

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KERATOKONUS TEDAVİSİNDE RİBOFLAVİN'İN GİRİŞİMSEL OLMAYAN
("EPI-ON") TEKNİK İLE KORNEAYA TAŞINMASI İÇİN OKÜLER İLAÇ
TAŞIYICI PLATFORMLARIN TASARLANMASI VE İN VİTRO-İN VİVO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Eren AYTEKİN

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2020**

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, her konuda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, hep yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN'a**,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sağlayan, özgür ve rahat çalışma ortamı yaratarak araştırmaya teşvik eden başta Anabilim Dalı Başkanımız **Prof. Dr. Levent ÖNER** olmak üzere tüm değerli öğretim üyesi/elemanı hocalarıma, araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Doktora çalışmalarım süresince hep yanımda olan ve beni hep cesaretlendiren, **Ecz. Kerem POLAT'a**, **Ecz. Özgün Fırat DÜZENLİ'ye** ve **Ecz. Nihat KURT'a**,

Her an yanımda olan, zor zamanları sevgisiyle ve desteğiyle kolaylıkla aştığım, varlığıyla hayatıma renk katan biricik nişanlım **Berna DEMİREL'e**,

Hayatım boyunca her türlü fedakârlıkla bu günlere gelmemin asıl mimarları olan başta babam **Galip AYTEKİN**, annem **Necla AYTEKİN**, ağabeyim **Emre AYTEKİN** ve ablam **Elvan AYTEKİN** olmak üzere tüm **AİLEM'e**,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Aytekin E. Keratokonus Tedavisinde Riboflavin'in Girişimsel Olmayan ("Epi-On") Teknik ile Korneaya Taşınması için Oküler İlaç Taşıyıcı Platformların Tasarlanması ve In vitro – In vivo Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Keratokonus, ilerleyici özellikte ve etkin tedavinin sağlanamaması durumunda kornea nakli ile sonuçlanabilen bir göz hastalığıdır. Hastalığın tedavisi için klinikte en yaygın kullanılan yöntem korneal çapraz bağlama işlemidir. Ancak, riboflavinin kornea epitelinden geçememesi nedeniyle, bu işlemde ilk olarak göz üzerindeki epitel tabakası cerrahi işlem ile kazınarak uzaklaştırılmaktadır. Bu durum hastada birçok komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için bu tez kapsamında epitel tabakasının kaldırılmasına ihtiyaç duymayan riboflavin (RB) ve riboflavin-5-fosfat sodyum (RT) içeren hidrofilik jel, nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT) ve RB ko-kristal formülasyonları geliştirilmiş ve *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. *Ex vivo* ilaç geçiş çalışmalarında mannitol içeren ko-kristal formülasyonlarının ve pozitif yüklü RT içeren NLT formülasyonlarının daha yüksek ilaç geçişi sağladığı belirlenmiştir. *Ex vivo* kornea ilaç tutulumu çalışmalarında RB içeren NLT formülasyonlarının diğer gruplara üstünlük gösterdiği bulunmuştur. *In vivo* çalışmalarda RB içeren formülasyonların RT içeren formülasyonlara oranla daha yüksek kornea ilaç konsantrasyonu sağladığı tespit edilmiştir. *In vivo* biyomekanik çalışmalarda geliştirilen formülasyonlardan en ümit verici olanın RT ve Transcutol P içeren (THJ-TP) termosensitif jel formülasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu formülasyonun 15 dakikada bir uygulanmasına rağmen, her iki dakikada bir uygulanan ve "epi-on" (epitel kazınmadan) yönteme uygun olarak geliştirilmiş ticari preparat olan MedioCROSS TE'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Keratokonus, Riboflavin, Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı, Hidrofilik Jel, Ko-Kristal

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (SBAG, 215S685), TÜBİTAK.

ABSTRACT

Aytekin E. Design and In vitro - In vivo Evaluation of Ocular Drug Delivery Platforms for the Delivery of Riboflavin by Noninvasive (“Epi-On”) Technique in the Treatment of Keratoconus, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Technology Programme, Ph.D Thesis, Ankara, 2020. Keratoconus is an eye disease that is progressive and can result in corneal transplantation if effective treatment is not provided. The most commonly used method in the clinic for the treatment of the disease is the corneal cross-linking procedure. However, since riboflavin cannot pass through the corneal epithelium, in this procedure, the epithelial layer on the eye is first removed by surgical operation. This causes many complications in the patient. To overcome this problem, hydrogel, nanostructured lipid carrier (NLT) and co-crystal formulations containing riboflavin (RB) or riboflavin-5-phosphate sodium (RT) which do not need the removal of the epithelial layer, were developed and evaluated in vitro, ex vivo and in vivo. In ex vivo drug permeation studies, it was determined that co-crystal formulations containing mannitol and NLT formulations containing positively charged RT provide higher drug transition. In ex vivo corneal drug accumulation studies, NLT formulations containing RB were found to be superior to other groups. In vivo studies, it has been found that formulations containing RB provide higher corneal drug concentrations than formulations containing RT. It was found that the most promising formulation developed in in vivo biomechanical studies was the thermosensitive gel formulation containing RT and Transcutol P (THJ-TP). Although this formulation is applied every 15 minutes, it has been found that it is statistically significantly more effective than MedioCROSS TE, which is applied every two minutes and developed in accordance with the “epi-on” method (without epithelium scraping).

Keywords: Keratoconus, Riboflavin, Nanostructured Lipid Carrier, Hydrogel, Co-Crystal

Supporting Institution: TÜBİTAK 1001 Project - Scientific and Technological Research Projects Support Program (SBAG, 215S685), TÜBİTAK.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gözün Yapısı ve Fizyolojisi	4
2.1.1. Korneanın Yapısı	5
2.2. Göze İlaç Uygulama Sırasında Karşılaşılan Güçlükler	9
2.3. Topikal Uygulanan İlaçların Oküler Biyoyararlanımını Artırmada Formülasyon Stratejileri	11
2.4. Göze Uygulanan İlaç Şekilleri	13
2.5. Hidrofilik Jeller	13
2.5.1. Hidrofilik Jellerin Oküler Uygulamadaki Yeri	17
2.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar	18
2.6.1. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcıların Hazırlanması	21
2.7. Farmasötik Ko-Kristaller	23
2.8. Keratokonus	28
2.8.1. Keratokonus Tedavisi	30
2.8.2. Korneal Kolajen Çapraz Bağlama	32
2.9. Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum	37
2.9.1. Riboflavin'in Genel Özellikleri	37
2.9.2. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un Genel Özellikleri	38

3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar	39
3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	39
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar	40
3.2. Analitik Metod Validasyonları	41
3.2.1. Riboflavin Miktar Tayini	41
3.2.2. Riboflavin'in Analitik Yöntem Validasyonu	42
3.2.3. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum Miktar Tayini	44
3.2.4. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un Analitik Yöntem Validasyonu	44
3.2.5. Dokudan Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum Miktar Tayini	45
3.3. Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Formülasyonların Geliştirilmesi	45
3.3.1. Riboflavin İçeren Farmasötik Ko-Kristallerin Hazırlanması	45
3.3.2. Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	48
3.3.3. Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı (NLT) Formülasyonlarının Hazırlanması	51
3.4. Sitotoksisite Çalışmaları	56
3.4.1. Farmasötik Ko-Kristal Formülasyonları Üzerinde Gerçekleştirilen Sitotoksisite Çalışmaları	58
3.4.2. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Sitotoksisite Çalışmaları	58
3.4.3. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı Formülasyonları Üzerinde Gerçekleştirilen Sitotoksisite Çalışmaları	58
3.4.4. Su Kontrol Grubu Sitotoksisite Çalışmaları	58
3.5. İn Vitro Permeasyon Çalışmaları	59
3.6. Ex Vivo İlaç Geçiş Çalışmaları	60
3.7. İn vivo Çalışmalar	63
3.7.1. Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İn-vivo Doku Dağılımı	63
3.7.2. Korneanın İn Vivo Biyomekanik Cevabının Değerlendirilmesi	63
3.8. Stabilitate Çalışmaları	65

4. BULGULAR	66
4.1. Analitik Yöntem Validasyonları	66
4.1.1. Riboflavin'in Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	66
4.1.2. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	70
4.2. Ko-Kristal Formülasyonları	74
4.2.1. Ön Denemeler için Çözünürlük Çalışmaları	74
4.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC) Sonuçları	75
4.2.3 X Işını Kristalografisi (XRD) Sonuçları	79
4.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları	84
4.2.5. İn Vitro Lipofilite Değerlendirme Çalışması	90
4.3. Hidrofilik Jel Formülasyonları	90
4.3.2. Jelleşme Sıcaklığının Tayini	91
4.3.3. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu	92
4.3.4. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları	93
4.4. NLT Formülasyonları	93
4.4.1. NLT Formülasyonlarının Faktöriyel Tasarımı	93
4.4.2. NLT Formülasyonlarının İlaç Yükleme Etkinliği ve İn Vitro İlaç Salımı	101
4.4.3. NLT Formülasyonlarının Morfolojik İncelenmesi	102
4.5. Sitotoksite Çalışmaları	104
4.6. Permeabilite Çalışmaları	105
4.7. Ex Vivo Çalışmalar	107
4.7.1. Ex Vivo Geçiş Çalışması	107
4.7.2. Ex Vivo Korneal Tutulum Çalışması	110
4.8. İn Vivo Çalışmalar	111
4.8.1. Sıçanlarda İn Vivo Doku Dağılımı Çalışmaları	111
4.8.2. Korneanın İn Vivo Biyomekanik Cevabının Değerlendirilmesi	112
4.9. Stabilite Çalışmaları	118
4.9.1. Hidrofilik Jel Stabilite Çalışmaları	118
4.9.2. NLT Stabilite Çalışmaları	122

5. TARTIŞMA	128
5.1. Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	130
5.2. Ko-Kristal Formülasyonları	132
5.2.1. Ön Denemeler İçin Çözünürlük Çalışmaları	132
5.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC) Çalışmaları	133
5.2.3. X Işını Kristalografisi (XRD) Sonuçları	134
5.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları	136
5.2.5. İn Vitro Lipofilite Değerlendirme Çalışması	136
5.3. Hidrofilik Jel Formülasyonları	136
5.3.1. Optimum Pluronic F-127 Konsantrasyonunun Belirlenmesi	137
5.3.2. Jelleşme Sıcaklığının Tayini	138
5.3.3. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu	139
5.4. NLT Formülasyonları	140
5.4.1. NLT Formülasyonlarının Faktöriyel Tasarımı	141
5.4.2. İlaç Yükleme Etkinliği ve İlaç Salımı Çalışmaları	144
5.4.3. Morfolojik Özellikler	145
5.5. Sitotoksiste Çalışmaları	146
5.5.1. NLT Formülasyonları	146
5.5.2. Hidrofilik Jel Formülasyonları	147
5.5.3. Nikotinamid	148
5.6. Hücre Kültürü Permeabilite Çalışmaları	148
5.7. Ex vivo Çalışmalar	149
5.7.1. Ex vivo Korneal Geçiş Çalışması	149
5.7.2. Ex vivo Korneal Tutulum (Korneada Birikme) Çalışması	150
5.8. İn Vivo Çalışmalar	151
5.8.1. Sıçanlarda İn Vivo İlaç Doku Dağılımı Çalışmaları	151
5.8.2. Tavşan İn-Vivo Çalışmalar	152
5.9. Stabilite Çalışmaları	155
5.9.1. Hidrofilik Jel Stabilite Çalışmaları	155

5.9.2. NLT Stabilite Çalışmaları	155
6. SONUÇ	156
7. KAYNAKLAR	158
8. EKLER	
EK 1. Etik Kurul Kararı	
EK 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
EK 3. Yayın Bilgisi	
EK 4. Orijinallik Ekran Görüntüsü	
EK 5. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

a/a	Ağırlık/ağırlık
a/h	Ağırlık/hacim
ARPE 19	İnsan retinal pigment epitel hücre hattı
ATCC	American Type Culture Collection
CMC	Karboksimetil Selüloz
DALK	Derin anterior lamellar keratoplasti
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	Fourier transform infrared
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HPMC	Hidroksi propil metil selüloz
KKÇP	Korneal kolajen çapraz bağlama
KLN	Katı lipid nanopartikül
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Miktar tayini sınırı
MTT	Metil-tiyazol-tetrazolyum
NLT	Nanoyapılı lipit taşıyıcı
PAA	Poliakrilamid
Papp	Görünür permeabilite sabiti
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Poli-etilen Glikol
PK	Penetran keratoplasti

PVA	Poli (Vinil Alkol)
PVP	Poli (Vinil Prolidon)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
TEER	Transepitelyal direnç
USP	Amerikan farmakopesi
UVA	Ultraviyole A
VK	Varyasyon katsayısı
\bar{X}	Ortalama
XRD	X Işını Kristalografisi
YAM	Yüzey aktif madde

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Gözün anatomik yapısı ve göze ilaç uygulanmasında karşılaşılan engellerin şematik gösterimi.	5
2.2.	Kornea yapısının şematik gösterimi.	6
2.3.	Hidrofobik etkileşimlerle kümeleşme sonucu jelleşmenin şematik gösterimi.	16
2.4.	Pozitif yüklü polimere zıt yüklü polimer veya zıt yüklü çapraz bağlayıcı madde eklenmesi sonucu jelleşmenin şematik gösterimi.	16
2.5.	Hidrojen bağı etkileşimi ile jelleşmenin şematik gösterimi.	17
2.6.	Çapraz bağlanma maddesi ile jelleşmenin şematik gösterimi.	17
2.7.	KLN ve NLT yapılarının şematik gösterimi.	20
2.8.	Etkin maddelerin olası katı form yapılarının şematik gösterimi.	25
2.9.	Normal göz ve keratokonuslu gözün şematik olarak gösterimi.	28
2.10.	Keratokonusta uygulanan tedavi yöntemlerinin şematik gösterimi.	30
2.11.	UVA ışığı uygulanması sonucunda riboflavinin serbest radikal oluşturma mekanizmasının şematik gösterimi.	33
2.12.	Standart ("Epi-Off") Yöntem ile KKÇB işleminin şematik olarak gösterimi.	34
2.13.	Riboflavinin kimyasal formülü.	37
2.14.	Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un kimyasal formülü.	38
3.1.	Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren termosensitif jel formülasyonlarının in vitro salım deneylerinin şematik gösterimi.	51
3.2.	NLT Formülasyonlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.	53
3.3.	MTT testinde kullanılan 96 kuyucuklu plakanın şematik gösterimi.	59
3.4.	İn vitro permeasyon çalışmalarının şematik gösterimi.	60
3.5.	<i>Ex vivo</i> geçiş çalışmaları için kullanılan transport sisteminin şematik görünümü.	62
3.6.	<i>Ex vivo</i> kornea çalışma düzeneğinin fotoğrafı.	62
3.7.	Tavşan gözlerine UV ışığı uygulanması (korneal çapraz bağlama işlemi) için kullanılan CCL Vario cihazının parametrelerini gösteren fotoğraf.	64
3.8.	Kornea numunelerinin Texture Analyzer cihazı ile incelenmesini gösteren fotoğraf.	65
4.1.	Riboflavin'in HPLC kromatogramı.	66

4.2.	Riboflavin'nin doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği.	67
4.3.	Riboflavin-5-fosfat sodyum'un kromatogramı.	70
4.4.	Riboflavin-5-fosfat sodyumun doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği.	71
4.5.	Saf maddelerin DSC termogramı.	76
4.6.	1R1N grubu formülasyonların DSC termogramı.	77
4.7.	1R1T, 1R1D, 1R1M ve 1R2N grubu formülasyonların DSC termogramı.	78
4.8.	Saf maddelerin XRD bulguları.	79
4.9.	1R1M grubu formülasyonların XRD bulguları.	80
4.10.	1R1N grubu formülasyonların XRD bulguları.	81
4.11.	1R2M grubu formülasyonların XRD bulguları.	82
4.12.	1R2N grubu formülasyonların XRD bulguları.	83
4.13.	Riboflavin'in FTIR spektrumu.	84
4.14.	Nikotinamid'in FTIR spektrumu.	85
4.15.	Mannitol'ün FTIR spektrumu.	85
4.16.	1R1M grubu formülasyonların FTIR spektrumları.	86
4.17.	1R2M grubu formülasyonların FTIR spektrumları.	87
4.18.	1R1N grubu formülasyonların FTIR spektrumları.	88
4.19.	1R2N grubu formülasyonların FTIR spektrumları.	89
4.20.	Farklı Pluronic F-127 oranlarının artan sıcaklık ile jelleşme bulguları.	91
4.21.	% 18 (a/h) Pluronic F-127 içeren örneğin 31,4°C'de tüpte düz (a) ve ters çevrilmiş (b) durumdaki görüntüleri.	92
4.22.	Hidrofilik jel formülasyonlarının sıcaklığa karşı viskozite değişimi bulguları.	92
4.23.	Hidrofilik jel formülasyonlarının in vitro ilaç salım profilleri.	93
4.24.	RBN grubu formülasyonların faktöriyel tasarım sonuçları.	95
4.25.	RBTP grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.	96
4.26.	RB+ grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.	97
4.27.	RTN grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.	98
4.28.	RTTP grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.	99
4.29.	RT+ grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.	100
4.30.	NLT formülasyonlarının ilaç yükleme bulguları.	101
4.31.	% 2 YAM içeren NLT formülasyonlarının kümülatif ilaç salımı.	102

4.32.	RBN, RBTP, RB+, RTN, RTTP, RT+ kodlu NLT formülasyonlarının SEM fotoğrafları.	103
4.33.	MTT testine ilişkin plakların görüntüsü.	104
4.34.	ARPE-19 hücre hattı kullanılarak her üç formülasyon grubu (ko-kristal, hidrofilik jel, NLT) ile gerçekleştirilmiş in vitro hücre canlılığı çalışması.	105
4.35.	ARPE-19 hücre hattı kullanılarak her üç formülasyon grubu (ko-kristal, hidrofilik jel, NLT) ile gerçekleştirilmiş in vitro geçiş çalışması.	106
4.36.	ARPE-19 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiş in vitro geçiş çalışması. Formülasyonlar etken madde ile karşılaştırılmıştır.	106
4.37.	Riboflavin içeren formülasyonların ex vivo geçiş çalışması bulguları.	108
4.38.	Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ex-vivo geçiş çalışması bulguları.	109
4.39.	Riboflavin içeren formülasyonların ex vivo korneal tutulum çalışması bulguları.	110
4.40.	Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ex vivo korneal tutulum çalışması bulguları.	110
4.41.	Riboflavin içeren formülasyonların uygulanması sonucu sıçan kornea dokusunda tespit edilen riboflavin konsantrasyonu değerleri.	111
4.42.	Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ve müstahzarlarının (D:MedioCross Dekstroz, TE:MedioCross Transepitelyal) uygulanması sonucu sıçan kornea dokusunda tespit edilen etken madde konsantrasyonu değerleri.	111
4.43.	Formülasyon uygulanmamış gruba UV ışığı uygulanmasının fotoğrafı.	112
4.44.	Formülasyon uygulanmış gruba UV ışığı uygulanmasının fotoğrafı.	112
4.45.	Korneada zamana bağlı ilaç birikimini gösteren fotoğrafı.	112
4.46.	Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %4 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi.	113
4.47.	Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %6 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi.	114
4.48.	Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %8 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi.	115
4.49.	Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %10 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi.	116
4.50.	Tüm formülasyonların ve piyasa preparatlarının uygulandığı korneaların farklı gerilim (strain) yüzdelerinde göstermiş olduğu direnç (stres) değerleri.	117
4.51.	BHJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	118

4.52.	BHJ-TP grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	119
4.53.	THJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	120
4.54.	THJ-TP grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	121
4.55.	NLT formülasyonlarının oda sıcaklığındaki SEM görüntüleri.	125
4.56.	NLT formülasyonlarının +4°C'deki sıcaklığındaki SEM görüntüleri.	126
4.57.	NLT formülasyonlarının -20°C'deki sıcaklığındaki SEM görüntüleri.	127

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Göze uygulanan ilaç şekilleri. .	13
2.2. Hidrofilik jellerin sınıflandırmaları.	15
2.3. Ko-kristal hazırlama yöntemleri.	26
2.4. Keratokonusta uygulanan tedavi yaklaşımları. .	31
2.5. Riboflavinin fizikokimyasal özellikleri.	37
2.6. Riboflavin-5-fosfat sodyum'un fizikokimyasal özellikleri.	38
3.1. Riboflavin'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	41
3.2. Riboflavin-5-fosfat sodyumun HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	44
3.3. Riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum'un LC/MS ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	45
3.4. Riboflavin'in Ko-Kristal Yapılarının Oluşturulması için Kullanılan Yöntemler.	47
3.5. Riboflavin ve riboflavin-5-Fosfat sodyum içeren hidrofilik jel formülasyonlarının bileşenleri.	49
3.6. Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonlarının bileşenleri ve oranları.	52
3.7. Faktöriyel tasarım çalışmaları.	54
3.8. Faktöriyel tasarım çalışmalarında hazırlanan NLT grupları.	54
3.9. İleri çalışmalar için seçilen formülasyonlar.	56
4.1. Riboflavin'in analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları.	68
4.2. Riboflavin'in analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik sonuçları.	68
4.3. Riboflavin'in analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları.	69
4.4. Riboflavin'in stabilitesine ilişkin bulgular.	69
4.5. Riboflavin-5-fosfat sodyumun analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları.	72
4.6. Riboflavin-5-fosfat sodyumun analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik sonuçları.	72
4.7. Riboflavin-5-fosfat sodyumun analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları.	73

4.8.	Riboflavin-5-fosfat sodyum'un stabilitesine ilişkin bulgular.	73
4.9.	Ön denemelerde 40 mg/20 mL konsantrasyondaki riboflavinin çözücü/çözücü karışımındaki çözünürlüğünün görsel değerlendirilmesi bulguları.	74
4.10.	Geliştirilen ko-Kristal formülasyonlarının su fazında dağılım yüzdeleri.	90
4.11.	NLT formülasyon grupları.	94
4.12.	RBN grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.	95
4.13.	RBTP grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.	96
4.14.	RB+ grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.	97
4.15.	RTN grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.	98
4.16.	RTTP grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.	99
4.17.	RT+ grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.	100
4.18.	NLT formülasyonlarının in vitro salım bulgularından elde edilen F2 değerleri	102
4.19.	BHJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	118
4.20.	BHJ-TP grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	119
4.21.	THJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	120
4.22.	THJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.	121
4.23.	NLT'lerin oda sıcaklığındaki stabiliteleeri.	122
4.24.	NLT'lerin +4°C'deki sıcaklığındaki stabiliteleeri.	123
4.25.	NLT'lerin -20°C'deki sıcaklığındaki stabiliteleeri.	124

1. GİRİŞ

Günümüzde ilaç araştırmaları ve teknolojisindeki büyük ilerlemelere rağmen, gözün eşsiz koruma mekanizmaları nedeniyle göz hastalıklarının tedavisi hala büyük zorluklar içermektedir. Bu mekanizmalar, ilaçların gözün hedeflenen bölgesine istenen düzeyde ve komplikasyonlar olmadan, güvenli bir şekilde taşınmasına ciddi engel teşkil etmektedir. Bunlardan biri de, gözün ön bölümünde yer alan saydam kornea tabakasıdır. Bu tabakanın üzerini örten gözyaşının üretim ve boşaltım döngüsü, enzim ve protein içeriği topikal uygulanan ilaçların inaktivasyonuna veya uzaklaştırılmasına neden olurken, kornea epitelinin lipid ve sıkı kavşaklardan oluşan yapısı hidrofilik ve iyonize ilaçların geçişine izin vermemektedir. İleri formülasyon tasarımları üzerinde yapılan birçok çalışmaya rağmen bu probleme çözüm bulunamaması nedeniyle bazı topikal ilaç uygulamaları, klinikte hala kornea epitelinin cerrahi işlem ile uzaklaştırılmasından sonra yapılmaktadır.

Keratokonus, korneanın incilmesi, sivrileşerek koni şekli alması ile meydana gelen, ilerleyici özellikte dejeneratif bir hastalıktır. Bu dejenerasyon, hastada ciddi görme kayıplarına yol açmakta ve etkin tedavinin sağlanamadığı durumlarda kornea nakli gerektiren ağır tablolar meydana gelebilmektedir.

Keratokonus toplumda yaygın (1-500/2000) olarak görülen bir hastalıktır. Günümüzde hastalığın patofizyolojisine göre tedavide kullanılan yöntemler; kornea çapraz bağlanması ("corneal cross-linking"), özel tasarlanmış lens, kornea içi halka veya intra-oküler lens implant uygulamaları ve lazerle (keratoktomi) tedavi olarak sıralanabilir. Bu uygulamalar arasında en yaygın olarak kullanılan ve diğer tedavi yöntemlerine göre daha başarılı sonuçlar veren tedavinin kornea çapraz bağlanması olduğu bildirilmiştir.

Keratokonus hastalığında, kornea epitelinin bazal membranındaki epitel hücrelerinin dejenerasyonu sonucu proteolitik enzimlerin salınması ile stromada bulunan kolajen lifleri parçalanarak korneanın biyomekanik gücü zayıflamaktadır. Kornea çapraz bağlanması tedavisinde, kolajen lifleri arasındaki çapraz bağlanma derecesi, B2 vitamini ve aynı zamanda fotoduyarlılaştırıcı ("photosensitizer") bir madde olan riboflavin uygulanmasının ardından UVA ışığı uygulaması ile

artırılmaktadır. Riboflavinin kornea epitelinden geçememesi nedeniyle, bu yöntemde, ilk olarak göz üzerindeki epitel tabakası cerrahi işlem ile kazınarak uzaklaştırılmaktadır (“Epi-Off” Tedavi). Tedavide en yaygın olarak kullanılan yöntem olmasına rağmen bu yöntemde, epitelin cerrahi işlem ile uzaklaştırılmasının birçok komplikasyonlara neden olduğu ve tedavinin başarısını olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Bu yöntemin sakıncaları; mikrobiyal enfeksiyon riski, kornea erimesi nedeniyle keratit oluşumu, görme netliğinin geri dönüşümsüz olarak azalmasına neden olan korneal skar oluşumu, şiddetli ağrı, topikal antibiyotik, steroid, nonsteroidal antiinflamatuvar veya lubrikan ilaç kullanma gerekliliği olarak sıralanabilir.

Riboflavin gibi birçok ilaç da prekorneal ve korneadaki engeller nedeniyle göz dokularına istenen düzeyde ulaşamamaktadır. İlaçların kornea epitelinden geçişlerini artırarak oküler biyoyararlanımı iyileştirmek üzere literatürde kullanılan yaklaşımlar; ilacın fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi (lipofilisitenin artırılması vb), penetrasyon artırıcıların kullanılması, formülasyon viskozitesinin artırılması, nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, formülasyona katyonik yük kazandırılması ve mukoadhezif formülasyonların hazırlanması vb. olarak sıralanabilir.

Girişimsel bir teknik olan klasik kornea çapraz bağlanması (“Epi-off”) yönteminin sakıncalarını ortadan kaldırmak üzere, riboflavinin korneaya epitel uzaklaştırılmadan (“Epi-on”) taşınması için birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda emülsiyon gibi lipid içeren formülasyonların hazırlanması, siklodekstrin, benzalkonyum klorür, EDTA, alkol gibi penetrasyon artırıcı maddelerin formülasyonlara ilave edilmesi, maddenin değişik tuzları veya baz halde uygulanması, lipofilik ester ön ilaç formları veya lipofilik ester lipid konjugatlarının hazırlanması gibi yaklaşımlar denenmiş olup, riboflavinin korneaya penetrasyonunda bir miktar artış sağlanmıştır. Ancak, girişimsel teknik ile elde edilen sonuç kadar başarılı sonuçlar henüz elde edilememiştir. Benzer şekilde, riboflavinin kornea epitelinden geçişini penetrasyon artırıcı kullanarak artırmak üzere geliştirilen bir ürün olan Ricrolin® TE’ nin, girişimsel teknik için geliştirilen klasik şekline göre (Ricrolin®) klinikte çok az tercih edildiği bildirilmiştir.

Son zamanlarda riboflavinin girişimsel olmayan teknik ile korneaya taşınmasına yönelik araştırma ve patent sayısında büyük bir artış olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar ve klinisyenler keratokonusun girişimsel olmayan, etkin ve güvenli tedavisi için yeni formülasyon tasarımlarına ihtiyaç olduğunu bildirmiştir. Bu yaklaşımlarda hedef riboflavinin büyük bir fizyolojik engel olan kornea epitelini geçerek etkin miktarda stromada birikmesinin sağlanmasıdır. Bu hedefe ulaşmada literatürde denenmemiş, rasyonel formülasyon yaklaşımlarının kullanılması optimum bir bakış açısı olabilir. Bu nedenle bu doktora tez çalışmasının amacı,

i) ilaçların kornea epitelini geçmesinde önemli katkı sağlayan artmış çözünürlük ve lipofilite faktörlerini birarada uygulamayı amaçlayan kimyasal yaklaşım: baz (lipofilik) haldeki riboflavinin mannitol, dekstroz ve trehaloz gibi yardımcı maddeler ile ko-kristal formlarının oluşturulmasıyla lipofilitesinin azalmadan çözünürlüğünün artırılması ile çözelti formülasyonun geliştirilmesi,

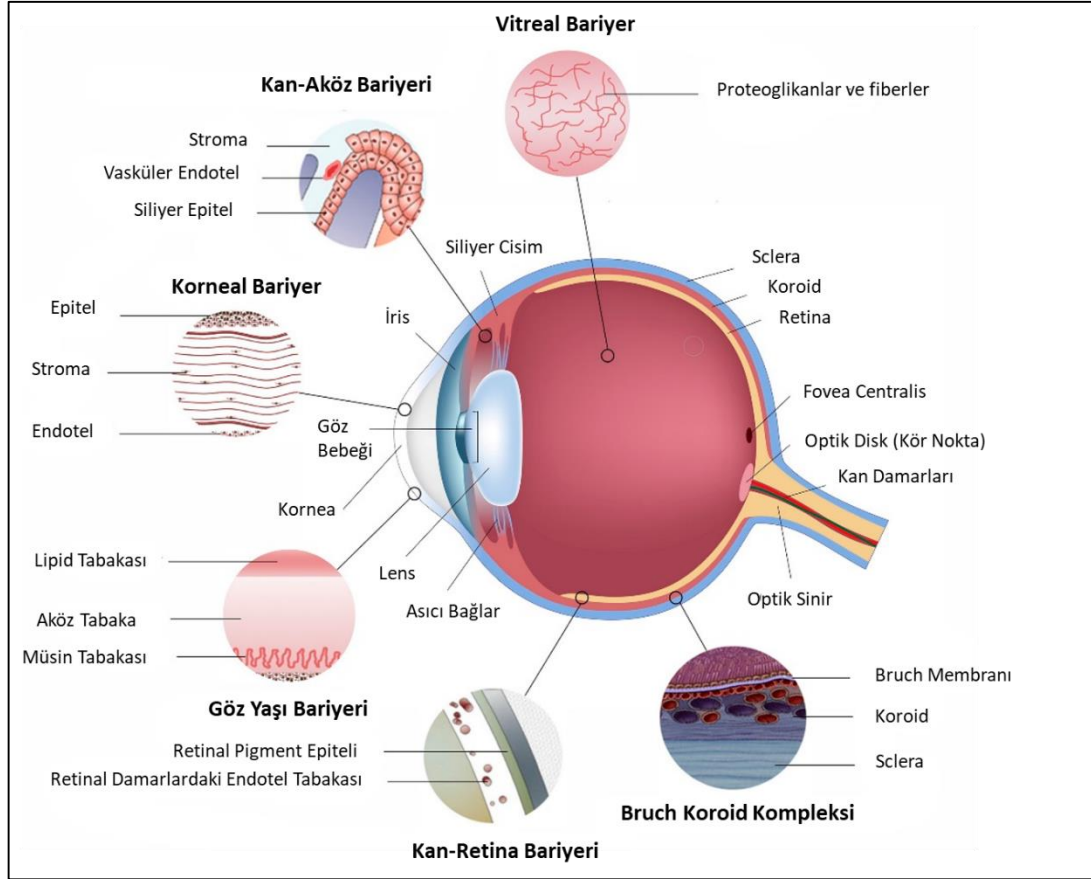
ii) ilaçların kornea epitelini geçmesinde önemli katkı sağlayan prekorneal alanda uzun süre kalış (artmış viskozite veya nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistem ile) faktörünü temel alan yaklaşım: bu yaklaşım kapsamında riboflavinin baz (lipofilik) veya tuz (hidrofilik) yapıda olmasının ve hidrofilik (termosensitif jel) veya hidrofobik (nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT)) sistemler ile taşınmasının uzun süre kalış yaklaşımına ilave bir katkısının olup olmayacağını araştırılması, olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen formülasyonlar üzerinde yapılacak in vitro karakterizasyon, ex vivo ve in vivo çalışmalar ile uygun formülasyonlar belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gözün Yapısı ve Fizyolojisi

Göz ışığı algılayan ve elektro-kimyasal sinyallere dönüştürerek görmeyi sağlayan organdır. Gözün anatomik yapısı anterior (ön) segment ve posterior (arka) segment olarak iki ayrı bölümde ifade edilebilir. Anterior segment, gözün 1/3'lük ön kısmını oluşturan, göz bebeği, kornea, iris, aköz hüner ve lensi içeren bölümdür. Gözün 2/3'lük arka kısmını meydana getiren posterior segment ise, vitröz hüner, retina, makula ve optik sinirleri içerir (1, 2) (Şekil 2.1.). Buna ilaveten, göz küresi fonksiyonel olarak üç tabakada incelenebilir. En dışta bulunan koruyucu tabaka sklera ve korneadan oluşmaktadır. Kornea 11,7 mm çapında ve 0,5 - 0,7 mm kalınlıkta şeffaf yapıda olan gözü enfeksiyonlara ve fiziksel hasara karşı koruyan bunun yanında ışığı kırarak lens ve retinaya ileten bölümdür (3). Sklera gözün en dış tabakası olup gözü iç ve dış kuvvetlerden koruyarak gözün şeklinin bozulmamasını sağlayan yapıdır (4). Orta tabaka, siliyer cisim, koroid ve irisi içermektedir. Koroid, retina ve sklera arasında bulunan yüksek derecede damarlanma gösteren yapıdır. İris, göz bebeği açıklığını kontrol ederek retinaya ulaşan ışık miktarının ayarlanmasında rol oynayan yapıdır. Siliyer cisim ise lensin şeklini kontrol eden yapıdır. Retina, iç tabakayı oluşturan ve görme duyusu için temel sinir hücreleri ve yapılarını içeren tabakadır (5).



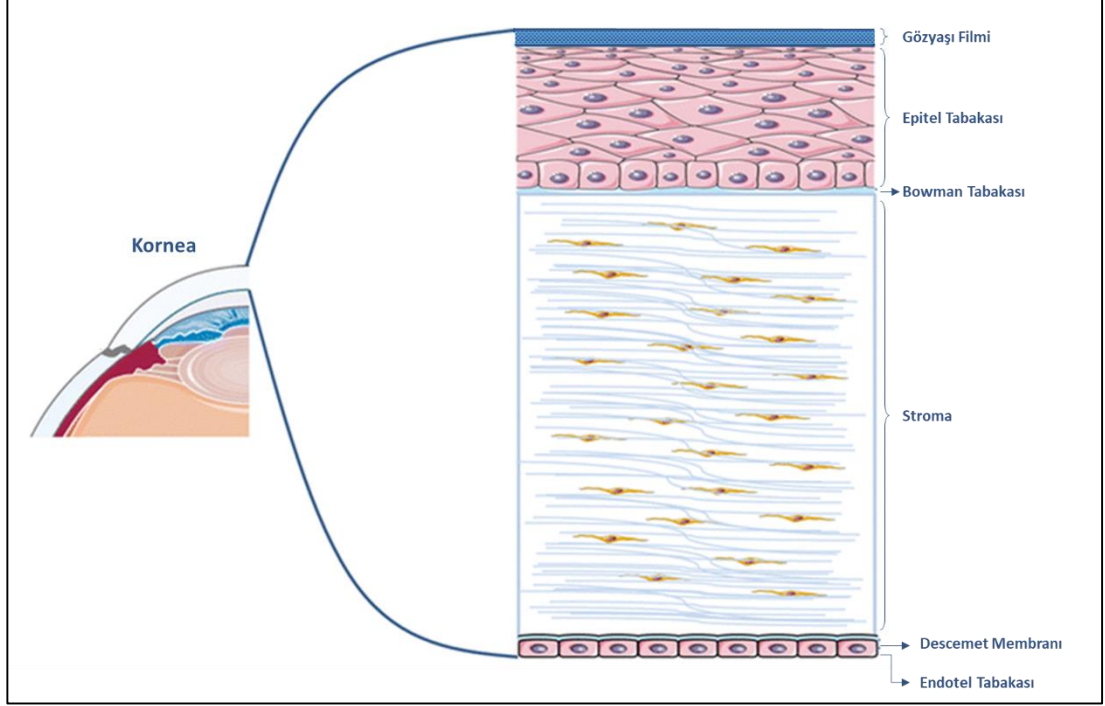
Şekil 2.1. Gözün anatomik yapısı ve göze ilaç uygulanmasında karşılaşılan engellerin şematik gösterimi. (Lynch ve ark. (6)'dan değiştirilerek).

2.1.1. Korneanın Yapısı

Kornea, damarlanmanın olmadığı, ışığa geçirgen saydam bir dokudur. Gözde enfeksiyonları ve fiziksel hasarları önlemek için yapısal bariyer görevi görmekte ve göz yüzeyinin yaklaşık %15'ini kaplamaktadır (Şekil 2.2.). Bunun yanı sıra göz yüzeyinde ışığın kırılımının yaklaşık %70'lik bölümü kornea tarafından gerçekleştirilmektedir. Yaklaşık olarak 11 mm çapında olan kornea dokusunun kalınlığı merkezde yaklaşık 500 µm olup periferde doğru kalınlaşan oval bir yapıya sahiptir. Kornea'nın %90'ı çapraz bağlı kolajen lifleri içeren stroma yapısından oluşmaktadır (7).

Kornea'nın oval ve kavisli yapısı içerdiği çeşitli biyomekanik yapılar ve çevresel faktörler ile sağlanmaktadır. Stromal sertlik ('rigidity') korneanın mevcut yapısının korunmasında özel bir öneme sahiptir (8).

Kornea 3 hücreli ve 2 ara yüzey olmak üzere toplam 5 tabakadan oluşmaktadır.



Şekil 2.2. Kornea yapısının şematik gösterimi. (Rowsey ve ark. (9)'dan değiştirilerek).

Epitel Tabakası

Epitel yüzeyi dış çevre ile temasta bulunan ve buna bağlı olarak gözdeki bariyerlerin ilkinin oluşturduğu 40 μm ile 50 μm kalınlığı ile korneal kalınlığın %10'unu meydana getiren yapıdır (7). Genel olarak yüzeysel yassı kısım, ortada kanat hücreleri ve en altta bazal hücreleri olarak 3 kısımda incelenebilir.

En fazla farklılaşma göstererek korneanın en dış kısmında bulunan epitel hücre tabakası yassı bir yapıya sahiptir ve gözyaşı filminin rahat bir şekilde yayılmasını sağlar. Gözyaşı, epitel tabakasını koruyan, aynı zamanda içerdiği büyüme faktörleri ile epitel tabakasının gelişmesi ve tamirinde hayati rol oynayan bir tabakadır. Epitel tabakanın en üstünde bulunan yassı hücrelerin yüzeyleri yüksek oranda mikrovilüllerle kaplıdır. Bu sayede epitel tabakasının yüzey alanı ve gözyaşına olan tutunma oranı ('adherence') artmaktadır (10).

Korneal epitel hücrelerinin ömürleri 7-10 gün arasında olup her hafta yenilenmesinin önünü açmaktadır (11). Yeni oluşan perilimbal bazal epitel hücreleri bir yandan korneanın yüzeyine doğru hareket edip eski hücreleri epitelin dış yüzeyine doğru itmekte bir yandan da başkalaşım göstermektedir. Bu eski hücreler korneal epitel tabakasının yüzeylerindeki görevlerini de tamamladıktan sonra gözyaşı ile uzaklaştırılmaktadır. Tüm bu oluşumlar gerçekleşirken epitel tabakası gözü koruma görevini eksiksiz yerine getirmelidir. Bunun gerçekleşmesini sağlayan tabaka epitelin orta kısmında bulunan kanat hücreleridir (12).

Korneal epitel tabakasının en alt katmanında bazal epitel hücreleri bulunmaktadır. Yaklaşık 20 µm kalınlığında olup kornea epitelindeki mitoz bölünme kapasitesine sahip tek hücre tipidir (13). Tight junctions (sıkı bağlantı) denilen hücrelerin yan yüzeylerini birbirine bağlayarak toksinler, mikroorganizmalar ve yabancı maddelerin geçişini önleyen yapılar bu tabakada bulunmaktadır. Bu hücreler tek sıra şeklinde bulunmakla birlikte aynı zamanda alt membrana hemidesmozomlarla tutunmaktadır (14). Bu güçlü bağlantılar sayesinde epitel tabakanın ayrışması önlenmektedir.

Bowman Tabakası

Stromanın üst kısmında yer alan yaklaşık 15 µm kalınlığında olan korneanın şeklini korumasına yardımcı olan tabakadır. Bowman tabakası hücresel bir yapı olmayıp tip I - tip IV kolajen ve proteoglikanlardan meydana gelmektedir. Rejenerasyon yeteneği bulunmadığından zarar gördüğü takdirde yara dokusu oluşabilmektedir (7).

Stroma

Korneanın temel yapısal iskeletini ve kornea kalınlığının yaklaşık %80-85'ini oluşturan bölümdür. Kolajen liflerden ve ekstrasellüler matriksten meydana gelmiştir. Paralel yapıdaki kolajen iplikçilerinin paketlenmesiyle paralel şekilde korneal lamellar yapılar oluşmaktadır (15). Stroma, bu kusursuz yapısı sayesinde trasparan özellik kazanmakta ve diğer kolajen içeren yapılardan ayrılmaktadır.

Lamellar yapılar genelde birbirlerinden bağımsız olsa da zaman zaman kolajen lifleri diğer lamellar yapılara uzanabilmektedir. Bu yapıların her biri yaklaşık 2 μm kalınlığındadır ve sayıları 200-250 arasında değişmektedir (16). Stromadaki kolajenin %58'ini tip I kolajen oluşturmaktadır ve tip V, tip VI, tip XII ve tip XIV türevi kolajenler de burada bulunur (17). Korneal lamellar yapıların stroma içerisinde yönelimi komşu lamellar yapılar tarafından belirlenmektedir. Stromanın endotele bakan bölgesindeki (posteriyor) lamellar yapılar birbirlerine yatay şekilde konumlanmışken stromanın epitele bakan bölgesindeki (anteriyor) lamellar yapılar birbirlerine daha dik konumlanmışlardır. Bu eşsiz yapı stromaya önemli bir dayanıklılık ve gerilme direnci kazandırmaktadır (16) .

Stromada lifli yapı katmanlarının arasında proteoglikan molekülleri bulunmaktadır. Bu yapılar bir protein çekirdeğine bağlı olan glikozaminoglikan zincirlerini içerir. Bu zincirler suyu sıkı bir şekilde bağlayarak jelimsi bir yapı meydana getirir ve korneanın baskı ve basınca dayanıklı, esnek bir hale gelmesinde önemli rol oynar (18).

Stromada kolajen lif yapılarına ve ekstraselüler matrikse ek olarak keratositler bulunmaktadır. Bu hücreler korneanın sertliği ve şeffaflığından sorumlu olan ekstraselüler matriksin ve kolajen liflerinin birbiri ile bağlanmasını sağlayan, proteoglikan sentezini düzenlemektedir. Bu keratositlerin çoğu stromanın yüzeyel tarafında daha yoğun şekilde bulunur ve korneal kristalin içerir. Bu kristalinler keratositlerden ışığın yansımalarını azaltmakta ve korneal şeffaflığın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (16).

“Descemet” Tabakası

Korneada stromanın arkası ile endotel tabakası arasında kalan, kalınlığı 5 μm ile 10 μm arasında değişebilen bir bazal membrandır “Descemet” tabakasının yapısında posteriyor ve anteriyor olarak iki ayrı bölüm bulunmaktadır. Posteriyor bölümü endotel tabakası tarafından meydana getirilmiş, anteriyor katmanı ise stromaya komşu olan kolajen lamellar yapıdan ve proteoglikanlardan oluşmuştur (19).

Endotel Tabakası

Korneanın posteriyor yüzeyinde tek tabaka halinde bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Endotel tabakası, sürekli kolajen salarak "Descemet" tabakasını oluşturmaktadır. Endotel tabakası su dengesini korur ve aköz hümörden gelen besin maddeleri ile çeşitli moleküllerine geçişine olanak sağlar (20).

2.2. Göze İlaç Uygulama Sırasında Karşılaşılan Güçlükler

Göz dokularına ilaç taşınması gözdeki anatomik ve fizyolojik engeller nedeniyle zordur. Gözün yüzeysel hastalıklarının tedavisinde, sistemik yoldan ilaç uygulanması, gözde yer alan kan-aköz bariyeri ve kan-retina bariyeri gibi engeller nedeniyle bu bölgede istenen düzeyde ilaç düzeyine ulaşılmasını önlemektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için uygulanan yüksek sistemik ilaç dozları hastalarda yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle gözün yüzeysel hastalıklarının tedavisinde topikal yoldan ilaç uygulanması sıklıkla tercih edilmektedir ve oftalmik preparatların yarısından fazlasını göz damlaları oluşturmaktadır (21). Ancak, topikal yoldan göze ilaç uygulanmasında düşük oküler biyoyararlanım (<% 5) gözlenmektedir. Bunun nedenleri şu şekilde özetlenebilir (22):

- İlacın göze uygulanması sonrasında ilaç çözeltisi gözyaşı ile seyrelmektedir.
- Gözde bulunan gözyaşının hacmi yaklaşık 7 ila 10 µL arasındadır. Göze uygulanan her bir damlanın hacmi yaklaşık 50 µL'dir. Bu nedenle uygulanan ilaç miktarının yaklaşık %80'i hemen göz yüzeyinden dışarı taşarak veya konjonktival yoldan uzaklaşmaktadır.
- Topikal yoldan uygulanan ilaç artan gözyaşı ve normal gözyaşı döngüsü ile seyrelmeye devam etmektedir.
- Gözde bulunan diğer bariyerler sonucunda ilacın gözün arka kısımlarına penetrasyonu kısıtlanmaktadır.

İlaçların oküler biyoyararlanımını düşüren ve gözde yer alan bariyerleri dört ana kısımda incelemek mümkündür (23):

- Gözyaşı tabakası
 - Lipid tabakası
 - Mukoaköz tabaka
- Kornea
- Konjonktiva
- Kan-oküler bariyerleri
 - Kan-aköz bariyeri
 - Kan-retina bariyeri

Gözyaşı tabakası, kornea ve göz kapakları arasında bulunan sıvı film tabakasıdır. Ekstraselüler matriks benzeri bir yapıya sahiptir ve epitel tabakadaki hücrelerin ve dış yapıların düzenlenmesinde ve beslenmesinde önemli rol oynamaktadır (24). Lipid tabakası, gözyaşı tabakasının üstünde bulunan yağlı bir tabaka olup gözdeki salgı bezleri tarafından üretilmektedir. Ana fonksiyonu gözyaşı tabakasının yüzeyinde hidrofobik bir yapı oluşturmaktır. Böylece, gözyaşının buharlaşmasını azaltmakta ve daha kararlı olmasını sağlamaktadır (25). Mukoaköz tabaka, konjonktival goblet ve kornea epitel hücreleri tarafından üretilen jel kıvamındaki yapıdır. Toksik ve yabancı maddelerin gözden uzaklaştırılması ve gözyaşının kararlı halde tutulması gibi görevleri bulunmaktadır (26).

Kornea, göze uygulanan ilaçlar da dahil olmak üzere tüm yabancı maddelerin gözün iç kısımlarına ulaşmasını engelleyen çok tabakalı bir yapıdır.

Konjonktiva, göz yüzeyinin yaklaşık %80'ini kaplayan ve mukus salgılayan ince bir yapıdır. Gözde pasif bir bariyer oluşturmasının yanı sıra gözyaşı salgılama göreviyle de bir bariyer oluşturmaktadır (27).

Kan-aköz bariyeri, gözün ön bölümünde yer alan sıkı kavşaklar oluşturan endotelial hücrelerden meydana gelen yapıdır. Albumin gibi makromoleküllerin aköz hümora geçmesini engellemektedir (28).

Kan-retina bariyeri, kan ve retina arasında bulunan kısıtlı geçişe izin veren retinal kapiller endotelial hücreler ve retinal pigment epitelial hücrelerden oluşan

bir yapıdır. Dış kısımda bulunan hücreler ışığa tepki sağlarken retinanın immün cevap oluşturmada rol oynamaktadır (29). İç kısımda bulunan retinal kapiller endotelial hücreler ise kanda bulunan moleküllerin retinaya geçişini engeller.

2.3. Topikal Uygulanan İlaçların Oküler Biyoyararlanımını Artırmada Formülasyon Stratejileri

Geleneksel oftalmik ilaç şekillerinden olan çözeltiler, ilaçların göze topikal olarak uygulanması için yaygın olarak kullanılan formlardır. Oftalmik çözeltilerin formülasyonunda dikkat edilmesi gereken faktörler çözünürlük, oküler toksisite, pKa, pH'nın etkisi, tonisite, tampon kapasitesi, viskozite, formülasyondaki diğer bileşenlerle uyumluluk, kullanılacak koruyucular, göze uygulamada rahatlık ve kolaylık olarak sıralanabilir (30).

Topikal uygulanan ilaçların oküler biyoyararlanımını artırmak için araştırmacılar, korneadaki ilaç kaybını en aza indiren ve korneanın ilaç absorpsiyonunu en üst düzeye çıkaran aşağıda belirtilen formülasyon stratejilerini geliştirmiştir (31):

Viskozitenin artırılması

Topikal olarak uygulanan ilacın prekorneal alandan eliminasyonunun zorlaştırılması, bu alandaki kalış süresinin artırılması ve dolayısıyla ilacın ön segmente penetre olmasının artırılması için uygulanan bir stratejidir. Bunun için genellikle polimerler formülasyona ilave edilir. Bu polimerlere örnek olarak metilselüloz, Poli(Vinil Alkol) (PVA), Poli (Vinil Prolidon) (PVP), hidroksietilselüloz, Hidroksi Propil Metil Selüloz (HPMC), hiyaluronik asit, veegum, aljinatlar, ksantan zamkı, jelatin, akasya ve kitre verilebilir (32).

Merhem geliştirilmesi

İlacın prekorneal alanda uzun süre kalmasını sağlamak üzere geliştirilen yüksek viskoziteye sahip merhemlerin göz yüzeyinden uzaklaştırılması zordur. Merhemler genellikle vücut sıcaklığına yakın bir erime veya yumuşama noktasına sahip olan, gözü tahriş etmeyen yarı katı ve katı hidrokarbonlar (parafin) karışımları kullanılarak formüle edilirler. Göz tarafından güvenli ve iyi tolere edilmesine rağmen,

merhemler görme bulanıklığı ve nadiren tahriş nedeniyle nispeten zayıf hasta uyumu ile karşı karşıya kalmaktadır (31).

Mukoadezyon özelliklerin artırılması- Pozitif yük kazandırılması

Mukoadezif sistemler, mukozaya yapışarak ilaçların burada tutulma süresini arttırır ve oküler biyoyararlanımın artırılmasını sağlayabilir.

Gözyaşında bulunan müsin tabakasının görevi hava-su-kornea arayüzünde optimum kırılma indisi olan oküler yüzeyi nemlendirmek ve çözünmüş proteinleri gözyaşlarında tutmaktır. Musin, mukopolisakkarit zincirinin terminal uçlarındaki sialik asit kalıntıları nedeniyle fizyolojik pH'da (7.4) negatif yüklüdür. Bu nedenle mukoadesif ve katyonik yapıdaki formülasyonlar mukoza epiteli aracılığıyla geçirgenliği geliştirmede önemli bir potansiyele sahiptir. Katyonik yapı, epitel yüzeylerinden negatif yüklü sialik asit grupları ile elektrostatik etkileşime girer. Buna ilaveten mukoadesif özellik, bu gruplarla hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşim olmasına neden olur (33, 34).

Penetrasyon artırıcıların kullanılması

Korneanın geçirgenlik özelliklerini geçici olarak artırmak amacıyla penetrasyon artırıcı maddeler formülasyona eklenebilir. Bu maddeler kornea epitelinin bütünlüğünü değiştirerek etki gösterdiklerinden, oküler tahriş ve toksisite gibi bazı sakıncaları olabilmektedir (35).

Ön ilaçların geliştirilmesi-Lipofilik özelliğin artırılması

Topikal olarak uygulanacak oküler ilaçların lipofilik özelliği modifiye edilerek ön ilaç formu hazırlanıp korneadan geçişi artırılabilir. Ön ilaç uygulandıktan sonra kimyasal veya enzimatik olarak metabolize edilerek aktif ilaca dönüştürülür. Böylece etki bölgesinde aktif ilacın yüksek miktarda bulunması sağlanarak oküler biyoyararlanımın artması sağlanabilir (36).

Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi

Oftalmik ilaçların topikal yoldan uygulanması için prekorneal alanda kalışını artırmak, bu alandan uzaklaşmasını engellemek ve korneadan ilaç geçişini artırmak amacıyla yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemler, polimerik nanopartiküller, katı lipit nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar,

lipozomlar, miseller, dendrimerler, hidrofilik jeller, insertler ve oküler minitabeller olarak sıralanabilir (37-39).

2.4. Göze Uygulanan İlaç Şekilleri

Göze uygulanan ilaç şekilleri, göz küresi veya konjonktivaya uygulanan veya konjonktival keseye yerleştirilen sıvı, yarı katı, katı veya koloidal özelliklerde olan steril ürünlerdir. Oküler preparatlarda istenilen etkiyi sağlamak için bir veya daha fazla etken madde ayrıca etken maddenin stabilitesini veya etkinliğini artırmak için yardımcı maddeler kullanılabilir. Göz hastalıklarının tedavisinde en çok kullanılan ilaç şekilleri çözelti şeklindeki göz damlalarıdır. Ancak, çözelti şeklinin gözde kalış süresinin kısa olması, tekrarlanan uygulamalara ihtiyaç duyulması, düşük hasta uyuncu ve tekrarlanan uygulamalara bağlı yan etki oluşturma gibi sakıncaları bulunmaktadır. Araştırmacılar bu nedenle farklı dozaj şekilleri üzerinde çalışmalar yapmaya yoğunlaşmıştır (40, 41). Göze uygulanan ilaç şekilleri Tablo 2.1.'de özetlenmiştir (40, 41).

Tablo 2.1. Göze uygulanan ilaç şekilleri. (40, 41).

Sıvı İlaç Şekilleri	Yarı Katı İlaç Şekilleri	Katı İlaç Şekilleri	Yenilikçi İlaç Şekilleri
Çözeltiler	Jeller	Kontakt Lensler	Nanosistemler
Emülsiyonlar	İn Situ Jeller	İmplantlar	Mikroiğneler
Süspansiyonlar	Merhemler	Mini Tabletler	

2.5. Hidrofilik Jeller

Hidrofilik jeller, genellikle polimerlerden oluşan, yüksek oranda su tutabilen, üç boyutlu ağı yapıda ilaç şekilleridir (42). Formülasyonlarında sıklıkla hidrofobik ve hidrofilik polimerler birlikte kullanılır ve yüksek oranda su tutma kapasitesine sahip olmalarına rağmen suda çözünmezler. Kullanılan polimere, polimer karışımlarına

veya polimerler arası ağ yapılarının sayısına ve niteliğine bağlı olarak şişme miktarı ve hızı, dolayısıyla ilaç salım hızı ayarlanabilmektedir (43).

Hidrofilik jeller son yıllarda üzerinde çok çalışılan taşıyıcı sistemlerdendir ve farklı sınıflama sistemine tabi tutulabilmektedir (Tablo 2.2.) Kullanılan polimerin tipine göre sınıflamada homopolimer tanımı tek bir monomerden meydana gelen hidrofilik jelleri ifade etmektedir. Bu gruba örnek olarak Polietilen Glikol (PEG) (44) ve Polivinil Prolidon (PVP) (45) hidrofilik jelleri verilebilir. Kopolimerik hidrofilik jeller en az bir tanesi hidrofilik olan iki farklı tip monomerden oluşmaktadır. Polivinil Prolidon/Polietilen Glikol (PVP/PEG) (46) ve Polivinil Prolidon/Karboksimetil Selüloz (PVP/CMC) (47) hidrofilik jelleri bu gruba örnek olarak verilebilir. Bir polimerin lineer olduğu diğerinin ise lineer polimerin arasında kimyasal bağ olmadan çapraz bağ oluşturduğu jeller yarı içiçe polimerik ağ hidrofilik jeller (“semi-interpenetrating polymer networks”) olarak isimlendirilir. Bu gruptaki hidrofilik jellere Polivinil Prolidon/Poliakrilamid (PVP/PAA) (48) hidrofilik jeli verilebilir. Poliüretan/Poliakrilamid (PU/PAA) (49) hidrofilik jellerinde olduğu gibi kullanılan polimerlerden en az birinin diğer polimer varlığında sentezlendiği ve/veya çapraz bağlandığı jellere içiçe polimerik ağ hidrofilik jeller (“interpenetrating polymer networks”) adı verilir.

Karboksimetil pullulan (50) gibi negatif yüklü polimerden hazırlanan hidrofilik jeller anyonik hidrofilik jel, polietilenimin (51) gibi pozitif yüklü polimerden hazırlanan hidrofilik jeller katyonik hidrofilik jel ve N-vinil kaprolaktam (52) gibi non-iyonik polimerlerden oluşan hidrofilik jeller ise nötral hidrofilik jel olarak sınıflandırılabilir.

Sıcaklık ile jelleşme

Sıcaklıkla in-situ jelleşen hidrofilik jeller, uygulanma bölgesinde sıcaklığın etkisiyle sıcaklığa duyarlı polimer yapısında meydana gelen değişimler sonucu jelleşmeyi ifade etmektedir. Oküler alanda kullanılan bu tür jeller oda sıcaklığında sıvı halde olup göz yüzeyinin sıcaklığı ile jel yapısına geçmektedir. Kullanılan polimerin cinsine, kopolimer oranına göre ve formülasyonda kullanılan yüzdesine göre jelleşme sıcaklığı ve profilleri ayarlanabilmektedir (53).

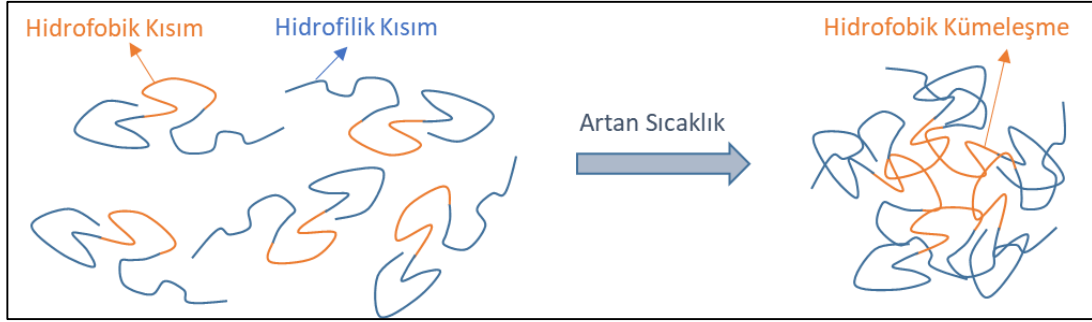
Tablo 2.2. Hidrofilik jellerin sınıflandırmaları. (54)

Sınıflandırma Cinsi	Sınıflandırma Türleri
Kullanılan Polimere Göre	Homopolimerik
	Kopolimerik
	Yarı iç içe polimerik ağ
	İç içe polimerik ağ
İyonik Yüke Göre	Anyonik
	Katyonik
	Non-iyonik
Polimer Kaynağına Göre	Doğal
	Sentetik
	Hibrid
Çapraz Bağlama Cinsine Göre	Fiziksel
	Kimyasal
Dış Etkenlere Verdikleri Cevaplara Göre	Kimyasal (pH, oksidanlar)
	Biyokimyasal (enzim, ligand)
	Fiziksel (sıcaklık, ışık, basınç)

Diğer bir sınıflandırma sistemi de hidrofilik jellerin çapraz bağ yapısına göre fiziksel veya kimyasal olmak üzere ayrılmasıdır. Fiziksel çapraz bağlar, pH, sıcaklık gibi dış etkilere bağlı oluşabileceği gibi, hidrofobik etkileşmeler ve elektriksel etkileşimler gibi fizikokimyasal etkilere bağlı olarak da gerçekleşebilmektedir. Kimyasal çapraz bağlar, genelde çapraz bağlayıcı maddelerin monomer çözeltisine eklenmesiyle ya da çapraz bağlayıcı maddelerin direkt olarak polimerlere konjuge edilmesiyle gerçekleşmektedir.

Hidrofobik etkileşimler sonucu jelleşme

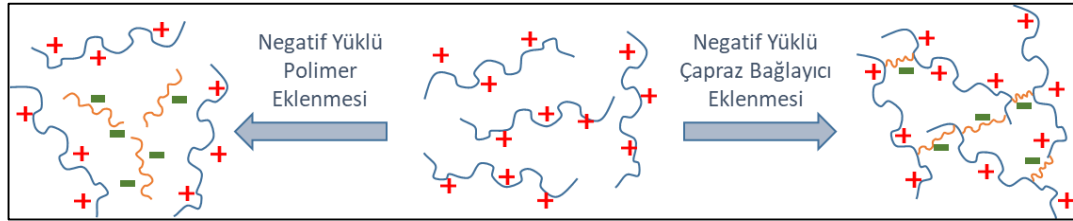
Hidrofobik yapıya sahip polimerler sıcaklıkla geri dönüşlü olarak jel yapısı oluşturabilirler. Düşük sıcaklıkta bu polimerler çözünür halde bulunurken sıcaklığın artması sonucunda hidrofobik bölgeler agregatlar oluşturarak jelleşme meydana gelmektedir (Şekil 2.3.). Polimerdeki hidrofobik bölgelerin miktarı arttıkça jelleşme sıcaklığı düşüş göstermektedir. Bu tip polimerlere örnek olarak Poloksamer olarak da bilinen polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit (PEO-PPO-PEO) triblok polimerleri verilebilir (55).



