GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILMAK İÇİN TASARLANMIŞ NANOFARMASÖTİKLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisan Tezi

Hasan Can HOŞER

Eskişehir 2026

GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILMAK İÇİN TASARLANMIŞ NANOFARMASÖTİKLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU

Hasan Can HOŞER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı

Farmasötik Teknoloji Programı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Alper ÖZTÜRK

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif KAYA TİLKİ

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat 2026

Eskişehir

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Brimi Koordinatörlüğü tarafından TYL-2025-2924 (ID: 2924) proje numarası ile desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hasan Can HOŞER'in "Glokom Tedavisinde Kullanılmak İçin Tasarlanmış Nanofarmasötiklerin Hazırlanması, Karakterizasyonu" başlıklı tezi 28.01.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalında Farmasötik Teknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Danışman) :	Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK	.....
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Sema ARISOY	.....
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Sinan ÖZER	.....

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILMAK İÇİN TASARLANMIŞ NANOFARMASÖTİKLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU

Hasan Can HOŞER

Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı

Farmasötik Teknoloji Programı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2026

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Alper ÖZTÜRK

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif KAYA TİLKİ

Bu çalışmada, glokom tedavisinde kullanılmak üzere brimonidin tartarat yüklü polimerik nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Glokom, retinal gangliyon hücrelerinin kaybıyla karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalık olup, göz içi basıncının düzenlenmesi bu sürecin yönetiminde kritik öneme sahiptir. Brimonidin tartarat, α_2-adrenerjik reseptör agonisti olarak hem göz içi basıncını düşürmekte hem de nöroprotektif etki göstermektedir. Ancak kısa yarı ömrü, düşük biyoyararlanımı ve oküler uygulamada sınırlı rezidans süresi nedeniyle formülasyon optimizasyonu gerektirmektedir. Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında Eudragit® RS 100 bazlı nanopartikül sistemleri geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Çift emülsiyon ve buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan bu sistemler parçacık boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, *in vitro* salım ve salım kinetiği, katı hal karakterizasyonları (DSC ve FT-IR), salım ve salım kinetiği açısından değerlendirilmiştir. Ardından geliştirilen nanopartikül sistemlerin biyolojik aktiviteleri, retinal hücre hattı kullanılarak hücre canlılığı, sitotoksisite ve oksidatif stres koşulları altında hücre koruyucu etki yönünden incelenmiş; ayrıca nanopartikül taşıyıcı sistemin hücresel yanıt üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra, oftalmik kullanım açısından sterilite uygunluğu araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, brimonidin tartarat yüklü nanopartiküllerin başarıyla hazırlandığını ve uzatılmış salım sağladığını göstermiştir. Bu çalışma, oftalmik ilaç taşıyıcı sistemlerinde polimerik nanopartiküllerin terapötik etkinliği artırma potansiyeline dikkat çekerek, glokom tedavisine yönelik önemli bir katkı sunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Brimonidin tartarat, Eudragit® RS 100, Glokom, Polimerik nanopartikül.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERISATION OF NANOPHARMACEUTICALS DESIGNED FOR USE IN THE TREATMENT OF GLAUCOMA

Hasan Can HOŞER

Department of Pharmaceutical Technology

Programme in Pharmaceutical Technology

Graduate School of Anadolu University, February 2026

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Co- Supervisor: Asst. Prof. Dr. Elif KAYA TİLKİ

This study aimed to develop polymeric nanocarrier systems loaded with brimonidine tartrate for use in the treatment of glaucoma. Glaucoma is a neurodegenerative disease characterized by the loss of retinal ganglion cells, and the regulation of intraocular pressure is critical in managing this process. Brimonidine tartrate, as an α_2-adrenergic receptor agonist, both lowers intraocular pressure and exhibits neuroprotective effects. However, its short half-life, low bioavailability, and limited residence time in ocular applications necessitate formulation optimization. Accordingly, in this thesis study, Eudragit® RS 100-based nanoparticle systems were developed and characterized. These systems, prepared by double emulsion and evaporation methods, were evaluated in terms of particle size, polydispersity index, zeta potential, *in vitro* release and release kinetics, determination of storage conditions with trehalose, solid-state characterizations (DSC and FT-IR), and release and release kinetics. Subsequently, the biological activities of the developed nanoparticle systems were investigated using retinal cell lines in terms of cell viability, cytotoxicity, and cell-protective effects under oxidative stress conditions; furthermore, the effects of the nanoparticle delivery system on cellular response were evaluated. In addition, suitability for sterility in terms of ophthalmic use was investigated. The findings showed that brimonidine tartrate-loaded nanoparticles were successfully prepared and provided extended release. This study highlights the potential of polymeric nanoparticles to enhance therapeutic efficacy in ophthalmic drug delivery systems, making a significant contribution to the treatment of glaucoma.

Keywords: Brimonidine tartrate, Eudragit® RS 100, Glaucoma, Polymeric nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, birikim ve rehberliğiyle her zaman yanımda olan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet Alper Öztürk'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik yaklaşımı, yapıcı önerileri ve desteği sayesinde bu çalışmanın her aşamasında yolumu aydınlatmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini her zaman hissettiren Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca, bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan, ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans ve doktora öğrenimlerine devam eden arkadaşlarıma da gönülden teşekkür ederim.

Biyolojik aktivite çalışmaları ve deneysel süreçlerimde yol göstericiliği ve desteğiyle katkı sunan Farmakoloji Ana Bilim Dalı öğretim görevlisi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif KAYA TİLKİ'ye teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca, tez sürecinde sterilite çalışmalarında değerli katkılarından dolayı Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı öğretim görevlisi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pervin Soyer'e gönülden teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde beni her daim destekleyen, sabır ve sevgilerini eksik etmeyen canım aileme ve yakın dostlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

__/02/2026

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

.....

Hasan Can HOŞER

__/02/2026

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında, yürütülmesinde, verilerin analizinde Etik Kurul İzni'ne gerek yoktur.

.....

Hasan Can HOŞER

__/02/2026

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken (örneğin ChatGPT, Gemini, DALL-E vb.) üretken yapay zekâ programlarından destek aldığımı beyan ederim. Tezin hazırlığı aşamasında üretken yapay zekâ programlarından (örneğin çeviri, bilimsel makale vb.) desteği aldım. Üretken yapay zekâ programlarından aldığım bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi bildiririm.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Hasan Can HOŞER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI..... i

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI..... ii

ÖZET..... iii

ABSTRACT..... iv

TEŞEKKÜR..... v

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ..... vi

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ..... vii

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI..... viii

İÇİNDEKİLER..... ix

TABLOLAR DİZİNİ..... xvi

ŞEKİLLER DİZİNİ..... xviii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... xxii

1. GİRİŞ..... 1

2. KAYNAK BİLGİSİ..... 3

2.1. Nanopartiküller……..... 3

2.1.1. Polimerik Nanopartiküller……..... 5

2.1.2. Polimerik Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler…….. 5

2.1.2.1. Eudragit® RS 100…….. 8

2.1.2.1.1. Kimyasal Yapısı ve Özellikleri…….....…..... 8

2.1.2.1.2. Fizikokimyasal ve Farmasötik Özellikler…….. 9

2.1.2.1.3. Nanopartikül Sistemlerinde Kullanımı…….. 9

2.1.2.1.4. Karakterizasyon ve Analitik Değerlendirmeler….. 10

2.1.3. Polimerik nanopartikül hazırlanmasında kullanılan yöntemler…..... 10

2.1.3.1. Diyaliz Yöntemi…….…….. 10

2.1.3.2. Süper Kritik Sıvı Teknolojisi…… 12

2.1.3.3. Tek Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi……..... 14

2.1.3.4. Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi……..... 15

2.1.3.5. Tuzla çöktürme……..... 17

2.1.3.6. Püskürterek Kurutma Yöntemi……... 19

2.1.3.7. Nanoçöktürme Yöntemi…… 21

2.2. Göz Anatomisi ve Fizyolojisi……..... 23

2.2.1. Gözün Genel Anatomisi……..... 23

2.2.2. Kornea ve Katmanlı Yapısı……... 24

2.2.3. Gözyaşı Filmi ve Gözyaşı Bariyeri……..... 25

2.3. Göz İçin Geleneksel İlaç Uygulama Yöntemleri……..... 26

2.3.1. Topikal Uygulama Yolu……..... 27

2.3.2. Lokal Enjeksiyon Yolları……... 28

2.3.3. Sistemik Uygulama Yolu……..... 23

2.3.4. Geleneksel Göz Hastalıkları Tedavileri ve Klinik Riskler……..... 30

2.3.5. Genel Değerlendirme……... 30

2.4. Oftalmik Hastalıklar…… 30

2.5. Glokom……..... 32

2.5.1. Glokom Tedavisinde Nanopartikül Taşıyıcı Sistemler……... 33

2.6. Adenilat Siklaz/cAMP……..... 34

2.6.1. Tanım ve Biyokimyasal Temel……... 34

2.6.2. Hücresel Rolü ve Fizyolojik Etkileri……..... 34

2.6.3. Adenilat Siklaz/cAMP Yolunun Oftalmik Sistemle İlişkisi……. 34

2.6.4. Patolojik Durumlarla İlişkilendirilmesi……... 35

2.7. Brimonidin Tartarat…….. 35

2.7.1. Glokomda Adenilat Siklaz/cAMP ve Brimonidin Etkisi…….. 37

2.7.2. Brimonidin Tartarat İçeren Preparatlar…….. 37

3. KALİTEYE DAYALI TASARIM (QbD) YAKLAŞIMI……..... 39

3.1. Farmasötik Ürün Geliştirmede Kaliteye Dayalı Tasarım (Quality by Design, QbD) Yaklaşımı……..... 39

3.2. Oküler Nanopartikül Sistemlerde Kaliteye Dayalı Tasarım (QbD) Yaklaşımının Önemi……..... 40

3.3. Hedef Ürün Kalite Profili (QTPP)……..... 41

3.4. Kritik Kalite Özellikleri (CQA)……..... 41

3.5. Karar Matrisi ve Risk Değerlendirme Yaklaşımları……..... 43

4. GEREÇLER……..... 45

4.1. Kullanılan Maddeler……..... 45

4.2. Kullanılan Cihazlar……..... 45

5. YÖNTEM……..... 47

5.1. UV Spektrofotometre Validasyon Çalışmaları……..... 47

5.1.1. Brimonidin Tartarat için Aseton: Su (1:1, *h/h*) Ortamında Yapılan Çalışmalar…… 47

5.1.1.1. Absorbans Belirleme Çalışmaları……..... 47

5.1.1.2. Doğrusallık……..... 47

5.1.1.3. Doğruluk……..... 48

5.1.1.4. Kesinlik……... 48

5.1.1.5. Duyarlılık…… 48

5.1.1.6. Seçicilik……... 49

5.1.2. Brimonidin Tartarat için STF pH 7.4 Ortamında Validasyon Çalışması……... 49

5.1.2.1. Absorbans Belirleme Çalışmaları…… 49

5.1.2.2. Doğrusallık……... 49

5.1.2.3. Doğruluk……... 49

5.1.2.4. Kesinlik…… 50

5.1.2.5. Duyarlılık…… 50

5.1.2.6. Seçicilik…… 50

5.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması……..... 50

5.2.1. A-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 52

5.2.2. B-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 53

5.2.3. C-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 53

5.2.4. D-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 53

5.2.5. E-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 53

5.2.6. F-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……... 54

5.2.7. G-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 54

5.2.8. H-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 54

5.2.9. I-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 55

5.2.10. J-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 55

5.2.11. K-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 55

5.2.12. L-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……... 55

5.2.13. M-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……... 56

5.2.14. N-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……..... 56

5.2.15. P-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 56

5.2.16. R-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……..... 57

5.2.17. S-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 57

5.2.18. T-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……..... 57

5.2.19. U-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……..... 57

5.2.20. V-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 58

5.2.21. Y-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 58

5.2.22. Z-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 58

5.2.23. P-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 59

5.2.24. S-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…….. 59

5.2.25. T-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 59

5.2.26. U-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 60

5.2.27. V-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması…… 60

5.2.28. Y-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……. 60

5.2.29. Z-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması……. 61

5.2.30. Yıkama ve Liyofilizasyon İşlemleri…….. 61

5.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu……..... 61

5.3.1. Parçacık Boyutu, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Belirleme Çalışması……..... 61

5.3.2. Optimum Formülasyon Seçim Stratejisi……. 62

5.3.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi Çalışmaları..... 64

5.3.4. *In Vitro* Salım Çalışması…….. 65

5.3.5. Salım Kinetiği Çalışması……. 65

5.4. Katı Hal Karakterizasyonları…….. 66

5.4.1. Termal (DSC) Analizler…….. 66

5.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometre Analizleri..... 66

5.5. Sterilite Kontrolü……..... 66

5.5.1. Mikrobiyolojik Değerlendirme/ Sterilite Testi…….. 66

5.6. Biyolojik Aktivite Testleri……..... 67

5.6.1. R28 Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması, Deneylere Hazırlık ve Hücre Sayımları……... 67

5.6.2. R28 Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonların ve tert-Bütil Hidroperoksit (tBHP) Test Konsantrasyonunun Belirlenmesi.. 68

5.6.3. tBHP ile İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi…….. 69

5.6.4. Beta-III-Tubulin Gen Ekspresyonu Değişimlerinin qRT-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi……..... 69

6. BULGULAR ve TARTIŞMA……..... 71

6.1. Analitik Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları……..... 71

6.1.1. Brimonidin Tartarat için Aseton: Su (1:1 *h/h*) Ortamında Validasyon Çalışması……..... 71

6.1.1.1. Absorbans belirleme…….. 71

6.1.1.2. Doğrusallık……. 73

6.1.1.3. Kesinlik……... 74

6.1.1.4. Doğruluk……. 75

6.1.1.5. Duyarlılık…… 76

6.1.1.6. Seçicilik……... 76

6.1.2. Brimonidin Tartarat için STF Ortamında Validasyon Çalışması….. 80

6.1.2.1. Absorbans belirleme…….. 80

6.1.2.2. Doğrusallık……. 82

6.1.2.3. Kesinlik……... 83

6.1.2.4. Doğruluk……. 84

6.1.2.5. Duyarlılık…… 85

6.1.2.6. Seçicilik……... 85

6.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu..... 89

6.2.1. Parçacık Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel……..... 89

6.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi……..... 97

6.4. *In Vitro* Dissolüsyon……..... 98

6.5. Salım Kinetiği……..... 100

6.6. Katı Hal Karakterizasyonları……..... 116

6.6.1. Termal Analiz…… 116

6.6.2. FT-IR Analizleri…… 120

6.7. Sterilite Kontrolü……..... 125

6.8. Biyolojik Aktivite Testleri……..... 129

6.8.1. R28 Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonlar ve

tBHP Test Konsantrasyonu……. 129

6.8.2. tBHP ile İndüklenen Oksidatif Stres Modelinde Antioksidan Aktivite Sonuçları…….. 132

6.8.3. Beta-III-Tubulin (TUBB3) Gen Ekspresyonundaki Değişimler…... 134

7. SONUÇ……..... 137

KAYNAKÇA……..... 139

ÖZ GEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler……..... 7

Tablo 2.2. Brimonidin Tartarat'ın IUPAC İsmi ve Özellikleri……... 35

Tablo 2.3. Brimonidin Tartarat İçeren Preparatlar …… 38

Tablo 5.1. Hazırlanan Blank ve BT Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlama Koşulları ve İçerikleri…….. 51

Tablo 5.1. (Devam) Hazırlanan Blank ve BT Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlama Koşulları ve İçerikleri…… 52

Tablo 5.2. Nanopartikül Hazırlama Sürecinde Sabit Tutulan ve Değiştirilen Parametreler…… 52

Tablo 5.3. Kalite Hedefli Ürün Profili (Quality Target Product Profile-QTPP) Bilgileri…… 63

Tablo 5.4. Kritik Kalite Özellikleri (Critical Quality Attributes-CQA)…….. 63

Tablo 5.5. Parçacık Boyutu Değerleri için Karar Matrisi……... 63

Tablo 5.7. Zeta Potansiyel Değerleri için Karar Matrisi……. 63

Tablo 5.8. BT Yüklemesi Sonrası Blank Formülasyona göre Değişim Değerlendirmesi için Karar Matrisi……. 64

Tablo 6.1. Doğrusallık çalışması sonuçları (aseton:su ortamı)……... 73

Tablo 6.2. 10,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (Aseton:Su Ortamı) ……..... 74

Tablo 6.3. 30,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (Aseton:Su Ortamı) ……..... 75

Tablo 6.4. 50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)……..... 75

Tablo 6.5. BT için Doğruluk Çalışması Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)……..... 76

Tablo 6.6. Doğrusallık Çalışması Sonuçları (STF Ortamı)……..... 82

Tablo 6.7. 10,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (STF Ortamı)… 83

Tablo 6.8. 30,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (STF Ortamı)… 84

Tablo 6.9. 50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (STF Ortamı)… 84

Tablo 6.10. BT için Doğruluk Çalışması Sonuçları (STF Ortamı)…… 85

Tablo 6.11. Formülasyonların Parçacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi (PDI) Değerleri…….. 89

Tablo 6.12. Optimum Formülasyon Seçiminde Uygulanan Karar Matrisi Sonuç Tablosu…… 95

Tablo 6.13. BT için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları……. 98

Tablo 6.14. V-BT-NP Kodlu Formülasyon için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları…….. 98

Tablo 6.15. Salım Kinetiği Çalışması Sonuçları……. 101

Tablo 6.16. (Devam) Salım Kinetiği Çalışması Sonuçları……..... 102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Nanoküre ve Nanokapsül Yapısının Şematik Gösterimi…….. 4

Şekil 2.2. Eudragit® RS 100'ün Kimyasal Yapısı…… 9

Şekil 2.3. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Diyaliz Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……... 12

Şekil 2.4. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Süper Kritik Sıvı Teknolojisi Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……..... 13

Şekil 2.5. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Tek Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……..15

Şekil 2.6. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……..17

Şekil 2.7. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Tuzla Çöktürme Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……..19

Şekil 2.8. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Püskürterek Kurutma Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……. 21

Şekil 2.9. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Nanoçöktürme Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi……. 23

Şekil 2.10. Göz Küresinin Genel Anatomisini ve Tabakalarının Şematik Olarak Gösterimi……... 24

Şekil 2.11. Kornea Tabakalarını (Epitel–Stroma–Endotel) Şematik Olarak Gösterimi……... 25

Şekil 2.12. Gözyaşı Filminin Lipid–Sulu–Mukus Tabakalarını Şematik Olarak Gösterimi……... 26

Şekil 2.13. Göz Anatomisi Üzerinde Farklı İlaç Uygulama Yollarını (Topikal, Lokal Enjeksiyon ve Sistemik) Gösteren Şematik Diyagram……... 27

Şekil 2.14. Topikal Damla Uygulaması Sonrası İlacın Göz Yüzeyinden Uzaklaştırılmasını Gösteren Şema……..... 28

Şekil 2.15. İntravitreal, Subkonjonktival ve Perioküler Enjeksiyon Bölgelerini Gösteren Anatomik Şema…… 29

Şekil 2.16. Sistemik Dolaşımdan Göze İlaç Geçişini ve Kan–Aköz ile Kan-Retina Bariyerlerini Şematik Olarak Gösterimi…….....30

Şekil 2.17. Brimonidin Tartarat'ın Kimyasal Yapısı……..…….. 36

Şekil 6.1. 200-800 nm Arasında 25,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (Aseton:Su Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)…….. 71

Şekil 6.2. 200-800 nm Arasında 50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (Aseton:Su Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)…….. 72

Şekil 6.3. 200-800 nm Arasında 100,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (Aseton:Su Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)…….. 72

Şekil 6.4. BT'nin Aseton: Su (1:1, *h/h*) Ortamında Standart Eğrisi…….. 73

Şekil 6.5. BT'ye ait Spektrum (25,0 µg.mL^{-1}, Aseton:Su Ortamı)……...77

Şekil 6.6. V-Blank-NP Kodlu Formülasyona ait Spektrum (Aseton:Su Ortamı)…..77

Şekil 6.7. Aseton:Su (1:1, *h/h*) Karışımına ait Spektrum (Aseton:Su Ortamı)……..78

Şekil 6.8. 200-800 nm Arasında 25,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (STF Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)…… 80

Şekil 6.9. 200-800 nm Arasında 50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (STF Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)…… 81

Şekil 6.10. 200-800 nm arasında 100,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda BT çözeltisi için elde edilen spektrum (STF ortamı, λmax=322,0 nm)……..... 81

Şekil 6.11. BT'nin STF (pH 7.4) Ortamında Standart Eğrisi…… 82

Şekil 6.12. BT'e ait Spektrum (25,0 µg.mL^{-1}, STF Ortamı)……..... 86

Şekil 6.13. V-Blank-NP Kodlu Formülasyona ait Spektrum (STF Ortamı)……. 86

Şekil 6.14. STF'e ait Spektrum (STF Ortamı)…….. 87

Şekil 6.15. BT ve V-BT-NP Kodlu Formülasyon için Kümülatif Salım Grafiği….. 99

Şekil 6.16. Birinci Derece Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 103

Şekil 6.17. Birinci Derece T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 103

Şekil 6.18. Birinci Derece F_{max} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 104

Şekil 6.19. First-order T_{lag} ve F_{max} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 104

Şekil 6.20. Higuchi Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)…….....105

Şekil 6.21. Higuchi T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 105

Şekil 6.22. Higuchi F_0 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)…….....106

Şekil 6.23. Korsmeyer-Peppas Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 106

Şekil 6.24. Kornsmeyer-Peppas T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..……..... 107

Şekil 6.25. Kornsmeyer-Peppas F_0 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 107

Şekil 6.26. Hixson-Crowell T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 108

Şekil 6.27. Hopfenberg Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..……... 108

Şekil 6.28. Baker-Lonsdale Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 109

Şekil 6.29. Baker-Lonsdale T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 109

Şekil 6.30. Peppas-Sahlin 1 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 110

Şekil 6.31. Peppas-Sahlin 1 T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 110

Şekil 6.32. Peppas-Sahlin 2 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)……..... 111

Şekil 6.33. Peppas-Sahlin 2 T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili…….....111

Şekil 6.34. Weibull 1 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili……..……..... 112

Şekil 6.35. Weibull 2 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili……..……..... 112

Şekil 6.36. Weibull 3 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili……...……..... 113

Şekil 6.37. Weibull 4 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili..……..... 114

Şekil 6.38. BT'e ait DSC eğrisi...……..... 117

Şekil 6.39. ERS 100 polimerine ait DSC eğrisi..……...117

Şekil 6.40. V-Blank-NP kodlu formülasyona ait DSC eğrisi……..... 118

Şekil 6.41. V-BT-NP kodlu formülasyona ait DSC eğrisi…….....118

Şekil 6.42. Fiziksel karışıma ait DSC eğrisi..……..... 119

Şekil 6.43. BT'ye ait FT-IR spektrumu...……..... 121

Şekil 6.44. ERS 100 polimerine ait FT-IR spektrumu….……..... 121

Şekil 6.45. V-Blank-NP kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu……..... 122

Şekil 6.46. V-BT-NP kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu…….. 122

Şekil 6.47. Fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumu……..... 123

Şekil 6.48. Sterilite analiz sonuçları……..... 126

Şekil 6.49. R28 hücrelerinde BT'nin farklı konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µg/mL) hücre canlılığı üzerindeki etkileri…….. 129

Şekil 6.50. R28 hücrelerinde V-BT-NP'nin farklı konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µg/mL) hücre canlılığı üzerindeki etkileri…….. 130

Şekil 6.51. R28 hücrelerinde V-Blank-NP'nin farklı konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µg/mL) hücre canlılığı üzerindeki etkileri……..... 131

Şekil 6.52. R28 hücrelerinde tBHP'nin farklı konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µM) hücre canlılığı üzerindeki etkileri…….. 132

Şekil 6.53. tBHP ile indüklenen oksidatif stres modelinde BT ve V-BT-NP uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri……... 133

Şekil 6.54. tBHP (7.5 µM) ile indüklenen oksidatif stres modeli altında TUBB3 gen ekspresyonundaki değişimler…….. 134

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrat derece

a/h : Ağırlık/hacim

AAG : Açık açılı glokom

AC : Adenilat Siklaz

ACTB : Beta-Aktin Geni

AIC : Akaike Bilgi Kriteri

AMD : Yaşa bağlı makula dejenerasyonu

ATP : Adenozin trifosfat

BSA : Sığır serum albümini

BT : Brimonidin Tartarat

Ca^{+2} : Kalsiyum

cAMP : Siklik adenozin monofosfat

CI : Hücre İndeksi

CO_2 : Karbondioksit

COD : Korelasyon Katsayısı

DLS : Dinamik Işık Saçılımı

DMEM : Dulbecco Tarafından Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DSC : Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

EE : Enkapsülasyon Etkinliği

ERL 100 : Eudragit® RL 100

ERS 100 : Eudragit® RS 100

EVA : Etilen-vinil asetat

FBS : Fetal Sığır Serumu

FIP : Uluslararası Eczacılık Federasyonu

FT-IR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi

h/h : Hacim/hacim

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

HCO_3^- : Bikarbonat

HSA : İnsan serum albümini

Hz : Hertz

IC_{50} : Yarı İnhibitör Konsantrasyon

ICH : Uluslararası Harmonizasyon Birliği

IOP : İntraoküler basınç /Göz İçi Basınç

J : Bağlanma Sabiti

kDa : Kilodalton

LOD : Tespit Sınırı

LOQ : Ölçüm Sınırı

Mg : Miligram

min : Dakika

Ml : Mililitre

mm : Mikrometre

MSC : Model Seçim Kriteri

MTT : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür

NBG : Normal Basınçlı Glokom

Nm : Nanometre

O/W : Yağ-içinde-su emülsiyonu

P-188 : Poloxamer 188 (Pluronic F68)

PAAG : Primer Açık Açılı Glokom

PCL : Polikaprolakton

PDI : Polidispersite İndeksi

PDO : Polidioksanon

PEG : Poli(etilen glikol)

PGA : Poli(glikolik asit)

PHB : Poli 3-hidroksibutirat

PKA : Protein Kinaz A

PKAG : Primer Kapalı Açılı Glokom

PLA : Poli(laktik asit)

PLGA : Poli(laktik-ko-glikolik asit)

PLLA : Poli(L-laktik asit)

PMMA : Poli(metil metakrilat)

PVA : Polivinil Alkol

QbD : Tasarım Kalitesi

qRT-PCR : Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

R^2 : Korelasyon Katsayısı

R28 : Retinal gangliyon hücre hattı

$R^2_{adjusted}$: Düzeltilmiş Korelasyon Katsayısı

RGC : Retinal Gangliyon Hücreleri

Rpm : Devir/dakika

RTCA DP : Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı

S : Regresyon çizgisinin eğimi

S_1/Y : Su-içinde-yağ emülsiyonu (W/O emülsiyonuna karşılık gelir)

$S_1/Y/S_2$: Su-içinde-yağ-içinde-su emülsiyo-nu (W/O/W emülsiyonuna karşılık gelir)

sAC : Çözünebilir Adenilat Siklaz

SAS : Süperkritik Anti-Çözücü

SCFT : Süper kritik sıvı teknolojisi

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

STF : Simüle Edilmiş Gözyaşı Sıvısı

tBHP : tert-Bütil Hidroperoksit

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

tmAC : Transmembran Adenilat Siklaz

TUBB3 : Beta-III-Tubulin

W/O : Su-içinde-yağ emülsiyonu

W/O/W : Su-içinde-yağ-içinde-su emülsiyonu

% : Yüzde

Δ : Kimyasal Kayma

λ_{max} : Maksimum dalga boyu

$\mu g.mL^{-1}$: Mikrogram/mililitre

µL : Mikrolitre

Mm : Mikromolar

σ : Sonucun standart sapması

1. GİRİŞ

Glokom, görme sinirinde progresif hasar meydana getiren, tedavi edilmediği takdirde kalıcı görme kaybına ve körlüğe yol açabilen ciddi bir oküler hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, glokom dünya genelinde körlüğün ikinci en yaygın nedenidir ve özellikle yaşlı popülasyonda prevalansı artmaktadır. Glokom, retina ganglion hücrelerinin kaybı, optik disk çukurlaşması ve görme alanı defektleri ile karakterizedir. Hastalığın ilerleyici doğası, erken tanı ve etkili tedavi stratejilerinin önemini ortaya koymaktadır.

Günümüzde glokom tedavisinde en yaygın uygulama topikal göz damlaları ile intraoküler basıncın (IOP) düşürülmesidir. Topikal formülasyonların kornea epiteli, konjonktiva, lakrimal drenaj ve gözyaşı sekresyonu gibi anatomik ve fizyolojik engeller nedeniyle biyoyararlanımı son derece düşüktür. Uygulanan ilacın yalnızca %1-10'u intraoküler dokulara ulaşabilmekte, bu da terapötik etkinliğin azalmasına ve sık dozlama gerekliliğine neden olmaktadır. Bu durum hem hasta uyumunu zorlaştırmakta hem de sistemik yan etki riskini artırmaktadır.

Son yıllarda gelişen farmasötik teknoloji araştırmaları ile birlikte, nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemler konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerine alternatif olarak ön plana çıkmıştır. Nanopartikül sistemler, yüksek yüzey alanları sayesinde ilacın çözünürlüğünü ve doku penetrasyonunu artırabilmekte, aynı zamanda uzatılmış salım profili sayesinde terapötik etkinliği uzatabilmektedir. Göze ilaç uygulamalarında nanotaşıyıcı sistemlerin kullanımı, korneal geçirgenliği artırma, etken maddenin gözde kalma süresini uzatma ve hedefli ilaç salımı sağlama gibi avantajlar sunmaktadır.

Brimonidin tartarat (BT), selektif alfa-2 (α2) adrenerjik reseptör agonisti olarak etki gösteren ve oküler sıvı üretimini azaltarak intraoküler basıncı düşüren bir etkin maddedir. BT, glokom ve oküler hipertansiyon tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir ajan olup, sistemik absorbsiyonu düşük ancak topikal uygulamada hızlı elimine olması nedeniyle sık aralıklarla dozlanması gerekmektedir. Bu durum, tedaviye uyum sorunları ve istenilen terapötik etkinliğin sağlanamaması gibi dezavantajlara neden olmaktadır.

Bu bağlamda, BT gibi etkin maddelerin terapötik etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla biyobozunur polimerler ile hazırlanan nanopartikül sistemlerin kullanımı önem kazanmaktadır. Eudragit® RS 100 (ERS 100), düşük geçirgenlik ve

modifiye salım özellikleri sayesinde göz için uygun bir taşıyıcı polimer olarak öne çıkmaktadır. Hidrofobik yapısı ve amonyum grubu içeren yapısı sayesinde ERS 100, oftalmik ilaç taşıyıcı sistemlerde ilacın uzatılmış salımını sağlamada etkili olabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, BT etkin maddesini içeren ERS 100 bazlı polimerik nanopartikül sistemlerin çift emülsiyon ve buharlaştırma yöntemiyle hazırlanması, karakterizasyonu ve *in vitro* değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, mevcut oftalmik tedavilerin yetersizliklerini aşmayı hedefleyen yeni bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi hedeflenmiş ve glokom tedavisinde nanofarmasötik uygulamaların potansiyeli araştırılmıştır.

Nanopartikül bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde ürün kalitesinin son aşamada test edilmesi yerine, formülasyon ve proses aşamalarında bilinçli kararlar alınmasını esas alan Tasarım Kalitesi (Quality by Design - QbD) yaklaşımının temel prensipleri benimsenmiştir. Bu yaklaşım doğrultusunda, geliştirilen nanofarmasötik sistemlerin terapötik etkinliğini ve güvenilirliğini doğrudan etkileyen parçacık boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyel gibi özellikler kritik değerlendirme kriterleri olarak ele alınmıştır. BT yüklü ERS 100 nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan yöntem ve formülasyon bileşenleri, söz konusu özellikler üzerindeki etkileri dikkate alınarak seçilmiş ve sistematik olarak değerlendirilmiştir. Böylece çalışmada elde edilen nanopartikül sistemlerinin tekrarlanabilirliğinin artırılması ve elde edilen sonuçların bilimsel olarak anlamlandırılabilir bir çerçevede yorumlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Nanopartiküller

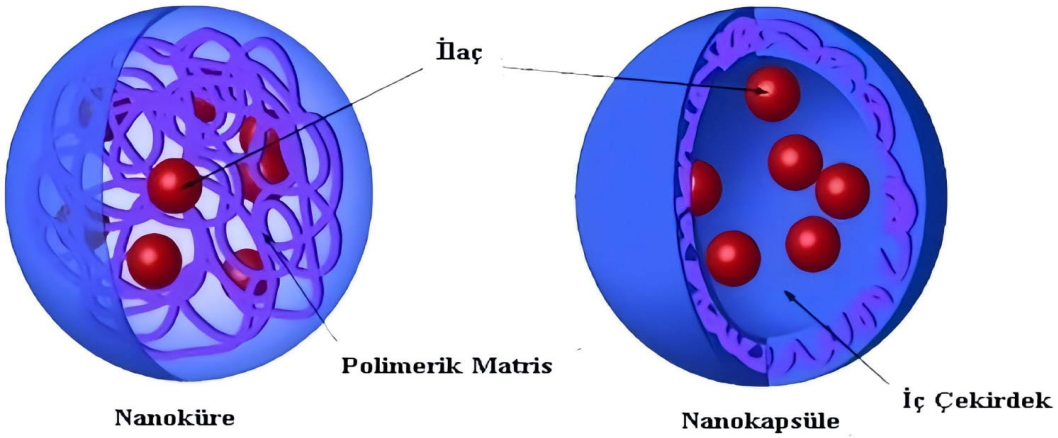
Nanoteknoloji, son yıllarda farmasötik bilimlerde önemli bir devrim yaratmış ve özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesinde çığır açıcı çözümler sunmuştur. Bu kapsamda, nanopartiküller; biyoyararlanımı düşük, çözünürlüğü sınırlı veya hedefe yönelik iletimi zor olan ilaç molekülleri için etkili taşıyıcı sistemler olarak dikkat çekmektedir. Tipik olarak 1–1000 nm boyut aralığında değişen bu kolloidal sistemler, ilacı çevreleyen ya da taşıyan bir polimerik matris içerisinde yapılandırılabilmektedir. Böylece, terapötik ajanların çözünürlük ve stabilite gibi kritik özellikleri artırılabilirken aynı zamanda farmakokinetik profilleri de optimize edilmektedir (Zielińska vd., 2020; Begines vd., 2020).

Nanopartiküller, yüksek yüzey alanı/hacim oranı sayesinde çözünürlüğü düşük ilaçların çözünürlük derecesini artırabilirken, aynı zamanda ilacın hedef dokuya yönlendirilmesini kolaylaştırmakta ve sistemik dolaşıma karışmasını sınırlayarak yan etki riskini azaltmaktadır. Konvansiyonel dozaj formlarına kıyasla daha uzun süreli ve kontrollü salım profili sunabilmeleri, tedavi süresince sabit plazma düzeylerinin korunmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, biyolojik bariyerlerin (örneğin kornea, epidermis, gastrointestinal membranlar) aşılması açısından da nanopartikül sistemlerin önemli avantajlar sunduğu gösterilmiştir (Begines vd., 2020; Yusuf vd., 2023).

Nanopartikül sistemler genellikle nanoküre ve nanokapsül olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Nanoküreler, ilacın polimer matriks içinde homojen dağıldığı yapılar iken; nanokapsüller, çekirdek-kabuk yapısına sahiptir ve ilacı çevreleyen bir polimerik kabuk ile karakterizedir. Hangi yapının tercih edileceği, hedeflenen tedavi şekli, ilacın fizikokimyasal özellikleri, uygulama yolu ve salım süresine göre belirlenmektedir. Bu sistemlerin üretimi sırasında kullanılan polimerlerin yapısı, çözünürlük özellikleri ve biyobozunurluk düzeyleri de sistemin performansını doğrudan etkilemektedir (Zielińska vd., 2020; Yusuf vd., 2023). Nanoküre ve nanokapsül yapısı Şekil 2.1.'de şematik olarak sunulmuştur.

Şekil 2.1.

Nanoküre ve Nanokapsül Yapısının Şematik Gösterimi



Kaynak: Christoforidis, Cebulla, Wang vd., 2012

Farmasötik teknoloji alanında nanopartiküller; oral, parenteral, pulmoner, transdermal ve özellikle de oftalmik uygulamalarda yaygın biçimde araştırılmaktadır. Oftalmik tedavilerde nanopartikül sistemlerin kullanımı, gözyaşı drenajı ve kornea geçirgenliği gibi fizyolojik sınırlamaları aşma potansiyeli taşımaktadır. Özellikle göz gibi hassas organlarda kontrollü, uzatılmış ve hedefe yönelik ilaç salımı sağlamak, hastaların tedaviye uyumunu artırırken, topikal uygulamalarda sık karşılaşılan sistemik yan etkilerin de azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Begines vd., 2020; Mitchell vd., 2021).

Bu avantajlarına rağmen, nanopartikül sistemlerin geliştirilmesinde karşılaşılan bazı zorluklar da mevcuttur. Üretim sürecindeki karmaşıklık, fizikokimyasal stabilitenin sağlanması, partikül boyutunun homojenliği ve istenen salım profilinin elde edilmesi gibi faktörler, sistemin etkinliği üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Ayrıca, endüstriyel ölçekte üretim sırasında karşılaşılan maliyet ve teknik kısıtlamalar da bu sistemlerin rutin kullanıma entegrasyonunu yavaşlatmaktadır. Yine de araştırma-geliştirme çalışmalarındaki ilerlemeler, bu engellerin aşılmasını mümkün kılmaktadır (Yusuf vd., 2023).

Nanopartikül araştırmaları günümüzde yoğun olarak devam etmekte olup, özellikle biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerin kullanımı ile hazırlanan sistemler farmasötik formülasyonlar açısından dikkat çekici bir potansiyele sahiptir. Bu sistemlerin klinik

uygulamalara entegrasyonu, gelecekte birçok terapötik alanda yenilikçi tedavi yaklaşımlarının önünü açacaktır (Zielińska vd., 2020; Mitchell vd., 2021).

2.1.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, farmasötik alanda ilaç taşıyıcı sistemler olarak yaygın şekilde kullanılan ve hem biyouyumluluğu hem de biyobozunurluğu ile dikkat çeken kolloidal yapılardır. Bu sistemler, polimer bazlı olmaları sayesinde terapötik ajanların hedef dokuya yönlendirilmesini, uzatılmış salımını ve sistemik yan etkilerinin azaltılmasını mümkün kılar (Andrade vd., 2024).

Polimerik nanopartiküllerin en belirgin özelliklerinden biri, yüksek yüzey alanı/hacim oranıdır. Bu özellik, partiküllerin biyolojik membranlarla etkileşim yeteneğini artırarak hücre içine alım süreçlerinde avantaj sağlar. Aynı zamanda, aktif maddenin çözünürlüğü düşük olsa dahi, nanoparçacık formunda çözünürlük ve biyoyararlanım önemli ölçüde artırılabilir (Kumari vd., 2010).

Polimerik nanopartiküller, taşıdıkları aktif maddeyi çevresel uyarılara duyarlı olarak salabilecek şekilde tasarlanabilir. Bu sistemler pH, sıcaklık veya enzim varlığı gibi fizyolojik koşullara yanıt vererek hedeflenen bölgede ilacın salımını gerçekleştirebilir. Bu yönüyle polimerik nanopartiküller, modifiye salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir (Mura, Nicolas ve Couvreur, 2013).

Yüzey fonksiyonlandırmaya açık yapıları sayesinde, polimerik nanopartiküller hedeflenmiş ilaç taşıyıcı için uygun platformlardır. Yüzeylerine ligand, antikor veya peptit gibi biyomoleküller bağlanarak spesifik reseptörlere sahip hücrelere yönlendirme sağlanabilir. Böylece sağlıklı dokular korunurken, ilaç etkisi yalnızca hedef hücrelerde yoğunlaştırılabilir (De Jong ve Borm, 2008).

Polimerik nanopartiküller aynı zamanda fiziksel stabilite açısından da avantajlıdır. Uygun formülasyon koşullarında uzun raf ömrüne sahip olabilirler ve dış etkenlere karşı içerdikleri aktif maddeyi koruma kapasitesi yüksektir. Bu, özellikle ışığa veya oksijene karşı hassas ilaçlar için önemlidir (Tapeinos vd., 2017).

2.1.2. Polimerik Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler

Polimerik nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve ilaçların hedefe yönelik, kontrollü ve sürdürülebilir salımını sağlayan sistemlerdir. Bu

sistemlerde kullanılan polimerler biyouyumluluk, biyobozunurluk, ilaç yükleme kapasitesi ve salım profili gibi özellikleri etkileyerek, sistemlerinin etkinliğini ve özelliğini belirler. İlaç taşıyıcı sistemleri hazırlamada kullanılan polimerler farklı şekillerde sınıflandırılabilmekle beraber genel olarak üç ana gruba ayrılır: doğal ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve sentetik ancak biyolojik olarak parçalanamayan polimerler (Kumari vd., 2010).

Doğal polimerler, biyouyumlulukları ve biyobozunurlukları sayesinde ilaç taşıyıcı sistemlerinde sıklıkla tercih edilir. Proteinler (albumin, kolajen, jelatin) ve polisakkaritler (kitosan, selüloz, aljinat) bu gruba dahildir. Kitosan, özellikle mukoadhezif özellikleri ve biyolojik bariyerleri geçme yeteneği nedeniyle dikkat çekmektedir (Kalam vd., 2022).

Sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler arasında poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimeri olan poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA) öne çıkar. PLGA, vücutta laktik asit ve glikolik asit gibi doğal metabolitlere parçalanır, bu da toksisite riskini azaltır (Danhier vd., 2012).

Sentetik ve biyolojik olarak parçalanamayan polimerler, uzun süreli salım sistemlerinde veya yapısal stabilitenin önemli olduğu uygulamalarda kullanılır. Poli(metil metakrilat) (PMMA) bu gruba örnektir ve biyobozunmaz yapısı nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır (De Jong ve Borm, 2008). Tablo 2.1'de nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan polimerler sunulmuştur.

Tablo 2.1.

Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerler	Polimer Grubu	Örnekler
Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilenler	Proteinler	Albumin, Kolajen, Jelatin, Sığır serum albümini, İnsan serum albümini
	Polisakkaritler	Selüloz, Dekstran, Kitosan, Kondroitin sülfat, Aljinat, Nişasta, Hiyaluronik asit
	Poliamidler	Poliamino asit, Polipeptid
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilenler	Poliesterler	Poli(laktik asit), poli(glikolik asit), Poli(laktik-ko-glikolik asit), Polikaprolakton, Polidioksanon, Poli 3-hidroksibutirat
	Polianhidridler, Poliotroesterler, Polifosfoesterler	Polifosfat, Polifosfonat, Polifosfit
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanamayanlar	Silikon elastomerler, Etilen-vinil asetat (EVA), Poliakrilatlar	Poli(metil metakrilat)

Kaynak: Tüylek, 2017

Farmasötik teknoloji ve farmasötik nanoteknoloji alanlarında sıklıkla kullılan bazı polimer örnekleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. PLGA (Poli(laktik-ko-glikolik asit): FDA onaylıdır, biyobozunur ve kontrollü salım sağlayan en yaygın kullanılan polimerlerden biridir (Makadia ve Siegel, 2011).
2. PLA ve PGA: PLGA'nın yapı taşlarıdır, benzer biyobozunur özellikler gösterir (Woodruff ve Hutmacher, 2010).
3. PCL (Polikaprolakton): Daha uzun süreli ilaç salımı sağlayabilen, oldukça hidrofobik bir polimerdir (Woodruff ve Hutmacher, 2010).

4. Kitosan: Mukoadhezif özelliği ve biyolojik bariyerleri geçme kapasitesi ile öne çıkar (Kalam vd., 2022).
5. Eudragit® RS ve RL: pH'dan bağımsız salım sağlayan, kontrollü salım sistemlerinde kullanılan sentetik polimerlerdir (Pandey vd., 2012).

Bu tez çalışmasında Eudragit® RS 100 (ERS 100) kullanıldığı için bir sonraki başlıkta ERS 100 ile ilgili literatür bilgileri sunulmuştur.

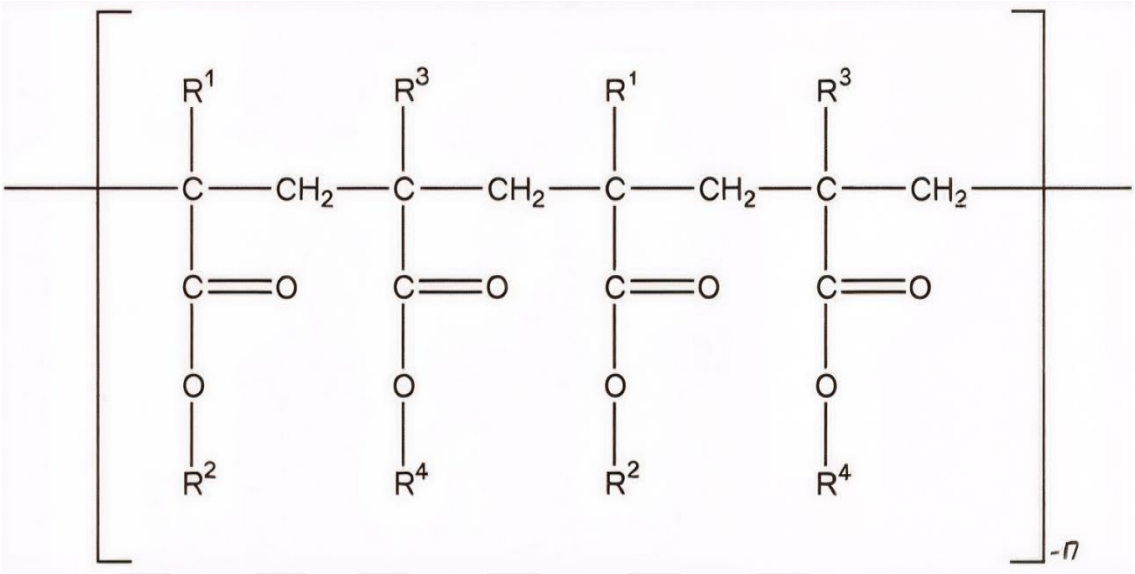
2.1.2.1. Eudragit® RS 100

2.1.2.1.1. Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Eudragit® RS 100 (ERS 100) metil metakrilat, etil akrilat ve kuaterner amonyum gruplarının rastgele kopolimerizasyonuyla elde edilen bir katyonik polimerdir. Yapısındaki kuaterner amonyum grupları, polimere pozitif yüzey yükü kazandırarak biyolojik zarlarla elektrostatik etkileşim kapasitesi sağlar. Bu özellik, ERS 100'ü mukozal yüzeylerle yüksek afiniteye sahip farmasötik taşıyıcı sistemler için uygun hâle getirir. Suda çözünmemekle birlikte, yapısal olarak şişebilir bir formdadır ve bu şişme davranışı, ilacın kontrollü, uzatılmış ve pH'dan bağımsız salımını mümkün kılar. (Pignatello, Ferro ve Puglisi, 2002; Pandey vd., 2012). Şekil 2.2'de ERS 100'ün kimyasal yapısı gösterilmiştir.

Şekil 2.2.

Eudragit® RS 100'ün Kimyasal Yapısı



Kaynak: Reddy vd., 2013

2.1.2.1.2. Fizikokimyasal ve Farmasötik Özellikler

ERS 100 amorf yapılı bir polimer olup camsı geçiş sıcaklığı (Tg) yaklaşık 65–70 °C aralığındadır. Su geçirgenliği düşüktür ve bu özelliği sayesinde uzatılmış salım sistemlerinde tercih edilir. Polimerin düşük higroskopikliği, iyi sıkıştırılabilirliği ve yüksek termal stabilitesi; tablet, kapsül, film ve pelet sistemlerinde uygulanabilirliğini artırmaktadır. Ayrıca gastrointestinal sistem boyunca pH'ye bağımlı olmaksızın uzatılmış salım sağladığı gösterilmiştir (Thakral, Thakral ve Majumdar, 2013).

2.1.2.1.3. Nanopartikül Sistemlerinde Kullanımı

ERS 100, nanopartikül sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoçöktürme, emülsiyon buharlaştırma ve püskürtme kurutma gibi yöntemlerde üretilen ERS 100 nanopartikülleri, genellikle küresel morfolojiye, pozitif zeta potansiyeline ve homojen boyut dağılımına sahiptir. Yapısal avantajları sayesinde bu partiküller mukozal yüzeylere tutunma kabiliyeti gösterir ve bu da nazal, oral ve oftalmik uygulamalarda etkili taşıyıcı sistemler oluşturur. Literatürde partikül boyutlarının çoğunlukla 100–300 nm aralığında olduğu ve enkapsülasyon veriminin yüksek seviyelerde gerçekleştiği rapor edilmiştir (Pandey vd., 2012; Cardoso vd., 2023).

2.1.2.1.4. Karakterizasyon ve Analitik Değerlendirmeler

ERS 100 içeren nanopartikül sistemleri, ileri karakterizasyon teknikleriyle değerlendirilir. Partikül boyutu ve dağılımı dinamik ışık saçılımı (DLS) ile; yüzey morfolojisi ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile analiz edilmektedir. Zeta potansiyel ölçümleri, yüzey yükünü ve kolloidal stabiliteyi belirlemede kritik öneme sahiptir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve X-Işını Kırınım (XRD) analizleri, polimer–ilaç etkileşimlerini ve sistemin kristal veya amorf yapıda olup olmadığını ortaya koyar. Termal analizler (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre-DSC, Termogravimetrik analiz-TGA) ise formülasyonların ısıya karşı kararlılığını ve kapsülasyonun değerlendirir. Bu teknikler, sistemin farmasötik uygunluğunun belirlenmesinde temel rol oynar (Nikam, Sahoo, Musale vd., 2023; Öztürk vd., 2017).

2.1.3. Polimerik Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Yöntemler

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler, elde edilecek taşıyıcı sistemlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirleyen en temel faktörlerdendir. Seçilen yöntem, partikül boyutu, morfolojisi, ilaç yükleme kapasitesi ve salım profili gibi parametreleri doğrudan etkiler (Ravi ve Gupta, 2016; Kumari vd., 2010). İlerleyen başlıklarda literatürde en sık kullanılan yedi temel hazırlama yöntemi detaylı olarak açıklanmıştır.

2.1.3.1. Diyaliz Yöntemi

Diyaliz yöntemi, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan, çözücünün kontrollü bir şekilde uzaklaştırılmasına dayanan basit ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde, polimer ve terapötik ajan uygun bir organik çözücü içinde çözülerek homojen bir çözelti elde edilir. Daha sonra bu çözelti, belirli moleküler ağırlıktaki maddelerin geçişine izin veren yarı geçirgen bir membran (diyaliz membranı) içerisine alınır ve çözücü olmayan ortamda (genellikle saf su) karıştırma altında inkübe edilir. Organik çözücünün dış faza kontrollü difüzyonu ile birlikte polimer ortamda çöker ve nanopartikül oluşumu gerçekleşir (Fruntke vd. 2025; Rao ve Geckeler, 2011).

Yöntem, özellikle biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerin (kitosan, PLGA, PCL vb.) kullanımıyla ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirmek için tercih edilmektedir. Özellikle

hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılmakta olup, düşük enerji ihtiyacı, basit ekipman gereksinimi ve çözücü kalıntılarının minimum düzeyde olması önemli avantajlarındandır (Fruntke vd., 2025; Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015). Ayrıca, ısıya duyarlı moleküller için uygun bir ortam sağlaması yöntemi avantajlı kılar (Rao ve Geckeler, 2011).

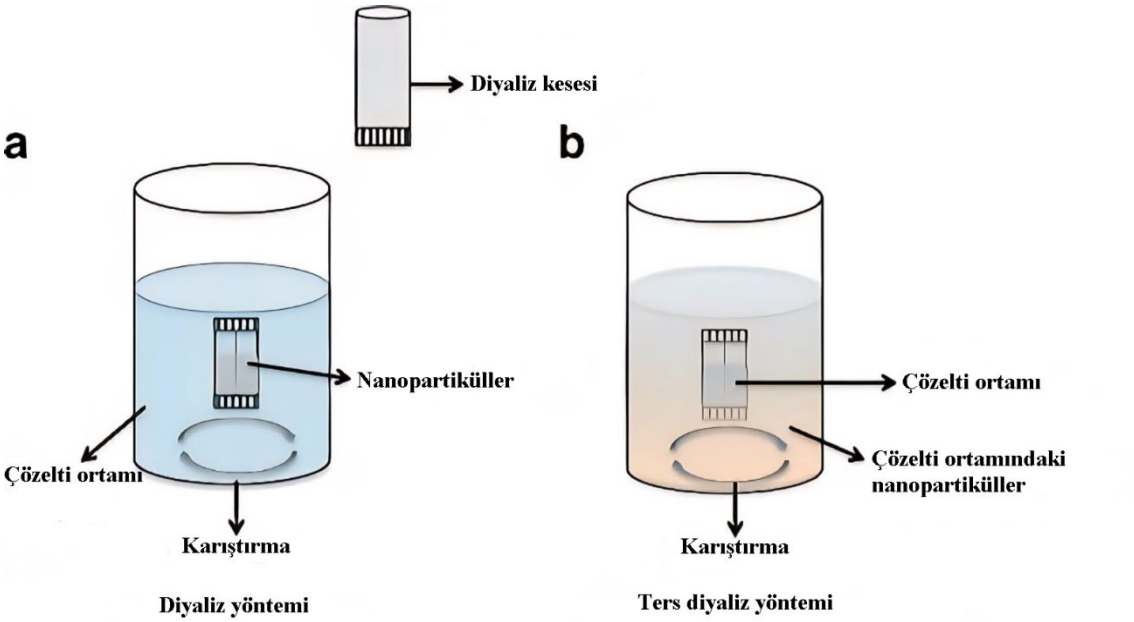
Diyaliz süreci genellikle 12 ila 96 saat sürebilir ve bu süre boyunca dış ortam sıvısı belirli aralıklarla değiştirilir. Nanopartikül boyutları; çözücünün tipi, polimerin doğası, membran geçirgenliği ve karıştırma hızı gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişmekte olup, genellikle 100–400 nm aralığında bulunur. Elde edilen nanopartiküller çoğunlukla homojen dağılım yani monodispers özellik gösterir (Jeong, Cho, Kim vd., 2001).

Yöntemin bazı dezavantajları arasında üretim süresinin uzun olması ve büyük ölçekli üretim için verimin düşük olması sayılabilir. Ayrıca partikül boyut kontrolü, çözücü difüzyon hızına ve sistem optimizasyonuna duyarlıdır. Bu nedenle, üretim ölçeklendirilmeden önce laboratuvar ortamında sistematik parametre optimizasyonları yapılmalıdır (Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015; Lassalle ve Ferreira, 2007).

Son dönem çalışmalarda, diyaliz yönteminin sürekli akış sistemleri veya mikroakışkan tabanlı platformlarla entegre edilerek daha verimli ve ölçeklenebilir hale getirilmesi hedeflenmiştir. Bu sayede hem üretilen nanopartiküllerin özellikleri daha iyi kontrol edilmekte hem de yöntem endüstriyel üretim açısından daha uygulanabilir hale gelmektedir (Fruntke vd. 2025; Bhardwaj ve Jangde, 2023). Şekil 2.3'te diyaliz yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması gösterilmiştir.

Şekil 2.3.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Diyaliz Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Shen ve Burgess, 2013

2.1.3.2. Süper Kritik Sıvı Teknolojisi

Süper kritik sıvı teknolojisi (Supercritical Fluid Technology, SCFT), polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında çevresel açıdan sürdürülebilir, çözücü kalıntısı bırakmayan ve yüksek derecede kontrollü partikül üretimi sağlayan modern bir yöntemdir. Bu yöntemin temelinde, kritik sıcaklık ve basıncın üzerindeki koşullarda sıvı ve gaz özelliklerini birlikte taşıyan süper kritik akışkanların (en yaygın olarak karbondioksit, CO_2) kullanımı yatmaktadır. Süper kritik CO_2, düşük yüzey gerilimi ve yüksek difüzyon katsayısı sayesinde hem çözücü hem de antisolvent olarak işlev görebilir (Byrappa vd., 2008; Bhardwaj ve Jangde, 2023).

Süper kritik sıvı teknolojisinin en yaygın uygulama türlerinden biri SAS (Supercritical Anti-Solvent, Süperkritik Anti-Çözücü) yöntemidir. Bu yöntemde polimer ve terapötik ajan, organik bir çözücü içinde çözülerek hazırlanır ve bu çözelti, yüksek basınç altında bulunan süper kritik CO_2 ortamına enjekte edilir. Süper kritik CO_2, organik çözücünün çözünürlüğünü düşürerek aniden çöktürülmesini sağlar; bu sayede polimer ve ilaç ortamda çökelerek homojen nanopartiküller oluşur. Oluşan partiküller daha sonra süper kritik ortamdan ayrılarak toplanır (Bhardwaj ve Jangde, 2023; Franco ve De Marco, 2020).

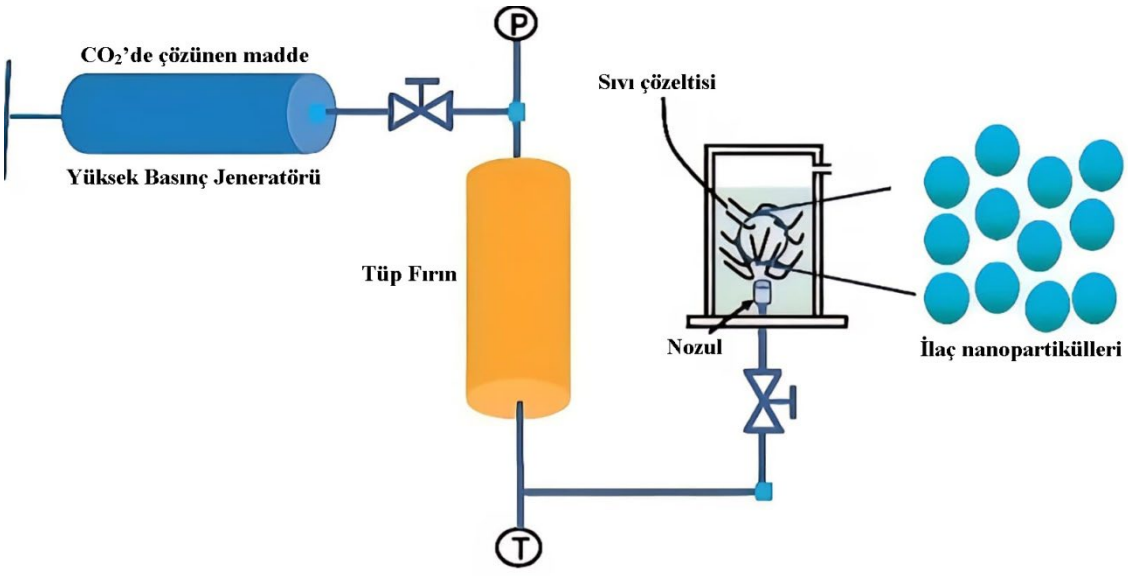
Bu yöntemde kullanılan başlıca polimerler arasında PLGA, poli(L-laktik asit) (PLLA), PCL ve doğal polimerler yer alır. Ayrıca, SAS yöntemiyle yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve düşük partikül aglomerasyonu sağlanabilmektedir. Üretilen nanopartiküller genellikle 50–500 nm arasında değişen boyutlara sahiptir ve dar dağılım gösterir (Byrappa vd., 2008; Kalani ve Yunus, 2011).

Süper kritik sıvı teknolojisinin avantajları arasında: çevre dostu oluşu, toksik çözücü kalıntısı bırakmaması, partikül boyutunun yüksek hassasiyetle kontrol edilebilmesi ve üretim koşullarının optimize edilebilirliği sayılabilir. Bununla birlikte, bu teknolojinin yüksek maliyetli ekipman gerektirmesi, operasyonel zorluklar ve bazı polimerlerin süper kritik CO_2 ile sınırlı çözünürlüğü gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Bhardwaj ve Jangde, 2023).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, süper kritik teknolojilerin nanopartikül sentezinde kullanımını artırarak farmasötik üretim süreçlerinin yeşil kimya ilkeleriyle daha uyumlu hâle getirmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, bu teknoloji mikroakışkan sistemlerle birleştirilerek daha hassas ve sürekli üretim sağlayan platformlar geliştirilmektedir (Knez, Pantić, Cör vd., 2019). Şekil 2.4'te ilgili yöntem şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.4.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Süper Kritik Sıvı Teknolojisi Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Meziani, Pathak ve Sun, 2009

2.1.3.3. Tek Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Tekli emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi (Single Emulsion-Solvent Evaporation), özellikle suda çözünmeyen (hidrofobik) etkin maddelerin polimerik nanopartiküller içinde enkapsülasyonu için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, polimer ve hidrofobik ilaç uçucu bir organik çözücü (genellikle diklorometan veya etil asetat) içinde çözülür. Elde edilen bu organik faz, yüzey aktif madde örneğin polivinil alkol (PVA) içeren sulu faza yavaşça damlatılarak yağ-içinde-su (Y/S-O/W) tipi bir ön emülsiyon oluşturulur (Li, Rouaud ve Poncelet, 2008).

