

**MOKSİFLOKSASİN VE SİKLODEKSTRİN KOMPLEKSLERİNİ İÇEREN
OFTALMİK *İN SİTU* JEL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Sinem UYAR ONGAR

Eskişehir 2019

**MOKSİFLOKSASİN VE SİKLODEKSTRİN KOMPLEKSLERİNİ İÇEREN
OFTALMİK *İN SITU* JEL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Sinem UYAR ONGAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinem UYAR-ONGAR'ın "Moksifloksasin ve Siklodekstrin Komplekslerini İçeren Oftalmik *In Situ* Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 20/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL	
Üye :	Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR	
Üye :	Dr. Öğr. Üye. Gülsel YURTDAŞ KIRIMLIOĞLU	

Prof. Dr. Nalan ÇİNDÖZÜ-KARABURUN
Müdür
Enstitü Müdürü

ÖZET

MOKSİFLOKSASİN VE SİKLODEKSTRİN KOMPLEKSLERİNİ İÇEREN OFTALMİK *İN SITU* JEL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinem UYAR ONGAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Moksifloksasin HCl, hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriyel patojenlere karşı yüksek potansiyele sahip dördüncü nesil florokinolon grubundan yeni bir antibiyotiktir. Çalışmada oftalmik kullanım amacıyla moksifloksasin siklodekstrin kompleksi içeren *in situ* jelleşen formülasyonlar hazırlanmış ve *in vitro* testler ile araştırılmıştır. Kompleksler SBE β CD, HP β CD ve M β CD ile, *in situ* jel formülasyonları ise Pluronic F127 ve HPMC ile hazırlanmıştır. *In situ* jel formülasyonlarında, çözünürlük artışı, jelleşme özellikleri, kararlılık ve antimikrobiyal etkinlik özelliklerine göre seçilen M β CD kompleksi kullanılmıştır. Moksifloksasin M β CD kompleksi ile hazırlanan F181-M β CD, F1815-M β CD ve F1915-M β CD kodlu *in situ* jel formülasyonlarının jelleşme özellikleri, reolojik davranışları, *in vitro* salım, antimikrobiyal etkinlik ve kararlılıkları incelenmiştir. Sonuç olarak Moksifloksasin M β CD kompleksi içeren *in situ* jel formülasyonlarının, uzatılmış salım profilleri, *in vitro* etkinlik, kararlılık ve jelleşmeyle uzatılmış gözde kalış süresi sağlama özellikleri ile klasik göz damlalarına alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Moksifloksasin HCl, *In situ* jel, İnküzyon kompleksi

ABSTRACT

PREPARATION and *IN VITRO* EVALUATION OF OPHTHALMIC *IN SITU* GEL FORMULATIONS CONTAINING MOXIFLOXACIN AND CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES

Sinem UYAR ONGAR

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2019

Supervisor: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Moxifloxacin HCl is a new fourth generation fluoroquinolone antibiotic with high potential for both gram-positive and gram-negative bacterial pathogens. *In situ* gelling formulations containing moxifloxacin cyclodextrin complexes were prepared for ophthalmic application and characteristic properties of the formulations were investigated by *in vitro* analyses. Complexes were prepared with SBE β CD, HP β CD and M β CD and *in situ* gelling formulations with Pluronic F127 and HPMC. M β CD complexes were used in *in situ* gelling formulations according to their enhanced solubility, gelling properties, stability and antimicrobial activity properties, The gelling properties, rheological behaviors, *in vitro* release, properties, antimicrobial efficacy and stability of *in situ* gelling formulations; F181-M β CD, F1815-M β CD and F1915-M β CD which were prepared with moxifloxacin M β CD complexes were investigated. As a result, due to the extended release profiles, *in vitro* efficacy, stability, and extended ocular residence time due to gelation, moxifloxacin M β CD complexes incorporated *in situ* gel formulations were regarded as alternative formulations to the classical eye drops.

Keywords: Moxifloxacin HCl, *In situ* gel, Inclusion complex.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, ihtiyacım olduğumda hep yardıma koşan, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, hatalarıma hep sabırla ve güler yüzle yardım eden çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Doç.Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doç.Dr. Ebru BAŞARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Alper ÖZTÜRK'e, Araş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e ve Araş.Gör. Kemal Can DEMİRKILINÇ'a teşekkür ederim.

Antimikrobiyal etkinlik testi çalışmalarında değerli bilgilerinden yararlandığım, bana hep yardım eden Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen, her zaman yardıma koşan değerli arkadaşlarım Kadri GÜLEÇ'e ve Kadir AYKAÇ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamızda kullandığımız etkin maddeyi temin eden DEVA İLAÇ'a teşekkür ederim.

NMR ve FT-IR çalışmalarına katkıları için Öğr. Üyesi Serkan LEVENT'e ve XRD çalışmalarına katkıları için NOBEL İLAÇ'a çok teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, her zaman beni destekleyen, cesaretlendiren ve güç veren anne ve babama tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu süreçte hep yanımda olan, benimle birlikte çabalayan, sevgisiyle ve fikirleriyle destek olan sevgili eşime teşekkür ederim.

Ve bu süreçte hayatımıza giren canım oğlum Bulut Atlas'a sonsuz sevgilerimle...

20/08/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Sinem UYAR OVGAR

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	İİİ
ÖZET	İV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR	VI
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	Vİİ
İÇİNDEKİLER	Vİİİ
TABLolar DİZİNİ	XV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
GÖRSELLER DİZİNİ	XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Siklodekstrinler	2
2.1.1. Doğal siklodekstrinler ve özellikleri	2
2.1.2. Siklodekstrin türevleri.....	4
2.1.3. Siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksleri.....	7
2.1.4. Faz-çözünürlük diyagramının belirlenmesi	9
2.1.5. Etken madde-siklodekstrin komplekslerinin hazırlanma yöntemleri	11

2.1.5.1. Yoğurma yöntemi (kneading).....	11
2.1.5.2. Birlikte çöktürme yöntemi (co-precipitation)	12
2.1.5.3. Püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon)	12
2.1.5.4. Nötralizasyon	12
2.1.5.5. Öğütme yöntemi (physical blending/grinding) ...	12
2.1.5.6. Çimento yöntemi (slurry).....	13
2.1.5.7. Kapalı kapta ısıtma yöntemi (damp mixing and heating)	13
2.1.5.8. Ekstrüzyon yöntemi.....	13
2.1.5.9. Pasta yöntemi	13
2.1.6. İnküzyon komplekslerinin analiz yöntemleri.....	13
2.1.6.1. Katı halde inküzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler	13
2.1.6.2. Çözelti halinde inküzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler.....	14
2.1.7. Siklodekstrinlerin farmakokinetiği ve toksisitesi.....	14
2.1.8. Siklodekstrinlerin farmasötik teknolojide kullanımı	16
2.1.8.1. Etkin madde salımı ve çözünmeye etkisi	16
2.1.8.2. İlaç biyoyararlanımı üzerine etkisi	16
2.1.8.3. İlaç güvenliğine etkisi	17
2.1.8.4. İlaç kararlılığına etkisi	17
2.1.9. Siklodekstrinlerin oftalmik formülasyonlarda kullanımı	17
2.2. Gözün Anatomisi	20
2.2.1. Kornea.....	20
2.2.2. Konjunktiva ve sklera.....	21
2.2.3. Retina	21
2.2.4. Gözyaşı film tabakası.....	21
2.2.5. Aköz humor	21
2.2.6. Oküler ilaç uygulamasını etkileyen bariyerler	22
2.2.6.1. Oküler yüzeyden ilaç kaybı	22
2.2.6.2. Lakrimal sıvı bariyeri	22
2.2.6.3. Kan-oküler bariyer engeli.....	22

2.2.7. Oküler etkin madde absorpsiyonu	23
2.2.7.1. Oküler ilaç uygulama yolları ve absorpsiyon	23
2.2.7.2. Oküler absorpsiyona etki eden faktörler	24
2.2.8. Oküler uygulanan dozaj şekilleri ve özellikleri.....	25
2.3. <i>İn-Situ</i> Aktivasyonla Jel Oluşturan Sistemler	27
2.3.1. <i>İn situ</i> jel oluşum mekanizmaları	27
2.3.1.1. Sıcaklık değişimi ile jelleşen sistemler	27
2.3.1.2. İyon etkisiyle jelleşen sistemler	28
2.3.1.3. pH'ya bağlı olarak jelleşen sistemler	28
2.3.1.4. Enzim/protein etkisiyle jelleşen sistemler	28
2.3.2. Çalışmamızda kullanılan <i>in situ</i> jel oluşturan polimerler	29
2.3.2.1. Poloksamerler (Pluronic)	29
2.3.2.2. Selüloz türevleri	29
2.4. Göz Enfeksiyon Hastalıkları ve Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar	30
2.4.1. Konjunktivit	30
2.4.2. Kornea ülseri / keratit	30
2.4.3. Endoftalmitis	30
2.5. Moksifloksasin Hidroklorür	31
2.5.1. Kimyasal özellikleri	32
2.5.2. Fizikokimyasal özellikleri.....	32
2.5.3. Analiz yöntemleri	32
2.5.4. Antimikrobiyal aktivite spektrumu.....	32
2.5.5. Aktivite mekanizması	33
2.5.6. Direnç gelişimi	33
2.5.7. Farmakokinetik özellikleri	34
3. GEREÇLER.....	35
3.1. Kullanılan Maddeler	35
3.2. Kullanılan Cihazlar	36

4. YÖNTEMLER	37
4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları.....	37
4.1.1. Analitik yöntem geliştirme	37
4.1.2. Analitik yöntem validasyonu	37
4.1.2.1. Doğrusallık	38
4.1.2.2. Doğruluk.....	38
4.1.2.3. Kesinlik.....	38
4.1.2.4. Çalışma aralığı	39
4.1.2.5. Duyarlılık.....	39
4.1.2.6. Seçicilik.....	39
4.1.2.7. Kararlılık.....	39
4.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	40
4.2.1. Çözünürlük faz diyagramlarının ve kompleksleşme oranlarının belirlenmesi.....	40
4.2.2. Moksifloksasin/siklodekstrin komplekslerinin hazırlanması	40
4.2.2.1. Moksifloksasin/SBEβCD kompleksinin hazırlanması	40
4.2.2.2. Moksifloksasin/HPβCD kompleksinin hazırlanması	41
4.2.2.3. Moksifloksasin/MβCD kompleksinin hazırlanması	41
4.2.3. Siklodekstrin komplekslerinin analizi.....	41
4.2.3.1. IR analizi	41
4.2.3.2. DSC analizi.....	42
4.2.3.3. NMR analizi	42
4.2.3.4. XRD analizi	42
4.2.3.5. Etkin madde ve komplekslerin çözünürlük tayini	42
4.2.3.6. Komplekslerdeki etkin madde miktarının belirlenmesi ..	42
4.2.3.7. Etkin maddenin ve komplekslerin çözelti kararlılığının incelenmesi	43
4.2.3.8. Antimikrobiyal etkinlik testi	43
4.3. <i>In Situ</i> Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	43
4.3.1. Formülasyon geliştirme çalışmaları	43
4.3.1.1. Etkin maddesiz formülasyonların hazırlanması	43

4.3.1.2. Etkin maddesiz formülasyonların jelleşme sıcaklığı	44
4.3.1.3. Kompleks içeren formülasyonların hazırlanması	44
4.3.1.4. Kompleks içeren formülasyonların jelleşme sıcaklığı.....	45
4.3.2. Kompleks içeren <i>in situ</i> jel formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi	45
4.3.2.1. pH ölçümü	45
4.3.2.2. Fiziksel görünüş	45
4.3.2.3. Jelleşme kapasitesi.....	46
4.3.2.4. Etkin madde miktar tayini	46
4.3.3. Formülasyon seçimi	46
4.3.4. <i>İn vitro</i> salım çalışmaları	46
4.3.5. Salım kinetiğinin belirlenmesi	47
4.3.6. Kararlılık çalışmaları	47
4.3.7. Formülasyonların antimikrobiyal etkinlik testi	47
5. BULGULAR.....	49
5.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları	49
5.1.1. Doğrusallık.....	49
5.1.1.1. Saf su (pH 7,0) ortamındaki doğrusallık çalışmaları	49
5.1.1.2. Mobil faz ortamındaki doğrusallık çalışmaları	49
5.1.1.3. Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamındaki doğrusallık çalışmaları	50
5.1.2. Doğruluk	51
5.1.2.1. Saf su (pH 7,0) ortamındaki doğruluk çalışmaları.....	51
5.1.2.2. Mobil faz ortamındaki doğruluk çalışmaları.....	52
5.1.2.3. pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğruluk çalışmaları	52
5.1.3. Kesinlik	52
5.1.4. Duyarlılık.....	53
5.1.5. Seçicilik	55
5.1.6. Kararlılık	56
5.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Değerlendirilmesi	57

5.2.1. Çözünürlük faz diyagramları ve kompleksleşme oranları.....	57
5.2.2. Siklodekstrin komplekslerinin analizi.....	59
5.2.2.1. FT-IR analizi.....	60
5.2.2.2. DSC analizi.....	63
5.2.2.3. NMR analizi	65
5.2.2.4. XRD analizi	68
5.2.2.5. Etkin madde ve komplekslerin çözünürlük tayini	71
5.2.2.6. Komplekslerdeki etkin madde miktarı.....	71
5.2.2.7. Etkin madde ve komplekslerin çözelti kararlılığı.....	71
5.2.2.8. Antimikrobiyal etkinlik testi	74
5.3. <i>In Situ</i> Jel Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	76
5.3.1. Formülasyon geliştirme çalışması	76
5.3.1.1. Kompleks içermeyen formülasyonların jelleşme sıcaklığı	76
5.3.1.2. Kompleks içeren formülasyonların jelleşme sıcaklığı.....	77
5.3.2. Formülasyon seçimi	77
5.3.3. MOX:M β CD kompleksi içeren <i>in situ</i> jel formülasyonlarının değerlendirilmesi.....	78
5.3.3.1. pH ölçümü	78
5.3.3.2. Fiziksel görünüş, jelleşme kapasitesi ve miktar tayini ölçümleri.....	78
5.3.4. <i>In vitro</i> salım çalışmaları ve salım kinetiği	79
5.3.5. Formülasyonların kararlılık çalışmaları	81
5.3.6. Formülasyonların antimikrobiyal etkinlik testi.....	93
6. TARTIŞMA.....	94
6.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları	94
6.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	96
6.2.1. IR analizleri	99
6.2.2. DSC analizleri.....	100
6.2.3. NMR analizleri	102

6.2.4. XRD analizleri.....	102
6.2.5. Çözünürlük çalışmaları.....	103
6.2.6. CD komplekslerinin çözelti kararlılığı.....	104
6.2.7. CD komplekslerinin antimikrobiyal etkinlikleri.....	105
6.3. <i>İn Situ</i> Jel Formülasyonu Çalışmaları.....	106
6.3.1. Ön formülasyonlar.....	106
6.3.2. Kompleks içeren <i>in situ</i> jel formülasyonları.....	108
6.3.2. <i>İn vitro</i> salım ve salım kinetiği.....	110
6.3.3. <i>İn situ</i> jel formülasyonlarının kararlılığı.....	111
6.3.4. <i>İn situ</i> jel formülasyonlarının antimikrobiyal etkinlikleri.....	114
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	116
KAYNAKÇA.....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	134

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Piyasada satılan farmasötik ürünlerde bulunabilen bazı siklodekstrinlerin çözünürlükleri ve farmakope monografları	4
Tablo 2.2. Kompleksleşme etkinliğini arttıran yöntemler	11
Tablo 4.1. HPLC çalışma koşulları	38
Tablo 4.2. <i>In situ</i> jel önformülasyon bileşenleri	45
Tablo 4.3. <i>In Situ</i> jel formülasyonunun jelleşme kapasitesi kodları	47
Tablo 5.1. Saf su ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar	49
Tablo 5.2. Mobil faz ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar	50
Tablo 5.3. Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar	51
Tablo 5.4. Saf su ortamında yapılan doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar	52
Tablo 5.5. Mobil faz ortamında yapılan doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar	52
Tablo 5.6. pH 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar	52
Tablo 5.7. Saf su ortamında yapılan kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar	53
Tablo 5.8. Mobil faz ortamında yapılan kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar	54
Tablo 5.9. pH 7,4 fosfat tamponundaki kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar	55
Tablo 5.10. <i>In vitro</i> salım ortamındaki kararlılık sonuçları	57
Tablo 5.11. Denge süresi belirleme çalışmalarına ait sonuçlar	57
Tablo 5.12. Moksifloksasin ve komplekslerinin pH 7,4 ortamındaki çözünürlük değerleri	71
Tablo 5.13. Moksifloksasinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları	72
Tablo 5.14. MOX:SBE β CD kompleksinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları	72
Tablo 5.15. MOX:HP β CD kompleksinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları	73
Tablo 5.16. MOX:M β CD kompleksinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları	73
Tablo 5.17. Etkin madde ve komplekslerin antimikrobiyal testlerine ait zon çapları	74
Tablo 5.18. Kompleks içermeyen formülasyonların jelleşme sıcaklıkları	76

Tablo 5.19. Kompleks içeren formülasyonların jelleşme sıcaklığı	77
Tablo 5.20. MOX:M β CD kompleksi içeren formülasyonların bileşimi (%a/h)	78
Tablo 5.21. MOX:M β CD kompleksi içeren in situ formülasyonların pH ve jelleşme sıcaklıkları	78
Tablo 5.22. MOX:M β CD kompleksi içeren in situ jelleşen formülasyonların, fiziksel görünüş, jelleşme kapasitesi ve miktar tayini ölçümleri	79
Tablo 5.23. <i>In vitro</i> salım kinetiğinin değerlendirmesine ait sonuçlar	81
Tablo 5.24. Kararlılık çalışmalarına ait etkin madde miktarları	82
Tablo 5.25. Kararlılık çalışmalarına ait pH değerleri	83
Tablo 5.26. Kararlılık çalışmalarına ait viskozite değerleri	86
Tablo 5.27. Kararlılık ortamlarında 3 ay bekletilen formülasyonlara ait jelleşme kapasiteleri ve jelleşme sıcaklığı	102
Tablo 5.28. Etkin madde, piyasa preparatı, plasebo formül ve <i>in situ</i> jel formülasyonlarının antimikrobiyal testlerine ait zon çapları	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. (A) β -CD'nin kimyasal yapısı, (B) geometrik yapısının 3 boyutlu gösterimi	3
Şekil 2.2. Bazı CD türevlerinin yapılarının şematik gösterimi	5
Şekil 2.3. Pazarlanan ilaçlarda kullanılan CD'lerin dağılımı	6
Şekil 2.4. İlaç-CD kompleks dengesi (A) 1:1 kompleks ve (B) 1:2 kompleks	9
Şekil 2.5. Higuchi'nin faz-çözünürlük diyagramı	9
Şekil 2.6. Gözün anatomisi	20
Şekil 2.7. Moksifloksasin hidroklorür'ün açık formülü	32
Şekil 5.1. Saf su ortamındaki doğrusallık çalışmasına ait regresyon eğrisi	49
Şekil 5.2. Mobil faz ortamındaki doğrusallık çalışmasına ait regresyon eğrisi	50
Şekil 5.3. pH 7,4 fosfat tamponundaki doğrusallık çalışmasına ait regresyon eğrisi	51
Şekil 5.4. Moksifloksasin, saf siklodekstrinler, etkin maddesiz F1915 formülasyonu ve etkin maddesiz üç çalışma ortamına ait seçicilik kromatogramları	56
Şekil 5.5. Moksifloksasin-SBE β CD çözünürlük faz diyagramı	58
Şekil 5.6. Moksifloksasin-HP β CD çözünürlük faz diyagramı	58
Şekil 5.7. Moksifloksasin-M β CD çözünürlük faz diyagramı	59
Şekil 5.8. MOX-SBE β CD kompleksi ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları	60
Şekil 5.9. MOX-HP β CD kompleksi ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları	61
Şekil 5.10. MOX-M β CD kompleksi ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları	62
Şekil 5.11. MOX-SBE β CD kompleksi ve bileşenlerine ait DSC termogramları	63
Şekil 5.12. MOX-HP β CD kompleksi ve bileşenlerine ait DSC termogramları	64
Şekil 5.13. MOX-M β CD kompleksi ve bileşenlerine ait DSC	64

termogramları

Şekil 5.14. MOX-SBE β CD kompleksi ve bileşenlerine ait NMR spektrumları	65
Şekil 5.15. MOX-HP β CD kompleksi ve bileşenlerine ait NMR spektrumları	66
Şekil 5.16. MOX-M β CD kompleksi ve bileşenlerine ait NMR spektrumları	67
Şekil 5.17. MOX-SBE β CD kompleksi ve bileşenlerine ait XRD profilleri	68
Şekil 5.18. MOX-HP β CD kompleksi ve bileşenlerine ait XRD profilleri	69
Şekil 5.19. MOX-M β CD kompleksi ve bileşenlerine ait XRD profilleri	70
Şekil 5.20. pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki in vitro salım profilleri	80
Şekil 5.21. 25°C saklama ortamında bozunmadan kalan % MOX miktarı	84
Şekil 5.22. 4°C saklama ortamında bozunmadan kalan % MOX miktarı	84
Şekil 5.23. 25°C saklama ortamındaki formülasyonların pH değişimi	85
Şekil 5.24. 4°C saklama ortamındaki formülasyonların pH değişimi	85
Şekil 5.25. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F181 formülasyonunun 25°C sıcaklıktaki reogramları	87
Şekil 5.26. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F181 formülasyonunun 34°C sıcaklıktaki reogramları	88
Şekil 5.27. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1815 formülasyonunun 25°C sıcaklıktaki reogramları	89
Şekil 5.28. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1815 formülasyonunun 34°C sıcaklıktaki reogramları	90
Şekil 5.29. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1915 formülasyonunun 25°C sıcaklıktaki reogramları	91
Şekil 5.30. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1915 formülasyonunun 34°C sıcaklıktaki reogramları	92

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 5.1. Etkin madde ve siklodekstrin komplekslerinin <i>S. Aureus</i> üzerindeki zon görünümleri	74
Görsel 5.2. Etkin madde ve siklodekstrin komplekslerinin <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki zon görünümleri	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

¹H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
AIC	Akaike Bilgi Kriteri
ANOVA	Varyans Analizi
BK	Benzalkonyum Klorür
CD	Siklodekstrin
CGTaz	Siklodekstrin glukanoferaz enzimi
C_{max}	Maksimum Konsantrasyon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
EAA	Konsantrasyon Eğrisi Altındaki Alan
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCl	Hidroklorik Asit
HEC	Hidroksietil Selüloz
HPβD	Hidroksiprobil Beta Siklodekstrin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPMC	Hidroksipropil Metil Selüloz
i	İlaç etkin maddesi
k	Hız sabiti
k.m.	Kafi miktar
LOD	Saptama Sınırı
LOQ	Miktar Tayin Sınırı
m	Eğim
MβCD	Metil beta siklodekstrin
MC	Metil Selüloz
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MSC	Model Seçme Kriteri
MOX	Moksifloksasin
NaCl	Sodyum Klorür
NaCMC	Sodyum Karboksimetil Selüloz
NSAİİ	Nonsteroidal Antienflamatuar İlaç
PF127	Pluronic® F127
PEO	Poliäten oksit
PTFE	Politetra Flor Etilen
PPO	Polipropilen oksit
PVP	Polivinilpirolidon
R²	Determinasyon Katsayısı
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
s	Saat
SBEβCD	Sülfobütileter beta siklodekstrin (Captisol®)
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
XRD	X-ışını kırınımı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Göz içine damlatılacak sulu çözeltiler ve yağlı süspansiyonlar, göz hastalıklarını tedavi etmeyi amaçlayan tüm formülasyonların yaklaşık % 90'ını temsil etmektedir. Topikal olarak göze uygulanan ilaçlar korneadan içeri girer ve göz dokularına biyolojik olarak dağıtılır. Gözyaşı sıvısının varlığıyla ilacın gözde bulunma süresi ve dolayısıyla absorpsiyonu azalır. Bu nedenle göze uygulanan preparatların biyoyararlanımı genellikle çok düşüktür.

Son yıllarda göze uygulanan preparatların biyoyararlanımının artırılmasını amaçlayan birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle siklodekstrinler çözünürlüğü başarılı bir şekilde arttırdığı için çok fazla tercih edilmişlerdir. Siklodekstrinler doğal olarak bulunan ve α , β , γ olarak adlandırılan, sırasıyla altı, yedi ya da sekiz glukoz ünitesinden oluşan hidrofilik, siklik oligosakkaritlerdir. Çözünürlüğü düşük, kararsız ve iritasyon etkisi olan etkin maddelerin siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksleri oluşturularak çözünürlük ve kararlılıklarında artış sağlanırken, yan etkilerinde azalma gözlenmektedir.

In situ jelleşen oftalmik sistemler, fizyolojik koşullara maruz kaldıklarında, jel fazına geçen, artan viskozite ve mukoadezif özellikleriyle oküler kalış süresinde artışa neden olan viskoz sıvılardır. Bu sistemler, ilaç ile kornea ve/veya konjunktival epitel arasındaki temas süresini uzatarak, drenajı yavaşlatarak oftalmik ilaçların oküler biyoyararlanımını arttırmaktadırlar.

Günümüzde bakteriyel enfeksiyonların topikal tedavisinde kullanılmakta olan moksifloksasin içeren göz damlaları bulunmaktadır. Moksifloksasin suda çözünürlüğü düşük ve ışığa karşı hassasiyeti olan bir etkin maddedir. Bu nedenler ile çalışmada moksifloksasinin siklodekstrin kompleksinin *in situ* jelleşen bir sistem içerisinde verilmesi ile çözünürlük, kararlılık ve biyoyararlanım için iyileştirme amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler (CD), bir *Bacillus amylobacter* besiyerinde nişastanın bozunma ürünleri olarak ilk olarak 1891'de Villiers tarafından izole edilmiştir. Bu maddelere selüloza benzerliği nedeniyle “cellulosine” adı verilmiştir. Sonraki yıllarda, Schardinger, CD bilimi için önemli bir keşifle, şeker ve nişasta içeren bitki materyalinden aseton ve etil alkol üretebilen yeni bir organizmayı izole ederek, 1911'de *Bacillus macerans* suşunun nişastadan büyük miktarda kristalin dekstrin (%25-30) ürettiğini açıklamıştır. Schardinger, ayrıca “cellulosine” i karakterize etme ve siklik oligosakkaritler olduklarını belirleme çalışmaları da yaparak CD kimyasının kurucusu olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, CD'lere, özellikle eski literatürlerde, Schardinger dekstrinleri denilmiştir. 1935'te Freudenberg ve arkadaşları ilk defa γ -CD'ni izole ederek, yapısını aydınlatmışlardır. Hemen ardından Cramer tarafından CD'in inklüzyon kompleksleri oluşturduğu keşfedilmiş ve bunlara “klatrat” adı verilmiştir. Daha sonra ise CD kimyası Bender ve Komiyama tarafından ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Günümüzde ise CD çalışmaları halen yoğun olarak sürdürülmektedir (Sa Couto, 2015).

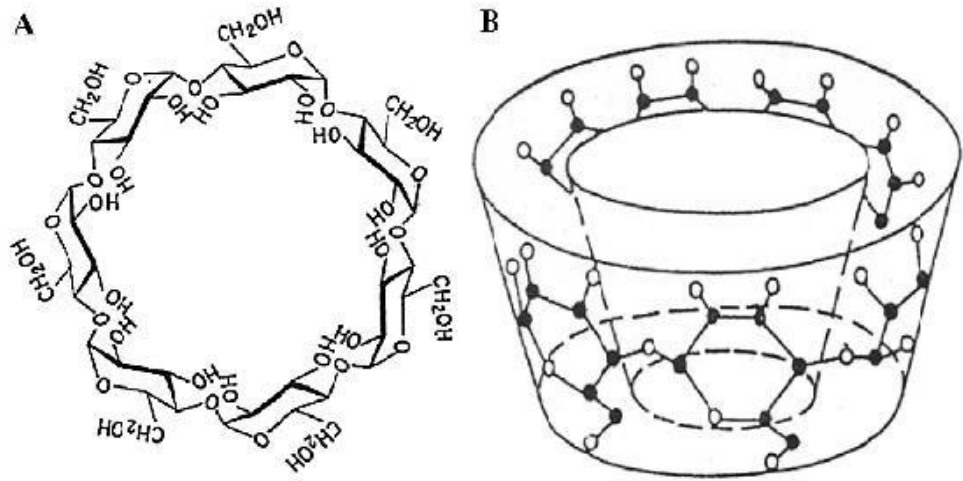
2.1.1. Doğal siklodekstrinler ve özellikleri

CD üretimi, nişastanın CD glukanotransferaz enzimi (CGTaz) tarafından parçalanmasıyla oluşmaktadır. CGTaz'ı üretmek için aşağıda sunulan çeşitli mikroorganizmalar kullanılmıştır: *Bacillus amylobacter*, *Bacillus macerans*, *Bacillus clausii* suşu E16, *Bacillus megaterium*, *Alkaliphilic Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* pAD26 hücreleri, *Amphibacillus* sp. NPST-10, *Amphibacillus* sp. NRC-WN ve *Klebsiella Pneumoniae* (Sa Couto, 2015).

CD üretimi dört adımda gerçekleşmektedir:

- CGTaz üreten mikroorganizma kültürünün hazırlanması,
- Oluşan enzimin ortamdan ayrılması, saflaştırılması ve kontaminasyonunun saptanması,
- Hidrolize olmuş nişastanın dekstrin karışımına enzimatik olarak dönüştürülmesi,
- Karışımdan siklodekstrinlerin ayrılması, saflaştırılması ve kristalize hale getirilmesi (Çelebi, 1987).

Dönüşümün sonuç ürünü, kullanılan çeşitli enzimlere bağlı olarak farklı oranlarda $\alpha/\beta/\gamma$ CD'in üç ana tipinin bir karışımıdır. Üç CD tipinin artırılması, suda çözünürlük farkına dayanır ve suda daha az çözünür β -CD kristalizasyonunu ve daha çözünür α - ve γ -CD'ler için kromatografik teknikleri içerir (Bartzoka, Crestini ve Lange, 2015). Bu siklik oligosakkaritler, (α -1,4) bağlı α -D-glukopiranoz birimlerinden oluşur ve bir miktar lipofilik merkezi boşluk ve bir hidrofilik dış yüzey içerirler. Glukopiranoz ünitelerinin sandalye konformasyonu nedeniyle, CD'ler silindir yerine kesik koni şeklindedirler (Şekil 2.1). Doğal α -, β - ve γ -CD sırasıyla altı, yedi ve sekiz glukopiranoz biriminden oluşmaktadır. Doğal CD'ler ve kompleksleri hidrofilik olmasına rağmen, sudaki çözünürlükleri sınırlıdır, özellikle β -CD'in suda çözünürlüğü oldukça sınırlıdır. Bunun, CD moleküllerinin kristal halde nispeten kuvvetli bir şekilde bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Loftsson vd., 2005).



Şekil 2.1. (A) β -CD'nin kimyasal yapısı, (B) geometrik yapısının 3 boyutlu gösterimi (Mura, 2014)

CD monografları birçok Farmakope'de bulunmaktadır. Örneğin, α -CD ve β -CD Amerikan Farmakopesi, Avrupa Farmakopesi ve Japon Farmakopesinde listelenmiştir. γ -CD yakında Amerikan Farmakopesinde ve daha sonra Avrupa Farmakopesinde yer alması beklenmektedir (Tablo 2.1). β -CD ve γ -CD, gıda katkı maddeleri olarak kullanılmak üzere FDA'nın "genel olarak güvenli kabul edilen" listesinde de yer almaktadır (Loftsson ve vd., 2005).

Tablo 2.1. Piyasada satılan farmasötik ürünlerde bulunabilen bazı siklodekstrinlerin çözünürlükleri ve farmakope monografları (Loftsson ve Duchene, 2007).

CD	Süstitüsyon Derecesi	Molekül Ağırlığı (Da)	Suda çözünürlüğü (mg/mL)	Farmakope		
				EP – 5.Baskı (2005)	USP - 28.baskı (2005)	JPC (1997)
α -CD	-	972	145	Var	Yok	Var
β -CD	-	1135	18.5	Var	Var	Var
HP- β -CD	0.65	1400	>600	Var	Var	Yok
RM- β -CD	1.8	1312	>500	Yok	Yok	Yok
SBE- β -CD	0.9	2163	>500	Yok	Yok	Yok
γ -CD	-	1297	232	Halen çalışılmakta	Var	Var
HP- γ -CD	0.6	1576	>500	Yok	Yok	Yok

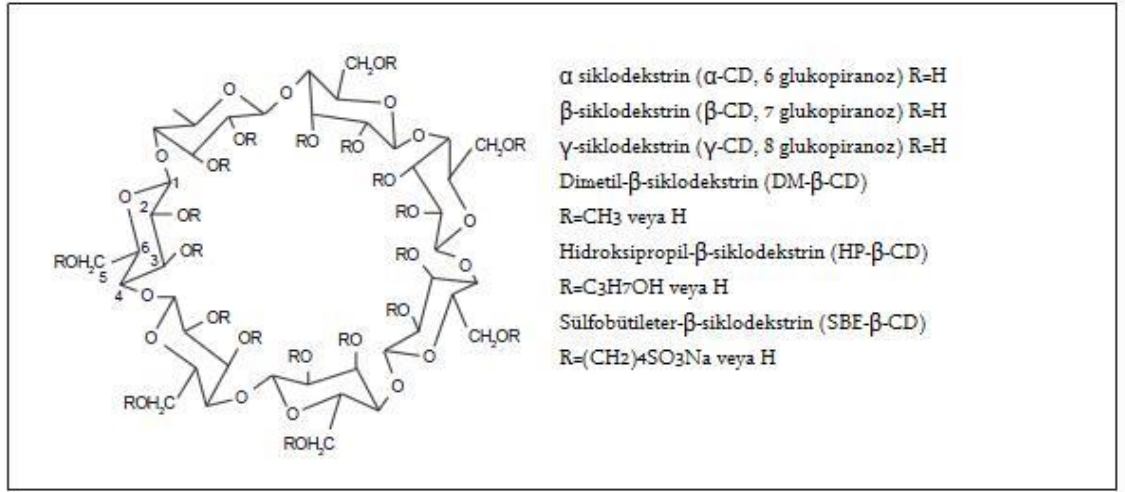
2.1.2. Siklodekstrin türevleri

CD'lerin suda düşük çözünürlüğü, hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Hidroksil grupları üzerindeki herhangi bir yer değiştirme, hidrofobik kısımlar tarafından bile olsa, sudaki çözünürlüklerinde çarpıcı bir artışa yol açmaktadır (Duchene, 2011).

Ekonomik fiyat, kolay eşebilirlik, onay durumu, boşluk boyutları, vb. nedenlerden dolayı β -CD en yaygın kullanılan CD'dir. Birçok amaç için kullanılması nedeniyle üretilen ve tüketilen CD'lerin en az %95'ini temsil etmektedir. Bununla birlikte, kendisinin ve komplekslerinin çoğunun düşük çözünürlüğü daha geniş kullanımını kısıtlamaktadır. Bu kısıtlılıklar nedeniyle, kimyasal veya enzimatik modifikasyonlar ile bütün CD'lerin çözünürlükleri belirgin bir şekilde iyileştirilmiştir (Szejtli,1997).

CD'lerde her glikopiranoz ünitesi, hem fonksiyon hem de reaktivite açısından farklı olan üç serbest hidroksi grubuna sahiptir. C (2) ve C (3) sekonder ve C (6) primer hidroksi gruplarının nispi reaktiviteleri, reaksiyon koşullarına (pH, sıcaklık, reaktifler) bağlıdır. β -CD'de, hidrojen atomu veya hidroksi grubu, örneğin; alkil, hidroksialkil, karboksialkil, amino, tiyo, tosil, glukosil, maltosil ve binlerce eter, ester, anhidro-,

deoksi-, asidik, baz, vb. türevleri kimyasal veya enzimatik reaksiyonlarla hazırlanabilir (Şekil 2.2.) (Szejtli,1997).



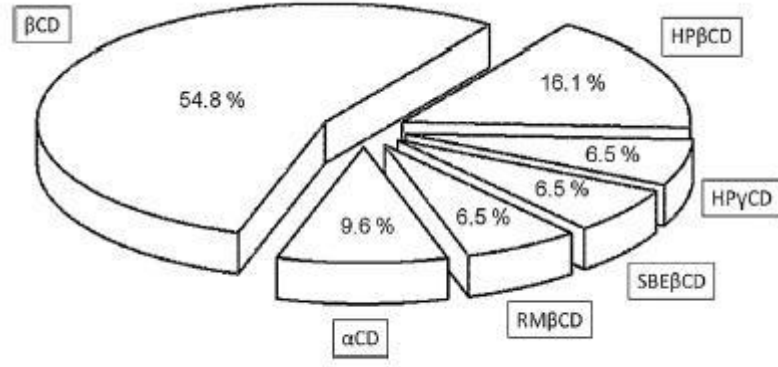
Şekil 2.2. Bazı CD türevlerinin yapılarının şematik gösterimi (Arajuo vd., 2006).

Bu türevlendirmelerin amaçları şunlardır:

- CD türevinin (ve komplekslerinin) çözünürlüğünün artırılması,
- CD ile etken madde arasındaki uyum ve/veya ilişkinin iyileştirilmesi, ilacın eşzamanlı olarak stabilizasyonu, reaktivite ve hareketliliğinin azaltılması,
- Bağlanma bölgesine spesifik (katalitik) gruplar eklemek (örneğin, enzim modellemesi),
- Çözünmez, immobilize edilmiş CD içeren yapılar, polimerler (örneğin kromatografik amaçlar için) oluşturmak (Szejtli, 2004).

Yüzlerce modifiye CD hazırlanmış ve uygulamaları gösterilmiştir. Bununla birlikte, sadece hidroksipropil, metil ve sülfobutil eter gruplarını içeren türevler ticari olarak yeni farmasötik eksipyanlar olarak kullanıma girmiştir (Şekil 2.3) (Kurkov ve Loftsson, 2013).

Metile edilmiş bir β-CD, β-CD'nin kendisinden daha hidrofobiktir, bu nedenle, moleküller ile daha kararlı (fakat çözülebilir) bir kompleks oluşturmaktadır. Türevlerin sulu çözünürlüğü sıcaklıktan olumsuz etkilenir ve ısı sterilizasyonu sırasında çökme meydana gelir. Bununla birlikte, rastgele metillenmiş β-CD (M14-β-CD), sıcaklık arttıkça artan, suda uygun bir çözünürlük (> 50 g/100 ml) gösterir (Mosher ve Thompson, 2007).



Şekil 2.3. Pazarlanan ilaçlarda kullanılan CD'lerin dağılımı (Kurkov ve Loftsson, 2013).

Hidroksipropilasyon, primer veya sekonder hidroksil grupları üzerinde tamamen rastgele bir şekilde meydana gelir ve amorf bir karışıma yol açar. Süstitüsyonun derecesi hidroksipropil türevlerinin kompleks oluşturma yeteneğini ve çözünürlüğünü etkiler. 2HP-β-CD'nin iki ticari preparatı, EncapsinTM ve Molecusol[®], çözünürlük ve kompleksleşme arasında bir denge sağlayan süstitüsyon seviyelerine sahiptir. Bu 2HP-β-CD türevleri, kompleksleşmede eşit derecede etkilidir ve %50'yi (a/h) aşan miktarlarda suda çözünürlük gösterirler. Her ikisi de parenteral olarak uygulanmıştır (Mosher ve Thompson, 2007).

Sülfobutil eter ise, Rajewski tarafından, doğrudan sülfonatlanmış CD'leri, C-6 pozisyona sülfonik asit parçasının sokulması yoluyla hazırlanmıştır. SBE-β-CD türevleri HP-β-CD'lere benzer, amorf kompleksler oluşturma eğilimindedir. Bunlar suda yüksek oranda çözünürler (> 50 mg/ml) ve biraz higroskopiktirler. SBE7-β-CD türevi klinik denemelerde kullanılmıştır ve ticari olarak Captisol[®] adıyla geliştirilmiştir. Parenteral uygulamalar için uygundur (Mosher ve Thompson, 2007).

Dallanmış CD türevleri, kimyasal veya enzimatik sentez yoluyla elde edilirler, burada birincil veya ikincil hidroksil gruplarının α-(1.6) bağları vasıtasıyla mono- veya disakkaritlerin ikamesi, suda çözünürlüğü ve kimyasal saflığı yüksek olan dallanmış CD'lerin oluşumu ile sonuçlanır (Miranda vd., 2011).

CD'lerin sudaki çözünürlükleri, hidroksil gruplarının, bir eter veya ester bağı vasıtasıyla metilden daha büyük alkil gruplarıyla değiştirildiğinde azalır. Çözünürlük, daha az polar çözücüde artan, daha az higroskopik özellikler ve daha düşük yüzey gerilimi sunan, yer değiştirme oranıyla orantılı olarak azalır (Miranda vd., 2011).

Açillenmiş türevler, tüm β -CD hidroksil gruplarının farklı alkil zincirleriyle ikame edilmesiyle elde edilirler; ilgili alkil zincir arttıkça, suda çözünürlük, erime noktası ve alkali hidroliz hızı azalmaktadır. β -CD türevlerinin organik çözücülerdeki (etanol, aseton veya kloroform) konsantre çözeltilerinde, çözücü buharlaştırıldıktan sonra meydana gelen bir jelleşme işleminden dolayı viskozite artar (Miranda vd., 2011).

Etilenmiş β -CD türevlerinden farklı olarak, açillenmiş CD'ler, ana CD (β -CD) verecek şekilde alkalın hidrolizinden sonra organizmadan kolayca elimine edilmektedir. Enteral uygulamada toksisiteyi kaldırdığı için bu önemli bir faktördür (Miranda vd., 2011).

2.1.3. Siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksleri

CD'ler, lipofilik bir merkezi boşluğa ve yüzey üzerine yerleştirilmiş hidroksil gruplarına sahiptir; hidrofobik bileşiklerin dahil edilmesi, esas olarak ilaç molekülleri ve CD boşluğunun duvarları arasındaki hidrofobik etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Ancak, Van der Waals ve dipol-dipol etkileşimleri gibi diğer kuvvetler de etken maddenin bağlanmasında rol oynamaktadır (Cheirsilp ve Rakmai, 2016).

İlaç-CD kompleksi oluşturmanın bir çok avantajı vardır; etken madde çözünürlüğünü arttırmak, biyoyararlanımı arttırmak, kararlılığı arttırmak, sıvıları ve yağları serbest akan tozlara dönüştürmek, koku ve tatları düzeltmek, hemolizi azaltmak, katkı maddesi uyumsuzluklarını önlemek (Chaudhary ve Patel, 2013).

CD'in aktif etken maddeyle bir inklüzyon kompleksi oluşturma kabiliyeti birkaç faktöre dayanır. Birincisi steriktir ve CD'in etken madde molekülünün boyutuna veya aktif bileşenlerin bazı önemli fonksiyonel gruplarının nispi boyutuna bağlıdır. Etken maddenin boyutu çok büyükse, CD boşluğuna tam olarak sığmayacaktır. Ek olarak, üç doğal CD'in yüksekliği aynı olabilese de, bunlar glikoz birimlerinin sayısı ve boşluğun çapı bakımından farklılık gösterir. Boyutlara dayanarak, α -CD tipik olarak düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle veya alifatik bir yan zincire sahip bileşiklerle bir kompleks oluşturabilir. β -CD, aromatik ve heterosiklik moleküller ile kompleks yapacaktır ve γ -CD, makrosiklikler ve steroidler gibi daha büyük molekülleri barındıracaktır (Jambhekar ve Breen, 2016).

Kompleks oluşumu için bir başka önemli faktör, seçilen CD'in farklı bileşenleri ile etken madde molekülü arasındaki termodinamik etkileşimdir. Bir kompleksleşmenin

gerçekleşmesi için, etken madde molekülünü CD boşluğuna çeken uygun bir enerji itici güç olmalıdır (Jambhekar ve Breen, 2016).

Küçük iyonize moleküller (örneğin, organik asitlerin ve bazların tuzları) ve suda çözünür polimerler (örneğin selüloz türevleri) gibi agregatları çözüdüren ve stabilize eden eksipyanlar kompleksleşme veriminin büyüklüğünü artırabilir (Loftsson ve Brewster, 2012).

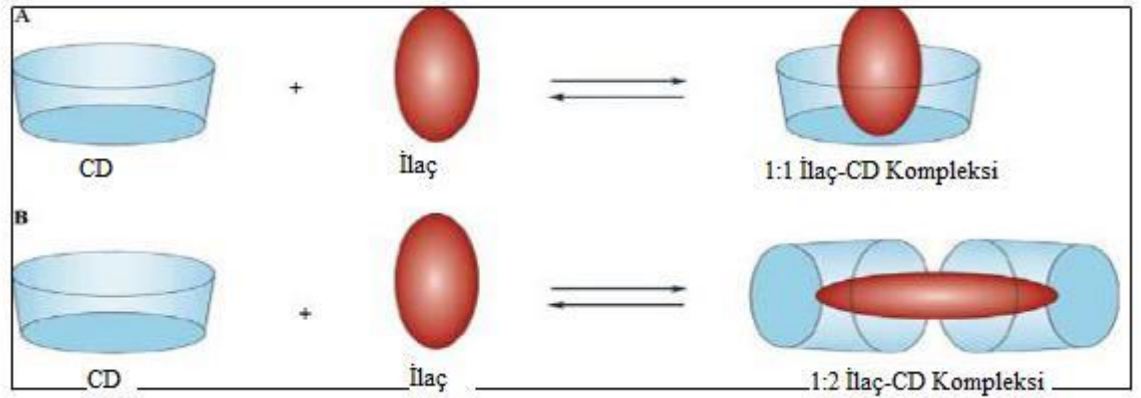
Kompleksler ya çözelti halinde ya da kristal halde olabilir. Su tipik olarak dahil etme kompleksi için tercih edilen bir çözücüdür, ancak kompleksleştirme bir yardımcı çözücü olan sistemde ve sulu olmayan çözücülerin varlığında gerçekleştirilebilir (Kumar Das vd., 2013).

