 10.2147/opth.s1409. PMID: 19668437; PMCID: PMC2699789.

33. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. JAMA. 2014 May 14;311(18):1901-11. doi: 10.1001/jama.2014.3192. PMID: 24825645; PMCID: PMC4523637.

34. Youn S, Yan DB. Five-Year Outcomes of Graft-Free Tube Shunts and Risk Factors for Tube Exposures in Glaucoma. J Glaucoma. 2024 Feb 1;33(2):139-147. doi: 10.1097/IJG.0000000000002255. Epub 2023 Jun 16. PMID: 37327480; PMCID: PMC10807750.

35. Oh DJ, Chen JL, Vajaranant TS, Dikopf MS. Brimonidine tartrate for the treatment of glaucoma. Expert Opin Pharmacother. 2019 Jan;20(1):115-122. doi: 10.1080/14656566.2018.1544241. Epub 2018 Nov 8. PMID: 30407890.

36. Han H, Li S, Xu M, Zhong Y, Fan W, Xu J, Zhou T, Ji J, Ye J, Yao K. Polymer- and lipid-based nanocarriers for ocular drug delivery: Current status and future perspectives. Adv Drug Deliv Rev. 2023 May;196:114770. doi: 10.1016/j.addr.2023.114770. Epub 2023 Mar 7. PMID: 36894134.

37. WHO. Blindness and vision impairment [Web Page]. World Health Organization; [Cited Date: 03.09.2024]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment

38. Li S, Chen L, Fu Y. Nanotechnology-based ocular drug delivery systems: recent advances and future prospects. J Nanobiotechnology. 2023 Jul 22;21(1):232. doi: 10.1186/s12951-023-01992-2. PMID: 37480102; PMCID: PMC10362606.

39. Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE, du Toit LC, Ally N, Pillay V. Hydrogel Biomaterials for Application in Ocular Drug Delivery. Front Bioeng Biotechnol. 2020 Mar 20;8:228. doi: 10.3389/fbioe.2020.00228. PMID: 32266248; PMCID: PMC7099765.

40. Siafaka, Panoraia I. et al. “Delivering Active Molecules to the Eye; the Concept of Electrospinning as Potent Tool for Drug Delivery Systems.” Journal of Drug Delivery Science and Technology 2023 June 104565. Journal of Drug Delivery Science and Technology. Web. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104565

41. Tian B, Bilsbury E, Doherty S, Teebagy S, Wood E, Su W, et al. Ocular Drug Delivery: Advancements and Innovations. Pharmaceutics 2022 14(9), 1931. doi.org/10.3390/pharmaceutics14091931

42. Ress D, Heeger DJ. Neuronal correlates of perception in early visual cortex. Nat Neurosci. 2003 Apr;6(4):414-20. doi: 10.1038/nn1024. PMID: 12627164; PMCID: PMC2278238.

43. Shell JW. Ophthalmic drug delivery systems. Surv Ophthalmol. 1984 Sep-Oct;29(2):117-28. doi: 10.1016/0039-6257(84)90168-1. PMID: 6505951.

44. Raj V.K, Mazumder R, Madhra M. Ocular Drug Delivery System: Challenges and Approaches. International Journal of Applied Pharmaceutics 1 2020 Sept: 49–57. doi: 10.22159/ijap.2020v12i5.38762

45. Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000 Jul;27(7):558-62. doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03288.x. PMID: 10874518.

46. Bourlais CL, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverge R. Ophthalmic drug delivery systems--recent advances. Prog Retin Eye Res. 1998 Jan;17(1):33-58. doi: 10.1016/s1350-9462(97)00002-5. PMID: 9537794.

47. Moiseev RV, Morrison PWJ, Steele F, Khutoryanskiy VV. Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery. Pharmaceutics. 2019 Jul 9;11(7):321. doi: 10.3390/pharmaceutics11070321. PMID: 31324063; PMCID: PMC6681039.

48. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. Pharm Res. 2009 May;26(5):1197-216. doi: 10.1007/s11095-008-9694-0. Epub 2008 Aug 29. PMID: 18758924; PMCID: PMC4516219.

49. Jumelle C, Gholizadeh S, Annabi N, Dana R. Advances and limitations of drug delivery systems formulated as eye drops. J Control Release. 2020 May 10;321:1-22. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.057. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32027938; PMCID: PMC7170772.

50. Castro-Balado A, Mondelo-García C, Zarra-Ferro I, Fernández-Ferreiro A. New ophthalmic drug delivery systems. Farm Hosp. 2020 Jul 1;44(4):149-157. English. doi: 10.7399/fh.11388. PMID: 32646346.

51. Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AK. Ocular drug delivery systems: An overview. World J Pharmacol. 2013;2(2):47-64. doi: 10.5497/wjp.v2.i2.47. PMID: 25590022; PMCID: PMC4289909.

52. Sultana Y, Jain R, Aqil M, Ali A. Review of ocular drug delivery. Curr Drug Deliv. 2006 Apr;3(2):207-17. doi: 10.2174/156720106776359186. PMID: 16611007.

53. Wang Y, Wang C. Novel Eye Drop Delivery Systems: Advance on Formulation Design Strategies Targeting Anterior and Posterior Segments of the Eye. Pharmaceutics. 2022 May 27;14(6):1150. doi: 10.3390/pharmaceutics14061150. PMID: 35745723; PMCID: PMC9229693.

54. Wang C, Pang Y. Nano-based eye drop: Topical and noninvasive therapy for ocular diseases. Adv Drug Deliv Rev. 2023 Mar;194:114721. doi: 10.1016/j.addr.2023.114721. Epub 2023 Feb 10. PMID: 36773886.

55. Kour J, Kumari N, Sapra B. Ocular prodrugs: Attributes and challenges. Asian J Pharm Sci. 2021 Mar;16(2):175-191. doi: 10.1016/j.ajps.2020.08.002. Epub 2020 Sep 28. PMID: 33995612; PMCID: PMC8105420.

56. Huang D, Chen YS, Rupenthal ID. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. Adv Drug Deliv Rev. 2018 Feb 15;126:96-112. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.008. Epub 2017 Sep 12. Erratum in: Adv Drug Deliv Rev. 2019 Jan 15;139:157. doi: 10.1016/j.addr.2019.05.006. PMID: 28916492.

57. Devasani R. S, Dev A, Rathod S, Deshmukh G. An overview of in situ gelling systems. Pharmaceutical and Biological Evaluations. 2016 Feb 3(1), 60–69.

58. Nirmal HB, Bakliwal SR, Pawar SP. In situ gel: New trends in controlled and sustained drug delivery system. International Journal of PharmTech Research. 2010;2(2):1398- 408.

59. J. Siepmann et al. Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery, Advances in Delivery Science and Technology, DOI 10.1007/978-1-4614-0881-9_4

60. Chai Q, Jiao Y, Yu X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. Gels. 2017 Jan 24;3(1):6. doi: 10.3390/gels3010006. PMID: 30920503; PMCID: PMC6318667.

61. Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. Annu Rev Biomed Eng. 2000;2:9-29. doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.9. PMID: 11701505.

62. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. Biomaterials. 2012 Sep;33(26):6020-41. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.050. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22681979.

63. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev. 2002 Jan 17;54(1):3-12. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00239-3. PMID: 11755703.

64. Gami P, Kundu D, Seera SDK, Banerjee T. Chemically crosslinked xylan-β-Cyclodextrin hydrogel for the in vitro delivery of curcumin and 5-Fluorouracil. Int J Biol Macromol. 2020 Apr 30;158:18-31. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.237. Epub ahead of print. PMID: 32360965.

65. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. Biotechnol Bioeng. 2009 Jul 1;103(4):655-63. doi: 10.1002/bit.22361. PMID: 19472329; PMCID: PMC2997742.

66. Matyash M, Despang F, Ikonomidou C, Gelinsky M. Swelling and mechanical properties of alginate hydrogels with respect to promotion of neural growth. Tissue Eng Part C Methods. 2014 May;20(5):401-11. doi: 10.1089/ten.TEC.2013.0252. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24044417.

67. Cunha-Vaz J. The blood-ocular barriers. Survey of Ophthalmology. 1979;23,5.doi:10.1016/0039-6257(79)90158-9.

68. Klouda L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. Eur J Pharm Biopharm. 2015 Nov;97(Pt B):338-49.doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.017. PMID: 26614556.

69. Flory P.J and Rehner J. Statistical mechanics of cross-linked polymer networks II. Swelling. The Journal of Chemical Physics 1943 October,11,521–526.doi: 10.1063/1.1723792

70. Necas J, Bartosikova L, Brauner P and Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. Veterinarni Medicina. 2008; *53*(8), 397–411. doi:10.17221/1930-VETMED

71. Huynh A, Priefer R. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. Carbohydr Res. 2020 Mar;489:107950. doi: 10.1016/j.carres.2020.107950. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32070808.