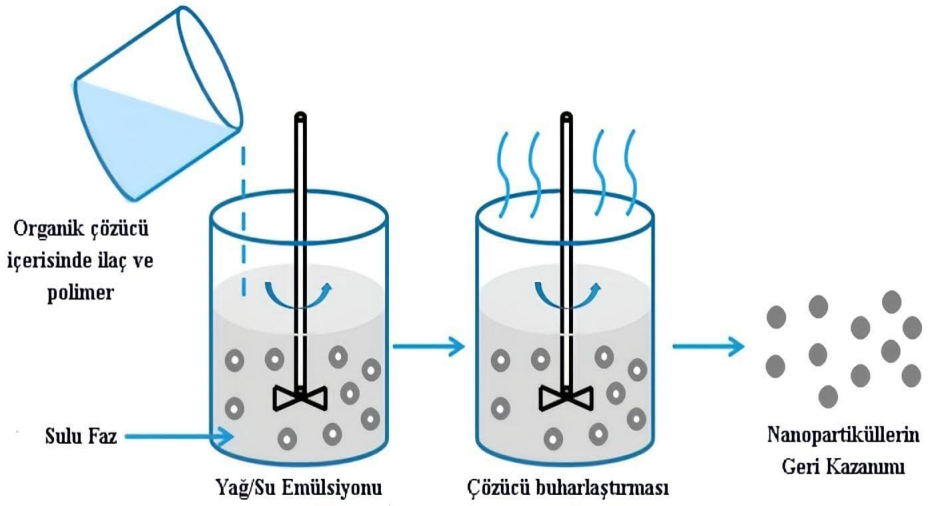
Oluşturulan ön emülsiyon, yüksek hızlı homojenizatör (10.000–15.000 rpm) veya prob-sonikatör (ultrasonikasyon) ile işlenerek ince damlacıklar haline getirilir. Bu sayede damlacık boyutları küçültülerek stabil bir emülsiyon elde edilir. Ardından uçucu çözücü, oda sıcaklığında manyetik karıştırma veya düşük basınç altında uzaklaştırılır. Çözücünün ortamdan uzaklaşması, polimerin çökmesine ve nanopartiküllerin oluşmasına neden olur (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

Elde edilen nanopartiküller santrifüj ile izole edilir, ardından saf su ile yıkanır. Uzun süreli stabilite için liyofilizasyon (dondurarak kurutma) işlemi uygulanabilir. Bu yöntemde sıklıkla kullanılan polimerler arasında PLGA, PLA, PCL, polistiren ve ERS 100, Eudragit® RL 100 (ERL 100) yer almaktadır. (Iqbal, Zafar vd., 2015).

Tekli emülsiyon yönteminin avantajları arasında basit ekipman gereksinimi, kontrollü partikül boyutu, yüksek enkapsülasyon verimi ve geniş polimer/ilaç uyumluluğu yer almaktadır. Ancak, emülsiyonun stabilitesi, yüzey etkin madde konsantrasyonu, karıştırma süresi ve çözücü buharlaşma koşulları gibi birçok parametre nihai partikül özelliklerini etkileyebilir (Nagavarma, Yadav vd., 2012). Şekil 2.5'te tek emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.5.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Tek Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Wang, Li, Tran, vd., 2016

2.1.3.4. Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Çift emülsiyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi (double emulsion–solvent evaporation), özellikle suda çözünebilen (hidrofilik) etkin maddelerin polimerik nanopartikül sistemlerine etkin şekilde enkapsülasyonunda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Tek emülsiyon yöntemlerinde hidrofilik etkin maddelerin dış sulu faza hızla difüze olabilmesi nedeniyle düşük enkapsülasyon verimi elde edilmesi, bu yöntemin geliştirilmesinde temel gerekçe olmuştur. Çift emülsiyon sistemleri, etkin maddenin iç sulu fazda hapsedilmesine olanak tanıyarak bu sınırlılığı önemli ölçüde azaltmaktadır (Crucho ve Barros, 2017).

Çift emülsiyon–çözücü buharlaştırma yönteminde, hidrofilik etkin maddelerin iç sulu fazdan dış faza difüzyonu enkapsülasyon verimini sınırlayan temel faktörlerden biridir. Bu durum, özellikle ikinci emülsiyon aşamasında oluşan konsantrasyon gradyanına bağlı olarak etkin maddenin dış faza geçişiyle ilişkilendirilmektedir. İç faz hacminin artırılmasının, hidrofilik etkin maddenin polimerik matriste tutulmasını iyileştirerek enkapsülasyon verimini artırdığı rapor edilmiştir. Bulgular, çift emülsiyon sistemlerinde faz oranlarının ve emülsifikasyon koşullarının dikkatle optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir (Cohen-Sela, Chorny, Koroukhov vd., 2009).

Bu yöntemde birincil emülsiyon genellikle ultrasonikasyon veya yüksek hızlı homojenizasyon ile stabilize edilir. ilk aşamada, etkin maddeyi içeren sulu faz ($S\text{-}W_1$), polimerin çözündüğü uçucu bir organik çözücü fazına (Y-O) ilave edilerek su-içinde-yağ ($S_1/Y\text{-}W_1/O$) tipi bir ön emülsiyon oluşturulur. Bu aşamada uygulanan ultrasonikasyon veya yüksek hızlı homojenizasyon işlemi, iç sulu fazın organik faz içerisinde ince damlacıklar hâlinde dağılmasını sağlayarak sistemin ilk stabilitesini belirler. Oluşturulan bu birincil emülsiyon, daha sonra yüzey etkin madde içeren ikinci bir sulu faza ($S_2\text{-}W_2$) kontrollü şekilde ilave edilerek su-içinde-yağ-içinde-su ($S_1/Y/S_2\text{-}W_1/O/W_2$) tipi çift emülsiyon sistemi elde edilir. İkincil emülsiyon aşamasında uygulanan enerji girişi, damlacık boyut dağılımını ve emülsiyonun kararlılığını doğrudan etkilemektedir (Crucho ve Barros, 2017).

Çift emülsiyonun oluşturulmasını takiben, sistemde bulunan organik çözücünün kontrollü biçimde uzaklaştırılmasıyla polimer çöktürülür ve nanopartikül yapısı oluşur. Bu süreçte çözücünün buharlaşma hızı, polimerin sertleşme mekanizması ve partikül morfolojisi üzerinde belirleyici rol oynar. Polimerin çökmesiyle birlikte etkin madde polimerik matris içerisinde enkapsüle edilerek nanopartikül yapısı oluşur. Elde edilen nanopartiküller genellikle santrifüjleme ile izole edilir, yüzeyde adsorbe olabilecek serbest etkin maddeden arındırılmak amacıyla yıkanır ve uzun süreli stabilite sağlamak için liyofilizasyon işlemine tabi tutulabilir (Li, Rouaud ve Poncelet, 2008).

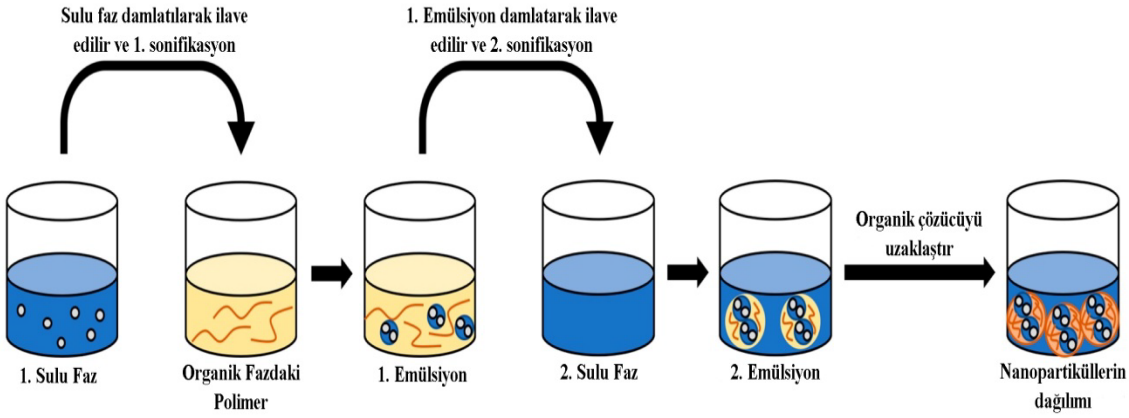
Çift emülsiyon–çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan nanopartikül sistemlerinde faz hacim oranları, polimer konsantrasyonu, yüzey etkin madde türü ve derişimi, karıştırma süresi ve uygulanan mekanik enerji gibi parametreler kritik öneme sahiptir. Bu parametreler; partikül boyutu, polidispersite indeksi, enkapsülasyon verimi ve *in vitro* salım profili üzerinde doğrudan etkilidir. Özellikle iç fazdan dış faza etkin madde geçişinin sınırlandırılması, sistemin optimizasyonunda temel hedeflerden biridir (Iqbal, Zafar vd., 2015).

Bu yöntemde yaygın olarak kullanılan polimerler arasında PLGA, PLA, PCL, polietilen glikol (PEG) türevleri ile metakrilat bazlı polimerler olan ERS 100 ve ERL 100 yer almaktadır. Bu polimerler, etkin maddenin erken sızmasını sınırlayarak kontrollü ve uzatılmış salım profili elde edilmesine olanak tanımaktadır (Cohen-Sela, Chorny, Koroukhov vd., 2009).

Bununla birlikte, çift emülsiyon yöntemi çok aşamalı bir proses olması nedeniyle formülasyon stabilitesinin sağlanmasında zorluklar içerebilmektedir. Etkin maddenin dış faza sızma riski ve görece düşük enkapsülasyon verimi, yöntemin başlıca sınırlılıkları arasında yer almaktadır. Bu durum literatürde de bildirilmiş olup, çift emülsiyon–çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan polimerik sistemlerde, emülgatör konsantrasyonu ve karıştırma enerjisindeki artışın, etkin maddenin iç fazdan dış faza geçişini kolaylaştırarak enkapsülasyon verimini olumsuz yönde etkileyebildiği rapor edilmiştir. Bu nedenle başarılı bir nanopartikül sisteminin geliştirilmesi için formülasyon ve proses parametrelerinin (faz oranları, karıştırma süresi ve yüzey etkin madde) sistematik şekilde optimize edilmesi gerekmektedir (Iqbal, Zafar vd., 2015; Li, Rouaud ve Poncelet, 2008). Şekil 2.6'da çift emülsiyon buharlaştırma yöntemi gösterilmiştir.

Şekil 2.6.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Çift Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Kim, Feng, Zhang vd., 2019

2.1.3.5. Tuzla Çöktürme Yöntemi

Tuzla çöktürme (salting-out) yöntemi, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan, emülsifikasyon temelli ve çözücü uzaklaştırmaya dayanan bir tekniktir. Bu yöntemin temel prensibi, normal koşullarda suyla tamamen karışabilen bir organik çözücünün, yüksek konsantrasyonda tuz içeren bir sulu faz varlığında su ile karışabilirliğinin azaltılmasına dayanmaktadır. Bu sayede polimerin kontrollü biçimde

çökmesi sağlanarak nanopartikül oluşumu gerçekleştirilmektedir (Sharma ve Walia, 2021; Krishnasailaja ve Sarithareddy, 2017).

Yöntemde polimer ve etkin madde genellikle aseton gibi suyla karışabilen bir organik çözücü içerisinde çözündürülür. Elde edilen bu faz, magnezyum klorür veya kalsiyum klorür gibi elektrolitlerle doygun hâle getirilmiş bir sulu faza kontrollü şekilde ilave edilir. Sulu fazda bulunan yüksek tuz konsantrasyonu, organik çözücünün suya difüzyonunu baskılayarak geçici bir faz ayrımı oluşturur ve bu aşamada emülsifikasyon gerçekleşir. Bu etki literatürde ters tuzlama (reverse salting-out) mekanizması olarak tanımlanmaktadır (Allemann, Gurny ve Doelker, 1992).

Emülsiyonun oluşumunu takiben sisteme saf su ilavesi yapılmasıyla, ortamın iyonik kuvveti azalır ve organik çözücü sulu faza doğru difüze olur. Bu süreç, çözücü içerisinde çözünmüş olan polimerin çözünürlüğünün azalmasına ve nanodamlacıklar içerisinde polimerin çökelerek nanopartikül yapısının oluşmasına yol açar. Oluşan nanopartiküller santrifüjleme ve yıkama adımlarıyla ortamdan izole edilir ve gerekirse kurutma işlemlerine tabi tutulur (Sharma ve Walia, 2021; Allemann, Gurny ve Doelker, 1992).

Tuzla çöktürme yöntemiyle hazırlanan nanopartiküllerin fiziksel özellikleri; karıştırma hızı, polimer konsantrasyonu, iç ve dış faz oranları, kullanılan tuzun tipi ve derişimi gibi proses parametrelerinden doğrudan etkilenmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda, bu parametrelerin optimize edilmesiyle genellikle 200–500 nm aralığında partikül boyutlarına sahip polimerik nanopartiküllerin elde edilebildiği bildirilmiştir (Krishnasailaja ve Sarithareddy, 2017; Gazi ve Sailaja, 2018). Ayrıca stabilizatör olarak polivinil alkol (PVA) gibi yardımcı maddelerin kullanılması, sistemin stabilitesini artırarak daha homojen partikül dağılımı elde edilmesine katkı sağlamaktadır (Wang, Li, Tran vd., 2016).

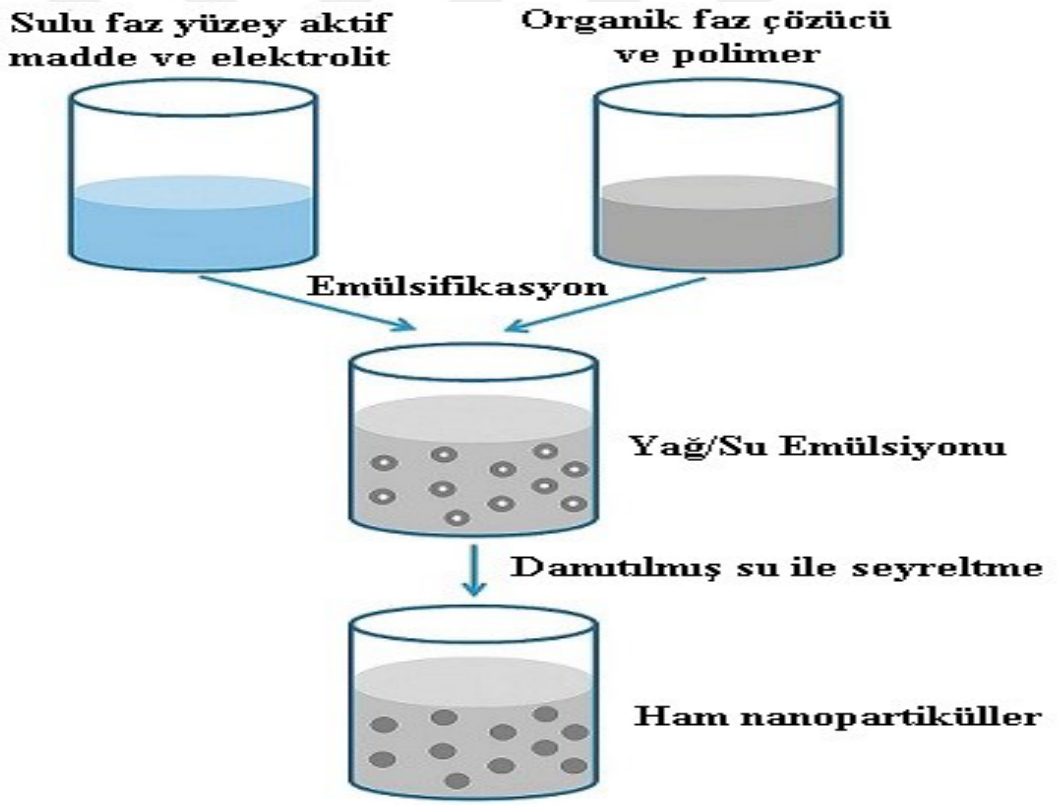
Bu yöntem, özellikle Eudragit® S100 gibi pH-duyarlı polimerlerin nanopartikül hâline getirilmesinde başarıyla uygulanmıştır. Eudragit® S100 bazlı nanopartiküllerin salting-out yöntemiyle hazırlandığı çalışmada, polimer derişimi ve tuz konsantrasyonundaki değişimlerin enkapsülasyon verimi ve partikül boyutu üzerinde belirleyici olduğu gösterilmiştir (Gazi ve Sailaja, 2018). Benzer şekilde, etil selüloz bazlı, PLA ve PLGA gibi farklı polimer sistemleriyle yapılan çalışmalarda da proses parametrelerinin

kontrollü şekilde ayarlanmasının nanopartikül özelliklerini doğrudan etkilediği rapor edilmiştir (Wang, Li, Tran vd., 2016; Krishnasailaja ve Sarithareddy, 2017).

Yöntemin avantajları arasında, düşük enerjili karıştırma koşullarında uygulanabilmesi ve ısıya duyarlı etkin maddeler için uygun bir üretim ortamı sunması yer almaktadır. Bununla birlikte, kullanılan tuzların sistemden uzaklaştırılması için ek saflaştırma adımlarına ihtiyaç duyulması ve proses parametrelerine yüksek duyarlılık göstermesi yöntemin başlıca sınırlılıkları arasında değerlendirilmektedir (Wang, Li, Tran vd., 2016; Allemann, Gurny ve Doelker, 1992). Şekil 2.7.'de tuzla çöktürme yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.7.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Tuzla Çöktürme Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Wang, Li, Tran vd., 2016

2.1.3.6. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi, sıvı hâlde hazırlanan polimerik çözeltilerin, emülsiyonların veya süspansiyonların yüksek sıcaklıklı bir gaz ortamında püskürtülerek hızla kurutulması prensibine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem, özellikle nanotaşıyıcı

sistemlerin toz hâline getirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı kuruma, partikül boyutu kontrolü ve ölçeklenebilirlik gibi avantajlar sunar (Vehring, 2008; Sosnik ve Seremeta, 2015).

Yöntem temel olarak üç ana aşamadan oluşur: atomizasyon, kurutma ve partikül toplama. İlk aşamada, hazırlanan çözelti, emülsiyon veya süspansiyon, yüksek hızlı bir nozülden veya dönel diskten geçirilerek sıcak hava ortamına püskürtülür. Bu atomizasyon sırasında sıvı, küçük damlacıklara ayrılır. İkinci aşamada bu damlacıklar sıcak hava ile temas ederken içerdikleri çözücü hızla buharlaşır. Son aşamada ise kuruyan katı partiküller siklon veya filtre sistemleri yardımıyla toplanır (Nandiyanto ve Okuyama, 2011).

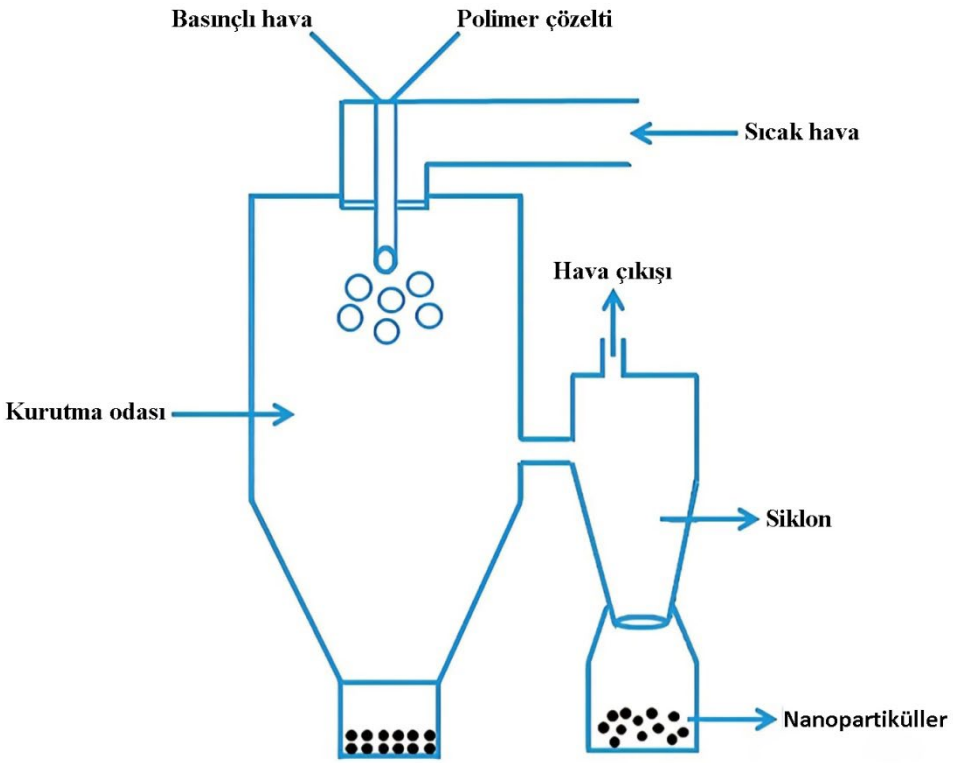
Püskürterek kurutma işlemi sırasında partikül boyutu ve morfolojisi; püskürtme nozülünün tipi, giriş-çıkış sıcaklığı, besleme oranı, hava akış hızı ve çözeltinin viskozitesi gibi parametrelere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu nedenle püskürterek kurutma, kontrollü ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için optimize edilmesi gereken çok sayıda parametre içerir (Vehring, 2008).

Püskürterek kurutma ile elde edilen nanopartiküller, genellikle küresel morfolojide ve tekdüze boyut dağılımına sahip olur. Yaygın olarak kullanılan polimerler arasında ERL 100, ERS 100, PCL, PLGA ve selüloz türevleri yer almaktadır. Bazı çalışmalar bu yöntemle laktik asit kopolimerleri (PLA vb.), PEG gibi polimerlerinde başarıyla uygulandığını göstermiştir (Sosnik ve Seremeta, 2015).

Yöntemin avantajları; kısa işlem süresi, partikül boyutunun kontrol edilebilirliği, düşük ısı transferiyle biyolojik moleküllerin korunması ve endüstriyel ölçekte uygulanabilir olmasıdır. Ancak düşük verim, yüksek enerji tüketimi ve cihazda nozul tıkanıklığı gibi bazı sınırlılıklar da bulunmaktadır (Sosnik ve Seremeta, 2015). Şekil 2.8.'de püskürterek kurutma yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.8.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Püskürterek Kurutma Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Wang, Li, Tran vd., 2016

2.1.3.7. Nanoçöktürme Yöntemi

Nanoçöktürme yöntemi, polimerin çözündüğü bir organik fazın, polimer için çözücü olmayan bir faz ile temas ettirilmesi sonucu oluşan ani aşırı doygunluk (supersatürasyon) prensibine dayanan basit ve etkili bir nanopartikül hazırlama tekniğidir. Bu yöntemde nanopartikül oluşumu, organik çözücünün antisolvent faza hızlı difüzyonu sırasında gerçekleşen çekirdeklenme ve büyüme mekanizmalarıyla açıklanmaktadır. Nanoçöktürme yöntemi, özellikle hidrofobik etkin maddelerin ve biyobozunur polimerlerin nanopartikül formuna dönüştürülmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Sharma ve Walia, 2021).

Yöntemin uygulanmasında polimer ve etkin madde genellikle aseton, etanol veya benzeri suyla karışabilir bir organik çözücü içerisinde çözündürülür. Elde edilen bu organik faz, sürekli karıştırma altında su veya stabilizatör içeren bir sulu faza kontrollü biçimde ilave edilir. Organik çözücünün sulu fazda hızla seyrelmesiyle birlikte polimerin çözünürlüğü azalır ve polimer çökerek nanopartikül yapısını oluşturur. Süreç sonunda sistemde kalan organik çözücünün uzaklaştırılması amacıyla düşük basınç

altında buharlaştırma veya benzeri uzaklaştırma işlemleri uygulanabilmektedir (Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015).

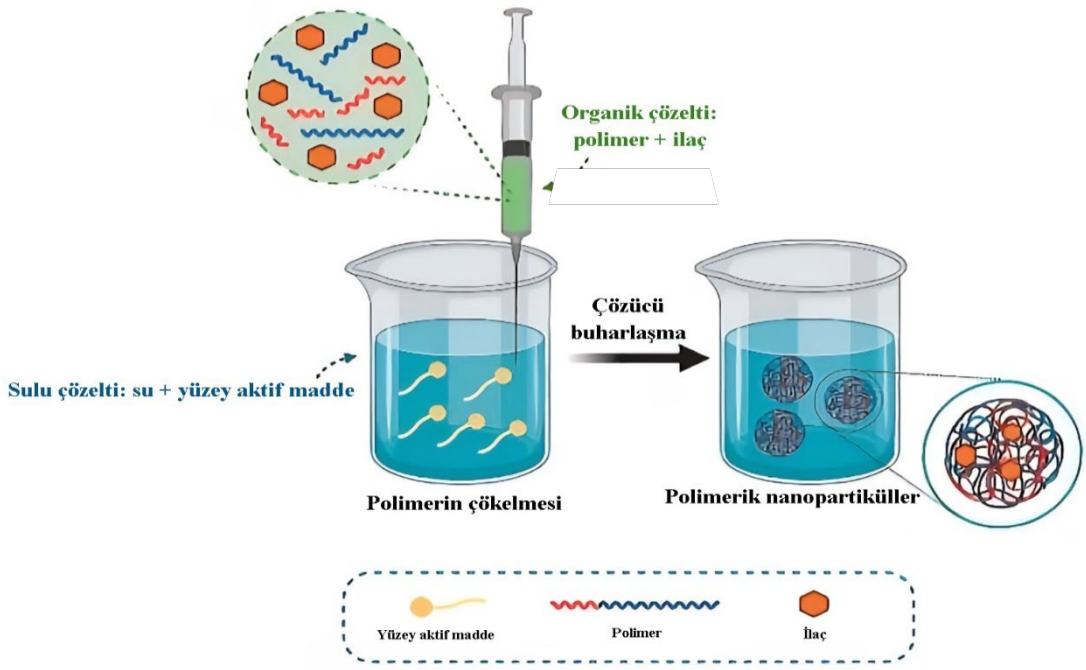
Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımı; kullanılan çözücü tipi, çözücü-antiçözücü oranı, polimer konsantrasyonu, enjeksiyon hızı ve karıştırma koşulları gibi proses parametrelerine bağlı olarak değişmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda, çözücü-antiçözücü oranının ve enjeksiyon hızının artırılmasının daha küçük ve daha homojen partiküllerin oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (Albisa, Piacentini, Sebastian vd., 2017). Ayrıca karıştırma hızının artırılmasının, polimerin çökme sırasında oluşan çekirdeklerin daha etkin şekilde dağılmasını sağlayarak partikül boyut dağılımını daralttığı rapor edilmiştir (Marinelli, Ciulla, Ritsema vd., 2022).

Nanoçöktürme yöntemi, PLA, PLGA ve PCL gibi biyobozunur polimerlerin yanı sıra Eudragit® bazlı polimerler ile de nanopartikül üretimine olanak tanımaktadır. Literatürde, Eudragit® içeren nanopartiküllerin nanoçöktürme yöntemiyle başarıyla hazırlandığı ve bu sistemlerde polimer konsantrasyonu ile çözücü-antisolvent oranının partikül boyutu ve stabilite üzerinde belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir (Sinkar, Bafna ve Mutha, 2022). Bu bulgular, nanoçöktürme yönteminin farklı polimer sistemlerine uyarlanabilir ve esnek bir üretim yaklaşımı sunduğunu ortaya koymaktadır.

Nanoçöktürme yönteminin başlıca avantajları arasında düşük enerji gereksinimi, basit ekipman kullanımı, ölçeklenebilirlik ve yüksek sıcaklık gerektirmemesi nedeniyle ısıya duyarlı etkin maddelerle uyumlu olması yer almaktadır. Bununla birlikte, partikül boyutunun proses parametrelerine yüksek duyarlılık göstermesi ve uygun koşullar sağlanmadığında geniş boyut dağılımı oluşabilmesi yöntemin başlıca sınırlılıkları arasında değerlendirilmektedir. Bu nedenle, hedeflenen nanopartikül özelliklerine ulaşabilmek için formülasyon ve proses parametrelerinin dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir (Albisa, Piacentini, Sebastian vd., 2017). Şekil 2.9.'da nanoçöktürme yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.9.

Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Nanoçöktürme Yönteminin Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Mahajan, Thakur ve Simran, 2021

2.2. Göz Anatomisi ve Fizyolojisi

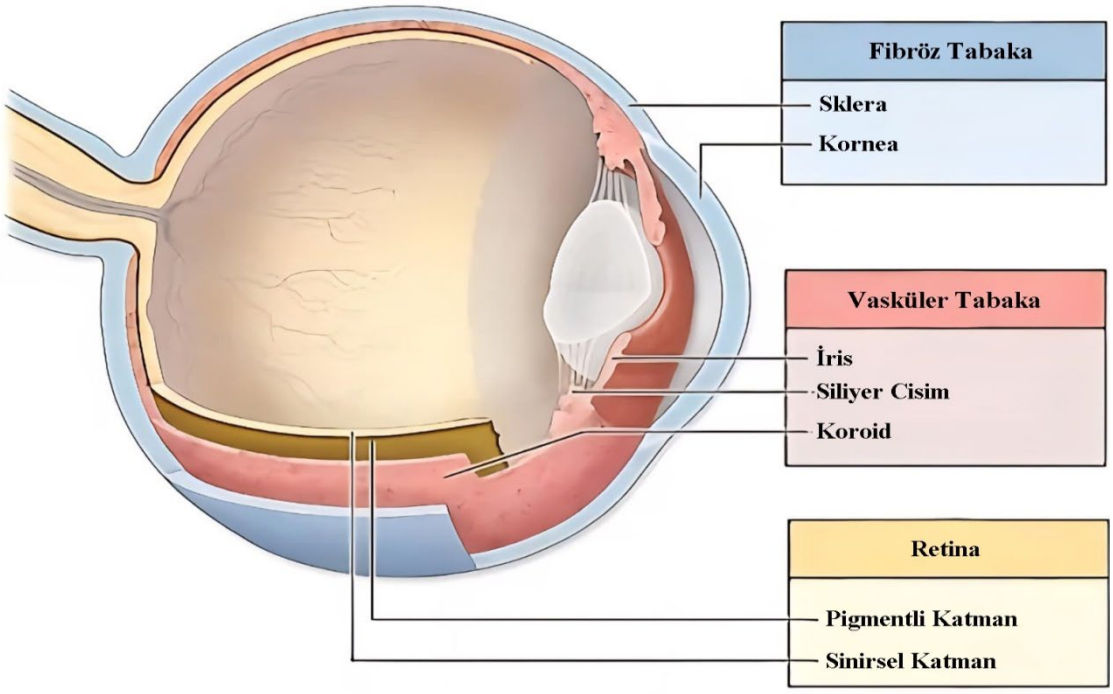
2.2.1. Gözün Genel Anatomisi

Göz, görme fonksiyonunu gerçekleştiren, anatomik ve fizyolojik açıdan oldukça karmaşık bir duyu organıdır. Göz küresi (*bulbus oculi*), orbita içerisinde yer almakta olup çevresindeki kaslar, sinirler, damarlar ve destek dokularıyla birlikte fonksiyonel bir bütün oluşturmaktadır. Ortalama çapı yaklaşık 22–26 mm olan göz küresinin yalnızca yaklaşık beşte birlik kısmı dışarıdan görülebilmektedir. Göz, ışığın retina üzerinde odaklanmasını ve bu ışık sinyalinin sinirsel uyarıya dönüştürülerek beyne iletilmesini sağlayan özelleşmiş yapılardan oluşmaktadır (Başmak, 2015).

Anatomik olarak göz küresi üç ana tabakadan meydana gelmektedir: fibröz tabaka (sklera ve kornea), vasküler tabaka (iris, siliyer cisim ve koroid) ve retina (pigmentli katman ve sinirsel katman). Bu tabakalar, gözün hem mekanik bütünlüğünü hem de optik ve nörosensoriyel fonksiyonlarını yerine getirmesinde temel rol oynamaktadır. Ayrıca göz içinde aköz hümor ve vitreus hümor ile dolu boşluklar bulunmakta olup, bu sıvılar ışığın iletimi ve göz içi basıncının korunması açısından önemlidir (Sebastian ve Senior, 2010). Şekil 2.10.'da göz küresinin genel anatomisi ve tabakaları şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.10.

Göz Küresinin Genel Anatomisini ve Tabakalarının Şematik Olarak Gösterimi (http-1).



2.2.2. Kornea ve Katmanlı Yapısı

Kornea, gözün ön kısmında yer alan saydam ve damarsız bir dokudur ve ışığın göze girişinde ilk kırıcı ortamını oluşturmaktadır. Optik gücün büyük bir kısmından sorumlu olan kornea, aynı zamanda dış ortam ile göz içi yapılar arasında önemli bir bariyer görevi görmektedir. Anatomik olarak kornea üç temel tabakadan oluşmaktadır: epitel, stroma ve endotel (Litzinger ve Rio-Tsonis, 2002).

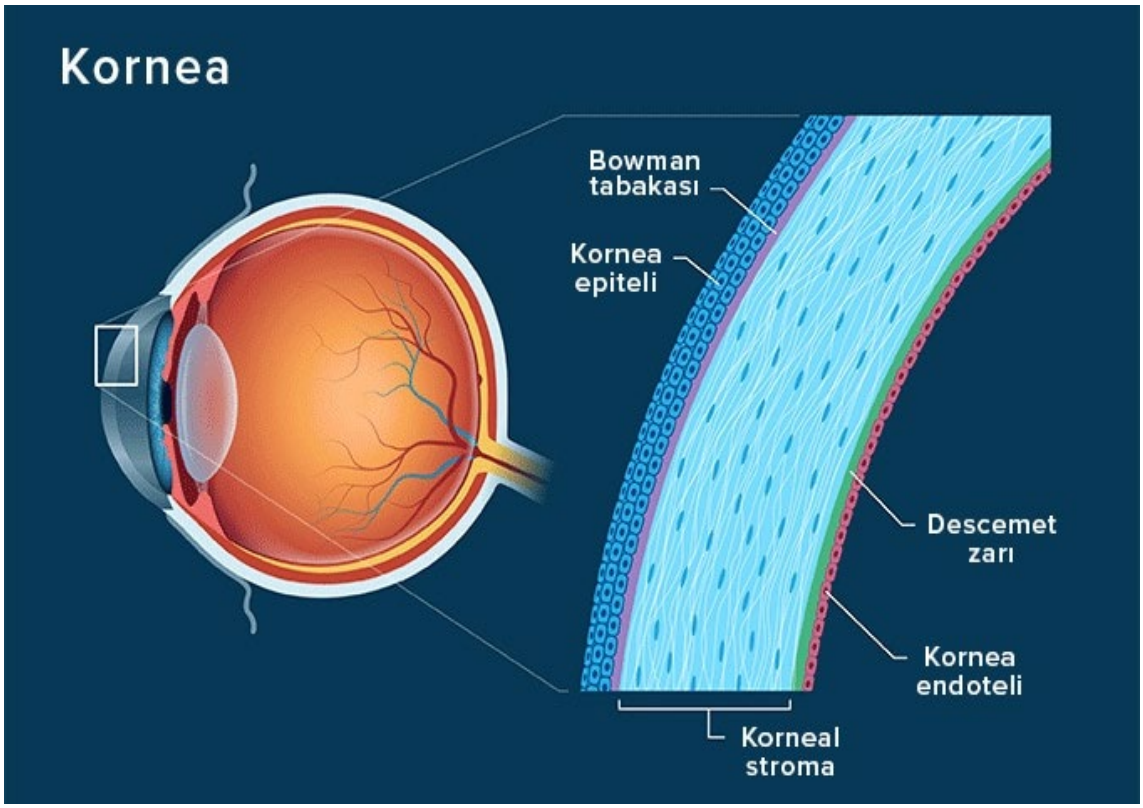
Kornea epiteli, çok katlı yassı epitel yapısında olup sıkı hücre bağlantıları sayesinde özellikle hidrofilik moleküllerin geçişine karşı önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Bu özellik, oftalmik ilaçların topikal uygulama sonrası göz içine penetrasyonunu sınırlayan başlıca faktörlerden biridir. Stromal tabaka, korneanın en kalın kısmını oluşturmakta ve düzenli kollajen lif yapısı sayesinde saydamlık sağlamaktadır. Endotel tabakası ise tek katlı hücrelerden oluşmakta olup korneanın hidrasyon dengesinin korunmasında kritik rol oynamaktadır (Litzinger ve Rio-Tsonis, 2002).

Kornea tabakalarının bu özgün yapısı, ilaçların korneal geçişinde hem fiziksel hem de fizyokimyasal bir engel teşkil etmekte; bu durum özellikle kontrollü ve hedefli oftalmik

ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Şekil 2.11.'de Kornea tabakaları şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.11.

Kornea Tabakalarını (Epitel–Stroma–Endotel) Şematik Olarak Gösterimi (http-2).



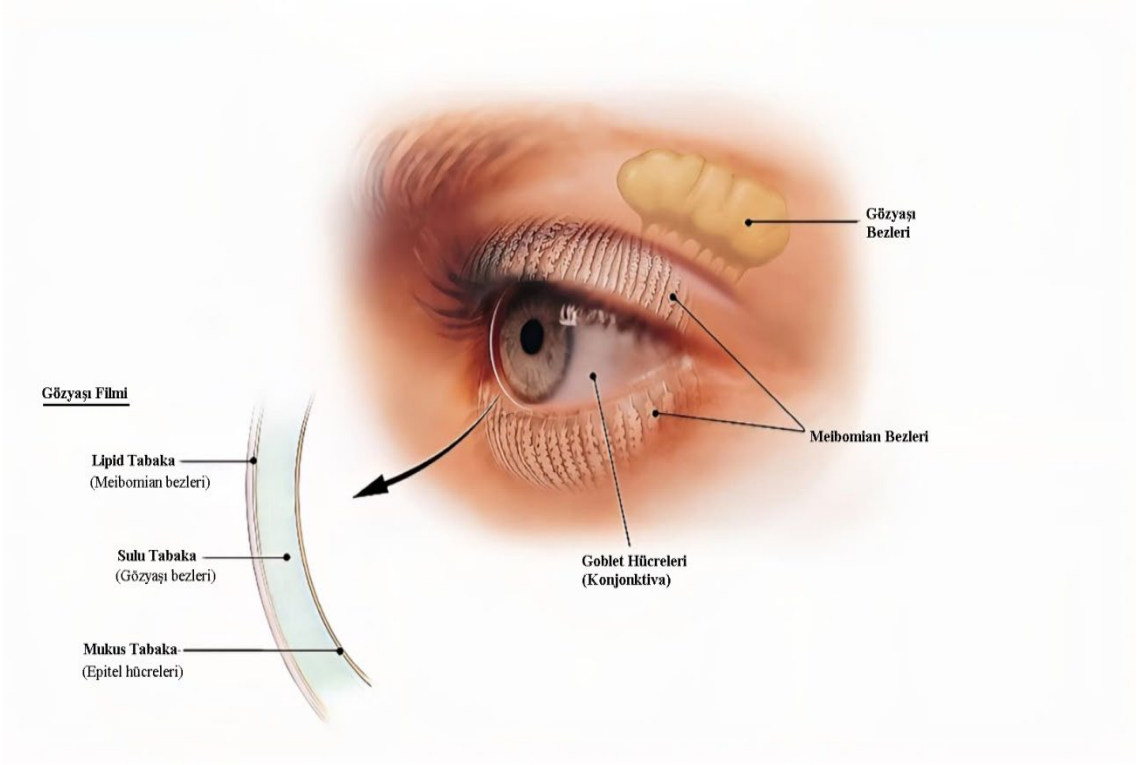
2.2.3. Gözyaşı Filmi ve Gözyaşı Bariyeri

Göz yüzeyi, gözyaşı filmi ile kaplı olup bu yapı hem optik yüzeyin düzgünlüğünü sağlamakta hem de koruyucu bir bariyer görevi üstlenmektedir. Gözyaşı filmi üç ana tabakadan oluşmaktadır: dış lipid tabaka, orta sulu tabaka ve iç mukus tabakası. Bu tabakalar birlikte çalışarak göz yüzeyinin nemlendirilmesini, enfeksiyonlardan korunmasını ve optik kalitenin sürdürülmesini sağlamaktadır (Başmak, 2015).

Gözyaşı filmi, oftalmik ilaç uygulamaları açısından önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Topikal olarak uygulanan ilaçların büyük bir kısmı, gözyaşı drenaj sistemi ve göz kırpma refleksi nedeniyle kısa sürede göz yüzeyinden uzaklaştırılmaktadır. Bu durum, ilacın kornea ile temas süresini azaltarak biyoyararlanımın düşmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla gözyaşı bariyeri, oftalmik tedavilerde karşılaşılan temel zorluklardan biri olarak kabul edilmektedir (Sebastian ve Senior, 2010). Şekil 2.12.'de gözyaşı filminin lipid–sulu–mukus tabakaları şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.12.

Gözyaşı Filminin Lipid–Sulu–Mukus Tabakalarını Şematik Olarak Gösterimi (http-3).

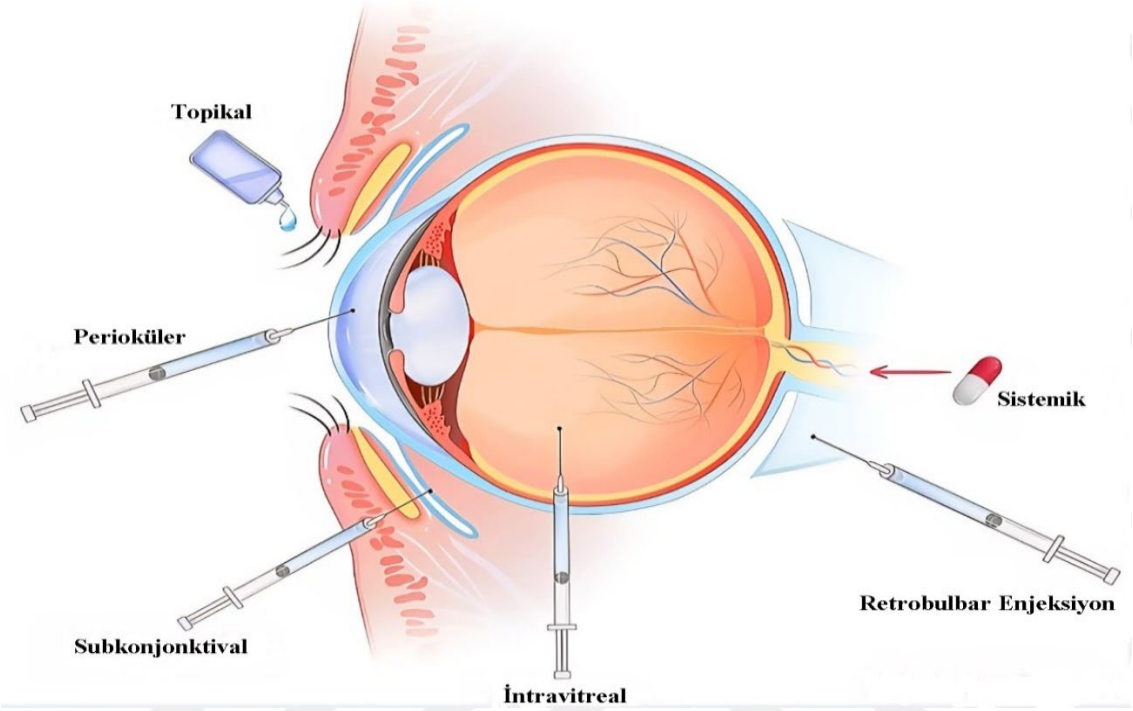


2.3. Göz için Geleneksel İlaç Uygulama Yöntemleri

Göz, kendine özgü anatomik yapısı ve güçlü fizyolojik bariyerleri nedeniyle ilaç uygulaması açısından farmasötik olarak en zorlu organlardan biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle oftalmik hastalıkların tedavisinde, hedef dokuya yeterli ilaç konsantrasyonunun ulaştırılabilmesi amacıyla farklı geleneksel ilaç uygulama yolları geliştirilmiştir. Klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan bu yöntemler; topikal, sistemik ve lokal enjeksiyon yolları olarak sınıflandırılmaktadır (Liu vd., 2023). Şekil 2.13.'te göz anatomisi üzerinde farklı ilaç uygulama yollarını şemetik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.13.

Göz Anatomisi Üzerinde Farklı İlaç Uygulama Yollarını (Topikal, Lokal Enjeksiyon ve Sistemik) Gösteren Şematik Diyagram



Kaynak: Li, Chen ve Fu, 2023

2.3.1. Topikal Uygulama Yolu

Topikal uygulama, oftalmik tedavilerde ilk tercih edilen yöntem olup göz damlaları, jeller, merhemler ve süspansiyonlar bu grupta yer almaktadır. Non-invaziv olması, kolay uygulanabilirliği ve hasta tarafından kabul edilebilirliği nedeniyle klinik kullanımda geniş yer bulmaktadır (Polat, Ünal vd., 2022).

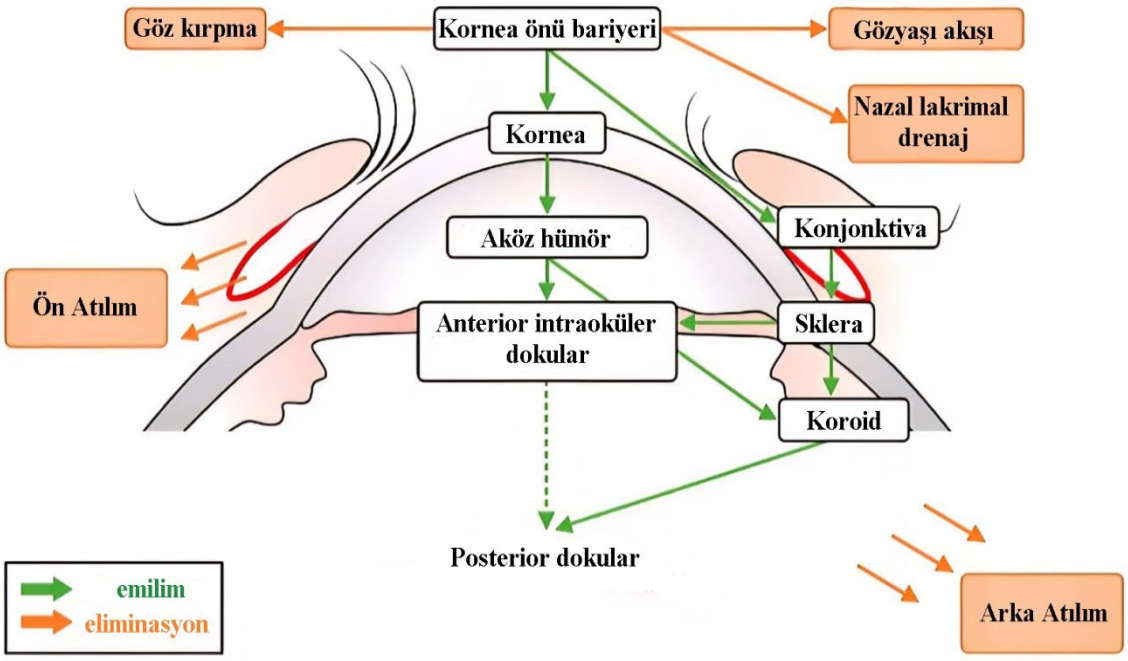
Bununla birlikte, topikal olarak uygulanan ilaçlar göz yüzeyinde çok kısa bir temas süresine sahiptir. Göz kırpma refleksi, gözyaşı akışı ve nazolakrimal drenaj mekanizması, ilacın büyük bölümünün dakikalar içerisinde ortamdan uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. Literatürde, topikal uygulanan dozun %90–95'inden fazlasının sistemik dolaşıma kaybolduğu ve intraoküler biyoyararlanımın genellikle %1'in altında kaldığı bildirilmektedir (Liu vd., 2023).

Bu durum, terapötik etkinin sürdürülebilmesi için sık dozlama gereksinimini beraberinde getirmekte, hasta uyuncunu azaltmakta ve uzun süreli tedavilerde klinik

başarıyı sınırlamaktadır. Şekil 2.14.'de topikal damla uygulaması sonrası ilacın göz yüzeyinden uzaklaştırılması şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.14.

Topikal Damla Uygulaması Sonrası İlacın Göz Yüzeyinden Uzaklaştırılmasını Gösteren Şema



Kaynak: Löscher, Seiz vd., 2022

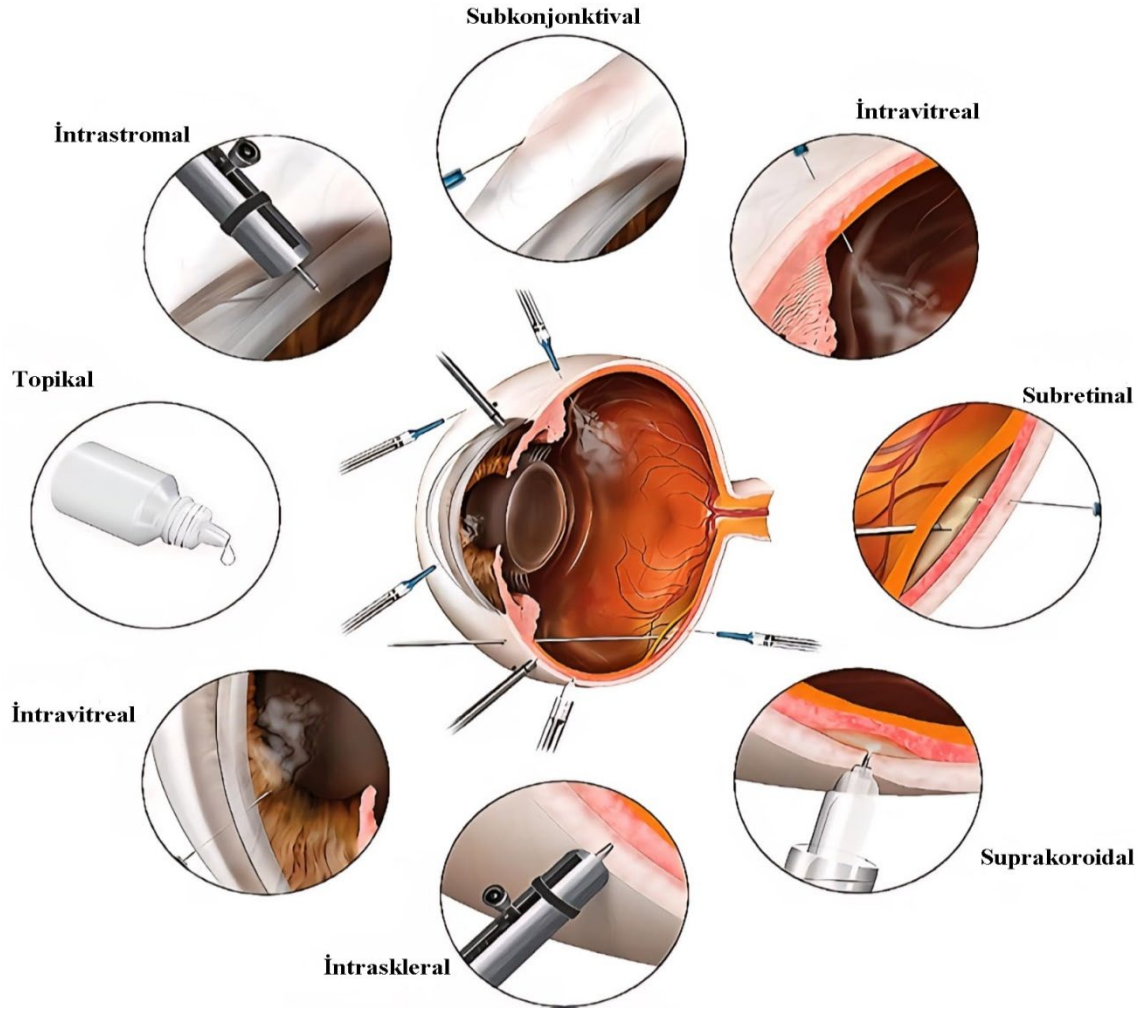
2.3.2. Lokal Enjeksiyon Yolları

Topikal uygulamanın posterior segment hastalıklarında yetersiz kalması nedeniyle, ilacın doğrudan göz içi dokulara verilmesini amaçlayan lokal enjeksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında intravitreal, intrakameral, subkonjonktival ve perioküler enjeksiyonlar yer almaktadır (Liu vd., 2023).

Özellikle intravitreal enjeksiyonlar, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, diyabetik makular ödem ve retinal vasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu yöntem, ilacın doğrudan hedef dokuya ulaşmasını sağlasa da endoftalmi, retinal dekolman ve hasta konforunun azalması gibi ciddi riskler taşımaktadır (Shikari ve Samant, 2016). Şekil 2.15.'te intravitreal, subkonjonktival ve perioküler enjeksiyon bölgelerini şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.15.

İntravitreal, Subkonjonktival ve Perioküler Enjeksiyon Bölgelerini Gösteren Anatomik Şema



Kaynak: Jo ve Kim, 2020

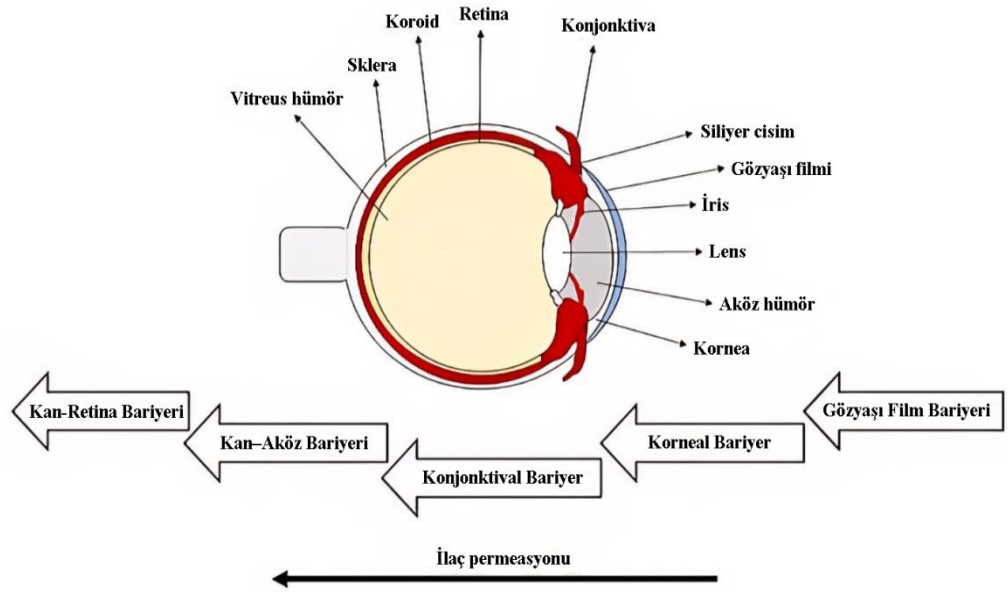
2.3.3. Sistemik Uygulama Yolu

Sistemik ilaç uygulaması oftalmik tedavilerde sınırlı kullanım alanına sahiptir. Kan–retina bariyerinin seçici geçirgenliği nedeniyle, sistemik dolaşımdan göze geçen ilaç miktarı oldukça düşüktür. Terapötik etkinin sağlanabilmesi için yüksek dozlara ihtiyaç duyulması, sistemik yan etki riskini artırmaktadır (Gaudana vd., 2010).

Bu nedenle sistemik uygulama genellikle yalnızca akut enfeksiyonlar veya inflamatuvar durumlarla sınırlı kalmaktadır. Şekil 2.16.'da sistemik dolaşımdan göze ilaç geçişini ve kan–aköz ile kan–retina bariyerlerini şematik olarak gösterimilmiştir.

Şekil 2.16.

Sistemik Dolaşımdan Göze İlaç Geçişini ve Kan–Aköz ile Kan–Retina Bariyerlerini Şematik Olarak Gösterimi



Kaynak: Bíró ve Aigner, 2019

2.3.4. Geleneksel Göz Hastalıkları Tedavileri ve Klinik Riskler

Bazı bölgelerde modern farmasötik preparatlara erişimin sınırlı olması nedeniyle, steril olmayan geleneksel göz tedavilerinin kullanıldığı bildirilmektedir. Bu uygulamaların enfeksiyon, korneal hasar ve kalıcı görme kaybı gibi ciddi komplikasyonlara yol açtığı literatürde vurgulanmaktadır (Eticha, Alemu vd., 2021; Atawi, Ayed ve Batran, 2024).

2.3.5. Genel Değerlendirme

Geleneksel göze ilaç uygulama yolları, klinik pratikte yaygın olarak kullanılmakla birlikte, gözün anatomik ve fizyolojik bariyerleri nedeniyle yetersiz biyoyararlanım, sık dozlama ihtiyacı ve hasta uyuncu sorunları gibi önemli sınırlılıklar barındırmaktadır. Bu sınırlamalar, oftalmik tedavilerde daha etkin, kontrollü ve uzun süreli ilaç salımı sağlayabilecek yeni taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Polat, Ünal vd., 2022).

2.4. Oftalmik Hastalıklar

Oftalmik hastalıklar, gözün anatomik ve fizyolojik yapılarında çeşitli patolojik değişikliklere yol açan yaygın hastalıklardır. Bu hastalıklar arasında enfeksiyöz,

inflamatuvar, dejeneratif, vasküler ve immünolojik kökenli bozukluklar yer almaktadır. Konjonktivit, keratit, üveit, glokom, diyabetik retinopati, yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD) ve katarakt en sık karşılaşılan oftalmik hastalıklar arasındadır. Görme bozukluğu ve körlük gibi ciddi sonuçlar doğurabilmeleri nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir problem teşkil ederler (Wakefield vd., 2005; Pinkas vd., 2023).

Göz hastalıklarının gelişiminde yaş, genetik yatkınlık, diyabet ve hipertansiyon gibi sistemik hastalıklar, ultraviyole ışığa maruziyet, sigara kullanımı, enfeksiyon etkenleri ve çevresel faktörler gibi risk unsurları rol oynamaktadır (Pinkas vd., 2023 ; Flaxman vd., 2017). Özellikle yaşa bağlı hastalıklar ve metabolik hastalıklara sekonder gelişen retinopatiler, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görme kaybının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (Kwatra ve Mitra, 2013).

Göz, dış etkilere karşı bir dizi fizyolojik bariyerle korunmaktadır. Bu bariyerler arasında kornea epiteli, gözyaşı filmi, konjonktiva, sklera, kan-retina bariyeri ve gözyaşı drenaj sistemi yer alır. Bu yapılar farmasötik açıdan da büyük önem taşır çünkü uygulanan ilaçların büyük kısmı bu bariyerleri aşmakta zorlanır. Örneğin, topikal ilaçların %5'ten azı anterior kamaraya ulaşabilmektedir. Bu nedenle oftalmik hastalıkların tedavisinde hedefe yönelik ve etkili taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gereklidir (Gaudana vd., 2010).

Enfeksiyöz göz hastalıkları bakteriyel, viral veya fungal etkenlere bağlı gelişebilir. Özellikle adenovirüs kaynaklı konjonktivitler toplumda sık görülen ve oldukça bulaşıcı klinik tablolardır. Korneayı etkileyen keratit olguları ise görme kaybıyla sonuçlanabilecek skar oluşumuna neden olabilir. İnflamatuvar göz hastalıkları, otoimmün süreçlerle de ilgilidir. Behçet hastalığı ve sarkoidoz gibi sistemik hastalıklarla birlikte seyreden üveit, görmeyi tehdit eden komplikasyonlara yol açabilir (Azari ve Barney, 2013; Wakefield vd., 2005).

Dejeneratif hastalıklar arasında en dikkat çekeni glokomdur. Göz içi basıncının artması sonucu optik sinirin hasar görmesiyle ortaya çıkan bu durum, ilerleyici ve geri dönüşsüz bir görme kaybı ile sonuçlanabilir. AMD ise yaşlanmaya bağlı olarak makula bölgesinde dejeneratif değişikliklerle karakterizedir. Diyabetik retinopati ise retina damarlarında mikroanevrizmalar, eksüda ve neovaskülarizasyon gibi patolojik değişikliklerle kendini gösterir. Erken tanı ve tedavi bu hastalıkların yönetiminde hayati öneme sahiptir (Pinkas vd., 2023; Wong vd., 2014; Yau vd., 2012).