Bir inklüzyon kompleksinin oluşumu, serbest ilaç ve CD molekülleri ile dahil edilen supramoleküller arasındaki dengenin sonucudur:



Bir inklüzyon kompleksinin oluşumu ve ayrışması, farklı isimlere sahip olan bir K sabiti ile yönetilir; afinite sabiti (ilaç molekülünün CD boşluğu için afinitesi), stabilite sabiti (inklüzyon kompleksi ile ayrışmamış bir formda stabilite) veya bağlanma sabiti. K değeri ne kadar yüksek olursa, kompleksleşme o kadar kararlı olur. K'nın değeri, diğer faktörlerin yanı sıra, CD boşluğunun ve ilaç molekülünün (veya molekülün bir kısmının) boyutuna bağlıdır (Duchene, 2011).

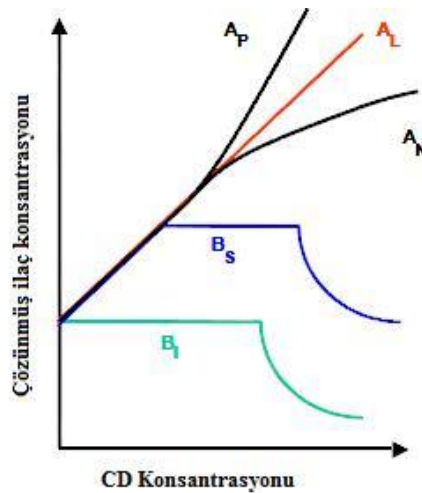
Oluşan kompleksler genellikle doğada 1:1'dir; bununla birlikte, bazen, bir oyukta tamamlanmamış yerleşme ve diğer ucun başka bir kompleks oluşturmaya müsait olması nedeniyle, 2:1, 2:2, vb. gibi daha yüksek dereceli kompleksler gözlenebilir (Şekil 2.4) (Jambhekar ve Thomas, 2013).



Şekil 2.4. İlaç-CD kompleks dengesi (A) 1:1 kompleks ve (B) 1:2 kompleks (Chaudhary ve Patel, 2013).

2.1.4. Faz-çözünürlük diyagramının belirlenmesi

Higuchi ve Connors (1965), çözelti içindeki konuk ve ev sahibi arasındaki etkileşimden türetilmiş faz çözünürlük profillerinden komplekslerin bir sınıflamasını belirlemiştir. A tipi eğriler, çözünür inklüzyon komplekslerinin oluşumunu göstermektedir. B tipi, zayıf çözünürlüğe sahip inklüzyon komplekslerinin oluşumunu gösterir. B_S tipi, sınırlı çözünürlük kompleksleri ortaya çıkarmakta ve B_I tipi eğri çözünmeyen komplekslerin oluşumunu göstermektedir. A tipi eğriler; A_L tipi (siklodekstrin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ilaç çözünürlüğünün doğrusal artırılması), A_P tipi (pozitif olarak sapan izotermilerin bir fonksiyonu) ve A_N tipi (negatif olarak sapan izotermiler) alt tiplerine bölünmüştür (Şekil 2.5) (Cheirsilp ve Rakmai, 2016).



Şekil 2.5. Higuchi'nin faz-çözünürlük diyagramı (Loftsson vd., 2005)

Genel olarak, suda çözünür CD türevleri A tipi faz çözünürlük profilleri oluştururken, daha az çözünür doğal CD'ler sıklıkla B tipi profiller oluştururlar. CD kompleksinin en yaygın tipi, bir ilaç etken maddesi molekülünün (İ), CD molekülü (CD) ile 1:1 kompleks oluşturduğu ilaç/CD kompleksidir (İ/CD):



Bu şartlar altında, birin altında eğime sahip olan bir A_L tipi faz-çözünürlük diyagramı gözlemlenecek ve kompleksin stabilite sabiti (K_{1:1}) etken maddenin eğiminden ve sulu kompleksleşme ortamında intrinsik çözünürlüğünden (S₀) hesaplanabilecektir (yani, bir CD bulunmadığı durumdaki etken madde çözünürlüğü):

$$K_{1:1} = \frac{Eğim}{S_0(1-Eğim)} \quad (2.3)$$

S₀= Etken maddenin gerçek (intrinsik) çözünürlüğü

Eğim= Faz çözünürlük diyagramının eğimi

K_{1:1}'in değeri sırasıyla 50 ila 2000 M⁻¹ arasındadır ve sırasıyla α, β ve γ-CD için ortalama 129, 490 ve 355 M⁻¹ değerindedir. 1:1 ilaç/CD kompleksleri için kompleksleşme etkinliği (KE) ise, faz çözünürlük diyagramının eğiminden hesaplanabilir (Loftsson vd., 2005):

$$KE = \frac{[İ/CD]}{[CD]} = S_0 \cdot K_{1:1} = \frac{Eğim}{(1-Eğim)} \quad (2.4)$$

KE= Kompleks etkinliği

S₀= Etken maddenin gerçek (intrinsik) çözünürlüğü

İ/CD= Kompleks halindeki CD konsantrasyonu

CD= Serbest haldeki CD konsantrasyonu

Eğim= Faz çözünürlük diyagramının eğimi

CD kompleksleri, sulu bir CD solüsyonuna fazla miktarda etken maddenin ilavesiyle hazırlanır. Oluşan süspansiyon istenen sıcaklıkta dengelenir ve daha sonra berrak İ/CD kompleksi çözeltisi oluşturmak için santrifüjlenir. Katı komplekslerin hazırlanması için su, sulu İ/CD kompleksinden buharlaştırma veya süblimasyon yoluyla uzaklaştırılır. Parenteral formülasyonların izotonikliği ve katı dozaj formlarının

formülasyon kütlesi gibi çeşitli nedenlerden ötürü, formülasyona mümkün olduğu kadar az CD dahil etmek önemlidir. Kompleksleşme etkinliği çeşitli yöntemlerle artırılabilir (Tablo 2.2) (Rasheed, Kumar ve Sravanthi, 2008).

Tablo 2.2. Kompleksleşme etkinliğini arttıran yöntemler (Rasheed, Kumar ve Sravanthi, 2008).

ETKİ	SONUÇ
İlaç iyonizasyonu	Noniyonize ilaçlar genellikle iyonik ilaçlardan daha kararlı kompleksler oluşturur. Bununla birlikte, bir ilacın iyonlaştırılması, gelişmiş kompleksleşmeye yol açan belirgin içsel çözünürlüğünü artırır.
Tuz formu	Bazen bir etken maddenin görünür intrinsik çözünürlüğünün tuz oluşumu yoluyla artırılması da mümkündür.
Kompleks içinde kompleks	Bazen bir etken maddenin görünür intrinsik çözünürlüğünü, metal komplekslerinin oluşumu ile arttırmak mümkündür
Asit/baz üçlü kompleksleri	Bazı organik hidroksi asitlerin (sitrik asit gibi) ve bazı organik bazların, ilaç/CD/asit veya baz üçlü komplekslerinin oluşumu yoluyla kompleksleşme etkinliğini arttırabildiği gösterilmiştir.
Polimer kompleksleri	Suda çözünür polimerler, ilaç/CD kompleksi ile bir üçlü kompleks oluşturur, böylece ilaç/CD kompleksinin gözlemlenen stabilite sabitini artırır. Sabit değerinde gözlenen bu artış, kompleksleşme etkinliğini artırır.
CD agregatlarının çözünürlüklerinin artırılması	Organik katyonların ve anyonların, sınırlı sulu çözünürlüğe sahip olan yüklenmemiş İ/CD komplekslerini çözündürdükleri bilinmektedir. Bu, katı ilaç/CD kompleks tozunun hazırlanması sırasında kompleksleşme etkinliğini arttırmaktadır.
İki veya daha fazla yöntemin kombinasyonu	Sıklıkla, kompleksleşme etkinliği yukarıda belirtilen yöntemlerden iki veya daha fazlasını birleştirerek daha da artırılabilir. Örneğin ilaç iyonlaşması ve polimer metodu veya sulu polimerizasyon ortamına hem polimerleri hem katyonları veya anyonları ilave ederek CD agregatlarının çözündürülmesi.

2.1.5. Etken madde-siklodekstrin komplekslerinin hazırlanma yöntemleri

CD komplekslerini hazırlamak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır.

2.1.5.1. Yoğurma yöntemi (*kneading*)

Katı komplekslerin büyük ölçekli hazırlanması için yoğurma tercih edilen bir yöntemdir. Yöntem, uygun çözücüde çözündürülmüş etken madde moleküllerinin CD'in bulamacına eklenmesini içerir. Karıştırma ile, karışımın viskozitesi artar ve bir macun oluşur. Macun kurutulabilir, toz haline getirilebilir ve yıkanabilir (Jambhekar ve Thomas, 2013).

2.1.5.2. Birlikte çöktürme yöntemi (co-precipitation)

Birlikte çöktürme yöntemi, hidrofobik etkin maddelerin CD komplekslerinin oluşumu için kullanılır. Konuk molekül veya hidrofobik etkin maddeler organik fazda, CD molekülleri sulu fazda çözülmüştür. Sulu faz çözeltisi karıştırılırken organik faz çözeltisi eklendiğinde oluşan kompleks çöker. Çökelti santrifüjlenerek ayrılır (Vikas vd., 2018).

2.1.5.3. Püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma (lyofilizasyon)

CD ve etkin madde molekülü deiyonize suda çözündürülür ve sonra çözelti püskürtmeli kurutucu ile kurutulur. Püskürtücü, giriş sıcaklığı ve numune besleme hızı gibi en uygun koşullar altında çalıştırılır; 50-70°C sıcaklıkları kullanıldığından, bu teknik sadece ısıya dayanıklı moleküller için kullanılır (Cheirsilp ve Rakmai, 2016).

Dondurularak kurutma tekniği, ısıya dayanıksız ve suda çözünebilen etkin maddeler için uygundur. Gerekli olan CD ve etkin madde molekülü oranı, karıştırılarak suda çözündürülür. Çözelti dondurularak kurutulur ve elde edilen toz organik çözücü ile yıkanır ve daha sonra vakum altında kurutulur (Cheirsilp ve Rakmai, 2016).

2.1.5.4. Nötralizasyon

Bu yöntemde eşit miktarda etkin madde ve CD konsantrasyonu 0,1 N NaOH içerisinde ayrı ayrı çözündürülür ve yaklaşık yarım saat karıştırılır. pH kaydedilir ve kompleksler çökeltildiğinde pH 7,5 olana kadar 0,1 N HCl karıştırılarak damla damla eklenir. Tortu süzülür ve klorsuz olana kadar yıkanır, 24 saat 250 °C'de kurutulup bir desikatörde saklanır (Chaudhary ve Patel, 2013).

2.1.5.5. Öğütme yöntemi (physical blending/grinding)

Sık kullanılan kompleksleştirme yöntemleri (yoğurma, püskürterek kurutma ve çökeltme) belirli bir miktarda çözücünün uygulanmasını gerektirir. Artık çözücünün katı üründen çıkarılması çoğu zaman sorunlara neden olur ve sadece bir öğütme işleminde uygun bir parçacık büyüklüğü elde edilebilir. Çözücü içermeyen teknolojinin endüstriyel ölçekte kullanımı bu nedenle özellikle önemlidir. Hesaplanan molar oranda ilaç ve CD öğütülerek, uygun bir karıştırıcıda karıştırılmasıyla uygulanır (Aigner vd., 2012).

2.1.5.6. Çimento yöntemi (slurry)

Kompleks oluşumu için CD'nin tamamıyla çözünmesi gerekli değildir. CD %50-60 oranında katı olacak şekilde suya eklenip karıştırılabilir. Sulu faz, çözeltide CD tarafından doyurulacaktır. Misafir moleküller çözeltide CD ile kompleks oluşturacak, oluşan kompleks sulu fazı doyururken kompleks kristalleşecek veya sulu fazın dışına çıkıp çökelti oluşturacaktır. CD kristalleri çözünmeye ve kompleks oluşumu için sulu fazı doyurmaya devam edecektir. Kompleks, birlikte çöktürme yöntemindekine benzer şekilde toplanabilmektedir (Akçakoca ve Atav, 2006).

2.1.5.7. Kapalı kapta ısıtma yöntemi (damp mixing and heating)

Belirli bir miktarda su buharı adsorbe edildikten sonra, ilaç etkin maddesi ve CD molekülü fiziksel karışımı bir kap içine kapatılır ve bir kompleksleşme bileşiği elde etmek için 43 °C ila 142 °C arasında değişen bir sıcaklığa kadar ısıtılır. Bu teknik ayrıca azot gazı basıncı altında da gerçekleştirilir ve ısıya dayanıklı uçucu maddeler için kullanılabilir (Cheirsilp ve Rakmai, 2016).

2.1.5.8. Ekstrüzyon yöntemi

Ekstrüzyon, ısıtma ve karıştırma yönteminin bir çeşididir ve sürekli bir sistemdir. CD, etkin madde ve su, önceden karıştırılabilir veya ekstrüzyon presine eklendiği gibi karıştırılabilir. Ekstrüderin silindirinde karıştırma derecesi, ısıtma miktarı ve zaman kontrol edilebilir. Suyun miktarına bağlı olarak, ekstrüde edilmiş kompleks, soğudukça kurur veya kompleks kuruması için bir fırına yerleştirilebilir. Ekstrüzyon, sürekli bir işlem olma ve çok az su kullanmanın avantajlarına sahiptir (Del Valle, 2004).

2.1.5.9. Pasta yöntemi

Bu çimento yönteminin bir çeşididir. Bir harç oluşturmak için sadece küçük bir miktar su ilave edilir ve havaneli kullanılarak CD ile karıştırılır, veya bir yoğurucu kullanılarak büyük ölçekte hazırlanabilir. Gereken zaman, etken madde miktarına bağlıdır. Oluşan kompleks doğrudan kurutulabilir, az miktarda su ile yıkanabilir ve süzme veya santrifüjleme ile toplanabilir (Del Valle, 2004).

2.1.6. İnküzyon komplekslerinin analiz yöntemleri

2.1.6.1. Katı halde inküzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler

1. X- Işını Kırınımı Yöntemi

2. Termoanalitik Yöntemler
 - a. Termogravimetri ve Diferansiyel Termogravimetri
 - b. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
 - c. Diferansiyel Termal Analiz
 - d. Çıkan Gaz Analizi
 - e. Termoanalitik Sistem
3. İnce Tabaka ve Kağıt Kromatografisi
4. Infrared (IR) Spektroskopisi
5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)
6. Islanabilirlik ve Çözünürlük Testleri (Bekers, Uijtendal ve Beijnen, 1991).

2.1.6.2. Çözelti halinde inklüzyon kompleksleşmesinin saptanmasında kullanılan yöntemler

1. Spektroskopik Yöntemler
 - a. Ultraviyole/görünür (UV/VIS) Spektroskopisi
 - b. Floresans Spektroskopisi
 - c. Dairesel Dikroizm Spektroskopisi
 - d. NMR Spektroskopisi
 - e. Elektron Spin Rezonansı
2. pH-Potansiyometrik Titrasyon
3. Elektrokimyasal Yöntemler
4. Mikrokalorimetri
5. Çözünürlük Yöntemi
6. Yüzey Gerilimi Yöntemi (Bekers, Uijtendal ve Beijnen, 1991).

2.1.7. Siklodekstrinlerin farmakokinetiği ve toksisitesi

CD'ler, suda çözünür lineer dekstrinlerle aynı fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerin çoğuna sahiptir. Bununla birlikte, döngüsel yapıları nedeniyle, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan hidrolize karşı lineer dekstrinlerden daha dirençlidirler. CD'ler, nişastayı indirgeyici olmayan uçtan hidrolize eden β -amilazlara karşı dirençlidir, ancak yavaş yavaş nişastayı karbonhidrat zinciri içinde hidrolize eden α -amilazlar tarafından yavaş yavaş hidrolize edilirler. Hidrolitik hız, halka boyutuna ve serbest CD'nin fraksiyonuna bağlıdır. CD'lerin hidrolize direnç gösterme mekanizması, tüm köprü oksijenlerinin merkezi boşluk içerisine gömülmesini içerir. Bu nedenle,

serbest CD, bir inklüzyon kompleksi içine bağlanan CD'den daha hızlı bir şekilde hidrolize edilir; hidroliz oranı, oyuk boyutu arttıkça artar. Örneğin, α -CD ve β -CD, tükürükte α -amilaza karşı esas olarak kararlıdır, oysa γ -CD tükürük ve α -amilaz tarafından sindirilmektedir (Kurkov ve Loftsson, 2013).

Doğal CD'lerin tümü ve daha önce belirtilen türevleri, gastrointestinal sistemdeki bakteriyel sindirime karşı hassastır. Oral uygulamadan sonra, γ -CD gastrointestinal kanalda neredeyse tamamen sindirilir, oysa hem α -CD hem de β -CD ağırlıklı olarak kolondaki bakteriler tarafından sindirilir. α -CD, β -CD'den daha yavaş sindirilir. CD'ler çoğunlukla (% 90'dan fazla) parenteral uygulamadan sonra glomerüler filtrasyon yoluyla idrarda değişmeden atılır. Büyük olasılıkla, kalan herhangi bir CD, düşük molekül ağırlıklı dekstranların atılımına benzer olan, karaciğer metabolizması ve gastrointestinal sistem yoluyla biliyer atılımı gibi diğer yollar tarafından elimine edilir (Kurkov ve Loftsson, 2013).

Sıçan ve köpeklerde yapılan detaylı metabolizma ve toksisite çalışmaları, CD'in oral yoldan güvenle uygulanabileceğini ve akut toksisite gözlenmediğini göstermiştir. Uzun süreli CD verilmesi organlarda önemli değişikliklere yol açmaz. Oral β -CD uygulamasının toksik semptomları indüklediği bilinmemekle birlikte, β -CD'nin ince bağırsakta emiliminin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Diğer taraftan, HP- β -CD'nin minimal absorpsiyon ve doku dağılımı gösterdiği ve böbreklerde en yüksek HP- β -CD konsantrasyonunun bulunduğu bildirilmiştir (Jambhekar ve Thomas, 2013).

Yüksek dozdaki CD'nin parenteral olarak uygulanmasından sonra ciddi toksisite belirtileri görülür. β -CD, kolesterol ile bir kompleks oluşturur. Suda zayıf çözünürlüğünden dolayı, β -CD'nin nefroz ve böbrek dokularında kompleksin kristalleşmesine neden olduğu bilinmektedir. β -CD'nin diğer yan etkileri, membran bozulmasını ve eritrositlerin hemolizini içerir. Metillenmiş türevlerin hemolitik aktiviteleri β -CD'den daha düşüktür (Jambhekar ve Thomas, 2013).

HP- β -CD, köpeklere ve sıçanlara intravenöz bir uygulamadan sonra renal atılım ile hızlı ve neredeyse tamamen elimine edilir. Parenteral olarak uygulandığında, nefrotoksisite, β -CD'inkinden daha azdır. Hidroksialkillenmiş CD'lerin eritrositler üzerindeki hemolitik aktiviteleri, doğal CD'lerin veya dimetil β -CD'ninkinden önemli ölçüde daha azdır. Dolayısıyla, hidroksialkillenmiş CD'ler parenteral preparatlarda daha iyi bir şekilde kullanılır. SBE- β -CD, HP- β -CD gibi CD'ler parenteral olarak güvenlidir (Jambhekar ve Thomas, 2013).

α -CD, bir immün baskılayıcı ajan olan siklosporini, oftalmik bir çözelti içinde çözündürmek için kullanılmıştır; burada $>4\%$ konsantrasyonlarında kullanılan α -CD, tavşanların kornealarında mikrovillus kaybı ve mikro erozyon gibi yüzeysel epitelyal toksisiteye neden olmuştur. Yarıklı ışık biyomikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, DM- β -CD'nin 5% ve $12,5\%$ konsantrasyonlarında oküler olarak uygulanmasının, tavşan gözlerinin konjunktival ve kornea yüzeyini tahriş ettiğini, oysa HP- β -CD'nin $12,5\%$ konsantrasyonunda bile iyi tolere edildiğini göstermiştir. 5 gün boyunca $12,5\%$ HP- β -CD tavşan gözlerine 1 saat aralıklarla günde altı kez uygulandıktan sonra bile toksisite belirtisi gözlenmemiştir. 5% 'lik bir HP- β -CD çözeltisinin, tavşan korneasında mikroskobik değişikliklere neden olmadığı veya izole edilmiş korneanın elektrofizyolojik parametrelerini etkilemediği bulunmuştur. Son çalışmalar ise β -CD'nin 10% 'luk sülfobütül eter türevinin *in vitro* sıgır kornea epitelinde önemli bir hasara yol açmadığını ve *in vivo* tavşan gözlerinde eşit derecede iyi tolere edildiğini göstermiştir (Irie ve Uekama, 1997).

2.1.8. Siklodekstrinlerin farmasötik teknolojide kullanımı

2.1.8.1. Etken madde salımı ve çözünmeye etkisi

Suda çözünmeyen etken madde içeren formülasyonlarda CD'ler çok önemli bir rol oynamaktadır; inklüzyon kompleksi veya katı dispersiyon yoluyla belirgin etken madde çözünürlüğünü veya çözünmesini iyileştirerek, kompleksleşme için yetersiz moleküler özelliklere sahip ilaçlar için hidrofilik taşıyıcılar olarak hareket ederek veya etken madde/CD kompleksi kullanımının zor olduğu, örneğin parasetamol gibi yüksek dozlu ilaçlar için tablet çözündürme arttırıcıları olarak (Challa vd., 2005).

2.1.8.2. İlaç biyoyararlanımı üzerine etkisi

CD'ler, etken madde çözünürlüğünü, çözünmesini ve/veya etken madde geçirgenliğini artırarak çözünürlüğü düşük ilaçların biyoyararlanımını arttırmaktadır. CD'ler, çözünmeyen hidrofobik ilaç etken maddelerini biyolojik bariyerin yüzeyinden geçebilir hale getirerek, örneğin; deri, mukoza veya göz korneası yüzeyinde, bariyerin lipid tabakalarını bozmadan ilaç geçirgenliğini arttırmaları. CD'ler, etken madde çözünürlüğünü ve emilimini geliştirerek hem oral çözümlerden hem de intravenöz formülasyondan lipofilik itrakonazolün biyoyararlanımını arttırmıştır. CD'lerin ilacın kararsızlığını ve ilaç tahrişini iyileştirme kabiliyetlerine ek olarak, nazal, oküler, rektal ve transdermal uygulamada emilme bölgesinde ilaç temas süresini iyileştirmeleri,

CD'nin gelişmiş biyoyararlanımına katkıda bulunan diğer önemli faktörlerdendir (Challa vd., 2005).

2.1.8.3. İlaç güvenliğine etkisi

İlaçların neden olduğu tahrişi iyileştirmek için CD'ler kullanılmıştır. CD'nin artan etken madde çözünürlüğünden kaynaklanan artan ilaç etkinliği ve potansiyeli (yani, optimum terapötik aktivite için gerekli dozun azaltılması), ilacı düşük dozlarda etkili hale getirerek ilaç toksisitesini azaltabilmektedir. Örneğin; β -CD, gansiklovirin, insan sitomegalovirüs klinik suşları üzerindeki antiviral aktivitesini arttırmış ve ilacın potansiyelinde ortaya çıkan artış, ilaç toksisitesini azaltmıştır. Parenteral formülasyonlarda suda az çözünen ilaçların kristalleşmesi ile ilişkili toksisiteler, çözünür etken madde/CD komplekslerinin oluşması ile azaltılabilmektedir (Challa vd., 2005).

2.1.8.4. İlaç kararlılığına etkisi

CD'ler, bazı kararsız etken maddelerin dehidrasyon, hidroliz, oksidasyon ve ışık hassasiyetine karşı stabilitesini artırabilir ve böylece ilaçların raf ömrünü uzatabilir. Bir moleküler kalkan oluşturarak, CD kompleksi kararsız etken madde moleküllerini moleküler seviyede kapsüller ve böylece onları çeşitli bozunma işlemlerine karşı korur. Örneğin; HP- β -CD, çözelti içerisinde 2-etil heksil p-dimetil aminobenzoatın foto-bozunmasını emülsiyon taşıyıcıya göre önemli ölçüde azaltmıştır (Challa vd., 2005).

CD'lerin ayrıca etken madde moleküllerinin kimyasal reaktivitesinin değiştirilmesi, çok uçucu maddelerin fiksasyonu, sıvı maddelerin tozlara dönüştürülmesi, maddelerin mikroorganizmalar tarafından parçalanmasına karşı koruma, kötü koku ve tatların maskelenmesi, pigmentlerin veya maddelerin renginin maskelenmesi gibi kullanım amaçları da bulunmaktadır (Del Valle, 2004).

2.1.9. Siklodekstrinlerin oftalmik formülasyonlarda kullanımı

Günümüz farmakolog ve formülasyon bilimcilerinin karşılaştığı en büyük zorluk oküler ilaç dağıtımıdır. Göz damlası, özellikle gözün ön segment hastalıklarının tedavisi için ilaç uygulamasının en uygun ve hasta uyumlu yoludur. İlaçların hedeflenen oküler dokulara verilmesi, çeşitli dinamik ve statik oküler bariyerler ile sınırlıdır. Ayrıca, terapötik etken madde seviyeleri, hedef dokularda uzun süre korunamaz. Geçtiğimiz yirmi yılda, oküler ilaç dağıtım araştırmaları, bu engelleri aşabilecek ve dokulardaki etken madde seviyelerini koruyabilen yeni, güvenli ve hasta uyumlu bir formülasyon ve

ilaç dağıtım cihazları/teknikleri geliştirmeye doğru ilerlemiştir. Ön segment ilaç dağıtımındaki ilerlemeler, geleneksel topikal çözeltilerin geçirgenlik ve viskozite arttırıcılarla modülasyonu ile gerçekleşmiştir (Patel vd., 2013).

Gözün en dış tabakası kornea, lipofilik bir epitelidir ve bu nedenle, korneadan göz içine nüfuz edebilmek için ilaçların biraz lipofilik olması gerekir. Bununla birlikte, kornea yüzeyinde mikrovilluslara bağlı olan, yaklaşık 8 µm kalınlıkta bir sulu tabaka olması nedeniyle, topikal olarak uygulanan ilaçların, korneal yüzeye erişmek ve bu sulu difüzyon bariyerine nüfuz edebilmek için suda çözünür olması gerekir. CD'in çözünürlüğüyle, doz-çözünürlük oranını arttırmak mümkündür ve daha önce sadece sistemik yolla verilebilen ilaçların topikal olarak uygulanması mümkündür. Örneğin, asetazolamid, glokomu 1000 mg'a kadar oral günlük dozla tedavi etmek için kullanılan bir karbonik anhidraz inhibitörüdür. Saf su içindeki asetazolamid'in sulu çözünürlüğü 0,7 mg/ml'dir, ancak %20 (a/h) sulu 2-HP-β-siklodekstrin çözeltisinde 7 mg/ml'dir (Loftsson vd., 2005).

CD'ler etken maddenin suda çözünürlüğünü artırır, göz içine ilaç emilimini artırır, sulu ortamlardaki kararlılığı artırır ve lokal tahrişi azaltır (Stefansson ve Loftsson, 2002). CD içeren çözelti formundaki su bazlı göz damlalarında bulunan ilaçların oküler uygulaması, etken maddenin CD kompleksinden salınması ve etken madde moleküllerinin kornea veya konjonktival epitel içine girebilmesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. (Kaur ve Kanwar, 2002).

Oftalmik ilaçlarda, aktif bileşenin optimal biyoyararlanımı, sulu çözelti formundaki göz damlasında CD'lerin uygun konsantrasyonu ile (<%15) elde edilmektedir. Göz küresi üzerine uygulanan formülasyonların geliştirilmesinde en sık kullanılan CD, tahriş edici etkiler göstermeyen 2-HP-β-CD'dir. Deksmetazon veya pilokarpin içeren 2-HP-β-CD ile inklüzyon kompleksi olarak içeren göz damlaları iyi tolere edilmekte ve geleneksel olanlara kıyasla daha yüksek biyoyararlanım sağlamaktadır (Baranowski vd., 2014).

Kanai ve diğ. (1989) α-CD ve bir lipofilik immünosüpresif ajan olan siklosporin kombinasyonlarını test ettiklerinde siklosporin-α-CD kompleksinin daha düşük kornea toksisitesine yol açtığını ve ilacın lipofilik bir taşıyıcıda olması nedeniyle korneaya 5-10 kat daha fazla girdiğini bulmuşlardır.

HP-β-CD gibi diğer β-CD türevleriyle elde edilen sonuçlar, oküler uygulamadan sonra daha az toksikolojik etki ortaya çıktığını göstermiştir. β-CD'in oküler olarak

%12,5'e kadar konsantrasyonlarda uygulanması tavşan kornea epiteli tarafından iyi tolere edilmiştir. Son zamanlarda, göz damlasındaki bazı CD adjuvanlarının, pilokarpin ön ilaçlarında görülen oküler tahrişi azalttığı gösterilmiştir (Kanai vd. 1989).

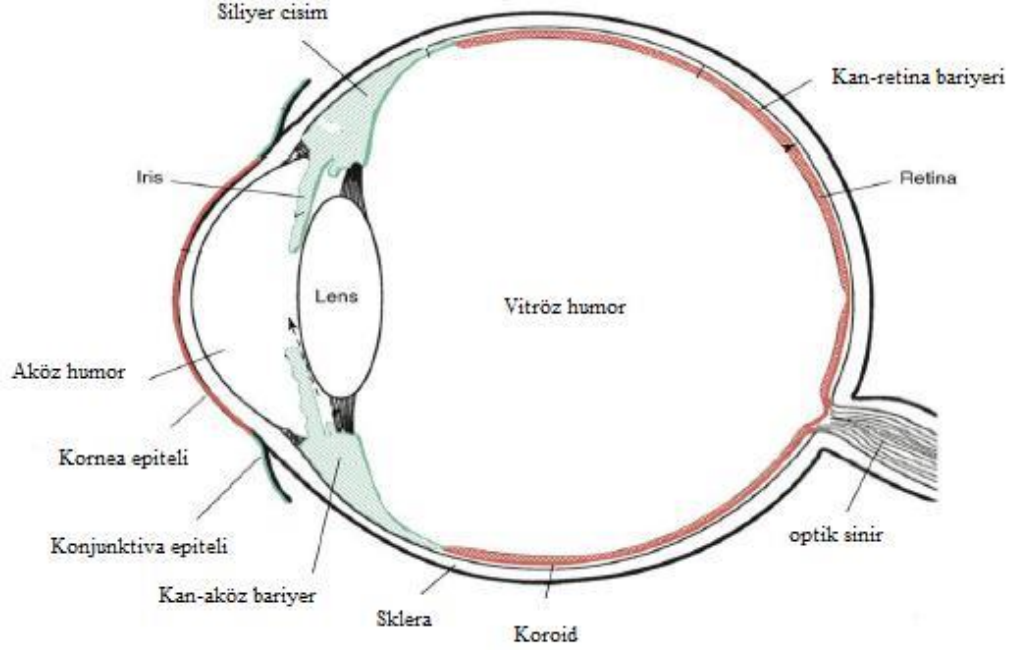
Reer vd. (1994), Voltaren ticari çözeltisine kıyasla, HP- β -CD ve bir NSAİİ ajan olan diklofenak içeren çözeltinin kornea geçirgenliğini arttırdığını göstermişlerdir (Le Boursais vd., 1998). HP- β -CD'nin hidrokortizonun sudaki çözünürlüğü ve kimyasal kararlılığı üzerindeki etkisi, kararlı bir topikal oftalmik hidrokortizon çözeltisi formüle etmek amacıyla araştırılmıştır. Hidrokortizonun sudaki çözünürlüğü, 0,972 mM'dır. Hidrokortizonun görünen çözünürlüğü, HP- β -CD ilavesi ile doğrusal olarak ($r^2=0,99$) ortalama 0,382 eğime sahip bir A_L tipi faz çözünürlük profili vererek 80 mM konsantrasyona kadar artmıştır. HP- β -CD ile birleşme, hidrokortizonun kimyasal kararlılığını da arttırmış ve birinci dereceden bozunma sabitleri, $13,60 \times 10^{-3}$ ve $1,70 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ den $6,73 \times 10^{-3}$ ve $0,90 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ 'e düşmüştür (Davies, Wang ve Tucker, 1997).

HP β CD'in siprofloksasinin çözünürlük, kararlılık ve *in vitro* salımı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, faz çözünürlük çalışmalarına göre A_L tipi çözünürlük eğrisi elde edilmiştir. HP β CD, siprofloksasinin çözünürlüğünü pH 5,5'te 3 kez ve pH 7,4'te 2 kez arttırmıştır. İki aylık kararlılık çalışmaları, siprofloksasinin pH 5,5'te pH 7,4'ten daha kararlı olduğunu ve siprofloksasinin stabilitesinin HP β CD ile anlamlı olarak arttığını göstermiştir. HP β CD:siprofloksasin kompleksinin kararlılık sabiti, HP β CD içeren sulu ortama %0,1 (a/h) polimer (HPMC ve PVP) ilave edilmesiyle daha da artmıştır. Ultrasonik su banyosunda hazırlanan çözeltilerin kararlılık sabitinin, otoklavda ısıtılarak hazırlanan çözeltilerden daha yüksek olduğu görülmüştür (Bozkır, Denli ve Başaran, 2012).

Dipivefrin (dipivalil epinefrin, DPE) glokom tedavisinde kullanılan, epinefrin'in bir dipivalik asit ester ön ilacı olup, kornea emiliminden sonra epinefrin salgılamaktadır. DPE'nin temel farmasötik sakıncası, damlacıkların pH değerini 2,5-3,5'a düşürerek kararlılığı azaltmasıdır. Bununla birlikte, asidik göz damlaları tahriş edicidir ve indüklenen gözyaşı akımı nedeniyle oküler biyoyararlanımı azaltabilirler. Bu çalışmada, DPE'nin sulu ortamdaki kararlılığını arttırmak için DPE'nin oftalmik formülasyonlarında HP- β -CD veya (SBE) $_{7m}$ - β -CD'nin olası kullanımı değerlendirilmiştir. Oda sıcaklığında 5,0 ve 7,4'lük pH değerlerinde, 9,2 mM HP- β -CD kararlılığı 4-5 kat artırırken, 9 mM (SBE) $_{7m}$ - β -CD, kararlılığı sırasıyla yaklaşık 20 ve 100 kat arttırmıştır (Jarho vd., 1997).

2.2. Gözün Anatomisi

İnsan gözü, ortalama çapı 24 mm ve ağırlığı 7,5 g olan küresel bir yapıdır; toplam vücut hacminin %0,05'inden daha azını kapsar. Gözün anatomisi, Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Göz, üç ana katmandan oluşur. Göz küresinin şeklini koruyan dış ön fibröz tabaka, kornea ve sklerayı içerir (Samanta vd., 2017).



Şekil 2.6. Gözün anatomisi (Del Amo ve Urtti, 2008).

2.2.1. Kornea

Kornea gözün ön tarafında bulunan güçlü ve net bir çıkıntıdır. Yetişkin korneanın yüzeyinin çapı yaklaşık 8 mm'dir. Vasküler olmayan bir yapı olan (herhangi bir kan damarı içermeyen) kornea, gerekli besinleri çevresindeki kılcal damarlardan almaktadır (Dhanapal ve Ratna, 2012). Kornea üç ana katmandan oluşur: epitel, stroma ve endotel. Optik olarak saydamdır ve gözün ana kırılma kısmıdır ve göze ışık iletiminin %75'inden fazlasından sorumludur (Samanta vd., 2017).

2.2.2. Konjunktiva ve sklera

Sklera gözün opak beyaz tabakasıdır ve yarı saydam bir konjunktiva ile kaplıdır. Uvea olarak bilinen orta vasküler tabaka iris, siliyer cisim ve koroidden oluşur. İris göz bebeğini büzerek veya dilate ederek retinaya ışık geçirme miktarını kontrol eder. Siliyer gövde, aköz humor salgılayarak ön segmentteki damarsız dokulara besin sağlar ve ayrıca göz içi basıncını korur (Samanta vd., 2017). Gözün açıkta kalan yüzeyi konjunktiva ve kornea içerir ve gözyaşı filmi ile kaplıdır. Konjunktiva, önemli elektrolitler, akışkan ve münlerin salgılanması yoluyla gözyaşı filminin oluşumuna katkıda bulunur (Dhanapal ve Ratna, 2012).

2.2.3. Retina

İç sinir tabakası retinadır ve çoğunlukla ışık Emilimi ve tespitinden sorumludur. Bir nöronal sinyale dönüştürülen ışık enerjisi, retinadan geçer ve optik sinirden çıkar. Gözün içi üç odadan oluşur: ön ve arka odaların her ikisi de aköz humor içerir ve vitröz oda retina tabakasına bitişik olarak uzanır ve ön tarafından mercek tarafından bağlanır (Samanta vd., 2017).

2.2.4. Gözyaşı film tabakası

Gözün ön yüzünün üstünde bir gözyaşı filmi vardır. Gözyaşı filmi üç katmandan oluşur: en dıştaki lipit katman, gözyaşı filminin %90'ını oluşturan orta sulu katman ve en içteki mün katmanı. Bu üç katman, farklı katmanlar olmaktan ziyade, harmanlanır. Sabit bir hidrasyon seviyesini koruyarak oküler yüzeyi korumak için birlikte çalışırlar ve gözyaşı sıvısındaki (örn; defensinler, katisidinler) immün makromoleküller ve enzimler (örneğin lizozim) yoluyla enfeksiyonu önlerler. Ayrıca, gözyaşı filmi, hücreli yüzeyin düzensizliklerini düzelterek retinal görüntü kalitesini iyileştirir (Samanta vd., 2017).

2.2.5. Aköz humor

Aköz humor, gözün dış/ön bölgesinde bulunan jöle benzeri bir maddedir. Korneanın hemen arkasında ve lensin önünde bulunan "gözün ön odasını" dolduran sulu bir sıvıdır. Aköz humor, çok az miktarda sodyum ve klorür iyonu içeren alkali tuz çözeltisidir. Esas olarak siliyer işlemlerle sürekli olarak üretilir, arka odadan göz bebeğinden geçerek ön odaya akar (Dhanapal ve Ratna, 2012).

2.2.6. Oküler ilaç uygulamasını etkileyen bariyerler

2.2.6.1. Oküler yüzeyden ilaç kaybı

Uygulamadan sonra, lakrimal sıvının akışı, ilacı göz yüzeyinden uzaklaştırır. Lakrimal devir hızı sadece yaklaşık 1 µl/dak olmasına rağmen, uygulanan ilacın fazla hacmi birkaç dakika içinde hızlı bir şekilde nazolakrimal kanala taşınır. İlaç uzaklaştırmanın bir başka kaynağı, oküler absorpsiyon yerine sistemik absorpsiyondur. Sistemik absorpsiyon, direkt olarak konjunktival keseden, yerel kan kılcal damarları yoluyla veya çözeltilinin burun boşluğuna akması ile gerçekleşmektedir (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.6.2. Lakrimal sıvı bariyeri

Kornea epiteli, lakrimal sıvıdan göze ilaç emilimini sınırlar. Kornea epitel hücreleri, paraselüler ilaç geçirgenliğini sınırlayan sıkı kavşaklar oluşturur. Bu nedenle, lipofilik ilaçlar tipik olarak en azından korneada hidrofilik ilaçlardan daha yüksek geçirgenlik derecesine sahiptir. Genel olarak, konjunktiva korneadan daha sızıntılı bir epitelidir ve yüzey alanı da korneanınkinden yaklaşık 20 kat daha fazladır (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.6.3. Kan-oküler bariyer engeli

Göz, kan dolaşımındaki ksenobiyotiklerden kan-oküler bariyeri tarafından korunmaktadır. Bu bariyer iki bölümden oluşur: kan-aköz bariyer ve kan-retina bariyeri. Bu bariyer, plazma albümininin aköz humor içine erişimini önler ve ayrıca hidrofilik ilaçların plazmadan aköz humor içine erişimini de sınırlar. Kan akımı ve göz arasındaki arka bariyer retina pigment epiteli ve retina kılcal damarlarının dar duvarlarından oluşur. Retina kılcal damarlarının aksine, koroidin damar yapısı, geniş kan akışına ve sızdıran duvarlara sahiptir. İlaçlar koroidal ekstravasküler boşluğa kolayca erişebilir, ancak daha sonra retina içine dağıtılması retina pigment epiteli ve retinal endoteli ile sınırlıdır (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.7. Oküler etkin madde absorpsiyonu

2.2.7.1. Oküler ilaç uygulama yolları ve absorpsiyon

2.2.7.1.1. Sistemik uygulama

Sistemik olarak uygulanan ilaçlar, arka oküler dokuya ulaşmak için kan-retina bariyerini ve ön oküler dokuya ulaşmak için kan-sulu bariyeri geçmelidirler. Bu engeller nedeniyle, lipitte zayıf çözünen ilaçların intra-vitreall ilaç seviyelerinin serum seviyelerinden %10 daha düşük olduğu bulunmuştur. Terapötik ilaç konsantrasyonunu göz içinde tutmak için, özellikle düşük terapötik indekse sahip ilaçlarda sistemik yan etkilere veya toksisiteye yol açan sık uygulama gerekmektedir. Dolayısıyla sistemik rota yalnızca aşağıdaki koşullar mevcut olduğunda kullanılabilir:

- Yüksek terapötik indeksleri olan ilaçlar için,
- Sınırlı sistemik yan etkiye sahip ilaçlarda,
- Diğer lokal uygulama rotaları mevcut olmadığında (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.7.1.2. Topikal uygulama

Topikal ilaçlar çözelti, süspansiyon ve merhem formundadırlar. İlaç absorpsiyonları korneal ve korneal olmayan yollardan meydana gelir. Korneal olmayan absorpsiyon, nazolakrimal sistem yoluyla meydana gelirken, ilacın çoğu korneaya taşınır. Korneal emilimi sınırlandıran faktörler şunlardır:

- Uygulanan çözeltilerin drenajı
- Lakrimasyon
- Gözyaşı debisi
- Metabolizma
- Gözyaşı buharlaşması
- Sınırlı kornea alanı
- Kötü kornea geçirgenliği
- Lakrimal proteinlerle bağlanma
- Enzimatik bozunma
- Kornea epiteli (lipofilik)

Bu faktörler korneadan ilaç emilimini <%5'e kadar azaltmaktadır (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.7.1.3. Intra-vitreal uygulama

Bu, ilacın vitreus boşluğuna doğrudan enjeksiyonunu ifade eder. Bu yolla uygulanan ilacın farmakokinetik özellikleri açıkça anlaşılamamıştır. Ancak hasta uyumu özellikle yaşlı hastalarda önemli bir konudur. Bu rotadaki diğer zorluklar, retina kanaması, endoftalmitis ve üveit dahil önemli yan etkilerdir (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.7.1.4. Perioküler uygulama

Bu uygulama dört benzersiz enjeksiyon içermektedir:

- Retro bulbar enjeksiyonu
- Per-bulbar enjeksiyon
- Sub-tenon enjeksiyon
- Sub-konjunktival enjeksiyon

Bu yöntemle verilen ilaçlar korneadan daha geçirgen olduğu için skleraya ulaşırlar. Ancak koroid dışındaki oküler doku için amaçlanan ilacın kan-retina bariyerine nüfuz etmesi gerekir, böylece arka segmentin biyoyararlanımı için zorluklar ortaya çıkmaktadır. Kontrollü salım formülasyonunun periyodik olarak verilebileceği potansiyel yolu göstermektedir (Nisha ve Deepak, 2012).

2.2.7.2. Oküler absorpsiyona etki eden faktörler

Uygulamaya ilişkin faktörler

- Damlatma hacmi
- Damla sayısı
- Uygulama sıklığı

Fizyolojik faktörler

- Korneanın yapısı
- Protein bağlanması
- İlaç metabolizması
- Gözyaşı üretimi ve lakrimal drenaj

Etken madde özelliklerine bağlı faktörler

- Çözünürlük ve partiyon katsayısı
- Molekül ağırlığı
- Etken maddenin kimyasal şekli

Formülasyona bağlı faktörler

- pH
- Konsantrasyon
- Formülasyondaki yardımcı maddeleri
- Tonisite
- Viskozite (Ünlü, 1988).

2.2.8. Oküler uygulanan dozaj şekilleri ve özellikleri

Oküler uygulanan dozaj şekilleri aşağıda sıralanmıştır:

- Çözeltiler
- Süspansiyonlar
- Merhemler
- Jeller
- Emülsiyonlar
- Stripler
- Enjeksiyonlar
- İnsertler (kontakt lens, implantlar)
- İlaç-cihaz kombinasyonları
- Yeni oftalmik dozaj formları
- Kolloidal sistemler (mikroemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar, nanopartiküller, lipozomlar, niozomlar, dendrimerler)
- Hidrojeller
- Mikroığneler, ultrason ve iyontoforez bazlı oküler ilaç dağıtım sistemleri (Aldrich vd. 2013).

Oküler preparatlarının taşınması gereken özellikler şunlardır:

- Göz damlaları ve banyoları içerisinde bulunan mikroplar ve özellikle *Bacillus Pyocyanus*, *Pseudomonas* türleri, göz mukozasında ve yaralı gözde korneayı bozup enfeksiyonlar meydana getirirler. Bu yüzden oftalmik çözeltiler steril olarak hazırlanmalıdırlar.
- Oftalmik çözeltiler izotonik olmalıdırlar. Gözyaşının ozmotik basıncı kanın ozmotik basıncına eşittir. Uygulanan preparatın gözde ağrı yapmaması için izotonik olması önemlidir.

- İzohidrik olmalıdır. Maddenin en etkili olduğu pH şartı oluşturulduğunda göz damlalarında en fazla etki sağlanır. Bir çok ilacın etkileri dissosiyeye olmamış halde, baz iken daha fazla, fakat dayanıklılıkları azdır. Bundan dolayı gözde kullanılacak etken maddeler en az dissosiyeye oldukları ve en çok kararlılık gösterdikleri ortam pH'sında hazırlanmış olmalıdırlar (İzgu, 1983).

Parenteral formülasyonlara benzer şekilde, oküler ürünler steril olmalıdır ve bu nedenle kalite kontrol yöntemleri sterilite değerlendirmesini içermelidir. Bu nedenle, üretimin ardından ve raf ömrünün tasarlanan süresinde, oküler ürünlere aşağıdaki kalite kontrol analizleri uygulanır:

Terapötik ajanın konsantrasyonu: İmalatı takiben, terapötik ajanın konsantrasyonu, nominal konsantrasyonun %95-105'inin içerisinde olmalıdır. Ürünün raf ömrü boyunca ilacın konsantrasyonu, nominal miktarın %90'ının altına düşmemelidir.

Koruyucu madde konsantrasyonu: Bu dozaj formlarında koruyucu madde konsantrasyonu analizi yapılır. Önceden olduğu gibi, terapötik ajanın konsantrasyonu, imalat sonrası ve ayrıca depolamadan sonra nominal konsantrasyonun %95-105'i arasında olmalıdır.