Şekil 2.3. Hidrofobik etkileşimlerle kümeleşme sonucu jelleşmenin şematik gösterimi. (Hoare ve ark. (56)'dan değiştirilerek)

Yük etkileşimleri ile jelleşme

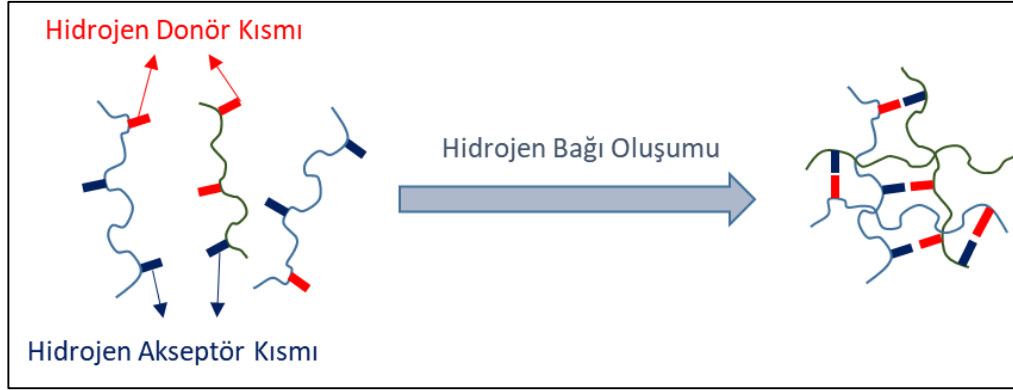
Yük etkileşimleri sonucu jelleşme, yüklü polimer ile zıt yüklü çapraz bağlama ajanı arasında olabileceği gibi zıt yüklü iki polimerin bir araya gelmesiyle de meydana gelebilmektedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Pozitif yüklü polimere zıt yüklü polimer veya zıt yüklü çapraz bağlayıcı madde eklenmesi sonucu jelleşmenin şematik gösterimi. (Hoare ve ark. (56)'dan değiştirilerek).

Hidrojen bağı etkileşimleri ile jelleşme

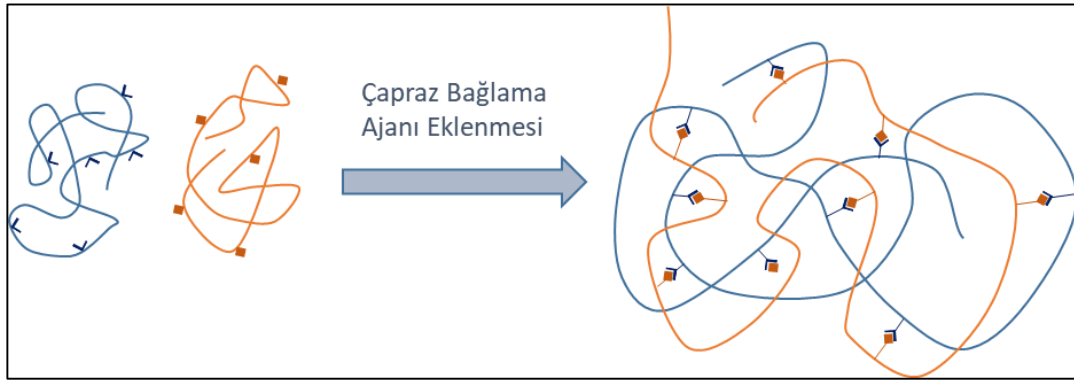
İki farklı polimerin karıştırılması sonucunda, yapılarında bulunan hidrojen bağı yapma özelliği olan bölgeler etkileşerek jelleşme meydana getirebilirler (Şekil 2.5.). Buna örnek olarak hyaluronik asit-metilselüloz (57) ve jelatin-agar (58) jelleri verilebilir. Bu grup hidrofilik jeller genellikle yüksek biyoyumluluk göstermektedir ancak hidrojen bağlarının kolayca ayrılması sonucu hızlı şekilde ilaç salımı gerçekleştirirler.



Şekil 2.5. Hidrojen bağı etkileşimi ile jelleşmenin şematik gösterimi. (Hoare ve ark. (56)'dan değiştirilerek).

Çapraz bağlama maddesi ile kovalent bağ oluşumu sonucu jelleşme

Çapraz bağlama maddeleri kullanılarak polimerler arasında bağ oluşumu ile jelleşme sağlanabilmektedir. Buna örnek olarak hyaluronik asit-tiramin hidrofilik jeli (59) verilebilir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Çapraz bağlama maddesi ile jelleşmenin şematik gösterimi. (Bi ve ark. (60)'dan değiştirilerek).

2.5.1. Hidrofilik Jellerin Oküler Uygulamadaki Yeri

Oftalmik ilaç uygulamalarında en önemli problemlerden biri ilacın lakrimal drenaj ve gözyaşı ile hızla gözden uzaklaştırılmasıdır. Bu nedenle çözelti şeklinde uygulanan ilaçların korneaya geçiş miktarı genelde %5'ten az olmaktadır (61). Yüksek

saydamlık, yüksek mekanik dayanıklılık, gözde uzun süre kalma ve biyoyumluluk gibi üstünlükleri nedeniyle hidrofilik jeller oküler uygulamalarda yalnızca ilaç taşımak için değil aşağıda sıralanan şekillerde de kullanılabilirler (62):

- In situ jelleşen ilaç taşıyıcı hidrofilik jeller,
- İlaç salan hidrofilik jel lensler,
- Oküler doku yapıştırıcıları,
- İntraoküler lensler,
- Vitröz sıvı replasmanları,
- İntravitröz ilaç taşıyıcı sistemler.

2.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar

Lipit içeren ilaç taşıyıcı sistemler, yüksek biyogeçimlilikleri nedeniyle son zamanlarda literatürde üzerinde yoğun çalışılan konular arasındadır. Bu sistemler, özellikle hidrofobik ilaçların taşınması için ideal sistemlerdir. Lipit içeren ilaç sistemler, katı lipit nanopartikül (KLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT) olarak sınıflandırılabilir. KLN'de yağ bileşeni yalnızca katı lipitlerden meydana gelmektedir ve bu durum düşük ilaç yüklemesine ve ilaç salımının hızlı olmasına neden olmaktadır. Bu durumun önüne geçebilmek için araştırmacılar NLT'yi geliştirilmiştir. NLT'de formülasyonlara katı yağlara ek olarak oda sıcaklığında sıvı halde olan yağlar da eklenmektedir (63). NLT'leri oluşturan bileşenler temel olarak üç grupta sınıflandırılabilir (64):

- Katı Yağlar,
- Sıvı Yağlar,
- Yüzey aktif maddeler.

Katı yağlar, oda sıcaklığında katı halde olan, erime dereceleri genellikle 40°C'den büyük olan yağlardır. Bu yağlar nanopartiküllerin katı halde kalmasına yardımcı olmaktadır. Bu gruba örnek olarak yağ asitlerinden stearik asit, monogliseritlerden gliseril monostearat, trigliseritlerden kaprilat trigliserit, mumlardan setil palmitat verilebilir (64).

Sıvı yağlar, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan NLT'leri KLN'lerden ayıran temel bileşendir. NLT'lerde sıvı yağ bileşeni sayesinde ilaç yükleme kapasitesi

artmakta ve daha kontrollü ilaç salımı sağlanmaktadır. Bu gruba örnek olarak oleik asit ve izopropil miristat verilebilir (64).

Yüzey aktif madde (YAM), nanopartiküllerin yüzeyinde yağ ve dış ortam arasında ara yüzey oluşturarak nanoyapılı lipit taşıyıcıların stabilitesini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. İyonik, non-iyonik ve amfoterik YAM'lara örnek olarak sırasıyla sodyum oleat, Tween 80 ve soya fosfolipiti Lipoid S 75 verilebilir (64).

NLT'ler yapısal olarak üç ayrı grupta incelenebilir (Şekil 2.7.) (65). Bunlar;

- NLT Tip 1

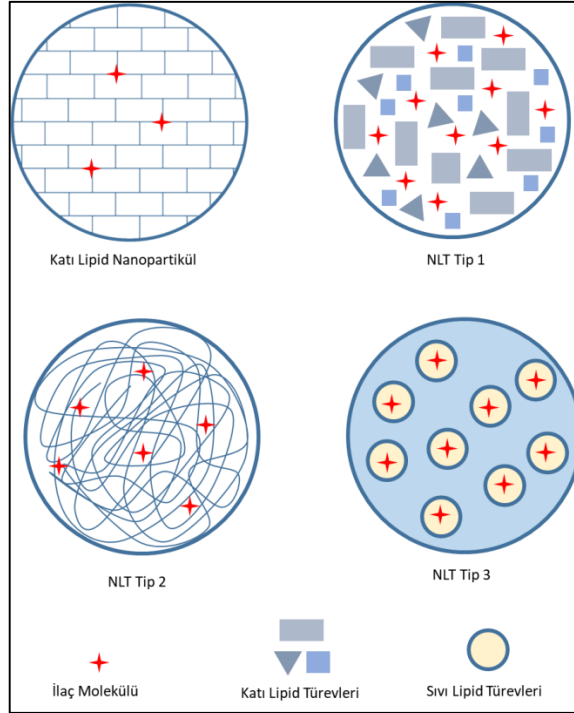
Bu gruptaki sistemler, kusurlu kristal yapıda NLT'ler olarak da adlandırılmaktadır. KLN formülasyonlarındaki katı yağların bir bölümünün sıvı yağlar ile değiştirilmesi sonucu, KLN'lerde görülen mükemmel düzenli yapı yerine boşluklu yapıda lipit örgüsü görülür. Bu sistemler, oluşan bu boşluklu yapı sayesinde daha fazla ilaç yükleme kapasitelerine sahiptir. Boşluklu yapıların miktarı artırılarak ilaç yükleme kapasitesi artırılabilir (65).

- NLT Tip 2

Amorf yapıda olan NLT türüdür. Tip 1 yapıda görülen kristal yapılar görülmez ve sıvı lipitler ile birlikte amorf bir yapı oluştururlar. Oluşan lipit matrisi yine katı haldedir. Bu sayede kristal yapılarda sıkça görülen etkin madde sızıntısı en aza indirilmektedir (65).

- NLT Tip 3

Bu gruptaki sistemler çoklu tip olarak da adlandırılmaktadır (Su içinde katı lipit içinde sıvı lipit). Bu tip NLT'lerde sıvı lipitler katı lipitler için homojen şekilde damlacık olarak kalmaktadır. Kullanılan sıvı lipitlerde çözünürlüğü yüksek olan etkin maddeler için oldukça uygun olan bir yöntemdir. Bu sayede ilaç yüklenmesi ve nanopartikül stabilitesi artırılmaktadır. Kullanılan sıvı lipit miktarları Tip 1'e oranla daha yüksektir (65).



Şekil 2.7. KLN ve NLT yapılarının şematik gösterimi. (Salunkhe ve ark. (66)'dan değiştirilerek).

NLT'lerin sahip olduğu özellikler nedeniyle birçok üstünlükleri vardır. Bu üstünlükler şu şekilde sıralanabilir:

- Yüksek biyoyumluluğa sahiptir (67),
- Su ile hazırlanma yöntemleri kullanılarak toksik çözücü kullanımının önüne geçilebilmektedir (68),
- Ölçek büyütmesi kolay olduğundan endüstriyel üretime uygundur (69),
- İlaç molekülünün stabilitesi artırılırken kontrollü salımının sağlanmasında etkilidir (70),
- KLN'lere göre daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir (71),
- Lipofilik ve hidrofilik ilaç molekülleri aynı anda yüklenebilir (72),
- Kullanılan lipidlerin çoğu biyoparçalanabilir (73).

2.6.1. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcıların Hazırlanması

NLT'lerin hazırlama yöntemleri şu şekilde sıralanabilir (74-76);

- Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi
- Emülsifikasyon-ultrasonikasyon yöntemi
- Solvan difüzyon yöntemi
- Solvan emülsiyon uçurma yöntemi
- Film ultrasonikasyon yöntemi
- Mikroemülsiyon yöntemi
- Sıcak eriyik ekstrüzyon yöntemi
- Süperkritik sıvı yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi

Bu yöntem, sıcak ve soğuk olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmesi ve kolayca ölçek büyütme işlemi yapılabilmesi gibi üstünlüklere sahiptir. Sıcak yöntemde, kullanılan tüm lipitleri eritecek kadar yüksek sıcaklık kullanılır ve eritilen lipit karışımına ilaç eklenerek karıştırılır. Sonrasında su fazı da aynı sıcaklığa getirilip lipit fazına eklenerek kaba emülsiyon elde edilir. Bu emülsiyon yüksek basınçlı homojenizasyona tabi tutularak damlacık büyüklüğü küçültülür. Elde edilen nano emülsiyon oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak partiküllerin katılaşması sağlanır. Koenzim Q10 içeren NLT formülasyonlarının hazırlanması bu yöntemle gerçekleştirilmiştir (77).

Sıcaklık ile parçalanmış ilaçlar için soğuk yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde katı lipitlerin erime derecesinin üstüne çıkılarak eritilir, ilaç ve diğer lipitler eklenerek karıştırılır. Sonrasında ani bir soğutma ile bu karışım katı hale getirilir. Katı karışımın partikül büyüklüğünü azaltmak için bilyalı mil değirmeni gibi cihazlar kullanılabilir. Elde edilen toz şeklindeki yapı, yüzey aktif ajan içeren soğuk suyla karıştırılır ve bir süspansiyon elde edilir. Elde edilen süspansiyon yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek hem partikül büyüklüğü küçültülür hem partikül dağılımı homojenize edilir (78). Genel olarak, sıcak yöntemle göre daha fazla basınç ve

döngü kullanılması gereklidir. Bu yöntemle hazırlanan formülasyonlara ondansetron hidroklorür içeren NLT formülasyonları örnek olarak verilebilir (79).

Emülsifikasyon-ultrasonikasyon yöntemi

Bu yöntemde katı lipitler erime noktası üzerinde ısıtılarak sıvı lipitler ve ilaç ile karıştırılır. Yüzey aktif madde içeren su fazı da aynı sıcaklığı getirilir. Oluşan kaba emülsiyon ultrasonikasyona maruz bırakılır ve belirli miktar su ile seyreltilir. Oluşan karışım soğutularak nanopartiküllerin katı şekilde elde edilmesi sağlanır. Literatürde bu hazırlama yöntemi ile fluvastatin içeren NLT formülasyonları geliştirilmiştir (80).

Solvan difüzyon yöntemi

Bu yöntemde metanol gibi su ile karışabilen organik çözücüde ilaç ve diğer lipitler gerekirse hafif ısıtılarak çözülür. YAM içeren sulu faz aynı sıcaklığa getirilerek lipit faz ile karıştırılır ve oda sıcaklığında karışım soğuyuncaya ve organik faz tamamen uçana kadar karıştırma işlemine devam edilir. Literatürde, raloksifen hidroklorür içeren NLT formülasyonları bu hazırlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (81).

Solvan emülsiyon uçurma yöntemi

Solvan difüzyon yönteminden farklı olarak, su ile karışabilen çözücüler yerine kloroform gibi suyla karışmayan çözücüler kullanılmaktadır. Literatürde bu hazırlama yöntemi kullanılarak kolesterol asetat içeren NLT formülasyonları geliştirilmiştir (82).

Film ultrasonikasyon yöntemi

Bu yöntemde lipitler ve ilaç organik fazda hafif bir ısıtma işlemi uygulanarak çözülür. Bu çözelti yuvarlak bir balona alınarak vakum altında rotavaporda organik faz tamamen uçana kadar karıştırılır. Bu süre sonunda balonda ince bir lipit film tabakası oluşur. Bu film tabakası YAM içeren su fazıyla karıştırılır ve bir miktar ısıtılarak ultrasonikasyon işlemi uygulanarak bir dispersiyon elde edilir. Hazırlanan bu dispersiyonun oda sıcaklığına kadar soğuması sağlanarak lipit nanopartiküller elde edilir. Gentiopikrin ve oleanolik asit içeren NLT formülasyonları bu hazırlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (83).

Mikroemülsiyon yöntemi

Bu yöntemde ısıtılarak eritilen katı lipit karışımına sıvı lipitler ve ilaç eklenerek çözülür. YAM içeren su fazı da aynı sıcaklığa getirilir. Mekanik karıştırma işlemi uygulanarak lipit faz su fazına eklenir. Oluşan mikroemülsiyon yine mekanik karışım altında soğuk suya (4°C) damlatılarak karıştırılır. Literatürde, bu hazırlama yöntemi ile valdekoksib içeren NLT formülasyonları hazırlanmıştır (84).

Sıcak eriyik ekstrüzyon yöntemi

Bu yöntemde üç farklı besleme bölgesi bulunan çift vidalı ekstrüder kullanılmaktadır. Cihazın ilk kısmından ilaç ve katı lipitler, ikinci kısmından sıvı lipitler, üçüncü kısmından ise YAM içeren su fazı eklenir. Bu eklemeler sırasında ekstrüderde karıştırmanın yanı sıra ısıtma işlemi de uygulanır. Bu sayede ekstrüzyon işleminin sonunda sıvı, kaba bir emülsiyon elde edilir. Bu emülsiyona ultrasonikasyon işlemi uygulanarak nanopartiküller elde edilir. Bhagurkar ve ark. lidokain içeren NLT formülasyonlarını bu hazırlama yöntemini kullanarak hazırlamıştır (85).

Süperkritik sıvı yöntemi

Bu yöntemde öncelikle katı lipitler eritilir ve ilaç ile karıştırılır. Daha sonra bu karışıma süperkritik özellik gösteren sıvı eklenerek (karbondioksit gibi) lipit yapısında çözünmesi sağlanır. Elde edilen bu karışım atomize edici özellikte püskürtücüden püskürtülür. Süperkritik sıvının genişmesi ve uçması ile oluşan ani soğutma etkisi sayesinde nanopartiküller elde edilmektedir (86).

2.7. Farmasötik Ko-Kristaller

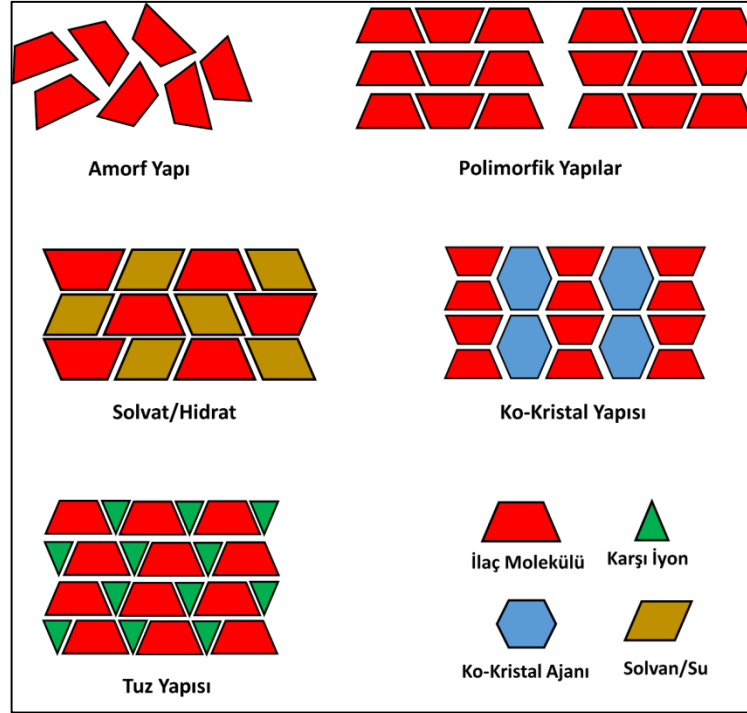
Ko-kristaller ilaç geliştirme çalışmalarında ilaç moleküllerinin fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesinde son zamanlarda oldukça dikkat çeken alternatif katı ilaç şekilleridir (87).

Ko-kristaller, bir ya da daha fazla molekülün belirli bir sitokiyometrik oranda bir araya gelerek meydana getirdiği kristal yapı olarak tanımlanabilir (88). Farmasötik ko-kristal ise moleküllerden birinin ilaç olduğu ve ilacın belirli bir ko-kristal maddesi ile (fumarik asit, nikotinamid, sakkarin, süksinik asit vb.) hidrojen bağları, van der waals kuvvetleri gibi kovalent olmayan bağlarla oluşturduğu kristal yapıları ifade

etmektedir (87, 89). Aynı ko-kristal maddeler ile farklı sitokiyometrik oranlarda farklı ko-kristaller elde edilebilmektedir (90).

Etken maddeler amorf, polimorf, tuz veya solvat/hidrat gibi birçok katı yapıda bulunabilmektedir (Şekil 2.8.). *Amorf yapılar* aynı kimyasal yapıya sahip bileşenlerin rastgele bir biçimde bir araya geliştirilerek oluşturdukları, belirli bir dizilim göstermeyen yapılardır ve belirgin bir erime noktasına sahip değildirler (91). *Polimorfizm*, aynı kimyasal yapıya sahip bileşenlerin tekli bağlar üzerinden rotasyonu ile belirgin ve farklı üç boyutlu yapılar oluşturduğu kristal formları olarak tanımlanabilir (92). Belirli sıcaklık ve basınçta aynı kimyasal yapının farklı kristal yapılarına dönüşmesi ise polimorfik dönüşüm olarak adlandırılır (93). *Solvat ve hidrat yapıları*, etken maddelerin su veya başka bir çözücüyle hidrojen bağları ve kovalent bağlar ile oluşturdukları kristal yapılar olup genelde psödopolimorfik formlar olarak adlandırılırlar (94). *Tuz yapıları*, iyonize olabilen etken maddelerin belirli sitokiyometrik oranda moleküler (asetat vb.) veya atomik (sodyum vb.) karşı iyonlarla oluşturdukları yapılardır (95). Kolay sentezlenebilmeleri ve etken maddelerin birçok fizikokimyasal özelliğini optimize edebildiklerinden endüstride yoğun bir şekilde kullanılır. Bu nedenle piyasadaki ilaçların %50'den fazlasında etken maddenin tuz hali kullanılmaktadır (96).

İlaç moleküllerinin kimyasal bileşimleri ve üç boyutlu yapıları, bu moleküllerin çözünürlüğü, stabilitesi ve erime derecesi gibi birçok fizikokimyasal özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Son zamanlarda keşfedilen etken maddelerin büyük bir bölümü biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde düşük çözünürlüğü ifade eden II ve IV no'lu grupta yer almaktadır. Çözünürlüğü artırmakta kullanılan bazı yöntemlere örnek olarak partikül büyüklüğünü küçültmek, ilacı ön-ilaç şekline getirmek, ilacın tuz formuna geçmek, siklodekstrinler ile kompleks hale getirmek verilebilir. Aynı zamanda ilaç molekülünün kristal yapısındaki farklılıklar da çözünürlüğe doğrudan etki etmektedir. İlaç moleküllerinin ko-kristal formları hazırlanarak da çözünürlüğü artırılabilir.



Şekil 2.8. Etken maddelerin olası katı form yapılarının şematik gösterimi. (Schultheiss ve ark. (97)'dan değiştirilerek).

Ko-kristal teknolojisi, ilaç moleküllerinin farmakolojik etkisini ve özelliklerini değiştirmeden fizikokimyasal özelliklerini amaca göre optimize ederek birçok üstünlük sağlamaktadır. Bu üstünlükler şu şekilde sıralanabilir (98):

- Çözünürlüğün ve çözünme hızının iyileştirilmesi (99),
- Kimyasal stabilitenin artırılması (100),
- Termal stabilitenin artırılması (101),
- Çözünme stabilitesinin artırılması (102),
- Fotostabilitenin artırılması (103),
- Neme karşı stabilitenin artırılması (104),
- Biyoyaralanımın artırılması (105),
- Permeasyonun artırılması (106),
- Tablet haline getirilebilirliğin iyileştirilmesi (107),
- Acı tadın maskelenmesi (108).

Ko-kristal hazırlamada kullanılan yöntemler Tablo 2.3.'de sunulmuştur (109).

Tablo 2.3. Ko-kristal hazırlama yöntemleri. (109)

Hazırlama Yöntemi Grupları	Hazırlama Türleri
Katı Hal Yöntemleri	Kuru karıştırma yöntemi
	Sıvı yardımıyla karıştırma yöntemi
	Ekstrüzyon yöntemi
	Sıcak eriyik ekstrüzyon yöntemi
	Yüksek parçalayıcı yaş granülasyon yöntemi
Çözelti Yardımcılı Yöntemler	Bulamaç yöntemi
	Yavaş uçurma yöntemi
	Püskürterek kurutma yöntemi
	Soğutma yöntemi
	Anti-çözücü yöntemi
Süperkritik Sıvı Yöntemleri	Süperkritik sıvı ekleme yöntemi
	Süperkritik anti-çözücü ekleme yöntemi
	Süperkritik püskürterek kurutma yöntemi

Kuru karıştırma yöntemi: Bu yöntemde etken madde ve ko-kristal maddesi katı halde havanda veya mekanik karıştırıcılarda belirli süre karıştırılır. Bu yöntemde ko-kristal oluşumu tamamen gerçekleşmediği takdirde bu karışımda oluşan ko-kristallerin yanında yüksek miktarda başlangıç maddelerini de içerebilmektedir (110).

Sıvı yardımıyla karıştırma yöntemi: Bu yöntemde karıştırma aşamasının başlangıcında küçük miktarda çözücü eklenmektedir. Kullanılan çözücünün katalitik etki sağlamasıyla kuru karıştırma yöntemine kıyasla daha etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde ıslatıcı olarak nitrometan (111), etanol (112), metanol (113) kullanılabilir.

Ekstrüzyon yöntemi: Başlangıç maddelerinin erime noktalarının altındaki sıcaklıklarda ekstrüder cihazı kullanarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde tozlar karıştırılırken aynı zamanda karışımın iletimi de sağlanmaktadır. Bu yöntemle literatürde ibuprofen-nikotinamid (114), karbamazepin-sinamik asit (115) ko-kristalleri hazırlanmıştır.

Sıcak eriyik ekstrüzyon yöntemi: Ekstrüzyon yönteminden farklı olarak başlangıç maddeleri erime derecelerinin üstünde ısıtılarak cihaza yüklenmektedir. Bu

yöntemle elde edilen ko-kristallere örnek olarak karbamazepin-nikotinamid (116) ve ibuprofen-izonikotinamid (117) ko-kristalleri verilebilir.

Yüksek parçalayıcı yaş granülasyon yöntemi: Bağlayıcı ve sıvı içeren ortamda başlangıç maddelerinin toplanması ve oluşan aglomeratların parçalayıcıda dağıtılması ile gerçekleştirilen bir yöntemdir. Literatürde pirasetam-tartarik asit (118) ve ivabradin hidroklorür-mandelik asit (119) ko-kristalleri bu yöntem ile hazırlanmıştır.

Bulamaç yöntemi: Etken maddenin ve ko-kristal maddesinin belirli bir sıvıda oluşturulmuş süspansiyonunun belirli süre karıştırılması ile gerçekleştirilen bir ko-kristal hazırlama tekniğidir. Literatürde meloksikam-asetilsalisik asit (120) ve toluensülfonamid-trifenilfosfin oksit (121) ko-kristalleri bu yöntem ile hazırlanmıştır.

Yavaş uçurma yöntemi: Etken madde ve ko-kristal maddesinin bir çözücü ya da çözücü karışımında tamamen çözünmesini takiben çözücünün ortamdan yavaşça uçurularak ko-kristal çökeltilerinin elde edilmesi ile oluşan bir yöntemdir. Norfloksasin-izonikotinamid (122) ve flurbiprofen-nikotinamid (123) ko-kristalleri bu yöntem ile hazırlanmıştır.

Püskürterek kurutma yöntemi: Etken maddenin ve ko-kristal maddesinin çözündüğü çözücünün ani şekilde uçurulduğu ko-kristal hazırlama yöntemidir. Bu yöntemle hazırlanan ko-kristallere örnek olarak karbamazepin-nikotinamid (124) ve sülfadimidin-aminosalisilik asit (125) ko-kristalleri verilebilir.

Soğutma yöntemi: Etken madde ve ko-kristal maddesinin çözünmüş olduğu çözücünün soğutulmasıyla ko-kristal elde edilmesi yöntemidir. Bu yöntemle hazırlanan ko-kristallere örnek olarak karbamazepin-nikotinamid (126) ve agomelatin-sitrik asit (127) ko-kristalleri verilebilir.

Anti-çözücü yöntemi: Etken madde ve ko-kristal maddesinin çözünmüş olduğu çözücüye başka bir anti-çözücü eklenmesiyle ko-kristallerin oluşması esasına dayanan bir yöntemdir.

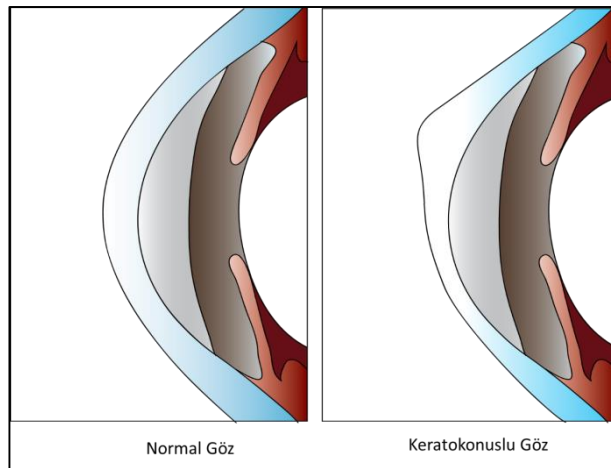
Süperkritik sıvı ekleme yöntemi: Etken madde ve ko-kristal maddesini içeren çözücüye süperkritik karbondioksit eklenmesi ve karıştırılması ile ko-kristal elde etme yöntemidir. Bu yöntemle indometazin-sakkarin (128) ko-kristalleri hazırlanmıştır.

Süperkritik anti-çözücü ekleme yöntemi: Etken madde, ko-kristal maddesi ve anti-çözücünün olduğu bileşime süperkritik karbondioksit eklenmesiyle ko-kristallerin çöktürülmesi esasına dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemle hazırlanan ko-kristallere örnek olarak naproksen-nikotinamid (129) ve diflunisal-nikotinamid (130) ko-kristalleri verilebilir.

Süperkritik püskürterek kurutma yöntemi: Süperkritik karbondioksit içerisinde çözüldürülmüş etken madde ve ko-kristal maddesinin püskürterek kurutulması ile süperkritik karbondioksitin uzaklaştırılması esasına dayalı ko-kristal oluşturma yöntemidir. Bu yöntemle teofilin-sakkarin ve teofilin-gentisik asit (131) ko-kristalleri hazırlanmıştır.

2.8. Keratakonus

Keratakonus ilk olarak 1854 yılında Nottingham ve ark. (132) tarafından bulanık görüş ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Keratokonus, stroma yapısında meydana gelen biyomekanik bozulmalar ile bağlantılı olarak korneanın incelmesi ve sivrileşmesi ile oluşan ilerleyici bir hastalıktır (Şekil 2.9.) (133, 134). Korneada meydana gelen konik şekil bozukluğu sonucu hastaların görüş kalitesinde önemli ölçüde düşüş yaşanmaktadır (135).



Şekil 2.9. Normal göz ve keratokonuslu gözün şematik olarak gösterimi.

Keratokonus genellikle ergenlik döneminde ortaya çıkar ve hastalık 30'lu yaşların ortasına kadar ilerlemesini sürdürebilmektedir (136). Hastalığın genel prevalansı ise yaklaşık olarak her 2000 kişide 1 olarak tespit edilmiştir (137).

Keratokonusun görülme sıklığının yüksek olmasına karşın nadir hastalık olarak kabul edilmektedir. Nadir hastalık, popülasyonda sıklıkla görülen diğer hastalıklara kıyasla daha düşük oranda görülen hastalıklar olarak tanımlanmaktadır (138). Nadir hastalıklar her ne kadar hastalık bazında düşük oranda görülse de hepsi birlikte değerlendirildiğinde toplumun önemli bir kısmında görülmektedir. Bu oranın Avrupa Ülkelerinde toplam popülasyonun %5-8'i arasında olduğu öngörülmektedir. Nadir hastalık olarak kabul gören hastalık sayılarında da bir netlik bulunmamaktadır. Yaklaşık olarak 5000-8000 arasında nadir hastalık olduğu kabul edilmektedir (139). Nadir hastalık tanımında ifade edilen düşük oran farklı bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Avrupa Birliği için EMA'nın kabul ettiği sınır her 2000 kişide 1 olmakla birlikte Amerika Birleşik Devletleri için FDA'nın kabul ettiği sınır ise her 200.000 kişide 1 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte keratokonus gibi görülme sıklığı yüksek olan hastalıklar da nadir hastalıklar çerçevesinde değerlendirilebilmektedir. Bu durumun gerekçelendirilmesi ise ilacın satışı ise sağlanacak gelirin, ilacın geliştirilmesinde yapılan harcamaları karşılamaması durumu ile yapılmaktadır. İlgili firmanın ilaçtan elde edeceği gelirin artırılması için farklı imtiyazlar sağlanmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde geliştirilen ilaca 7 yıllık Pazar imtiyazı tanınmaktadır. Bu süre Amerika Birleşik Devletlerinde 10 yıla çıkmaktadır. Pazar imtiyazı ile geliştirilen ilaca patent hakkından bağımsız olarak tekelleşme hakkı tanınmaktadır. Bu sürede farklı firmalar tarafından geliştirilen ilaçlar pazara çıkamamaktadır. Bu durumun istisnası ise yeni geliştirilen ilacın hedef hastalığın tedavinde başarı oranını artırmasıdır (138).

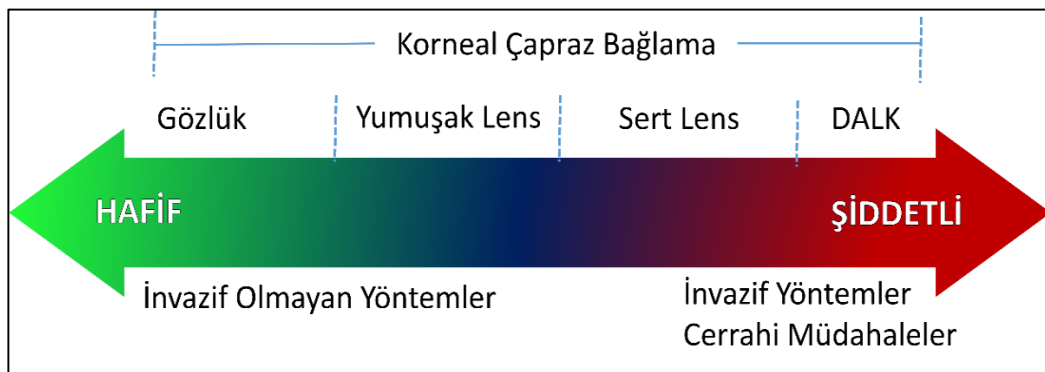
Kornea yapısının mekanik stabilitesi temel olarak kolajen moleküllerinin yapısı ve bu yapıların yerleşimi tarafından oluşturulmaktadır. Bu yapı ve yerleşimlerin dayanıklılığını ise ilgili yapıların arasındaki çapraz bağlanmalar sağlamaktadır. Keratokonus sonucu oluşan patolojik değişimlerin ilki korneal epitelinin bazal epitel yoğunluğunun azalması olarak belirtilmektedir (140, 141). Bazal membrandaki epitel hücrelerinin dejenerasyonu sonucu salınan proteolitik enzimler stromada bulunan

kolajen liflerini parçalayarak korneanın biyomekanik gücünde azalmaya neden olmaktadır (140, 142). Buna ilaveten, keratokonusu kolajen lamellar yapılarının kalınlığının değişmemesine karşın bu yapıların sayısında azalma ve konumlanmalarında farklılık gözlenmektedir (143, 144). Bu yapılar arasındaki çapraz bağların sayısının azalması sonucu lamellar yapılar birbiri üzerinden kayarak korneada incelmeye sebep olmaktadır (145, 146). Keratokonusun sebep olduğu bu farklılıklar sonucunda korneanın biyomekanik yapısında değişim olmaktadır.

2.8.1. Keratokonus Tedavisi

Keratokonus tedavisinde hastalığın evresine göre çeşitli yaklaşımlar olmakla birlikte, genellikle hastalığın ilerleyişini durdurmak üzere yoğunlaşmaktadır. Hastalığın ilk aşamalarında gözlük ve lens gibi girişimsel olmayan yöntemler uygulanırken, ilerlemiş vakalarda derin anterior lamellar keratoplasti (DALK) gibi cerrahi yöntemlerle görüş düzeltilmeye çalışılır. Korneal kolajen çapraz bağlama (KKÇB) yöntemi son zamanlarda uygulanan etkin bir yöntemdir (147). KKÇB genellikle daha çok hastalığın ilk aşamalarında kullanılırken, ilerlemiş vakalarda hastalığın ilerlemesini durdurmak için tercih edilebilir (Şekil 2.10.).

Keratokonusu uygulanan tedavi yaklaşımları özet şeklinde Tablo 2.4'te verilmiştir (148).



Şekil 2.10. Keratokonusu uygulanan tedavi yöntemlerinin şematik gösterimi.

Tablo 2.4. Keratokonusta uygulanan tedavi yaklaşımları. (148).

Tedavi Türü	Tedavi Özellikleri
Korneal Kolajen Çapraz Bağlama	Görece yeni ve oldukça umut vaat eden bir yöntemdir, keratokonusun ilerlemesini durdurma amacıyla uygulanmaktadır.
Kontakt Lens	Hastalığın erken dönemlerinde görüş düzeltmek için uygulanmaktadır.
İntraoküler Lens	İlerlemesi durmuş keratokonus vakalarında ve miyop astigmat hastalarında olumlu sonuç veren bir yöntemdir.
Korneal Transplantasyon	Keratokonus sonucu yapısal bozulmaya uğramış korneanın yapısını değiştirmek için uygulanan yöntemdir.
Kombine Tedavi	Belirtilen tedavi yöntemlerinin birlikte kullanılmasını ifade etmektedir.

Kontakt lensler keratokonustaki görüş kaybını düzeltmede ilk seçenek olarak değerlendirilir (149). Fakat doğası gereği hastalık sürekli ilerlediğinden gözlük ile kontrol altına alınması zordur. Bu nedenle kontakt lensler keratokonusta daha sıklıkla kullanılmaktadır. Bu lensler, yumuşak kontakt lens ve gaz geçirgen kontakt lens olarak iki sınıfta incelenebilir. Yumuşak kontakt lensler kullanım kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilmektedir (150). Ancak hastalığın ilerleyen aşamalarında yumuşak lensler görüşü düzeltebilmek için yeterli gelmemekte ve sert lenslere geçiş yapılmaktadır. Her ne kadar sert lensler kullanımda rahatsızlık hissi verse de sağladıkları düzgün optik yüzey sayesinde görüşü oldukça düzeltmektedir (151). Son zamanlarda hibrit lensler üzerinde çalışılmaktadır. Bu lenslerin merkezi bölümü görüşü daha iyi düzeltmek amacıyla sert lensten oluşurken dış kısımları kullanım rahatlığı için yumuşak lensten meydana gelmektedir (152).

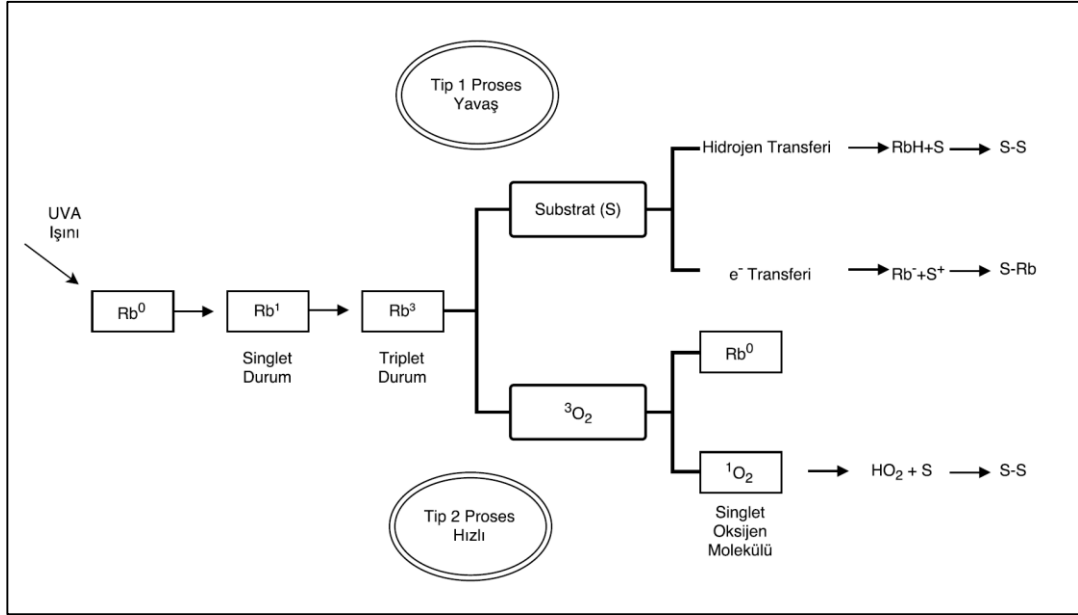
Keratoplasti, diğer bir deyişle kornea nakli, hasarlı korneanın cerrahi yöntemle çıkarılarak sağlam kornea ile değiştirilmesidir. Penetran keratoplasti (PK) keratokonus tedavisinde standart bir yöntemdir ve yeni geliştirilen DALK yönteminin kullanılması günümüzde artmaktadır (153). PK yönteminde korneadaki tüm dokular çıkarılırken, DALK tekniğinde endotel ve "Descemet" tabakası gözde bırakılmaktadır (154). Bu nedenle DALK yönteminde endotel reddi riski elimine edilerek immünsüpresif ilaçlara daha az ihtiyaç duyulmaktadır (155).

2.8.2. Korneal Kolajen Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama (“cross-linking”) terimi proteinler ya da bazı moleküller arasında oluşan kimyasal köprüleri ifade etmektedir. Yapılan araştırmalarda (156, 157) diyabet hastalarında keratokonus şiddetinin daha az olduğu ve bunun nedeninin glikozilasyon aracılı çapraz bağlanmanın stromal yapıyı güçlendirmesi olduğu bildirilmiştir. Bu duruma benzer bir etki sağlamak için araştırmacılar UV ışık ile aktive olan ve çapraz bağlanmayı sağlayan KKÇB yöntemini geliştirmiştir (158, 159). Bu yöntemde, fotoduyarlılaştırıcı (“photosensitizer”) bir madde olan riboflavin ve UVA (Ultraviyole A) ışığı kullanılarak korneadaki kolajenlerin çapraz bağlanma sayısının artırılması ve keratokonus sonucu bozulan kornea yapısının mekanik stabilitesinin geri kazanılması hedeflenmektedir.

Korneada normal fizyolojik koşullarda kolajen çapraz bağlanması lizil oksidaz enzimi ile gerçekleşmektedir (160). KKÇB yönteminde, fotoduyarlılaştırıcı olarak kullanılan riboflavin, uygulanan UVA ışığı absorbe ederek serbest radikaller oluşturmakta, bu radikaller doğal lizil oksidaz yolağını aktive etmektedir. Bunun yanı sıra bir vitamin türevidir olan riboflavin (B2 vitamini) gözün endotel, lens ve retina tabakasının hasar almasını önlemektedir (159). Riboflavinin sudaki çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle çalışmalarda ve ticari preparatlarda genellikle riboflavin-5-fosfat sodyum tuzu kullanılmaktadır.

Riboflavin baz, lipofilik yapıda olup suda pratik olarak çözünmemektedir (0,14 mg/mL). Riboflavin-5-fosfat sodyum ise riboflavin’in tuz şeklidir ve çözünürlüğü artırılmıştır (35,71 mg/mL) (161).



Şekil 2.11. UVA ışığı uygulanması sonucunda riboflavinin serbest radikal oluşturma mekanizmasının şematik gösterimi. (Raiskup ve ark. (162)'dan değiştirilerek).

UVA ışığı uygulanması sonucunda riboflavinin meydana getirdiği fotokimyasal reaksiyonlar tip 1 ve tip 2 olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.11.). Tip 2 ortamdaki oksijen varlığında gerçekleşen hızlı bir reaksiyondur. Tekli (singlet) oksijen molekülü reaktif yapıda bir radikaldir ve kolajen yapılarında bulunan karbonil grupları ile reaksiyona girer. Ortamdaki oksijen tükendiğinde ise tip 1 reaksiyonları devreye girmektedir. KKÇB işleminde her iki proses de görev almaktadır (163).

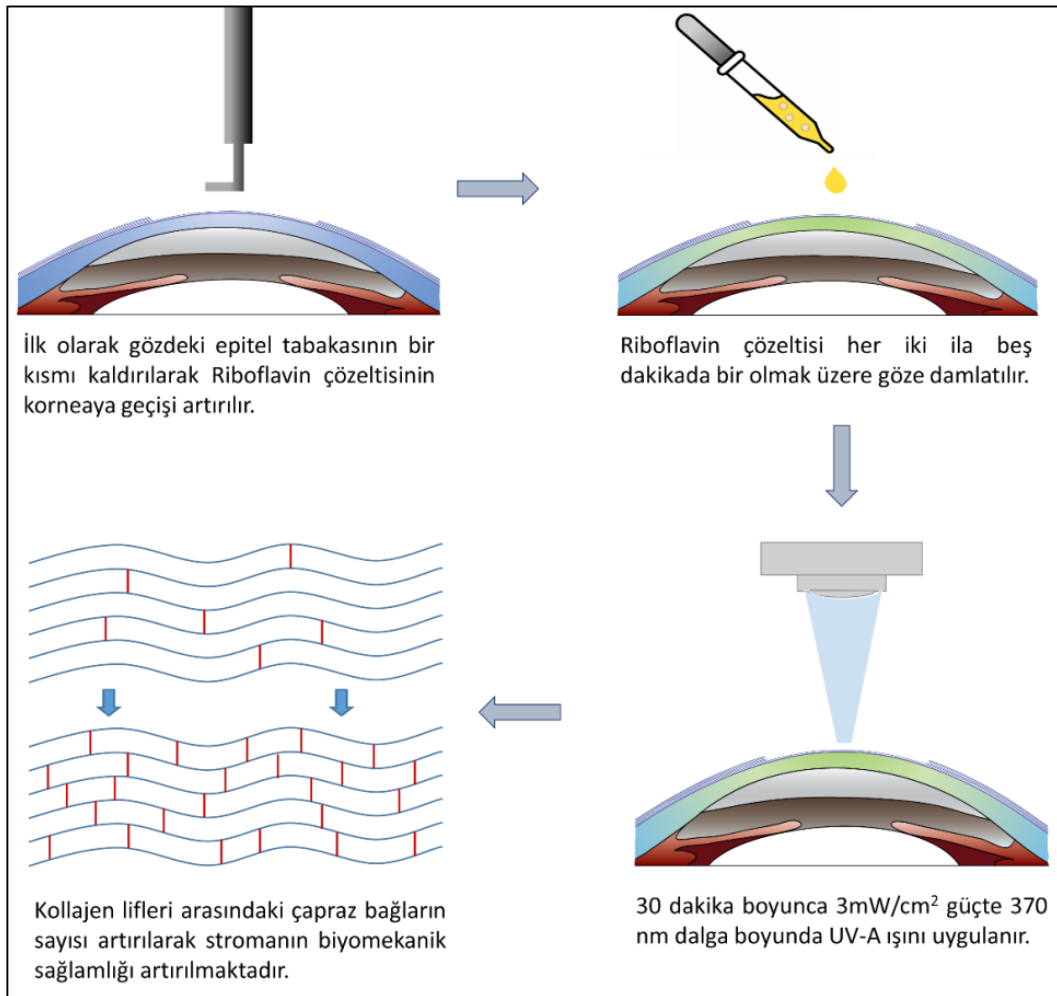
UVA ışığı uygulanması ile riboflavin tip 1 veya tip 2 reaksiyonlarını gerçekleştirerek kolajen lifler arasında yeni çapraz bağ yapıları oluşturmaktadır. Bu nedenle stromal yapının biyomekanik sertliği artırılarak keratokonus hastalığının ilerlemesi önlenmektedir. KKÇB yöntemi genellikle standart ("epi-off") ve girişimsel olmayan ("epi-on") olarak iki farklı şekilde uygulanabilir.

Standart ("Epi-Off") Yöntem ile Korneal Kolajen Çapraz Bağlama

Dresden Protokolü olarak da isimlendirilen bu yöntemde korneanın stroma üzerindeki epitel tabakası cerrahi işlem ile kazınarak uzaklaştırılmaktadır. Bunun nedeni, kullanılan riboflavin çözeltilerinin korneanın epitel tabakası nedeniyle

stromaya penetre olamamasıdır (164). Bu işlemde öncelikle göze topikal anestezi damlatılır. Sonrasında kornea epitel 7-9 mm çapında olacak şekilde kazınarak kaldırılır. % 0,1'lik (a/h) riboflavin çözeltisi göze 30 dakika boyunca her 2-5 dakikada bir olmak üzere damlatılır. Daha sonra 370 nm dalga boyunda ve $3\text{mW}/\text{cm}^2$ ($5.4\text{ J}/\text{cm}^2$) yoğunlukta UVA ışığı 30 dakika uygulanır. UVA uygulaması sırasında her 2-5 dakikada bir riboflavin çözeltisi damlatılmaya devam edilir (Şekil 2.12.).

Gözdeki epitel tabakasının kazınması sonucu iritasyon oluşumu, görmede bulanıklık gibi çeşitli komplikasyonlar meydana gelmektedir. İşlem sonrası gözde oluşacak ağrının önlenmesi için sistemik analjezik ilaçlar ve tekrar epitelizasyon olana kadar antibiyotik ve kortikosteroidler kullanılmaktadır. Görmede bulanıklığın meydana geldiği durumlarda sert lenslerin kullanılması gerekebilmektedir (165).



Şekil 2.12. Standart ("Epi-Off") Yöntem ile KKÇB işleminin şematik olarak gösterimi.

Girişimsel Olmayan (“Epi-On”) Yöntem ile Korneal Kolajen Çapraz Bağlama

KKÇB’de standart yöntem (“epi-off”) ile tedavi sonrası hastalarda komplikasyonlar meydana gelmesi, oftalmoloji alanında çalışan hekimleri ve araştırmacıları kornea epiteli uzaklaştırılmadan (“epi-on”) bu işlemin yapılması için araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir. Bu araştırmalar sonucunda i) mekanik, ii) kimyasal (formülasyon) ve iii) iyontoforez yaklaşımları geliştirilmiştir (163).

Mekanik yaklaşımda epitelin tamamının kaldırılması yerine epitelde küçük kesikler veya çukurlar açılarak riboflavinin geçişinin artırılması hedeflenmektedir. Yapılan bir çalışmada Bowman tabakası bozulmadan epitel tabakasında küçük çukurlar açılmış bu sayede tüm epitelin kaldırılması ile oluşabilecek yan etkilerin azaltılarak iyileşmenin hızlandırıldığı bildirilmiştir (166). Hashemi ve ark. (136) tarafından yapılan bir çalışmada kornea epitelinde 2 mm genişliğinde şeritler açılarak riboflavin uygulaması yapılmış ve keratokonusun ilerlemesinin durdurulduğu bildirilmiştir. Literatürde mekanik uygulamanın her zaman başarılı sonuçlar vermediğini gösteren çalışmalar da vardır. Örneğin, Samaras ve ark. (167) domuz kornea epitelinde kare şeklinde parçalar oluşturacak şekilde kesilmiş ve riboflavin uygulaması ile UVA çapraz bağlama işlemi gerçekleştirmiştir. Çalışmada bir diğer grupta domuz kornea epiteli tamamen uzaklaştırıldıktan sonra KKÇB işlemi yapılmıştır (standart tedavi). Araştırmacılar epiteli kare şeklinde parçalara bölünen grupta riboflavinin homojen olarak dağılmaması nedeniyle iyi sonuçlar elde edilemediğini, standart tedavinin daha hızlı ve yüksek oranda iyileşme sağladığını belirtmiştir.

Kimyasal yaklaşımda riboflavinin gözle temas süresinin artırılması, formülasyonda kullanılan maddeler ile epitelin permeasyonunun artırılması veya riboflavin çözeltisinin fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Torricelli ve ark. (168), tavşan gözlerine % 0,02 benzalkonyum klorür ve % 0,01 EDTA içeren riboflavin çözeltisinin epitel uzaklaştırılmadan uygulandığında standart yönteme göre biyomekanik sertliği (stiffness) artırdığını bildirmiştir. Benzer şekilde, Kissner ve ark. (169) % 0,02 benzalkonyum içeren riboflavin çözeltisini epitel uzaklaştırılmadan tavşan gözlerine uygulamış ve bu şekilde riboflavinin korneal epitelde geçişinin arttığını, stromada yeterli şekilde biriktiğini ve korneanın

biyomekanik sertliğini artırdığını tespit etmiştir. Buna ilaveten, trometamol ve EDTA içeren riboflavin formülasyonlarının (170) ve vitamin E-TPGS (171) içeren riboflavin formülasyonlarının epitel uzaklaştırılmadan uygulandıklarında keratokonusun ilerleyişini durdurduğu gösterilmiştir.

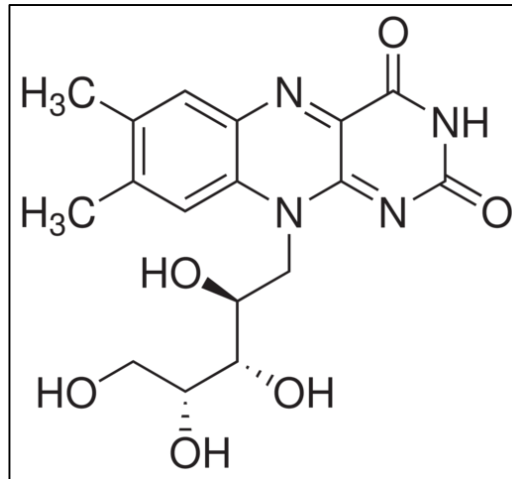
İyontoforez yaklaşımında iyonize ilaç moleküllerinin düşük bir elektrik akımı yardımıyla korneadan geçişinin artırılması sağlanmaktadır (172). Riboflavin negatif yüklü bir molekül olduğundan iyontoforez yöntemine uygundur (163). Cassagne ve ark. (173) yaptığı çalışmada 1mA akımda 5 dakika boyunca riboflavin çözeltisini iyontoforez yöntemiyle tavşan gözlerine damlatarak UVA ışığı uygulamıştır. Diğer bir grup tavşan gözlerine epitelin kazındığı standart yöntem uygulanmıştır. Her iki grup karşılaştırıldığında, iyontoforez uygulanan grubun stromasındaki riboflavin miktarının standart yöntemle biriken miktarın yarısı olduğu, ancak biyomekanik incelemelerde iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı, iyontoforez yönteminin etkili olduğu bildirilmiştir. Diğer bir araştırmada (174), riboflavin çözeltisi 1mA akımda 5 dakika boyunca iyontoforez yöntemiyle tavşan gözlerine damlatılıp UVA uygulandığında, standart yöntem ile daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmada UVA ışığının gücü 10 mW/cm²' ye çıkarıldığında, aynı akım ve sürede iyontoforez işlemi uygulanan grupta standart tedavi uygulanan gruba göre daha yüksek biyomekanik değerler tespit edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, riboflavinin kornea epitelinden geçişinin mekanik, kimyasal veya iyontoforez yaklaşımları ile artırıldığı ve biyomekanik sertliğini iyileştirildiği çalışmalara rastlanmaktadır. Ancak bu yöntemlerle riboflavinin korneadan geçişinin ve korneanın biyomekanik özelliklerin iyileşmediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (175, 176). *Bu nedenle klinikte hala epitelin kazınarak uzaklaştırıldığı standart yöntem ("epi-off") uygulanmaktadır.*

2.9. Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum

2.9.1. Riboflavin'in Genel Özellikleri

Riboflavin sarı-turuncu renkte serbest akış gösteren bir tozdur. Kimyasal formülü Şekil 2.13.'de gösterilmektedir. B2 vitamini ve laktoflavin olarak da isimlendirilmektedir. Vücutta flavin mononükleotid gibi karbonhidrat ve yağların redoks reaksiyonlarında görev alan flavokoenzimlerin yapılarının oluşumunda rol oynamaktadır. Riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum gibi türevleri gıdalarda ve gıda takviyelerinde kullanıldığı gibi renklendirici olarak da kullanılmaktadır. Fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.5.'de özetlenmiştir (177).



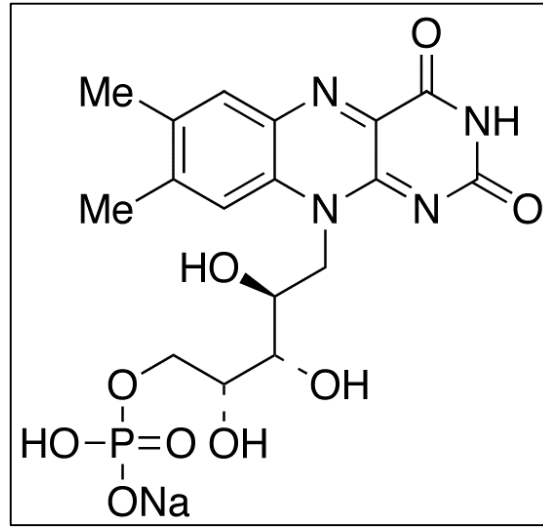
Şekil 2.13. Riboflavinin kimyasal formülü. (178)

Tablo 2.5. Riboflavinin fizikokimyasal özellikleri. (177)

IUPAC İsimlendirmesi	7,8,-dimetil-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5,-tetrahidroksipentil]benzo[g] pteridin-2,4(3H,10H)-dion
Sinonimleri	Vitamin B2, laktoflavin
CAS No	83-88-5
Kapalı Formülü	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
Molekül Ağırlığı	376,37 g/mol
Erime Derecesi	280°C
Çözünürlük	Suda: 0,07-0,16 g/L Etanolde, eterde, asetonunda ve kloroformda pratik olarak çözünmez.

2.9.2. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un Genel Özellikleri

Riboflavin-5-fosfat sodyum turuncu renkli bir tozdur. Kimyasal formülü Şekil 2.14.'de verilmiştir. Kullanım alanları Riboflavin ile benzerdir. Sudaki çözünürlüğünün yüksek olması sebebiyle ticari preparatlarda bu şekli kullanılmaktadır. Fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.6.'da özetlenmiştir (177) .



Şekil 2.14. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un kimyasal formülü. (178)

Tablo 2.6. Riboflavin-5-fosfat sodyum'un fizikokimyasal özellikleri. (177)

IUPAC İsimlendirmesi	Sodyum[(2S,3R,4R)-5-(7,8-dimethyl-2,4-dioksobenzo[g]pteridin-10-yl)-2,3,4-trihidroksipentil]hidrojen fosfat
Sinonimleri	Riboflavin sodyum fosfat
CAS No	130-40-5
Kapalı Formülü	C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₉ PNa
Molekül Ağırlığı	478,33 g/mol
Erime Derecesi	249-253°C
Çözünürlük	Suda: 37 g/L Etanolde çok az çözünür, eterde, asetonda ve kloroformda pratik olarak çözünmez.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

Madde	Marka
2-Propanol	Merck, Almanya
Asetonitril	Sigma, ABD
Compritol ATO	Gattefossé, Fransa
Cremophor EL	Sigma, ABD
Dekstroz	Merck, Almanya
Diklorometan	Merck, Almanya
Diyaliz Membranı	Sigma, ABD
DMEM-F12	Merck, Almanya
DMSO	Merck, Almanya
EDTA	Sigma, ABD
Etanol	Sigma, ABD
Etil Asetat	Merck, Almanya
FBS	Merck, Almanya
Formik Asit	Merck, Almanya
Gelucire 44/14	Gattefossé, Fransa
Kalsiyum Klorür	Merck, Almanya
Mannitol	Merck, Almanya
MedioCROSS D	Avedro, ABD
MedioCROSS TE	Avedro, ABD
Metanol	Sigma, ABD
Miglyol 812	IOI Chemicals, Almanya
MTT	Merck, Almanya
Nikotinamid	Sigma, ABD
N-N-Dimetil formamid	Merck, Almanya

Penisilin-Streptomisin	Merck, Almanya
Pluronic F-127	Sigma, ABD
Potasyum Fosfat	Merck, Almanya
Riboflavin	Sigma, ABD
Riboflavin-5-fosfat sodyum	Sigma, ABD
Sodyum Asetat	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Stearilamin	Sigma, ABD
Transcutol P	Gattefossé, Fransa
Trehaloz	Merck, Almanya
Tripsin-EDTA	Lonza, İsviçre

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar

Cihaz/Yazılım	Marka/Program Adı
Bilyeli Değirmen	Retsch, Almanya
Çok noktalı manyetik karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
Doku analiz cihazı	Stable Micro Systems, İngiltere
DSC cihazı	TA Instruments, ABD
Ex-vivo geçiş çalışması	Warner-Instruments, ABD
FTIR cihazı	Perkin Elmer FTIR System Spectrum BX, ABD
Hassas terazi	Mettler Toledo, İsviçre
Homojenizatör	Ultra Turrax T-18 IKA, Almanya
HPLC cihazı	Agilent 1200/ ABD
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
İstatistik Yazılımı	Minitab 16
Kornea çapraz bağlama cihazı	CCL Vario, İsviçre
Laminar hava akımlı kültür kabini	Faster, İtalya
Liyofilizatör	Hirayama, Japonya

Mikropipetler	Eppendorf, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Rotavapor	IKA, Almanya
Santrifüj aleti	Hermle Z383K, Almanya
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra saf su cihazı	Millipore, ABD
Ultrasonikatör cihazı	Bandelin, Almanya
UV spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vizkometre	Brookfield DV2R-RV, Kanada
Vorteks	IKA, Almanya
XRD cihazı	Malvern Pananalytical, İngiltere

3.2. Analitik Metod Validasyonları

3.2.1. Riboflavin Miktar Tayini

Tez çalışmalarında riboflavin miktar tayini için HPLC yöntemi kullanılmış ve kromatografik koşullar Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Riboflavin'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar. (179)

Mobil Faz	Asetat Tamponu (Sodyum asetat/CaCl ₂ /EDTA): Metanol
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	1 mL.dk ⁻¹
Dedektör	Floresan
Dalga boyu	Eksitasyon:420 nm/ Emisyon: 530 nm
Kolon	C8
Sıcaklık	23 °C

3.2.2. Riboflavin'in Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgül ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan işlemdir (180). HPLC metodunun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır:

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Günlerarası tekrarlanabilirlik
- Duyarlılık
- Stabilitate (180)

Doğrusallık ("Linearity")

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının doğrudan orantılı olmasını sağlama özelliğidir (180). Analiz sonucunda, çözeltilerin konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları kullanılarak doğru denklemi hesaplanmış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü yapılmıştır.