72. Kooy F. K, Beeftink H. H, Eppink M. H. M, Tramper J, Eggink G and Boeriu C. G. Structural and functional evidence for two separate oligosaccharide binding sites of Pasteurella multocida hyaluronan synthase. Advances in Enzyme Research. 2013 Jun;01(04), 97–111. doi:10.4236/aer.2013.14011.

73. Salih A.R.C, Farooqi H.M.U, Amin H, Karn P. R, Meghani N and Nagendran S. Hyaluronic acid: comprehensive review of a multifunctional biopolymer. Futur J Pharm Sci 2024;10, 63 (2024). doi:10.1186/s43094-024-00636-y.

74. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito DV, Klaassen CD, Marks JG Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW; Cosmetic Ingredient Review Expert Panel; Andersen FA. Final report of the safety assessment of hyaluronic acid, potassium hyaluronate, and sodium hyaluronate. Int J Toxicol. 2009 Jul-Aug;28(4 Suppl):5-67. doi: 10.1177/1091581809337738. PMID: 19636067.

75. Zhang X, Wei D, Xu Y, Zhu Q. Hyaluronic acid in ocular drug delivery. Carbohydr Polym. 2021 Jul 15;264:118006. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118006. Epub 2021 Mar 29. PMID: 33910737.

76. Drugbank: Hyaluronic Acid Database [Online Database]. Drugbank. 2012. [Cited Date: 22.02.2024]. Available from: https://go.drugbank.com/drugs/DB08818

77. Snibson GR, Greaves JL, Soper ND, Tiffany JM, Wilson CG, Bron AJ. Ocular surface residence times of artificial tear solutions. Cornea. 1992 Jul;11(4):288-93. doi: 10.1097/00003226-199207000-00003. PMID: 1424647.

78. Larsen N. E and Balazs E. A. Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. Advanced Drug Delivery Reviews. 1991 Jun; 7,279-293. doi:10.1016/0169-409X(91)90007-Y.

79. Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. Br J Ophthalmol. 2002 Feb;86(2):181-4. doi: 10.1136/bjo.86.2.181. PMID: 11815344; PMCID: PMC1771021.

80. Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. Dtsch Arztebl Int. 2015 Jan 30;112(5):71-81; quiz 82. doi: 10.3238/arztebl.2015.0071. PMID: 25686388; PMCID: PMC4335585.

81. Fezza JP. Cross-linked hyaluronic acid gel occlusive device for the treatment of dry eye syndrome. Clin Ophthalmol. 2018 Nov 8;12:2277-2283. doi: 10.2147/OPTH.S187963. PMID: 30510396; PMCID: PMC6231461.

82. Ursapharm. Hylo Gel®. [Web Page]. [22.02.2024] Available from:https://hylo.de/en/products/hylo-gel

83. Santen. Hyalein %0.3 Ophtalmic Solution. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.santen.com/content/dam/santen/korea/pdfs/products/dryeye/hyalein0.3_PI(06)_20210701.pdf

84. Eyestil %0.15 Göz Damlası, Çözelti. [Online Veritabanı]. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. 2025. [Yayıncı Yılı: 30.06.2025]. URL: https://www.titck.gov.tr/kubkt

85. OmniVision. Fermavisc® SafeDrop® 0,1%. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.omnivision.ch/produkt/fermavisc-safedrop-0-1-prozent/

86. OmniVision. Fermavisc® SafeDrop® Gel. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.omnivision.ch/produkt/fermavisc-safedrop-gel/

87. OmniVision. Fermavisc® SafeDrop® Lipocur. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.omnivision.ch/produkt/fermavisc-safedrop-lipocur/

88. OmniVision. Hylo-Vision® Sine [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.omnivision.de/en/product/hylo-vision-sine/

89. Visufarma. Xailin® HA. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.visufarma.com/product-group/ocular-lubricants/

90. Bayer. HydraSense®. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.hydrasense.ca/en/eye-care/dry-eyes/

91. Bayer. HydraSense® Gel Drops. [Web Page]. [22.02.2024] Available from: https://www.hydrasense.ca/en/eye-care/ultra-for-dry-eyes/

92. Omodaka K, Horii T, Takahashi S, Kikawa T, Matsumoto A, Shiga Y, Maruyama K et al. 3D evaluation of the lamina cribrosa with swept-source optical coherence tomography in normal tension glaucoma. PLoS One. 2015 Apr 15;10(4):e0122347. doi: 10.1371/journal.pone.0122347. PMID: 25875096; PMCID: PMC4398555.

93. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. Ophthalmology. 2014 Nov;121(11):2081-90. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24974815.

94. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Gordon MO. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. Arch Ophthalmol. 2002 Jun;120(6):701-13; discussion 829-30. doi: 10.1001/archopht.120.6.701. PMID: 12049574.

95. Galanopoulos A, Goldberg I. Clinical efficacy and neuroprotective effects of brimonidine in the management of glaucoma and ocular hypertension. Clin Ophthalmol. 2009;3:117-22. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19668554; PMCID: PMC2709013.

96. Leske MC. Ocular perfusion pressure and glaucoma: clinical trial and epidemiologic findings. Curr Opin Ophthalmol. 2009 Mar;20(2):73-8. doi: 10.1097/ICU.0b013e32831eef82. PMID: 19240538; PMCID: PMC2662722.

97. Wang L, Cull GA, Piper C, Burgoyne CF, Fortune B. Anterior and posterior optic nerve head blood flow in nonhuman primate experimental glaucoma model measured by laser speckle imaging technique and microsphere method. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Dec 17;53(13):8303-9. doi: 10.1167/iovs.12-10911. PMID: 23169886; PMCID: PMC3525139.

98. Quigley HA, Addicks EM. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. Arch Ophthalmol. 1981 Jan;99(1):137-43. doi: 10.1001/archopht.1981.03930010139020. PMID: 7458737.

99. Park SC, Brumm J, Furlanetto RL, Netto C, Liu Y, Tello C, Liebmann JM, Ritch R. Lamina cribrosa depth in different stages of glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Feb 26;56(3):2059-64. doi: 10.1167/iovs.14-15540. PMID: 25722212.

100. National Center for Advancing Translational Sciences Database [Online Database]. NIH. [Cited Date: 24.02.2024]. Available from: https://drugs.ncats.io/drug/4S9CL2DY2H

101. Drugbank: Brimonidine Tartrate Database [Online Database]. Drugbank. [Cited Date: 09.04.2024]. Available from: https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000195

102. Cantor LB, Burke J. Brimonidine. Expert Opin Investig Drugs. 1997 Aug;6(8):1063-83. doi: 10.1517/13543784.6.8.1063. PMID: 15989664.

103. Popa VT. Clinical pharmacology of adrenergic drugs. J Asthma. 1984;21(3):183-207. doi: 10.3109/02770908409077417. PMID: 6145698.

104. Hodapp E, Kolker AE, Kass MA, Goldberg I, Becker B, Gordon M. The effect of topical clonidine on intraocular pressure. Arch Ophthalmol. 1981 Jul;99(7):1208-11. doi: 10.1001/archopht.1981.03930020082006. PMID: 7020658.

105. Yüksel N, Elibol O, Caglar Y, Alçelik T. Short-term effect of apraclonidine on intraocular pressure in glaucoma patients receiving timolol and pilocarpine. Ophthalmologica. 1997;211(6):354-7. doi: 10.1159/000310828. PMID: 9380353.

106. Cardakli UF, Smythe BA, Eisele JR, Kaufman PL, Perkins TW. Effect of chronic apraclonidine treatment on intraocular pressure in advanced glaucoma. J Glaucoma. 1993 Winter;2(4):271-8. PMID: 19920532.

107. Adkins JC, Balfour JA. Brimonidine. A review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of open-angle glaucoma and ocular hypertension. Drugs Aging. 1998 Mar;12(3):225-41. doi: 10.2165/00002512-199812030-00005. PMID: 9534022.

108. National Library of Medicine. Database [Online Database]. NIH. [Cited Date: 24.02.2024]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/static-page/down_bethesda.html

109. McAuliffe-Curtin D, Buckley C. Review of alpha adrenoceptor function in the eye. Eye (Lond). 1989;3 (Pt 4):472-6. doi: 10.1038/eye.1989.71. PMID: 2575042.

110. Nocentini A, Supuran CT. Adrenergic agonists and antagonists as antiglaucoma agents: a literature and patent review (2013-2019). Expert Opin Ther Pat. 2019 Oct;29(10):805-815. doi: 10.1080/13543776.2019.1665023. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31486689.

111. Oh DJ, Chen JL, Vajaranant TS, Dikopf MS. Brimonidine tartrate for the treatment of glaucoma. Expert Opin Pharmacother. 2019 Jan;20(1):115-122. doi: 10.1080/14656566.2018.1544241. Epub 2018 Nov 8. PMID: 30407890.