Günümüzde oftalmik hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaç uygulama yöntemleri arasında topikal damlalar, sistemik tedaviler, perioküler ve intravitreal enjeksiyonlar ile göz içi implantlar yer almaktadır. Ancak geleneksel yöntemler çoğunlukla yetersiz kalmakta ve hastaların tedaviye uyumu düşmektedir. Bu nedenle hedeflenmiş, uzun süre etkili ve biyouyumlu taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi; ilaçların göz içi yapılara etkin ulaştırılması ve terapötik etkinliğin artırılması açısından büyük önem taşımaktadır (Kwatra ve Mitra, 2013).

2.5. Glokom

Glokom, optik sinir başında geri dönüşü olmayan hasar meydana getiren, sıklıkla artmış göz içi basıncı (GİB) ile ilişkilendirilen kronik, ilerleyici bir nörodejeneratif göz hastalığıdır. Küresel olarak 70 milyondan fazla kişiyi etkilediği ve 6 milyondan fazla insanda bilateral körlüğe neden olduğu tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre glokom, yaşa bağlı görme kayıplarının en önde gelen ikinci nedenidir. Hastalığın büyük çoğunluğu asemptomatik seyrettiğinden tanı genellikle ileri evrelerde konulmakta, bu da görme kaybını geri döndürülemez kılmaktadır (Addo, 2016; Weinreb vd., 2014).

Glokom, klinik olarak anatomik ve patofizyolojik temellere göre sınıflandırılmaktadır. En yaygın iki formu primer açık açılı glokom (PAAG) ve primer kapalı açılı glokomdur (PKAG). PAAG, Batı toplumlarında daha sık görülmekte ve sıklıkla yavaş ilerleyen, sessiz seyreden bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. Buna karşılık, PKAG daha ani başlangıçlı olup ağrı, kızarıklık, baş ağrısı ve görme bozukluğu ile karakterizedir. Normal basınçlı glokom (NBG), GİB'in normal sınırlar içinde olmasına rağmen optik sinir hasarının görüldüğü bir formdur. Sekonder glokomlar ise travma, inflamasyon, tümörler veya uzun süreli kortikosteroid kullanımı gibi faktörlerle ilişkilidir (Gupta ve Chen, 2016; Zembala vd., 2023).

Glokomun patogenezi, aköz hümörün üretim ve drenaj dengesizliğine bağlı olarak artan GİB ile ilişkilidir. Bu artış, trabeküler ağ ve Schlemm kanalı yoluyla aköz hümör çıkışında dirençle karşılaşılması sonucu oluşur. Sonuç olarak optik sinir başında mekanik ve vasküler stres artar, bu durum gangliyon hücrelerinin apoptozuna ve sinir lifi tabakasında incelmeye neden olur. Nörodejeneratif sürecin oluşumunda glutamat eksitotoksisitesi, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar süreçler önemli rol oynamaktadır (Weinreb vd., 2014; Jonas vd., 2017).

Risk faktörleri arasında ileri yaş, siyah ırk, ailesel yatkınlık, miyopi, korneal kalınlık azalması, sistemik hipertansiyon ve diyabet yer almaktadır. Glokomun yaygınlığı, yaşla birlikte belirgin olarak artmaktadır. Özellikle 60 yaş üzerindeki bireylerde prevalansı anlamlı şekilde yüksektir. Ayrıca steroid kullanımı ve oküler travma gibi faktörler de sekonder glokoma neden olabilmektedir. (Gupta ve Chen, 2016; Jonas vd., 2017).

2.5.1. Glokom Tedavisinde Nanopartikül Taşıyıcı Sistemler

Glokom tedavisinin temel amacı, GİB'i düşürerek optik sinir hasarını yavaşlatmak veya durdurmaktır. İlk basamak genellikle topikal göz damlalarıdır. Prostaglandin analogları (Latanoprost, Travoprost), beta-blokerler (Timolol), alfa-agonistler (Brimonidin) ve karbonik anhidraz inhibitörleri (Asetazolamid) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak topikal uygulamalarda biyoyararlanım oldukça düşüktür; genellikle %5'in altındadır. Tedaviye uyum eksikliği, yan etkiler ve sistemik emilim, bu ilaçların etkinliğini sınırlayan önemli faktörlerdir (Jonas vd., 2017; Zembala vd., 2023).

Bu nedenle lazer trabeküloplasti, siklofotokoagülasyon, trabekülektomi ve drenaj implantları gibi cerrahi müdahaleler tercih edilebilmektedir. Ancak bu yöntemlerin invaziv oluşu, komplikasyon riski ve uzun dönem başarısızlık oranları da önemli sınırlılıklar oluşturmaktadır (Weinreb vd., 2014).

Son yıllarda glokom tedavisinde yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ön plana çıkmıştır. Bu sistemler, hem hasta uyumunu artırmak hem de farmakolojik etkinliği yükseltmek amacıyla geliştirilmiştir. Nanopartiküller, mikroküreler, lipozomlar, dendrimerler ve *in situ* jelleşen sistemler gibi sistemler kontrollü salım, hedeflendirme ve uzun süreli etki gibi avantajlar sunmaktadır (Occhiutto vd., 2020; Addo, 2016; Juliana vd., 2019). PLGA ve kitosan gibi biyobozunur polimerlerin yanı sıra biyouyumlu fakat biyobozunur olmayan ERS 100 ve ERL 100 gibi polimerlerde de glokom tedavisinde ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır. ERS 100 ve ERL 100, suda çözünmeyen ancak şişebilen yapısıyla uzatılmış salım uygulamaları için uygundur. Yapılan çalışmalarda, ERS 100 ve ERL 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin, GİB'i düşürücü ilaçların salımını uzattığı ve optik sinir dejenerasyonunu yavaşlatmaya yardımcı olabileceği rapor edilmiştir (Zafar vd., 2016; Pandey vd., 2012; Cardoso vd., 2023). Ayrıca yüzey modifikasyonlarıyla geliştirilen nanopartikül sistemleri, optik sinire spesifik hedefleme sağlamakta ve sistemik yan etkileri minimize etmektedir. Bu sistemler özellikle nöroprotektif tedaviler açısından önem arz etmektedir. Çalışmalar,

brimonidin, timolol, dorzolamid gibi ajanların polimerik sistemlerle salımının daha etkili ve uzun süreli olabileceğini göstermiştir (Zafar vd., 2016; Zembala vd., 2023; Occhiutto vd., 2020).

2.6. Adenilat Siklaz/cAMP

2.6.1. Tanım ve Biyokimyasal Temel

Adenilat siklaz (AC), adenozin trifosfatı (ATP) siklik adenozin monofosfata (cAMP) dönüştüren bir enzim ailesidir. Bu enzimler hücre içi sinyal iletiminde kritik rol oynar. Memelilerde AC'leri kodlayan 10 farklı gen bulunmakta olup, bunlardan dokuzu transmembran adenilat siklazlar (tmAC), biri ise çözünebilir adenilat siklazdır (sAC). tmAC'ler G-protein bağlı reseptörler tarafından aktive edilirken, sAC HCO_3^- ve Ca^{+2} gibi hücre içi sinyallerle düzenlenir. sAC, özellikle göz gibi metabolik olarak aktif dokularda, HCO_3^- sensörü olarak işlev görür ve hücre içi cAMP düzeylerini modüle ederek çeşitli biyolojik tepkileri başlatır (Lee vd., 2014; Shim vd., 2017; Thompson vd., 2024).

2.6.2. Hücresel Rolü ve Fizyolojik Etkileri

cAMP, hücre içi ikinci haberci olarak protein kinaz A (PKA), Epac ve iyon kanallarını aktive ederek sinyal iletim yollarını düzenler. Bu etkiler gen ekspresyonu, hücre çoğalması, farklılaşma, metabolizma ve iyon kanalları kontrolü gibi pek çok süreci kapsar. Göz dokularında sAC'nin varlığı, kornea endoteli ve retina gangliyon hücreleri (RGC) gibi yapılarda iyon dengesi, hücre sağkalımı ve hacim regülasyonu üzerinde önemli etkiler ortaya koymaktadır (Lee vd., 2014; Shim vd., 2017; Thompson vd., 2024).

2.6.3. Adenilat Siklaz/cAMP Yolunun Oftalmik Sistemle İlişkisi

cAMP'nin gözdeki etkileri özellikle siliyer cisim, retina ve kornea gibi bölgelerde belirgindir. sAC, kornea endotelyumunda su-iyon dengesi üzerinde rol oynar; bu sayede kornea şeffaflığı sağlanır. Retinada ise RGC'lerin sağkalımında ve aksonal büyümede sAC kaynaklı cAMP sinyallemesi etkilidir. Siliyer cisimde yer alan pigmentli ve pigmentsiz epitel hücrelerinde sAC'ın ekspresyonu gözlenmiştir ve bu yapıdaki sAC aktivitesi, aköz hümör üretimi ve drenajı ile ilişkili olabilir (Lee vd., 2014; Lee ve Marmorstein , 2014; Thompson vd., 2024).

2.6.4. Patolojik Durumlarla İlişkilendirilmesi

cAMP düzeylerindeki düzensizlikler, retina gangliyon hücrelerinde apoptoz, glial aktivasyon ve optik sinir başı bölgesinde inflamasyon gibi mekanizmaları etkileyebilir. sAC'ın ekspresyonunun azaltılması RGC sağkalımını olumsuz etkileyebilirken, KH7 gibi inhibitörlerin uygulanması IOP'i artırmakta ve drenaj direncini yükseltmektedir. Ayrıca ONH astroglia hücrelerinde cAMP sinyalleme yolunun bozulması, glokom gibi hastalıkların ilerlemesinde rol oynayabilir (Shim vd., 2017; Lee ve Marmorstein , 2014; Thompson vd., 2024).

2.7. Brimonidin Tartarat

Brimonidin tartarat (BT), selektif bir α_2-adrenerjik reseptör agonistidir ve oftalmik uygulamalarda GİB'i düşürmek amacıyla kullanılır. Moleküler formülü $C_{15}H_{16}BrN_5O_6$ olup, yapısında bromlu kinoksalin halkası ve imidazolin grubu içerir. Bu yapısal özellikleri sayesinde α_2-adrenerjik reseptörlerine yüksek afinite gösterir ve α_1-reseptörlerine göre yaklaşık 1000 kat daha fazla seçiciliğe sahiptir. Bu seçicilik, brimonidinin terapötik etkisini artırırken, sistemik yan etkilerin riskini azaltır (Cantor, 2006). Tablo 2.2.'de BT hakkında bazı kimyasal bilgiler verilmiş olup, Şekil 2.17'de BT'nin kimyasal yapısı şematik olarak gösterilmiştir.

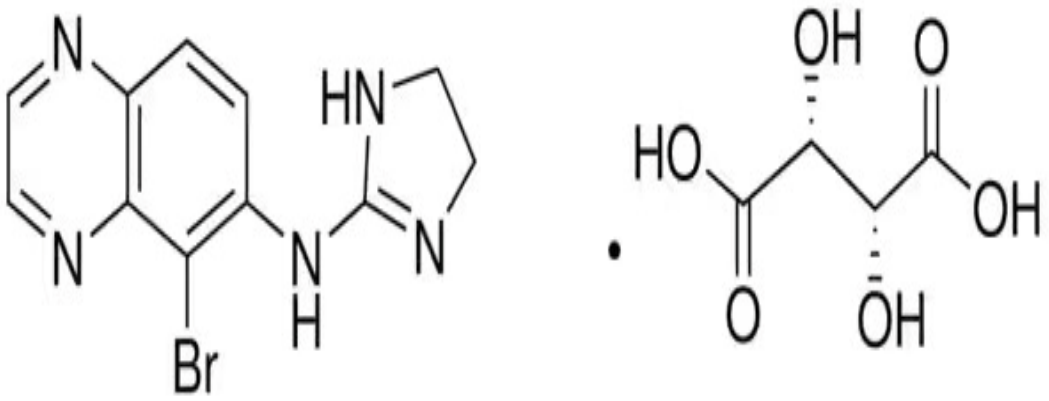
Tablo 2.2.

Brimonidin Tartarat'ın IUPAC İsmi ve Özellikleri (http-4)

IUPAC ismi:	5-bromo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)quinoxalin-6-amine;(2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioic acid
Moleküler formülü:	$C_{15}H_{16}BrN_5O_6$
Moleküler ağırlık:	442.22 g/mol

Şekil 2.17.

Brimonidin Tartarat'ın Kimyasal Yapısı (http-5)



BT, α_2-adrenerjik reseptörleri aktive ederek AC enzimini inhibe eder. Bu inhibisyon, hücre içi cAMP düzeylerinin azalmasına neden olur. Sonuç olarak, siliyer cisimde aköz hümör üretimi azalır ve uveoskleral yoldan dışa akım artar. Ayrıca BT'nin RGC'i oksidatif stres ve eksitotoksisiteye karşı koruyarak nöroprotektif etkiler gösterdiği de belirtilmiştir (Shen vd., 2021).

BT, özellikle AAG ve oküler hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Günde iki veya üç kez uygulandığında, GİB'i anlamlı düzeyde azaltır. Monoterapi olarak veya beta-blokerlerle kombinasyon halinde kullanılabilir. Klinik çalışmalar, BT'nin GİB düşürücü etkisinin yanı sıra, RGC'nin hayatta kalımını destekleyen nöroprotektif etkilerinin de olduğunu ortaya koymuştur (Shen vd., 2021 ; Cantor, 2006).

Topikal uygulamadan sonra BT hızla korneadan emilerek aköz hümöre ulaşır. Maksimum plazma konsantrasyonuna yaklaşık 1-2 saat içinde ulaşır ve sistemik yarı ömrü yaklaşık 2 saattir. Retina ve koroid dokusunda da ölçülebilir düzeylerde bulunabilir. Sistemik dolaşıma geçen BT'nin karaciğerde metabolize edilir ve idrarla atılır (Eriko vd., 2021).

BT'nin en sık bildirilen yan etkileri arasında konjonktival hiperemi, alerjik konjonktivit ve gözde kaşıntı yer alır. Sistemik yan etkiler nadir olmakla birlikte ağız kuruluğu, yorgunluk, baş ağrısı ve hipotansiyon gibi semptomlar görülebilir. 0.1% ve 0.025% konsantrasyonlu formları daha iyi tolere edilmektedir. Klinik çalışmalarda ciddi sistemik yan etkiler nadir olup, ilaç genellikle güvenli kabul edilir (Torkildsen vd., 2018).

2.7.1. Glokomda Adenilat Siklaz/cAMP ve Brimonidin Etkisi

AC/cAMP yolu, glokom patofizyolojisinde hem aköz hümör üretimi hem de retinal hücrelerin sağkalımı açısından kritik bir düzenleyici mekanizmadır. tmAC'ler, G-protein bağlı reseptörlerle etkileşimli çalışarak hücre içi cAMP düzeylerini belirlerken; çözünebilir sAC, HCO_3^- ve Ca^{+2} aracılığıyla düzenlenir. Bu iki izoform, glokomla ilişkili yapılarda (siliyer cisim, retina gangliyon hücreleri ve optik sinir başı) farklı işlevsel roller üstlenmektedir. (Shim vs., 2017).

BT, α_2-adrenerjik reseptörleri aktive ederek Gi protein aracılığıyla tmAC enzimini inhibe eder. Bu inhibisyon, hücre içi cAMP düzeylerinin azalmasına yol açar. cAMP azalması, siliyer cisimde aköz hümör üretiminin düşmesine ve uveoskleral akımın artmasına neden olur. Bu etkiler BT'nin GİB düşürücü etkisinin temelini oluşturur (Cantor, 2006).

Bununla birlikte, BT'nin cAMP düzeyini azaltarak RGC'i oksidatif stres ve eksitotoksisiteden koruduğu gösterilmiştir. Bu durum, cAMP'nin yalnızca sekonder haberci olarak değil, aynı zamanda nöronal sağkalımın düzenleyicisi olarak da işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. cAMP düzeylerindeki düşüşün, RGC'lerde Ca^{2+} geçişini azaltarak hücre içi apoptoz sinyallerini baskıladığı düşünülmektedir (Shim vs., 2017).

BT'nin etkisinin büyük ölçüde tmAC inhibisyonu üzerinden gerçekleştiği, sAC izoformunun ise bu etki mekanizmasına dahil olmadığı belirtilmiştir. sAC'nin HCO_3^- duyarlı yapısı ve farklı hücresel lokalizasyonu nedeniyle, BT'nin terapötik etkilerinde belirgin bir rol oynamadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla, BT tedavisinde gözlemlenen cAMP azalması ve ilişkili fizyolojik etkiler, tmAC kaynaklı cAMP sentezinin baskılanmasına dayanmaktadır (Shim vs., 2017).

Glokom tedavisinde BT, yalnızca göz içi basıncını düşürmekle kalmayıp, AC/cAMP yoluna müdahale ederek retina hücrelerini koruyucu bir etki de sunmaktadır. Bu çift yönlü etki, brimonidini hem basınç regülasyonunda hem de nöroprotektif tedavi yaklaşımlarında değerli bir ajan haline getirmektedir (Cantor, 2006).

2.7.2 Brimonidin Tartarat İçeren Preparatlar

RxMediaPharma'da bulunan BT içeren preparatlar Tablo 2.3'te sunulmuştur.

Tablo 2.3.

Brimonidin Tartarat İçeren Preparatlar (http-6)

Müstahzar ismi	BT konsantrasyonu	Farmasötik form ve miktar	Firma	Orijinal /Jenerik
ALPHAGAN P GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	ABBVIE	Orijinal
BİRİGLO GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	SABA	Jenerik
BREMON GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	DEVA	Jenerik
BRİMOGUT GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	BİLİM İLAÇ	Jenerik
BRİMOLİX GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	VEM İLAÇ	Jenerik
BRİOP GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	WORLD OPHTHALMICS	Jenerik
GLOGER GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	BİEM	Jenerik
RİMONAL GÖZ DAMLASI	%0.2	Çözelti, 5 mL	WORLD MEDICINE	Jenerik
RİMONAL P GÖZ DAMLASI	%0.15	Çözelti, 5 mL	WORLD MEDICINE	Jenerik

3. KALİTEYE DAYALI TASARIM (QbD) YAKLAŞIMI

3.1. Farmasötik Ürün Geliştirmede Kaliteye Dayalı Tasarım (Quality by Design, QbD) Yaklaşımı

Kaliteye Dayalı Tasarım (Quality by Design, QbD), farmasötik ürün geliştirme sürecinde ürün kalitesinin yalnızca son testlerle değil, tasarım aşamasından itibaren sistematik olarak inşa edilmesini amaçlayan bilimsel bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, ürün ve proses değişkenlerinin ürün performansı üzerindeki etkilerinin önceden anlaşılmasını ve kontrol altına alınmasını esas almaktadır. QbD felsefesi, ürün kalitesinin "sonradan test edilerek doğrulanamayacağı, ancak tasarım aşamasında planlanması gerektiği" prensibine dayanmaktadır. Geleneksel farmasötik geliştirme süreçlerinde ürün kalitesi çoğunlukla deneme–yanılma yöntemleriyle optimize edilmekte ve kalite, üretim sonrası yapılan analizlerle değerlendirilmektedir. Bu yaklaşım, özellikle karmaşık ilaç taşıyıcı sistemlerde değişkenlik riskini artırmakta ve prosesin tekrarlanabilirliğini sınırlamaktadır. QbD yaklaşımı ise ürün geliştirme sürecini bilimsel temellere oturtarak, kritik kalite özellikleri ve proses parametreleri arasındaki ilişkilerin sistematik şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır (Katta, 2018).

Uluslararası düzenleyici otoriteler tarafından da desteklenen QbD yaklaşımı, ICH Q8 (Farmasötik Geliştirme), ICH Q9 (Kalite Risk Yönetimi) ve ICH Q10 (Farmasötik Kalite Sistemi) kılavuzları ile çerçevelendirilmiştir. Bu kılavuzlar kapsamında QbD, ürün performansını etkileyen değişkenlerin tanımlanması, risk analizlerinin yapılması ve bilimsel verilere dayalı karar alma süreçlerinin uygulanmasını içermektedir (Polat, Aytekin vd., 2024).

QbD yaklaşımının temel bileşenleri arasında hedef ürün profilinin tanımlanması, kritik kalite özelliklerinin belirlenmesi, risk değerlendirme stratejilerinin uygulanması ve proses kontrolünün sağlanması yer almaktadır. Bu bileşenler sayesinde ürün geliştirme süreci yalnızca istenen kalite hedeflerine ulaşmakla kalmamakta, aynı zamanda prosesin ölçeklenebilirliği ve uzun dönemli stabilitesi de güvence altına alınmaktadır. Son yıllarda QbD yaklaşımı, özellikle nanopartikül temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır. Nanotaşıyıcı sistemlerin çok sayıda formülasyon ve proses değişkeni içermesi, klasik geliştirme yaklaşımlarının yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda QbD, nanopartikül sistemlerin

rasyonel ve tekrarlanabilir biçimde geliştirilmesine olanak tanıyan güçlü bir araç olarak öne çıkmaktadır (Jeong, Yoon vd., 2025).

Özellikle oküler ilaç taşıyıcı sistemlerde dar terapötik aralık, düşük biyoyararlanım ve yüksek biyolojik değişkenlik gibi faktörler, ürün kalitesinin hassas biçimde kontrol edilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle QbD yaklaşımı, oküler nanopartikül sistemlerin geliştirilmesinde bilimsel ve sistematik bir yol haritası sunmaktadır (Rathod, Shah ve Dave, 2020).

3.2. Oküler Nanopartikül Sistemlerde Kaliteye Dayalı Tasarım (QbD) Yaklaşımının Önemi

Oküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, gözün karmaşık anatomik ve fizyolojik bariyerleri nedeniyle farmasötik ürün tasarımı açısından önemli güçlükler içermektedir. Gözyaşı drenajı, korneal epitel bariyeri ve sınırlı rezidans süresi gibi faktörler, özellikle topikal uygulamalarda düşük biyoyararlanım ve yüksek değişkenliğe yol açmaktadır. Nanopartikül temelli sistemler bu sınırlamaların aşılmasına olanak sağlasa da, ürün performansı çok sayıda formülasyon ve proses değişkenine duyarlıdır (Jeong, Yoon vd., 2025).

Bu çok değişkenli yapı içerisinde QbD yaklaşımı, oküler nanopartikül sistemlerin rasyonel ve kontrollü biçimde geliştirilmesi için önemli bir çerçeve sunmaktadır. Partikül boyutu, yüzey yükü, polidispersite indeksi ve salım profili gibi parametrelerde meydana gelen küçük değişikliklerin dahi oküler penetrasyon ve terapötik etkinlik üzerinde belirleyici etkiler oluşturması, bu sistemlerde kalite–performans ilişkilerinin önceden tanımlanmasını zorunlu kılmaktadır. QbD yaklaşımı, bu ilişkilerin risk temelli yöntemlerle değerlendirilmesine ve kritik değişkenlerin erken aşamada belirlenmesine olanak tanımaktadır (Saha, Ulhosna vd., 2021).

Özellikle oküler nanopartikül sistemlerde QbD'nin sağladığı en önemli katkı, kritik kalite özellikleri ile formülasyon ve proses değişkenleri arasındaki etkileşimlerin sistematik olarak analiz edilmesidir. Böylece deneysel çalışmalar daha hedefli şekilde planlanmakta, ürün performansındaki değişkenlik azaltılmakta ve geliştirilen sistemlerin klinik gereksinimlerle uyumu artırılmaktadır. Bu yönüyle QbD, oküler nanopartikül sistemlerin geliştirilmesinde yalnızca kalite kontrol yaklaşımı değil, ürün tasarımını yönlendiren bütüncül bir strateji olarak değerlendirilmektedir. (Jeong, Yoon vd., 2025).

3.3. Hedef Ürün Kalite Profili (QTPP)

Hedef Ürün Kalite Profili (Quality Target Product Profile, QTPP), QbD yaklaşımının temel bileşenlerinden biri olup, geliştirilecek farmasötik ürünün klinik kullanım amacı ve hasta gereksinimleri doğrultusunda sahip olması beklenen kalite özelliklerini tanımlamaktadır. QTPP'nin ürün geliştirme sürecinin erken aşamalarında belirlenmesi, formülasyon ve proses tasarımının bilimsel ve hedef odaklı biçimde ilerlemesini sağlamaktadır (Namjoshi, Dabbaghi vd., 2020).

Oküler ilaç taşıyıcı sistemlerde QTPP'nin tanımlanması, gözün hassas yapısı, sınırlı doz hacmi ve yüksek güvenlilik gereksinimleri nedeniyle özel önem taşımaktadır. Bu kapsamda oküler uygulamalar için oluşturulan QTPP; topikal uygulanabilirlik, göz yüzeyinde yeterli rezidans süresi, hedeflenen terapötik etkinin güvenli biçimde sağlanması ve oküler dokularla uyumlu bir profil sergilenmesi gibi kriterleri içermektedir. Bu hedeflerin açık biçimde tanımlanması, rastgele optimizasyon yaklaşımlarının önüne geçerek ürün geliştirme sürecini yönlendirmektedir (Namjoshi, Dabbaghi vd., 2020).

Nanopartikül temelli sistemlerde QTPP, partikül boyutu, yüzey özellikleri ve salım davranışı gibi fonksiyonel performansı doğrudan etkileyen parametrelerin önceden hedeflenmesine olanak tanımaktadır. Bu durum, kritik kalite özelliklerinin (CQA) rasyonel şekilde belirlenmesini kolaylaştırmakta ve deneysel çalışmaların sistematik bir yapı içerisinde yürütülmesini sağlamaktadır. Sonuç olarak QTPP, oküler nanopartikül sistemlerin klinik gereksinimlere uygun, güvenli ve etkin biçimde tasarlanabilmesi için yönlendirici bir araç olarak QbD yaklaşımının temelini oluşturmaktadır (Koevary, Dehghani vd., 2025).

3.4. Kritik Kalite Özellikleri (CQA)

Kritik Kalite Özellikleri (Critical Quality Attributes, CQA), QbD yaklaşımı kapsamında geliştirilen bir farmasötik ürünün hedeflenen kalite profiline ulaşabilmesi için kontrol altında tutulması gereken; ürünün güvenliliği, etkinliği ve klinik performansı ile doğrudan ilişkili fiziksel, kimyasal, biyolojik veya mikrobiyolojik özellikler olarak tanımlanmaktadır. CQA'lar, Hedef Ürün Kalite Profili (QTPP) doğrultusunda belirlenmekte ve ürün performansını etkileyen değişkenlerin sistematik biçimde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Schofield, Robbins ve Miró-Quesada, 2015).

QbD yaklaşımında CQA'ların tanımlanması, ürün geliştirme sürecinin temel basamaklarından birini oluşturmaktadır. QTPP'de belirlenen klinik ve kalite hedefleri doğrultusunda, ürünün hangi özelliklerinin kritik olduğu değerlendirilmekte ve bu özellikler için kabul edilebilir sınırlar tanımlanmaktadır. Bu sayede ürün geliştirme süreci, deneme–yanılma temelli yaklaşımlar yerine, önceden belirlenmiş kalite hedeflerine dayalı planlı bir yapı içerisinde yürütülmektedir (Alt, Zhang vd., 2016).

Oküler ilaç taşıyıcı sistemlerde CQA kavramı, gözün hassas yapısı ve sınırlı tolerans aralığı nedeniyle özel bir önem taşımaktadır. Oküler uygulamalarda ürünün güvenli ve etkin olabilmesi; partikül boyutu, partikül boyut dağılımı, yüzey yükü, fiziksel stabilite ve salım profili gibi özelliklerin titizlikle kontrol edilmesini gerektirmektedir. Bu özelliklerde meydana gelebilecek küçük değişikliklerin dahi oküler irritasyon, düşük biyoyararlanım veya yetersiz terapötik etki gibi istenmeyen sonuçlara yol açabileceği bildirilmektedir (Rahman, Xu vd., 2014).

Nanopartikül temelli oküler sistemlerde partikül boyutu ve polidispersite indeksi, en kritik kalite özellikleri arasında yer almaktadır. Literatürde, partikül boyutunun korneal penetrasyon, oküler rezidans süresi ve biyoyararlanım üzerinde doğrudan etkili olduğu; polidispersite indeksinin ise sistemin homojenliğini ve tekrarlanabilirliğini yansıtan önemli bir kalite göstergesi olduğu vurgulanmaktadır. Bu parametrelerin CQA olarak tanımlanması, formülasyon ve proses değişkenlerinin ürün performansı üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Alt, Zhang vd., 2016).

Yüzey yükü (zeta potansiyeli), oküler nanopartikül sistemlerde bir diğer kritik kalite özelliği olarak değerlendirilmektedir. Zeta potansiyeli, nanopartiküllerin göz yüzeyi ile etkileşimini, mukoadhezyon davranışını ve fiziksel stabilitesini etkileyen temel bir parametredir. Uygun yüzey yüküne sahip sistemlerin, göz yüzeyinde daha uzun süre kalabildiği ve terapötik etkinliği artırabildiği bildirilmektedir. Bu nedenle zeta potansiyeli, QbD yaklaşımı kapsamında mutlaka değerlendirilmesi gereken CQA'lar arasında yer almaktadır (Rahman, Xu vd., 2014).

Salım profili ve fiziksel stabilite de oküler nanopartikül sistemlerin performansını doğrudan etkileyen kritik kalite özellikleri arasında bulunmaktadır. İlacın kontrollü ve öngörülebilir şekilde salınması, terapötik etkinliğin sürdürülebilmesi açısından büyük

önem taşırken; fiziksel stabilitenin sağlanması, ürünün raf ömrü boyunca kalite özelliklerini koruyabilmesi için gereklidir. QbD yaklaşımı, bu kalite özelliklerinin formülasyon ve proses değişkenleri ile olan ilişkilerinin sistematik biçimde değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (Schofield, Robbins ve Miró-Quesada, 2015).

3.5. Karar Matrisi ve Risk Değerlendirme Yaklaşımları

QbD yaklaşımında ürün geliştirme süreci, hedef ürün kalite profilinin (QTPP) tanımlanması ile sınırlı kalmamakta; bu profili etkileyen formülasyon ve proses değişkenlerinin risk temelli olarak değerlendirilmesini de içermektedir. Bu kapsamda risk değerlendirme yaklaşımları, ürün performansını ve kalitesini etkileyebilecek değişkenlerin sistematik biçimde tanımlanması, analiz edilmesi ve önceliklendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Karar matrisi uygulamaları, bu sürecin yapılandırılmış ve rasyonel bir şekilde yürütülmesine olanak tanıyan temel araçlar arasında yer almaktadır (Schofield, Robbins ve Miró-Quesada, 2015).

Karar matrisi yaklaşımı, birden fazla formülasyon veya proses değişkeninin kritik kalite özellikleri (CQA) üzerindeki potansiyel etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde, QTPP ve CQA doğrultusunda belirlenen değişkenler; kalite üzerindeki etki düzeyleri ve risk önem derecelerine göre puanlandırılmakta ve öncelik sırasına konulmaktadır. Böylece ürün geliştirme sürecinde hangi değişkenlerin daha kritik olduğu bilimsel temellere dayalı olarak ortaya konulabilmektedir (Alt, Zhang vd., 2016).

Oküler nanopartikül sistemlerde karar matrisi ve risk değerlendirme yaklaşımlarının kullanımı, sistemin çok değişkenli ve karmaşık yapısı nedeniyle özel bir önem taşımaktadır. Partikül boyutu, yüzey yükü, polimer konsantrasyonu, yüzey aktif madde tipi ve üretim parametreleri gibi çok sayıda değişkenin ürün performansı üzerinde etkili olması, deneysel çalışmaların rastgele şekilde yürütülmesini güçleştirmektedir. Risk temelli yaklaşımlar sayesinde bu değişkenlerin CQA'lar üzerindeki potansiyel etkileri önceden değerlendirilebilmekte ve deneysel çalışmalar daha hedefli bir çerçevede planlanabilmektedir (Rahman, Xu vd., 2014).

Literatürde QbD temelli oküler ürün geliştirme çalışmalarında, karar matrisi uygulamalarının özellikle formülasyon geliştirme ve optimizasyon aşamalarında yaygın

olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Bu yaklaşımlar, yüksek risk taşıyan değişkenlerin erken aşamada belirlenmesine olanak tanırken, ürün kalitesi üzerinde sınırlı etkisi olan değişkenlerin elenmesini sağlayarak deneysel yükü azaltmaktadır. Böylece ürün geliştirme süreci zaman ve kaynak kullanımı açısından daha verimli hale gelmektedir (Rathod, Shah ve Dave, 2020).

Karar matrisi ve risk değerlendirme yaklaşımları, kalite özellikleri ile formülasyon ve proses değişkenleri arasındaki ilişkinin şeffaf ve gerekçelendirilebilir biçimde ortaya konulmasını sağlamaktadır. Bu durum, ürün geliştirme sürecinde alınan kararların bilimsel temellere dayandırılmasına ve elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğinin artırılmasına katkı sağlamaktadır. Sonuç olarak bu yaklaşımlar, oküler nanopartikül sistemlerin geliştirilmesinde QbD yaklaşımının uygulanabilirliğini güçlendiren ve ürün tasarımını yönlendiren temel araçlar arasında yer almaktadır. Bu bölümde sunulan kavramsal çerçeve, tezin Materyal–Metod ve Bulgular/Tartışma bölümlerinde ele alınan QbD temelli uygulamaların teorik temelini oluşturmaktadır. (Katta, 2018).

4. GEREÇLER

4.1. Kullanılan Maddeler

Madde Adı:	Firma Adı:
Aseton	: Merck, Almanya
Brimonidin Tartarat	: Bilim, Türkiye
Eudragit® RS 100	: Evonik Indüstries, Almanya
DMEM	: Gibco, Amerika
DMSO	: Merck, Almanya
Fetal Sığır Serumu	: Capricorn Scientific, Amerika
Kalsiyum Klorür Dihidrat	: Merck, Almanya
LightCycler 480 SYBR Green I Master	: Roche Diagnostics, İsviçre
Metanol	: Merck, Almanya
MTT	: Sigma-Aldrich, Amerika
Penisilin/Streptomisin	: Gibco, Amerika
Polivinil alkol (PVA)	: BASF, Amerika
Poloxamer 188 (Pluronic F68)	: BASF, Amerika
Potasyum Klorür	: Merck, Almanya
Sabouraud Dekstroz Agar	: BIOMARK, Hindistan
Sodyum Bikarbonat	: Merck, Almanya
Sodyum Klorür	: Merck, Almanya
Sodyum Tiyoglikolat	: Merck, Almanya
Span 60	: Sigma-Aldrich, Amerika
tBHP	: Sigma-Aldrich, Amerika

4.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı:	Firma Adı:
Buz Dolabı	: Arçelik, Türkiye
Cedex XS	: Roche-Innovatis, Almanya

Cytation 3 Multi-mode Reader	: Biotek, Amerika
Çekerocak	: Hedlab X-Pro EN 141775, Türkiye
Derin Dondurucu	: Liebherr LGEX 3410 Medline, İsviçre
Distile su cihazı	: MiliQ Milipore, Fransa
DSC	: Shimadzu DSC-60, Kolombiya
EcoPURE Total RNA Kit	: EcoTech Biotechnology, Türkiye
FT-IR	: Shimadzu IR Prestige-21, Japonya
Hassas terazi	: Ohaus E1 2140, Amerika
LightCycler 480 RT-PCR	: Roche, Almanya
Liyofilizatör	: Operon FDB-8602, Güney Kore
Manyetik karıştırıcı	: Jeiotech MS-33MH, Güney Kore
Mikropipet seti	: Eppendorf, Almanya
NanoDrop 2000 spektrofotometresi	: Thermo Scientific, Amerika
pH metre	: Mettler Toledo S210-U, Çin
Prob sonikatör	: Sonics VCX130PB, Amerika
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	: Roche, Almanya
Ultrasonik banyo	: Elma, Almanya
UV-Spektrofotometre	: Shimadzu, Japonya
Vorteks	: Jeo Tech, Kore
Zetasizer	: Malvern Nano ZS, İngiltere

5. YÖNTEM

5.1. UV Spektrofotometre Validasyon Çalışmaları

In vitro çalışmalarda Brimonidin Tartarat (BT) için miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enkapsülasyon etkinliği çalışmaları ve *in vitro* salım çalışmaları için iki farklı validasyon çalışması yapılmıştır.

5.1.1. Brimonidin Tartarat için Aseton: Su (1:1, *h/h*) Ortamında Yapılan Çalışmalar

Yöntemin uygunluğunun araştırılması ve bu amaç doğrultusunda yeterli, güvenilir aynı zamanda tekrarlanabilir sonuçların alınması analitik yöntem validasyonunun ana amacıdır. BT için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında miktar tayini validasyonunda doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri inceleme parametresi olarak seçilmiş ve istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu çalışmanın değerlendirilme Uluslararası Uyum Konseyi'nin (ICH) kriterlerine göre yapılmıştır (Nocentini ve Supuran, 2019; Borman ve Elder, 2014).

5.1.1.1. Absorbans Belirleme Çalışmaları

Enkapsülasyon etkinliği çalışmalarında kullanmak üzere BT için aseton: su (1:1 *h/h*) ortamında miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için ilk olarak 25 mg BT tam olarak tartılmış ardından aseton: su (1:1 *h/h*) ile yıkanarak amber cam balon jojeye alınıp 25 mL'e aseton: su (1:1 *h/h*) karışımı ile tamamlanmıştır. Bu çözelti beş dakika manyetik karıştırıcıda tutulmuş ve sonuç olarak stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonun 1000,0 $\mu g.mL^{-1}$ olmasından hareketle farklı seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometrede maksimum absorbansın (λ_{max}) bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Bhagav, Deshpande vd., 2010).

5.1.1.2. Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için 1 stok çözeltiden 5,0 ile 60,0 $\mu g.mL^{-1}$ arasında 7 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti için analizler 3 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 322,0 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir (Smerikarova, Bozhanov ve Marslarska, 2019).

5.1.1.3. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntemle elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % ortalama ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için 3 farklı konsantrasyonda (10,0 $\mu g.mL^{-1}$, 30,0 $\mu g.mL^{-1}$, 50,0 $\mu g.mL^{-1}$) 3'er kez tekrarlanmıştır (Çevikelli, Öztürk ve Güven, 2024).

5.1.1.4. Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda (10,0 $\mu g.mL^{-1}$, 30,0 $\mu g.mL^{-1}$, 50,0 $\mu g.mL^{-1}$) BT içeren çözeltiler hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltilerin her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (Rubim, Rubenick vd., 2013).

5.1.1.5. Duyarlılık

Tespit sınırı (LOD), numunede tespit edilebilecek en düşük analit miktarıdır. Ölçüm sınırı (LOQ) uygun kesinlik ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen numune içindeki analit miktarlarının en düşük olmasıdır (Borman ve Elder, 2014).

Analitik yöntem validasyon çalışması için LOD ve LOQ değerleri standart sapma yöntemi kullanılarak Denklem 5.1. ve Denklem 5.2. yardımıyla ICH yönergelerine göre hesaplanmıştır. Denklem 5.1 ve Denklem 5.2'de yer alan σ = yanıtın standart sapması; S= regresyon çizgisinin eğimidir.

$$LOD = \frac{3{,}3 \times \sigma}{S} \tag{5.1.}$$

$$LOD = \frac{10 \times \sigma}{S} \tag{5.2.}$$

5.1.1.6. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü/seçiciliği için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar BT, aseton: su (1:1 *h/h*) karışımı ve V-Blank-NP (Blank formülasyon) için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Padilha, Azevedo, Miranda-Andrades vd., 2022).

5.1.2. Brimonidin Tartarat için STF pH 7.4 Ortamında Validasyon Çalışması

5.1.2.1. Absorbans Belirleme Çalışmaları

In vitro salım çalışmalarından önce BT için simüle edilmiş gözyaşı sıvısı (STF pH 7.4) ortamında validasyon çalışmaları UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için öncelikle STF ile yıkanarak amber cam balon jojeye alınmış tam tartılmış olan 25 mg BT, 25 mL'e STF ile tamamlanmıştır. Oluşan çözelti beş dakika manyetik karıştırıcıda tutulmuş ve sonuç stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonun 1000,0 $\mu g.mL^{-1}$ olmasından hareketle, seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometride λ_{max}'ın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Bhagav, Deshpande vd., 2010).

5.1.2.2. Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için 1 stok çözeltiden 5,0 ile 60,0 $\mu g.mL^{-1}$ arasında 7 farklı derişimde çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti için analizler 3 farklı gün olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 322 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. (Smerikarova, Bozhanov ve Marslarska, 2019).

5.1.2.3. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntemle elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % ortalama ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için 3 farklı konsantrasyonda (10,0 $\mu g.mL^{-1}$, 30,0 $\mu g.mL^{-1}$, 50,0 $\mu g.mL^{-1}$) 3'er kez tekrarlanmıştır (Çevikelli, Öztürk ve Güven, 2024).

5.1.2.4. Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda (10,0 $\mu g.mL^{-1}$, 30,0 $\mu g.mL^{-1}$, 50,0 $\mu g.mL^{-1}$) BT içeren çözeltiler hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltilerim her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (Rubim, Rubenick vd., 2013).

5.1.2.5. Duyarlılık

STF ortamında yapılan validasyon çalışması için LOD ve LOQ analizleri '5.1.1.5. Duyarlılık' bölümünde yer verilen Denklem 5.1. ve Denklem 5.2. yardımı ile hesaplanmıştır (Maharini, Martien, Nugroho vd., 2021).

5.1.2.6. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü/seçiciliği, UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar BT, STF ve V-Blank-NP (Blank formülasyon) için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Padilha, Azevedo, Miranda-Andrades vd., 2022).

5.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

BT suda çözünür bir etkin maddedir (Maiti, Paul, Mondol vd., 2011). Bu sebeple literatür araştırması sonucunda bu tez çalışması kapsamında hazırlanan ERS 100 bazlı nanopartikül formülasyonlarının 'Çift Emülsifikasyon Çözücü Buharlaştırma' yöntemi kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir. Formülasyon ön deneme çalışmalarında çözücü (metanol, aseton), yüzey etkin madde cinsi (Poloksamer 188/P-188 ve Polivinil alkol/PVA), yüzey etkin madde konsantrasyonu (%0.5 *a/h*, %1.0 *a/h* ve %1.5 *a/h*) ve sonikasyon süreleri (30, 60, 90 ve 120 saniye) değiştirilerek deneme çalışmaları yapılmış; QbD yaklaşımları ve uygun sonuçlara göre optimum formülasyon seçilmiştir. Bu çalışmada hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının hazırlama koşulları ve içerikleri Tablo 5.1.'de sunulmuştur. Tablo 5.2.'de ise nanopartikül hazırlama sürecinde sabit tutulan ve değiştirilen parametreler verişmiştir.

Tablo 5.1.

Hazırlanan Blank ve BT Yüklü Nanopartikü Formülasyonlarının Hazırlama Koşulları ve İçerikleri.

Formülasyon Kodu	Su fazı (S_1)		Yağ fazı (Y_1)			Su fazı (S_2)	Cihaz koşulları ve süre	
	(PVA veya P-188)	BT	ERS 100	Çözücü	Span 60		Prob sonikasyon gücü (Amplitude)	Prob sonikasyon süresi (Saniye)
A-Blank-NP	PVA (% 0.5 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	PVA (% 0.5 *a/h*), 10 mL	% 60	90
B-Blank-NP	PVA (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	PVA (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	90
C-Blank-NP	PVA (% 0.5 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	PVA (% 0.5 *a/h*), 10 mL	% 60	120
D-Blank-NP	PVA (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	PVA (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	120
E-Blank-NP	P-188 (% 0.5 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	P-188 (% 0.5 *a/h*), 10 mL	% 60	90
F-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	90
G-Blank-NP	P-188 (% 0.5 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	P-188 (% 0.5 *a/h*), 10 mL	% 60	120
H-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Metanol, 3 mL	-	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	120
I-Blank-NP	PVA (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	-	PVA (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	90
J-Blank-NP	PVA (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	-	PVA (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	120
K-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*),200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	-	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	90
L-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	-	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	120
M-Blank-NP	PVA (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	PVA (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	90
N-Blank-NP	PVA (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	PVA (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	120
P-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	90
R-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	120
S-Blank-NP	P-188 (% 0.5 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	P-188 (% 0.5 *a/h*), 10 mL	% 60	90
T-Blank-NP	P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL	% 60	60
U-Blank-NP	P-188 (% 1.5 *a/h*), 200 µL	-	60 mg	Aseton, 3 mL	20 mg	P-188 (% 1.5 *a/h*), 10 mL	% 60	90

Tablo 5.1. (Devam)

Hazırlanan Blank ve BT Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlama Koşulları ve İçerikleri

V-Blank-NP	**P-188 (% 0.5 *a/h*), 200 µL**	**-**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 0.5 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**60**
Y-Blank-NP	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL**	**-**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**30**
Z-Blank-NP	**P-188 (% 1.5 *a/h*), 200 µL**	**-**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.5 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**60**
P-BT-NP	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**90**
S-BT-NP	**P-188 (% 0.5 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 0.5 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**90**
T-BT-NP	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**60**
U-BT-NP	**P-188 (% 1.5 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.5 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**90**
V-BT-NP	**P-188 (% 0.5 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 0.5 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**60**
Y-BT-NP	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.0 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**30**
Z-BT-NP	**P-188 (% 1.5 *a/h*), 200 µL**	**6 mg**	**60 mg**	**Aseton, 3 mL**	**20 mg**	**P-188 (% 1.5 *a/h*), 10 mL**	**% 60**	**60**

***a/h*:** ağırlık/hacim, **BT:** Bromonidin tartarat, **ERS 100:** Eudragit® RS 100, **PVA:** Polivinil alkol, **P-188:** Poloksamer 188.

Tablo 5.2.

Nanopartikül Hazırlama Sürecinde Sabit Tutulan ve Değiştirilen Parametreler

Parametre	Durum
Polimer tipi	ERS (Sabit)
Polimer miktarı	60 mg (Sabit)
Sonikasyon amplitüd değeri	% 60 (Sabit)
Sonikasyon süresi	30-120 saniye (Değişken)
Yüzey etkin madde tipi	PVA / P-188 8Değişken)
Yüzey etkin madde derişimi	%0.5 - %1.5 (Değişken)
Span 60	Var / Yok (Değişken)
BT	Var / Yok (Değişken)

5.2.1. A-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

A-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA

çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.2. B-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

B-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.3. C-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

C-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.4. D-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

D-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.5. E-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

E-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda

30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL Poloxamer 188 (P-188) çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.6. F-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

F-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.7. G-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

G-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.8. H-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

H-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL metanol, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.9. I-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

I-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.10. J-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

J-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.11. K-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

K-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.12. L-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

L-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100, aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0

a/h, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.13. M-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

M-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.14. N-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

N-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.15. P-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

P-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.16. R-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

R-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 120 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.17. S-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

S-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.18. T-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

T-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 60 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.19. U-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

U-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra,

ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.20. V-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

V-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 60 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.21. Y-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

Y-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 30 saniye boyunca tutulmuştur (S_1/Y/S_2 emülsiyonu).

5.2.22. Z-Blank-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

Z-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL^{-1} polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan ERS 100 ve span 60 (20 mg), aseton içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60

amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 60 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.23. P-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli P-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) hazırlanmıştır. P-Blank-NP kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.24. S-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli S-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) hazırlanmıştır. S-Blank-NP kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.25. T-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli T-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) hazırlanmıştır. T-Blank-NP kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve

% 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 60 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.26. U-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli U-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*) hazırlanmıştır. U-Blank-NP kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 (% 1.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 90 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.27. V-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) hazırlanmıştır. V-Blank-NP kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P-188 çözeltisi (% 0.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 60 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.28. Y-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli Y-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) hazırlanmıştır. Y-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P-188 çözeltisi (% 1.0 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60

amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 30 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.29. Z-BT-NP Kodlu Formülasyonun Hazırlanması

BT içeren etkin maddeli Z-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg BT içeren 200 µL'lik P188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*) hazırlanmıştır. Z-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi span 60 (20 mg) içeren 20 $mg.mL^{-1}$ polimer (3 mL aseton, 60 mg ERS 100) konsantrasyonunda ERS 100 çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 30 saniye boyunca 3 mL ERS 100 çözeltisine 200 µL BT içeren P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon P-188 çözeltisi (% 1.5 *a/h*, 10 mL) içine damla damla eklenmiş ve % 60 amplitüd prob sonikasyon (Sonics, USA) altında 60 saniye boyunca tutulmuştur ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

5.2.30. Yıkama ve Liyofilizasyon İşlemleri

$S_1/Y/S_2$ emülsiyonu oluşumundan sonra gözlenen nanopartikül oluşumu gözlenen formülasyonlarda bulunan organik çözücü oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı (250 rpm) ile sürekli karıştırma altında 4 saat boyunca buharlaştırılmıştır. Oluşan nanopartikül süspansiyonundan nanopartikülleri toplamak için, süspansiyon 4°C'de 30 dakika boyunca 11.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve ardından nanopartikül 5 mL distile su içinde yeniden dağıtılmıştır. Bu yıkama işlemi kalıntı maddeler ve çözücülerin tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için yapılmıştır. Yıkama ve santrifüj adımları toplamda 3 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır.

5.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.3.1. Parçacık Boyutu, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Belirleme Çalışması

Nanopartiküllerin parçacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDI), Zetasizer Nano (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) cihazı ile dinamik ışık saçılımı tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan nanopartiküllerin parcacık boyut ve PDI değerleri, taze hazırlanmış formülasyonların distile suda dağıtılmasıyla analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin Zeta (ζ) potansiyel değerleri, 25 ^oC oda sıcaklığında tek kullanımlık katlanmış bir kılcal zeta hücrede aynı cihaz kullanılarak belirlenmiştir (Öztürk, Ekinci vd., 2022).

5.3.2. Optimum Formülasyon Seçim Stratejisi

Bu tez çalışmasında geliştirilen nanopartikül formülasyonları arasından optimum nanopartikül formülasyonun seçimi, kalite hedefli ürün profili (Quality target product profile-QTPP) ve kritik kalite özellikleri (Critical quality attributes-CQA) esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel temel kalite kriterleri olarak belirlenmiştir. Her bir formülasyon, önceden tanımlanmış kabul aralıklarına göre nitel olarak değerlendirilmiş ve bu değerlendirme sırasında parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel analiz sonuçları "uygun (++)", "kabul edilebilir (+)" ve "uygun değil (-)" şeklinde sınıflandırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, karşılaştırmalı bir karar matrisi yardımıyla yorumlanmış ve en dengeli performansı gösteren formülasyonlar optimum sistemler olarak seçilmiştir. BT yüklemesi sonrası partikül özelliklerinde meydana gelen değişimler ayrıca değerlendirilmiş ve yükleme sonrası nanopartikül özellikleri en az değişen sistemler tercih edilmiştir. Bu tez çalışmasında bu yaklaşımın kullanılmasındaki çalışmada amaç istatistiksel modelleme değil, deneysel tarama sonucu elde edilen nanopartikül özelliklerinin QbD yaklaşımı çerçevesinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2009; Yu, Amidon, Khan vd., 2014).

Bununla birlikte, QbD yaklaşımının temel ilkeleri doğrultusunda, formülasyon ve proses değişkenlerinin belirlenen CQA'lar üzerindeki etki düzeylerinin ve risk önceliklerinin daha ayrıntılı şekilde ortaya konulması önem taşımaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, değişken–çıktı ilişkileri nicel istatistiksel yöntemlerle modellenmemiş; QTPP ve CQA'lar arasındaki ilişki, karar matrisi üzerinden nitel olarak yorumlanmıştır. Özellikle sonikasyon süresi, yüzey aktif madde tipi ve konsantrasyonu ile polimer oranı gibi değişkenlerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkilerinin daha detaylı olarak incelenebilmesi için, ilerleyen çalışmalarda QTPP ve CQA parametrelerinin risk temelli puanlama yaklaşımlarıyla yapılandırılması ve uygun QbD programları ile desteklenen istatistiksel araştırmalar (DoE, regresyon ve yanıt yüzeyi metodolojileri gibi) kullanılarak değişkenlerin ana etkileri ve olası etkileşimlerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesi planlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında değerlendirilen QTTP ve CQA bilgileri sırasıyla Tablo 5.3 ve Tablo 5.4'te sunulmuştur. CQA için önemli parametreler olan parçacık boyutu, PDI,

zeta potansiyel ve BT yüklemesi sonrası değişim değerlendirmesi için karar matrisleri ve açıklamaları sırasıyla Tablo 5.5, Tablo 5.6, Tablo 5.7 ve Tablo 5.8'de verilmiştir.

Tablo 5.3.

Kalite Hedefli Ürün Profili (QTPP) Bilgileri

Hedef özellik	Gerekçe
200 nm altında boyut	Oküler uygulanabilirlik
Monodispers dağılım	Nanopartikül boyut kalitesi ve Oküler uygulanabilirlik
Uygun zeta potansiyel	Kolloidal stabilite
BT yüklemesi ardından nanopartikül özelliklerinde minimum değişim	Uygulanabilirlik

Tablo 5.4.

Kritik Kalite Özellikleri (CQA)

CQA	Kabul kriteri
Parçacık boyutu değeri	100–200 nm
PDI değeri	≤ 0.4 (tercihen ≤ 0.35)
Zeta potansiyel değeri	>15
BT yüklemesi ardından nanopartikül özelliklerinde	Minimum

Tablo 5.5.

Parçacık Boyutu Değerleri için Karar Matrisi

Parçacık boyutu değeri	Yorum	Matris sembolu
≤ 200 nm	Uygun / hedef aralık	++
200-250 nm	Kabul edilebilir	+
> 250 nm	Uygun değil	-

Tablo 5.6.

Polidispersite İndeksi (PDI) Değerleri için Karar Matrisi

PDI değeri	Yorum	Matris sembolu
≤ 0.300	Uygun / hedef aralık (Monodispers/dar dağılım)	++
0.300-0.400	Kabul edilebilir	+
> 0.400	Uygun değil (Heterojen/polidispers dağılım)	-

Tablo 5.7.

Zeta Potansiyel Değerleri için Karar Matrisi

Zeta potansiyel değeri	Yorum	Matris sembolu
≥ 20 mV	İyi kolloidal stabilite	++
15–20 mV	Orta / kabul edilebilir	+
< 15 mV	Zayıf stabilite / Uygun değil	-

Tablo 5.8.

BT Yüklemesi Sonrası Blank Formülasyona Göre Değişim Değerlendirmesi için Karar Matrisi

Blank formülasyona göre değişim	Yorum	Matris sembolu
Minimum seviyede değişti	Sistem kesin	++
Orta düzey değişim	Kabul edilebilir	+
Belirgin yüksek oranda değişim	Uygun değil	-

5.3.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi Çalışmaları

Nanopartikül formlasyonlarına BT yüklemesi, ‘’4.1.1. Brimonidin Tartarat için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında yapılan çalışmalar’’ bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile belirlenmiştir. ERS 100 bazlı nanopartikül formülasyonun BT içeriği doğrudan ilacın nanopartikül formülasyonundan ekstrakte edilmesi ile değerlendirilmiştir. Liyofilize nanopartikül 5 mg olacak şekilde hassas terazi ile tartılmış ardından üzerine 1 mL çözücü [aseton: su (1:1, *h/h*)] ilave edilmiş ve 5 dakika vortekslenerek nanopartiküllerin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Vorteksleme işlemi sonrası hazırlanan çözelti 0.22 μm membran filtre ile süzülmüş, gerekli seyreltmeler ardından BT miktar tayini için UV spektrofotometrede analiz edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) olarak ifade edilmiş ve literatüre göre hesaplanmıştır (Denklem 5.3.) (Öztürk, Banderas vd., 2019).

$$\%\, EE \;= \left(\frac{Enkapsüle\ edilen\ \ BT\ miktarı\ (mg)}{NP\ hazırlamada\ eklenen\ teorik\ BT\ miktarı\ (mg)}\right) \times 100 \tag{5.3}$$

İlaç yükleme kapasitesi (Drug Loading, %DL), enkapsüle edilen BT miktarının nanopartikülün toplam kütlesine oranı kullanılarak hesaplanmış ve Denklem 5.4. ile ifade edilmiştir:

$$\%\, DL \;= \left(\frac{Enkapsüle\ edilen\ BT\ miktarı\ (mg)}{Enkapsüle\ edilen\ BT\ miktarı\ (mg) + Polimer\ miktarı\ (mg)}\right) \times 100 \tag{5.4}$$

5.3.4. *In Vitro* Salım Çalışması

BT enkapsüle edilmiş nanopartiküllerin *in vitro* salım profilini belirlemek için 30 saatlik bir salım çalışması yapılmıştır. Nanopartikül formülasyonundan BT salımı diyaliz membran yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Öncelikle, 5 mg BT'e eşdeğer miktarda BT içeren liyofilize nanopartikül formülasyonu ve 5 mg saf BT, önceden STF, ile ıslatılmış diyaliz membran torbalarına (Selüloz diyaliz membranı, MWCO:14.000 Da; düz genişlik: 33 mm; D9652, Sigma-Aldrich) ayrı ayrı aktarılmış ve 2 mL STF ile tamamlanmıştır. İki ucu kapalı olan her diyaliz torbası daha sonra 37±1°C'de tutulan STF daldırılmış ve termostat kontrollü bir çalkalayıcıda 100 rpm'de karıştırılmıştır. Ortam buharlaşmasını en aza indirmek için, reseptör bölmeleri deney boyunca sıkıca kapatılmıştır. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 9. saat, 12. saat, 24. saat, 30. saat), salım ortamından 3 mL örnek çekilmiş ve hemen eşit hacimde taze, önceden ısıtılmış STF ortamlara eklenmiştir. Ardından numuneler gerekli seyreltmelerin ardından '5.1.2. Brimonidin Tartarat için STF ortamında validasyon çalışması' bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile analiz edilmiş ve sonuçlar % kümülatif çözünen miktar-zaman grafiğine dönüştürülmüştür. Tüm ölçümler her grup için üç kez yapılmış ve sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir.

5.3.5. Salım Kinetiği Çalışması

In vitro salım çalışmalarında elde edilen veriler ile DDSolver yazılım programı kullanılarak salım kinetikleri araştırılmıştır. Hesaplama süresini kısaltmak, hesaplama hatalarını ortadan kaldırmak ve uygun salım profili/kinetiklerin belirlemek için excel eklentisi olan DDSolver isimli bilgisayar programı kullanılmıştır. Dissolusyon profilleri elde edildikten sonra, en önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için veriler DDSolver programına aktarılamıştır. Bu kriterler korelasyon katsayısı (Rsqr, R^2 veya COD), düzeltilmiş korelasyon katsayısı (Rsqr_adj veya $R^2_{adjusted}$), Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Model Secim Kriteri (MSC)'dir. En yüksek R^2, $R^2_{adjusted}$ ve MSC değerleri ve en düşük AIC değerleri kinetik modelleri değerlendirmek için seçim kriteri olarak kullanılmış olup farklı istatistiksel parametrelerede dikkat edilmiştir (Zuo, Gao vd., 2014 ; Costa ve Lobo, 2001).

5.4 Katı Hal Karakterizasyonları

5.4.1. Termal (DSC) Analizler

Termal özellikler, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC, DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI) kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 5 mg numune, alüminyum kap içinde tartılmış, 50 $mL.dk^{-1}$ hızdaki hava akımı ve 10°$C.dk^{-1}$ ısıtma hızı altında 30°C ile 300°C sıcaklık aralığında analiz edilmiştir. V-BT-NP kodlu BT yüklü nanopartikül formülasyonunun analizine ek olarak, referans ve karşılaştırma açısından saf BT, saf ERS 100, V-Blank-NP kodlu formülasyon ve fiziksel karışım analiz edilmiştir.

5.4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometre Analizleri

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizleri FT-IR cihazı (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) ile 4000-500 cm^{-1} dalga boyu aralığında saf BT, saf ERS 100, V-Blank-NP kodlu formülasyon, BT yüklü V-BT-NP kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FT-IR cihazının sıcaklık kontrol mekanizmalı DLATGS dedektörü, dinamik hizalama sistemi ile donatılmış otomatik kurutuculu sızdırmaz Michelson interferometresi (30° geliş açısı) özellikleri bulunmaktadır. Analizler 0,5 cm^{-1} çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

5.5. Sterilizasyon ve Sterilite Kontrolü

5.5.1. Mikrobiyolojik Değerlendirme/ Sterilite Testi

Glokom tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonunun sterilizasyon yöntemi olarak aseptik filtrasyon tercih edilmiştir. Sterlizasyon sonrası mikrobiyolojik sterilite değerlendirmesi, membran filtrasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, farmasötik ürünlerin sterilite kontrolünde yaygın olarak kullanılan ve Amerikan Farmakopesi ile Avrupa Farmakopesi (Ph. Eur. 2.6.1) tarafından tanımlanan temel yaklaşımlardan biridir (European Pharmacopoeia Commission, 2023; United States Pharmacopeia [USP], 2024). Çalışmada hem BT içermeyen blank formülasyon (V-Blank-NP) hem de BT içeren V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonu analiz edilmiştir. Her bir numune aseptik koşullar altında, iki farklı por çapına sahip steril membran filtre kullanılarak filtrelenmiştir. Nanopartikülleri süzmek için kullanılan filtrelerin çapları 0,45 µm ve 0,20 µm olarak belirlenmiştir. Filtrasyon işlemi, steril filtrasyon düzeneğinde enjektör

yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Filtrasyon sonrası formüller, uygun besiyerlerine aktarılmıştır.

