

**NORFLOKSASİN YÜKLÜ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nesibe Hatun BAŞARAN

Eskişehir 2023

**NORFLOKSASİN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nesibe Hatun BAŞARAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

Eskişehir Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ekim 2023

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2108S147 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nesibe Hatun BAŞARAN'ın "Norfloksasin Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *İn Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi/...../2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı - Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

.....

Üye : Doç. Dr. Evrim AKYIL

.....

Üye : Doç. Dr. Umay Merve GÜVEN

.....

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Enstitü Müdürü

ÖZET

NORFLOKSASİN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Nesibe Hatun BAŞARAN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ekim 2023

Danışman: Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

Nalidiksik asidin geniş spektrumlu antimikrobiyal etkili analogu olan Norfloksasin (NFX), gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı güçlü aktiviteye sahipken, anaeroblara karşı sınırlı aktiviteye sahip olan bir florokinolondur. Topikal oküler ilaç uygulaması, hızlı etki ve yüksek hasta uyuncu nedeniyle gözdeki ön segment hastalıklarını tedavi etmek için en çok tercih edilen yollardan biridir. Topikal uygulamalarda etkin maddenin biyoyararlanımı, gözün anatomik ve fizyolojik özelliklerinden dolayı düşüktür. Tez çalışmamız kapsamında NFX'in oküler uygulamaya yönelik bir formülasyonunun geliştirilmesi amacı ile nanoçöktürme yöntemiyle polilaktikoglikolik asit (PLGA), Kitosan ve Eudragit L-30 D-55 polimerleri kullanılarak NFX içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküler sistemler ile etkin maddenin salım süresinin uzatılmasını ve daha düşük dozda etkin madde ile etkin bir tedavinin sağlanması amaçlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların, fizikokimyasal karakteristik özellikleri *in vitro* analiz yöntemleri ile detaylı olarak incelenmiştir. Yapılan analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde formülasyonların oküler pH'da etkin maddenin uzatılmış salımını başarı ile sağladıkları belirlenmiştir. Yapılan antifungal aktivite çalışmaları sonucunda daha düşük dozda etkin bir tedavinin sağlanabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2108S147 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Norfloksasin, Polimerik nanopartikül, Nanoçöktürme, Poli(laktik-ko-glikolik asit), Oküler ilaç taşıyıcı sistemler

ABSTRACT

PREPARATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF NORFLOXACIN LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES

Nesibe Hatun BAŞARAN

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Education, October 2023

Supervisor: Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

Norfloxacin (NFX), the broad-spectrum antimicrobial-acting analogue of nalidixic acid, is a fluoroquinolone that has strong activity against gram-positive and gram-negative bacteria, while having limited activity against anaerobes. Topical ocular drug application is one of the most preferred ways to treat anterior segment diseases of the eye due to its rapid effect and high patient compliance. The bioavailability of the active substance in the eye is low due to the anatomical and physiological characteristics of the eye. Within the scope of our thesis studies, nanoparticles were prepared using polylactic-co-glycolic acid (PLGA), Chitosan and Eudragit L-30 D-55 polymers by NFX nanocomposition method in order to develop a formulation of NFX nanoparticles for ocular application. It was aimed to prolong the duration of the active substance with nanoparticulate systems and to provide an effective treatment with a lower dose of the active substance. The physicochemical characteristics of the prepared formulations were examined in detail using *in vitro* analysis methods. The physicochemical characteristics of the prepared formulations were examined in detail using *in vitro* analysis methods. When the results of the analyzes were evaluated, it was determined that the formulations successfully provided extended release of the active substance at ocular pH. As a result of the antifungal activity studies, it was concluded that an effective treatment can be provided at lower doses. This thesis was supported by Anadolu University Scientific Research Projects Coordination Unit with the project number of 2108S147.

Keywords: Norfloxacin, Polymeric nanoparticle, Nanocomposition, Poly(lactic-co-glycolic acid), Ocular drug delivery systems.

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarına başladığım yer olan Almanya’da bana değerli zamanını ayıran, soru ve yanıtlarımı sabırla cevaplayan her konuda beni bilgilendiren değerli bilgilerini benimle paylaşıp ilerlememi sağlayan, bana her aşamayı tek tek gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Udo BAKOWSKY, Dr. Bernd GUTBERLET ve Valeri ROSCHENKO’ya teşekkür ederim.

Süreç boyunca Türkiye’deki danışmanlığımı yapan bu uzun ve zorlu yolda bana vakit ayıran, büyük bir ilgi ve alakayla sürecimi yöneten, samimiyeti ve güler yüzü ile kıymetli bilgilerini benimle paylaşıp sürecimi yöneten, araştırma ve sonuçlanmasında desteğini benden eksik etmeyen kıymetli ilk danışman hocam Doç. Dr. Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU’na teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarımın devamında yeni danışmanım olarak görev alan, engin bilgilerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleri sayesinde tez çalışmamı toparlamamı sağlayan ve verdiği değerli bilgilerden meslek yaşamım boyunca da faydalanacağımı düşündüğüm, güler yüzlü, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Ebru BAŞARAN’a her şey için teşekkür ederim.

Çalışmalarım için gerekli olan mikrobiyoloji analizlerinin gerçekleştirilmesinde göstermiş olduğu yardımlarından dolayı Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK’e ve bana vakit ayırıp her konuda desteğini esirgemeyen Arş.Gör. KADİR AYKAÇ’a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, yüksek lisans eğitimim boyunca göstermiş oldukları ilgi ve alakalarından dolayı, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nın tüm hocalarına ve üyelerine çok teşekkür ederim.

Ve son olarak çalışmam boyunca uzakta olmalarına rağmen sevgilerini her zaman hissettiğim, beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (2108S147 nolu proje).

Nesibe Hatun BAŞARAN

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.

Nesibe Hatun BAŞARAN

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	2
2.1 Göz.....	2
2.1.1. Gözün anatomik yapısı.....	2
2.1.2 Kornea'nın anatomisi.....	4
2.1.2.1 <i>Epitelyum</i>	4
2.1.2.2 <i>Bowman zarı</i>	5
2.1.2.3 <i>Stroma</i>	6
2.1.2.4 <i>Descemet Membranı</i>	6
2.1.2.5 <i>Endotelyum</i>	6
2.1.3 Konjonktiva.....	7
2.1.4 Retina'nın anatomik yapısı.....	7
2.1.5 Oküler enfeksiyonlar.....	8
2.1.6 Fizyolojik ve farmakokinetik sınırlamalar.....	9
2.1.7 Oküler uygulamalarda biyoyararlanımı artırmak	

için stratejiler.....	10
2.2 Norfloksasin.....	11
2.2.1 Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	11
2.2.2 Norfloksasin'in farmakolojik özellikleri.....	11
2.2.3 Norfloksasin ile tedavi edilebilen oküler enfeksiyonlar.....	16
2.2.4 Norfloksasin'in miktar tayini yöntemleri.....	16
2.2.5 Norfloksasin içeren ticari preparatlar.....	17
2.3 Oküler Uygulamaya Yönelik Hazırlanan Etkin Madde Taşıyıcı	
Sistemler ve Uygulama Yolları	17
2.3.1 Oküler topikal uygulama ve oküler tedavinin kısıtlamaları	17
2.3.2 Biyoyararlanımı artırmak için kullanılan formülasyonlar.....	20
2.3.2.1 Hidrojeller.....	20
2.3.2.2 Viskozite artırıcı polimerler.....	21
2.3.2.3. Siklodekstrinler.....	21
2.3.2.4. Süspansiyonlar.....	22
2.3.2.5 Merhemler.....	22
2.3.2.6. Penetrasyon arttırıcılar.....	23
2.3.2.7 Mukoadesif polimerler.....	24
2.3.2.8 Faz geçiş sistemleri.....	26
2.3.2.9 Veziküler sistemler.....	28
2.3.2.9.1 Lipozom.....	28
2.3.2.9.2 Niozom.....	29
2.3.2.9.3 Farmakozom.....	30
2.3.2.10 Emülsiyon sistemler	30
2.4 Partiküler Sistemler	31
2.4.1 Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri.....	33
2.4.1.1 Çözücü buharlaştırma yöntemi.....	33

2.4.1.2 Emülsifikasyon/çözücü difüzyonu yöntemi.....	34
2.4.1.3 Tuzla çöktürme yöntemi.....	34
2.4.1.4 Koaservasyon veya iyonik jelleşme yöntemi.....	34
2.4.1.5 Nanoçöktürme yöntemi.....	34
2.4.1.6 Püskürterek kurutma yöntemi.....	35
2.4.1.7 Süperkritik sıvı teknolojisi.....	35
2.4.1.8 Diyaliz yöntemi.....	36
2.4.2 Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	36
2.4.2.1 Parçacık büyüklüğü, şekli ve yüzey özellikleri.....	37
2.4.2.2 Zeta potansiyel.....	37
2.4.2.3 pH analizi.....	38
2.4.2.4 Katı hal analizleri.....	38
2.4.2.4.1 Nükleer manyetik rezonans analizi.....	38
2.4.2.4.2 Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi.....	39
2.4.2.4.3 Termal analiz.....	39
2.4.2.5 İn vitro salım.....	39
2.4.3 Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler.....	40
2.4.3.1 Poli(laktik-ko-glikolik asit).....	40
2.4.3.2 Eudragit L-30 D-55	41
2.4.3.3 Kitosan	42
2.4.4 Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri.....	43
3. GEREÇLER.....	45
3.1 Kullanılan Malzemeler.....	45
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	46
4. YÖNTEMLER.....	47
4.1 Norfloksasin ile Yapılan Çalışmalar.....	47

4.1.1 Termal analiz.....	47
4.1.2 FT-IR analizi.....	47
4.1.3 Proton NMR analizi.....	47
4.1.4 Norfloksasin miktar tayini.....	47
4.1.4.1 Doğrusallık.....	48
4.1.4.2 Doğruluk.....	48
4.1.4.3 Kesinlik.....	48
4.1.4.4 Duyarlılık.....	48
4.1.5 Seçicilik.....	49
4.1.5 Çalışma koşullarındaki kararlılık.....	49
4.2 Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları.....	50
4.2.1 NP1 hazırlanışı.....	50
4.2.2 NP2 hazırlanışı.....	50
4.2.3 NP3 hazırlanışı.....	51
4.3 Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	51
4.3.1 Parçacık şekli, büyüklüğü ve dağılımı.....	51
4.3.2 Zeta potansiyel.....	52
4.3.3 Termal analiz.....	52
4.3.4. FT-IR analizi.....	52
4.3.5. NMR analizi.....	52
4.3.6. Enkapsülasyon etkinliği.....	52
4.4 <i>İn Vitro</i> Salım.....	53
4.5 Antifungal Aktivite Çalışmaları.....	53
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	55
5.1 NFX ile Yapılan Çalışmalar.....	55
5.1.1 Termal analiz.....	55

5.1.2 FT-IR analizi.....	55
5.1.3 Proton NMR analizi.....	56
5.1.4 NFX'in YBSK ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları.....	57
5.1.4.1 Doğrusallık.....	57
5.1.4.2 Doğruluk.....	60
5.1.4.3 Kesinlik.....	61
5.1.4.4 Duyarlılık.....	64
5.1.4.5 Seçicilik.....	64
5.1.5 Çalışma şartlarındaki kararlılık.....	67
5.2 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	67
5.2.1 Parçacık şekli, büyüklüğü ve dağılımı.....	67
5.2.2 Zeta potansiyel.....	71
5.2.3 Enkapsülasyon etkinliği.....	71
5.2.4 Termal analiz.....	72
5.2.5 FT-IR analizi.....	75
5.2.6 ¹ H-NMR analizi.....	76
5.3 <i>İn vitro</i> Salım Çalışmaları.....	83
5.4 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	84
5.4.1 Hücrelerin çoğaltılması.....	84
5.4.2 WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi.....	84
5.4.3 Metodun uygulanması.....	85
5.4.4 Mikrobrot dilüsyon yöntemi ile antikandida aktivite testi.....	85
5.4.5 Anneksin V-PI yöntemi ile kandida apoptozisin belirlenmesi.....	87
6. SONUÇ.....	91
KAYNAKÇA.....	92
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Norfloksasin'e bağı olarak gözlenen advers etki insidansları.....	15
Tablo 2.2. Norfloksasin'in farmakokinetik özellikleri.....	16
Tablo 2.3. Polimerler ve mukoadesyon dereceleri.....	26
Tablo 4.1. YBSK analiz şartları.....	47
Tablo 4.2. Hazırlanan nanonartikül formülasyonlarının içerikleri.....	51
Tablo 5.1. Seri 1 YSBK sonuçları ve değerlendirilmesi.....	57
Tablo 5.2. Seri 2 YBSK sonuçları ve değerlendirilmesi.....	58
Tablo 5.3. Seri 3 YSBK sonuçları ve değerlendirilmesi.....	58
Tablo 5.4. Doğrusallık hesabı için 3 seriden elde edilen ortalama Alan/Rt değerleri.....	59
Tablo 5.5. 20 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması.....	60
Tablo 5.6. 40 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	60
Tablo 5.7. 80 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması.....	61
Tablo 5.8. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün.....	62
Tablo 5.9. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün.....	62
Tablo 5.10. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün.....	63
Tablo 5.11. Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları.....	63
Tablo 5.12. LOD ve LOQ değerleri.....	64
Tablo 5.13. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı.....	70
Tablo 5.14. Zeta potansiyel değerleri.....	71
Tablo 5.15. Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarları.....	72
Tablo 5.12. Antikandidal aktivite analiz sonuçları.....	86
Tablo 5.13. Kandidal apoptoz analiz sonuçları.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gözün anatomisi.....	2
Şekil 2.2. Gözün anatomisinin şematik gösterimi	4
Şekil 2.3. Kornea'nın anatomik yapısı.....	5
Şekil 2.4. Retina'nın anatomik yapısı.....	8
Şekil 2.5. Norfloksasin'in açık formülü.....	12
Şekil 2.6. Mukoadezyon mekanizması.....	25
Şekil 2.7. Tek tabakalı lipozomun ve çok katlı lipozomun şematik gösterimi	29
Şekil 2.8. Farmakozom yapısının şematik gösterimi.....	31
Şekil 2.9. Nanokapsüllerin ve nanokürelerin şematik gösterimi.....	32
Şekil 2.10. Poli laktik-ko-glikolik asidin yapısı.....	42
Şekil 2.11. Eudragit L-30 D-55'in kimyasal yapısı.....	43
Şekil 2.12. Kitosan'ın kimyasal yapısı.....	44
Şekil 5.1. Norfloksasin'e ait DSC termogramı.....	55
Şekil 5.2. NFX' e ait FT-IR spektrumu.....	56
Şekil 5.3. NFX'e ait ¹ H-NMR analizi.....	56
Şekil 5.4. NFX'e ait doğrusallık grafiği.....	59
Şekil 5.5. Norfloksasin'e ait referans kromatogram.....	65
Şekil 5.6. Norfloksasin, mobil faz, fosfat tampona ait referans kromatogram.....	65
Şekil 5.7. PLGA mobil faza ait referans kromatogram.....	66
Şekil 5.8. PLGA-EU mobil faza ait referans kromatogram.....	66
Şekil 5.9. PLGA-CTS mobil faza ait referans kromatogram.....	67
Şekil 5.10. NP1 nanopartiküllerine ait AFM görüntüleri.....	68
Şekil 5.11. NP2 nanopartiküllerine ait AFM görüntüleri.....	68
Şekil 5.12. NP3 nanopartiküllerine ait AFM görüntüleri.....	68
Şekil 5.13. NP1 nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.....	69

Şekil 5.14. NP2 nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.....	69
Şekil 5.15. NP3 nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.....	69
Şekil 5.16. EPNFX'e ait DSC termogramı.....	73
Şekil 5.17. CPNFX'e ait DSC termogramı.....	74
Şekil 5.18. NP1'e ait DSC termogramı.....	74
Şekil 5.19. NP2'ye ait DSC termogramı.....	74
Şekil 5.20. NP3'e ait DSC termogramı.....	75
Şekil 5.21. PLGA'ya ait FT-IR analiz spektrumu.....	77
Şekil 5.22. Eudragit L-30 D-55'e ait FT-IR analiz spektrumu.....	77
Şekil 5.23. Kitosan'a ait FT-IR analiz spektrumu.....	78
Şekil 5.24. NP1'e ait FT-IR analiz spektrumu.....	78
Şekil 5.25. NP2'ye ait FT-IR analiz spektrumu.....	79
Şekil 5.26. NP3'e ait FT-IR analiz spektrumu.....	79
Şekil 5.27. PLGA'ya ait ¹ H-NMR analiz spektrumu.....	80
Şekil 5.28. Eudragit L-30 D-55'e ait ¹ H-NMR analiz spektrumu.....	80
Şekil 5.29. Kitosan'a ait ¹ H-NMR analiz spektrumu.....	81
Şekil 5.30. NP1'e ait ¹ H-NMR analiz spektrumu.....	81
Şekil 5.31. NP2'ye ait ¹ H-NMR analiz spektrumu.....	82
Şekil 5.32. NP3'e ait ¹ H-NMR analiz spektrumu.....	82
Şekil 5.33. Hazırlanan nanopartiküllere yüklenen NFX'in <i>in vitro</i> salım çalışmaları.....	83
Şekil 5.34 Mikrobrot h dilüsyon yöntemi ile antikandida l aktivite testi analiz sonuçları..	89

SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ

AC	: Aseton
AFM	: Atomik kuvvet elektron mikroskop
CAP	: Selüloz Asetat Ftalat
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
CD	: Siklodekstrin
CdCl ₃	: Döterokloroform
CF	: Sürekli Akış
<i>C. glabrata</i>	: <i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	: <i>Candida krusei</i>
<i>C.parapsilosis</i>	: <i>Candida parapsilosis</i>
CPNFX	: Formüle Edilmemiş CTS, PLGA, NFX
CTS	: Kitosan
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
Dk	: Dakika
EC	: Etil Selüloz
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
ELS	: Elektroforetik Işık Saçılımı
EPNFX	: Formüle Edilmemiş Eu L-30 D-55, PLGA, NFX
EU	: Eudragit L-30 D-55
FCS	: Floresan Korelasyon Spektrofotometrisi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FIFFF	: Akış Alanı AKİŞ Fraksiyonu
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi
HA	: Hiyalüronik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
¹ H-NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri
HPC	: Hidroksipropil Selüloz
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HPMC	: Hidroksipropil Metil Selüloz
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Kılavuzu
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Miktar Tayini Sınırı
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MC	: Metil Selüloz
ME	: Mikroemülsiyon
NaCMC	: Sodyum Karboksimetil Selüloz
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NFX	: Norfloksasin
NTA	: Nanoparçacık İzleme Analizi
NP	: Nanopartiküller
PAA	: Poliakrilik Asit
PBS	: Fosfat Tamponu
PCS	: Foton Korelasyon Spektrofotometrisi
PDLA	: Poli D-laktik Asit
PLLA	: Poli L-Laktik Asit
PE	: Polietilen
PEG	: Polietilen Glikol
PGA	: Poliglikolik Asit
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PNP	: Polimerik nanopartiküller
PS	: Fosfatidilserin
PVA	: Polvinil Alkol
PVP	: Polivinil Prolidon
RESS	: Süperkritik Çözeltinin Hızlı Genişlemesi
RESOLV	: Çözeltinin Sıvı Çözeltiye Hızlı Genişlemesi
SEM	: Taramalı elektron mikroskop
SH	: Standart Hata
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV-VIS	: Ultraviyole ve Görünür Işık Spektrofotometrisi

YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ZP	: Zeta Potansiyel

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nalidiksik asidin geniş spektrumlu antimikrobiyal etkili analogu olan Norfloksasin (NFX), gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı güçlü aktiviteye sahipken, anaeroblara karşı sınırlı aktiviteye sahip olan bir florokinolondur. Birçok ülkede insan ve hayvanlardaki enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (Goldstein, 1987; Lee, M.D. vd.,1987). NFX, idrar yolu, safra ve solunum yollarının bakteriyel enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Gonore tedavisi ve kanserle ilişkili nötropenik hastalarda enfeksiyonun profilaksisi amacıyla kullanılır. (Lee, M.D. ve Ronald, M.D., 1987; Wolfson, M.D. ve Hooper, M.D., 1988; Van der Waaij ve vd., 1989; Al-Mustafa ve Al-Ghamdi, 2000) *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Shigella* gibi çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Vijan ve Council, 2008). Ancak NFX'in sudaki düşük çözünürlüğü etkili bir tedavi potansiyelini oldukça sınırlamaktadır (Nayak vd., 2022). NFX'in keratit tedavisinde kullanımı araştırılmış ve umut verici sonuçlar alınmıştır (Gebreel vd., 2021).

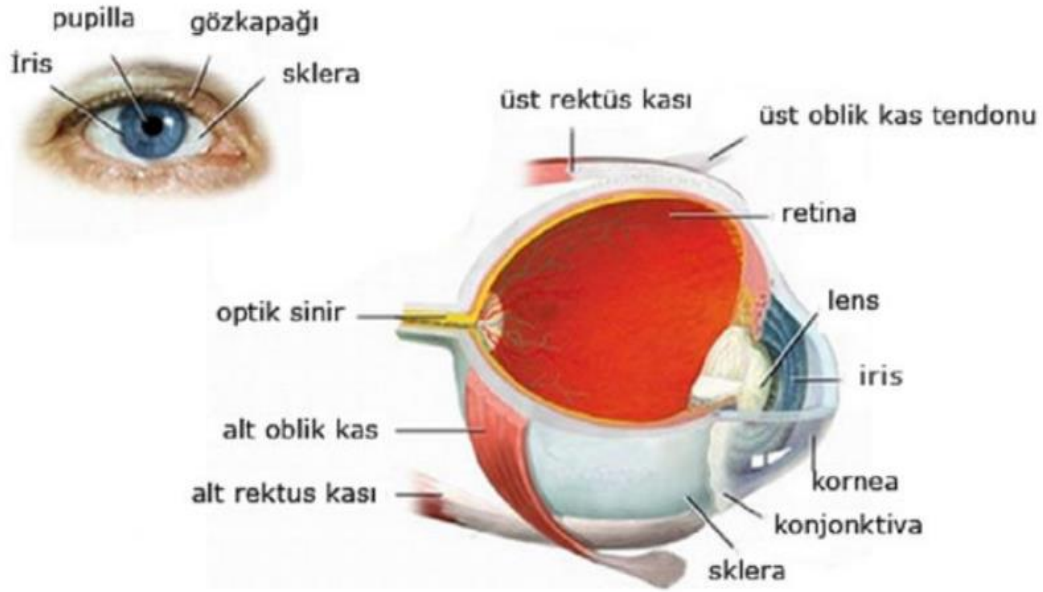
Topikal oküler ilaç uygulamasının hızlı, lokalize ilaç etkisi ve hastanın kabul edilebilirliği, gözde ön segment hastalıklarını tedavi etmek için en çok tercih edilen yollardan biridir. Gözde etkin madde biyoyararlanımı, gözün anatomik ve fizyolojik özelliklerinden dolayı düşüktür. (Hamdy ve Raid, 2012). NFX'in biyoyararlanımı sudaki düşük çözünürlüğüne bağlı olarak sık ve uzun süreli uygulama gerektirmektedir (Carratalá vd., 1998; Arredondo vd., 2004; Fernández vd., 2006). Genellikle iyi tolere edilen ve yan etkileri çok şiddetli olmayan NFX'in tablet, şurup,süspansiyon ve göz damlası formlarında müstahzarları bulunmaktadır. Tez çalışmalarımız kapsamında NFX'in oküler uygulamaya yönelik bir formunun geliştirilmesi amacı ile NFX'in nanoçöktürme yöntemiyle polilaktikoglikolik asit (PLGA), Kitosan (CTS) ve Eudragit L-30 D-55 (EU) polimerleri kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküler sistemler ile etkin maddenin süresinin uzatılmasını ve daha düşük dozda etkin madde ile etkin bir tedavinin sağlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1 Göz

2.1.1. Gözün anatomik yapısı

Göz, göz çukuru, göz küresi ve göz kapağını içeren oldukça kompleks bir organdır. Göz çukuru, gözü, göz dışı kasları, kan damarlarını ve gözün sinirlerini barındıran kemiklerle çevrili, içbükey bir boşluktur. Göz küresi, göz kapakları ve gözyaşı sıvısı ile korunmaktadır. Göz kapaklarının hareketi, göz küresinin kayganlığını artırarak yabancı cisimlere karşı korunmasına yardımcı olur (Kaplan,2007). Gözyaşı sıvısının toplam hacmi yaklaşık 7-10 μ l'dir (Gan vd., 2013) Kornea ve konjonktival yüzeyler sürekli gözyaşı akışı ile kaplıdır (Şekil 2.1) (Rolando ve Zierhut, 2001).



Şekil 2.1. Gözün anatomisi (<http-1>)

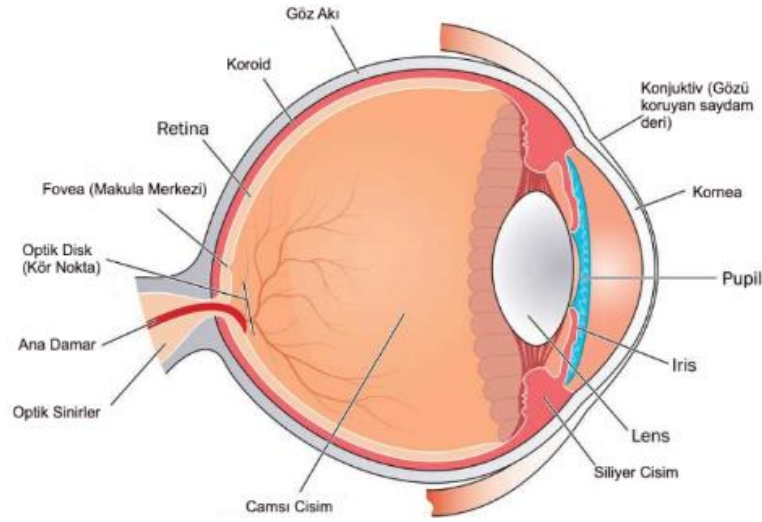
Gözyaşı filmi, kornea ve konjonktiva üzerinde koruyucu bir tabaka olarak epitel hücreleri için nemli bir ortamın oluşması sağlar. Bakterisidal özelliğidir. Göz kapaklarının kayganlığı, epitel hücre ve korneaya oksijen ve karbondioksit gibi çeşitli ürünlerin taşınmasında rol oynar. Beyaz kan hücrelerinin göze doğru gitmeleri gibi birçok görevi yerine getirir (Almeida vd., 2013). Göz yüzeyi yüzeysel lipid tabakası, orta sulu tabaka ve derin mukoza tabakasından oluşur (Patil ve Dowd, 2000). Tabaka esterler,

triasilgliseroller, serbest steroller, sterol esterleri ve serbest yağ asitlerinden oluşur ve gözyaşı sıvısının yüzey gerilimini düşürür, buharlaşmayı önler (Almeida vd., 2013).

Sulu kısım, ana ve yardımcı lakrimal bezler tarafından salgılanır ve inorganik tuzlar, glikoz ve üre ile biyopolimerler, proteinler ve glikoproteinler içermektedir. Gözyaşında bulunan elektrolitlerin varlığı, uygulanan ilaçların kornea ve/veya konjonktival epitel arasındaki temas süresini uzatarak oküler biyoyararlanımın artmasını sağlar. Göz bebeği, ışığın göze girmesine izin verir. Retinada bulunan emici pigmentler göz bebeğinin siyah görünmesine sebep olmaktadır. Merkezinde göz bebeğinin yer aldığı, renkli dairesel kas, irisi oluşturmaktadır. İris, pupillanın boyutunu kontrol etmektedir (Wilson, 2004).

İris rengi, melanositler tarafından üretilen eumelanin (kahverengi / siyah melaninler) ve feomelaninden (kırmızı / sarı melaninler) oluşmaktadır. Melanokortin-1 (MC1R) Reseptör Geni, eumelanin üretiminin bir düzenleyicisidir. MC1R genindeki nokta mutasyonları melanogenezi yani melanin üretimini etkilemektedir (Kolb, 2005). MC1R gen alellerinde nokta mutasyonlarının varlığı, açık tenli ve mavi/yeşil gözlü insanlarda ortak bir özelliktir (Valverde vd., 1995; Metzelaar-Blok ve vd., 2001). Gözün ön kısmını, kornea, iris, göz bebeği ve kristal mercek oluşturmaktadır. Göz bebeği, göze giren ışık miktarını iris düzenler. Hem iris hem de göz bebeği, hava-kornea arayüzündeki kırılma indisindeki büyük farktan dolayı gözün ana kırılma bileşeni olan dışbükey şeffaf kornea ile kaplıdır (Şekil 2.1) (Irsch ve Guyton, 2009).

Göz üç farklı katmandan oluşmaktadır. Sklera ve kornea tarafından oluşturulan dış tabaka, iris ve siliyer cisimden oluşan anterior tabaka, koroidi içeren posterior kısımdan oluşan ara tabaka ve duysal kısım olarak adlandırılan gözün iç tabakasında bulunan retinadan oluşur. Önde, kornea ve iris arasında, arkada iris, zonül lifleri ve mercek arasında, aköz humor, vitröz haznede ise daha yoğun bir sıvı olan vitröz humor ile doludur (Atchison, 2023). İrisin arkasında ise mercek bulunur. Lens, siliyer cismin ön kısmına bağlı zonül lifleri tarafından asılır. Siliyer kas hareketlerinin bir sonucu olarak bu bağların kasılması veya gevşemesi, retinada keskin bir görüntü oluşmasını sağlar. Lensin şekli değişir. Işık ışınları şeffaf kornea ve mercekten retinaya odaklanır. İnsan retinasındaki görüntü, algı için gereken daha yüksek işlemler için en ince detayın çözülmesini ve bu detayın beyne doğrudan iletilmesini başlatmaktadır (Şekil 2.2) (Kolb, 2005).



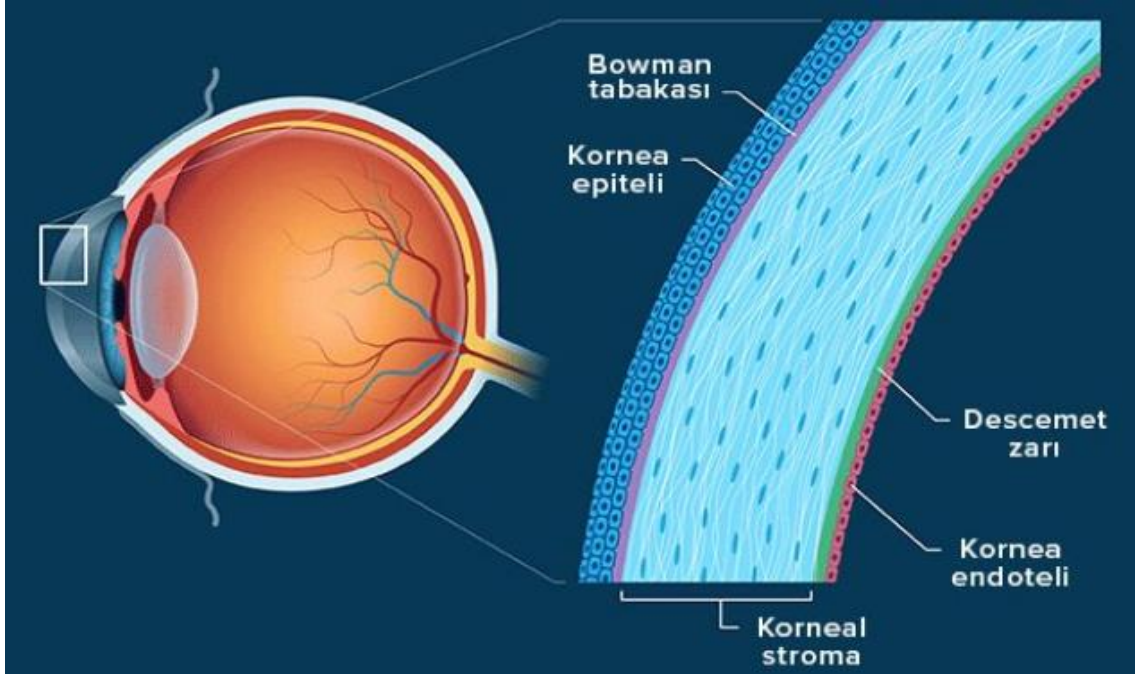
Şekil 2.2 Göz anatomisinin şematik gösterimi (http-2)

2.1.2 Kornea'nın anatomisi

Kornea ve sklera temel olarak göz içindeki yapıları koruyan tabakalardır. Kornea, bariyer görevi görür ve gözü enfeksiyonlara karşı korur. Şeffaf bir avasküler dokudur (Del Monte ve Kim, 2011). Kornea oval şekillidir ve 11-12 mm ene 9-11 mm yüksekliği sahiptir. Kornea hücresel ve aselüler bileşenlerden oluşur. Epitel hücrelerden, keratositler ve endotel hücrelerinden oluşur. Kollajen ve glikozaminoglikanları içerir. Epitel hücreleri epidermal ektodermden türetilir. Keratosit ve endotel hücreleri nöral tepeden türetilir (Dua vd, 2013). Anterior kornea stromal sertliği, kornea eğriliğinin korunmasında önemlidir. Stromal hidrasyonun korneanın gerilme ve kayma kuvvetlerine tepkisini de etkilemektedir. İnsan korneası, epitel, stroma ve endotel, Bowman zarı ve Descemet zarından oluşur (Şekil 2.3) (Sridhar, 2018).