Doğruluk ("Accuracy")

Analitik yöntem ile bulunan deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığı belirlenmiştir. Kullanılan yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi için hazırlanan stok çözeltiden % geri kazanılan değerler hesaplanmıştır (180).

Kesinlik ("Precision")

Bir yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade eden kesinlik parametresi standart sapma (SS) veya varyasyon katsayısıyla (VK) ifade edilir. Kesinlik, normal çalışma koşullarında analitik yöntemin tekrar edilebilirlik

(repeatability) veya tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) derecesinin bir göstergesidir (180).

Tekrarlanabilirlik ("Repeatability")

Yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla aynı konsantrasyonda hazırlanan örnek arka arkaya 6 kez uygulanarak elde edilen pik alanlarının \bar{X} , SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. (180).

Özgüllük ("Specificity")

Özgüllük, bir analitik yöntemin amaçlanan maddeyi spesifik olarak tayin edilebilmesidir (180).

Duyarlılık ("Sensitivity")

i) Miktar Tayini Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (180).

ii) Saptama Sınırı (Limit of Detection, LOD)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (180).

Stabilite

Riboflavin'in deneyler süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla 2,5 µg/mL konsantrasyonda 3 seri olmak üzere çözeltiler hazırlanmış ve örnekler hemen, 24. ve 48. saatlerde analiz edilmiştir.

3.2.3. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum Miktar Tayini

Tez çalışmalarında riboflavin-5-fosfat sodyum miktar tayini için HPLC yöntemi kullanılmış ve kromatografik koşullar Tablo 3.2’de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Riboflavin-5-fosfat sodyumun HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar. (181)

Mobil Faz	Fosfat Tamponu (KH ₂ PO ₄):Metanol (77,5:22,5)
Enjeksiyon hacmi	50 µL
Akış hızı	0,9 mL.dk ⁻¹
Dedektör	Floresan
Dalga boyu	Eksitasyon:440 nm/ Emisyon: 530 nm
Kolon	L1
Sıcaklık	25 °C

3.2.4. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum’un Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgül ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan işlemdir (180). HPLC metodunun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır:

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Günlerarası tekrarlanabilirlik
- Duyarlılık
- Stabilite (180)

Riboflavin-5-fosfat sodyum’un analitik validasyon parametreleri için yapılan çalışmalar riboflavin için yukarıda (Bölüm 3.2.1.) verilen çalışmalarla aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Dokudan Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum Miktar Tayini

İn vivo çalışmalarda kornea dokusundan riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum miktar tayini için LC-MS yöntemi kullanılmıştır ve kromatografik koşullar Tablo 3.3'de özetlenmiştir. Bu amaçla Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, ABD) cihazı kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum'un LC/MS ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar. (182)

Mobil Faz	%0,1 Formik Asit / Asetonitril (Gradient)
Kullanılan kolon	ACE5 AQ 150x3.0mm
Akış hızı	0.6 mL.dk ⁻¹
Dedektör	Q-TOF
Nitrojen gazı akışı	14 L/dk
Kapiller Voltaj	1500 V pozitif, 1250 V negatif
Koni Voltajı	500 V
Kaynak sıcaklığı	250°C
Desolvasyon sıcaklığı	350°C
Ekstraktör voltajı	400 V
İyon tarama aralığı	m/z 100 - 500

3.3. Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Formülasyonların Geliştirilmesi

3.3.1. Riboflavin İçeren Farmasötik Ko-Kristallerin Hazırlanması

Riboflavin'in çözünürlüğü hem suda hem de organik çözücülerde oldukça düşük olduğundan (183), öncelikle ko-kristal hazırlanmasında çözünürlük kontrolü görsel olarak gerçekleştirilmiştir (184). Bunun için riboflavinin belirlenen çözücü ve çözücü karışımlarında çözünürlük kontrolü amacı ile 40 mg riboflavin veya ko-kristal yapıcı madde, 20 mL çözücü veya çözücü karışımına eklenerek görsel olarak incelenmiştir.

Ko-kristallerin hazırlanmasında yapılan ön denemeler sonunda, i) çözücü yardımı ile birlikte uçurma yöntemi (109) ve ii) birlikte karıştırma yöntemi (185) nin kullanılmasına karar verilmiştir.

Çözücü yardımı ile birlikte uçurma yöntemi

Bu yöntemde riboflavin ve ko-kristal yapıcı maddenin bir çözücüde çözüldükten sonra çözücünün uçurulması ile her iki maddenin birlikte çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir (109). Yapılan ön denemeler sonucunda bu yöntemde çözücü olarak DMSO'nun kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu yöntem için; 1 birim mol riboflavin ve 1 veya 2 birim mol nikotinamid,
1 birim mol riboflavin ve 1 veya 2 birim mol mannitol,
1 birim mol riboflavin ve 1 birim mol dekstroz,
1 birim mol riboflavin ve 1 birim mol trehaloz,
birlikte DMSO'da çözülmüş ve vakum altında 50°C'de ısıtma veya liyofilizatörde dondurarak kurutma yöntemi ile DMSO'nun uçması sağlanmıştır.

Birlikte karıştırma yöntemi

Bu yöntem için; 1 birim mol riboflavin ve 1 birim mol nikotinamid,
1 birim mol riboflavin ve 1 birim mol mannitol,
havanda veya bilyeli değirmende yardımcı çözücü kullanımı (etanol – metanol) da denenerek birlikte karıştırma işlemi yapılmıştır (185).

Ko-kristal hazırlanması için yapılan denemeler için detaylı bilgi Tablo 3.4.'de sunulmuştur. Daha sonra hazırlanan ko-kristal formülasyonlarının kontrolleri DSC, XRD ve FTIR analizleri ile yapılmıştır.

Tablo 3.4. Riboflavin'in Ko-Kristal Yapılarının Oluşturulması İçin Kullanılan Yöntemler.

Formülasyon Kodu	Etken Madde	Ko-Kristal Maddesi	Yöntem	Hazırlama Şekli
1R1T Liyo	1 k Riboflavin	1 k Trehaloz	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k trehaloz'un DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün + 3 gün olacak şekilde lyofillize edilmesi.
1R1D Liyo	1 k Riboflavin	1 k Dekstroz	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k dekstroz'un DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün + 3 gün olacak şekilde lyofillize edilmesi.
1R1N Fiziksel	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Fiziksel K.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in hiçbir işlem yapılmaksızın fiziksel olarak karışımı.
1R1N Liyo	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün + 3 gün olacak şekilde lyofillize edilmesi.
1R1N Vakum	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün boyunca vakum altında DMSO'nun uçurulması.
1R1N Su	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in suda çözüldükten sonra rotavaporda uçurulması.
1R1N MeOH	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in metanolde çözüldükten sonra çeker ocağa kendiliğinden uçurulması.
1R1N ACN	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in asetonitrilde çözüldükten sonra çeker ocağa kendiliğinden uçurulması.
1R2N MeOH	1 k Riboflavin	2 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k nikotinamid'in metanolde çözüldükten sonra çeker ocağa kendiliğinden uçurulması.
1R2N ACN	1 k Riboflavin	2 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k nikotinamid'in asetonitrilde çözüldükten sonra çeker ocağa kendiliğinden uçurulması.
1R2N Fiziksel	1 k Riboflavin	2 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k nikotinamid'in hiçbir işlem yapılmaksızın fiziksel olarak karışımı.
1R2N Liyo	1 k Riboflavin	2 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k nikotinamid'in DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün + 3 gün olacak şekilde lyofillize edilmesi.
1R2N Vakum	1 k Riboflavin	2 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k nikotinamid'in suda çözüldükten sonra rotavaporda uçurulması.
1R2N Su	1 k Riboflavin	2 k Nikotinamid	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k nikotinamid'in suda çözüldükten sonra bir miktar rotavaporda uçurulması, çöken maddenin filtrasyonu toplanarak kurutulması.
1R1M Fiziksel	1 k Riboflavin	1 k Mannitol	Fiziksel K.	1 k Riboflavin ile 1 k Mannitolun hiçbir işlem yapılmaksızın fiziksel olarak karışımı
1R1M Liyo	1 k Riboflavin	1 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k Mannitolun DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün + 3 gün olacak şekilde lyofillize edilmesi
1R1M Vakum	1 k Riboflavin	1 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k Mannitolun DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün boyunca vakum altında DMSO'nun uçurulması
1R1M Su	1 k Riboflavin	1 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k Mannitolun suda çözüldükten sonra rotavaporda uçurulması
1R1M Su Filtre	1 k Riboflavin	1 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 1 k Mannitolun suda çözüldükten sonra bir miktar rotavaporda uçurulması, çöken maddenin filtrasyonu toplanarak kurutulması.
1R2M Fiziksel	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Fiziksel K.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun hiçbir işlem yapılmaksızın fiziksel olarak karışımı.
1R2M Liyo	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün + 3 gün olacak şekilde lyofillize edilmesi.
1R2M Vakum	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun DMSO'da çözüldükten sonra 3 gün boyunca vakum altında DMSO'nun uçurulması.
1R2M Su	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun suda çözüldükten sonra rotavaporda uçurulması.
1R2M Su Filtre	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun suda çözüldükten sonra bir miktar rotavaporda uçurulması, çöken maddenin filtrasyonu toplanarak kurutulması.
1R2M ACN	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun asetonitrilde çözüldükten sonra çeker ocağa kendiliğinden uçurulması.
1R2M ACN	1 k Riboflavin	2 k Mannitol	Çözelti Y.U.	1 k Riboflavin ile 2 k Mannitolun asetonitrilde çözüldükten sonra çeker ocağa kendiliğinden uçurulması.
1R1N B.D.	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Birlikte K.Y.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in bilyalı değirmen ile bir saat karıştırılması.
1R1N B.D. MeOH	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Birlikte K.Y.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in metanol yardımıyla bilyalı değirmen ile bir saat karıştırılması.
1R1N H.	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Birlikte K.Y.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in havan ile yarım saat karıştırılması.
1R1N H. Etanol	1 k Riboflavin	1 k Nikotinamid	Birlikte K.Y.	1 k Riboflavin ile 1 k nikotinamid'in etanol yardımıyla havan ile yarım saat karıştırılması.

k: Birim mol, Çözelti Y.U.: Çözelti yardımıyla uçurma yöntemi, Birlikte K.Y.: Birlikte karıştırma yöntemi, Fiziksel K.: Fiziksel karışım

İn Vitro Lipofilisite Değerlendirme Çalışması

Hazırlanan ko-kristal formülasyonlarının in vitro lipofilisite değerlerinin tespit edilmesi için oktanol:su karışımındaki dağılım yüzdeleri hesaplanmıştır (186). Bunun için, hazırlanan ko-kristal formülasyonları 5 mg/100 mL olacak şekilde PBS içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltilerden 5'er mL alınarak üstüne 5 mL 1-oktanol eklenmiş ve 30 dk yatay çalkalayıcıda ve sonra 1 saat boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Örnekler 1 gece dinlendirildikten sonra PBS bölümü alınarak ve mobil fazla 10 kat seyreltilerek HPLC'de analiz edilmiştir.

3.3.2. Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında sıcaklığa bağlı olarak (termosensitif) in situ jelleşme gösterecek olan hidrofilik jel formülasyonları hazırlanarak, riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum tuzunun kornea yüzeyinde kalış süresinin uzatılması ile korneaya penetrasyonunun artırılması hedeflenmiştir. Ayrıca bu formülasyonlara penetrasyon artırıcı ilavesinin korneal penetrasyon üzerine etkisi de incelenecektir. Termosensitif polimer olarak oküler alanda sıklıkla kullanılan Pluronic F-127 polimeri seçilmiştir (187).

Pluronic F-127 polimeri ile hidrofilik jel formülasyonlarının hazırlanması için soğuk yöntem ("cold method") kullanılmıştır (188). Bunun için literatürde Pluronic F-127 için verilen % 15, 18 veya 20 (a/h) konsantrasyon değeri kullanılarak jel formülasyonları hazırlanmıştır. Bölüm 4.3.1'de belirtildiği üzere jelleşme sıcaklıkları bulgularının değerlendirilmesinin ardından formülasyonlarda % 18 (a/h) konsantrasyonda Pluronic F-127 kullanılmasına karar verilmiştir. Formülasyon bileşenleri Tablo 3.5'te sunulmuştur. Hazırlama aşamasında Pluronic F-127 polimeri distile su içinde gece boyunca +4°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sonrasında bu karışıma riboflavin (% 0.1, a/h) veya riboflavin-5-fosfat sodyum (% 0.1, a/h), sodyum klorür (% 0.7, a/h), benzalkonyum klorür (% 0.01, a/h) veya Transcutol

P (% 0.1, a/h) eklenerek 30 dakika daha +4°C'de karıştırılması sağlanmıştır. Elde edilen formülasyonlar kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlar;

- Riboflavin ve permeasyon artırıcı (Transcutol P) içeren hidrofilik jel formülasyonları (**BHJ-TP**)
- Riboflavin içeren, permeasyon artırıcı (Transcutol P) içermeyen hidrofilik jel formülasyonları (**BHJ**)
- Riboflavin-5-fosfat sodyum ve permeasyon artırıcı (Transcutol P) içeren hidrofilik jel formülasyonları (**THJ-TP**)
- Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren permeasyon artırıcı (Transcutol P) içermeyen hidrofilik jel formülasyonları (**THJ**) olarak sıralanabilir.

Tablo 3.5. Riboflavin ve riboflavin-5-Fosfat sodyum içeren hidrofilik jel formülasyonlarının bileşenleri.

Kod	Riboflavin (%)	Riboflavin-5-fosfat sodyum (%)	Pluronic F-127 (%)	NaCl (%)	Benzalkonyum klorür (%)	Transcutol P (%)	Su (mL)
BHJ	0.1	-	18	0.7	0.01	-	25
BHJ-TP	0.1	-	18	0.7	0.01	0.1	25
THJ	-	0.1	18	0.7	0.01	-	25
THJ-TP	-	0.1	18	0.7	0.01	0.1	25

Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Jelleşme Sıcaklığı Tayini

Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren termosensitif hidrofilik jellerin jelleşme sıcaklığının tespit edilmesi için (n=3), jel formülasyonları, su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak termometre kontrolünde sıcaklığı yükseltilmiş, manyetik karıştırıcı çubuğunun dönmeye başladığı sıcaklık derecesi sol-jel geçiş sıcaklığı olarak tespit edilmeye çalışılmıştır (189). Ancak bu yöntem ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemediği için diğer bir geçerli metod olan tüp çevirme ("tube inversion") yöntemi kullanılmıştır (190). Bu

yöntemde tüp içindeki jel formülasyonları su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve artan sıcaklık ile birlikte tüp ters çevriliğinde içeriğinin sabit şekilde akmadan kaldığı sıcaklık derecesi sol-jel geçiş sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

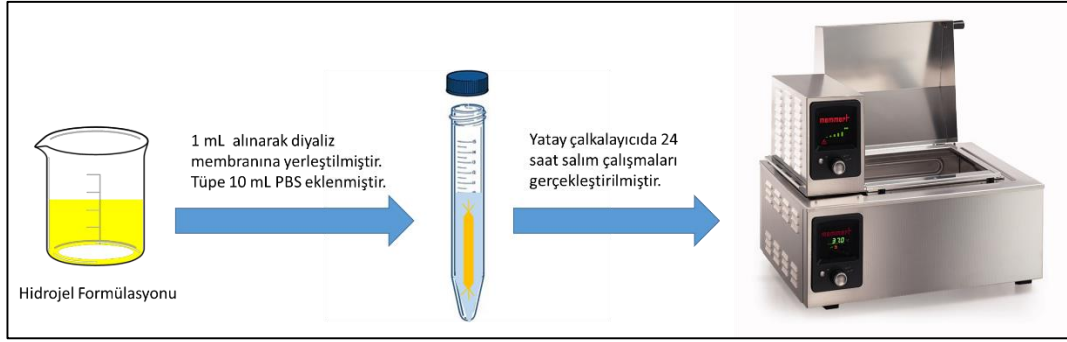
Viskozite Tayini

Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren termosensitif hidrofilik jel formülasyonlarının (n=3) viskozite ölçümleri 37 °C'de, Brookfield Viskometresi (DV2T-RV) ve CP52 spindle kullanılarak yapılmıştır. Tespit edilen viskozite (cP) değerleri sıcaklığa (°C) karşı grafiğe geçirilmiştir.

In-vitro Salım Çalışmaları

Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren termosensitif jel formülasyonları için in vitro salım deneyleri (n=3) "Diyaliz Torbası Yöntemi" kullanılarak gerçekleştirilmiştir (191). Salım ortamı olarak PBS pH 7.4 kullanılmıştır. Çalışmalarda termosensitif jel formülasyonlarından 1 mL alınarak diyaliz zarı (MW 14000 Cut off) içerisine (~8 cm² diyaliz alanı) yerleştirilmiştir. Bu sistem, 10 mL pH 7,4 PBS tamponu içeren kapaklı falkon tüp içerisine alınıp 32±2 °C'de 50 rpm hızla çalışmakta olan yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. 0.5, 1, 2, 3, 6, 18 ve 24. saatlerde alınan salım örneklerinden HPLC analizi ile riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum tayin edilmiştir. Her bir örnek alım zamanında dış hacim tamamen alınarak yerine taze pH 7,4 PBS tamponu eklenmiştir (Şekil 3.1.).

Hidrofilik jel formülasyonlarından etken maddelerin in vitro salım profillerini karşılaştırmak için benzerlik faktörleri (f₂) hesaplanmıştır (192).



Şekil 3.1. Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren termosensitif jel formülasyonlarının in vitro salım deneylerinin şematik gösterimi.

3.3.3. Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı (NLT) Formülasyonlarının Hazırlanması

Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren ve 3 farklı özellikte NLT formülasyonları eriyik emülsifikasyon yönteminin modifiye edilmesi (193, 194) ile hazırlanmıştır (Tablo 3.6.).

Riboflavin içeren NLT formülasyonları:

- Riboflavin içeren, katyonik madde veya penetrasyon artırıcı içermeyen formülasyon (**RBN**)
- Riboflavin ve penetrasyon artırıcı (Transcutol P) içeren formülasyon (**RBTP**)
- Riboflavin ve katyonik madde (Stearilamin) içeren formülasyon (**RB+**)

Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonları:

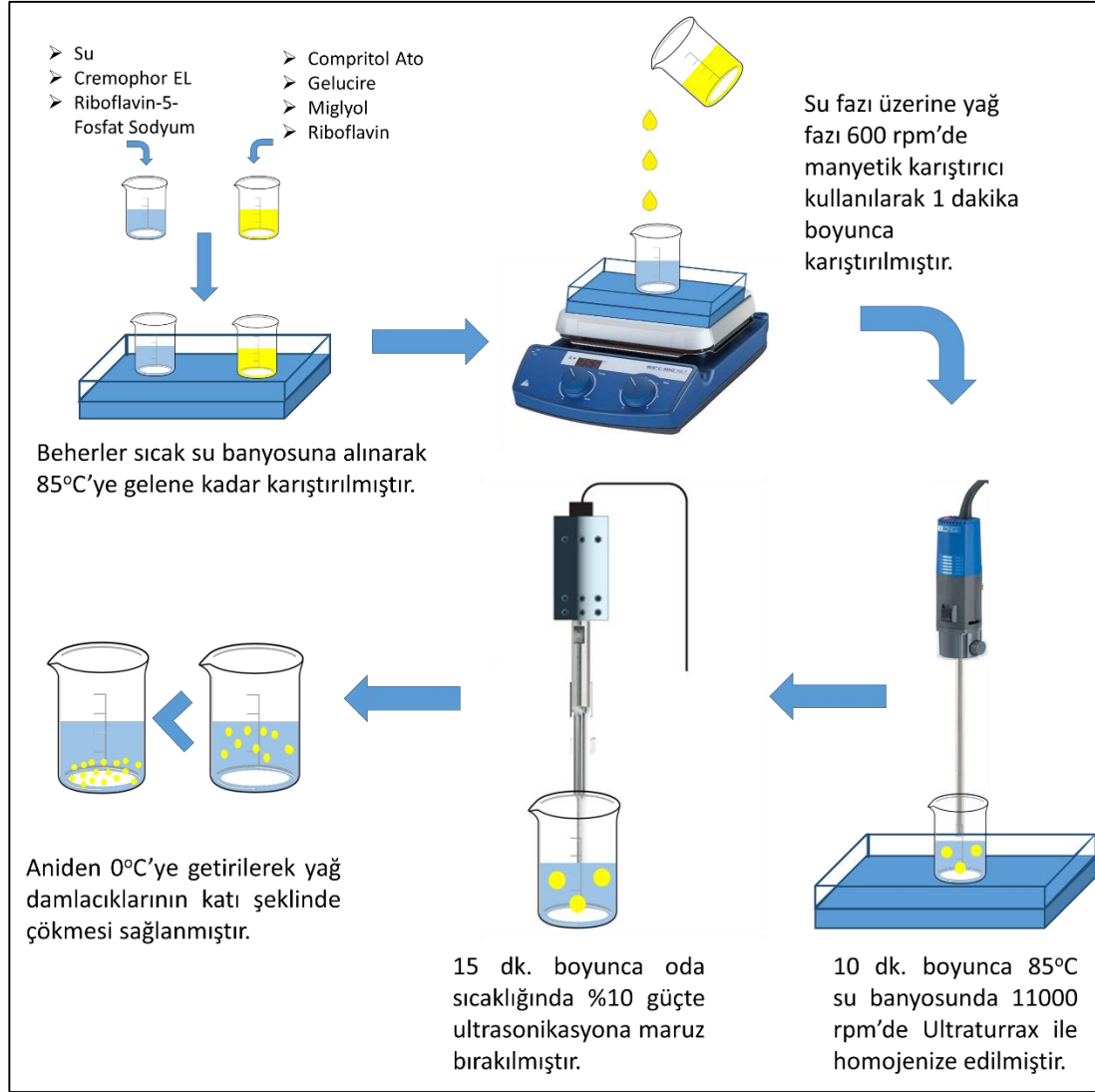
- Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren, katyonik madde veya penetrasyon artırıcı içermeyen formülasyon (**RTN**)
- Riboflavin-5-fosfat sodyum ve penetrasyon artırıcı (Transcutol P) içeren formülasyon (**RTTP**)
- Riboflavin-5-fosfat sodyum ve katyonik madde (Stearilamin) içeren formülasyon (**RT+**)

Tablo 3.6. Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonlarının bileşenleri ve oranları.

Kod	RBN	RBTP	RB+	RTN	RTTP	RT+
Riboflavin (%) (YF)	0,2	0,2	0,2	-	-	-
Riboflavin-5-fosfat sodyum (%) (SF)	-	-	-	0,2	0,2	0,2
“Compritol ATO” (%) (YF)	4	4	4	4	4	4
“Gelucire 44/14” (%) (YF)	4	4	4	4	4	4
“Miglyol 812” (%) (YF)	2	2	2	2	2	2
“Cremophor EL” (%) (SF) (YAM)	2	2	2	2	2	2
“Transcutol P” (%) (SF)	-	0,4	-	-	0,4	-
Stearilamin (%) (YF)	-	-	0,2	-	-	0,2
Su (mL) (SF)	25	25	25	25	25	25

YF: Yağ Fazı, SF: Su Fazı, YAM: Yüzey Aktif Madde

Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonlarının hazırlanması için, 0,5 g “Cremophor EL” 25 mL su içerisine eklenip karıştırılarak su fazı oluşturulmuştur (riboflavin-5-fosfat sodyum ve/veya “Transcutol P” içeren gruplarda bu madde/maddeler su fazına eklenmiştir). Su fazı su banyosunda 85 °C’ye ısıtılmıştır. Yağ fazı için, 1 g “Compritol ato 888”, 1 g “Gelucire 44/14” ve 0,5 g “Miglyol” ayrı beherde karıştırılmıştır (riboflavin ve/veya stearilamin içeren gruplarda bu madde/maddeler yağ fazına eklenmiştir). Hazırlanan yağ fazı da su banyosunda 85 °C’ye getirilmiştir. Son olarak su banyosunda yağ fazı su fazına damla damla ilave edilerek 600 rpm’de manyetik karıştırıcıda 1 dakika karıştırılarak kaba emülsiyon oluşturulmuştur. Hazırlanan kaba emülsiyon önce 85°C’de Ultra-Turrax yardımı ile 10 dakika 11000 rpm’de homojenize edilmiştir. Bu işlemden sonra karışıma tekrar oda sıcaklığında 15 dakika %10 güçte ultrasonikasyon uygulanmıştır. Hazırlanan emülsiyon buz banyosuna alınarak ve sıcaklığının aniden 0°C’ye düşmesi sağlanarak NLT’lerin çökmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. NLT Formülasyonlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.

Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı Formülasyonlarının Geliştirilmesinde Faktöriyel Tasarım Çalışmaları

NLT hazırlama yönteminin genel çerçevesi belirlendikten sonra optimum formülasyonun bulunması için faktöriyel tasarım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada faktöriyel tasarım 2^2 olacak şekilde, 6 farklı grup ve toplamda 24 ayrı formülasyon olarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7.) (tüm formülasyonlar $n=3$ olacak şekilde çalışılmış ve 72 adet formülasyon hazırlanmıştır). Bu tasarımın nedeni 2 ayrı etken madde ve 3 farklı (nötr, pozitif yüklü veya Transcutol P içeren) özellikte nanopartikül hazırlanmasıdır (Tablo 3.8.).

Tablo 3.7. Faktöriyel tasarım çalışmaları.

Yağ Fazı Miktarı		YAM Miktarı
Yüksek	%20	%4
Düşük	%10	%2

Tablo 3.8. Faktöriyel tasarım çalışmalarında hazırlanan NLT grupları.

Etken madde	Nötr	Penetrasyon Artırıcı İçeren	Stearilamin İçeren
Riboflavin	RBN	RBTP	RB+
Riboflavin-5 fosfat sodyum	RTN	RTTP	RT+

Hazırlanan 6 NLT grubundan partikül büyüklüğü ve PDI değeri açısından uygun bulunan formülasyonlar seçilerek in vitro salım, ARPE-19 ile hücre kültürü ve ex vivo çalışmalara alınmıştır.

Riboflavin veya Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Hazırlanan NLT formülasyonlarının şekilleri ve yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizinde nanopartiküller karbon grid üzerine tespit edilmiş ve Au-Pd kaplama ile kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiştir (195).

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümü

NLT'lerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri için Malvern Zeta Sizer Nano Series, Nano ZS aleti kullanılmıştır. Liyofilizasyondan önce ve sonra elde edilen nanopartiküller distile suda süspand edilindikten sonra ölçüm (n=3) yapılmıştır.

İlaç Yükleme Etkinliği

Formülasyonların ilaç yükleme etkinliği ("drug loading") çalışmaları için 10 mg liyofilize NLT formülasyonundan (n=3) 10 mg tartılmış ve 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerine 5 mL metanol eklenmiş ve 2'şer dakika vortekslenmiştir. Daha sonra elde edilen karışım 1 dk %10 güçte ultrasonikasyona tabi

tutulmuştur. Son karışım 1'e 10 oranında tampon ile seyreltilerek numunelerdeki etken madde miktarları HPLC ile tayin edilmiştir.

In Vitro Salım Çalışmaları

Riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonları için in vitro salım deneyleri (n=3) "Diyaliz Torbası Yöntemi" kullanılarak gerçekleştirilmiştir (191). Bunun için, 10 mg liyofilize formülasyon (n=3) tartılmış ve 1 mL pH 7,4 PBS'te disperse edilerek diyaliz membranına (MW 14000 cut off) yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu sistem 10 mL PBS 7,4 içeren 15 mL'lik santrifüj tüplerine alınmış ve 32±2 °C'de 50 rpm hızla çalışmakta olan yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. 0.5, 1, 2, 3, 6, 18 ve 24. saatlerde alınan salım örneklerinden HPLC analizi ile riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum tayin edilmiştir. Her bir örnek alım zamanında dış hacim tamamen alınarak yerine taze pH 7,4 PBS tamponu eklenmiştir.

NLT formülasyonlarından etken maddelerin *in vitro* salım profillerini karşılaştırmak için benzerlik faktörleri (f₂) hesaplanmıştır (192).

Formülasyonların Belirlenmesi ve Sterilizasyonu

Ön formülasyon çalışmaları sırasında elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak:

- FTIR, DSC ve XRD sonuçları ile ko-kristal oluşumu tespit edilmiş 1R1N ve 1R1M kodlu formülasyonlar
- BHJ, BHJ-TP, THJ ve THJ-TP kodlu hidrofilik jel formülasyonları
- %10 Yağ fazı ve %2 sürfaktan içeren RBN, RBTP, RB+, RTN, RTTP ve RT+ kodlu NLT formülasyonları

daha ileri çalışmalar (ex vivo permeasyon ve in vivo) için belirlenmiştir. Belirlenen formülasyonların kodları ve özellikleri Tablo 3.9.' da sunulmuştur.

Tablo 3.9. İleri çalışmalar için seçilen formülasyonlar.

Formülasyon Grubu	Kodu	Açıklama
Ko-Kristal	1R1N	1 birim mol riboflavin ve 1 birim mol nikotinamid'den oluşan ko-kristal
	1R1M	1 birim mol riboflavin ve 1 birim mol mannitol'den oluşan ko-kristal
Hidrofilik Jel	BHJ	Riboflavin içeren hidrofilik jel
	BHJ-TP	Riboflavin ve transcutol P içeren hidrofilik jel
	THJ	Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren hidrofilik jel
	THJ-TP	Riboflavin-5-fosfat sodyum ve transcutol P içeren hidrofilik jel
Nanolipid Yapılı Taşıyıcı	RBN	Riboflavin içeren nötr nanolipid yapılı taşıyıcı
	RBTP	Riboflavin ve transcutol P içeren nanolipid yapılı taşıyıcı
	RB+	Riboflavin ve stearylamin içeren nanolipid yapılı taşıyıcı
	RTN	Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren nanolipid yapılı taşıyıcı
	RTTP	Riboflavin-5-fosfat sodyum ve transcutol P içeren nanolipid yapılı taşıyıcı
	RT+	Riboflavin-5-fosfat sodyum ve stearylamin içeren nanolipid yapılı taşıyıcı

Yukarıda kodları belirtilen, seçilen formülasyonlardan farmasötik ko-kristal, hidrofilik jel ve NLT formülasyonlarının sterilizasyonu “filtrasyon” tekniği ile gerçekleştirilmiştir (196). Bunun için, aseptik ortamda laminar hava kabini içinde ko-kristal, hidrofilik jel (+4 C’de çözelti formunda) ve NLT formülasyonları, 0.22 µm lik steril filtrelerden süzülerek steril hale getirilmiştir.

Sterilizasyon kontrolü için formülasyonlar steril distile suda 24 saat inkübe edilmiş daha sonra 1 ml örnek alınarak sıvı tiyoglikolat ve triptik soy buyyon besiyerlerine ekilmiştir. 24 saat sonra tüplerdeki sıvılardan 1’er mL alınarak üreme kontrolü için *P.aeuroginosa* (ATCC 27853) standart kökeninden 100 CFU süspansiyonlar hazırlanarak aynı plaklara ekim yapılmıştır. Tüm plaklar 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda besiyerlerindeki üreme sonuçları incelenmiştir (197).

3.4. Sitotoksisite Çalışmaları

Tez kapsamında geliştirilen üç formülasyon grubu (farmasötik ko-kristal, termosensitif hidrofilik jel veya NLT) üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmaları 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) (MTT) testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu test in-vitro koşullarda hücrelerin canlılığına dayanan ve sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif, kolorimetrik bir testtir. Bu yöntem,

hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir (198). Bir tetrazolyum tuzu olan MTT sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller (formazan kristalleri) oluşmaktadır. Kristaller, DMSO veya HCl içeren saf izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu kristal, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir.

Tez çalışmalarında sitotoksosite çalışmaları ARPE-19 (insan retinal pigment epitel) (ATCC CRL-2302) hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ARPE-19 kültür ortamı hazırlanması amacıyla DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) üzerine %10 (h/h) oranında fetal sığır serumu ve penisilin-streptomisin karışımından 50 ünite/mL ilave edilmiştir. Daha sonra, ARPE-19 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve 24 saatlik hücre stabilizasyonunun ardından plaklardaki ortam uzaklaştırılmış ve belirli oranda seyreltilen formülasyonlar ilave edilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalara 1 mg/mL konsantrasyonda 25 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra %45 DMF ve %25 SDS içeren çözelti, 80 µL/kuyu olacak şekilde formazan kristallerini çözmek amacıyla kuyucuklara eklenmiştir (Şekil 3.3.). Kuyucukların absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA plak okuyucu ile okunarak hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Kontrol grubunun absorbans değeri %100 hücre canlılık oranı olarak kabul edilmiştir.

Literatürde riboflavinin hücre kültürü çalışmalarında hücre büyümesini artırdığı yönünde araştırmalara (199-201) rastlandığından taşıyıcı sistemin etkisinin net görülebilmesi için sitotoksosite çalışmaları sadece etken madde içermeyen formülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Farmasötik Ko-Kristal Formülasyonları Üzerinde Gerçekleştirilen Sitotoksisite Çalışmaları

Ko-kristal formülasyonları üzerinde sitotoksisite çalışmaları için FTIR, DSC ve XRD sonuçları göz önünde bulundurularak 1R1N ve 1R1M formülasyonlarının seçilmesine karar verilmiştir (Tablo 3.9.)

Etken madde içermeyen ko-kristal formülasyonlarının sitotoksisitesinin incelenmesinde nikotinamid'in DMSO'daki çözeltisi kullanılmıştır (202). Bunun için, 48,8 mg nikotinamid'in 5 mL DMSO'da çözülerek bu çözülden 65 µL alınmış ve 10 mL'ye hücre ortamı ile tamamlanmıştır. Bu çözelti ve bu çözeltinin belirli orandaki seyreltmeleri MTT testinde kullanılmıştır.

3.4.2. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Sitotoksisite Çalışmaları

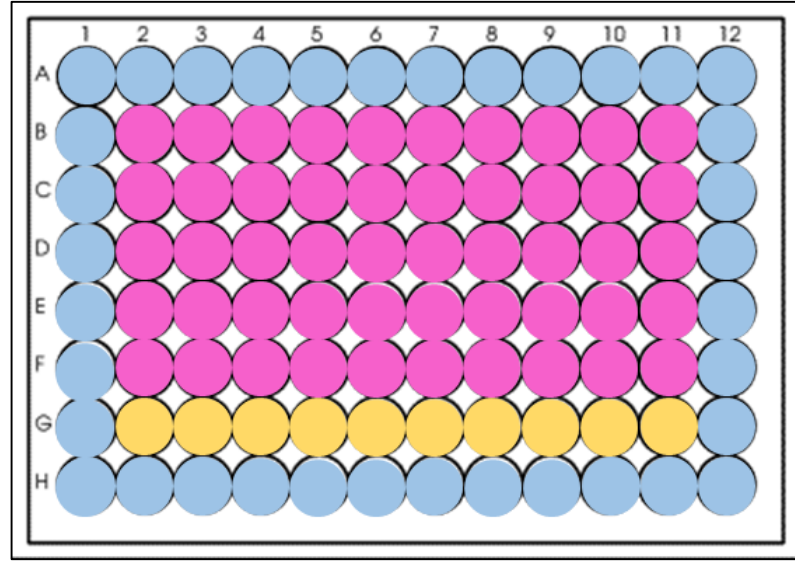
Etken madde içermeyen hidrofilik jel formülasyonlarının sitotoksisitesinin incelenmesinde (Tablo 3.9.), formülasyonlardan 1 mL alınıp 10 mL'ye hücre ortamı ile tamamlanmıştır. Bu çözelti ve bu çözeltinin belirli orandaki seyreltmeleri MTT testinde kullanılmıştır (202).

3.4.3. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcı Formülasyonları Üzerinde Gerçekleştirilen Sitotoksisite Çalışmaları

Etken madde içermeyen NLT formülasyonlarının sitotoksisitesinin incelenmesinde liyofilize formülasyon 100 mg olarak tartılmış ve 2 mL distile suda dağıtılmıştır. Bu karışımdan 1 mL alınıp 10 mL'ye hücre ortamı ile tamamlanmıştır (202). Bu karışım ve bu karışımın belirli orandaki seyreltmeleri MTT testinde kullanılmıştır.

3.4.4. Su Kontrol Grubu Sitotoksisite Çalışmaları

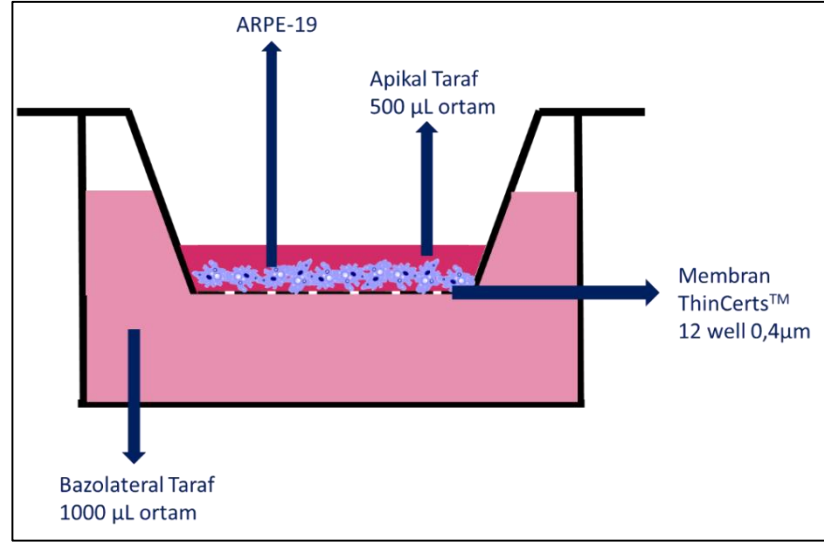
Bu çalışma formülasyonlarda bulunabilecek (özellikle hidrofilik jel grubunda) suyun hücreler üzerinde toksik etki oluşturup oluşturmayacağını tespit etmek için yapılmıştır (202). Bu test için 1 mL steril su 10 mL'ye hücre ortamı ile tamamlanmıştır. Bu çözelti ve bu çözeltinin belirli orandaki seyreltmeleri MTT testinde kullanılmıştır.



Şekil 3.3. MTT testinde kullanılan 96 kuyucuklu plakanın şematik gösterimi. (pembe: formülasyon uygulanan, sarı: kontrol grubu uygulanan, mavi: PBS 7,4 uygulanan kuyucuklar).

3.5. İn Vitro Permeasyon Çalışmaları

İn vitro permeasyon çalışmaları ARPE-19 (insan retinal pigment epitel) (ATCC CRL-2302) hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (203). ARPE-19 kültür ortamı hazırlanması amacıyla DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) üzerine %10 (h/h) fetal sığır serumu ve penisilin-streptomisin karışımından 50 ünite/mL ilave edilmiştir. Hücreler 15×10^4 / kuyu olmak üzere 12 kuyucuklu plakaya (113.1 mm^2 yüzey alanı) ekilmiş ve 37°C , %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. İnsertlerdeki kültür ortamı her iki günde bir değiştirilmiştir. Hücrelerin ekiminden 15-21 gün sonra hücre tek tabakası doygunluğa ulaştığında tabakanın bütünlüğü Millicell® ERS yardımıyla transepitelyal direnç (TEER) ölçülerek test edilmiş ve direnç $200\text{-}250 \Omega\text{cm}^2$ olduğunda geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. İn vitro permeasyon çalışmalarının şematik gösterimi.

Permeasyon çalışmaları için formülasyonların PBS' de çözülmüş/dağıtılmış şekillerinden (n=3) 0,5 mL alınarak hücre tek tabakasının apikal yüzeyine, 1 mL PBS ise hücre tek tabakasının bazolateral yüzeyine eklenmiştir (Şekil 3.4.). Daha sonra kuyucuklar 30 rpm'de çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında bazolateral taraftan örnek alınarak etken madde miktarları HPLC'de analiz edilmiştir. Etken maddeler için görünür permeabilite sabiti (Papp, cm/s) hesaplanmıştır (204).

3.6. Ex Vivo İlaç Geçiş Çalışmaları

Ex vivo çalışmalarda 2-3,5 kg ağırlığında erkek veya dişi, albino, Yeni Zelanda tavşanları kullanılmıştır. Deneyler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinde uzman göz hekimi gözetiminde etik kurul kararına göre yürütülmüştür (Etik kurul onayı Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanlarından alınmıştır (No: 2015/69 - 01)).

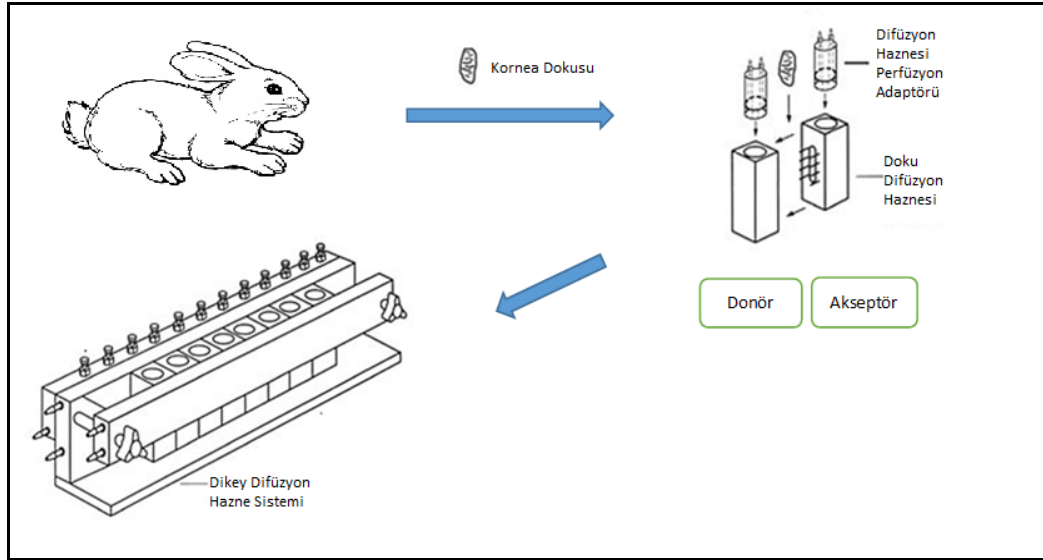
Riboflavin'in *ex vivo* şartlarda korneadan geçiş ve tutulumunun incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada, formülasyonlar ticari preparatlarla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tüm geçiş çalışmaları n=3 olarak gerçekleştirilmiştir. *Ex vivo* geçiş çalışmalarına *in vitro* karakterizasyon bulgularının değerlendirilmesi sonucunda

seçilen formülasyonlar ve 2 adet piyasa preparatı (MedioCrROSS D ve MedioCROSS TE) da dahil olmak üzere toplam 14 formülasyon denenmiştir.

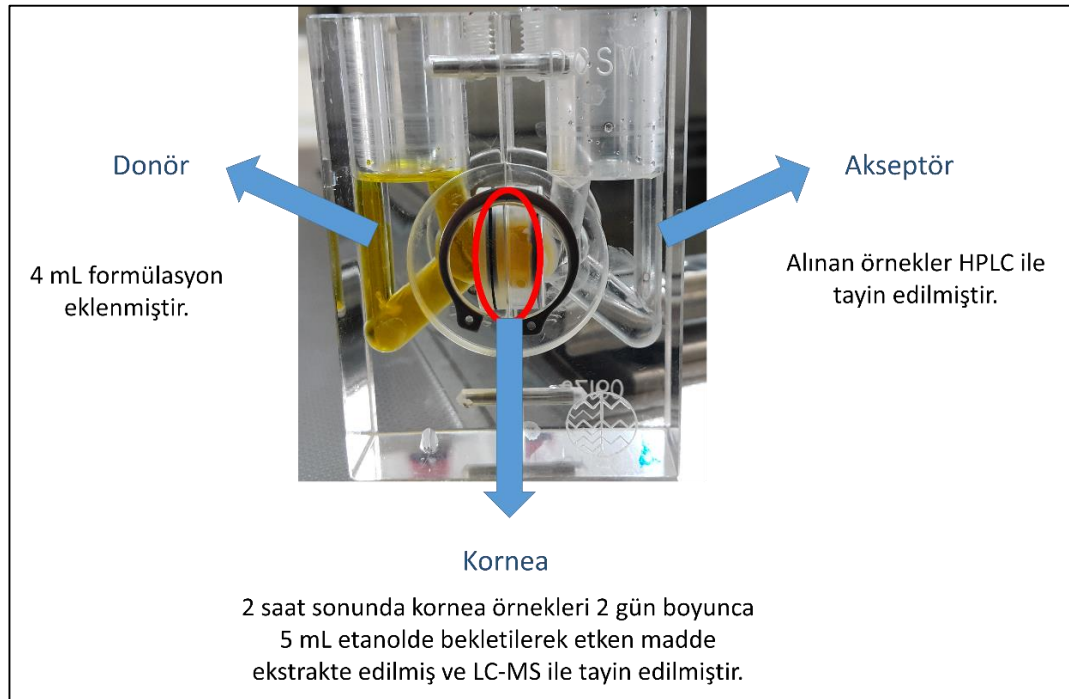
MedioCrROSS D' nin formülasyonu, %0,1 (a/a) riboflavine eşdeğer riboflavin-5-fosfat sodyum'un ve %20 (a/a) dekstranın sudaki çözeltisinden oluşmaktadır.

MedioCROSS TE'nin formülasyonu ise %0,25 (a/a) riboflavine eşdeğer riboflavin-5-fosfat sodyum'un, %1,2 (a/a) hidroksipropil metil süllülozun ve %0,01 (a/a) benzalkonyum klorürün sudaki çözeltisinden oluşmaktadır.

Çalışmada kullanılacak kornea, taze tavşan gözlerinden izole edilmiş ve geçiş çalışmaları için doku transport sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.5.). Doku transport hücrelerini donör ve akseptör taraflarına, kornea dış yüzeyi donör tarafa bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Hücrenin donör tarafında formülasyon çözeltileri yerleştirilirken akseptör tarafında PBS pH 7,4 tamponu eklenmiştir (Şekil 3.6.). Transport düzeneğinin sıcaklığı deney süresince 32°C'de sabit tutulmuştur. İki saat süresince belirli zaman aralıklarında akseptör hücreden örnek alınarak (15. dk., 30. dk., 1. saat, 2. saat) örneklerdeki riboflavin ve riboflavin-5-fosfat miktarları LC-MS yöntemi ile tespit edilmiştir. Etken maddeler için görünür permeabilite sabiti (Papp, cm/s) hesaplanmıştır (204). Ayrıca deney sonunda kornealar 5 mL etanolde 3 gün bekletilerek ekstrakte edilen riboflavin ve riboflavin-5-fosfat miktarları LC-MS yöntemi ile tespit edilmiştir (205).



Şekil 3.5. *Ex vivo* geçiş çalışmaları için kullanılan transport sisteminin şematik görünümü.



Şekil 3.6. *Ex vivo* kornea çalışma düzeneğinin fotoğrafı.

3.7. İn vivo Çalışmalar

3.7.1. Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İn-vivo Doku Dağılımı

Çok fazla tavşan kaybını önlemek üzere, deney modelini yansıtabilecek daha küçük bir deney hayvanı olduğu için in vivo doku dağılımı çalışmaları 250-300 g ağırlığında erkek Sprague Dawley sıçanlar üzerinde yürütülmüştür. Deneyler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinde uzman göz hekimi gözetiminde etik kurul protokoluna uygun olarak yürütülmüştür (Onay Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alınmıştır (No: 2015/69 -01)).

İn vivo çalışmalara in vitro karakterizasyon bulgularının değerlendirilmesi sonucunda seçilen formülasyonlar ve 2 adet ticari preparat (MedioCrROSS D ve MedioCROSS TE) da dahil olmak üzere toplam 14 formülasyon dahil edilmiştir. Bu çalışmalarda, sıçan gözlerine topikal olarak formülasyonların uygulanmasından 30 dk. sonra korneada bulunan etken madde miktarları incelenmiştir. Formülasyonların uygulanmasından 30 dakika sonra hayvanlara 300 mg/kg Ketamin ve 30 mg/kg Ksilazin ile ötenazi uygulanmış, her iki göz çıkarılarak 2 mL etanol içerisine alınmış ve 3 gün boyunca buzdolabında inkübe edilmiştir. Daha sonra bu numunelerdeki etken madde miktarları LC-MS kullanılarak tayin edilmiştir.

3.7.2. Korneanın İn Vivo Biyomekanik Cevabının Değerlendirilmesi

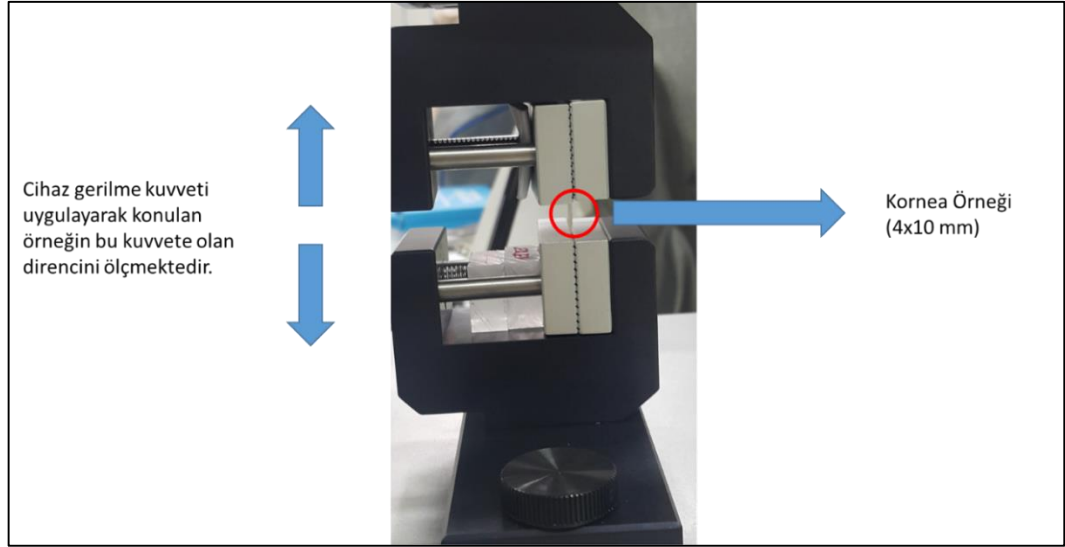
Formülasyon uygulanması sonrası korneanın biyomekanik cevabının (Korneal "stiffness" (sertlik-sağlamlık) incelemesi) değerlendirilmesi çalışmalarında 2-3,5 kg ağırlığında erkek veya dişi, albino, Yeni Zelanda tavşanları kullanılmıştır. Deneyler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinde uzman göz hekimi gözetiminde etik kurul kararına göre yürütülmüştür (Etik kurul onayı Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanlarından alınmıştır (No: 2015/69 - 01)).

Bu çalışmalarda 12 adet seçilen formülasyon ve 2 adet piyasa preparatı (MedioCrROSS D ve MedioCROSS TE) olmak üzere toplam 14 formülasyon denenmiştir (Tablo 3.9.) (n=3). Deney öncesi tavşanlara ketamin hidroklorür (30 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) intamusküler uygulanarak genel anestezi sağlanmıştır.

Seçilen formülasyonların her 2 dk'da 1 damla olarak göze topikal uygulanmasından sonra (hidrofilik jeller her 15 dk'da bir olacak şekilde uygulanmıştır) 30 dk. boyunca CCL Vario cihazı kullanılarak tavşan gözlerine UVA ışığı (370 nm , 3 mW/cm^2) uygulanmıştır (Şekil 3.7.). Bu uygulamadan 3 hafta sonra tavşanlar aşırı dozda (2mL) T61 ve ketamin injeksiyonu ile sakrifiye edilerek gözleri çıkarılmış ve korneaları dik şekilde (superior-inferior) kesilerek 4mm genişliğinde 10 mm uzunluğunda korneal şeritler elde edilmiştir. Bu şeritler TA-XT Plus Texture Analyzer'a yerleştirilerek biyomekanik ölçümleri yapılmış ve formülasyonların korneal çapraz bağlanması üzerindeki etkileri biyomekanik ölçüm ile incelenmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.7. Tavşan gözlerine UV ışığı uygulanması (korneal çapraz bağlama işlemi) için kullanılan CCL Vario cihazının parametrelerini gösteren fotoğraf.



Şekil 3.8. Kornea numunelerinin Texture Analyzer cihazı ile incelenmesini gösteren fotoğraf.

3.8. Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlar üzerinde fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için:

Hidrofilik jel formülasyonlarının;

- 25°C'de %40 bağıl nemde ve
- 4°C'de (buzdolabında) 30 gün saklanması sonrasında viskoziteleri değerlendirilmiştir.

NLT formülasyonlarının;

- 25°C'de %40 bağıl nemde,
- 4°C'de ve
- 20°C'de 30 gün saklanması sonrasında partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüş ve SEM görüntüleri elde edilmiştir.

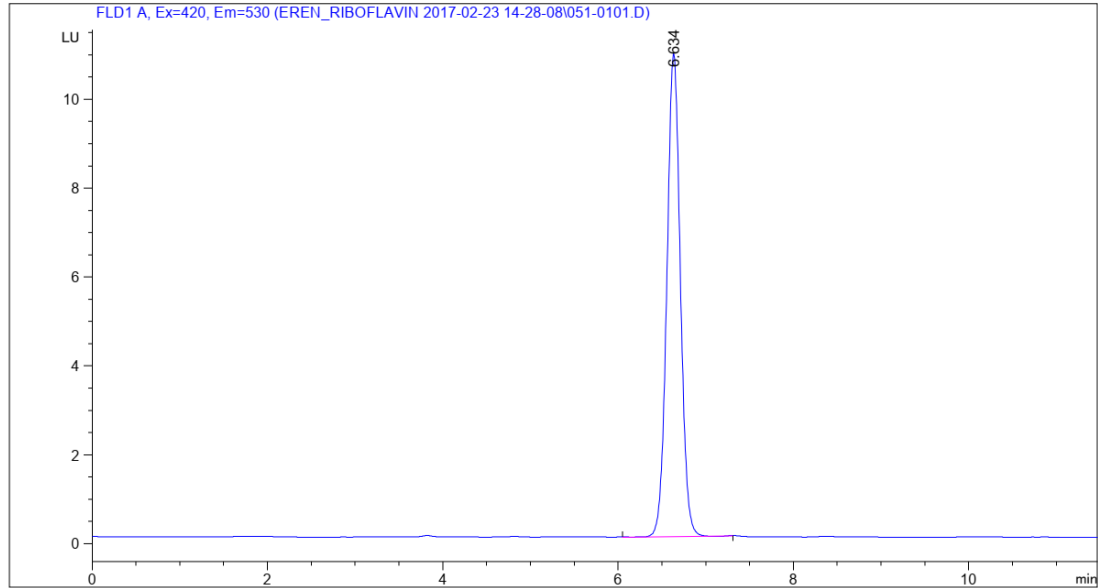
4. BULGULAR

4.1. Analitik Yöntem Validasyonları

4.1.1. Riboflavin'in Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Bölüm 3.2' de belirtildiği gibi asetat tamponu (sodyum asetat/CaCl₂/EDTA): Metanol (65:35) mobil fazı kullanılarak ve Eksitasyon:420 nm/ Emisyon: 530 nm dalga boylarında gerçekleştirilen HPLC miktar tayinine ilişkin kromatogram şekil 4.1.'de verilmiş olup yöntemin validasyonuna ilişkin bulgular aşağıda verilmiştir:

Acq. Operator : EREN
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date : 2/23/2017 2:29:58 PM
Seq. Line : 1
Location : Vial 51
Inj : 1
Inj Volume : 20.000 µl
Acq. Method : C:\CHEM32\1\DATA\EREN_RIBOFLAVIN 2017-02-23 14-28-08\EREN_RIBOFLAVIN.M
Last changed : 2/23/2017 2:01:16 PM by EREN
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\EREN_RIBOFLAVIN.M
Last changed : 2/23/2017 2:01:16 PM by EREN
Additional Info : Peak(s) manually integrated

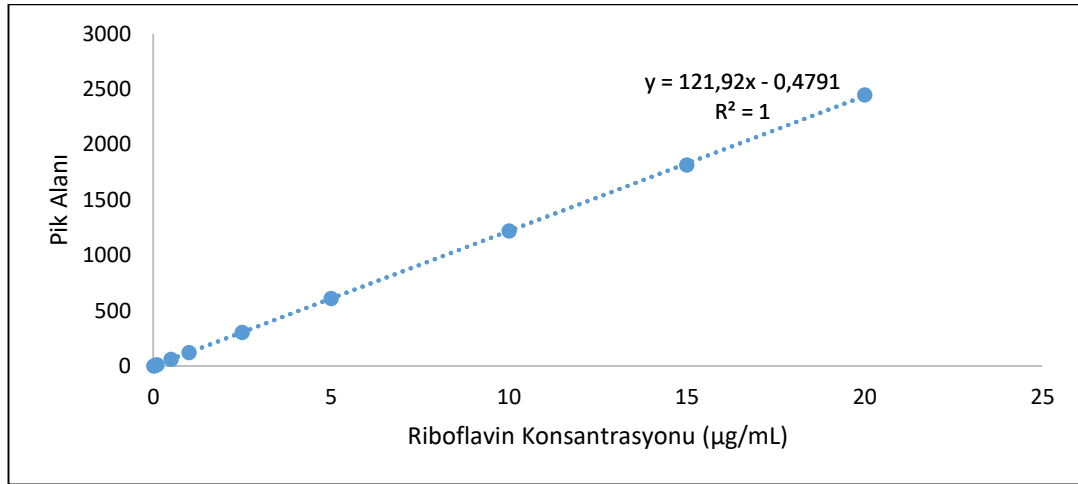


Şekil 4.1. Riboflavin'in HPLC kromatogramı.

Doğrusallık

Riboflavin doğrusallık çalışmaları 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda etken maddenin verdiği piklerin eğri altında kalan alanlarının belirlenmesi ile hazırlanmıştır. ICH kılavuzlarına uygun olarak hedef konsantrasyon

olan 10 µg/mL'nin %200 ve 25 değerlerini kapsayacak şekilde ve en az 6 nokta alınarak konsantrasyonlar belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemini Şekil 4.2.'de yer almaktadır.



Şekil 4.2. Riboflavin'in doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği (n=6).

Yapılan hesaplamalar sonucu tanımlayıcılık katsayısı olan R² değeri 1 olarak bulunmuş ve denklemin doğrusallığı gösterilmiştir. R²'nin 1'e yakın olması, deneysel verilerin güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Doğruluk ve Geri Kazanım

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, kalibrasyon sınırları içerisinde bulunan, düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda (0,1 µg/mL, 2,5 µg/mL ve 20 µg/mL) 3 seri çözelti hazırlanarak HPLC analizi yapılmıştır. Ölçümle bulunan konsantrasyonlardan riboflavinin geri kazanımları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunarak yöntemin doğruluğu gösterilmiştir (180).

Tablo 4.1. Riboflavin'in analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları (n=3).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
0,1	0,1018	101,8	1,63
2,5	2,502	100,08	0,87
20	20,082	100,41	0,46

Kesinlik

Riboflavin'in 0,1 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 3 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen pik alanı değerlerinin ortalamasının kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve varyasyon katsayısı değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.'de özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunarak yöntemin kesinliği gösterilmiştir (180).

Tablo 4.2. Riboflavin'in analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik sonuçları (n=3).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
0,1	0,1017	1,37
2,5	2,505	0,72
20	20,058	0,36

Günler Arası Tekrar Edilebilirlik

Riboflavin'in 0,1 µg/mL, 2,5 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 3 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen piklerin eğri altında kalan alan değerlerinin ortalamasının kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3.'te özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunarak yöntemin tekrar edilebilirliği gösterilmiştir (180).

Tablo 4.3. Riboflavin'in analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=3).

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Varyasyon Katsayısı (%)
0,1	0,1019	1,37
2,5	2,497	0,69
20	19,965	0,58

Özgüllük

Hazırlanan formülasyonlarda kullanılan Compritol ATO, Pluronic F-127 gibi maddelerin Eksitasyon: 420 nm / Emisyon: 530 nm dalga boylarında riboflavinin oluşturduğu pik alanlarında girişim yapmadığı yöntemin özgül olduğu belirlenmiştir.

Duyarlılık (LOD ve LOQ)

Yapılan çalışmalar sonucunda 0,01 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda sinyal/gürültü oranı 46,6 olarak bulunmuştur. Saptama sınırı (LOD) için sinyal/gürültü oranı en az 3 olmalıdır. Çalışmada saptama sınırı 0,0006 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Miktar tayini sınırı (LOQ) için sinyal/gürültü oranı en az 10 olmalıdır. Çalışmada miktar tayini sınırı 0,002 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Stabilite

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan riboflavin çözeltisinin stabilite bulguları Tablo 4.4'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar riboflavinin deney süresince stabil kaldığını göstermektedir.