Filtrasyon sonrası mikrobiyal gelişimin değerlendirilmesi amacıyla iki farklı besiyeri kullanılmıştır. Sodyum Tiyoglikolatlı besiyeri (Thioglycollate Agar, TA), aerobik ve anaerobik bakterilerin tespiti için tercih edilmiştir (USP, 2024). Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ise maya ve küf gibi fungal mikroorganizmaların gelişimini desteklemek amacıyla kullanılmıştır (Cappuccino ve Sherman, 2005).

Filtrasyon sonrasında formüllerden 100 µL örnek alınarak bakteri ve mantarların üremesini gözlemlemek amaçlı uygun besiyerlerine yayma ekim yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Tiyoglikolatlı besiyerleri 30-35 °C, SDA plakları ise 20-25 °C sıcaklıkta 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca besiyerleri günlük olarak gözlemlenmiş; koloni gelişimi mikrobiyal üreme varlığı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar "üreme var" veya "üreme yok" şeklinde nitel olarak kaydedilmiştir (European Pharmacopoeia Commission, 2023).

5.6. Biyolojik Aktivite Testleri

5.6.1. R28 Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması, Deneylere Hazırlık ve Hücre Sayımları

R28 hücreleri, retinal hücre davranışlarının incelenmesi amacıyla farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılan ve iyi karakterize edilmiş bir hücre hattıdır. Farklılaşma, nöroproteksiyon, sitotoksisite, ışık stimülasyonu, retinal gen ekspresyonu ve nöronal fonksiyon gibi çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır. Tam bir göz dokusunu birebir yansıtmasa da, R28 hücreleri birçok retinal sürecin incelenmesi için önemli bir deneysel model olarak kabul edilmektedir (Seigel, 2014).

R28 retinal hücre hattı, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37 ° C'de, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) büyüme besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler flask tabanında %70-80 yoğunluğa ulaştığında hücreler pasajlanarak yeni flasklara aktarılmış veya sonraki deneylerde kullanılmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır.

Nanopartiküllerin serum proteinleri ile etkileşime girerek aglomerasyon veya çökelme göstermesini önlemek ve glutamat ile indüklenen eksitotoksik koşulları korumak

amacıyla, deneysel uygulamalarda kullanılan tüm nanopartikül konsantrasyonları %1 FBS içeren düşük glukozlu DMEM besiyeri içerisinde hazırlanmıştır.

Deneyler öncesinde, uygun hücre sayılarını belirlemek için Tripan mavisi çözeltisi ile hücreler boyanacak ve hücre sayım cihazı Cedex XS (Roche-Innovatis, Almanya) kullanılmıştır.

5.6.2. R28 Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonların ve tert-Bütil Hidroperoksit (tBHP) Test Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücre koruyucu aktivite deneylerinde, R28 hücre hattında brimonidin tartarat (BT), blank formülasyon (V-Blank-NP) ve BT-yüklü nanopartikül formülasyonunun (V-BT-NP) sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarının belirlenmesi ve reaktif oksijen türlerini indüklemek amacıyla kullanılacak tBHP test konsantrasyonunun saptanması için MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] testi uygulanmıştır. Bu test, boyanın yapısında bulunan tetrazolyum halkasının canlı hücrelerdeki sağlam mitokondrinin süksinat dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla yıkılması sonucunda oluşan formazan tuzunun kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Formazan tuzunun miktarı, hücre canlılığıyla doğru orantılıdır (Stockert vd., 2018).

Öncelikle R28 hücreleri büyüme besiyerlerinde çoğaltılmış ve 96-kuyucuklu plakalara her kuyucukta $1x10^4$ hücre olacak yoğunlukta ekilmiştir ve hücrelerin plaka tabanına yapışması amacıyla 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler, 400, 100, 10 ve 1 µg/ml tBHP, BT, V-Blank-NP ve V-BT-NP içeren konsantrasyon grupları ile 24 veya 48 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki mevcut besiyerleri atılarak 100 µL temiz besiyeri içerisinde 10 µL MTT (0,5 mg/ml) reaktifi kuyucuklara ilave edilmiştir. 3 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri atılarak her kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş ve 540 ve 570 nm dalga boyunda, Cytation 3 Multi-mode Reader cihazında (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri) her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Deneyler birbirinden bağımsız 2 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % hücre canlılık olarak belirlenmiştir (Kaya-Tilki vd., 2016) (Denklem 5.5).

$$\%\ Canlılık\ = \left(\frac{\text{Örneğin } absorbans\ değeri}{Kontrol\text{ün } absorbans\ değeri}\right) \times 100$$

(5.5)

5.6.3. tBHP ile İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Glokom patogenezinde retinal ganglion hücre kaybının temel mekanizmalarından biri oksidatif stres olup, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi mitokondriyal disfonksiyon, apoptotik yolakların aktivasyonu ve hücresel hasar ile ilişkilidir (Weinreb vd., 2014). tBHP, oksidatif stresi güçlü bir şekilde indükleyen ve hücre canlılığını anlamlı düzeyde azaltan bir ajandır. Bu nedenle, nanopartiküllerin hücre koruyucu etkilerini değerlendirmek amacıyla deney grupları: kontrol, tBHP kontrol ve hasar sonrası tedavi (post-treatment) grupları olarak oluşturulmuştur.

Deneylerde, 10^4 R28 hücresi 7,5 µM veya 75 µM tBHP içeren besiyeri ile 1 saat süreyle muamele edilerek oksidatif stres indüklenmiştir. tBHP maruziyetinin ardından, tBHP içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler taze besiyeri ile yıkanmıştır.

Hasar sonrası tedavi grubunda, oksidatif stres indüksiyonunu takiben hücreler sitotoksik olmadığı belirlenen nanopartikül konsantrasyonları (1 ve 10 µg/mL) ile inkübe edilmiştir. tBHP kontrol grubunda ise tBHP maruziyetini takiben herhangi bir tedavi uygulanmaksızın hücreler yalnızca taze besiyeri içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Tüm gruplar, hasar sonrası dönemde 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda hücre canlılığı daha önce tanımlandığı şekilde MTT testi ile değerlendirilmiştir (Yan vd., 2024).

5.6.4. Beta-III-Tubulin Gen Ekspresyonu Değişimlerinin qRT-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi

β-III-tubulin, tubulin protein ailesinin izoformlarından biridir. Tubulinler, memeli hücrelerinde sitoskeletonu oluşturan mikrotübüllerin bileşenleriyken, β-III-tubulin özellikle nöronlarda ifade edilir (Romero-Alemán et al., 2010). Retinada ise, β-III-tubulin, erken doğmuş hücre soyuna ait nöronlarda, özellikle retinal gangliyon hücreleri (RGC) bulunmuştur. R28 hücre hattında da eksprese edildiği daha önce gösterilmiştir (Taylor-Walker et al., 2016). Bu nedenle, formülasyonların R28 hücrelerinde, β-III-tubulin gen ekspresyonu üzerindeki etkileri qRT-PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

R28 hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk için 1 × 10^6 hücre yoğunluğunda ekilmiştir. Hücrelerde oksidatif stres oluşturmak amacıyla 7,5 µM tBHP uygulanmış ve 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından mevcut besiyeri uzaklaştırılarak, sitotoksik olmayan konsantrasyonları (10 ve 1 µg/ml) içeren taze besiyeri ile değiştirilmiş ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, hücrelerden toplam RNA, üretici firmanın protokolüne uygun olarak EcoPURE Total RNA Kit (EcoTech Biotechnology, Türkiye) kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen RNA'nın miktarı ve saflığı, 260 ve 280 nm dalga boylarında NanoDrop 2000 spektrofotometresi (Thermo Scientific, ABD) ile değerlendirilmiştir.

cDNA sentezi, üretici talimatları doğrultusunda Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (katalog no: 05091284001, Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri, LightCycler 480 RT-PCR cihazında (Roche, Almanya) gen ekspresyon analizleri için kullanılmış ve amplifikasyon işlemleri LightCycler 480 SYBR Green I Master (katalog no: 04707516001, Roche, Almanya) ile yürütülmüştür. PCR karışımları ve cDNA örnekleri 96 kuyucuklu plaklara yüklenmiş ve SYBR Green I analiz yöntemi için uygun sıcaklık protokolü uygulanmıştır. Gen ekspresyon düzeyleri, referans gen olarak kullanılan ACTB'ye göre normalize edilerek değerlendirilmiştir. (Kaya-Tilki ve Dikmen, 2021).

6. BULGULAR ve TARTIŞMA

6.1. Analitik Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları

6.1.1. Brimonidin Tartarat için Aseton: Su (1:1 *h/h*) Ortamında Validasyon Çalışması

6.1.1.1. Absorbans Belirleme

Aseton: su (1:1 *h/h*) karışımı içinde 25,0 µg.mL^{-1}, 50,0 µg.mL^{-1} ve 100,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış olan BT çözeltilerinin 322,0 nm'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil 6.1., Şekil 6.2. ve Şekil 6.3.'te sunulmuştur.

Şekil 6.1.

200-800 nm Arasında 25,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (Aseton:Su Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)



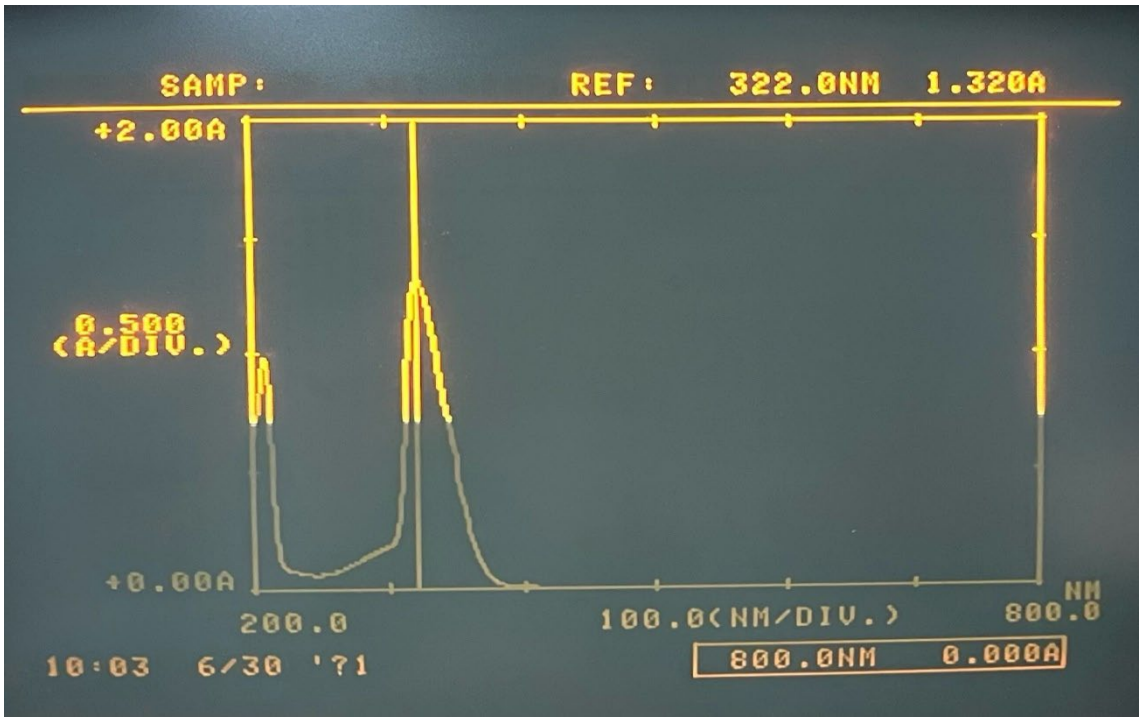
Şekil 6.2.

200-800 nm Arasında 50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (Aseton:Su Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)



Şekil 6.3.

200-800 nm Arasında 100,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (Aseton:Su Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)



6.1.1.2. Doğrusallık

BT'nin aseton: su (1:1 *h/h*) içinde 5,0-60,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonları aralığında yedi farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 322,0 nm'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 6.1.'de sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) Şekil 6.4.'de gösterilmiştir.

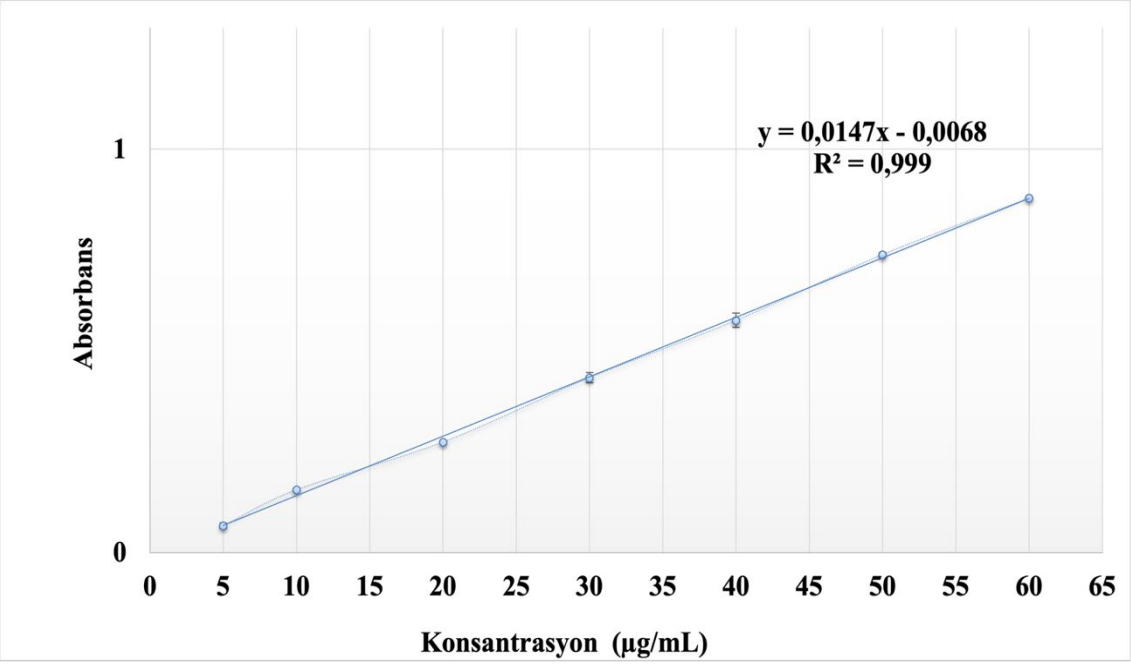
Tablo 6.1.

Doğrusallık Çalışması Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)

BT (µg.mL^{-1})	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
5.0	0.061	0.058	0.080	0.066	0.010	0.010
10.0	0.159	0.149	0.158	0.155	0.010	0.000
20.0	0.269	0.279	0.273	0.274	0.010	0.000
30.0	0.409	0.452	0.439	0.433	0.020	0.010
40.0	0.544	0.605	0.578	0.576	0.030	0.020
50.0	0.749	0.735	0.732	0.739	0.010	0.010
60.0	0.854	0.918	0.865	0.879	0.030	0.020

Şekil 6.4.

BT'nin Aseton: Su (1:1 h/h) Ortamında Standart Eğrisi



6.1.1.3. Kesinlik

BT için 10,0 µg.mL^{-1}, 30,0 µg.mL^{-1} ve 50,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonlarda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar analizi, 3 gün art arda yapılmıştır. Sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği analiz edilmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları 10,0 µg.mL^{-1}, 30,0 µg.mL^{-1} ve 50,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 6.2., Tablo 6.3. ve Tablo 6.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 6.2.

10,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)

	10 µg.mL^{-1} (Absorbans)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	0.137	0.138	0.142
	0.142	0.141	0.139
	0.140	0.143	0.141
	10 µg.mL^{-1} (Konsantrasyon)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	9.752	9.82	10.092
	10.092	10.024	9.888
	9.956	10.159	10.024
Ortalama	**9.993**	**10.001**	**10.001**
Standart Sapma	0.171	0.171	0.104
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	1.719	1.707	1.036
% 95 Güven Aralığı	0.424	0.424	0.257

Tablo 6.3.

30,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)

	30 µg.mL^{-1} (Absorbans)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	0.435	0.432	0.435
	0.442	0.436	0.441
	0.431	0.442	0.434
	30 µg.mL^{-1} (Konsantrasyon)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	29.968	29.765	29.968
	30.443	30.036	30.375
	29.697	30.443	29.900
Ortalama	**30.036**	**30.081**	**30.081**
Standart Sapma	0.378	0.341	0.257
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	1.258	1.135	0.854
% 95 Güven Aralığı	0.938	0.848	0.638

Tablo 6.4.

50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)

	50 µg.mL^{-1} (Absorbans)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	0.728	0.726	0.728
	0.729	0.724	0.746
	0.731	0.741	0.721
	50 µg.mL^{-1} (Konsantrasyon)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	49.845	49.709	49.845
	49.912	49.573	51.066
	50.048	50.727	49.370
Ortalama	**30.036**	**30.081**	**30.081**
Standart Sapma	49.935	50.003	50.093
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	0.104	0.630	0.875
% 95 Güven Aralığı	0.208	1.261	1.747

6.1.1.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (10,0 µg.mL^{-1}, 30,0 µg.mL^{-1}, 50,0 µg.mL^{-1}) BT içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında

‘y= 0,0147x – 0,0068’ olarak elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. BT için doğruluk çalışması sonuçları Tablo 6.5.’te sunulmuştur.

Tablo 6.5.

BT için Doğruluk Çalışması Sonuçları (Aseton:Su Ortamı)

	Konsantrasyon		
	10 µg.mL^{-1}	**30 µg.mL^{-1}**	**50 µg.mL^{-1}**
Elde Edilen Absorbanslar	0.141	0.434	0.731
	0.139	0.436	0.729
	0.138	0.433	0.728
Bulunan Konsantrasyonlar	10.024	29.900	50.048
	9.888	30.036	49.912
	9.820	29.832	49.845
% Geri Kazanım	100.237	99.667	100.096
	98.880	100.120	99.825
	98.202	99.441	99.689
Ortalama % Geri Kazanım	**99.106**	**99.743**	**99.870**
Standart Sapma	1.036	0.345	0.207
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	1.046	0.346	0.208
%95 Güven Aralığı	2.574	0.858	0.515

6.1.1.5. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,976 µg.mL^{-1} ve 2,958 µg.mL^{-1} olarak elde edilmiştir.

6.1.1.6. Seçicilik

Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre’den elde edilen spektrumlar BT, aseton: su (1:1 *h/h*) karışımı ve V-Blank-NP (Blank formülasyon) için sırasıyla Şekil 6.5., Şekil 6.6. ve Şekil 6.7.’de gösterilmiştir.

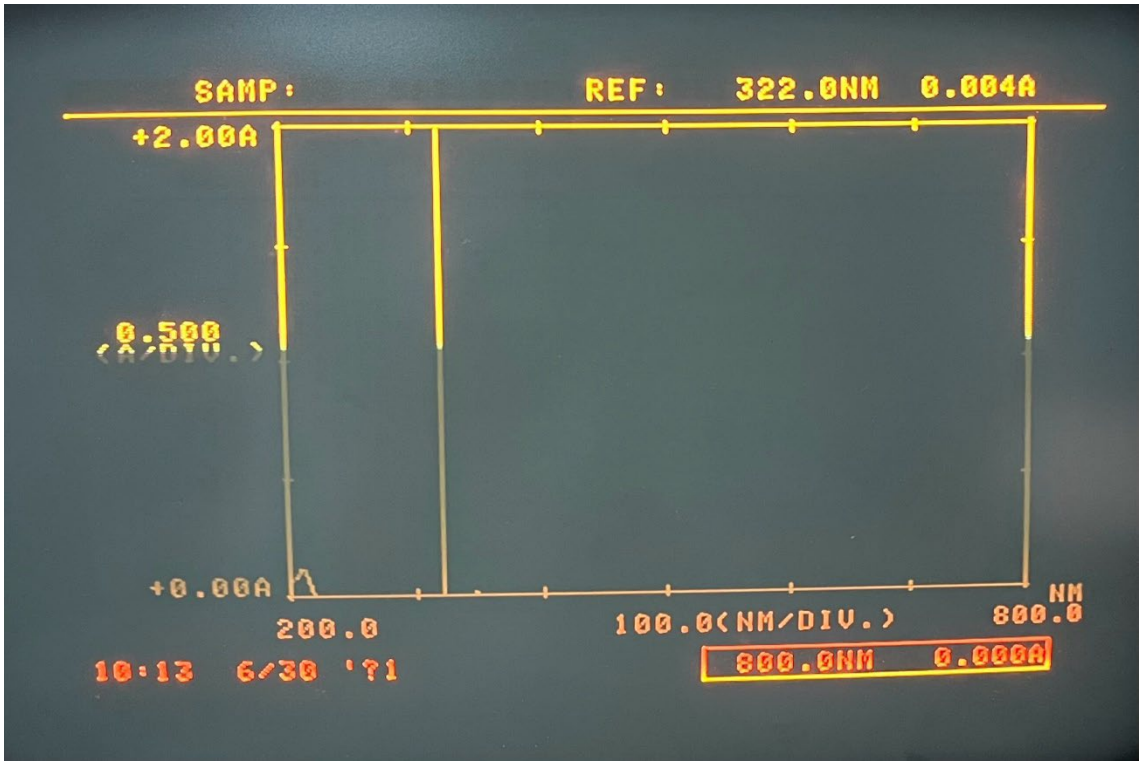
Şekil 6.5.

BT'ye ait Spektrum (25,0 µg.mL^{-1}, Aseton:Su Ortamı)



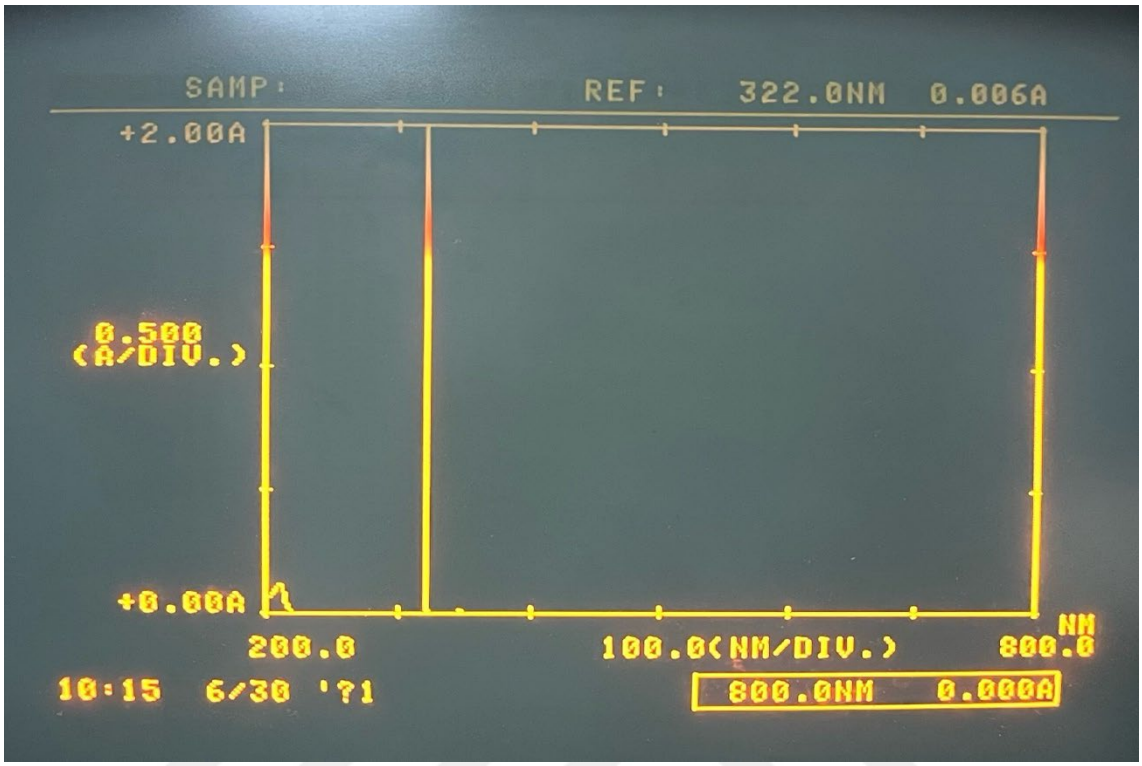
Şekil 6.6.

V-Blank-NP Kodlu Formülasyona ait Spektrum (Aseton:Su Ortamı)



Şekil 6.7.

Aseton:Su (1:1, h/h) Karışımına ait Spektrum (Aseton:Su Ortamı)



Nanopartikül sistemlerinde enkapsülasyon etkinliğinin doğru biçimde hesaplanabilmesi, etkin maddenin miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğine doğrudan bağlıdır. Bu nedenle, BT içeren formülasyonlarda %EE hesaplamalarına geçilmeden önce, BT'nin nicel analizine yönelik bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve yöntem performansı analitik geçerlilik açısından değerlendirilmiştir. Ölçümler, Shimadzu (Japonya) UV-160A model spektrofotometre kullanılarak, kuvars küvetler aracılığıyla gerçekleştirilmiş ve analiz dalga boyu olarak BT'nin maksimum absorbans verdiği 322,0 nm seçilmiştir. Literatürde UV spektrofotometrik yöntemlerin farmasötik analizlerde yaygın şekilde kullanıldığı; yöntemin özellikle hızlı, düşük maliyetli ve tekrarlanabilir sonuçlar sunması nedeniyle tercih edildiği bildirilmektedir. Ancak bu avantajların geçerli olabilmesi, geliştirilen yöntemin doğrusal yanıt, yeterli seçicilik ve kabul edilebilir doğruluk–kesinlik sınırları içerisinde çalıştığının gösterilmesini gerektirmektedir. Bu doğrultuda, çalışmada geliştirilen yöntem ICH kılavuzlarında tanımlanan temel analitik performans kriterleri çerçevesinde ele alınmıştır (Bhagav, Deshpande vd., 2010; Jain, Khatal ve Surana, 2011).

Doğrusallık değerlendirmesi için BT referans standardından hazırlanan stok çözelti kullanılmış ve 5,0–60,0 μg.mL^{-1} aralığında yedi farklı konsantrasyonda çalışma çözeltileri elde edilmiştir. Bu konsantrasyon aralığı, hem nanopartikül sistemlerinden beklenen BT miktarlarını kapsaması hem de cihaz yanıtının doğrusal davranış sergileyebileceği aralıkta yer alması nedeniyle tercih edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri üzerinden oluşturulan kalibrasyon eğrisi doğrultusunda regresyon denklemi y =0,0147x−0,0068 olarak hesaplanmış, korelasyon katsayısı (R^2) ise 0,9990 bulunmuştur (Bkz. Şekil 6.4.). Literatürde, UV temelli kantitatif analizlerde R^2 değerinin 0,990'ın üzerinde olması doğrusal yanıt için yeterli kabul edilmekte olup, elde edilen sonuç yöntemin yüksek doğrusal performans sergilediğini göstermektedir (Jain, Khatal ve Surana, 2011; Smerikarova, Bozhanov ve Marslarska, 2019).

Yöntemin seçiciliği, BT'nin spektral davranışı esas alınarak değerlendirilmiştir. BT çözeltisinin 200–800 nm aralığında taranması sonucunda maksimum absorbansın 322.0 nm'de oluştuğu belirlenmiş (Bkz. Şekil 6.1., 6.2. ve 6.3.); aynı dalga boyunda kullanılan çözücü sisteminin (Bkz. Şekil 6.7.) ve BT içermeyen V-Blank-NP kodlu boş nanopartikül formülasyonunun anlamlı bir absorbans göstermediği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 6.6.). Bu durum, ölçülen sinyalin yalnızca BT'ye ait olduğunu ve formülasyon bileşenlerinin analizi etkilemediğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde literatürde, analitik yöntemin matriks bileşenlerinden bağımsız sinyal üretmesi seçicilik açısından temel bir gereklilik olarak vurgulanmaktadır (Padilha, Azevedo, Miranda-Andrades vd., 2022; Singh ve Shinde, 2010).

Kesinlik çalışmaları, yöntemin tekrarlanabilirliğini ortaya koymak amacıyla farklı günlerde ve farklı konsantrasyon seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. 10.0, 30.0 ve 50.0 μg.mL^{-1} derişimlerinde yapılan ölçümlerde %RSD değerlerinin tüm günlerde %2'nin altında kalması, yöntemin hem kısa vadeli hem de günler arası analizlerde tutarlı sonuçlar üretebildiğini göstermektedir (Bkz. Tablo 6.2., Tablo 6.3. ve Tablo 6.4.). Literatürde UV spektrofotometrik yöntemler için %RSD'nin %2'nin altında olması, yeterli kesinlik göstergesi olarak kabul edilmektedir (Öztürk, Yenilmez vd., 2018; Priyadarsini ve Lahoti, 2022).

Doğruluk değerlendirmesi, geri kazanım çalışmaları üzerinden ele alınmıştır. Bilinen miktarda BT içeren çözeltiler üzerinde yapılan (10.0, 30.0 ve 50.0 μg.mL^{-1}) analizlerde

geri kazanım oranlarının %99–100 aralığında bulunması, geliştirilen yöntemin gerçek BT miktarını doğru şekilde yansıttığını ortaya koymaktadır (Bkz. Tablo 5.5.). Ayrıca hesaplanan tespit sınırı ve tayin sınırının (Bkz. 6.1.1.5. Duyarlılık), doğrusal aralıkta çalışılan en düşük konsantrasyonun altında olması, yöntemin düşük derişimlerde dahi yeterli duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir (Rubim, Rubenick vd., 2013; Çevikelli, Öztürk ve Güven, 2024; Öztürk, Yenilmez vd., 2018).

Tüm bu analitik performans göstergeleri birlikte değerlendirildiğinde, aseton:su (1:1, *h/h*) ortamında uygulanan UV spektrofotometrik yöntemin BT'nin miktar tayini için uygun, güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemin nanopartikül sistemlerinde enkapsülasyon etkinliği hesaplamalarında analitik dayanak olarak güvenle kullanılabileceğini göstermektedir (Padilha, Azevedo, Miranda-Andrades vd., 2022).

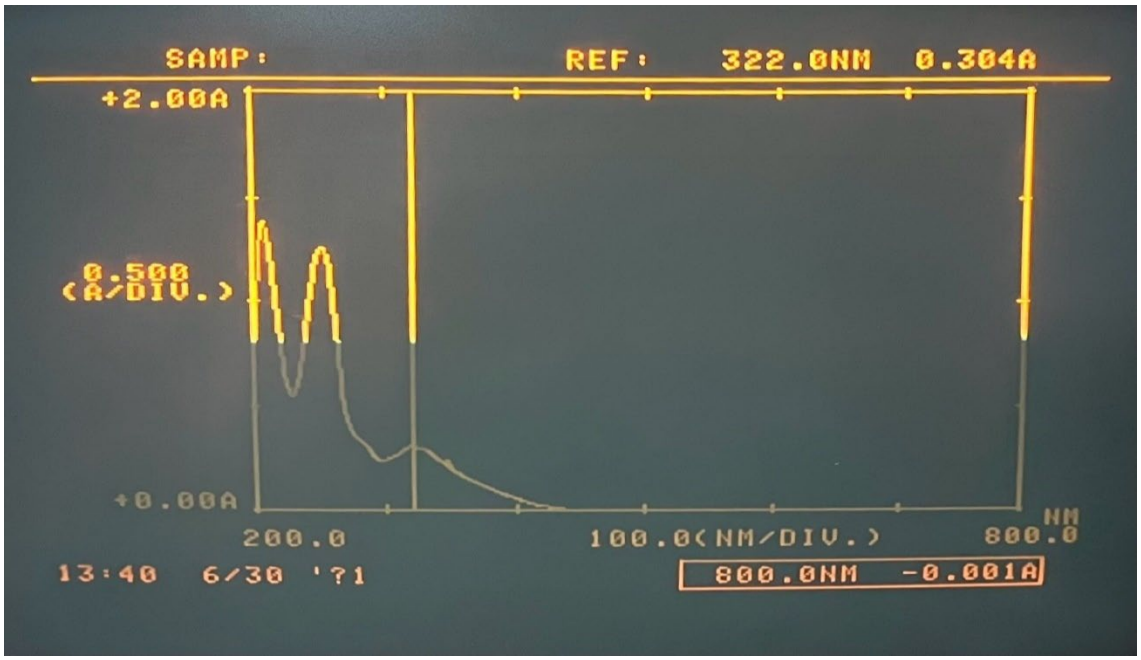
6.1.2. Brimonidin Tartarat için STF Ortamında Validasyon Çalışması

6.1.2.1. Absorbans Belirleme

STF (pH 7.4) karışımı içinde 25,0 µg.mL^{-1}, 50,0 µg.mL^{-1} ve 100,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış olan BT çözeltilerinin 322,0 nm'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil 6.8., Şekil 6.9. ve Şekil 6.10.'te sunulmuştur.

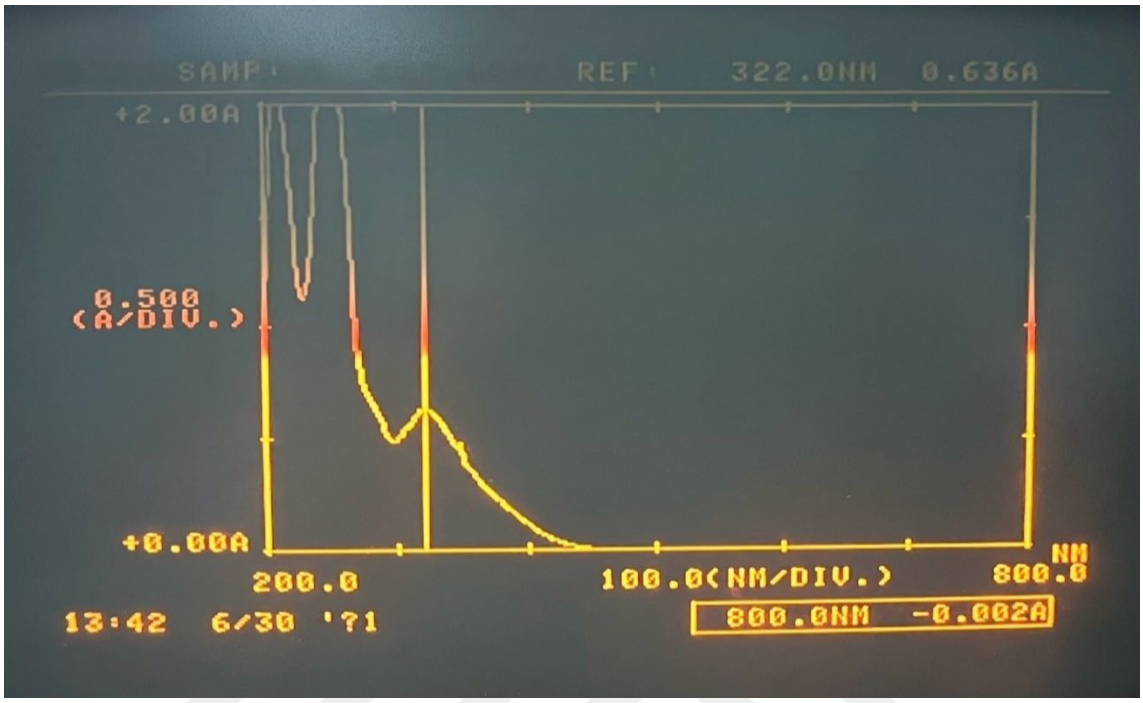
Şekil 6.8.

200-800 nm Arasında 25,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (STF Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)



Şekil 6.9.

200-800 nm Arasında 50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (STF Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)



Şekil 6.10.

200-800 nm Arasında 100,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyonda BT Çözeltisi için Elde Edilen Spektrum (STF Ortamı, λ_{max}=322,0 nm)



6.1.2.2. Doğrusallık

BT'nin STF ortamında 5,0-60,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonları aralığında yedi farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 322,0 nm'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 6.6.'da sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) Şekil 6.11.'de sunulmuştur.

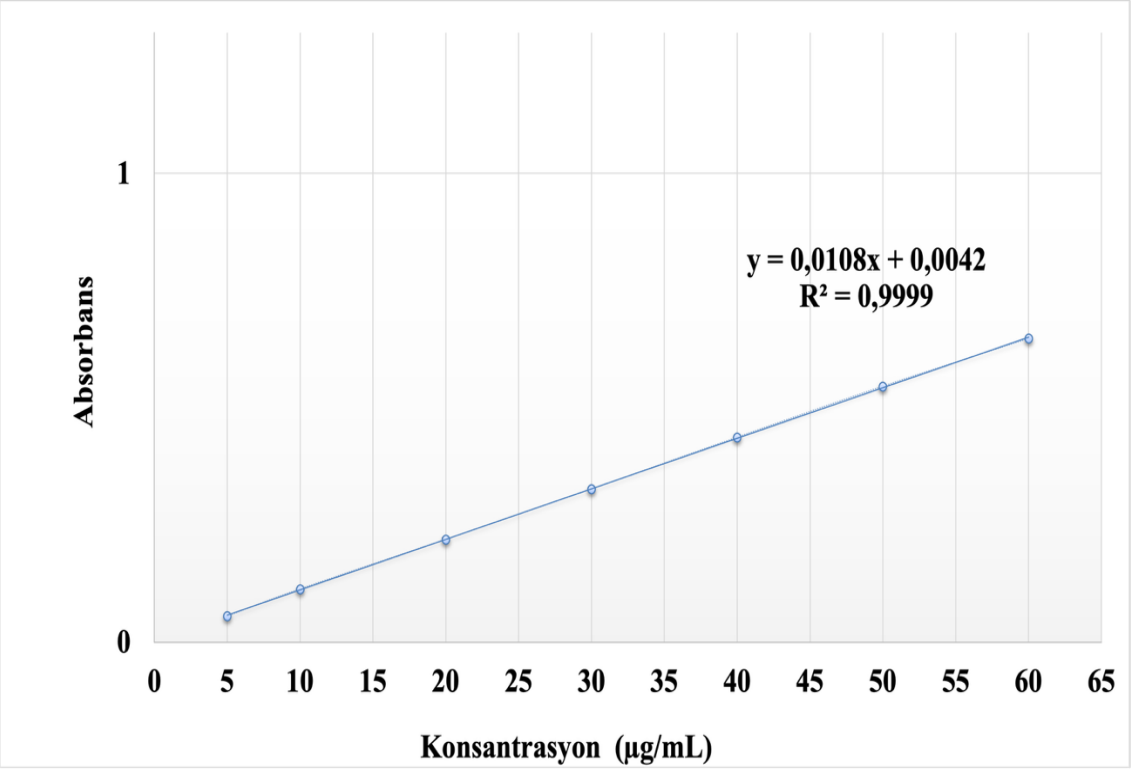
Tablo 6.6.

Doğrusallık Çalışması Sonuçları (STF Ortamı)

BT (µg.mL^{-1})	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
5.00	0.050	0.057	0.061	0.056	0.010	0.000
10.00	0.110	0.116	0.115	0.114	0.000	0.000
20.00	0.214	0.221	0.224	0.220	0.010	0.000
30.00	0.323	0.329	0.329	0.327	0.000	0.000
40.00	0.441	0.435	0.436	0.437	0.000	0.000
50.00	0.543	0.549	0.546	0.546	0.000	0.000
60.00	0.645	0.654	0.645	0.648	0.010	0.000

Şekil 6.11.

BT'nin STF Ortamında Standart Eğrisi



6.1.2.3. Kesinlik

BT için 10,0 µg.mL^{-1}, 30,0 µg.mL^{-1} ve 50,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar analizi, 3 gün artarda yapılmıştır. Analiz sonuçları doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları 10,0 µg.mL^{-1}, 30,0 µg.mL^{-1} ve 50,0 µg.mL^{-1} konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 6.7., Tablo 6.8. ve Tablo 6.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 6.7.

10,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (STF Ortamı)

	10 µg.mL^{-1} (Absorbans)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	0.113	0.113	0.112
	0.112	0.111	0.110
	0.111	0.109	0.114
	10 µg.mL^{-1} (Konsantrasyon)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	10.089	10.089	9.997
	9.997	9.904	9.811
	9.904	9.718	10.182
Ortalama	**9.997**	**9.904**	**9.997**
Standart Sapma	0.093	0.185	0.185
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	0.928	1.873	1.856
% 95 Güven Aralığı	0.230	0.461	0.461

Tablo 6.8.

30,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (STF Ortamı)

	30 µg.mL^{-1} (Absorbans)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	0.320	0.323	0.328
	0.332	0.329	0.329
	0.328	0.331	0.327
	30 µg.mL^{-1} (Konsantrasyon)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	29.288	29.566	30.030
	30.401	30.122	30.122
	30.030	30.308	29.937
Ortalama	**29.906**	**29.999**	**30.030**
Standart Sapma	0.567	0.386	0.093
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	1.895	1.287	0.309
% 95 Güven Aralığı	1.408	0.959	0.230

Tablo 6.9.

50,0 µg.mL^{-1} Konsantrasyon için Kesinlik Sonuçları (STF Ortamı)

	50 µg.mL^{-1} (Absorbans)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	0.536	0.543	0.543
	0.541	0.544	0.547
	0.550	0.539	0.540
	50 µg.mL^{-1} (Konsantrasyon)		
	1. Gün	**2. Gün**	**3. Gün**
	49.321	49.970	49.970
	49.785	50.063	50.341
	50.619	49.599	49.962
Ortalama	**49.908**	**49.877**	**50.001**
Standart Sapma	0.658	0.245	0.326
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	1.318	0.492	0.651
% 95 Güven Aralığı	1.635	0.610	0.809

6.1.2.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (10,0 µg.mL^{-1}, 30,0 µg.mL^{-1}, 50,0 µg.mL^{-1}) BT içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında

‘y=0,0108x+0,0042’ olarak elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. BT için doğruluk çalışması sonuçları Tablo 6.10.’da sunulmuştur.

Tablo 6.10.

BT için Doğruluk Çalışması Sonuçları (STF Ortamı)

	Konsantrasyon		
	10 µg.mL^{-1}	**30 µg.mL^{-1}**	**50 µg.mL^{-1}**
Elde Edilen Absorbanslar	0.113	0.326	0.538
	0.111	0.328	0.536
	0.111	0.325	0.549
Bulunan Konsantrasyonlar	10.089	29.844	49.506
	9.904	30.030	49.321
	9.904	29.751	50.527
% Geri Kazanım	100.894	99.481	99.013
	99.039	100.099	98.642
	99.039	99.172	101.053
Ortalama % Geri Kazanım	**99.657**	**99.584**	**99.569**
Standart Sapma	1.071	0.472	1.298
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	1.075	0.474	1.304
%95 Güven Aralığı	2.660	1.173	3.226

6.1.2.5. Duyarlılık

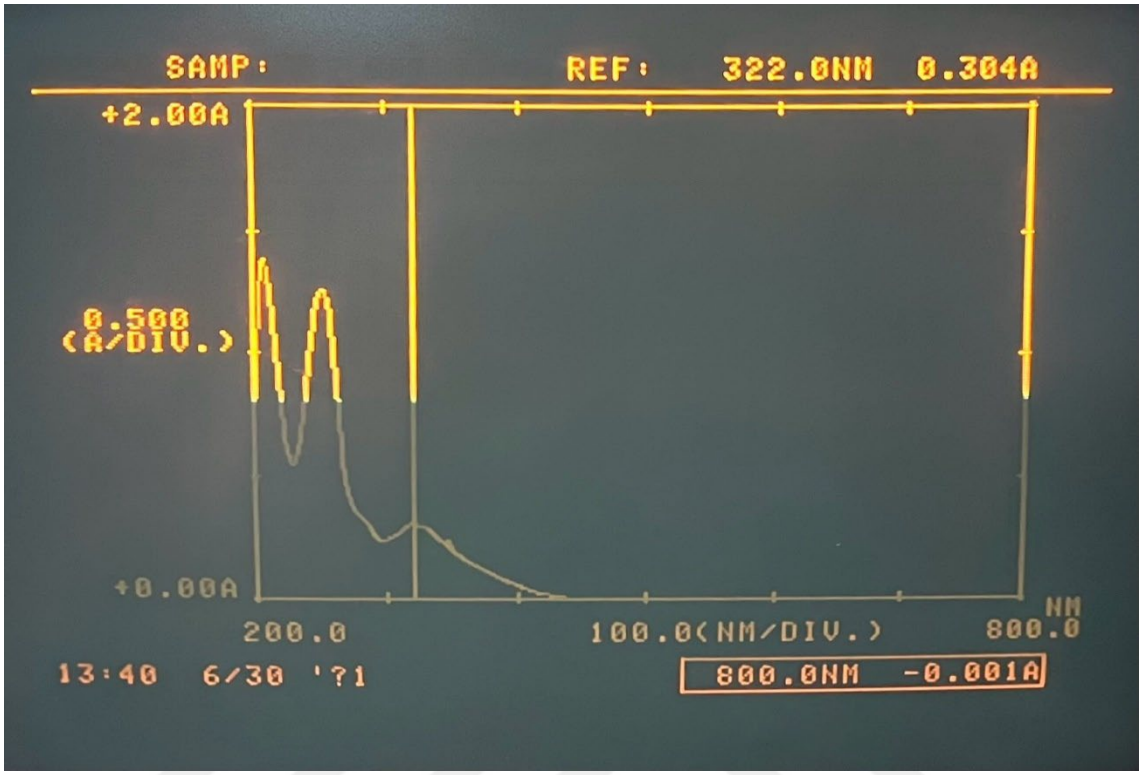
LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,334 µg.mL^{-1} ve 4,044 µg.mL^{-1} olarak elde edilmiştir.

6.1.2.6. Seçicilik

Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre’den elde edilen spektrumlar BT, STF ve V-Blank-NP (Blank formülasyon) için sırasıyla Şekil 6.12., Şekil 6.13. ve Şekil 6.14.’da gösterilmiştir.

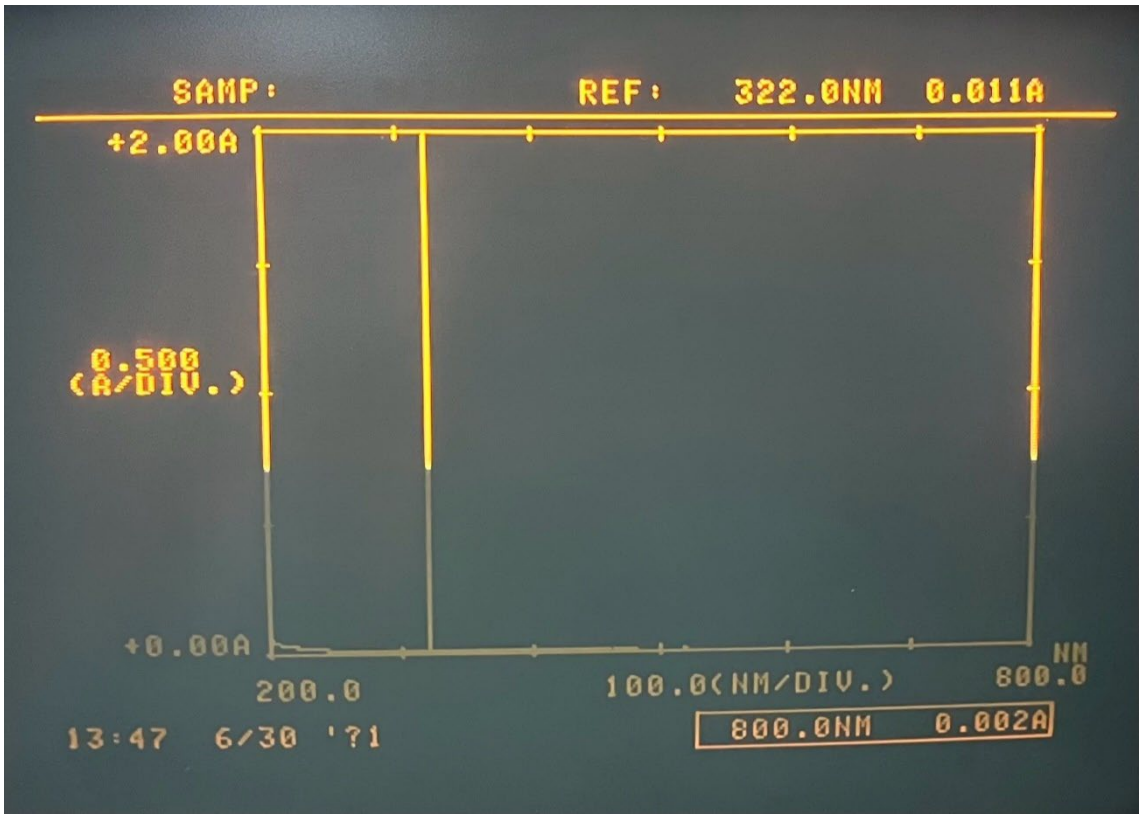
Şekil 6.12.

BT'e ait Spektrum (25,0 µg.mL^{-1}, STF Ortamı)



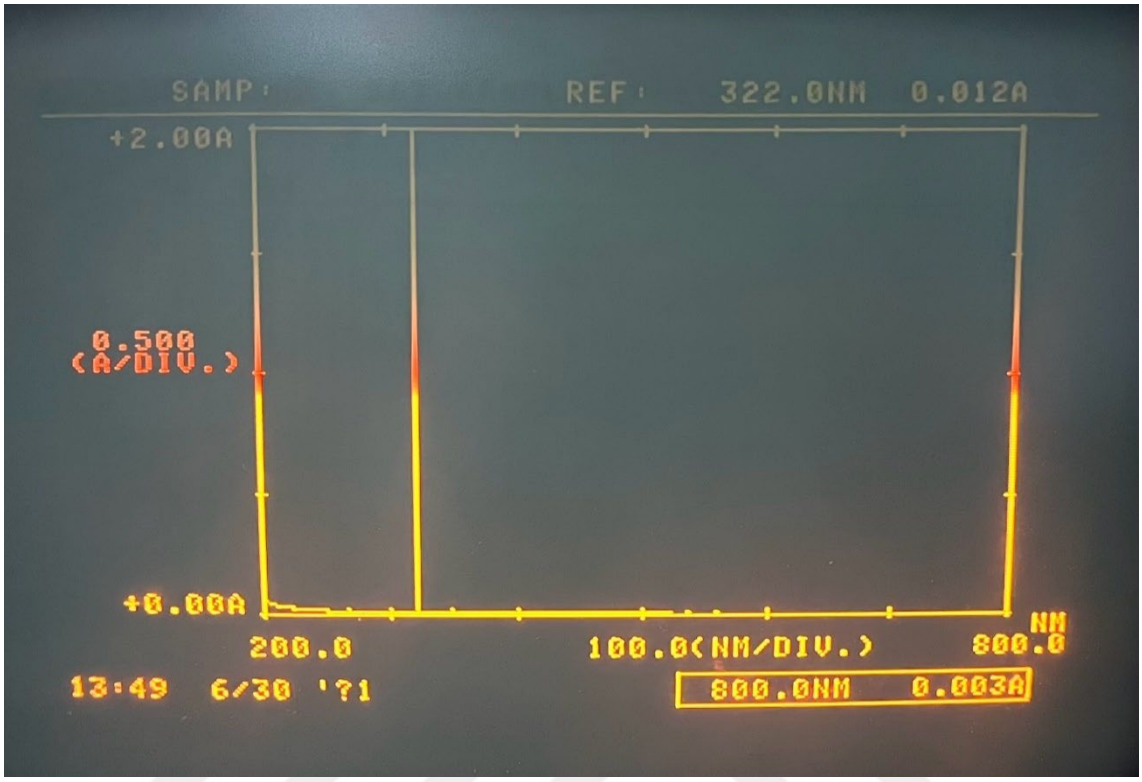
Şekil 6.13.

V-Blank-NP Kodlu Formülasyona ait Spektrum (STF Ortamı)



Şekil 6.14.

STF'e ait Spektrum (STF Ortamı)



In vitro salım çalışmalarında elde edilen verilerin güvenilirliği, salım ortamında etkin maddenin doğru, seçici ve tekrarlanabilir biçimde tayin edilebilmesine doğrudan bağlıdır. Bu nedenle, BT içeren nanopartikül sistemlerin salım profilleri değerlendirilmeden önce, STF ortamına özgü ve bu ortamda uygulanabilir bir UV spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiş ve analitik performansı sistematik olarak incelenmiştir. Ölçümler, Shimadzu (Japonya) UV-160A model spektrofotometre kullanılarak, kuvars küvetler aracılığıyla gerçekleştirilmiş ve analiz dalga boyu olarak BT'nin karakteristik absorbans maksimumu olan 322.0 nm tercih edilmiştir (Maharini, Martien, Nugroho vd., 2021; Singh ve Shinde, 2010).

BT çözeltisinin 60,0 µg.mL^{-1} derişiminde 200–800 nm aralığında taranması sonucunda maksimum absorbansın 322,0 nm'de oluştuğu belirlenmiş (Bkz. Şekil 6.8., 6.9 ve 6.10.); aynı dalga boyunda STF ortamının (Bkz. Şekil 6.14.) ve BT içermeyen V-Blank-NP kodlu boş nanopartikül formülasyonunun (Bkz. Şekil 6.13.) anlamlı bir absorbans göstermediği gözlenmiştir. Bu bulgu, geliştirilen yöntemin salım ortamı ve formülasyon matriksinden kaynaklanabilecek girişimlere karşı seçici olduğunu ve ölçülen sinyalin

yalnızca BT'ye ait olduğunu ortaya koymaktadır (Maharini, Martien, Nugroho vd., 2021; Singh ve Shinde, 2010).

Doğrusallık değerlendirmeleri için BT referans standardından hazırlanan stok çözelti STF ortamında hazırlanmış ve *in vitro* salım deneylerinde beklenen BT konsantrasyonlarını kapsayacak şekilde 5,0–60,0 $\mu g.mL^{-1}$ aralığında yedi farklı çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Bunların sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi için regresyon denklemi $y = 0,0108x + 0,0042$ olarak hesaplanmış ve korelasyon katsayısı (R^2) 0,9999 bulunmuştur (Bkz. Şekil 6.11.). UV temelli kantitatif analizlerde R^2 değerinin 0,990'ın üzerinde olmasının doğrusal yanıt için yeterli kabul edildiği göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen bu değer yöntemin STF ortamında yüksek doğrusal performans sergilediğini göstermektedir (Jain, Khatal ve Surana, 2011; Smerikarova, Bozhanov ve Marslarska, 2019).

Yöntemin tekrarlanabilirliği ve günler arası tutarlılığı, farklı konsantrasyon seviyelerinde gerçekleştirilen kesinlik çalışmaları ile değerlendirilmiştir. 10,0, 30,0 ve 50,0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ derişimlerinde yapılan analizlerde %RSD değerlerinin tüm günlerde %2 sınırının altında kalması (Bkz. Tablo 6.7., Tablo 6.8. ve Tablo 6.9.), yöntemin *in vitro* salım çalışmalarında uzun süreli ölçümler için yeterli kesinliğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Öztürk, Yenilmez vd., 2018; Priyadarsini ve Lahoti, 2022).

Doğruluk çalışmaları kapsamında BT içeren çözeltiler üzerinde yapılan (10,0, 30,0 ve 50,0 $\mu g.mL^{-1}$) analizlerde elde edilen geri kazanım oranlarının %99.5–99.7 aralığında bulunması, geliştirilen yöntemin STF ortamında BT miktarını doğru biçimde yansıttığını göstermektedir (Bkz. Tablo 6.10.). Ayrıca tespit ve tayin sınırlarının (Bkz. 6.1.2.5. Duyarlılık), doğrusal aralıkta test edilen en düşük konsantrasyonun altında olması, yöntemin düşük derişimlerde dahi salım miktarlarını güvenilir biçimde izleyebileceğini ortaya koymaktadır (Rubim, Rubenick vd., 2013; Çevikelli, Öztürk ve Güven, 2024; Öztürk, Yenilmez vd., 2018).

Tüm bu analitik değerlendirmeler birlikte ele alındığında, STF ortamında uygulanan UV spektrofotometrik yöntemin, BT içeren nanopartikül sistemlerin *in vitro* salım çalışmalarında etkin madde miktarının izlenmesi amacıyla uygun, güvenilir ve pratik bir analitik araç olduğu sonucuna varılmıştır (Maharini, Martien, Nugroho vd., 2021).

6.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

6.2.1. Parçacık Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel

Bu tez çalışmasında formüle edilen tüm blank ve BT yüklü nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel değerleri Tablo 6.11.'de sunulmuştur.

Tablo 6.11.

Formülasyonların Parçacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi (PDI) Değerleri

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm) (ortalama ± standart sapma)	Polidispersite İndeksi (PDI) (ortalama ± standart sapma)	Zeta Potansiyel (mV) (ortalama ± standart sapma)
M-Blank-NP	186.2 ± 2.6	0.211 ± 0.003	+ 8.5 ± 0.1
N-Blank-NP	117.4 ± 1.2	0.245 ± 0.023	+ 6.7 ± 0.1
R-Blank-NP	232.1 ± 1.3	0.189 ± 0.042	+ 16.7 ± 1.0
P-Blank-NP	132.2 ± 19.5	0.258 ± 0.003	+ 20.8 ± 0.6
P-BT-NP	218.8 ± 15.0	0.295 ± 0.085	+ 16.3 ± 1.2
S-Blank-NP	135.6 ± 2.1	0.375 ± 0.023	+ 25.1 ± 0.3
S-BT-NP	139.6 ± 23.7	0.455 ± 0.065	+ 19.4 ± 0.3
T-Blank-NP	178.2 ± 7.7	0.511 ± 0.017	+ 20.4 ± 0.6
T-BT-NP	211.1 ± 36.1	0.552 ± 0.032	+ 15.5 ± 0.3
U-Blank-NP	142.9 ± 8.7	0.374 ± 0.007	+ 16.3 ± 0.1
U-BT-NP	149.8 ± 9.7	0.442 ± 0.025	+ 11.6 ± 0.5
V-Blank-NP	177.7 ± 0.8	0.326 ± 0.032	+ 20.5 ± 0.2
V-BT-NP	180.2 ± 3.4	0.369 ± 0.031	+ 19.1 ± 0.6
Y-Blank-NP	189.1 ± 9.5	0.574 ± 0.018	+ 22.4 ± 0.7
Y-BT-NP	193.9 ± 2.0	0.445 ± 0.002	+ 16.7 ± 0.6
Z-Blank-NP	97.1 ± 9.6	0.399 ± 0.013	+ 17.8 ± 1.1
Z-BT-NP	143.3 ± 4.3	0.466 ± 0.019	+ 11.3 ± 0.4

Bu tez çalışmasında nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında, çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır ve hazırlanan ERS 100 bazlı sistemlerde yüzey etkin madde tipi/konsantrasyonu (PVA veya P-188), organik çözücü (metanol veya aseton), organik çözücüde Span 60 yokluğu / varlığı ve sonikasyon süresinin (30-120 sn) nanopartikül oluşumu ve kolloidal özellikler üzerindeki etkisi sistematik olarak değerlendirilmiştir. Tüm formülasyonlarda prob sonikasyon amplitüd değeri %60 olarak sabit tutulmuş, S_1 hacmi 200 µL ve S_2 hacmi 10 mL olarak kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında ele alınan bu yaklaşım ile çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemine

ait proses parametrelerinin etkisi incelenerek, nanopartikül oluşumunun özellikleri ve proses kaynaklı belirleyicileri ortaya koymayı sağlamıştır. (Öztürk, Ekinci vd., 2022; Bhagav, Chandran ve Upadhyay, 2011).

İlk formülasyon aşamasında Span 60 içermeyen formülasyonlarda (A-Blank-NP, B-Blank-NP, C-Blank-NP, D-Blank-NP, E-Blank-NP, F-Blank-NP, G-Blank-NP, H-Blank-NP, I-Blank-NP, J-Blank-NP, K-Blank-NP ve L-Blank-NP) nanopartikül yapısı gözlenememiştir ve bu sebeple parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel analizleri yapılmamıştır.