Koruyucu etkinlik testi: Koruyucu maddelerin formülasyon içindeki etkinliği uygun farmakope metodu kullanılarak değerlendirilmelidir.

Görünüm: Tüm oküler ürünlerin görünüm özellikleri vardır.

pH: Sulu bazlı formülasyonların pH'ı ölçülür ve belirtilen aralıklarla karşılaştırılır.

Viskozite: Ürünlerin viskozitesi ölçülür ve ürün özelliklerinde tanımlanan aralık ile karşılaştırılır.

Dispers faz boyutu analizi: Disperse ilacın süspansiyon formülasyonları içindeki parçacık boyutu dağılımları, parçacık boyutu analizi metodolojisi kullanılarak belirlenir.

Donma - çözülme depolaması: Gerekirse, bu maddede tanımlanan ürünlerde donma - çözülme döngüsü gerçekleştirilir.

Sterilite testi: Oküler ürünlerin hem imalat sonrası hem de ürünün raf ömrü boyunca steril olması gerekir. Preparatların sterilitesinin değerlendirilmesi, farmakope yöntemleri (örneğin BP/USP/EP) kullanılarak yapılır. Bu yöntemler, büyüme ortamının bileşimi, validasyon testleri ve sonuçların gözlemlenmesi ve yorumlanması dahil olmak üzere ürün içindeki mikrobiyal içeriğin belirlenmesi için gereken protokolü tanımlar (http-1).

2.3. *İn-Situ* Aktivasyonla Jel Oluşturan Sistemler

İn situ jeller, ortamdaki pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet gibi spesifik koşullardaki küçük değişikliklere duyarlı polimerlerden oluşur. *İn situ* jeller, göze uygulama sırasında sıvıdır ve uygulamadan sonra çevresel değişikliklere yanıt olarak gözün çıkıntısında hızlı bir şekilde jelleşir; son olarak fizyolojik koşullar altında etken maddeyi yavaşça salar. Sonuç olarak, *in situ* jelin kalış süresi uzatılacak ve etken madde sürekli bir şekilde salınacak, bu da gelişmiş biyoyararlanım, asgariye indirilmiş sistemik absorpsiyon ve düşük hasta dozaj rejimi ile sonuçlanan hasta uyumluluğuna yol açacaktır. Ayrıca, basit üretim süreci, uygulama kolaylığı ve doğru dozun teslimi gibi diğer bazı potansiyel üstünlükler de *in situ* jelleşme sistemleri tarafından gösterilmiştir (Wu vd., 2019).

İn situ jelleşen oftalmik sistemler, fizyolojik koşullara maruz kaldıklarında, jel fazına kayan ve artan viskozite ve muko-yapışkanlık özellikleriyle oküler kalış süresinde bir artışa neden olan viskoz sıvılardır. Bu sistemler, preparat ile dolayısıyla ilaç ile kornea ve/veya konjunktival epitel arasındaki temas süresini uzatarak oftalmik ilaçların oküler biyoyararlanımını arttırmak için kullanılır. *İn situ* jel sistemleri, gözyaşı filmindeki belirli elektrolitlerin varlığı, pH veya sıcaklık değişimi ile viskozite artışı ve drenajın yavaşlatılması ile ilaç biyoyararlanımında artışa neden olurlar (Almeida vd., 2014).

2.3.1. *İn situ* jel oluşum mekanizmaları

2.3.1.1. Sıcaklık değişimi ile jelleşen sistemler

Sıcaklık, çevreye duyarlı polimer sistemlerinde en yaygın kullanılan uyarıcıdır. Sıcaklık değişimi sadece nispeten kolay kontrol edilmekle kalmaz, aynı zamanda *in vitro* ve *in vivo* olarak da kolayca uygulanabilir. Bu sistemde, çözeltinin jelleşmesi sıcaklıktaki değişikliklerle tetiklenir, böylece ilacın salınması sağlanır. Bu hidrojeller oda sıcaklığında (20–25 °C) sıvıdır ve sıcaklıktaki bir artış nedeniyle vücut sıvılarıyla (35–37 °C) temas ettiğinde jelleşir. Sol-jelden geçişleri sıcaklıktaki artışla tetiklenen biyomateryalin kullanımı, *in situ* jel oluşumuna yaklaşmanın çekici bir yoludur. Sıcaklığa bağlı jelasyon gösteren polimerler; Poloxamer veya pluronics, selüloz türevleri [metil selüloz, HPMC, etil hidroksil etil selüloz] ve xyloglucan vs. (Saini vd., 2015).

2.3.1.2. İyon etkisiyle jelleşen sistemler

İyonik duyarlı *in situ* jeller neredeyse sadece oftalmik yol için kullanılmaktadır. Aslında, gözyaşı sıvısının iyonik konsantrasyonu, üç boyutlu bir ağ ve jelasyonla sonuçlanan konformasyonel değişikliklere yol açan polimer zincirleri arasında iyonik reaksiyonlara izin veren önemli bir kriterdir. Genellikle anyonik ve biyo-uyumlu polimerler, örneğin gellan zankı, aljinatlar veya karragenanlar, oküler katyonlarla etkileşimlerden dolayı jelleşebilirler (Destruel vd., 2017).

2.3.1.3. pH'ya bağlı olarak jelleşen sistemler

pH değişimlerine cevap veren asidik veya alkalın fonksiyonel gruplar içeren polimerlere pH duyarlı polimerler denir. Solüsyonun jelleşmesi pH 4,4'te pH'daki bir değişiklik ile tetiklenir, formülasyon, gözyaşı sıvısı tarafından pH 7,4'e yükseltildiğinde jelleşmeye maruz kalan bir çözeltidir. Formülasyonun (pH 4,4) gözyaşı filmine yerleştirilmesinden sonra yaklaşık 2,8 birim pH değişimi, yüksek sıvı lateksinin viskoz bir jelle hemen hemen anında dönüşmesine neden olur. Çok sayıda iyonize edilebilir gruba sahip olan polimerler, polielektrolit olarak bilinir. Hidrojelin şişmesi, pH arttıkça zayıf asidik (anyonik) gruplar varlığında artar, ancak polimer zayıf bazik (katyonik) gruplar içeriyorsa azalır (Saini vd., 2015).

2.3.1.4. Enzim/protein etkisiyle jelleşen sistemler

Doğal enzimler tarafından katalize edilen *in situ* jel oluşumları geniş çapta araştırılmamıştır, ancak kimyasal ve fotokimyasal yaklaşımlara göre bazı üstünlükleri vardır. Örneğin, bir enzimatik işlem, monomerler ve başlatıcılar gibi potansiyel olarak zararlı kimyasallara ihtiyaç duymadan fizyolojik koşullar altında verimli bir şekilde çalışır. İnsülini serbest bırakabilen hidrojeller kullanan akıllı uyarılara duyarlı dağıtım sistemleri araştırılmıştır. İmmobilize edilmiş insülin ve glukoz oksidaz içeren katyonik pH'ya duyarlı polimerler, tutulan insülini aralıklı bir şekilde serbest bırakan kan glukoz seviyesine yanıt olarak şişebilir. Enzim miktarının ayarlanması, karışımların jel oluşumundan önce enjekte edilmesini sağlayan jel oluşum oranını kontrol etmek için uygun bir mekanizma da sağlar (Nirmal, Bakliwal ve Pawar, 2010).

2.3.2. Çalışmamızda kullanılan *in situ* jel oluşturan polimerler

2.3.2.1. Poloksamerler (*Pluronic*)

Poloksamerler, hidrofilik etilen oksit alanları ve hidrofobik propilen oksitleri nedeniyle amfifilik bir yapı sergileyen bir triblok kopolimer poli (etilen oksit) - b-poli (propilen oksit) -b-poli (etilen oksit) (PEO-PPO-PEO) yapısındadırlar. PEO-PPO-PEO (Pluronic veya Poloxamers) kopolimerlerinin üçlü bloğu, vücut sıcaklığında %15 (a/a) üzerindeki konsantrasyonlarda jelleşmeye maruz kalır. Sol-jel faz geçişini yüksek bir sıcaklıkta açıklamak için temel olası mekanizmalar önerilmiştir, polimerin kademeli olarak çözünmesi, arttırılmış misel toplanması ve polimerik ağıın dolaşmış olması. Pluronic triblok kopolimerleri piyasada farklı fiziksel formlarda ve moleküler ağırlıklarda farklı sınıflarda bulunur. Sınıfların fiziksel tanımlarına bağlı olarak sıvı için L, hamur için P ve pullar için F olarak verilmiştir. Yaygın olarak kullanılan poloksamerler 188 (F-68), 237 (F-87), 338 (F-108) ve 407 (F-127) 'dir. Pluronic F-127 (F-127) veya Poloxamer 407 (P407) (kopolimer PEO106-PPO70-PEO106), hidrofilik özelliğine katkıda bulunan %70 oranında etilen oksitten oluşur. F-127, molekül ağırlığı 12000 Da, PEO/PPO oranı 2:1 olan, toksik olmayan, 4 °C'nin altında düşük viskoziteli ve vücut sıcaklığında bir yarı katı jel oluşturan bir kopolimerdir. Ayrıca, F-127, düşük sıcaklıklarda hidrojen bağları nedeniyle soğuk suda sıcak suda olduğundan daha iyi çözünürlüğe sahiptir (Wu vd., 2019).

2.3.2.2. Selüloz türevleri

Selüloz, birkaç yüz ila on bin β (1 \rightarrow 4) bağlantılı d-glikoz ünitesinden oluşan doğrusal bir zincir içeren bir polisakkarittir. Topikal oftalmik formülasyonlarda kullanılan selüloz türevleri, metil selüloz (MC), hidroksietil selüloz (HEC), hidroksipropil metilselüloz (HPMC), sodyum karboksimetil selüloz (NaCMC). Düşük konsantrasyonlarda (%1-10), sulu çözeltileri sıvı halde bulunur, ancak ısıtma üzerine jel oluşturur. Selüloz türevleri tarafından sergilenen yüksek faz geçiş sıcaklığı, fiziksel veya kimyasal modifikasyon ile düşürülebilir. Geçiş sıcaklığı, MC için 40 ila 50 °C arasında ve HPMC için 75 ila 90 °C arasındadır. Sodyum klorür ilavesinin, geçiş sırasındaki MC jelleşme sıcaklığını 32 ila 34 °C'ye düşürdüğü bilinmektedir. Hidroksipropil molar süstitüsüyonu ile HPMC jelleşme sıcaklığını yaklaşık 40 °C'ye düşürülebilir (Wu vd., 2019).

2.4. Göz Enfeksiyon Hastalıkları ve Kullanılan Antimikrobiyal Ajanlar

Göz enfeksiyonlarına bakteri, mantar veya virüsler sebep olabilir. Göz enfeksiyonları gözün bazı kısımlarında ortaya çıkabilir ve sadece bir gözü veya her ikisini de etkileyebilir. Sık görülen göz enfeksiyonları konjunktivit, korneal ülserler ve endoftalmitir (Dhanapal ve Ratna, 2012).

2.4.1. Konjunktivit

Konjunktivit, şişlik (iltihaplanma) veya göz kapaklarını kaplayan zar enfeksiyonu (konjunktiva) şeklindedir. *Staphylococcus aureus*, bakteriyel konjunktivit ve blepharokonjunktivitlerin en sık sebebidir. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* gibi diğer birçok organizma da konjunktivite neden olur (Dhanapal and Ratna, 2012).

2.4.2. Kornea ülseri / keratit

Korneanın enflamasyonu (keratit) kornea ödemi, hücrel infiltrasyon ve siliyer tıkanıklık ile karakterizedir. Göz küresinin en ön kısmı olan kornea, atmosfere maruz kalır ve bu nedenle kolayca enfekte olur. Bakteriyel korneal ülserler virülan organizmanın neden olduğu en yaygın olanlardır. Kornea ülseri ile ilişkili yaygın bakteriler *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocyanea*, *E.coli* ve *Proteus* vs.'dir (Dhanapal and Ratna, 2012).

2.4.3. Endoftalmitis

Göz içi iltihabı ve göz küresinin iç katlarını içeren şiddetli göz içi enflamasyonu (pürülan üveit) şeklindedir. Neden olan organizmalar arasında *Streptococci*, *E.coli*, *Pseudomonas*, vb. bulunur. Bu enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde antiviraller, antifungaller ve antibakteriyeller kullanılır. Oküler bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan yaygın topikal antibakteriyeller arasında sülfonamidler, aminoglikozitler, polimiksin bazlı kombinasyonlar ve florokinolonlar bulunur (Dhanapal and Ratna, 2012).

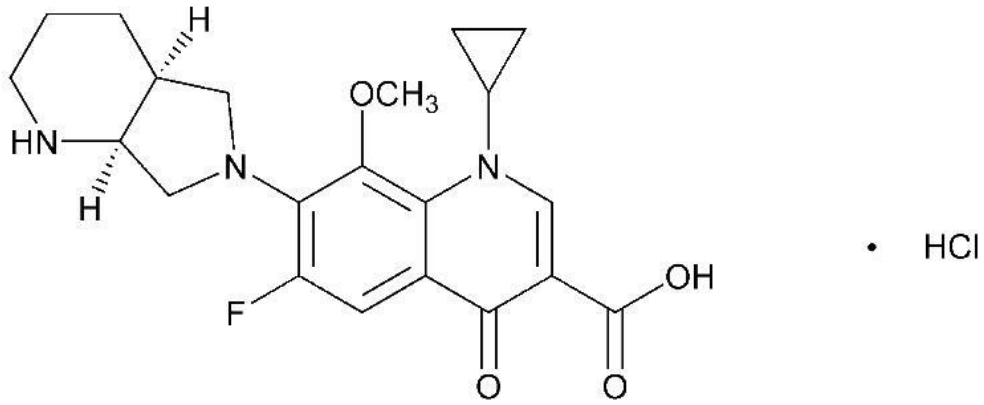
Florokinolonlar, oküler enfeksiyonlardan sorumlu olan bir gram-negatif ve anaerobik türlerin konaklarını kapsayan genişleyen bir geniş spektrumlu antibakteriyel sınıfını temsil eder. Bu antibakteriyeller, oftalmoloji alanında popülerlik kazanmıştır, çünkü birçok oküler enfeksiyonun tedavisinde kombinasyon terapisine eşdeğer oldukları gösterilmiştir. Florokinolonlar ayrıca *Streptokok* ve *Stafilokok* türleri dahil

olmak üzere çeşitli gram-pozitif organizmalara karşı da etkilidir; ancak, bu organizmaların bazılarında direnç ortaya çıkmaktadır (Dhanapal and Ratna, 2012).

2.5. Moksifloksasin Hidroklorür

İlk kinolon türü antibiyotik olan nalidiksik asit (NegGram), 1962'de tanıtılmıştır. O zamandan beri yapılan modifikasyonlar, gram-pozitif organizmaların da kapsanmasını sağlayan ikinci, üçüncü ve dördüncü nesil florokinolonların ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır (Oliphant ve Green, 2002).

Moksifloksasin (MOX), hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriyel patojenlere karşı yüksek potansiyele sahip yeni bir dördüncü nesil florokinolondur (Şekil 2.7.). Sınıfında *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı en yüksek potansiyele sahiptir. MOX, topikal oküler kullanım için %0,5'lik oftalmik çözelti olarak geliştirilmiştir (VIGAMOX[®], Alcon Laboratories). Yüksek potansiyele ek olarak, topikal antibiyotiklerin istenen bir özelliği, kornea boyunca hızlı geç ve ön oküler dokulara yoğun penetrasyonudur (Robertson vd., 2005).



Şekil 2.7. Moksifloksasin hidroklorür'ün açık formülü (USP 41)

Kimyasal adı: 1-Siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-8-metoksi-7 - [(4aS, 7aS) -oktahidro-6H-pirol [3,4-b] piridin-6-il] -4 -oksa-3-kinolinkarboksilik asit hidroklorür

Kapalı formülü: C₂₁H₂₄FN₃O₄ · HCl

Molekül ağırlığı: 43789

2.5.1. Kimyasal özellikleri

Ana molekülün çekirdeği olan 4-kinolon çekirdeğinin 1, 5, 7 ve 8. pozisyonlarındaki modifikasyonu, gelişmiş antimikrobiyal aktivite, güvenlik ve tolere edilebilirliği olan yeni florokinolonları tasarlamıştır. N-1 azot atomlarındaki süstitüsyonlar, aktivite spektrumu ve molekülün gücü için kritiktir. Moksifloksasin içindeki N-1 siklopropil ikamesi, gram pozitif ve anaerobik izolatlar karşı artmış aktivite sağlar. C-5 pozisyonundaki süstitüsyonlar ayrıca *in vitro* aktiviteyi gram-pozitif izolatlar karşı etkiler; molekül ne kadar büyük olursa gram pozitif potansiyel o kadar büyük olur. Hacimli bir C-7 (diazabisiklononil halka) yan zincir ve C-8 pozisyonundaki bir metoksi grubunun eklenmesi, dirençli bakteriyel alt popülasyonların seçilme potansiyelini azaltır ve DNA jitos ve topoizomeraz IV, esansiyel bakteriyel enzimler için bağlanma/bloke etme afinitesini artırır. Bu modifikasyonlar, oküler ve oküler olmayan izolatlar arasında daha eski florokinolonlarda ortaya çıkan direnç zorluğunu karşılamak üzere geliştirilmiştir (Miller 2008).

2.5.2. Fizikokimyasal özellikleri

Biraz sarıdan tam sarıya varan toz veya kristallerdir. Moksifloksasin HCl, 0,1 N NaOH içerisinde çözünür; suda ve metanolde az miktarda çözünür; 0,1 N HCl, dimetilformamid ve alkol içerisinde çok az çözünür; metilen klorür, aseton, etil asetat ve toluen içerisinde pratik olarak çözünmez; ek olarak tert-bütül metil eter ve n-heptanda çözünmez. Moksifloksasin HCl monohidrat, kristalizasyon için kullanılan çözücüye bağlı olarak prizma, iğne veya oval kesim gibi farklı şekillerde bulunabilir (Al Omari vd., 2014).

2.5.3. Analiz yöntemleri

Titrimetrik yöntemler (sulu ve susuz titrasyon), elektrokimyasal yöntemler (voltametri, polarografi), spektroskopik yöntemler (spektrometri, floresans, kolorimetrik analiz, atomik absorpsiyon spektroskopisi, kemilüminometrik analiz), kromatografik yöntemler (yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ultra performanslı sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez) gibi yöntemlerle analiz edilebilmektedir (Al Omari vd., 2014).

2.5.4. Antimikrobiyal aktivite spektrumu

MOX HCl'in oftalmik çözeltisi, belirlenmiş duyarlı organizmaların neden olduğu bakteriyel konjunktivit tedavisi için FDA tarafından 2003 yılının Nisan ayında

onaylanmıştır. Duyarlı organizmalar arasında *Corynebacterium türleri*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* grubu, *Acinetobacter lwoffii*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Chlamydia trachomatis* vardır (Al Omari vd., 2014).

2.5.5. Aktivite mekanizması

Florokinolonlar, DNA sentezi için gerekli olan bakteri enzimlerini (yani replikasyon, transkripsiyon, onarım ve rekombinasyon) hedefleyen güçlü antibakteriyel ajanlardır. Bu önemli bakteriyel enzimler DNA giraz ve topoizomeraz IV'tür. Florokinolonun etkisindeki asıl olay, üçlü ilaç-enzim-DNA kompleksleri olarak DNA girazın veya topoizomeraz IV'ün tutulmasıdır. Florokinolon-enzim-DNA kompleksleri, DNA'nın çoğaltılmış ipliklerinin çözülmesini ve / veya ayrılmasını önleyerek, DNA çoğalmasının inhibisyonunu ve bakteri ölümünü gerçekleştirir. Çift sarmallı DNA'daki kopmalar, kopyalayan hücrenin ölümü ile sonuçlanır. DNA giraz, topoizomeraz IV'ü kodlayan bir gen içermeyen bir bakteri grubunu temsil eden *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* ve *Treponema pallidum* gibi organizmalar da hedeftir. Gram negatif organizmalarda, florokinolonlara karşı DNA giraz, topoizomeraz IV'den daha duyarlıdır ve birincil hedef olarak kabul edilir. Gram-pozitif organizmalar için florokinolonların hedefi daha karmaşıktır. Bu organizmalardaki giraz, florokinolonlara gram-negatif bakterilerden daha az duyarlıdır. Gram-pozitif organizmalarda genel hedef topoizomeraz IV'tür. Dördüncü kuşak florokinolonlar hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV'ü hedeflemektedir (Stroman vd., 2005).

2.5.6. Direnç gelişimi

Florokinolonlara direnç, dört ana bakteri mekanizmasının bir veya daha fazlasında önemli genetik değişiklikler içermektedir: a) DNA sentezi için enzimler, b) jilat koruyucu proteinler, c) hücre geçirgenliği veya d) ilaç akışı. Florokinolonları parçalayan enzimler henüz bakterilerde bildirilmemiştir, fakat mantarlarda bulunmuştur. Florokinolon direnci, adım adım gelişmektedir. Azalan duyarlılık, hücre içi ilaç konsantrasyonunu düzenleyen porinlerle veya hedef enzimleri saldırıya karşı koruyan proteinlerdeki değişimlerle ilişkilendirmiştir. DNA giraz veya topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerdeki nokta mutasyonları, florokinolonların bu enzimlere afinitesini

azaltmaktadır. Gram-negatif organizmalarda bulunan plazmid, DNA girazı florokinolonlardan koruyan 218-amino asitli bir proteini kodlayarak direnç sağlayan qnr (kinolon direnci) lokusunu içerir. Bakterilerin akış pompası mekanizması, ölümcül florokinolon seviyelerinin sitoplazmada birikmesini önleyerek bakteriyel dirence katkıda bulunmaktadır. Bazı florokinolonlar, özellikle de moksifloksasin, hücreden dışarı çıkmasını engelleyen 7. pozisyondaki hacimli yan zincir kısımları nedeniyle bakteri akış mekanizmalarından daha az etkilenmektedir (Stroman vd., 2005).

2.5.7. Farmakokinetik özellikleri

Farmakodinamik, antimikrobiyal ajanın bulaşıcı mikroorganizma üzerindeki etkisini tanımlanmaktadır. Bu etki; bakteri türleri, mikrobiyal direnç mekanizması, büyüme fazı, enfekte aşılama, öldürme derecesi, öldürme zamanı ve MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) dağılımları ile karakterizedir. Bu kompleks ilişkinin üçüncü ortağı, hem ilacın hem de patojenin hastaya yaptığıdır. Bu etkileşim hastanın yaşı, genetik geçmişi, altta yatan hastalıkları ve geçmişteki antimikrobiyal maruziyeti ile tanımlanır. Maksimum konsantrasyonun (C_{maks}) MİK'e ve konsantrasyon eğrisi altındaki alana (EAA) oranı, konsantrasyona bağlı anti-enfektifler için klinik sonuçlar ile en uygun olan farmakodinamik endekslerdir (Miller 2008).

Topikal MOX HCl oftalmik çözeltisinin uygulanmasından sonra, MOX sistemik dolaşım içine emilmektedir. Toplam 8 doz için her 8 saatte bir bilateral topikal oküler dozlarda MOX HCl oftalmik çözeltisi alan yetişkin 21 erkek ve kadının plazma MOX konsantrasyonları ölçülmüş ve ortalama kararlı durum C_{maks} ve EAA, sırasıyla 2,7 ng/mL ve 41,9 ng ·s/mL bulunmuştur. Bu sistemik maruz kalma değerleri 400 mg oral doz MOX dozundan sonra bildirilen ortalama C_{maks} ve EAA'dan en az 1600 ve 1000 kat daha düşüktür. MOX'in plazma yarı ömrünün 13 saat olduğu tahmin edilmektedir. MOX vücutta yaygın olarak dağılmakta ve değişmeden, glukuronid veya sülfat konjugatları olarak dışkı ya da idrarla atılmaktadır (Product Monograph: Teva, 2015).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Moksifloksasin hidroklorür	Deva İlaç, Türkiye
2-Hidroksipropil-β-siklodekstrin	Sigma-Aldrich, Almanya
Metil-β-siklodekstrin	Abcr, Almanya
Sulfabutileter-β-siklodekstrin (Captisol®)	San Diego, ABD
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Asetonitril	Merck, Almanya
Benzalkonyum klorür	Fluka, Danimarka
Sodyum hidroksit	Riedel-de Haen, Almanya
Karboksimetil selüloz	Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroksipropil metil selüloz	Kimetsan, Türkiye
Mueller Hinton Broth	Labm, İngiltere
Agar agar	Doğa İlaç, Türkiye
Pluronic F127	Sigma, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Riedel-de Haen, Almanya
Hidroklorik asit	Riedel-de Haen, Almanya
Asetik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Kalsiyum klorür 2H ₂ O	Merck, Almanya
Sodyum bikarbonat	Doğa İlaç, Türkiye
Monobazik potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	Horasan Kimya, Türkiye
o-Fosforik asit	Merck, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi	Mettler Toledo XSE105, ABD
Vorteks	Scilogex MX-S, ABD
Manyetik karıştırıcı	IKA RT-15, Almanya
Ultrasonifikatör	Wisd WUC-A03H, Güney Kore
Termometre	Ebro TFX 410, Almanya
Mikrosantrifüj	Electro Mag M4800M, Türkiye
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60, Japonya
Ultrasonik su banyosu	N-Biotek, ABD
Manyetik karıştırıcı	WiseStir, Kore
Reometre	Brookfield, ABD
Derin dondurucu	New Brunswick, ABD
Steril kabin	Heraeus KS12, Almanya
Densitometre	Biosan Den-1B, Türkiye
Liyofilizatör	Labconco, ABD
Nükleer manyetik rezonans (NMR)	Bruker Fourier 300, Almanya
Infrared spektrofotometresi	Schimadzu, Japonya
Yatay çalkalayıcı	Thys 2, Almanya
Yüksek performanslı sıvı kromatogafisi	Shimadzu, Japonya
YBSK kolonu	Waters XSelect C18 5µm, İrlanda
pH-metre	Mettler Toledo, ABD
Isıtıcı su banyosu	PolyScience, ABD
X-ışını kırınım cihazı	Rigaku, Japonya

4. YÖNTEMLER

4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

4.1.1. Analitik yöntem geliştirme

Çalışmalarda, etkin madde olan moksifloksasin hidroklorürün miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Sabit faz olarak C18 kolonunun kullanıldığı sistemde, metanol, distile su ve asetonitril, 60:45:5 (h/h/h) oranlarında karıştırılıp o-fosforik asitle pH 2,7 ye ayarlanarak hazırlanan hareketli faz ile izokritik ayırım yapılmasına karar verilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C de tutulmuş, 1 ml/dak akış hızıyla 302 nm de ölçüm yapılmıştır (Tablo 4.1.). En uygun hareketli faz seçiminde daha önceden moksifloksasinle yapılmış bir çalışmadan yararlanılmıştır (Yurtdaş Kırmıoğlu vd., 2018).

Tablo 4.1. HPLC çalışma koşulları (Yurtdaş Kırmıoğlu vd., 2018).

Cihaz	Shimadzu HPLC
Kolon	Waters Kolon C18 250x4.6x5µm
Hareketli Faz	Metanol:Su:Asetonitril (60:45:5, h/h/h) (pH 2,7)
Fırın Sıcaklığı	30 °C
Akış Hızı	1 ml/dak
Enjeksiyon Hacmi	20 µl

4.1.2. Analitik yöntem validasyonu

Analitik yöntem validasyonunun amacı, kullandığımız yöntemin uygunluğunun, doğruluk ve güvenilirliğinin verilerle ispatlanmasıdır. Bu çalışmalar kapsamında Uluslararası Harmonizasyon Konseyi (ICH) tarafından belirlenen analitik yöntem validasyon parametrelerinden doğrusallık, doğruluk, kesinlik, çalışma aralığı, duyarlılık, seçicilik ve kararlılık parametreleri esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A (R2), 2005). Analitik yöntem validasyon çalışmaları, çalışmanın farklı aşamalarında yer alan her bir çözünme ortamı için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmalarının gerçekleştirildiği çözünme ortamları; saf su (pH 7,0), mobil faz ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarıdır. Her bir çalışma ortamı için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, çalışma aralığı, duyarlılık ve seçicilik parametrelerine ait sonuçlar ICH kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

4.1.2.1. Doğrusallık

Doğrusallık, belirli bir konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltilerden çalışma aralığı içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin doğru orantı oluşturan sonuçları verebilme yeteneğidir. Doğrusallık, analizlerdeki konsantrasyonların verdiği sinyallerin incelenmesidir. Doğrusallık ilişkisinin tespiti, test sonuçlarının uygun istatistiksel yöntemlerle, örneğin bir regresyon çizgisinin en küçük kareler yöntemiyle hesaplanmasıyla değerlendirilmektedir. Doğrusallığın ispatı için en az 5 konsantrasyon ile çalışılması önerilmektedir.

Doğrusallık çalışmaları kapsamında regresyon eşitliklerinin oluşturulması için, 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyon (10, 30, 50, 80 ve 100 µg/ml) ile her bir çözünme ortamı için 3'er seri çalışma yapılmıştır. Hazırlanan çözeltiler HPLC'ye enjekte edilerek pik alanları bulunmuştur. Elde edilen pik alanı değerleri ile çözeltilerin bilinen derişimleri kullanılarak regresyon eşitlikleri oluşturulmuştur.

4.1.2.2. Doğruluk

Gerçek değer veya kabul edilmiş referans değer ile bulunan değerlerin birbirine olan yakınlığı analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir. Konsantrasyonu bilinen en az 3 farklı örneğin ölçümünün 3 kez tekrarlanmasıyla analitik yöntemin doğruluğu araştırılabilmektedir. Doğruluk çalışmaları kapsamında, çalışma aralığının en alt, orta ve en üst konsantrasyonlarında çalışılarak, yöntem ile elde edilen konsantrasyon değerleri üzerinden yüzde geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

4.1.2.3. Kesinlik

Kesinlik, aynı stoktan hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki seriler arasında her bir konsantrasyonun birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Kesinlik, tekrar elde edilebilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik gibi üç aşamada değerlendirilmekte, bağıl standart sapma ve güven aralığı hesaplanmaktadır.

Tekrar elde edilebilirlik, bir analizin laboratuvar koşulları değiştirildiği durumlarda da doğru sonuç vermesidir. Ara kesinlik, değişkenlerin (gün, analist, ekipman vb.) analitik yöntemle etkisinin belirlenmesidir. Tekrarlanabilirlik ise kısa zaman aralıklarında aynı çalışma koşullarındaki kesinliği ifade etmektedir. Kesinlik çalışması 3 farklı konsantrasyon ile 6 tekrarlı olarak 3 farklı günde çalışılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.4. Çalışma aralığı

Analitik yöntemin doğrusallık, doğruluk ve kesinlik koşullarına sahip olduğunun gösterilmesi için çalışılan aralık, örneğin alt ve üst konsantrasyonlarının aralığıdır. Bu aralık doğrusallık çalışmaları ile belirlenmektedir.

4.1.2.5. Duyarlılık

Duyarlılık, analitik yöntemin analiz edilen örneğin en düşük konsantrasyonunu saptayabilme ve tayin edebilme yeteneğidir. Saptama sınırı (LoD) değeri örnek içindeki analit konsantrasyonunun tam değer olarak en düşük düzeydeki miktarıdır ve her zaman kantitatif olmayabilir. Miktar tayini sınırı (LoQ) değeri ise örnek içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak saptanabilen en düşük miktarıdır.

Analitik yöntemin saptama sınırı (LoD) ve miktar tayini sınırı (LoQ) aşağıdaki eşitliklerle hesaplanabilmektedir:

$$LoD = \frac{3,3\sigma}{S} \qquad LoQ = \frac{10\sigma}{S} \qquad (4.1 \text{ ve } 4.2)$$

Bu denklemlerde; σ standart sapma, S kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

4.1.2.6. Seçicilik

Analitik yöntemin belirli bir analit için spesifik olmasına seçicilik denir. Analitik yöntemin belirli bir analit için spesifikliğini kanıtlamanın mümkün olmadığı durumlarda iki veya daha fazla yöntemin kombinasyonu önerilmektedir.

4.1.2.7. Kararlılık

Etkin maddenin pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlanan konsantrasyonu belli çözeltisi, in vitro salım çalışmalarındaki şartlara uygun olarak 34 °C lik etüvde 72 saat bekletilmiştir. Belirli zaman aralıklarında ortamdan örnekler alınıp HPLC ile ölçülmüştür. Deney 3 tekrarlı yapılmıştır.

4.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

4.2.1. Çözünürlük faz diyagramlarının ve kompleksleşme oranlarının belirlenmesi

Çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında kullanılmak üzere denge süresinin belirlenmesi için, 10 ml su içerisinde 5 mM konsantrasyonunda SBE β CD, HP β CD ve M β CD içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilere etkin maddenin aşırı miktarları eklenerek 225 vuruş/dak hız ile yatay çalkalayıcıda ışıktan korunarak çalkalamaya bırakılmıştır. 24 saat aralıklarla 6 gün boyunca her bir çözeltiden alınan örnekler 0,45 μ m por çapına sahip PTFE filtreden süzülerek HPLC ile analiz edilmiş ve çözünürlük artışının tamamlandığı süreler denge süresi olarak tespit edilmiştir.

Moksifloksasinin SBE β CD, HP β CD ve M β CD ile kompleks oluşturma oranlarının belirlenmesi amacıyla, siklodekstrinlerin su içerisinde 0 mM'dan başlayarak 30 mM'a kadar değişen konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyona etkin maddenin aşırı miktarı ilave edilip yatay çalkalayıcıda 225 vuruş/dak hız ile denge süresince ışıktan korunarak çalkalanmıştır. Denge süresi sonunda alınan örnekler 0,45 μ m por çapına sahip PTFE filtreden süzöldükten sonra HPLC ile analiz edilmiştir. Su ortamında oluşturulan regresyon eşitliği yardımıyla, her bir siklodekstrin konsantrasyonunda çözünen moksifloksasin miktarları hesaplanmıştır. Siklodekstrin konsantrasyonlarına karşılık moksifloksasin konsantrasyonlarına ait değerlerin grafiğe geçirilmesi ile oluşturulan diyagramlar yardımıyla faz diyagram tipleri belirlenmiş ve Higuchi eşitliğine göre kompleks oluşturma oranları hesaplanmıştır (Higuchi ve Connors, 1965).

4.2.2. Moksifloksasin/siklodekstrin komplekslerinin hazırlanması

Moksifloksasin/siklodekstrin kompleksleri, faz diyagramı çalışmaları ile belirlenen molar oranlar kullanılarak liyofilizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır (Corciova vd., 2015). Komplekslerin hazırlanışına ait işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

4.2.2.1. Moksifloksasin/SBE β CD kompleksinin hazırlanması

Moksifloksasinin SBE β CD ile 1:15 molar oranda kompleks oluşturduğu belirlenmiş olduğundan, bu molar oranları sağlayacak miktarda etkin madde ve siklodekstrin ile çalışılmıştır. Buna göre 0,2 g moksifloksasin üzerine 10 ml su ilave edilmiş ve çözünen kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra 1,4815 g SBE β CD üzerine 10 ml su ilave edilmiş ve çözünen kadar karıştırılmıştır. SBE β CD

çözeltisi, karışmakta olan moksifloksasin çözeltisi üzerine yavaş yavaş ilave edildikten sonra denge süresince yatay çalkalayıcıda 225 vuruş/dak hız ile çalkalanmıştır. Çalkalayıcıdan alınan çözelti -85 °C'de 24 saat süre ile dondurulmuştur ve liyofilizatörde 48 saat kurutularak katı halde kompleks elde edilmiştir.

4.2.2.2. Moksifloksasin/HPβCD kompleksinin hazırlanması

Moksifloksasinin HPβCD ile 1:11 molar oranda kompleks oluşturduğu belirlenmiş olduğundan, bu molar oranları sağlayacak miktarda etkin madde ve siklodekstrin ile çalışılmıştır. Buna göre 0,2 g moksifloksasin üzerine 10 ml su ilave edilmiş ve çözünene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra 0,7032 HPβCD üzerine 10 ml su ilave edilmiş ve çözünene kadar karıştırılmıştır. HPβCD çözeltisi, karışmakta olan moksifloksasin çözeltisi üzerine yavaş yavaş ilave edildikten sonra denge süresince yatay çalkalayıcıda 225 vuruş/dak hız ile çalkalanmıştır. Çalkalayıcıdan alınan çözelti -85 °C'de 24 saat süre ile dondurulmuştur ve liyofilizatörde 48 saat kurutularak katı halde kompleks elde edilmiştir.

4.2.2.3. Moksifloksasin/MβCD kompleksinin hazırlanması

Moksifloksasinin MβCD ile 1:3 molar oranda kompleks oluşturduğu belirlenmiş olduğundan, bu molar oranları sağlayacak miktarda etkin madde ve siklodekstrin ile çalışılmıştır. Buna göre 0,2 g moksifloksasin üzerine 10 ml su ilave edilmiş ve çözünene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra 0,1808 g MβCD üzerine 10 ml su ilave edilmiş ve çözünene kadar karıştırılmıştır. MβCD çözeltisi, karışmakta olan moksifloksasin çözeltisi üzerine yavaş yavaş ilave edildikten sonra denge süresince yatay çalkalayıcıda 225 vuruş/dak hız ile çalkalanmıştır. Çalkalayıcıdan alınan çözelti -85 °C'de 24 saat süre ile dondurulmuştur ve liyofilizatörde 48 saat kurutularak katı halde kompleks elde edilmiştir.

4.2.3. Siklodekstrin komplekslerinin analizi

4.2.3.1. IR analizi

Moksifloksasin hidroklorür, çalışmada kullanılan siklodekstrinlerin (SBEβCD, HPβCD, MβCD), etkin madde/siklodekstrin fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin FT-IR analizi için 500-4000 cm⁻¹ arasında spektrumları alınmıştır.

4.2.3.2. DSC analizi

Etkin madde, saf siklodekstrinlerin, etkin madde/siklodekstrin fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin termal davranışlarını belirlemek üzere diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılmıştır. 4 mg hassas olarak tartılmış numuneler alüminyum analiz hücresi içerisine konulup preslendikten sonra cihaza yerleştirilmiştir. 40-320 °C sıcaklık aralığında, 10 °C/dak ısı artış hızı ve 50 ml/dak azot gazı akış hızında termogramları alınmıştır.

4.2.3.3. NMR analizi

5-10 mg hassas olarak tartılmış etkin madde, saf siklodekstrinler, etkin madde/siklodekstrin fiziksel karışımları ve hazırlanan kompleksler dimetil sülfoksit (CH₃)₂SO içerisinde çözüldürüldükten sonra bir ucu kapalı cam boruya konularak cihazın uygun bölümüne yerleştirilmiş ve spektrumları alınmıştır.

4.2.3.4. XRD analizi

Etkin madde, saf siklodekstrinler, etkin madde/siklodekstrin fiziksel karışımları ve hazırlanan komplekslerin X-ışını kırınım analizleri 0-40 °C aralığında 40 kV voltaj ve 20 mA akım şiddetindeki jeneratör kullanılarak yapılmıştır.

4.2.3.5. Etkin madde ve komplekslerin çözünürlük tayini

Kompleksleşme sonrasında etkin madde çözünürlüğündeki artışın tespiti için, pH 7,4 fosfat tamponunda çalışılmıştır. 2 ml pH 7,4 fosfat tamponu içerisine moksifloksasin veya komplekslerin aşırı miktarları konularak 25 °C'de yatay çalkalayıcıda 1 saat çalkalanarak en yüksek çözünürlük değerine ulaşması beklenmiştir. Sürenin sonunda aşırı doymuş çözelti formundaki karışımlardan örnek alınarak 0,45 mm por çapındaki PTFE membran filtreden süzölmüştür. Elde edilen çözeltilerdeki moksifloksasin konsantrasyonları HPLC ile ölçülmüştür. Deneyle 3 tekrarlı yapılmıştır.

4.2.3.6. Komplekslerdeki etkin madde miktarının belirlenmesi

Komplekslerin içerdiği etkin madde miktarının belirlenmesi amacıyla, 4 mg kompleks tartılarak 1 ml mobil faz içerisinde çözüldürülmüş ve HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz ile elde edilen pik alanı ve regresyon eşitliği yardımıyla kompleksde bulunan moksifloksasin miktarı hesaplanmıştır. Deneyle her bir kompleks için üç tekrarlı yapılmıştır.

4.2.3.7. Etkin maddenin ve komplekslerin çözelti kararlılığının incelenmesi

Kompleks hazırlanmasının etkin madde kararlılığı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla, saf etkin madde ve komplekslerin pH 7,4 fosfat tamponunda bilinen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanarak, 25 °C karanlıkta, 25 °C gün ışığında ve 4 °C buzdolabında, 2 ay süre ile takip edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (başlangıç, 3., 6., 10, 15., 20., 30., 45. ve 60. gün) alınan örnekler HPLC ile analiz edilerek, kalan etkin madde miktarları başlangıç konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır.

4.2.3.8. Antimikrobiyal etkinlik testi

Kompleks hazırlanmasının etkin maddenin antimikrobiyal etkinliği üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla agar difüzyon testi kullanılmıştır (Jain, Shah ve Rajadhyaksha, 2008). Test için 90 mm çapındaki tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına besiyeri olarak antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan Mueller Hinton Agar konulmuş ve her bir petri kabına 0,5 McFarland bulanıklığına göre $1,5 \times 10^8$ cfu/mL koloni oluşturacak miktarda mikroorganizma ekilmiştir. Daha sonra 1, 10, 100, 500 µg/ml MOX içeren konsantrasyonlarda hazırlanan saf etkin madde, MOX:SBEβCD, MOX:HPβCD ve MOX:MβCD komplekslerine ait çözeltilerden 100 µl'lik örnekler alınarak *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* ekilmiş besi yerlerine uygulanmıştır. 37 °C etüvde 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen zon çapları ölçülmüştür.

4.3. *In Situ* Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Oftalmik uygulamaya yönelik olarak hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarında polimer olarak Pluronic® F127 (PF127) ve hidrokispropil metil selüloz (HPMC), izotoni ayarı için sodyum klorür (NaCl), koruyucu madde olarak benzalkonyum klorür (BK) ve çözücü olarak distile su kullanılmıştır.

4.3.1. Formülasyon geliştirme çalışmaları

4.3.1.1. Etkin maddesiz formülasyonların hazırlanması

Formülasyon çalışmalarına literatürlerde yer alan farklı polimer oranları kullanılarak başlanılmıştır. Etkin maddenin sudaki çözeltisini izotonik hale getirmek için gereken NaCl miktarı Rault Yasası'na göre belirlenmiştir. Koruyucu madde miktarı

seçiminde ise piyasada bulunan göz preparatlarında en çok kullanılan madde ve orana göre %0,01 benzalkonyum klorür kullanılmıştır.

In situ jel hazırlanmasında genel olarak, sıcak ve soğuk yöntem olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Sıcaklık etkisi ile jelleşen sistemler hazırlanırken karıştırma işleminin soğuk ortamda yapılması gerekmektedir (Rawat, Warade ve Lahoti, 2010). Bu nedenle hazırlama sırasında buz kalıpları ile sıcaklığı 10 °C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Etkin madde içermeyen formülasyon hazırlamak için iki farklı polimer (PF127 ve HPMC), NaCl, BK ve distile su beher içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi 24 saat süresince 200 rpm hızda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan önformülasyonlar, kodları, formülasyonlara ait bileşenler ve bileşenlerin oranları Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

4.3.1.2. Etkin maddesiz formülasyonların jelleşme sıcaklığı

Göze uygulanacak sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sistemlerde ideal jelleşme sıcaklığı göz sıcaklığı olan 32-34 °C'dir. Bu nedenle formülasyon seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk parametre jelleşme sıcaklığıdır. Jelleşme sıcaklığının tespiti için hazırlanan formülasyonlar 0 °C'den 50 °C'ye kadar *Test Tüpü Eğme Yöntemi (Test Tube Tilting Method)* ile test edilmiştir. Her bir formülasyon için çalışmalar 3 kez tekrarlanarak, göz yüzeyinin sıcaklığı olan 32 °C'de jelleşen polimer oranlarına sahip formülasyonlar seçilmiştir. (Nirmal, Bakliwal ve Pawar, 2010).

4.3.1.3. Kompleks içeren formülasyonların hazırlanması

Ön formülasyonlardan jelleşme sıcaklığı uygun olan ilk 9 formülasyona, piyasa preparatına uygun olarak %0,5 (a/a) konsantrasyonda etkin madde içerecek oranda kompleksler (MOX:SBE β CD, MOX:HP β CD, MOX:M β CD) eklenerek etkin maddeli 9 formülasyon hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda, etkin madde içermeyen formülasyonların hazırlama basamakları aynen uygulanırken karıştırma işleminin başında diğer maddeler ile birlikte kompleksler eklenmiş, 24 saat boyunca 200 rpm hızda ve 10 °C sıcaklıkta karıştırılmıştır.

Tablo 4.2. *İn situ* jel önformülasyon bileşenleri (%a/h)

Kod	PF127	HPMC	NaCl	BK	Distile su
F1805	18	0,5	0,9	0,01	km 100
F181	18	1	0,9	0,01	km 100
F1815	18	1,5	0,9	0,01	km 100
F1905	19	0,5	0,9	0,01	km 100
F191	19	1	0,9	0,01	km 100
F1915	19	1,5	0,9	0,01	km 100
F2005	20	0,5	0,9	0,01	km 100
F201	20	1	0,9	0,01	km 100
F2015	20	1,5	0,9	0,01	km 100
F2105	21	0,5	0,9	0,01	km 100
F211	21	1	0,9	0,01	km 100
F2115	21	1,5	0,9	0,01	km 100
F2305	23	0,5	0,9	0,01	km 100
F231	23	1	0,9	0,01	km 100
F2315	23	1,5	0,9	0,01	km 100
F2505	25	0,5	0,9	0,01	km 100
F251	25	1	0,9	0,01	km 100
F2515	25	1,5	0,9	0,01	km 100

4.3.1.4. Kompleks içeren formülasyonların jelleşme sıcaklığı

Test tüpü eğme yöntemi kullanılarak etkin madde içeren formülasyonların jelleşme sıcaklıkları ölçülmüştür. Etkin maddenin jelleşme sıcaklığına olan etkisini görmek için F1805, F181, F1815, F191, F1915, F2005, F201, F2105 ve F211 etkin maddesiz formülasyonlara MOX:SBE β CD, MOX:HP β CD, MOX:M β CD ayrı ayrı eklenerek *test tüpü eğme yöntemiyle* denenmiştir. Çalışmalar her bir formülasyon için 3 kez tekrarlanmıştır.