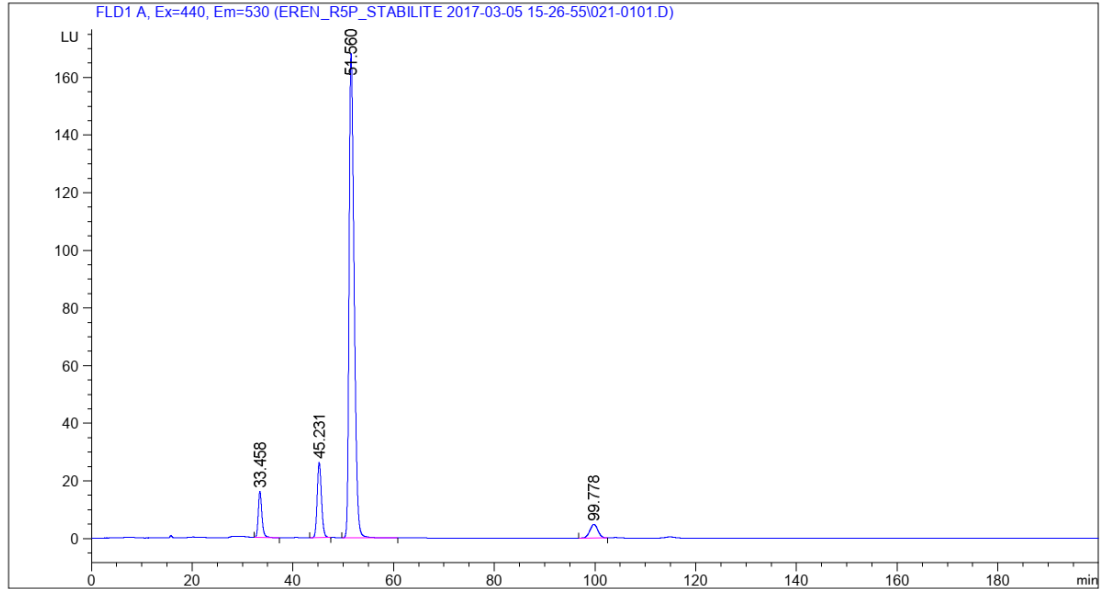
Tablo 4.4. Riboflavin'in stabilitesine ilişkin bulgular (n=3).

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Zaman (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
2,5	0	2,502	100,08
2,5	24	2,491	99,64
2,5	48	2,479	99,16

4.1.2. Riboflavin-5-Fosfat Sodyum için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Bölüm 3.2' de verildiği gibi Fosfat tamponu (Monobazik potasyum fosfat) :Metanol (77,5:22,5) mobil fazı kullanılarak ve Eksitasyon:440 nm/ Emisyon: 530 nm dalga boylarında geliştirilen HPLC miktar tayinine ilişkin kromatogram şekil 4.3.'te verilmiş olup yöntemin validasyonuna ilişkin bulgular aşağıda verilmiştir:

Acq. Operator : EREN Seq. Line : 1
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 21
 Injection Date : 3/5/2017 3:28:19 PM Inj : 1
 Inj Volume : 50.000 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\DATA\EREN_R5P_STABILITE 2017-03-05 15-26-55\EREN_YENI.M
 Last changed : 3/4/2017 1:12:39 PM by EREN
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\EREN_YENI.M
 Last changed : 3/16/2017 6:27:10 PM by EREN

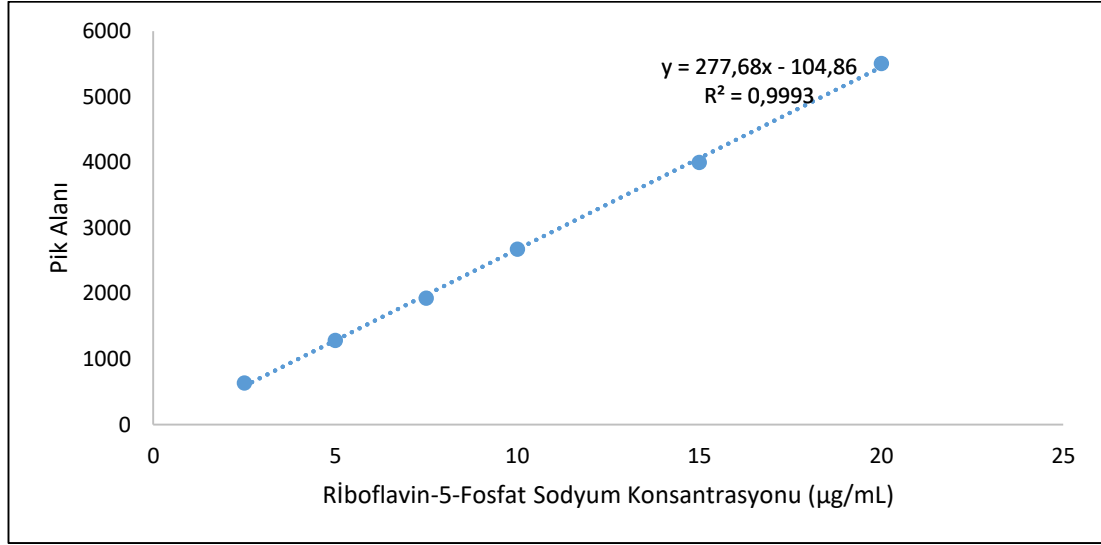


Şekil 4.3. Riboflavin-5-fosfat sodyum'un kromatogramı.

Doğrusallık

Riboflavin-5-fosfat sodyum doğrusallık çalışmaları 2,5, 5, 7,5, 10, 15 ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda etken maddenin verdiği piklerin eğri altında kalan alanlarının belirlenmesi ile hazırlanmıştır. ICH kılavuzlarına uygun olarak hedef konsantrasyon olan 10 µg/mL'nin %200 ve 25 değerlerini kapsayacak şekilde ve 6

nokta alınarak belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi şekil 4.4.'te yer almaktadır.



Şekil 4.4. Riboflavin-5-fosfat sodyumun doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği (n=6).

Yapılan hesaplamalar sonucu tanımlayıcılık katsayısı olan R² değeri 0,9993 olarak bulunmuş ve denklemin doğrusallığı gösterilmiştir. R²'nin 1'e yakın olması, deneysel verilerin güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Doğruluk ve Geri Kazanım

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, kalibrasyon sınırları içerisinde bulunan, düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda (5 µg/mL, 10 µg/mL ve 15 µg/mL) 3 seri çözelti hazırlanarak HPLC analizi yapılmıştır. Ölçümle bulunan konsantrasyonlardan riboflavin-5-fosfat sodyum'un geri kazanımları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5.'te özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunarak yöntemin doğruluğu gösterilmiştir (180).

Tablo 4.5. Riboflavin-5-fosfat sodyumun analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları (n=3).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
5	5,002	100,04	0,86
10	10,016	100,16	0,39
15	14,777	98,51	0,56

Kesinlik

Riboflavin-5-fosfat sodyumun 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 15 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 3 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin ortalamasının kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve varyasyon katsayısı değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6.'da özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunarak yöntemin kesinliği gösterilmiştir (180).

Tablo 4.6. Riboflavin-5-fosfat sodyumun analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik sonuçları (n=3).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
5	5,018	0,38
10	10,043	0,21
15	14,787	0,18

Günler Arası Tekrar Edilebilirlik

Riboflavin-5-fosfat sodyumun 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 15 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin 3 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin ortalamasının kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.7.'de özetlenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunmuştur.

Tablo 4.7. Riboflavin-5-fosfat sodyumun analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=3).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
5	5,026	0,54
10	9,979	0,68
15	15,005	0,63

Özgüllük

Hazırlanan formülasyonlarda kullanılan Compritol ATO, Pluronic F-127 gibi maddelerin Eksitasyon: 440 nm / Emisyon: 530 nm dalga boylarında riboflavin-5-fosfat sodyumun oluşturduğu pik alanlarında girişim yapmadığı belirlenmiştir.

Duyarlılık (LOD ve LOQ)

Yapılan çalışmalar sonucunda 2,5 µg/mL konsantrasyonda sinyal/gürültü oranı 3281,4 olarak bulunmuştur. Saptama sınırı (LOD) için sinyal/gürültü oranı en az 3 olmalıdır. Çalışmada saptama sınırı 0,002 µg/mL olarak bulunmuştur. Miktar tayini sınırı(LOQ) için sinyal/gürültü oranı en az 10 olmalıdır. Çalışmada miktar tayini limiti 0,007 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan riboflavin-5-fosfat sodyum çözeltisinin stabilite bulguları Tablo 4.8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar riboflavinin deney süresince stabil kaldığını göstermektedir.

Tablo 4.8. Riboflavin-5-fosfat sodyum'un stabilitesine ilişkin bulgular (n=3)

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
10	0	10,016	100,16
10	24	10,001	100,01
10	48	9,993	99,93

4.2. Ko-Kristal Formülasyonları

4.2.1. Ön Denemeler için Çözünürlük Çalışmaları

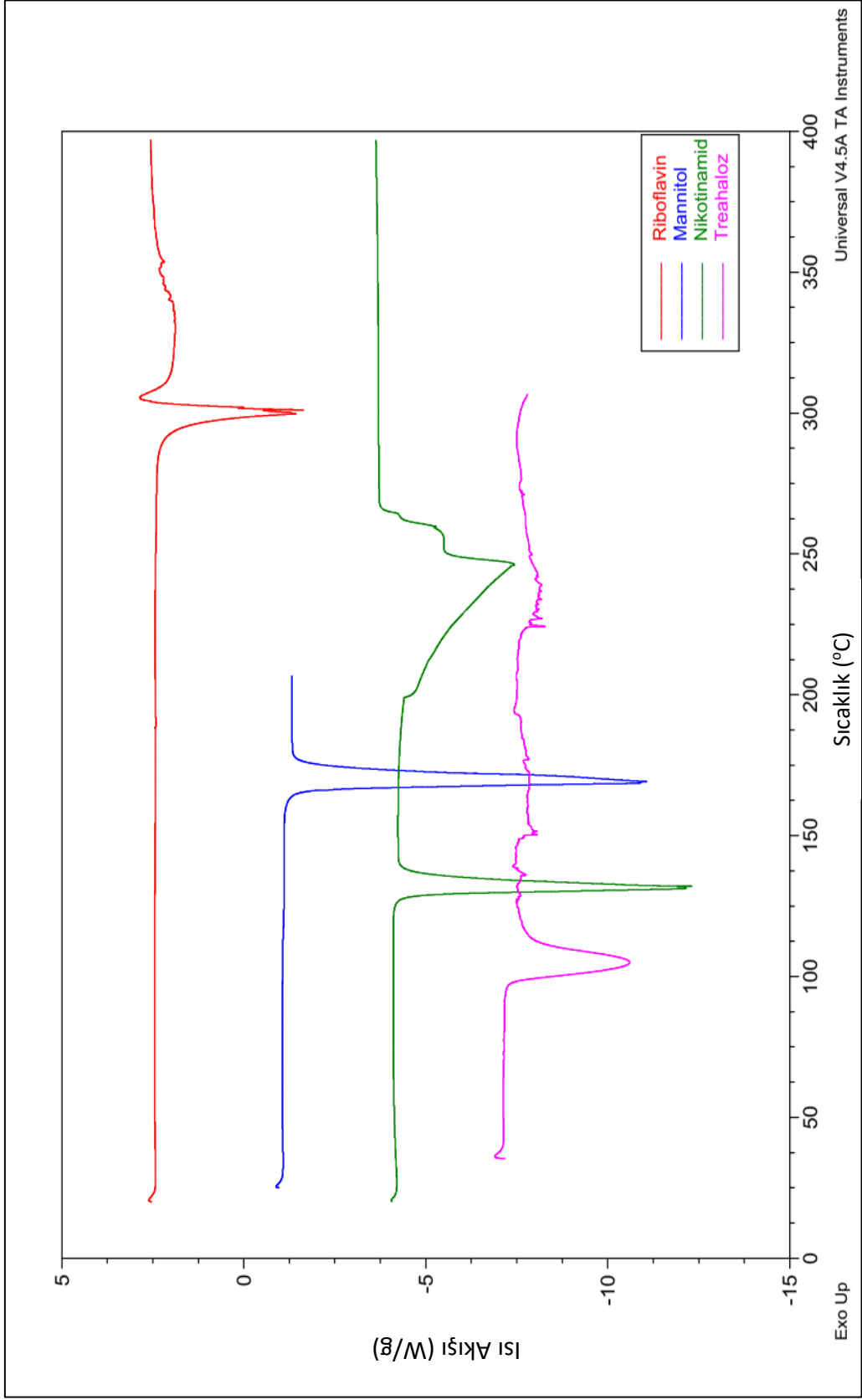
Riboflavinin hem suda hem de organik çözücülerdeki çözünürlüğü oldukça düşük olduğundan ve ko-kristal formülasyonlarını hazırlamada kullanılacak çözücülerdeki çözünürlük bilgilerine literatürde rastlanmadığından, hazırlanan çözücü karışımlarındaki kontrolü ön denemeler için görsel olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, 40 mg riboflavinin 20 mL çözücü/çözücü karışımındaki çözünürlüğü değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya ait bulgular Tablo 4.9.'da sunulmuştur.

Tablo 4.9. Ön denemelerde 40 mg/20 mL konsantrasyondaki riboflavinin çözücü/çözücü karışımındaki çözünürlüğünün görsel değerlendirilmesi bulguları.

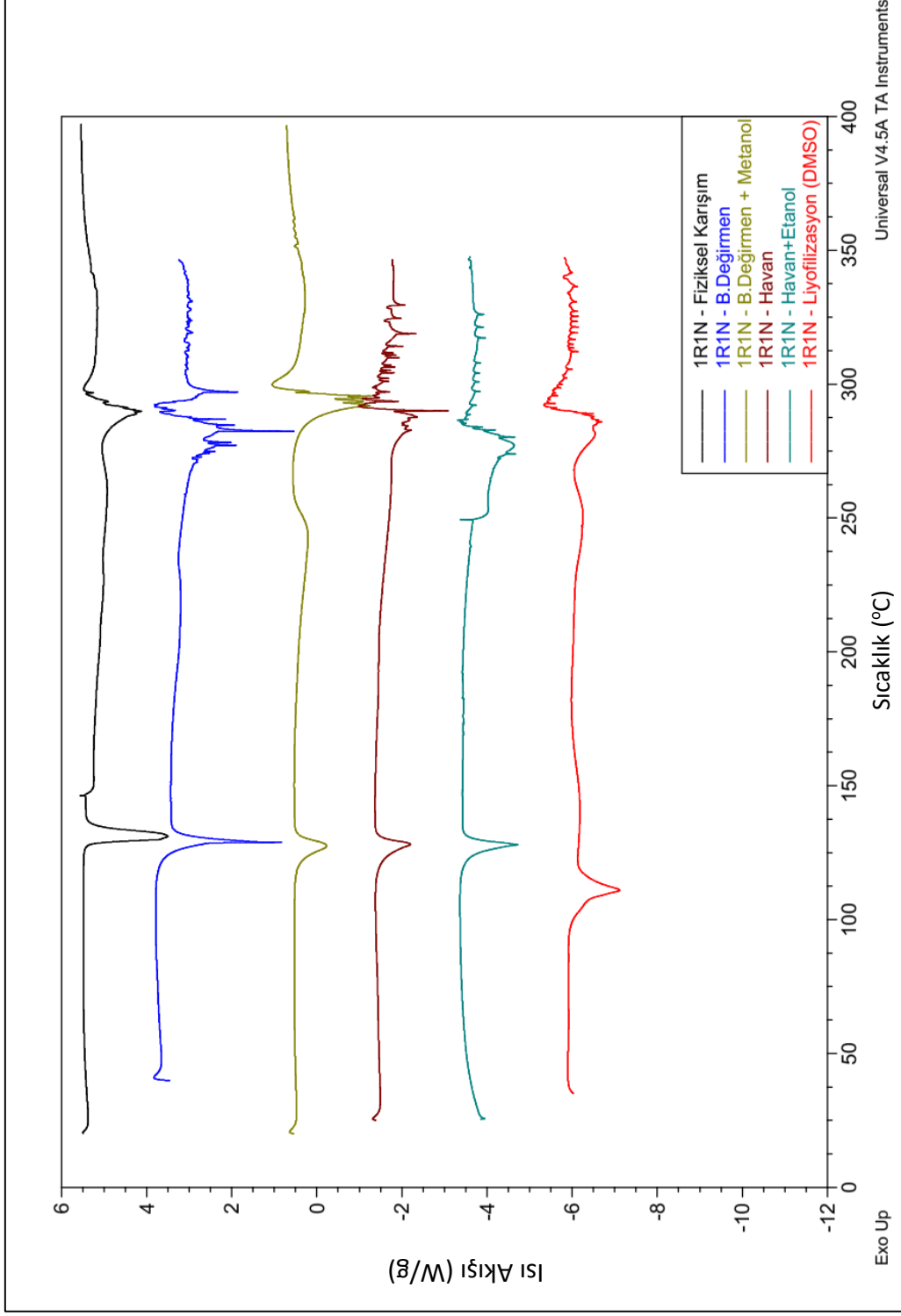
Çözücü/Çözücü Karışımı	Riboflavin'in Çözünürlüğü
%100 Su	Çözünmedi
%100 Su (0,1 N NaOH)	Çözündü
%100 Asetonitril	Çözünmedi
%100 Etanol	Çözünmedi
%100 Metanol	Çözünmedi
%100 Etil Asetat	Çözünmedi
%100 N-N Dimetil Formamid	Çözünmedi
%100 Diklorometan	Çözünmedi
%100 2-Propanol	Çözünmedi
%95 Su / %5 Metanol	Çözünmedi
%95 Su / %5 Asetonitril	Çözünmedi
%100 Dimetilsülfoksit	Çözündü

4.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC) Sonuçları

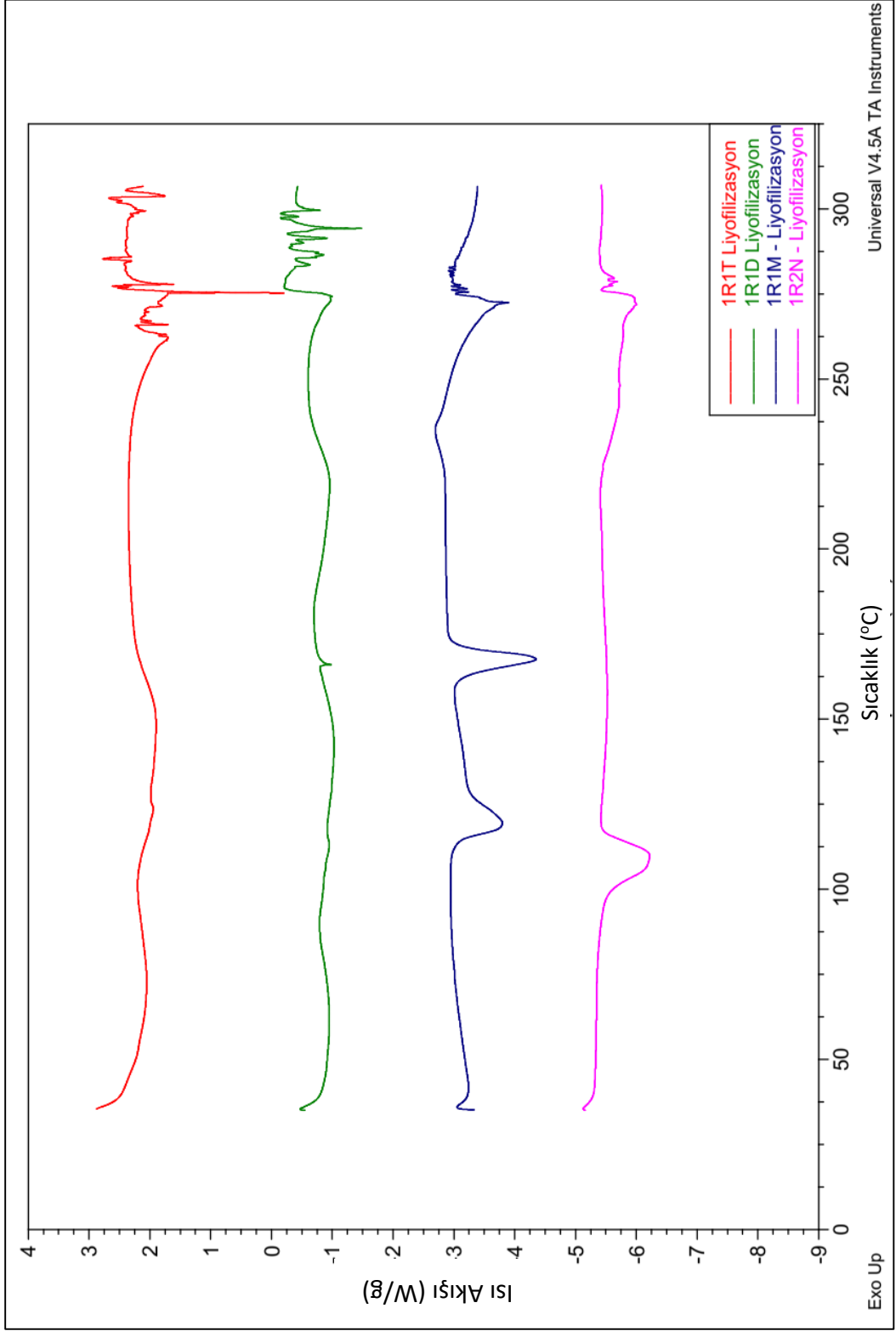
Ko-Kristal oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla örneklerin DSC sonuçları incelenmiştir (Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.).



Şekil 4.5. Saf maddelerin DSC termogramı.



Şekil 4.6. 1R1N grubu formülasyonların DSC termogramı.

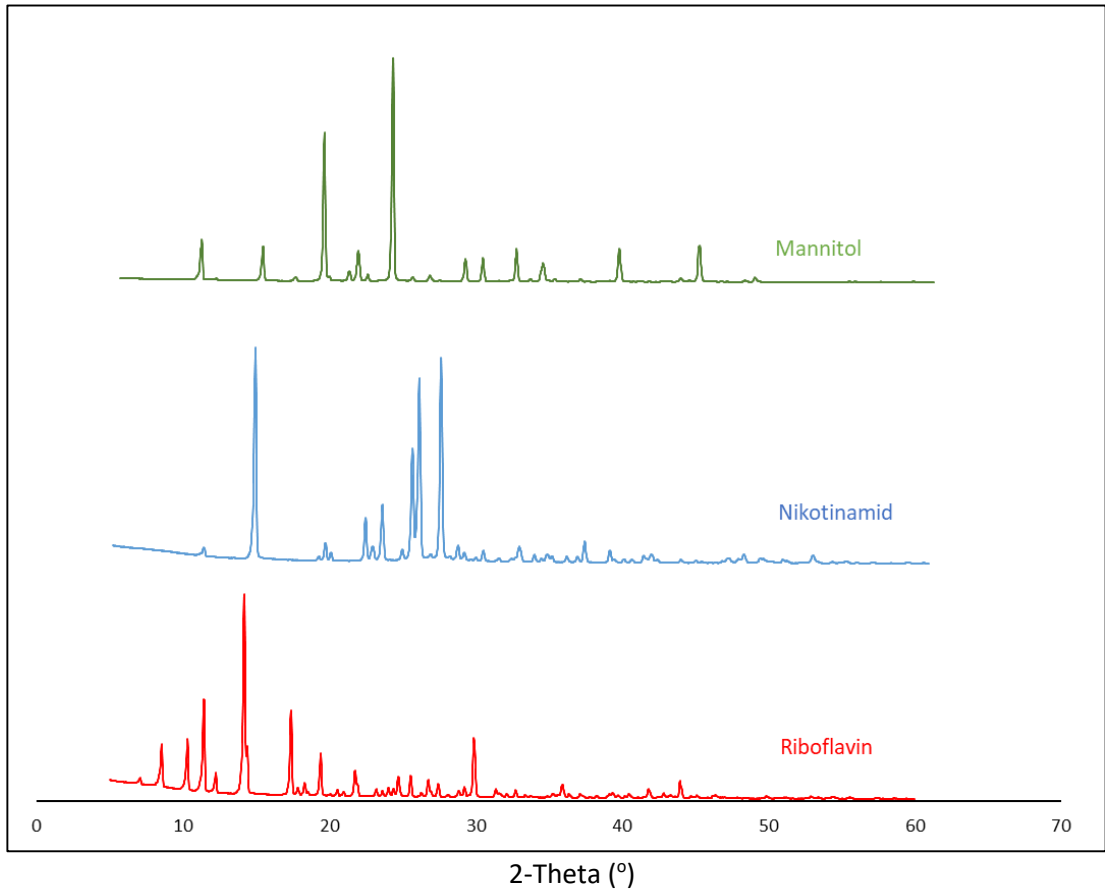


Şekil 4.7. 1R1T, 1R1D, 1R1M ve 1R2N grubu formülasyonların DSC termogramı.

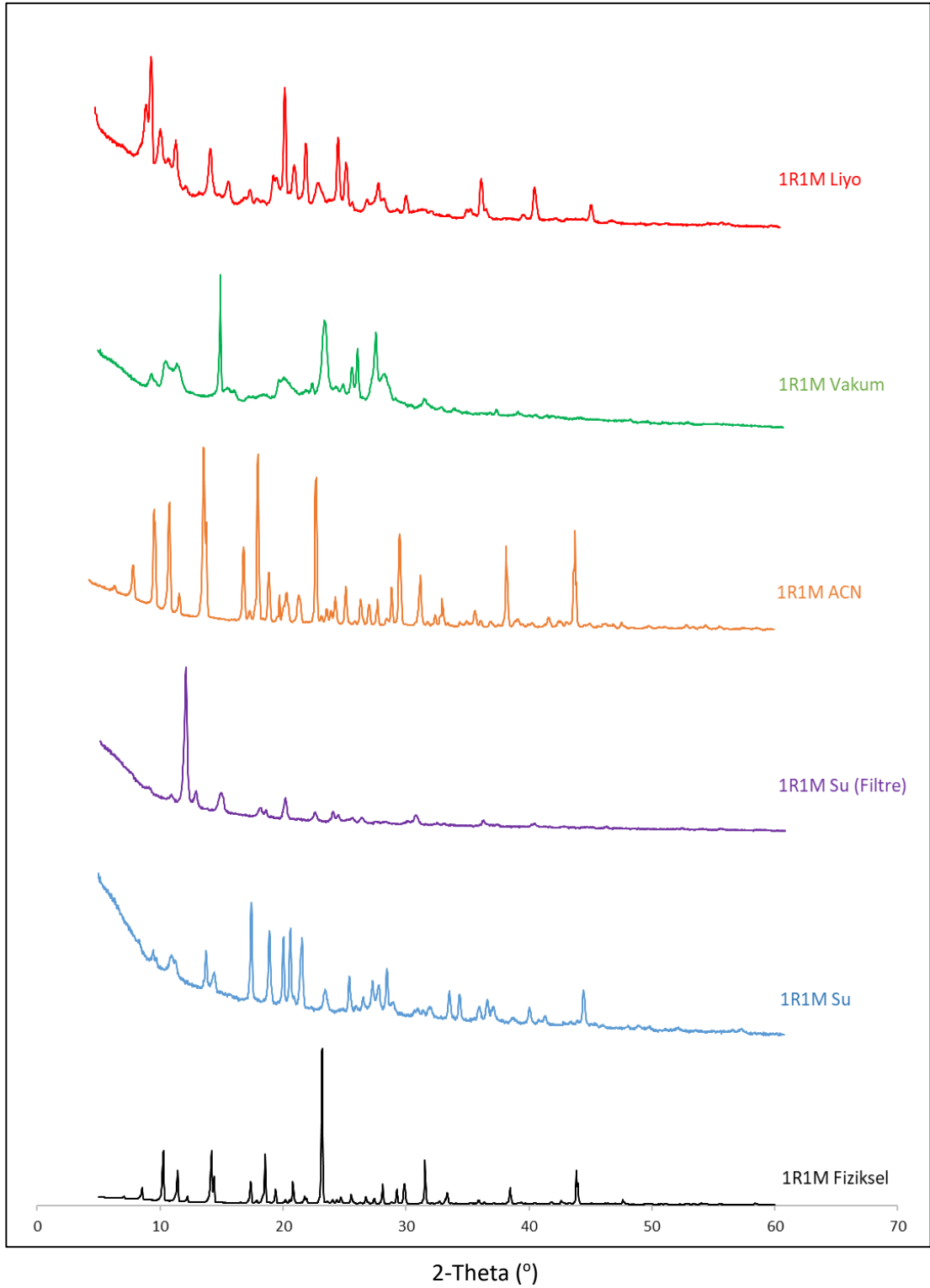
Elde edilen DSC termogramları incelendiğinde, mekanik karıştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlarda ko-kristal oluşumunun meydana gelmediği ve çözelti yardımı ile birlikte uçurma yöntemi ile elde edilen formülasyonlar üzerinde yoğunlaşılması gerektiği düşünülmüştür. Bu durumun yanı sıra trehaloz ve dekstroz ile yapılan denemelerde de yeni bir pikin oluşmadığı ve/veya mevcut piklerin kaybolmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında XRD çalışmalarında ko-kristal maddesi olarak nikotinamid ve mannitolün kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.3 X Işını Kristalografisi (XRD) Sonuçları

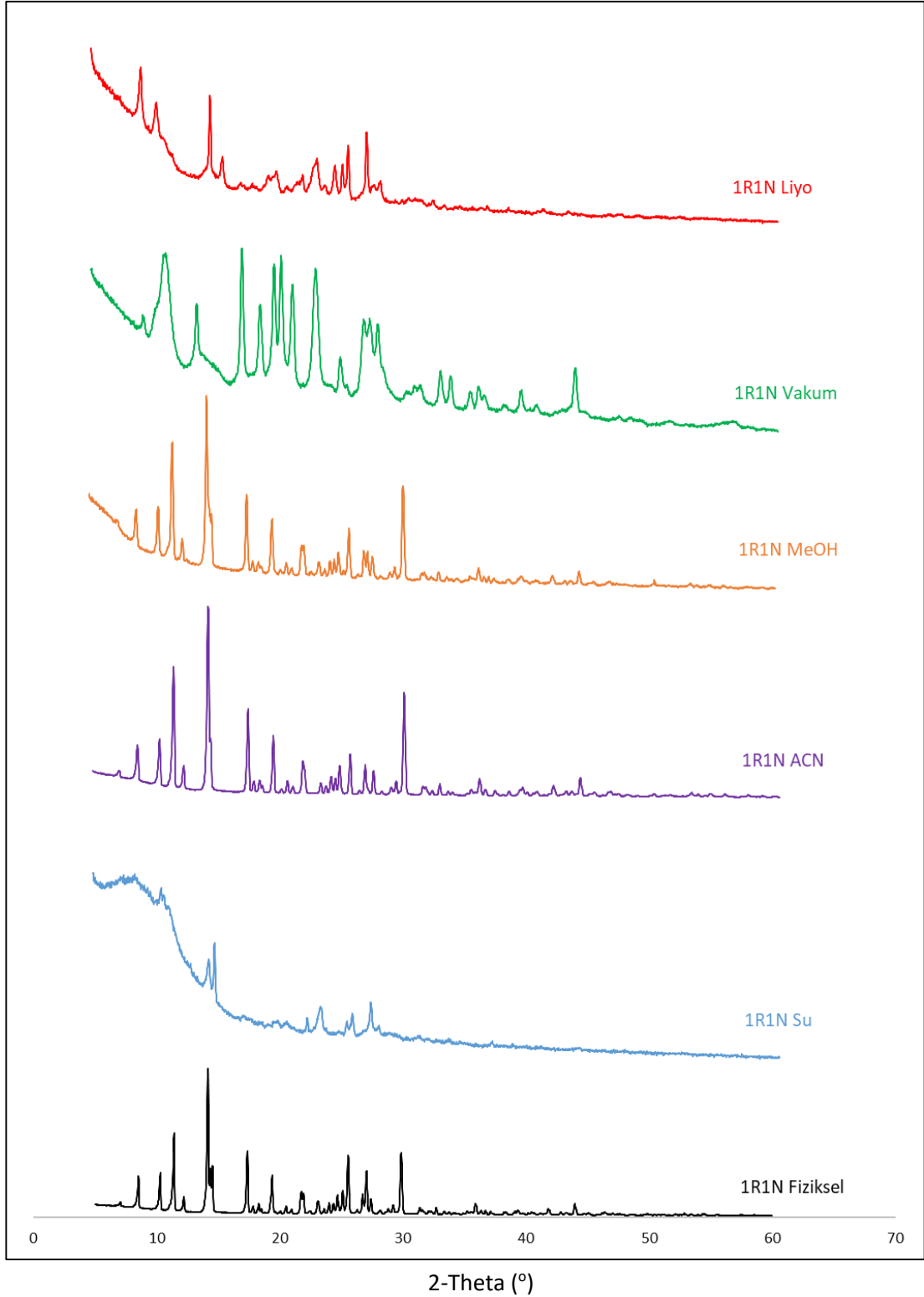
Ko-Kristal oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla örneklerin XRD sonuçları incelenmiştir. Örneklerin 2 Theta derecesine karşılık yoğunluk grafikleri incelenmiştir (Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.).



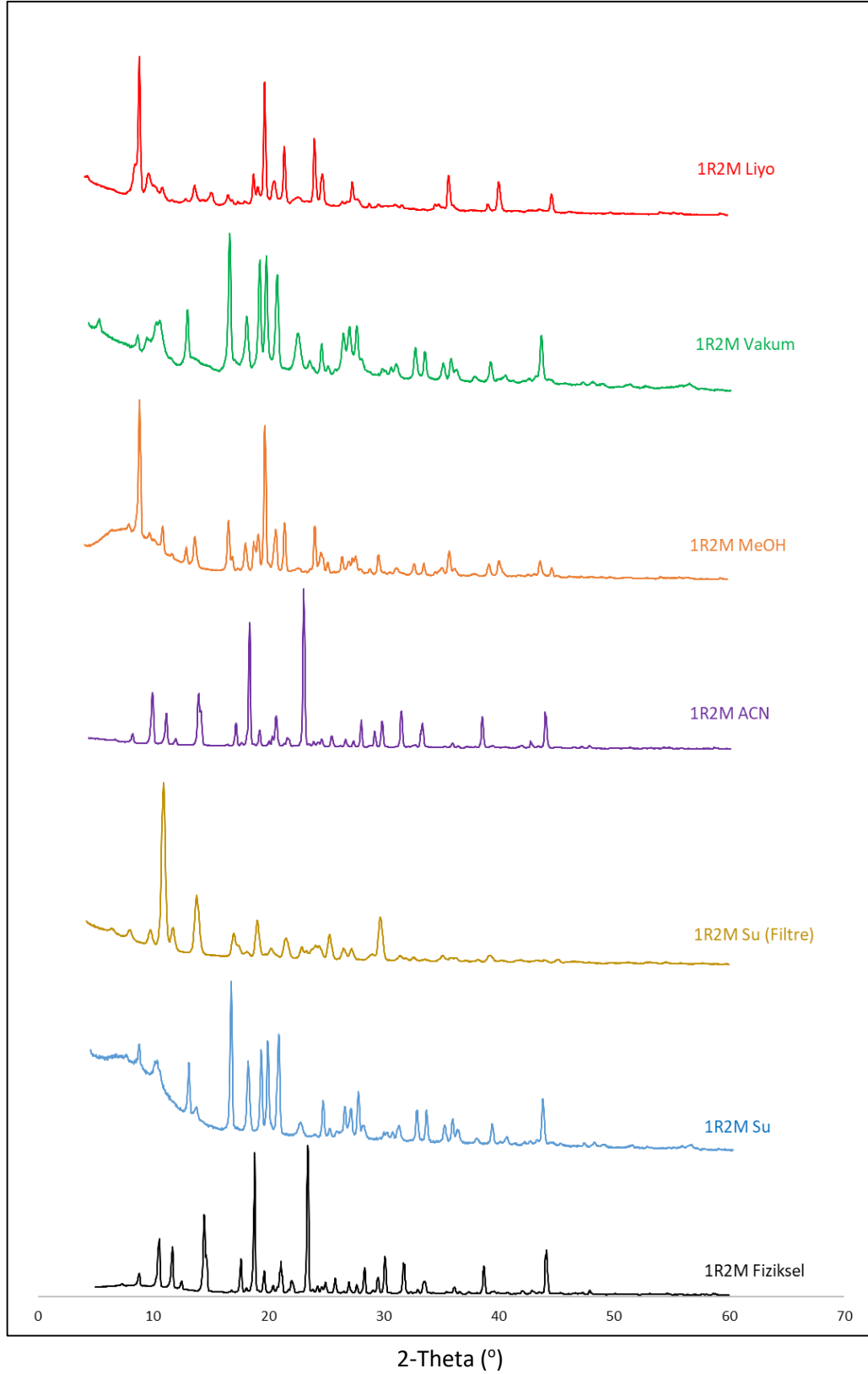
Şekil 4.8. Saf maddelerin XRD bulguları.



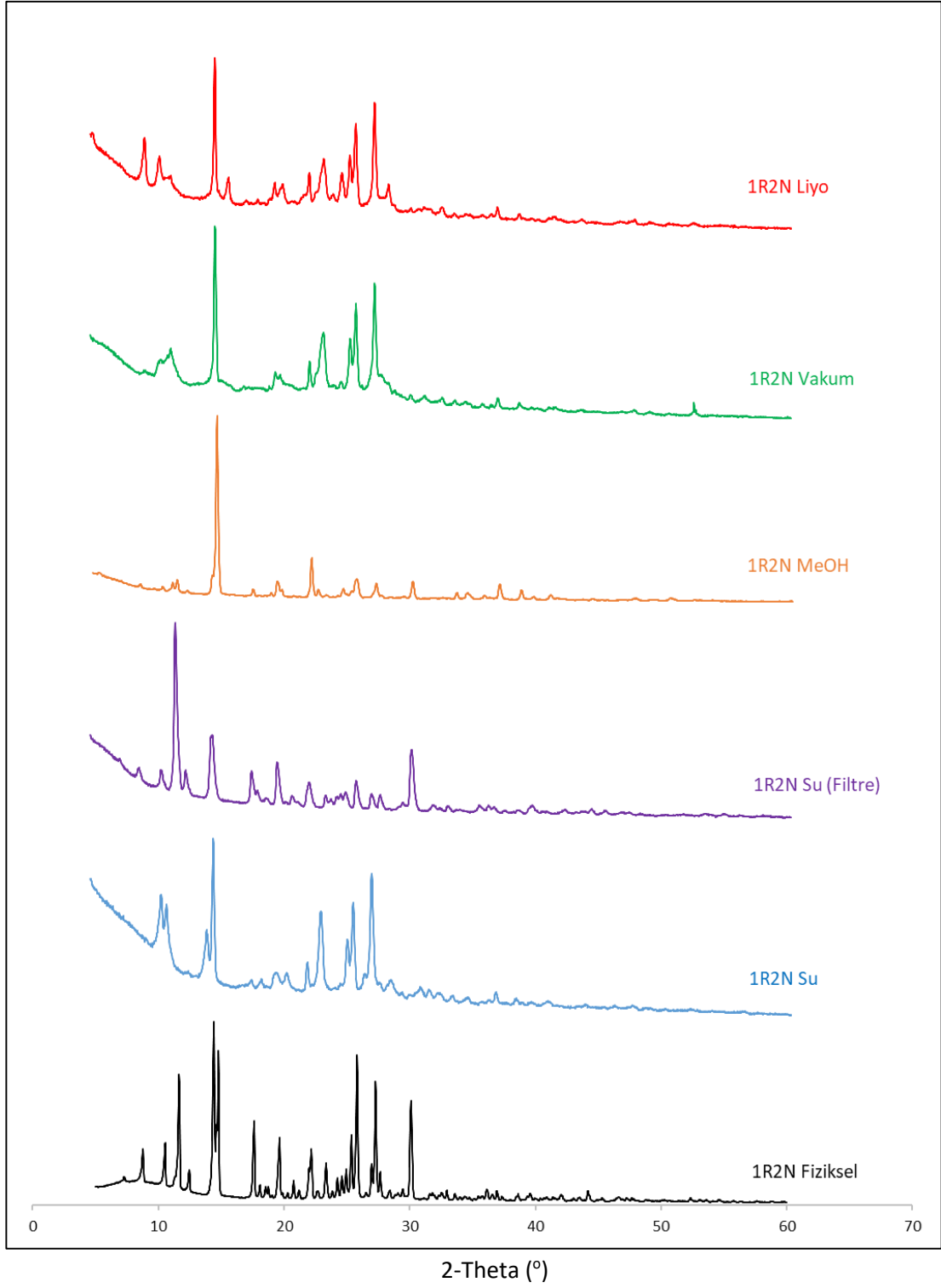
Şekil 4.9. 1R1M grubu formülasyonların XRD bulguları.



Şekil 4.10. 1R1N grubu formülasyonların XRD bulguları.



Şekil 4.11. 1R2M grubu formülasyonların XRD bulguları.



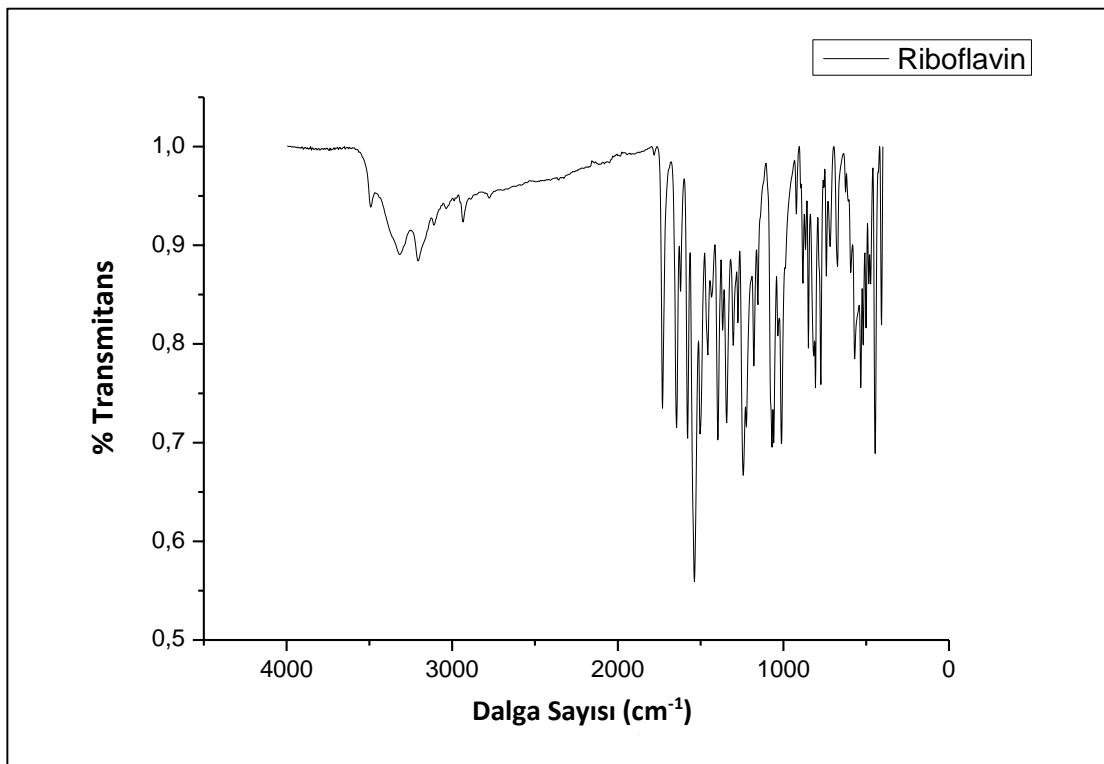
Şekil 4.12. 1R2N grubu formülasyonların XRD bulguları.

Elde edilen XRD sonuçları incelendiğinde bir ileri değerlendirme basamağı olan FTIR’de incelenecek formülasyonların kristal yapılarında belirgin değişiklik gözlenen 1R-1M (liyofilizasyon) ve 1R-1M (vakum), 1R-2M (liyofilizasyon) ve 1R-2M (vakum), 1R-1N (liyofilizasyon) ve 1R-1N (vakum), 1R-2N (liyofilizasyon) ve 1R-2N (vakum) olmasına karar verilmiştir.

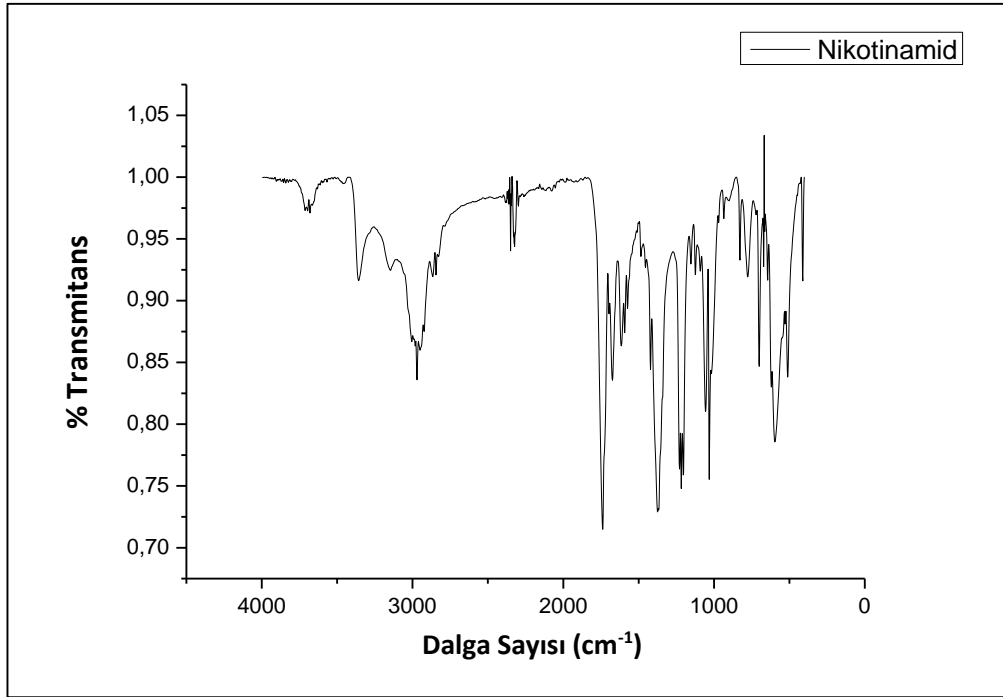
Diğer formülasyonlarda kristal yapılarda değişme görülse de hazırlamalarında kullanılan çözücü miktarları riboflavinin çözünürlüğünün çok düşük olmasından dolayı çok yüksektir. Bu nedenle ileri analizlerde ve deneylerde bu formülasyonların kullanılmaması kararlaştırılmıştır.

4.2.4. Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

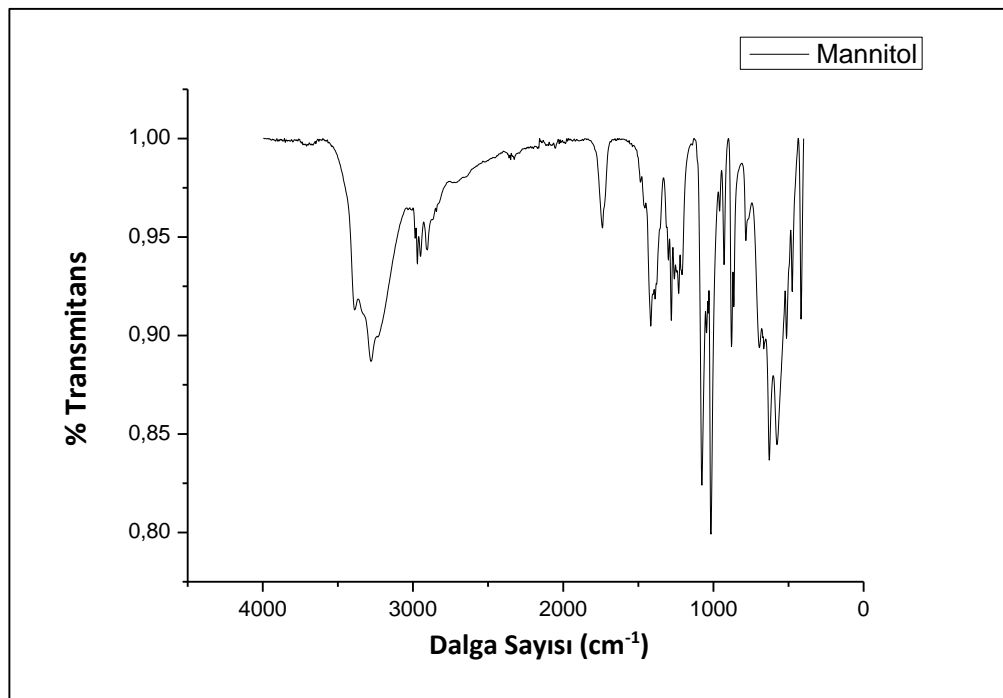
Ko-Kristal oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla örneklerin FTIR sonuçları incelenmiştir. Örneklerin dalga sayısına karşılık % Transmittans grafikleri incelenmiştir (Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.).



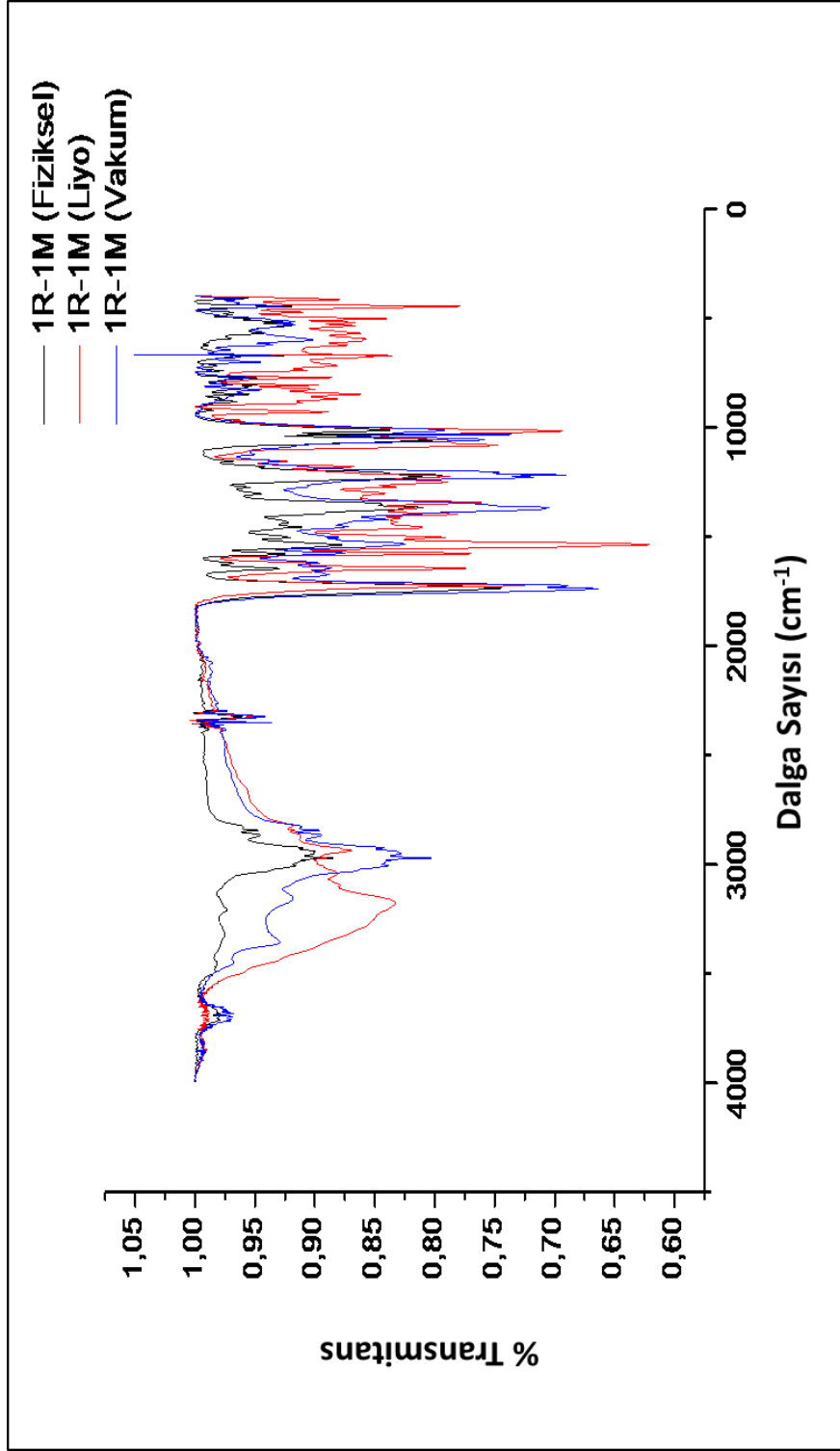
Şekil 4.13. Riboflavin'in FTIR spektrumu.



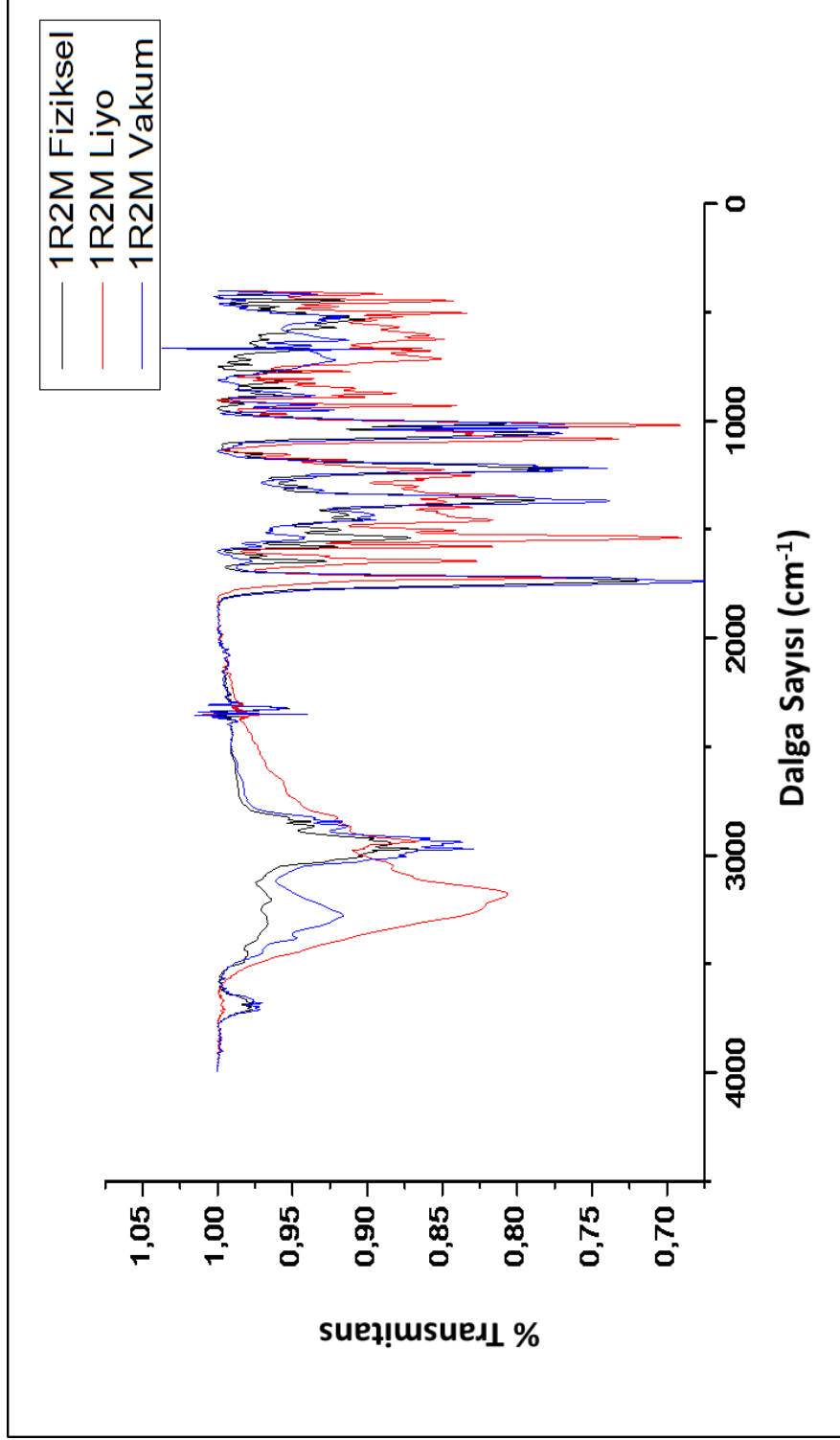
Şekil 4.14. Nikotinamid'in FTIR spektrumu.



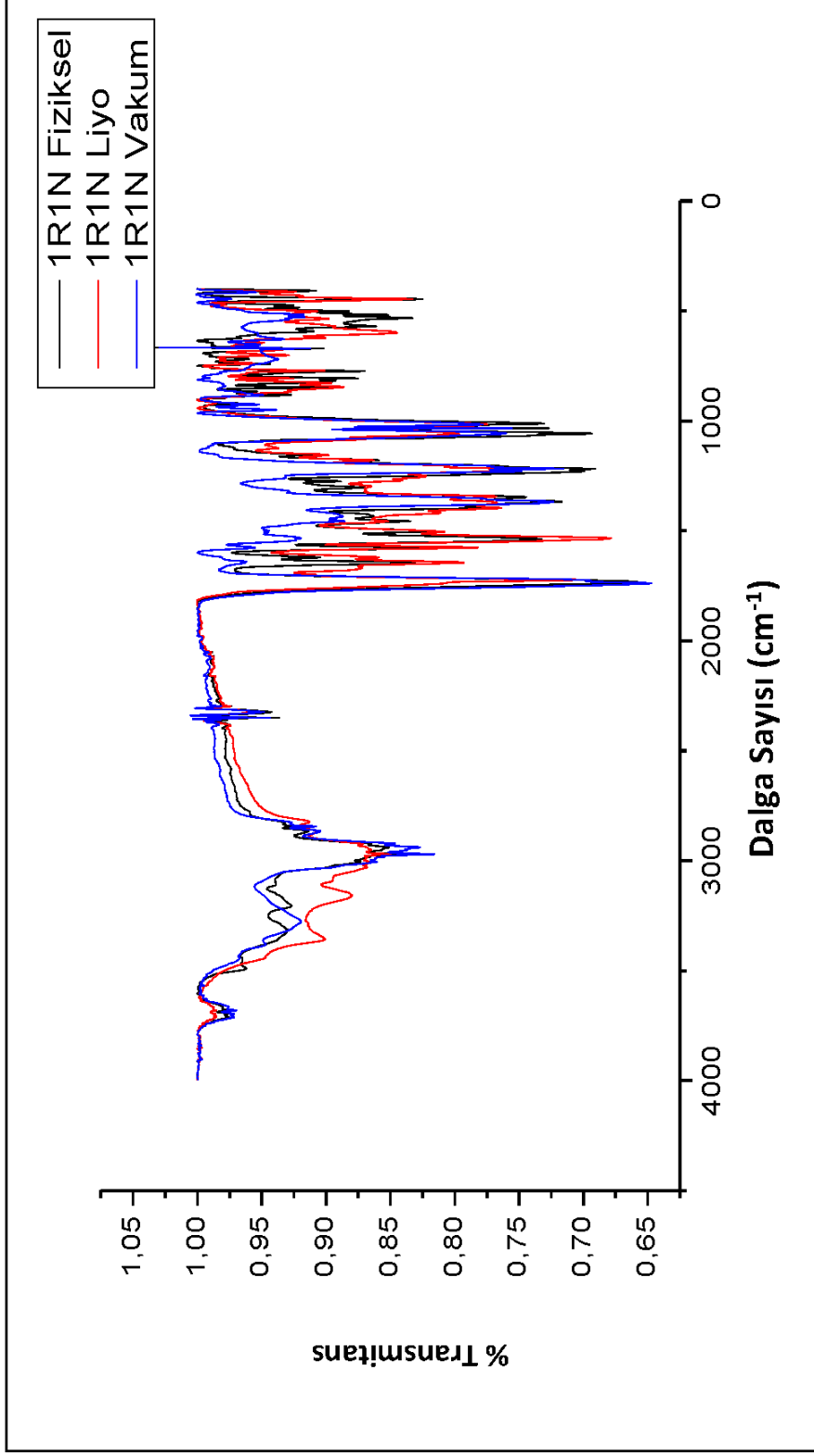
Şekil 4.15. Mannitol'ün FTIR spektrumu.



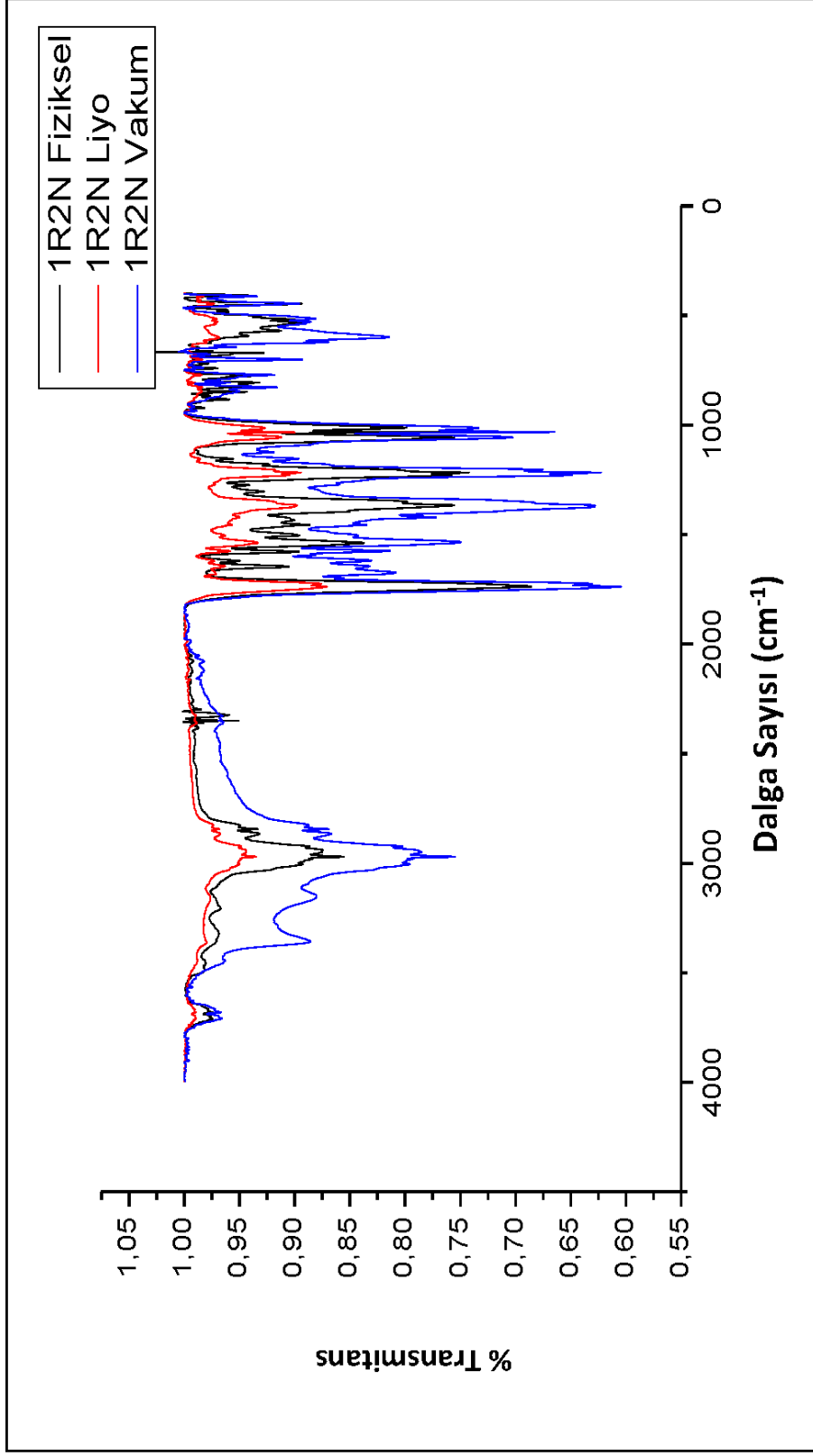
Şekil 4.16. 1R1M grubu formülasyonların FTIR spektrumları.