A-Blank-NP, B-Blank-NP, C-Blank-NP ve D-Blank-NP kodlu nanopartikül formülasyonlarında (PVA % 0.5 *a/h* veya % 1.0 *a/h*; metanol 3 mL; sonikasyon süresi 90-120 saniye) ayrıca E-Blank-NP, F-Blank-NP, G-Blank-NP ve H-Blank-NP kodlu formülasyonlarında (P-188 % 0.5 *a/h* veya % 1.0 *a/h*; metanol 3 mL; sonikasyon süresi 90-120 saniye) nanopartikül oluşumunun doğrulanamaması, $S_1/Y/S_2$ sistemde birinci emülsiyonun stabilizasyonunun bu koşullarda yetersiz kaldığını düşündürmüştür. Benzer biçimde I-Blank-NP ve J-Blank-NP kodlu formülasyonlarda (PVA % 1.0 *a/h*; aseton 3 mL; sonikasyon süresi 90-120 saniye) ayrıca K-Blank-NP ve L-Blank-NP kodlu formülasyonlarda (P-188 % 1.0 *a/h*; aseton 3 mL; sonikasyon süresi 90-120 saniye) Span 60 bulunmamasına bağlı olarak ölçülebilir, ayrık ve kolloidal olarak stabil bir nanopartikül formülasyonu elde edilememiştir. Elde edilen bu sonuçlar çözücünün aseton gibi daha uçucu bir çözücüye çevrilmesinin tek başına yeterli olmadığını, özellikle çift emülsiyon yapıda birincil emülsiyonun ara yüz stabilizasyonunun kritik bir "gerek koşul" olduğunu göstermektedir. (Murakami, Kobayashi vd., 1999; Sahoo, Panyam vd., 2002; Mainardes ve Evangelista, 2005).

Bu tez çalışmasında nanopartikül oluşumu açısından belirgin kırılma noktası, organik faza Span 60 eklenmesiyle ortaya çıkmıştır. Span 60, organik fazda (aseton içeren faz) kullanılmıştır. Düşük HLB değerine sahip lipofilik bir yüzey etkin madde olan Span 60'ın organik fazda bulunması, özellikle S_1/Y ara yüzeyinin stabilizasyonunda belirleyici rol oynamıştır. Span 60 içermeyen formülasyonlarda nanopartikül oluşumu gözlenmemiş olup buna karşılık Span 60 içeren formülasyonlarda S_1/Y emülsiyonunun stabil kalması, polimer zincirlerinin iç faz etrafında kontrollü şekilde organize olmasını sağlamış ve nanopartikül oluşumu ile sonuçlanmıştır. Span 60 içeren formülasyonlarda

(M-Blank-NP, N-Blank-NP, P-Blank-NP, R-Blank-NP, S-Blank-NP, T-Blank-NP, U-Blank-NP, V-Blank-NP, Y-Blank-NP ve Z-Blank-NP) nanopartiküllerin oluştuğu gözlenmiş ve partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır. Bu durumun Span 60'ın $S_1/Y/S_2$ sistemde özellikle S_1/Y ara yüzünde emülsiyon damlacıklarını stabilize ederek çözücü uzaklaştırma sürecinde polimerin kontrollü çekirdeklenmesine ve partikül ölçeğinde katılaşmasına katkı sağladığını düşündürebilir. Bu tez çalışmasında Span 60'ın organik faza eklenmesi bu sistemde nanopartikül oluşumu için başlatıcı bir parametre olarak değerlendirilmiştir. (Iqbal, Zafar vd., 2015; Tefas, Tomuţă vd., 2015).

Span 60 eklenen sistemlerde S_1 ve S_2 fazlardaki yüzey etkin madde tipi değiştirildiğinde nanopartikül özelliklerinde belirgin farklar ortaya çıkmıştır. Bu tez çalışmasında ilk olarak yüzey etkin madde olarak PVA kullanılmış ve formülasyonlara M ve N kodları verilmiştir. M-Blank-NP (PVA % 1.0 *a/h*; aseton 3 mL; Span 60 20 mg; sonikasyon süresi 90 saniye) kodlu formülasyonda parçacık boyutu 186.2 ± 2.6 nm, PDI değeri 0.211 ± 0.003 ve zeta potansiyel değeri +8.5 ± 0.1 mV olarak ölçülmüştür. N-Blank-NP (PVA % 1.0 *a/h*; aseton 3 mL; Span 60 20 mg; sonikasyon süresi 120 saniye) formülasyonunda ise parçacık boyutu değeri 117.4 ± 1.2 nm, PDI değeri 0.245 ± 0.023 ve zeta potansiyel değeri +6.7 ± 0.1 mV bulunmuştur. Elde edilen bu bulgular PVA'nın güçlü bir sterik yüzey etkin madde olarak PDI değerlerini düşük tutabildiğini, sonikasyon süresinin 90'dan 120 saniyeye uzatılmasının hidrodinamik boyutu belirgin şekilde azaltabildiğini; ancak zeta potansiyelin +10 mV'un altında kalmasının elektrostatik itmenin sınırlı olduğunu göstermektedir. Bu sebeple S_1 ve S_2 fazlarda PVA kullanılan nanopartikül formülasyonlarında dağılım görece dar olsa da zeta potansiyelin/yüzey yükünün düşük olması, uzun süreli kolloidal stabilitenin daha çok sterik bariyere bağımlı kalabileceğini düşündürmüştür (Sahoo, Panyam vd., 2002; Mainardes ve Evangelista, 2004; Honary ve Zahir, 2013).

S_1 ve S_2 fazlarda P-188 kullanılan Span 60'lı formülasyonlar, yüzey yükü ve dağılım açısından daha geniş bir aralık göstermiş ve derişim-sonikasyon kombinasyonunun kritik olduğu anlaşılmıştır. 120 saniye prob sonikasyon uygulanan R-Blank-NP (P-188 % 1.0 *a/h*; aseton; Span 60) kodlu formülasyonda parçacık boyutu değeri 232.1 ± 1.3 nm, PDI değeri 0.189 ± 0.042 ve zeta poatnsiyel değeri +16.7 ± 1.0 mV olarak ölçülmüştür. Bu formülasyonda PDI nispeten düşük olmasına karşın boyutun 200 nm

üzerine çıkması, 120 saniye olarak uygulanan prob sonikasyon ile yüksek enerji girdisinin bazı koşullarda yeniden-aglomerasyon/büyüme mekanizmalarını tetikleyebileceği veya sistemin daha büyük parçacık boyutuna sahip fakat nispeten daha tekdüze bir popülasyona kayabileceği şeklinde yorumlanabilir. Buna karşılık 90 saniye sonikasyon uygulanan P-Blank-NP (P-188 % 1.0 *a/h*) formülasyonunda parçacık boyutu değeri 132.2 ± 19.5 nm, PDI değeri 0.258 ± 0.003 ve zeta potansiyel değeri +20.8 ± 0.6 mV bulunmuştur. P-Blank-NP kodlu formülasyona PDI iyi düzeyde olmakla birlikte parçacık boyutu standard sapmasının yüksek oluşu, sistemin ölçüm/parti bazında heterojenliğe veya metastabil/polidespers dağılıma yatkın olabileceğini düşündürmüş; optimum seçimde yalnızca ortalama değerlere değil, varyasyonun büyüklüğüne de dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. (Jafari, Assadpoor vd., 2008; Schubert ve Müller-Goymann, 2003; Danaei, Dehghankhold, Ataei vd., 2018).

P-188 derişiminin 60 saniye sonikasyon koşulunda etkisi çok belirgin şekilde izlenmiştir. P-188'i %0.5 *a/h* oranında içeren V-Blank-NP (aseton; Span 60; sonikasyon süresi 60 saniye) kodlu formülasyonda parçacık boyutu değeri 177.7 ± 0.8 nm, PDI değeri 0.326 ± 0.032 ve zeta potansiyel değeri +20.5 ± 0.2 mV olarak ölçülmüştür. Aynı sonikasyon süresinde P-188'i %1.0 *a/h* oranında içeren T-Blank-NP kodlu formülasyonda parçacık boyutu değeri 178.2 ± 7.7 nm iken PDI değeri 0.511 ± 0.017'ye yükselmiş, zeta potansiyel değeri +20.4 ± 0.6 mV olarak bulunmuştur. Bu durum, P-188 derişiminin %1.0 *a/h* konsantrasyona çıkarılmasının boyut ortalamasını belirgin değiştirmeden dağılımı genişlettiğini ve sistemde sekonder agregasyon olasılığını artırdığını düşündürmektedir. P-188'i %1.5 *a/h* oranında içeren Z-Blank-NP kodlu formülasyona ise parçacık boyutu değeri 97.1 ± 9.6 nm'e düşmüş ve PDI değeri 0.399 ± 0.013 ve zeta potansiyel değeri +17.8 ± 1.1 mV olarak ölçülmüştür. Boyutun çok küçülmesine karşın PDI'nin yüksek kalması, DLS ölçümünde çok parçalı dağılım olasılığını veya küçük partikül fraksiyonunun ölçümü baskınlaştırdığı bir senaryoyu akla getirmektedir. Bu üçlü karşılaştırma, P-188 için yüksek derişim mutlaka daha iyi stabilizasyon sağlayabilir yaklaşımının bu set formülasyon için geçerli olmadığını; optimumluğun derişim ve enerji girdisiyle birlikte oluştuğunu göstermektedir. (Rosaini, Rivai, Octavia vd., 2021; Aldayel, Badran, Alomrani vd., 2023; Cortés, Hernández-Parra, Bernal-Chávez vd., 2021; Pandita, Ahuja, Lather vd., 2011).

Sonikasyon süresi etkisi, özellikle kısa süreli uygulandığında parçacık boyut dağılımının belirgin şekilde yükselmesini beraberinde getirmiştir. 30 saniye sonikasyon uygulanan Y-Blank-NP (P-188 % 1.0 *a/h*; aseton, Span 60) kodlu formülasyonda parçacık boyutu 189.1 ± 9.5 nm, PDI değeri 0.574 ± 0.018 ve zeta potansiyel değeri +22.4 ± 0.7 mV olarak saptanmıştır. Yüksek PDI değeri, bu sürede emülsifikasyon enerjisinin yetersiz kaldığını, damlacık kırılmasının tam gerçekleşmediğini ve heterojen bir popülasyon oluştuğunu göstermektedir. Buna karşılık 60 saniye prob sonikasyon uygulanan V-Blank-NP kodlu formülasyonda PDI değerinin 0.326 ± 0.032 seviyesinde kalması, bu sürenin damlacık oluşumu ve stabilizasyon arasında daha dengeli bir optimum süre/enerji sağladığını düşündürmüştür. 90 sn ve 120 sn gibi daha uzun sürelerde ise bazı formülasyonlarda PDI iyileşmekle birlikte boyut büyümesi veya standard sapma artışı gibi parametreler, enerji artışı/ısıl etki/çarpışma frekansı dengesinin sistemden sisteme değişebileceğini dolayısıyla optimumun proses koşullarının tek bir süreyle değil, kompozisyonla birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. (Teng, He, Xu vd., 2020; Sinsuebpol ve Changsan, 2020; Owodeha-Ashaka, Ilomuanya ve Iyire, 2021; Adrover, Varani, Paolicelli vd., 2018).

Bu tez çalışmasında elde edilen bu veriler doğrultusunda en optimum olabilecek blank formülasyonlar P-Blank-NP, S-Blank-NP, T-Blank-NP, U-Blank-NP, V-Blank-NP, Y-Blank-NP ve Z-Blank-NP olarak belirlenmiş ve ilgili blank formülasyon oranları ile BT yüklü formülasyonlar hazırlanmıştır. BT yüklemenin nanopartikül özellikleri üzerindeki etkisi, eşleştirilmiş formülasyonlar üzerinden karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Genel eğilim, BT yüklemesiyle partikül boyutunda ve PDI'de artış, ZP değerinde ise azalma gözlenmiştir. P-Blank-NP ile P-BT-NP karşılaştırıldığında parçacık boyutu 132.2 ± 19.5 nm'den 218.8 ± 15.0 nm'ye yükselmiş, PDI değeri 0.258 ± 0.003'ten 0.295 ± 0.085'e yükselmiş ve zeta potansiyel değeri +20.8 ± 0.6 mV'dan +16.3 ± 1.2 mV'a düşmüştür. Benzer şekilde S-Blank-NP (135.6 ± 2.1 nm; 0.375 ± 0.023; +25.1 ± 0.3 mV) ile S-BT-NP (139.6 ± 23.7 nm; 0.455 ± 0.065; +19.4 ± 0.3 mV) karşılaştırıldığında dağılımın genişlediği ve yüzey yükünün azaldığı görülmektedir. T serisinde zaten yüksek olan PDI değerinin (T-Blank-NP: 0.511 ± 0.017) BT yüklemesiyle daha da yükselmesi (T-BT-NP: 0.552 ± 0.032) yüklemenin heterojenliği artırabildiğini göstermektedir. Z serisinde BT yüklemesi sonrası parçacık boyutunun 97.1 ± 9.6 nm'den 143.3 ± 4.3 nm'e çıkması ve zeta potansiyel değerinin +17.8 ± 1.1 mV'dan +11.3 ± 0.4 mV'a düşmesi,

etkin maddenin yüzey/yük dengesini değiştirdiğini desteklemektedir. Bu davranış, BT'nin hidrofilik/iyonik karakteri nedeniyle emülsiyon içi yerleşiminin ve polimer–yüzey etkin madde diziliminin değişmesiyle ilişkilendirilebilir. (Crucho ve Barros, 2017; Yenilmez, 2017; Danhier vd., 2012).

Bununla birlikte BT yüklemesi sonrası en sağlam ya da kararlı davranış V kodlu seride elde edilmiştir. V-Blank-NP (P-188 % 0.5 *a/h*; aseton; Span 60; sonikasyon süresi 60 saniye) kodlu formülasyonda parçacık boyutu değeri 177.7 ± 0.8 nm, PDI değeri 0.326 ± 0.032 ve zeta potansiyel değeri +20.5 ± 0.2 mV iken; V-BT-NP kodlu formülasyonda parçacık boyutu değeri 180.2 ± 3.4 nm, PDI değeri 0.369 ± 0.031 ve zeta potansiyel değeri +19.1 ± 0.6 mV olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda V kodlu nanopartikül setinde BT yüklemesiyle parçacık boyutunun yalnızca minimal düzeyde arttığını, PDI değerinin kontrollü biçimde yükseldiğini ve yüzey yükünün stabiliteyi destekleyecek aralıkta korunduğunu göstermektedir. Dolayısıyla V formülasyonu, etkin madde yüklenmesi sonrası dahi partikül boyutu-dağılım-zeta potansiyel dengesini en iyi koruyan sistem olarak öne çıkmıştır. Bu nedenle V-Blank-NP ve V-BT-NP, hem blank hem de BT yüklü sistemde tekrarlanabilirlik (düşük SD), kabul edilebilir PDI ve yeterli zeta potansiyel sağlaması nedeniyle optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir ve bu tez çalışması için diğer karakterizasyon ve analizler V-Blank-NP ve V-BT-NP kodlu formülasyonlar üzerinden yürütülmüştür. (Crucho ve Barros, 2017; Danhier vd., 2012; Hasan, 2012; Tefas, Tomuţă vd., 2015).

Bu optimum formülasyon seçimi seçimi QbD yaklaşımıyla değerlendirilmiştir. Hedef ürün profili (QTPP) kapsamında nanopartikül boyutunun yaklaşık 100–200 nm aralığında olması, dağılımın mümkün olduğunca dar tutulması (PDI ≤ 0.4; tercihen ≤ 0.35), zeta potansiyelin kolloidal stabiliteyi destekleyecek düzeyde kalması (|ZP| ≥ 15 mV) ve etkin madde yüklenmesi sonrası sistemin özellikleri koruması kritik kalite özellikleri (CQA) olarak tanımlanmıştır. Bu CQA'lar açısından değerlendirildiğinde PVA bazlı sistemler (M ve N) düşük PDI sağlasa da düşük zeta potansiyel değerleri nedeniyle elektrostatik stabilite yönünden sınırlı kalmaktadır. P-188 % 1.0 *a/h* ve kısa sonikasyonlu sistemler (T ve Y) yüksek PDI nedeniyle heterojenlik göstermekte; P-188 % 1.5 *a/h* içeren Z serisinde boyut küçülse bile PDI yüksekliği heterojenlik olasılığını göstermiştir. 120 sn sonikasyon uygulanan R serisi düşük PDI değeri verse de boyutun 232 nm seviyesine çıkması hedef aralık açısından dezavantaj oluşturabilmektedir. Bu

karşılaştırmalar içinde V serisi, boyutun hedef aralıkta kalması, PDI'nin kontrol edilebilir düzeyde olması, zeta potansiyel değerinin +19–21 mV bandında stabiliteyi desteklemesi ve BT yüklenmesi sonrası parametrelerdeki değişimin minimal olması nedeniyle CQA'ların birlikte optimize edildiği sistem olarak seçilmiştir (Bastogne, 2017; Danaei, Dehghankhold, Ataei vd., 2018; Tefas, Tomuţă vd., 2015; Yenilmez, 2017). Karar matrisi sonuç tablosu Tablo 6.12.'de sunulmuştur.

Tablo 6.12.

Optimum Formülasyon Seçiminde Uygulanan Karar Matrisi Sonuç Tablosu

Formülasyon seti	Parçacık boyutu	PDI	Zeta potansiyel	BT yüklemesi sonrası NP özelliklerinde değişim	Değerlendirme
M/N	+	++	-	-	Zayıf zeta poansiyel
P	+	++	+	-	SD yüksek
R	-	++	+	-	Büyük boyut
T/Y	-	-	+	-	Heterojen
Z	+	-	+	-	Çoklu popülasyon
V	++	++	+	++	Optimum formülasyon

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, ERS 100 bazlı nanopartiküllerin çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmasında nanopartikül oluşumunun yalnızca polimer ve sonikasyonla açıklanamayacağını; özellikle Span 60 varlığıyla emülsiyon stabilizasyonunun sağlanmasının ve P-188 derişimi ile sonikasyon süresinin birlikte optimize edilmesinin belirleyici olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler, P-188 %0.5 (*a/h*) ve 60 saniye sonikasyon süresi kombinasyonunun (V kodlu formülasyonlar) hem blank hem de BT yüklü sistemde boyut-dağılım-zeta potansiyel parametreleri açısından en dengeli performansı verdiğini ve etkin madde yüklenmesi sonrasında dahi yapısal özellikleri koruduğunu ortaya koymuştur; bu nedenle V-Blank-NP ve V-BT-NP optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir.

QbD yaklaşımının dışında sonuçlar literatüre göre de değerlendirilmiştir. BT yüklü formülasyonların parçacık boyutlarının blank formülasyonlara göre daha büyük olduğu sonucu elde edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar da bu gözlemi desteklemekte, etkin madde içeren nanopartiküllerin blank olanlara kıyasla genellikle daha yüksek

parçacık boyutu sergileyebileceğini bildirmektedir. Bunun nedeni, polimerlerin etkin maddeyi kapsülleyerek nanopartikül yapısını oluşturması ve bu süreçte partikül boyutunda artışa neden olması şeklinde açıklanmaktadır (Yenilmez, 2017; Hariharan, Murali, Roy vd., 2025; Varan ve Bilensoy, 2017).

Nanopartiküllerin parçacık boyutu, glokom tedavisinde ilacın korneal bariyerden geçişini belirleyen temel faktörlerden biridir. Yapılan çalışmalarda 200 nm'den daha küçük boyutlara sahip nanosistemlerin kornea yoluyla permeasyonu artırdığı ve ön kamara sıvısında daha yüksek ilaç seviyeleri sağladığı bildirilmiştir. Benzer şekilde yaklaşık 250 nm civarındaki partiküllerin korneal epitel hücreleri tarafından endositoz yoluyla alındığı ve göz dokularında etkinliğin yükseldiği rapor edilmiştir. Ayrıca 150 nm'ye yakın boyutların, partiküllerin korneada daha uzun süre tutulmasını ve ilacın intraoküler biyoyararlanımını artırdığını gösteren bulgular da mevcuttur. Sonuç olarak, literatürde 100–200 nm aralığında elde edilen nanopartiküllerin korneal geçirgenliği artırdığı, oküler dokularda daha uzun süre tutulduğu ve glokom tedavisinde etkinliği belirgin şekilde yükselttiği rapor edilmiştir (Janagam, Wu ve Lowe, 2017; Azadi ve David, 2024; Ban, Zhang, Huang vd., 2017). Bu sebeple V-BT-NP kodlu formülasyon optimum formülasyon olarak seçilmesi uygundur.

PDI değerlerinin nanopartiküllerin monodispersliğini gösteren önemli bir parametre olduğu ve optimum değerin 0.3'ün altında olması gerektiği, fakat literatürde 0.5'in altındaki değerlerin de kabul edilebilir aralıkta bulunduğu ifade edilmektedir (Hughes vd., 2015; Danaei, Dehghankhold, Ataei vd., 2018). Bu bilgiler ışığında, hazırlanan tüm ERS 100 bazlı nanopartiküllerin uygun kaliteye ve monodispers özelliklere sahip olduğu sonucuna varılabilir fakat QbD yaklaşımıyla beraber en optimum formülasyonun V-BT-NP olduğu söylenebilir. (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2009; Pielenhofer, Meiser, Gogoll vd., 2023; Hidayat, Wardhana, Suwendar vd., 2025; Rampado ve Peer, 2023).

Zeta potansiyel, nanoformülasyonların kararlılığını ve biyolojik sistemlerle etkileşimini belirleyen temel parametrelerden biridir. Mutlak değeri ±30 mV'un üzerinde olan zeta potansiyeli değerleri, partiküller arasında güçlü elektrostatik itme kuvveti oluşturarak sistemin elektrostatik olarak kararlı kalmasını sağlar. Zeta potansiyel değeri ≤ 30 mV olan parçacıkların sterik olarak stabilize edilebileceğini belirtmek gerekir. Literatürde,

pozitif yüzey yüküne sahip nanosistemlerin, negatif yüklü korneal mukus tabakasıyla elektrostatik etkileşimi artırarak göz yüzeyinde daha uzun süre kaldığı ve bunun sonucunda intraoküler biyoyararlanımı yükselttiği belirtilmektedir (Onugwu vd., 2023; Mohanraj ve Chen; 2006). Bu bilgiye göre optimum olarak seçilen V-BT-NP kodlu formülasyonun 19.1 ± 0.6 mV olarak elde edilen zeta potansiyel değeri, literatürde bildirilen aralıkla uyumlu olup pozitif yükü sayesinde sistemin kararlı olabileceğini desteklemektedir (Hasan, 2012; Karami ve Abdouss, 2024; Souza, Saez ve Mansur, 2023; Yenilmez, 2017).

6.3. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi

Bu tez çalışmasında BT yüklü nanopartiküllerin % EE ve % DL sırasıyla % 47.6 ± 3.4 (Ortalama ± SS) ve % 4.5 olarak hesaplanmıştır. BT'nin küçük molekül ağırlığına sahip, hidrofilik ve iyonik bir etkin madde olması dikkate alındığında, S1/Y/S2 temelli çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde BT'nin iç su fazından dış faza difüzyon eğiliminde olduğu söylenebilir. Literatür incelendiğinde benzer yöntem ve sistemler için genellikle orta düzeyde % EE değerleri raporlanmıştır. Bu tez çalışmasında çalışmada elde edilen bu sonuçlar literatürle uyumlu olduğu söylenebilir (Park, Hyun Ha, Sol Ha vd., 2019; Satue, Jansman vd., 2021; Royo, Sebastián, Martínez vd., 2021; Ali, Walboomers vd., 2019).

Bu tez çalışmasında Span 60'ın organik fazda kullanılması ile S_1/Y ara yüzeyinin stabilize edilmesi, çözücü uzaklaştırma sürecinde BT'nin polimer matrisi içerisinde katılmasını sağlamış ve % EE yaklaşık %50 (% 47.6 ± 3.4) düzeyinde olmasına olanak sağladığı söylenebilir; ancak %DL'nin sınırlı kalması, BT'nin hidrofilik karakterine ve kullanılan S_1/Y/S_2 sistemin yapısı gereği olduğu söylenebilir. Bu durum, özellikle oküler uygulamalar açısından dezavantajdan ziyade kontrollü ve güvenli bir ilaç sunumu için uygun bir özellik olarak değerlendirilmektedir (Sharma ve Chauhan, 2020; Han Tsai, Wang, Lin vd., 2018). Bu tez çalışmasında elde edilen % EE ve % DL değerleri, parçacık boyutu ve zeta potansiyel değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde, geliştirilen BT yüklü nopartikül sisteminin oküler uygulamalarda potansiyel olabilecek uygun bir taşıyıcı sistem adayı olabilir.

6.4. *In Vitro* Dissolüsyon

BT ve BT yüklü V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonu için zamana karşı kümülatif çözünen BT miktarı değerleri 'ortalama ± standart sapma' olarak sırasıyla Tablo 6.13. ve Tablo 6.14.'de sunulmuştur. Analizler sonrası elde edilen tüm dissolüsyon verileri kullanılarak BT ve V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonu için 30 saatlik *in vitro* dissolüsyon profilleri Şekil 6.15.'te sunulmuştur.

Tablo 6.13.

BT için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları

Zaman	Ortalama	SS	Sonuç
1. saat	% 92.4	3.7	%92.4 ± 3.7
2. saat	% 99.3	0.8	%99.3 ± 0.8

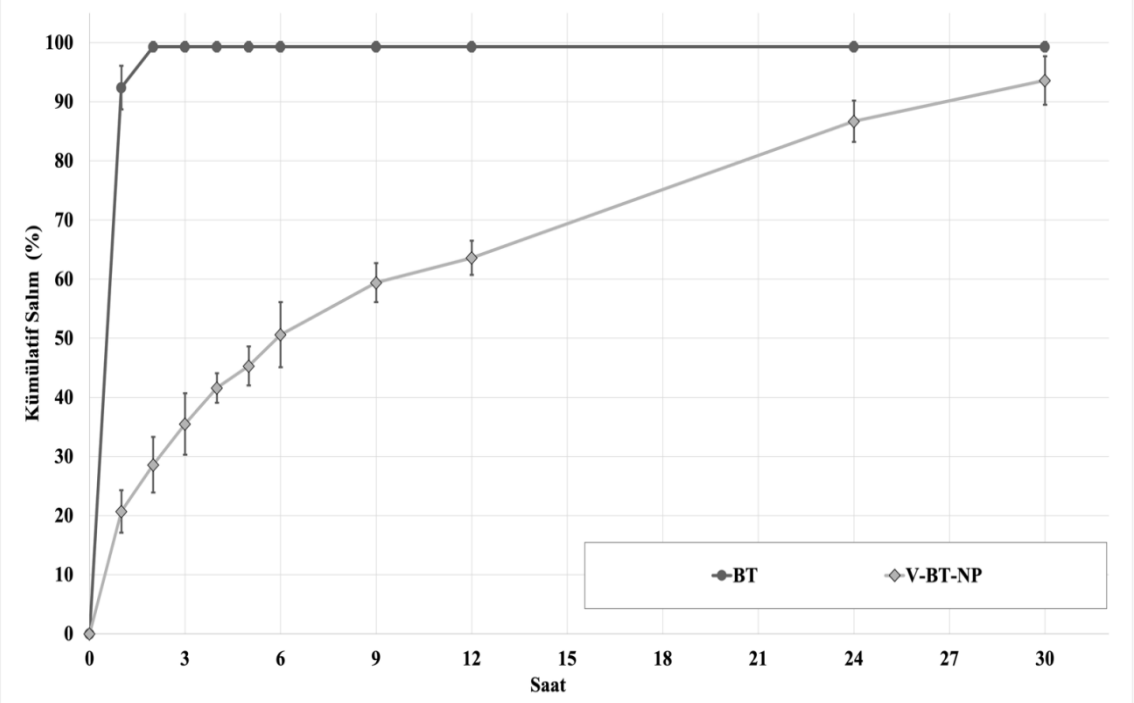
Tablo 6.14.

V-BT-NP Kodlu Formülasyon için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları

Zaman	Ortalama	SS	Sonuç
1. saat	% 20.7	3.6	% 20.7 ± 3.6
2. saat	% 28.6	4.7	% 28.6 ± 4.7
3. saat	% 35.5	5.2	% 35.5 ± 5.2
4. saat	% 41.6	2.5	% 41.6 ± 2.5
5. saat	% 45.3	3.3	% 45.3 ± 3.3
6. saat	% 50.6	5.5	% 50.6 ± 5.5
9. saat	% 59.4	3.3	% 59.4 ± 3.3
12. saat	% 63.6	2.9	% 63.6 ± 2.9
24. saat	% 86.7	3.5	% 86.7 ± 3.5
30. saat	% 93.6	4.1	% 93.6 ± 4.1

Şekil 6.15.

BT ve V-BT-NP Kodlu Formülasyon için Kümülatif Salım Grafiği



STF ortamında gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları, saf BT ile V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonu arasında zamana bağlı farklılıklar olduğunu göstermiştir. Saf BT, birinci saat sonunda %92.4 ± 3.7 oranında salım göstermiş, ikinci saatte ise salım %99.3 ± 0.8 oranına ulaşmıştır. Bu hızlı salım BT'nin STF ortamında yüksek çözünürlüğe sahip olması ile ilişkili olduğu söylenebilir. Bu durum değerlendirildiğinde ilgili salım oranlarının geleneksel oküler damla formülasyonlarında sıklıkla karşılaşılan kısa etki süresi ve hızlı prekorneal drenaj problemini temsil ettiği söylenebilir (Gaudana vd., 2010; Bhagav, Chandran ve Upadhyay, 2011; Prabhu vd., 2010).

V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonun sonuçları incelendiğinde zamana yayılmış ve uzatılmış bir salım profili sergilediği söylenebilir. Birinci saat sonunda % 20.7 ± 3.6 oranında salım gözlenmiş ve bu oran nanopartikül yüzeyine yakın veya yüzeyde bulunan BT'nin olabileceğini göstermiştir. Birinci saat sonunda elde edilen bu oran ve hızlı salım, BT gibi hidrofilik ve iyonik etkin madde içeren nanopartikül formülasyonları için uyumlu bir durumdur (Bhagav, Chandran ve Upadhyay, 2011; Prabhu vd., 2010).

Birinci saatten sonra, 1-6. saat aralığında, V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonunda salımın düzenli ve kademeli bir artış gösterdiği söylenebilir. Bu

zaman diliminde kümülatif salım oranları sırasıyla %28.6 ± 4.7 (2. saat), % 35.5 ± 5.2 (3. saat), % 41.6 ± 2.5 (4. saat), % 45.3 ± 3.3 (5. saat), ve % 50.6 ± 5.5 (6. saat) olarak hesaplanmıştır. Bu artış, BT'nin nanopartikül matrisi içerisinden STF ortamına difüzyon kontrollü bir mekanizma ile salındığını düşündürmektedir. Altıncı saatten sonra salım hızında belirgin bir yavaşlama olduğu gözlenmiştir. V-BT-NP formülasyonunda salım oranı % 59.4 ± 3.3 (9. saat) ve % 63.6 ± 2.9 (12. saat) değerlerine ulaşmıtır. Bu durum, nanopartikül matrisi içerisinde iç bölgelerde bulunan BT'nin daha uzun difüzyon yolları kat ederek salınması şeklinde yorumlanmıştır (Bhagav, Chandran ve Upadhyay, 2011; Bhagav, Trivedi vd., 2011).

İlerleyen zaman aralıklarında V-BT-NP kodlu formülasyonunun uzatılmış salım özelliğini sürdürdüğü belirlenmiştir. Salım oranı 24. saatte % 86.7 ± 3.5 ve 30. saatte % 93.6 ± 4.1 olarak hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında in vitro salım sonuçları için elde edilen Standart sapma (SS) değerleri incelendiğinde saf BT için SS değerlerinin ikinci saatte ± 0.8 olması, BT'nin hızlı ve homojen şekilde çözüldüğü şeklinde yorumlanabilir. V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonunda SS değerlerinin ±2.5-5.5 aralığında değiştiği gözlenmiş ve bu durum nanopartikül formülasyonlarında beklenen deneysel varyasyon olarak yorumlanmıştır (Weng, Tong ve Chow, 2020).

Sonuç olarak V-BT-NP kodlu naopartikül formülasyonunda elde edilen dengeli salım profili, V-BT-NP'nin oküler uygulamalarda hızlı drenajı azaltma, etki süresini uzatma ve daha stabil bir terapötik etki elde etme potansiyeline sahip olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

6.5. Salım Kinetiği

V-BT-NP formülasyonlarının ilaç salım mekanizmalarını aydınlatmak üzere gerçekleştirilen kinetik modelleme çalışmaları, DDSolver programı kullanılarak 22 farklı model kapsamında yürütülmüştür. Elde edilen *in vitro* verilerin modellere adaptasyonu sonucunda ortaya çıkan kinetik parametreler ve istatistiksel veriler Tablo 6.15 ve 6.16'da paylaşılmıştır.

Birinci derecede'den Weibull türevlerine kadar geniş bir yelpazede değerlendirilen modellerin salım eğrileri, Şekil 6.16-6.37 aralığında görselleştirilmiştir. Bu analizler, geliştirilen NP sistemlerinin salım kinetiği üzerindeki model uyumunun ve baskın salım süreçlerinin kapsamlı bir şekilde yorumlanmasına olanak sağlamıştır.

Tablo 6.15.

Salım Kinetiği Calısması Sonucları

Model	Denklem	N_observed	DF	R_obs-pre	Rsqr (R^2)	Rsqr_adj ($R^2_{adjusted}$)	MSE	MSE_root	Weighting	SS	WSS	AIC	MSC
First-order	$F=100*[1-Exp(-k_1*t)]$	11.000	8.000	0.986	0.913	0.913	65.894	8.118	1.000	658.942	658.942	73.397	1.904
First-order Tlag	$F=100*\{1-Exp[-k_1*(t-T_{lag})]\}$	11.000	9.000	0.984	0.963	0.959	31.344	5.599	1.000	282.094	282.094	66.065	2.570
First-order Fmax	$F=F_{max}*[1-Exp(-k_1*t)]$	11.000	9.000	0.987	0.922	0.914	65.597	8.099	1.000	590.377	590.377	74.188	1.832
First-order Tlag and Fmax	$F=F_{max}*\{1-Exp[-k_1*(t-T_{lag})]\}$	11.000	9.000	0.986	0.970	0.963	28.133	5.304	1.000	225.067	225.067	65.580	2.614
Higuchi	$F=k_H*t^{0.5}$	11.000	10.000	0.994	0.977	0.976	17.707	4.208	1.000	177.070	177.070	58.942	3.218
Higuchi Tlag	$F=kH*(t-Tlag)^{0.5}$	11.000	9.000	0.971	0.914	0.904	72.494	8.514	1.000	652.443	652.443	75.288	1.732
Higuchi F0	$F=F_0+k_H*t^{0.5}$	11.000	9.000	0.994	0.985	0.984	12.331	3..512	1.000	110.981	110.981	55.803	3.503
Korsmeyer-Peppas	$F=k_{KP}*t^n$	11.000	9.000	0.998	0.995	0.995	4.171	2.042	1.000	37.537	37.537	43.878	4.587
Korsmeyer-Peppas Tlag	$F=k_{KP}*(t-T_{lag})^n$	11.000	8.000	0.999	0.999	0.998	1.334	1.155	1.000	10.674	10.674	32.046	5.663
Korsmeyer-Peppas F0	$F=F_0+k_{KP}*t^n$	11.000	8.000	0.998	0.995	0.994	4.692	2.166	1.000	37.537	37.537	45.878	4.405
Hixson-Crowell Tlag	$F=100*\{1-[1-k_{HC}*(t-T_{lag})]^3\}$	11.000	9.000	0.967	0.914	0.904	72.546	8.517	1.000	652.913	652.913	75.296	1.731
Hopfenberg	$F=100*[1-(1-k_{HB}*t)^n]$	11.000	9.000	0.985	0.911	0.901	75.032	8.662	1.000	675.288	675.288	75.667	1.697
Baker-Lonsdale	$3/2*[1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL}*t$	11.000	10.000	0.999	0.985	0.985	11.466	3.386	1.000	114.656	114.656	54.161	3.652
Baker-Lonsdale Tlag	$[1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL}*(t-T_{lag})$	11.000	9.000	0.992	0.976	0.973	20.583	4.537	1.000	185.247	185.247	61.439	2.991
Peppas-Sahlin 1	$F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}$	11.000	8.000	0.999	0,998	0.997	2.037	1.427	1.000	16.295	16.295	36.699	5.240
Peppas-Sahlin 1 Tlag	$F=k_1*(t-Tlag)^m+k_2*(t-Tlag)^{(2*m)}$	11.000	7.000	0.999	0.999	0.998	1.618	1.272	1.000	11.327	11.327	34.699	5.422
Peppas-Sahlin 2	$F=k_1*t^{0.5}+k_2*t$	11.000	9.000	0.999	0.999	0.998	1.252	1.119	1.000	11.271	11.271	30.644	5.790
Peppas-Sahlin 2 Tlag	$F=k_1*(t-T_{lag})^{0.5}+k_2*(t-T_{lag})$	11.000	8.000	0.999	0.997	0.996	2.703	1.644	1.000	21.623	21.623	39.811	4.957
Weibull 1	$F=100*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	11.000	8.000	0.993	0.984	0.981	14.726	3.837	1.000	117.806	117.806	58.459	3.262
Weibull 2	$F=100*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	11.000	9.000	0.996	0.991	0.990	7.700	2.775	1.000	69.301	69.301	50.623	3.974
Weibull 3	$F=F_{max}*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	11.000	8.000	0.998	0.990	0.988	9.039	3.006	1.000	72.310	72.310	53.091	3.750
Weibull 4	$F=F_{max}*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	11.000	7.000	0.992	0.982	0.975	19.085	4.369	1.000	133.595	133.595	61.843	2.954

Açıklamalar: **N_observed** (Gözlem Sayısı); **DF** (Serbestlik Derecesi); **R_obs-pre** (Korelasyon Katsayısı); **Rsqr (R^2)** (Belirleme Katsayısı); **Rsqr_adj (R^2adjusted)** (Düzeltilmiş Belirleme Katsayısı); **MSE** (Ortalama Kare Hatası); **MSE_root** (Kök Ortalama Kare Hatası); **Weighting** (Ağırlıklandırma); **SS** (Karelerin Toplamı); **WSS** (Ağırlıklı Kareler Toplamı); **AIC** (Akaike Bilgi Kriteri); **MSC** (Model Seçim Kriteri)

Tablo 6.16. (Devam)

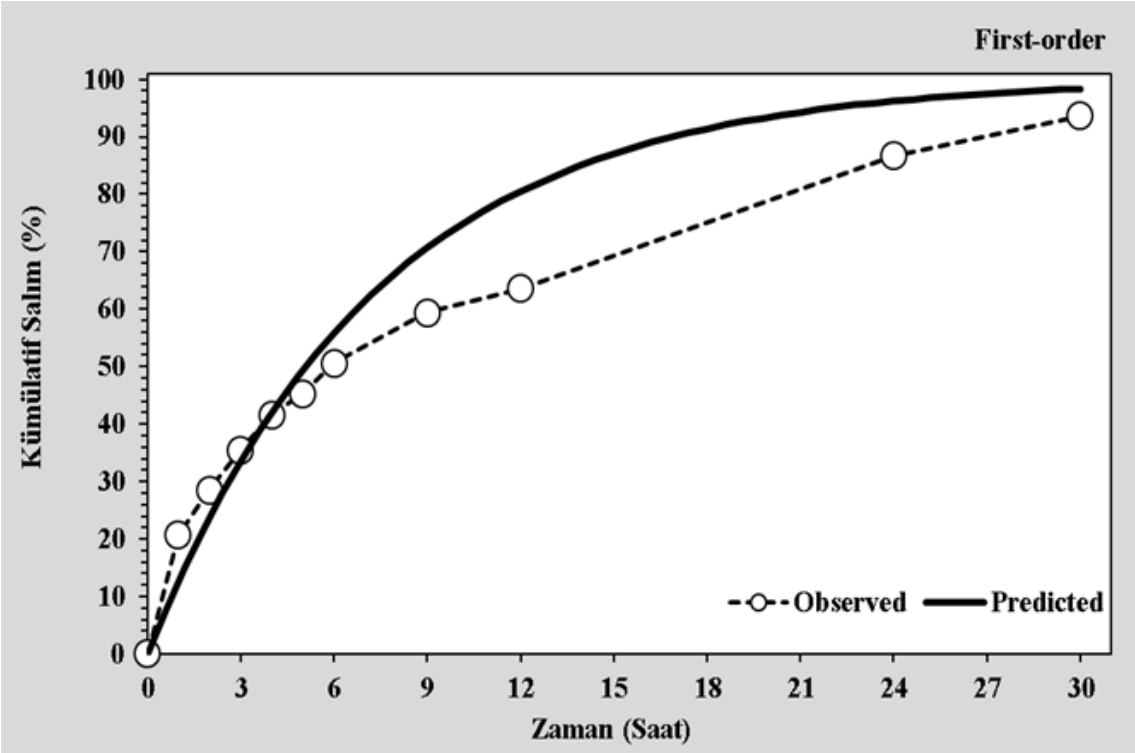
Salım Kinetiği Çalışması Sonuçları

Model	Denklem	k_{KP}	n	k_H	α	β	Ti	T_{lag}	F_{max}	F_0	k_{HC}	k_{HB}	k_{BL}	k_1	k_2	m
First-order	$F=100*[1-Exp(-k_1*t)]$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.136	-	-
First-order Tlag	$F=100*\{1-Exp[-k_1*(t-T_{lag})]\}$	-	-	-	-	-	-	-2.046	-	-	-	-	-	0.082	-	-
First-order Fmax	$F=F_{max}*[1-Exp(-k_1*t)]$	-	-	-	-	-	-	-	98.28	-	-	-	-	0.098	-	-
First-order Tlag and Fmax	$F=F_{max}*\{1-Exp[-k_1*(t-T_{lag})]\}$	-	-	-	-	-	-	-1.538	98.20	-	-	-	-	0.090	-	-
Higuchi	$F=k_H*t^{0.5}$	-	-	18.406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Higuchi Tlag	$F=k_H*(t-T_{lag})^{0.5}$	-	-	16.879	-	-	-	-1.877	-	-	-	-	-	-	-	-
Higuchi F0	$F=F_0+k_H*t^{0.5}$	-	-	16.09	-	-	-	-	-	8.035	-	-	-	-	-	-
Korsmeyer-Peppas	$F=k_{KP}*t^n$	21.704	0.442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Korsmeyer-Peppas Tlag	$F=k_{KP}*(t-T_{lag})^n$	24.800	0.395	-	-	-	-	0.400	-	-	-	-	-	-	-	-
Korsmeyer-Peppas F0	$F=F_0+k_{KP}*t^n$	21.704	0.442	-	-	-	-	-	-	0.000	-	-	-	-	-	-
Hixson-Crowell Tlag	$F=100*\{1-[1-k_{HC}*(t-T_{lag})]^3\}$	-	-	-	-	-	-	-4.984	-	-	0.017	-	-	-	-	-
Hopfenberg	$F=100*[1-(1-k_{HB}*t)^n]$	-	4.500	-	-	-	-	-	-	-	-	0.022	-	-	-	-
Baker-Lonsdale	$3/2*[1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL}*t$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.008	-	-	-
Baker-Lonsdale Tlag	$3/2*[1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL}*(t-T_{lag})$	-	-	-	-	-	-	0.879	-	-	-	-	0.011	-	-	-
Peppas-Sahlin 1	$F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.001	-0.566	0.450
Peppas-Sahlin 1 Tlag	$F=k_1*(t-T_{lag})^m+k_2*(t-T_{lag})^{(2*m)}$	-	-	-	-	-	-	0.400	-	-	-	-	-	24.905	-0.994	0.450
Peppas-Sahlin 2	$F=k_1*t^{0.5}+k_2*t$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.337	-0.959	-
Peppas-Sahlin 2 Tlag	$F=k_1*(t-T_{lag})^{0.5}+k_2*(t-T_{lag})$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.989	-1.274	0.400
Weibull 1	$F=100*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	-	-	-	3.909	0.627	0.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Weibull 2	$F=100*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	-	-	-	4.894	0.709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Weibull 3	$F=F_{max}*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	-	-	-	5.674	0.694	-	-	112.101	-	-	-	-	-	-	-
Weibull 4	$F=F_{max}*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	-	-	-	3.876	0.643	0.40	-	98.280	-	-	-	-	-	-	-

Açıklamalar: **n** (ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyon üssüdür); k_H (Higuchi salım sabiti); **α** (sürecin zaman ölçeğini tanımlayan ölçek parametresi); **β** (Eğrinin sigmoid, üstel veya parabolik karakterini tanımlar); **Ti** (Konum parametresi, çözünmenin başlamasından önceki gecikme süresini temsil eder); **Tlag** (Lag time, ilacın salıma başlamadan önce geçen gecikme süresidir); F_{max} (Sonsuz zamandaki maksimum salınan ilaç yüzdesi); F_0 (Başlangıçta çözeltide bulunan ilaç fraksiyonu); k_{HC} (Hixson–Crowell salım sabiti); k_{HB} (Hopfenberg salım sabiti); k_{BL} (Baker–Lonsdale salım sabiti); k_1 (Peppas–Sahlin modelinde Fickian difüzyon katkısını temsil eder); k_2 (Peppas–Sahlin modelinde polimer gevşemesi (Case-II) katkısını temsil eder); **m** (Peppas–Sahlin modelinde difüzyon üssü (diffüzyon-relaksasyon etkileşimini gösterir))

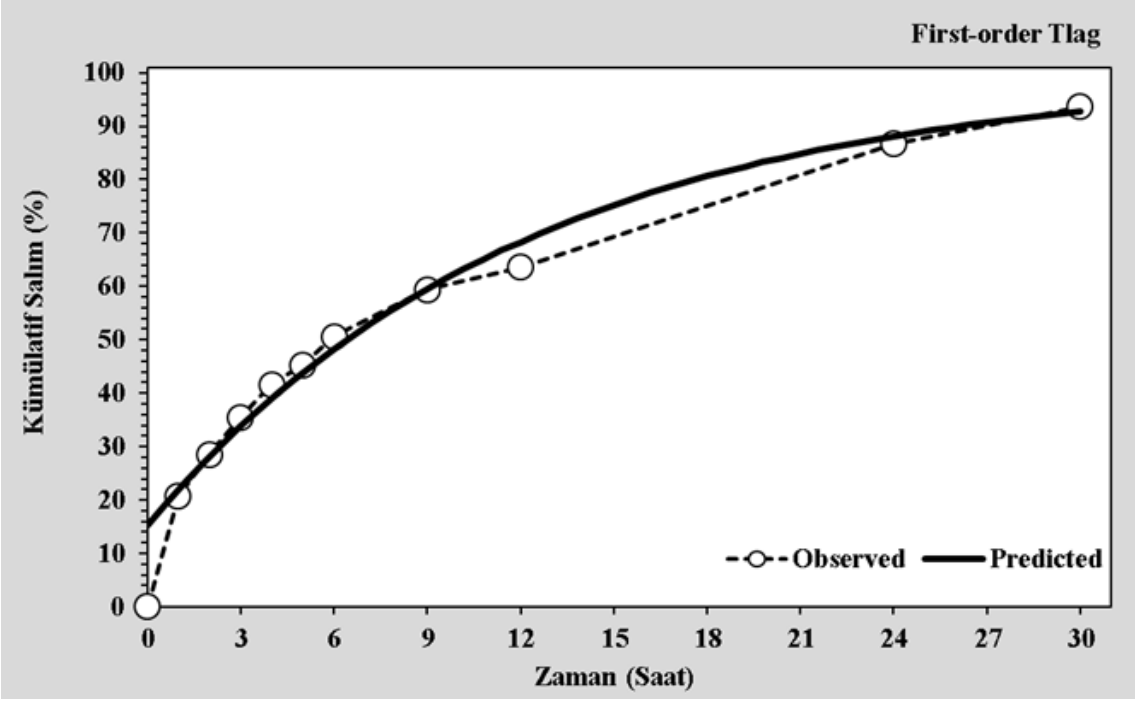
Şekil 6.16.

Birinci Derece Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



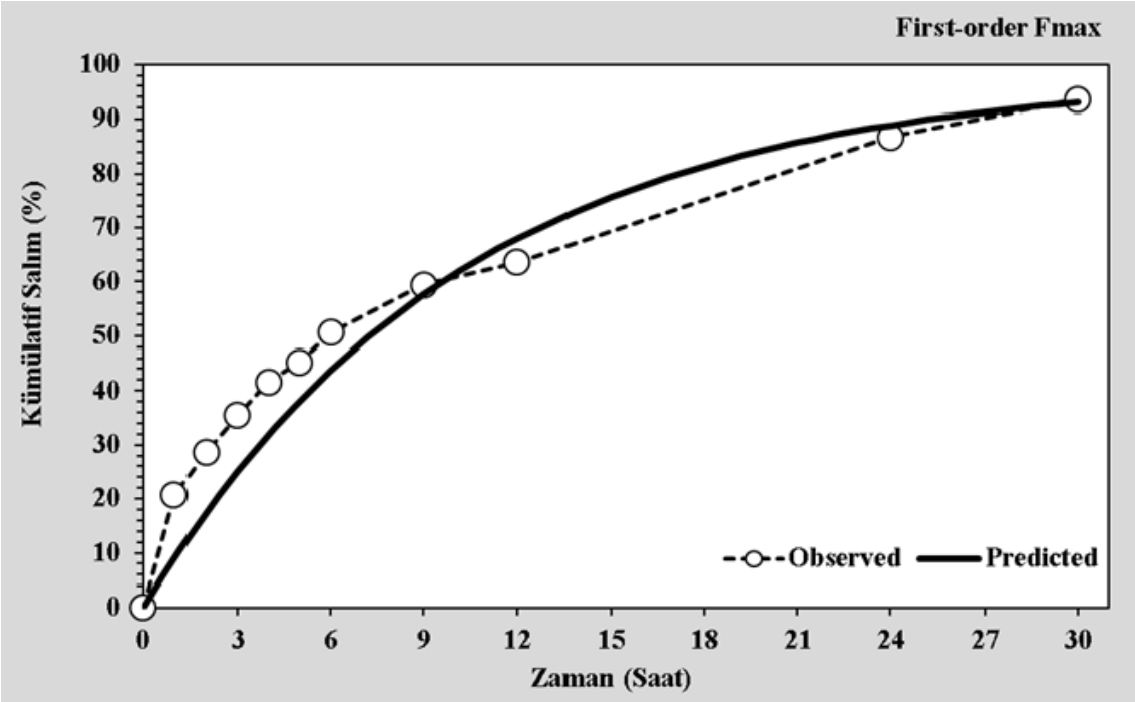
Şekil 6.17.

Birinci Derece T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



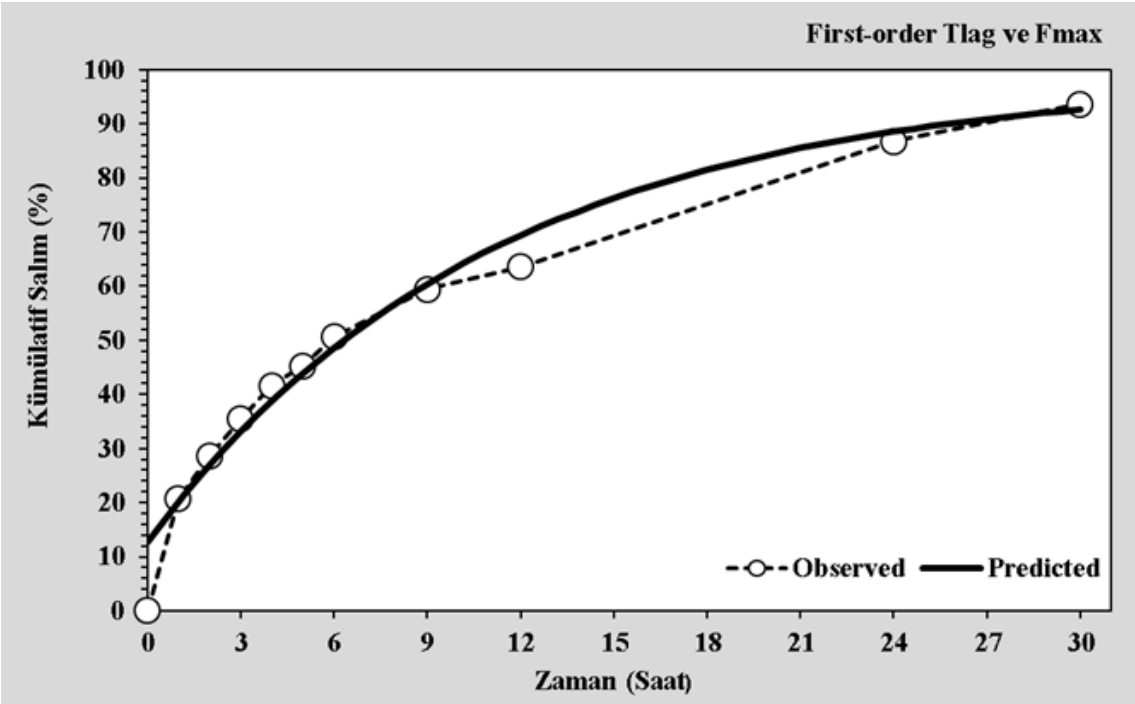
Şekil 6.18.

First-Order F_{max} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



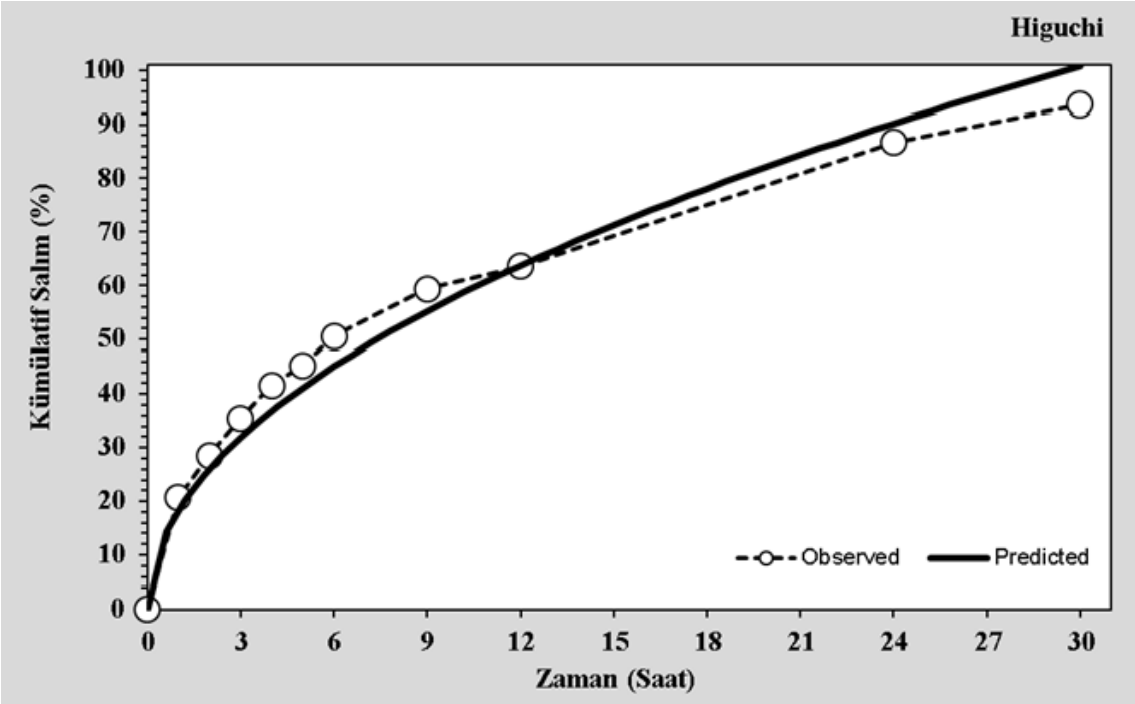
Şekil 6.19.

First-Order T_{lag} ve F_{max} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



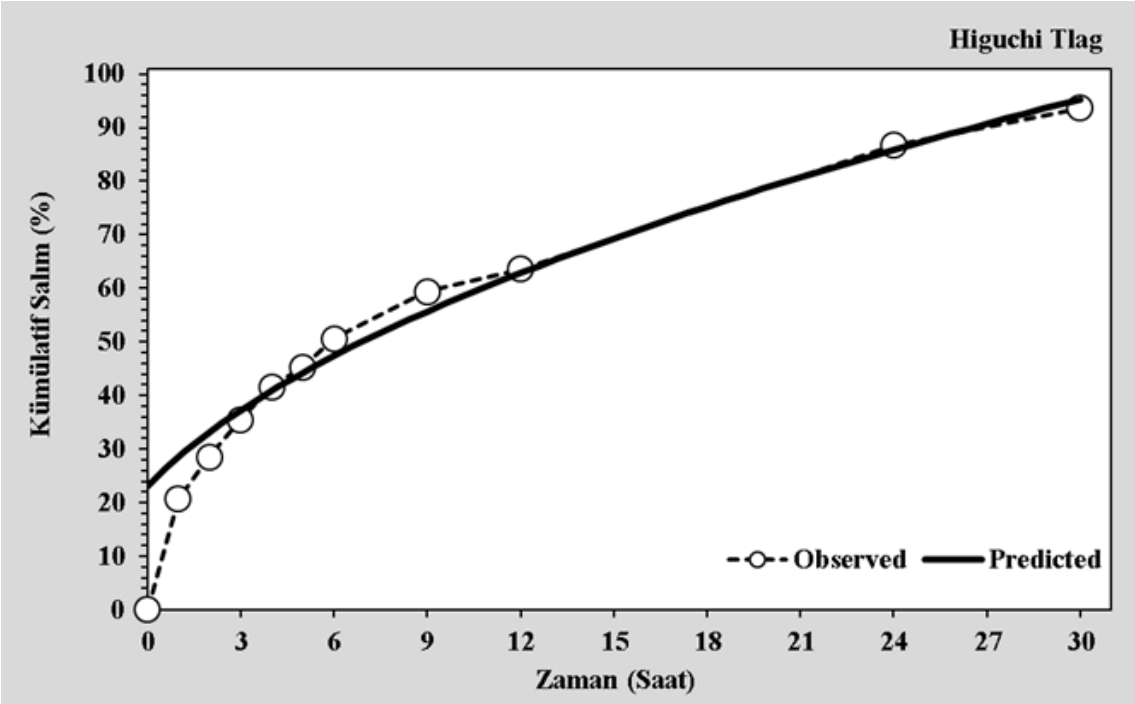
Şekil 6.20.

Higuchi Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



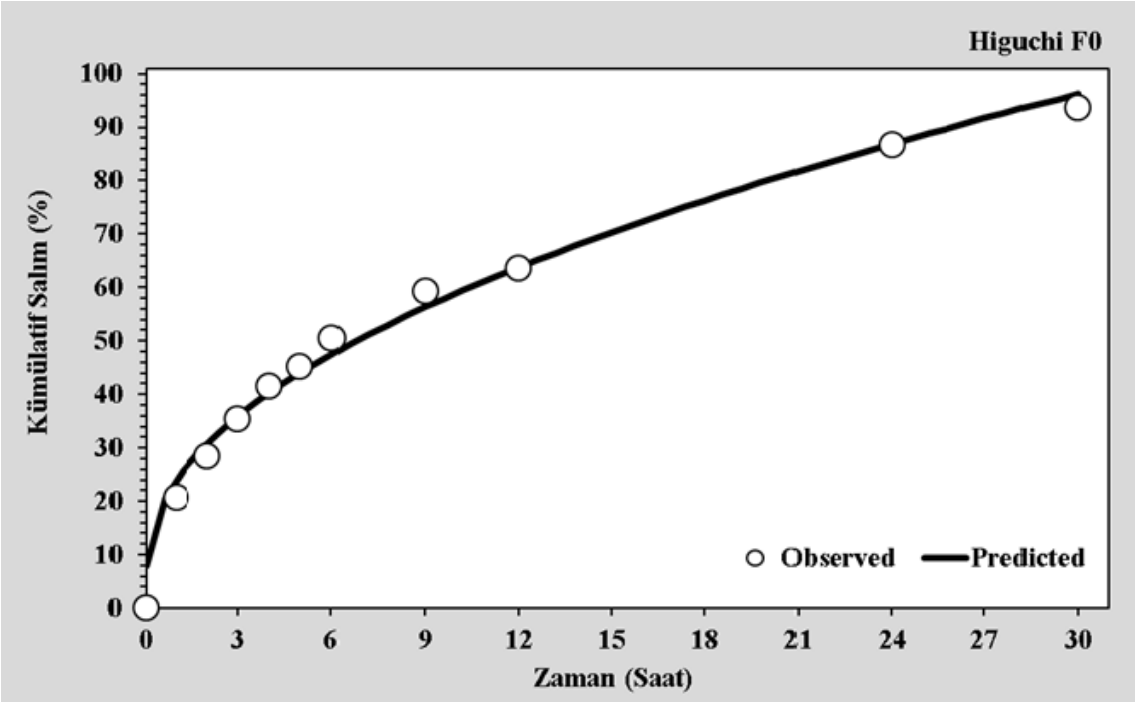
Şekil 6.21.