4.3.2. Kompleks içeren *in situ* jel formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

4.3.2.1. pH ölçümü

Kompleksler ile hazırlanan formülasyonların pH ölçümü oda sıcaklığında pH metre ile yapılmıştır.

4.3.2.2. Fiziksel görünüş

Kompleks içeren *in situ* jel formülasyonlarının fiziksel görünüşleri siyah ve beyaz arka planda görsel olarak incelenmiştir.

4.3.2.3. Jelleşme kapasitesi

Kompleksler ile hazırlanan formülasyonların jelleşme kapasitesini belirlemek için 34 °C’de 10 ml taze hazırlanmış suni gözyaşı ortamına 1 damla formülasyon damlatılmış ve jelleşme süresi görsel olarak belirlenmiştir. Jelleşme kapasitesini belirlemek için Tablo 4.3’te belirtilen kod sistemi kullanılmıştır (Makwana, Patel ve Parmar, 2016).

Tablo 4.3. *İn Situ jel formülasyonunun jelleşme kapasitesi kodları (Makwana, Patel ve Parmar, 2016).*

Gözlem	Kod
Jelleşme oluşmadı	-
Jelleşme birkaç dakika içinde oluştu ve birkaç saat sürdü	+
Jelleşme hemen oluştu ve birkaç saat sürdü	++
Jelleşme hemen oluştu ve uzun süre sürdü	+++
Çok yoğun jel oluştu	++++

4.3.2.4. Etkin madde miktar tayini

Kompleks içeren *in situ* jel formülasyonları üzerinde etkin madde miktar tayini, daha önceden valide edilmiş HPLC yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Deneyle her formül için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.3.3. Formülasyon seçimi

Formülasyon geliştirme çalışmalarından sonra jelleşme sıcaklıkları ve pH değerleri dikkate alınarak oftalmik kullanıma en uygun olabilecek formülasyonlar belirlenmiştir. ~32 °C’de jelleşen, en düşük polimer konsantrasyonuna sahip ve göz sıvısının pH’sı olan 6,5’e en yakın pH değerine sahip olan 3 formülasyon *in vitro* salım ve kararlılık çalışmaları için seçilmiştir.

4.3.4. *İn vitro* salım çalışmaları

İn vitro salım çalışmalarında diyaliz membran yöntemi ile göz pH’sına ekivalan olan pH 7,4 fosfat tamponu ortamı kullanılmıştır (Cohen vd., 1997; Jain vd., 2008; Kim vd. 2002). Bir gece önceden pH 7,4 fosfat tamponu ile hidrate edilen selüloz asetat diyaliz membran (12000-14000 Da MWCO) içerisine 1 ml pH 7,4 fosfat tamponu, magnet ve 2,5 mg saf MOX yerleştirilerek membranın iki ucu kapatılmıştır. Hazırlanan diyaliz torbası 34±0,5 °C deki 25 ml pH 7,4 fosfat tamponu içeren beher içerisine

konulmuş ve manyetik karıştırıcı 100 rpm’de çalıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (15 dk, 30 dk, 60 dk, 2s, 3s, 4s, 5s, 6s, 12s, 24s, 48s, 72s) ortamdan 250 µl örnek alınarak YBSK’de analiz edilmiştir. Her örnek alınan zamanda taze ortam sıvısı aynı hacimde salım ortamına eklenmiştir. Deneyle aynı miktarda (2,5 mg) saf MOX içeren *in situ* jel formülasyonları ve MOX:MβCD kompleks ile hazırlanmış *in situ* jel formülasyonları ile aynı şartlarda yürütülmüştür. Farklı zamanlarda salınan MOX konsantrasyonları kullanılarak hesaplanan % kümülatif MOX salımı zamana karşı grafiğe geçirilerek salım profilleri oluşturulmuştur. Çalışmalar 3 tekrarlı yapılmıştır.

4.3.5. Salım kinetiğinin belirlenmesi

In vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler farklı kinetik modellere (Sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik, Higuchi, Kormeyer-Peppas) uygulanmıştır. En uygun kinetik modelin seçiminde hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) değerleri incelenmiştir.

4.3.6. Kararlılık çalışmaları

Kararlılık çalışmalarında formülasyonlar, 4 ± 3 °C, 25 ± 2 °C’lik kararlılık kabinlerine yerleştirilmiştir ve belirli zaman aralıklarında (0., 15., 30., 60. ve 90. gün) fizikokimyasal özellikleri test edilmiştir (ICH Q1A-R2, 2003). Testler içerisindeki fiziksel görünüş, pH ölçümü, etkin madde miktar tayini 0., 15., 30., 60. ve 90. gün olmak üzere tüm zaman aralıklarında, reolojik incelemeler ise 0., 30., 60. ve 90. gün 20 rpm’de 25 °C ve 34 °C’de ölçülmüştür (Srividya, Cardoza ve Amin, 2001). Çalışmanın sonunda ek olarak formülasyonların jelleşme kapasiteleri ve jelleşme sıcaklıkları da ölçülmüştür.

Kararlılık çalışmalarındaki reolojik ölçümler 25 °C ve 34 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta yapılmıştır.

4.3.7. Formülasyonların antimikrobiyal etkinlik testi

Kompleksler ile yapılan antimikrobiyal etkinlik testlerinde MOX’nin *Staphylococcus aureus* üzerinde *Pseudomonas aeruginosa*’ya göre daha etkili olması nedeniyle, formülasyonların antimikrobiyal etkinlik testlerinde *Staphylococcus aureus* ile çalışılmıştır. Formülasyonların antimikrobiyal etkinliğini belirlemek amacıyla agar difüzyon testi kullanılmıştır (Jain, Shah ve Rajadhyaksha, 2008). Test için 90 mm çapındaki tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına Mueller Hinton Agar konulmuş ve her bir petri kabına 0,5 McFarland bulanıklığına göre $1,5\times 10^8$ cfu/mL koloni

oluşturacak miktarda *Staphylococcus aureus* ekilmiştir. Çalışmada kompleksler ile hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarının antimikrobiyal etkinliklerini, saf MOX, saf etkin madde ile hazırlanan *in situ* jel formülasyonları, piyasa preparatı (Vigamox®) ve plasebo formülasyon (en yüksek polimer oranı içeren formülasyona ait) ile karşılaştırmak amacıyla, formülasyonların steril su ile seyreltilmesiyle hazırlanan 1, 4, 7 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda MOX içeren çözeltilerden 100 µl kullanılmıştır. Kompleksler üzerinde yapılan antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında 100 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında zonların çok büyük olması nedeniyle ölçüm yapılamadığı için formülasyonlar ile yapılan bu çalışmada 1, 4, 7 ve 10 µg/ml konsantrasyonlar ile çalışılmıştır. Çözeltiler petrilerdeki test organizmasının (*Staphylococcus aureus*) ekili bulunduğu steril agar besi yeri ortamına çukurlar açılarak uygulanmıştır. Petriler 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve inhibisyon çapları ölçülmüştür. Çalışma iki tekrarlı olarak yürütülmüştür.

5. BULGULAR

5.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları

5.1.1. Doğrusallık

5.1.1.1. Saf su (pH 7,0) ortamındaki doğrusallık çalışmaları

Bir analitik yöntemin doğrusallığının kanıtlanabilmesi için determinasyon katsayısının 0,999'dan yüksek olması gerekmektedir (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A(R2) 2005). MOX'in saf su (pH 7,0) içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üç seri çözeltisiyle yapılan HPLC analiz sonuçları ile elde edilen determinasyon katsayısı, çalışılan konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusallığını göstermiştir. Saf su ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 5.1'de, elde edilen regresyon eğrisi Şekil 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Saf su ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar

	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
Determinasyon katsayısı (r^2)	0.997	0.999	0.9997	0.9997
Eğim	90896	99982	92028	94302
y-kesişim	-37092	-187163	-147108	-123787



Şekil 5.1. Saf su ortamındaki doğrusallık çalışmasına ait regresyon eğrisi (n=3)

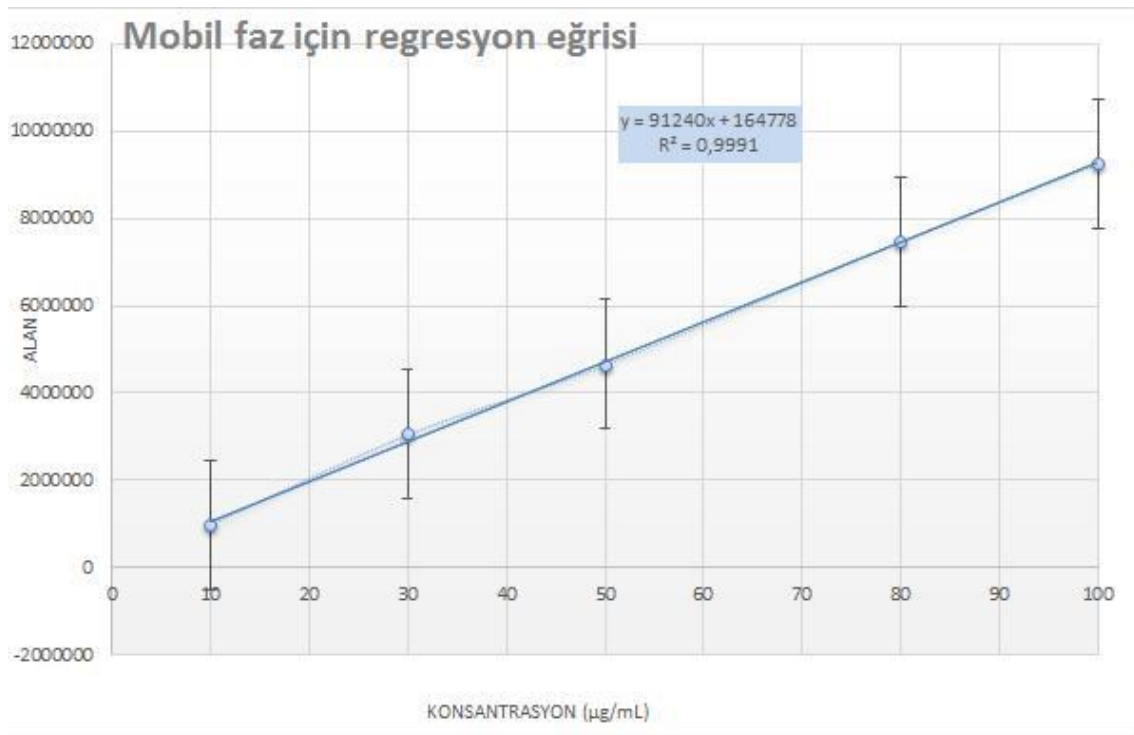
5.1.1.2. Mobil faz ortamındaki doğrusallık çalışmaları

MOX'in mobil faz içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üç seri çözeltisiyle yapılan HPLC analiz sonuçları ile elde edilen determinasyon katsayısı, çalışılan konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusallığını göstermiştir. Mobil faz

ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 5.2’de, elde edilen regresyon eğrisi Şekil 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.2. Mobil faz ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar

	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
Determinasyon katsayısı (r^2)	0.999	0.9989	0.9986	0.9991
Eğim	91055	93403	89263	91240
y-kesişim	154843	103870	235621	164778



Şekil 5.2. Mobil faz ortamındaki doğrusallık çalışmasına ait regresyon eğrisi ($n=3$)

5.1.1.3. Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamındaki doğrusallık çalışmaları

MOX'in fosfat tamponu (pH 7,4) içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üç seri çözeltisiyle yapılan HPLC analiz sonuçları ile elde edilen determinasyon katsayısı, çalışılan konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusallığını göstermiştir. Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 5.3’de, elde edilen regresyon eğrisi Şekil 5.3’de verilmiştir.

Tablo 5.3. Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında yapılan doğrusallık çalışmalarına ait sonuçlar

	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
Determinasyon katsayısı (r^2)	0.9986	0.9998	0.9993	0.9997
Eğim	91021	90411	91913	91115
y-kesişim	-529.08	18503	53400	23791



Şekil 5.3. pH 7,4 fosfat tamponundaki doğrusallık çalışmasına ait regresyon eğrisi (n=3)

5.1.2. Doğruluk

5.1.2.1. Saf su (pH 7,0) ortamındaki doğruluk çalışmaları

Saf su ortamındaki doğruluk çalışmalarında üç konsantrasyon için elde edilen ortalama yüzde geri kazanım, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri Tablo 5.4'de verilmiştir. Doğruluk için % geri kazanım değerlerinin kabul edildiği aralık $\pm\%2$ 'dir (ICH Q2/R1). Elde edilen bulgulara göre analitik yöntemin doğruluk değerlerinin uygun olduğu gösterilmiştir.

Tablo 5.4. Saf su ortamında yapılan doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	100
Ortalama % Geri Kazanım	99.50	100.67	99.62
%95 Güven Aralığı	0,125032	0.363681	1.339593
Standart Hata	0,029059	0.084525	0.311341

5.1.2.2. Mobil faz ortamındaki doğruluk çalışmaları

Mobil faz ortamındaki doğruluk çalışmalarında üç konsantrasyon için elde edilen ortalama yüzde geri kazanım, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri Tablo 5.5’de verilmiştir.

Tablo 5.5. Mobil faz ortamında yapılan doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	100
Ortalama % Geri Kazanım	98.53	101.06	101.47
%95 Güven Aralığı	0.062516	1.180162	0.718828
Standart Hata	0.014530	0.274287	0.167066

5.1.2.3. pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğruluk çalışmaları

pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğruluk çalışmalarında üç konsantrasyon için elde edilen ortalama yüzde geri kazanım, %95 güven aralığı ve standart hata değerleri Tablo 5.6’da verilmiştir.

Tablo 5.6. pH 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	100
Ortalama % Geri Kazanım	100.80	100.07	100.33
%95 Güven Aralığı	0.113837	0.770216	0.475892
Standart Hata	0.026458	0.179010	0.110604

5.1.3. Kesinlik

Kesinlik çalışmalarında, üç konsantrasyon ile üç farklı günde analizler gerçekleştirilerek, su, mobil faz, pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan çalışmalara ait standart sapma, varyasyon katsayısı ve güven aralığı değerleri Tablo 5.7-5.9’da verilmiştir. Analitik yöntemin kesinliğinin kanıtlanması için varyasyon katsayısının 2’den düşük olması istenmektedir (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A(R2) 2005).

Tekrarlanabilirlik için maksimum %3, tekrar elde edilebilirlik için maksimum %5 değeri de kabul edilmektedir (Shabir, 2003).

Doğrusallık, doğruluk ve kesinlik çalışmalarında uygun sonuçlar alınması ile, 5-100 µg/ml konsantrasyon aralığı analitik yöntemin çalışma aralığı olarak tespit edilmiştir.

5.1.4. Duyarlılık

Kullanılan analitik yöntemin, derişimdeki küçük değişimleri saptama kapasitesi ve düşük konsantrasyonları saptama yeteneğini belirlemek için, saptama sınırı (LoD) ve tayin sınırı (LoQ) değerleri her bir çalışma ortamı için eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere göre; su ortamı için LoD 2,7 µg/ml, LoQ 8,2 µg/ml, mobil faz ortamı için LoD 2,4 µg/ml, LoQ 7,3 µg/ml, pH 7,4 fosfat tamponu için LoD 1,0 µg/ml, LoQ 3,0 µg/ml'dir.

Tablo 5.7. *Saf su ortamında yapılan kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar*

1.gün			
Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	5	50	100
Ortalama	4,79	50,63	98,83
Standart Sapma	0,0491	0,3693	0,8341
Varyasyon Katsayısı	1,0262	0,7296	0,8439
%95 Güven Aralığı	0,1220	0,9175	2,0719
2.gün			
Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	5	50	100
Ortalama	6,02	53,96	106,71
Standart Sapma	0,0587	0,6987	0,6730
Varyasyon Katsayısı	0,9752	1,2948	0,6307
%95 Güven Aralığı	0,1458	1,7356	1,6718
3.gün			
Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	5	50	100
Ortalama	6,06	50,07	97,55
Standart Sapma	0,0967	0,4586	0,8971
Varyasyon Katsayısı	1,5960	0,9161	0,9196
%95 Güven Aralığı	0,2401	1,1393	2,2285

Tablo 5.8. Mobil faz ortamında yapılan keskinlik çalışmalarına ait sonuçlar

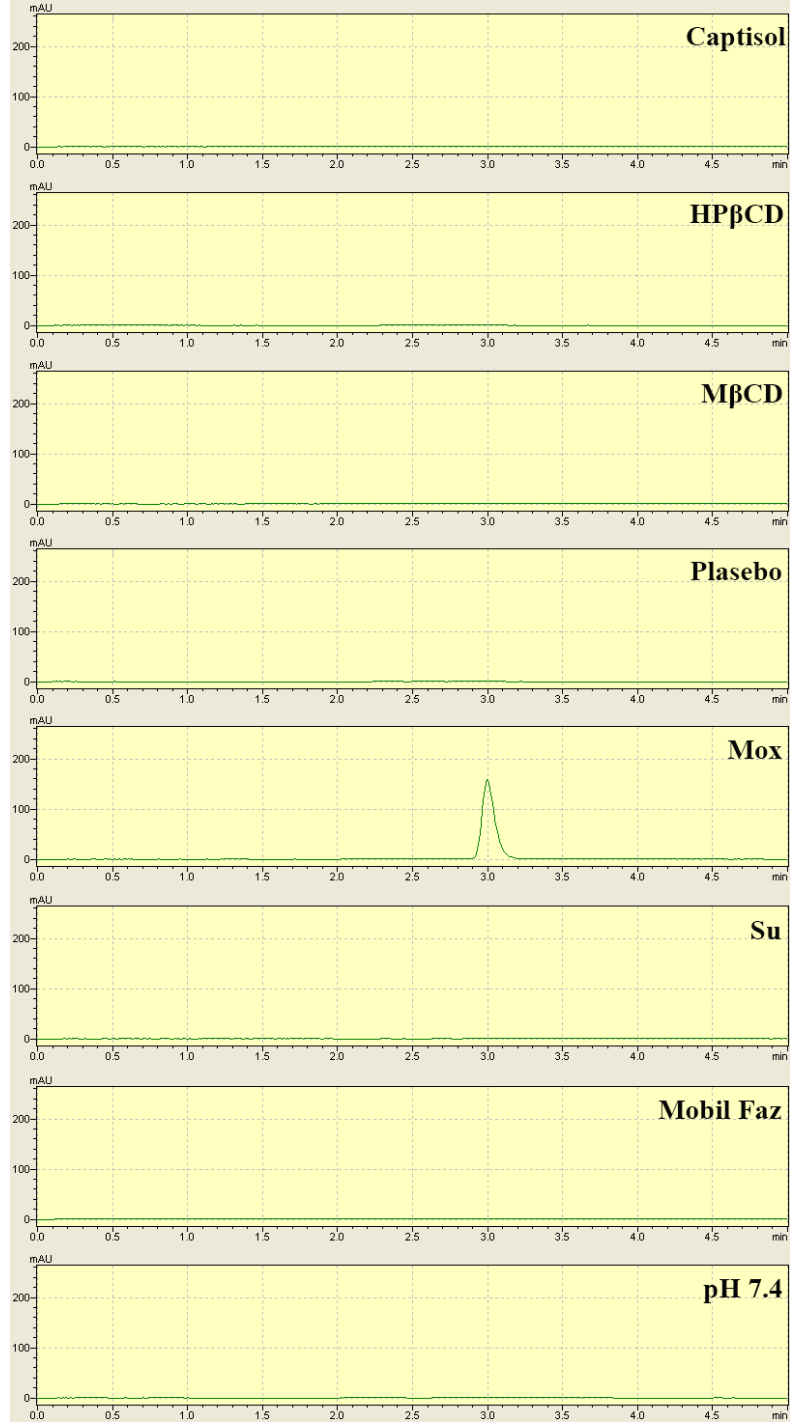
1.gün			
Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	100
Ortalama	6,82	54,49	106,05
Standart Sapma	0,0976	0,5350	0,8883
Varyasyon Katsayısı	1,4303	0,9818	0,8376
%95 Güven Aralığı	0,2425	1,3290	2,2066
2.gün			
Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	100
Ortalama	6,86	50,97	103,16
Standart Sapma	0,1195	0,7763	1,3282
Varyasyon Katsayısı	1,7419	1,5230	1,2876
%95 Güven Aralığı	0,2968	1,9284	3,2995
3.gün			
Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	100
Ortalama	7,79	55,64	105,43
Standart Sapma	0,0851	0,9220	2,1001
Varyasyon Katsayısı	1,0929	1,6571	1,9919
%95 Güven Aralığı	0,2115	2,2904	5,2169

Tablo 5.9. pH 7,4 fosfat tamponundaki kesinlik çalışmalarına ait sonuçlar

1.gün			
Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	5	50	100
Ortalama	4,79	52,05	101,12
Standart Sapma	0,0695	0,9089	0,6012
Varyasyon Katsayısı	1,4514	1,7463	0,5945
%95 Güven Aralığı	0,1728	2,2578	1,4934
2.gün			
Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	5	50	100
Ortalama	4,05	50,53	99,97
Standart Sapma	0,0706	0,9546	0,7266
Varyasyon Katsayısı	1,7430	1,8891	0,7268
%95 Güven Aralığı	0,1754	2,3713	1,8050
3.gün			
Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	5	50	100
Ortalama	4,08	49,80	101,98
Standart Sapma	0,0691	0,5094	1,5527
Varyasyon Katsayısı	1,6942	1,0229	1,5226
%95 Güven Aralığı	0,1717	1,2654	3,8571

5.1.5. Seçicilik

Mobil fazdan, analiz yapılan çözünme ortamlarından ve formülasyon bileşenlerinden kaynaklı herhangi bir pikin etkin madde piki ile girişim yapmadığını göstermek amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda mobil faz, su, pH 7,4 fosfat tamponu ve plasebo formülasyon HPLC ile analiz edilerek kromatogramları alınmıştır. Analitik yöntemin seçiciliğini gösteren kromatogramlar Şekil 5.4'de verilmiştir.



Şekil 5.4. Moksifloksasin, saf siklodekstrinler, etkin maddesiz F1915 formülasyonu ve etkin maddesiz üç çalışma ortamına ait seçicilik kromatogramları

5.1.6. Kararlılık

Etkin maddenin *in vitro* salım çalışmasının yapıldığı ortamında kararlılığı araştırılmıştır. pH 7,4 fosfat tamponu ile 100 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler, 34 °C'lik etüvde *in vitro* salımın takip edildiği süre (72 saat) bekletilmiş, belirli zaman aralıklarında HPLC ile ölçülen konsantrasyonlar ile elde edilen kararlılık

sonuçları Tablo 5.10'da verilmiştir. Sonuçlarda MOX konsantrasyonlarında azalma olmadığı görülmüştür.

Tablo 5.10. *In vitro* salım ortamındaki kararlılık sonuçları (n=3,±SS)

Zaman	Kalan moksifloksasin miktarları (%)
Başlangıç	100,00
0,5. Saat	100,02±1,65
1. saat	101,04±2,31
3. saat	100,79±3,06
6. saat	100,74±2,85
12. saat	100,92±3,31
24. saat	100,57±2,77
48. saat	100,89±1,14
72. saat	100,82±2,58

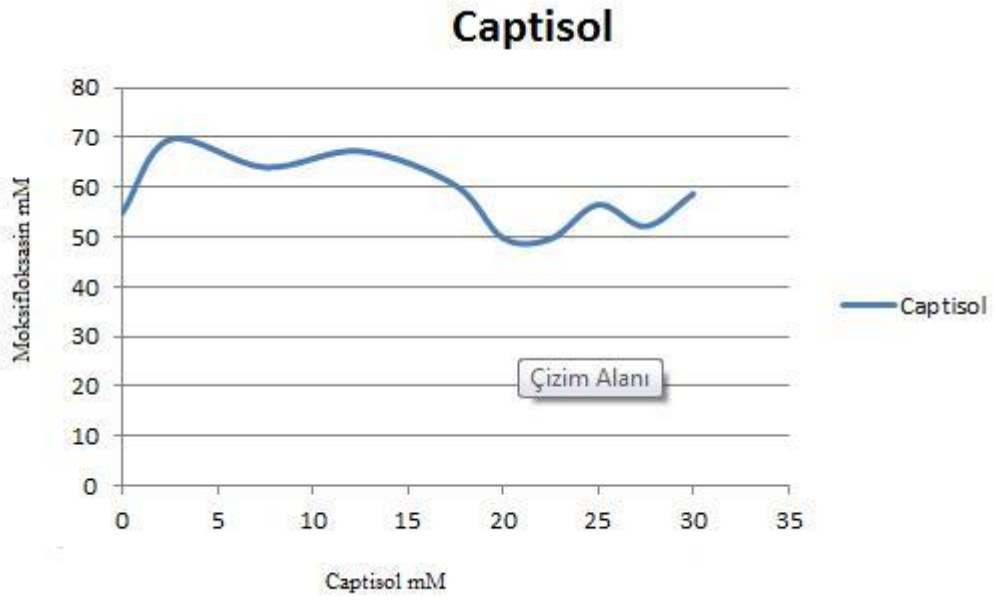
5.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Değerlendirilmesi

5.2.1. Çözünürlük faz diyagramları ve kompleksleşme oranları

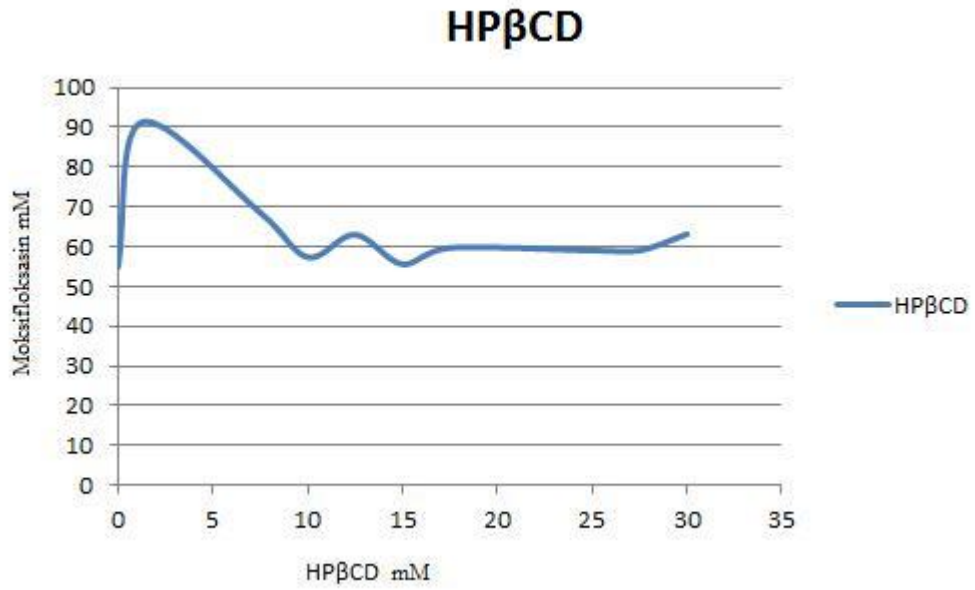
Bölüm 4.2.1.'de anlatılan şekilde yapılan denge süresi belirleme çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 5.11.'de sunulmuştur. 0-30 mM konsantrasyon aralığında siklodekstrin içeren sulu çözeltilere etkin maddenin aşırı miktarlarının ilavesi ile denge süresince çalkalama ile elde edilen çözünürlük-faz diyagramları Şekil 5.5., Şekil 5.6. ve Şekil 5.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.11. *Denge süresi belirleme çalışmalarına ait sonuçlar*

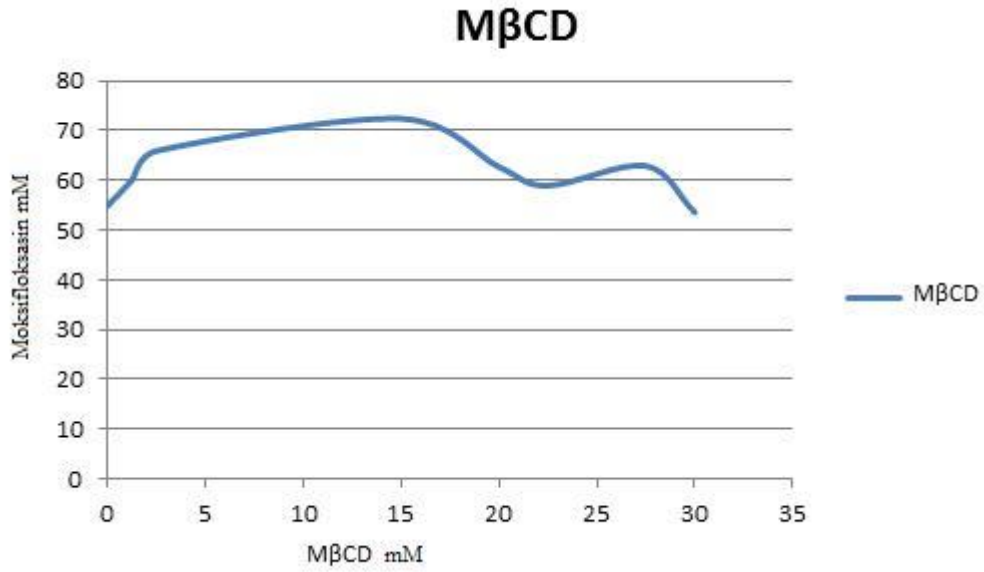
	Çözünen moksifloksasin miktarı (mg/mL)					
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün
SBEβCD	14,26	12,15	14,88	14,99	15,32	16,06
HPβCD	19,22	19,07	24,27	31,26	21,53	30,00
MβCD	14,25	14,51	21,54	23,44	25,08	23,83



Şekil 5.5. Moksifloksasin-SBE β CD çözünürlük faz diyagramı



Şekil 5.6. Moksifloksasin-HP β CD çözünürlük faz diyagramı



Şekil 5.7. Moksifloksasin-MβCD çözünürlük faz diyagramı

Üç farklı siklodekstrinin 0-30 mM konsantrasyonlarına karşı çözünen moksifloksasinin mM konsantrasyonu grafiğe geçirildiğinde elde edilen çözünürlük diyagramlarının Higuchi'nin faz çözünürlük diyagramlarından Bs tipi diyagrama uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir. Aşağıda verilen Bs tipi için geliştirilmiş denklemden yararlanılarak etkin madde ve siklodekstrinlerin hangi molar oranlarda etkin madde:siklodekstrin kompleksi oluşturacakları tespit edilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre etkin madde:siklodekstrin kompleks oluşturma oranları SBEβCD için 1:15, HPβCD için 1:11, MβCD için 1:3 olarak bulunmuştur (Higuchi ve Connors, 1965).

$$\frac{\text{Moksifloksasin içeriği}}{\text{Siklodekstrin içeriği}} = \frac{\text{Moksifloksasin çözünürlüğündeki artış}}{\text{Siklodekstrin çözünürlüğündeki artış}} \quad (5.1)$$

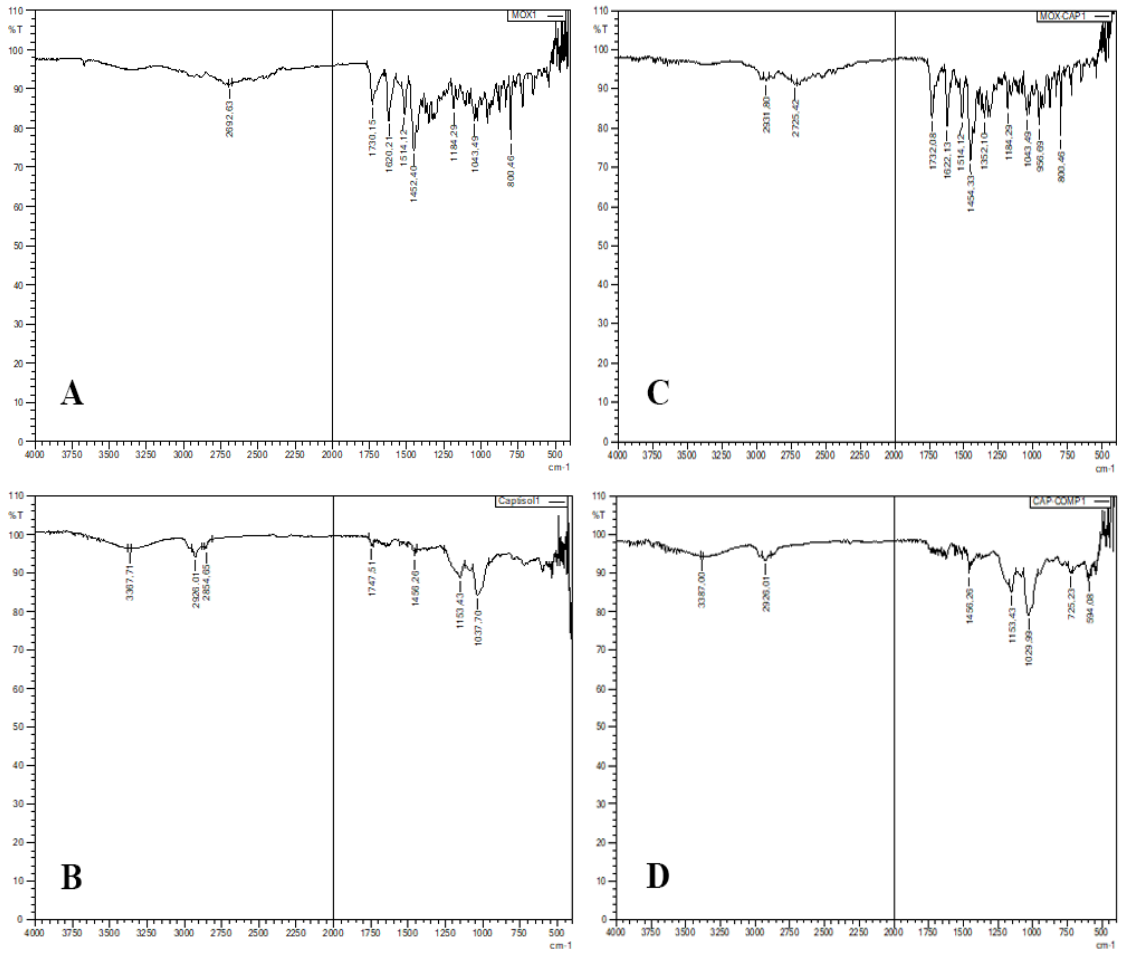
5.2.2. Siklodekstrin komplekslerinin analizi

Bölüm 4.2.2.'de anlatıldığı şekilde, hesaplanan molar oranlarda liyofilizasyon yöntemi ile hazırlanan kompleksler üzerinde FT-IR, DSC, NMR, XRD, çözünürlük, miktar tayini, çözelti kararlılığı ve antimikrobiyal etkinlik analizleri yapılmıştır. Elde edilen komplekslerin % verim değerleri, bileşime giren toplam teorik kütle miktarı ile elde edilen komplekslerin pratik kütle miktarı üzerinden hesaplanmıştır. % verim değerleri MOX:SBEβCD, MOX:HPβCD ve MOX:MβCD kompleksleri için sırasıyla

%95,18±0,04±0,02, %89,44±0,03±0,02 ve %87,14±2,81±1,62 (ortalama ± SS ± SH) olarak tespit edilmiştir

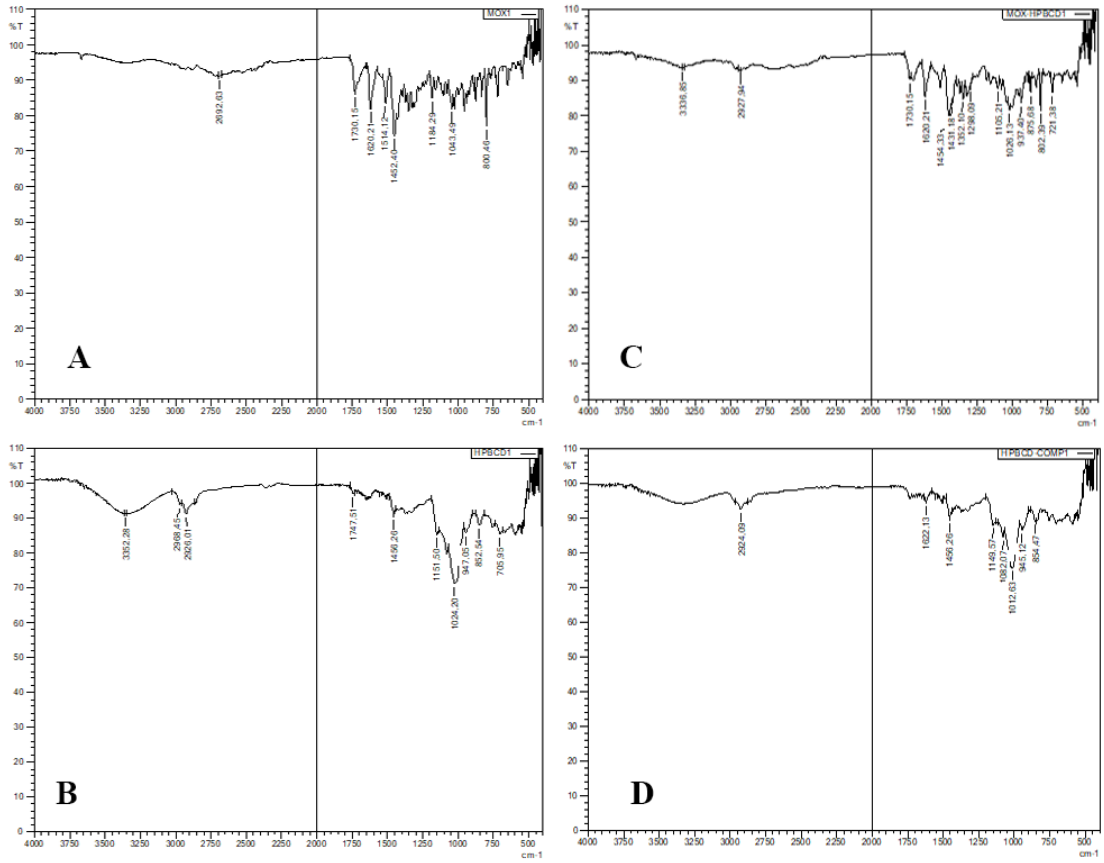
5.2.2.1. FT-IR analizi

Saf etkin madde, saf siklodekstrinler, etkin madde ile siklodekstrinlerin fiziksel karışımları ve hazırlanan komplekslerin 500-4000 cm⁻¹ arasındaki FT-IR spektrumları Şekil 5.8., Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.'da sunulmuştur.



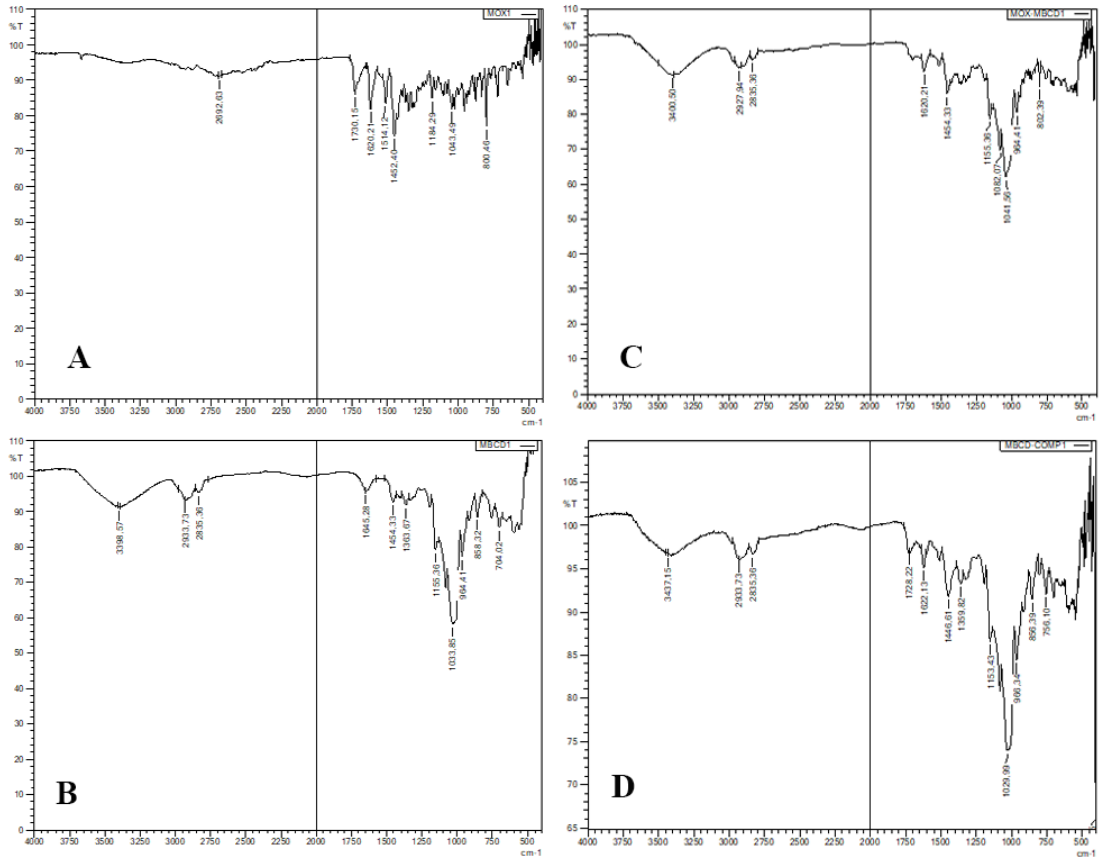
Şekil 5.8. MOX:SBEβCD kompleksi ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları

A. Saf moksifloksasin B. SBEβCD C. MOX:SBEβCD fiziksel karışımı D. MOX:SBEβCD kompleksi



Şekil 5.9. MOX:HPβCD kompleksi ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları

A. Saf moksifloksasin **B.** HPβCD **C.** MOX:HPβCD fiziksel karışımı **D.** MOX:HPβCD kompleksi

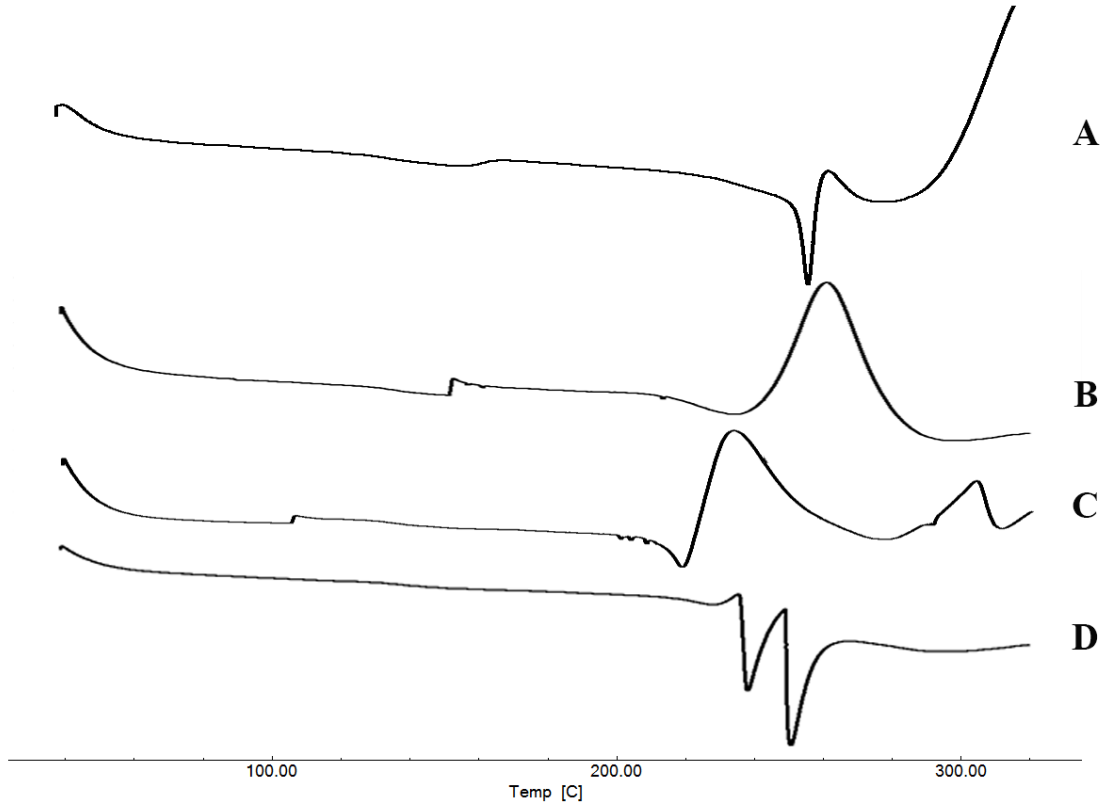


Şekil 5.10. MOX:MβCD kompleksi ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları

A. Saf moksifloksasin **B.** MβCD **C.** MOX:MβCD fiziksel karışımı **D.** MOX:MβCD kompleksi

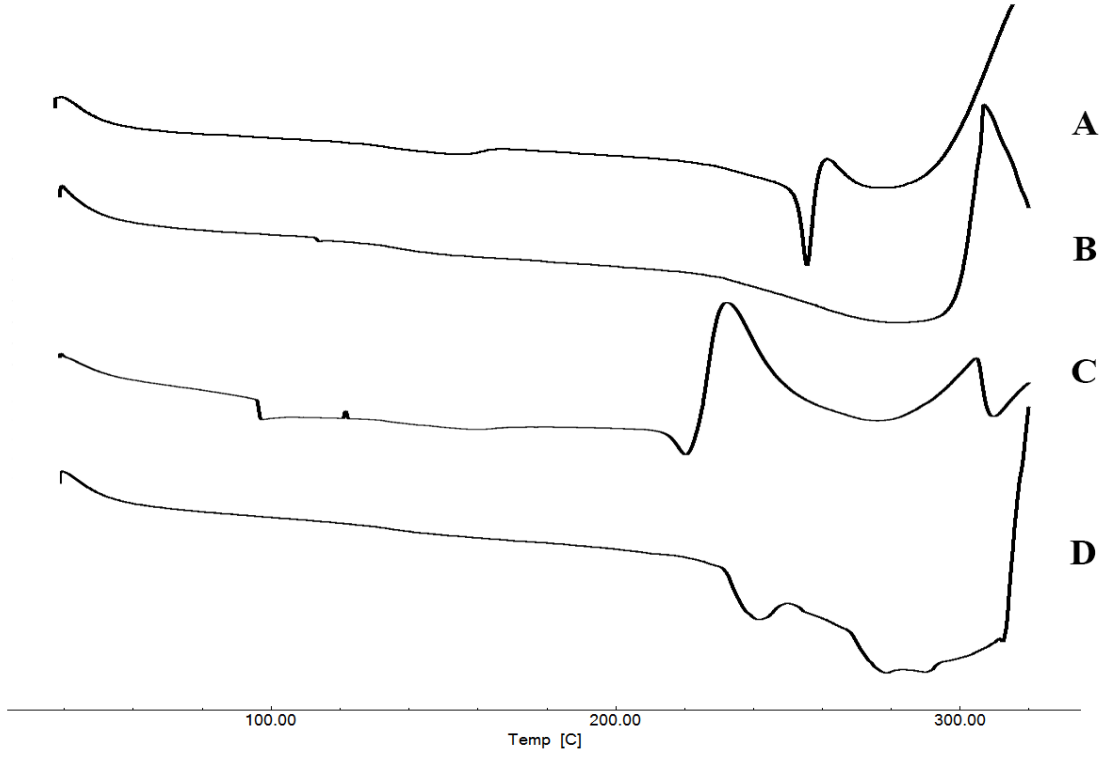
5.2.2.2. DSC analizi

Saf etkin madde, saf siklodekstrinler, etkin madde ile siklodekstrinlerin fiziksel karışımları ve hazırlanan komplekslerin 40-320 °C arasındaki DSC termogramları Şekil 5.11., Şekil 5.12. ve Şekil 5.13.'de sunulmuştur.