Şekil 4.17. 1R2M grubu formülasyonların FTIR spektrumları.



Şekil 4.18. 1R1N grubu formülasyonların FTIR spektrumları.



Şekil 4.19. 1R2N grubu formülasyonların FTIR spektrumları.

1R-1M liyofilizasyon ve 1R-1N liyofilizasyon sonuçları incelendiğinde 3500 cm⁻¹ alanlarında alkol ve fenol O-H bağları olduğu gözlenmiştir.

4.2.5. İn Vitro Lipofilisite Değerlendirme Çalışması

Bölüm 3.3.1' de belirtildiği şekilde, hazırlanan ko-kristal formülasyonlarının in vitro lipofilisitelelerinin tespit edilmesi için oktanol:su karışımındaki dağılım değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.10' da ko-kristal formülasyonlarının su fazındaki (PBS) dağılım yüzdeleri sunulmuştur (n= 3, ortalama±standart sapma ($\bar{X}\pm SS$)).

Tablo 4.10. Geliştirilen ko-Kristal formülasyonlarının su fazında dağılım yüzdeleri (n=3, $\bar{X}\pm SS$).

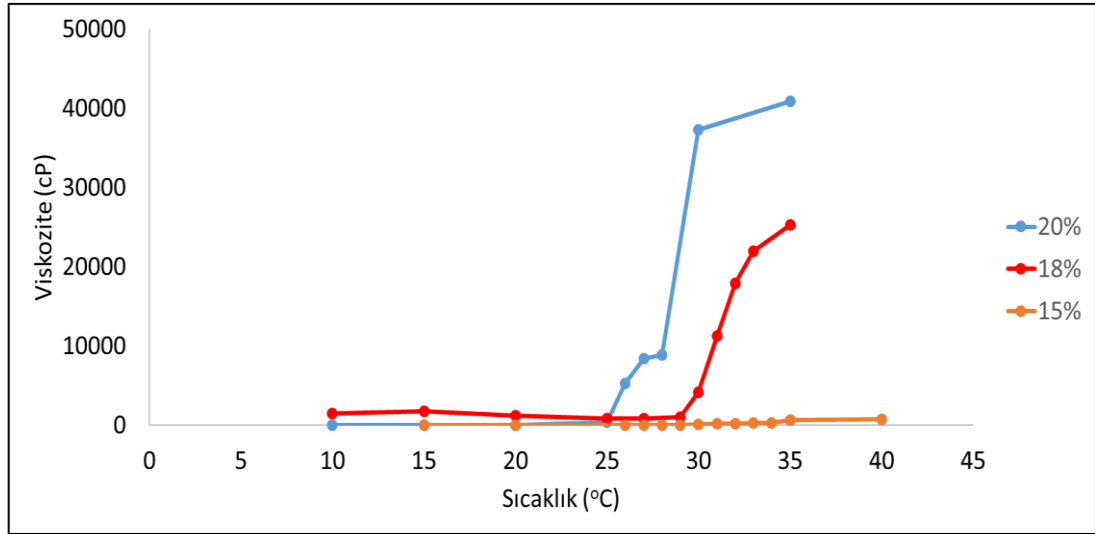
	1R1N	1R1M	1R2N	1R2M
Pik Alanı	368,4	354,6	304,3	291
Konsantrasyon (ug/ml)	3,02	2,91	2,49	2,39
Seyreltme Faktörü (x10)	30,25	29,12	24,99	23,90
Su Fazında Kalma Yüzdeleri	60,51±1,25	58,24±1,33	49,99±2,32	47,81±1,78

DSC, XRD ve FTIR sonuçları değerlendirildiğinde ileri çalışmalarda (ex vivo, in vivo) 1R-1M liyofilizasyon ve 1R-1N liyofilizasyon formülasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3. Hidrofilik Jel Formülasyonları

4.3.1 Optimum Pluronik F-127 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

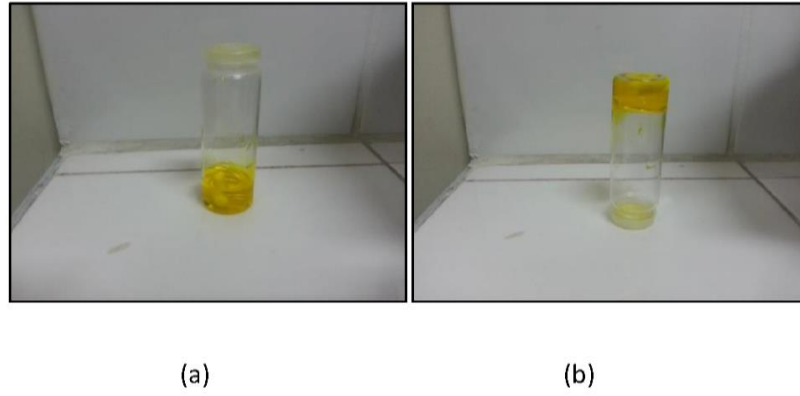
Bölüm 3.3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan hidrofilik jel formülasyonlarında en uygun Pluronik F-127 konsantrasyonunun bulunabilmesi için, farklı oranlarda polimer kullanılarak sıcaklığa bağlı viskozite değişimleri incelenmiştir. Burada hedef, formülasyonun oda sıcaklığında sıvı halde kalarak kolay uygulanabilmesi, göz yüzeyi sıcaklığı olan 32°C'de ise jelleşme göstermesidir. Şekil 4.20.'de gösterilen viskozite grafikleri incelendiğinde göz yüzeyinin sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta jelleştiği tespit edilen polimer konsantrasyonu %18 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. Farklı Pluronic F-127 oranlarının artan sıcaklık ile jelleşme bulguları (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

4.3.2 Jelleşme Sıcaklığının Tayini

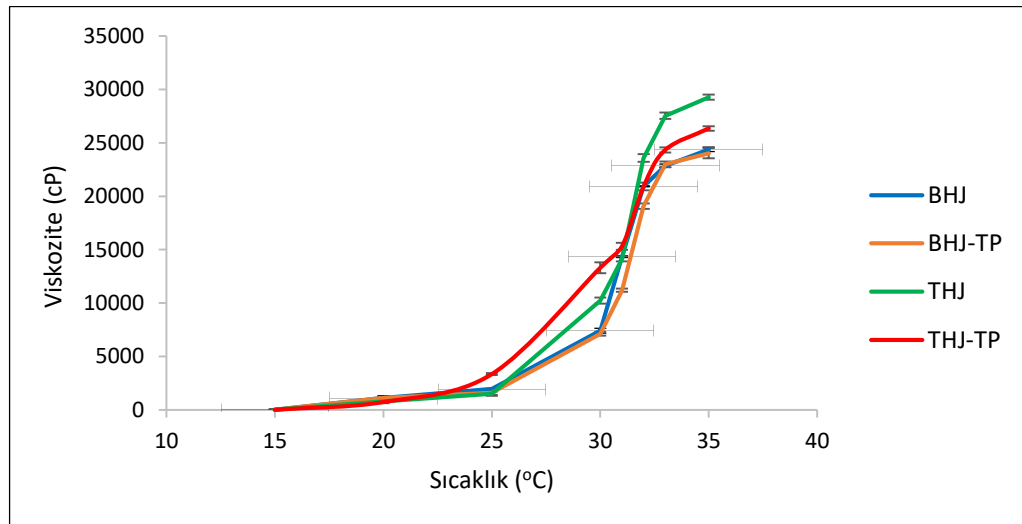
Bölüm 3.3.2' de belirtildiği gibi, %18 Pluronic F-127 içeren örneğin jelleşme sıcaklığı incelenmiştir. Örneğin viskozite değerlerindeki artış bu nokta hakkında genel bir bilgi verse de, hangi noktadan sonra jelleşme sonrası viskozite artışının devam ettiği konusunda daha net bilgiye sahip olabilmek için ayrıca jelleşme sıcaklığı tespit edilmiştir. Şekil 4.21'de görüldüğü üzere ters çevirme yöntemi ile jelleşme sıcaklığının 31,4°C olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.21. % 18 (a/h) Pluronic F-127 içeren örneğin 31,4°C'de tüpte düz (a) ve ters çevrilmiş (b) durumdaki görüntüleri.

4.3.3. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

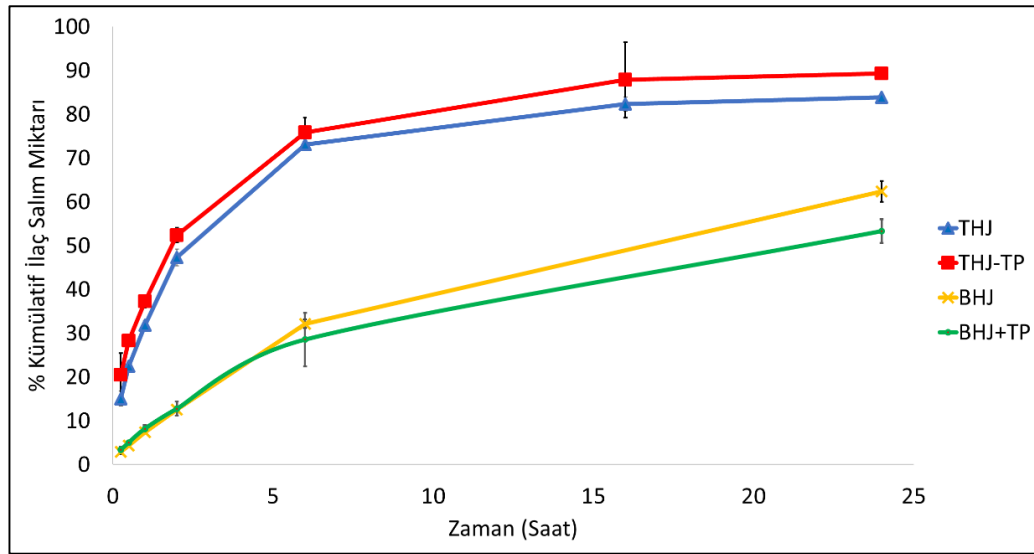
Bölüm 3.3.2' de belirtildiği gibi hazırlanan hidrofilik jel formülasyonlarında kullanılan eksipyanların ve etken maddelerin jelleşmeye olan etkisinin incelenmesi amacıyla hazırlanan formülasyonların sıcaklığa karşı viskozite grafikleri Şekil 4.22.'de elde edilmiştir. Hazırlanan tüm preparatlarda 32°C düzeylerinde jelleşme sağlandığı gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Hidrofilik jel formülasyonlarının sıcaklığa karşı viskozite değişimi bulguları (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

4.3.4. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

Hazırlanan hidrofilik jel formülasyonlarının in vitro ilaç salım profillerini incelemek amacıyla pH 7,4 PBS ortamında zamana karşı %kümülatif ilaç salım miktarları belirlenmiştir. Riboflavin içeren formülasyonlarda salım daha uzun sürmesine karşın riboflavin-5-fosfat içeren formülasyonlarda salım görece daha hızlı gerçekleşmiştir (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. Hidrofilik jel formülasyonlarının in vitro ilaç salım profilleri (n=6, $\bar{X} \pm SS$).

4.4. NLT Formülasyonları

4.4.1. NLT Formülasyonlarının Faktöriyel Tasarımı

Formülasyon değişkenlerinin nanopartiküllerin boyutuna ve PDI'ya olan etkisini belirlemek amacıyla Minitab® programı ile 2² tam faktöriyel tasarım gerçekleştirilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Her bir formülasyon grup partikül büyüklüğünden bağımsız in vitro-in vivo etkilere sahip olduğundan kendi içlerinde faktöriyel tasarım gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplar Tablo 4.11.'de verilmiştir.

Tablo 4.11. NLT formülasyon grupları.

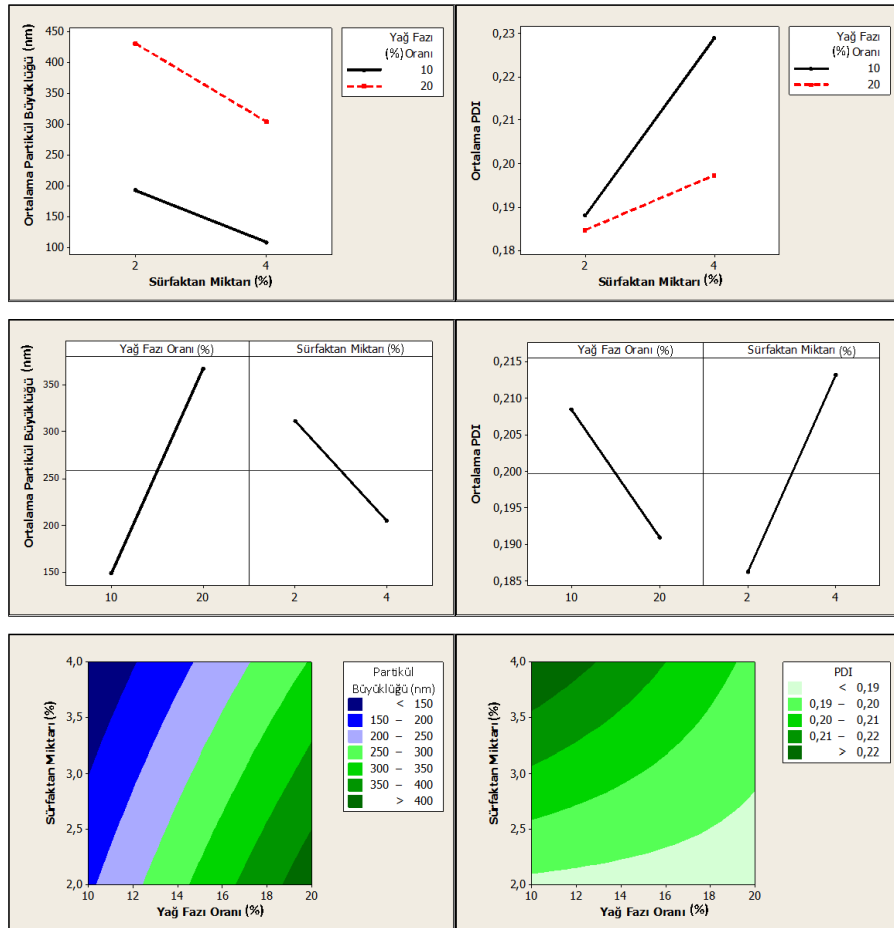
Kod	Riboflavin Baz (%)	Riboflavin-5-fosfat sodyum(%)	Compritol ATO (%)	Gelucire 44/14 (%)	Miglyol 812 (%)	Cremophor EL (%)	Transcutol P (%)	Stearilamin (%)
RBN 1	0.2	-	4	4	2	2	-	-
RBN 2	0.2	-	8	8	8	2	-	-
RBN 3	0.2	-	4	4	2	4	-	-
RBN 4	0.2	-	8	8	8	4	-	-
RBTP 1	0.2	-	4	4	2	2	0,4	-
RBTP 2	0.2	-	8	8	8	2	0,4	-
RBTP 3	0.2	-	4	4	2	4	0,4	-
RBTP 4	0.2	-	8	8	8	4	0,4	-
RB+ 1	0.2	-	4	4	2	2	-	0,2
RB+ 2	0.2	-	8	8	8	2	-	0,2
RB+ 3	0.2	-	4	4	2	4	-	0,2
RB+ 4	0.2	-	8	8	8	4	-	0,2
RTN 1		0.2	4	4	2	2	-	-
RTN 2		0.2	8	8	8	2	-	-
RTN 3		0.2	4	4	2	4	-	-
RTN 4		0.2	8	8	8	4	-	-
RTTP 1		0.2	4	4	2	2	0,4	-
RTTP 2		0.2	8	8	8	2	0,4	-
RTTP 3		0.2	4	4	2	4	0,4	-
RTTP 4		0.2	8	8	8	4	0,4	-
RT+ 1		0.2	4	4	2	2	-	0,2
RT+ 2		0.2	8	8	8	2	-	0,2
RT+ 3		0.2	4	4	2	4	-	0,2
RT+ 4		0.2	8	8	8	4	-	0,2

Nötr Riboflavin NLT Formülasyonları

Tablo 4.12. RBN grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

	P.B. (nm)	PDI	Zeta (mV)	Ort. P.B. (nm)	Ort. PDI	Ort. Zeta (mV)
RBN 1	228,9±2,02	0,185±0,01	-10,6±0,40	191,7±26,4	0,188±0,004	-10,41±0,73
	169,4±1,55	0,194±0,02	-9,43±0,29			
	177±1,53	0,185±0,01	-11,2±0,25			
RBN 2	442,4±8,34	0,187±0,02	-12,9±0,53	490,8±8,7	0,184±0,008	-13,6±0,66
	429,1±5,63	0,173±0,02	-13,4±0,70			
	421,1±7,13	0,194±0,01	-14,5±0,35			
RBN 3	102±0,94	0,169±0,01	-9,57±0,70	107,4±13,1	0,157±0,009	-10,66±0,807
	94,89±1,62	0,158±0,01	-10,91±0,59			
	125,6±0,36	0,146±0,01	-11,5±1,55			
RBN 4	189,2±3,12	0,205±0,01	-9,54±0,57	303,5±80,8	0,194±0,005	-11,08±1,1
	360,8±6,14	0,193±0,02	-11,5±0,26			
	360,6±4,20	0,194±0,03	-12,2±0,49			

P.B.: Partikül büyüklüğü, Zeta: Zeta potansiyeli



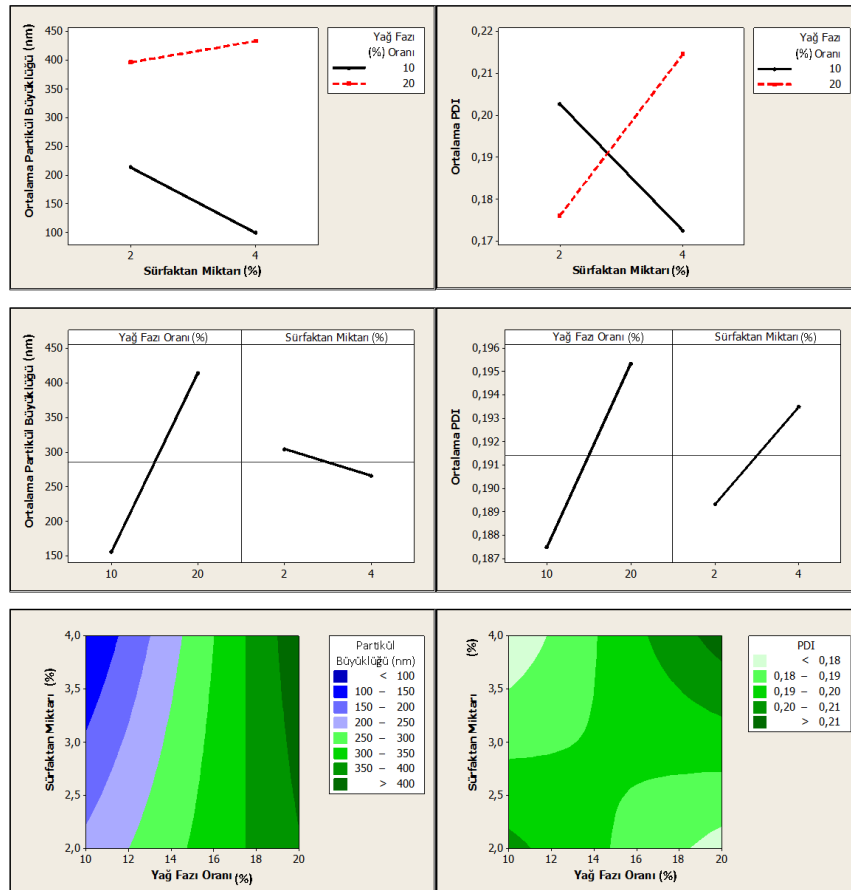
Şekil 4.24. RBN grubu formülasyonların faktöriyel tasarım sonuçları.

Riboflavin ve Transcutol P İçeren NLT Formülasyonları

Tablo 4.13. RBTP grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

	P.B. (nm)	PDI	Zeta (mV)	Ort. P.B. (nm)	Ort. PDI	Ort. Zeta (mV)
RBTP 1	223±2,55	0,208±0,01	-11,7±0,30	213,1±8,3	0,202±0,004	-10,9±0,50
	202,6±1,10	0,204±0,01	-10,7±0,30			
	213,7±1,10	0,196±0,03	-10,3±0,46			
RBTP 2	401,5±3,19	0,167±0,01	-10,3±0,36	395,9±8,5	0,176±0,013	-10,5±0,50
	402,5±3,66	0,194±0,02	-9,99±0,11			
	383,8±3,98	0,167±0,01	-11,3±0,30			
RBTP 3	90±0,60	0,174±0,01	-9,29±0,41	99,2±7,2	0,173±0,002	-9,67±0,27
	107,7±0,7	0,170±0,01	-9,94±0,34			
	99,8±0,20	0,173±0,01	-9,80±0,24			
RBTP 4	469,3±6,70	0,202±0,01	-9,87±0,20	432,9±30,4	0,214±0,024	-10,3±0,724
	434,8±1,40	0,193±0,02	-9,71±0,33			
	394,7±4,30	0,249±0,01	-11,32±0,15			

P.B.: Partikül büyüklüğü, Zeta: Zeta potansiyeli



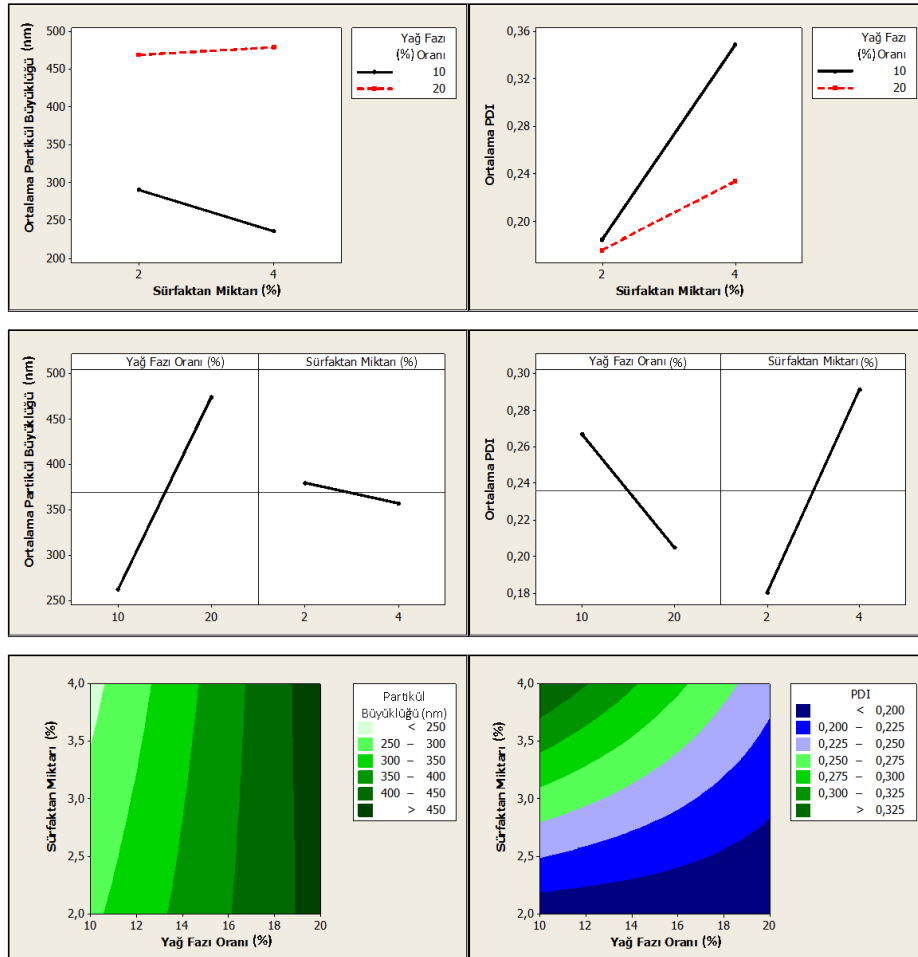
Şekil 4.25. RBTP grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.

Riboflavin ve Stearilamin İçeren NLT Formülasyonları

Tablo 4.14. RB+ grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

	P.B. (nm)	PDI	Zeta (mV)	Ort. P.B. (nm)	Ort. PDI	Ort. Zeta (mV)
RB+ 1	302,4±6,10	0,184±0,01	20,6±1,50	290,2±8,80	0,184±0,005	18,8±1,3
	282,1±8,80	0,178±0,01	18,7±1,10			
	286±4,30	0,192±0,01	17,2±0,78			
RB+ 2	472,2±8,60	0,153±0,02	10,3±0,73	469,1±12,60	0,176±0,033	14,1±3,9
	482,8±7,00	0,223±0,01	19,6±0,72			
	452,3±1,70	0,153±0,01	12,6±0,43			
RB+ 3	211,1±3,20	0,270±0,01	23,8±0,50	235,3±17,20	0,349±0,056	23±0,6
	249,3±1,10	0,396±0,02	23±0,15			
	245,5±2,40	0,381±0,01	22,2±0,55			
RB+ 4	443,1±3,80	0,137±0,02	13,4±0,37	479,4±27,80	0,233±0,115	14,6±1,4
	510,7±5,20	0,396±0,05	16,6±0,58			
	484,6±3,10	0,168±0,03	13,8±0,34			

P.B.: Partikül büyüklüğü, Zeta: Zeta potansiyeli



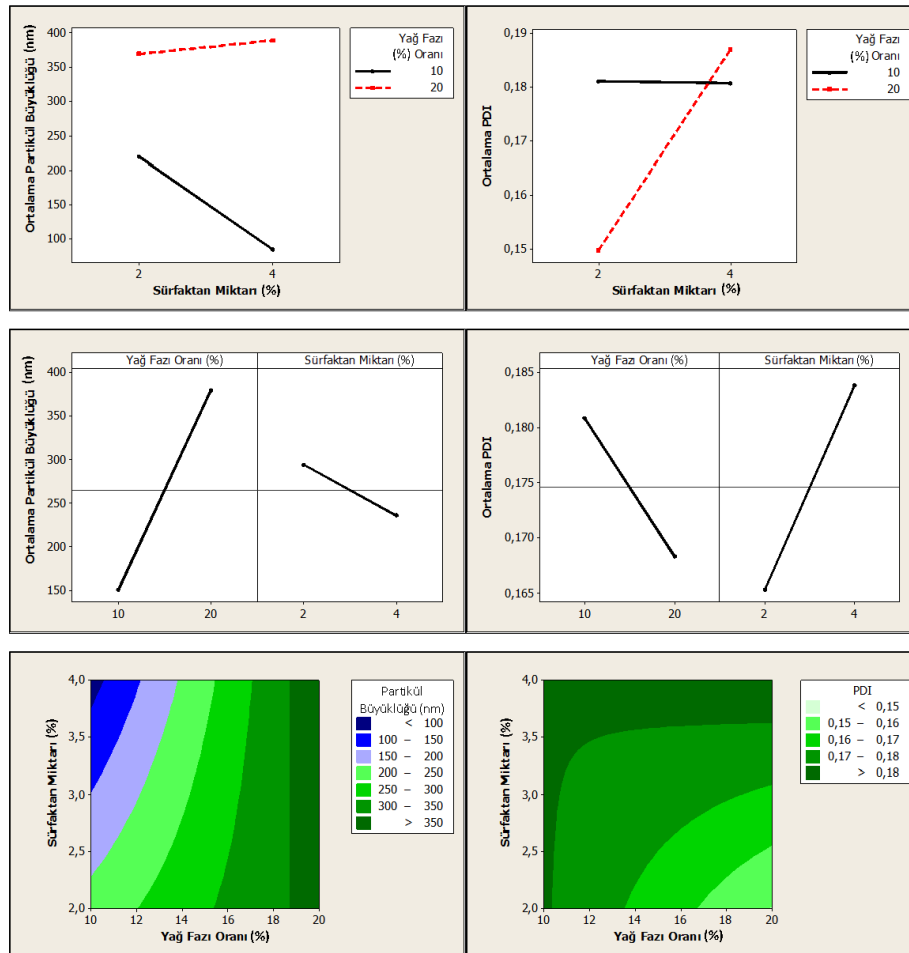
Şekil 4.26. RB+ grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.

Nötr Riboflavin-5-P Sodyum NLT Formülasyonları

Tablo 4.15. RTN grubu formülasyonların formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

	P.B. (nm)	PDI	Zeta (mV)	Ort. P.B. (nm)	Ort. PDI	Ort. Zeta (mV)
RTN 1	219±1,20	0,186±0,01	-3,79±0,27	218,9±1,00	0,185±0,012	-6,37±1,90
	220,4±0,70	0,188±0,01	-6,99±0,28			
	217,7±2,10	0,169±0,01	-8,33±0,15			
RTN 2	364,5±2,70	0,150±0,01	-10,3±0,26	369,2±4,80	0,150±0,007	-10,46±0,30
	367,3±2,90	0,159±0,01	-10,2±0,11			
	375,7±6,00	0,140±0,01	-10,9±0,20			
RTN 3	61,1±0,15	0,197±0,00	-11,4±1,32	83,4±16,00	0,180±0,015	-9,80±1,85
	90,6±0,70	0,185±0,01	-10,8±2,79			
	98,4±0,35	0,160±0,01	-7,21±0,82			
RTN 4	367,6±4,50	0,196±0,03	-9,80±0,05	389±19,40	0,187±0,006	-10,11±0,48
	384,9±4,40	0,182±0,02	-9,74±0,41			
	414,7±2,20	0,183±0,02	-10,8±0,52			

P.B.: Partikül büyüklüğü, Zeta: Zeta potansiyeli



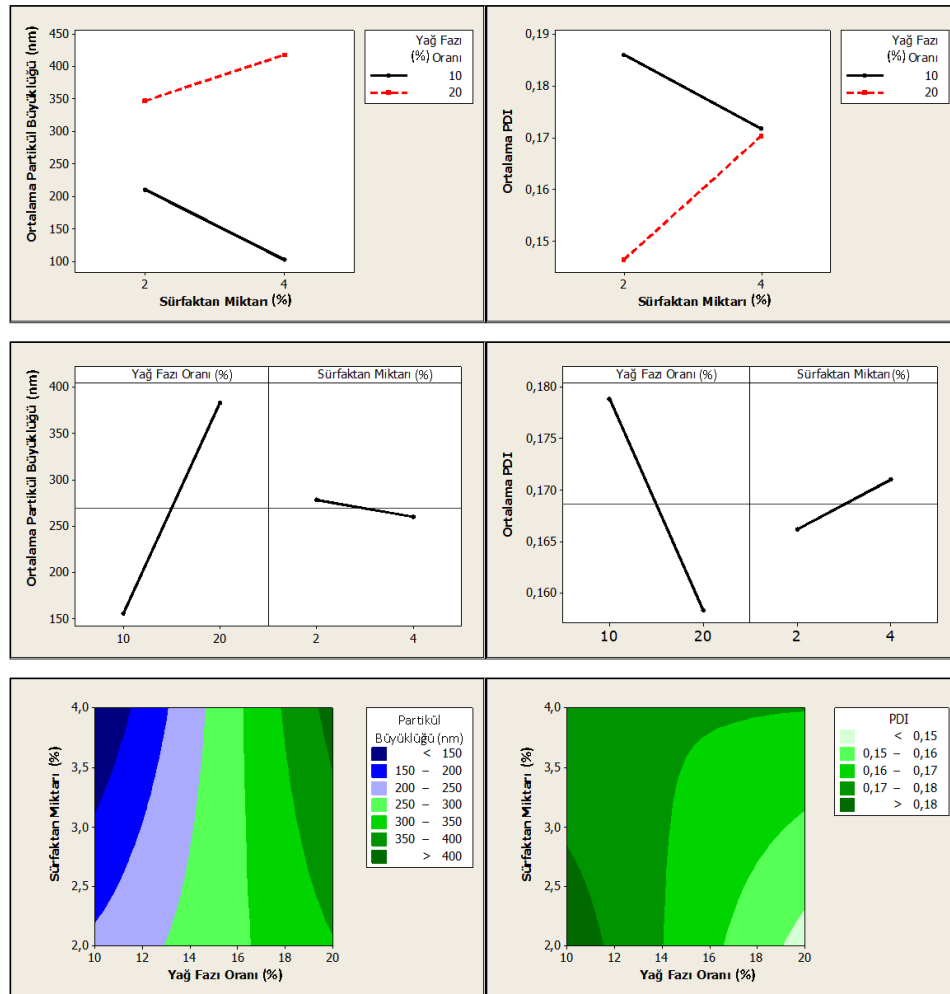
Şekil 4.27. RTN grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.

Riboflavin-5-P Sodyum ve Transcutol P İçeren NLT Formülasyonları

Tablo 4.16. RTTP grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

	P.B. (nm)	PDI	Zeta (mV)	Ort. P.B. (nm)	Ort. PDI	Ort. Zeta (mV)
RTTP 1	199,1±1,50	0,213±0,01	-6,60±0,24	210,2±10,2	0,186±0,024	-7,92±1,00
	207,6±0,70	0,191±0,01	-8,14±0,21			
	223,8±1,10	0,154±0,02	-9,02±0,27			
RTTP 2	345,6±2,00	0,155±0,01	-11,3±0,23	346,7±9,40	0,146±0,010	-11,1±0,28
	335,8±2,90	0,132±0,01	-10,7±0,17			
	358,7±0,40	0,152±0,01	-11,3±0,30			
RTTP 3	100,6±0,40	0,160±0,01	-7,97±0,62	102,1±3,10	0,172±0,020	-7,63±0,24
	106,4±0,20	0,2±0,01	-7,54±0,26			
	99,3±1,00	0,155±0,01	-7,40±0,37			
RTTP 4	427,2±3,80	0,171±0,03	-9,19±0,19	418,2±6,40	0,170±0,010	-8,86±0,53
	412,8±1,60	0,183±0,00	-9,28±0,25			
	414,5±6,10	0,157±0,05	-8,11±0,12			

P.B.: Partikül büyüklüğü, Zeta: Zeta potansiyeli



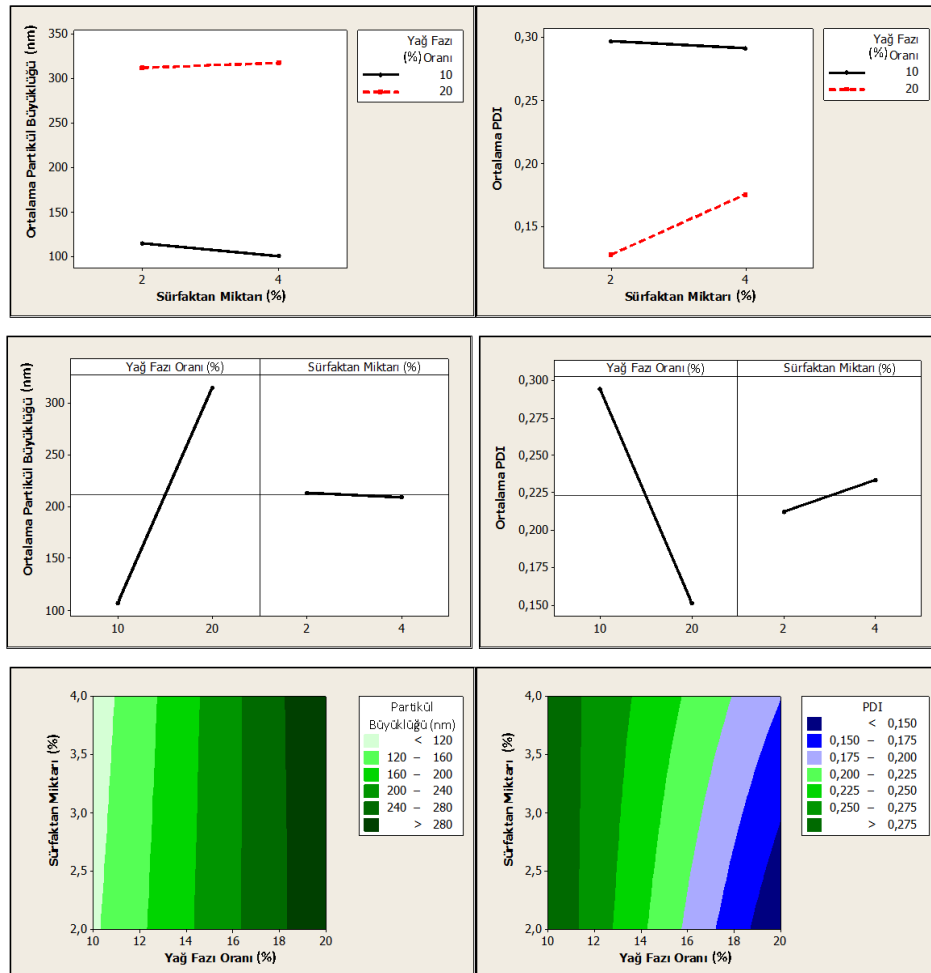
Şekil 4.28. RTTP grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.

Riboflavin-5-P Sodyum ve Stearilamin İçeren NLT Formülasyonları

Tablo 4.17. RT+ grubu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve Zeta potansiyel değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

	P.B. (nm)	PDI	Zeta (mV)	Ort. P.B. (nm)	Ort. PDI	Ort. Zeta (mV)
RT+ 1	122,2±1,10	0,246±0,00	16,3±0,72	122,2±0,90	0,246±0,003	16,63±0,24
	120,7±1,20	0,259±0,00	16,7±0,51			
	99,7±1,10	0,386±0,02	16,8±0,04			
RT+ 2	332,1±2,50	0,129±0,02	15,9±0,23	312,3±19,70	0,128±0,005	16,23±0,33
	319,3±1,50	0,133±0,01	16,1±0,28			
	285,4±1,40	0,121±0,01	16,7±0,20			
RT+ 3	112,1±1,90	0,276±0,00	14,1±0,37	100,3±8,40	0,291±0,034	15,46±0,98
	92,9±0,70	0,339±0,03	15,9±0,23			
	95,9±1,70	0,259±0,01	16,4±0,20			
RT+ 4	289±4,90	0,151±0,01	16,3±0,62	317,9±20,50	0,176±0,018	16,03±0,30
	329,8±0,90	0,193±0,01	16,2±0,05			
	334,8±4,1	0,183±0,019	15,6±0,529			

P.B.: Partikül büyüklüğü, Zeta: Zeta potansiyeli

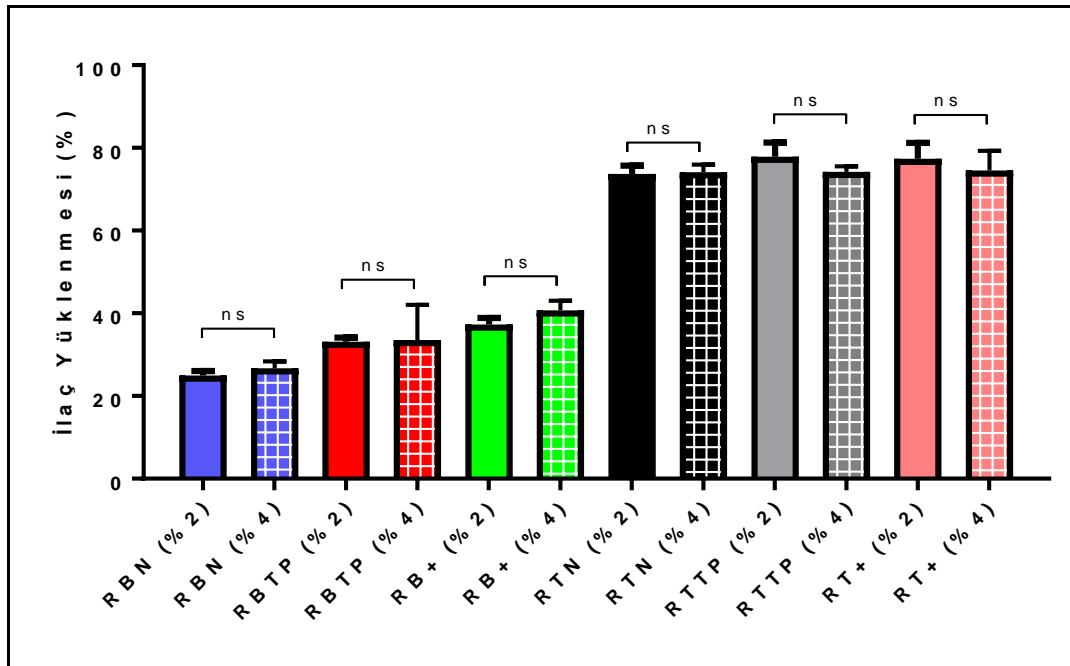


Şekil 4.29. RT+ grubu formülasyonlarının faktöriyel tasarım sonuçları.

Sonuçlar incelendiğinde, %20 oranında yağ içeren formülasyonların partikül büyüklüklerinin genel olarak 320 nm ve 490 nm arasında olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu formülasyonların ileri aşamalarda kullanılmaması kararlaştırılmıştır. Öte yandan %10 yağ fazı ve %2 - %4 sürfaktan içeren formülasyonların salım deneylerinde ve hücre kültürü deneylerinde kullanılarak optimum formülasyonların ex vivo ve in vivo deneylere taşınmasına karar verilmiştir.

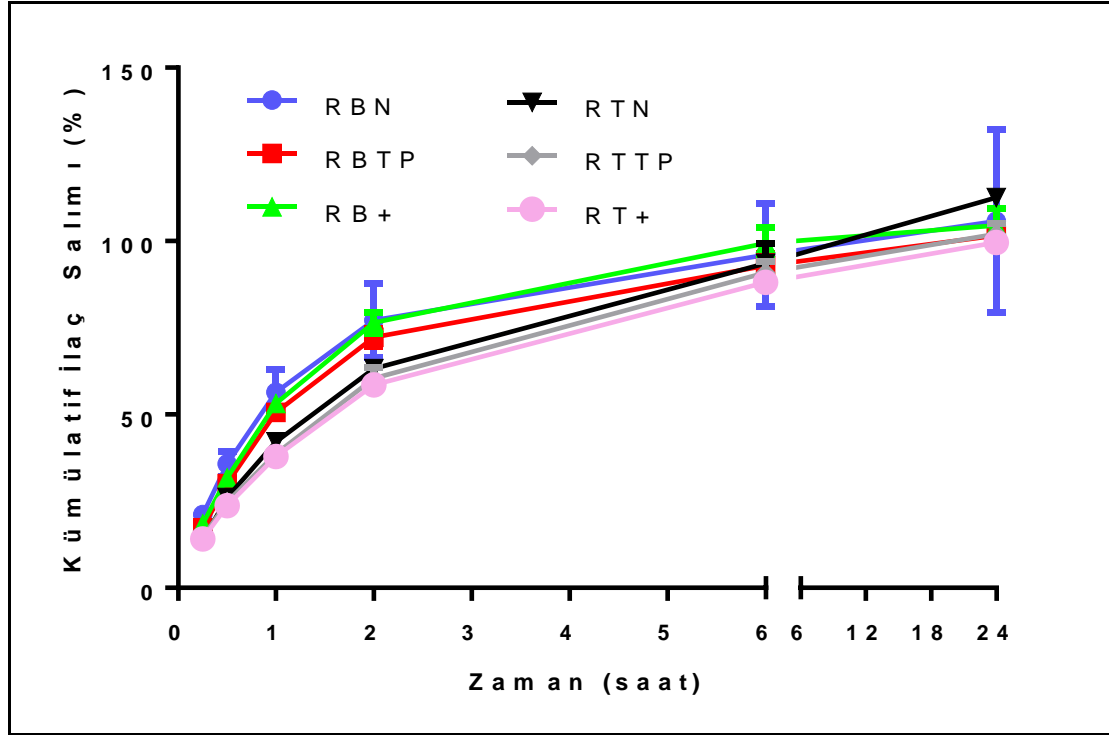
4.4.2. NLT Formülasyonlarının İlaç Yükleme Etkinliği ve İn Vitro İlaç Salımı

Hazırlanan NLT formülasyonlarının ilaç yükleme etkinlikleri Şekil 4.30.'da verilmiştir. %2 ve %4 oranında sürfaktan içeren NLT formülasyonları değerlendirildiğinde, partikül büyüklüğünde görülen farklılıklara karşın ilaç yükleme değerleri açısından önemli bir fark görülmemiştir. Kullanılan sürfaktan miktarını azaltmak ve buna bağlı olarak olası toksisite sorunlarının önüne geçmek amacıyla %2 sürfaktan içeren NLT formülasyonları ile devam edilme kararı alınmıştır.



Şekil 4.30. NLT formülasyonlarının ilaç yükleme bulguları. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz bağımsız çift yönlü T testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamli değil, $p > 0,05$.

% 2 YAM içeren NLT formülasyonlarının ilaç salım grafikleri Şekil 4.31.'de verilmiştir. Tablo 4.16.'daki F2 değerleri incelendiğinde genel olarak NLT formülasyonlarının benzer in vitro ilaç salımı gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.18.).



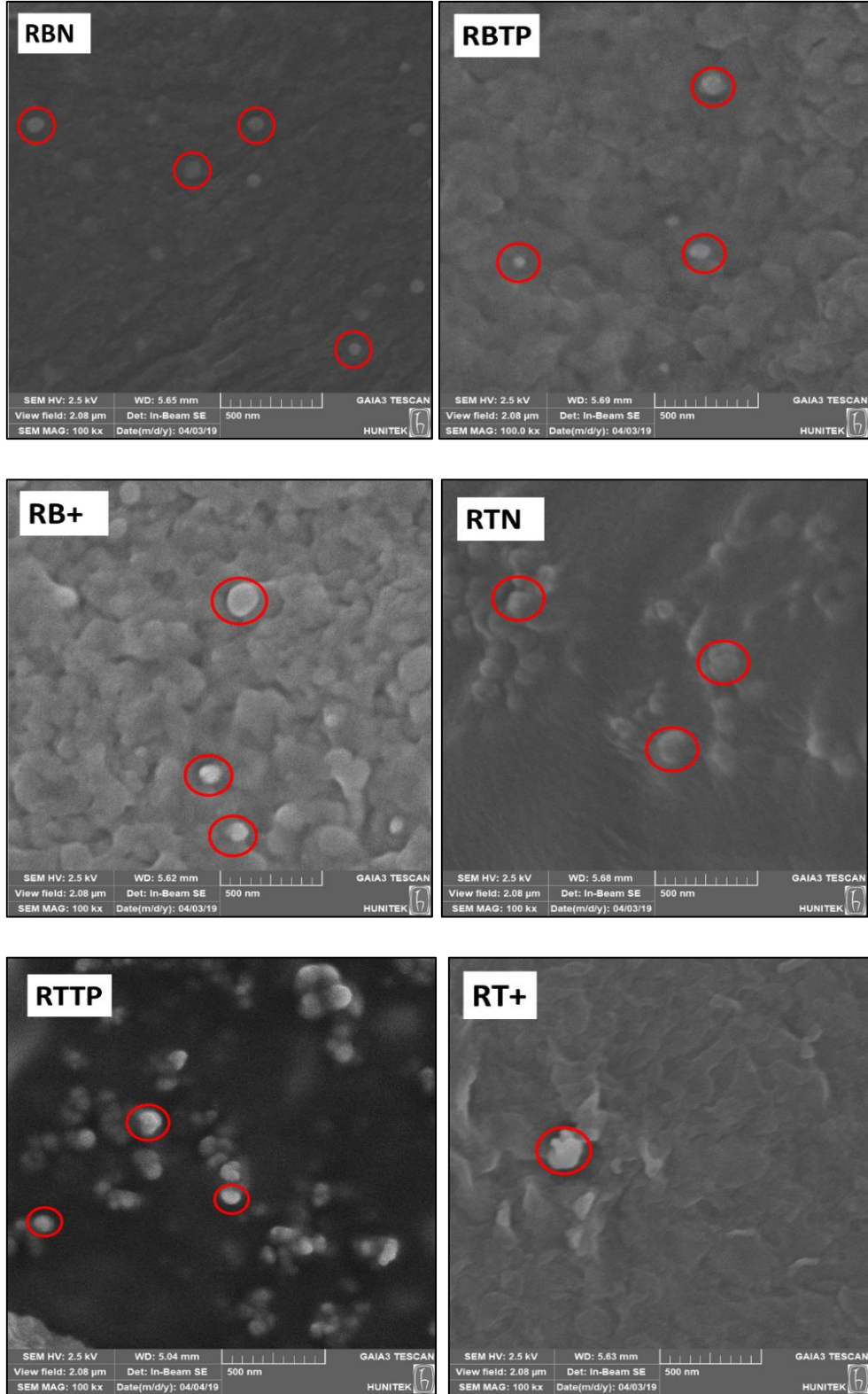
Şekil 4.31. % 2 YAM içeren NLT formülasyonlarının kümülatif ilaç salımı (n=6 $\bar{X} \pm SS$).

Tablo 4.18. NLT formülasyonlarının in vitro salım bulgularından elde edilen F2 değerleri

	RBN	RBTP	RB+		RTN	RTTP	RT+
RBN		63,21	74,39	RTN		79,83	72,9
RBTP	63,21		77,01	RTTP	79,83		90,51
RB+	74,39	77,01		RT+	72,9	90,51	

4.4.3. NLT Formülasyonlarının Morfolojik İncelenmesi

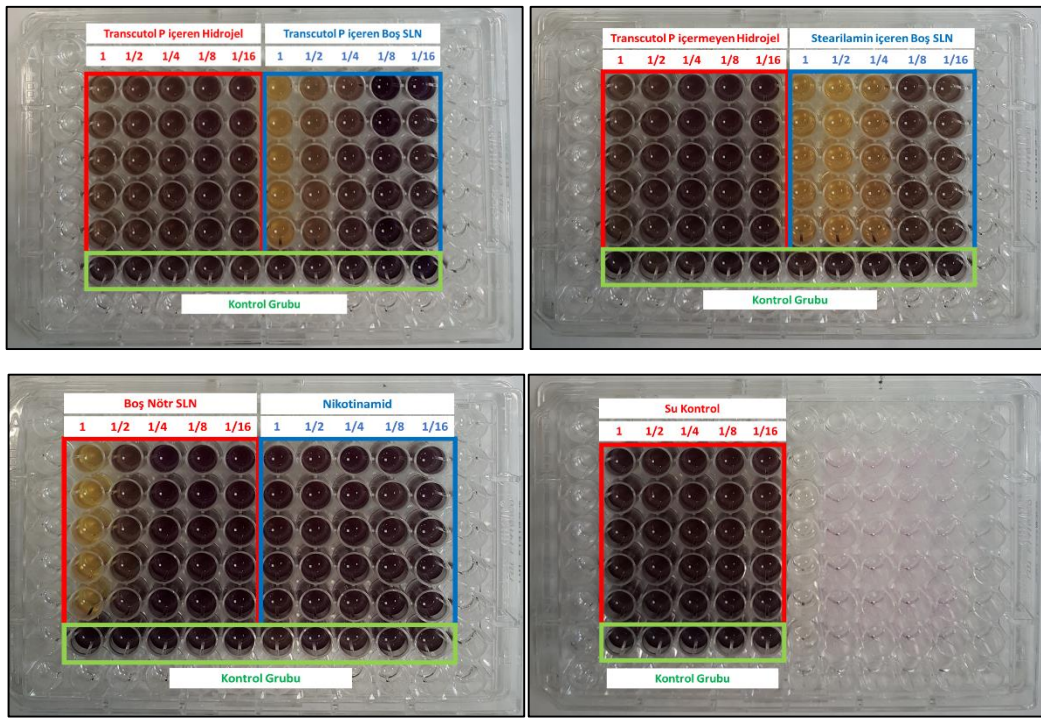
Hazırlanan NLT formülasyonlarının SEM görüntüleri Şekil 4.32.'de verilmiştir. NLT formülasyonlarının SEM görüntüleri incelendiğinde, partikül boyutlarının ZetaSizer'da bulunan değerlerle uyumlu olduğu ve şekillerinin küresel ve küresele yakın olduğu gözlenmiştir.



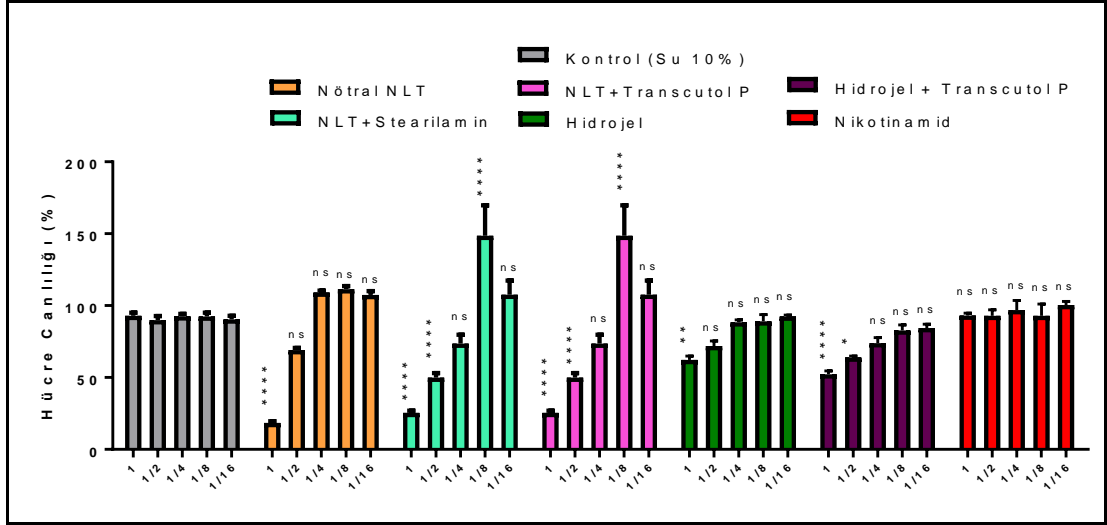
Şekil 4.32. RBN, RBTP, RB+, RTN, RTTP, RT+ kodlu NLT formülasyonlarının SEM fotoğrafları.

4.5. Sitotoksosite Çalışmaları

Bölüm 3.4' de belirtildiği gibi sitotoksosite çalışmalarında formazan kristalleri haricinde absorbans veren etkenleri elimine etmek amacıyla 570 nm'ye ilave olarak 650 nm dalga boyunda da ölçümler yapılmıştır. 570 nm'de elde edilen sonuçlardan 650 nm'deki sonuçlar çıkarılarak sadece formazan kristallerinin verdiği sonuçlara ulaşılmıştır. MTT testi plak görüntüsü Şekil 4.33. ve hazırlanan formülasyonların sitotoksisiteleri Şekil 4.34.'te gösterilmiştir.



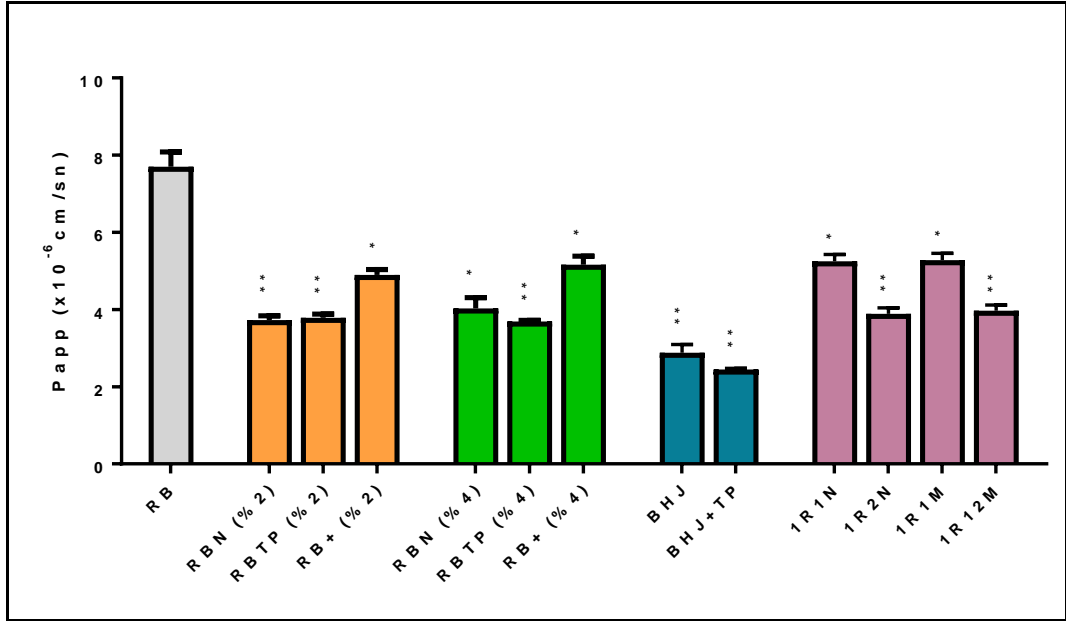
Şekil 4.33. MTT testine ilişkin plakların görüntüsü.



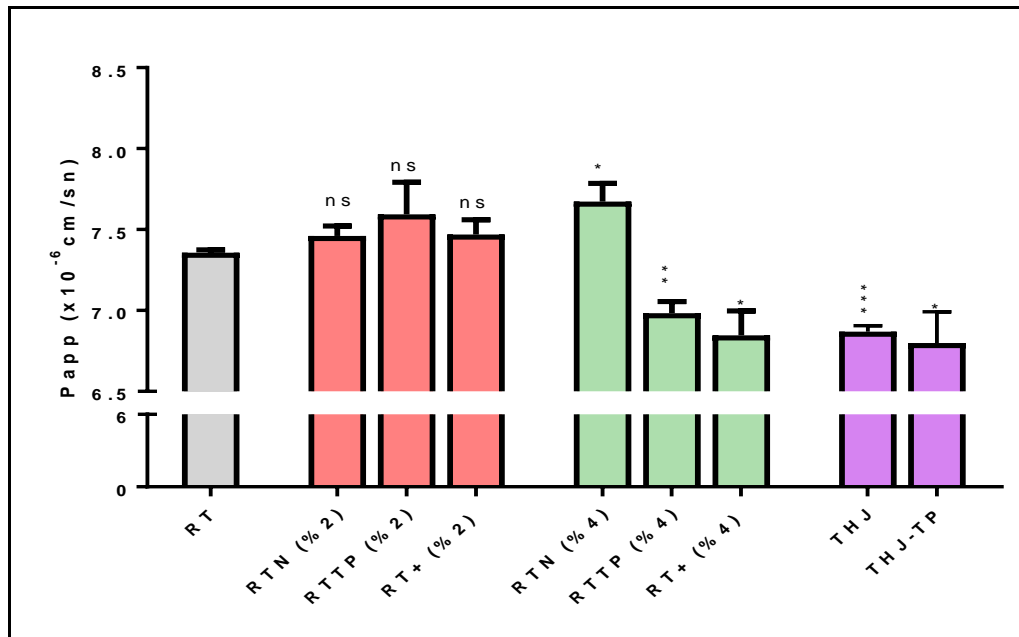
Şekil 4.34. ARPE-19 hücre hattı kullanılarak her üç formülasyon grubu (ko-kristal, hidrofilik jel, NLT) ile gerçekleştirilmiş in vitro hücre canlılığı çalışması. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz bağımsız çift yönlü T testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamlı değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 ve ****=p<0,0001 olarak gösterilmiştir.

4.6. Permeabilite Çalışmaları

Bölüm 3.5' de belirtildiği gibi ARPE-19 hücre hattı kullanılarak yapılan permeabilite çalışmalarında farklı oranda YAM içeren NLT formülasyonları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.35. ve Şekil 4.36.). Bu nedenle ex vivo ve in vivo çalışmalarda daha az toksisiteye neden olacağı öngörülen %2 oranında YAM içeren NLT'lerin kullanılması kararlaştırılmıştır.



Şekil 4.35. ARPE-19 hücre hattı kullanılarak her üç formülasyon grubu (ko-kristal, hidrofilik jel, NLT) ile gerçekleştirilmiş in vitro geçiş çalışması. Formülasyonlar etken madde ile karşılaştırılmıştır. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz bağımsız çift yönlü T testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$ olarak gösterilmiştir.