Higuchi T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



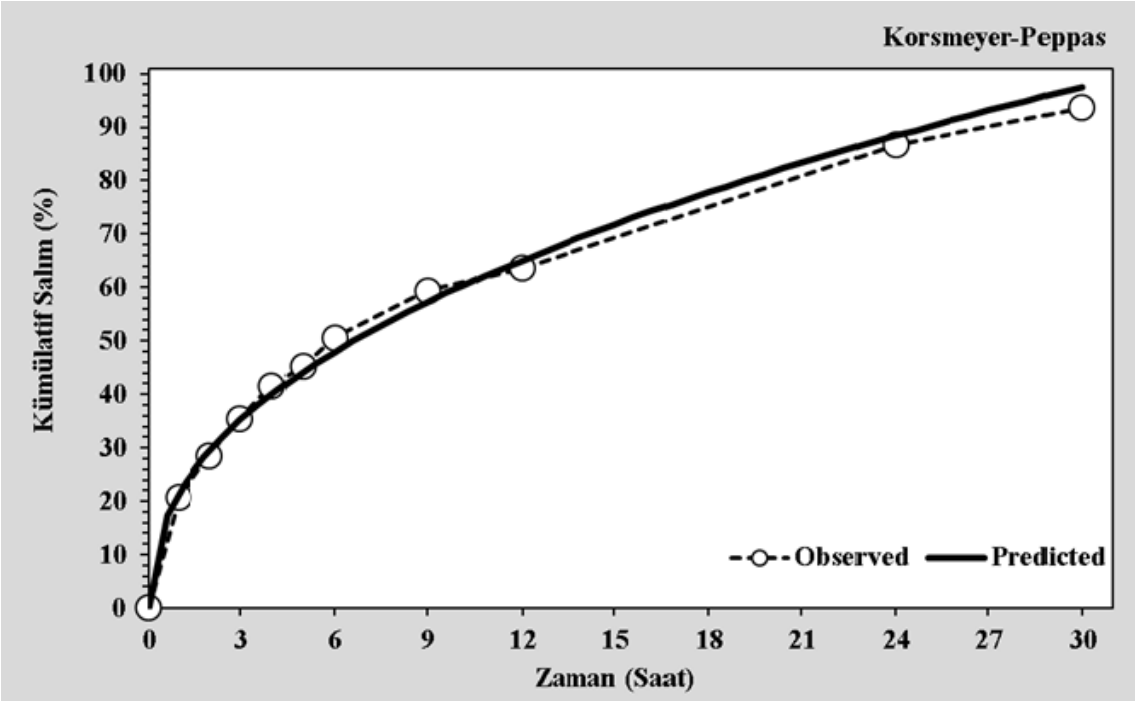
Şekil 6.22.

Higuchi F_0 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



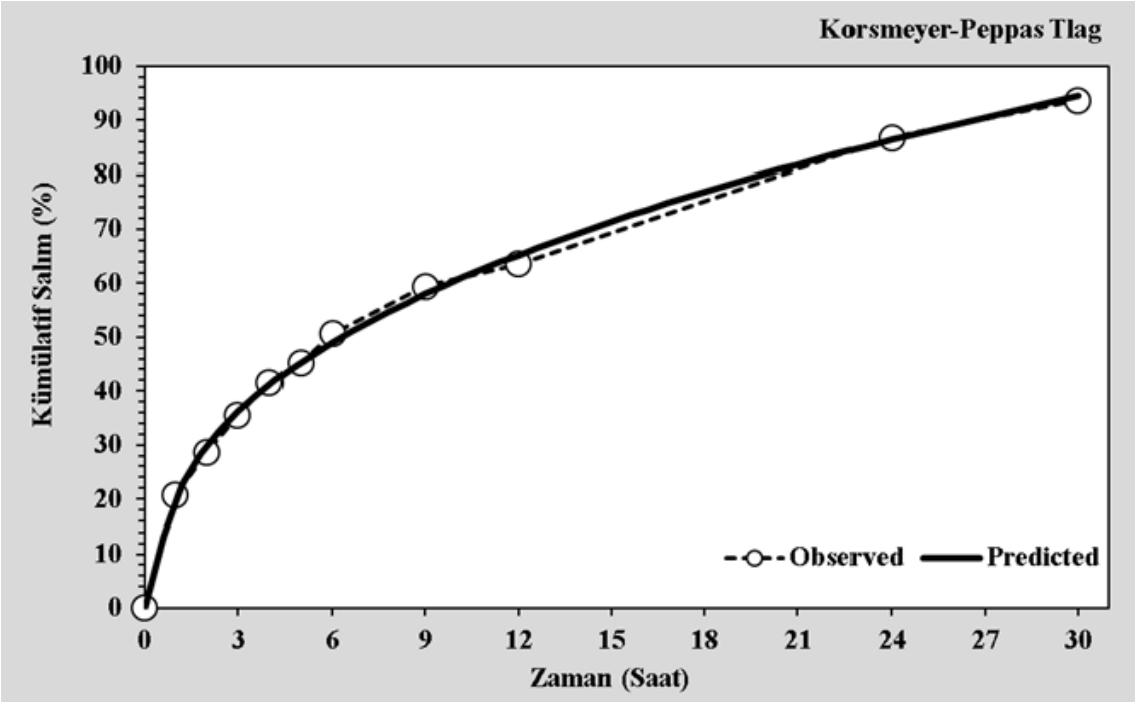
Şekil 6.23.

Korsmeyer-Peppas Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



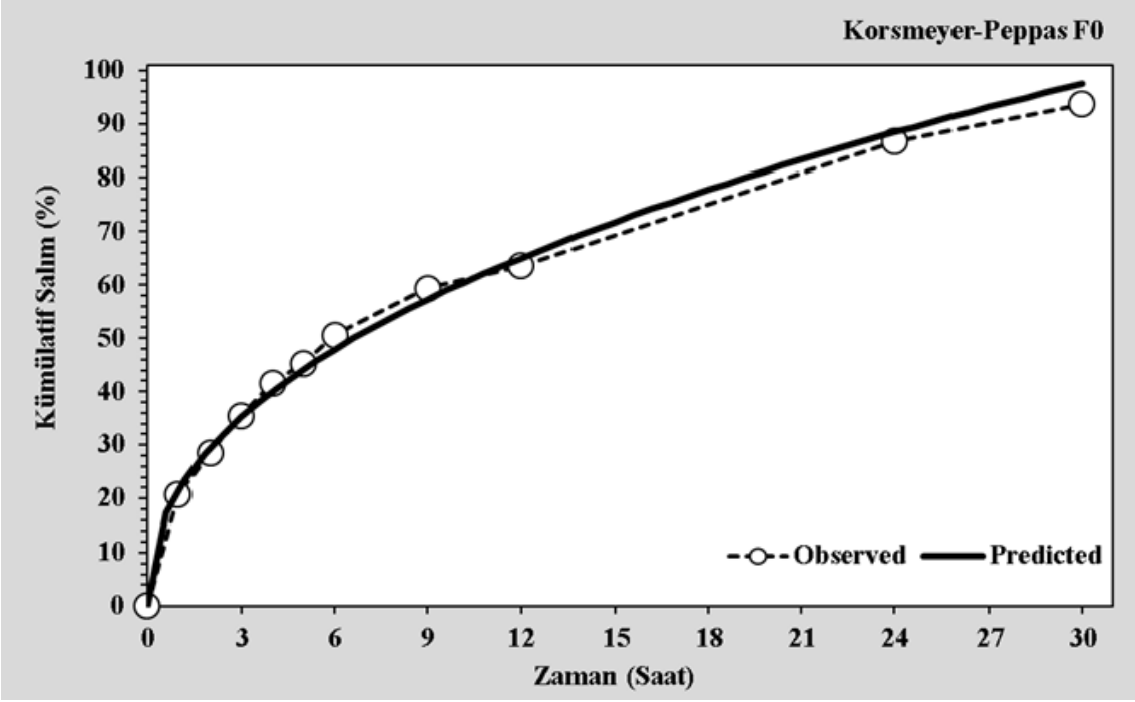
Şekil 6.24.

Kornsmeyer-Peppas T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



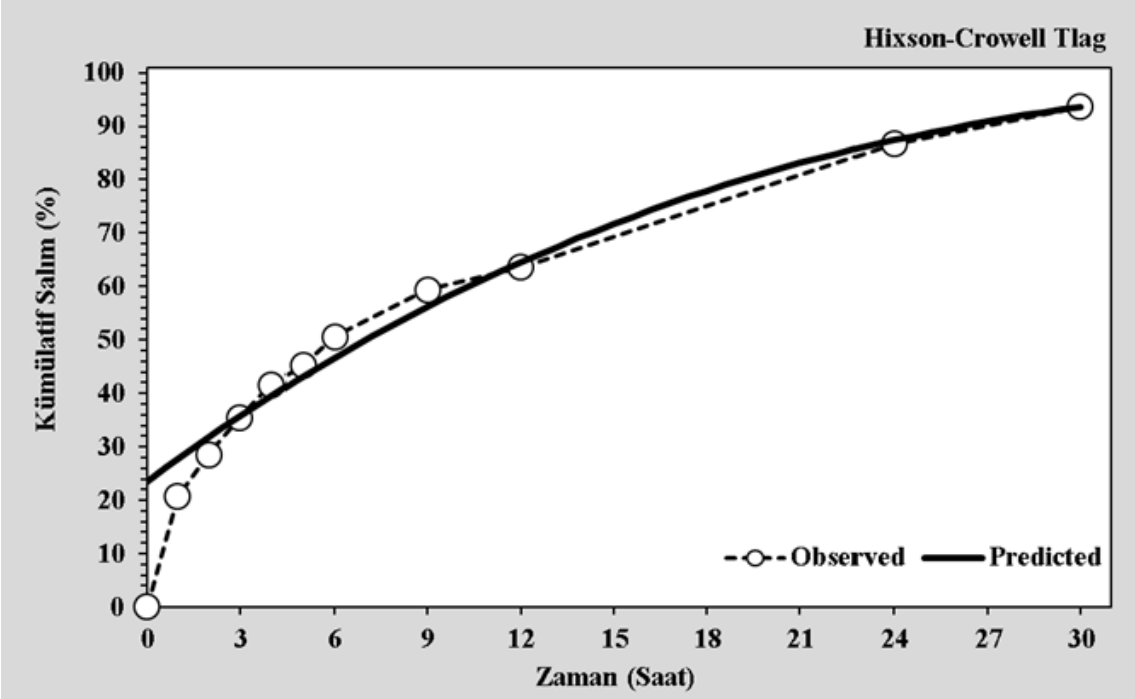
Şekil 6.25.

Kornsmeyer-Peppas F_0 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



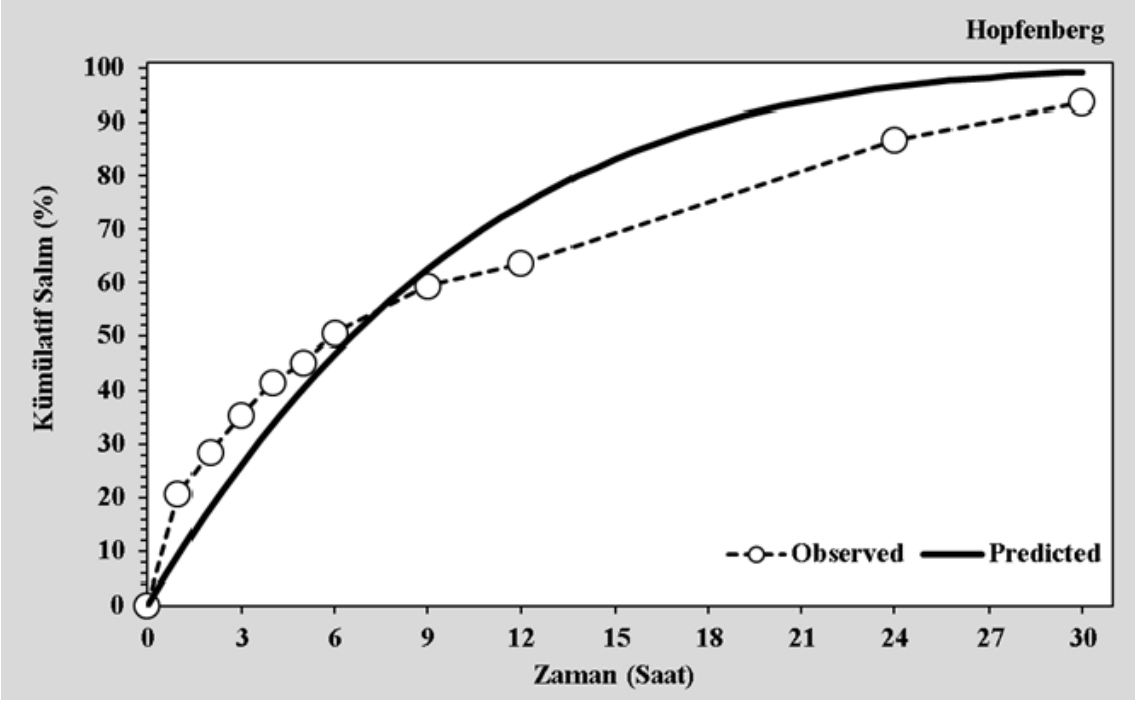
Şekil 6.26.

Hixson-Crowell T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



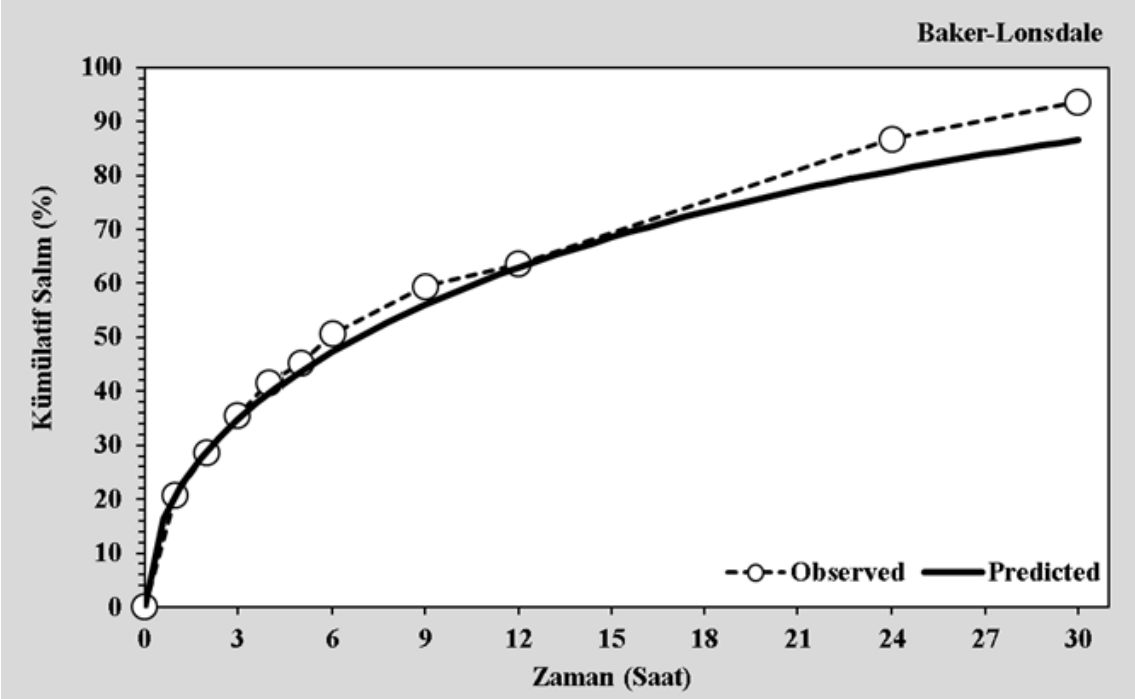
Şekil 6.27.

Hopfenberg Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



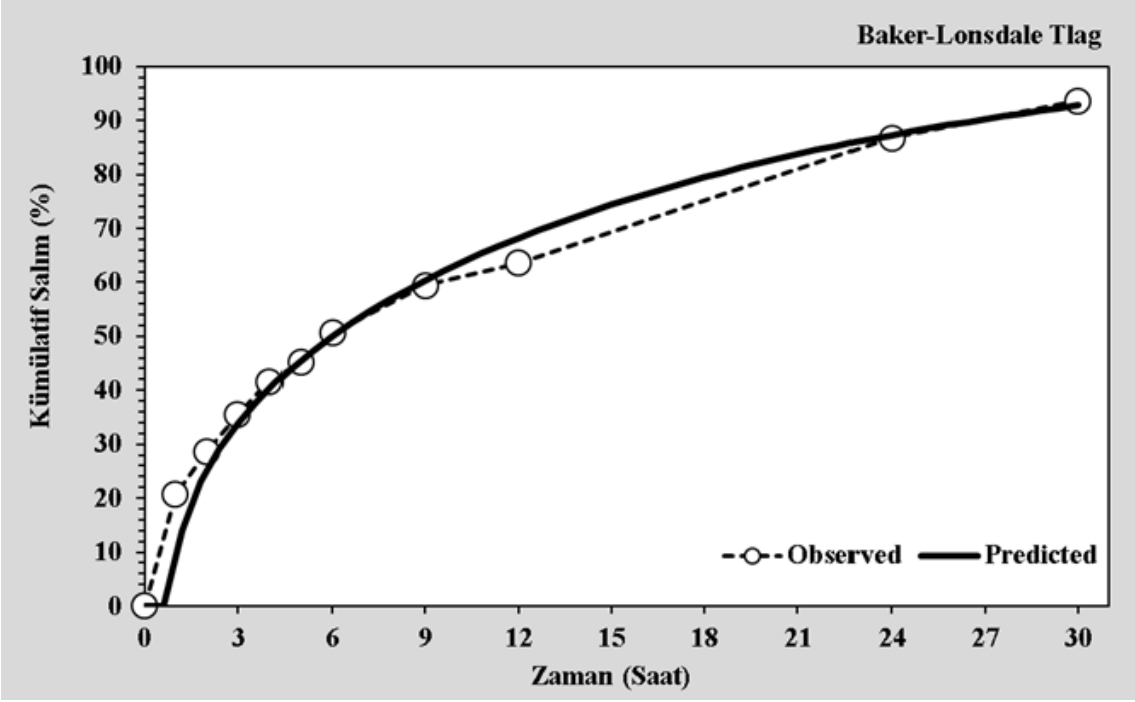
Şekil 6.28.

Baker-Lonsdale Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



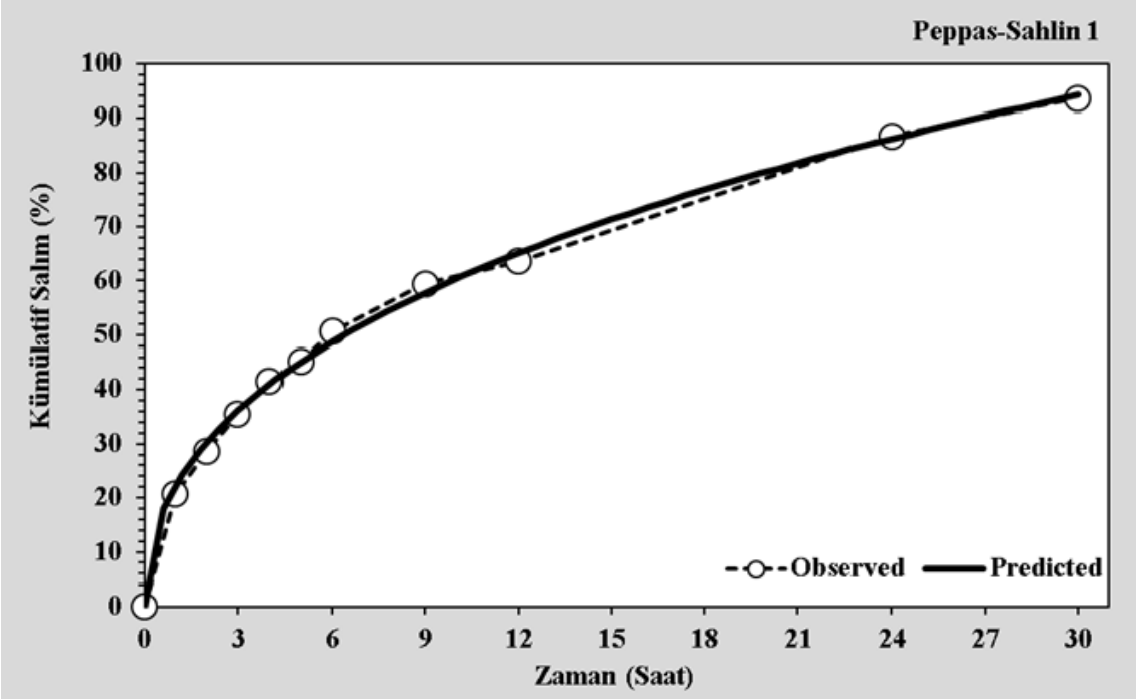
Şekil 6.29.

Baker-Lonsdale T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



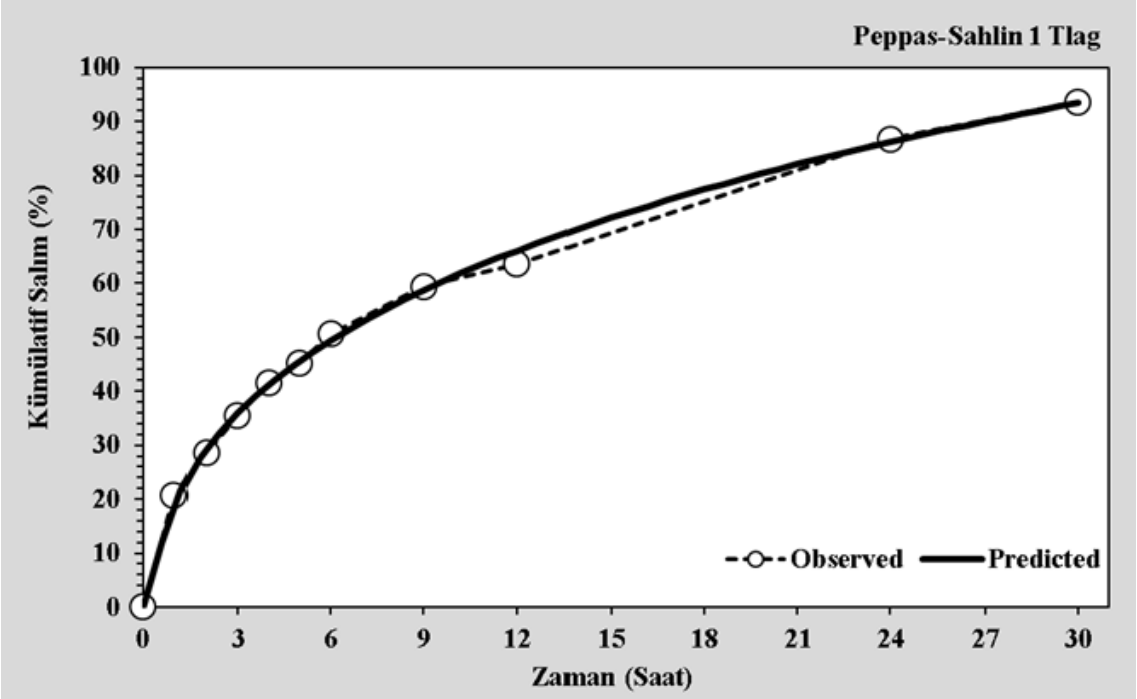
Şekil 6.30.

Peppas-Sahlin 1 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



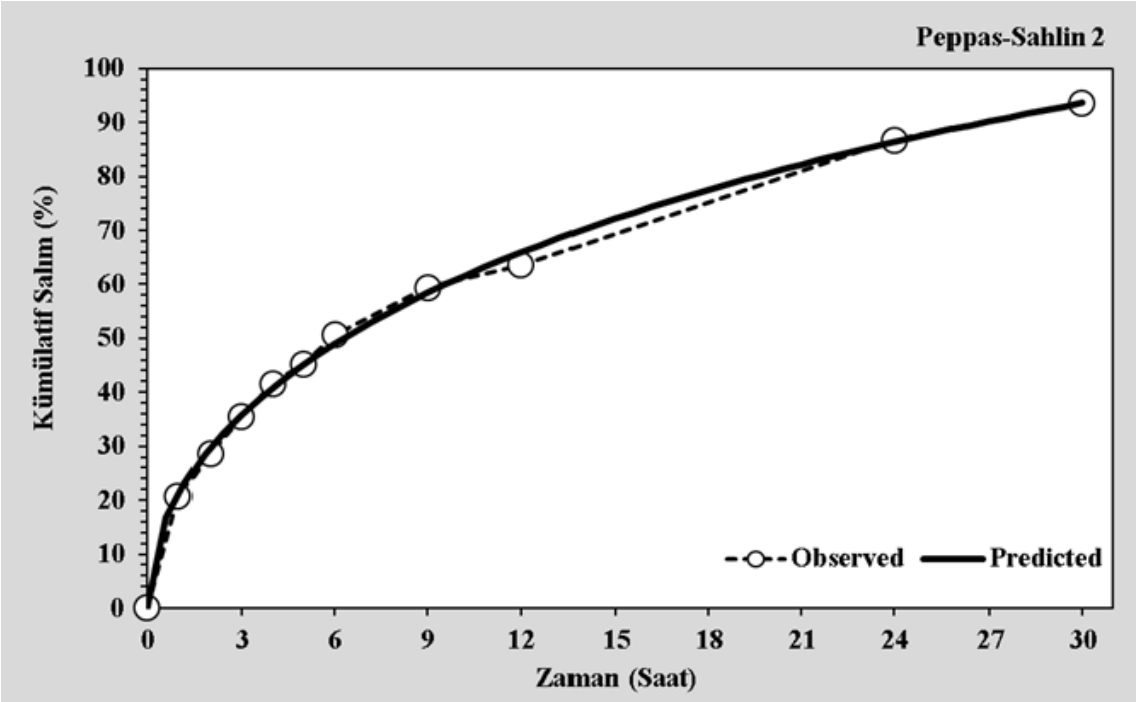
Şekil 6.31.

Peppas-Sahlin 1 T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



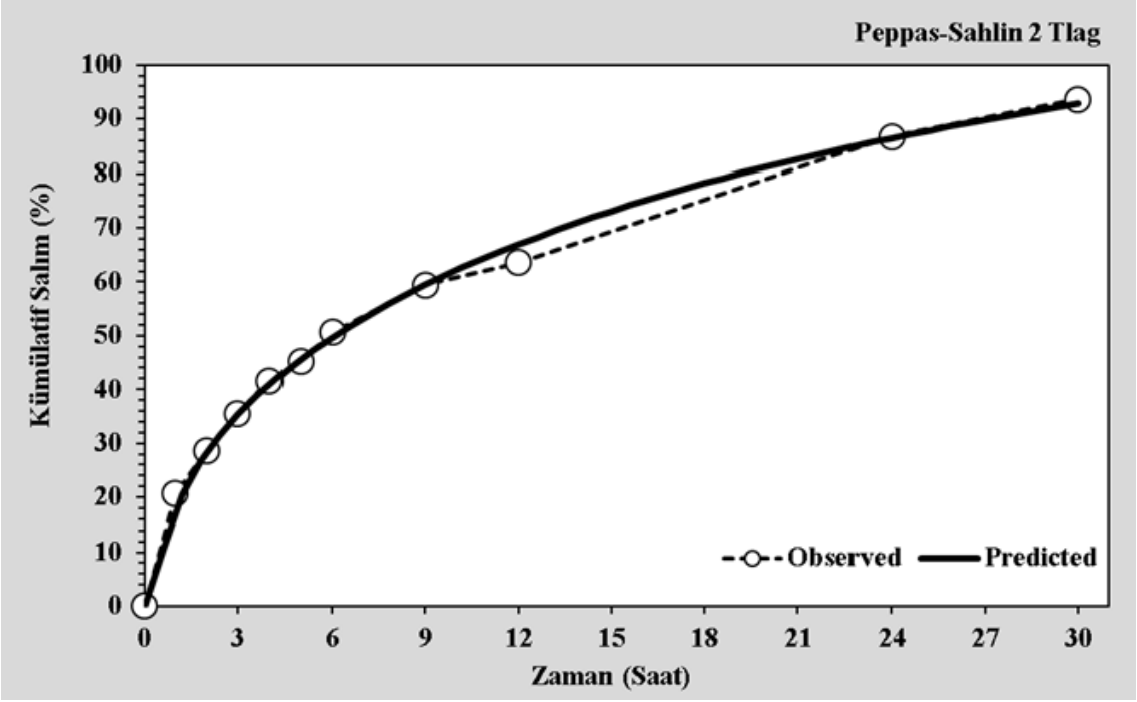
Şekil 6.32.

Peppas-Sahlin 2 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



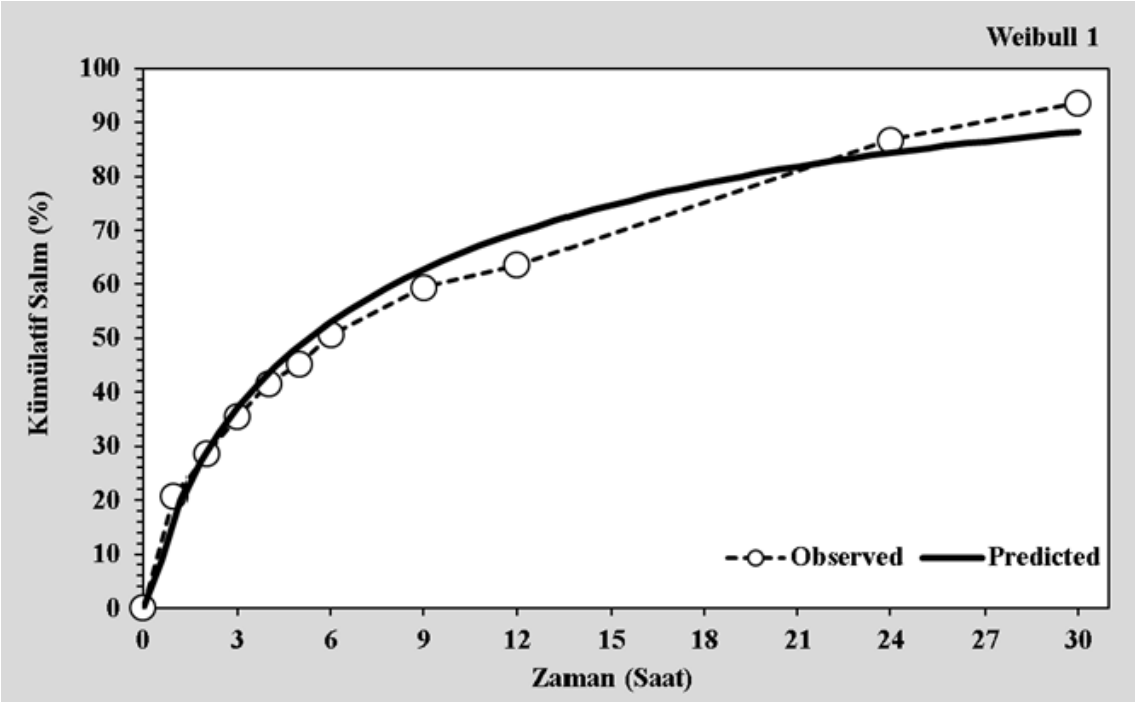
Şekil 6.33.

Peppas-Sahlin 2 T_{lag} Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



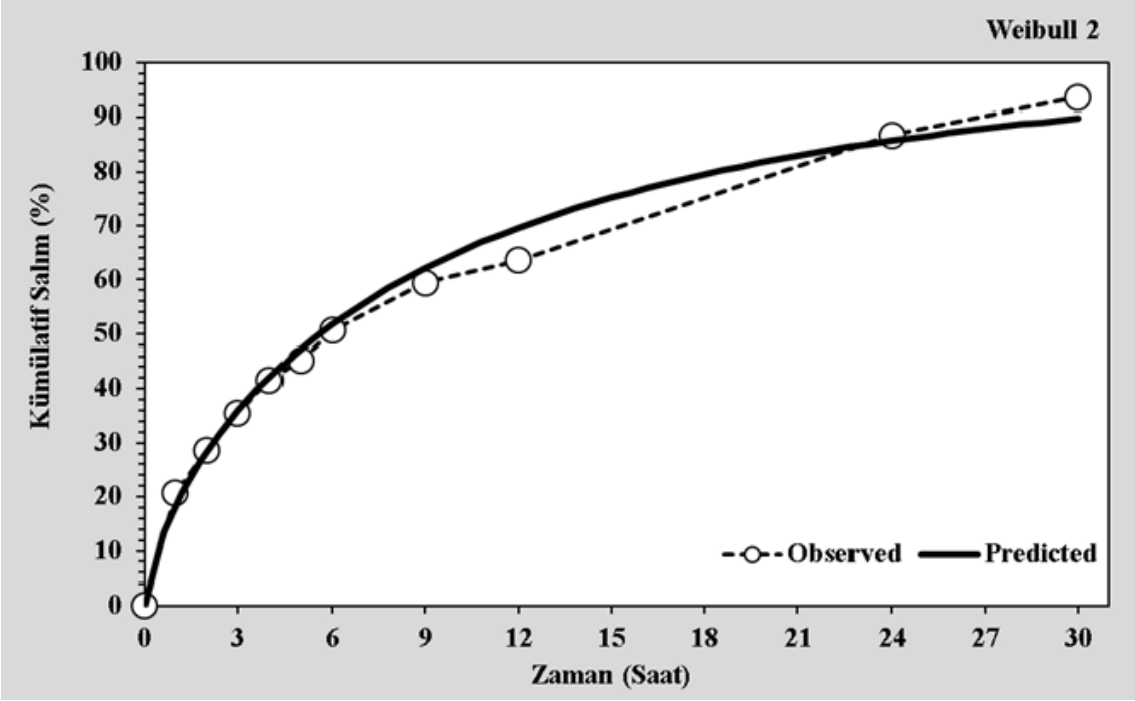
Şekil 6.34.

Weibull 1 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



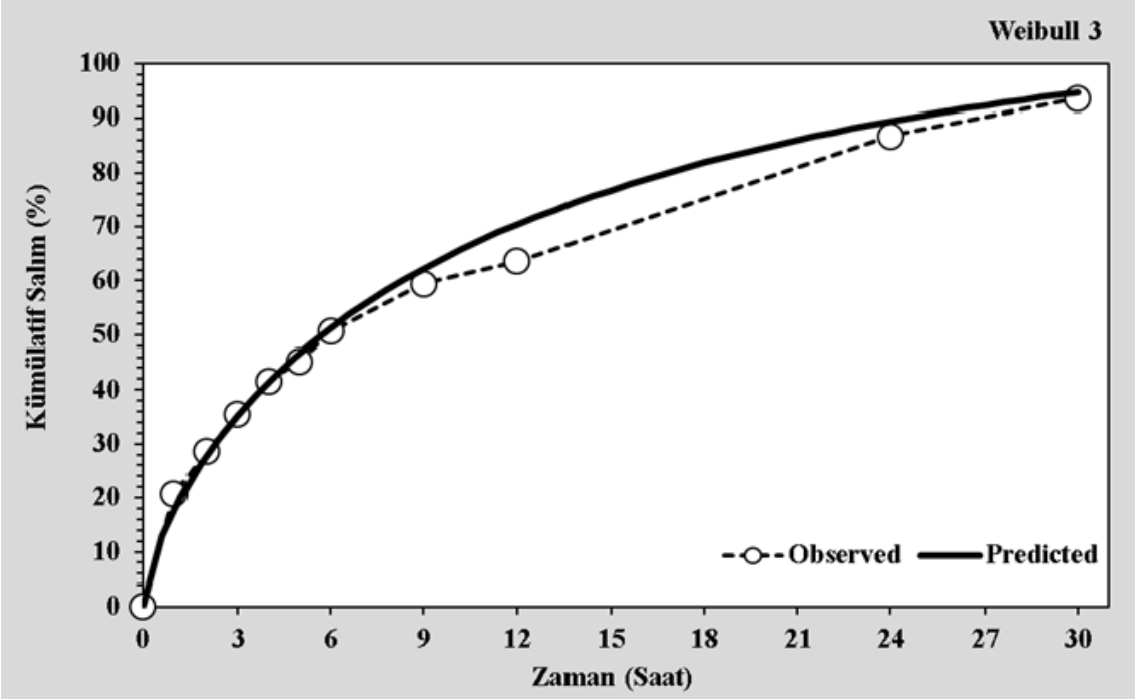
Şekil 6.35.

Weibull 2 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



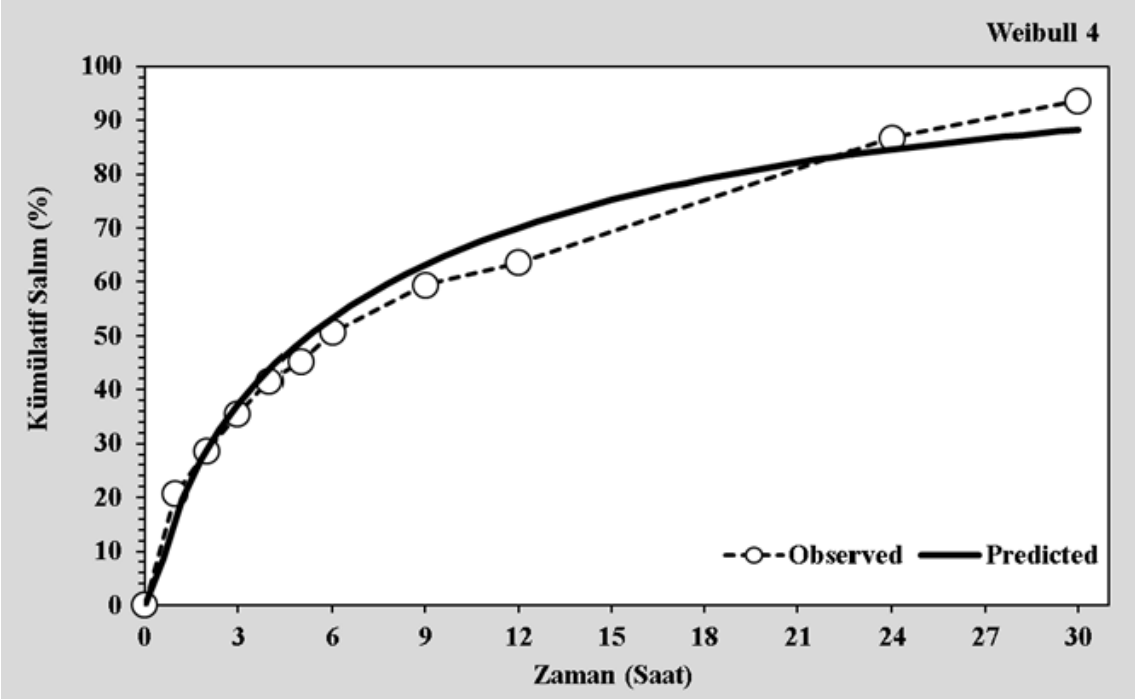
Şekil 6.36.

Weibull 3 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



Şekil 6.37.

Weibull 4 Grafiği (Observed: Elde Edilen Salım Profili, Predicted: Beklenen Salım Profili)



V-BT-NP formülasyonunun in vitro salım verileri DDSolver yazılımı kullanılarak farklı kinetik modellere (Birinci-derece, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Hixson–Crowell, Hopfenberg, Baker–Lonsdale, Peppas–Sahlin ve Weibull vb.) uygulanmış ve her model için uyum başarısı; R^2 (Rsqr), düzeltilmiş R^2 (Rsqr_adj), AIC ve MSC kriterleri üzerinden değerlendirilmiştir. Analizde 11 gözlem noktası (N_observed=11) kullanılmıştır (Costa ve Lobo, 2001).

Model karşılaştırmasında en düşük AIC ve en yüksek MSC değerlerinin en iyi uyumu temsil ettiği dikkate alınmıştır. Bu doğrultuda, incelenen modeller arasında Peppas–Sahlin 2 modelinin Rsqr=0,999, Rsqr_adj=0,999, AIC=30,641 ve MSC=5,790 değerleriyle en iyi uyumu sağladığı görülmüştür. Aynı model için hata parametrelerinin de düşük olduğu (MSE=1,252; MSE_root=1,119) belirlenmiştir. Bu sonuçlar, salım profilinin tek bir mekanizma ile açıklanmak yerine birden fazla süreç bileşeninin katkısıyla daha iyi temsil edildiğini düşündürmektedir (Zhang, Huo vd., 2010; Çoban, Usta ve Pinar, 2024).

Birinci derece kinetik model, salım hızının sistemde kalan ilaç miktarına bağlı olduğunu ve tek baskın kinetik süreç tarafından kontrol edildiğini varsayar. Klasik birinci derece model için elde edilen R^2=0,913, AIC=73,397 ve MSC=1,904 değerleri, modelin deneysel veriyi sınırlı düzeyde temsil edebildiğini göstermektedir. Buna karşın modele gecikme süresinin (Tlag) eklenmesiyle uyumun belirgin biçimde iyileştiği (R^2=0,963; AIC=66,065; MSC=2,570) görülmüştür. Benzer şekilde, hem gecikme süresi hem de maksimum salınabilir fraksiyonu (Fmax) içeren birinci derece modelde de uyumun arttığı (R^2=0,970; AIC=65,580; MSC=2,614) belirlenmiştir. Bu sonuçlar, salımın yalnızca "kalan ilaç miktarına bağlı" tek bir üstel süreçle açıklanamadığını; başlangıçta hidratasyon, polimer şişmesi veya yüzey bariyeri gibi ek süreçlerin salım kinetiğine katkı verdiğini ortaya koymaktadır (Costa ve Lobo, 2001; Unagolla ve Jayasuriya, 2018).

Higuchi modeli, ilacın homojen bir matriks içerisinden Fick tipi difüzyonla salındığını ve salım miktarının zamanın karekökü ile orantılı olduğunu varsayar. Bu modele ait uyum değerlerinin görece yüksek olması (R^2=0,977; AIC=58,942; MSC=3,218), V-BT-NP sisteminde difüzyonun önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak modele başlangıç fraksiyonunu temsil eden F0 parametresinin eklenmesiyle uyumun daha da artması (Higuchi F0: R^2=0,985; AIC=55,803; MSC=3,503) ve F0 değerinin yaklaşık 8

olarak hesaplanması, salımın erken fazında difüzyondan bağımsız bir katkının bulunduğunu göstermektedir. Bu durum, başlangıçta yüzeyde veya matrikse zayıf bağlı ilaç fraksiyonlarının daha hızlı salındığını; daha sonra ise matriks içi difüzyonun baskın hâle geldiğini düşündürmekte ve salımın tek başına difüzyon mekanizması ile açıklanamayacağını ortaya koymaktadır (Zhang, Huo vd., 2010; Unagolla ve Jayasuriya, 2018).

Korsmeyer–Peppas modeli, özellikle erken zamanlı salım verilerini tanımlamak üzere geliştirilmiş yarı-empirik bir yaklaşımdır ve salım mekanizmasını tek bir n üssü ile ifade eder. Bu model için elde edilen R^2=0,995, AIC=43,878 ve MSC=4,587 değerleri, Higuchi ve birinci derece modellere kıyasla daha iyi bir uyuma işaret etmektedir. Hesaplanan n değerinin 0,442 olması, difüzyonun baskın katkısını desteklemekle birlikte, sistemin ideal Fick tipi difüzyondan sapma gösterdiğini de düşündürmektedir. Modele gecikme süresinin eklenmesiyle (Korsmeyer–Peppas Tlag) uyumun daha da iyileştiği (R^2=0,999; AIC=32,046; MSC=5,240; Tlag≈0,40) görülmüştür. Bu durum, salımın başlangıcında belirli bir gecikme veya bariyer fazının bulunduğunu ve bunu takiben difüzyon ağırlıklı bir fazın devreye girdiğini göstermekte; dolayısıyla salımın tek bir kinetik süreçle açıklanamayacağını ortaya koymaktadır (Hasçiçek, Tilkan vd., 2011; Çoban, Usta ve Pinar, 2024).

Weibull modeli, salım mekanizmasını doğrudan fiziksel süreçler üzerinden tanımlamamakla birlikte, salım eğrisinin şeklini ve zaman bağımlı davranışını başarıyla temsil eden ampirik bir yaklaşımdır. Weibull türevleri için elde edilen yüksek uyum değerleri (örneğin Weibull 2: R^2=0,991; AIC=50,623; MSC=3,974) modelin deneysel eğriyi başarılı şekilde tanımladığını göstermektedir. Buna karşın β parametresinin 0,627–0,709 aralığında ve 1'in altında bulunması, salımın başlangıçta daha hızlı, ilerleyen zamanlarda ise yavaşlayan bir karakter sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu eğri şekli, tek bir sabit mekanizmadan ziyade başlangıçta yüzey veya kolay erişilebilir fraksiyonların, devamında ise matriks içi difüzyon ve artan bariyer etkilerinin devreye girdiği çok zaman ölçekli bir sürece işaret etmektedir (Costa ve Lobo, 2001; Unagolla ve Jayasuriya, 2018).

Erozyon veya geometrik değişim temelli Hixson–Crowell, Hopfenberg ve Baker–Lonsdale modelleri değerlendirildiğinde, bazı parametrelerin fiziksel olarak anlamlı olmayan değerlere zorlandığı görülmüştür. Özellikle Hixson–Crowell Tlag modelinde

gecikme süresinin negatif çıkması, modelin deneysel veriyi açıklamak için fiziksel gerçeklikten uzak parametreler kullandığını göstermektedir. Benzer şekilde Hopfenberg modelinde n değerinin 4,5 gibi yüksek bir değere ulaşması ve Baker–Lonsdale modelinde gecikme parametresine ihtiyaç duyulması, salımın yalnızca erozyon veya saf geometrik difüzyon ile açıklanamayacağını ortaya koymaktadır. Bu bulgular, bu modellerin tek başına baskın bir mekanizma varsayımıyla sistem davranışını temsil etmekte yetersiz kaldığını desteklemektedir (Zhang, Huo vd., 2010; Unagolla ve Jayasuriya, 2018).

Peppas–Sahlin 2 modeline ait parametreler incelendiğinde k_1=22,337 ve k_2=−0,959 olarak hesaplanmıştır. Bu model formu (DDSolver çıktındaki denklem) salımı $t^{0.5}$ ve t terimlerinin birleşimiyle açıklamaktadır. k_2'nin negatif bulunması, modelin ikinci bileşeninin (lineer zaman terimine bağlı kısım) uyum sırasında salım eğrisinin belirli bölgelerinde düzeltici/dengeleyici bir rol üstlenebildiğini; dolayısıyla verinin tamamının tek baskın mekanizma ile kusursuz açıklanamadığını işaret eder. Bu nedenle mekanizma yorumu yapılırken, en güvenli yaklaşım "salım davranışının karma/çok bileşenli olduğu" ve model seçiminin bu nedenle Peppas–Sahlin ailesinde toplandığı yönündedir (Hasçiçek, Tilkan vd., 2011; Lefnaoui ve Mostefa, 2013).

Sonuç olarak, DDSolver ile yapılan kinetik modelleme değerlendirmesinde Peppas–Sahlin 2 modeli (Rsqr=0,999; AIC=30,641; MSC=5,790) en başarılı uyumu sağlamış; bu durum V-BT-NP sisteminin salım profilinin tek mekanizmaya indirgenemeyen, difüzyonun baskın olduğu ancak formülasyon/matris etkilerinin de katkı verebildiği bir salım davranışı sergilediğini düşündürmüştür (Zhang, Huo vd., 2010; Hasçiçek, Tilkan vd., 2011; Lefnaoui ve Mostefa, 2013).

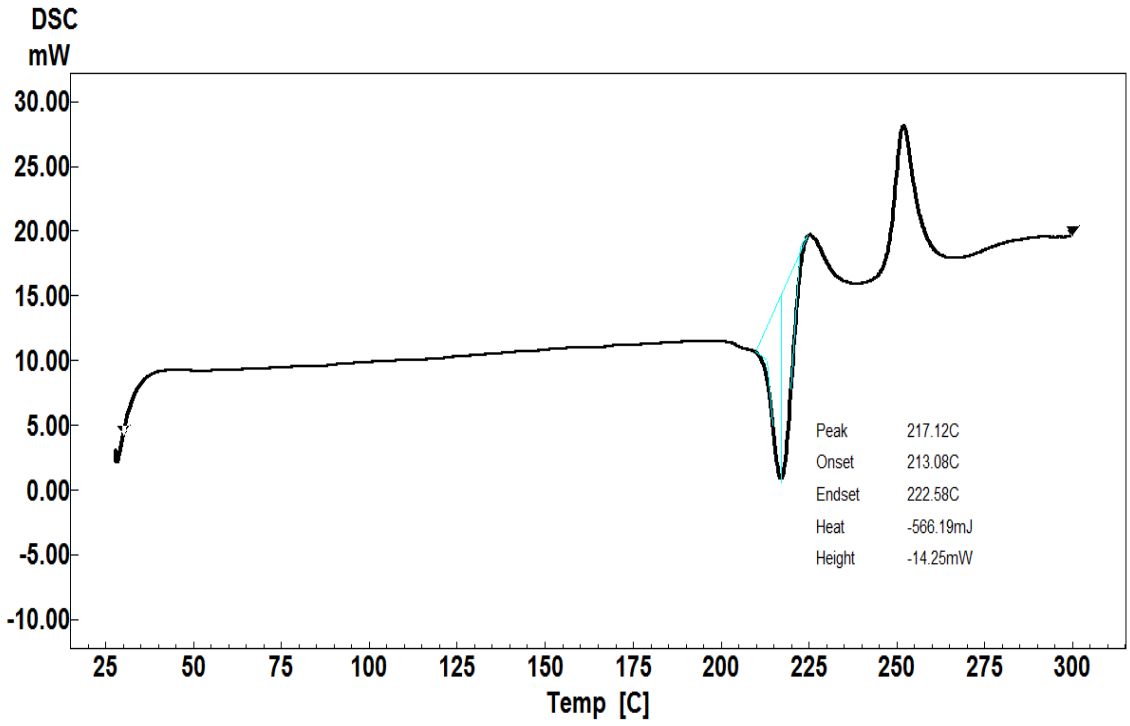
6.6. Katı Hal Karakterizasyonları

6.6.1. Termal Analiz

BT, ERS 100, V-Blank-NP kodlu formülasyon, BT yüklü V-BT-NP kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait termogramlar / DSC eğrileri sırasıyla Şekil 6.38., Şekil 6.39., Şekil 6.40., Şekil 6.41. ve Şekil 6.42.'da sunulmuştur.

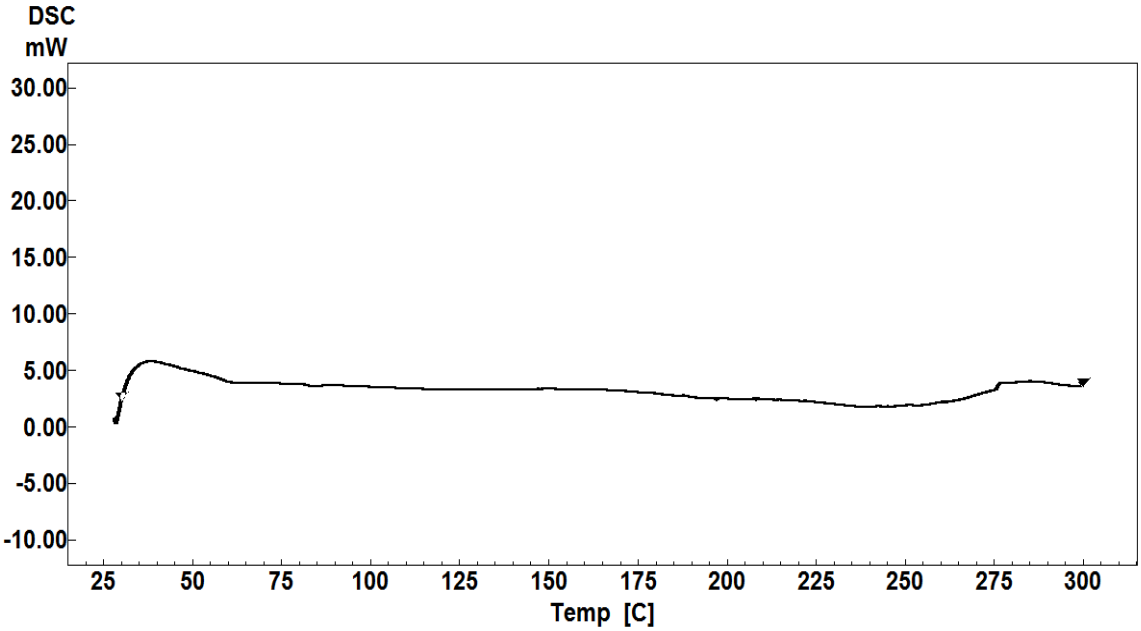
Şekil 6.38.

BT'ye ait DSC Eğrisi



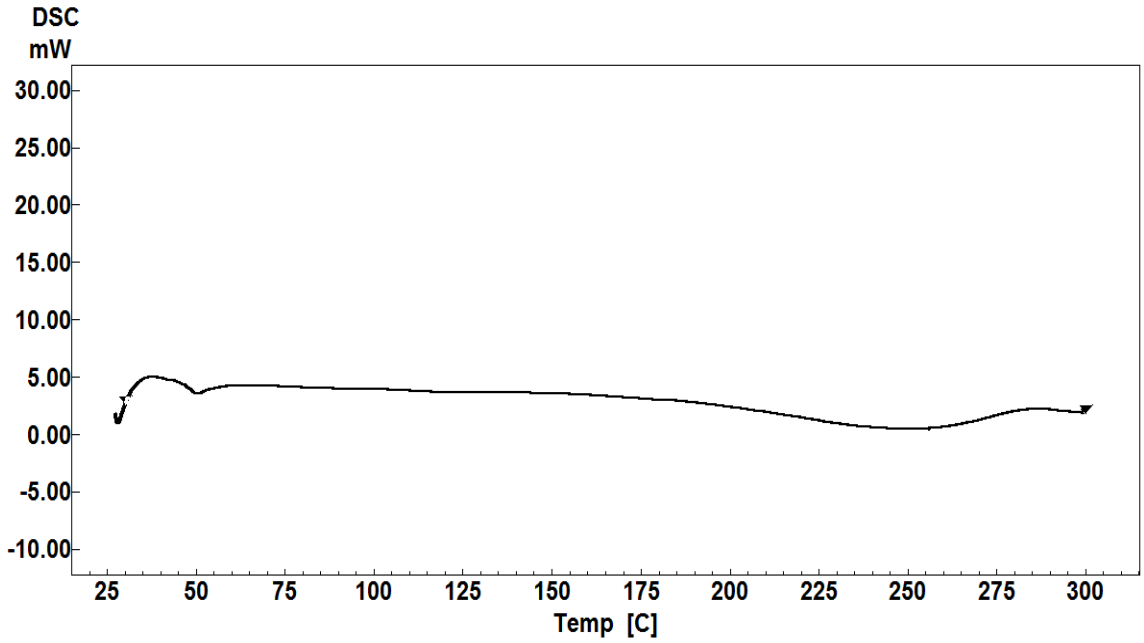
Şekil 6.39.

ERS 100 Polimerine ait DSC Eğrisi



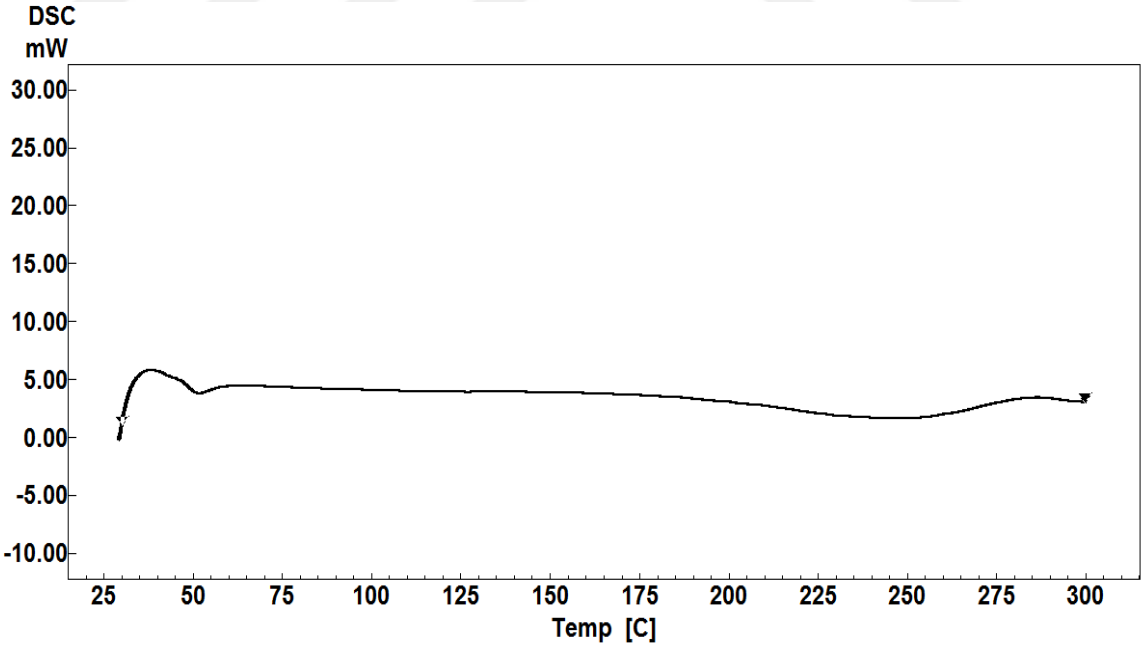
Şekil 6.40.

V-Blank-NP Kodlu Formülasyona ait DSC Eğrisi



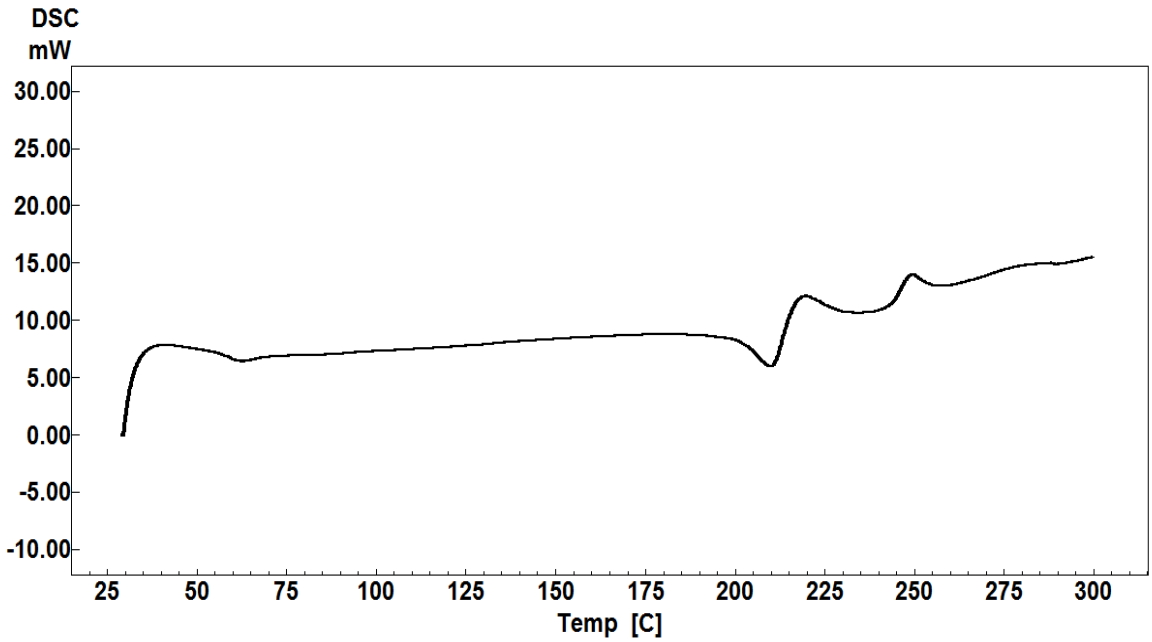
Şekil 6.41.

V-BT-NP Kodlu Formülasyona ait DSC Eğrisi



Şekil 6.42.

Fiziksel Karışıma ait DSC Eğrisi



Saf BT'ye ait DSC eğrisinde, etkin maddenin kristalin yapısını yansıtan karakteristik endotermik erime piki 217.12 °C sıcaklığında gözlenmiştir (Bkz. Şekil 6.38). Bu pik, BT'nin belirgin bir erime davranışı sergilediğini ve kristalin formda bulunduğunu göstermektedir. Erime sürecinin hemen ardından, yaklaşık 225°C civarında başlayan ve 250°C üzerinde şiddetlenen yukarı yönlü ekzotermik sinyaller ise maddenin termal bozunma (dekompozisyon) sürecine girdiğine işaret etmektedir (Bkz. Şekil 6.38). Benzer şekilde ERS 100 polimerine ait DSC eğrisinde, polimerin amorf yapısıyla uyumlu olarak belirgin bir cam geçiş sıcaklığı (Tg) gözlenmiş, keskin bir erime piki izlenmemiştir (Şekil 6.39) (Souza, Maia, Patrício vd., 2016; Nikam, Sahoo, Musale vd., 2023).