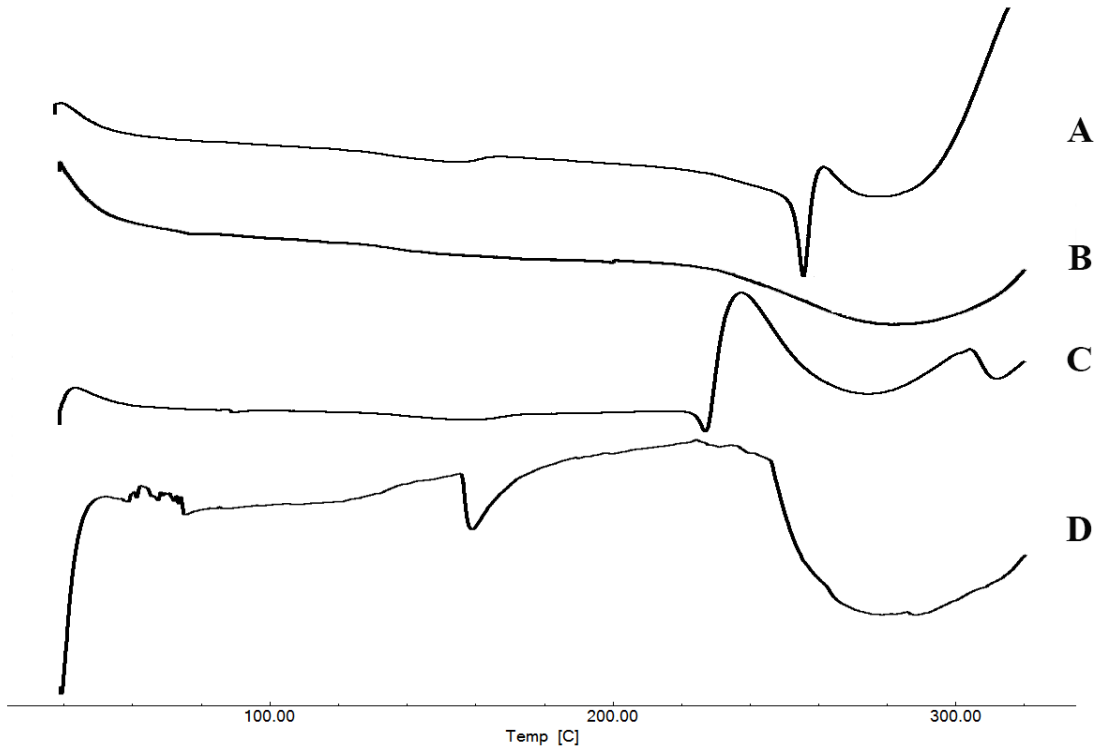


Şekil 5.11. MOX:SBE β CD kompleksi ve bileşenlerine ait DSC termogramları

A.Saf moksifloksasin B. SBE β CD C. MOX:SBE β CD fiziksel karışımı D. MOX:SBE β CD kompleksi



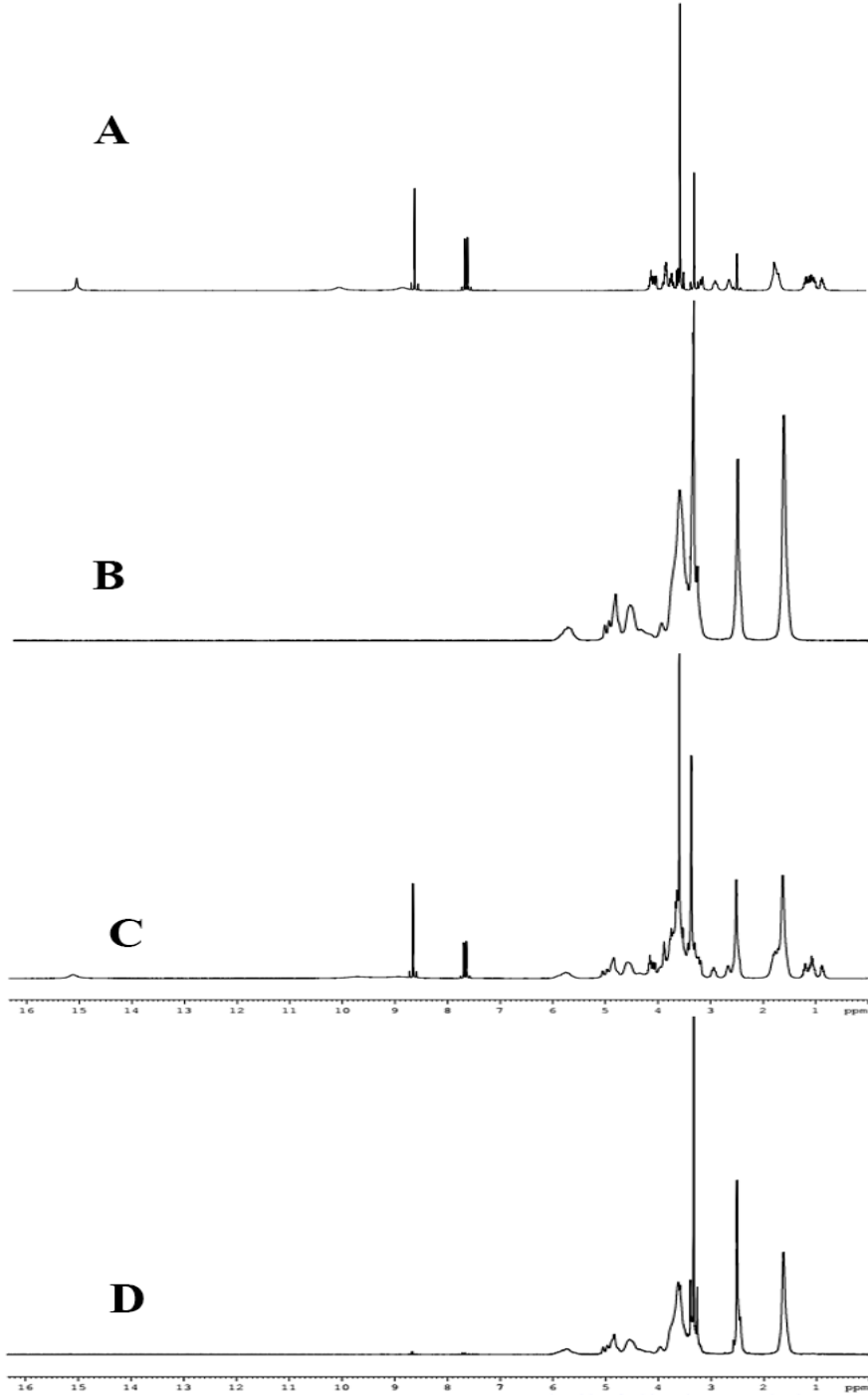
Şekil 5.12. MOX:HPβCD kompleksi ve bileşenlerine ait DSC termogramları
A.Saf moksifloksasin B. HPβCD C. MOX:HPβCD fiziksel karışımı D. MOX:HPβCD kompleksi



Şekil 5.13. MOX:MβCD kompleksi ve bileşenlerine ait DSC termogramları
A.Saf moksifloksasin B. MβCD C. MOX:MβCD fiziksel karışımı D. MOX:MβCD kompleksi

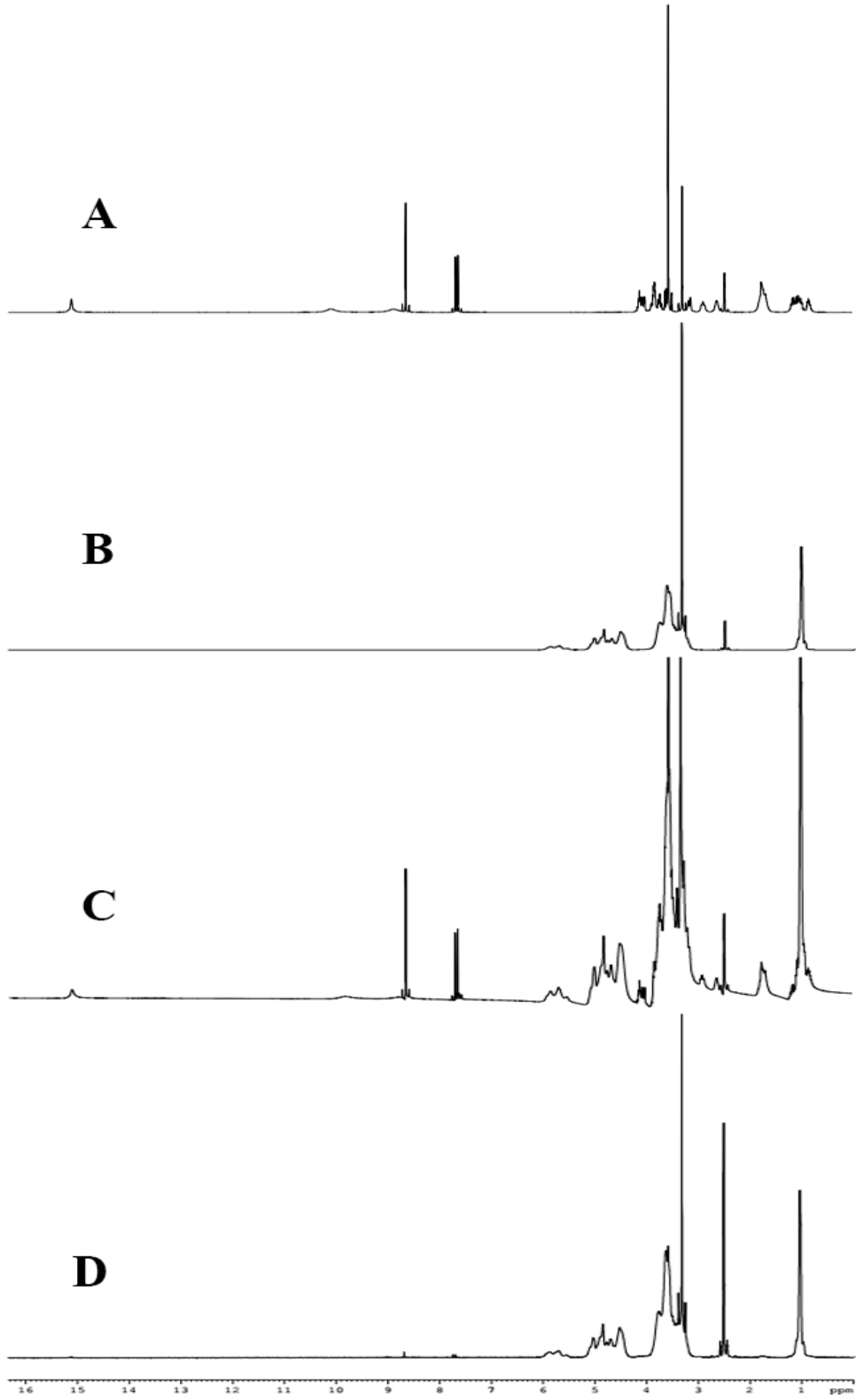
5.2.2.3. NMR analizi

Saf etkin madde, saf siklodekstrinler, etkin madde ile siklodekstrinlerin fiziksel karışımları ve hazırlanan komplekslere ait NMR spektrumları Şekil 5.14., Şekil 5.15. ve Şekil 5.16.'da sunulmuştur.

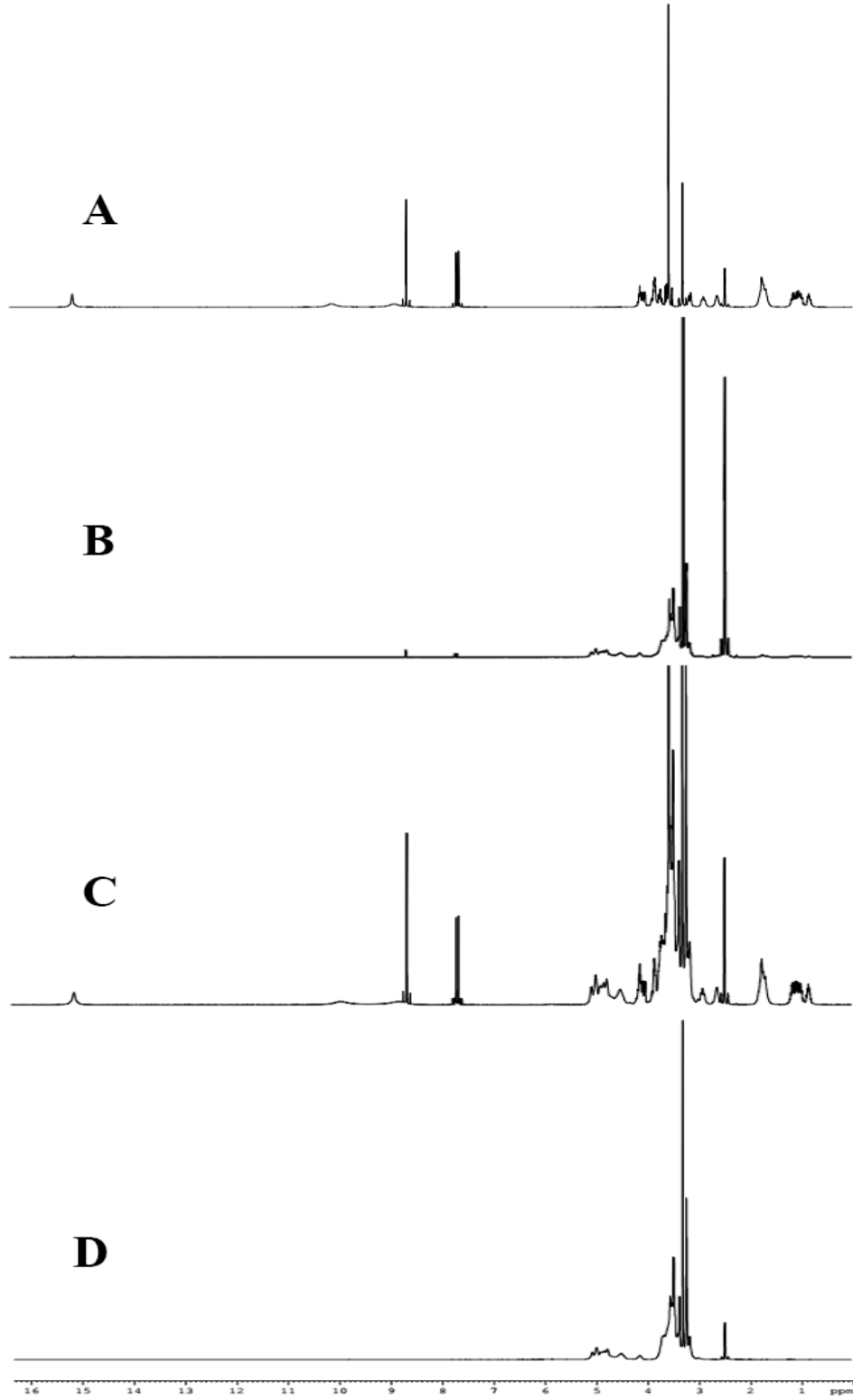


Şekil 5.14. MOX:SBE β CD kompleksi ve bileşenlerine ait NMR spektrumları

A.Saf moksifloksasin B. SBE β CD C. MOX:SBE β CD fiziksel karışımı D. MOX:SBE β CD kompleksi



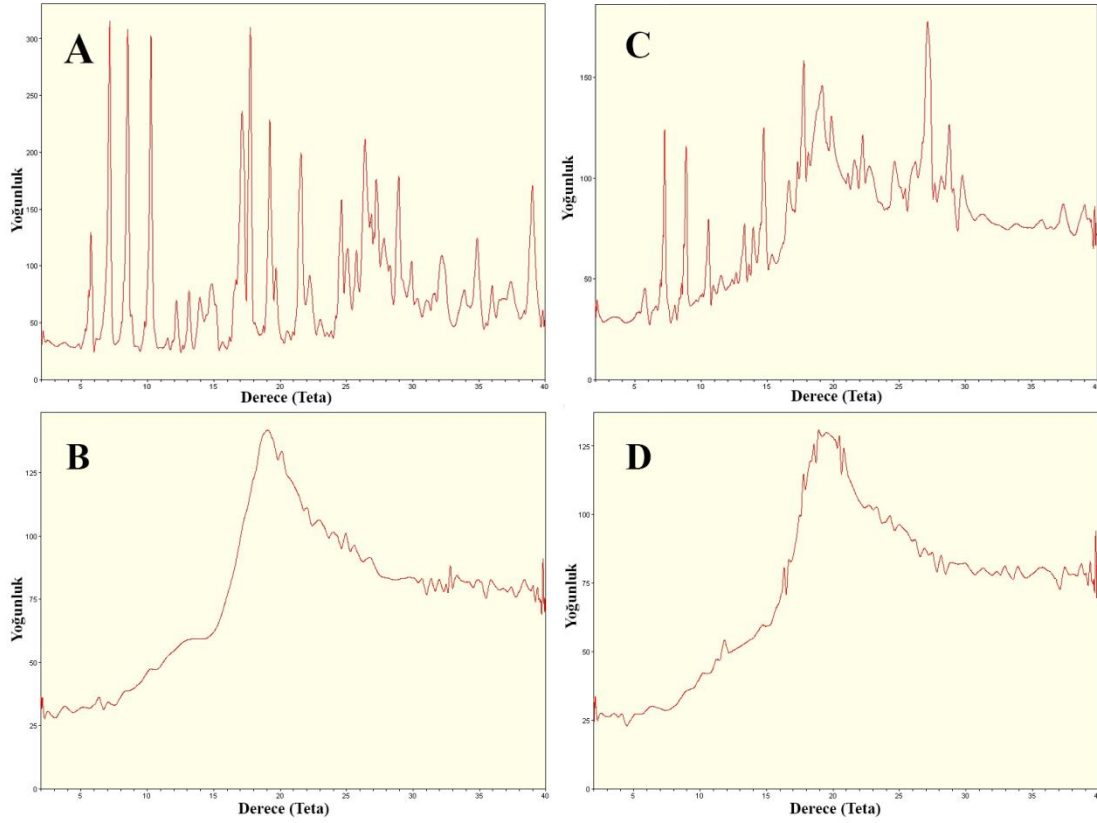
Şekil 5.15. MOX:HPβCD kompleksi ve bileşenlerine ait NMR spektrumları
A.Saf moksifloksasin B. HPβCD C. MOX:HPβCD fiziksel karışımı D. MOX:HPβCD kompleksi



Şekil 5.16. *MOX:MβCD kompleksi ve bileşenlerine ait NMR spektrumları*
A. Saf moksifloksasin B. MβCD C. MOX:MβCD fiziksel karışımı D. MOX:MβCD kompleksi

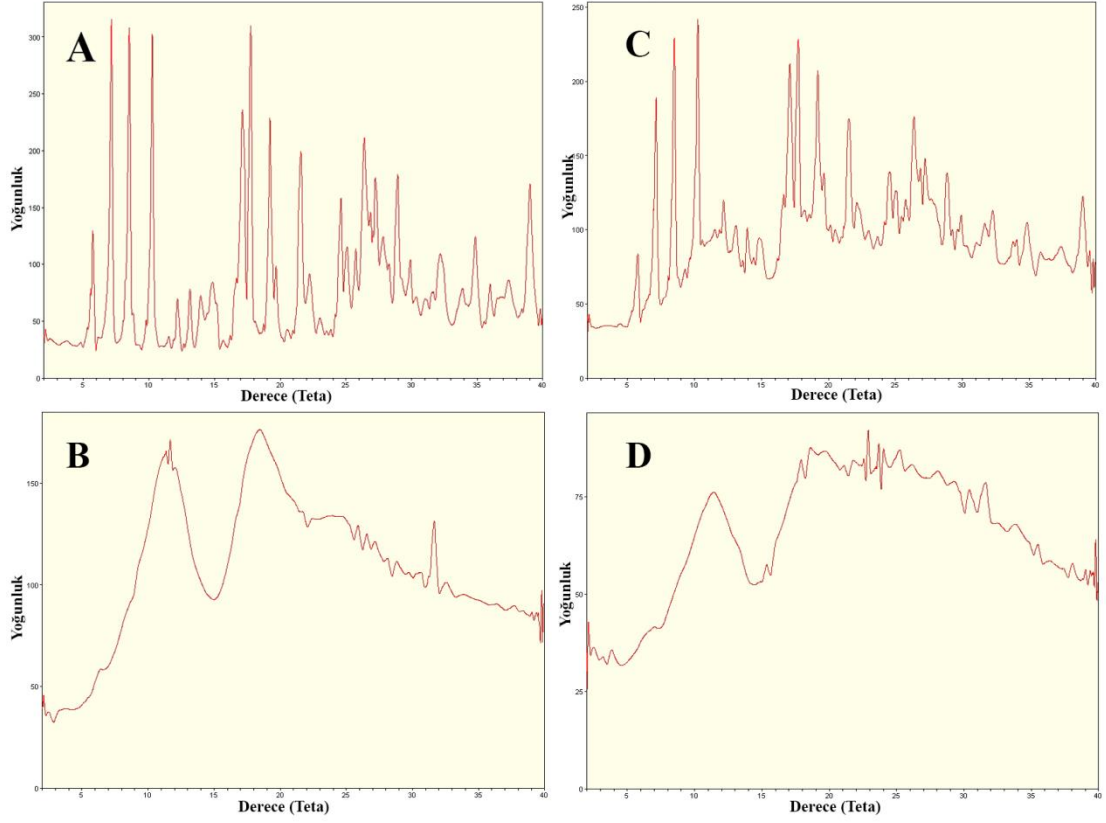
5.2.2.4. XRD analizi

Saf etkin madde, saf siklodekstrinler, etkin madde ile siklodekstrinlerin fiziksel karışımları ve hazırlanan komplekslere ait XRD profilleri Şekil 5.17., Şekil 5.18. ve Şekil 5.19.'da sunulmuştur.



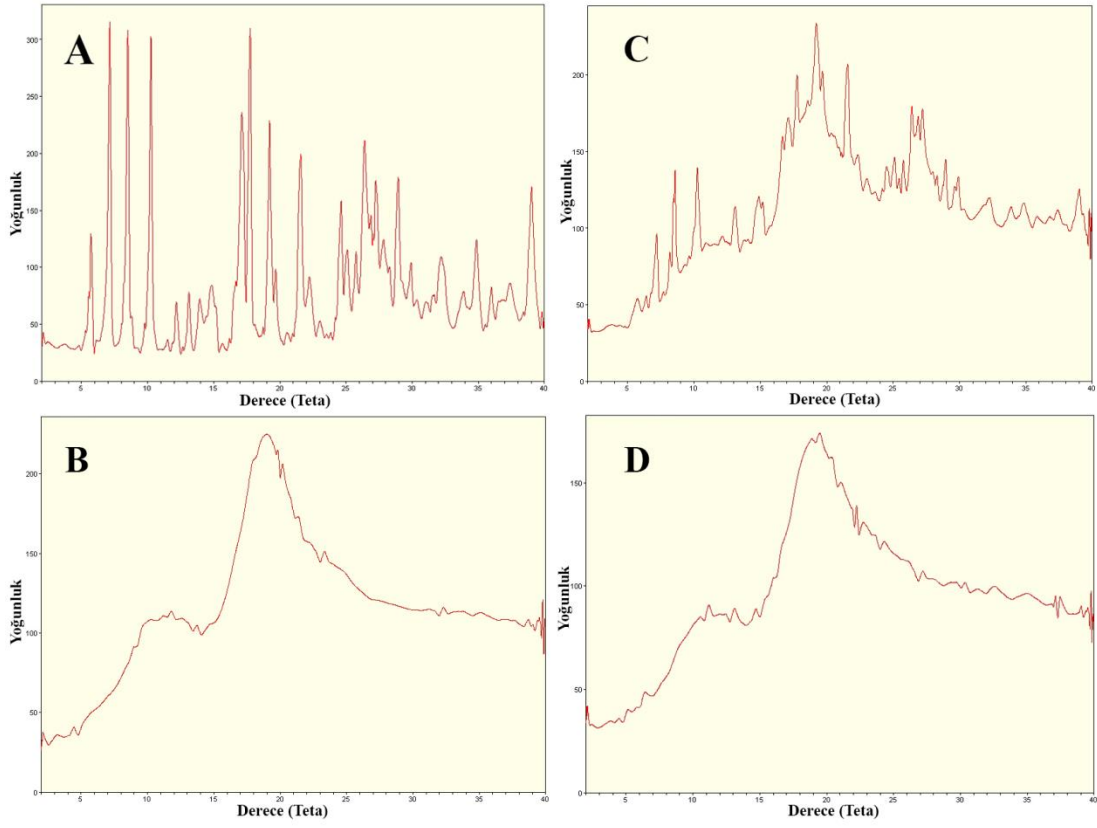
Şekil 5.17. MOX:SBEβCD kompleksi ve bileşenlerine ait XRD profilleri

A. Saf moksifloksasin B. SBEβCD C. MOX:SBEβCD fiziksel karışımı D. MOX:SBEβCD kompleksi



Şekil 5.18. *MOX:HPβCD kompleksi ve bileşenlerine ait XRD profilleri*

A. Saf moksifloksasin B. HPβCD C. MOX:HPβCD fiziksel karışımı D. MOX:HPβCD kompleksi



Şekil 5.19. *MOX:MβCD kompleksi ve bileşenlerine ait XRD profilleri*
A. Saf moksifloksasin B. MβCD C. MOX:MβCD fiziksel karışımı D. MOX:MβCD kompleksi

5.2.2.5. Etkin madde ve komplekslerin çözünürlük tayini

Moksifloksasin ve kompleksleri ile Bölüm 4.2.3.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak, pH 7,4 fosfat tamponu ortamında elde edilen çözünürlük değerleri Tablo 5.12.'de verilmiştir.

Tablo 5.12. Moksifloksasin ve komplekslerinin pH 7,4 ortamındaki çözünürlük değerleri (n=3)

Çözünen moksifloksasin miktarı (mg/ml)				
Etkin madde/Kompleks	Ortalama	± SS	± SH	±Güven Aralığı
Saf MOX	2,79	0,0794	0,0458	0,1972
MOX:SBEβCD	11,66	1,5991	0,9233	3,9725
MOX:HPβCD	12,90	0,7206	0,4161	1,7901
MOX:MβCD	15,34	1,2841	0,7414	3,1900

5.2.2.6. Komplekslerdeki etkin madde miktarı

Kompleksler üzerinde yapılan etkin madde miktar tayini çalışmalarının sonuçlarına göre, MOX:SBEβCD, MOX:HPβCD ve MOX:MβCD komplekslerinin 1 mg'ında sırasıyla $0,013 \pm 0,0006 \pm 0,0003$ mg, $0,028 \pm 0,0003 \pm 0,0002$ mg ve $0,109 \pm 0,0020 \pm 0,0012$ mg (ortalama ± SS ± SH) moksifloksasin bulunduğu tespit edilmiştir.

5.2.2.7. Etkin madde ve komplekslerin çözelti kararlılığı

Bölüm 4.2.3.7.'de anlatılan şekilde yapılan çalışmalar sonucunda, çözeltilerin pH 7,4 fosfat tamponu ortamında elde edilen kararlılık sonuçları Tablo 5.13., Tablo 5.14., Tablo 5.15. ve Tablo 5.16.'da verilmiştir.

Tablo 5.13. Moksifloksasinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları (ortalama±SH, n=3)

Zaman	Kalan moksifloksasin (%)		
	Gün ışığı	Karanlık (25 °C)	Buzdolabı (4 °C)
Başlangıç	100,00±0,64	100,00±0,64	100,00±0,64
3. Gün	98,67±0,28	99,09±0,29	98,62±0,24
6. Gün	96,37±0,79	98,48±0,64	98,54±0,26
10. Gün	95,67±0,35	98,90±0,31	98,91±0,54
15. Gün	89,41±2,77	98,45±0,83	98,22±0,09
20. Gün	87,67±2,58	94,94±0,86	96,66±1,02
30. Gün	79,12±1,00	100,18±0,45	98,55±0,27
45. Gün	77,83±2,87	98,11±0,41	97,27±1,58
60. Gün	56,08±6,92	100,70±0,25	98,33±0,87

Tablo 5.14. MOX:SBEβCD kompleksinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları (ortalama±SH, n=3)

Zaman	Kalan moksifloksasin (%)		
	Gün ışığı	Karanlık (25 °C)	Buzdolabı (4 °C)
Başlangıç	100,00±0,05	100,00±0,05	100,00±0,05
3. Gün	99,61±0,28	99,50±0,24	99,43±0,37
6. Gün	98,38±0,11	99,28±0,30	98,90±0,06
10. Gün	97,84±0,10	99,27±0,50	99,35±0,31
15. Gün	95,60±1,41	99,84±0,15	98,92±0,25
20. Gün	88,22±2,16	99,23±0,17	98,73±0,36
30. Gün	88,90±2,56	100,11±0,13	99,52±0,60
45. Gün	85,86±2,70	98,91±1,52	100,35±8,84
60. Gün	69,03±4,95	100,79±0,09	99,34±0,38

Tablo 5.15. *MOX:HP β CD* kompleksinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları (ortalama \pm SH, n=3)

Zaman	Kalan moksifloksasin (%)		
	Gün ışığı	Karanlık (25 °C)	Buzdolabı (4 °C)
Başlangıç	100,00 \pm 0,05	100,00 \pm 0,05	100,00 \pm 0,05
3. Gün	98,96 \pm 0,28	99,20 \pm 0,05	99,33 \pm 0,12
6. Gün	98,10 \pm 0,11	99,24 \pm 0,06	99,29 \pm 0,10
10. Gün	95,94 \pm 0,44	99,10 \pm 0,21	99,35 \pm 0,10
15. Gün	90,59 \pm 2,36	99,87 \pm 0,50	97,89 \pm 0,68
20. Gün	86,95 \pm 1,39	96,47 \pm 1,43	98,069 \pm 0,47
30. Gün	85,23 \pm 3,05	100,01 \pm 1,00	99,04 \pm 0,45
45. Gün	77,87 \pm 3,40	99,09 \pm 0,24	98,31 \pm 0,15
60. Gün	58,03 \pm 5,72	100,55 \pm 0,05	99,28 \pm 0,41

Tablo 5.16. *MOX:M β CD* kompleksinin farklı ortamlardaki kararlılık sonuçları (ortalama \pm SH, n=3)

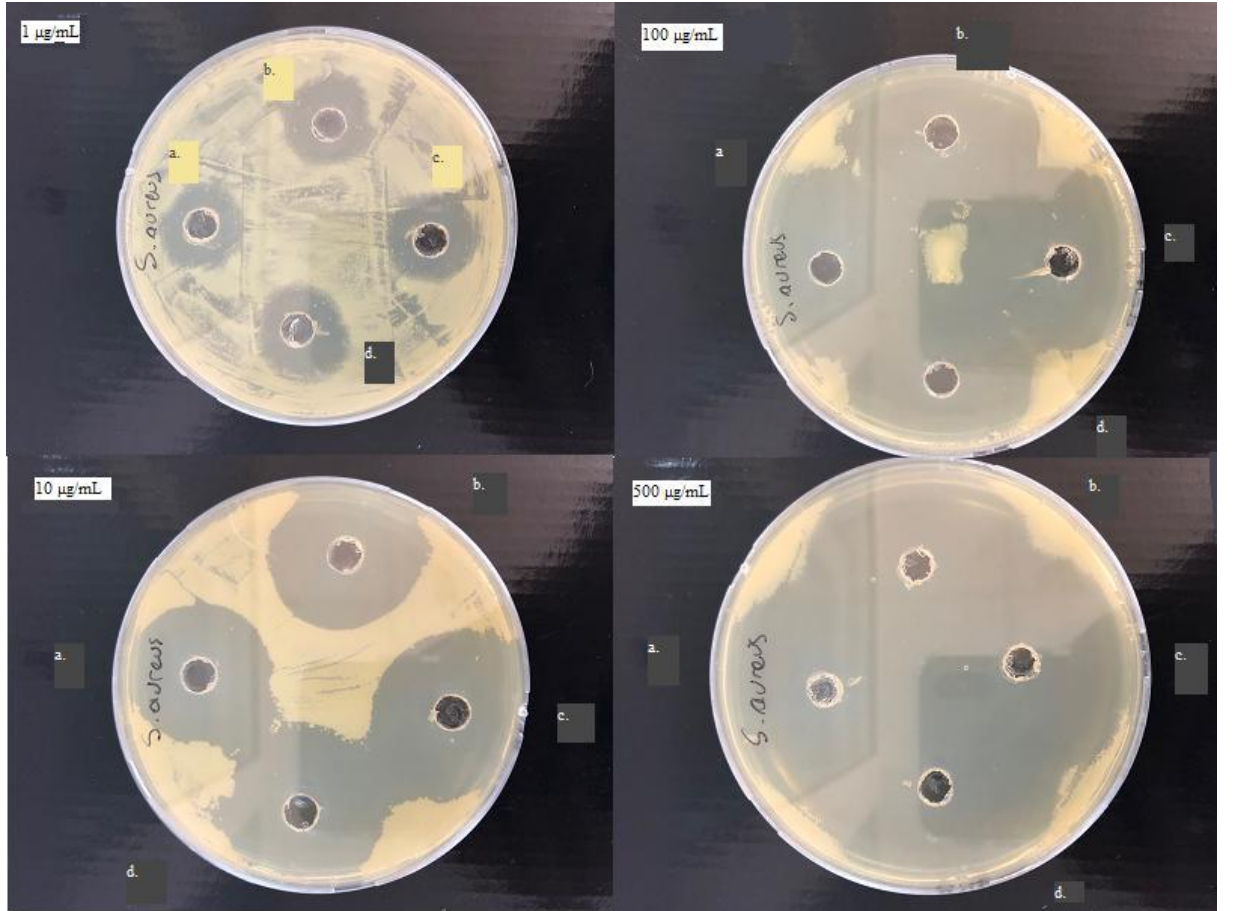
Zaman	Kalan moksifloksasin (%)		
	Gün ışığı	Karanlık (25 °C)	Buzdolabı (4 °C)
Başlangıç	100,00 \pm 0,61	100,00 \pm 0,61	100,00 \pm 0,61
3. Gün	99,92 \pm 0,40	101,37 \pm 0,14	103,31 \pm 0,99
6. Gün	98,72 \pm 0,28	101,46 \pm 0,07	103,68 \pm 0,97
10. Gün	95,94 \pm 0,21	101,23 \pm 0,07	103,48 \pm 1,06
15. Gün	88,08 \pm 0,65	101,32 \pm 0,27	101,84 \pm 1,12
20. Gün	86,47 \pm 0,36	100,32 \pm 0,20	101,99 \pm 0,97
30. Gün	83,72 \pm 1,95	101,63 \pm 0,42	103,25 \pm 0,78
45. Gün	77,32 \pm 2,87	100,58 \pm 0,41	104,54 \pm 1,88
60. Gün	52,53 \pm 4,31	102,58 \pm 0,40	104,00 \pm 0,82

5.2.2.8. Antimikrobiyal etkinlik testi

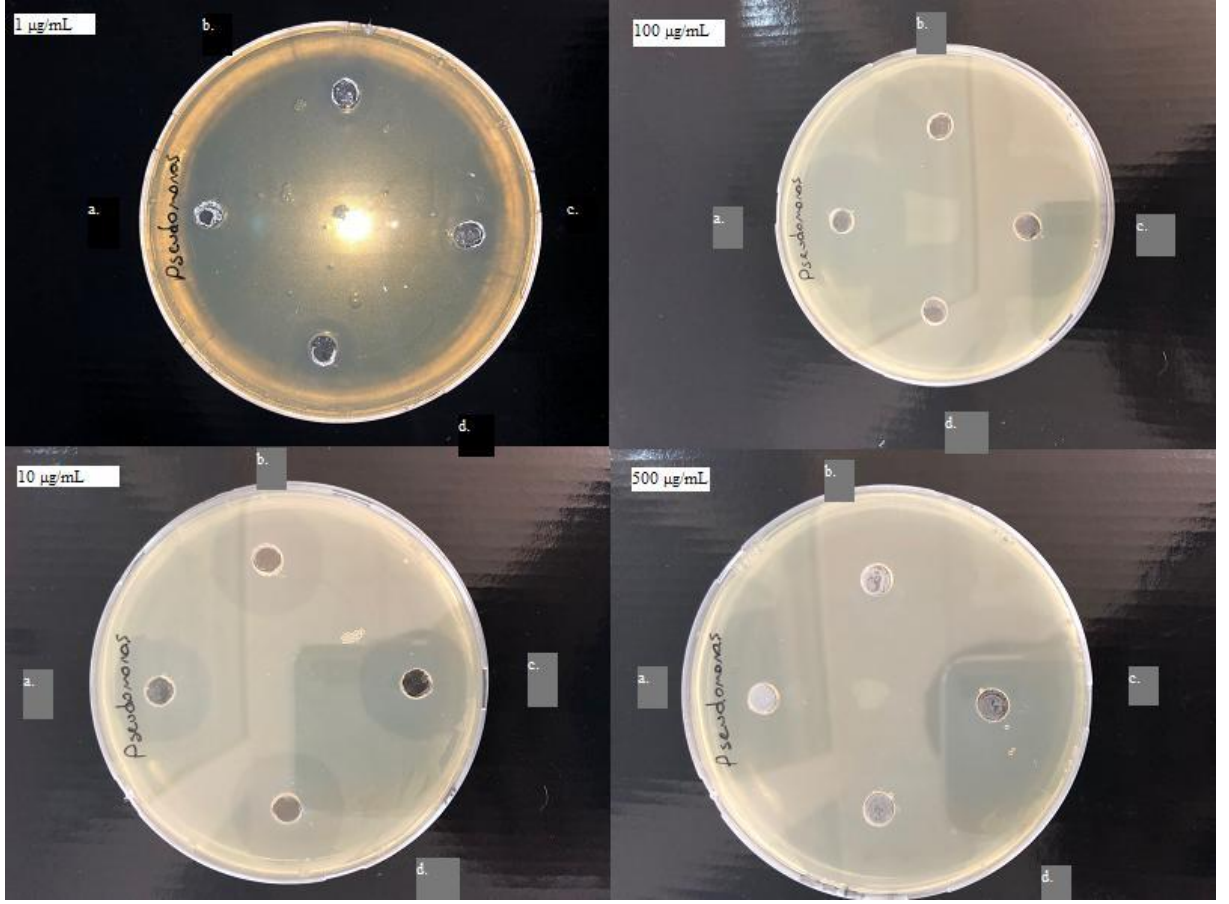
Bölüm 4.2.3.8.'de anlatıldığı şekilde yapılan antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları Tablo 5.17.'de ve Görsel 5.1., Görsel 5.2.'de verilmiştir.

Tablo 5.17. Etkin madde ve komplekslerin antimikrobiyal testlerine ait zon çapları

<i>Staphylococcus aureus</i>	C	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml
	MOX		20 mm	33 mm	Zonlar çok büyük olduğundan ölçülemedi.
MOX-SBEβCD		20 mm	31 mm		
MOX-HPβCD		21 mm	33 mm		
MOX-MβCD		20 mm	36 mm		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MOX	13 mm	24 mm	37 mm	Zonlar çok büyük olduğundan ölçülemedi.
	MOX-SBEβCD	12 mm	24 mm	37 mm	
	MOX-HPβCD	14 mm	25 mm	36 mm	
	MOX-MβCD	13.5 mm	24 mm	36 mm	



Görsel 5.1. Etkin madde ve siklodekstrin komplekslerinin *S. Aureus* üzerindeki zon görünümüleri
a.MOX:SBEβCD, b.MOX:HPβCD, c.MOX:MβCD, d.MOX



Görsel 5.2. Etkin madde ve siklodekstrin komplekslerinin *P. aeruginosa* üzerindeki zon görünüşleri
a.MOX:SBEβCD, b.MOX:HPβCD, c.MOX:MβCD, d.MOX

5.3. *In Situ* Jel Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

5.3.1. Formülasyon geliştirme çalışması

Formülasyon geliştirme çalışmalarında öncelikle PF127 ve HPMC'yi farklı oranlarda içeren ve kompleks içermeyen 18 tane in situ jelleşen formülasyon hazırlanmıştır. Daha sonra bu formülasyonlar içerisinde, uygun jelleşme sıcaklığına sahip ve polimer içeriği düşük olan 9 formülasyon seçilmiş ve bu formülasyonlara %0,5 a/h oranında MOX ilavesi için hesaplanan miktarda MOX:CD kompleksi ilave edilmiştir.

5.3.1.1. Kompleks içermeyen formülasyonların jelleşme sıcaklığı

Kompleks içermeyen formülasyonlar 10 °C'den 50 °C'ye kontrollü olarak ısıtılarak her bir formülasyonun jelleşme sıcaklığı ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Tablo 5.18.'de verilmiştir.

Tablo 5.18. *Kompleks içermeyen formülasyonların jelleşme sıcaklıkları*

Formülasyon	Jelleşme Sıcaklığı (°C)
F1805	27,6
F181	25,7
F1815	25,3
F1905	Jelleşme görülmedi.
F191	35,8
F1915	32,7
F2005	24,4
F201	23,0
F2015	22,6
F2105	25,0
F211	24,6
F2115	24,9
F2305	25,1
F231	24,3
F2315	23,5
F2505	23,4
F251	21,9
F2515	21,5

5.3.1.2. Kompleks içeren formülasyonların jelleşme sıcaklığı

Kompleks içermeyen formülasyonlardan uygun jelleşme sıcaklığına ve daha düşük polimer içeriğine sahip olan formülasyonlara (F1805, F181, F1815, F191, F1915, F2005, F201, F2105 ve F211) etkin madde içeren üç farklı siklodekstrin kompleksi eklenerek formülasyonlar hazırlanmış ve jelleşme sıcaklıkları tespit edilmiştir. Kompleksler ile hazırlanmış olan %0,5 a/h oranında MOX içeren bu formülasyonlara ait jelleşme sıcaklıkları Tablo 5.19.'da verilmiştir.

Tablo 5.19. Kompleks içeren formülasyonların jelleşme sıcaklığı

Formülasyon	Jelleşme Sıcaklığı (°C)		
	MOX:SBE β CD	MOX:HP β CD	MOX:M β CD
F1805	Jelleşme yok	Jelleşme yok	35,0
F181	Jelleşme yok	Jelleşme yok	30,2
F1815	Jelleşme yok	Jelleşme yok	28,1
F191	Jelleşme yok	Jelleşme yok	Jelleşme yok
F1915	Jelleşme yok	Jelleşme yok	32,5
F2005	Jelleşme yok	Jelleşme yok	Jelleşme yok
F201	Jelleşme yok	Jelleşme yok	Jelleşme yok
F2105	Jelleşme yok	Jelleşme yok	41,5
F211	Jelleşme yok	27,4	Jelleşme yok

5.3.2. Formülasyon seçimi

Kompleks içeren formülasyonlara ait jelleşme sıcaklığına ait sonuçlar incelendiğinde, MOX:SBE β CD kompleksi ile hazırlanan formülasyonlarda jelleşme gözlenmediği, MOX:HP β CD kompleksi ile hazırlanan formülasyonlardan sadece F211 formülasyonunda jelleşme gözlendiği, MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanan formülasyonlardan 5 tanesinde jelleşme olduğu, 4 tanesinde jelleşme olmadığı tespit edilmiştir. MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanan jelleşme gösteren formülasyonlardan jelleşme sıcaklığı 32 °C'ye en yakın olan formülasyonlar (F181, F1815, F1915) *in vitro* salım, kararlılık ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları için seçilmiştir.

In vitro salım, kararlılık ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları için seçilen MOX:M β CD kompleksi içeren F181-M β CD, F1815-M β CD, F1915-M β CD kodlu formülasyonlara ait formülasyon bileşen ve oranları Tablo 5.20.'de verilmiştir.

Tablo 5.20. MOX:MβCD kompleksi içeren formülasyonların bileşimi (% a/h)

Formül	MOX	PF127	HPMC	NaCl	BK	Distile su
F181-MβCD	0,5	18	1	0,9	0,01	y.m.100
F1815-MβCD	0,5	18	1,5	0,9	0,01	y.m.100
F1915-MβCD	0,5	19	1,5	0,9	0,01	y.m.100

5.3.3.MOX:MβCD kompleksi içeren *in situ* jel formülasyonlarının değerlendirilmesi

5.3.3.1. pH ölçümü

Gözün tolere edebileceği pH değerleri pH 4-8 aralığındadır (Baranowski vd., 2014). Çalışmaya konu olan moksifloksasinin oftalmik piyasa preparatı olan Vigamox® 6,8 pH değerine sahiptir (Schlech ve Alfonso, 2005). MOX:MβCD kompleksi ile hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığındaki pH değerleri ~5,5'dir. Formülasyonların gözde daha rahat tolere edilebilmeleri için 0,1 N NaOH kullanılarak formülasyon pH'ları ~6,5'e ayarlanmıştır. 0,1 N NaOH ile pH'nın 6,5'e ayarlanmasından sonra formülasyonların jelleşme sıcaklıkları tekrar ölçülmüştür. Formülasyonların pH ayarlamasından önce ve sonraki jelleşme sıcaklıkları Tablo 5.21'de verilmiştir.