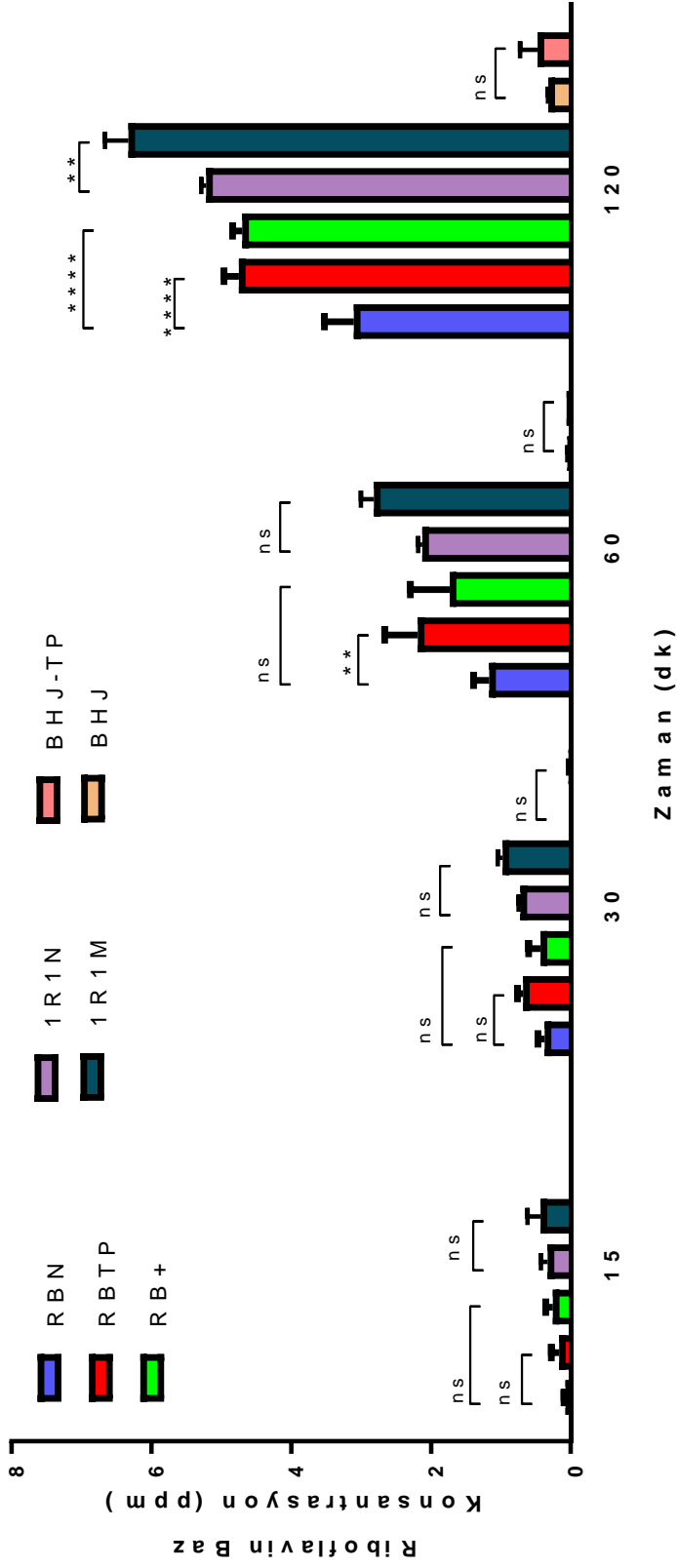


Şekil 4.36. ARPE-19 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiş in vitro geçiş çalışması. Formülasyonlar etken madde ile karşılaştırılmıştır. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz bağımsız çift yönlü T testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamı değil, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$ olarak gösterilmiştir.

4.7. Ex Vivo Çalışmalar

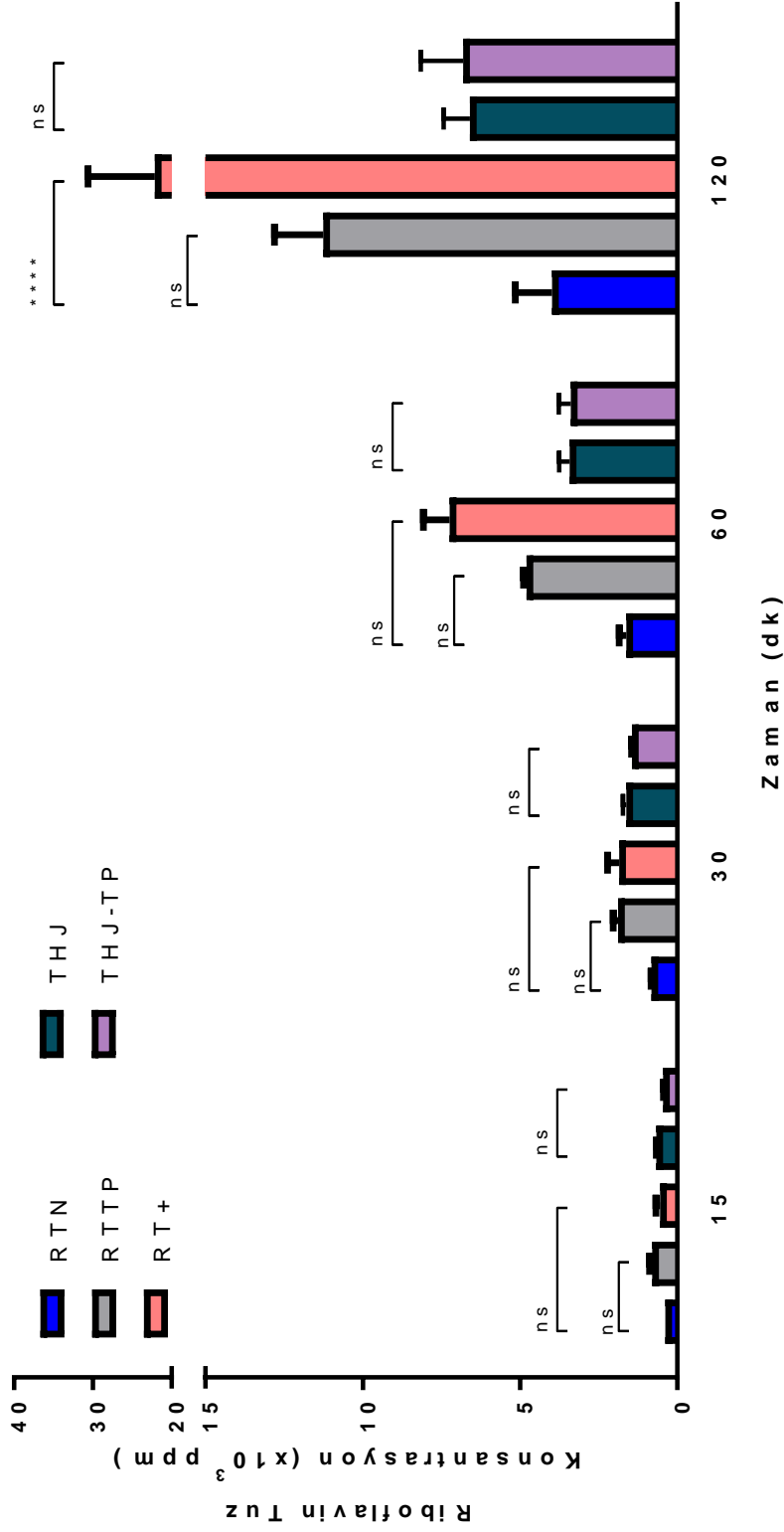
4.7.1. Ex Vivo Geçiş Çalışması

Bölüm 3.6' de belirtildiği gibi riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum ile hazırlanan formülasyonların tavşan korneasından zamana bağlı olarak geçişi değerlendirilmiş ve Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de sunulmuştur.



Şekil 4.37. Riboflavin içeren formülasyonların ex vivo geçiş çalışması bulguları (n= 3, $\bar{X} \pm SS$).

İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamlı değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001 olarak gösterilmiştir.

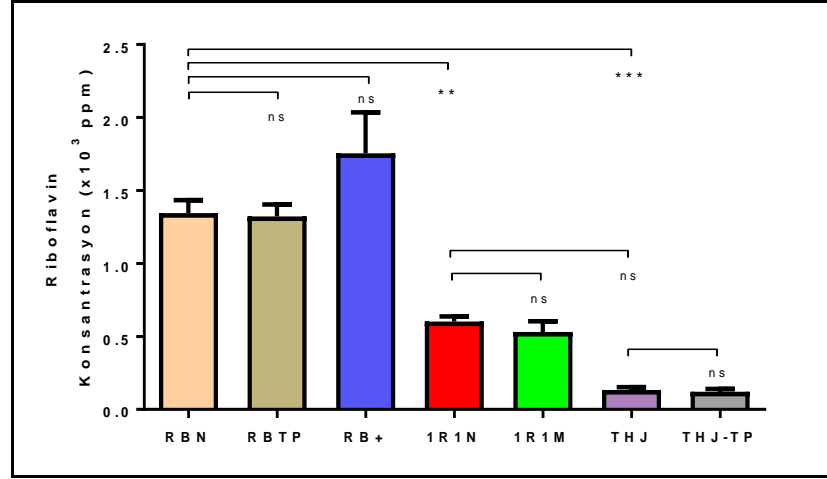


Şekil 4.38. Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ex-vivo geçiş çalışması bulguları. (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

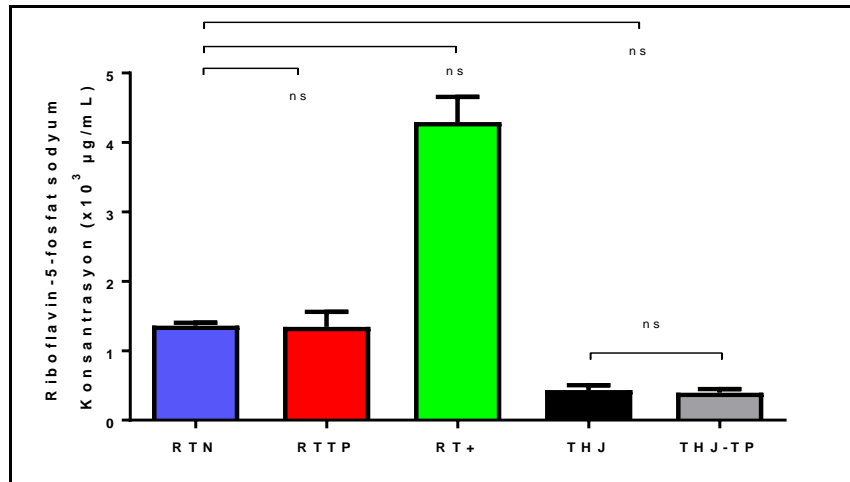
İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamlı değil, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$ olarak gösterilmiştir.

4.7.2. Ex Vivo Korneal Tutulum Çalışması

Bölüm 3.6' de belirtildiği gibi riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum ile hazırlanan formülasyonlarıdaki etken maddelerin tavşan korneasında tutunan konsantrasyonları değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'ta sunulmuştur.



Şekil 4.39. Riboflavin içeren formülasyonların ex vivo korneal tutulum çalışması bulguları. (n= 3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamı değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 olarak gösterilmiştir.

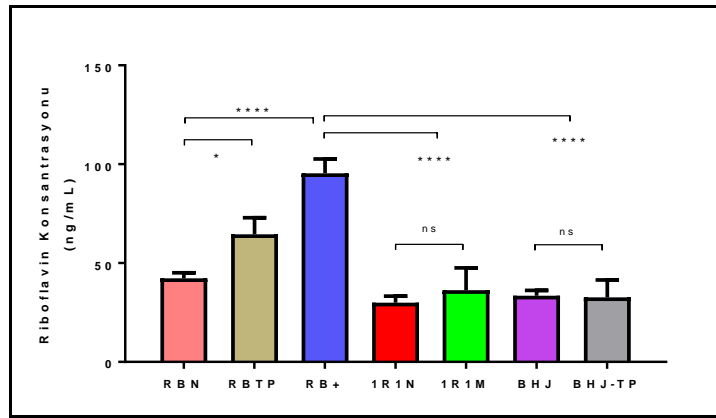


Şekil 4.40. Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ex vivo korneal tutulum çalışması bulguları. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamı değil olarak gösterilmiştir.

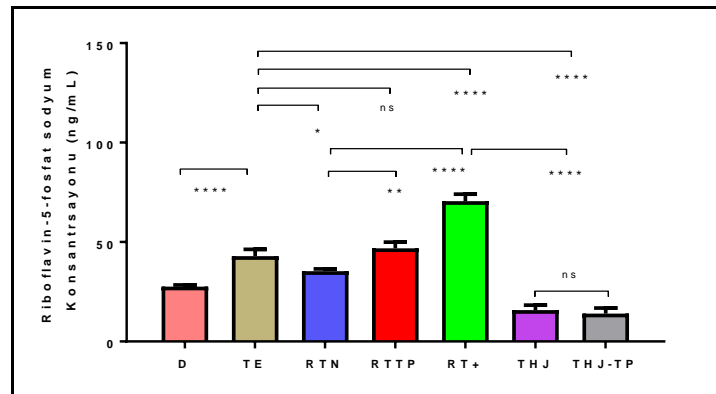
4.8. İn Vivo Çalışmalar

4.8.1. Sıçanlarda İn Vivo Doku Dağılımı Çalışmaları

Bölüm 3.7.1' de belirtildiği üzere sıçan gözlerine topikal olarak formülasyonların uygulanmasından 30 dk. sonra korneada bulunan etken madde miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.41 ve 4.42.' de sunulmuştur.



Şekil 4.41. Riboflavin içeren formülasyonların uygulanması sonucu sıçan kornea dokusunda tespit edilen riboflavin konsantrasyonu değerleri (n= 3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamli değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001 olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ve müstahzarlarının (D:MedioCross Dekstroz, TE:MedioCross Transepitelyal) uygulanması sonucu sıçan kornea dokusunda tespit edilen etken madde konsantrasyonu değerleri (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamli değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001 olarak gösterilmiştir.

4.8.2. Korneanın İn Vivo Biyomekanik Cevabının Değerlendirilmesi

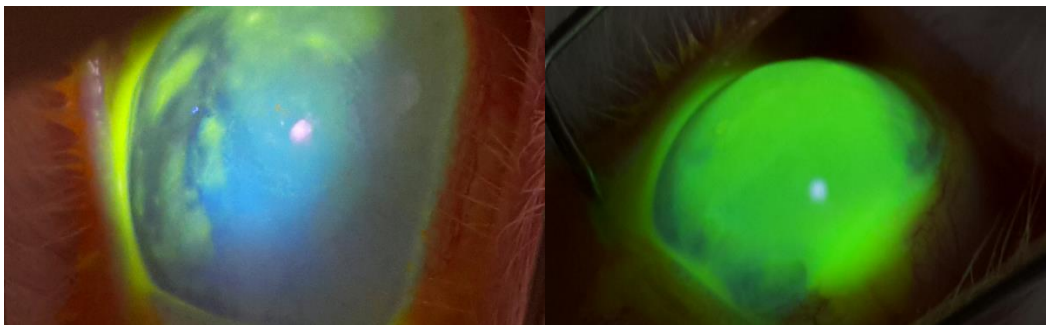
Bölüm 3.7.2' de belirtildiği gibi seçilen formülasyonlar ve 2 adet piyasa preparatı (MedioCrROSS D ve MedioCROSS TE) tavşanlara uygulandıktan sonra tavşan gözlerine UVA ışığı (370 nm, 3 mW/cm²) uygulanmıştır. . Bu uygulamadan 3 hafta sonra tavşanların gözleri çıkarılarak korneal şeritler elde edilmiştir. Bu şeritler TA-XT Plus Texture Analyzer'a yerleştirilerek biyomekanik ölçümleri yapılmış ve uygulanan formülasyonların korneal çapraz bağlanma üzerindeki etkileri biyomekanik ölçüm ile incelenmiştir (Şekil 4.43. - Şekil 4.45.). Elde edilen bulgular Şekil 4.46- Şekil 4.50 arasında sunulmuştur.



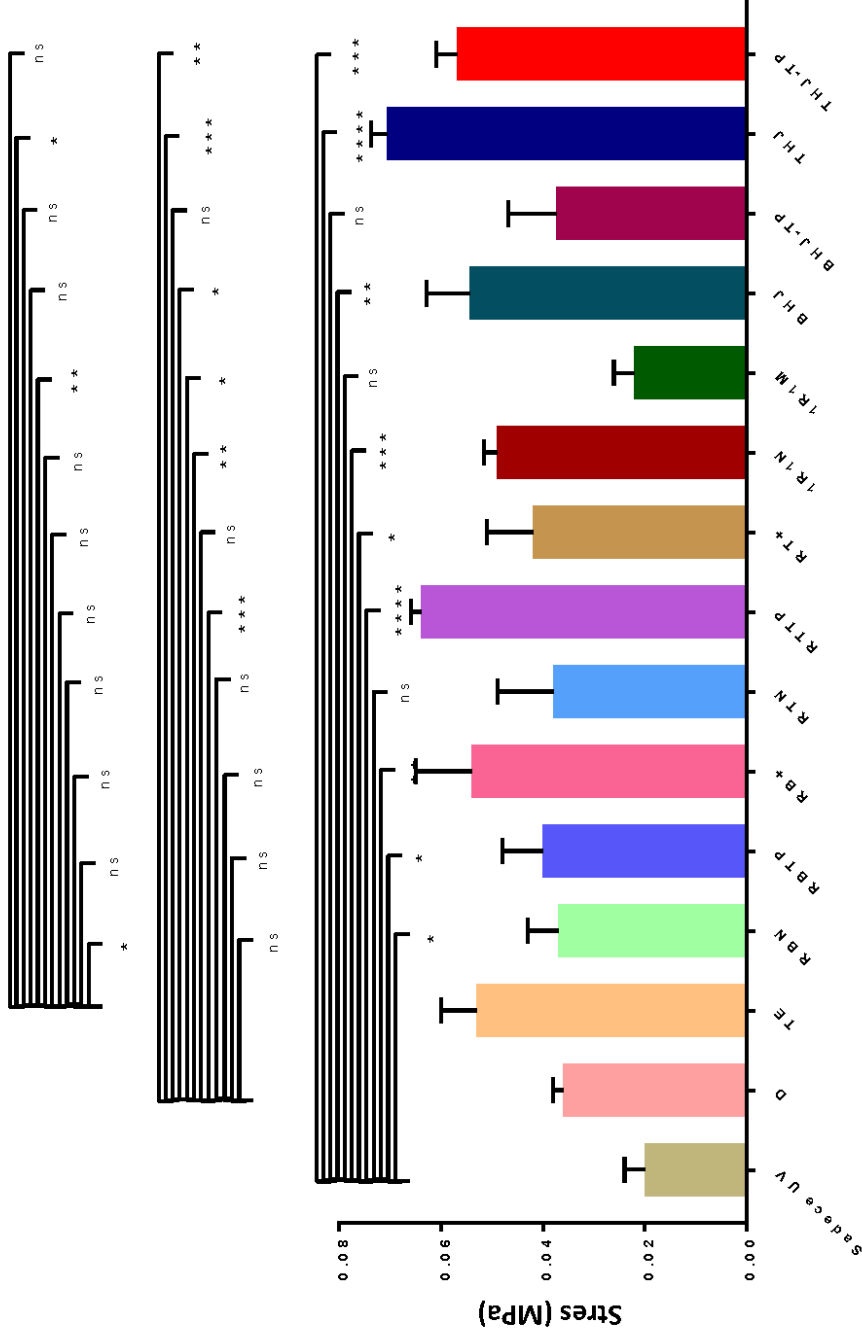
Şekil 4.43. Formülasyon uygulanmamış gruba UV ışığı uygulanmasının fotoğrafı.



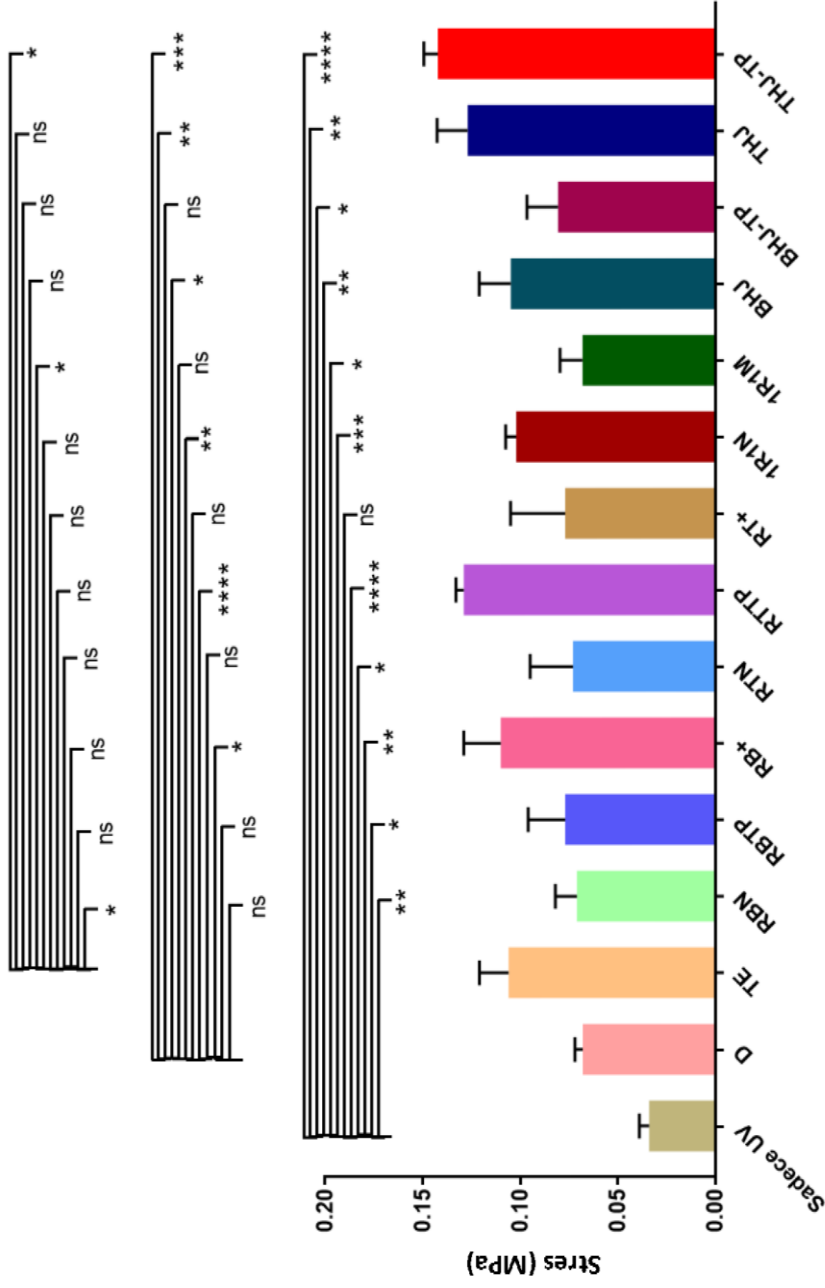
Şekil 4.44. Formülasyon uygulanmış gruba UV ışığı uygulanmasının fotoğrafı.



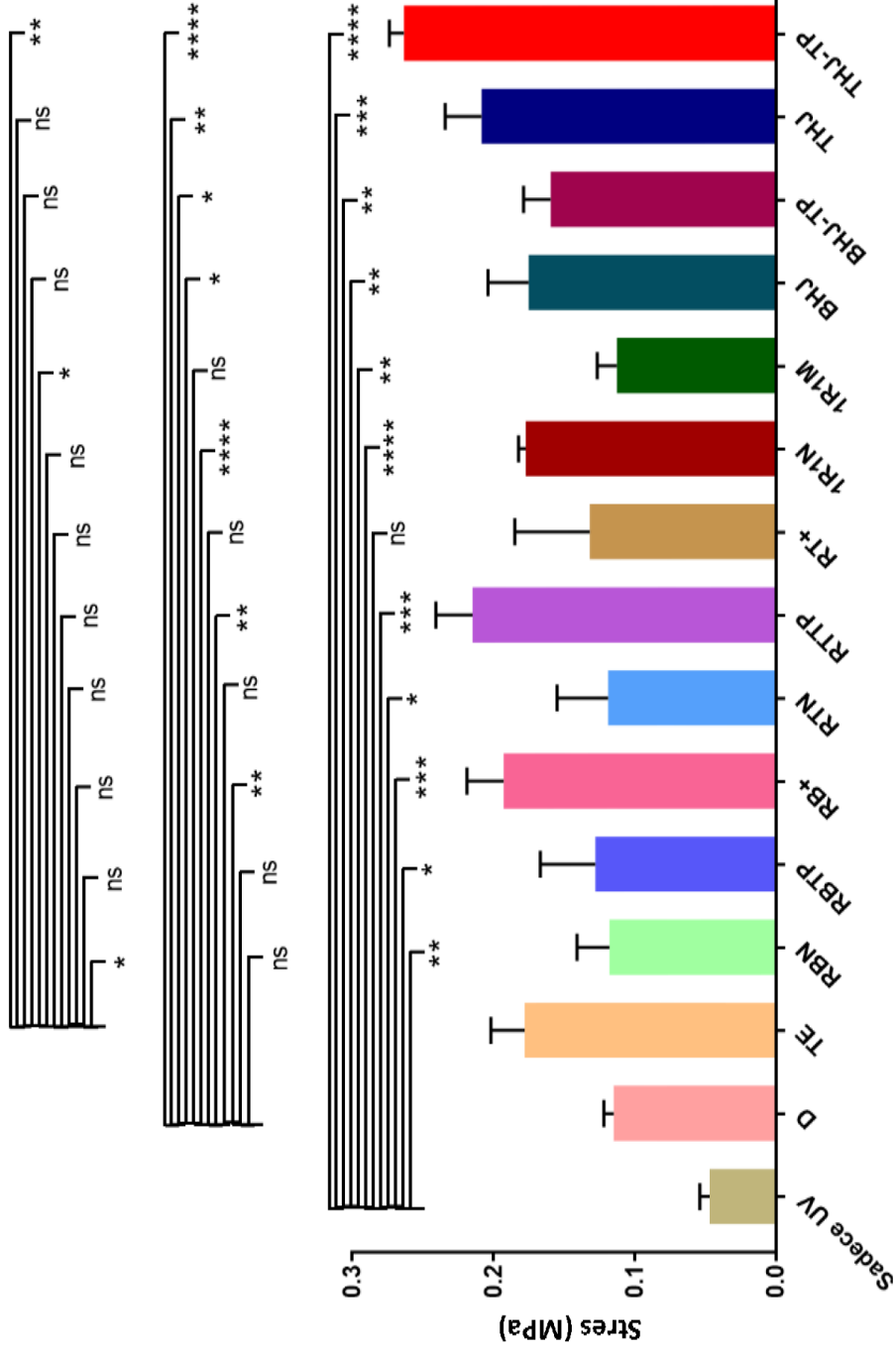
Şekil 4.45. Korneada zamana bağlı ilaç birikimini gösteren fotoğrafı.



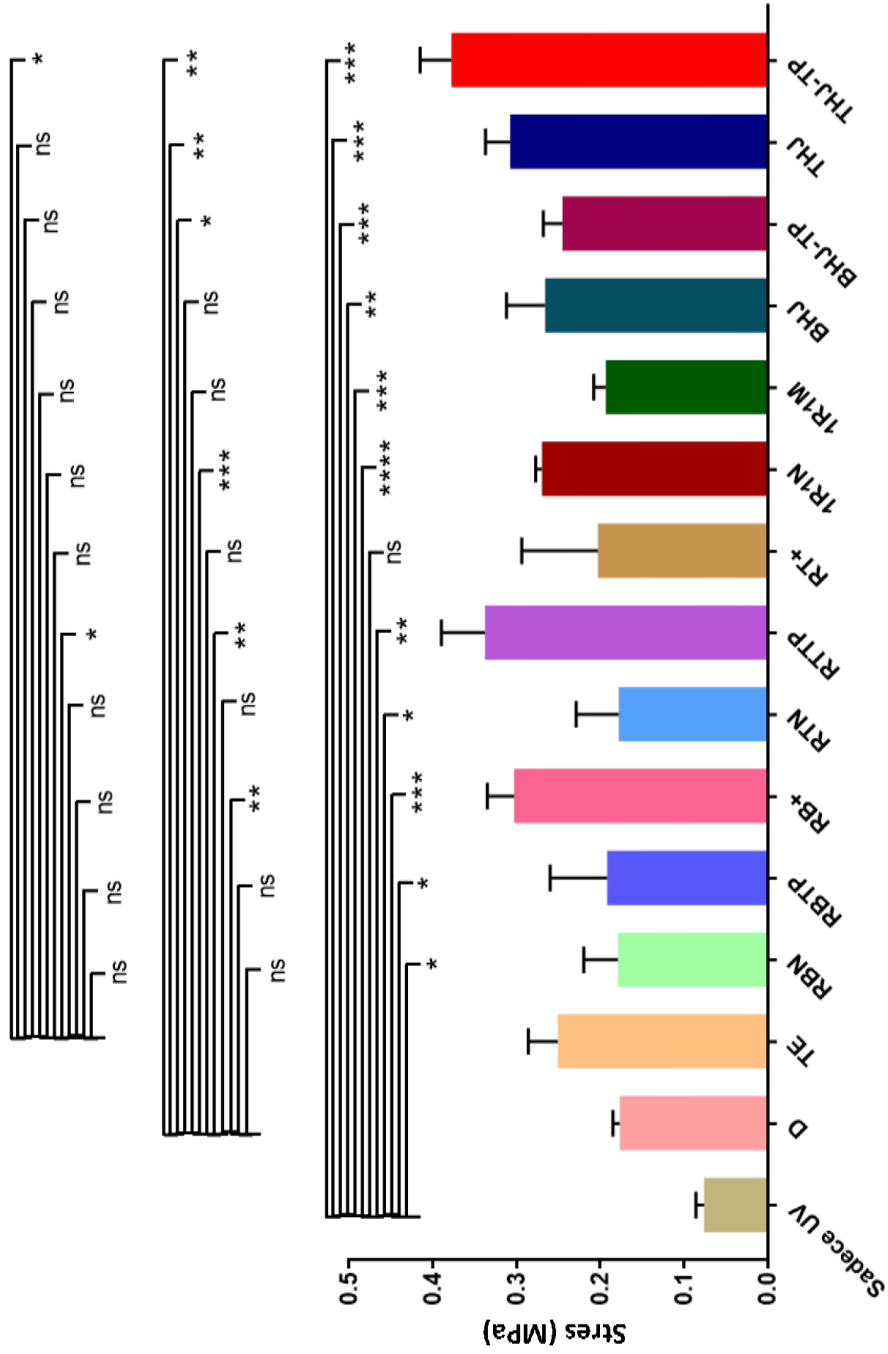
Şekil 4.46. Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %4 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz çift yönlü bağımsız t testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamlı değil, * =p<0,05, ** =p<0,01, *** =p<0,001, **** =p<0,0001 olarak gösterilmiştir.



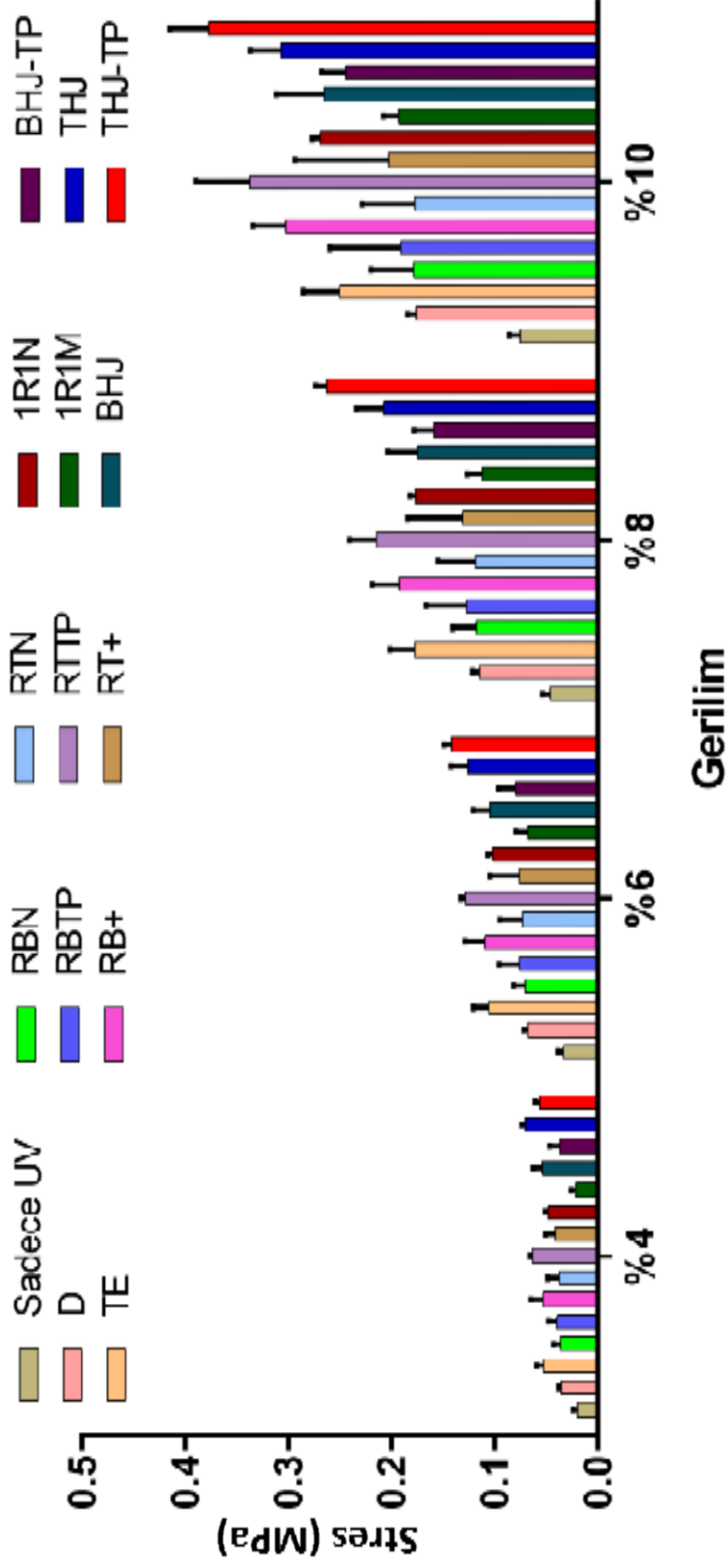
Şekil 4.47. Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %6 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz çift yönlü bağımsız t testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamlılık değil, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$ olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.48. Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %8 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz çift yönlü bağımsız t testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamli değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001 olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Formülasyon ve müstahzar uygulanan tavşan kornea kesitlerinin %10 gerilimde biyomekanik cevaplarının incelenmesi. (n=3, $\bar{X} \pm SS$). İstatistiksel analiz çift yönlü bağımsız t testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamı değil, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$ olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.50. Tüm formülasyonların ve piyasa preparatlarının uygulandığı korneaların farklı gerilim (strain) yüzdelerinde göstermiş olduğu direnç (stres) değerleri ($n=3$, $\bar{X} \pm SS$).

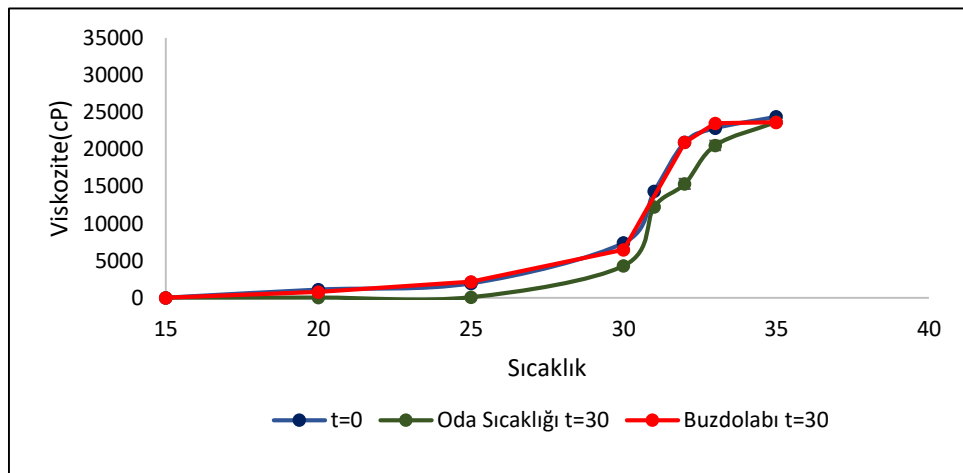
4.9. Stabilité Çalışmaları

Bölüm 3.8’de hazırlanan formülasyonlar üzerinde fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiş Şekil 4.51.-4.57. ve Tablo 4.19.-4.25.’te gösterilmiştir.

4.9.1. Hidrofilik Jel Stabilité Çalışmaları

Tablo 4.19. BHJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

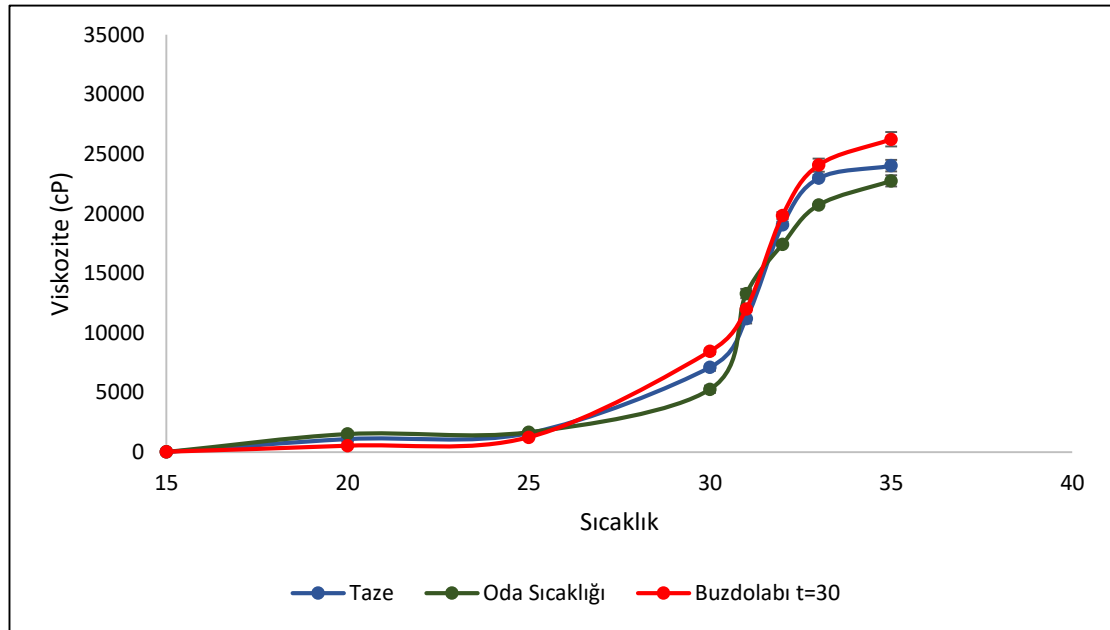
BHJ Numuneler (t=0)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	14,60	843,37	2034,01	7094,23	14287,7	20885,8	23068,6	24656,2
n=2	14,60	1141,03	1885,18	7639,94	14486,1	20935,4	22771	24358,5
n=3	14,40	1339,47	1934,79	7491,11	14287,7	20985	22721,4	24160,1
$\bar{X} \pm SS$	14,53± 0,09	1107,95± 203,87	1951,32± 61,7	7408,42± 230,32	14353,83± 93,52	20935,4± 40,49	22853,67± 153,32	24391,6± 203,87
BHJ Oda Sıcaklığı Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	14,88	24,81	74,41	4167,24	12452,1	15081,4	19596	23713,6
n=2	14,88	29,77	74,41	4233,39	12154,5	14684,6	20885,8	23564,7
n=3	14,88	24,81	74,41	4531,05	12154,5	16272,1	21084,2	23763,2
$\bar{X} \pm SS$	14,88±0	26,46± 2,33	74,41±0	4310,56± 158,23	12253,7± 140,29	15346,03± 674,56	20522± 659,77	23680,5± 84,34
BHJ -4°C Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	19,84	1041,81	1885,18	6647,74	14166,1	20885,8	23664	23763,2
n=2	19,84	446,49	2034,01	6598,13	14062,3	20836,2	23614,4	23664
n=3	19,84	843,37	2579,72	6151,64	13859,3	21084,2	23267,1	23465,5
$\bar{X} \pm SS$	19,84±0	777,22± 247,49	2166,30± 298,57	6465,83± 223,09	14029,2± 217,41	20935,40± 107,14	23515,1± 176,57	23630,90± 123,76



Şekil 4.51. BHJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

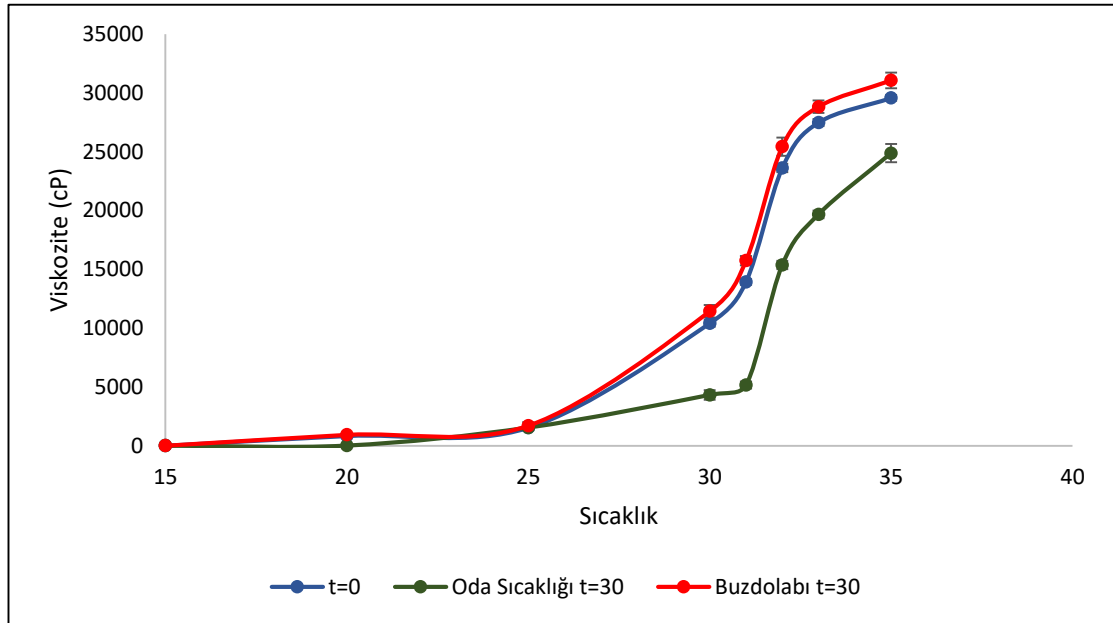
Tablo 4.20. BHJ-TP grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.

BHJ-TP Numuneler (t=0)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	24,81	1141,03	1438,69	6945,4	11112,6	19050,2	22969,4	24705,8
n=2	24,81	1091,42	1488,3	7044,62	11410,3	19397,5	22671,8	23812,8
n=3	24,81	1091,42	1885,18	7391,89	11063	18752,6	23316,7	23564,7
$\bar{X} \pm SS$	24,81±0	1107,95± 23,38	1604,05± 199,81	7127,30± 191,42	11195,30± 135,37	19066,77± 263,53	22985,97± 263,53	24027,70± 490,02
BHJ-TP Oda Sıcaklığı Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	19,84	1537,91	1587,52	4911,39	12948,2	17363,5	20687,4	23366,3
n=2	14,88	1240,25	1885,18	5655,54	13097	17363,5	20737	22671,8
n=3	19,84	1785,96	1537,91	5258,66	13841,2	17561,9	20786,6	22225,3
$\bar{X} \pm SS$	18,18± 2,33	1521,37± 223,09	1670,20± 153,35	5275,19± 304,02	13295,47± 390,64	17429,63± 93,52	20737± 40,49	22754,4± 469,46
BHJ-TP -4°C Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	24,81	446,49	1141,03	8136,04	11708	19794,4	24308,9	25549,2
n=2	24,81	496,1	1240,25	8632,14	12005,6	19496,7	24606,6	27037,5
n=3	24,81	644,93	1339,47	8582,53	12253,7	20240,9	23316,7	26144,5
$\bar{X} \pm SS$	24,81±0	529,17± 84,32	1240,25± 81,01	8450,23± 223,09	11989,10± 223,08	19844± 305,83	24077,40± 551,45	26243,70± 611,63

**Şekil 4.52.** BHJ-TP grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

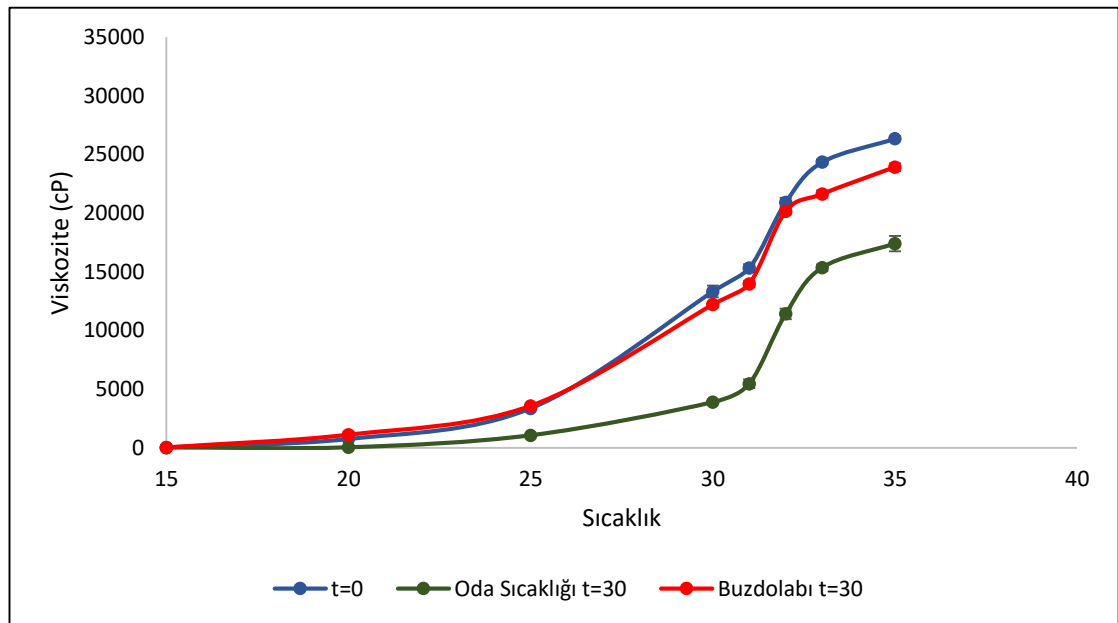
Tablo 4.21. THJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.

THJ Numuneler (t=0)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	14,88	843,37	1537,91	10418,1	13940,4	23614,4	27483,9	29567,6
n=2	14,88	793,76	1736,35	10467,7	14486,1	24011,2	27186,3	29269,9
n=3	14,88	744,15	1240,25	9822,78	13990	23118,3	27930,4	28972,2
$\bar{X} \pm SS$	14,88± 0	1107,95± 40,50	1951,32± 203,87	7408,42± 293,02	14353,83± 246,38	20935,4± 365,27	22853,67± 305,79	24391,6± 243,07
THJ Oda Sıcaklığı Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	14,88	24,81	1488,3	3968,8	5605,93	15676,8	20042,4	25896,4
n=2	14,88	24,81	1686,74	4911,39	4961	15577,5	19744,8	24705,8
n=3	14,88	29,77	1488,3	4117,63	4961	14883	19248,7	24011,2
$\bar{X} \pm SS$	14,88± 0	26,46± 2,33	1554,44± 93,54	4332,60± 413,74	5175,97± 304,02	15379,10± 353,13	19678,63± 327,38	24871,13± 778,45
THJ -4°C Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	19,84	992,2	1785,96	11311,1	15329,5	25152,3	28079,3	30262,1
n=2	14,88	843,37	2034,01	12154,5	16272,1	24656,2	29269,9	31006,3
n=3	14,88	992,2	1339,47	10864,6	15627,1	26491,7	29121,1	31899,2
$\bar{X} \pm SS$	16,53± 2,33	942,59± 70,15	1719,81± 287,37	11443,40± 534,84	15742,90± 393,43	25433,40± 775,25	28823,43± 529,67	31055,87± 669,26

**Şekil 4.53.** THJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

Tablo 4.22. THJ grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi.

THJ-TP Numuneler (t=0)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	24,81	793,76	3224,65	12600,9	14883	20985	24308,9	26442,1
n=2	24,81	843,37	3423,09	13543,5	15676,8	20439,3	24060,9	26045,2
n=3	24,81	595,32	3423,09	13791,6	15379,1	21332,3	24656,2	26541,4
$\bar{X} \pm SS$	24,81 ± 0	744,15 \pm 107,16	3356,94 \pm 93,54	13312 \pm 512,92	15312,97 \pm 327,42	20918,87 \pm 367,55	24342 \pm 244,15	26342,90 \pm 214,37
THJ-TP Oda Sıcaklığı Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	19,84	29,77	1141,03	3819,97	5853,98	11311,1	15379,1	16470,5
n=2	19,84	44,65	1041,81	3770,36	5556,32	10914,2	15676,8	17958,8
n=3	19,84	29,77	992,2	4068,02	4961	12005,6	14982,2	17760,4
$\bar{X} \pm SS$	19,84 ± 0	34,73 \pm 7,01	1058,34 \pm 61,87	3886,11 \pm 130,20	5457,10 \pm 371,24	11410,30 \pm 451,04	15346,03 \pm 284,53	17396,57 \pm 659,81
THJ-TP -4°C Numuneler (t=30)								
cP	15°C	20°C	25°C	30°C	31°C	32°C	33°C	35°C
n=1	24,81	744,15	3671,14	12452,1	14287,7	20092,1	21927,6	24308,9
n=2	24,81	1141,03	3373,48	12253,7	13642,8	20488,9	21729,2	23961,6
n=3	24,81	1438,69	3671,14	11906,4	13940,4	19844	21233,1	23515,1
$\bar{X} \pm SS$	24,81 ± 0	1107,95 \pm 284,50	3571,92 \pm 140,31	12204,07 \pm 225,52	13956,97 \pm 263,53	20141,67 \pm 265,60	21629,97 \pm 292,08	23928,53 \pm 324,09

**Şekil 4.54.** THJ-TP grubu hidrofilik jellerin farklı sıcaklıktaki stabilitesi (n=3, $\bar{X} \pm SS$).

4.9.2. NLT Stabilite Çalışmaları

Tablo 4.23. NLT'lerin oda sıcaklığındaki stabiliteleri.

RBN Oda Sıcaklığı (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	221,3	0,181	-7,17	222±2,23	0,164±0,02	-7,24±0,06
n=2	224,5	0,133	-7,29			
n=3	220,2	0,179	-7,26			
RBTP Oda Sıcaklığı (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	203,1	0,223	-11,3	204,8±1,50	0,225±0,01	-11,4±0,17
n=2	205,6	0,24	-11,6			
n=3	205,8	0,213	-11,3			
RB+ Oda Sıcaklığı (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	89,27	0,44	28	91,1±1,60	0,441±0,01	27,2±1,30
n=2	92,06	0,437	25,7			
n=3	92,04	0,445	28			
RTN Oda Sıcaklığı (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	281,5	0,375	-1,66	294,9±18,55	0,358±0,05	-1,64±0,09
n=2	287,2	0,302	-1,54			
n=3	316,1	0,396	-1,72			
RTTP Oda Sıcaklığı (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	261,3	0,21	-8,68	264,1±2,42	0,210±0,01	-8,36±0,34
n=2	265,6	0,219	-8			
n=3	265,4	0,201	-8,39			
RT+ Oda Sıcaklığı (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	232,1	0,332	17,6	212,1±35,25	0,393±0,11	17,2±0,47
n=2	232,8	0,333	17,4			
n=3	171,4	0,514	16,7			

P.B.:Partikül büyüklüğü, Z.P.: Zeta potansiyeli

Tablo 4.24. NLT'lerin +4°C'deki sıcaklığındaki stabiliteleri.

RBN +4°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	69,3	0,173	-3,71	70,67±1,33	0,180±0,01	-4,08±0,57
n=2	70,73	0,19	-3,79			
n=3	71,97	0,177	-4,74			

RBTP +4°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	255,9	0,192	-7,04	260,5±3,97	0,198±0,02	-6,73±0,48
n=2	262,4	0,186	-6,17			
n=3	263,1	0,216	-6,99			

RB+ +4°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	176,6	0,213	32	176,9±0,23	0,201±0,01	32,5±0,55
n=2	177	0,205	33,1			
n=3	177	0,185	32,4			

RTN +4°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	557,2	0,274	-3,07	613,2±45,49	0,262±0,02	-3,02±0,16
n=2	600,8	0,233	-3,16			
n=3	663,6	0,279	-2,84			

RTTP +4°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	407,2	0,205	-6,23	414,8±24,12	0,223±0,02	-6,14±0,07
n=2	441,8	0,255	-6,12			
n=3	395,4	0,21	-6,08			

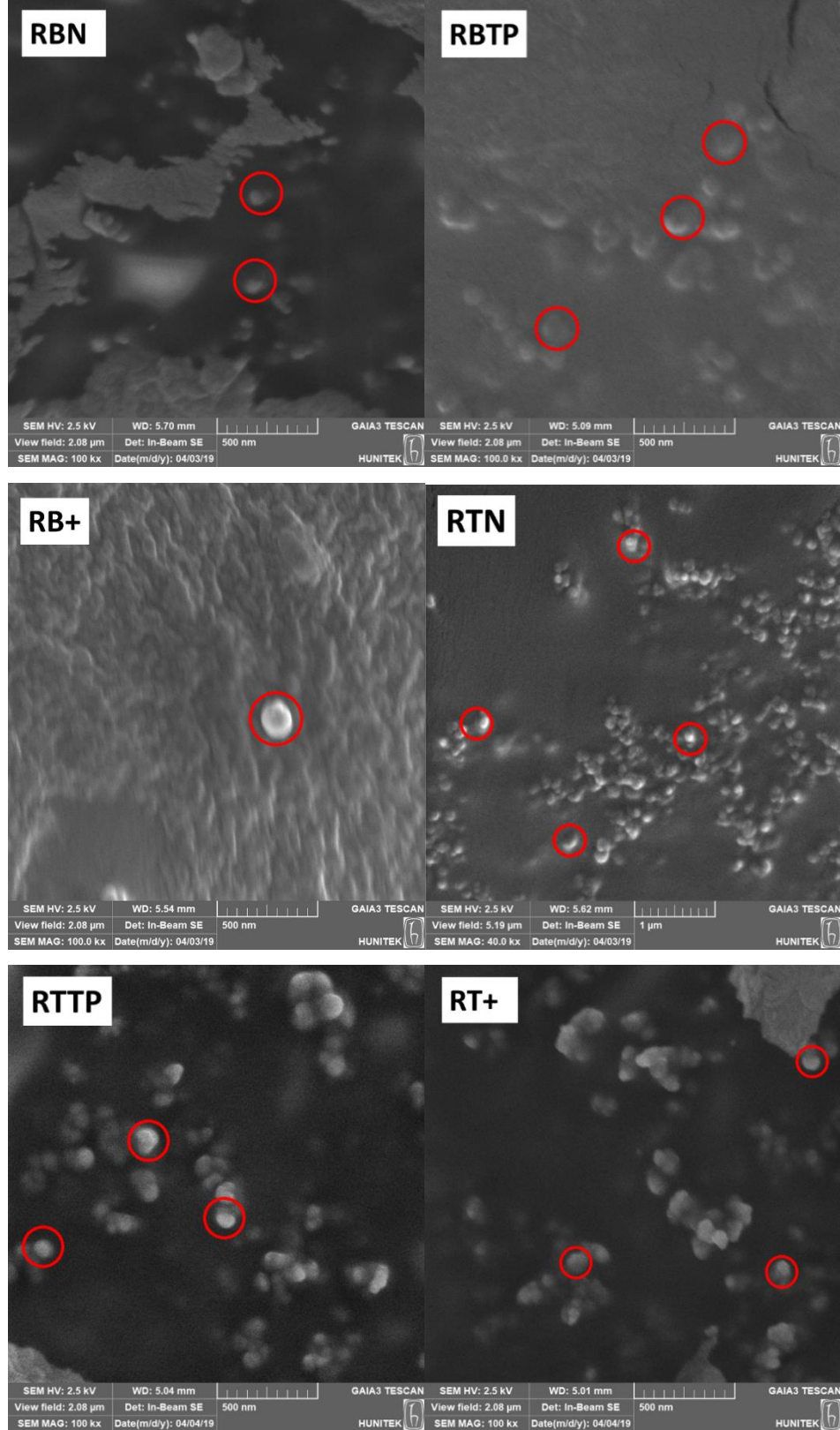
RT+ +4°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	143,4	0,23	22,4	143,1±2,52	0,227±0,01	22,6±0,52
n=2	145,4	0,234	22,2			
n=3	140,4	0,218	23,2			

P.B.:Partikül büyüklüğü, Z.P.: Zeta potansiyeli

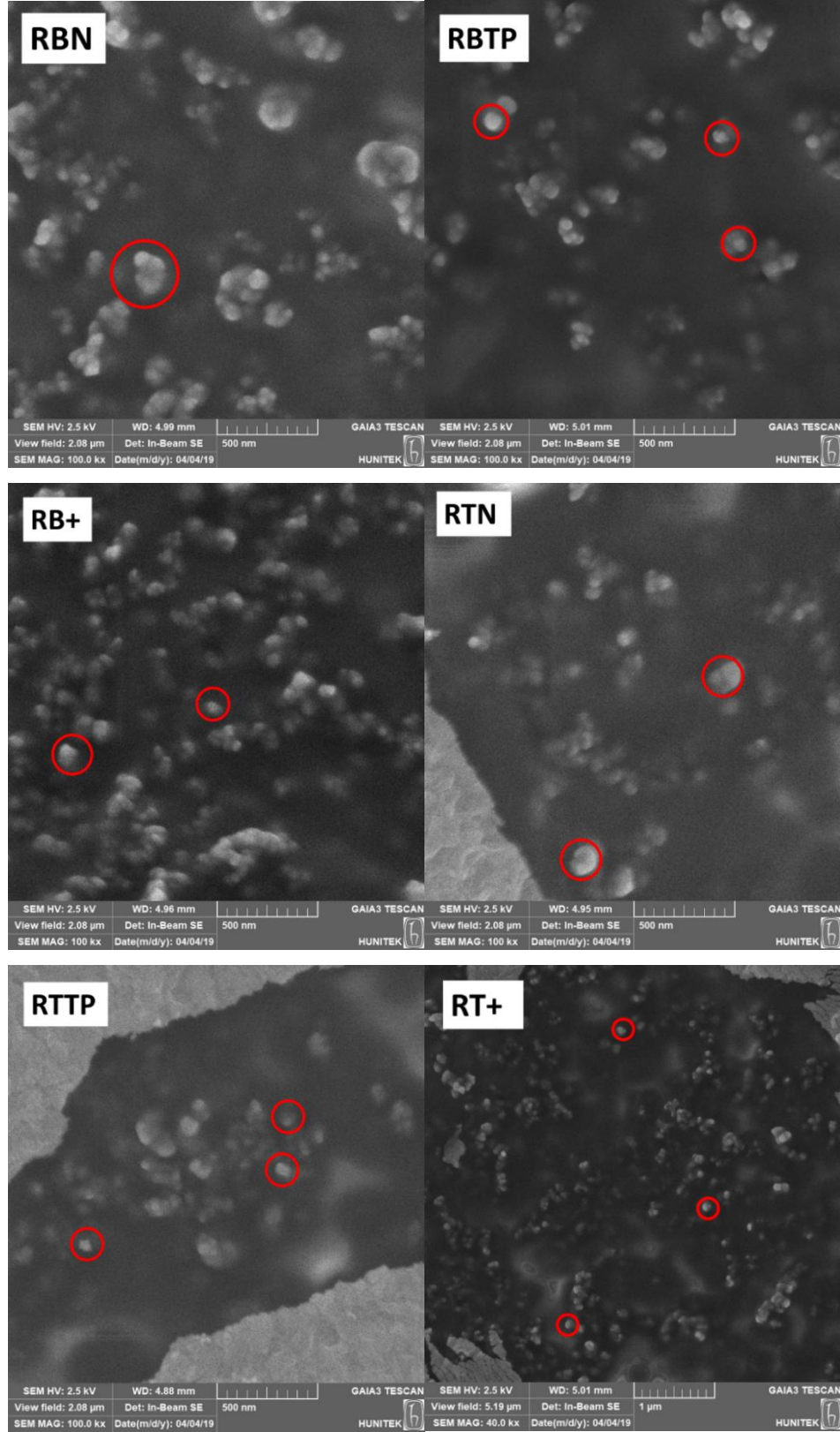
Tablo 4.25. NLT'lerin -20°C'deki sıcaklığındaki stabiliteleri.