V-Blank-NP kodlu nanopartikül formülasyonuna ait DSC eğrisi incelendiğinde, polimer matrisine ait termal davranışın korunduğu ve polimerin karakteristik Tg değerinin nanopartikül formunda da sürdüğü görülmektedir (Bkz. Şekil 6.40). Bu durum, nanopartikül hazırlama sürecinin polimerin temel termal özelliklerini bozmadığını ve taşıyıcı matrisin yapısal bütünlüğünü koruduğunu düşündürmektedir (Akartaş, Ateş ve Reis, 2024; Nikam, Sahoo, Musale vd., 2023).

V-BT-NP kodlu etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonuna ait DSC eğrisinde ise, saf BT'ye ait karakteristik erime pikinin belirgin şekilde gözlenmediği dikkat

çekmektedir (Bkz. Şekil 6.41). Bu durum, BT'nin nanopartikül matrisi içerisinde moleküler düzeyde dağılmış olabileceğini veya amorf bir forma geçtiğini düşündürmektedir. Etkin maddenin kristalin pikinin kaybolması, BT'nin polimer matrisine başarılı şekilde enkapsüle edildiğine ve kristal yapısının nanopartikül oluşumu sırasında baskılandığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, DSC analizinin tek başına kimyasal bağ oluşumunu kanıtlamadığı, gözlenen değişimlerin fiziksel etkileşimler ve matris etkisiyle ilişkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Rosiak, Tykarska ve Cielecka-Piontek, 2023; Nandi, Ajiboye, Patel vd., 2021; Rojek, Bartyzel vd., 2024).

Fiziksel karışıma ait DSC eğrisi değerlendirildiğinde hem BT'ye hem de polimere ait karakteristik termal olayların büyük ölçüde korunduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 6.42). Bu durum, fiziksel karışımda etkin madde ve polimer arasında belirgin bir termal etkileşim oluşmadığını, buna karşın bileşenlerin yalnızca mekanik olarak bir arada bulunduğunu göstermektedir (Lin, 2021; Rojek, Bartyzel vd., 2024).

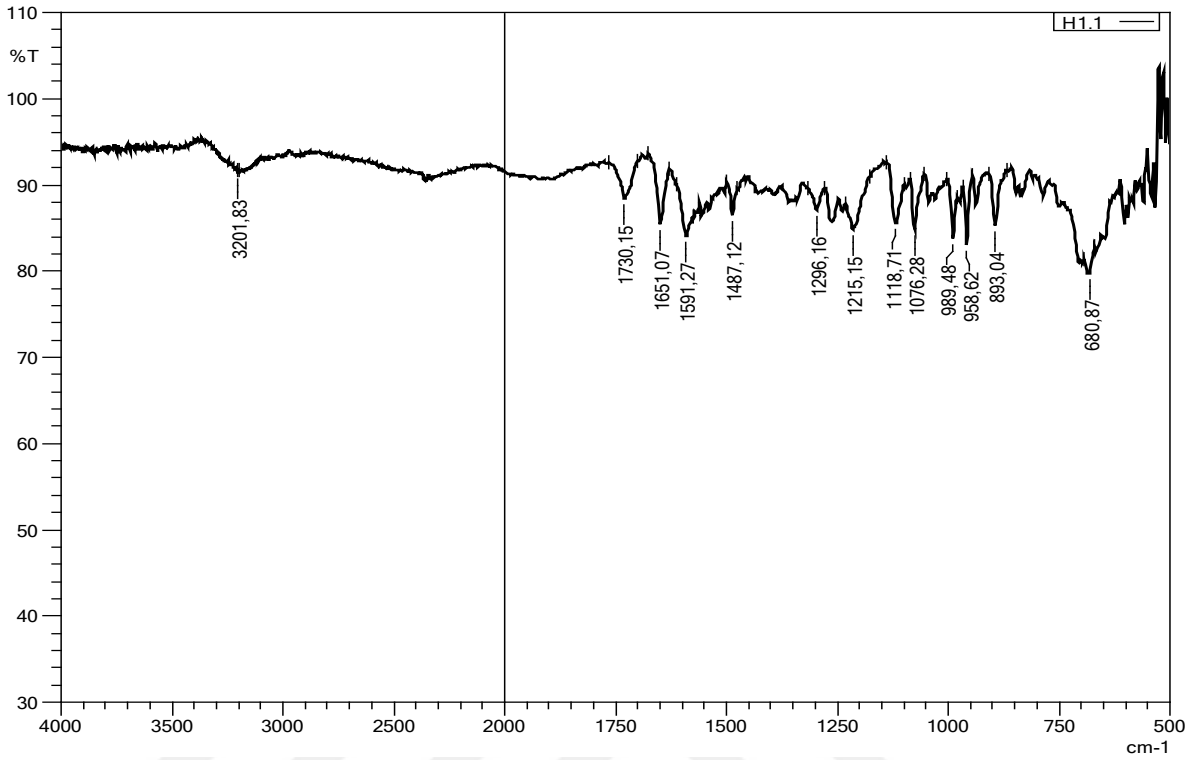
Tüm DSC bulguları birlikte değerlendirildiğinde, V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonunda BT'nin kristalin yapısının baskılandığı ve etkin maddenin polimer matris içerisinde amorf veya moleküler düzeyde dağılmış bir formda bulunduğu sonucuna varılmaktadır. Bu durum, nanopartikül sistemlerde sıklıkla hedeflenen homojen ilaç dağılımı ve potansiyel kontrollü salım davranışı açısından olumlu bir gösterge olarak değerlendirilebilir (Rosiak, Tykarska ve Cielecka-Piontek, 2023; Nandi, Ajiboye, Patel vd., 2021; Sharma ve Chauhan, 2020).

6.6.2. FT-IR Analizleri

BT, ERS 100, V-Blank-NP kodlu formülasyon, BT yüklü V-BT-NP kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 6.43., Şekil 6.44., Şekil 6.45., Şekil 6.46. ve Şekil 6.47.'de sunulmuştur.

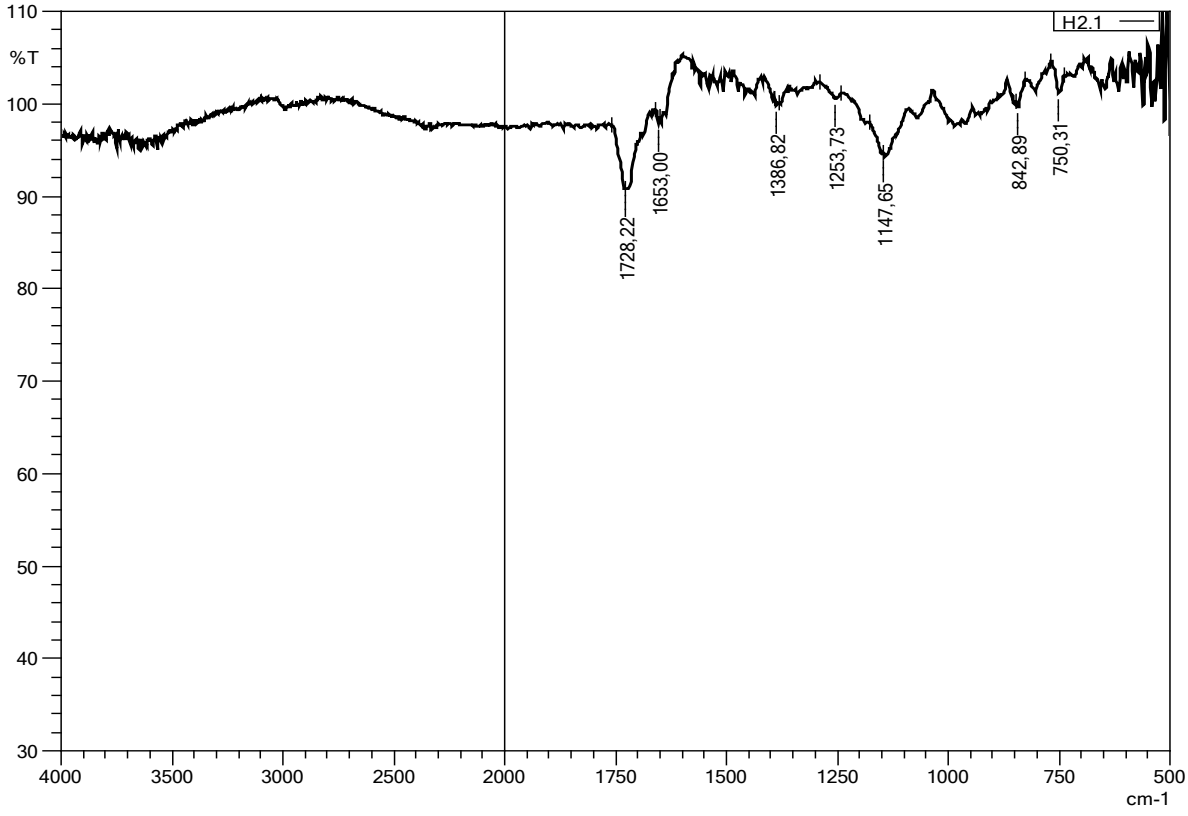
Şekil 6.43.

BT'ye ait FT-IR Spektrumu



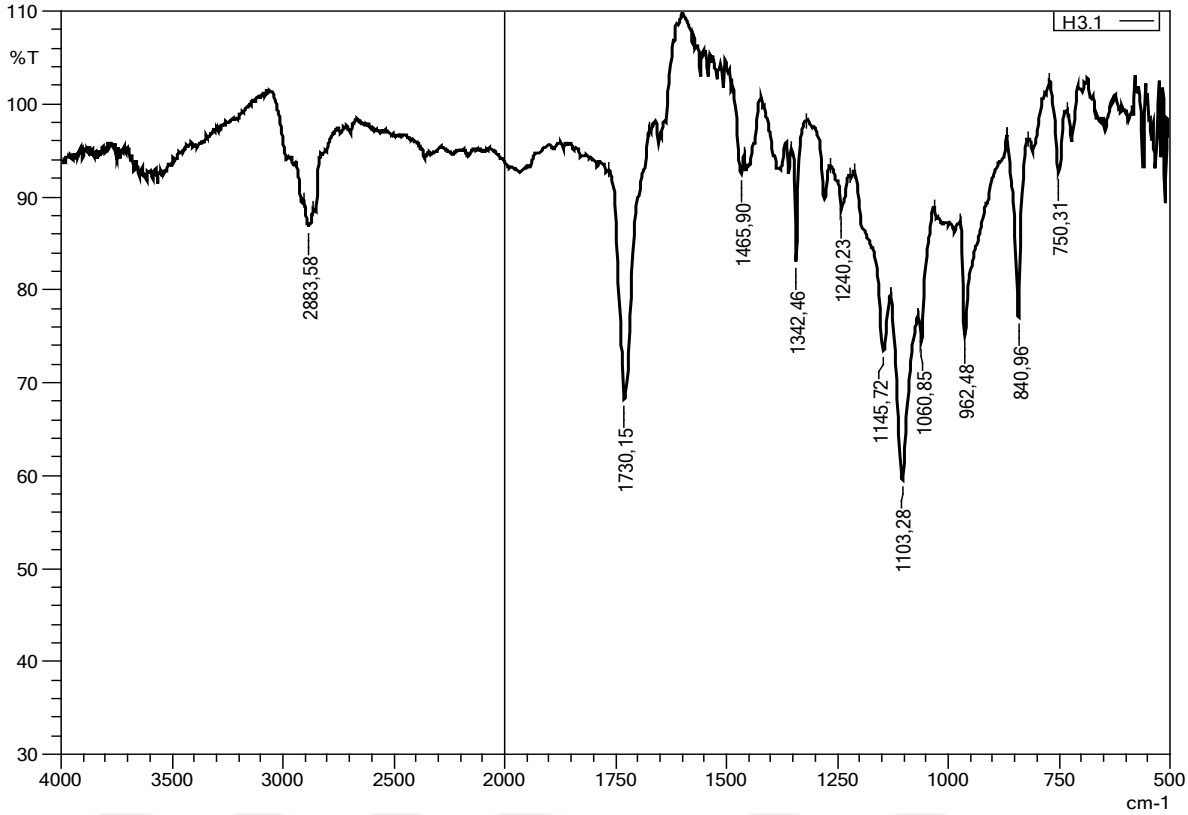
Şekil 6.44.

ERS 100 Polimerine ait FT-IR Spektrumu



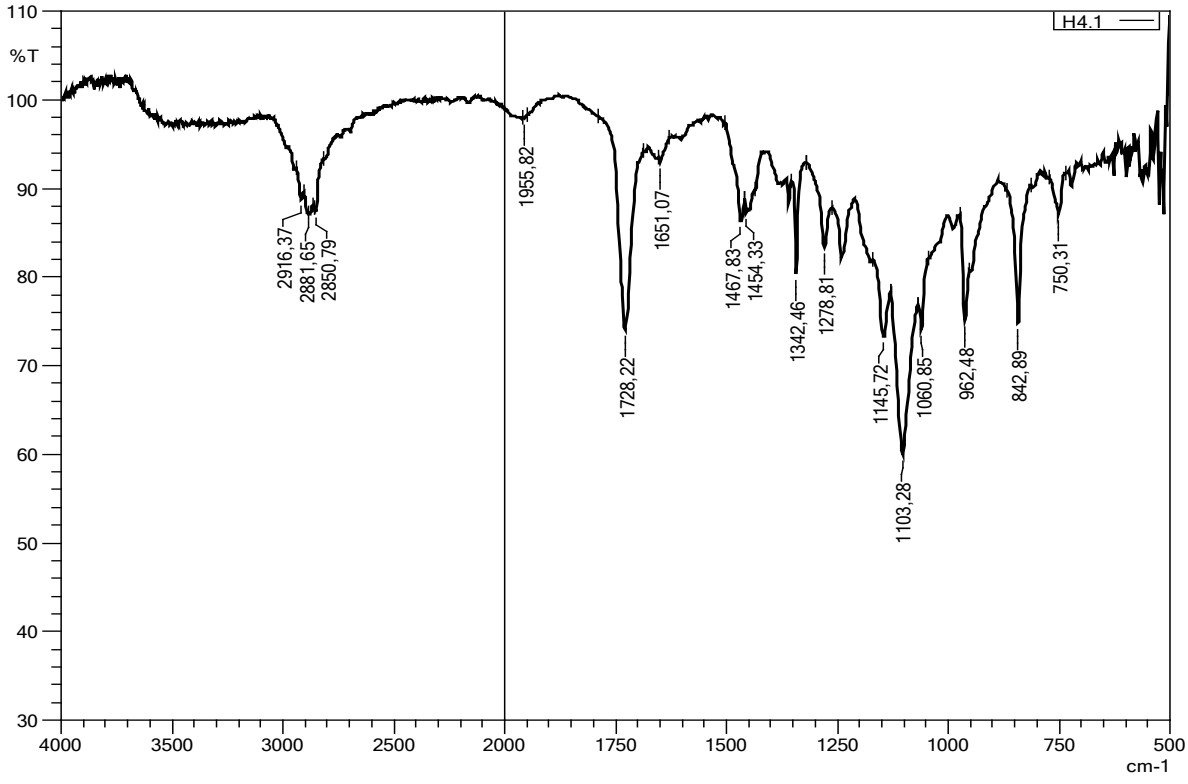
Şekil 6.45.

V-Blank-NP Kodlu Formülasyona ait FT-IR Spektrumu



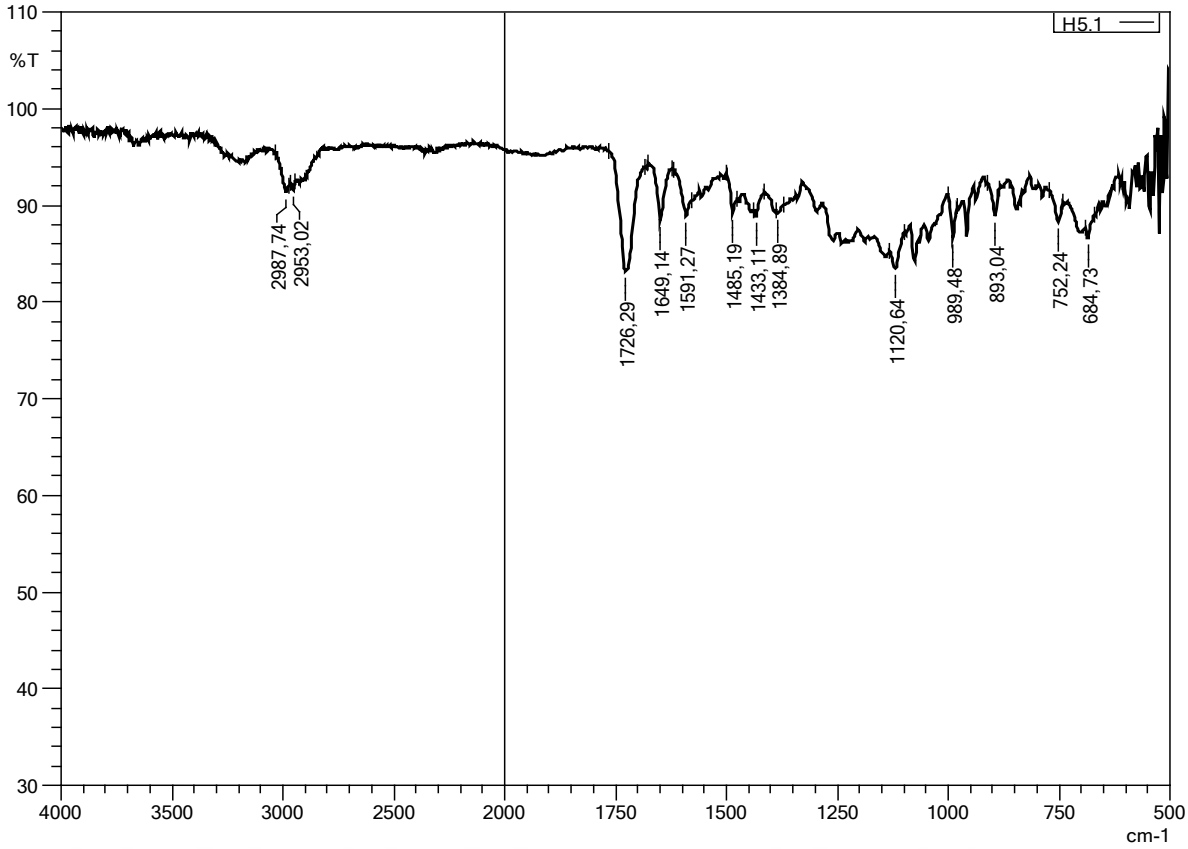
Şekil 6.46.

V-BT-NP Kodlu Formülasyona ait FT-IR Spektrumu



Şekil 6.47.

Fiziksel Karışıma ait FT-IR Spektrumu



Saf BT'ye ait FT-IR spektrumunda etkin maddenin fonksiyonel gruplarına karşılık gelen karakteristik bantlar belirgin şekilde izlenmektedir. 3201.83 cm^{-1} civarındaki geniş bant, BT'nin yapısında bulunan hidrojen bağlarına katılan N–H/O–H gerilme titreşimleriyle (özellikle tartarat kısmındaki hidroksil grupları ve/veya amin/imidazolin N–H etkileşimleri) ilişkilendirilmektedir. 1730.15 cm^{-1}'de gözlenen kuvvetli bant, tartarat kısmındaki karbonil (C=O) gerilme titreşimlerini temsil eder. 1651.07 cm^{-1} bandı ise BT'nin azot içeren yapısına bağlı C=N/C=C karakterli gerilme titreşimleri ve/veya N–H bükülmesi gibi titreşimlerle ilişkilendirilebilir (bu bölge BT'de yapısal olarak sık görülen bir bölgedir). Aromatik halka titreşimleri kapsamında 1591.27 cm^{-1} bandı aromatik C=C gerilme titreşimlerine karşılık gelirken, 1487.12 cm^{-1} bandı aromatik iskelet titreşimleri ve/veya C–H bükülme titreşimleriyle ilişkilendirilmektedir. 1296.16 ve 1215.15 cm^{-1} bantları, BT'nin amin/heterosiklik yapısına bağlı C–N gerilme titreşimleri ile uyumludur. Parmak izi bölgesinde 1118.72 ve 1076.28 cm^{-1} civarındaki bantlar tartarat kısmındaki C–O gerilme titreşimleri (ve/veya C–N katkıları) ile ilişkilendirilirken, 989.48, 958.62 ve 893.04 cm^{-1} bantları aromatik/heterosiklik yapıya

ait karakteristik halka titreşimleri ve düzlem dışı C–H titreşimleriyle değerlendirilebilir. 680.87 cm^{-1} bandı da aromatik yapıya ait düzlem dışı C–H titreşimleriyle uyumludur. Bu bantların varlığı, saf BT'nin kimyasal bütünlüğünü koruduğunu ve spektrumun literatürde bildirilen BT karakteristik FT-IR profiliyle genel olarak uyumlu olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 6.43). (Sharma ve Chauhan, 2020; Souza, Maia, Patrício vd., 2016).

Eudragit® RS 100 polimerine ait FT-IR spektrumunda, 1728 cm^{-1}'de metakrilat ester gruplarına ait karakteristik C=O gerilme bandı belirgindir. Ayrıca 1653 cm^{-1} civarındaki bant, polimer omurgasına ait titreşimlerle ilişkilendirilmiştir. 1386 cm^{-1}'de gözlenen bant CH_3 bükülme titreşimlerine karşılık gelirken, 1253 ve 1143 cm^{-1}'deki bantlar ester bağlarına ait C–O–C gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. 842–750 cm^{-1} aralığındaki bantlar ise metakrilat zincirlerine ait düzlem dışı C–H titreşimleriyle ilişkilendirilmektedir. Bu FT-IR profili, Eudragit® RS 100'ün literatürde bildirilen amorf polimer yapısıyla uyumludur (Nikam, Sahoo, Musale vd., 2023; Akartaş, Ateş ve Reis, 2024).

V-Blank-NP kodlu nanopartikül formülasyonuna ait FT-IR spektrumunda, Eudragit® RS 100'e ait karakteristik bantların (ester C=O ~1730 cm^{-1} ve C–O–C/C–O bölgesi ~1240–1145 cm^{-1} ile 840–750 cm^{-1} aralığı) büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Spektrumda bant şiddetlerinde değişim ve küçük dalga sayısı kaymaları gözlenmekle birlikte, yeni bir reaksiyon ürünü oluşumunu veya polimerin kimyasal yapısında bozunmayı düşündürecek belirgin bir yeni fonksiyonel grup bandı tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, nanopartikül hazırlama sürecinin taşıyıcı polimerin kimyasal bütünlüğünü genel olarak koruduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 6.45) (Akartaş, Ateş ve Reis, 2024; Rojek, Bartyzel vd., 2024).

V-BT-NP kodlu nanopartikül formülasyonuna ait FT-IR spektrumunda, taşıyıcı polimere ait karakteristik bantların (ester C=O bandı ~1728 cm^{-1} ve C–O–C/C–O bölgesi ~1278–1060 cm^{-1} ile 842–750 cm^{-1} aralığı) büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Spektrum genel profili V-Blank-NP ile benzer olup bazı bantlarda şiddet değişimi ve bant genişlemesi dikkat çekmektedir. Saf BT'ye ait bazı karakteristik bantların (özellikle yüksek dalga sayısı bölgesindeki N–H/O–H bandı gibi) formülasyonda belirgin şekilde izlenememesi, etkin maddenin polimer matrisi içinde düşük oran/örtüşme etkisiyle maskelenmesi veya matrise dağılmış/etkileşimli durumda

bulunması ile ilişkilendirilebilir. Yeni bir fonksiyonel grup oluşumunu gösterecek belirgin bir bant gözlenmemesi, BT ile polimer arasında kimyasal bağ oluşumundan ziyade fiziksel etkileşimlerin (örn. hidrojen bağı/iyonik etkileşimler) baskın olduğunu düşündürmektedir (Bkz. Şekil 6.46) (Lin, 2021; Rosiak, Tykarska ve Cielecka-Piontek, 2023).

Fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumu incelendiğinde, hem BT'ye hem de Eudragit® RS 100'e ait karakteristik bantların genel olarak korunduğu görülmektedir. Ester karbonil bandının ~1726 cm^{-1} civarında izlenmesi ve parmak izi bölgesinde her iki bileşene ait bantların birlikte bulunması, spektrumun iki bileşenin üst üste binmiş (süperpoze) profili şeklinde olduğunu göstermektedir. Bazı bölgelerde bant şiddetlerinde değişim ve bantların örtüşmesine bağlı küçük kaymalar gözlenebilmekle birlikte, yeni bir fonksiyonel grup oluşumunu düşündürecek belirgin bir bant ortaya çıkmamıştır. Bu durum, fiziksel karışımda BT ile polimer arasında kimyasal bağ oluşumundan ziyade bileşenlerin ağırlıklı olarak mekanik/fiziksel olarak bir arada bulunduğunu desteklemektedir (Bkz. Şekil 6.47) (Lin, 2021; Rojek, Bartyzel vd., 2024).

FT-IR analizinden elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, BT'nin nanopartikül formülasyonu içerisinde kimyasal bütünlüğünü koruduğu ve polimer matrisi ile esas olarak fiziksel etkileşimler yoluyla bulunduğu sonucuna varılmaktadır. Bu sonuçlar, DSC analizinden elde edilen bulgularla uyumlu olup etkin maddenin polimer matris içerisinde homojen şekilde dağılmış olabileceğini desteklemektedir (Lin, 2021; Akartaş, Ateş ve Reis, 2024).

6.7. Sterilite Kontrolü

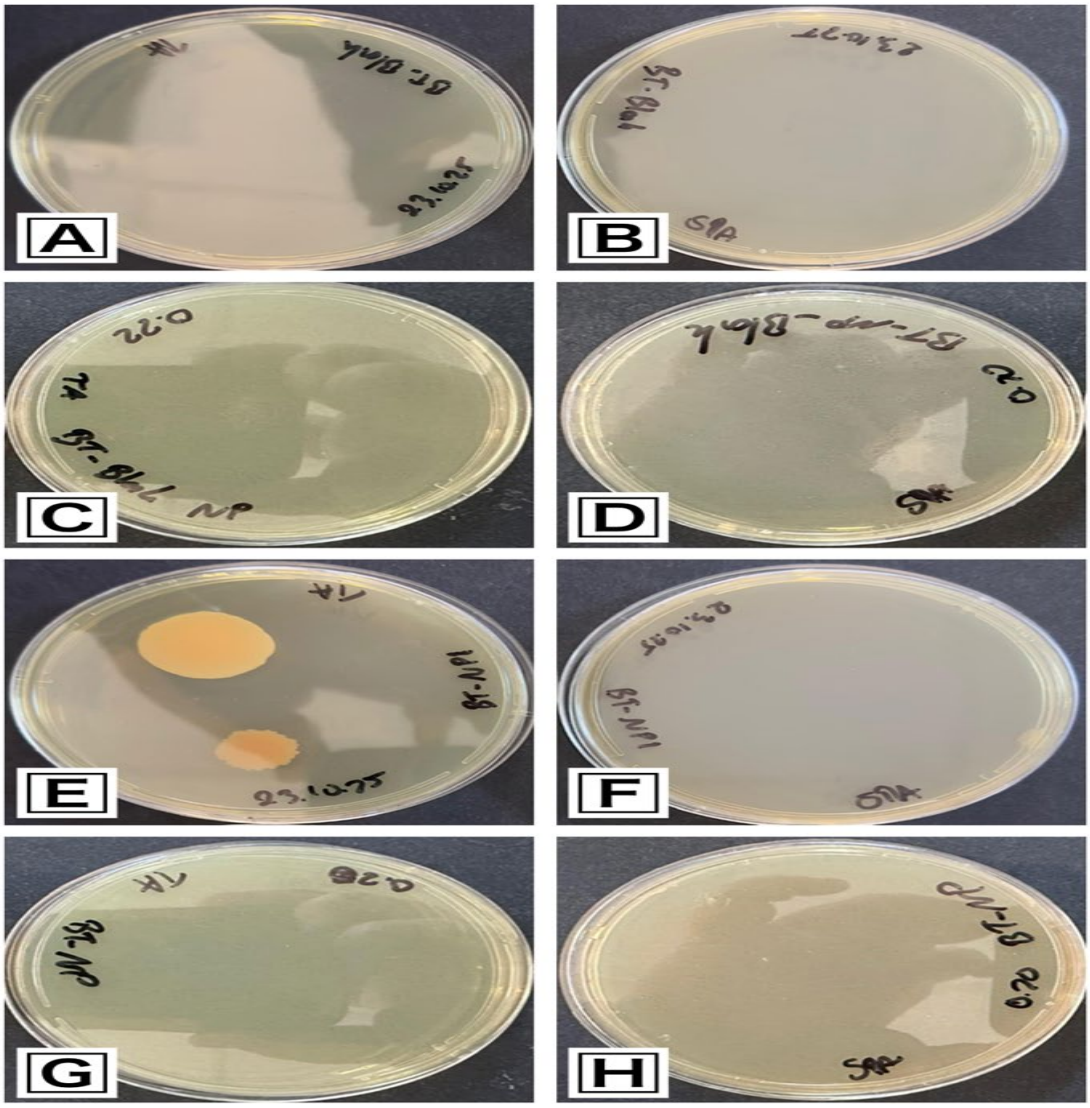
Her oftalmik ürün, ürünün raf ömrü boyunca son kabında steril olmasını sağlamak için onaylanmış koşullar altında üretilmesi gerekmektedir (Missel vd., 2016). Tüm oftalmik preparatlar tamamen steril olmalı ve mümkün olduğunda, kullanım süresince steriliteyi sağlamak için uygun bir koruyucu eklenmelidir. Oftalmik ürünlerde steril ürün elde etmek için en çok kullanılan sterilite yöntemleri; buhar sterilizasyonu (otoklavlama), kuru ısı sterilizasyonu, gaz sterilizasyonu, iyonlaştırıcı radyasyon ile sterilizasyon, filtrasyon ile sterilizasyondur. Oftalmik ürünlerde son kaplarında otoklavlama ile sterilize etmek tercih edilse de, bu yöntem formülasyonun termal kararsızlığı nedeniyle uygun olmayabilir. Alternatif olarak, filtrasyon veya ışınlama gibi diğer sterilizasyon

prosedürleri kullanılabilir. Diğer bir seçenek de formülasyonun sterilize edilmiş tüm bileşenlerinin aseptik koşullar altında bir araya getirilmesidir (Allen vd., 2013; Gibson, 2016).

V-Blank-NP ve V-BT-NP koldu formülasyonlara ait filtrasyon sonrası TA ve SDA besiyerlerindeki görünüm örnekleri Şekil 6.48'de sunulmuştur. Analizler incelendiğinde hem blank hem de aktif formülasyonlarda 0,45 µm filtrasyon sonrası besiyerlerinde mikrobiyal üreme gözlenirken, 0,20 µm filtrasyon sonrası hiçbir besiyerinde mikrobiyal gelişim saptanmamıştır.

Şekil 6.48.

Sterilite Analiz Sonuçları



A:** V-Blank-NP kodlu formülasyonun 0,45 µm filtrasyonu sonrası TA besiyerindeki gelişim görüntüsü, **B:** V-Blank-NP kodlu formülasyonun 0,45 µm filtrasyonu sonrası SDA besiyerindeki gelişim görüntüsü, **C:

V-Blank-NP kodlu formülasyonun 0,20 µm filtrasyonu sonrası TA besiyerindeki gelişim görüntüsü, ***D:*** *V-Blank-NP kodlu formülasyonun 0,20 µm filtrasyonu sonrası SDA besiyerindeki gelişim görüntüsü,* ***E:*** *V-BT-NP kodlu formülasyonun 0,45 µm filtrasyonu sonrası TA besiyerindeki gelişim görüntüsü,* ***F:*** *V-BT-NP kodlu formülasyonun 0,45 µm filtrasyonu sonrası SDA besiyerindeki gelişim görüntüsü,* ***G:*** *V-BT-NP kodlu formülasyonun 0,20 µm filtrasyonu sonrası TA besiyerindeki gelişim görüntüsü,* ***H:*** *V-BT-NP kodlu formülasyonun 0,20 µm filtrasyonu sonrası SDA besiyerindeki gelişim görüntüsü,*

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, filtrasyonda kullanılan por çapının farmasötik formülasyonların mikrobiyolojik sterilitesinin sağlanmasında kritik bir rol oynadığını ortaya koymuştur. 0,20 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilen tüm örneklerde gerek TA besiyerinde gerekse SDA besiyerinde mikrobiyal üreme gözlenmemiştir (Şekil 6.48-C, Şekil 6.48-D, Şekil 6.48-G, Şekil 6.48-H). Buna karşılık, 0,45 µm por çaplı filtre kullanılarak filtrelenen örneklerde, her iki besiyerinde de mikrobiyal gelişim tespit edilmiştir (Şekil 6.48-A, Şekil 6.48-B, Şekil 6.48-E, Şekil 6.48-F). Bu durum, literatürde iyi bilinen sterilizan filtrasyon prensipleri ile uyumludur. Farmasötik uygulamalarda 0,22 µm (veya 0,20 µm) por çapına sahip filtreler, mikroorgaizmaların büyük çoğunluğunu tutabilme kapasitesine sahip oldukları için "sterilizan filtre" olarak kabul edilmektedir (Jornitz, 2019). Buna karşın 0,45 µm por çapına sahip filtreler, mikrobiyal yükün azaltılmasında etkili olmakla birlikte tam sterilite garantisi sağlamamaktadır (Sandle, 2025). Bu bilinen bir gerçektir fakat bu tez çalışmasında 0,45 µm por çapına sahip filtrenin öncelikle denenmesinin amacı formülasyon bileşenlerin herhangi birinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığının araştırılması amaçlıdır.

Tarihsel olarak, özellikle *Brevundimonas diminuta* gibi çok küçük boyutlu bakterilerin (~0,3 µm), 0,45 µm por çapına sahip filtrelerden geçebildiği ve bu nedenle 0,45 µm por çapına sahip filtreler ile filtrasyonun sterilizasyon amacıyla yetersiz kaldığı rapor edilmiştir (Jornitz, 2019). Bu bulgular doğrultusunda, günümüzde steril farmasötik ürünlerin üretiminde 0,20–0,22 µm filtrasyon standardı benimsenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler de bu literatürü desteklemekte; 0,45 µm por çapına sahip filtreler ile filtrasyonun nanofarmasötik formülasyonlarda mikrobiyal kontaminasyonu tamamen ortadan kaldırmadığını göstermektedir. Ayrıca hem boş formülasyonda (V-Blank-NP) hem de BT yüklü V-BT-NP kodlu formülasyonda benzer sonuçların elde edilmesi, formülasyon bileşenlerinin bakteriyostatik veya fungistatik bir etki göstermediğini düşündürmektedir. Bu durum, kullanılan sterilite test yönteminin

USP <61>'de tanımlanan yöntem uygunluğu (method suitability) kriterlerini karşıladığını desteklemektedir (USP, 2024). Nanofarmasötik sistemler, partikül boyutları ve taşıyıcı yapıları nedeniyle sterilizasyon açısından ek zorluklar içerebilmektedir. Ancak bu çalışmada kullanılan membran filtrasyon yaklaşımı, nanofarmasötiklerin filtrelenebilirliğinin uygun olduğunu ve doğru por çapı seçildiğinde sterilitenin sağlanabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle oftalmik uygulamalar için tasarlanan preparatlarda, sterilite kritik bir kalite parametresi olduğundan, bu sonuçlar klinik güvenlik açısından önem taşımaktadır (Sandle, 2025).

Özetle elde edilen görsel ve nitel bulgular, filtrasyonda kullanılan filtre por çapının sterilite sağlanmasında belirleyici bir faktör olduğunu ortaya koymuş 0,45 µm membran filtrasyon sonrası gerek TA gerekse SDA besiyerlerinde mikrobiyal gelişim gözlenmesi, bu por çapının farmasötik formülasyonlarda tam sterilite sağlamada yetersiz kalabildiğini göstermiştir. Buna karşın 0,20 µm por çapına sahip filtre kullanıldığında, her iki besiyerinde de mikrobiyal üreme saptanmamıştır. Blank (V-Blank-NP) ve BT yüklü V-BT-NP kodlu formülasyonların her ikisinde de benzer sonuçların elde edilmesi, formülasyon bileşenlerinin mikroorganizma üremesini baskılayıcı bir etki göstermediğini ve kullanılan test yönteminin uygunluğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, sterilite testinin yanlış negatif sonuç verme riskinin düşük olduğunu düşündürmektedir.

Bununla birlikte, filtre çapının nanopartikül süspansiyonları üzerinde oluşturabileceği olası fiziksel etkiler bu tez kapsamında ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Filtrasyon sırasında partikül boyutu filtre gözenek çapına yakın veya daha büyük olan nanopartiküllerin kısmi tutuluma uğraması, sistemden uzaklaştırılması ya da filtrasyon sonrası partikül dağılımında değişim meydana gelmesi olasıdır. Bu tez çalışmasında aseptik filtrasyon uygulaması ön deneme niteliğinde gerçekleştirilmiş olup, filtrasyon öncesi ve sonrası partikül konsantrasyonu, kütle dengesi ve geri kazanım oranlarının nicel olarak hesaplanması hedeflenmemiştir. İlerleyen çalışmalarda, filtrasyon sürecinin nanopartikül kaybı üzerindeki etkilerinin ayrıntılı biçimde değerlendirilmesi; filtrasyon öncesi ve sonrası partikül boyutu dağılımı, zeta potansiyeli ve yükleme verimi karşılaştırmaları yapılarak olası kayıpların hesaplanması ve telafi edilebilmesine yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

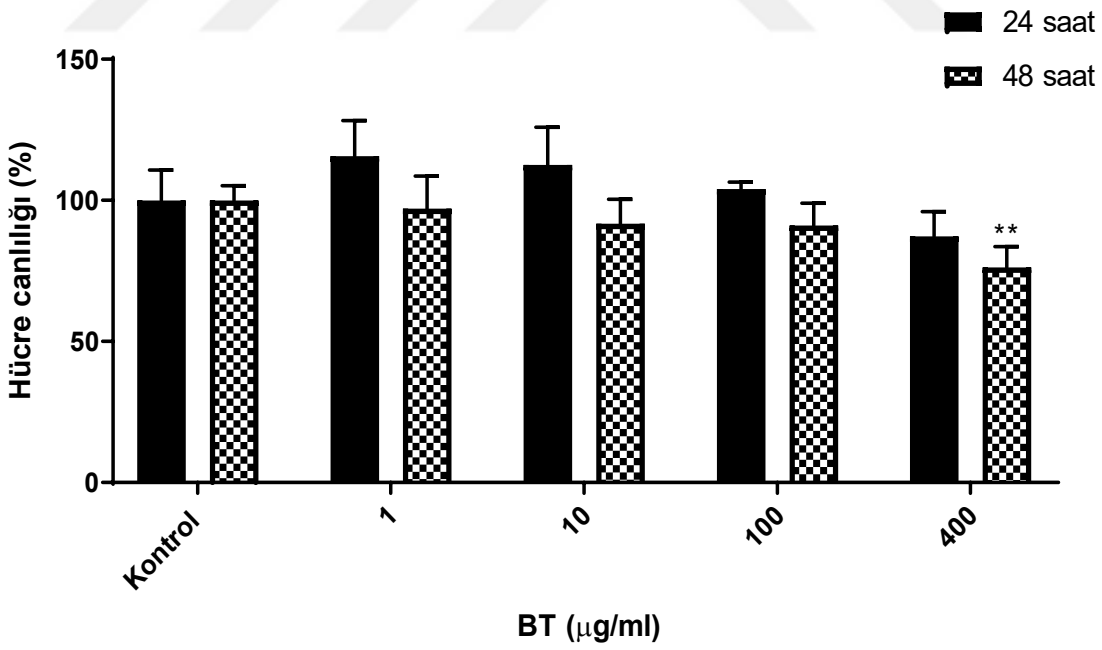
6.8. Biyolojik Aktivite Testleri

6.8.1. R28 Hücrelerinde Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonlar ve tBHP Test Konsantrasyonu

MTT testi sonuçlarına göre BT uygulaması hücre canlılığı üzerinde sınırlı bir etki göstermiştir. 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığı 1, 10, 100 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %115,7, %112,6, %104,0 ve %87,2 olarak belirlenmiş olup, test edilen konsantrasyon aralığında hücre canlılığı %50'nin altına düşmemiştir. 48 saatlik inkübasyonda ise hücre canlılığı aynı konsantrasyonlarda sırasıyla %97,1, %91,7, %91,1 ve %76,3 olarak saptanmış, en yüksek konsantrasyonda dahi %50'nin üzerinde kalmıştır. Bu nedenle 24 ve 48 saat için IC_{50} değerleri >400 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 6.49.).

Şekil 6.49.

*R28 Hücrelerinde BT'nin Farklı Konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µg/mL) Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri. Hücre Canlılığı, 24 ve 48 Saatlik Uygulamaların Ardından Belirlenmiştir. Veriler, İki Bağımsız Deneyden Elde Edilen Ortalama ± Standart Sapma (SD) Olarak Sunulmuştur (n = 6). Anlamlı Farklılıklar, **p < 0,01 ile Gösterilirken, Anlamlı Olmayan Farklılıklar ns (p > 0,05) Olarak İfade Edilmiştir.*

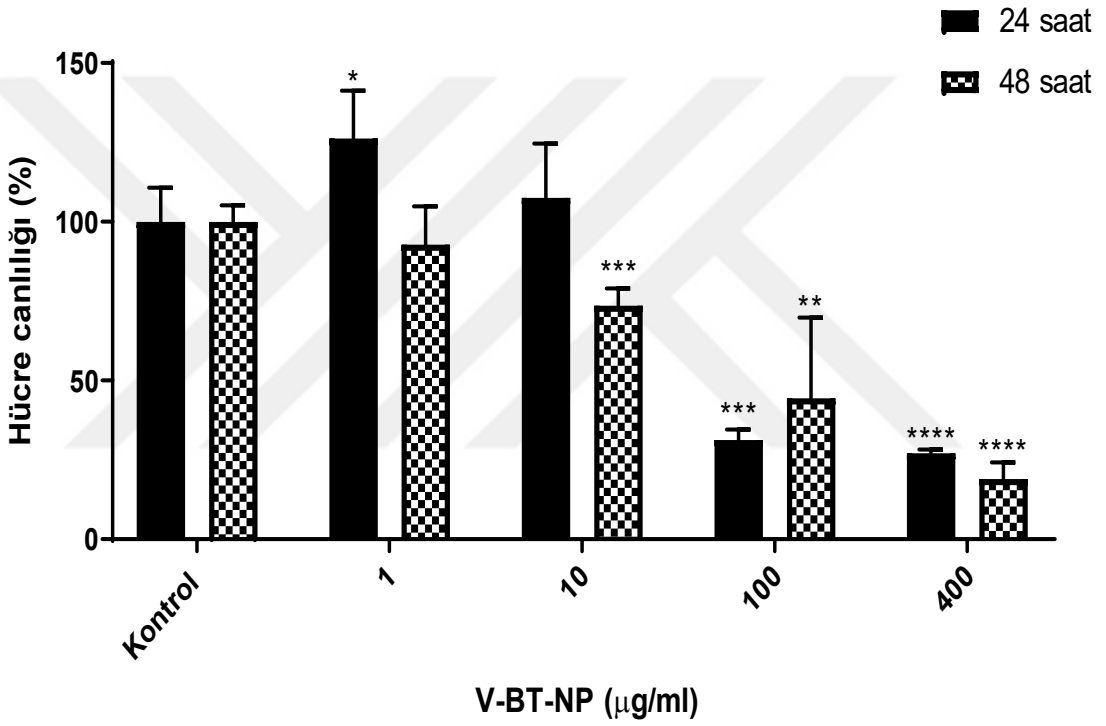


MTT testi sonuçlarına göre V-BT-NP uygulaması hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak belirgin şekilde azaltmıştır. 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığı 1, 10, 100 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %126,3, %107,6, %31,2 ve %27,1 olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonda ise hücre canlılığının aynı

konsantrasyonlarda sırasıyla %92,8, %73,5, %44,4 ve %19,0'a düştüğü saptanmıştır. Bu sonuçlara paralel olarak IC_{50} değerleri 24 saat için 77,65 µg/mL, 48 saat için 233,96 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 6.50.).

Şekil 6.50.

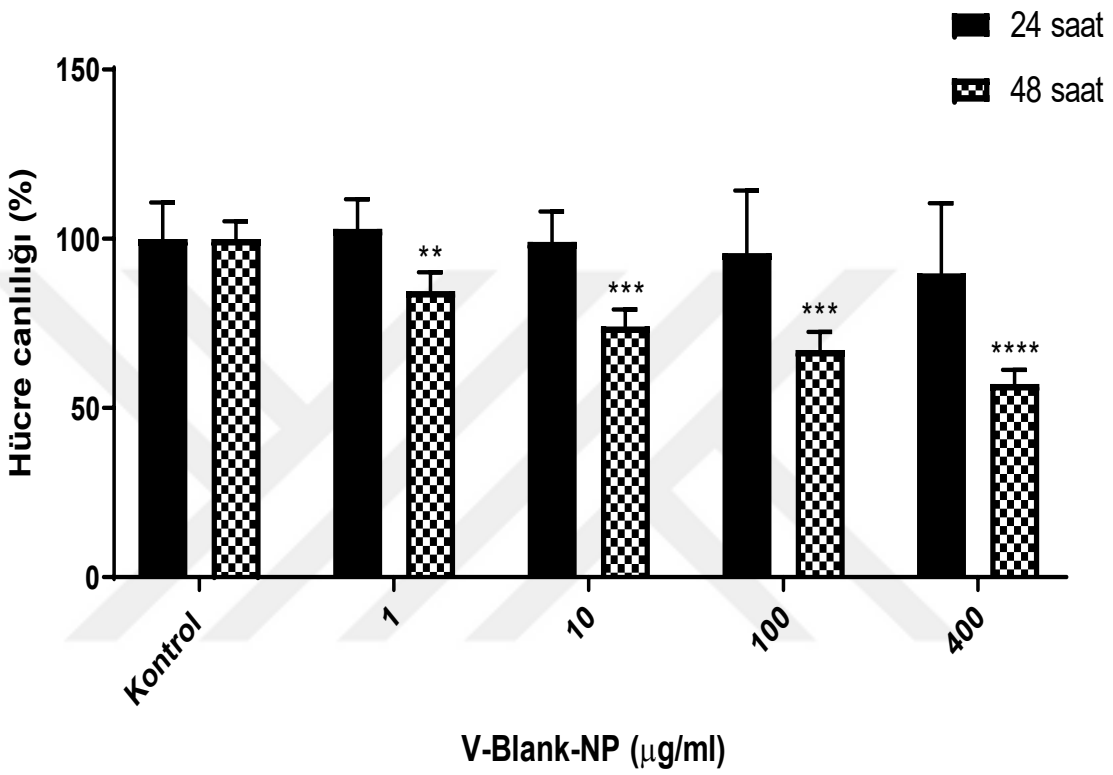
*R28 Hücrelerinde V-BT-NP'nin Farklı Konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µg/mL) Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri. Hücre Canlılığı, 24 ve 48 Saatlik Uygulamaların Ardından Belirlenmiştir. Veriler, İki Bağımsız Deneyden Elde Edilen Ortalama ± Standart Sapma (SD) Olarak Sunulmuştur (n = 6). Anlamlı Farklılıklar; *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ve ****p < 0,0001 ile Gösterilirken, Anlamlı Olmayan Farklılıklar ns (p > 0,05) Olarak İfade Edilmiştir.*



MTT testi sonuçlarına göre V-Blank-NP uygulaması hücre canlılığını sınırlı düzeyde etkilemiştir. 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığı 1, 10, 100 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %103,0, %99,1, %95,8 ve %89,8 olarak belirlenmiş olup, test edilen konsantrasyon aralığında hücre canlılığı %50'nin altına düşmemiştir. 48 saatlik inkübasyonda ise hücre canlılığı aynı konsantrasyonlarda sırasıyla %84,5, %74,1, %67,1 ve %57,1 olarak saptanmış, buna rağmen en yüksek konsantrasyonda dahi %50'nin üzerinde kalmıştır. Bu nedenle 24 ve 48 saat için IC_{50} değerleri >400 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 6.51.).

Şekil 6.51.

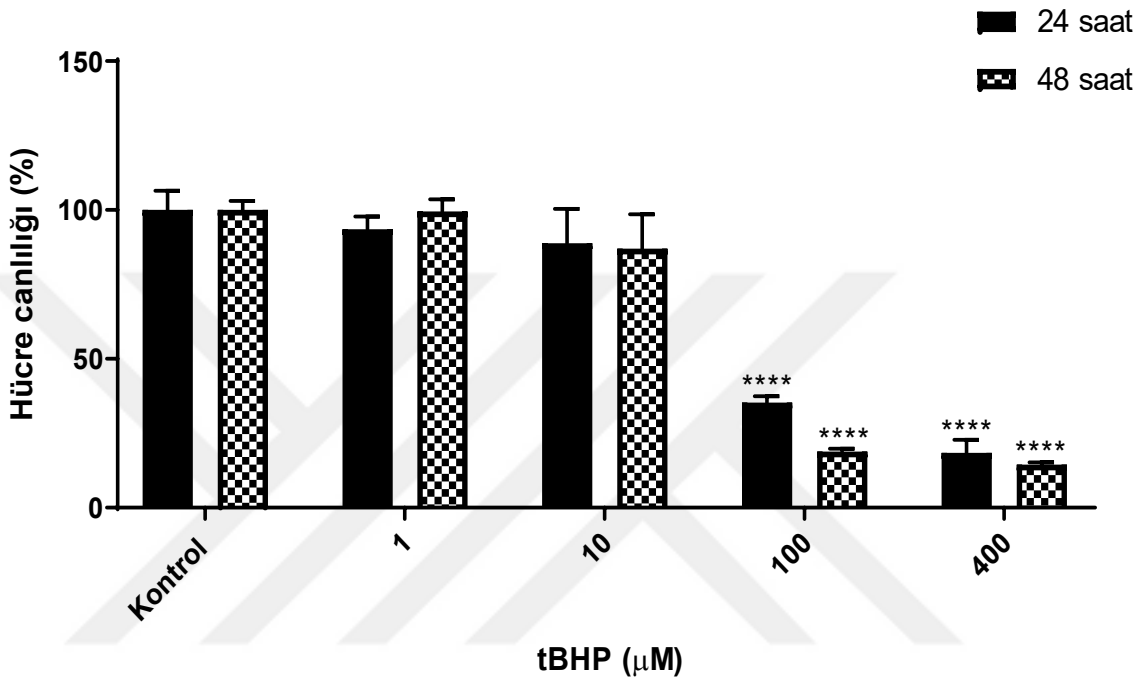
*R28 Hücrelerinde V-Blank-NP'nin Farklı Konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µg/mL) Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri. Hücre Canlılığı, 24 ve 48 Saatlik Uygulamaların Ardından Belirlenmiştir. Veriler, İki Bağımsız Deneyden Elde Edilen Ortalama ± Standart Sapma (SD) Olarak Sunulmuştur (n = 6). Anlamlı Farklılıklar; **p < 0,01, ***p < 0,001 ve ****p < 0,0001 ile Gösterilirken, Anlamlı Olmayan Farklılıklar ns (p > 0,05) Olarak İfade Edilmiştir.*



MTT testi sonuçlarına göre tBHP uygulaması hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak belirgin şekilde azaltmıştır. 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığı 1, 10, 100 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %93,5, %88,8, %35,3 ve %18,4 olarak belirlenmiş olup, bu süre için hesaplanan IC_{50} değeri 75,61 µg/mL'dir. 48 saatlik inkübasyonda ise hücre canlılığı aynı konsantrasyonlarda sırasıyla %99,5, %87,0, %18,9 ve %14,5 olarak saptanmış ve IC_{50} değeri 171,59 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 6.52.).

Şekil 6.52.

*R28 Hücrelerinde tBHP'nin Farklı Konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 400 µM) Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri. Hücre Canlılığı, 24 ve 48 Saatlik Uygulamaların Ardından Belirlenmiştir. Veriler, İki Bağımsız Deneyden Elde Edilen Ortalama ± Standart Sapma (SD) Olarak Sunulmuştur (n = 6). Anlamlı Farklılıklar, ****p < 0,0001 ile Gösterilirken, Anlamlı Olmayan Farklılıklar ns (p > 0,05) Olarak İfade Edilmiştir.*



MTT testi sonuçları doğrultusunda, tBHP'nin 24 saatlik uygulamasında IC_{50} değerinin 75,61 µg/mL olarak belirlenmesi nedeniyle, oksidatif hasar modeli oluşturmak amacıyla 24 saatlik inkübasyon süresi tercih edilmiş ve IC_{50}'ye yakın bir konsantrasyon olan 7,5 µg/mL tBHP deneysel tasarıma dahil edilmiştir.

6.8.2. tBHP ile İndüklenen Oksidatif Stres Modelinde Antioksidan Aktivite Sonuçları

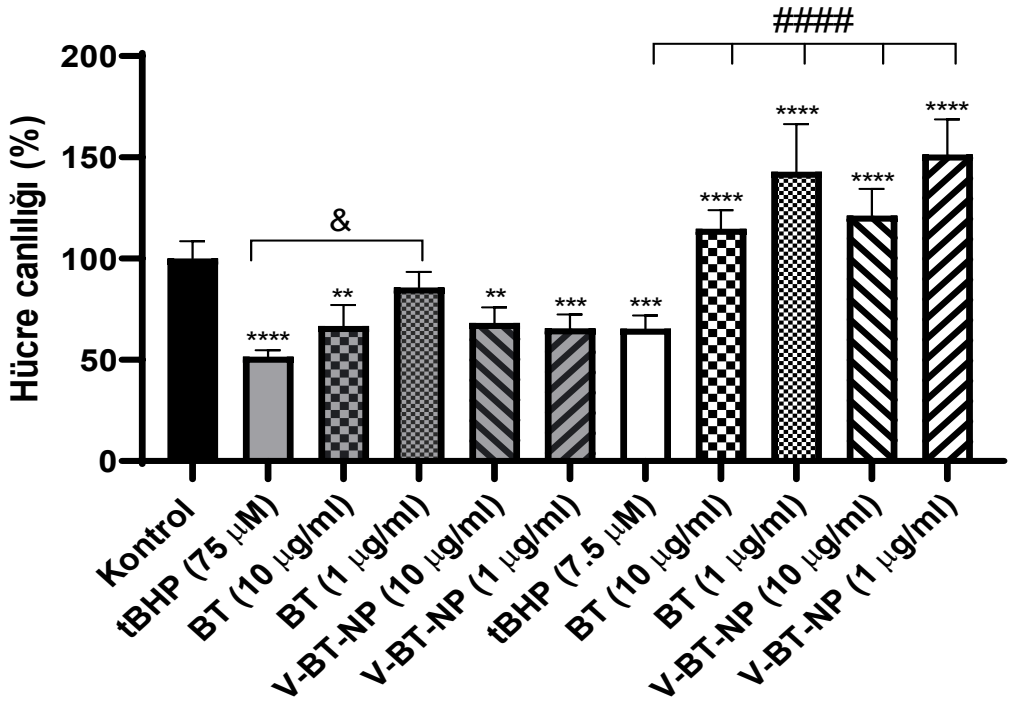
75 µM tBHP ile oksidatif stres oluşturulan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığının %51,7'ye düştüğü gözlenmiştir. tBHP uygulamasını takiben BT uygulanan gruplarda hücre canlılığının %66,8 ve %65,5 seviyelerine yükseldiği belirlenmiştir. V-BT-NP ile muamele edilen gruplarda ise hücre canlılığının %85,7, %68,3 ve %65,4 düzeylerine çıktığı saptanmıştır (Şekil 6.53.).

Daha düşük dozda uygulanan tBHP'nin (7,5 µM) hücre canlılığında belirgin bir azalmaya yol açmaması, bu konsantrasyonun sitotoksik bir hasardan ziyade hafif düzeyde bir oksidatif uyarı oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu koşullar altında

özellikle V-BT-NP uygulanan gruplarda hücre canlılığının %100'ün üzerine çıkması (%114,7–%151,3), gerçek bir hücre proliferasyonundan çok mitokondriyal metabolik aktivitenin artışı ve hücresel adaptif yanıtların aktive olması ile ilişkili olabilir. Nitekim MTT testinin mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı bir yöntem olması, sub-sitotoksik oksidatif stres altında ortaya çıkan metabolik uyarıların ölçülen canlılık değerlerine yansımasına neden olabilmektedir. Bu nedenle düşük doz tBHP kullanılan deney grupları, ağır bir oksidatif hasar modeli olarak değil; antioksidan yanıtların ve hücresel adaptasyon mekanizmalarının değerlendirildiği bir stres modeli olarak ele alınmalıdır. Bu bağlamda elde edilen bulgular, V-BT-NP'nin sub-sitotoksik oksidatif stres koşullarında hücresel metabolik aktiviteyi ve hücre fonksiyonlarını destekleyici bir etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Şekil 6.53.

tBHP ile İndüklenen Oksidatif Stres Modelinde BT ve V-BT-NP Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri. Hücreler 75 µM ve 7,5 µM tBHP ile Muamele Edildikten Sonra BT ve V-BT-NP'nin Farklı Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiştir. Hücre Canlılığı MTT Testi ile Değerlendirilmiş ve Sonuçlar Kontrol Grubuna göre Yüzde (%) Olarak İfade Edilmiştir. Veriler İki Bağımsız Deneyin Ortalaması ± Standart Sapma (SD) Olarak Sunulmuştur (n = 5). Anlamlı Farklılıklar Kontrol Grubuna göre $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ ve $^{****}p < 0,0001$; 75 µM tBHP'ye göre $^{\&}p < 0.05$; 7.5 µM tBHP'ye göre: $^{\#\#\#\#}p < 0,0001$ ile Gösterilirken, Anlamlı Olmayan Farklılıklar ns ($p > 0,05$) Olarak İfade Edilmiştir.

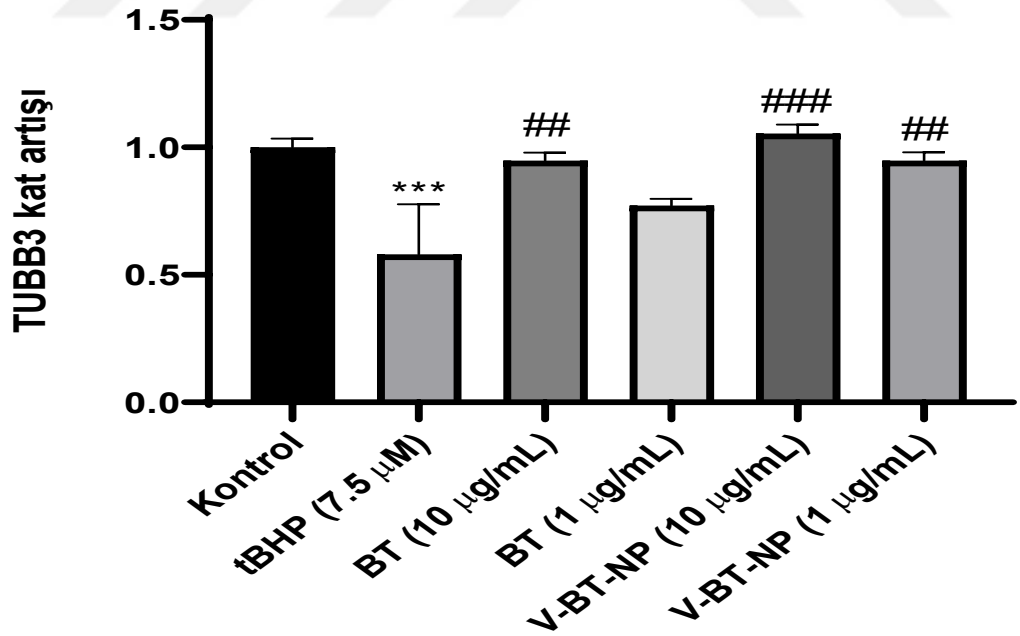


6.8.3. Beta-III-Tubulin (TUBB3) Gen Ekspresyonundaki Değişimler

qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kontrol grubunda Beta-III-Tubulin gen ekspresyonu 1 olarak kabul edilmiştir. tBHP uygulaması, Beta-III-Tubulin ekspresyonunu 0,58 katına düşürerek kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalmaya neden olmuştur. BT 10 µg/mL grubunda gen ekspresyonunun 0,95 kat, V-BT-NP 10 µg/mL ve V-BT-NP 1 µg/mL gruplarında ise sırasıyla 1,05 kat ve 0,95 kat seviyelerine yükseldiği belirlenmiştir. Bu artışların, tBHP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Buna karşılık BT 1 µg/mL grubunda gözlenen değişimin tBHP grubuna göre anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 6.54.).