2.1.2.1 Epitelyum

Korneanın epitel yüzeyi gözde ilk engeldir ve gözyaşı filmi-kornea arayüzünün ayrılmaz bir parçasıdır (Şekil 2.3). Limbustan limbuse aşırı homojenlik ile karakterize tabakalı, keratinize olmayan skuamöz bir tabakadır. Embriyolojik olarak kornea epiteli, gebeliğin 5. ve 6. haftaları arasında yüzey ektoderminden türetilir. 4-6 hücre tabakası kalınlığında (40 µm ila 50 µm) keratinize olmayan, tabakalı skuamöz epitelden oluşur (Şekil 2.3) (Farjo vd, 2009).



Şekil 2.3. Kornea'nın anatomik yapısı (<http-3>)

Epitel tabaka oksijen ve glikoz ile beslenmektedir. Gözler açıkken çevreden oksijen almaktadır. Göz kapakları kapalıyken oksijen gözyaşı kaynaklı alınmaktadır. Glikoz başlıca aköz hümörden difüzyonla epitele ulaşmaktadır (Gandhi ve Jain, 2015). Epitel, sıkı kavşaklar sergilediği için topikal olarak uygulanan hidrofilik ilaçların penetrasyonunda ana engeldir. Lipofilik ilaçların, muhtemelen plazma zarının lipit çift katmanlarında çözünerek ve ardından hücre ötesi yolla hareket ederek epitele kolayca nüfuz ettiği iyi bilinmektedir (Gupta vd., 2010).

2.1.2.2 Bowman zarı

Bowman'ın tabakası, bazal kornea epitel hücrelerinin hemen altında bulunan 8-15 μm kalınlığında, amorf bir fibriler yapıdır (Şekil 2.3). Bu tabaka rejeneratif değildir, kornea stroması ile epitel hücreleri arasında bir sınır oluşturmaktadır. Yeniden epitelizasyona dahil olduğu düşünülmektedir. Bowman'ın tabakası, proteoglikan matrisine implante edilen kısa tip I kollajen fibrilleri içermektedir (Cholkar vd., 2013).

2.1.2.3 Stroma

Stroma, kornea kalınlığının yaklaşık % 90'ını oluşturur, çoğunluğu (% 78) sudan oluşur ve geri kalanı korneaya kuvvet, elastikiyet ve form veren kolajendir. Her biri serpiştirilmiş hücrelere, keratositlere sahip yüksek sıralı kollajen fibrillerinden oluşan kollajen tabakalarından oluşan yoğun bir dokudur (Şekil 2.3). Kollajen fibrilleri arasındaki matris proteoglikanlar ve diğer proteinleri içerir (Ehlers ve Hjortdal, 2006). Stromal kollajen fibrilleri, proteoglikanlarla çevrili kompleks oluşturan tip I ve V kollajenden oluşmaktadır. Korneanın hidrasyonunun ve yapısal özelliklerinin düzenlenmesine yardımcı olurlar (Addo vd., 2016). Stroma, hidrofilik yapısı nedeniyle yüksek lipofilik ilaçlar için bir engeldir (Malhotra ve Majumdar, 2001).

2.1.2.4 Descemet Membranı

Endotel hücreleri, 8 haftalık aşamada rahimde başlayarak, sürekli olarak Descemet zarını salgılar. Doğumdan önce salgılanan ön 3 mm, elektron mikroskobu ile bakıldığında belirgin bir bantlı görünüme sahiptir (Şekil 2.3). Ancak doğumdan sonra üretilen Descemet zarı amorf bir ultrastrüktürel dokuya sahiptir. Descemet yaşla birlikte 10 mm kalınlığa kadar birikebilmektedir (DelMonte ve Kim, 2011).

2.1.2.5 Endotelyum

Kornea endoteli, mitotik olmayan ve aköz hümörle doğrudan temas halinde olan hücrelerin en içteki tek tabakasıdır (Şekil 2.3). Endotel kendini korurken, stroma kornea şeffaflığını sağlamak için sönük bir durumda kalır. Bu tek tabaka, ozmotik bir gradyan oluşturmak için gerekli olan iyon akısına karşı sınırlı geçirgenliğe sahiptir. Endotel hücre sayıları genellikle yaşla birlikte azalır. Kornea endoteli basit bir düşük küboidal epiteldir (Weller vd., 2016; Srinivas, 2010). Korneanın arka yüzeyini kaplayan tek bir düz, çokgen hücre tabakasından oluşur ve yaklaşık 5 µm derinliğinde ve 20 µm çapında olan bu hücreler, bazolateral plazma membranlarındaki iyonik pompalar aracılığıyla stromanın nispeten susuz durumunu korur (Eghrari, 2015).

2.1.3 Konjonktiva

Konjoktiva göz kapağının iç kısmı ile sklera yüzeyini kaplayan ince bir tabakadır. Keratinize olmayan çok katlı epitel ve goblet hücrelerinden oluşur (Şekil 2.3). Gözlerin yağlanması yardımcı olan ve mikroorganizmaların girişini önleyen mukus üretmektedir (Addo vd., 2016). Konjonktiva, korneanın kenarına sıkıca yapışıktır ve gözün kolayca hareket etmesini sağlayan gevşek kıvrımlar vardır. Konjonktiva oldukça vaskülarizedir; gözün kırmızı olması yaralanma veya hasta olduğuna işaret eder (Agarwal vd., 2016). Konjonktiva, palpebral, bulbar ve forniksten oluşmaktadır (Vision RX Encyclopedia, 2005). Palpebral; marjinal, tarsal ve orbit konjonktiva olarak üçe ayrılır (Güneş, 2020). Forniks, kapakların arka yüzeyini kaplayan konjonktivanın oluşturduğu bir kıvrımdır (Majumder, 2008).

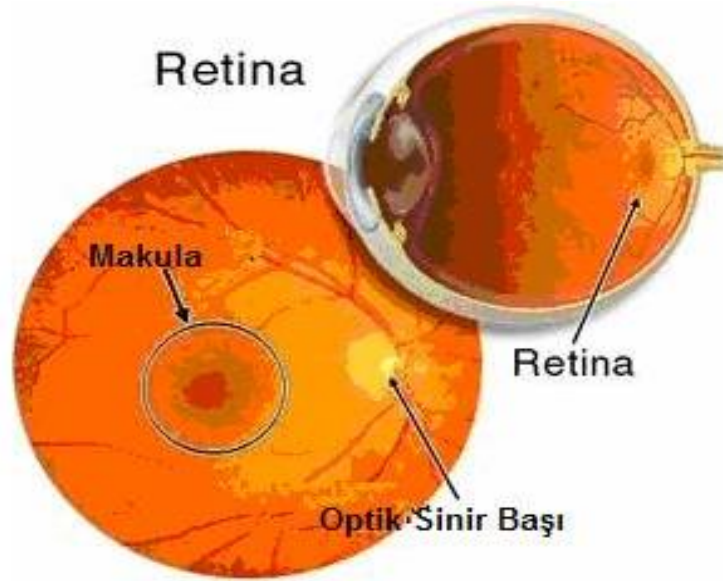
Goblet hücreleri, müsin salgılayan tek hücreli bezlerdir. Yuvarlak ve oval yapıdadırlar. Epitel hücrelerinin yüzeyine kayganlık vermek ve korumakla görevlidir. Yaklaşık 2 mL/gün kadar mukoza üretebilmektedirler. Ayrıca gözyaşı filminin yüzey gerilimini azaltarak kararlılığını arttırmaktadır (Majumder, 2008). Konjonktivanın bariyer özellikleri iyonlar ve su dahil hidrofilik çözünenlerin konjonktiva boyunca paraselüler taşınması oldukça sınırlı olmaktadır. Konjonktiva da yer alan epitel hücreleri epitelin en apikal kısmında sıkı kavşaklar ile birleşmektedir. Bu kavşaklar, hücreler arasında sıkı engeller oluşturur ve hidrofilik ilaçların hücreler arası yollarla difüzyonu için büyük bir engel oluşturlar (Hosoya vd., 2005).

2.1.4 Retina'nın anatomik yapısı

Retina, ışık kaynağından gelen ışınları gelen yakalayan ve bunları hem elektriksel hem de kimyasal sinyaller olarak beyne ileterek görme duyusunu oluşturan göz içindeki fotoreseptör hücreleri ve glial hücrelerden oluşmaktadır. Retina gözün vasküler koroid ve fibröz sklerayı içeren diğer ana katmanları arasında en içteki sınırı oluşturmaktadır (Şekil 2.1, Şekil 2.2). Hastalık belirtileri retinada yaşamın farklı aşamalarında ortaya çıkabilir, bunların çoğu görme yeteneğini ve dolayısıyla yaşam kalitesini ciddi şekilde tehlikeye atmaktadır (Nguyen vd., 2022).

Embriyogenez sırasında, vertebral retina optik çanaktan veya optik vezikülün invajinasyonu ile oluşur. Vitröz boşluğu çevreleyen optik çanağın iç duvarı nihayetinde

nöral retina olur. koroid ve sklera ile çevrili dış duvar, retina pigment epiteli (RPE) haline gelmektedir (Miller vd, 2005). Retina, çevresindeki sklera ve kornea tarafından korunmaktadır. Retinanın merkezinde makula olarak bilinen bölgenin merkezinde hafif oval şekilli, damarsız kırmızımsı nokta olan fovea bulunmaktadır (Willoughby vd., 2010) (Şekil 2.4). Yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve diyabetik retinopatinin oldukça yaygın hale gelmesiyle, retinaya ilaç verme yöntemlerinin iyileştirilmek amacıyla etkili biyoyararlanım sağlayan ancak oldukça invaziv olan ve sıklıkla tekrarlanan kullanımda oküler komplikasyonlara yol açan intravitreal enjeksiyonlar, hidrojel, lipozomlar ve sentetik polimerler gibi nanopartiküller kullanılmaktadır (Bozzuto ve Molinari, 2015).



Şekil 2.4. Retina'nın anatomik yapısı (http-4)

2.1.5 Oküler enfeksiyonlar

Yaralanmalar; korneadaki küçük sıyrıklar, genellikle kendi kendine iyileşir. Daha derin çizikler veya diğer yaralanmalar kornea izine ve görme sorunlarına neden olabilir (http-5). Cogan Sendromu ise, görmede azalma ve ışığa duyarlılık yaratan otoimmün bir hastalıktır (http-8). Korneal ülser, Gözde enfeksiyon nedeniyle oluşur (http-9). Polen alerjisi gözleri tahriş edebilir ve alerjik konjonktivite neden olabilmekte, gözler kırmızı, kaşıntılı ve sulu hale gelebilir. Keratit, kızarıklık ve şişlik yaparak korneanın iltihaplanmasına neden olmaktadır. Keratitin en yaygın nedeni, kontakt lenslerle ilgili enfeksiyonlardır. Gözler yetersiz gözyaşı sergilediğinde, kuru göz hastalığı meydana

gelmektedir. Rahatsız edici ve görme sorunlarına neden olabilmektedir (http-5). Steven-Johnson sendromu, irido korneal endotel sendromu ve pterijum dahil olmak üzere oküler uçuklar korneayı etkileyebilecek daha az yaygın görülebilecek bir hastalık türüdür (http-6). Oküler herpesin ana nedeni *Herpes simplex* virüsü I'dir (HSV I). Kornea yüzeyinde hasar oluşturmakta ve buna bağlı olarak görme yetisinde azalmalara neden olabilmektedir (http-7). Zona virüsü daha önce geçirmiş kişilerde suçiçeği virüsünün tekrarlanmasıdır. *Herpes zoster* korneada kabarcıklara veya lezyonlara, ateşe ve etkilenen sinir liflerinden ağrıya neden olabilmektedir (http-10). Keratokonus, normalde yuvarlak kubbe şeklindeki korneanın giderek incelmesi ve koni benzeri bir çıkıntının gelişmesinden dolayı önemli görme bozukluğuna sebep olmaktadır. Harita-nokta-parmak izi distrofisi ise korneanın en dış tabakası olan epitelin anormal kıvrımlarına ve yeniden çoğalmasına neden olan kornea rahatsızlığıdır. Fuch distrofisi de korneanın en iç tabakası olan kornea endotelinin kademeli olarak bozulmasıdır. Bu hücreler zamanla zayıfladıkça kornea şişerek bulanık görmeye sebep olabilir (http-11).

2.1.6 Fizyolojik ve farmakokinetik sınırlamalar

Gözün fizyolojik yapısı oküler uygulamalarda pek çok ilacın düşük emilimine neden olmakta ve buna bağlı olarak oküler çözeltiler ile çoğunlukla düşük terapötik etkinlik gözlenmektedir (Bhattarai vd., 2010). Gözü yabancı maddelerden uzak tutmak için lakrimasyon ve göz kırpması hareketi de uygulanan formülasyonların göz yüzeyinden kolaylıkla uzaklaşmasına neden olmakta ve buna bağlı olarak oküler tedavi oldukça güçleşmektedir (Bhattarai vd., 2010; Almeida, 2013). Ticari göz damlaları çoğunlukla 25-56 ml hacimde hazırlanarak tekrarlı uygulamalar gerektirmektedir (Almeida vd., 2016). Göze bir damla damlatıldığında, insan konjoktival forniksi anlık olarak yaklaşık 30 µl hacim içerebilir, ancak damlatılan çözelti, göz yaşının 7-10 µl'lik normal hacmine dönene kadar damlatılan çözelti konjoktival forniksten hızla dışarı akmaktadır (Järvinen vd., 1995). Göze damlatıldıktan sonra, ilaç gözyaşı filminde bulunan sıvı ile karışır ve kalıcı lakrimal sıvı üretimi (0.5–2.2 ml / dak) nedeniyle filmde yaklaşık 1– 2 dakikalık kısa bir kalma süresine sahiptir (Li ve Chauhan, 2006). Lakrimal devir hızı sadece yaklaşık 1 ml / dk olmasına rağmen, sıvının fazla hacmi çok kısa bir süre içinde nazolakrimal kanala doğru yol almaktadır (Ludwig, 2005; Urtti, 2006; Gan vd., 2013). Diğer bir kısıtlama ise, ilacın oküler absorpsiyonu yerine sistemik absorpsiyona

uğramasıdır. İlaç içeren gözyaşı nazolakrimal kanala gider ve burun boşluğuna boşalmaktadır. Buradan ilaç, sistemik dolaşıma katılmaktadır. Bu da, ilaç kaybına ve olası yan etkilere yol açabilmektedir (Xinming vd., 2008). Lipofilik ilaçlar korneadan, kolaylaştırılmış difüzyon veya iki katmanlı lipit tabakasında difüzyonla kolayca geçebilirken, hidrofilik ilaçların gözyaşı filminden kornea veya konjonktival epitele geçmesi zordur. Hem kornea hem de kornea dışı epitelden paraselüler giriş, hidrofilik ilaçlar için en önemli penetrasyon yolu haline gelmektedir (De La Fuente vd., 2010).

2.1.7 Oküler uygulamalarda biyoyararlanımı artırmak için stratejiler

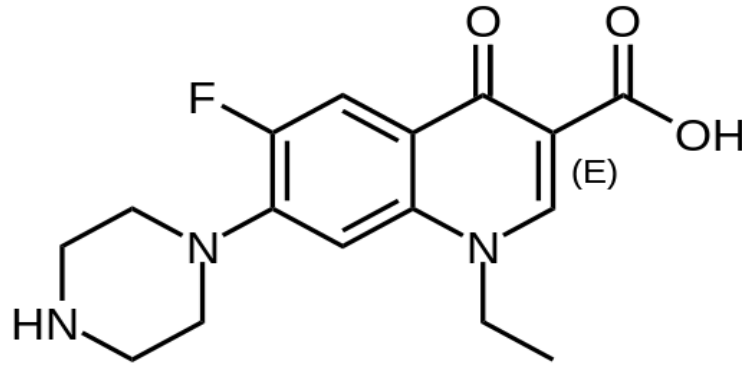
Oküler biyoyararlanımı iyileştirmek için ön ilaçlar, penetrasyon artırıcılar, iyon çiftleri, iyontoforez ve siklodekstrinler ile kimyasal ve farmasötik modifikasyonla kornea geçirgenliği arttırılmaya çalışılmış, süspansiyon, merhem, vizkoz, biyoadezif ya da *in situ* jelleşen taşıyıcılar ile ilacın gözde kalış süreci uzatılmak istenmiştir (Irimia vd., 2018; Kour vd., 2021).