RBN -20°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	288,6	0,261	-14,1	291,4±3,02	0,261±0,01	-14,7±0,55
n=2	294,6	0,256	-15			
n=3	290,4	0,266	-15,1			
RBTP -20°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	396,3	0,419	-12,1	381,8±12,59	0,401±0,01	-13,1±1.00
n=2	375,4	0,398	-14,1			
n=3	373,7	0,386	-13			
RB+ -20°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	197,1	0,275	46,3	196,8±1,96	0,286±0,02	46±0,52
n=2	194,7	0,314	45,4			
n=3	198,6	0,27	46,3			
RTN -20°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	813,2	0,689	-5,61	840,2±82,72	0,685±0,073	-5,89±0,410
n=2	933	0,756	-5,7			
n=3	774,3	0,61	-6,36			
RTTP -20°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	629,4	0,544	-0,9	642,4±24,04	0,537±0,01	-1,30±0,35
n=2	628,8	0,525	-1,61			
n=3	669	0,541	-1,38			
RT+ -20°C (t=30)						
	P.B. (nm)	PDI	Z.P. (mV)	P.B. (nm) $\bar{X}\pm SS$	PDI $\bar{X}\pm SS$	Z.P. (mV) $\bar{X}\pm SS$
n=1	332,8	0,453	28,8	360,1±24,63	0,405±0,04	31,8±2,63
n=2	380,6	0,385	33,8			
n=3	367	0,378	32,7			

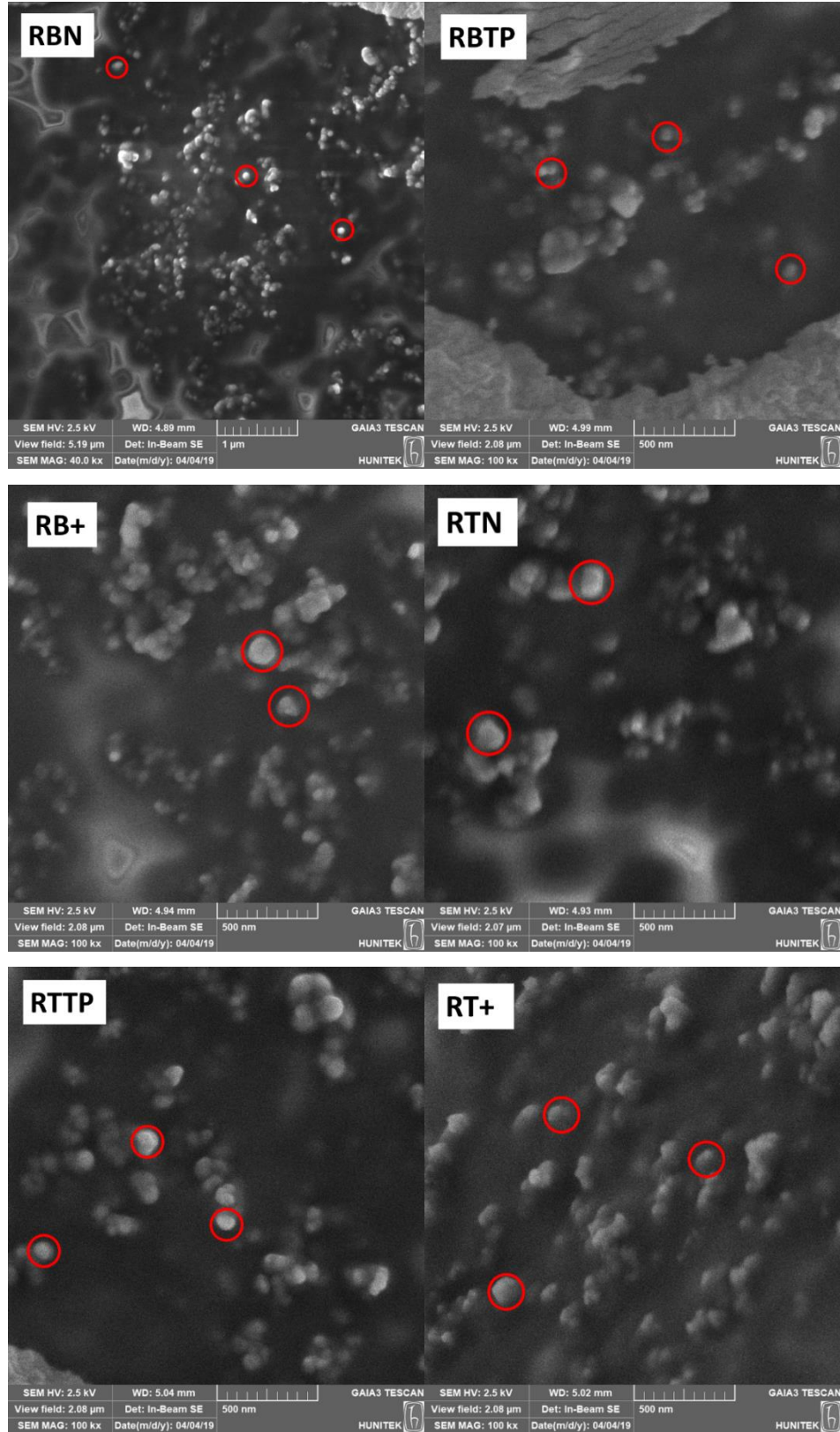
P.B.:Partikül büyüklüğü, Z.P.: Zeta potansiyeli



Şekil 4.55. NLT formülasyonlarının oda sıcaklığındaki SEM görüntüleri.



Şekil 4.56. NLT formülasyonlarının +4°C'deki sıcaklığındaki SEM görüntüleri.



Şekil 4.57. NLT formülasyonlarının -20°C 'deki sıcaklığındaki SEM görüntüleri.

5. TARTIŞMA

İlaç taşıyıcı sistem araştırmalarında oftalmik ilaç taşınması, gözün birçok statik (korneal epitel, stroma, retina) ve dinamik bariyerleri (lakrimal sıvı sekresyonu, koroid ve konjonktival kan akışı) içermesi ve karmaşık yapısı nedeniyle en zorlu alanlardan biridir (206).

Keratokonus, korneanın incilmesi, sivrileşerek koni şekli alması ile meydana gelen, ilerleyici özellikte dejeneratif bir hastalıktır. Bu dejenerasyon, hastada ciddi görme kayıplarına yol açmakta ve etkin tedavinin sağlanamadığı durumlarda kornea nakli gerektiren ağır tablolar meydana gelebilmektedir.

Keratokonus hastalığında, korneanın stroma tabakasında bulunan kolajen lifleri parçalanarak korneanın biyomekanik gücü zayıflamaktadır. Hastalığın tedavisinde kullanılan yöntemler arasında, “korneanın çapraz bağlanması” son zamanlarda ümit vadeden bir yöntemdir. Kornea çapraz bağlanması tedavisinde, kolajen lifleri arasındaki çapraz bağlanma derecesi, B2 vitamini ve aynı zamanda fotoduyarlılaştırıcı (“photosensitizer”) bir madde olan riboflavin uygulanmasının ardından UVA ışığı uygulaması ile artırılmaktadır. Riboflavinin kornea epitelinden geçememesi nedeniyle, klinikte bu yöntemde, ilk olarak göz üzerindeki epitel tabakası cerrahi işlem ile kazınarak uzaklaştırılmaktadır (“Epi-Off” Tedavi). Tedavide en yaygın olarak kullanılan yöntem olmasına rağmen bu yöntemde, epitelin cerrahi işlem ile uzaklaştırılmasının birçok komplikasyonlara neden olduğu ve tedavinin başarısını olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Bu yöntemin sakıncaları; mikrobiyal enfeksiyon riski, kornea erimesi nedeniyle keratit oluşumu, görme netliğinin geri dönüşümsüz olarak azalmasına neden olan korneal skar oluşumu, şiddetli ağrı, topikal antibiyotik, steroid, nonsteroidal antiinflamatuvar veya lubrikan ilaç kullanma gerekliliği olarak sıralanabilir (207).

Riboflavin gibi birçok ilaç da prekorneal ve korneadaki engeller nedeniyle göz dokularına istenen düzeyde ulaşamamaktadır. İlaçların kornea epitelinden geçişlerini artırarak oküler biyoyararlanımı iyileştirmek üzere literatürde kullanılan yaklaşımlar; ilacın fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi (*lipofilisitenin artırılması vb*), *penetrasyon artırıcıların kullanılması*, formülasyon viskozitesinin artırılması,

nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, *formülasyona katyonik yük kazandırılması* ve mukoadhezif formülasyonların hazırlanması vb. olarak sıralanabilir (31).

Girişimsel bir teknik olan klasik kornea çapraz bağlanması (“Epi-off”) yönteminin sakıncalarını ortadan kaldırmak üzere, riboflavinin korneya epitel uzaklaştırılmadan (“Epi-on”) taşınması için birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda emülsiyon gibi lipid içeren formülasyonların hazırlanması, siklodekstrin, benzalkonyum klorür, EDTA, alkol gibi penetrasyon artırıcı maddelerin formülasyonlara ilave edilmesi, maddenin değişik tuzları veya baz halde uygulanması, lipofilik ester ön ilaç formları veya lipofilik ester lipid konjugatlarının hazırlanması gibi yaklaşımlar denenmiş olup, riboflavinin korneaya penetrasyonunda bir miktar artış sağlanmıştır. Ancak, girişimsel teknik ile elde edilen sonuçların daha başarılı olduğu görülmektedir (208).

Son zamanlarda araştırmacılar ve klinisyenler keratokonusunun girişimsel olmayan, etkin ve güvenli tedavisi için yeni formülasyon tasarımlarına ihtiyaç olduğunu bildirmiştir. Bu yaklaşımlarda hedef riboflavinin büyük bir fizyolojik engel olan kornea epitelini geçerek etkin miktarda stromada birikmesinin sağlanmasıdır. Bu hedefe ulaşmada literatürde denenmemiş, rasyonel formülasyon yaklaşımlarının kullanılması optimum bir bakış açısı olabilir. Bu nedenle bu doktora tez çalışmasının amacı,

i) ilaçların kornea epitelini geçmesinde önemli katkı sağlayan artmış çözünürlük ve lipofilisite faktörlerini birarada uygulamayı amaçlayan kimyasal yaklaşım: baz (lipofilik) haldeki riboflavinin mannitol, dekstroz ve trehaloz gibi yardımcı maddeler ile ko-kristal formlarının oluşturulmasıyla lipofilitesinin azalmadan çözünürlüğünün artırılması ile çözelti formülasyonunun geliştirilmesi,

ii) ilaçların kornea epitelini geçmesinde önemli katkı sağlayan prekorneal alanda uzun süre kalış (artmış viskozite veya nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistem ile) faktörünü temel alan yaklaşım: bu yaklaşım kapsamında riboflavinin baz (lipofilik) veya tuz (hidrofilik) yapıda olmasının ve hidrofilik (termosensitif jel) veya hidrofobik

(nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT)) sistemler ile taşınmasının uzun süre kalış yaklaşımına ilave bir katkısının olup olmayacağını araştırılması, olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen formülasyonlar üzerinde yapılacak in vitro karakterizasyon, ex vivo ve in vivo çalışmalar ile uygun formülasyonlar belirlenecektir.

5.1. Riboflavin ve Riboflavin-5-Fosfat Sodyum'un Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Literatürde hem riboflavin hem de riboflavin-5-fosfat sodyum'un miktar tayini için UV spektrofotometre, spektrofotometre, kütle spektrometresi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) , kapiler elektroforez ve mikrobiyolojik yöntemler gibi farklı yöntemler bulunmaktadır (209). Tez kapsamındaki in vitro çalışmalar için, bu yöntemler içinde düşük miktarlardaki hem riboflavin hem de riboflavin-5-fosfat sodyum'u yüksek hız, yüksek hassasiyet ve doğruluk ve ile en hassas ve özgül bir şekilde saptayan yöntem olması nedeni ile HPLC yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Analitik yöntem validasyonları hem riboflavin hem de riboflavin-5-fosfat sodyum için ayrı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulguların değerlendirilmesinde ICH Q2/R1 "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" kılavuzu (210) esas alınmıştır.

Riboflavin'in miktar tayini Bölüm 4.1.1'de belirtilen şekilde Eksitasyon:420 nm/ Emisyon: 530 nm dalga boyunda, 6 farklı konsantrasyonla gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılacak analizlere uygun olması için geniş bir konsantrasyon aralığı (0,1-20 µg/mL) seçilerek çalışılmıştır. Çalışılan konsantrasyon aralığında yapılan hesaplamalar sonucunda analitik yöntem validasyon parametrelerinden biri olan doğrusallık için R^2 değeri 1 olarak bulunmuştur. R^2 değeri 1'e ne kadar yakın olursa yöntemin güvenilirliği o kadar artmaktadır (180). Yapılan özgüllük çalışması ile formülasyon içinde kullanılan diğer maddelerin riboflavin'in miktar tayini üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Yöntem validasyonu kapsamında; doğrusallık, doğruluk kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik), saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) incelenmiştir. Hesaplanan saptama sınırı ve

tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 0,0006 µg/mL ve 0,002 µg/mL olarak bulunmuştur. İlgili kılavuza (*ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*) göre analitik yönteme ilişkin validasyon parametrelerinin belirlenen varyasyon katsayılarının (VK) %2'nin altında olması beklenmekte ve geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olması gerekmektedir (210). VK'nın %2'nin altında olması, yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerlerinin kabul edilebilir  l de farklılık gösterdiğini belirtmektedir. Riboflavin için geliştirilen analitik yöntemde tüm varyasyon katsayıları %2'nin altında olup geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olduğu gösterilmiştir. Bu da ilgili yöntemin hassas ve tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

Riboflavin-5-fosfat sodyum'un miktar tayini Bölüm 4.1.2'de belirtilen şekilde Eksitasyon:440 nm/ Emisyon: 530 nm dalga boyunda, 6 farklı konsantrasyonla gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılacak analizlere uygun olması için geniş bir konsantrasyon aralığı (2,5-20 µg/mL) seçilerek çalışılmıştır. Çalışılan konsantrasyon aralığında yapılan hesaplamalar sonucunda analitik yöntem validasyon parametrelerinden biri olan doğrusallık için R² değeri 0,9993 olarak bulunmuştur. R² değeri 1'e ne kadar yakın olursa yöntemin güvenilirliği o kadar artmaktadır (180). Yapılan  zg ll k çalışması ile formülasyon içinde kullanılan diğer maddelerin riboflavin-5-fosfat sodyum'un miktar tayini üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Yöntem validasyonu kapsamında; doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik), saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) incelenmiştir. Hesaplanan saptama sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 0,002 µg/mL ve 0,007 µg/mL olarak bulunmuştur. İlgili kılavuza (*ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*) göre, analitik yönteme ilişkin validasyon parametrelerinin belirlenen varyasyon katsayılarının (VK) %2'nin altında olması beklenmekte ve geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olması gerekmektedir (210). VK'nın %2'nin altında olması, yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerlerinin kabul edilebilir  l de farklılık gösterdiğini belirtmektedir. Riboflavin-5-fosfat sodyum için geliştirilen analitik yöntemde tüm varyasyon katsayıları %2'nin altında olup geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında

olduğu gösterilmiştir. Bu da ilgili yöntemin hassas ve tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

5.2. Ko-Kristal Formülasyonları

5.2.1. n Denemeler için çözünürlük alışmaları

Tez çalışmasında farmasötik ko-kristallerin hazırlanması için literatürde sıklıkla kullanılan (211-213) ko-kristal maddeleri olan trehaloz, dekstroz, mannitol ve nikotinamidin kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde bu maddelerin ko-kristal formülasyonlarının hazırlanmasında başlıca kullanılan su veya organik çözücülerde çözünürlük sorunu olmadığı bildirildiğinden, n denemelerde znrlğu hakkında sınırlı bilgi olan riboflavin üzerinde durulmuştur. Bunun için ilk olarak belirli miktarda riboflavin ko-kristal hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan çözücü veya çözücü karışımları (su, 0,1N NaOH zeltisi, etanol, etil asetat, dimetil formamid, metilen klorür, propanol, metanol, asetonitril, dimetil sülfoksit (DMSO) veya karışımları) içinde zlmeye çalışılarak görsel inceleme yapılmıştır. Bu inceleme sonunda 40 mg riboflavinin sadece 20 mL DMSO veya 0,1N NaOH çözeltisinde çözündüğü tespit edilmiştir. Riboflavin her ne kadar suda çözünen vitaminler grubunda yer alsada keratokonus tedavisinde kullanıldığı oranda suda ve birçok çözücüde çözünmemektedir (183).

Çözücü seçimi çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda ko-kristal formülasyonlarının hazırlanması için n denemelere geçilmiştir. Bunun için, DMSO'nun yüksek kaynama derecesi nedeniyle formülasyondan evaporasyonla uzaklaşması oldukça zor olacağından 0,1 N NaOH ile denemelere başlanmıştır. Ancak yapılan HPLC çalışmalarında, riboflavinin 0,1N NaOH içinde 20 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisinde, ilk bir saat içerisinde yaklaşık % 8,5'inin parçalandığı tespit edilmiş ve bu bulgu literatür ile uyumlu bulunmuştur (161). Bu nedenle çalışmalara DMSO ile devam edilmiştir. Buna ilave olarak, riboflavin asetonitril, etanol ve metanolde 40 mg/20 mL konsantrasyonda çözünmesi de bu çözücülerin yüksek miktarı (500 mL) kullanılarak 40 mg riboflavinin çözünmesi sağlanmış ve bazı n formülasyon denemeleri bu çözücülerle gerçekleştirilmiştir (bkz Tablo 3.4).

5.2.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC) Çalışmaları

Ko-kristal gibi yapılarda, etken maddenin kristal özelliklerinin değişmesi sonucunda fizikokimyasal özelliklerinde değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimlerden biri de erime noktasında meydana gelen değişimlerdir (214). DSC termogramlarında yeni oluşan pikler ve/veya fiziksel karışımda oluşan piklerin kaybolması gibi farklılıklar kristal yapısındaki değişiklikleri belirtebilir. Bu değişikliklerin tespiti ko-kristal oluşumunun doğrulanmasında sıklıkla başvurulan değerlendirme şekillerindedir. DSC çalışmalarında ilk olarak yöntem denemeleri yapılmıştır. En umut vadeden karışım olan riboflavin-nikotinamid (183) farklı ko-kristal hazırlama yöntemleri ile denenmiştir.

Şekil 4.3'te riboflavin ve ko-kristal maddelerinin saf haldeki DSC termogramları verilmiştir. Elde edilen bu termogramlar literatürde riboflavin (215), mannitol (216), nikotinamid (217) ve trehaloz (218) için verilen termogramlar ile uyumlu bulunmuştur. Bir birim mol riboflavin ile bir birim mol nikotinamid içeren ve farklı hazırlama teknikleri ile hazırlanan ko-kristal formülasyonlarına ait bulgular Şekil 4.4.'te sunulmuştur. Bulgular incelendiğinde, DMSO kullanılarak liyofilizasyon ile hazırlanan grupta nikotinamid pikinin tamamen kaybolarak yeni bir pik oluşumunun meydana geldiği gözlenmiştir. Havan ve bilyeli değirmen kullanılarak yapılan doğrudan karıştırma ve çözücü yardımıyla karıştırma işlemi ile hazırlanan gruplarda piklerde bir değişim meydana gelmemiştir. Bu durum, liyofilizasyon ile çözücü uçurma yönteminin riboflavin ko-kristallerinin hazırlanması için daha uygun olduğunu göstermiş ve diğer formülasyon gruplarında da bu yöntemin uygulanmasına karar verilmiştir.

Şekil 4.5. incelendiğinde trehaloz ve dekstroza hazırlanan gruplarda yeni bir pik oluşumuna rastlanmadığı görülmektedir. Mannitolün kullanıldığı formülasyon grubu değerlendirildiğinde, mannitol ve riboflavin piklerine rastlanmakla birlikte 125°C civarında yeni bir pik meydana geldiği görülmektedir. Bu durum yeni bir yapının (ko-kristal) oluştuğunu düşündürmektedir. Bir kısım mol riboflavin ile iki kısım mol nikotinamid'in oluşturduğu grafik incelendiğinde, 1R1N örneğinde oluşan pikin yine oluştuğu ve riboflavinin pikinin daha küçüldüğü görülmektedir.

5.2.3. X Işını Kristalografisi (XRD) Sonuçları

X Işını Kristalografisi (XRD) kristal yapıda olan bir maddenin X-ışını demetlerini kendine has bir şekilde kırmasına dayanan bir analiz yöntemidir. Ko-kristal formülasyonlarında, etken madde ve ko-kristal maddesinin kristal yapılarından farklı bir kristal dizilimi meydana geldiğinden kendine has bir XRD spektrumu meydana getirmektedir. Bu nedenle XRD analizi ko-kristal doğrulama çalışmalarında en çok kullanılan yöntemlerden biridir (219).

Şekil 4.6.'da etkin madde, mannitol ve nikotinamidin XRD spektrumları verilmiştir. Bu spektrumlarla literatürde riboflavin (220), mannitol (221) ve nikotinamid (222) için verilen XRD spektrumları uyumlu bulunmuştur.

Şekil 4.7'de 1 kısım mol riboflavin ve 1 kısım mol mannitolün farklı çözücüler ve hazırlama şekilleri kullanılarak elde edilen yapılarının XRD sonuçları verilmektedir. 1R1M Liyo grubu için, 36°'de yeni bir pik gözlenirken 32°'de fiziksel karışımda gözlenen pik gözlenmemiştir. Oluşan değişimler kristal yapıda ortaya çıkan farklılaşmalar sebebiyle meydana gelmiş olabileceğinden ko-kristal oluşumu gerçekleşmiş olabilir. 1R1M Vakum grubu için, 32° ve 44° civarı fiziksel karışımda gözlenen pikler gözlenmemiştir. Bu durum ko-kristal oluşumunu düşündürmektedir. 1R1M ACN grubunda pik boyutlarında değişim meydana gelmiş olmasına karşın pikler fiziksel karışım ile aynıdır. Bu nedenle bu grup için ko-kristal oluşmadığı söylenebilir. 1R1M Su (filtre) grubunda pikler oldukça azalmıştır. Bu nedenle elde edilen yapının kristal yapı özelliğini kaybettiği ve buna bağlı olarak ko-kristal oluşmadığı söylenebilir. 1R1M Su grubunda ise 32°'de fiziksel karışımda gözlenen pik gözlenmemiştir. 35° civarı oluşan yeni pik sonucunda da kristal yapısında değişme meydana geldiği söylenebilir.

1R1N Liyo grubunda, 12-18-30° civarı fiziksel karışımda gözlenen pikler gözlenmemiştir. Bu durum kristal yapının değiştiğini göstermektedir. 1R1N Vakum grubunda, pikler fiziksel karışıma oldukça benzemekle birlikte biraz daha yayvanlaşmıştır. Bu nedenle kristal yapısında belirgin bir değişim olmadığı söylenebilir. 1R1N MeOH ve 1R1N ACN grupları fiziksel karışımla oldukça benzerdir. Bu nedenle ko-kristal meydana gelmediği düşünülmektedir. 1R1N Su grubunda ise

piklerin kaybolmasından dolayı yapının kristal yapısını kaybettiği sonucuna ulaşılabilir (Şekil 4.8).

1R2M Liyo grubunda 15-18-23-45° civarı fiziksel karışımda gözlenen pikler gözlenmemiştir. Bu durumda kristal yapının değiştiği sonucuna ulaşılabilir. 1R2M Vakum grubunda pik şiddetleri değişmekle birlikte genel anlamda fiziksel karışıma oldukça benzerdir. 1R2M grubunda 9-20° civarındaki pikler daha belirgin hale gelmiş olup fiziksel karışımdaki 10-18-23° civarındaki pikler kaybolmuştur. Bu durum kristal yapının değiştiğine işaret etmektedir. 1R2M grubundaki pikler fiziksel karışımla neredeyse aynı olup ko-kristal oluşumu gözlenmemiştir. 1R2M Su (filtre) grubunda fiziksel karışımda gözlenen 18-23-38-45° civarındaki pikler kaybolmuştur. Bu durum kristal yapının değişmiş olabileceğine işaret etmektedir. 1R2M grubunda ise pik şiddetlerinde değişme görülmesine karşın fiziksel karışımla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Bu nedenle ko-kristal oluşmadığı sonucuna varılabilir (Şekil 4.9.).

1R2N Liyo grubunda 12-18-20-30° civarı fiziksel karışımda gözlenen pikler gözlenmemiştir. Bu nedenle kristal yapının değiştiği varsayımında bulunulabilir. 1R2N Vakum grubunda da Liyo grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. 1R2N MeOH grubunda ayırt edici pikler kaybolmuş olduğundan yapının kristal özelliğini büyük oranda kaybettiği çıkarımı yapılabilir. 1R2N Su (filtre) grubunda pik şiddetlerinde değişme görülmekle birlikte genel anlamda fiziksel karışıma oldukça benzemektedir. 1R2N Su grubunda 18-30° civarı fiziksel karışımda gözlenen pikler gözlenmemiş olup kristal yapıda değişiklik olduğu görülmektedir (Şekil 4.10.).

Elde edilen XRD sonuçları toplu olarak incelendiğinde, bir ileri değerlendirme basamağı olan FTIR'de incelenecek formülasyonların 1R-1M liyofilizasyon ve 1R-1M vakum, 1R-2M liyofilizasyon ve 1R-2M vakum, 1R-1N liyofilizasyon ve 1R-1N vakum, 1R-2N liyofilizasyon ve 1R-2N vakum olmasına karar verilmiştir. Bu formülasyonlarda kristal yapıdaki değişimler belirgindir.

Diğer formülasyonlarda kristal yapılarda değişme görülse de hazırlamalarında kullanılan çözücü miktarları riboflavinin çözünürlüğünün çok düşük olmasından dolayı çok yüksektir. Bu nedenle ileri analizlerde ve deneylerde bu formülasyonların kullanılmaması kararlaştırılmıştır.

5.2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile katı, sıvı ya da gaz haldeki örneğin fonksiyonel grupları ve bu grupların bağ yapıları hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (223).

Şekil 4.11., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13'te etken madde ve ko-kristal maddelerinin saf haldeki FTIR spektrumları verilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde riboflavin (224), mannitol (225) ve nikotinamid (226) için verilen FTIR spektrumları ile uyumlu bulunmuştur.

FTIR sonuçları incelendiğinde 1R-1M liyofilizasyon ve 1R-1N liyofilizasyon formülasyon grubunda, fiziksel karışımlardan farklı olarak 3500 cm⁻¹ alanlarında alkol ve fenol O-H bağları oluştuğu gözlenmiştir. Bu oluşan yeni bağların ko-kristal oluşumu nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (Şekil 4.14. - Şekil 4.16.)

5.2.5 İn Vitro Lipofilisite Değerlendirme Çalışması

İn vitro lipofilisite çalışmaları ile, hazırlanan ko-kristal formülasyon gruplarının lipofilite özellikleri hakkında bilgi edinilebilir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde nikotinamid ve mannitolün ko-kristal içerisindeki sitokiyometrik oranı arttıkça lipofilitenin arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.8.). Bu sonuç tek başına değerlendirildiğinde 1R2N ve 1R2M grupları daha lipofilik olduğu için tercih edilir gözüktüğü de diğer karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde 1R1N ve 1R1M gruplarının kristal yapılarındaki değişimlerin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Ko-kristal formülasyonları ile ilgili yapılan DSC, XRD, FTIR ve lipofilisite bulguları toplu olarak değerlendirildiğinde ileri çalışmalarda 1R1N ve 1R1M gruplarının kullanılmasına karar verilmiştir.

5.3. Hidrofilik Jel Formülasyonları

Prekorneal alanda ilacın kalış süresini artırmanın en yaygın yollarından biri olan formülasyonun viskozitesini artırma yaklaşımı için sıklıkla polimerlerden

yararlanılmaktadır. Hidrofilik jel formülasyonlarında suda veya sulu çözücülerde şişme ve/veya sıvı-jel geçişini başlatma özelliği olan polimerler kullanılır (227).

Geleneksel jellerin göz yüzeyine homojen ve tekrarlanabilir uygulanmasında sorunlarla karşılaşılırken aynı zamanda görmede bulanıklık oluşturma gibi olumsuz etkiler de görülebilmektedir (228). İn situ jelleşen sistemlerde ise çözeltilerin uygulama kolaylığı ve jellerin gözde kalış süresini artırarak oküler biyoyararlanımı iyileştirme hedefleri birleştirilmektedir. Böylelikle in situ jelleşen sistemler sıvı halinde göze damlatılır ve pH, sıcaklık veya iyon değişimi gibi çevresel faktörler sonucunda göz yüzeyinde jelleşirler (229). Sıcaklıkla jelleşen (termosensitif) sistemler, genellikle oda sıcaklığında sıvı halde olup vücut sıcaklığıyla jelleşme göstermektedir. Termosensitif jelleri hazırlamak için en sık kullanılan polimerler Poloksamer ve selüloz türevleridir (230).

5.3.1. Optimum Pluronic F-127 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İyonik olmayan yüzey aktif poloksamerler, Pluronic® adıyla ticari olarak temin edilebilmektedir. Renksiz ve şeffaf jellerin üretimini sağlayabilen Pluronic F-127, oftalmolojide en yaygın kullanılan polimerler arasındadır (231). Pluronic hazırlanan formülasyonun özelliklerine bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir. Genel olarak, formülasyondaki polimer oranı arttıkça jelleşme kapasitesi artmakta ve jelleşme sıcaklığı düşmektedir (232). Yapılan bir araştırmada Pluronic içeren jel formülasyonlarında yüklenen ilacın lipofilikliğin artmasının salım oranını azalttığı bildirilmiştir (233).

Termosensitif jeller kullanım kolaylığı ve oküler biyoyararlanımı artırmaları gibi özellikleri ile oküler alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu jeller uygulama sırasında yaklaşık 25°C olan oda sıcaklığında sıvı halde olup kolayca göze damlatılmaktadır. Göz yüzeyine ulaştığında ise yaklaşık 32°C olan göz yüzeyi sıcaklığı ile jelleşme meydana gelmekte ve bu sayede formülasyonun göz yüzeyinde kalış süresi uzamaktadır (234, 235).

Hidrofilik jellerin hazırlanmasından önce formülasyonlarda kullanılacak Pluronic oranlarının belirlenmesi için % 15, 18 veya % 20 (a/h) oranında polimer

içeren jeller hazırlanmıştır. Uygun polimer miktarının belirlenmesinde kriter, hazırlanan çözeltinin oda sıcaklığında çözelti halinde kalırken, 31-32°C arasında jel yapısına dönüşmesidir. Şekil 4.18'de görüldüğü üzere, % 15 (a/h) Pluronic F-127 içeren çözeltide 31-32°C arasında jelleşme olmadığı, % 20'lik (a/h) formülasyonda ise jelleşmenin 25°C'de başladığı dolayısıyla uygulama sırasında jel yapısında olacak olması nedeniyle sorunlarla karşılaşılabilceği tespit edilmiştir. % 18 (a/h) Pluronic F-127 içeren çözelti 25°C civarında çözelti halinde kalırken, 31-32°C aralığında jelleşme tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Ryu ve ark. (236) yaptıkları çalışmada %18 Pluronic F-127 içeren sulu çözeltinin 30°C civarında jelleştiğini göstermiştir. Bu nedenle etken madde içeren hidrofilik jel formülasyonlarında Pluronic F-127 oranı % 18 (a/h) olarak belirlenmiştir.

5.3.2. Jelleşme Sıcaklığının Tayini

Artan sıcaklığa karşı elde edilen viskozite değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen bulgular hazırlanan polimer çözeltisinin jelleşmesi konusunda genel bir bilgi sağlasa da, jelleşme noktasının tam olarak tespit edilmesinde yeterli olamamaktadır. Bu durumun nedeni, jelleşme gerçekleştikten sonra da viskozite değerlerinde artışın devam etmesidir (237). Literatürde termosensitif jellerde jelleşme noktasının hızlı bir şekilde tayini için manyetik karıştırma sırasında manyetik çubuğun durduğu sıcaklık noktasının tespiti veya ters çevirme (tube inversion) yöntemleri kullanılmaktadır (238). Formülasyon geliştirme çalışmalarında jelleşme sıcaklığının tespitinde ilk denemeler karıştırma sırasında manyetik çubuğun durduğu sıcaklığın tespiti yöntemiyle yapılmıştır. Ancak bu yöntemde, manyetik karıştırıcının hızı, manyetik çubuğun ve kabın şekli gibi birçok değişken sonuca etki ettiğinden tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle jelleşme noktasının tam tayini için ters çevirme (190) yöntemine geçilmiştir. Ters çevirme yönteminin prensibi, sıcaklık artışı sırasında belirlenmiş sıcaklığa gelen örneğin ters çevirilerek akışkanlık gösterip göstermediğinin kontrol edilmesidir. Örnek, tüp ters çevrildikten sonra da hareketsiz şekilde tüpün üst kısmında kalıyorsa jelleşme gerçekleşmiştir sonucuna ulaşılır. Tez kapsamında hazırlanan %18 Pluronic F-127 içeren hidrofilik jel örneğinin

incelenmesinde sıcaklık 0,2°C'lik dilimler halinde artırılmış ve her artırma sonrası tüp ters çevrilerek jelleşme kontrolü gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19'da sunulduğu gibi, 31,4°C'de jelleşmenin sağlandığı görülmektedir. Literatürde benzer şekilde, Gratieri ve ark. (239) hazırladıkları oküler jel formülasyonunun jelleşme sıcaklığını ters çevirme yöntemi ile tespit etmiş ve jelleşmenin 32 °C'de olduğunu bildirmiştir.

5.3.3. Hidrofilik Jel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Viskozite tayini

%18 (a/h) Pluronic F-127 jel çözeltisinin artan sıcaklıkla değişen viskozite değerleri tespit edildikten sonra, bu çözeltiliye yardımcı maddelerin ve riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyum eklenmesinin viskozite değerlerinde veya jelleşme özelliğinde bir değişiklik meydana getirip getirmediğinin tespiti için formülasyonların artan sıcaklığa bağlı viskoziteleri ölçülmüştür. Şekil 4.20.'de görüldüğü üzere 25°C'den önce hiçbir formülasyonun jelleşme göstermediği ve Pluronic F-127 jel çözeltisinde elde edilen viskozite değerlerinden farklı değerler elde edilmediği, 30°C civarında jelleşmenin başladığı bulunmuştur.

In Vitro İlaç Salımı Çalışmaları

Hidrofilik jeller, göz yüzeyinde ilacın kalış süresini artırmasının yanında sürekli ilaç salımı için uygun formülasyon şekilleridir (227). Üç boyutlu bir hidrofilik polimer zinciri ağından oluşan yapıları, su tutma için yüksek imkân sağlar ve bu sayede ilaç salımı kontrol edilebilir (228).

Şekil 4.21.'de riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum içeren hidrofilik jel formülasyonlarının in vitro ilaç salım profilleri sunulmuştur. Salım profilleri incelendiğinde, riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonlarından ilaç salımının daha hızlı olduğu görülmektedir. Riboflavinin sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle hidrofilik jel formülasyonlarında salım ortamına çözünerek geçmesinin daha uzun sürdüğü düşünülmektedir. In vitro salım çalışmalarında kullanılan jellerin içindeki etken madde miktarları hesaplanmış ve 10 mL'lik in vitro salım ortamında sink koşulların sağlandığı tespit edilmiştir (240). Elde edilen bulgularımızla paralel şekilde, Owonubi ve ark. (241) yaptığı çalışmada, proguanil HCl ve klorokin difosfat içeren

termosensitif jel formülasyonları hazırlamış ve in vitro salım çalışmalarında klorokin difosfatın formülasyonlardan daha hızlı salındığını tespit etmiştir. Araştırmacılar, klorokin difosfatın çözünürlüğünün 50 mg/mL iken profuanil HCL'de bu değer 0,156 mg/mL olduğunu, bu nedenle çözünürlüğü daha yüksek olan klorokin difosfatın daha hızlı salındığını bildirmiştir. Literatürde benzer sonuçlara Castro ve ark. (242) ile Alhnan ve ark. (243) yaptığı çalışmalarda da rastlanmıştır.

Korneal kolajen çapraz bağlama (KKÇB) operasyonlarından önce ve operasyon sırasında her 2 ile 5 dk'da bir riboflavin-5-fosfat sodyum çözeltisi damlatılmaktadır. Tez çalışmasında hidrofilik jel formülasyonu geliştirilmesindeki ana hedef bu damlatma sıklığını azaltmak ve operasyonu hem hasta hem de klinisyen açısından kolaylaştırmaktır. KKÇB operasyon süresi genel olarak 60-90 dakika arasında gerçekleştiğinden hazırlanan formülasyonlarda çok uzun süren bir ilaç salımı hedeflenmemiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde daha hızlı salım gerçekleştiren riboflavin-5-fosfat sodyum içeren hidrofilik jellerin umut vadeden formülasyonlar olduğu düşünülmektedir.

5.4. NLT Formülasyonları

NLT formülasyonları ilacın prekorneal alanda kalış süresini ve korneal epitel tabakasından geçişini artırmasından dolayı oküler formülasyon tasarlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir (244). NLT formülasyonlarının üstünlükleri, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesine (245, 246) ve uzun raf ömrüne (247, 248) sahip olmaları ve uzun süreli ilaç salımı sağlamaları sıralanabilir (249). Yapılan bir çalışmada, suda çözünürlüğü düşük bir antineoplastik ilaç olan desitabin yüklü NLT'ler, Precirol ATO5 (katı lipit) ve Transcutol HP (sıvı lipit) kullanılarak soğuk homojenizasyon tekniği ile hazırlanmıştır. Hazırlanan NLT'lere % 84 oranında ilaç yüklendiği tespit edilmiştir (250). Bu tez kapsamında riboflavin veya riboflavin-5-fosfat sodyumun girişimsel olmayan bir şekilde göze uygulanarak kısa süreli kontrollü salımı hedeflenmektedir. Piyasa preparatlarında yüksek çözünürlüğü sebebiyle riboflavin-5-fosfat sodyum kullanılsa da riboflavinin daha hidrofobik yapısı sebebiyle korneal epitelten daha kolay geçebileceği düşünülmüş, bu nedenle

riboflavin içeren NLT formülasyonları geliştirilmiştir. Ayrıca, geliştirilen NLT formülasyonlarına penetrasyon artırıcı (Transcutol P) (251) veya pozitif yük sağlayıcı (Stearilamin) (252) madde eklenmesi stratejileri uygulanarak ilacın korneaya geçen miktarının artırılması hedeflenmiştir.

5.4.1. NLT Formülasyonlarının Faktöriyel Tasarımı

NLT formülasyonlarında kullanılan yağ fazı oranının ve YAM miktarının formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımına olan etkisini incelemek amacıyla 2² tam faktöriyel tasarım gerçekleştirilmiştir. Bunun için 6 farklı NLT grubu kendi içlerinde faktöriyel tasarıma tabi tutulmuştur. Bunun nedeni her grubun formülasyonunda farklı bir yaklaşım kullanılmasıdır. Örneğin, RBTP grubu RBN grubundan farklı olarak penetrasyon artırıcı (Transcutol P) içermektedir. Bu durumda, RBN grubu ile partikül büyüklüğü ve PDI açısından daha uygun sonuçlar elde edilse bile penetrasyon artırıcı içermesi nedeniyle RBTP formülasyonları ile in vivo çalışmalarda daha iyi sonuçlar elde edilebilir. Faktöriyel tasarıma in vivo deneylerin dahil edilmesi ise çok fazla hayvan kaybına neden olacağından her formülasyon grubunun kendi içinde değerlendirilmesine ve gruplardan elde edilen en uygun formülasyonun hayvan çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir. Bu çalışma kapsamında toplam 24 formülasyon grubu tasarlanmış ve her biri n=3 şeklinde çalışılarak 72 adet formülasyon üzerinde çalışılmıştır (Tablo 4.9.).

Riboflavin İçeren Nötr NLT Formülasyonları

Riboflavin içeren nötr NLT formülasyonları incelendiğinde (Tablo 4.10. ve Şekil 4.22.), yağ fazı oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı, PDI değerlerinin azaldığı saptanmıştır. Benzer sonuçlara literatürde sıklıkla raslanmaktadır (253-255). Formülasyonlarda YAM miktarı % 2'den % 4'e çıkarıldığında partikül büyüklüğünün azaldığı ve PDI değerinin arttığı tespit edilmiştir. Ancak, %20 yağ fazı içeren örneklerde YAM miktarı arttıkça partikül büyüklüğünde de artış gözlenmiştir. Bu duruma PDI değerlerindeki artışın neden olabileceği düşünülmektedir ve bu sonuçlar literatür ile uyumludur (256). RBN 2 grubunda ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 421-442 nm aralığında çıkması ve RBN 4 grubunda ise yüksek YAM miktarına

rağmen ortalama partikül büyüklüğünün RBN 1 grubundan büyük çıkması nedeniyle bu gruplar elenerek ileri çalışmalara RBN 1 ve RBN 3 grupları ile devam edilmesine karar verilmiştir. RBN 1 ve RBN 3 arasındaki seçimde ise ilaç yükleme miktarları ve in vitro hücre kültürü permeasyon çalışmalarının sonuçları göz önünde bulundurulacaktır.

Riboflavin ve Transcutol P İçeren NLT Formülasyonları

Riboflavin ve Transcutol P içeren NLT grubu incelendiğinde (Tablo 4.11. ve Şekil 4.23.), yağ fazı oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı, PDI değerlerinin azaldığı saptanmıştır. YAM miktarı %2'den %4'e çıkarıldığında ortalama partikül büyüklüğünün bir miktar azaldığı, PDI değerinin arttığı gözlenmiştir. RBTP 2 grubunda ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 395 nm olarak çıkması ve RBTP 4 grubunda yüksek YAM miktarına rağmen ortalama partikül büyüklüğünün RBTP 1 grubundan büyük çıkması nedeniyle bu gruplar elenerek ileri çalışmalara RBTP 1 ve RBTP 3 grupları ile devam edilmesine karar verilmiştir. RBTP 1 ve RBTP 3 arasındaki seçimde ise ilaç yükleme miktarları ve in vitro hücre kültürü permeasyon çalışmalarının sonuçları göz önünde bulundurulacaktır.

Riboflavin ve Stearilamin İçeren NLT Formülasyonları

Bu grup formülasyonlara stearylamin eklenmesinin nedeni pozitif yüklü NLT formülasyonlarının elde edilmesidir. Riboflavin ve stearylamin içeren NLT grubunun sonuçları değerlendirildiğinde (Tablo 4.12. ve Şekil 4.24.) zeta potansiyeli değerinin pozitif değerlere ulaştığı tespit edilmiştir. Buna ilaveten, yağ fazı oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı, PDI değerlerinin azaldığı saptanmıştır. YAM miktarı %2'den %4'e çıkarıldığında ortalama partikül büyüklüğünün bir miktar azaldığı, PDI değerinin arttığı gözlenmiştir. RB+ 2 grubunda ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 469 nm olarak çıkması ve RB+ 4 grubunda yüksek YAM miktarına rağmen ortalama partikül büyüklüğünün RB+ 1 grubundan büyük çıkması nedeniyle bu gruplar elenerek ileri çalışmalara RB+ 1 ve RB+ 3 grupları ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu iki grup arasındaki seçimde ise ilaç yükleme miktarları ve in vitro hücre kültürü permeasyon çalışmalarının sonuçları göz önünde bulundurulacaktır.

Riboflavin-5-Fosfat Sodyum İçeren Nötr NLT Formülasyonları

Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT grubu incelendiğinde (Tablo 4.13. ve Şekil 4.25.) yağ fazı oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı, PDI değerlerinin azaldığı saptanmıştır. YAM miktarının %2'den %4'e çıkarıldığında ortalama partikül büyüklüğünün bir miktar azaldığı, PDI değerinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır. RTN 2 grubunda ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 369 nm olarak çıkması ve RTN 4 grubunda yüksek YAM miktarına rağmen ortalama partikül büyüklüğünün RTN 1 grubundan büyük çıkması nedeniyle bu iki grubun ileri çalışmalara alınmamasına karar verilmiştir. RTN 1 ve RTN 3 grupları arasındaki seçimde ise ilaç yükleme miktarları ve in vitro hücre kültürü permeasyon çalışmalarının sonuçları göz önünde bulundurulacaktır.

Riboflavin-5-Fosfat Sodyum ve Transcutol P İçeren NLT Formülasyonları

Riboflavin-5-fosfat sodyum ve Transcutol P içeren NLT grubu değerlendirildiğinde (Tablo 4.14. ve Şekil 4.26.) yağ fazı oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı, PDI değerlerinin azaldığı saptanmıştır. YAM miktarı %2'den %4'e çıkarıldığında ortalama partikül büyüklüğünün bir miktar azaldığı, PDI değerinin arttığı tespit edilmiştir. RTTP 2 grubunda ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 346 nm olarak çıkması ve RTTP 4 grubunda yüksek YAM miktarına rağmen ortalama partikül büyüklüğünün RTTP 1 grubundan büyük çıkması nedeniyle ileri çalışmalara RTTP 1 ve RTTP 3 grupları ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Riboflavin-5-Fosfat Sodyum ve Stearilamin İçeren NLT Formülasyonları

Riboflavin-5-fosfat sodyum ve stearylamin içeren NLT grubu incelendiğinde (Tablo 4.15. ve Şekil 4.27.), hedeflendiği şekilde zeta potansiyeli değerinin pozitif değerlere ulaştığı tespit edilmiştir. Yağ fazı oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı, PDI değerlerinin azaldığı saptanmıştır. YAM miktarı %2'den %4'e çıkarıldığında ortalama partikül büyüklüğünün sabit kaldığı, PDI değerinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır. RT+ 2 grubunda ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 312 nm olarak çıkması sonucunda bu grup elenmiştir. RT+ 4 grubu ise yüksek YAM miktarına rağmen ortalama partikül büyüklüğü RB+ 1 grubundan büyük çıkmıştır. Bu nedenle bu grup

da elenmiştir. RT+ 1 ve RT+ 3 grupları arasındaki seçim ilaç yükleme miktarlarına ve in vitro hücre kültürü permeasyon çalışmaları sonuçlarına göre gerçekleştirilmiştir.

Faktöriyel Tasarım Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi

Nanopartiküler sistemlerin göz dokularında dağılımına partikül büyüklüğü, formülasyon bileşenleri, yüzey yükü ve uygulama şekli gibi birçok faktörün etki ettiği bildirilmiştir (257). Literatürde nanopartiküllerin göz dokularında dağılım oranını artırmak için ideal bir partikül büyüklüğü aralığına rastlanmamaktadır. Bununla birlikte, Sakurai ve ark. (258) tarafından yapılan bir çalışmada 50 nm, 200 nm ve 2 µm partikül büyüklüğüne sahip floresan işaretli polistiren nanopartikülleri intravitreal olarak tavşan gözlerine uygulanmış ve göz dokularındaki dağılımları incelenmiştir. Çalışmada 200 nm partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin vitröz boşlukta homojen biçimde dağıldığı, 50 nm partikül büyüklüğüne sahip formülasyonların retina bariyerlerini geçtiği belirtmiştir. Bu nedenle çalışmalarımızda kullanılacak nanopartiküllerin seçiminde partikül büyüklüğünün 200 nm değerine yakın olması kriteri belirlenmiştir. Faktöriyel tasarım sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde %20 yağ fazı içeren grupların YAM miktarı %4'e çıkarılsa dahi partikül büyüklüğünün hedeflenen değerden daha fazla olduğu görülmüş ve bu grupların ileri çalışmalarda kullanılmamasına %10 yağ fazı içeren gruplar ile devam edilmesine karar verilmiştir.

5.4.2. İlaç Yükleme Etkinliği ve İlaç Salımı Çalışmaları

NLT formülasyonlarının ilaç yükleme etkinliği bulguları Şekil 4.28'te verilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere, tüm gruplarda, hidrofobik yapıdaki riboflavin nanopartiküllere yüklenme oranının riboflavin-5-fosfat sodyuma göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, lipit yapıdaki NLT formülasyonlarına hidrofobik yapıdaki ilaç moleküllerinin hidrofilik olanlara göre daha yüksek oranda yüklenmesi beklenir (259). Literatürde bu yönde sonuçlar olmakla birlikte hidrofilik moleküllerin NLT formülasyonlarına daha yüksek oranda yüklendiğine ilişkin çalışmalar da mevcuttur (259-261). Ayrıca, riboflavin-5-fosfat sodyum'da bulunan fosfat gruplarının Compritol ATO 888'de bulunan hidroksil gruplarıyla hidrojen bağı oluşturması sonucu etkileşimin arttığı ve ilaç yüklenme oranının yükseldiği

düşünülmektedir (262-264). Formülasyon grupları kendi içlerinde YAM miktarına göre değerlendirildiğinde, formülasyonların partikül büyüklüğü farklılıklarının ilaç yükleme üzerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, Desai ve ark. (265) darunavir yüklü NLT formülasyonları hazırlamış ve ilaç yükleme etkinliği değerlerinin formülasyonların partikül büyüklüğünden bağımsız olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, ilaç yükleme etkinliğindeki bu benzerlik nedeniyle sonucu YAM'ların olası toksitesinden kaçınmak için %2 YAM içeren NLT formülasyonları ile ileri çalışmalara devam edilmesi kararı verilmiştir.

İn vitro salım çalışmalarında kullanılan NLT'lerde bulunan etken madde miktarları hesaplanmış ve 10 mL'lik in vitro salım ortamında sink koşulların sağlandığı tespit edilmiştir (240). Şekil 4.29.'da verilen in vitro salım grafikleri incelendiğinde tüm formülasyonların benzer ilaç salım profillerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum Tablo 4.16.'da verilen F2 benzerlik testi ile de desteklenmiştir. Salım profilleri değerlendirildiğinde tüm formülasyonlarda ilk 2 saat içinde yüklenen ilacın % 50'sinden fazlasının hızlı bir şekilde salındığı, bunu takiben yavaş salımın 24. saate kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla paralel olarak literatürde, NLT'lerden ilaç salımının genellikle iki aşamalı olduğu, başlangıçta patlama etkisine ("burst effect") bağlı hızlı bir ilaç salımının ardından, uzatılmış daha yavaş bir salımın gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu salım profilinin, matriksin yapısına, hazırlama yöntemine, yüklenen etken madde miktarına ve özelliklerine ve formülasyonun partikül büyüklüğüne bağlı olarak değişebildiği de belirtilmiştir (266, 267). Bunların yanı sıra salım profiline etki eden önemli faktörlerden birinin etkin maddenin lipit matriks içindeki dağılımı olduğu bildirilmiştir (268).

5.4.3. Morfolojik Özellikler

NLT formülasyonlarının SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.30.) elde edilen sonuçların partikül büyüklüğü sonuçlarıyla uyumlu olduğu, tüm nanopartiküllerin küresel ve küresele yakın olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra SEM görüntüleri polimerik nanopartiküllerde olduğu kadar net elde edilememiştir. Bunun nedeni hazırlanan nanopartiküllerin yağlı yapıda olmasıdır. SEM ile görüntü

alırken uygulanan elektron bombardımanına bağlı olarak örnek sıcaklıkları hızla artış göstermektedir. Hazırlanan NLT'lerde bulunan Gelucire 44/14 katı lipidinin erime sıcaklığı 44°C olduğundan (269) görüntüleme sırasında örnekler hızla deformasyona uğramakta ve yapılarında bozulmalar meydana gelmektedir. RB+ örneğinde de görüldüğü üzere arka planda bulunan iç içe geçmiş görüntü eriyik NLT'lerden dolayı meydana gelmektedir. Benzer durumlara literatürde sıklıkla karşılaşılmakta olup partikül büyüklüğü azaldıkça bu durum artmaktadır (270-273).

5.5. Sitotoksiste Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların olası sitotoksik etkilerini değerlendirmek için in vitro hücre kültüründe sitotoksiste deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.31.). Literatürde riboflavin'in hücre canlılığını artırdığı bildirildiğinden (274-276) formülasyondan kaynaklı sitotoksitenin net şekilde saptanması amacıyla etken madde içermeyen formülasyonlar değerlendirilmiştir.

5.5.1. NLT Formülasyonları

Nötral NLT formülasyonları

Sitotoksiste çalışmaları için Şekil 4.32.' de sunulan % canlılık sonuçları değerlendirildiğinde, nötral NLT formülasyonunun yüksek oranda kullanıldığı örneklerde hücre ölümü gözlemediği, seyreltme oranının 1/2 ve daha fazla olduğu örneklerde ise bu etkinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, ileri deneylerde nötral NLT formülasyonları sitotoksik etkinin gözlenmediği konsantrasyonda kullanılmıştır.

Stearilamin İçeren NLT Formülasyonları

Şekil 4.32' de verilen % canlılık sonuçları incelendiğinde, stearilamin içeren NLT formülasyonlarının yüksek oranda kullanıldığı örneklerde hücre ölümü gözlenmiştir. Seyreltme oranı arttıkça sitotoksitenin azaldığı görülmektedir. Seyreltme oranı 1/4 olduğunda formülasyonların hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkisinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Formülasyonlarda meydana gelen sitotoksitenin stearilaminden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Benzer şekilde, Ven ve ark. (277)'nin gerçekleştirdiği çalışmada stearylamin içeren nanopartiküllerin sitotoksitelerinin içermeyen formülasyonlara göre önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, ileri deneylerde stearylamin içeren NLT formülasyonları sitotoksik etkinin gözlenmediği konsantrasyonda kullanılmıştır.

Transcutol P İçeren NLT Formülasyonları

Bu formülasyon grubu için % canlılık sonuçları değerlendirildiğinde (Şekil 4.32.) Transcutol P içeren NLT formülasyonlarını yüksek oranda içeren örneklerde hücre ölümü gözlenmiştir. Formülasyonların seyreltme oranı arttıkça sitotoksitenin azaldığı görülmektedir. Seyreltme oranı 1/4 olduğunda formülasyonların hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkisinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ortadan kalktığı gözlenmiştir. Formülasyonlarda meydana gelen sitotoksitenin Transcutol P kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, Ujhelyi ve ark. (278) yaptığı çalışmada formülasyonlardaki Transcutol P miktarı artıkça sitotoksitenin arttığını belirtmiştir. Bu aşamadan sonraki deneylerde Transcutol P içeren NLT formülasyonları sitotoksik etkinin gözlenmediği konsantrasyonda kullanılmıştır.

5.5.2. Hidrofilik Jel Formülasyonları

Hidrofilik jel formülasyonlarında % canlılık sonuçları değerlendirildiğinde (Şekil 4.32.) genel olarak Transcutol P içeren hidrofilik jel formülasyonlarının içermeyenlere göre daha yüksek sitotoksite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun Transcutol P'den kaynaklandığı düşünülmektedir (278). Transcutol P içeren içeren ve içermeyen gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise her iki grup için de formülasyonun yüksek oranda kullanıldığı örneklerde hücre ölümünün gözlendiği seyreltme (1/2) ile bu durumun ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonraki deneylere testlerde hidrofilik jel formülasyonları sitotoksik etkinin gözlenmediği oranda kullanılmıştır.

5.5.3. Nikotinamid

Farmasötik ko-kristal formülasyonlarında bulunan riboflavin çıkarıldığında geriye sadece nikotinamid kaldığı için, sitotoksisite deneylerinde sadece nikotinamid kullanılmıştır. % canlılık sonuçları değerlendirildiğinde (Şekil 4.32.) nikotinamid içeren çözeltilerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı gözlenmiş ve tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak benzer hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir.

5.6. Hücre Kültürü Permeabilite Çalışmaları

Riboflavin içeren formülasyonların ARPE-19 hücre hattında elde edilen permeabilite sonuçları Şekil 4.33.'te sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, riboflavinin su içinde süspansiyon şeklinde hazırlanan formülasyonun hazırlanan formülasyonlar ile karşılaştırıldığında en yüksek geçiş değerine sahip olduğu bulunmuştur. NLT formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında artan YAM miktarına bağlı olarak azalan partikül büyüklüğünün permeasyon üzerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmadığı görülmüştür. Bu nedenle ilerideki deneylerde daha düşük YAM içeren dolayısıyla daha az sitotoksik olacağı düşünülen %2 YAM içeren NLT'lerin kullanılmasına karar verilmiştir. Riboflavin içeren hidrofilik jel grubu formülasyonlarda, Transcutol P'nin anlamlı bir etki göstermediği bulunmuştur. Ancak, Transcutol P'nin sıkı kavşakları (tight junctions) açıcı etkisini hücre hattında gösterememiş olma ihtimali göz önünde bulundurularak eks-vivo ve in vivo çalışmalarda tüm hidrofilik jel formülasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Ko-kristal formülasyonlarında 1'e 1 oranda riboflavin ve ko-kristal maddesi içeren 1R1N ve 1R1M formülasyonlarının 1'e 2 oranda riboflavin ve ko-kristal maddesi içeren 1R2N ve 1R2M formülasyonlarına kıyasla daha iyi permeasyon göstermesi nedeniyle ex vivo ve in vivo çalışmalara 1R1N ve 1R1M formülasyonlarının dahil edilmesine karar verilmiştir.

Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ARPE-19 hücre hattında elde edilen permeabilite sonuçları Şekil 4.34.'de sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, riboflavin-5-fosfat sodyumun suda çözelti şeklinde hazırlanan

formülasyonun hazırlanan formülasyonlar ile karşılaştırıldığında ilaç geçişi değerleri arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir. NLT formülasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde, %4 YAM içeren NLT'lerden yalnızca RTN grubundan elde edilen değerlerin, %2 YAM içeren grup formülasyonlarından elde edilen değerlerden istatistiksel olarak farklı olduğu (daha yüksek) bulunmuştur. Yine de bu farkın olası YAM sitotoksitesi için yeterli olmadığı düşünülmüş ve riboflavin-5-fosfat sodyum grubunda da %2 YAM içeren NLT'lerin kullanılması karar verilmiştir. Hidrofilik jel gruplarında riboflavin-5-fosfat sodyum içeren hidrofilik jeller ile elde edilen ilaç geçiş değerleri çözeltiliye göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha düşük olmakla birlikte, Transcutol P'nin sıkı kavşakları (tight junctions) açıcı etkisini hücre hattında gösterememiş olma ihtimali göz önünde bulundurularak ex vivo ve in vivo çalışmalarda tüm hidrofilik jel formülasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

5.7. Ex vivo Çalışmalar

5.7.1. Ex vivo Korneal Geçiş Çalışması

Riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum ile hazırlanan formülasyonlardan etken maddelerin tavşan korneasından zamana bağlı olarak geçişi Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da sunulmuştur. Şekil 4.35.'te verilen riboflavin içeren formülasyonlar ex vivo şatlarda kornea dokusundan geçişleri (transport) açısından karşılaştırıldığında sıralamanın ko-kristal > NLT > hidrofilik jel formülasyonları şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun ko-kristal formülasyonlarında riboflavinin yapısında meydana gelen kristal değişimleri sebebi ile olabileceği düşünülmektedir. Ko-kristal formülasyonlarından sonra en yüksek geçişin NLT formülasyonlarında olması formülasyonların lipit yapısı nedeniyle hücre membranlarından kolayca geçmesinden kaynaklanabilir (279). Buna ilaveten, Transcutol P veya Stearilamin içeren pozitif yüklü NLT'lerin nötr nanopartiküllere kıyasla daha yüksek geçişe sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde literatürde Zadeh ve ark. (251) Transcutol P içeren NLT'lerin propranolol hidroklorürün korneal geçişini içermeyen formülasyonlara göre artırdığını bildirmiştir. Khames ve ark. (252) tarafından yapılan çalışmada, stearylamin ile pozitif yüklü hale getirilmiş NLT'lerin nötr formülasyonlara göre natamisin

korneal geçişini artırdığını tespit etmiştir. Çalışmalarda en düşük permeasyon değerleri hidrofilik jel formülasyonlarında tespit edilmiştir. Bu formülasyonlar oküler uygulamalarda gözde kalış süresini uzatarak üstünlük sağlamaktadır. Ancak geçiş çalışmalarında kullanılan düzenekte, preparatlar formülasyon özelliğinden bağımsız olarak sürekli kornea ile temas halinde olduğundan hidrofilik jellerin bu üstünlüğünü gösteremediği düşünülmektedir.

Şekil 4.36.'da verilen riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonlar ex vivo şartlarda kornea dokusundan geçişleri (transport) açısından karşılaştırıldığında sıralamanın NLT > hidrofilik jel formülasyonları şeklinde olduğu tespit edilmiştir. NLT formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise stearylamin yüklü pozitif NLT formülasyonlarının negatif yüklü kornea yüzeyi ile etkileşime girerek diğer formülasyonlara göre daha iyi tutunması sonucu geçişin arttığı düşünülmektedir.

Riboflavin içeren hidrofilik jel formülasyonları, riboflavin-5-fosfat sodyum içeren hidrofilik jel formülasyonları ile karşılaştırıldığında, suda iyi çözünmesi nedeniyle riboflavin-5-fosfat sodyum tuzu içeren formülasyonlarda daha yüksek ilaç geçiş değerlerinin elde edildiği düşünülmektedir.

5.7.2. Ex vivo Korneal Tutulum (Korneada Birikme) Çalışması

Riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum ile hazırlanan formülasyonlardan etken maddelerin tavşan korneasından zamana bağlı olarak tutulması (birikmesi) Şekil 4.37. ve Şekil 4.38'de sunulmuştur. Şekil 4.37.'da verilen riboflavin içeren formülasyonlar ex vivo şartlarda kornea dokusunda tutulumları açısından karşılaştırıldığında sıralamanın NLT > ko-kristal > hidrofilik jel formülasyonları şeklinde olduğu tespit edilmiştir. NLT formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yüksek tutulma değerinin stearylamin içeren NLT formülasyonunda görüldüğü tespit edilmiştir. Bunun nedeni, pozitif yüklü stearylamin içeren NLT'lerin negatif yüklü kornea yüzeyi ile etkileşime girmesi ile açıklanabilir. Geçiş çalışmalarına benzer şekilde hidrofilik jel formülasyonlarında ilacın korneada tutulma değerleri de düşük bulunmuştur.

Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonların ex vivo şatlarda kornea dokusunda tutulumlarında sıralamanın NLT > hidrofilik jel formülasyonları şeklinde olduğu tespit edilmiştir. NLT formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise stearylamin yüklü pozitif NLT formülasyonlarının negatif yüklü kornea yüzeyi ile etkileşime girerek diğer formülasyonlara göre daha iyi tutunması sonucu ilaç geçişinin arttığı düşünülmektedir.

5.8. İn Vivo Çalışmalar

5.8.1. Sıçanlarda İn Vivo İlaç Doku Dağılımı Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların ve riboflavin-5-fosfat sodyum içeren piyasa preparatlarının (D:MedioCross Dekstroz, TE:MedioCross Transeptilyal) in vivo çalışmalarda göze uygulanması sonucu korneaya geçen etken madde miktarlarının (korneada tutulma/korneada birikme) tespit edilmesi amacıyla, sıçan gözlerine topikal olarak formülasyonların uygulanmasından 30 dk. sonra korneada bulunan etken madde miktarları tespit edilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.39. ve Şekil 4.40.' da sunulmuştur. Genel olarak, etken maddeler temel alınarak karşılaştırma yapıldığında Şekil 4.39 ve 4.40'ta riboflavin içeren formülasyonlarda riboflavin-5-fosfat sodyum içeren formülasyonlara göre daha yüksek kornea ilaç miktarı tespit edilmiştir. Bu durumun nedeni, riboflavinin daha hidrofobik yapıya sahip olmasından dolayı lipofilik ilaçların yüksek oranda geçişine izin veren kornea epitelinden daha kolay permeasyon sağlaması ve korneada daha yüksek oranda birikmesi olarak düşünülmektedir.