112. Arthur S, Cantor LB. Update on the role of alpha-agonists in glaucoma management. Exp Eye Res. 2011 Sep;93(3):271-83. doi: 10.1016/j.exer.2011.04.002. Epub 2011 Apr 20. PMID: 21524649.

113. Drugs Database [Online Database]. FDA. 2001. [Cited Date: 14.06.2024]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm

114. Giaccio M. Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004;44(3):155-72. doi: 10.1080/10408690490441433. PMID: 15239370.

115. Shahi T, Assadpour E. and Jafari S. M. Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of ‘red gold’; saffron. Trends in Food Science and Technology. 2016 December; doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.010.

116. Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Avicenna's (Ibn Sina) the Canon of Medicine and saffron (Crocus sativus): a review. Phytother Res. 2013 Apr;27(4):475-83. doi: 10.1002/ptr.4784. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22815242.

117. Rameshrad M, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review. Expert Opin Ther Pat. 2018 Feb;28(2):147-165. doi: 10.1080/13543776.2017.1355909. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28705037.

118. Wang HF, Ma JX, Shang QL, An JB, Chen HT, Wang CX. Safety, pharmacokinetics, and prevention effect of intraocular crocetin in proliferative vitreoretinopathy. Biomed Pharmacother. 2019 Jan; 109:1211-1220. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.193. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30551371.

119. Guo ZL, Li MX, Li XL, Wang P, Wang WG, Du WZ, Yang ZQ et al. Crocetin: A Systematic Review. Front Pharmacol. 2022 Jan 14; 12:745683. doi: 10.3389/fphar.2021.745683. PMID: 35095483; PMCID: PMC8795768.

120. Wang Y, Sun J, Liu C, Fang C. Protective effects of crocetin pretreatment on myocardial injury in an ischemia/reperfusion rat model. Eur J Pharmacol. 2014 Oct

15; 741:290-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.052. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25176181.

121. Eidenberger T. Omnica GMBH. Hydrolysate of crocin. DE Patent Number: WO 2010/094745A1 [Patent Date:26.08.2010]

122. Pubchem Database [Online Database]. NIH. [Cited Date: 18.08.2024]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/static-page/down_bethesda.html

123. Drugbank: Crocetin Database [Online Database]. Drugbank. [Cited Date: 17.09.2024]. Available from: https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000195

124. Diao SL, Sun JW, Ma BX, Li XM, Wang D. Influence of crocetin on high-cholesterol diet induced atherosclerosis in rats via anti-oxidant activity together with inhibition of inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway. Saudi J Biol Sci. 2018 Mar;25(3):493-499. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.11.005. Epub 2016 Nov 10. PMID: 29692651; PMCID: PMC5911641.

125. Yamauchi M, Tsuruma K, Imai S, Nakanishi T, Umigai N, Shimazawa M, Hara H. Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. Eur J Pharmacol. 2011 Jan 10;650(1):110-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.081. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20951131.

126. Ishizuka F, Shimazawa M, Umigai N, Ogishima H, Nakamura S, Tsuruma K, Hara H. Crocetin, a carotenoid derivative, inhibits retinal ischemic damage in mice. Eur J Pharmacol. 2013 Mar 5;703(1-3):1-10. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.007. Epub 2013 Feb 18. PMID: 23428630.

127. Ohno Y, Nakanishi T, Umigai N, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. Oral administration of crocetin prevents inner retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate in mice. Eur J Pharmacol. 2012 Sep 5;690(1-3):84-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.06.035. Epub 2012 Jul 1. PMID: 22760072.

128. Quality Considerations for Topical Ophthalmic Drug Products. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). December 2023. Revision 1. https://www.fda.gov/media/172937/download

129. Using the Inactive Ingredient Database Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug

Evaluation and Research (CDER). July 2019. https://www.fda.gov/media/128687/download

130. Tu EY. Balancing antimicrobial efficacy and toxicity of currently available topical ophthalmic preservatives. Saudi J Ophthalmol. 2014 Jul;28(3):182-7. doi: 10.1016/j.sjopt.2014.06.006. Epub 2014 Jun 23. PMID: 25278794; PMCID: PMC4181434.

131. Abu Shaqra QM, Al-Groom RM, Abu Shaqra AQ. Antimicrobial Effectiveness in Eye Drops: Limited Sterility versus Reduction in Microbial Count. PDA J Pharm Sci Technol. 2020 May-Jun;74(3):309-317. doi: 10.5731/pdajpst.2019.009845. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31941794.

132. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceuticals Excipients. Sixth ed.USA; Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.p.56-58.

133. Abusharha AA, Pearce EI. The effect of low humidity on the human tear film. Cornea. 2013 Apr;32(4):429-34. doi: 10.1097/ICO.0b013e31826671ab. PMID: 23023409.

134. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Oct;47(10):4309-15. doi: 10.1167/iovs.05-1504. PMID: 17003420.

135. Troiano P, Monaco G. Effect of hypotonic 0.4% hyaluronic acid drops in dry eye patients: a cross-over study. Cornea. 2008 Dec;27(10):1126-30. doi: 10.1097/ICO.0b013e318180e55c. PMID: 19034126.

136. Lim LT, Ah-Kee EY, Collins CE. Common eye drops and their implications for pH measurements in the management of chemical eye injuries. Int J Ophthalmol. 2014 Dec 18;7(6):1067-8. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.06.29. PMID: 25540767; PMCID: PMC4270978.

137. Pholpramool C, Chaturapanich G. Effect of sodium and potassium concentrations and pH on the maintenance of motility of rabbit and rat epididymal spermatozoa. J Reprod Fertil. 1979 Sep;57(1):245-51. doi: 10.1530/jrf.0.0570245. PMID: 41945.

138. Connor AJ, Severn P. Use of a control test to aid pH assessment of chemical eye injuries. Emerg Med J. 2009 Nov;26(11):811-2. doi: 10.1136/emj.2008.067439. PMID: 19850809.

139. Tiffany JM. The viscosity of human tears. Int Ophthalmol. 1991 Nov;15(6):371-6. doi: 10.1007/BF00137947. PMID: 1778667.

140. Ibrahim SS. The Role of Surface Active Agents in Ophthalmic Drug Delivery: A Comprehensive Review. J Pharm Sci. 2019 Jun;108(6):1923-1933. doi: 10.1016/j.xphs.2019.01.016. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30684539.

141. Ravet O. The deleterious effect of certain surface active agents on the ocular surface. Bull Soc Belge Ophtalmol. 2007;(304):145-9. French. PMID: 17718239.

142. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. Ophthalmology. 2014 Nov;121(11):2081-90. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24974815.

143. Aptel F, Cucherat M, Denis P. Efficacy and tolerability of prostaglandin analogs: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. J Glaucoma. 2008 Dec;17(8):667-73. doi: 10.1097/IJG.0b013e3181666557. PMID: 19092464.

144. Novack GD. Ophthalmic beta-blockers since timolol. Surv Ophthalmol. 1987 Mar-Apr;31(5):307-27. doi: 10.1016/0039-6257(87)90116-0. PMID: 2885931.

145. Simmons ST; Alphagan/Trusopt Study Group. Efficacy of brimonidine 0.2% and dorzolamide 2% as adjunctive therapy to beta-blockers in adult patients with glaucoma or ocular hypertension. Clin Ther. 2001 Apr;23(4):604-19. doi: 10.1016/s0149-2918(01)80064-3. PMID: 11354394.

146. Greenfield DS, Liebmann JM, Ritch R. Brimonidine: a new alpha2-adrenoreceptor agonist for glaucoma treatment. J Glaucoma. 1997 Aug;6(4):250-8. PMID: 9264305.

147. Galanopoulos A, Goldberg I. Clinical efficacy and neuroprotective effects of brimonidine in the management of glaucoma and ocular hypertension. Clin Ophthalmol. 2009; 3:117-22. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19668554; PMCID: PMC2709013.

148. Rosin LM, Bell NP. Preservative toxicity in glaucoma medication: clinical evaluation of benzalkonium chloride-free 0.5% timolol eye drops. Clin Ophthalmol. 2013; 7:2131-5. doi: 10.2147/OPTH.S41358. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24204115; PMCID: PMC3817055.

149. Sarkar J, Chaudhary S, Namavari A, Ozturk O, Chang JH, Yco L, Sonawane S, Khanolkar V, Hallak J, Jain S. Corneal neurotoxicity due to topical benzalkonium

chloride. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Apr 6;53(4):1792-802. doi: 10.1167/iovs.11-8775. PMID: 22410563; PMCID: PMC3995561.

150. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. J Nanobiotechnology. 2018 Sep 19;16(1):71. doi: 10.1186/s12951-018-0392-8. PMID: 30231877; PMCID: PMC6145203.