Lipozom, emülsiyon, nanopartikül ya da nanokapsül gibi yeni geliştirilen kolloidal dispersiyon sistemler ile ilacın daha uzun süre retansiyonu sağlanmıştır. Ek olarak, parçalanabilir matrisler, parçalanabilir olmayan matrisler, kollajen kalkanları ve temas mercekle ve membran kontrollü cihazlar ve implante edilebilir cihazlar kullanılmaktadır (Almeida vd., 2013). Polimerik jel kullanımı ile hazırlanan solüsyonlar vizikosite vermek suretiyle biyoyararlanımı artırmak için kullanılan başarılı yöntemlerden biridir (Abdel-Mottaleb vd., 2007; Nagarwal vd., 2009). Viskozitedeki artış rahatsızlığa ve bulanık görmeye veya yabancı cisim hissine neden olabilir. Bu sebeple, en uygun vizikozite aralığı ve reolojik davranışın seçilmesi gerekmektedir (Zhu ve Chauhan, 2008). Jelleşmeden önceki formülasyonlar 5-1000 mPas'lık bir viskoziteye sahip olmalı ve gözde jelleştikten sonra yaklaşık 50-50.000 mPas'lık bir viskoziteye sahip olmalıdır (Mohanambal vd., 2011).

2.2 Norfloksasin

2.2.1 Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kapalı formülü $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ olan 1-etil (-6-floro- 1,4-dihidro-4-okso-7- (1-piperazinil)-kinolin-3-karboksilik asit olarak isimlendirilen NFX, genel olarak, çok çeşitli aerobik gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkilidir. NFX'in moleküler ağırlığı 319.33 g/mol'dür. Madde beyaz/açık sarı renkli kristal yapılı bir tozdur (http-12). Kokusuzdur ve tadı acıdır. Buzlu asetik asitte serbestçe çözünür ve etanol, metanol ve suda çok az çözünür (Hongtanee, 2022). CAS (Chemical Abstracts Service) kayıt numarası 0458-96-7'olan NFX'in partisyon katsayısı (oktanol/su) 0.46'dır. Erime noktası ise yaklaşık 220-221 °C'dir. Hava ile temasta higroskopik, hemihidrat oluşturur. (O'Neil, 2006). NFX, iki proton grubu reseptörüne sahiptir. Karboksilik grup, hafif asit koşullarında protonlanır (pKa 6.34). Alkali ortamda protonlanan piperazin halkasındaki dördüncü konumdaki nitrojen ile ilişkili grup, pKa 2D 8.75 (Mouton ve vd., 2005). Nötral pH'da ağırlıklı olarak zwitterion vardır (protonsuz karboksilik grup ve protonsuz N-4 ile). pH 10'da, etkin maddenin % 90'ından fazlası iyonik formda; pH 4.5 ve altında ise katyonik formda bulunmaktadır. pH 4.5'in altında veya 8.0'ın üzerinde sudaki çözünürlüğü artmaktadır (Musa ve Eriksson, 2009). NFX'in açık formülü Şekil 2.5'te gösterilmiştir (http-13).



Şekil 2.5. Norfloksasin'in açık formülü (http-13)

2.2.2 Norfloksasin'in farmakolojik özellikleri

NFX, sentetik, florokinolon grubuna ait geniş spektrumlu antibakteriyel bir ajandır (Naeem vd., 2016). Özellikle NFX'in antibakteriyel spektrumu, çoklu antibiyotiğe

dirençli, gram negatif çubuklar, aminoglikozide dirençli *P.aeruginosa* ve beta-laktamaz üreten organizmaları içerir (Tabcheh vd., 2023). NFX'in etki mekanizması, DNA replikasyonu için gerekli olan bakteriyel DNA girazın inhibisyonu şeklindedir (Hooper ve Jacoby, 2016). NFX yüksek verimli antibakteriyel etkiye, iyi oral absorpsiyona ve düşük toksisiteye sahiptir. Genellikle iyi tolere edilir ve yan etkileri çok şiddetli değildir. NFX uzun zaman önce sentezlenmiş olmasına ve ardından birçok florokinolonun geliştirilmiş olmasına rağmen, çeşitli bulaşıcı hastalıkların tedavisinde hala çok önemli bir yere sahiptir (Thompson, 2007).

NFX, 6. pozisyonda bir flor ve 7. pozisyonda bir piperazin halkası ile oral olarak emilen bir florokinolon antibakteriyeldir. 6 Pozisyonundaki flor atomu, gram negatif organizmalara karşı gücü artırır ve 7 pozisyonundaki piperazin kısmı, anti-psödomonal aktiviteden sorumludur. Bu değişiklikler, in vitro antibakteriyel aktivitede eski kinolonlarınkine kıyasla belirgin bir artışa sebep olmuştur (Fedorowicz vd., 2023). NFX *Neisseria Gonorrhoeae*'nin hem penisiline duyarlı hem de penisiline dirençli suşlarına karşı aktiftir. NFX, gram pozitif koklara, gram negatif bakterilere göre daha düşük etkiye sahiptir. Genel olarak stafilokoklar ilaca streptokoklardan daha yatkındır. NFX, diğer florokinolonlar gibi, anaerobik bakteri aktivitesi düşüktür (Upton, 2021). İlk kinolon olan Nalidiksik asit (1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4 okso 1,8-naftiridin-3-karboksilik asit), 1962'de sentezlenen yeni 1,8-naftiridin antimikrobiyal ajan sınıfının ilkidir. Antimalaryal ilaç olan Klorokin'in den türetilmiştir. O zamandan beri, kimyasal olarak ilişkili bir dizi başka bileşik sentezlenip, değerlendirilmiş ve tedaviye dahil edilmiştir (Chierentin ve Salgado, 2013). Kinolon molekülünün florürlenmesinden sonra mevcut ajanlar iyileştirilmiş ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay alan ilk kişi norfloksasin (1-etil-6-floro-1,4dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolinkarboksilik asit) 1984'te ve ilaç şirketi Kyorin Seiyaku Kabushiki Kaisha tarafından patentlenmiştir (Bolon, 2009).

NFX'in etki mekanizması, DNA replikasyonu için gerekli olan önemli bakteriyel enzim DNA girazının A alt biriminin inhibisyonuyla DNA replikasyonunun bloke edilmesine bağlıdır ve bu bir DNA çift sarmalını ikiye kopyalamak için gereken çözülmeye izin verir (Crumplin vd., 1984; Pohlhaus Kreuzer, 2005). DNA giraz, 100.000 ila 150.000 dalton moleküler ağırlığa sahip iki A alt biriminden ve her biri 90.000 ila 95.000 dalton moleküler ağırlığa sahip iki B alt biriminden oluşmaktadır. Florokinolonlar

A alt birimini inhibe etmektedir (Spencer ve Panda, 2023). NFX, bakteriyel DNA giraz için memelilere göre 100 kat daha yüksek afiniteye sahiptir. Florokinolonlarda plazmid aracılı dirençle karşılaşılmaz (Goldstein, 1987) NFX, 1980 yılında, geniş antibakteriyel aktivite spektrumunu belgeleyen Japonlar tarafından sentezlenmiştir (Kumazawa ve Yagisawa, 2002). Florokinolonların bakterisit aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğunu bildirilmiştir (Chen vd., 2012). Çeşitli enfeksiyon modellerinde antibakteriyel etkinliği tahmin etmede minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) verileriyle birlikte farmakokinetik verilerin oynadığı önemli rolü tartışılmıştır (Segreti vd., 2012). Florokinolonlar gastrointestinal sistemden hızlı bir şekilde emilmektedir (Borcherding vd., 1996). Oral yoldan verilen florokinolonların emilimi, magnezyum, alüminyum, demir, çinko veya kalsiyum ile birlikte uygulandığında önemli miktarda düşer. Bu bileşikler, gastrointestinal sistemde çözünmeyen bir ilaç katyonik şelat kompleksi oluşturmaktadır. Bu ilaçların emilimi, yiyeceklerden sınırlı derecede etkilenmektedir (Walden vd., 2021). Florokinolonların solunum yolu dokularına ve sıvılarına dağılımı, bu ajanların yaygın solunum yolu patojenlerine karşı aktivitesi sebebiyle ilgi çekmektedir (Chierentin ve Nunes Salgado, 2015).

NFX safra ve böbrek yoluyla vücuttan atılmaktadır. Yaklaşık 275 mL/dk'lık yüksek böbrek klirens hızı, böbrek atılımı sırasında hem glomerüler filtrasyona hem de tübüler sekresyona girmesi beklenir. NFX'in yarılanma ömrü 3-4 saattir (Merck &Co. Inc., 2000). Florokinolonlar uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Bu sebeple günde bir veya iki kez dozlama yapmak yeterlidir. NFX'in toksisitesi ile ilgili mevcut çalışmalar, her biri 3 ila 14 gün boyunca günde iki kez 400 mg dozlarda verilen NFX'in yan etkileri hakkında bilgi sağlar (Philipps vd., 2000). NFX için, 200-400 mg'lık bir oral dozdan sonra, 60-90 dakika içinde sırasıyla 0.8 ± 0.3 ve 1.5 ± 0.6 mg L⁻¹'lik ortalama pik serum konsantrasyonları elde edilir. Gıda ve süt ürünleri, NFX'in emilimini hafifçe etkilemektedir. Hayvanlarda yapılan çalışmalar, NFX'in dağılım hacminin çok büyük olduğunu, vücut ağırlığının yaklaşık %50'sinin ve biyoyararlanımının %50-80 olduğunu göstermektedir. Serumdaki ilacın yaklaşık % 15'i plazma proteinlerine bağlanmaktadır. 200 mg'lık tek bir oral dozdan sonra, insan sütünde NFX bulunamamıştır. Nispeten düşük lipofilite nedeniyle çok düşük bir merkezi sinir sistemi penetrasyonuna sahiptir (Chierentin ve Nunes Salgado, 2016; Chenel vd., 2004). NFX, sistit, piyelit, sistopiyelit, piyelonefrit, kronik prostatit, epididimit ve ürolojik cerrahi ve nörojenik mesane ile ilişkili genitoüriner enfeksiyonlar; akut gastroenterit; duyarlı mikroorganizmaların neden

olduğu bakteriyel; *Neisseria gonorrhoeae* suşlarının neden olduğu ve penisilinaz üretmeyen gonokokal servisit; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* ve *Serratia marcescens*; kornea konjonktivasını içeren yüzeysel oküler ve bazı *Streptococcus pneumoniae* hariç Gram neden olduğu enfeksiyonlara neden olan hastalıkların tedavisinde faydalıdır (Ramirez-Ronda vd., 1987; Roner vd., 2004; Wagenlehner vd., 2011; Gauzit ve Lakdhari, 2012).

Enfeksiyona neden olan organizmaları izole etmek ve tanımlamak ve NFX'e duyarlılıklarını belirlemek için tedaviden önce uygun kültür ve duyarlılık testleri yapılmalıdır (Merck, 2000). İdrar yolu enfeksiyonları üzerine yapılan 12 çalışmada, 1.136 hasta arasında toplam 77 advers reaksiyon rapor edilmiştir. NFX, çalışmalarının çoğunda hastaların yüzde onundan daha azında bildirilen hem mümkün hem de olası reaksiyonlar dahil, hepsi mutlaka ilaca bağlı advers reaksiyonlarla genel olarak iyi tolere edilmiştir. bulantı, kusma, anoreksi gibi gastrointestinal semptomlar ve baş dönmesi, baş ağrısı, uyuşukluk, uykusuzluk en sık bildirilenlerdir ancak tedavinin kesilmesini gerektirecek kadar şiddetli bulunmamışlardır. Eklem şişmesi veya tendiniti olan dört hastada, ikisi NFX ile tekrar verildiğinde nüks gösterdi, ya düşük sıklıkta ya da kan sayımı ve karaciğer fonksiyon testleri gibi laboratuvar testlerinde anormallik rapor edilmemiştir. Bir çalışmada, hem NFX hem de trimetoprim-sülfametoksazol alan hastalarda eşdeğer daha yüksek laboratuvar anormallikleri sıklıkları bulunmuştur (Sharma vd., 2008). Tablo 2.1'de NFX'e bağlı en sık görülen yan etkiler sıralanmıştır (Bertino ve Fish, 2000).

Tablo 2.1. Norfloksasin'e bağlı olarak gözlenen advers etki insidansları (Bertino ve Fish, 2000)

Yan Etki	İnsidans(%)
Bulantı	2.6-4.2
İshal	0.3-1.0
Tat Almada Bozulma	-
Baş Ağrısı	2.8
Baş Dönmesi	1.7
Fototoksosite	1.6

NFX için, 200-400 mg'lık bir oral dozdan sonra, sırasıyla 0.8 ± 0.3 ve 1.5 ± 0.6 mg L⁻¹'lik ortalama pik serum konsantrasyonları 60-90 dakika içinde elde edilir. Gıdaların ve özellikle süt ürünlerinin varlığı emilimini biraz bozmaktadır. Hayvanlarda yapılan çalışmalar, NFX dağılım hacminin çok büyük olduğunu, vücut ağırlığının yaklaşık %50'sinin ve biyoyararlanımın %50–80 olduğunu göstermektedir. Plazma proteinlerine yaklaşık %15 oranında bağlanır. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 3 saat olarak bildirilmiştir. Kararlı bir NFX konsantrasyonuna genellikle dozlamadan sonraki iki gün içinde ulaşılır (Sharma vd., 2008). NFX'in vücuttaki farmakokinetik özellikleri ve dağılımı Tablo 2.2'de özetlenmiştir (Katzung, 2004).

En önemli kazanılmış kinolon direnci, bakteriyel DNA giraz enziminin mutasyonundan kaynaklanır (Grüger vd., 2004). En fazla olduğu organizmalar *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter spp.* ve *Enterococcus spp.* NFX'e direnç gösterir. Bu nedenle NFX, aminoglikozitler, penisilinler, sefalosporinler, tetrasiklinler, makrolidler ve sülfonamidler dahil olmak üzere diğer bazı antimikrobiyal ajanlara dirençli belirtilen organizmalara karşı aktivite gösterebilir. NFX ve nitrofurantoin arasında *in vitro* antagonizma gösterilmiştir (Sharma vd., 2008).

Tablo 2.2. Norfloksasin'in farmakokinetik özellikleri (Katzung, 2004)

Etkin Madde	Yarılanma Ömrü (sa)	Oral Biyoyararlanım (%)	Serum Tepe Konsantrasyonu (µg/mL)	Oral Doz (mg)	Atılım yolu
Norfloksasin	3.5-5	80	1.5	400	Böbrek

Tüm florokinolon ajanları, alüminyum veya magnezyum içeren antasitler ve antasitler ve kalsiyum, demir veya çinko içeren ürün gibi çok değerlikli katyon içeren ürünlerle etkileşime girer (Walden ve Khotimchenko, 2021). Antiasitlerin varlığı NFX'in gastrointestinal sistemden emilimini azaltmakta ve buna bağlı olarak ciddi bir enfeksiyonun tedavisi sırasında tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir (Aronson, 2016). Teofilin ve NFX birlikte uygulandığında, teofilin seviyelerinin izlenmesi tavsiye edilmektedir (Merck, 2000). NFX'in siklosporinler ile birlikte kullanımı yüksek serum siklosporin seviyeleri bildirilmiştir (Weiner ve Buhimschi, 2009). NFX, idrar yolu

enfeksiyonları, *Neisseria gonore* üretrit ve/veya servisit tedavisinde etkilidir. Beş gün boyunca günde iki veya üç kez 400 mg NFX kullanımı, *E. coli* veya *Shigella* türlerinin neden olduğu bakteriyel gastroenterit tedavisinde kotrimoksazol veya nalidiksik asit kadar etki göstermiştir (Sharma ve Jain, 2008).

Oral yoldan 14 gün boyunca günde 3 kez 400 mg kullanımı tifo ateşinin tedavisinin etkililiğinde kanıtlanmıştır (Effa vd., 2011). NFX, hepatik siroz ve asitli hastalarda bakteriyel peritonit oranını azaltmak için önemli bir başarı ile kullanılmıştır (Dong vd., 2022). NFX oftalmik solüsyonu, bakteriyel konjonktivit tedavisinde kloramfenikol kadar etki göstermektedir (Epling, 2010). Öncelikle birinci basamak antitüberküloz tedavisinde direnç veya intolerans içeren vakalarda tüberkülozu tedavi etmek için kullanılsa da, florokinolon grubu ilaçlar potansiyel birinci basamak ajanlardır ve bu endikasyon için incelenmektedir. Bununla birlikte, *Mycobacterium tuberculosis*'te, özellikle monoterapi olarak veya başarısız bir çoklu ilaç rejiminde tek aktif ajan olarak uygulandığında florokinolon direncinin gelişmesi konusunda endişeler vardır (Ginsburg vd., 2003).