Tablo 5.21. MOX:MβCD kompleksi içeren *in situ* formülasyonların pH ve jelleşme sıcaklıkları (n=3)

Formül	pH ayarlamadan önce		pH ayarlamadan sonra	
	pH±SH	Jelleşme sıcaklığı (°C)	pH±SH	Jelleşme sıcaklığı (°C) ±SH
F181-MβCD	5,27±0,0033	30,2	6,51±0,0000	32,8±0,1453
F1815-MβCD	5,35±0,0033	28,2	6,43±0,0030	28,4±0,0667
F1915-MβCD	5,31±0,0033	32,5	6,34±0,0000	35,1±0,1155

5.3.3.2. Fiziksel görünüş, jelleşme kapasitesi ve miktar tayini ölçümleri

In vitro salım, kararlılık ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları için seçilen MOX:MβCD kompleksi içeren MKF181, MKF1815, MKF1915 kodlu formülasyonların fiziksel görünüşleri, jelleşme kapasiteleri incelenmiş ve HPLC ile etkin madde miktar tayinleri yapılmıştır. Formülasyonların fiziksel görünüşlerinin

incelenmesi siyah ve beyaz arka fonda görsel olarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların fiziksel görünüş, jelleşme kapasiteleri ve miktar tayini sonuçları Tablo 5.22’de verilmiştir.

Tablo 5.22. MOX:M β CD kompleksi içeren *in situ* jelleşen formülasyonların, fiziksel görünüş, jelleşme kapasitesi ve miktar tayini ölçümleri

Formülasyon	Fiziksel görünüş	Jelleşme kapasitesi	Miktar tayini * (mg) \pm SH (n=3)
F181-M β CD	Berrak, homojen	++	4,69 \pm 0,0184
F1815-M β CD	Berrak, homojen	++	4,94 \pm 0,211
F1915-M β CD	Berrak, homojen	++	4,65 \pm 0,002

++ Jelleşme hemen oluştu ve birkaç saat sürdü, * 1 ml formül içerisindeki MOX miktarı

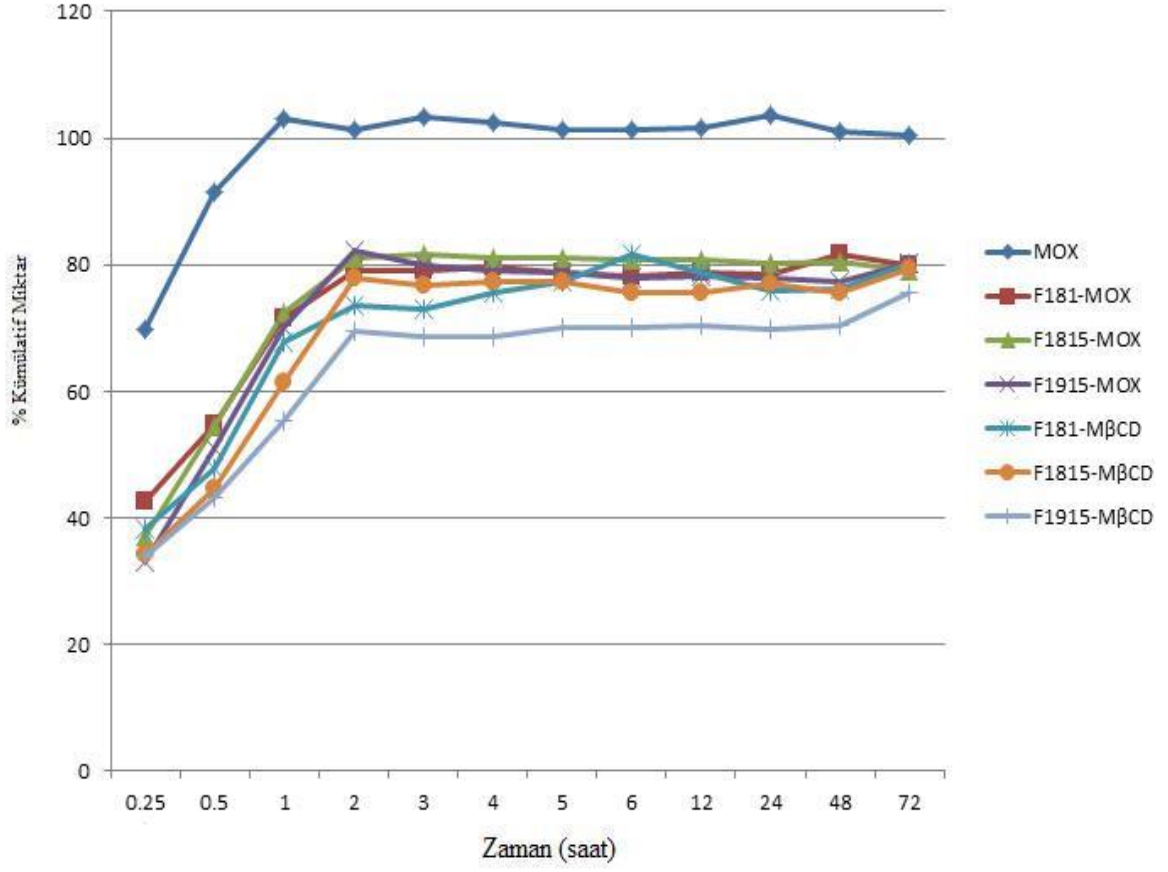
5.3.4. *In vitro* salım çalışmaları ve salım kinetiği

2,5 mg MOX içeren miktarlarda, saf etkin madde, saf etkin madde ile hazırlanmış formülasyonlar ve MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanmış formülasyonlar ile Bölüm 4.3.4.’de anlatıldığı şekilde yapılan *in vitro* salım çalışmalarına ait salım profili Şekil 5.20.’de verilmiştir.

In vitro salım çalışmalarından elde edilen verilerin farklı kinetik modellere (Sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik, Higuchi, Korsmeyer-Peppas) DDSolver programı ile uygulanması ile elde edilen hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2) Akaike bilgi kriteri (AIC) ve Model seçme kriteri (MSC) Tablo 5.23’te sunulmuştur. Salım profillerinin hangi salım kinetiği modeline uyum gösterdiğinin değerlendirilmesinde, en yüksek k, r^2 , MSC kriteri ile en düşük AIC değeri baz alınmaktadır (Zuo vd., 2014).

k, r^2 , MSC ve AIC değerlendirmelerine göre saf etkin maddenin salım kinetiği birinci derece kinetiğe, saf etkin madde ve kompleksler ile hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarının salım kinetiği Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum göstermiştir.

Şekil 5.20. pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki in vitro salım profilleri



Tablo 5.23. *İn vitro* salım kinetiğinin değerlendirilmesine ait sonuçlar (k_0 : Sıfırıncı derece salım hız sabiti, k_1 : Birinci derece salım hız sabiti, k_H : Higuchi salım hız sabiti, k_{KP} : Korsmeyers-Peppas salım hız sabiti, n : difüzyon sabiti, r^2 : determinasyon katsayısı, AIC: Akaike bilgi kriteri, MSC: Model seçme kriteri)

Kinetik Model	Kriter	MOX	F181-MOX	F1815-MOX	F1915-MOX	F181-MβCD	F1815-MβCD	F1915-MβCD
Zero order	k_0	69,51	50,42	51,00	50,54	46,70	42,28	18,03
	r^2	-11,14	-2,32	-1,06	-0,31	-0,29	-0,99	-3,69
	AIC	38,20	33,59	33,04	32,04	31,04	31,04	73,67
	MSC	-3,00	-1,70	-1,22	-0,77	-0,76	-1,19	-1,79
First Order	k_1	4,90	1,39	1,45	1,45	1,23	1,01	0,52
	r^2	0,97	0,48	0,78	0,86	0,69	0,29	-0,66
	AIC	13,57	26,21	24,16	23,14	25,29	26,92	65,36
	MSC	3,16	0,14	0,99	1,45	0,68	-0,16	-0,76
Higuchi	k_H	92,34	64,93	65,10	63,79	58,74	53,67	40,24
	r^2	-2,16	0,52	0,76	0,90	0,94	0,83	-0,34
	AIC	32,81	25,82	24,40	21,77	18,87	21,14	63,67
	MSC	-1,65	0,24	0,94	1,80	2,28	1,29	-0,54
Korsmeyer-Peppas	k_{KP}	119,70	67,05	66,95	65,11	59,78	54,95	57,41
	r^2	-3,73	0,96	0,93	0,95	1,00	1,00	0,87
	AIC	36,43	18,25	21,53	21,26	9,57	-2,94	46,73
	MSC	-2,55	2,14	1,65	1,92	4,61	7,31	1,57
	n	0,39	0,31	0,38	0,44	0,40	0,35	0,22

5.3.5. Formülasyonların kararlılık çalışmaları

3 ay boyunca 25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabı ortamlarında tutulan MβCD kompleksleri ile hazırlanmış formülasyonlar üzerinde belirlenen zaman aralıklarında fiziksel görünüş, etkin madde miktar tayini, pH ölçümleri ve reolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Siyah ve beyaz arka fonda görsel olarak incelenen formülasyonlar berrak ve homojen görünümünü kararlılık çalışması süresince korumuşlardır.

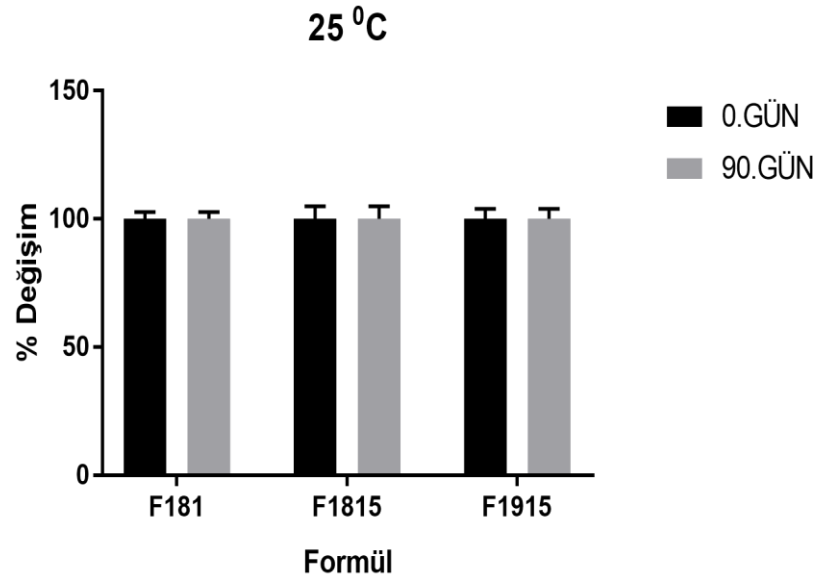
Kararlılık çalışmalarından elde edilen etkin madde miktar tayini sonuçları Tablo 5.24'te, pH ölçümlerine ait sonuçlar ise Tablo 5.25'te verilmiştir. Kararlılık çalışmalarına ait sonuçların GrapPad programı ile Two Way Anova istatistiksel değerlendirme sonuçları Şekil 5.21-5.24'de verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde formülasyonlarının etkin madde miktarları ile pH değerlerinin başlangıç ve 3. ay değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 5.24. Kararlılık çalışmalarına ait etkin madde miktarları (ortalama \pm SH, n=3)

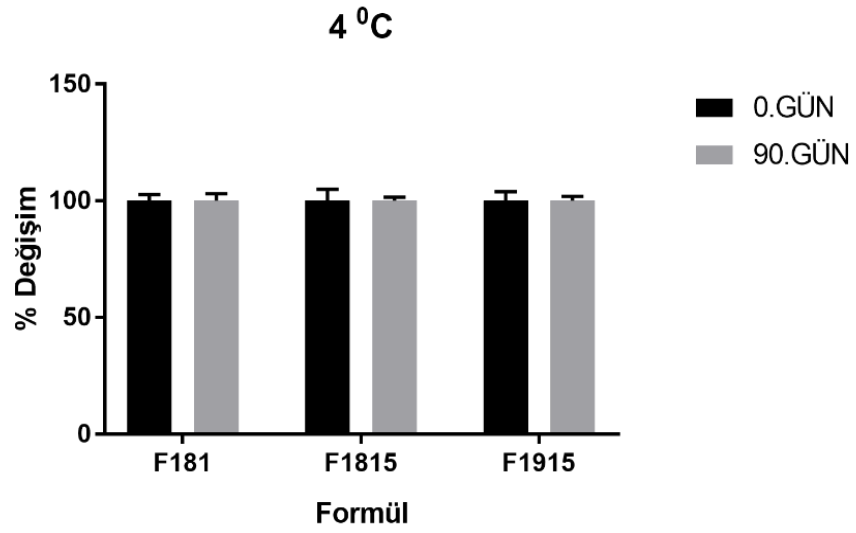
Zaman	Formülasyon	% Etkin Madde	
		25 °C Karanlık	4 °C Buzdolabı
0.Gün	F181-M β CD	100,00 \pm 0,46	100,00 \pm 0,46
	F1815-M β CD	100,00 \pm 0,94	100,00 \pm 0,94
	F1915-M β CD	100,00 \pm 0,72	100,00 \pm 0,72
15. Gün	F181-M β CD	101,18 \pm 0,36	99,65 \pm 0,35
	F1815-M β CD	99,72 \pm 0,21	99,92 \pm 0,33
	F1915-M β CD	100,91 \pm 1,31	99,94 \pm 0,16
30. Gün	F181-M β CD	101,53 \pm 0,29	101,0 \pm 0,20
	F1815-M β CD	100,53 \pm 1,55	101,43 \pm 0,51
	F1915-M β CD	101,28 \pm 2,52	101,36 \pm 0,35
60. Gün	F181-M β CD	99,95 \pm 0,46	101,77 \pm 0,52
	F1815-M β CD	100,18 \pm 0,17	101,68 \pm 0,71
	F1915-M β CD	99,54 \pm 0,10	100,83 \pm 0,51
90. Gün	F181-M β CD	99,13 \pm 0,28	101,20 \pm 0,54
	F1815-M β CD	99,75 \pm 0,22	99,72 \pm 0,29
	F1915-M β CD	100,23 \pm 0,27	99,84 \pm 0,35

Tablo 5.25. Kararlılık çalışmalarına ait pH değerleri (ortalama \pm SH, n=3)

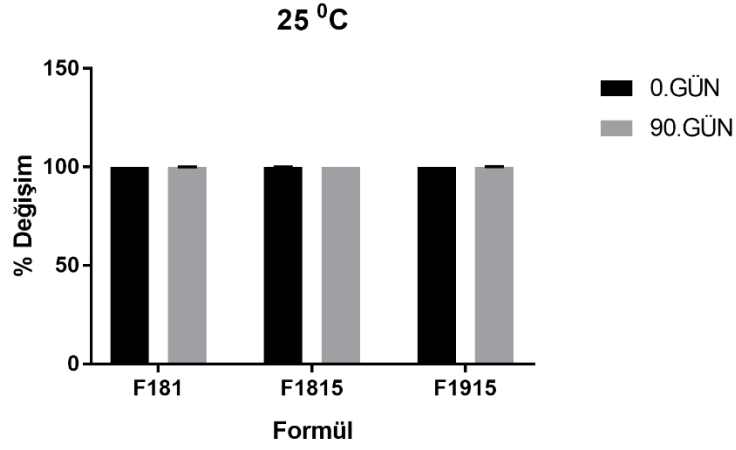
Zaman	Formülasyon	pH	
		25 °C Karanlık	4 °C Buzdolabı
0.Gün	F181-M β CD	6,51 \pm 0,00	6,51 \pm 0,00
	F1815-M β CD	6,43 \pm 0,003	6,43 \pm 0,003
	F1915-M β CD	6,34 \pm 0,00	6,34 \pm 0,00
15. Gün	F181-M β CD	6,50 \pm 0,01	6,50 \pm 0,005
	F1815-M β CD	6,43 \pm 0,003	6,43 \pm 0,01
	F1915-M β CD	6,34 \pm 0,00	6,34 \pm 0,00
30. Gün	F181-M β CD	6,50 \pm 0,00	6,50 \pm 0,00
	F1815-M β CD	6,42 \pm 0,01	6,43 \pm 0,00
	F1915-M β CD	6,33 \pm 0,00	6,33 \pm 0,01
60. Gün	F181-M β CD	6,48 \pm 0,00	6,49 \pm 0,01
	F1815-M β CD	6,39 \pm 0,01	6,42 \pm 0,005
	F1915-M β CD	6,30 \pm 0,01	6,31 \pm 0,01
90. Gün	F181-M β CD	6,46 \pm 0,003	6,47 \pm 0,00
	F1815-M β CD	6,35 \pm 0,00	6,40 \pm 0,005
	F1915-M β CD	6,28 \pm 0,005	6,29 \pm 0,003



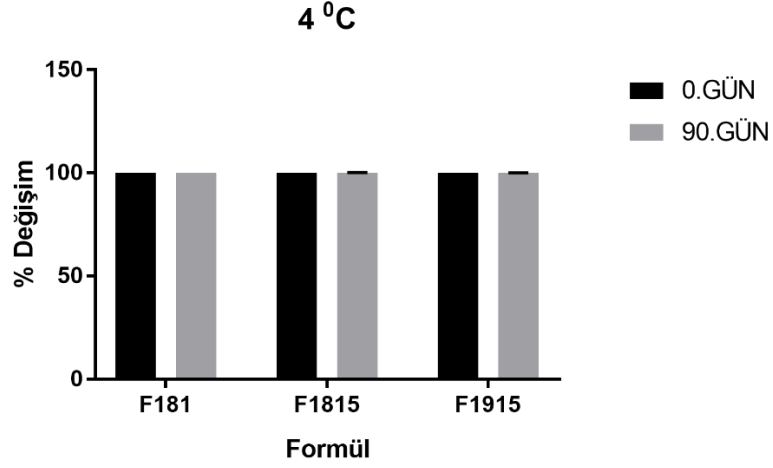
Şekil 5.21. 25 °C saklama ortamında bozunmadan kalan %MOX miktarı



Şekil 5.22. 4 °C saklama ortamında bozunmadan kalan %MOX miktarı



Şekil 5.23. 25 °C saklama ortamındaki formülasyonların pH değişimi



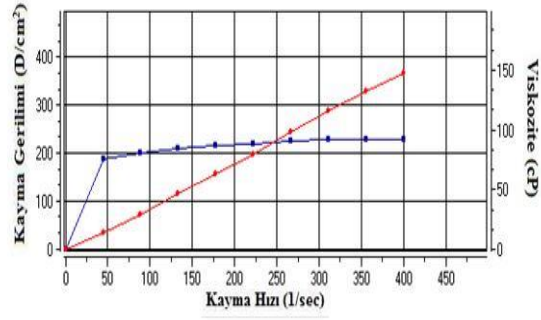
Şekil 5.24. 4 °C saklama ortamındaki formülasyonların pH değişimi

25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabı şartlarında 3 ay boyunca kararlılıkları incelenen formülasyonların reolojik ölçümleri, iki farklı sıcaklıkta (25 °C ve 34 °C) reometre ile yapılmıştır. Reolojik incelemelerde elde edilen reogramlar Şekil 5.25-5.30'da, viskozite sonuçları ise Tablo 5.26'da verilmiştir.

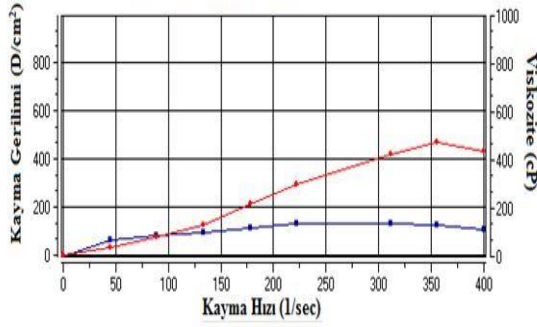
Tablo 5.26. Kararlılık çalışmalarına ait 25 °C ve 34 °C'de 60 rpm'de ölçülen viskozite (cP) değerleri (ortalama \pm SH, n=3)

Zaman	Formülasyon	25 °C Karanlık		4 °C Buzdolabı	
		25 °C	34 °C	25 °C	34 °C
0.Gün	F181-M β CD	253,33 \pm 168,85	110,20 \pm 24,45	253,33 \pm 168,85	110,20 \pm 24,45
	F1815-M β CD	156,00 \pm 12,12	136,33 \pm 6,64	156,00 \pm 12,12	136,33 \pm 6,64
	F1915-M β CD	177,00 \pm 6,08	151,00 \pm 32,31	177,00 \pm 6,08	151,00 \pm 32,31
30. Gün	F181-M β CD	143,67 \pm 20,34	159,67 \pm 71,46	299,33 \pm 17,82	116,33 \pm 4,70
	F1815-M β CD	168,67 \pm 31,54	101,00 \pm 40,00	155,67 \pm 25,17	119,50 \pm 9,50
	F1915-M β CD	132,00 \pm 25,51	174,67 \pm 53,57	186,67 \pm 12,00	141,00 \pm 3,00
60. Gün	F181-M β CD	81,33 \pm 9,53	138,50 \pm 27,50	253,50 \pm 48,50	112,50 \pm 10,50
	F1815-M β CD	85,67 \pm 20,58	81,33 \pm 22,75	101,50 \pm 2,50	92,67 \pm 4,41
	F1915-M β CD	82,67 \pm 7,86	85,33 \pm 3,48	116,00 \pm 13,00	122,00 \pm 9,00
90. Gün	F181-M β CD	142,33 \pm 34,74	115,67 \pm 2,33	226,00 \pm 8,00	64,67 \pm 11,41
	F1815-M β CD	91,33 \pm 6,96	97,00 \pm 11,59	119,67 \pm 10,65	72,50 \pm 1,50
	F1915-M β CD	132,00 \pm 10,00	80,00 \pm 17,00	157,00 \pm 8,00	97,67 \pm 14,85

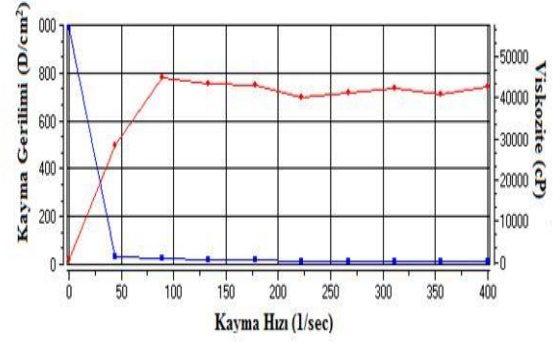
25 °C F181 BAŞLANGIÇ



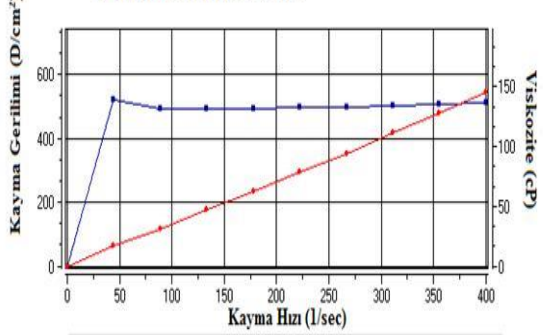
25°C F181 KARANLIK 30.GÜN



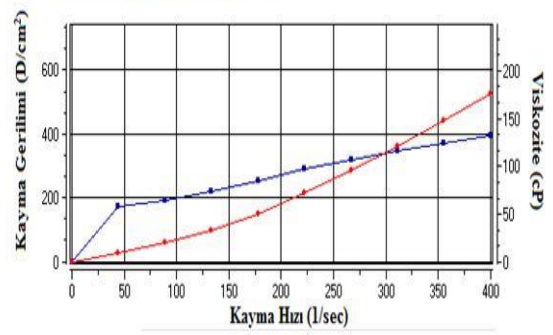
25°C BUZDOLABI F181 30. GÜN



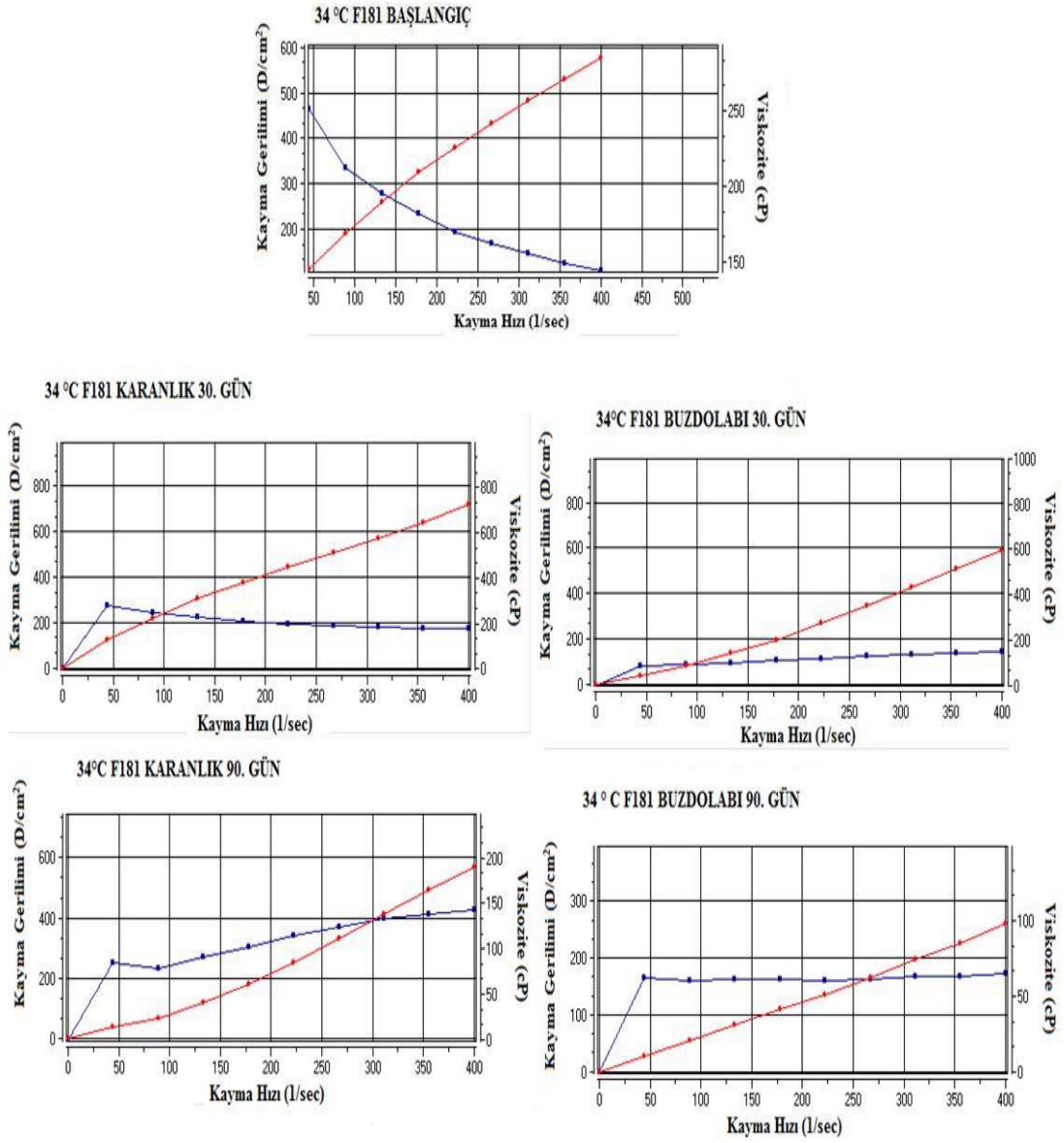
25°C F181 KARANLIK 90. GÜN



25 ° C F181 BUZDOLABI 90. GÜN

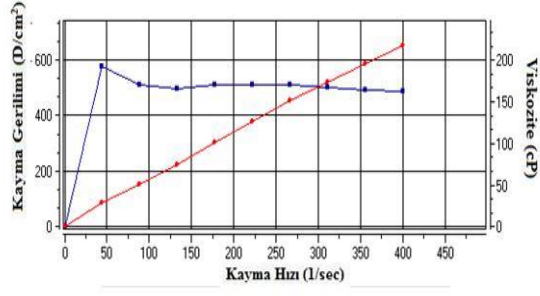


Şekil 5.25. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F181 formülasyonunun 25°C sıcaklıktaki reogramları

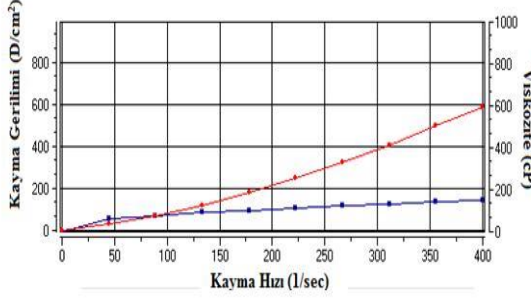


Şekil 5.26. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F181 formülasyonunun 34°C sıcaklıktaki reogramları

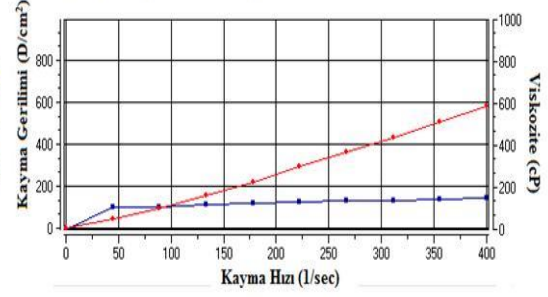
25 °C F1815 BAŞLANGIÇ



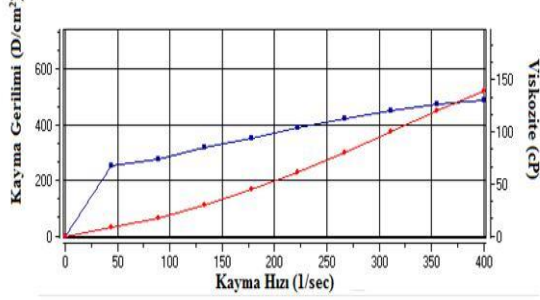
25 °C F1815 KARANLIK 30. GÜN



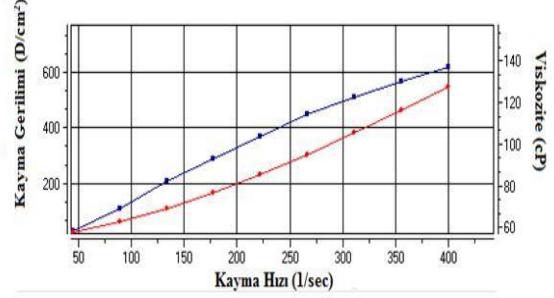
25 °C F1815 BUZDOLABI 30. GÜN



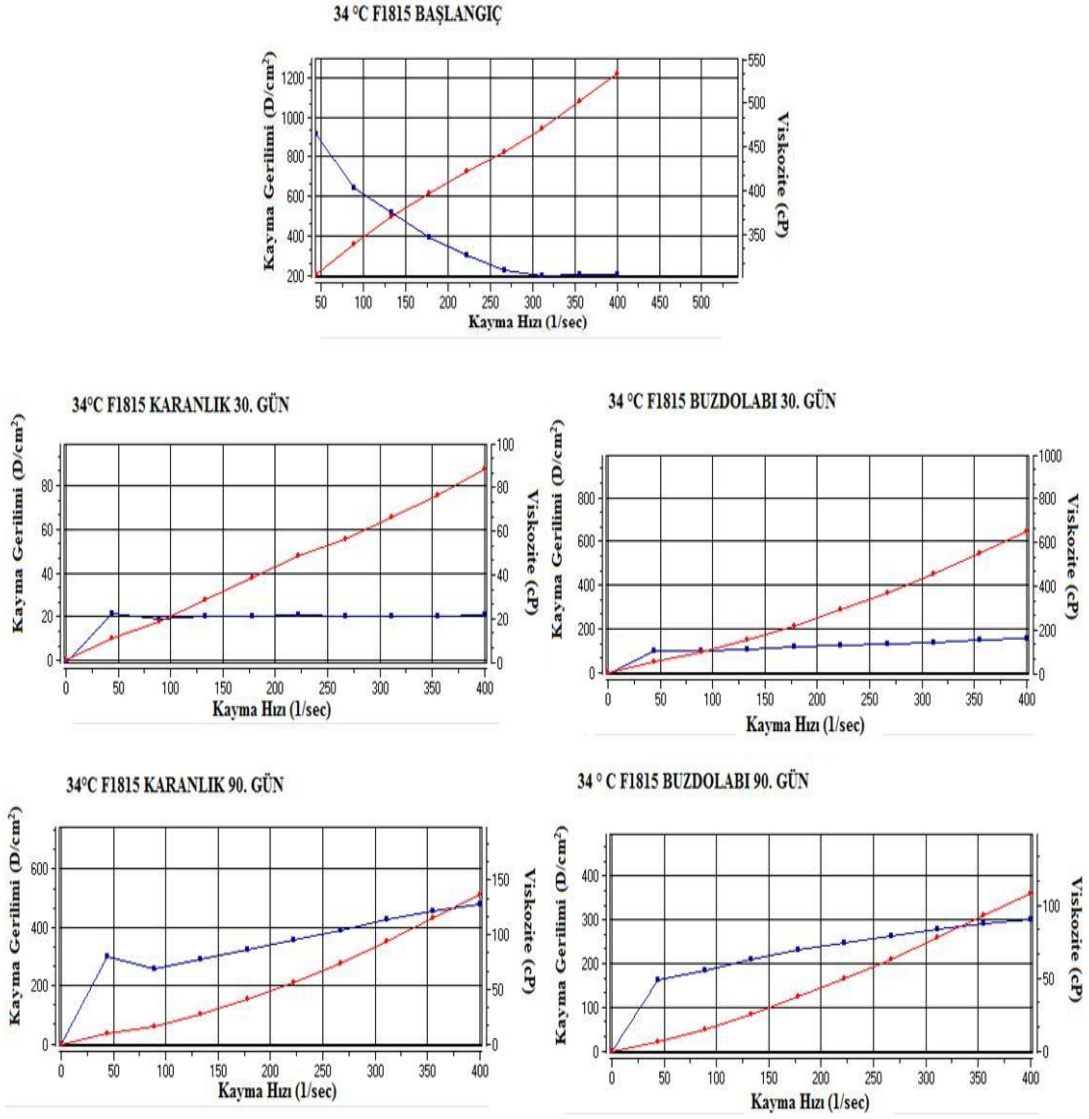
25 °C F1815 KARANLIK 90. GÜN



25 °C F1815 BUZDOLABI 90. GÜN

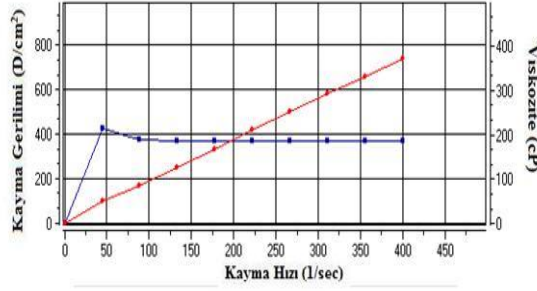


Şekil 5.27. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1815 formülasyonunun 25°C sıcaklıktaki reogramları

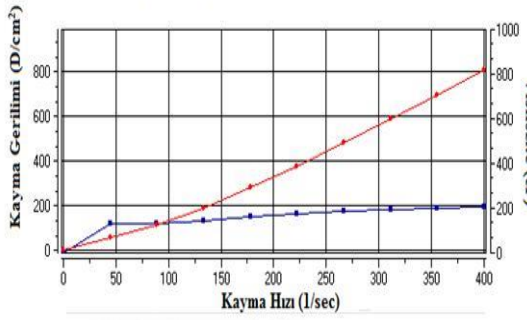


Şekil 5.28. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1815 formülasyonunun 34°C sıcaklıktaki reogramları

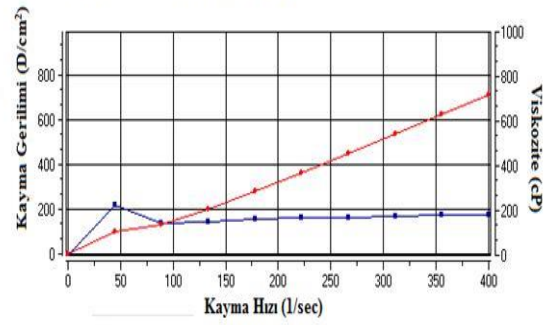
25 °C F1915 BAŞLANGIÇ



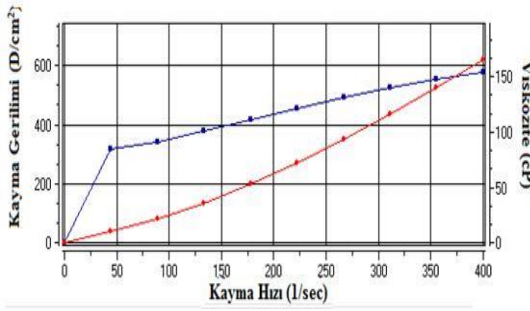
25°C F1915 KARANLIK 30. GÜN



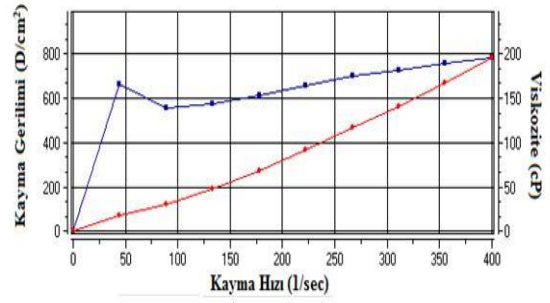
25 °C F1915 BUZDOLABI 30. GÜN



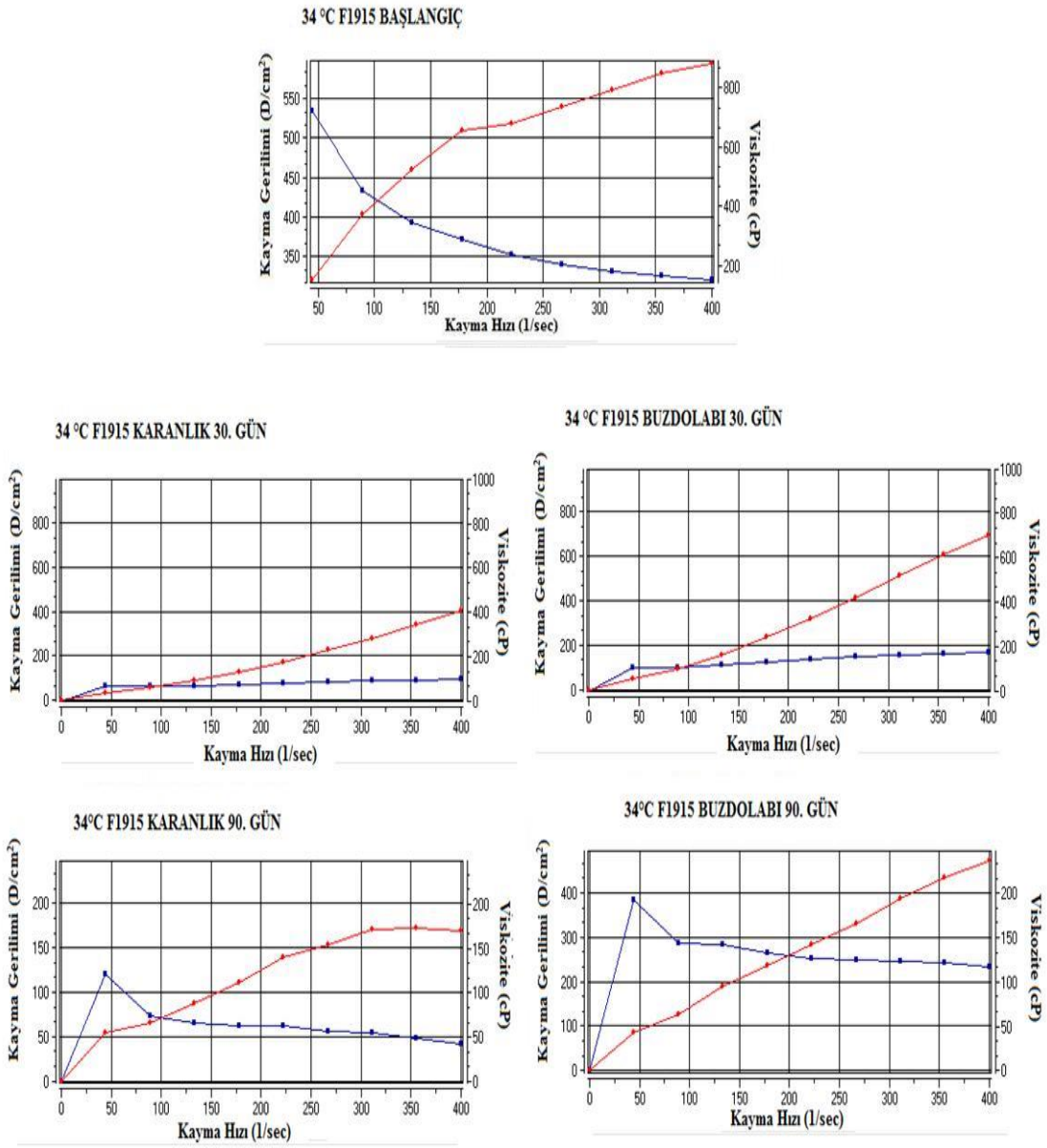
25 °C F1915 KARANLIK 90.GÜN



25 °C F1915 BUZDOLABI 90. GÜN



Şekil 5.29. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1915 formülasyonunun 25°C sıcaklıktaki reogramları



Şekil 5.30. 25°C karanlıkta ve buzdolabında 3 ay bekletilen F1915 formülasyonunun 34°C sıcaklıktaki reogramları

Kararlılık çalışmasının sonunda formülasyonların jelleşme kapasitesi ve jelleşme sıcaklığı belirlenerek, formülasyonların 4 °C ve 25 °C sıcaklıklarda saklanması jelleşme kapasitesi ve jelleşme sıcaklığı üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Kararlılık çalışmasının 3. ayının sonunda yapılan jelleşme kapasitesi ve jelleşme sıcaklığına ait sonuçlar Tablo 5.27’de gösterilmiştir.

Tablo 5.27. Kararlılık ortamlarında 3 ay bekletilen formülasyonlara ait jelleşme kapasiteleri ve jelleşme sıcaklığı

Formülasyon	Jelleşme Kapasitesi		Jelleşme Sıcaklığı	
	25 °C Karanlık	4 °C Buzdolabı	25 °C Karanlık	4 °C Buzdolabı
F181-MβCD	-	-	38,7	34,8
F1815-MβCD	++	++	33,9	31,2
F1915-MβCD	-	-	46,1	38,5

++ Jelleşme hemen oluştu ve birkaç saat sürdü, - Jelleşme oluşmadı

5.3.6. Formülasyonların antimikrobiyal etkinlik testi

Bölüm 4.3.7.’de anlatıldığı şekilde yapılan antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları Tablo 5.28’de verilmiştir.

Tablo 5.28. Etkin madde, piyasa preparatı, plasebo formül ve in situ jel formülasyonlarının antimikrobiyal testlerine ait zon çapları (ortalama ±SH, n=2)

Staphylococcus aureus	Kod/C	1 µg/ml	4 µg/ml	7 µg/ml	10 µg/ml
		MOX	-	-	15,5±0,5
	Vigamox®	-	15,0	22,5±2,5	25,5±1,5
	Plasebo	-	-	-	-
	F181-MOX	-	-	-	21,0±1,0
	F1815- MOX	-	-	-	18,5±3,5
	F1915- MOX	-	-	16,5±0,5	22,5±1,5
	F181-MβCD	-	-	14,5±0,5	22,5±1,4
	F1815-MβCD	-	-	18,0±2,0	25,0±0,0
	F1915-MβCD	-	-	13,5±0,5	19,0±0,0

6. TARTIŞMA

Tezin bu bölümünde analitik yöntem validasyonu ve hazırlanan siklodekstrin kompleksleri ile *in situ* jel formülasyonlara ait *in vitro* çalışmaların bulguları tartışılacaktır.

6.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları

Tez içeriğinde yapılan tüm miktar tayini çalışmaları HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC; yüksek duyarlılığa sahip olması, hızlı sonuç vermesi, kolay uygulanabilmesi ve uzun yıllardır kullanılan bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmiştir. HPLC çalışmalarında mobil faz olarak, uygun pik morfolojisi ve alıkonma zamanının elde edildiği, 60:45:5 (h/h/h) oranlarında metanol:su:asetonitril içeren ve o-fosforik asit ile pH'sı 2,7'ye ayarlanan mobil faz ile çalışılmıştır. Pik şekli ve alıkonma zamanı için kolonun özelliklerine uygun olarak 1,0 ml/dk akış hızı kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi, kolon koşullarına uygun olarak validasyon çalışmalarında ve analizlerde 20 µL olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C olarak ayarlanmıştır. Yapılan literatür taramalarından yola çıkılarak 250-310 nm dalga boyu aralığında, 250 mm × 4.6 mm 5 µm C18 kolon ile çalışılmış, ölçümler 302 nm'de yapılmıştır (Yurtdaş Kırmınoğlu vd., 2018).

Komplekslerin hazırlanmasına yönelik olarak faz diyagramı çalışmalarında saf su ortamında, komplekslerin ve *in situ* jel formülasyonlarının miktar tayini çalışmalarında mobil faz ortamında ve *in vitro* salım çalışmalarında pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılacak Moksifloksasin HCl ölçümleri için, her üç ortamda analitik yöntem validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ortamların her birinde kullanılacak analitik yöntemin doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, çalışma aralığı, duyarlılık, seçicilik ve kararlılık parametreleri incelenerek ICH kriterlerine göre değerlendirilmiş ve yöntemin her üç ortamda da etkin madde miktar tayini için güvenli olduğu kanıtlanmıştır.

Analitik yöntemin 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığındaki doğrusalılık çalışmalarından elde edilen regresyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (r^2) saf su için 0,9997, mobil faz için 0,9991, pH 7,4 fosfat tamponu için 0,9997 bulunarak ICH için 0,999'den büyük olma kriterini sağlamış ve yöntemin doğrusalılığı kanıtlanmıştır (Tablo 5.1-5.3) (Şekil 5.1-5.3) (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A(R2) 2005). Saf su, mobil faz ve pH 7.4 fosfat tamponu ortamlarında yöntemin doğruluğunun araştırılmasında üç konsantrasyon ile yapılan çalışmalarda, tüm ortam ve konsantrasyonlarda elde edilen geri kazanım sonuçlarının \pm %2 sınırları içerisinde olduğu ve yöntemin ICH doğruluk

kriterlerine uygunluğu gösterilmiştir (Tablo 5.4-5.6). Üç ortam ve üç konsantrasyon ile yapılan kesinlik çalışmalarında, üç farklı günde yapılan analizlerde varyasyon katsayılarının %2'nin altında bulunması ile yöntemin kesinliğini kanıtlamıştır (Tablo 5.7-5.9). (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A(R2) 2005).