Şekil 6.54.

tBHP (7.5 µM) ile İndüklenen Oksidatif Stres Modeli Altında TUBB3 Gen Ekspresyonundaki Değişimler. Hücreler tBHP ile Muamele Edildikten Sonra BT (1 ve 10 µg/mL) ve V-BT-NP (1 ve 10 µg/mL) Uygulamalarına Tabi Tutulmuştur. Beta-III-Tubulin Gen Ekspresyonu qRT-PCR Yöntemi ile Analiz Edilmiş, Sonuçlar Kontrol Grubuna göre Normalize Edilerek Kat Değişimi (Fold Change) Olarak İfade Edilmiştir. Veriler Ortalama ± SD Olarak Sunulmuştur (n = 6). Anlamlı Farklılıklar Kontrol Grubuna göre $^{***}p < 0,001$; 7.5 µM tBHP'ye göre: $^{\#\#}p < 0,01$ ve $^{\#\#\#\#}p < 0,0001$ ile Gösterilirken, Anlamlı Olmayan Farklılıklar ns ($p > 0,05$) Olarak İfade Edilmiştir.



tBHP uygulamasıyla Beta-III-Tubulin gen ekspresyonunun belirgin şekilde azalması, oksidatif stresin nöronal yapı ve mikrotübül bütünlüğü üzerinde baskılayıcı etki oluşturduğunu göstermektedir. tBHP'ye kıyasla BT 10 µg/mL ve özellikle V-BT-NP 10 ve 1 µg/mL gruplarında gen ekspresyonunun anlamlı şekilde artması, bu uygulamaların

oksidatif stresin yol açtığı yapısal hasarı kısmen tersine çevirebildiğini düşündürmektedir. V-BT-NP gruplarında daha belirgin etki gözlenmesi, nanopartikül formülasyonunun hücre içi etkiyi güçlendirdiğini ve sitoprotektif potansiyeli artırdığını desteklemektedir.

Bu çalışmada, BT ve V-BT-NP uygulamalarının hücre canlılığı, oksidatif stres ve nöronal yapısal bütünlük üzerindeki etkileri tBHP ile indüklenen oksidatif stres modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. MTT sonuçları, tBHP uygulamasının hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığını ve böylece oksidatif stres modelinin başarıyla oluşturulduğunu göstermiştir. Özellikle 75 µM tBHP konsantrasyonunda hücre canlılığının yaklaşık %50 düzeyine düşmesi, hücrelerde ciddi oksidatif hasar meydana geldiğini ortaya koymuştur.

tBHP sonrası uygulanan BT gruplarında hücre canlılığında kısmi bir iyileşme gözlenirken, V-BT-NP uygulamaları bu etkiyi daha belirgin hale getirmiştir. Özellikle V-BT-NP'nin uygun konsantrasyonlarında hücre canlılığının kontrol düzeylerine yaklaşması veya aşması, nanopartikül formülasyonunun BT'ye kıyasla hücre koruyucu etkinliği artırdığını düşündürmektedir. Bu durum, nanopartikül yapının hücresel alımı ve biyoyararlanımı artırarak antioksidan etkinliği güçlendirmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

V-Blank-NP ve BT gruplarında IC_{50} değerlerinin 24 ve 48 saatlik uygulamalarda 400 µg/mL'nin üzerinde bulunması, bu grupların test edilen konsantrasyon aralığında belirgin bir sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Buna karşılık V-BT-NP ve tBHP gruplarında daha düşük IC_{50} değerlerinin elde edilmesi, bu uygulamaların hücresel yanıtı daha güçlü şekilde modüle ettiğini göstermektedir. Özellikle tBHP'nin düşük IC_{50} değerleri, oksidatif stresin hücre canlılığı üzerindeki yıkıcı etkisini desteklemektedir.

qRT-PCR analizleri, tBHP uygulamasının Beta-III-Tubulin gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde azalttığını, yani oksidatif stresin nöronal sitoskeleton bütünlüğünü olumsuz etkilediğini göstermiştir. Buna karşılık BT 10 µg/mL ve özellikle V-BT-NP 1 ve 10 µg/mL gruplarında Beta-III-Tubulin gen ekspresyonunun tBHP grubuna kıyasla anlamlı şekilde artması, bu uygulamaların oksidatif hasarın yol açtığı yapısal bozulmayı kısmen

tersine çevirebildiğini düşündürmektedir. V-BT-NP'nin daha güçlü bir etki göstermesi, nanopartikül formülasyonunun nöroprotektif potansiyeli artırdığını desteklemektedir.

Genel olarak bu sonuçlar, V-BT-NP'nin tBHP ile indüklenen oksidatif strese karşı hem hücre canlılığını koruyucu hem de nöronal yapısal bütünlüğü destekleyici etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, BT'nin nanopartikül formuna dönüştürülmesinin antioksidan ve sitoprotektif etkinliği artırabileceğini ve oksidatif stresle ilişkili hücresel hasarların önlenmesinde umut vadeden bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

7. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, glokom tedavisinde kullanılmak üzere Brimonidin Tartarat yüklü Eudragit® RS 100 temelli polimerik nanopartiküller çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak başarıyla formüle edilmiş ve oküler uygulamalara yönelik kontrollü salım sağlayan bir nanofarmasötik sistem geliştirilmiştir. Elde edilen bulgular, hazırlanan nanopartikül sistemin oküler kullanım açısından uygun fizikokimyasal özellikler sergilediğini, etkin maddenin polimerik matris içerisinde stabil bir şekilde enkapsüle edildiğini ve taşıyıcı yapının etkin madde yüklendikten sonra da bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir. In vitro salım çalışmaları, nanopartikül formülasyonunun brimonidinin hızlı salım karakterini belirgin biçimde yavaşlattığını ve zamana yayılmış, kontrollü bir salım profili oluşturduğunu ortaya koymuştur. Katı hal karakterizasyonları (DSC ve FT-IR), etkin maddenin polimer matrisi içerisinde kimyasal bir dönüşüme uğramaksızın başarılı şekilde dağıldığını ve sistemde ağırlıklı olarak fiziksel etkileşimlerin rol oynadığını doğrulamıştır.

Glokom tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen nanofarmasötik formülasyonların mikrobiyolojik sterilite değerlendirmesi filtrasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 0.20 µm por çapına sahip filtre kullanılarak yapılan filtrasyonun, nanofarmasötik formülasyonlarda mevcut olabilecek mikroorganizmaların etkin şekilde uzaklaştırılmasını sağladığını ve ürünlerin sterilitesini güvence altına aldığını göstermiştir. Buna karşılık, 0.45 µm por çaplı filtrasyonun, mikrobiyal kontaminasyonu tamamen ortadan kaldırmada yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, farmasötik literatür ve farmakope standartları ile uyumlu olup, nanofarmasötik ürünlerin steril üretiminde filtre por çapının kritik bir parametre olduğunu vurgulamaktadır. Özellikle oftalmik uygulamalar için geliştirilen ürünlerde sterilite, hasta güvenliği açısından vazgeçilmez bir gerekliliktir. Sonuç olarak, bu çalışmada uygulanan membran filtrasyon esaslı sterilite testi, glokom tedavisinde kullanılacak nanofarmasötiklerin mikrobiyolojik kalite kontrolünde güvenilir ve etkin bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında, taşıyıcı sistemin tek başına belirgin bir sitotoksik etki göstermediği, buna karşın brimonidinin nanopartikül formda sunulmasının hücresel yanıtı modüle edebildiği ve oksidatif stres koşulları altında hücre koruyucu etkiyi destekleyebildiği belirlenmiştir. Bu bulgular, geliştirilen nanopartikül

sistemin yalnızca farmasötik özellikler açısından değil, biyolojik etki bakımından da potansiyel avantajlar sunduğunu ortaya koymaktadır. Tüm bu sonuçlar, Brimonidin Tartarat yüklü Eudragit® RS 100 nanopartiküllerinin glokom tedavisinde geleneksel oküler uygulamalarla ilişkili kısa etki süresi ve sınırlı biyoyararlanım gibi temel sorunların aşılmasına katkı sağlayabilecek umut verici bir nanoteknolojik yaklaşım olduğunu göstermektedir. Optimize edilmiş enkapsülasyon, kontrollü salım ve hücresel düzeyde destekleyici biyolojik yanıtı bir arada sunan bu sistem, glokom tedavisine yönelik gelecekte geliştirilecek nanofarmasötik stratejiler için güçlü bir temel oluşturmaktadır. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, formülasyonun uzun dönem stabilite özelliklerinin, ileri katı hal karakterizasyonlarının ve in vivo değerlendirmelerin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

Addo, R. T. (2016). Ocular drug delivery: Advances, challenges and applications. In Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47691-9

Adrover, A., Varani, G., Paolicelli, P., Petralito, S., di Muzio, L., Casadei, M. A., ve Tho, I. (2018). Experimental and modeling study of drug release from HPMC-based erodible oral thin films. Pharmaceutics, 10(4). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040222

Akartaş, I., Ates, A., ve Reis, R.(2024).Antibacterial activity and cytocompatibility evaluation of cefpodoxime proxetil loaded eudragit rs 100 nanoparticles. Journal of Research in Pharmacy, 28(2), 409–428. https://dergipark.org.tr/en/pub/jrespharm/article/1684489

Albisa, A., Piacentini, E., Sebastian, V., Arruebo, M., Santamaria, J., ve Giorno, L. (2017). Preparation of Drug-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles by Membrane-Assisted Nanoprecipitation. Pharmaceutical Research, 34(6), 1296–1308. https://doi.org/10.1007/s11095-017-2146-y

Aldayel, T. S., Badran, M. M., Alomrani, A. H., AlFaris, N. A., Altamimi, J. Z., Alqah - tani, A. S., Nasr, F. A., Ghaffar, S., & Orfali, R. (2023). Optimization of cationic nanoparticles stabilized by poloxamer 188: A potential approach for improving the biological activity of Aloe perryi. Heliyon, 9(12). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22691

Ali, M., Walboomers, X. F., Jansen, J. A., & Yang, F. (2019). Influence of formulation parameters on encapsulation of doxycycline in PLGA microspheres prepared by double emulsion technique for the treatment of periodontitis. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 52, 263–271. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.031

Allemann, E., Gurny, R., ve Doelker, E. (1992).Preparation of aqueous polymeric nano-dispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. In International Journal of Pharmaceutics (Vol. 87). https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90249-2

Allen, L., ve Ansel, H. C.(2013).Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. Lippincott Williams & Wilkins.

Alt, N., Zhang, T. Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., Beck,

H., Emrich, T., ve Harris, R. J. (2016). Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. Biologicals, 44(5), 291–305. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.005

Andrade, S., Ramalho, M. J., ve Loureiro, J. A.(2024).Polymeric Nanoparticles for Biomedical Applications. In Polymers (Vol. 16, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/polym16020249

Arınmış, K. N., Kıyan, H. T., ve Öztürk, A. A. (2024). Preparation, Characterization, Antioxidant Activities, and Determination of Anti-Alzheimer Effects of PLGA-Based DDSs Containing Ferulic Acid. ACS Omega, 9(10), 11321–11338. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38497027/

Atawi, R., Ayed, A., ve Batran, A. (2024). Traditional eye medicine practice and its determinant factors among ophthalmic patients in the West Bank. Journal of Public Health Research, 13(2). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38577243/

Azadi, M., ve David, A. E. (2024).Enhancing Ocular Drug Delivery: The Effect of Physicochemical Properties of Nanoparticles on the Mechanism of Their Uptake by Human Cornea Epithelial Cells. ACS Biomaterials Science and Engineering, 10(1), 429–441. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38055935/

Azari, A. A., ve Barney, N. P. (2013). Conjunctivitis: A systematic review of diagnosis and treatment. In JAMA (Vol. 310, Issue 16, pp. 1721–1729). American Medical Association. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24150468/

Ban, J., Zhang, Y., Huang, X., Deng, G., Hou, D., Chen, Y., ve lu, Z. (2017). Corneal permeation properties of a charged lipid nanoparticle carrier containing dexamethasone. International Journal of Nanomedicine, 12, 1329–1339. https://doi.org/10.2147/IJN.S126199

Bastogne, T. (2017). Quality-by-design of nanopharmaceuticals – a state of the art. In Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine (Vol. 13, Issue 7, pp. 2151–2157). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.05.014

Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., ve Alcudia, A. (2020). Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. In Nanomaterials (Vol. 10, Issue 7, pp. 1–41). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nano10071403

Bhagav, P., Trivedi, V., Shah, D., ve Chandran, S. (2011). Sustained release ocular in-

serts of brimonidine tartrate for better treatment in open-angle glaucoma. Drug Delivery and Translational Research, 1(2), 161–174. https://doi.org/10.1007/s13346-011-0018-2

Bhagav, P., Upadhyay, H., ve Chandran, S. (2011). Brimonidine tartrate-eudragit long-acting nanoparticles: Formulation, optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. AAPS PharmSciTech, 12(4), 1087–1101. https://doi.org/10.1208/s12249-011-9675-1

Bhardwaj, H., ve Jangde, R. K. (2023). Current updated review on preparation of poly - meric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. Next Nanotechnology, 2, 100013. https://doi.org/10.1016/j.nxnano.2023.100013

Bíró, T., ve Aigner, Z. (2019).Current approaches to use cyclodextrins and mucoadhesi-ve polymers in ocular drug delivery-a mini-review. Scientia Pharmaceutica, 87(3). https://doi.org/10.3390/scipharm87030015

Byrappa, K., Ohara, S., ve Adschiri, T. (2008). Nanoparticles synthesis using supercriti-cal fluid technology - towards biomedical applications. In Advanced Drug Delivery Reviews (Vol. 60, Issue 3, pp. 299–327). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.09.001

Cantor, L. B. (2006).Brimonidine in the treatment of glaucoma and ocular hypertension. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2(4), 337–346.

Cappuccino, J. G., ve Sherman, N. (2005). Microbiology: a laboratory manual (p. 507). San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings. https://cuvas.edu.pk/cuvas_libraries/ebooks/microbiology-a-laboratory-manual-pearson-education-2014.pdf

Cardoso, A. M. L., Oliveira, E. E., Machado, B. A. S., ve Marcelino, H. R. (2023). Eud-ragit®-based nanoparticles for controlled release through topical use. In Journal of Nanoparticle Research (Vol. 25, Issue 2). Springer Science and Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/s11051-023-05678-6

Christoforidis, J. B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., ve Cebulla, C. M.(2012).Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. In Mediators of Inflammation (Vol. 2012). https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3441042/

Cionni, R. J., Hoffman, R. S., Mah, F. S., Shorstein, N. H., Mccann, N. K., Whitman, J., Romansky, M. A., Counsel, W., ve Hurley, N. (2018). Guidelines for the Cleaning and Sterilization of Intraocular Surgical Instruments Ophthalmic

Instrument Cleaning and Sterilization (OICS) Task Force Ophthalmic Outpatient Surgery Society (OOSS). https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2018.05.001

Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., ve Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. Journal of Controlled Release, 133(2), 90–95. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.073

Coll-Satue, C., Jansman, M. M. T., Thulstrup, P. W., ve Hosta-Rigau, L.(2021). Optimi-Optimization of hemoglobin encapsulation within plga nanoparticles and their investigation as potential oxygen carriers. Pharmaceutics, 13(11). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111958

Cortés, H., Hernández-Parra, H., Bernal-Chávez, S. A., del Prado-Audelo, M. L., Caballero-Florán, I. H., Borbolla-Jiménez, F. v., González-Torres, M., Magaña, J. J., ve Leyva-Gómez, G. (2021). Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. In Materials (Vol. 14, Issue 12). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ma14123197

Costa, P., Manuel, J., ve Lobô´´, S. (2001).Modeling and comparison of dissolution profiles. In European Journal of Pharmaceutical Sciences (Vol. 13). https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1

Crucho, C. I. C., ve Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the pre - paration variables and characterization methods. In Materials Science and Engineering C (Vol. 80, pp. 771–784). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004

Çevikelli, T., Güven, U. M., ve Öztürk, A. A. (2024).Metronidazole Loaded Novel Microemulsion Formulation for Topical Delivery and Characterization With Validated New UPLC Method. Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences, 49(1), 111–128. https://doi.org/10.55262/fabadeczacilik.1359138

Çoban, Ö., Usta, D. Y., ve Pinar, S. G. (2024). Evaluation of Different Methods for Dissolution Profile Similarity Comparison of Montelukast Tablets in Türkiye. Dissolution Technologies, 31(1), 40–49. https://doi.org/10.14227/DT310124P40

da S. Padilha, J., Azevedo, M. F. M. F., Miranda-Andrades, J. R., de Falco, A., Kai, J., ve Aucelio, R. Q. (2022). Use of selective quenching of a photoluminescent probe based on a Eu(III) β-diketonate complex for determination of methylmercury in produced water after liquid-liquid extraction. Talanta, 244. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123406

Danaei, M.,Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F.,Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., ve Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. In Pharmaceutics (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., le Breton, A., ve Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. In Journal of Controlled Release (Vol. 161, Issue 2, pp. 505–522). https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043

De Jong, W. H., ve Borm, P. J. A. (2008).Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. In International Journal of Nanomedicine (Vol. 3, Issue 2, pp. 133–149). https://doi.org/10.2147/ijn.s596

De Souza, J. F., Maia, K. N., de Oliveira Patrício, P. S., Fernandes-Cunha, G. M., da Silva, M. G., de Matos Jensen, C. E., ve da Silva, G. R. (2016). Ocular inserts based on chitosan and brimonidine tartrate: Development, characterization and biocompatibility. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 32, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.01.008

Ekinci, M., Öztürk, A. A., Santos-Oliveira, R., ve İlem-Özdemir, D. (2022). The use of Lamivudine-loaded PLGA nanoparticles in the diagnosis of lung cancer: Preparation, characterization, radiolabeling with 99mTc and cell binding. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 69. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103139

Eriko, G. S., Keisuke, K., Seiko, S., Masaaki, K., ve Kawamura, K. A. (2021). Ocular and Systemic Pharmacokinetics of Brimonidine and Timolol After Topical Administration in Rabbits: Comparison Between Fixed-Combination and Single Drugs. Ophthalmology and Therapy. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11537694

Eticha, B. L., Alemu, H. W., Assaye, A. K., ve Tilahun, M. M. (2021). Attitude towards traditional eye medicine and associated factors among adult ophthalmic patients attending university of gondar comprehensive specialized hospital-tertiary eye care and training center, northwest ethiopia. Clinical Optometry, 13, 323–332. https://doi.org/10.2147/OPTO.S335781

European Pharmacopoeia Commission. (2023). European Pharmacopoeia (11th ed.). EDQM, Council of Europe. https://www.edqm.eu/en/web/edqm/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition

Evonik. (2020). EUDRAGIT® RS 100 for synthesis: CAS No. 3343-24-1. Evonik In - dustries.

Flaxman, S. R., Bourne, R. R. A., Resnikoff, S., Ackland, P., Braithwaite, T., Cicinelli, M. v., Das, A., Jonas, J. B., Keeffe, J., Kempen, J., Leasher, J., Limburg, H., Naidoo, K., Pesudovs, K., Silvester, A., Stevens, G. A., Tahhan, N., Wong, T., Taylor, H., … Zheng, Y. (2017). Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Global Health, 5(12), e1221–e1234. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30393-5

Franco, P., ve Marco, I. de. (2020). Supercritical antisolvent process for pharmaceutical applications: A review. Processes, 8(8). https://doi.org/10.3390/PR8080938

Fruntke, A., Hülsmann, J., Skodda, L. H., Blümbott, B., Godmann, M., Koschella, A., Heinzel, T., Heinze, T., ve Wilke, T. (2025). Polysaccharide-Based Nanoparticles Prepared by Dialysis: Novel Drug Delivery Systems for Chemistry Education. Journal of Chemical Education. https://www.researchgate.net/publication/388740826_Polysaccharide-Based_Nanoparticles_Prepared_by_Dialysis_Novel_Drug_Delivery_Systems_for_Chemistry_Education

Gaudana, R., Ananthula, H. K., Parenky, A., ve Mitra, A. K. (2010). Ocular drug deli - very. In The AAPS journal (Vol. 12, Issue 3, pp. 348–360). https://doi.org/10.1208/s12248-010-9183-3

Gibson, M. (2016). Ophthalmic dosage forms. In Pharmaceutical preformulation and formulation (pp. 443-467). CRC Press.

Gupta, D., ve Chen, P. P. (2016). Glaucoma. American Family Physician, 93(8), 668 –674.

Güven, U. M., Öztürk, A. A., ve Yenilmez, E. (2020). Evaluation of carvedilol-loaded eudragit® nanoparticles. Journal of Research in Pharmacy, 24(1), 71–81. https://dergipark.org.tr/en/pub/jrespharm/article/1686267

H. Başmak (2015). GÖZÜN ANATOMİSİ VE FİZYOLOJiSİ. Türkiye Optik ve Opto - metrik Meslekler Derneği. https://isikoptik12.wordpress.com/wp-content/uploads/2014/11/gc3b6z-anatomisi.pdf

Hasan, A. A. (2012). Formulation and evaluation of dorzolamide hydrochloride-loaded

nanoparticles as controlled release drug delivery system. Asian Journal of Pharmaceutics, 6(1), 67–73. https://www.asiapharmaceutics.info/index.php/ajp/article/view/75

Hasçiçek, C., Yüksel-Tilkan, G., Türkmen, B., ve Özdemir, N. (2011). Effect of formu - lation parameters on the drug release and floating properties of gastric floating two-layer tablets with acetylsalicylic acid. Acta Pharmaceutica, 61(3), 303–312. https://doi.org/10.2478/v10007-011-0028-0

Hemlata, Hariharan, A., Murali, N., Roy, S., Betal, S., Kumar, S., ve Minocha, S.(2025) . Engineered BSA nanoparticles: Synthesis, drug loading, and advanced characterization. Biology Methods and Protocols, 10(1). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41018848/

Hidayat, A. F., Wardhana, Y. W., Suwendar, S., Mohammed, A. F. A., Mahmoud, S. A. ,Elamin, K. M., ve Wathoni, N. (2025). A Review on QbD-Driven Optimization of Lipid Nanoparticles for Oral Drug Delivery: From Framework to Formulation. In International Journal of Nanomedicine (Vol. 20, pp. 8611–8651). Dove Medical Press Ltd. https://doi.org/10.2147/IJN.S534137

Honary, S., ve Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12(2), 255–264. https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19

Honary, S., ve Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12(2), 265–273. https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL RE - QUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2). (2009). https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf

Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., ve Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent techni - ques used for drug encapsulation. In International Journal of Pharmaceutics (Vol. 496, Issue 2, pp. 173–190). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.057

Ismailovi, N., Kıyan, H. T., ve Öztürk, A. A. (2023). A Novel Phytotherapy Application : Preparation, Characterization, Antioxidant Activities and Determination of Anti-inflammatory Effects by *In vivo* HET-CAM Assay of Chitosan-based DDSs Containing Endemic Helichrysum pamphylicum P.H. Davis & Kupicha

Methanolic Extract . Current Drug Delivery, 21(6), 901–916. https://doi.org/10.2174/1567201820666230328122504

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., ve Bhandari, B. (2008).Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. In Food Hydrocolloids (Vol. 22, Issue 7, pp. 1191–1202). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006

Jain, P. S., Khatal, R. N., & Surana, S. J. (2011). Development and Validation of First Order Derivative UV-Spectrophotometric Method for Determination of Brimonidine tartrate in Bulk and in Formulation. In Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research Original Research. https://www.researchgate.net/publication/267944838_Development_and_Validation_of_First_Order_Derivative_UV-Spectrophotometric_Method_for_Determination_of_Brimonidine_tartrate_in_Bulk_and_in_Formulation

Janagam, D. R., Wu, L., ve Lowe, T. L. (2017). Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. In Advanced Drug Delivery Reviews (Vol. 122, pp. 31–64). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.001

Jeong, J. H., Yoon, T. H., Ryu, S. W., Kim, M. G., Kim, G. H., Oh, Y. J., Lee, S. J., Kwak, N. W., Bang, K. H., ve Kim, K. S. (2025). Quality by Design (QbD)-Based Development of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for the Ocular Delivery of Flurbiprofen. Pharmaceutics, 17(5). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17050629

Jeong, Y. il, Cho, C. S., Kim, S. H., Ko, K. S., Kim, S. il, Shim, Y. H., ve Nah, J. W. (2001). Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant. Journal of Applied Polymer Science, 80(12), 2228–2236. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.1326

Jo, D. H., & Kim, J. H. (2020). Toward the clinical application of therapeutic angioge - nesis against pediatric ischemic retinopathy. In Journal of Lipid and Atherosclerosis (Vol. 9, Issue 2, pp. 268–282). Korean Society of Lipid and Atherosclerosis. https://doi.org/10.12997/jla.2020.9.2.268

Jonas, J. B., Aung, T., Bourne, R. R., Bron, A. M., Ritch, R., ve Panda-Jonas, S. (2017). Glaucoma. In The Lancet (Vol. 390, Issue 10108, pp. 2183–2193). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31469-1

Jornitz, M. W.(Ed.).(2019). Filtration and purification in the biopharmaceutical industry . CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315164953

Juliana, F. R., Kesse, S., Boakye-Yiadom, K. O., Veroniaina, H., Wang, H., ve Sun, M. (2019). Promising approach in the treatment of glaucoma using nanotechnology and nanomedicine-based systems. In Molecules (Vol. 24, Issue 20). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules24203805

Kalam, M. A., Iqbal, M., Alshememry, A., Alkholief, M., ve Alshamsan, A. (2022). Development and Evaluation of Chitosan Nanoparticles for Ocular Delivery of Tedizolid Phosphate. Molecules, 27(7). https://doi.org/10.3390/molecules27072326

Kalani, M., ve Yunus, R. (2011).Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. In International journal of nanomedicine (Vol. 6, pp. 1429–1442). https://doi.org/10.2147/ijn.s19021

Kamińska, A., Pinkas, J., Wrześniewska-Wal, I., Ostrowski, J., & Jankowski, M. (2023) . Awareness of Common Eye Diseases and Their Risk Factors—A Nationwide Cross-Sectional Survey among Adults in Poland. International Journal of Environmental Research and Public Health, 20(4). https://doi.org/10.3390/ijerph20043594

Katta (2018). Quallity By Design (QbD) Approach For The Development of Topical Ocular Formulations.

Kaya-Tilki, E., Dikmen, M., ve Öztürk, Y. (2016). Effects of DNMT and HDAC inhibitors (RG108 and trichostatin a) on NGF-induced Neurite outgrowth and cellular migration. International Journal of Pharmacology, 12(4), 351–360. https://doi.org/10.3923/ijp.2016.351.360

Kaya-Tilki, E., Öztürk, A. A., Engür-Öztürk, S., ve Dikmen, M. (2024). Enhanced anti-angiogenic effects of aprepitant-loaded nanoparticles in human umbilical vein endothelial cells. Scientific Reports, 14(1). https://doi.org/10.1038/s41598-024-70791-y

Kaya-Tilki, E., ve Dikmen, M. (2021). Neuroprotective effects of some epigenetic mo - difying drugs' on Chlamydia pneumoniaeinduced neuroinflammation: A novel model. PLoS ONE, 16(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260633

Kim, M. R., Feng, T., Zhang, Q., Chan, H. Y. E., ve Chau, Y. (2019). Co-encapsulation and co-delivery of peptide drugs via polymeric nanoparticles. Polymers, 11(2). https://doi.org/10.3390/polym11020288

Knez, Ž., Pantić, M., Cör, D., Novak, Z., ve Knez Hrnčič, M. (2019). Are supercritical fluids solvents for the future? In Chemical Engineering and Processing - Process Intensification (Vol. 141). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107532

Koevary, J., Erapeutics, A., Cap, B., Casasola, E., Global, B., Beddard, R., Freeman - Allen, V., Nelson, M., Myers, B., Eugene, S., Brainxell, B., En Cellares, Y., Tomtishen, J., Cellcan, C. H., Burke, C., Sondej, J., Zamilpa, R., Malone, C., Pollard, M., … Schlegel, A. (2025). A-CELL ✲ ii Reviewers Production Houman Dehghani Allogene. https://alliancerm.org/wp-content/uploads/2025/08/PROJECT-A-CELL-V2.pdf#page=58

Krishnasailaja, A., ve Sarithareddy, A. (2017). Preparation and characterisation of sulfa-salazine loaded polymeric nanoparticles by salting out technique. Journal of Bionanoscience, 11(1), 17–23. https://www.academia.edu/34359116/Preparation_and_Characterisation_of_Sulfasalazine_Loaded_Polymeric_Nanoparticles_by_Salting_Out_Technique

Kumari, A., Yadav, S. K., ve Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric based drug delivery systems. In Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (Vol. 75, Issue 1, pp. 1–18). https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

Kwatra, D. (2013). Drug delivery in ocular diseases: Barriers and strategies. World Journal of Pharmacology, 2(4), 78. https://bpgweb.azurewebsites.net/2220-3192/full/v2/i4/78.htm

Lassalle, V., ve Ferreira, M. L. (2007). PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation. In *Macromolecular Bioscience* (Vol. 7, Issue 6, pp. 767–783). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17541922/

Lee, Y. S., Marmorstein, L. Y., ve Marmorstein, A. D. (2014). Soluble adenylyl cyclase in the eye. In Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease (Vol. 1842, Issue 12, pp. 2579–2583). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.032

Lee, Y. S., ve Marmorstein, A. D. (2014). Control of outflow resistance by soluble adenylyl cyclase. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 30(2–3), 138–142. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24320087/

Lefnaoui, S., ve Moulai-Mostefa, N. (2013). Investigation of the Effects of Cellulose Derivatives on the Kinetics of Drug Release from Cellulose-Based Hydrogel Using a Response Surface Method. Journal of Pharmaceutical Technology,

Research and Management, 1(1), 119–132. https://doi.org/10.15415/jptrm.2013.11008

Li, M., Rouaud, O., ve Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. In International Journal of Pharmaceutics (Vol. 363, Issues 1–2, pp. 26–39). https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018

Li, S., Chen, L., ve Fu, Y. (2023). Nanotechnology-based ocular drug delivery systems: recent advances and future prospects. In Journal of Nanobiotechnology (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12951-023-01992-2

Lin, S. Y. (2021). Current and potential applications of simultaneous DSC-FTIR micro - spectroscopy for pharmaceutical analysis. Journal of Food and Drug Analysis, 29(2), 182–202. https://doi.org/10.38212/2224-6614.3345

Litzinger, T. C., & Rio-Tsonis, K. del. (2002). Eye Anatomy.

Liu, L. C., Chen, Y. H., ve Lu, D. W. (2023). Overview of Recent Advances in Nano - Based Ocular Drug Delivery. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 24, Issue 20). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms242015352

López-Royo, T., Sebastián, V., Moreno-Martínez, L., Uson, L., Yus, C., Alejo, T., Zaragoza, P., Osta, R., Arruebo, M., ve Manzano, R. (2021). Encapsulation of large-size plasmids in PLGA nanoparticles for gene editing: Comparison of three different synthesis methods. Nanomaterials, 11(10). https://doi.org/10.3390/nano11102723

Löscher, M., Seiz, C., Hurst, J., & Schnichels, S. (2022). Topical Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye. In Pharmaceutics (Vol. 14, Issue 1). MDPI. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010134

Luís Occhiutto Raul Maranhão Vital Paulino Costa Anastasios G Konstas, M. C., Occ - hiutto Á V P Costa, M. L., ve Maranhão, R. C. (2020). Nanotechnology for Medical and Surgical Glaucoma Therapy-A Review. Adv Ther, 37, 155–199. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.10265768

Luo, W. C., O'Reilly Beringhs, A., Kim, R., Zhang, W., Patel, S. M., Bogner, R. H., ve Lu, X. (2021). Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 169, 256–267. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.10.014

Mahajan, K., Thakur, N., ve Simran, . (2021). Review on Polymer Based Nanoparticles for Increase the Bioavalibilty of Poorly Water Soluble Drug. Journal of Pharmaceutical Research International, 56–74. https://www.academia.edu/69985483/Review_on_Polymer_Based_Nanoparticles_for_Increase_the_Bioavalibilty_of_Poorly_Water_Soluble_Drug

Mahalingam, M., ve Krishnamoorthy, K. (2015). Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: Multi-criteria decision making approach. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 5(1), 57–67. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4352224/

Maharini, I., Martien, R., ve Kharis Nugroho, A. (2021). Validation UV Spectrophoto - metric Method to Determine Entrapment Efficiency of Ocular Polymeric Nanoparticle Levofloxacin Hemihydrate. https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00956

Mainardes, R. M., ve Evangelista, R. C. (2005). PLGA nanoparticles containing prazi - quantel: Effect of formulation variables on size distribution. International Journal of Pharmaceutics, 290(1–2), 137–144. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.027

Maiti, S., Paul, S., Mondol, R., Ray, S., ve Sa, B. (2011). Nanovesicular formulation of brimonidine tartrate for the management of glaucoma: in vitro and in vivo evaluation. AAPS PharmSciTech, 12(2), 755–763. https://doi.org/10.1208/s12249-011-9643-9

Majid Abdouss, M. H. K. (2024). Assessing Particle Size and Surface Charge in Drug Carrier Nanoparticles for Enhanced Cancer Treatment: A Comprehensive Review Utilizing DLS and Zeta Potential Characterization. Polymer Science: Peer Review Journal, 5(3). https://doi.org/10.31031/psprj.2024.05.000615

Makadia, H. K., ve Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as bio - degradable controlled drug delivery carrier. Polymers, 3(3), 1377–1397. https://doi.org/10.3390/polym3031377

Marinelli, L., Ciulla, M., Ritsema, J. A. S., van Nostrum, C. F., Cacciatore, I., Dimmito, M. P., Palmerio, F., Orlando, G., Robuffo, I., Grande, R., Puca, V., & di Stefano, A. (2022). Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of a Hydrophilic Peptide Loaded on PEG-PLGA Nanoparticles. Pharmaceutics, 14(9). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091821

Meziani, M. J., Pathak, P., ve Sun, Y.-P. (2009). Supercritical fluid technology for na -

notechnology in drug delivery. M. M. de Villiers, P. Aramwit, & G. S. Kwon (Eds.), Nanotechnology in drug delivery içinde (ss. 69-104). Springer; AAPS Press. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77668-2_3

Missel, P. J., Lang, J. C., Rodeheaver, D. P., ve Jani, R. (2016). Design and evaluation of ophthalmic pharmaceutical products. In Modern Pharmaceutics, Volume 2 (pp. 119-208). CRC Press.

Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., ve Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. In Nature Reviews Drug Discovery (Vol. 20, Issue 2, pp. 101–124). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8

Mohanraj, V. J., ve Chen, Y. (2006). Nanoparticles-A Review. In Tropical Journal of Pharmaceutical Research (Vol. 5, Issue 1). https://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634

Mura, S., Nicolas, J., ve Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. In Nature Materials (Vol. 12, Issue 11, pp. 991–1003). https://doi.org/10.1038/nmat3776

Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., ve Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. In International Journal of Pharmaceutics (Vol. 187). https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00187-8

Nagavarma, B., V., N., Yadav H., K., S, Ayaz, A., Vasudha, L., S. ve Shivakumar, H., G., (2012). *Different Techniques For Preparation of Polymeric Nanoparticles - a Review*. https://www.researchgate.net/publication/279545193_Different_techniques_for_preparation_of_polymeric_nanoparticles-_A_review

Namjoshi, S., Dabbaghi, M., Roberts, M. S., Grice, J. E., & Mohammed, Y. (2020). Quality by design: Development of the quality target product profile (QTPP) for semisolid topical products. In Pharmaceutics (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030287

Nandi, U., Ajiboye, A. L., Patel, P., Douroumis, D., ve Trivedi, V. (2021). Preparation of solid dispersions of simvastatin and soluplus using a single-step organic solvent-free supercritical fluid process for the drug solubility and dissolution rate enhancement. Pharmaceuticals, 14(9). https://doi.org/10.3390/ph14090846

Nandiyanto, A. B. D., ve Okuyama, K. (2011). Progress in developing spray-drying

methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. Advanced Powder Technology, 22(1), 1–19. https://doi.org/10.1016/j.apt.2010.09.011

Nikam, A., Sahoo, P. R., Musale, S., Pagar, R. R., Paiva-Santos, A. C., ve Giram, P. S. (2023). A Systematic Overview of Eudragit® Based Copolymer for Smart Healthcare. In Pharmaceutics (Vol. 15, Issue 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020587

Nocentini, A., ve Supuran, C. T. (2019). Adrenergic agonists and antagonists as anti - glaucoma agents: a literature and patent review (2013–2019). In Expert Opinion on Therapeutic Patents (Vol. 29, Issue 10, pp. 805–815). Taylor and Francis Ltd. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31486689/

Nunes, L. R., Lemos-Senna, E., ve Silva, B. B. (2012).Development of polymer micro - particles containing brimonidine tartrate for ophthalmic use. Current Drug Delivery, 9(2), 217–224.

Onugwu, A. L., Nwagwu, C. S., Onugwu, O. S., Echezona, A. C., Agbo, C. P., Ihim, S. A., Emeh, P., Nnamani, P. O., Attama, A. A., ve Khutoryanskiy, V. v. (2023). Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. In Journal of Controlled Release (Vol. 354, pp. 465–488). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.018

Owodeha-Ashaka, K., Ilomuanya, M. O., ve Iyire, A. (2021). Evaluation of sonication on stability-indicating properties of optimized pilocarpine hydrochloride-loaded niosomes in ocular drug delivery. Progress in Biomaterials, 10(3), 207–220. https://doi.org/10.1007/s40204-021-00164-5

Özturk, A. A., & Arpagaus, C. (2021).Nano Spray-Dried Drugs for Oral Administration : A Review. In Assay and Drug Development Technologies (Vol. 19, Issue 7, pp. 412–441). Mary Ann Liebert Inc. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34550790/

Öztürk, A. A., Banderas, L. M., Cayero Otero, M. D., Yenilmez, E., ve Yazan, Y.(2018) . Characterization and Gastrointestinal Stability. Am. J. Pharm, 37(9), 1730–1771.

Öztürk, A. A., Banderas, L. M., Otero, M. D. C., Yenilmez, E., Şenel, B., ve Yazan, Y. (2019). Dexketoprofen trometamol-loaded poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles: Preparation, *in vitro* characterization and cyctotoxity. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 18(1), 1–11. https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i1.1

Öztürk, A. A., Güven, U. M., ve Yenilmez, E. (2018). Flurbiprofen loaded gel based topical delivery system: Formulation and *in vitro* characterization with new developed UPLC method. Acta Pharmaceutica Sciencia, 56(4), 81–105. https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05627

Öztürk, A. A., Namlı, İ., Güleç, K., ve Kıyan, H. T. (2020). Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: Formulation, characterization and *in vivo* HET-CAM analysis. Microvascular Research, 130. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.103991

Öztürk, A. A., ve Kıyan, H. T. (2020). Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using *in vivo* HET-CAM assay. Microvascular Research, 128. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.103961

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B., & Yazan, Y. (2017). Dexketoprofen Trometamol-Loaded Kollidon ® SR and Eudragit ® RS 100 Polymeric Nanoparticles: Formulation and In Vitro-In Vivo Evaluation. In *Am. J. Pharm* (Vol. 36, Issue 11).

Pandey, H., Kumar Sharma, U., ve Pandey, A. C.(2012).EUDRAGIT - BASED NANOSTRUCTURES: A POTENTIAL APPROACH FOR OCULAR DRUG DELIVERY. 1(2), 40–43. https://www.omicsonline.org/open-access-pdfs/eudragitbased-nanostructures-a-potential-approach-for-ocular-drugdelivery-.pdf

Pandita, D., Ahuja, A., Lather, V., Benjamin, B., Dutta, T., Velpandian, T., ve Khar, R. K. (2011). Development of lipid-based nanoparticles for enhancing the oral bioavailability of paclitaxel. AAPS PharmSciTech, 12(2), 712–722. https://doi.org/10.1208/s12249-011-9636-8

Park, H., Ha, D. H., Ha, E. S., Kim, J. S., Kim, M. S., ve Hwang, S. J. (2019). Effect of stabilizers on encapsulation efficiency and release behavior of exenatide-loaded PLGA microsphere prepared by the W/O/W solvent evaporation method. Pharmaceutics, 11(12). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120627

Pharm, I. J., Smerikarova, M., Bozhanov, S., & Maslarska, V.(2019).Short Communications Development and Validation of a RP-HPLC Method to Quantify Amoxicillin, Tinidazole, Esomeprazole and Lan-soprazole in a Mixture. http://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.611

Pharmacia Lettre, D., Bhagav, P., Deshpande, P., Pandey, S., & Chandran, S. (2010). Scholars Research Library Development and Validation of Stability Indicating UV Spectrophotometric Method for the Estimation of Brimonidine Tartrate in Pure Form, Formulations and Preformulation Studies. 2(3), 106–122. https://www.scholarsresearchlibrary.com/abstract/development-and-validation-of-stability-indicating-uv-spectrophotometricrnmethod-for-the-estimation-of-brimonidine-tartr-3146.html

Pielenhofer, J., Meiser, S. L., Gogoll, K., Ciciliani, A. M., Denny, M., Klak, M., Lang, B. M., Staubach, P., Grabbe, S., Schild, H., Radsak, M. P., Spahn-Langguth, H., ve Langguth, P. (2023). Quality by Design (QbD) Approach for a Nanoparticulate Imiquimod Formulation as an Investigational Medicinal Product. Pharmaceutics, 15(2). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020514

Pignatello, R., Ferro, M., & Puglisi, G. (2002). Preparation of Solid Dispersions of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs With Acrylic Polymers and Studies on Mechanisms of Drug-Polymer Interactions. In AAPS PharmSciTech (Vol. 3, Issue 2). https://doi.org/10.1208/pt030210

Polat, H. K., Aytekin, E., Karakuyu, N. F., Kurt, N., ve Yaziksiz, Y. (2024). LIPID NA-NOPARTICLES AS OCULAR DRUG DELIVERY SYSTEM. In Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi (Vol. 48, Issue 2, pp. 751–765). University of Ankara. https://doi.org/10.33483/jfpau.1420064

Prabhu, P., Kumar, N. R., Koland, M., Harish, N. M., Vijayanarayan, K., Dhondge, G., ve Charyulu, R. N. (2010). Preparation and evaluation of nano-vesicles of brimonidine tartrate as an ocular drug delivery system. Journal of Young Pharmacists, 2(4), 356–361. https://doi.org/10.4103/0975-1483.71623

Priyadarsini, S., ve Lahoti, S. R. (2022). RP-HPLC method development and validation for quantification of letrozole solid lipid nanoparticle. Journal of Research in Pharmacy, 26(2), 421–430. https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/4819490

POLAT, H. K., ÜNAL, S., AYTEKİN, E., ve GÖZCÜ, S. (2022).Ocular Drug Delivery Delivery Systems: Traditional Review. Journal of Literature Pharmacy Sciences, 11(3), 189–200. https://doi.org/10.5336/pharmsci.2022-93906

Rahman, Z., Xu, X.,Katragadda, U., Krishnaiah, Y. S. R.,Yu, L., ve Khan, M. A. (2014) . Quality by design approach for understanding the critical quality attributes of cyclosporine ophthalmic emulsion. Molecular Pharmaceutics, 11(3), 787–799. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp400484g

Rampado, R., ve Peer, D. (2023). Design of experiments in the optimization of nanoparticle-based drug delivery systems. Journal of Controlled Release, 358, 398–419. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.05.001

Rao, J. P., ve Geckeler, K. E. (2011).Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. In Progress in Polymer Science (Oxford) (Vol. 36, Issue 7, pp. 887–913). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001

Rathod, V. R., Shah, D. A., ve Dave, R. H. (2020).Systematic implementation of quality-by-design (QbD) to develop NSAID-loaded nanostructured lipid carriers for ocular application: preformulation screening studies and statistical hybrid-design for optimization of variables. Drug Development and Industrial Pharmacy, 46(3), 443–455. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32037896/

Ravi, G., ve Gupta, V. (2016). A Review on Recent Trends and Various Preparation Techniques of Polymeric Nanoparticles. Available Online Www.Jocpr.Com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 8(12), 207–214. https://www.jocpr.com/articles/a-review-on-recent-trends-and-various-preparation-techniques-of-polymeric-nanoparticles.pdf

Reddy, D. (2013). Formulation and *in vitro* evaluation of antineoplastic drug loaded na-particles as drug delivery system. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7(23), 1592–1604. https://doi.org/10.5897/AJPP2013.3436

Rojek, B., Bartyzel, A., Sawicki, W., ve Plenis, A. (2024). DSC, TGA-FTIR and FTIR Assisted by Chemometric Factor Analysis and PXRD in Assessing the Incompatibility of the Antiviral Drug Arbidol Hydrochloride with Pharmaceutical Excipients. Molecules, 29(1). https://doi.org/10.3390/molecules29010264

Romero-Alemán, M. M., Monzón-Mayor, M., Santos, E., ve Yanes, C. (2010). Expres-sion of neuronal markers, synaptic proteins, and glutamine synthetase in the control and regenerating lizard visual system. Journal of Comparative Neurology, 518(19), 4067–4087. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20737600/

Rosaini, Henni, Rivai, H., Dona Octavia, M., Yulia Rosanti, E., ve Makmur, I. (2021). The Effect of Different Concentration of Poloxamer 188 on Nanocrystalline Characteristics of Celery Herb Extract (Apium graveolens L.). Scholars Academic Journal of Pharmacy, 10(1), 1–5. https://doi.org/10.36347/sajp.2021.v10i01.001

Rosiak, N., Tykarska, E., ve Cielecka-Piontek, J. (2023). The Study of Amorphous Ka - empferol Dispersions Involving FT-IR Spectroscopy. International Journal of Molecular Sciences, 24(24). https://doi.org/10.3390/ijms242417155

Rubim, A. M., Rubenick, J. B., Laporta, L. V., Madalena, C., ve Rolim, B. (2013). A simple method for the quantification of diclofenac potassium in oral suspension by high-performance liquid chromatography with UV-detection. In Article Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Vol. 49, Issue 3). https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300021

Saha, M., Saha, D. R., Ulhosna, T., Sharker, S. M., Shohag, M. H., Islam, M. S., Ray, S. K., Rahman, G. M. S., ve Reza, H. M. (2021). QbD based development of resveratrol-loaded mucoadhesive lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *63*. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102480

Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., ve Labhasetwar, V. (2002). Residual polyvinyl al - cohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake a a a. In Journal of Controlled Release (Vol. 82). https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00127-X

Salim, S. A.,Badawi, N. M.,EL-Moslamy, S.H.,Kamoun, E. A., ve Daihom,B. A. (2023) . Novel long-acting brimonidine tartrate loaded-PCL/PVP nanofibers for versatile biomedical applications: fabrication, characterization and antimicrobial evaluation. RSC Advances, 13(22), 14943–14957. https://doi.org/10.1039/d3ra02244g

Sandle, T. (2014). Sterile ophthalmic preparations and contamination control. Journal of GXP Compliance, 18(3), 1–5. https://www.academia.edu/26905777/Sterile_Ophthalmic_Preparations_and_Contamination_Control

Sandle, T.(2025).Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: tech- nology, validation and current regulations. Woodhead Publishing. https://catalog.nlm.nih.gov/discovery/fulldisplay?docid=alma9916239433406676&context=L&vid=01NLM_INST:01NLM_INST&lang=en&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=LibraryCatalog&query=lds56,contains,Sterilization%20--%20methods,AND&mode=advanced&offset=50

Schubert, M. A., ve Müller-Goymann, C. C. (2003).Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles-evaluation of the method and process parameters. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00130-3

Sebastian, E., ve Senior, A. (2010). The Complexity and Origins of the Human Eye: A Brief Study on the Anatomy, Physiology, and Origin of the Eye. https://digitalcommons.liberty.edu/honors/116/

Seigel, G. M. (2014). Review: R28 retinal precursor cells: The first 20 years. Molecular Vision, 20, 301–306.

Sharma, P. K., ve Chauhan, M. K. (2020). Optimization and evaluation of encapsulated brimonidine tartrate-loaded nanoparticles incorporation in situ gel for efficient intraocular pressure reduction. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 95(1), 190–201. https://doi.org/10.1007/s10971-020-05305-z

Sharma, R., ve Walia, M. K. (2021). Nanoparticles:An Overview Preparation And Cha - racterization. International Journal of Pharmaceutical Research and Applications, 6, 368. https://ijprajournal.com/issue_dcp/Nanoparticles%20An%20Overview%20Preparation%20And%20Characterization.pdf

Shen, J., ve Burgess, D. J. (2013). *In vitro* dissolution testing strategies for nanoparticu - late drug delivery systems: Recent developments and challenges. In Drug Delivery and Translational Research (Vol. 3, Issue 5, pp. 409–415). https://doi.org/10.1007/s13346-013-0129-z

Shen, J., Wang, Y., ve Yao, K. (2021). Protection of retinal ganglion cells in glaucoma: Current status and future. In Experimental Eye Research (Vol. 205). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108506

Shikari, H., ve Samant, P. (2016). Intravitreal injections: A review of pharmacological agents and techniques. Journal of Clinical Ophthalmology and Research, 4(1), 51. https://journals.lww.com/jcor/fulltext/2016/04010/intravitreal_injections__a_review_of.12.aspx

Shim, M. S.,Kim, K. Y., ve Ju, W. K.(2017).Role of cyclic AMP in the eye with glauco- ma. BMB Reports, 50(2), 60–70. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.2.200

Siddiqua Gazi, A., ve Sailaja, A. K. (2018). Preparation and Characterization of Parace- tamol Loaded Eudragit S100 Nanoparticles by Salting Out Technique. Journal of Developing Drugs, 07(01). https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000183

Singh, K. H., ve Shinde, U. A. (2010).Development and Evaluation of Novel Polymeric

Nanoparticles of Brimonidine Tartrate. In Current Drug Delivery (Vol. 7). https://www.researchgate.net/publication/44625170_Development_and_Evaluation_of_Novel_Polymeric_Nanoparticles_of_Brimonidine_Tartrate

Sinkar, K. P., Bafna, P. S., & Mutha, R. E. (2022). Nanoprecipitation Based Preparation and Physicochemical Characterization of Flavonoid Nanoparticles. Journal of Plant Resources, 20(2), 139–145. https://doi.org/10.3126/bdpr.v20i2.57028

Sinsuebpol, C., ve Changsan, N. (2020). Effects of ultrasonic operating parameters and emulsifier system on sacha inchi oil nanoemulsion characteristics. Journal of Oleo Science, 69(5), 437–448. https://doi.org/10.5650/jos.ess19193

Solak, B., Soyer, P., Kaya-Tilki, E., ve Öztürk, A. A.(2025).Evaluation of antimicrobial properties and antioxidant activity of rosmarinic acid loaded Resomer RG 502 H based nanoparticles against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress: A detailed formulation, characterization and efficacy determination study. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 106. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106721

Sosnik, A., ve Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. In Advances in Colloid and Interface Science (Vol. 223, pp. 40–54). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003

Souza, I. D. L., Saez, V., ve Mansur, C. R. E. (2023). Lipid nanoparticles containing co-enzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. In Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (Vol. 230). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113491

Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., ve Blázquez-Castro, A.(2018).Tetrazo-lium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. In Acta Histochemica (Vol. 120, Issue 3, pp. 159–167). Elsevier GmbH. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005

T. Schofield, D. Robbins ve G. Miró-Quesada (2015). Critical Quality Attributes, Spe - cifications, and Control Strategy. Quality by Design for Biopharmaceutical Drug Product Development. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2316-8_21

Tapeinos, C., Battaglini, M., ve Ciofani, G. (2017).Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. In Journal of Controlled Release (Vol. 264, pp. 306–332). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.033

Taylor-Walker, G., Lynn, S. A., Keeling, E., Munday, R., Johnston, D. A., Page, A., Scott, J. A., Goverdhan, S., Lotery, A. J., ve Ratnayaka, J. A. (2016). The Alzheimer's-related amyloid beta peptide is internalised by R28 neuroretinal cells and disrupts the microtubule associated protein 2 (MAP-2). Experimental Eye Research, 153, 110–121. https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.10.013

Teasdale, A., Elder, D., Borman, P., ve Elder Phil Borman, D. (2014). ICH Quality Guidelines-A guide to practical implementation through case study examples Edited by Chapter 5 VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1).

Tefas, L. R., Tomuţă, I., Achim, M., ve Vlase, L. (2015).Development and optimization of quercetin-loaded plga nanoparticles by experimental design. Clujul Medical, 88(2), 214–223. https://doi.org/10.15386/cjmed-418

Teng, F., He, M., Xu, J., Chen, F., Wu, C., Wang, Z., ve Li, Y. (2020). Effect of ultrasonication on the stability and storage of a soy protein isolate-phosphatidylcholine nanoemulsions. Scientific Reports, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-70462-8

Teva Canada Limited. (2014). Product monograph: ratio-Brimonidine (Brimonidine Tartrate) Ophthalmic Solution 0.2% w/v. Submission Control No: 178571.

Thakral, S., Thakral, N. K., & Majumdar, D. K. (2013). Eudragit®: A technology evaluation. Expert Opinion on Drug Delivery, 10(1), 131-149. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23102011/

Thompson, P., Vilkelyte, V., Woronkowicz, M., Tavakoli, M., Skopinski, P., ve Roberts , H. (2024). Adenylyl Cyclase in Ocular Health and Disease: A Comprehensive Review. In Biology (Vol. 13, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/biology13060445

Torkildsen, G. L., Sanfilippo, C. M., DeCory, H. H., ve Gomes, P. J. (2018). Evaluation of Efficacy and Safety of Brimonidine Tartrate Ophthalmic Solution, 0.025% for Treatment of Ocular Redness. Current Eye Research, 43(1), 43–51. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29120262/

Tsai, C. H., Wang, P. Y., Lin, I. C., Huang, H., Liu, G. S., ve Tseng, C. L. (2018). Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 19, Issue 9). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19092830

Tüylek, Z. (2017).İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim. Bozok Tıp Dergisi , 7(3), 89–98.

Unagolla, J. M., & Jayasuriya, A. C. (2018). Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 114, 199–209. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.012

United States Pharmacopeia(2024).United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 47–NF 42). United States Pharmacopeial Convention.

Vaneev, A., Tikhomirova, V., Chesnokova, N., Popova, E., Beznos, O., Kost, O., ve Klyachko, N. (2021). Nanotechnology for topical drug delivery to the anterior segment of the eye. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 22, Issue 22). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms222212368

Varan, C., ve Bilensoy, E. (2017). Cationic PEGylated polycaprolactone nanoparticles carrying post-operation docetaxel for glioma treatment. Beilstein Journal of Nanotechnology, 8(1), 1446–1456. https://doi.org/10.3762/bjnano.8.144

Vauthier, C., ve Bouchemal, K. (2009).Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. In Pharmaceutical Research (Vol. 26, Issue 5, pp. 1025–1058). Springer New York. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3

Vehring, R. (2008).Pharmaceutical particle engineering via spray drying. In Pharmaceutical Research (Vol. 25, Issue 5, pp. 999–1022). https://doi.org/10.1007/s11095-007-9475-1

Wakefield, D., ve Chang, J. H.(2005).Epidemiology of uveitis. In International Ophthal-Ophthalmology Clinics (Vol. 45, Issue 2, pp. 1–13). https://doi.org/10.1097/01.iio.0000155938.83083.94

Wang, Y., Li, P., Tran, T. T. D., Zhang, J., ve Kong, L. (2016). Manufacturing techni - ques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. Nanomaterials, 6(2). https://doi.org/10.3390/nano6020026

Weinreb, R. N., Aung, T., ve Medeiros, F. A.(2014).The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. In JAMA (Vol. 311, Issue 18, pp. 1901–1911). American Medical Association. https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192

Weng, J., Tong, H. H. Y., ve Chow, S. F. (2020). In vitro release study of the polymeric

drug nanoparticles: Development and validation of a novel method. Pharmaceutics, 12(8), 1–18. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080732

Wiedmann, J., Kussin, C., & Jürgens, H. D. (2009). Design and implementation of a mobile multi-sensor platform for wireless environmental monitoring. Springer.

Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., ve Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. The Lancet Global Health, 2(2). https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1

Woodruff, M. A., ve Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. In Progress in Polymer Science (Oxford) (Vol. 35, Issue 10, pp. 1217–1256). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Yan, X., Liu, Q., Wu, S., Fan, X., Teng, Y., Wang, N., & Zhang, J. (2024). Tert-butyl hydroperoxide induces trabecular meshwork cells injury through ferroptotic cell death. Journal of Cell Communication and Signaling, 18(3), e12050. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39524143/

Yang, H., Li, J., Patel, S. K., Palmer, K. E.,Devlin, B., ve Rohan, L. C.(2019).Design of poly(Lactic-co-glycolic acid) (plga) nanoparticles for vaginal co-delivery of griffthsin and dapivirine and their synergistic effect for hiv prophylaxis. Pharmaceutics, 11(4). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040184

Yang, Y.,Wu, J.,Lu, W., Dai, Y.,Zhang, Y., ve Sun, X.(2022).Alterations in Mitochond-ria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Under Oxidative Stress in R28 Cells. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1432798/v1

Yau, J. W. Y., Rogers, S. L., Kawasaki, R., Lamoureux, E. L., Kowalski, J. W., Bek, T., Chen, S. J., Dekker, J. M., Fletcher, A., Grauslund, J., Haffner, S., Hamman, R. F., Ikram, M. K., Kayama, T., Klein, B. E. K., Klein, R., Krishnaiah, S., Mayurasakorn, K., O'Hare, J. P., … Wong, T. Y. (2012). Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. Diabetes Care, 35(3), 556–564. https://doi.org/10.2337/dc11-1909

Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., ve Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. In AAPS Journal (Vol. 16, Issue 4, pp. 771–783). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3

Yusuf, A., Almotairy, A. R. Z., Henidi, H., Alshehri, O. Y., ve Aldughaim, M. S.(2023) . Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems. In Polymers (Vol. 15, Issue 7). MDPI. https://doi.org/10.3390/polym15071596

Zafar, A., Ahmad, J., Akhter, S., ve Addo, R. T.(2016).Nanotechnology for transcorneal drug targeting in glaucoma: Challenges and progress. In Ocular Drug Delivery :Advances, Challenges and Applications (pp. 75–99). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47691-9_6

Zembala, J., Forma, A., Zembala, R., Januszewski, J., Zembala, P., Adamowicz, D., Teresiński, G., Buszewicz, G., Flieger, J., ve Baj, J. (2023). Technological Advances in a Therapy of Primary Open-Angle Glaucoma: Insights into Current Nanotechnologies. In Journal of Clinical Medicine (Vol. 12, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/jcm12185798

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., ve Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. AAPS Journal, 12(3), 263–271. https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., ve Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. In Molecules (Vol. 25, Issue 16). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules25163731

Zielińska, A., Soles, B. B., Lopes, A. R., Vaz, B. F., Rodrigues, C. M., Alves, T. F. R., Klensporf-Pawlik, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Severino, P., Santini, A., Chaud, M. v., ve Souto, E. B. (2020). Nanopharmaceuticals for eye administration: Sterilization, depyrogenation and clinical applications. Biology, 9(10), 1–18. https://doi.org/10.3390/biology9100336

Zuo, J., Gao, Y., Bou-Chacra, N., ve Löbenberg, R. (2014). Evaluation of the DDSolver software applications. BioMed Research International, 2014. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24877067/

http-1: https://www.hiseyeness.com/layers-of-the-eye.php (Erişim tarihi: 28.12.2025)

http-2: https://www.allaboutvision.com/tr/goz-bakimi/goz-anatomisi/goz-yapisi/kornea/ (Erişim tarihi: 28.12.2025)

http-3: https://www.linkedin.com/pulse/three-layers-tear-film-bridgitte-shen-lee-od/ (Erişim tarihi: 28.12.2025)

http-4: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Brimonidine-Tartrate#section=Chemical-Classes (Erişim tarihi: 18.12.2025)

http-5: https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/aldrich/cds022538?srsltid=AfmBOopLFUqJ8sZomud78Dgz0oH8UNwafiy6lsaqLjEdEP4gohFZ56h3 (Erişim tarihi: 18.12.2025)

http-6: RxMediaPharma (Erişim tarihi: 05.06.2025)

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasan Can HOŞER

Yabancı Dil : İngilizce – B1 Seviyesi

Doğum Yeri / Yılı :

E-Posta : _____

ORCID Numarası : _____

Eğitim Bilgileri:

Lisans: Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Lise: Kütahya Konuralp Anadolu Lisesi

İlk ve Orta Öğretim: Kütahya Atatürk İlkokulu ve Ortaokulu

Mesleki Deneyim:

Kurum: Kütahya Defne Eczanesi

Birim: 2. Eczacı

Bilimsel Faaliyetleri (Kongre, Sempozyum, Çalıştay vb.):

Hoşer H. C., Öztürk A. A.(22.09.2025). Development and Characterization of Eudragit RS 100-Based Nanoparticles Stabilized by Poloxamer 188 via Double Emulsion Solvent Evaporation Method: Impact of Formulation Parameters and Brimonidine Tartrate Loading. 7th International Symposium on Advances in Pharmaceutical Analysis, Ankara, Türkiye

Hoşer H. C., Öztürk A. A.(22.09.2025). Development and Validation of a UV Spectrophotometric Method for Quantification of Brimonidine Tartrate in Acetone:Water and Simulated Tear Fluid Media. 7th International Symposium on Advances in Pharmaceutical Analysis, Ankara, Türkiye