2.2.3 Norfloksasin ile tedavi edilebilen oküler enfeksiyonlar

NFX, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* ve *Staphylococcus pneumoniae* bakterilerinin duyarlı suşlarının neden olduğu konjonktivit ve blefarit tedavisinde endikedir (Merck, 2000).

2.2.4 Norfloksasin'in miktar tayini yöntemleri

NFX'in miktar tayininde en çok Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ve Ultraviyole ve görünür ışık spektrofotometrisi (UV-VIS) kullanılmaktadır. Mendes ve arkadaşları (2015), β -Siklodekstrin inklüzyon komplekslerinde NFX'in kantitatif analizi için YBSK metodu kullanmışlardır. 40 °C'de Fosfat tamponu (pH 3.0) ve asetonitrilden (86:14 v/ v) oluşan basit bir mobil faz, floresan dedektör kullanılan çalışmada Akış hızı 1 mL/dk ve dalga boyu 278 nm'dir. Siddiqui vd. (2009), farmasötik formülasyonlarda ve insan serumunda ayrı ayrı pefloksasin, nrfloksasin, siprofloksasin ve ofloksasinin

kantitatif tayini için YBSK yönteminden faydalanmışlardır. Çalışmalar, fosforik asit ile ayarlanmış bir pH 2.9'un su-asetonitril (50: 50, v / v) mobil fazı ve dahili standart olarak propilparaben kullanılarak yürütülmüştür. Analizler, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarında bir Ultraviyole (UV) detektörü kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Chierentin ve Nunes Salgado (2014), tabletlerde NFX'in kantitatif tayini için UV-VIS spektrofotometrilerini kullanmışlardır. NFX, UV yönteminde 0,1 M hidroklorik asit (HCl) ortamında 277 nm'de maksimum absorpsiyon gösterirken, VIS spektrofotometrik yöntem için kloranilik asit reaktifi ile reaksiyona girerek maksimum absorpsiyonu 520 nm'de olan mor bir çözelti oluşturmuştur. Kassab vd. (2005), Siprofloksasin ve NFX'in YBSK ile kantitatif tayinini yapmışlardır. Su:asetonitril:triethylamin (80:20:0.3 v/v/v) kullanılmış olup, pH fosforik asit ile 3.3'e ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 279 nm'de analizler gerçekleştirilmiştir. Bera vd. (2014), Formülasyonlardaki NFX kantitatif tayini için için Ters Faz-YBSK Yöntemi kullanmışlardır. 60:40 oranında 5.3 mM pH 3.5 fosfat tamponu ve asetonitrilden oluşan hareketli bir faz kullanılmış ve NFX'in dalga boyu ve retansiyon süresi sırasıyla 278 nm ve 2.11 dk olarak bulunmuştur.

2.2.5 Norfloksasin içeren ticari preparatlar

Ülkemizde NFX'in ticari preparatının bulunmamasına rağmen, dünyada Astrica firmasının Norfloxacin I.P[®] 400 mg tablet, MSD firmasına ait Noroxin[®] 400 mg tableti ve Cipla firmasının Norflox[®] oküler süspansiyonu (0.3% NFX) bulunmaktadır ([http-12](http://12)).

2.3 Oküler Uygulamaya Yönelik Hazırlanan Etkin Madde Taşıyıcı Sistemler ve Uygulama Yolları

2.3.1 Oküler topikal uygulama ve oküler tedavinin kısıtlamaları

Farmakoterapötiklerin temel amacı, yanıtı ortaya çıkarmak için yeterli bir süre boyunca amaçlanan etki bölgesinde etkili bir ilaç konsantrasyonunun elde edilmesidir. Oküler terapötiklerde karşılaşılan önemli bir sorun, etki bölgesinde optimal bir konsantrasyonun elde edilememesidir. İlaçların oküler dozaj formlarından zayıf biyoyararlanımı, esas olarak gözyaşı üretimi, düşük emilim, kısa kalma süresi ve kornea

epitelinin geçirgenliğinin az olmasından kaynaklanmaktadır (Karthikeyan ve Pandey, 2009).

Sıklıkla kullanılan oküler dozaj formları;

- (a) Jeller, viskozite veren ajanlar, merhemler ve sulu süspansiyonlar dozaj formları.
- (b) Daha yeni penetrasyon artırıcılar kavramı, faz geçiş sistemleri, çeşitli ilaçların çözünürlüğünü artırmak için siklodekstrinlerin kullanımı, veziküler sistemler ve aşağıdakiler gibi kimyasal dağıtım sistemleri ön ilaçlar.
- (c) Oküler uygulanabilen kollajen kalkanlar, oküler filmler, tek kullanımlık kontakt lensler ve diğer yeni oftalmik ilaç dağıtım sistemleri dahil olmak üzere geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan kontrollü/sürekli ilaç dağıtım sistemleri.
- (d) Etkili olmayan bir ilacın terapötik tepkisini iyileştirmek için ilaç dağıtım teknolojilerinin bir kombinasyonuna yönelik yeni eğilimler olarak gruplandırılabilir (Kaur ve Kanwar, 2002)

Gözyaşı, emilim, kornea epitel zarının nispi geçirimsizliği vb. sebepler precornal kayıp faktörlerinden kabul edilmektedir. Bu nedenle, ilaçların oküler dozaj formlarında biyoyararlanımı düşüktür. Aktif maddenin biyoyararlanımı, gözyaşı döngüsü, göz kırpmaya refleksi, nazolakrimal drenaj veya oküler engeller gibi anatomik ve fizyolojik kısıtlamalardan dolayı %5'in altındadır. Oftalmik olarak uygulanan doz, ilacın uygulama gücü, hacmi, uygulama sıklığı veya ilacın göz yüzeyi ile temas halinde tutulma süresi değiştirilerek ayarlanabilmektedir (Irimia vd., 2018). Topikal damlatma, ön segmenti etkileyen hastalıkları tedavi etmek için en çok tercih edilen invaziv olmayan ilaç uygulama yoludur. Göz damlası gibi geleneksel dozaj formları, oftalmik formülasyonların % 90'ını oluşturmaktadır. Bunun nedeni, uygulama kolaylığı ve hasta uyumu ile ilişkilendirilmektedir (Gulsen ve Chauhan, 2004). Ayrıca, yukarıda belirtilen engeller nedeniyle topikal göz damlası damlatılmasının ardından arka segment oküler dokulara terapötik ilaç konsantrasyonunun sağlanması zordur (Patel vd., 2013).

İlaç, intravitreal enjeksiyonlar, perioküler enjeksiyonlar ve sistemik uygulama gibi farklı uygulama şekilleri ile arka segment oküler dokulara verilebilmektedir (Patel vd., 2013). Epitel ve endotel, lipitler açısından zengindir. Stroma, yüksek su içeriğine sahiptir (Lai, 2013). Epitelin, transkorneal taşınmanın hız sınırlayıcı engeli olduğu

bildirilmektedir. Bariyer işlevi, moleküllerin lipofilitesine olumlu bir şekilde bağlıdır ve makromolekülleri dışlar (Akhter vd., 2022). Kornea epitelinin yüzey tabakası, deskuamasyon hücrelerinden oluşmaktadır. Deskuamasyon hücreleri, güçlü bir bariyer oluşturan “sıkı kavşaklar” olarak adlandırılan hücreler arası kavşaklara sahiptir. Hücreler arası sıkı kavşaklar, hidrofilik maddelere zayıf geçirgendir ve daha büyük moleküllerin geçişini kısıtlamaktadır. Korneadan nüfuz edebilen maksimum moleküler ağırlığın 500 Da olduğu bildirilmiştir (Diebold ve Calonge, 2010). Epiteli kolayca geçecek kadar lipofilik küçük moleküller için, stroma ve endotel önemli bir rol oynar ve endotel daha önemlidir (Ohia ve Sharif, 2022). Kornea stroması kollajenden oluşur ve paralel lameller halinde düzenlenir. Oldukça hidrofilik, gözenekli ve açık örgülüdür, bu nedenle hidrofilik moleküllerin kolayca geçmesine izin verir. Makromoleküller için stroma, endotel Alıntısından daha büyük bir bariyer sağlar (Prausnitz ve Noonan, 2000). Kornea endoteli, aköz hümör ile korneanın arka yüzeyini kaplayan tek hücreli bir tabakadır (Eghrari vd., 2015). Yüksek metabolik aktivite, hücrelerin sitoplazmasından kaynaklanmaktadır. Kornea endoteli, maddelerin aköz hümörden stromaya geçişini düzenler (Parekh vd., 2021). Endotel fosfolipitler açısından zengin olması sebebiyle lipofilik maddelere karşı geçirgendir. İyonlar ise oldukça zor geçmektedir (Bye vd., 2013). Korneadan emilim, eliminasyona göre daha yavaştır (Rajput vd., 2023).

Topikal oftalmik ilaçlarda korneal absorpsiyon ve göz yaşının buharlaşması biyoyararlanımı artırmaktadır. Drenaj, göz yaşı devri, ilaç-protein etkileşimi, pH farkı, metabolizma ise biyoyararlanımı düşürmektedir (Kaur ve Kanwar, 2002). Gözün ön kornea yüzeyi, gözyaşı bezlerinden gözyaşı sıvısı olarak salgılanan gözyaşlarıyla nemli tutulur. Gözyaşları korneayı bir film şeklinde kaplarlar (Dartt ve Willcox, 2013). Gözyaşı filmi üç farklı katmandan oluşur: Glikoprotein içeren iç katman; lizozim içeren orta sulu katman ve gözyaşlarının buharlaşmasını en aza indiren dış yağlı katman (Chang ve Purt, 2022). İlaç, damlatma üzerine, oftalmik ilaç dağıtımına karşı müthiş bir savunma uygulayan koruyucu fizyolojik mekanizmaları, yani gözyaşı üretimini uyarır (Kumar vd., 2012). Bir damla sulu çözeltinin gözden atılması yaklaşık 5-6 dakika sürer, ilacın kornea bariyerine nüfuz etmesi için oldukça az bir zamandır (Ollinkangas, 2022). Hidrofilik ilaçlar gibi kornea boyunca zayıf emilen topikal olarak uygulanan oftalmik ilaçlar, bulbar konjonktiva ve ön sklerayı uveal yola geçen kornea dışı absorpsiyon yolu yoluyla emilebilir ve ilaç aköz hümörü atlayarak iris-siliyer cisme ulaşmaktadır (Amo, 2022). Konjonktiva yoluyla ilacın sistemik emiliminin, konjonktival kan kılcal damarlarının ve

lenfatiklerin varlığından dolayı verimsiz olduğu düşünülmektedir. Sistemik dolaşımda önemli ilaç kaybına neden olarak oküler biyoyararlanımı azaltabilmektedir. Hidrofilik bir ilaç penetrasyonunun, sklerokonjonktival yolun transkorneal yola göre daha hızlı olduğu düşünülmektedir (Ameeduzzafar vd., 2016). İlaç moleküllerinin sklera boyunca difüzyonu için perivasküler boşluklar yoluyla, jel benzeri mukopolisakkaritlerin sulu ortamı yoluyla veya bir kollajen fibril matrisinden oluşan skleral madde boyunca total üç olası yol olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, kornea dışı yollar, yeni oküler dağıtım sistemlerinde kullanılabilirler (Ambati ve Adamis, 2002). Topikal olarak uygulanan ilaçlar daha geniş yüzey alanı ve nazal mukozal membranın daha yüksek geçirgenliği sebebiyle daha düşük etki göstermektedirler (Patel vd., 2010). Bu sebeple oküler ilaçlar, nazal mukozal yol ile sistemik dolaşıma girme olasılığına sahiptirler (Farkouh vd., 2016). Prekorneal faktörler, ilaç penetrasyonunu oldukça düşürür ve aktif bileşenlerin %10 veya daha düşük miktarı göz dokularına ulaşabilmektedir. Anatomik ve fiziksel engellerden dolayı etkin maddenin %1'inden daha azı istenilen etkinin sağlamak için kullanılabilir (Kaur ve Kanwar, 2002).

2.3.2 Biyoyararlanımı artırmak için kullanılan formülasyonlar

Oftalmik farmasötik araştırmalarda karşılaşılan zorluk, oküler ilaç biyoyararlanımının çok düşük değerlerde (%5-20) olmasıdır. Özellikle topikal uygulamalarda oküler biyoyararlanımı arttırmak için yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çoğunlukla bu sistemler ile prekorneal ilaç emilimini en üst düzeye çıkarmaya ve prekorneal bölgedeki ilaç kaybını en aza indirmeye çalışılmaktadır (Patel vd., 2010). Bu amaçla pek çok yeni formülasyon geliştirilmiştir. Tezimizin ilerleyen kısımlarında bu sistemler kısaca tanıtılmaya çalışılacaktır.

2.3.2.1 Hidrojeller

Hidrojeller, su veya biyolojik sıvıları emebilen hidrofilik, üç boyutlu maddelerdir (Peppas vd., 2000). Hidrojeller, yapısındaki fiziksel ve kimyasal bağlardan şişme davranışı göstermektedirler. Biyouyumlu ve dıvı olarak canlı bir hücreye uygulandıklarında vücut sıcaklığında jelleşebilmektedirler. Kontrollü salıma izin vermektedirler. Modifiye edilebilmekte ve biyoparçalanır ya da biyoemilebilir

yapıdadırlar. (Singh vd., 2010). Hidrojellerin yüksek maliyet, zor sterilize edilebilme, kolay bakteriyel kontaminasyon ve kontak lenslerde görülen reaksiyonlar gibi dezavantajları vardır (Peppas vd., 2000). pH, sıcaklık, çevresel değişiklik vb. uyaranlara bağlı olarak hidrojeller şişer. Hidrojel içeren ilaç sulu ortamla temas ettiğinde, su sisteme nüfuz eder ve difüzyon yoluyla ilaç ortama salınmaktadır (Nagam vd., 2016). Sulu jeller tipik olarak polivinil alkol (PVA), poliakrilamid, poloksamer, hidroksipropil metilselüloz (HPMC), karbomer, polimetilvinileter maleik anhidrit ve hidroksipropil etilselüloz gibi polimerleri kullanır. Hidrojeller, suda çözünen ilaçların salınmasına yardımcı olan gözyaşı sıvısı ile uzun süreli tutma ve daha iyi karışabilirlik sağlayan yüksek viskozite gibi açık özellikler sunar. (Narayana ve Ahmed, 2022).

2.3.2.2 Viskozite artırıcı polimerler

Viskozite artırıcı polimerler, viskoziteyi artırma ve böylece preoküler bölgeden eliminasyon oranını düşürerek ilacın gözdeki penetrasyonunda fayda sağlama özelliklerinden dolayı oftalmik formülasyonlarda oldukça tercih edilen katkı maddeleridir. Prekorneal tutulum süresi ve transkorneal penetrasyonu artırır ancak insanlarda biyoyararlanımı arttırmak için çok daha az etkiye sahiptir (Raj vd., 2020). Polivinil alkol (PVA), polivinilpirolidon (PVP), metilselüloz, hidroksietil selüloz, hidroksipropil metilselüloz (HPMC) ve hidroksipropil selüloz viskoziteyi artırmak için kullanılır (Nisha ve Deepak, 2012). Viskoziteyi artırmak gözde bulanıklık yapabilmektedir. Formülasyon krem, jel ve merhem şeklindeki formlarda hazırlanabilmektedir (Bhaskaran vd., 2005).

2.3.2.3. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler (CD), α (1,4) bağlantılı glukopiranoz alt birimlerinden oluşan makrosiklik oligosakkaritlerdir (Laza-Knoerr vd., 2010). İlaçların fizikokimyasal stabilitesini, çözünürlüğünü, çözünme oranını ve biyoyararlanımını iyileştirmek için kullanılırlar. CD'ler biyoyararlanımı, çözünürlüğü ve çözünme oranını, terapötik aktivitenin yoğunluğunu veya süresini, geçirgenliğini, fizikokimyasal stabilitesini artırır. Doku tahrişi ve toksisiteyi azaltmaktadır (Jacob ve Nair, 2018). CD-ilac kompleksinin, kornea iltihabı, glokom, mantar enfeksiyonu ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon dahil

olmak üzere çeşitli ilaç kategorilerinin sulu çözünürlüğünü, ilaç salınımını, kornea geçirgenliğini, biyoyararlanımını ve klinik etkinliğini arttırmıştır (Ahn vd., 2017). CD'ler, hidrofobik ilaç moleküllerini çözelti içinde tutar ve sulu gözyaşı sıvısında kaldıkları biyolojik zarın yüzeyine ileterek taşıyıcı görevi görmektedir (Loftsson ve Stefánsson, 2003). Siklodekstrinler, lipofilik ilaçların çözünürlüğünü artırır ve çözünmüş ilaç moleküllerini membran yüzeyinde tutarak biyoyararlanımı artırmaktadır. (Löscher vd., 2022). Çok fazla siklodekstrin eklenmesi ise, ilacın biyoyararlanımını azaltacaktır (Cal ve Centkowska, 2008).