Riboflavin içeren gruplar kendi aralarında içlerinde kıyaslandığında (Şekil 4.39) en yüksek korneal ilaç tutulumun RB+ kodlu (stearylamin içeren) NLT formülasyonu ile sağlandığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni pozitif yüklü formülasyonların negatif yüzey yüküne sahip kornea ile etkileşime girmesi ile açıklanabilir. Transcutol P içeren NLT'ler ise ikinci en fazla korneal ilaç tutulumu sağlayan grup olmuştur ve bu durum Transcutol P'nin kornea epiteldeki sıkı kavşakları açarak riboflavinin geçişini artırması ile açıklanabilir. Riboflavin içeren formülasyonların sıçanlara uygulanması sonrası kornea dokusunda tespit edilen en düşük ilaç miktarı ko-kristal formülasyonlarının

uygulama sonrası elde edilmiştir. Bu durum en düşük viskoziteye sahip olan ko-kristal formülasyonlarının gözden çabuk uzaklaştırılması ile açıklanabilir.

Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren preparatlar kendi aralarında incelendiğinde (Şekil 4.40.) riboflavin içeren gruplarına paralel olarak, en yüksek korneal ilaç tutulumun RT+ kodlu (stearilamin içeren) NLT formülasyonu ile sağlandığı tespit edilmiştir. “Epi-on” uygulamalar için geliştirilmiş olan MedioCROSS TE[®], MedioCROSS D[®]'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla kornea ilaç miktarı sağlamıştır. “Epi-on” (epitel kazınmadan) uygulamalar için geliştirilmiş olan MedioCROSS TE[®]'nin formülasyonunda % 0.25 riboflavine eşdeğer riboflavin-5-fosfat sodyum , % 1.2 HPMC ve % 0.01 benzalkonyum klorür bulunmaktadır. “Epi-off” (epitel kazınarak) uygulamalar için geliştirilmiş olan MedioCROSS D[®]'nin formülasyon bileşenleri % 0.1 riboflavine eşdeğer riboflavin-5-fosfat sodyum ve %20 dekstran'dan oluşmaktadır. İki piyasa preparatı kendi arasında karşılaştırıldığında MedioCROSS TE[®] ile daha yüksek kornea riboflavin -5-fosfat sodyum miktarının elde edilmesinin nedeni formülasyonun içerdiği benzalkonyum klorürün penetrasyon artırıcı bir yardımcı madde olması ile açıklanabilir.

Hidrofilik jel formülasyonları dışında tüm formülasyonlar (ticari preparatlar dahil) ticari preparatların klinikte kullanımlarında olduğu gibi her iki dakikada bir damla olarak uygulanmıştır. Yüksek viskozitesi ve jel özelliği nedeniyle hidrofilik jel formülasyonları 15 dk da bir damla olarak uygulanmıştır. Aradaki bu büyük uygulama farkına rağmen jel formülasyonları da önemli ölçüde etkin bulunmuştur. Bu durum jel formülasyonları ile ilacın artmış korneal temas süresi ile açıklanabilir.

5.8.2. Tavşan İn-Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmaların ikinci bölümünü tavşan gözlerine formülasyonların uygulanmasını takiben elde edilen kornea dokusunun biyomekanik cevabının ölçülmesi oluşturmaktadır. Biyomekanik cevabın ölçülmesi için, elde edilen korneaların Texture-analyzer XT-Plus cihazı ile uygulanan farklı strain (uygulanan germe) değerlerine karşı gösterdiği direnç ölçülmüştür.

Kornea dokularında riboflavin ve Riboflavin-5-fosfat sodyum miktarının belirlenmesinin yanında biyomekanik cevabın ölçülmesinin nedeni, ilaç miktarının kornea sertliğini artırmada tek başına etkili bir parametre olmamasıdır. Burada önemli nokta riboflavinin dışarıdan UV ışığı ile aktive olması ve bu aktivasyonun etkinliğidir. Riboflavin her ne kadar tekli oksijen molekülü oluşmasına yardımcı olsa da ortamda fazla miktardaki tekli oksijenin yıkımında rol oynayarak dengenin korunmasını da sağlamaktadır (280). Bir başka deyişle, gözdeki riboflavin konsantrasyonunun artırılması ile fazladan tekli oksijen reaktifinin oluşturulamayacağı sonucuna ulaşılabilir.

Şekil 4.44., 4.45., 4.46., 4.47. ve 4.48’de verilen farklı gerilim oranlardaki stres seviyeleri incelendiğinde, yalnızca UV uygulanan gruba kıyasla, RT+ hariç tüm formülasyonlarda (piyasa preparatları dahil) %4, 6, 8 veya 10 gerilim düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Benzer şekilde, ticari formülasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında kornea ilaç miktarlarında olduğu gibi Epi-on” (epitel kazınmadan) uygulamalar için geliştirilmiş olan MedioCROSS TE®’nin, “epi-off” (epitel kazınarak) uygulamalar için geliştirilmiş olan MedioCROSS D®’ den daha yüksek etkinlik gösterdiği bulunmuştur.

Şekil 4.47.’de verilen %10 gerilimdeki sonuçlar incelendiğinde; riboflavin içeren NLT formülasyonları arasında en etkili preparatın pozitif yüklü, stearylamin içeren NLT formülasyonları olduğu görülmektedir. Bu durum ex vivo ve in-vivo çalışmalarda elde edilen bulguları desteklemektedir. Formülasyonun sahip olduğu pozitif yük nedeniyle negatif yüklü korneaya daha iyi tutunma sağladığından bu etkinin oluştuğu düşünülmektedir. Trancutol P içeren RBTP formülasyonun RBN formülasyonuna kıyasla üstün olmadığı tespit edilmiştir. Riboflavin, riboflavin-5-fosfat sodyuma göre daha hidrofobik bir yapıda olduğu için epitelden kolayca geçebilmektedir. Bu nedenle Trancutol P bu formülasyonlarda penetrasyon artırıcı etkinliğini tam olarak göstermemiştir.

Riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde ex vivo ve in vivo doku ilaç miktarı çalışmalarından farklı olarak en etkili formülasyonun Trancutol P içeren NLT formülasyonu olduğu görülmüştür.

(ex vivo ve in vivo yapılan çalışmalarda pozitif yüklü riboflavin-5-fosfat sodyum içeren NLT formülasyonlarının daha yüksek tutulum gösterdiği bulunmuştur). Bu durumun nedeni pozitif yüklü NLT formülasyonlarının korneanın epitel tabakasına tutunma gösterdiği, ancak stroma tabakasına Transcutol P (penetrasyon artırıcı) içeren formülasyonlar kadar geçemediği ve bunun sonucu olarak stromada bulunan kolajenler arası çapraz bağ oluşumuna yeteri kadar etki edemediği düşünülmektedir. Buna ilaveten, riboflavin-5-fosfat sodyum hidrofilik bir madde olduğundan kornea epitelinden geçmesi oldukça zordur. Bu nedenle epitelten geçişi artıran Transcutol P, bu maddenin etkinliğini anlamlı şekilde artırmıştır.

Termosensitif jel formülasyonları kendi aralarında incelendiğinde en etkin formülasyonun riboflavin 5-fosfat sodyum ve Transcutol P içeren (THJ-TP) olduğu bulunmuştur. Bu durum, riboflavin-5-fosfat sodyumun sahip olduğu yüksek çözünürlük nedeniyle riboflavin içeren hidrofilik jellere kıyasla daha etkili olduğunu göstermektedir. İçerdiği Transcutol P sayesinde geçişi kolaylaşan riboflavin-5-fosfat sodyumun, hidrofilik yapıda bulunan stromaya daha kolay penetre olduğu düşünülmektedir. Hidrofilik jeller, ex vivo ve in vivo rat çalışmalarının aksine fizyolojik cevap açısından oldukça etkili bulunmuştur. Bu durumun sebebi olarak göz yüzeyini tamamen kaplayan hidrofilik jeldeki riboflavin ve riboflavin-5-fosfat sodyum'un UV ışığı ile yüksek miktarda etkileşime girdiği, bunun sonucunda oluşan radikallerin stromadaki kolajenler arasındaki çapraz bağları indüklemiş olabileceği düşünülmektedir.

Ko-kristal formülasyonları arasından en etkin olanın ise 1R-1N formülasyonu olduğu görülmüştür.

İn vivo biyomekanik cevabın ölçülmesi çalışmaları genel olarak değerlendirildiğinde, geliştirilen formülasyonlardan en ümit verici olanın riboflavin 5-fosfat sodyum ve Transcutol P içeren (THJ-TP) termosensitif jel formülasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu formülasyonun 15 dakikada bir uygulanmasına rağmen, her iki dakikada bir uygulanan ve "epi-on" (epitel kazınmadan) yöntemine uygun olarak geliştirilmiş ticari preparat olan MedioCROSS TE'den istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük gösterdiği tespit edilmiştir.

5.9. Stabilite Çalışmaları

5.9.1. Hidrofilik Jel Stabilite Çalışmaları

Hidrofilik jellerin fiziksel stabilite sonuçları incelendiğinde oda sıcaklığında saklanan numunelerin (özellikle THJ ve THJ-TP grupları) jelleşme özelliklerinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Ancak, 4°C'de saklanan numunelerde hidrofilik jellerin başlangıç viskozite değerleri ile benzer viskozite bulguları elde edilmiştir (Tablo 4.17., 4.18., 4.19., 4.20. ve Şekil 4.49., 4.50., 4.51., 4.52.). Benzer şekilde, Gadad ve ark. (188) Pluronic F-127 ile geliştirdikleri in situ hidrofilik jellerin kısa dönem stabilite çalışmalarında, oda sıcaklığındaki grubun jelleşme sıcaklığında bir miktar değişiklik meydana geldiğini, 4°C'de saklanan grupta herhangi bir değişiklik meydana gelmediğini bildirmiştir.

5.9.2. NLT Stabilite Çalışmaları

NLT'lerin fiziksel stabilite sonuçları incelendiğinde, formülasyonların SEM görüntülerinde genel olarak küresel yapılarını korudukları tespit edilmiştir. Bunun yanısıra, formülasyonların oda sıcaklığında saklandıklarında taze hazırlanmış NLT'lerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerlerine daha yakın sonuçlar verdikleri görülmüştür. Bu sonuca paralel olarak, Souto ve ark. (281) hazırladıkları NLT'lerin oda sıcaklığında 90 güne kadar partikül boyutu ve PDI açısından stabil bulmuşlardır. Benzer şekilde Loo ve ark. (282) da hazırladıkları NLT formülasyonlarının oda sıcaklığında 90 gün boyunca fiziksel olarak stabil kaldıklarını bildirmiştir. Özellikle dondurularak saklanan nanopartiküllerde partikül büyüklüğünde artış belirlenmiştir. Donma ve erime döngülerinin sonucunda özellikle RTN ve RTTP gruplarının agregat oluşturdukları SEM görüntülerinde de gözlenmektedir. NLT'lerin oda sıcaklığında katı formda olması nedeniyle daha stabil oldukları (Tablo 4.21., 4.22., 4.23. ve Şekil 4.53., 4.54., 4.55.) tespit edilmiştir.

6. SONUÇ

Keratokonus, korneanın incilmesi, sivrileşerek koni şekli alması ile meydana gelen, ilerleyici özellikte dejeneratif bir hastalıktır. Günümüzde keratokonus tedavisinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri korneal çapraz bağlanması ("corneal cross-linking")'dır. Bu tedavide, kolajen lifleri arasındaki çapraz bağlanma derecesi, B2 vitamini ve aynı zamanda fotoduyarlılaştırıcı ("photosensitizer") bir madde olan riboflavin uygulanmasının ardından UVA ışığı uygulaması ile artırılmaktadır. Riboflavinin kornea epitelinden geçememesi nedeniyle, bu yöntemde, ilk olarak göz üzerindeki epitel tabakası cerrahi işlem ile kazınarak uzaklaştırılmaktadır ("Epi-Off" yöntem). Tedavide en yaygın olarak kullanılan yöntem olmasına rağmen bu yöntemde, epitelin cerrahi işlem ile uzaklaştırılmasının birçok komplikasyonlara neden olduğu ve tedavinin başarısını olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Bu sakıncaları ortadan kaldırmak üzere, riboflavinin korneaya epitel uzaklaştırılmadan ("Epi-on" yöntem) taşınması için birçok araştırma yapılmıştır. Ancak, girişimsel teknik ile elde edilen sonuç kadar bir başarılı sonuçlar henüz elde edilememiştir. Benzer şekilde, riboflavinin kornea epitelinden geçişini penetrasyon artırıcı kullanarak artırmak üzere geliştirilen bir ürün olan Ricrolin® TE' nin, girişimsel teknik için geliştirilen klasik şekline göre (Ricrolin®) klinikte daha az tercih edilmesi dikkat çekmiştir.

Bu tez çalışması, literatürde ve klinikte riboflavinin korneaya epitel uzaklaştırılmadan ("Epi-on") taşınması için ihtiyaç duyulan yeni bir yaklaşımın/ilaç şeklinin ortaya çıkarılması için gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, i) ilaçların kornea epitelini geçmesinde önemli katkı sağlayan artmış çözünürlük ve lipofilisite faktörlerini birarada uygulamayı amaçlayan kimyasal yaklaşım ile ko-kristal formlarının tasarlanması ve ii) ilaçların kornea epitelini geçmesinde önemli katkı sağlayan prekorneal alanda uzun süre kalış (artmış viskozite veya nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistem ile) faktörünü temel alan yaklaşım: hidrofilik termosensitif jel veya hidrofobik (nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT)) sistemlerin tasarlanması, gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan bu formülasyonların in vitro karakterizasyon, hücre

kültürü, ex vivo ve in vivo olarak değerlendirilmesi sonucunda, tavşan gözlerinden elde edilen kornea dokusunun biyomekanik cevabının ölçülmesi deneylerinde, geliştirilen formülasyonlardan en ümit verici olanın riboflavin 5-fosfat sodyum ve Transcutol P içeren (THJ-TP) termosensitif hidrofilik jel formülasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu formülasyonun 15 dakikada bir uygulanmasına rağmen, her iki dakikada bir uygulanan ve “epi-on” (epitel kazınmadan) yöntemine uygun olarak geliştirilmiş ticari preparat olan MedioCROSS TE'den istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük gösterdiği belirlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan araştırmalarda dikkati çeken diğer bir konu da, dünya çapında yaygın (1-500/2000) olarak görülen bir hastalık olmasına rağmen keratokonus, Amerikan Ulusal Nadir Hastalık Organizasyonu tarafından nadir hastalık olarak tanımlanmış ve riboflavin-5-fosfat içeren, Photrexa® adlı ticari preparat Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu tarafından yetim ilaç statüsünde ruhsatlandırılmıştır. Bu durum, üretici firmalara bu ürün için 7 yıllık bir pazar imtiyazı sağlamış ve ürünün geliştirilmesi ve üretilmesinin önünü açmıştır. Buna karşın, Avrupa İlaç Ajansı riboflavin-5-fosfat içeren preparatlardan MedioCROSS D® ve MedioCROSS TE® adlı ürünleri tıbbi cihaz statüsünde değerlendirmiştir. Ülkemizde de bu ürünler tıbbi cihaz statüsünde değerlendirilmektedir ve ithal edilmektedir. Ülkemiz ilaç firmalarının bu konuya ilgisini artırarak bu ürünün yerli olarak geliştirilip üretilmesinin önünü açmak için, bu ürünlerin ülkemizde de yetim ilaç statüsünde değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2004;23(3):253-81.
2. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res*. 2009;26(5):1197-216.
3. Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal SR, Vyas SP. Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review. *Curr Pharm Des*. 2009;15(23):2724-50.
4. Watson PG, Young RD. Scleral structure, organisation and disease. A review. *Experimental Eye Research*. 2004;78(3):609-23.
5. Venkata Ratnam G MS, Rajesh. Ocular Drug Delivery: An Update Review. *Ocular Drug Delivery: An Update Review*. 2011;1(4):437-46.
6. Lynch C, Kondiah PP, Choonara YE, du Toit LC, Ally N, Pillay V. Advances in Biodegradable Nano-Sized Polymer-Based Ocular Drug Delivery. *Polymers*. 2019;11(8):1371.
7. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(3):588-98.
8. Muller L, Pels E, Vrensen G. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *The British Journal of Ophthalmology*. 2001;85(4):437-43.
9. Rowsey TG, Karamichos D. The role of lipids in corneal diseases and dystrophies: a systematic review. *Clinical and translational medicine*. 2017;6(1):30.
10. Farjo A, McDermott M, Soong H. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. *Ophthalmology*, 3rd ed St Louis, MO, Mosby. 2008:203-8.
11. Hanna C, Bicknell DS, O'BRIEN JE. Cell turnover in the adult human eye. *Archives of ophthalmology*. 1961;65(5):695-8.
12. Hazlett L, Wells P, Spann B, Berk R. Epithelial desquamation in the adult-mouse cornea. A correlative TEM-SEM study. *Ophthalmic Research*. 1980;12(5-6):315-23.
13. Wiley L, SundarRaj N, Sun T, Thoft R. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1991;32(3):594-602.
14. Hamrah P, Sahin A. 5 - Limbus and Corneal Epithelium. In: Lee EJJMB, editor. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. London: W.B. Saunders; 2013. p. 29-33.
15. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental Eye Research*. 2004;78(3):503-12.
16. Funderburgh JL. The Corneal Stroma. In: Dartt DA, editor. *Encyclopedia of the Eye*. Oxford: Academic Press; 2010. p. 515-21.
17. DRUBAIX I, LEGEAS J-M, MALEK-CHEHIRE N, SAVOLDELLI M, MÉNASCHE M, ROBERT L, ve ark. Collagen synthesized in fluorocarbon polymer implant in the rabbit cornea. *Experimental eye research*. 1996;62(4):367-76.

18. Scott J, Haigh M. 'Small'-proteoglycan: collagen interactions: keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. *Bioscience reports*. 1985;5(9):765-74.
19. Pavelka M, Roth J. Descemet's Membrane. *Functional Ultrastructure*: Springer Vienna; 2010. p. 184-5.
20. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*. 2003;17(8):912-8.
21. Saettone MFJBBP. Progress and problems in ophthalmic drug delivery. 2002;1:167-71.
22. Singh V, Ahmad R, Heming TJJJoDD. The challenges of ophthalmic drug delivery: a review. 2011;3(1):56-62.
23. Addo RT. *Ocular drug delivery: advances, challenges and applications*: Springer; 2016.
24. Barar J, Asadi M, Mortazavi-Tabatabaei SA, Omid YJJoo, research v. Ocular drug delivery; impact of in vitro cell culture models. 2009;4(4):238.
25. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, ve ark. The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. 2011;52(4):1922-9.
26. Winter KN, Anderson DM, Braun RJJMm, IMA bajot. A model for wetting and evaporation of a post-blink precorneal tear film. 2010;27(3):211-25.
27. Gukasyan HJ, Kim K-J, Lee VH. The conjunctival barrier in ocular drug delivery. *Drug Absorption Studies*: Springer; 2008. p. 307-20.
28. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *J Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(11):1131-5.
29. Hornof M, Toropainen E, Urtti AJEjop, biopharmaceutics. Cell culture models of the ocular barriers. 2005;60(2):207-25.
30. Richards RME. *Ophthalmic products*. Pharmacy Practice E-Book. 2019:204.
31. Irimia T, Ghica MV, Popa L, Anuța V, Arsene A-L, Dinu-Pîrvu C-E. Strategies for improving ocular drug bioavailability and corneal wound healing with chitosan-based delivery systems. *Polymers*. 2018;10(11):1221.
32. Pal Kaur I, Kanwar M. Ocular preparations: the formulation approach. *Drug development and industrial pharmacy*. 2002;28(5):473-93.
33. Khare A, Grover K, Pawar P, Singh I. Mucoadhesive polymers for enhancing retention in ocular drug delivery: a critical review. *Reviews of Adhesion and Adhesives*. 2014;2(4):467-502.
34. Dubashynskaya N, Poshina D, Raik S, Urtti A, Skorik YA. Polysaccharides in ocular drug delivery. *Pharmaceutics*. 2020;12(1):22.
35. Moiseev RV, Morrison PW, Steele F, Khutoryanskiy VV. Penetration enhancers in ocular drug delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(7):321.
36. Barot M, Bagui M, R Gokulgandhi M, K Mitra A. Prodrug strategies in ocular drug delivery. *Medicinal Chemistry*. 2012;8(4):753-68.

37. Omerović N, Vranić E. Application of nanoparticles in ocular drug delivery systems. *Health and Technology*. 2019;1-18.
38. Singh V, Bushetti S, Raju SA, Ahmad R, Singh M, Ajmal M. Polymeric ocular hydrogels and ophthalmic inserts for controlled release of timolol maleate. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2011;3(2):280.
39. Moosa RM, Choonara YE, du Toit LC, Kumar P, Carmichael T, Tomar LK, ve ark. A review of topically administered mini-tablets for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014;66(4):490-506.
40. Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta JJTSWJ. Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. 2014;2014.
41. Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AKJWjop. Ocular drug delivery systems: an overview. 2013;2(2):47.
42. Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer RJAm. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. 2006;18(11):1345-60.
43. Zhang Y, Won CY, Chu CCJJoPSPAPC. Synthesis and characterization of biodegradable network hydrogels having both hydrophobic and hydrophilic components with controlled swelling behavior. 1999;37(24):4554-69.
44. Lin C-C, Anseth KSJPr. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. 2009;26(3):631-43.
45. Benamer S, Mahlous M, Boukrif A, Mansouri B, Youcef SLJNI, Materials MiPRSBBIw, ve ark. Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly (vinyl pyrrolidone). 2006;248(2):284-90.
46. Lugão AB, Rogero SO, Malmonge SMJRP, Chemistry. Rheological behaviour of irradiated wound dressing poly (vinyl pyrrolidone) hydrogels. 2002;63(3-6):543-6.
47. Wang M, Xu L, Hu H, Zhai M, Peng J, Nho Y, ve ark. Radiation synthesis of PVP/CMC hydrogels as wound dressing. 2007;265(1):385-9.
48. Murthy PK, Mohan YM, Varaprasad K, Sreedhar B, Raju KMJJoC, Science I. First successful design of semi-IPN hydrogel–silver nanocomposites: a facile approach for antibacterial application. 2008;318(2):217-24.
49. Abraham GA, De Queiroz AA, San Román JJB. Hydrophilic hybrid IPNs of segmented polyurethanes and copolymers of vinylpyrrolidone for applications in medicine. 2001;22(14):1971-85.
50. Mocanu G, Mihaï D, Dulong V, Picton L, Le Cerf DJCp. New anionic crosslinked multi-responsive pullulan hydrogels. 2012;87(2):1440-6.
51. Satapathy MK, Nyambat B, Chiang C-W, Chen C-H, Wong P-C, Ho P-H, ve ark. A gelatin hydrogel-containing nano-organic PEI–Ppy with a photothermal responsive effect for tissue engineering applications. 2018;23(6):1256.
52. Ratner BD, HOFFMAN AS. Synthetic hydrogels for biomedical applications. ACS Publications; 1976.
53. Wang Q, Zuo Z, Cheung CKC, Leung SSY. Updates on thermosensitive hydrogel for nasal, ocular and cutaneous delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:86-101.

54. Bahram M, Mohseni N, Moghtader M. An introduction to hydrogels and some recent applications. *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*: IntechOpen; 2016.
55. Xiong X, Tam K, Gan LJJon, nanotechnology. Polymeric nanostructures for drug delivery applications based on Pluronic copolymer systems. 2006;6(9-10):2638-50.
56. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008;49(8):1993-2007.
57. Liu J, Lin S, Li L, Liu EJIjop. Release of theophylline from polymer blend hydrogels. 2005;298(1):117-25.
58. Gupta D, Tator CH, Shoichet MSJB. Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. 2006;27(11):2370-9.
59. Kurisawa M, Chung JE, Yang YY, Gao SJ, Uyama HJCC. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid–tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. 2005(34):4312-4.
60. Bi X, Liang A. In Situ-Forming Cross-linking Hydrogel Systems: Chemistry and Biomedical Applications. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. 2016;86:541-7.
61. Sultana Y, Jain R, Aqil M, Ali AJCdd. Review of ocular drug delivery. 2006;3(2):207-17.
62. Kirchof S, Goepferich AM, Brandl FPJEJoP, Biopharmaceutics. Hydrogels in ophthalmic applications. 2015;95:227-38.
63. H Muller R, Shegokar R, M Keck CJCdd. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. 2011;8(3):207-27.
64. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. *Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability*: Springer; 2015.
65. Shidhaye S, Vaidya R, Sutar S, Patwardhan A, Kadam VJCdd. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers-innovative generations of solid lipid carriers. 2008;5(4):324-31.
66. Salunkhe SS, Bhatia NM, Kawade VS, Bhatia MS. Development of lipid based nanoparticulate drug delivery systems and drug carrier complexes for delivery to brain. *J Appl Pharm Sci*. 2015;5:110-29.
67. Fretheim A, Odgaard-Jensen J, Brørs O, Madsen S, Njølstad I, Norheim OF, et al. Comparative effectiveness of antihypertensive medication for primary prevention of cardiovascular disease: systematic review and multiple treatments meta-analysis. 2012;10(1):33.
68. Pallerla SM, Prabhakar BJIJPSRR. A review on solid lipid nanoparticles. 2013;20(2):36.
69. Singh P, Gupta RK, Jan R, Raina SKJJoMS. Adherence for medication among self-reporting rural elderly with diabetes and hypertension. 2017;31(2):86.
70. Purohit DKJAJoPFftafAJP. Nano-lipid carriers for topical application: Current scenario. 2016;10(1).
71. Selvamuthukumar S, Velmurugan RLih, disease. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. 2012;11(1):159.

72. Sharma A, Baldi AJDD. Nanostructured Lipid Carriers: A Review. 2018;7(191):2.
73. Nguyen H, Hwang I, Park JW, Park HJJom. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. 2012;29(6):596-604.
74. Li Q, Cai T, Huang Y, Xia X, Cole SP, Cai YJN. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. 2017;7(6):122.
75. Yoon G, Park JW, Yoon I-SJJoPI. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. 2013;43(5):353-62.
76. KM AS, Natarajan J, Thirumaleshwar S, Kumar HJJJoRiPS. A review of the preparation, characterization and application of nanostructured lipid carriers. 2020;11(1):1130-5.
77. Piao H, Ouyang M, Xia D, Quan P, Xiao W, Song Y, ve ark. In vitro–in vivo study of CoQ10-loaded lipid nanoparticles in comparison with nanocrystals. 2011;419(1-2):255-9.
78. Mehnert W, Mäder KJAddr. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. 2012;64:83-101.
79. Duong V-A, Maeng H-J, Chi S-CJJoDDS, Technology. Nanostructured lipid carriers containing ondansetron hydrochloride by cold high-pressure homogenization method: Preparation, characterization, and pharmacokinetic evaluation. 2019;53:101185.
80. El-Helw A-RM, Fahmy UAJJjon. Improvement of fluvastatin bioavailability by loading on nanostructured lipid carriers. 2015;10:5797.
81. Shah NV, Seth AK, Balaraman R, Aundhia CJ, Maheshwari RA, Parmar GRJJoar. Nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement of raloxifene: Design and in vivo study. 2016;7(3):423-34.
82. Sjöström B, Bergenståhl BJJjop. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. 1992;88(1-3):53-62.
83. Zhang K, Lv S, Li X, Feng Y, Li X, Liu L, ve ark. Preparation, characterization, and in vivo pharmacokinetics of nanostructured lipid carriers loaded with oleanolic acid and gentiopicrin. 2013;8:3227.
84. Joshi M, Patravale VJDD, pharmacy i. Formulation and evaluation of nanostructured lipid carrier (NLC)–based gel of Valdecoxib. 2006;32(8):911-8.
85. Bhagurkar AM, Repka MA, Murthy SNJJops. A novel approach for the development of a nanostructured lipid carrier formulation by hot-melt extrusion technology. 2017;106(4):1085-91.
86. Berton A, Piel G, Evrard BJRpodd, formulation. Powdered lipid nano and microparticles: production and applications. 2011;5(3):188-200.
87. Qiao N, Li M, Schlindwein W, Malek N, Davies A, Trappitt GJJjop. Pharmaceutical cocrystals: an overview. 2011;419(1-2):1-11.
88. Chen Y, Li L, Yao J, Ma Y-Y, Chen J-M, Lu T-BJCG, ve ark. Improving the solubility and bioavailability of apixaban via apixaban–oxalic acid cocrystal. 2016;16(5):2923-30.

89. Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ. *J Pharm Sci*. Pharmaceutical co-crystals. 2006;95(3):499-516.
90. Li Z, Matzger AJ. *J Pharm Sci*. Influence of coformer stoichiometric ratio on pharmaceutical cocrystal dissolution: three cocrystals of carbamazepine/4-aminobenzoic acid. 2016;13(3):990-5.
91. Yu LJ. *Adv Pharm Sci Technol*. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. 2001;48(1):27-42.
92. Gavezzotti A. *J Pharm Sci*. A solid-state chemist's view of the crystal polymorphism of organic compounds. 2007;96(9):2232-41.
93. Brog J-P, Chanez C-L, Crochet A, Fromm K. *J Pharm Sci*. Polymorphism, what it is and how to identify it: a systematic review. 2013;3(38):16905-31.
94. Healy AM, Worku ZA, Kumar D, Madi AM. *J Pharm Sci*. Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. 2017;117:25-46.
95. Vioglio PC, Chierotti MR, Gobetto R. *J Pharm Sci*. Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges. 2017;117:86-110.
96. Tan D, Loots L, Friščić T. *J Pharm Sci*. Towards medicinal mechanochemistry: evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs). 2016;52(50):7760-81.
97. Schultheiss N, Newman A. *J Pharm Sci*. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Crystal growth and design*. 2009;9(6):2950-67.
98. Kumar S, Nanda A. *J Pharm Sci*. Approaches to Design of Pharmaceutical Cocrystals: A Review. 2018;667(1):54-77.
99. Ranjan S, Devarapalli R, Kundu S, Vangala VR, Ghosh A, Reddy CM. *J Pharm Sci*. Three new hydrochlorothiazide cocrystals: Structural analyses and solubility studies. 2017;1133:405-10.
100. McNamara DP, Childs SL, Giordano J, Iarriccio A, Cassidy J, Shet MS, et al. *J Pharm Sci*. Use of a glutaric acid cocrystal to improve oral bioavailability of a low solubility API. 2006;23(8):1888-97.
101. Oswald ID, Allan DR, McGregor PA, Motherwell WS, Parsons S, Pulham CR. *J Pharm Sci*. The formation of paracetamol (acetaminophen) adducts with hydrogen-bond acceptors. 2002;58(6):1057-66.
102. Trask AV, Motherwell WS, Jones WJ. *J Pharm Sci*. Design. Pharmaceutical cocrystallization: engineering a remedy for caffeine hydration. 2005;5(3):1013-21.
103. Vangala VR, Chow PS, Tan RBJ. *J Pharm Sci*. design. Co-crystals and co-crystal hydrates of the antibiotic nitrofurantoin: structural studies and physicochemical properties. 2012;12(12):5925-38.
104. Basavoju S, Boström D, Velaga SP. *J Pharm Sci*. Indomethacin–saccharin cocrystal: design, synthesis and preliminary pharmaceutical characterization. 2008;25(3):530-41.
105. Zhu B, Zhang Q, Wang J-R, Mei X. *J Pharm Sci*. Design. Cocrystals of baicalein with higher solubility and enhanced bioavailability. 2017;17(4):1893-901.

106. Sanphui P, Devi VK, Clara D, Malviya N, Ganguly S, Desiraju GRJMp. Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug–coformer interactions. 2015;12(5):1615-22.
107. Zhou Z, Li W, Sun W-J, Lu T, Tong HH, Sun CC, ve ark. Resveratrol cocrystals with enhanced solubility and tabletability. 2016;509(1-2):391-9.
108. Bandari S, Dronam VR, Eedara BBJoPI. Development and preliminary characterization of levofloxacin pharmaceutical cocrystals for dissolution rate enhancement. 2017;47(6):583-91.
109. Karimi-Jafari M, Padrela L, Walker GM, Croker DM. Creating cocrystals: a review of pharmaceutical cocrystal preparation routes and applications. *Crystal Growth & Design*. 2018;18(10):6370-87.
110. Thayyil AR, Juturu T, Nayak S, Kamath S. Pharmaceutical Co-Crystallization: Regulatory Aspects, Design, Characterization, and Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2020;10(2):203.
111. Friščić T, Reid DG, Day GM, Duer MJ, Jones WJCG, Design. Effect of fluorination on molecular conformation in the solid state: Tuning the conformation of cocrystal formers. 2011;11(4):972-81.
112. Bethune SJ, Schultheiss N, Henck J-OJGg, design. Improving the poor aqueous solubility of nutraceutical compound pterostilbene through cocrystal formation. 2011;11(7):2817-23.
113. Brittain HGJGg, design. Vibrational spectroscopic studies of cocrystals and salts. 3. Cocrystal products formed by benzenecarboxylic acids and their sodium salts. 2010;10(4):1990-2003.
114. Kelly AL, Gough T, Dhumal RS, Halsey S, Paradkar AJIjop. Monitoring ibuprofen–nicotinamide cocrystal formation during solvent free continuous cocrystallization (SFCC) using near infrared spectroscopy as a PAT tool. 2012;426(1-2):15-20.
115. Repka MA, Battu SK, Upadhye SB, Thumma S, Crowley MM, Zhang F, ve ark. Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: Part II. 2007;33(10):1043-57.
116. Liu X, Lu M, Guo Z, Huang L, Feng X, Wu CJPr. Improving the chemical stability of amorphous solid dispersion with cocrystal technique by hot melt extrusion. 2012;29(3):806-17.
117. Li S, Yu T, Tian Y, McCoy CP, Jones DS, Andrews GPJMp. Mechanochemical synthesis of pharmaceutical cocrystal suspensions via hot melt extrusion: feasibility studies and physicochemical characterization. 2016;13(9):3054-68.
118. Rehder S, Christensen NPA, Rantanen J, Rades T, Leopold CSJEJoP, Biopharmaceutics. High-shear granulation as a manufacturing method for cocrystal granules. 2013;85(3):1019-30.
119. Sládková V, Dammer O, Sedmak G, Skořepová E, Kratochvíl BJC. Ivabradine hydrochloride (S)-mandelic acid co-crystal: in situ preparation during formulation. 2017;7(1):13.
120. Cheney ML, Weyna DR, Shan N, Hanna M, Wojtas L, Zaworotko MJJJops. Coformer selection in pharmaceutical cocrystal development: a case study of a meloxicam

aspirin cocrystal that exhibits enhanced solubility and pharmacokinetics. 2011;100(6):2172-81.

121. Croker DM, Rasmuson ÅCJOPR, Development. Isothermal suspension conversion as a route to cocrystal production: one-pot scalable synthesis. 2014;18(8):941-6.
122. Basavoju S, Boström D, Velaga SPJCG, design. Pharmaceutical cocrystal and salts of norfloxacin. 2006;6(12):2699-708.
123. Chow SF, Chen M, Shi L, Chow AH, Sun CCJPr. Simultaneously improving the mechanical properties, dissolution performance, and hygroscopicity of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide. 2012;29(7):1854-65.
124. Patil SP, Modi SR, Bansal AKJEJoPS. Generation of 1: 1 carbamazepine: nicotinamide cocrystals by spray drying. 2014;62:251-7.
125. Walsh D, Serrano DR, Worku ZA, Norris BA, Healy AMJlJop. Production of cocrystals in an excipient matrix by spray drying. 2018;536(1):467-77.
126. Sheikh AY, Rahim SA, Hammond RB, Roberts KJJC. Scalable solution cocrystallization: case of carbamazepine-nicotinamide I. 2009;11(3):501-9.
127. Holaň J, Ridvan L, Billot P, Štěpánek FJCES. Design of co-crystallization processes with regard to particle size distribution. 2015;128:36-43.
128. Padrela L, Rodrigues MA, Tiago Jo, Velaga SP, Matos HA, de Azevedo EGJCG, ve ark. Insight into the mechanisms of cocrystallization of pharmaceuticals in supercritical solvents. 2015;15(7):3175-81.
129. Neurohr C, Erriguible A, Laugier S, Subra-Paternault PJCEJ. Challenge of the supercritical antisolvent technique SAS to prepare cocrystal-pure powders of naproxen-nicotinamide. 2016;303:238-51.
130. Cuadra IA, Cabañas A, Cheda JA, Martínez-Casado FJ, Pando CJJoCU. Pharmaceutical co-crystals of the anti-inflammatory drug diflunisal and nicotinamide obtained using supercritical CO₂ as an antisolvent. 2016;13:29-37.
131. Padrela L, Rodrigues MA, Tiago J, Velaga SP, Matos HA, de Azevedo EGJTJoSF. Tuning physicochemical properties of theophylline by cocrystallization using the supercritical fluid enhanced atomization technique. 2014;86:129-36.
132. Nottingham J. Practical observations on conical cornea: and on the short sight, and other defects of vision connected with it. 1854.
133. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: an inflammatory disorder[quest]. Eye. 2015;29(7):843-59.
134. Bourges JL, Robert AM, Robert L. A genetic anomaly of oriented collagen biosynthesis and cross-linking: Keratoconus. Pathologie Biologie. 2015;63(1):24-31.
135. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. Survey of ophthalmology. 1984;28(4):293-322.
136. Hashemi H, Seyedian MA, Miraftab M, Fotouhi A, Asgari S. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet a irradiation for keratoconus: long-term results. Ophthalmology. 2013;120(8):1515-20.
137. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. American journal of ophthalmology. 1986;101(3):267-73.

138. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, ve ark. Rare disease terminology and definitions—a systematic global review: report of the ISPOR rare disease special interest group. *Value in Health*. 2015;18(6):906-14.
139. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2019;179(6):885-92.
140. Teng C. Electron microscope study of the pathology of keratoconus: part I. *American journal of ophthalmology*. 1963;55(1):18-47.
141. Somodi S, Hahnel C, Slowik C, Richter A, Weiss D, Guthoff R. Confocal in vivo microscopy and confocal laser-scanning fluorescence microscopy in keratoconus. *German journal of ophthalmology*. 1996;5(6):518-25.
142. Elsheikh A, Alhasso D, Rama P. Assessment of the epithelium's contribution to corneal biomechanics. *Experimental eye research*. 2008;86(2):445-51.
143. Takahashi A, Nakayasu K, Okisaka S, Kanai A. [Quantitative analysis of collagen fiber in keratoconus]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1990;94(11):1068-73.
144. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1997;38(1):121-9.
145. Cannon D, Foster C. Collagen crosslinking in keratoconus. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1978;17(1):63-5.
146. Ambrósio R, Alonso RS, Luz A, Velarde LGC. Corneal-thickness spatial profile and corneal-volume distribution: tomographic indices to detect keratoconus. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2006;32(11):1851-9.
147. Chunyu T, Xiujun P, Zhengjun F, Xia Z, Feihu Z. Corneal collagen cross-linking in keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2014;4(1):1-8.
148. Jhanji V, Sharma N, Vajpayee RB. Management of keratoconus: current scenario. *British Journal of Ophthalmology*. 2010;bjo. 2010.185868.
149. Espandar L, Meyer JJMEAjoo. Keratoconus: overview and update on treatment. 2010;17(1):15.
150. Barnett M, Mannis MJJC. Contact lenses in the management of keratoconus. 2011;30(12):1510-6.
151. Leung KKJC, Optometry E. RGP fitting philosophies for keratoconus. 1999;82(6):230-5.
152. Rathi VM, Mandathara PS, Dumpati SJJoo. Contact lens in keratoconus. 2013;61(8):410.
153. Sarezky D, Orlin SE, Pan W, VanderBeek BLJC. Trends in corneal transplantation in keratoconus. 2017;36(2):131.
154. Watson SL, Ramsay A, Dart JK, Bunce C, Craig EJO. Comparison of deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. 2004;111(9):1676-82.
155. Luengo-Gimeno F, Tan DT, Mehta JSJTos. Evolution of deep anterior lamellar keratoplasty (DALK). 2011;9(2):98-110.

156. Kuo IC, Broman A, Pirouzmanesh A, Melia M. Is There an Association between Diabetes and Keratoconus? *Ophthalmology*. 2006;113(2):184-90.
157. Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;214(3):793-7.
158. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Experimental eye research*. 1998;66(1):97-103.
159. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American journal of ophthalmology*. 2003;135(5):620-7.
160. Kagan HM, Trackman PC. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;5(3):206-10.
161. Hertz JJ. A stability and solubility study of riboflavin and some derivatives: University of Florida; 1954.
162. Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A I Principles. *The ocular surface*. 2013;11(2):65-74.
163. Raiskup F, Spoerl E. Corneal Crosslinking with Riboflavin and Ultraviolet A. I. Principles. *The Ocular Surface*. 2013;11(2):65-74.
164. Hayes S, O'Brart DP, Lamdin LS, Douth J, Samaras K, Marshall J, ve ark. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2008;34(4):657-61.
165. O'Brart DPS. Corneal collagen cross-linking: A review. *Journal of Optometry*. 2014;7(3):113-24.
166. Rechichi M, Daya S, Scoria V, Meduri A, Scoria GJJoC, Surgery R. Epithelial-disruption collagen crosslinking for keratoconus: one-year results. 2013;39(8):1171-8.
167. Samaras K, Douth J, Hayes S, Marshall J, Meek KM, O'Brart DPJJoRS. Effect of epithelial retention and removal on riboflavin absorption in porcine corneas. 2009;25(9):771-5.
168. Torricelli AA, Ford MR, Singh V, Santhiago MR, Dupps Jr WJ, Wilson SEJEer. BAC-EDTA transepithelial riboflavin-UVA crosslinking has greater biomechanical stiffening effect than standard epithelium-off in rabbit corneas. 2014;125:114-7.
169. Kissner A, Spoerl E, Jung R, Spekl K, Pillunat LE, Raiskup FJCER. Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin corneal collagen cross-linking. 2010;35(8):715-21.
170. Filippello M, Stagni E, O'Brart DJJoC, Surgery R. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. 2012;38(2):283-91.
171. Caruso C, Ostacolo C, Epstein RL, Barbaro G, Troisi S, Capobianco DJC. Transepithelial corneal cross-linking with vitamin E-enhanced riboflavin solution and abbreviated, low-dose UV-A: 24-month clinical outcomes. 2016;35(2):145.
172. Eljarrat-Binstock E, Domb AJJoCR. Iontophoresis: a non-invasive ocular drug delivery. 2006;110(3):479-89.

173. Cassagne M, Laurent C, Rodrigues M, Galinier A, Spoerl E, Galiacy SD, ve ark. Iontophoresis transcorneal delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking with riboflavin in a rabbit model. 2016;57(2):594-603.
174. Vinciguerra P, Mencucci R, Romano V, Spoerl E, Camesasca FI, Favuzza E, ve ark. Imaging mass spectrometry by matrix-assisted laser desorption/ionization and stress-strain measurements in iontophoresis transepithelial corneal collagen cross-linking. 2014;2014.
175. El-Kateb M, Mostafa MM, Soliman KA, Saleh SYJTEJoC, Surgery R. Epithelium-off versus epithelium-on corneal collagen cross-linking with accelerated UV- a protocol for treatment of keratoconus. 2017;23(2):39.
176. Raiskup F, Veliká V, Veselá M, Spörl EJKMFA. Cross-Linking in Keratoconus: " Epi-off" or " Epi-on"? 2015;232(12):1392-6.
177. Additives EPo, Journal PoSuiAFJE. Safety and efficacy of vitamin B2 (riboflavin and riboflavin 5'-phosphate ester monosodium salt) produced by *Bacillus subtilis* for all animal species based on a dossier submitted by DSM. 2016;14(1):4349.
178. Additives EPoF, Food NSat. Scientific Opinion on the re-evaluation of riboflavin (E 101 (i)) and riboflavin-5'-phosphate sodium (E 101 (ii)) as food additives. EFSA Journal. 2013;11(10):3357.
179. Silva Jr LS, Trevisan MG, Rath S, Poppi RJ, Reyes FG. Chromatographic determination of riboflavin in the presence of tetracyclines in skimmed and full cream milk using fluorescence detection. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2005;16(6A):1174-8.
180. Shabir GA. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. Journal of validation technology. 2005;10:314-25.
181. Guo J, Lu Y, Dong H. HPLC-MS analysis of the riboflavin crude product of semisynthesis. Journal of chromatographic science. 2006;44(9):552-6.
182. Hauser NJ, Santasania CT. An Alternative to the USP and EP Methods for the Analysis of Riboflavin (Vitamin B2) and Impurities [Internet] [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/pharmaceutical/lcms-usp-riboflavin.html>].
183. Coffman RE, Kildsig DO. Effect of nicotinamide and urea on the solubility of riboflavin in various solvents. Journal of pharmaceutical sciences. 1996;85(9):951-4.
184. Ng CM, Manickam S. Improved functionalization and recovery of carboxylated carbon nanotubes using the acoustic cavitation approach. Chemical Physics Letters. 2013;557:97-101.
185. Qiao N, Li M, Schlindwein W, Malek N, Davies A, Trappitt G. Pharmaceutical cocrystals: an overview. International journal of pharmaceutics. 2011;419(1-2):1-11.
186. Schönsee CD, Bucheli TD. Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Selected Natural Toxins. Journal of Chemical & Engineering Data. 2020;65(4):1946-53.
187. Shastri DH, Patel L, Parikh R. Studies on in situ hydrogel: a smart way for safe and sustained ocular drug delivery. Journal of Young Pharmacists. 2010;2(2):116-20.

188. Gadad AP, Wadklar PD, Dandghi P, Patil A. Thermosensitive in situ gel for ocular delivery of lomefloxacin. *Indian J Pharm Educ Res.* 2016;50(2):S96-S105.
189. Soliman KA, Ullah K, Shah A, Jones DS, Singh TR. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. *Drug Discovery Today.* 2019;24(8):1575-86.
190. Singh TRR, Laverty G, Donnelly R. *Hydrogels: design, synthesis and application in drug delivery and regenerative medicine*: CRC Press; 2018.
191. D'Souza S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics.* 2014;2014.
192. Stevens RE, Gray V, Dorantes A, Gold L, Pham L. Scientific and regulatory standards for assessing product performance using the similarity factor, f_2 . *The AAPS Journal.* 2015;17(2):301-6.
193. Luo Q, Zhao J, Zhang X, Pan W. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system. *International journal of pharmaceutics.* 2011;403(1-2):185-91.
194. Shen J, Deng Y, Jin X, Ping Q, Su Z, Li L. Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A: improving in vivo ocular distribution. *International journal of pharmaceutics.* 2010;402(1-2):248-53.
195. Musselman I, Panapitiya N, Bushdiecker D, Tomasek M, Miller C, Gilpin C, ve ark. SEM, TEM, and AFM Analyses of Phase-Separated Polymer Blend Membranes for Gas Separations. *Microscopy and Microanalysis.* 2014;20(S3):2064-5.
196. Pardeike J, Weber S, Matsko N, Zimmer A. Formation of a physical stable delivery system by simply autoclaving nanostructured lipid carriers (NLC). *International journal of pharmaceutics.* 2012;439(1-2):22-7.
197. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology.* 1966;45(4):493-6.
198. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams D. A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 1994;5(3):154-9.
199. Covre JL, Cristovam PC, Loureiro RR, Hazarbassanov RM, Campos M, Sato ÉH, ve ark. The effects of riboflavin and ultraviolet light on keratocytes cultured in vitro. *Arquivos brasileiros de oftalmologia.* 2016;79(3):180-5.
200. Stachon T, Wang J, Song X, Langenbucher A, Seitz B, Szentmáry N. Impact of crosslinking/riboflavin-UVA-photodynamic inactivation on viability, apoptosis and activation of human keratocytes in vitro. *Journal of biomedical research.* 2015;29(4):321.
201. Xin Z, Pu L, Gao W, Wang Y, Wei J, Shi T, ve ark. Riboflavin deficiency induces a significant change in proteomic profiles in HepG2 cells. *Scientific reports.* 2017;7(1):1-10.
202. Polat HK, Pehlivan SB, Özkul C, Çalamak S, Öztürk N, AYTEKİN E, ve ark. Development of Besifloxacin HCl Loaded Nanofibrous Ocular Inserts for the Treatment of Bacterial Keratitis: In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Evaluation. *International journal of pharmaceutics.* 2020:119552.

203. Garcia-Ramírez M, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Simó R. Measuring permeability in human retinal epithelial cells (ARPE-19): implications for the study of diabetic retinopathy. *Permeability Barrier: Springer*; 2011. p. 179-94.
204. da Silva SB, Ferreira D, Pintado M, Sarmiento B. Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery—In vitro tests. *International journal of biological macromolecules*. 2016;84:112-20.
205. Morrison PW, Khutoryanskiy VV. Enhancement in corneal permeability of riboflavin using calcium sequestering compounds. *International journal of pharmaceutics*. 2014;472(1-2):56-64.
206. Cholkar K, Dasari SR, Pal D, Mitra AK. *Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. Ocular transporters and receptors: Elsevier*; 2013. p. 1-36.
207. Beckman KA, Milner MS, Luchs JI, Majmudar PA. *Corneal Cross-linking: Epi-On vs. Epi-Off Current Protocols, Pros, and Cons*.
208. Samaras K, Douth J, Hayes S, Marshall J, Meek KM, O'Brart DP. Effect of epithelial retention and removal on riboflavin absorption in porcine corneas. *Journal of Refractive Surgery*. 2009;25(9):771-5.
209. Gul W, Perveen S, Anwar Z, Qadeer K, Ahmad IJRJoP, Sciences P. Methods of analysis of riboflavin (vitamin B2): A review. 2014;2(2):10-21.
210. European Medicines Agency. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. EMEA London; 1995.
211. Hong D, Li Y, Zhu S, Zhang L, Pang C. Three insensitive energetic co-crystals of 1-nitronaphthalene, with 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT), 2, 4, 6-trinitrophenol (picric acid) and D-mannitol hexanitrate (MHN). *Central European Journal of Energetic Materials*. 2015;12.
212. Berry DJ, Seaton CC, Clegg W, Harrington RW, Coles SJ, Horton PN, ve ark. Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: a study of nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients. *Crystal Growth and Design*. 2008;8(5):1697-712.
213. Braga D, Grepioni F, Shemchuk O. Organic–inorganic ionic co-crystals: a new class of multipurpose compounds. *CrystEngComm*. 2018;20(16):2212-20.
214. Karagianni A, Malamataris M, Kachrimanis K. Pharmaceutical cocrystals: new solid phase modification approaches for the formulation of APIs. *Pharmaceutics*. 2018;10(1):18.
215. Ferreira LT, Alarcon RT, Perpétuo GL, Bannach G. Investigation and characterization by TG/DTG–DTA and DSC of the fusion of Riboflavin, and its interaction with the antibiotic norfloxacin in the screening of cocrystal. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2019;136(2):581-8.
216. Jaipal A, Pandey M, Charde S, Raut P, Prasanth K, Prasad R. Effect of HPMC and mannitol on drug release and bioadhesion behavior of buccal discs of buspirone hydrochloride: In-vitro and in-vivo pharmacokinetic studies. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015;23(3):315-26.
217. Saganowska P, Wesolowski M. DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2018;133(1):785-95.

218. Verhoeven N, Neoh TL, Furuta T, Yamamoto C, Ohashi T, Yoshii H. Characteristics of dehydration kinetics of dihydrate trehalose to its anhydrous form in ethanol by DSC. *Food chemistry*. 2012;132(4):1638-43.
219. Aitipamula S, Vangala VR. X-ray crystallography and its role in understanding the physicochemical properties of pharmaceutical cocrystals. *Journal of the Indian Institute of Science*. 2017;97(2):227-43.
220. de Farias SS, Siqueira SMC, Cunha AP, de Souza CAG, dos Santos Fontenelle RO, de Araújo TG, ve ark. Microencapsulation of riboflavin with galactomannan biopolymer and F127: Physico-chemical characterization, antifungal activity and controlled release. *Industrial Crops and Products*. 2018;118:271-81.
221. Cares-Pacheco M, Vaca-Medina G, Calvet R, Espitalier F, Letourneau JJ, Rouilly A, ve ark. Physicochemical characterization of D-mannitol polymorphs: the challenging surface energy determination by inverse gas chromatography in the infinite dilution region. *International journal of pharmaceutics*. 2014;475(1-2):69-81.
222. Nasr M, Karandikar H, Abdel-Aziz RT, Moftah N, Paradkar A. Novel nicotinamide skin-adhesive hot melt extrudates for treatment of acne. *Expert opinion on drug delivery*. 2018;15(12):1165-73.
223. Griffiths PR, De Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*: John Wiley & Sons; 2007.
224. Chakraborty P, Bairi P, Roy B, Nandi AK. Rheological and fluorescent properties of riboflavin–poly (N-isopropylacrylamide) hybrid hydrogel with a potentiality of forming Ag nanoparticle. *Rsc Advances*. 2014;4(97):54684-93.
225. Lin J, Huang J, Chen J, Lin Z, Ou Y, Yao L, ve ark. Low cytotoxic d-mannitol isolated from the industrial wastewater of *Agaricus bisporus*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2016;4(9):610-4.
226. Zidan AS, Ahmed OA, Aljaeid BM. Nicotinamide polymeric nanoemulsified systems: a quality-by-design case study for a sustained antimicrobial activity. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:1501.
227. Ruel-Gariepy E, Leroux J-CJJoP, *Biopharmaceutics*. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. 2004;58(2):409-26.
228. Kumar S, Haglund BO, Himmelstein KJJJoop, *therapeutics*. In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery. 1994;10(1):47-56.
229. Miller SC, Donovan MDJJoop. Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits. 1982;12(2-3):147-52.
230. Huffman AS, Afrassiabi A, Dong LCJJocr. Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions. 1986;4(3):213-22.
231. Felt O, Baeyens V, Buri P, Gurny R. *Mucosal drug delivery, ocular*1999.
232. Wei G, Xu H, Ding PT, Zheng JMJJocr. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. 2002;83(1):65-74.
233. Mazor Z, Ticho U, Rehany U, Rose LJBJoO. Piloplex, a new long-acting pilocarpine polymer salt. B: Comparative study of the visual effects of pilocarpine and Piloplex eye drops. 1979;63(1):48-51.

234. Cao Y, Zhang C, Shen W, Cheng Z, Yu LL, Ping QJ. *Joc. Poly (N-isopropylacrylamide)–chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery.* 2007;120(3):186-94.
235. Gupta H, Jain S, Mathur R, Mishra P, Mishra AK, Velpandian TJ. *Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel system.* 2007;14(8):507-15.
236. Ryu JH, Lee Y, Kong WH, Kim TG, Park TG, Lee HJB. *Catechol-functionalized chitosan/pluronic hydrogels for tissue adhesives and hemostatic materials.* 2011;12(7):2653-9.
237. Fakhari A, Corcoran M, Schwarz A. *Thermogelling properties of purified poloxamer 407.* *Heliyon.* 2017;3(8):e00390.
238. Soliman KA, Ullah K, Shah A, Jones DS, Singh TR. *JDDT. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications.* 2019;24(8):1575-86.
239. Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmiento VH, de Freitas O, Lopez RFV. *A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery.* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2010;75(2):186-93.
240. Phillips DJ, Pygall SR, Cooper VB, Mann JC. *Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems.* *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2012;64(11):1549-59.
241. Owonubi S, Aderibigbe B, Mukwevho E, Sadiku ER, Ray SS. *JJoIC. Characterization and in vitro release kinetics of antimalarials from whey protein-based hydrogel biocomposites.* 2018;9(1):39-52.
242. Castro Otero E, Mosquera Tallón V, Katime I. *Dual Drug Release of Triamterene and Aminophylline from Poly (N-Isopropylacrylamide) Hydrogels.* 2012.
243. Alhnan MA, Cosi D, Murdan S, Basit AW. *JopS. Inhibiting the gastric burst release of drugs from enteric microparticles: the influence of drug molecular mass and solubility.* 2010;99(11):4576-83.
244. Seyfoddin A, Shaw J, Al-Kassas RJ. *Dd. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery.* 2010;17(7):467-89.
245. Chen D-B, Yang T-z, Lu W-L, ZHANG QJ. *bulletin p. In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel.* 2001;49(11):1444-7.
246. Fundarò A, Cavalli R, Bargoni A, Vighetto D, Zara GP, Gasco MR. *JPR. Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after iv administration to rats.* 2000;42(4):337-43.
247. Freitas C, Müller RH. *Jop. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions.* 1998;168(2):221-9.
248. Freitas CJ. *Jom. Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN™) in aqueous dispersion after addition of electrolyte.* 1999;16(1):59-71.
249. Bhandari R, Kaur IP. *Jop. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles.* 2013;441(1-2):202-12.

250. Neupane YR, Srivastava M, Ahmad N, Kumar N, Bhatnagar A, Kohli KJ. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. 2014;477(1-2):601-12.
251. Sharif Makhmal Zadeh B, Niro H, Rahim F, Esfahani GJ. Ocular delivery system for propranolol hydrochloride based on nanostructured lipid carrier. 2018;86(2):16.
252. Khames A, Khaleel MA, El-Badawy MF, El-Nezhawy AO. Natamycin solid lipid nanoparticles—sustained ocular delivery system of higher corneal penetration against deep fungal keratitis: preparation and optimization. 2019;14:2515.
253. Shah M, Pathak KJ. Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2³ full-factorial design. 2010;11(2):489-96.
254. Gambhire MS, Bhalekar MR, Gambhire VM. Statistical optimization of dithranol-loaded solid lipid nanoparticles using factorial design. 2011;47(3):503-11.
255. Dhoranwala KA, Shah P, Shah SJ. Formulation Optimization of Rosuvastatin Calcium-Loaded Solid Lipid Nanoparticles by 3² Full-Factorial Design. 2015;1(2).
256. Upadhyay S, Patel J, Patel V, Saluja AJ. Effect of different lipids and surfactants on formulation of solid lipid nanoparticles incorporating tamoxifen citrate. 2012;4(Suppl 1):S112.
257. Xu Q, Kambhampati SP, Kannan RM. Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. Middle East African journal of ophthalmology. 2013;20(1):26.
258. Sakurai E, Ozeki H, Kunou N, Ogura Y. Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics. Ophthalmic research. 2001;33(1):31-6.
259. Peres LB, Peres LB, de Araújo PHH, Sayer C. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016;140:317-23.
260. Shah M, Agrawal Y, Garala K, Ramkishan A. Solid lipid nanoparticles of a water soluble drug, ciprofloxacin hydrochloride. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2012;74(5):434.
261. Ghadiri M, Fatemi S, Vatanara A, Doroud D, Najafabadi AR, Darabi M, et al. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. International journal of pharmaceutics. 2012;424(1-2):128-37.
262. Ulyanov NB, James TL. RNA structural motifs that entail hydrogen bonds involving sugar–phosphate backbone atoms of RNA. New Journal of Chemistry. 2010;34(5):910-7.
263. Watenpaugh K, Sieker L, Jensen L. The binding of riboflavin-5'-phosphate in a flavoprotein: flavodoxin at 2.0-Å resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1973;70(12):3857-60.
264. Aburahma MH, Badr-Eldin SM. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. Expert opinion on drug delivery. 2014;11(12):1865-83.
265. Desai J, Thakkar HJ. Effect of particle size on oral bioavailability of darunavir-loaded solid lipid nanoparticles. 2016;33(7):669-78.

266. Schwarz C, Mehnert W, Lucks J, Müller RJJCR. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. 1994;30(1):83-96.
267. Gordillo-Galeano A, Mora-Huertas CEJEJoP, Biopharmaceutics. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. 2018;133:285-308.
268. Desfrancois C, Auzély R, Texier IJP. Lipid nanoparticles and their hydrogel composites for drug delivery: A review. 2018;11(4):118.
269. Panigrahi KC, Patra CN, Jena GK, Ghose D, Jena J, Panda SK, ve ark. Gelucire: a versatile polymer for modified release drug delivery system. 2018;4(1):102-8.
270. Nair R, Kumar AC, Priya VK, Yadav CM, Raju PYJLih, disease. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. 2012;11(1):72.
271. Sanna V, Gavini E, Cossu M, Rassu G, Giunchedi PJJop, pharmacology. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. 2007;59(8):1057-64.
272. Kulbacka J, Pucek A, Wilk KA, Dubińska-Magiera M, Rossowska J, Kulbacki M, ve ark. The effect of millisecond pulsed electric fields (msPEF) on intracellular drug transport with negatively charged large nanocarriers made of solid lipid nanoparticles (SLN): In vitro study. 2016;249(5):645-61.
273. Dudhipala N, Puchchakayala GJDD, pharmacy i. Capecitabine lipid nanoparticles for anti-colon cancer activity in 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon cancer: Preparation, cytotoxic, pharmacokinetic, and pathological evaluation. 2018;44(10):1572-82.
274. Covre JL, Cristovam PC, Loureiro RR, Hazarbasanov RM, Campos M, Sato ÉH, ve ark. The effects of riboflavin and ultraviolet light on keratocytes cultured in vitro. 2016;79(3):180-5.
275. Stachon T, Wang J, Song X, Langenbucher A, Seitz B, Szentmáry NJJobr. Impact of crosslinking/riboflavin-UVA-photodynamic inactivation on viability, apoptosis and activation of human keratocytes in vitro. 2015;29(4):321.
276. Xin Z, Pu L, Gao W, Wang Y, Wei J, Shi T, ve ark. Riboflavin deficiency induces a significant change in proteomic profiles in HepG2 cells. 2017;7(1):1-10.
277. Ven H, Vermeersch M, Shunmugaperumal T, Vandervoort J, Maes L, Ludwig A. Solid lipid nanoparticle (SLN) formulations as a potential tool for the reduction of cytotoxicity of saponins. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;64(3):172-6.
278. Ujhelyi Z, Kalantari A, Vecsernyés M, Róka E, Fenyvesi F, Póka R, ve ark. The enhanced inhibitory effect of different antitumor agents in self-microemulsifying drug delivery systems on human cervical cancer HeLa cells. Molecules. 2015;20(7):13226-39.
279. Sánchez-López E, Espina M, Doktorovova S, Souto E, García M. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye—Part II—Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2017;110:58-69.

- 280.** Huang R, Choe E, Min D. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *Journal of food science*. 2004;69(9):C726-C32.
- 281.** Souto E, Wissing S, Barbosa C, Müller R. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2004;58(1):83-90.
- 282.** Loo C, Basri M, Ismail R, Lau H, Tejo B, Kanthimathi M, ve ark. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:13.