151. Rodrigues T, Reker D, Schneider P, Schneider G. Counting on natural products for drug design. Nat Chem. 2016 Jun;8(6):531-41. doi: 10.1038/nchem.2479. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27219696.

152. Siddiqui A. A, Iram F, Siddiqui S, Sahu K. Role of natural products in drug discovery process. International Journal of Drug Development and Research. 2014 Jun 6(2), 172–204.

153. Lam PL, Wong WY, Bian Z, Chui CH, Gambari R. Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. Nanomedicine (Lond). 2017 Feb;12(4):357-385. doi: 10.2217/nnm-2016-0305. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28078952.

154. Fennell E, Huyghe JM. Chemically Responsive Hydrogel Deformation Mechanics: A Review. Molecules. 2019 Sep 28;24(19):3521. doi: 10.3390/molecules24193521. PMID: 31569433; PMCID: PMC6804226.

155. Dubey A, Prabhu P. Formulation and evaluation of stimuli-sensitive hydrogels of timolol maleate and brimonidine tartrate for the treatment of glaucoma. Int J Pharm Investig. 2014 Jul;4(3):112-8. doi: 10.4103/2230-973X.138340. PMID: 25126524; PMCID: PMC4131382.

156. Jiang S, Chappa AK, Proksch JW. A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for the quantitation of brimonidine in ocular fluids and tissues. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009 Jan 15;877(3):107-14. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.11.009. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19109079.

157. Mathrusri AM, Narendra R, Pattanaik MR. Novel analytical spectrophotometric methods for the quantification of brimonidine tartrate -An α adrenergic agonist. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2015 July, 8(3), 509–514.

158. Ibrahim F, El-Enany N, El-Shaheny RN, Mikhail IE. Validated spectrofluorimetric and spectrophotometric methods for the determination of brimonidine tartrate in

ophthalmic solutions via derivatization with NBD-Cl. Application to stability study. Luminescence. 2015 May;30(3):309-17. doi: 10.1002/bio.2730. Epub 2014 Jul 10. PMID: 25044105.

159. Zsila F, Bikádi Z, Simonyi M. Induced chirality upon crocetin binding to human serum albumin: Origin and nature. Tetrahedron Asymmetry. 2001;12(22), 3125–3137. https://doi.org/10.1016/S0957-4166(01)00552-3

160. Wang C, Li X, Su J, Duan J, Yao Y, Shang Q. Crocetin inhibits choroidal neovascularization in both in vitro and in vivo models. Exp Eye Res. 2024 Jan; 238:109751. doi: 10.1016/j.exer.2023.109751. Epub 2023 Dec 13. PMID: 38097101.

161. Etkin Maddelerin ve Bitmiş Ürünlerin Stabilite Testlerine İlişkin Kılavuz. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. İRD-KLVZ-05, 15.11.2022 Revizyon1. https://www.titck.gov.tr/mevzuat/etkin-maddelerin-ve-bitmis-urunlerin-stabilite-testlerine-iliskin-kilavuz-27122018173017

162. United States Pharmacopeia (2022). General Chapter, ⟨771⟩ Ophthalmic Products—Quality Tests. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99560_04_01.html

163. Wiley A. Chambers, MD. Brimonidine tartrate ophthalmic solution, 0.025%. Bausch & Lomb. Clinical Review. February 2017, NDA 208144. https://www.fda.gov/media/111063/download

164. Tiffany JM. The viscosity of human tears. Int Ophthalmol. 1991 Nov;15(6):371-6. doi: 10.1007/BF00137947. PMID: 1778667.

165. Arif FAC, Hilmi MR, Kamal KM, Ithnin MH. Evaluation of 18 artificial tears based on viscosity and pH. Malaysian Journal of Ophthalmology. July 2;2:96-111. doi:10.35119/myjo.v2i2.109

166. Shah MV, Bahri D. Topical brimonidine tartrate ophthalmic solution. Sentiss Pharma Pvt Ltd. European Patent Number: WO 2015/097600 [Patent Date:17.06.2020]

167. Aragona P, Simmons PA, Wang H, Wang T. Physicochemical Properties of Hyaluronic Acid-Based Lubricant Eye Drops. Transl Vis Sci Technol. 2019 Nov 1;8(6):2. doi: 10.1167/tvst.8.6.2. PMID: 31695963; PMCID: PMC6827422.

168. Specifications: Test Procedures And Acceptance Crıteria for New Drug Substances And New Drug Products: Chemical Substances. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Topi Q6A, May 2000, CPMP/ICH/367/96.