2.3.2.4. Süspansiyonlar

Süspansiyonlar, uygun süspansiyon ve dispersiyon ajanları içeren çoğunlukla aktif bileşenlerin çözücünde çözünmediği dispersiyonlardır (Maulvi vd., 2021). Formülasyonlarında süspansiyonlar, diğer tekniklerin uygun olmaması nedeniyle aseptik olarak hazırlanması gereken fiziksel stabilite ve sterilizasyon yöntemi ile ilgili sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Yanlış dozlamayı önlemek için süspansiyonlar kullanımdan önce yeterince çalkalanmalıdır ve çalkalama gerekliliği hasta uyumunun bozulmasına neden olabilir (Davies, 2000). Partikül büyüklüğündeki artışla birlikte retansiyon artarken, göz tahrişinde olduğu gibi askıda kalan ilaçların çözünme hızı da partikül boyutunun azalmasıyla artar. Bu nedenle, her ilaç türü için optimum bir partikül boyutu seçilmelidir (Toropainen vd., 2021). Depolama sırasında kristal yapısında, yani polimorfizmde bir değişiklik meydana gelebilir, bu da ilacın biyoyararlanımını etkileyebilmektedir (Kaur ve Kanwar, 2002).

2.3.2.5 Merhemler

Merhemler, gözü tahriş etmeyen ve vücudun fizyolojik sıcaklığında eriyen parafin gibi yarı katı ve katı hidrokarbonun bir karışımıdır (Rathore ve Nema, 2009). Biyoyararlanımı iyileştirmek ve ilaç salınımını sürdürmek için ilaç taşıyıcıları olarak faydalıdır. Ancak görme bulanıklığına ve göz kapaklarının matlaşmasına neden olabilmektedir (Sultana vd., 2006). Görüntüde bulanıklık oluşmasının önlenmesi için uyumadan önce alt göz kapağına sürülmektedirler. Susuz yapıda olmaları onları lipofilik ve neme duyarlı ilaçlar için iyi bir seçim haline getirir. Çözeltilere kıyasla daha yüksek

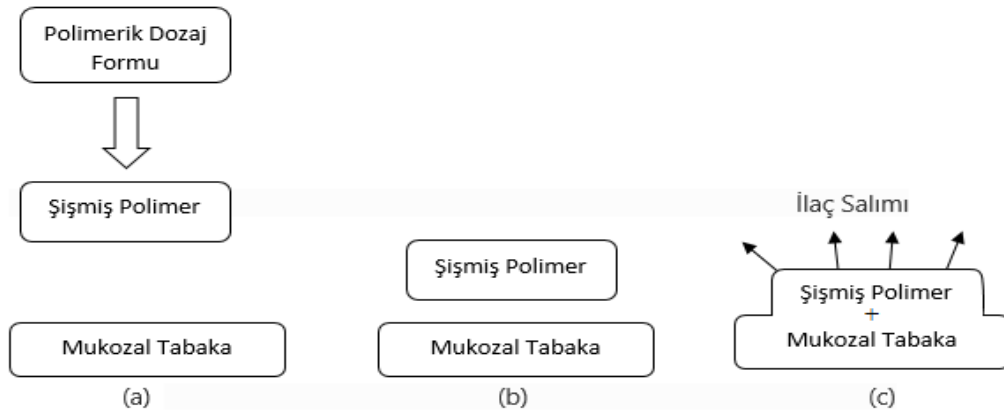
tutma süresine ve biyoyararlanıma sahiptirler (Ahmed vd., 2023). Merhemler, 34°C’de erimektedirler. Merhemler, bir merhem fazından oluşan basit fazlı ve emülsiyon benzeri iki fazlı sistemden oluşan bileşik fazlı olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Merhem, göze uygulandığında konjonktival kesede daha uzun süre kalacak küçük damlalara dönüşmektedir (Baranowski vd., 2014). Küçük damlalara dönüşmesi merhemin konjonktival kesede emilimini ve ilacın gözde kalma zamanını artırmaktadır (Ghate ve Edelhauser, 2006). Arzu edilen merhem, gözü tahriş etmemeli, üniform yapıda, kolayca üretilmeli ve bulanık görmeye sebebiyet vermemelidir (Ali ve Lehmuusaari, 2006).

2.3.2.6. Penetrasyon artırıcılar

Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki, penetrasyon arttırıcıların etki tarzlarına bağlı olarak kornea, konjonktiva veya skleradaki ilaç moleküllerinin geçirgenliğini farklı şekilde artırmaktadır. Penetrasyon arttırıcı olarak en sık kullanılan maddelerden biri benzalkonyum klorürdür. Benzalkonyum klorür, epitelin dış tabakasında bulunan çözünen ve çözücü moleküller için fizyolojik ve anatomik difüzyon bariyerlerini parçalayarak penetrasyon arttırıcı görevi gören bir koruyucudur (Mahaling ve Katti, 2016). Bu amaçla kullanılan bir diğer madde kaprik asit, plazma zarının kutup başı grubuna bağlanan ve ilaç moleküllerinin geçirgenliğini artıran bir yağ asididir (Williams ve Barry, 2004). Diğer bir penetrasyon arttırıcı ise Ca^{2+} iyonlarıyla kompleksleşerek epitel hücrelerinin sıkı kavşaklarını etkileyen etilendiamintetraasetik asittir (EDTA) (Mahaling ve Katti, 2016). Sodyum glikokolat ve sodyum taurokolat, mukozayı parçalayarak mukozal membran geçirgenliğini artıran safra tuzlarıdır. Hücreler arasındaki sıkı kavşakları genişletmektedir. Ayrıca ilaç çözünürlüğünü ve çözünme oranını artırarak hücre ötesi emilimi arttırırlar. Bunun nedeni, sulu difüzyon tabakasındaki direncin üstesinden gelerek mukozal membranın geçirgenliğini artıran misellerin oluşmasıdır. Ayrıca, membran akışkanlığını etkileyen membran lipidleri ve proteinleri ile etkileşime girerek biyoyararlanımı arttırdıkları gösterilmiştir (Mikov vd., 2006).

2.3.2.7 Mukoadezif polimerler

Gözün yüzeyinde, gözü korumak için müsin yapılı bir tabaka bulunmaktadır. Bu tabaka 7.4 fizyolojik pH'da negatif yüklüdür ve pozitif yüklü ilaç formülasyonlarının müsin yapılı tabakaya daha iyi yapışmasına izin vermektedir (Başaran ve Yazan, 2012). Müsin tabakası, pozitif yüklü ilaçların kendisine tutunabilmesi için hidroksil, karboksilik ve sülfat gruplarına sahiptir (Ludwig, 2005). Mukoadezif bağ, polimer ile mukoza zarı arasındaki elektron transferini başlatmaktadır. Moleküller arası bağlar, elektron transferine yardımcı olurlar. Polimer ve glikoproteinler kaynaşır ve mukoadesif protein yüzeyine yayılmaktadır (Smart, 2005; Chatterjee vd., 2017). İlaç yayıldıktan sonra, muko-yapışkan polimerlerin gözden uzaklaştırılmasına gerek yoktur (Nanda vd., 2018). Şekil 2.6, kesin mekanizmanın belirlenmesi zor olmasına rağmen, mukoadesyonun temel sürecini göstermektedir. (Chatterjee vd., 2017) Mukoadezif maddenin ideal moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu, kullanılan polimer tipine göre değişmektedir (Lanier vd., 2021). Önerilen ilk mukoadesif polimerler poli (akrilik asit) ve karbomerlerdir. Poliakrilatlar veya karbomerler gibi polianyonik polimerler, kuru göz sendromunun ve travmatik yaralanmanın tedavisinde yapay gözyaşı olarak önerilmişlerdir. Bu yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin kullanımı, doğal mukus benzeri özelliklerine ve oküler yüzeyde tutunabilmelerine dayanmaktadır (Ludwig, 2005). Konsantrasyona bağlı olarak hissedilen rahatsızlıklar rapor edilebilmektedir (Calonge, 2001). İyi bir mukoadesif, mukus tabakası ile uyumlu ve yakın temasta olmalıdır. Polimer zincirleri, mukusa karışıp yeterli derinliğe ulaşabilecek kadar hareketli ve esnek olmalıdırlar. Müsinlerle hidrojen bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle birbirlerine tutunmalıdırlar (Lee vd., 2000; Imam vd., 2003). Bu etkileşimler, polimerin iyonik gücüne ve pH'ına bağlıdır, çünkü fonksiyonel grupların iyonlaşmasındaki veya yüklerin korunmasındaki değişiklikler elektrostatik itmeyi ve mukus ağının genişlemesini etkiler. Ortamın pH'ının düşürülmesi, proton veren karboksil grupları içeren polimerlerin mukoadesyonu teşvik eder, çünkü iyonize karboksil grupları yerine yüksüz, muhtemelen hidrojen bağları yoluyla müsin molekülleriyle reaksiyona girmektedir. Mevcut yüklü grupların sayısı arttığında, polimer boyunca şişme basıncı artar ve bu da polimer ağı içindeki boş alanı genişletir (Ludwig, 2005). Sonuç olarak, mukusla etkileşime giren polimerlerin gözde kalma süresi birkaç saat ile bir gün arasında değişiklik göstermektedir (Lee vd., 2000).



Şekil 2.6. Mukoadezyon mekanizması (Lanier vd., 2021)

[a: Polimer ve mukozal tabakanın birleşmeden önceki hali, b: Polimer ve mukozal tabaka temas etmek üzere, c: Polimer ve tabaka birleşmiş halde]

Mukoadezyonu etkileyen polimerle ilgili faktörler; hidrasyon veya şişme derecesi, moleküler ağırlık, fonksiyonel gruplar, moleküler konformasyon veya zincir esnekliği ve hareketliliği ve konsantrasyondur (Ludwig, 2005). Hem anyonik hem de katyonik yüklü polimerler, iyonik olmayan selüloz eterlere veya polivinil alkole (PVA) kıyasla daha iyi bir mukoadezif kapasite gösterir (Se'choy vd., 2000). Tablo 2.3'te mukoadezif polimerler ve onların mukoadezyon kapasiteleri değerlendirilmiştir (Ludwig, 2005).

Selüloz türevlerinden özellikle selüloz eterler mukoadezif olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Selüloz eterler arasında etil selüloz (EC), hidroksietil selüloz, hidoksipropil selüloz (HPC), metil selüloz (MC), karboksimetil selüloz (CMC) veya hidroksilpropilmetil selüloz (HPMC) gibi iyonik olmayan selüloz eterleri ve sodyum karboksimetil selüloz (NaCMC) gibi anyonik eter türevleri bulunmaktadır. Poliakrilatlar gibi bazı mukoadezif polimerler, farklı pH değerlerinde değişken yapışma kabiliyeti göstermektedirler. Bu yüzden, mukoadezif preparat tipine göre mukoadezif polimer seçimi yapılmalıdır (Shokri and Adibkia, 2013). NaCMC ve HPC gibi selüloz eterlerin avantajı, poliakrilat ve tiyolat mukoadezif polimerlere göre yapışma süresi ve yapışma kuvvetinin ortamın pH'ına daha az bağımlı olmalarıdır (Grabovac vd., 2005).

Hyalüronik asit (HA), biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir (Choi vd., 2008) ve toksisite riski olmayan bir polimerdir (Jiang vd., 2012). Aynı zamanda yüksek su bağlama kapasitesine, viskoz akışa ve psödoplastik davranışa sahip, tahriş etmeyen ve oküler yüzeyde kalma süresini uzatabilen mukoadezif bir polimerdir (Yenice vd., 2008).

CTS, biyouyumlu ve biyoparçalanabilen, gözde iyi tolere edilebilen hidrofilik mukoadeziv bir polimerdir (Silva vd., 2017). Ayrıca, CTS antimikrobiyal ve yara iyileştirici özellikler sergiler (Ludwig, 2005). Gerçekten de, CTS'nin pozitif yüklü amino grupları, mün negatif yüklü sialik asit kalıntıları ile etkileşime girerek ilacın kornea temas süresini uzatır (De Campos vd., 2004; Almeida vd., 2014).

Tablo 2.3. *Polimerler ve mukoadezyon dereceleri (Ludwig, 2005)* [A: Anyonik, K: Katyonik, Nİ: Noniyonik, Mukoadezyon Derecesi: +++: Mükemmel, ++: iyi, +: az/yok]

Polimer	Yükü	Mukoadezyon Derecesi
Poliakrilik asit (Nötralize)	A	+++
Karbomer (Nötralize)	A	+++
Hiyalüronik Asit	A	+++
Kitosan	K	++
Sodyum Karboksimetilselüloz	A	++(+)
Poligalaktronik asit	A	++
Sodyum Aljinat	A	++(+)
Pektin	A	++(+)
Ksantan Sakızı	A	+
Ksiloglukan sakızı	A	+
Skleroglukan	A	+
Poloksamer	Nİ	+(+)
Hidroksipropil metilselüloz	Nİ	+
Metilselüloz	Nİ	+
Poli (vinil alkol)	Nİ	+
Poli (vinil piroidon)	Nİ	+

2.3.2.8 Faz geçiş sistemleri

Faz geçiş sistemi aynı zamanda in situ sistem olarak da bilinir latince bir ifadedir. Yerinde jel yani, vücuda verilmeden önce çözelti halinde olan, ancak verildikten sonra jel oluşturmak için yerinde jelleşmeye tabi tutulan ilaç verme sistemidir. İn situ jelin avantajlarından bazıları şunlardır: Biyoyaralanımı iyi, azaltılmış doz ve azaltılış dozlama sıklığı, hasta uyuncu ve konforu artırır ve üretimi daha az karmaşıktır bu sebeple üretim

maliyeti düşüktür. (Kadam vd., 2019). Jelleşme, sıcaklık, ultrason, ışık veya mekanik strese bağlı fiziksel, ph ve iyonik kuvvet nedenli kimyasal veya enzim ya da biyomoleküllere bağlı biyolik nedenlerle oluşabilir (Jeong ve Gutowska, 2002; Kumar vd., 2007).

Sıcaklık değişiminden dolayı solüsyondan jele dönen polimerlere sıcaklığa duyarlı polimerler denir. Bazı polimerlerin bu ayırt edici özelliği, bir formülasyonun, sıcaklığın artması durumunda vücut dışında bir jele dönüşebileceği gibi bir dezavantajı olmasına rağmen *in situ* sistemler için arzu edilebilmektedir. Bu sebeple, uygulamadan öncesi çözelti formunu korumak için gereken belirli bir saklama koşulu vardır. Sıcaklık muhtemelen polimerin stabilitesini etkileyebilir ve bazen erken jelleşme meydana gelebilir. Bazı doğal polimerler, tek başlarına ve bunların kombinasyonu, sulu CTS çözeltisi ve ksiloglukan gibi ısıya duyarlı özelliklere sahiptirler. Vücut sıcaklığına çok yakın bir sıcaklıkta jele dönüşebilmektedirler (Miyazaki vd., 2003). Çözeltinin viskozitesi, maddenin akışkan olabilmesi için optimum düzeyde olmalıdır. Uygulama esnasında şişelerden kolayca çıkmalıdır. Çözeltinin reolojik özellikleri, önerilen oküler uygulama açısından önemlidir. pH'a bağlı jelleşme sisteminde, karboksilik ya da sülfonik bir asit ya da amonyum tuzları gibi bazik gruba sahip polielektrolitlerin varlığı söz konusudur. Genellikle düşük Ph'da çözelti halinde bulurken, gözyaşı pH'ı olan 7.4'te jele dönüşür. En sık kullanılan pH'a duyarlı polimerler Poliakrilik asit (PAA, Carbopol 940), polikarbofil ve selüloz asetat ftalattır (CAP) (Wu vd., 2018). CTS'nin normalde nötr veya alkali pH'da oldukça kararlı bir kristal yapıya sahip olduğunu gösterilmiştir (Ganguly ve Dash, 2004). Bununla birlikte seyreltik asitlerde (pH <5.0) serbest amino grubu protonlanır (R-NH₃) ve sulu çözünürlüğü artar. CTS'nin asidik ortamdaki çözünürlüğü de moleküler ağırlığına bağlıdır. Alkali pH'a maruz kaldığında asidik CTS çözeltisi bu yükü kaybeder ve viskoz jele dönüşmektedir. Tüm polimerinin çözeltileri asidik pH'ta stabil olması gerekmektedir. (Chenite vd., 2001).