ICH kılavuzlarına göre analitik yöntemin güvenilirliği için yöntemin duyarlılığını gösteren saptama ve tayin sınırlarının (LoD ve LoQ) çalışma aralığının en düşük konsantrasyonunun altında olması istenmektedir. Yöntemin konsantrasyonlardaki küçük değişimleri saptama kapasitesi ve yeteneğini belirlemek için, LoD ve LoQ değerleri her bir çalışma ortamı için eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere göre; saf su ortamı için LoD 2,7 µg/ml, LoQ 8,2 µg/ml, mobil faz ortamı için LoD 2,4 µg/ml, LoQ 7,3 µg/ml, pH 7,4 fosfat tamponu için LoD 1,0 µg/ml, LoQ 3,0 µg/ml'dir. Tüm duyarlılık verilerinin doğrusallığın gösterildiği 10-100 µg/ml aralığının altında olması nedeniyle yöntemin duyarlı olduğu gösterilmiştir.

Yöntemin doğru ve güvenilir sonuçlar verebilmesi için seçici olması yani analiz yapılan ortamlarda ve formülasyon bileşenlerinde bulunan kimyasallardan gelebilecek piklere ait alıkonma zamanlarının etkin maddeye ait alıkonma zamanı (2,94 dakika) ile girişim yapmaması gerekmektedir. Seçicilik araştırması için analiz yapılan ortamlar (saf su, mobil faz, pH 7,4 fosfat tamponu), kompleks hazırlamada kullanılan siklodekstrinlerin (SBEβCD, HPβCD, MβCD) çözeltileri ve *in situ* jel formülasyonuna ait plasebo formülasyonu HPLC ile etkin madde analizlerinde kullanılan çalışma şartlarında analiz edildiğinde, elde edilen kromatogramların hiç birinde etkin maddenin alıkonma zamanında pik gözlenmeyerek kullanılan bileşenlerin ve analiz ortamlarının girişim yapmadığı belirlenmiş ve yöntemin seçiciliği tespit edilmiştir (Şekil 5.4).

Analizlerden doğru sonuç alınabilmesi için analitin çözüdüğu ortam ve çalışma şartlarında kararlılığının değişmemesi gerekmektedir. Kararlılık çalışması kapsamında *in vitro* salım çalışmalarında kullanılan ortam (pH 7,4 fosfat tamponu), çalışma süresi (72 saat) ve çalışma sıcaklığında (34±0,5 °C) bekletilen MOX çözeltilerinde belirli zaman aralıklarında ve 72 saatin sonunda etkin maddenin başlangıç konsantrasyonlarındaki değerlerden herhangi bir azalma görülmemiş olup, etkin maddenin kararlılığı belirlenmiştir (Tablo 5.10).

6.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

CD'ler çözünürlük, biyoyararlanım, güvenlik ve kararlılık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle formülasyonlarda etkin maddeler ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. MOX HCl Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre Sınıf I ilaç olmakla birlikte suda az çözünmekte ve ışığa karşı duyarlılık göstermektedir (Al-Omari vd., 2014). Sulu göz damlası preparatlarında CD kullanımı çözünürlük, kimyasal kararlılık, oküler ilaç tahrişinin azaltılması ve oküler ilaç geçirgenliğinin artırılması amaçlarını içermektedir (Rasheed vd. 2008). Çalışmada bu doğrultuda MOX'un çözünürlük ve kararlılığında iyileşme sağlamak amacıyla MOX:CD kompleksleri hazırlanarak, oküler uygulamalarda klasik göz damlalarına göre gözde kalış süresini uzatarak tedavide üstünlük sağlayan *in situ* jelleşen formülasyonlara eklenmiştir.

Refleks göz yaşarması ve kırpışması ile ilacın hızlı uzaklaşmasını engellemek için, oftalmik preparatlarda kullanılan taşıyıcıların oküler yüzey için non-irritan olması gerekmektedir (Challa vd. 2005). Oftalmolojide kullanılan CD türevleri β ve γ CD'nin hidroksipropil türevleri, rastgele metillenmiş β CD ve SBE β CD'dir (Stefansson ve Loftsson, 2002). İnsan kornea epitel hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmalarına göre CD'lerin sitotoksitesi şu sıra ile artmaktadır; α CD > DM β CD > SBE β CD = HP β CD > γ CD. Hidrofilik CD'lerin özellikle DM β CD, SBE β CD ve HP β CD'nin göze toksik olmadığı ve sulu göz damlalarında iyi tolere edilmesi nedeniyle çalışmada bu CD'ler kullanılmıştır (Loftsson ve Brewster, 1996; Cal ve Centkowska, 2008). Avrupa'da ruhsatlı ticari bir göz damlasının (Clorocil®) bileşiminde M β CD bulunmaktadır. HP β CD Avrupa ve Amerikan Farmakopelerine kayıtlıdır ve ayrıca FDA'nın İnaktif Farmasötik Bileşenler listesinde yer almaktadır (Loftsson ve Duchêne, 2007).

Sulu çözeltideki CD'ler, etkin madde molekülünü veya çoğunlukla sadece terapötik molekülün lipofilik kısmını merkezlerindeki boşluk içerisine alarak inklüzyon kompleksi oluşturabilirler (Jambhekar ve Breen 2016). Etkin madde:CD komplekslerinin sitokiyometri oranları ve stabilite veya bağlanma sabitlerinin sayısal değerleri, CD konsantrasyonuna karşı çözünürlük diyagramlarından elde edilmektedir. Bu faz-çözünürlük tekniği ilk olarak Higuchi ve Connors tarafından geliştirilmiştir (Higuchi ve Connors, 1965).

Faz çözünürlük diyagramları A (A_L , A_P , A_N) ve B (B_S , B_I) tipi olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. A tipi diyagramlar çözünebilir komplekslerin oluşumunu, B

tipi diyagramlar ise zayıf çözünürlük sağlayan kompleksleşmeyi göstermektedir. Doğal CD'ler sudaki zayıf çözünürlükleri nedeniyle genellikle B tipi eğriler oluşturmakla birlikte, modifiye CD'ler (SBE β CD, HP β CD, M β CD) çözünür kompleksler üretebilmektedir (Del Valle, 2004).

Etkin maddenin SBE β CD, HP β CD ve M β CD ile hangi molar oranlarda kompleksleşeceğinin tespiti için öncelikle faz çözünürlük diyagramı çalışmalarına yönelik olarak çözünürlük denge süreleri belirlenmiştir. 5 mM CD sulu çözeltisinde aşırı miktarda MOX ile yapılan çalışmalarda çözünürlük artışının tamamlandığı denge süreleri SBE β CD, HP β CD ve M β CD için sırasıyla 6 gün, 4 gün ve 5 gün olarak bulunmuştur (Tablo 5.11). Çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında 0-30 mM aralığındaki CD çözeltilerine MOX aşırı miktarlarda eklenerek denge süresince çalkalamadan sonra çözünen MOX miktarları HPLC ile tespit edilmiştir (Demirel M. vd. 2006, Waleczek vd. 2003). Her bir CD konsantrasyonuna karşılık çözünen MOX konsantrasyonları grafiğe geçirilerek elde edilen çözünürlük faz diyagramlarının Higuchi'nin çözünürlük-faz diyagramlarından Bs tipi diyagrama uyum sağladıkları görülmüştür (Şekil 5.5-5.7) (Higuchi ve Connors, 1965). Bs tipi için geliştirilmiş olan stokiyometrik hesaplardan yararlanılarak CD'lerin MOX ile kompleksleşme oranları SBE β CD için 1:15, HP β CD için 1:11, M β CD için 1:3 olarak hesaplanmıştır (Higuchi ve Connors, 1965).

CD:ilaç komplekslerinin sentezi için yüklenen bileşiğin özelliklerine bağlı olarak, yoğurma, nötralizasyon, öğütme, birlikte çöktürme, kapalı kapta ısıtma ve dondurarak kurutma gibi bir çok yöntem bulunmaktadır. Genel olarak kompleksler sulu siklodekstrin çözeltilerine ilacın aşırı miktarının ilavesi ile hazırlanmaktadır. Oluşan süspansiyon, bir haftadan fazla süre uygun sıcaklıkta sürekli çalkalanarak dengeye getirilir ve daha sonra berrak ilaç siklodekstrin kompleks çözeltisi için filtre veya santrifüj edilir. Katı komplekslerin hazırlanması için sulu çözeltideki su, evaporasyon (örnek olarak püskürterek kurutma) veya süblimasyon (örnek olarak liyofilizasyon) ile uzaklaştırılır (Junco vd. 2002). Liyofilizasyon gerçek inklüzyon komplekslerinin eldesi için uygun ve özellikle ısıya dayanıksız ilaçlar için yararlı bir yöntemdir. Liyofilizasyon ile elde edilen ürünler saf etkin maddeye göre daha iyi çözünürlük ve hızlı absorpsiyon özellikleri göstermektedir (Castillo vd. 1999; Krishna Mohan vd. 2012).

Çalışmada diğer yöntemlere göre başarılı inklüzyon kompleksi hazırlanmasına imkan vermesi, bileşenlerin ısıya maruz kalmaması, etkin maddenin çözünürlük ve

absorbsiyon artışına katkı sağlaması nedenleriyle liyofilizasyon yöntemi kullanılmıştır. MOX:CD komplekslerinin hazırlanmasında, çözünürlük faz çalışmalarından hesaplanan molar oranlarda etkin madde ve CD'ler tartılmış, ayrı ayrı saf su içerisinde çözündürülmüş, iki çözelti birbiri ile karıştırıldıktan sonra denge süresince yatay çalkalayıcıda çalkalanmış, liyofilize edilerek kuru toz formda elde edilmişlerdir.

İlaç etkin maddesi:CD komplekslerinin çoğunun inklüzyon kompleksi olduğu düşünülmeyle birlikte, CD'in ayrıca misel benzeri yapılar yoluyla etkin madde çözünürlüğü sağlayan kompleks agregatlar ve inklüzyon kompleksi olmayan formlar oluşturdukları bilinmektedir. Faz-çözünürlük profilleri, sadece artan CD konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğünü nasıl etkilediğini tanımlamaktadır ve inklüzyon komplekslerinin oluşumunu doğrulamakta yetersiz kalmaktadır (Jambhekar ve Breen 2016). Bu nedenle gerçek inklüzyon komplekslerinin oluşup oluşmadığının belirlenmesi için karakterizasyon çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır.

Kompleksasyon büyük oranda CD'in boyutlarına ve moleküldeki fonksiyonel grupların özel sterik düzenine bağlıdır. Etkin madde:CD molekülleri arasında oluşan inklüzyon kompleksleri, katı ve çözelti halinde karakterize edilebilirler. Inklüzyon komplekslerinin katı hal karakterizasyonu; termo-analitik yöntemler (DSC, DTA vb.), taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-ışını difraktometrisi ve tek kristal X-ışını yapı analizi, ıslanabilirlik ve dissolüsyon testleri, infrared (IR) spektroskopisi, ince tabaka kromatografisi (TLC) teknikleri ile yapılmaktadır. Çözelti halindeki inklüzyon komplekslerinin karakterizasyonu ise; elektrokimya, polarografi, kondüktivite, polarimetri, çözünürlük çalışmaları, spektroskopi yöntemleri (ESR, UV/VIS, CD, floresans spektroskopisi), pH-potansiyometrik titrasyon ve mikroklorimetri ile gerçekleştirilmektedir (Singh vd. 2010).

Bu çalışmada, hazırlanan MOX:CD komplekslerinin katı hal karakterizasyonu IR, DSC, NMR, XRD ile, çözelti halindeki karakterizasyonları ise çözünürlük çalışmaları ile araştırılmıştır. Komplekslerin karakterizasyon incelemelerinde, komplekslerle birlikte saf etkin madde, saf CD'ler ve fiziksel karışımlarına ait analizler de yapılarak, saf maddelerin referansları ile uyumluluğu, kompleks hazırlama işlemlerinden sonra bileşenlerdeki olası değişimleri ve inklüzyon kompleksi oluşumunun araştırılması amaçlanmıştır.

6.2.1. IR analizleri

Etkin maddenin IR analizinde, 800 cm^{-1} (-CH gerilmesi), 1043 cm^{-1} (-CH₂), 1182 cm^{-1} (C-O), $1452\text{-}1375\text{ cm}^{-1}$ (-CH), $1620\text{-}1514\text{ cm}^{-1}$ (C=O), 1738 cm^{-1} (C=O, COOH) ve 2692 cm^{-1} 'de MOX'un susuz formuna ait karakteristik pikler (Şekil 5.8.A) görülmüş ve literatüre ile uyumlu bulunmuştur (Al Omari vd. 2014). SBE β CD'in IR analizinde literatüre benzer olarak O-H gerilmesi nedeniyle $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ 'de yoğun bantlar, $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde -CH ve -CH₂ gruplarının titreşimleri görülmektedir (Şekil 5.8.B) (Aramă vd. 2011; Deng vd. 2016). MOX:SBE β CD fiziksel karışımına ait IR analizinde hem etkin maddenin hem de CD'in karakteristik pikleri görülmektedir (Şekil 5.8.C). Bir literatürde MOX'un FT-IR spektrumunda analitik absorpsiyon bantları olan kinolon aromatik fragmanındaki C-C bağlarının titreşimine karşılık gelen 1445 cm^{-1} 'deki en yoğun bant ve C-F bağlarının titreşimine karşılık gelen 1045 cm^{-1} 'deki bant görülmektedir. 1622 cm^{-1} 'deki bant, karbonil gruplarındaki C = O bağlarının gerilme titreşimlerine, 1580 cm^{-1} 'deki bant ise ayrılmamış karboksil gruplarının absorpsiyonunu denk gelir. MOX:SBE β CD kompleksine ait IR analizinde, SBE β CD varlığında, MOX'un $1300\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki ana absorpsiyon bantlarının yoğunluğu azalmış, 1452 cm^{-1} 'deki yoğunluk 1029 cm^{-1} bandına kaymıştır. Bu değişim, özellikle MOX'un 1455 cm^{-1} 'deki C-C bağlarına ait titreşimlerde daha belirgindir (Şekil 5.8.D) ve MOX'un karbonil grubu ile CD boşluğunun hidroksil grupları arasında hidrojen bağlarının oluşum olasılığını desteklemektedir. Literatürde bu değişikliklerin ligand konsantrasyonu arttıkça daha belirgin hale geldiği rapor edilmiştir (Skuredina vd. 2018).

Şekil 5.9 MOX, HP β CD, MOX:HP β CD fiziksel karışımı ve bunların kompleksine ait IR spektrumlarını göstermektedir. HP β CD'nin IR analizinde literatüre benzer olarak, 3352 cm^{-1} 'de (O-H gerilme titreşimi), 2926 cm^{-1} 'de (C-H gerilme titreşimi) ve 1151 ile 1034 cm^{-1} 'de (C-H, C-O gerilme titreşimi) belirgin absorpsiyon bantları görülmektedir (Şekil 5.9.B) (Wang vd. 2011). Fiziksel karışımın IR spektrumu tekli bileşenlerden farklı değildir (Şekil 5.9.C). Kompleks içerisindeki MOX miktarının azlığından dolayı komplekse ait IR spektrumu HP β CD'e benzerdir (Şekil 5.9.D) (Yuan vd. 2012). Komplekse ait IR spektrumunda MOX:CD etkileşmelerinden dolayı, MOX'un 800 , 1043 , 1514 , 1738 ve 2692 cm^{-1} 'deki karakteristik IR bantları kaybolmuş, 1452 ve 1628 cm^{-1} 'deki bantlar kayarak azalmıştır. Bu bulgular MOX'un karbonil grubu ile HP β CD'in hidroksil grupları arasında hidrojen bağlarının oluşma olasılığını desteklemektedir. Bir çalışmada HP β CD ve MOX kompleksinin FT-IR spektrumları

çekilmiş, en yoğun absorpsiyon bantlarının, MOX'un IR spektrumunda 1445 cm^{-1} (kinolonun aromatik yapısının C = C bağlarının titreşimleri) ve 1045 cm^{-1} 'de (C-F bağlarının titreşimleri) meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca karbonil ve karboksil gruplarının ($1720\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) ve MOX'un aromatik yapısının (1455 cm^{-1}) C = C bağlarının emilim bölgelerinde değişikliklere dikkat çekilmiştir. C- N bağlarının (aromatik tersiyeramin) (1360 cm^{-1}) ve C-F bağlarının (1050 cm^{-1}) absorpsiyon bantlarının da değiştiği görülmüş ve sistemdeki HP- β -CD içeriği ne kadar yüksekse, MOX'un IR spektrumundaki değişikliklerin de o kadar arttığı belirtilmiştir (Deygen, Egorov ve Kudryashova, 2016).

Şekil 5.10'da MOX, M β CD, MOX:M β CD fiziksel karışımı ve bunların kompleksine ait IR spektrumları verilmiştir. M β CD'nin IR analizinde literatüre benzer olarak, 3432 cm^{-1} 'de (O-H gerilme titreşimi), 2933 cm^{-1} 'de (C-H gerilme titreşimi) ve 1030 ile 950 cm^{-1} 'de (C-H, C-O gerilme titreşimi) güçlü absorpsiyon bantları görülmektedir (Şekil 5.10.B) (Chao vd. 2014). Fiziksel karışımın IR spektrumu M β CD'e benzerdir ve moleküller arası etkileşim meydana geldiğini düşündürmektedir (Şekil 5.10.C). MOX:M β CD kompleksine ait IR spektrumunda, MOX'un 1452 cm^{-1} 'deki belirgin piki kayarak azalmış, 800 cm^{-1} 'deki güçlü absorpsiyon bantı da dahil olmak üzere tüm diğer karakteristik IR pikleri kaybolmuş ve ayrıca 756 cm^{-1} 'de bileşenlerde olmayan bir pik ortaya çıkmıştır (Şekil 5.10.D). IR spektrumlarına göre inklüzyon kompleks oluşumu, etkin maddenin karakteristik piklerinin kaybolması ve orijinal MOX veya M β CD spektrumlarında olmayan yeni piklerin ortaya çıkması ile doğrulanmaktadır (Güleç ve Demirel, 2016). Bu veriler, M β CD'nin hidroksil grupları ile MOX'un COOH, C=O ve C-N fonksiyonel grupları arasında hidrojen bağlanmasından dolayı M β CD ile olası kompleks oluşumunu göstermektedir (Skuredina vd., 2017).

6.2.2. DSC analizleri

DSC verileri polimerin yapısı ve karışımdaki etkin maddenin fiziksel durumu hakkında bilgi vermektedir (Li vd. 2013). Bu amaçla elde edilen katı ürünlerin fiziksel karışım veya gerçek inklüzyon kompleksi olup olmadığının tespiti için çalışmada DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Saf MOX, saf CD'ler, MOX:CD fiziksel karışımları ve MOX:CD komplekslerinin DSC termogramları Şekil 5.11-5.13'de yer almaktadır. MOX'un termal eğrisi, literatür ile uyumlu olarak molekülün kristalin anhidr formunu

gösteren 255-258 °C aralığında tipik erime termogramı göstermiştir (Şekil 5.11.A) (Dorofeev vd. 2004). SBE β CD termogramında 238°C'de dekompozisyon başlangıcını gösteren bir endotermik pik bulunmaktadır (Şekil 5.11.B). MOX:SBE β CD fiziksel karışımı iki bileşenin de termal davranışını gösterirken, MOX:SBE β CD kompleksinde ilki 238°C'de SBE β CD'e, ikincisi 255-258 °C aralığında MOX'a ait olan iki keskin endotermik pik bulunmaktadır (Şekil 5.11.C-D).

HP β CD termogramında 220-300 °C aralığında CD molekülündeki su kaybından kaynaklanan geniş bir pik bulunmaktadır (Şekil 5.12.B) (Patel ve Patel, 2010). Fiziksel karışımda biraz sola kaymakla birlikte MOX endotermik piki ayırddedilebilmekte ve ilacın orijinal kristalinitesinin değişmediğini göstermektedir (Şekil 5.12.C). MOX:HP β CD kompleksinde, 225 °C'de başlayan geniş dehidrasyon piki içerisinde saf etkin madde pikine göre küçülmüş, genişlemiş ve tepe noktası 240 °C'ye kaymış endotermik bir pik görülmüştür (Şekil 5.12.D). Benzer kaymalar, örneğin amorfluğundaki artış, kristalinitedeki azalış veya bazı ilaç:CD etkileşmelerinden kaynaklanabilmektedir (Patel ve Patel, 2010).

M β CD termogramında 200-320 °C aralığında CD molekülündeki su kaybından kaynaklanan bir pik, fiziksel karışımda her iki bileşenin karakteristik termal profili, komplekste ise 158 °C'de yeni ortaya çıkan keskin bir pik ile 240-320 °C'de geniş bir endotermik pik bulunmaktadır (Şekil 5.13.B-D). Komplekste ayrıca MOX'un erime piki kaybolmuştur. Etkin maddenin erime pikinin kaybolması genellikle inklüzyon kompleksinin oluşum kanıtı olarak yorumlanmakta ve literatürde pik kaybolması inklüzyon kompleks hazırlamada en iyi yöntemlerden biri olan liyofilizasyon yöntemi ile doğrulanmaktadır (Cunha-Filho vd. 2007). MOX:M β CD kompleksine ait termogramdan MOX'un erime pikinin kaybolması, kristal yapıdaki MOX'un M β CD'in merkez boşluğuna yerleşmesinden kaynaklanabilir ve bu da gerçek inklüzyon kompleksi oluşumunu destekleyebilmektedir.

Yapılan bir çalışmada saf MOX'u DSC termogramı, aktif maddenin erimesine karşılık gelen ve kristalimsi doğasını gösteren 263 °C'de keskin bir endotermik pik göstermiştir. Bununla birlikte, MOX erimesinin bu karakteristik piki, MOX ve β -CD inklüzyon kompleksi için gözlenmemiş ve bu konakçı ile konuk molekül arasındaki katı hal etkileşimlerini göstermiştir. Bu DSC sonuçları, MOX'un artık kristalin yapıda olduğu gibi olmadığını, β -CD ile kompleksleşmesinden dolayı amorf bir şekilde bulunduğunu doğrulamıştır (Szabo vd., 2018).

6.2.3. NMR analizleri

¹H NMR, inklüzyon oluşumunun kanıtı için basit ve güvenilir bir yöntemdir. Konak ve konuk moleküller arasındaki etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağlardır. Eğer konuk molekül CD'in boşluğuna katılırsa, NMR spektrumundaki kimyasal kaymaları (δ) değişecektir. CD'lerdeki H3 ve H5 protonları sırasıyla ikincil ve primer yüze yakın olmakla birlikte, H3 ve H5 protonlarının iç kavitede yer aldıkları bilinmektedir (Deng vd. 2016). Konuk moleküllerin CD boşluklarına katılmaları ile CD'lerin ¹H NMR spektrumlarında H3 ve H5 protonlarının yukarı doğru kayması gözlenmektedir ve kaymanın büyüklüğü kompleks kararlılığının ölçüsü olarak kullanılabilir. Özellikle $\Delta\delta H3 > \Delta\delta H5$ veya $\Delta\delta H3 < \Delta\delta H5$ verilerinin sırasıyla konunun CD boşluğuna kısmen veya tamamen katıldığına göstergesi olduğu literatürde belirtilmiştir (Mura, 2014).

Saf etkin madde, saf CD'ler, fiziksel karışımlar ve komplekslere ait ¹H NMR spektrumları Şekil 5.14-5.16'da yer almaktadır. Elde edilen spektrumlarda SBE β CD'in H3 ve H5 protonları sırasıyla 3,6090 ve 3,3487 ppm'de; HP β CD'in H3 ve H5 protonları sırasıyla 3,7386 ve 3,7173 ppm'de; M β CD'in H3 ve H5 protonları sırasıyla 3,5757 ve 3,3729 ppm'de yer almaktadır (Şekil 5.14.B-5.15.B-5.16.B). Bulunan değerler literatürler ile uyum göstermektedir (Deng vd. 2016; Chao vd. 2014). MOX:SBE β CD, MOX:HP β CD, MOX:M β CD komplekslerine ait ¹H NMR spektrumları, H3 protonu için aşağı veya yukarı alana doğru nispeten düşük kayma (sırasıyla -0,0044, 0,1257 ve -0,1358 ppm) gösterirken, H5 protonu için aşağı veya yukarı alana doğru çok daha büyük kaymalar (sırasıyla -0,2325, 0,1431 ve 0,1875 ppm) göstermiştir (Şekil 5.14.D-5.15.D-5.16.D). Elde edilen sonuçlara göre tüm komplekslerde $\Delta\delta H3 < \Delta\delta H5$ olduğunda MOX'un CD'lerin boşluğuna tamamen katılarak inklüzyon kompleksi oluşturdukları tespit edilmiştir. En yüksek H3 proton kayması MOX:M β CD kompleksinde, en yüksek H5 proton kayması ise MOX:SBE β CD kompleksinde görülmüştür.

6.2.4. XRD analizleri

Aktif farmasötik bileşenlerin (API) çoğunluğu polimorf, solvat ve amorf form gibi farklı katı formlarda bulunabilir. Bu katı formlar, aktif bileşenin fizikokimyasal özelliklerinde büyük farklılıklar gösterebilir ve bu nedenle ilaç ürününün kalitesini,

güvenliğini ve etkinliğini etkileyebilir (Shete vd. 2010). DSC analizlerine ek olarak kristalinite XRD kullanılarak belirlenmiştir. Saf MOX, saf CD'ler, MOX:CD fiziksel karışımları ve MOX:CD komplekslerinin XRD spektrumları Şekil 5.17-5.19'da gösterilmiştir. MOX'un XRD paterninde, 6,8, 8,6, 10,3, 17,3, 17,5, 19,3, 21,6, 26,4, 27,5 ve 29,4 2θ değerlerinde gözlenen keskin kristal pikler molekülün kristal yapısını göstermektedir ve bulunan değerler literatür ile uyumludur (Al Omari vd. 2014) (Şekil 5.17.A). CD'lere ait XRD paternlerindeki, SBE β CD'de tek, HP β CD ve M β CD'de iki geniş pik bileşiklerin amorf karakterde olduklarını doğrulamıştır (Şekil 5.17.B, 5.18.B, 5.19.B) (Das vd. 2018; Liu vd. 2006; Charoenchaitrakool vd. 2002). Tüm fiziksel karışımlarda MOX'un kristalin pikleri görülmekle birlikte (Şekil 5.17.C, 5.18.C, 5.19.C), CD molar oranının en düşük olduğu MOX:M β CD (1:3) fiziksel karışımında pikler daha belirgin izlenmektedir (Şekil 5.19.C). Liyofilize kompleksler ile elde edilen XRD paternlerinde MOX'a ait kristalin pikleri kaybolmuş ve profiller komplekslerin hazırlandığı CD paternlerine benzer olarak amorf profil göstermiştir (Şekil 5.17.D, 5.18.D, 5.19.D). Etkin madde piklerinin yok olması veya azalması, ilaç kristalinitesinin kaybı veya ilaç:CD etkileşimi ile ilgili olabilmektedir. Etkin maddenin karakteristik piklerinin kaybolması ise DSC ve IR analizleri ile uyumlu olarak CD boşluğuna ilacın yerleştiğini desteklemektedir (Yurtdaş *et al.*, 2011, p.429–435; Demirel *et al.*, 2011, p.437–445).

6.2.5. Çözünürlük çalışmaları

MOX HCl, 1,2-6,8 pH aralığında 250 ml'de küçük doz/çözünürlük değerlerine ve 0,832 logP değerine sahiptir. Suda organik çözücülerden daha fazla, yüksek pH'larda da düşük pH'lara göre daha fazla çözünmektedir. WHO, EMA ve US FDA kılavuzlarına göre MOX HCl oldukça çözünür bir ilaç olarak kabul edilmekte ve yüksek çözünürlük yüksek permeabiliteye bağlı olarak Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre Sınıf I ilaç olarak sınıflandırılmaktadır (Al-Omari vd., 2014). Göze damla şeklinde uygulanan çözeltilerin bir damlası ile yaklaşık 0,05 ml çözelti uygulanmaktadır. Bu durumda su bazlı göz damlası çözeltisinde ilacın dozunun formülasyonun 0,05 ml'sinde çözünebilir olması gerekmektedir. Oftalmik formülasyonlara ait bu 0,05 doz:çözünürlük (D:S) oranı, diğer ilaç formülasyonlarından çok daha düşüktür (tabletlerde 250, burun spreylerinde 0,3) (Stefansson ve Loftsson, 2002). CD'ler suda çözünen ilaçların

çözünürlüklerini daha da arttırarak, doz çözünürlük oranını yükseltebilmektedir (Rasheed vd. 2008).

Kompleks hazırlanması sonrasında etkin madde çözünürlüğündeki artışın tespiti için yapılan çalışmalara ait sonuçlara göre, saf etkin maddenin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki çözünürlüğü $2,79 \pm 0,05$ (ort \pm SH) mg/ml iken, kompleksleşmeden sonraki çözünürlük değerleri MOX:SBE β CD, MOX:HP β CD, MOX:M β CD kompleksleri için sırasıyla $11,66 \pm 0,92$, $12,90 \pm 0,42$ ve $15,34 \pm 0,74$ mg/ml'ye yükselmiştir (Tablo 5.12).

6.2.6. CD komplekslerinin çözelti kararlılığı

Moksifloksasin HCl ışığa hassas bir moleküldür ve sulu çözeltisi 245nm UV lambaya maruz kaldığında kararsızlık göstermektedir. Farklı akış hızları ve fotokimyasal reaksiyon ünitesinin bekletme yerine farklı uzaklıkları denendiğinde, %30, %54 veya %83 fotodegradasyon dereceleri elde edilmiştir (Al Omari vd. 2014). Moksifloksasin HCL sulu çözeltisinin güneş ışığı ile fotodegradasyonunun izlendiği bir çalışmada, 136 saat sonunda konsantrasyonun en az %50 oranında azaldığı tespit edilmiştir. HPLC/MS ile yapılan araştırmada alisiklik halkanın fotooksidasyonu ile moksifloksasin N-oksid oluşumu belirlenmiştir (Ferdig vd. 2005).

Siklodekstrin komplekslerinde, her bir konuk molekülü siklodekstrin türevi molekül ile bireysel olarak çevrelenmiş olduğundan mikroskobik açıdan mikroenkapsülasyon oluşmaktadır. Mikroenkapsülasyon konuk molekülün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde avantajlı değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişikliklerin en bilinenleri; ışığa veya oksijene hassas bileşiklerin stabilizasyonu, konuk moleküllerin kimyasal reaktivitelerinin modifikasyonu ve bileşiklerin çözünürlüğünün iyileştirilmesidir (Del Valle, 2004).

Çalışmada hazırlanması amaçlanan ilaç taşıyıcı sistem raf ömrü boyunca çözelti formunda bulunacağından ve etkin maddenin çözelti formundaki kararlılığı düşük olduğundan, kompleks hazırlanmasının etkin madde kararlılığı üzerine etkisinin araştırılması komplekslerle hazırlanan çözeltiler üzerinde yürütülmüştür. Çalışma öncesinde komplekslerdeki etkin madde miktarları validasyonu yapılmış olan HPLC ile tespit edilmiş ve komplekslerdeki ortalama etkin madde geri elde yüzdesi SBE β CD için %95,18, HP β CD için % 89,44 ve M β CD için % 87,14 olarak hesaplanmıştır.

Gün ışığı, 25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabı şartlarında sürdürülen çalışmanın sonuçlarında; %100 kabul edilen başlangıçtaki konsantrasyon iki ayın sonunda gün ışığı

ortamında saf etkin madde çözeltisinde %56,08±6,92 (ort±SH), MOX:SBEβCD kompleks çözeltisinde %69,03±4,95, MOX:HPβCD kompleks çözeltisinde %58,03±5,72 ve MOX:MβCD kompleksi çözeltisinde %52,53±4,31'e düşmüştür (Tablo 5.13-5.16). Gün ışığı ortamı için MOX:SBEβCD kompleksleri kararlılık artışı sağlamışlardır. Diğer iki ortamdaki sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, etkin madde madde kaybı saf etkin madde çözeltisinde en fazla %94,94±0,86'ya MOX:SBEβCD ve MOX:HPβCD kompleks çözeltilerinde en fazla %96,47±1,43'e düşmüştür. MOX:MβCD kompleks çözeltisine ait 25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabı sonuçlarının tamamı %100'ün üstündedir. CD komplekslerinin çözelti kararlılığı sonuçlarına göre gün ışığı ortamı için MOX:SBEβCD kompleksinin, 25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabı ortamları için MOX:MβCD kompleksinin etkin madde kararlılığı açısından daha iyi koruma sağladıkları belirlenmiştir.

6.2.7. CD komplekslerinin antimikrobiyal etkinlikleri

Moksifloksasin, streptokoklara ve stafilocoklara karşı geliştirilmiş geniş spektrumlu 8-metoksi florokonolondur ve klinikte gram negatif oküler patojenlere karşı orta ila mükemmel aktivite göstermektedir (Miller 2008). Etkili olduğu bakteriler arasında *S epidermidis*, *S aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Neisseria gonorrhoea* ve *Proteus mirabilis* gibi gram negatif ve pozitif mikroorganizmalar yer almaktadır (Hariprasad vd. 2006). Moksifloksasin gram negatif izolatlardan olan *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde de aktivite göstermektedir ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC₉₀) 2,60 mg/ml'dir. (Callegan vd. 2003) Moksifloksasin diğer tüm topikal antibiyotiklere göre çok daha yüksek potens göstermekte ve metisiline dirençli stafilocok türlerinin yok edilmesini sağlamaktadır (Dol vd. 2014). Moksifloksasin deoksiribonükleik asitin rekombinasyonu, replikasyonu, translasyonu ve onarımında rol oynayan önemli bakteriyel enzimlere (topoizomeraz II ve IV) bağlanarak bakteri üremesini durdurucu etkiye sahiptir. Her iki enzime de bağlanabilmesi ile etkinliği artmakta ve dirençli bakteriyel alt popülasyonlarına karşı olası seçiciliği azalmaktadır (Miller 2008).

Çalışmada, oküler enfeksiyonların tedavisine yönelik olarak hazırlanması amaçlanan *in situ* jelleşen sistem içerisine moksifloksasin hidroklorür'ün CD kompleksinin konulması planlanmıştır. Kompleks hazırlanmasından sonra etkin

maddenin antimikrobiyal etkinliğinde değişim olup olmadığının tespiti için, *in situ* jelleşen oftalmik çözeltilerin hazırlanmasından önce MOX:CD komplekslerinin *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri saf etkin madde etkinliği karşılaştırılmıştır. Üç kompleks ve saf etkin maddenin aynı konsantrasyonlarda (1, 10, 100 ve 500 µg/mL) ve aynı şartlarda yürütülen çalışma sonuçlarına göre, *Staphylococcus aureus* üzerinde 100 ve 500 µg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde 500 µg/mL konsantrasyondaki örneklerin zon çapları zonların çok fazla büyüyerek birleşmesi nedeniyle ölçülememiştir (Görsel 5.1-5.2). Ölçülen zon çaplarının sonuçlarına göre, *Staphylococcus aureus* üzerindeki 10 µg/mL konsantrasyondaki karşılaştırmada saf etkin maddeye göre en fazla etkinlik artışı MOX:MβCD kompleksi ile elde edilmiştir, bu çalışmada saf etkin maddenin zon çapı 33 mm iken MOX:MβCD kompleksine ait zon çapı 36 mm'dir (Tablo 5.17).

Sonuçların tümü birlikte değerlendirildiğinde, *Staphylococcus aureus* üzerinde MOX:HPβCD kompleksinin 1 µg/mL, MOX:MβCD kompleksinin 10 µg/mL; *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde MOX:HPβCD kompleksinin 1 ve 10 µg/mL, MOX:MβCD kompleksinin 1 µg/mL konsantrasyonlarında etkin maddenin aynı konsantrasyonlarına göre daha büyük zon çapları elde edilmesi ile aktivite artışı gözlenmiştir (Tablo 5.17). Aktivite artışını gösteren bu zon çaplarındaki değişim, *Staphylococcus aureus*'da 10 µg/mL C'daki MOX:MβCD kompleksi hariç (3 mm), tümünde 0.5-1 mm olarak ortaya çıkmıştır.

6.3. *In Situ* Jel Formülasyonu Çalışmaları

6.3.1. Ön formülasyonlar

Staphylococcus aureus, bakteriyel keratitin ana nedenlerinden biridir. Bununla birlikte, akut ve subakut konjuktivit, bakteriyel endoftalmi ve keratokonjuktivite gibi gözün dış enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir. *S.aureus* oküler enfeksiyonları gözde ciddi iltihaplanma, ağrı, kornea perforasyonu, skar ve görme kaybına neden olabilmektedir (Dajcs vd. 2004). Bu nedenle *S.aureus* kaynaklı keratit rahatsızlıklarının tedavisi için yeni antibiyotik formülasyonlarına ihtiyaç bulunmaktadır.

Ancak göz damlaları ile ilgili önemli bir problem, yüksek lokal ilaç konsantrasyonunun sürdürülememesidir. Oftalmik ilaçların jeller ve polimer matriste

uygulanmasının ilaçların korneaya temas süresini arttırdığı, bunun da oküler biyoyararlanımı arttıran bir durum olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte bu ilaç taşıyıcı sistemlere (jel ve polimer matris) olan hasta uyuncu tatmin edici değildir ve düşük viskoziteli göz damlaları oftalmik ilaçlar için en uygun uygulama şekli olarak görülmektedir. Hidrofilik siklodekstrinler göz korneası gibi sıkı biyolojik engellere nüfuz etmemekte, ilacın kornea yüzeyindeki kullanılabilirliklerini ve oküler biyoyararlanımını arttırmaktadır (Rasheed vd. 2008).

Poloxamer 407 (Pluronic F127) oda sıcaklığında (25°C) çözelti, vücut sıcaklığında (37°C) yarı katı bir saydam jele dönüşebilen hareketli bir viskoz sıvı olarak davranmaktadır. Toksikite verileri bu kopolimerin iyi tolere edildiğini göstermektedir. Bu nedenle rektal, vajinal, oküler, transdermal ve parenteral enjeksiyonluk preparatlarda kullanılmaktadır. Uygulandığı yerde etkin maddenin kalış süresini uzatarak terapötik etkinliği arttırmakta, uygulama sıklığını azaltmaktadır (Ruel-Gariepy ve Leroux, 2004). Hidroksipropil metil selüloz (HPMC) ise suda çözünür bir polimerdir ve HPMC jelleri daha fazla berraklığa sahiptir. Berraklığı ve viskozitesi nedeniyle, ilacın gözle temasını uzattığı için göz damlası için bir araç olarak kullanılmaktadır. Kontakt lensler için bir "ıslatma çözeltisi", yapay göz yerleştirmek için bir kayganlaştırıcı ve ayrıca teşhis için kullanımları bulunmaktadır. Oftalmik çözeltilerde klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. HPMC ayrıca, suni gözyaşı preparatlarında kuru göz tedavisi için tek başına veya diğer viskozite arttırıcı maddeler ile birlikte a/a olarak % 0.3 ila % 1 HPMC içeren çözeltiler yaygın olarak kullanılmaktadır (Khangtragool, 2014).

Sulu çözelti içinde % 15 veya daha yüksek bir konsantrasyondaki Pluronic F127, 4 °C'den 23 °C'ye veya daha yüksek bir sıcaklığa ısıtıldığında düşük viskoziteli bir çözeltiliden yarı katı bir jel haline dönüşür ve bu termojelasyon soğutma işlemiyle geri dönüşümlüdür. Termojelasyon olgusu, bir sol-gel geçiş sıcaklığı ile karakterize edilir. Yani, bu sıcaklığın altında numune akışkanken, bu geçiş sıcaklığının üstünde jel haline gelmektedir (El-Kamel, 2002).

Lakrimal sıvı, %0.9'luk bir NaCl çözeltisine karşılık gelen bir izotonisite değerine sahip olan kanla izotoniktir. İdeal olarak, oftalmik bir çözelti, bu izotonisite değerine sahip olmalıdır, ancak göz %0.6 NaCl çözeltisine kadar düşük ve %2 NaCl çözeltisinininkine kadar yüksek izotonikliği belirgin bir rahatsızlık olmadan da tolere edebilmektedir (Reddy, Sambasivarao ve Chandrasekhara, 2016).

Oftalmik ürünler steril olarak üretilmeli ve mikroorganizmalardan arındırılmalıdır. Açıldığında, multidoz bir ürününün sterilitesi kullanım süresi boyunca korunmalıdır. Oftalmik preparatlar içerisinde en yaygın kullanılan antimikrobiyal koruyucu madde benzalkonyum klorür (BK)'dür. Bununla birlikte, çözelti içinde kararlı, otoklavlamaya dayanıklı, ve genellikle %0,01 konsantrasyonunda, oftalmik formülasyonlarda kullanılan pH aralığı üzerinde etkili bir koruyucudur (Gibson, 2009).

Yukarıda verilen literatür bilgilerinden hareketle *in situ* jel formülasyonlarının geliştirilmesindeki çalışmalara, farklı % a/h oranlarında Pluronic F127 ve HPMC bileşenlerinden oluşan ön formülasyonlar ile başlanılmıştır. %18, 19, 20, 21, 23 ve 25 oranlarında Pluronic F127 (P F127), %0,5, 1, 1,5 oranlarında HPMC, %0,9 NaCl ve %0,01 BK ve distile su içeren bileşenlerle, soğuk yöntem kullanılarak toplamda 18 formülasyon hazırlanmıştır (Tablo 5.2). Pluronic F127 sıcaklıkla jelleşen bir polimer olduğu için çalışmada soğukta hazırlama yöntemi seçilmiştir (Rawat, Warade ve Lahoti, 2010). Etkin maddesiz hazırlanan formülasyonların jelleşme sıcaklıkları sonuçlarında sadece %19 PF127 ve %0,5 HPMC içeren F1905 kodlu formülasyonda jelleşme görülmemiş, diğer 17 formülasyonda 21,5-35,8 °C aralığında değişen jelleşme sıcaklıkları tespit edilmiştir (Tablo 5.18). Jelleşme sıcaklığı ölçümlerinden HPMC oranının artması ile jelleşme sıcaklığının ters orantılı olarak azaldığı izlenmiştir. Bu formülasyonlardan uygun jelleşme sıcaklığına (göz sıcaklığı olan 32-34 °C'de jelleşmenin sağlanabileceği) sahip ve etkin madde eklenmesiyle formülasyonun jelleşme sıcaklığının değişebileceği düşünülerek diğerlerine göre polimer içeriği düşük 9 formülasyon (F1805, F181, F1815, F191, F1915, F2005, F201, F2105, F211) daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir.

6.3.2. Kompleks içeren *in situ* jel formülasyonları

Ön formülasyon çalışmalarından seçilen 9 formülasyonun her birine, piyasa preparatındaki etkin madde oranında %0,5 (a/h) MOX içeren miktarlarda MOX:SBE β CD, MOX:HP β CD ve MOX:M β CD kompleksleri eklenerek *in situ* jel formülasyonları hazırlanmış ve jelleşme sıcaklıkları belirlenmiştir. MOX:SBE β CD kompleksi ile hazırlanan 9 formülasyonun hiç birinde jelleşme görülmemiş, MOX:HP β CD kompleksi ile hazırlanan bir formülasyonda (F211) 27,4°C'de jelleşme gözlenmiş, MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanan 5 formülasyonda jelleşme

gözlenmiştir (F1805-35,0 °C, F181-30,2 °C, F1815-28,1 °C, F1915-32,5 °C, F2105-41,5 °C) (Tablo 5.19). Jelleşmelerin MOX:MβCD kompleksi ile hazırlanan formülasyonlarda ortaya çıkmış olması, bu kompleksin çözünürlük, kararlılık açılarından ve katı hal karakterizasyon sonuçlarına göre kompleksleşmenin diğer komplekslere göre daha kuvvetli olması açısından isabetli olmuştur. MOX:MβCD kompleksi ile hazırlanarak jelleşme gösteren formülasyonlardan jelleşme sıcaklığı 32 °C'ye en yakın olan üç formülasyon (F181, F1815, F1915) ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Daha sonra saf etkin madde ile hazırlanacak olan *in situ* jel formülasyonları ile karışıklığa yol açmaması için bu üç formülasyonun kodları F181-MβCD, F1815-MβCD, F1915-MβCD olarak belirlenmiştir (Tablo 5.20).

Literatürde gözün ortalama sıcaklığı $34,51 \pm 0,82$ °C olarak belirtilmektedir, aynı zamanda normal bir oküler yüzey sıcaklığının 32,9 ila 36°C arasında değiştiği gösterilmektedir (Purslow ve Wolffsohn, 2005; Tkáčová, Živčák ve Foffová, 2011). Bu nedenle 32-36 °C arasında jelleşmesi beklenen formülasyonlarımızın jel geçiş sıcaklığına *test tüpü eğme yöntemi* kullanılarak bakılmıştır. Test tüpü eğme yönteminde, sıcaklık zamanla kademeli olarak arttırılarak faz geçişi görsel olarak kaydedilmekte ve böylece jel geçiş sıcaklığı belirlenmektedir (Nirmal vd, 2010).

Bir literatürde geliştirilen moksifloksasin HCl içeren oftalmik *in situ* jel sisteminin pH değerinin ortalama 6,5 civarında olduğu ve bu değeri gözün tolere edebileceği rapor edilmiştir (Mandal vd., 2012). Başka bir literatürde ise piyasa preparatı olan Vigamox[®]'un pH değeri 6,8 olarak gösterilmiştir (Miller 2008).

F181-MβCD, F1815-MβCD, F1915-MβCD formülasyonları hazırlanarak pH değerleri ve jelleşme sıcaklıkları ölçüldüğünde, F181-MβCD'nin 5,27 pH ve 30,2 °C jelleşme sıcaklığına, F1815-MβCD'in 5,35 pH ve 28,2 °C jelleşme sıcaklığına, F1915-MβCD'in 5,31 pH ve 32,5 °C jelleşme sıcaklığına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.21). Gözün tolere edebileceği pH değeri aralığı 4-8 olmakla birlikte, gözün daha rahat tolere edebilmesi için formülasyonların pH değerleri 0,1 N NaOH ile 6,5'e ayarlanmıştır (Baranowski vd. 2014). pH'nın 6,5'a ayarlanmasından sonra ölçülen pH ve jelleşme sıcaklıkları şöyle bulunmuştur: F181-MβCD'nin 6,51 pH ve 32,8 °C jelleşme sıcaklığı, F1815-MβCD'in 6,43 pH ve 28,4 °C jelleşme sıcaklığı, F1915-MβCD'in 6,34 pH ve 35,1 °C jelleşme sıcaklığı (Tablo 5.21). Elde edilen sonuçlara göre pH ayarlaması için ilave edilen 0,1 N NaOH, formülasyonların jelleşme sıcaklıklarını arttırmıştır. Ancak

artmış olan jelleşme sıcaklıkların gözde jelleşme için uygun oldukları değerlendirilerek çalışmalara devam edilmiştir.