169. Sturner WQ, Dowdey AB, Putnam RS, Dempsey JL. Osmolality and other chemical determinations in postmortem human vitreous humor. J Forensic Sci. 1972 Jul;17(3):387-93. PMID: 4669585.

170. Van Santvliet L, Ludwig A. Determinants of eye drop size. Surv Ophthalmol. 2004 Mar-Apr;49(2):197-213. doi: 10.1016/j.survophthal.2003.12.009. PMID: 14998692.

171. Whitson JT, Love R, Brown RH, Lynch MG, Schoenwald RD. The effect of reduced eyedrop size and eyelid closure on the therapeutic index of phenylephrine. Am J Ophthalmol. 1993 Mar 15;115(3):357-9. doi: 10.1016/s0002-9394(14)73588-3. PMID: 8442496.

172. Pasovic L, Utheim TP, Maria R, Lyberg T, Messelt EB, Aabel P, Chen DF, Chen X, Eidet JR. Optimization of Storage Temperature for Cultured ARPE-19 Cells. J Ophthalmol. 2013;2013:216359. doi: 10.1155/2013/216359. Epub 2013 Oct 22. PMID: 24251032; PMCID: PMC3819763.

173. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Exp Eye Res. 1996 Feb;62(2):155-69. doi: 10.1006/exer.1996.0020. PMID: 8698076.

174. Ramírez C, Cáceres-del-Carpio J, Chu J, Chu J, Moustafa MT, Chwa M, Limb GA, Kuppermann BD, Kenney MC. Brimonidine Can Prevent In Vitro Hydroquinone Damage on Retinal Pigment Epithelium Cells and Retinal Müller Cells. J Ocul Pharmacol Ther. 2016 Mar;32(2):102-8. doi: 10.1089/jop.2015.0083. Epub 2015 Dec 1. PMID: 26624556; PMCID: PMC6445176.

175. Weng S, Mao L, Gong Y, Sun T, Gu Q. Role of quercetin in protecting ARPE-19 cells against H2O2-induced injury via nuclear factor erythroid 2 like 2 pathway activation and endoplasmic reticulum stress inhibition. Mol Med Rep. 2017 Sep;16(3):3461-3468. doi: 10.3892/mmr.2017.6964. Epub 2017 Jul 13. PMID: 28713895.

176. Hsu MY, Hsiao YP, Lin YT, Chen C, Lee CM, Liao WC, Tsou SC, Lin HW, Chang YY. Quercetin Alleviates the Accumulation of Superoxide in Sodium Iodate-

Induced Retinal Autophagy by Regulating Mitochondrial Reactive Oxygen Species Homeostasis through Enhanced Deacetyl-SOD2 via the Nrf2-PGC-1α-Sirt1 Pathway. Antioxidants (Basel). 2021 Jul 14;10(7):1125. doi: 10.3390/antiox10071125. PMID: 34356358; PMCID: PMC8301007.

177. 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 Deliv. 2007 Nov;14(8):507-15. doi: 10.1080/10717540701606426. PMID: 18027180.

178. Mahboobian MM, Seyfoddin A, Rupenthal ID, Aboofazeli R, Foroutan SM. Formulation Development and Evaluation of the Therapeutic Efficacy of Brinzolamide Containing Nanoemulsions. Iran J Pharm Res. 2017 Summer;16(3):847-857. PMID: 29201076; PMCID: PMC5610741.

179. Kumar R, Sinha VR. Solid lipid nanoparticle: an efficient carrier for improved ocular permeation of voriconazole. Drug Dev Ind Pharm. 2016 Dec;42(12):1956-1967. doi: 10.1080/03639045.2016.1185437. Epub 2016 May 20. PMID: 27143048.

ÖZGEÇMİŞ

BENZERLİK RAPORU

Yüksek Lisans Tezi Sinem KÖKSAL İNTİHAL İÇİN.pdf

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%9	%7	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.kanto.co.jp İnternet Kaynağı	%2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	www.pharmacompass.com İnternet Kaynağı	<%1
4	www.lexpera.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.dogaltedavi.org İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Rutgers University, New Brunswick Öğrenci Ödevi	<%1
7	bcp-instruments.com İnternet Kaynağı	<%1
8	www.bidd.group İnternet Kaynağı	<%1
9	Eren, Rümeysa. "Elektro-Püskürtme Yöntemi Ile Pla Içine Kapsüle Edilen Tamarindus Indica Ekstrelerinin Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkileri", Marmara Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
10	www.kejapub.com İnternet Kaynağı	<%1
11	hjbc.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1