İyon ile tetiklenen *in situ* jel sisteminde, solüsyon viskozitesi, gözyaşı sıvılarının iyonik konsantrasyonuna maruz kaldığında artmaktadır (Ma vd., 2008). Ozmotik olarak indüklenen jelleşme olarak da adlandırılmaktadır. (Majeed ve Khan, 2019) İyona duyarlı polimerler, göz yüzeyindeki lakrimal sıvıda bulunan tek ve iki değerlikli katyonlarla çapraz bağlanabilir ve ilacın tutulma süresini artırabilmektedir (Kumar vd., 2013). *In situ* jel sisteminde çözeltinin reolojik özelliği ve jel gücü, jelin ilaçtan salınabilme hızı için

oldukça önemlidir. Jelleşme için Pluronik F127, Jellan Sakızı, Sodyum Aljinat, CTS, Ksiloglukan, Pektin, Ksantan Sakızı ve Karagenan ve ayrıca Poli (D, L-laktit), Poli (etilen glikol), Poli (D, L-laktit) ve poli (ϵ -kaprolakton) gibi çeşitli sentetik polimerler de kullanılır. Sentetik polimerler esas olarak enjekte edilebilir *in situ* oluşumlarda kullanılmaktadır (Devasani vd., 2016). Termal olarak, UV ışığı veya redoks başlatıcı sistemle kullanılarak yapılan çözelti polimerizasyonu veya çapraz bağlama, boyutu 1 μ m ila 1 mm arasında değişen küresel hidrojel mikropartiküllerinin hazırlanması için süspansiyon polimerizasyonu, gama ve elektron ışını gibi yüksek enerjilerin kullanıldığı radyasyon ile polimerizasyon ya da fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller ile *in situ* jeller hazırlanmaktadır (Nerkar vd., 2013). *In situ* jeller oral, oküler, nazal, rektar, vajinal ve enjekte edilebilir ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır (Nirmal vd., 2010).

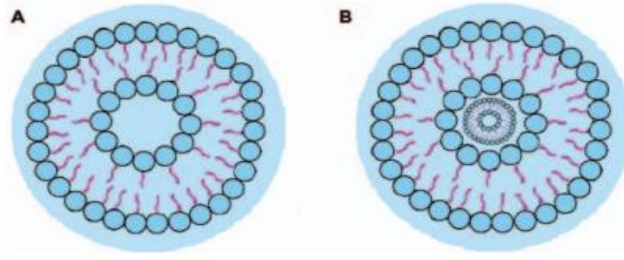
2.3.2.9 Veziküler sistemler

Veziküler sistemler sadece kornea yüzeyinde uzun süreli ve kontrollü etki sağlamada yardımcı olmakla kalmamakta, aynı zamanda gözyaşı/kornea epitel yüzeyinde bulunan enzimlerden ilacın metabolizmasını önleyerek kontrollü oküler dağıtım sağlamada da yardımcı olmaktadır (Kaur vd., 2004). Veziküller, etki bölgesinde ilaç aktivitesini lokalize edecek ve sürdürecektir bir oftalmik ilaç dağıtım sistemine olan ihtiyacı karşılamak için umut verici bir yol sunmaktadır. Lipozom, niozom gibi veziküller etkin bir tedavi sağlayabilecek ilaç taşıyıcı sistemler olarak değerlendirilmektedir (Kaur vd., 2004).

2.3.2.9.1 Lipozom

Lipozomlar, lipit molekülünden oluşan, iki tabakalı yapıların bulunduğu etrafı bir zarla çevrelenmiş sulu bir hacme sahip basit mikroskobik veziküllerdir. Lipozomlarda fosfolipid ve kolesterolün ana bileşenler olduğu bir dizi bileşen bulunur. Fosfolipidlerin tipi, fosfogliseritleri ve sfingolipidleri ve bunların hidroliz ürünlerini içerir (Biju vd., 2006). Yaklaşık 25-10.000 nm çapında biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen lipit vezikülleridir (Ebrahim vd., 2005). Zayıf emilen ilaçlar, düşük partisyon katsayısına sahip ilaçlar, çözünürlüğü düşük veya orta ila yüksek moleküler ağırlığa sahip ilaçlar için arzu edilen bir formülasyon tipidir. Lipozomlar oküler uygulamalarda emilimi

artırmaktadır (Kaur vd.,2004). Lipozomlar korneanın negatif yüklü yüzeyine kolaylıkla bağlanabilecek şekilde formüle edilebilirler (Patel ve Agrawal, 2011). Fosfolipid yapıları sayesinde toksisite riskleri yoktur ve biyolojik olarak parçalanabilirler. Amfifilik karakterleri nedeniyle lipozomlar, hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikleri yükleme yeteneğine sahiptir. Bileşimlerine bağlı olarak, lipozomlar pozitif, negatif veya nötr yüklü olabilmektedirler (Şekil 2.7) (Pietzyk ve Henschke, 2000; Hathout vd., 2007).



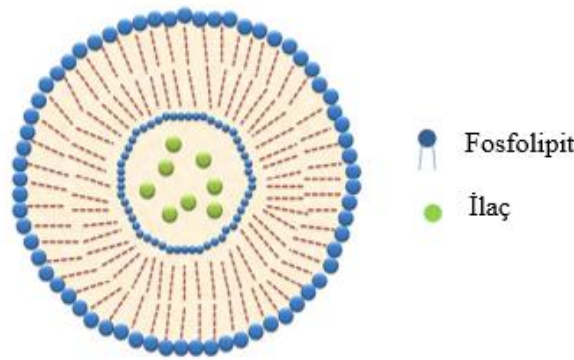
Şekil 2.7. Tek tabakalı lipozomun (a) ve çok katmanlı lipozomun (b) şematik gösterimi (Achouri vd., 2012)

2.3.2.9.2 Niozom

Lipozomların sakıncaları kararsız yapıda olmaları, fosfolipitlerin oksidatif bozunmaya uğraması ve yüksek maliyetleridir. Lipozomların bu sakıncalarını ortadan kaldıracak, lipozomlara kıyasla kimyasal olarak kararlı oldukları ve hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçları hapsedebildikleri için niozomlar geliştirilmiştir. Toksisite riskleri yoktur ve hazırlanma yöntemleri basittir. Niozomlar, hidrofobik veya amfifilik ilaçların verilmesinde iyonik olmayan yüzey aktif madde vezikülleridir (Patel ve Agrawal, 2011). Niozomlar kararlı, hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçları yapısında bulundurabilen bir maddedir. Düşük toksisiteye sahiptir. Esnek, daha fazla ilaç miktarını yapısı itibarıyla bünyesinde tutabilen, biyoyumlu farmasötik forma sahiptir. Biyoparçalanır ve immünojenik değildir (Carafa vd., 2002). Lipozomlarla kıyaslandığında, hidrofilik ilaçların biyoyararlanımının arttığı görülmektedir. Bunun nedeni, yüzey aktif maddelerin penetrasyon artırıcılar olarak hareket etmesi ve bağlantı komplekslerini kırmasıdır (Kaur vd., 2002). Değiştirilmiş bir niozom formu olan discomes denilen non-iyonik sürfaktan, yani Solulan C24 ilavesiyle niozomlardan türetilen 12-60 µm boyutundaki büyük yapılar da oftalmik ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılır. Oküler uygulandıklarında gözde daha uzun süreyle tutuldukları belirtilmektedir (Kaur vd., 2004).

2.3.2.9.3 Farmakozom

Farmakozomlar, lipidlere kovalent olarak bağlanan ilaçlar olarak belirtilir ve ultra ince veziküller, misel veya altıgen agrega yapısına sahiptir. Sistem, farmakon olarak adlandırılan ilacı, soma denilen taşıyıcıya bağlayarak oluşturulur, bu nedenle “Farmakozomlar” olarak adlandırılırlar (Supraja ve Mullangi, 2019). Esas olarak el ile sallayarak ya da eter enjeksiyonu methoduyla hazırlanırlar. Farmakozomlar, kanserde ilaç hedeflemede ve ayrıca 5-flouro-2-deoksiüridin Farmakozomları kullanılarak beyin hedeflemede kullanılmaktadır (Şekil 2.8) (Sharma vd., 2014).



Şekil 2.8. Farmakozom yapısının şematik gösterimi (Singh vd., 2017)

2.3.2.10 Emülsiyon sistemler

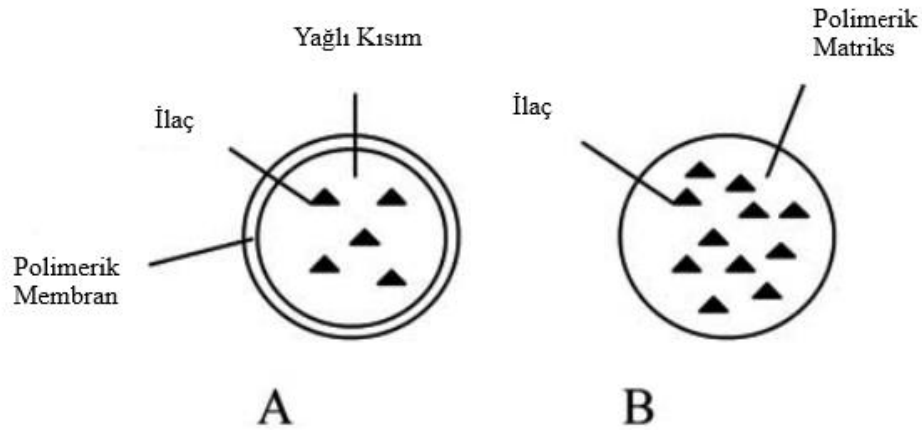
Emülsiyon sistemler arasında oküler olarak en sık kullanılan sistemler arasında mikroemülsiyonlar (ME) yer almaktadır. ME’ler, yüzey aktif maddeler ve yardımcı yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilen yağlı faz ve sulu fazın termodinamik olarak kararlı dağılımıdır ve 100 nm’den küçük küçük bir damlacık boyutundadır (Gautam ve Kesavan, 2017) ME’ler, termodinamik olarak karalı, hazırlanması, sterilize edilmesi kolay ve ucuz oldukları için mevcut geleneksel oftalmik dozaj formlarına göre ilgi çekici ve etkili alternatiflerdir (Vandamme, 2002). Yağ fazı, sulu faz ve yüzey aktif madde ve birlikte yardımcı yüzey aktif madde kombinasyonundan oluşan termodinamik olarak kararlı sistemlerdir. ME’ler, düşük viskoziteli, Newton akış davranışına ve düşük yüzey gerilimine sahip şeffaf sistemlerdir. Yapısında hidrofilik ve hidrofobik ilaçları içerebilmektedir. Sulu faz, organik faz ve yüzey aktif maddenin seçimi, ilacın çözünürlüğünü etkilemektedir (Barar vd., 2009). Yüksek oranda yüzey etkin madde kullanılmalarına bağlı olarak hazırlanan ME’ler kararlıdır ve çoğunlukla tahriş edici özellikleri yoktur (Alany vd., 2006; Lv vd., 2006) ME’ler faz inversiyon ve faz titrasyon

yöntemiyle hazırlanmaktadır (Gautam ve Kesavan, 2017). ME'ler göz damlası olarak kolaylıkla uygulanabilirler ve küçük damlacık büyüklükleri görmeyi engellemeden tedavi edebilmeyi sağlarlar. Basit, ucuz ve termodinamik olarak kararlı olmaları ve kolay üretimleri ve sterilize edilebilmeleri üstünlükleri arasında değerlendirilmektedir (Lawrence ve Rees 2000).

Hidrofobik ilaçların, sulu çözeltiler halinde verilebilmeleri için ME olarak formüle edilebilmektedirler. Katyonik yüzey aktif maddelerin kullanımı, negatif yüklü kornea epiteline bağlanan emülsiyonlarda ve mikroemülsiyonlarda pozitif yüklü damlalar oluşturarak gözde kalış süresini artırmaktadır. Ayrıca ME'ler gözyaşı sıvısının viskozitesini artırabilir ve ilacın gözde kalış sürecini uzatabilmektedir (Peng vd, 2011).

2.4 Partiküler Sistemler

Partiküler sistemler oküler uygulamalarda etkinlikleri bakımından pek çok araştırmacı tarafından incelenen oldukça etkili ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Özellikle oküler uygulamalarda küçük partikül boyutlarına bağlı olarak oküler iritasyona neden olmayan nano yapıli partiküler sistemler sıklıkla araştırma konusu olmaktadır. Nanopartiküller kabaca mikron altı boyutlu kolloidal sistemler olarak tanımlanır (boyut olarak 10 ila 1000 nm arasında değişir), biyolojik olarak parçalanabilir veya parçalanmayan polimerler ile hazırlanabilirler. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan işleme bağlı olarak nanoküreler veya nanokapsüller elde edilebilmektedir (Şekil 2.9) (Mainardes vd., 2005). Bununla birlikte, 50-400 nm partiküller hastalar tarafından büyük partiküllere göre daha iyi tolere edilmektedir. Çünkü kornea bariyerine kolaylıkla nüfuz edebilmektedirler (Almeida vd., 2014).



Şekil 2.9. Nanokapsüllerin (A) ve nanokürelerin (B) şematik gösterimi (Mainardes vd., 2005)

Nanokürelerde aktif bileşikler, yüzeyde adsorbe edilebilir, matrise hapsedilebilmektedir. Nanokapsüller polimerik bir kabuğa ve bir iç çekirdeğe sahiptir. Bu durumda, aktif maddeler sadece çekirdek içinde çözülmez, aynı zamanda yüzeylerinde adsorbe edilebilir (Mainardes ve Silva, 2004). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bu nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarının, örneğin transferrin ve folat veya OX26 monoklonal antikoru gibi hedefleme molekülleri kullanılarak gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir (Kondiah vd., 2018). Nanokapsüller ve nanoküreler, günümüzde organlara ilaç hedeflemesini iyileştirmek ve ilaç biyoyararlanımını artırmak için kullanılmaktadırlar (De Campos vd., 2003). Nanopartikül oluşturmak için polilaktit, metil metakrilat, ϵ -kaprolakton gibi biyolojik ortamda parçalanabilen polimerler ya da hiyalüronik asit, CTS, jelatin, sodyum aljinat gibi doğal polimerler kullanılmaktadır (Achouri vd., 2012).

Nanopartiküller, tahriş etmeyen ve sürekli salınım sağlaması sebebiyle sık dozlama gerektirmeyen ve küçük boyutlu yapısı sebebiyle oküler ilaç dağıtımı için iyi sistemlerdir (Bu vd., 2007). Toksikite oluşturmaz, biyoyumlu ve muko yapışkanlık sağlamaları açısından çeşitli avantajlar sunarlar. Polimerlerden nanopartiküllerin üretimi için polimerizasyon, çözücü buharlaştırma, salting-out, diyaliz ve süperkritik akışkanların teknolojisi gibi yöntemler kullanılabilir. Mikroemülsifikasyon, miniemülsifikasyon, yüzey aktif madde içermeyen emülsifikasyon ve arayüzey polimerizasyonu gibi çeşitli yöntemler kullanılarak farklı monomerlerin polimerizasyonu işlemiyle de doğrudan oluşturulabilir. Hazırlama yöntemine ilişkin karar, polimer tipi, uygulama yeri veya gerekli boyutlar gibi çok sayıda belirleyiciye dayanmaktadır (Muhamad vd., 2014).

Kullanılan polimerin yapısına bağlı olarak, birincil çökeltilme veya iyonotropik jelleşme gibi basit bir yöntem kullanılarak üretilmektedir. Nanopartikül yapımında kullanılan polimerlerin, oküler dokuda tutunma kabiliyetleri, büyüklükleri ve mukoadesif özelliklere sahip olması önemlidir. Bu polimerler, göz yüzeyinde bulunan münin ile etkileşime girerek gözdeki ilaç klirensini en aza indirir. Perikorneal retansiyon süresi artar ve böylece ilaç biyoyararlanımı artar. Bu özellikler olmadan nanopartiküller, sulu çözeltilerle aynı oranda perikorneal alandan elimine edilir (Omerović ve Vranić, 2020). Nanopartiküller hazırlaması basit olan, verimliliği ve etkinliği yüksek, hedeflenen bölgeye daha fazla konsantrasyonda aktif bir farmasötik bileşen sağlayan moleküllerdir.