F181-M β CD, F1815-M β CD, F1915-M β CD formülasyonları üzerinde *in vitro* salım, kararlılık ve antimikrobiyal aktivite testleri yapılması planlanmıştır. Bu testlerden önce formülasyonlarda fiziksel görünüş, jelleşme kapasitesi ve etkin madde miktar tayini incelemeleri yapılmış, elde edilen sonuçlara göre; her üç formülasyonun da berrak ve homojen görünüşte olduğu, jelleşme kapasitesi değerlendirmelerinde jelleşmenin hemen oluşarak birkaç saat sürdüğü belirlenmiştir. Formülasyonların 1 ml'sindeki MOX miktarları ise, F181-M β CD'de 4,49 mg, F1815-M β CD'de 4,94 mg, F1915-M β CD'de 4,65 mg bulunmuştur.

Oftalmik bir preparat steril olmayan maddelerden formülasyon haline getirildiğinde, sonuç ürünün sterilize edilmesi gerekmektedir. Nihai ambalajında otoklavlama ile sterilizasyon (terminal sterilizasyonu), ürünün kararlılığının olumsuz etkilenmemesi durumunda uygun kalite kontrol prosedürlerine uyulması şartıyla bazı ürünler için mümkün olabilmektedir. Oftalmik preparatların 0,22 μ m'lik steril bir filtreden steril ambalajına süzülmesi en yaygın kullanılan yöntemdir (Sandle, 2014).

Oküler preparatların steril olma zorunluluğu nedeniyle, geliştirilecek her oküler formülasyonlar için uygun bir sterilizasyon yöntemi belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmada, formülasyonların çözelti formunda olması ve sanayide yaygın kullanımı nedeniyle sterilizasyon için öncelikli olarak steril filtrasyon yöntemi değerlendirilmiştir. Formülasyonlar uygun şekilde hazırlanıp pH ayarlaması yapıldıktan sonra 0,22 μ m por çapına sahip steril membran filtre ile süzülerek karakterizasyonlarında değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Fiziksel görünüş, pH, jelleşme sıcaklığı ve jelleşme kapasitelerinin steril filtrasyon sonrası değişmemesi nedeniyle formülasyonlar için sterilizasyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

6.3.2. *In vitro* salım ve salım kinetiği

MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanan F181-M β CD, F1815-M β CD, F1915-M β CD kodlu *in situ* jel formülasyonları ile saf moksifloksasin (MOX), saf moksifloksasin içeren F181-MOX, F1815-MOX ve F1915-MOX kodlu *in situ* jel formülasyonlarının diyaliz membran ile yapılan *in vitro* salım çalışmalarından elde edilen zamana karşı yüzde kümülatif çözünen etkin madde miktarları değerlendirildiğinde şu sonuçlar ortaya çıkmıştır. 34 °C'deki çalışma sıcaklığında

çözelti formunda bulunan MOX'un salım profili hızlı salım göstererek 1 saatte %100'e ulaşmıştır. Saf etkin madde ve kompleksler ile hazırlanan *in situ* jel formülasyonları da çalışma sıcaklığında jelleşmelerine bağlı olarak birbirlerine benzer ve saf etkin maddeye göre daha yavaş salım göstermişlerdir. *In situ* jel formülasyonları jel sistemden etkin madde salım mekanizmasındaki farklılığa bağlı olarak, 1 saatte %55-72 arasında değişen ve 2 saatte %69-82 arasında değişen salım değerleri göstermişler, salım profilleri 72 saate kadar aynı seviyede devam etmiştir. F181-M β CD formülasyonunda 6. saate kadar salımda artış gözlenmiş, 6. saatte sabitlenmiştir ve 2. saatte patlama etkisi (burst effect) görülmüştür. Hazırladığımız diğer *in situ* jel formülasyonları monofazik salım karakteristiği gösterirken, F181-M β CD formülasyonu farklı olarak bifazik salım profili göstermiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde F181-M β CD formülasyonu ile diğer jel formülasyonlarına kıyasla uzatılmış salım elde edilmiştir.

Elde edilen salım verilerinin uyum gösterdikleri kinetik modeller DDSolver programı ile belirlenmiştir (Zhang vd., 2010). Salım profillerinin platoya ulaştığı süreye kadar olan veriler (F181-M β CD için 0-6 s, diğerleri için 0-2 s) program yardımıyla sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine uygulanmıştır. En uygun kinetik modelin seçimi için salım verilerinin hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2), model seçme kriteri (MSC) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) değerlerine bakılmıştır (Öztürk, 2017). En yüksek k, r^2 , MSC değerleri ile en düşük AIC verilerine göre, MOX'un birinci derece kinetik modele, formülasyonların ise Korsmeyer-Peppas kinetik modeline uyum gösterdiği belirlenmiştir.

Korsmeyer-Peppas modeli, polimerik materyallerden etkin madde salımını tanımlamaktadır. Bu modele uyum gösteren sistemlerde etkin madde, difüzyon ya da polimer erozyonu ile açığa çıkmaktadır (Peppas ve Sahlin, 1989). Bu modele ait "n" difüzyon sabiti ise, dozaj şeklinin biçimine bağlı olarak salım mekanizmasına ait bir katsayıyı göstermektedir. DDSolver programı ile elde edilen bu sabit tüm *in situ* jelleşen formülasyonlarda 0,22-0,44 arasında değişen değerler almıştır. Literatüre göre "n" difüzyon sabitinin bu değerleri, etkin maddenin difüzyon ile salımının yanı sıra polimerik gevşemenin de olduğunu belirtmektedir (Ritger ve Peppas, 1987).

6.3.3. *In situ* jel formülasyonlarının kararlılığı

Farmasötik formülasyonların kullanıma kadar ve kullanım süresi boyunca etkin madde ve formülasyonun kararlılığını sürdürmeleri gerekmektedir. Kararlılık

çalışmaları formülasyonların etkinlik ve güvenliğinin raf ömrü boyunca korunduğunun göstergesi ve güvencesi olarak son derece önemli çalışmalardır.

Çalışmada *in situ* jel formülasyonlarının kararlılığının incelenmesi amacıyla, piyasa preparatına uygun olarak %0,5 a/h oranında etkin madde içerecek miktarda MOX:MβCD kompleksi ile hazırlanmış olan üç farklı formülasyon (F181-MβCD, F1815-MβCD ve F1915-MβCD) 4°C buzdolabı ve 25±2 °C kararlılık kabini içinde ışıktan korunarak üç ay boyunca kararlılık açısından değerlendirilmiştir (ICH Q1A-R2, 2003). Kararlılık takibinde başlangıç zamanında, 15., 30., 60. ve 90. günde formülasyonların fiziksel görünüşleri, etkin madde miktarları ile pH değerleri; başlangıç zamanında, 30., 60. ve 90. gün, oda sıcaklığına ve göz sıcaklığına uygun olarak 25 ve 34 °C’lerde ölçülen viskozite değerleri ile reolojik davranışları; 90. günün sonunda jelleşme kapasiteleri ve jelleşme sıcaklıkları ölçülmüştür (Dol vd. 2014).

Kararlılık çalışmalarına ait elde edilen sonuçlarda siyah ve beyaz arka fonda görsel olarak incelenen formülasyonların berrak ve homojen görünüşleri ile fiziksel görünüşlerini çalışma süresince korudukları belirlenmiştir (Gupta vd. 2007). Çalışma süresince valide HPLC yöntemi ile analiz edilen etkin madde miktarlarına göre tüm formülasyon ve her iki çalışma ortamında, etkin madde kaybının 3. ayın sonuna kadar %1’den fazla olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 5.25). Üç ay sonunda formülasyonlardaki etkin madde miktarlarındaki değişimler istatistiksel olarak GrapPad programı ve Two Way Anova testi ile değerlendirildiğinde de değerler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 5.22-5.23).

Kararlılık çalışmalarının 3. ay sonundaki pH değerleri göre; F181-MβCD formülasyonun başlangıçtaki 6,51±0,00 olan pH değerinin 25±2 °C’de 6,46±0,003’e, 4 °C’de 6,47±0,00’a; F1815-MβCD formülasyonun başlangıçtaki 6,43±0,003 olan pH değerinin 25±2 °C’de 6,35±0,00’a, 4 °C’de 6,40±0,00’a; F1915-MβCD formülasyonun başlangıçtaki 6,34±0,00 olan pH değerinin 25±2 °C’de 6,28±0,005’e, 4 °C’de 6,29±0,003’e düştüğü görülmüştür (Tablo 5.26). Üç ay sonunda formülasyonlardaki pH değişimleri istatistiksel olarak GrapPad programı ve Two Way Anova testi ile değerlendirilmiş ve değerler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 5.23-5.24). Etkin madde miktar tayini ve pH değerlerine ait sonuçlar formülasyonların kimyasal kararlılıklarında değişim olmadığını göstermektedir.

Başlangıç zamanında ve 90. gün 25 ve 34 °C’lerde 60 rpm’de ölçülen viskozite değerlerine göre; üç formülasyonun (F181-MβCD, F1815-MβCD ve F1915-MβCD) her

iki saklama sıcaklığında ve her iki ölçüm sıcaklığında başlangıçtan itibaren üçüncü ayın sonuna kadar viskozitede büyük kayıplar görülmüştür (Tablo 5.27). Elde edilen sonuçlarda 4 °C’de bekletilen formülasyonların birinci ay sonuna kadar viskozitelerindeki değişikliklerin düşük olduğu tespit edilmiştir. Viskozite değerlerindeki kayıplara karşın formülasyonlar çözelti formlarını korumakla birlikte, reolojik ölçümler ve göze uygulanış için uygun viskozite gösterebilmişlerdir. Bununla birlikte viskozite değerleri arasındaki farkların anlamlı olup olmadığının belirlenebilmesi için istatistiksel değerlendirmelere ihtiyaç bulunmaktadır.

Viskozitedeki değişimlerin sistemin reolojik davranışına etkisinin izlenmesi için ölçümler esnasında alınan reogramlar değerlendirilmiştir. Şekil 5.25-5.30 arasındaki yer alan reogramlar incelendiğinde, başlangıç reogramlarında tüm formülasyonların 0-400 rpm aralığında 25 °C’de yapılan ölçümlerinde bu sıcaklıklardaki çözelti formlarına uygun olarak sabit viskozite değerleri ile Newton akış modeline uyum gösterdikleri, 34 °C’de yapılan ölçümlerinde bu sıcaklıklardaki jel formlarına uygun olarak kayma hızı arttıkça azalan viskozite değerleri ile Psödoplastik akış modeline uyum gösterdikleri tespit edilmiştir. Üç ay boyunca kaydedilen reogramlarda ise, 25 °C’de bekletilen formülasyonların 25 °C’deki reogramlarında; F181-MβCD’in 3 ay boyunca Newton modelini koruduğu, F1815-MβCD ve F1915-MβCD’in ilk 2 ay Newton akış davranışını koruduğu, 3. ay sonunda plastik akış geçtiği, 34 °C’deki reogramlarında; F181-MβCD’in ilk iki ay psödoplastik üçüncü ay plastik, F1815-MβCD’in ilk 2 ay Newton, 3. ay plastik, F1915-MβCD’in ilk ay Newton, 2. ve 3. aylarda psödoplastik akış modeline uyum gösterdiği izlenmiştir (Şekil 5.25-5.30). 4 °C’de bekletilen formülasyonların 25 °C’deki reogramlarında; F181-MβCD, F1815-MβCD ve F1915-MβCD’in 2 ay Newton son ay plastik, 34 °C’deki reogramlarında; değişken akış modelleri gösterdikleri görülmüştür (Şekil 5.25-5.30). Sonuçta 25 °C’deki reogramlara göre tüm formülasyonların iki ay boyunca, beklenildiği gibi Newton akış modelini korudukları ancak 34 °C’deki reogramların sürekli değişkenlik göstermesi nedeniyle bu sıcaklıktaki reogramlara göre genel bir sonuç belirtmenin güvenli olmayacağı değerlendirilmiştir.

In situ jelleşen sistemler için önemli karakterizasyonlardan olan jelleşme kapasitesi ve jelleşme sıcaklıklarına ait sonuçlar değerlendirildiğinde, üçüncü ay sonundaki jelleşmenin F1815-MβCD formülasyonunda başlangıçtakine uygun olarak

hemen oluşarak birkaç saat sürdüğü belirlenmiştir. F181-M β CD ve F1915-M β CD formülasyonlarının jelleşme sıcaklıkları değiştiği için jelleşme kapasitesi çalışmasında jelleşme gözlenmemiştir. F181-M β CD, F1815-M β CD ve F1915-M β CD formülasyonlarının başlangıçtaki jelleşme sıcaklıkları sırasıyla 32,8, 28,4 ve 35,1 °C'dir. 25 °C'de bekletilen formülasyonların jelleşme sıcaklıklarının sırasıyla 38,7, 33,9, 46,1 °C'ye yükseldiği, yine benzer şekilde 4 °C'de bekletilen formülasyonların jelleşme sıcaklıklarının sırasıyla 34,8, 31,2, 38,5 °C'ye yükseldiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre 25°C'de bekletme formülasyonların jelleşme sıcaklıklarında 5-6 °C yükselmeye, 4 °C'de bekletme ise 2-3 °C yükselmeye neden olmuştur. Bu sıcaklık yükselmelerinin viskoziteye ve 34 °C'deki reogramlara olumsuz yansımaları yukarıdaki sonuçlarda izlenmiştir. Üç ayın sonundaki jelleşme sıcaklıklarına göre oftalmik uygulamada sıcaklıkla jelleşmenin sağlanabilmesi açısından ve diğer kararlılık değerlendirmelerine göre F181-M β CD ve F1815-M β CD formülasyonları uygun olarak değerlendirilmiştir.

6.3.4. *In situ* jel formülasyonlarının antimikrobiyal etkinlikleri

Kompleksler üzerinde yapılan antimikrobiyal etkinlik çalışmalarına ait sonuçlarda, *Staphylococcus aureus* üzerindeki etkinliğin *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde elde edilen etkinlikten daha fazla olması ve oftalmik enfeksiyonlarda *Staphylococcus aureus*'un sıklıkla görülmesi nedeniyle, *in situ* jel formülasyonları ile yapılan antimikrobiyal testler sadece *Staphylococcus aureus* ile yürütülmüştür. Ayrıca kompleksler ile yapılan antimikrobiyal testlerde 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda ölçülemeyen büyüklüklerde zon çapları oluşması nedeniyle, bu bölümdeki çalışmalarda 1, 4, 7 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda çalışılmıştır.

Çalışmada 1, 4, 7 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda etkin madde içeren, saf etkin madde çözeltilisi (MOX), piyasa preparatı (Vigamox®), saf etkin madde ile hazırlanmış *in situ* jel formülasyonları (F181-MOX, F1815-MOX ve F1915-MOX), MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanmış *in situ* jel formülasyonları (F181-M β CD, F1815-M β CD ve F1915-M β CD) ve plasebo formülasyon aynı şartlarda inkübasyona bırakılarak sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, plasebo formülasyon ile beklenen şekilde zon görülmemiş; Vigamox® ile 4 µg/mL'de 15,0 mm, 7 µg/mL'de 22,5±2,5 ve 10 µg/mL'de 25,5±1,5 mm zon çapı; MOX'un 1 ve 4 µg/mL'sinde zon görülmezken, 7 ve

10 µg/mL’de sırasıyla 15,5±0,5 ve 21,0±1,41 mm (ort±SH) zon çapı elde edilmiştir. F181-MOX ve F1815-MOX sadece 10 µg/mL’de, sırasıyla 21,0±1,0 ve 18,5±3,5 mm zon çapı oluşturmuştur. F1915-MOX, F181-MβCD, F1815-MβCD ve F1915- MβCD, 7 µg/mL’de sırasıyla 16,5±0,5, 14,5±0,5, 18,0±2,0 ve 13,5±0,5 mm; 10 µg/mL’de sırasıyla 22,5±1,5, 22,5±1,4, 25,0±0,0 ve 19,0±0,0 mm zon çapı göstermiştir (Tablo 5.29). F181-MOX ve F1815-MOX’da 7 µg/mL’de zon görülmezken aynı formülasyonların kompleksler ile hazırlanmış şekilleri olan F181-MβCD ve F1815-MβCD’de sırasıyla 14,5±0,5, 18,0±2,0 mm zon çapı eldesi ve yine F181-MOX ve F1815-MOX’da 10 µg/mL’de sırasıyla 21,0±1,0, 18,5±3,5 mm zon görülürken, F181-MβCD ve F1815-MβCD’de sırasıyla zon çaplarının 22,5±1,4, 25,0±0,0 mm’ye yükselmesi, CD ile kompleksleşmenin etkin maddenin antimikrobiyal etkinliğinde artış sağladığını göstermiştir. Bu bulgular saf kompleksler ile saf etkin maddenin karşılaştırıldığı antimikrobiyal test sonuçları ile de uyumludur.

Piyasa preparatının zon çapları, tüm formülasyonlardan daha yüksektir. Buna neden olarak piyasa preparatındaki etkin madde kaynağının farklı olması ve piyasa preparatında çalışmada geliştirilen formülasyonlardan farklı olarak benzalkonyum klorür koruyucusunun bulunmamasının olduğu düşünülmüştür (Miller 2008). Bu nedenle formülasyonlara ait antimikrobiyal sonuçlar saf etkin maddeye ait sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda, 7 µg/mL’de F1915-MOX ve F1815-MβCD’nin MOX’dan daha yüksek, 10 µg/mL’de F1915-MOX, F181-MβCD ve F1815-MβCD’nin MOX’dan daha yüksek zon çapına sahip olduğu görülmüştür. Sadece 10 µg/mL’de F181-MβCD’nin, her iki konsantrasyonda da F1815-MβCD’nin MOX’dan daha yüksek etkinlik göstermesi bu iki formülasyonun ileri araştırmalar için aday olabileceklerini göstermiştir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın tamamından elde edilen verilere göre aşağıda belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır:

-HPLC yöntem validasyonunda incelenen doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, seçicilik ve kararlılık parametrelerinden elde edilen sonuçların, ICH kılavuzlarında yer alan analitik validasyon kriterlerine uygunluk göstermesi ile yöntemin çalışmada güvenli olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir.

-SBE β CD, HP β CD, M β CD ile yapılan çözünürlük faz çalışmaları ile Bs tipi faz diyagramlarına uygunluk gösterdikleri belirlenerek, sitokiyometrik hesaplamalar ile etkin madde ve CD'lerin kompleksleşebilecekleri molar oranlar sırasıyla 1:15, 1:11 ve 1:3 olarak bulunmuştur.

-MOX:CD kompleksleri liyofilizasyon yöntemi ile katı formda başarı ile hazırlanarak, IR, DSC, NMR ve XRD ile yapılan katı hal karakterizasyon çalışmalarında inklüzyon komplekslerinin oluştuğu gösterilmiştir.

-SBE β CD, HP β CD ve M β CD kompleksleri ile etkin madde çözünürlük değerinde sırasıyla 4,2, 4,6 ve 5,5 kat artış sağlanmıştır.

-CD kompleksleriyle hazırlanan sulu çözeltilerin 2 ay boyunca gün ışığı, 25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabında bekletilmesi sonrasında yapılan miktar tayini sonuçlarında gün ışığında bekletilen çözeltilerin etkin madde miktarında 3. günden itibaren azalma görüldüğü ve 2. ayın sonunda etkin maddenin yaklaşık %50 oranında azaldığı saptanmıştır.

-CD komplekslerinin çözelti kararlılığı sonuçlarına göre gün ışığı ortamı için MOX:SBE β CD kompleksinin, 25 °C karanlık ve 4 °C buzdolabı ortamları için MOX:M β CD kompleksinin etkin madde kararlılığı açısından daha iyi koruma sağladıkları belirlenmiştir.

-MOX:CD kompleksleri ve saf etkin madde ile 1 ve 10 μ g/mL konsantrasyonlarda hazırlanan MOX içeren çözeltiler ile *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde yapılan antimikrobiyal etkinlik çalışmasında ölçülen zon çaplarına göre, MOX:HP β CD kompleksi ile zon çaplarında 1 mm büyüme görülürken, en fazla zon çapı büyümesi (3 mm artış) MOX:M β CD kompleksi ile 10 μ g/mL C'da *Staphylococcus aureus* üzerinde elde edilmiştir.

-*In situ* jel formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen ön formülasyon çalışmalarında, Pluronic F127 polimerinin %18, 19, 20, 21 a/h, HPMC'nin

%0,5, 1, 1,5 a/h oranlarında kullanılması ile uygun jelleşme kapasitesi ve jelleşme sıcaklıklarının elde edilebildiği bulunmuştur.

-Ön formülasyonlara %0,5 a/h oranında etkin madde ilavesi amacıyla hesaplanan miktarlarda MOX:SBE β CD, MOX:HP β CD, MOX:M β CD komplekslerinin eklenmesinden sonra sadece MOX:M β CD kompleksi ile istenilen jelleşme özelliklerinin sağlanabildiği tespit edilmiştir.

-MOX:M β CD kompleksi içeren *in situ* jel formülasyonlarının pH'sının 0,1 N NaOH ile pH 6,5'e ayarlanması ile formülasyon özelliklerinin istenilen sınırlar içinde sağlanabildiği saptanmıştır. Geliştirilen *in situ* jel formülasyonlarının 0,22 μ m por çapına sahip steril membran filtre ile sterilizasyonunun sağlanabileceği belirlenmiştir.

-Ön formülasyon çalışmalarının sonuçlarına göre F181-M β CD, F1815-M β CD ve F1915-M β CD kodlu formülasyonların uygun fiziksel görünüş, pH, jelleşme kapasitesi ve jelleşme sıcaklığı değerlerine sahip olduğu ve *in vitro* salım, kararlılık, *in situ* jel formülasyonlarında antimikrobiyal etkinlik çalışmalarına bu formülasyonlar ile devam edilmesinin uygunluğu belirlenmiştir.

-*In vitro* salım çalışmalarına sonuçlarına göre, saf etkin madde 1 saatte %100 kümülatif salım ile hızlı, *in situ* jel formülasyonları ise 2 saatte %69-82 ve 72 saate kadar aynı seviyelerde kalan daha yavaş bir salım göstermişlerdir.

-Saf etkin maddenin kinetik modeli, hızlı salım profiline uygun olarak birinci derece, *in situ* jelleşen sistemlerin kinetik modelleri ise salımda difüzyon ve erozyonun birlikte yer aldıkları Korsmeyer-Peppas modele uyum göstermişlerdir.

-MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanan *in situ* jelleşen formülasyonların 25 °C ve 4 °C'de yürütülen kararlılık çalışmalarına göre, F181-M β CD, F1815-M β CD ve F1915-M β CD kodlu formülasyonların fiziksel görünüş, etkin madde miktarı, pH değerleri açısından kararlılıklarını korudukları tespit edilmiştir.

-Kararlılık çalışmalarında üçüncü ayın sonunda ölçülen jelleşme sıcaklıklarında başlangıç değerlerine göre artışlar tespit edilmiştir. Bu bulgulara paralel olarak da F181-M β CD, F1815-M β CD ve F1915-M β CD kodlu formülasyonların üç aylık kararlılık çalışmaları sonucunda 1-2 ay içerisinde viskozitelerinde düşüş ve uyum gösterdikleri akış modellerinde değişim görülmüştür.

- *In situ* jelleşen formülasyonların kararlılık çalışması sonuçlarının tamamı birlikte değerlendirildiğinde, F181-M β CD, F1815-M β CD kodlu formülasyonların uygun olduğu belirlenmiştir.

-MOX:M β CD kompleksi ile hazırlanan *in situ* jel formülasyonları ile saf MOX'un antimikrobiyal etkinliklerinin karşılaştırılmasında, F181-M β CD ve F1815-M β CD kodlu *in situ* jel formülasyonlarının saf MOX'dan daha yüksek etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Ancak MOX:CD inklüzyon komplekslerinin hazırlanması ile saf etkin maddeden daha yüksek olarak elde edilen antimikrobiyal etkinlik sonuçlarının, etkin maddenin mikroorganizmalar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonlarına olan etkilerinin incelenmesi için ilave testlere ihtiyaç bulunmaktadır.*

KAYNAKÇA

Aigner, Z., Berkesi, O., Farkas, G., Szabó-Révész, P. (2012) DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by co-grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 62-67.

Akçakoca E. P., Atav R., (2006). Siklodekstrinlerin İnküzyon Kompleksleri. *Tekstil ve Konfeksiyon* 2, s 94-99.

Aldrich D.S., Bach, C.M., Brown, W., Chambers, W., Fleitman, J., Hunt, D.R., Marques M.R.C., Mille Y., Mitra, A.K., Platzer, S.M.; *et al.* Ophthalmic Preparations. US Pharmacopeial Convention. **2013**, 39, 1–21. Available online: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/meetings/workshops/ophthalmicpreparations.pdf (erişim tarihi: 10 şubat 2019).

Almeida H., Amaral M. H., Lobaço P. and Sousa Lobo J. M. (2014). *In situ* gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discovery Today* Volume 19, Number 4 S:400-412.

Al Omari M.M.H., Jaafari D.S., Al-Sou'od K.A ve Badwan A.A., (2014). Chapter 7: Moxifloxacin Hydrochloride. Edited by Harry G. Brittain. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, Volume 39 içinde (s. 299-431), 2014 Elsevier Inc.

Arajuo, D.R., Assuncao Braga A.F, Moraes C. M., Fraceto, L.F., Paula, E. (2006). Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 56(5), 495-506.

Aramă C, Nicolescu C, Nedelcu A, Monciu CM. (2011). Synthesis and characterization of the inclusion complex between repaglinide and sulfobutylether- β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70: 421-428.

Baranowski P., Karolewicz B., Gajda M., and Pluta J., (2014). Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 861904, 14

Bartzoka E. D., Crestini C. and Lange H. (2015). Chapter 5: Biomass Derived and Biomass Inspired Polymers in Pharmaceutical Applications. V.K. Thakur and M. K. Thakur (Editors), *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies Volume 3 Biodegradable Polymers* içinde (s. 145) Scrivener Publishing USA.

Bekers, O., Uijtendaal, E.V., Beijnen, J.H. (1991). Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 17: 1503-1549.

Bozkır A., Denli Z.F. ve Başaran B., (2012). Effect Of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin On The Solubility, Stability And *In-Vitro* Release Of Ciprofloxacin For Ocular Drug Delivery. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, Vol. 69 No. 4 pp. 719n724.

Cal K., Centkowska K. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68: 467-478.

Callegan MC, Ramirez R, Kane ST, Cochran DC, Jensen H. (2003). Antibacterial activity of the fourth-generation fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against ocular pathogens. *Advances in Therapy* 20(5): 246-252.

Cappello B., Iervolino M., Miro A., Chetoni P., Burgalassi S. And Saettone M. F. (2002). Formulation and Preliminary in vivo Testing of Rufloxacin-Cyclodextrin Ophthalmic Solutions. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 44: 173–176.

Castillo JA, Palomo-Canales J, Garcia JJ, Lastres JL, Bolas F, Torrado JJ. (1999). Preparation and characterization of albendazole b-cyclodextrin complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 25(12):1241-1248.

Chadhaa R., Balaa M., Aroraa P., Jainb D.V.S., Pissurlenkarc R. R.S, Coutinho E. C., (2014). Valsartan inclusion by methyl- β -cyclodextrin: Thermodynamics, molecular modelling, Tween 80 effect and evaluation. *Carbohydrate Polymers* 103 (s.300– 309).

Challa R., Ahuja A., Ali J. and Khar R.K., (2005). Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech*; 6 (2) Article 43, s E329-E357.

Chao J, Liu Y, Zhang Y, Zhang J, Zhang Y, Guo Z, Wang Y, Qin L, Zhang B. (2014) Investigation of the inclusion behavior of ofloxacin with methyl β cyclodextrin. *J Mol Liq*, 200: 404-409.

Charoenchaitrakool M, Dehghani F, Foster NR. (2002). Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. 239: 103-112.

Chaudhary V.B., Patel J.K., (2013). Cyclodextrin Inclusion Complex To Enhance Solubility Of Poorly Water Soluble Drugs: A Review. *Chaudhary & Patel, IJPSR, 2013; Vol. 4(1): 68-76*.

Cheirsilp B., Rakmai J., (2016). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biol Eng Med*, Volume 2(1): 1-6.

Cohen S., Lobel E., Trevgoda A. ve Peled Y. (1997). A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye. *Journal of Controlled Release*, 44, 201-208.

Corciova A., Ciobanu C., Poiata A., Mircea C., Nicolescu A., Drobeta M., Varganici C.D., Pinteala T. ve Marangoc N. (2015). Antibacterial and antioxidant properties of hesperidin: β -cyclodextrin complexes obtained by different techniques. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 81(1-2), 71-84.

Cunda-Filho MS, Dacunha-Marinho B, Torres-Labandeira JJ, Martinez-Pacheco R, Landin M. (2007). Characterization of α -lapachone and methlated α -cyclodextrin solid-state systems. *AAPS PharmSciTech*, 8:E60.

Çelebi, N. (1987). Siklodekstrinler I Özellikleri, Hazırlama Yöntemleri ve Klatrat Bileşikleri. *FABAD Farm. Bil. Der.* 12, 5. 15.

Dajcs JJ, Thibodeaux BA, Marquart ME, Girgis DO, Traidej M ve O'Callaghan RJ. (2004). Effectiveness of ciprofloxacin, levofloxacin, or moxifloxacin for treatment of experimental staphylococcus aureus keratitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6): 1948-1952.

Das SK, Kahali N, Bose A, Khanam J. (2018). Physicochemical characterization and in vitro dissolution performance of ibuprofen-Captisol[®] (sulfobutylether sodium salt of α -CD) inclusion complexes. *Journal of Molecular Lipids* 261: 239-249.

Davies N.M., Wang G., Tucker I.G., (1997). Evaluation of a hydrocortisone: hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 156 (1997) 201–209.

Del Amo, E. M. Urtti, A. (2008). Current and future ophthalmic drug delivery systems: a shift to the posterior segment. *Drug Discovery Today*, vol. 13, no.4, pp 135–143.

Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39: 1033-1046.

Demirel M., Büyükköroğlu G., Kalava B.S., Yazan Y. (2006). Enhancement in Dissolution Pattern of Piribedil by Molecular Encapsulation with β -Cyclodextrin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006, 28(2): 83-88.

Demirel, M., Yurtdaş, G. and Genç, L. (2011). Inclusion complexes of ketoconazole with beta-cyclodextrin, physicochemical characterization and in vitro dissolution behaviour of its vaginal suppositories, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 70 s.437-445.

Deng Y., Pang Y., Guo Y., Ren Y., Wang F., Liao X. Ve Yang B. (2016). Host-guest inclusion systems of daidzein with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD): Preparation, binding behaviors and water solubility. *Journal of Molecular Structure* 1118 (s. 307-315).

Destruel P. L., Zeng N., Maury M., Mignet N. and Boudy V. (2017). In vitro and in vivo evaluation of in situ gelling systems for sustained topical ophthalmic delivery: state of the art and beyond. *Drug Discovery Today* _ Volume 22, Number 4 _ April 2017. S638-651.

Deygen I. M., Egorov A. M., and Kudryashova E. V., (2016). Structure and Stability of Fluoroquinolone-(2-Hydroxypropyl)- β -Cyclodextrin Complexes as Perspective Antituberculosis Drugs. *Moscow University Chemistry Bulletin*, Vol. 71, No. 1, (s. 1–6).

Dhanapal R. and Ratna J.V. (2012). Ocular Drug Delivery System – A Review. *International Journal of Innovative Drug Discovery*, Ramaiyan Dhanapal. / Vol 2/ Issue 1/ 2012/ 4-15.

Dol H., Gandhi S., Pardhi D. and Vyawahare N., (2014). Formulation and evaluation of *in situ* ophthalmic gel of moxifloxacin hydrochloride. *The Pharma Innovation Journal* 2014; 3(5): 60-66.

Dorofeev VL, Arzamastsev AP, Veselova OM. (2004). Melting point determination for the analysis of drugs of the fluoroquinolone group. *Pharm Chem J*, 38: 333-335.

Duchene D. (2011). Cyclodextrins And Their Inclusion Complexes. Edited by Erem Bilensoy. *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications, First Edition* içinde (s.3-18) Published by John Wiley & Sons, Inc.

El-kamel, A.H. (2002). In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutics*, 241 (1), 47-55.

Ferdig M, Kaleta A, Buchberger W. (2005). Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples, *J. Sep. Sci.* 28: 1448–1456.

Gibson M., (2009). Chapter 12:Ophthalmic Dosage Forms. Edited by Mark Gibson *Pharmaceutical Preformulation and Formulation Vol. 19* içinde (s. 431-455) Informa Healthcare USA, Inc.

Gupta, H., Jain, S., Mathur, R., Mishra, P., Mishra, A.K. ve Velpandian, T. (2007). Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel system. *Drug Delivery*, 14 (8), 507-515.

Güleç K, Demirel M. (2016). Characterization and antioxidant activity of quercetin/methyl- β -cyclodextrin complexes. *Current Drug Delivery*, 13: 444-451.

Hariprasad SM, Shah GK, Mieler WF. (2006). Vitreous and aqueous penetration of orally administered moxifloxacin in humans. *Arch Ophthalmol*, 124(2): 178-182.

Higuchi, T., Connors, K.A. (1965). Phase-Solubility Techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 4: 117-212.

ICH Q1A-R2, (2003). International Conference On Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing Of New Drug Substances And Products.

ICH Q2A-R2, (2005), International Conference On Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology.

ICH Q2B, (1996). International Conference On Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guidance for industry, validation of analytical procedures, methodology.

Irie, T., Uekama, K. (1997) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of pharmaceutical Sciences*, 86 (2), 147-162.

İzğü E., (1983). Bölüm 7: Oftalmik Çözeltiler. Genel – Endüstriyel Farmasötik Teknoloji –II ve İlaç Sanayiinde Organizasyon Uluslararası İyi İmalat (Gmp)- Kontrol (Glp) Koşulları Fabrika ve Çalışma Güvenliği. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları* No: 55 (s 142-150).

Jain, S.P., Shah, S.P., Rajadhyaksha, N.S. (2008). In situ ophthalmic gel of ciprofloxacin hydrochloride for once a day sustained delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 34: 445-452

Jambhekar S.S., Breen P., (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discovery Today*, Volume 21, Number 2.

Jambhekar S.S., Thomas C. M., (2013). Cyclodextrins in Pharmacy: Background and Introduction. *Journal of Chronotherapy and Drug Delivery*, Vol 4, Issue 1: 1-13.

Jarho P., Jarvinen K., Urtti A., Stella V.J., Jarvinen T. (1997) . The use of cyclodextrins in ophthalmic formulations of Dipivefrin. *International Journal of Pharmaceutics* 153, 225–233.

Junco S, Casimiro T, Ribeiro N, Da Ponte MN, Marques HC. (2002). A comparative study of naproxen-beta cyclodextrin complexes prepared by conventional methods and using supercritical carbon dioxide. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44:117-121.

Kanai A, Alba RM, Takano T, Kobayashi C, Nakajima A, Kurihara K, Yokoyama T. & Fukami M. (1989): The effect on the cornea of alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporin eye drops. *Transplant Proc*, Book 121:3150–3152.

Kaur I.P. ve Kanwar M., (2002). Ocular Preparations: The Formulation Approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(5), 473–493.

Khangtragool, A. (2014). Methocel E4M: Preparation and properties as a vehicle for the ocular drug delivery of vancomycin. *Chiang Mai Journal of Science*, 41 (1), (s.166-173).

Kim E.Y., Gao Z.G., Park J.S., Li H. ve Hun K. (2002). rhEGF/HP- β -CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 233, 159-167.

Krishna Mohan PR, Sreelakshmi G, Muraleedharan CV, Joseph R. (2012). Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 62:77-84.

Kumar Das S., Rajabalaya R., David S., Gani N., Khanam J., Nanda A., (2013). Cyclodextrins-The Molecular Container. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences Volume 4* (2), s. 1694.

Kurkov S. V., Loftsson T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 453,167– 180.

Le Boursais C., Acar L., Zia H., Sado P.A., Needham T. and Leverage R., (1998). Ophthalmic Drug Delivery Systems Recent Advances. *Progress Retinal and Eye Research*, 1998 Jan; volume 17(1):33-58.

Li B, Konecke S, Harich K, Wegie IL, Taylor LS, Edgar KJ. (2013). Solid dispersion of quercetin in cellulose derivative matrices influences both solubility and stability. *Carbohydrate Polymers*, 92: 2033-2040.

Liu J, Qiu L, Gao J, Jin Y. (2006). Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 312: 137-147.

Loftsson T., Brewster M. E., (2012). Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 101, No. 9, page 3019-3032.

Loftsson, T., Duchene, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329, 1–11.

Loftsson T., Jarho P., Másson M. ve Järvinen T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion Drug Deliv.* 2, 335-351.

Makwana S.B., V.A.Patel, S.J.Parmar, (2016). Development and characterization of in-situ gel for ophthalmic formulation containing ciprofloxacin hydrochloride. *Results in Pharma Sciences* 6(2016)1–6.

Mandal, S., Thimmasetty, M., Prabhushankar, G.L. ve Geetha, M.S. (2012). Formulation and evaluation of an in situ gel-forming ophthalmic formulation of moxifloxacin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2 (2), 78-82.

Miller D. ,(2008).Review of moxifloxacin hydrochloride ophthalmic solution in the treatment of bacterial eye infections. *Clinical Ophthalmology* 2008:2(1) 77–91.

Miranda J. C., Azevedo Martins T. E., Veiga F., Gomes Ferraz H., (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 47, n. 4.

Mosher G., Thompson D. O. (2007) Complexation: Cyclodextrins. James Swarbrick (Editor), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition Volume 2* içinde (s. 671-696) Informa Healthcare USA, Inc.

Mura P. (2014). Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 101, s. 238–250.

Nirmal H.B., Bakliwal S.R., Pawar S.P., (2010). In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research* CODEN (USA): IJPRIF ISSN : 0974-4304 Vol.2, No.2, pp 1398-1408.

Nisha S., Deepak K., (2012). An Insight To Ophthalmic Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* /Vol. III/ Issue II/April June, 2012/09-13.

Oliphant C.M., Green G.M., (2002). Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*/Volume 65, Number 3 S455-464.

Öztürk, A.A. (2017). Deksketoprofen Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanonoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve *In Vitro/In Vivo* Değerlendirilmesi. Yayınlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Patel R, Patel M. (2010). Solid-state characterization and *in vitro* dissolution behavior of lorazepam:hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 4(6): 442-452.

Patel A., Cholkar K., Agrahari V., and Mitra A.K., (2013). Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol.* 2013 ; 2(2): 47–64.

Peppas N, Sahlin J. (1989). A simple equation for the description of solute release III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm*, 57: 169-172.

Product Monograph: *Teva-Moxifloxacin Ophthalmic Solution*. Moxifloxacin Ophthalmic Solution, USP, Date of Revision: 11 August 2015.

Purslow C., Wolffsohn J.S., (2005). Ocular Surface Temperature: A Review. *Eye & Contact Lens* 31(3): 117–123.

Rasheed A., Kumar C. K. A., Sravanthi V. V. N. S. S, (2008). Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. *Sci Pharm.* 2008; 76; 567–598.

Rawat S., Warade S., Lahoti S. (2010). *In Situ* Gel Formulation of Ornidazole for the Treatment of Periodontal Disease. *Current Pharma Research* Vol. 1, Issue 1, October-December 2010 (s. 60-69).

Reddy M.H., Sambasivarao K., Chandrasekhara Rao Baru (2016). Methods of adjusting tonicity and pH values of some drugs and substances. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3(10): 207-212.

Ritger PL, Peppas NA. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders and discs. *J Control Release*, 5: 23-36.

Robertson S.M., Curtis M.A., Schlech B.A., Rusinko A., Owen G.R., Dembinska O., Liao J., and Dahlin D.C. (2005). Ocular Pharmacokinetics of Moxifloxacin After Topical Treatment of Animals and Humans. *Survey Of Ophthalmology* Volume 50 (1).

Ruel-Gariepy E. ve Leroux J. (2004). In situ-forming hydrogels-review of temperature sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2), (s. 409-426).

Sa Couto, A. (2015). Chapter 9:Cyclodextrins. K. G. Ramawat ve J.M. Merillon (Editors), *Polysaccharides* içinde (s. 247-287). Springer International Publishing Switzerland.

Saini R., Saini S., Singh G., Banerjee A., (2015). *In Situ* Gels- A New Trends In Ophthalmic Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharma Sciences and Research* (IJPSR) Vol 6 No 05 May 2015, s:886-890.

Samanta A. , Merrett K. , Gerasimov M., Griffith M. (2017). Chapter 21: Ocular applications of bioresorbable polymers-from basic research to clinical trials.

Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications Edited by: Giuseppe Perale and Jöns Hilborn. Woodhead Publishing (s497-523).

Sandle T. (2014). Sterile Ophthalmic Preparations and Contamination Control. *Journal of GXP Compliance* Volume 18 Number 3.

Shabir, G., (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *J Chromatogr A*. 987(1-2), 57–66.

Shete, G., Puri, V., Kumar, L. and Bansal, A.K. (2010). Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples, *AAPS PharmSciTech.*, 11 (2), 598–609.

Singh R, Bharti N, Madan J, Hiremath SN. (2010). Characterization of cyclodextrin inclusion complexes-a review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2(3), 171-183.

Srividya B., Cardoza R.M. ve Amin P.D. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system. *Journal of Controlled Release* 73, 205-211.

Schlech B. A., and Eduardo Alfonso.(2005) Overview of the Potency of Moxifloxacin Ophthalmic Solution 0.5% (VIGAMOX®). *Survey Of Ophthalmology* Volume 50 • Supplement 1 • November 2005

Skuredina A. A., Le-Deygen I. M., and Kudryashova E. V., (2018). The Effect of Molecular Architecture of Sulfobutyl Ether- β -Cyclodextrin Nanoparticles on Physicochemical Properties of Complexes with Moxifloxacin. *Colloid Journal*, Vol. 80, No. 3, (s. 312–319).

Skuredina A. A., Le-Deygen I. M., Uporov I. V., and Kudryashova E. V., (2017). A Study of the Physicochemical Properties and Structure of Moxifloxacin Complex with Methyl- β -Cyclodextrin. *Colloid Journal*, Vol. 79, No. 5, (s. 668–676).

Spulber M., Pinteala M., Fifere A., Moldoveanu C., Mangalagiu I., Harabagiu V., Simionescu B. C. (2008). Water soluble complexes of methyl- β -cyclodextrin and sulconazole nitrate. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 62: (s.135–142).

Stefansson E. and Loftsson T., (2002). Cyclodextrins in Eye Drop Formulations. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 44: 23–27.

Stroman D.W., Dajcs J.J., Cupp G.A. and Schlech B.A., (2005). *In Vitro* and *In Vivo* Potency of Moxifloxacin and Moxifloxacin Ophthalmic Solution 0.5%, A New Topical Fluoroquinolone. *Survey Of Ophthalmology* Volume 50, Supplement 1, November 2005, s.16-31.

Szabo Z.I., Deme R., Mucsi Z., Rusu A., Mare A.D., Fiser B., Toma F., Sipos E., Toth G. (2018). Equilibrium, structural and antibacterial characterization of moxifloxacin- β -cyclodextrin complex. *Journal of Molecular Structure* 1166, (s. 228-236).

Szejtli J. (1997). Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem.*, 7(4), 575–587.

Szejtli J. (2004). Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 76, No. 10, pp. 1825–1845.

The United States Pharmacopeia 2017 (*USP 41–NF 36*)

Tkáčová M, Živčák J, Foffová P. (2011). A Reference for Human Eye Surface Temperature Measurements in Diagnostic Process of Ophthalmologic Diseases. Measurement 2011, Proceedings of the 8th International Conference, Smolenice, Slovakia (s.406-409).

Ünlü N., Şumnu M., Hincal A.A., (1988). Göz Preparatlarında Biyoyararlılık ve Farmakokinetik. *FABAD Farm. Bil. Der.* 13, 522 – 535.

Vikas Y., Sandeep K., Braham D., Manjusha C., Budhwar V., (2018). Cyclodextrin Complexes: An Approach to Improve the Physicochemical Properties of Drugs and Applications of Cyclodextrin Complexes. *Asian Journal of Pharmaceutics*,(Suppl), 12 (2), S394.

Waleczek K.J., Cabral Marques H.M., Hempel B., Schmidt P.C. (2003). Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55 (s. 247–251).

Wang J, Cao Y, Sun B, Wang C. (2011). Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 124: 1069-1075

Wu Y., Liu Y., Li X., Kebebe D., Zhang B., Ren J., Lu J., Li J., Du S. and Liu Z., (2019). Research progress of in-situ gelling ophthalmic drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 1–15.

Yuan C, Jin Z, Xu X. (2012). Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: UV, FTIR, ^1H NMR and molecular modeling studie. *Carbohydrate Polymers*, 89: 492-496.

Yurtdaş, G., Demirel, M. and Genç, L. (2011). Inclusion complexes of fluconazole with β -cyclodextrin, Physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of its formulation, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 70 (3–4), 429–435.

Yurtdaş-Kırımlıoğlu G., Özer S., Büyükköroğlu G. & Yazan Y. (2018). Formulation and In Vitro Evaluation of Moxifloxacin Hydrochloride-Loaded Polymeric Nanoparticles for Ocular Application. *Latin American Journal of Pharmacy* - **37** (9): 1850-62.

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. and Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12 (3), 263-271.

Zuo, J., Gao, Y., Bou-Chacra, N., Löbenberg, R. (2014). Evaluation of the ddsolver software applications. *BioMed Research International*, Article ID 204925, 1-9.

http-1: The Pharmaceutical Journal, PJ June 2017 online, online: <https://www.pharmaceutical-journal.com/pharmacy-learning-centre/topical-drug-dosage-forms-for-eye-conditions/20202915.article?firstPass=false> (Erişim tarihi: 10 şubat 2019).

http-2:

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (Erişim tarihi: 13.06.2019)