Salım mekanizması, hidrasyonla şiştikten sonra etkin madde salınır. Etki yerinde enzimatik reaksiyonlarla nanoparçacık çekirdeğinden ilaç salınmaktadır (Souto vd., 2010)

2.4.1 Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri

Polimerik Nanopartiküllerin (PNP'lerin) taşıyıcı olarak avantajları arasında kontrollü salınım, terapi ve görüntüleme, ilaç moleküllerinin korunması ve spesifik hedeflemesi, terapötik indekste iyileştirmelerin kolaylaştırılması yer almaktadır (Kamaly vd., 2012; Krasia-Christoforou ve Georgiou, 2013). PNP'lerden ilaç salınımı, polimer matrisinden polimer biyolojik bozunma ve ilaç difüzyon oranlarının düzenlenmesiyle elde edilir. Proteinler, şekerler veya diğer doğal makromoleküller, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve biyolojik olarak parçalanamayan, ancak farmasötik olarak kabul edilebilir polimerler gibi pnp'lerin hazırlanması için çeşitli sentetik veya doğal polimerler kullanılmaktadır (Kumari vd., 2010; Monsour vd., 2010; Joshi ve Patel, 2012).

PNP hazırlama yönteminin seçimi genellikle polimer tipine, ilacın fizikokimyasal özelliklerine ve PNP'lerin istenen nihai özelliklerine göre belirlenir. PNP hazırlamak için çeşitli hazırlama yöntemleri kullanılmaktadır (Crucho ve Barros, 2017).

2.4.1.1 Çözücü buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemde polimer, diklorometan, kloroform veya etil asetat gibi organik bir çözücü içinde çözülmeştir. Polimer ve ilaç çözeltisinin karışımı daha sonra suda yağ (o / w) emülsiyonu oluşturmak üzere bir yüzey aktif madde veya emülsifiye edici madde içeren sulu bir çözelti içinde emülsifiye edilir. Emülsiyon oluştuktan sonra, organik çözücü basınç düşürölerek ya da karıştırılarak uçurulmaktadır. Partiköl büyüklüğünün yüzey etkin madde, homojenizasyon hızı, polimerin türü ve konsantrasyonlarından etkilendiğı belirlenmiştir. Küçük parçacık boyutu üretmek için, genellikle yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılmaktadır (Dadwal, 2014).

2.4.1.2 Emülsifikasyon/çözücü difüzyonu yöntemi

Çözücü difüzyonu yöntemi, çözücü buharlaştırma yönteminin farklı bir versiyonudur. Suyla karışabilen çözücü ve az miktarda suyla karışmayan organik çözücü, yağ fazı olarak kullanılmaktadır. İki faz arasında küçük parçacıkların oluşumuna yol açan bir ara yüzey oluşturulur. Su ile karışabilen çözücünün konsantrasyonu arttıkça, partikül boyutunda bir azalma elde edilebilmektedir. Hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar için hem çözücü buharlaştırma hem de çözücü difüzyon yöntemleri kullanılabilir (Zhang vd., 2001).

2.4.1.3 Tuzla çöktürme yöntemi

Bu yöntemde toksisite açısından farmasötik olarak kabul görmesi nedeniyle suda karışabilen organik çözücü olarak genellikle aseton seçilmektedir. Yöntem, suda yüksek konsantrasyonlu bir tuz çözeltisinde, suda çözünür PVA'nın asetondaki bir polimer çözeltisine eklenmesinden oluşmaktadır. Aseton her oranda saf su ile karışabilse de sulu fazın yüksek tuz konsantrasyonu fazın karışmasını engeller. Emülsifikasyondan sonra, yeterli miktarda saf su eklenmesi, nanopartiküllerin oluşmasına neden olmaktadır (Mittal vd., 2007).

2.4.1.4 Koaservasyon veya iyonik jelleşme yöntemi

Koaservasyon yöntemi homojen bir çözeltiden polielektrolit oluşturmak için sıvı-sıvı faz ayrımını ve daha sonra aktif madde etrafında koaservat oluşumun sağlandığı bir yöntem olarak açıklanmaktadır. Polimerler arasındaki etkileşimi etkileyebilecek faktörler arasında biyopolimer tipi, konsantrasyon, pH, elektrostatik etkileşim ve iyonik kuvvet bulunmaktadır (Umar vd., 2022).

2.4.1.5 Nanoçöktürme yöntemi

Nanoçöktürme, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların enkapsüle edilmesi için kullanılan basit bir yöntemdir. Yöntem, birbirleriyle karışabilen iki çözücünün eklenmesini gerektirir ve faz ayrımında nanopartikül oluşmaktadır. Sistem ideal olarak iki çözücüden

oluşmaktadır. İlki polimerin ve ilacın içinde çözündüğü bir çözücü, ancak ikinci sistemde ise çözünmediği çözücü kullanılmaktadır. Bu yöntemde, nanopartiküller hızlıca oluşur. Uygulanması kolaydır ve tek adımdan ibarettir. (Bilati vd., 2005).

2.4.1.6 Püskürterek kurutma yöntemi

İlaç çözelti içinde çözülür ve uygun bir çapraz bağlayıcı madde eklenir. Bu karışım sıcak hava akımı içinde atomize edilmektedir. Atomizasyonda, çözücü buharlaşır ve serbest akışlı tozların oluşumuna yol açar. Parçacık boyutu, nozulun boyutuna, püskürtme akış hızına, atomizasyon basıncına ve giriş havası sıcaklığına ve çapraz bağın uzantısına bağlıdır (Sinha ve Muthu, 2007). Püskürterek kurutma yönteminde, birim işlem sayısı azaltılarak üretim verimliliği artırılır. Böylece işlem maliyeti düşer. İlaçların kompaktlığını arttırmak, mikrokapsülasyon, granülasyon ve kompleks oluşumu gerçekleştirmek amacıyla spreyle kurutma uygulanmaktadır. Ek olarak, biyofarmasötik özelliklerin modifikasyonu ve kuru toz aerosollerin ve ısıya duyarlı malzemelerin formülasyonu için spreyle kurutma başarıyla kullanılmaktadır (Jain Manu vd., 2012)

2.4.1.7 Süperkritik sıvı teknolojisi

Süperkritik akışkanlar kullanılarak süperkritik çözeltinin hızlı genişlemesi (RESS) ve süperkritik çözeltinin sıvı çözücüye hızlı genişmesi (RESOLV) yöntemleri ile nanopartiküller hazırlanır. RESS'de, çözünen, bir çözelti oluşturmak için süper kritik bir sıvı içinde çözülür, ardından çözeltinin kılcal nozül boyunca ortam havasına hızlı bir şekilde genişmesi sağlanır. Genleşmede hızlı basınç düşüşü ile birlikte yüksek derecede süper doygunluk ve dolayısıyla iyi dağılmış parçacıkların oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Weber vd.,2002). RESOLV yöntemi, süperkritik çözeltinin, çözücü olarak adlandırılan ortam havası yerine sıvı bir çözücüye genişlemesidir. RESS nano ölçek iken bu yöntem mikro ölçeklidir (Meziani vd., 2005; Hutchenson, 2002).

2.4.1.8 Diyaliz yöntemi

Bu yöntemde polimer, organik bir çözücü içinde çözündürülmekte ve uygun bir diyaliz tüpünün içine yerleştirilmektedir. Çözücünün membran içindeki yer değiştirmesini, çözünürlük kaybına ve nanopartiküllerin homojen süspansiyonlarının oluşumuna bağlı olarak polimerin ilerleyici agregasyonu takip eder. Diyaliz yöntemiyle polimerik nanopartikül oluşum mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Polimer çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan çözücü, nanopartiküllerin morfolojisini ve partikül büyüklüğü dağılımını etkilemektedir (Nagavarma vd., 2012).

2.4.2 Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

2.4.2.1 Parçacık büyüklüğü, şekli ve yüzey özellikleri

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan en önemli parametreler parçacık büyüklüğü, parçacık büyüklüğü dağılımı ve partikül morfolojisidir. Morfoloji çoğunlukla elektron mikroskobu ile analiz edilmektedir. Daha küçük parçacıklar daha geniş yüzey alanı sunar. Sonuç olarak, üzerlerine yüklenen ilacın çoğu, hızlı ilaç salınımına yol açan parçacık yüzeyine maruz kalacaktır. Bu nedenle salım özelliklerinin değerlendirilebilmesi için de morfolojik analizler önem taşımaktadır (Redhead vd., 2001).

Parçacıkların morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla, Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Floresan Korelasyon Spektroskopisi (FCS), Nanoparçacık İzleme Analizi (NTA) ve Akış Alanı Akış Fraksiyonasyonu (FIFFF) kullanılmaktadır (Domingos vd., 2009). Taramalı elektron mikroskobu (SEM) doğrudan görselleştirme ile morfolojik açıdan inceleme imkanı sağlamaktadır. Bu elektron mikroskobuna dayalı teknikler, morfolojik ve boyutlandırma analizinde çeşitli avantajlar sunmaktadırlar. Ancak boyut dağılımı ve gerçek popülasyon ortalaması hakkında sınırlı bilgi vermektedirler. SEM karakterizasyonu için, nanoparçacık çözeltisi önce kuru bir toza dönüştürülmeli, daha sonra bir numune tutucuya monte edilmeli ve ardından bir püskürtme kaplayıcı kullanılarak altın gibi iletken bir metal ile kaplanmalıdır. Örnek daha sonra bir odaklanmış ince elektron demeti ile taranmaktadırlar (Jores vd., 2004). Nanopartiküller, yeterli boyut ve elektron yoğunluğuna ulaştığında TEM tarafından tespit edilmektedirler. Bu nedenle, daha fazla gözlem sayısı için TEM, ortalama çap (d_n) sayısı kullanılmalıdır

(Leppard, 2008). TEM, SEM'den farklı bir prensipte çalışır, ancak genellikle aynı tür verileri getirmektedirler (Molpeceres vd., 2000). AFM yanal mesafeleri de ölçebilse de, mikron altı boyutlardaki nanoparçacıklar için, genellikle yükseklik ölçümlerinin daha doğru olduğu kabul edilecek şekilde sistematik bir veri sunar (Balnois vd.,2007). AFM'nin en önemli avantajı, iletken olmayan numuneleri herhangi bir spesifik işlem yapılmadan görüntüleyebilmesi, hassas biyolojik ve polimerik nano ve mikro yapıların görüntülenmesine izin vermesidir (Shi vd., 2003).

Parçacıkların büyüklük ve dağılımları morfolojik özellikler analiz edilirken yukarıda belirtilen yöntemler ile de belirlenebilse de geçerli bir veri eldesi daha çok Dinamik ışık saçılımı (DLS), lazer kırınım analizleri gibi yöntemler ile hızlı bir şekilde analiz edilmektedir. En sık kullanılan ve foton korelasyon spektroskopisi (PCS) olarak da bilinen DLS nanometreden birkaç mikrometre aralığında kolloidal süspansiyonlardaki Brownian nanopartiküllerinin boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (DeAssis vd., 2008). Nanopartiküllerin difüzyon katsayıları otokorelasyon fonksiyonunun yerleştirilmesiyle hesaplanır ve Stokes Einstein denklemi yoluyla parçacıkların hidrodinamik çapını (veya yarıçapını) belirlemek için kullanılır. Analiz, ölçülen nesnenin küresel şekilli olduğunu varsayar ve çözeltinin viskozitesinin bilinmesini gerektirir. Yöntem ayrıca partikül boyutu dağılımı hakkında da bilgi vermektedir (Caputo vd., 2019).

2.4.2.2 Zeta potansiyel

Sıvıdaki parçacıkların itme ve çekme kuvvetlerinden kaynaklanan hareketine kayma, bu düzlemde ölçülen potansiyele, zeta potansiyeli denmektedir. Kısaca partiküllerin yüzeyi ile partikülü çevreleyen dispersiyon ortamında oluşan elektronötral bölge arasındaki potansiyel farkı olarak tanımlanmaktadır. Zeta potansiyel değerlerinin ± 25 mV'dan daha yüksek değerde olması süspansiyonun kararlı olduğunu gösteren bir parametredir (Freitas ve Müller, 1998). Değeri, süspansiyon stabilitesi ve partikül yüzey morfolojisi ile ilgilidir. Bu sebeple ürün stabilite çalışmalarında ve yüzey adsorpsiyon araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Delgado vd, 2007). Asılı parçacıkların zeta potansiyel tayini için Elektroforetik Işık Saçılımı (ELS), Akustik ve Elektroakustik olarak üç yöntem kullanılmaktadır. Hassasiyet, doğruluk ve çok yönlülüğü nedeniyle

ELS, birçok uygulama için en iyi seçimdir (Xu vd.,2007). Zeta potansiyeli, parçacık boyutundan veya moleküler ağırlıktan farklı olarak, yalnızca parçacıkları değil, aynı zamanda çevrelerini de içeren bir özelliktir. Birçok durumda, yüksek çözünürlük ve doğru sonuçlar elde etmek için seyreltmeden sonra askıda kalan parçacıkların zeta potansiyeli ölçülse de, bu sonuçlar orijinal ortamdaki gerçek değerlerinden büyük ölçüde farklı olacaktır ve kullanıcıyı yanıltabilmektedir (Sekiwa vd., 2004).

2.4.2.3 pH analizi

Oküler uygulamalarda pH değeri 3.5 - 9 arasındaki pH değerleri tolere edilebilmesine rağmen, pH'ın neden olduğu gözyaşındaki artış, gözde iritasyon ve rahatsızlık potansiyelini en aza indirmek için formülasyonun pH'ını fizyolojik değere ayarlama eğilimi vardır. Ancak pH değerinin değiştirilmesi elektrolitlerdeki nanopartiküllerin zeta potansiyellerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. pH'ın artmasıyla zeta potansiyel değerinin azaldığı, bunun temel olarak düşük pH değerlerinde daha fazla H⁺ emilmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Gibson, 2004). pH formülasyonların, fiziksel ve kimyasal durumu düzenleyen en önemli parametrelerden biridir (Hotze vd., 2010). pH'daki değişimler partiküllerin yüzey yükünü ve nanopartiküllerin çözünme derecesini etkileyebilmektedir (Badawy vd., 2010). Partikül davranışı asidik ve alkali koşullarda değişmektedir. pH, partikül boyutunu ve stabilitesini etkilemektedir (Fernando ve Zhou, 2019).

2.4.2.4 Katı hal analizleri

2.4.2.4.1 Nükleer manyetik rezonans analizi

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, analiz edilen sistemin biraz bozulmasını gerektiren dönüşümsel bir moleküler karakterizasyon aracıdır ve aynı zamanda bileşenlerin atom çekirdeğinin kimyasal çevrelerinde istisnai bir çalışma sağlar. Bu özellikler NMR'ı özellikle bazı durumlarda kimyasal yapının, reaksiyonların ve hatta dinamiklerin yerinde analizi için çok uygun hale getirir. NMR kullanılarak mümkün olan kimyasal çözünürlük, nanopartiküllerin nihai mimarisini karakterize etmek için özellikle çekicidir. NMR yöntemi genel olarak tamamen tahribatsızdır ve hassas partiküller

üzerinde uzun süreli çalışmalara izin vermektedir. Karmaşık homojen olmayan bir karışımdaki tek tek bileşenlerin moleküler hareketliliğini ve maddenin kimyasal yapısı hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca, alan boyutlarını, kimyasal değişimi, paramanyetik merkezlere yakınlığı veya reaksiyon kinetiğini göstermektedir. Yapısal bozulmaya neden olan herhangi bir numune hazırlama prosedürü gerektirmemektedir (Mayer, 2005).

2.4.2.4.2 Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

FT-IR'nin açılımı Fourier dönüşümlü kızılötesi anlamına gelmektedir. Kızılötesi (IR) radyasyon bir numuneden geçtiğinde radyasyon kaydedilmektedir. Farklı yapılarına sahip moleküller farklı spektrumlar ürettiğinden, spektrumlar molekülleri tanımlamak ve ayırt etmek için kullanılabilir. FTIR, çeşitli nedenlerle tercih edilen kızılötesi spektroskopi yöntemidir. Numuneyi yok etmez, eski tekniklerden önemli ölçüde daha hızlıdır ve çok daha hassastır (http-13).

2.4.2.4.3 Termal analiz

Farmasötiklerin erime noktalarını elde etmek ve saflıklarını belirlemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılmaktadır. DSC, farklı analitlerin termal stabilitesini, cam geçişlerini ve polimorfik dönüşümlerini belirlemede yararlıdır. Polimer ve nanopartikül özelliklerinin analizinde yapıların ve olası etkileşimlerin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Nassimbeni, Báthori, 2017).

2.4.2.5 İn vitro salım

Invitro salım çalışması, nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemlerinin güvenliği, etkinliğini ve kalitesini değerlendirmek için kritik bir testtir (Weng vd.,2020). Nanopartiküllerin in vitro salım kinetiği, ilaç salımını değiştirme yetenekleri hakkında bilgi sağlar, bu nedenle ürünlerin güvenliği, etkinliği ve kalitesinin değerlendirilmesi için dikkate alınması gerekmektedir (Cardot vd.,2007). Nanopartikül yapıları formülasyonların ilaç salım profilleri çoğunlukla sürekli akış (CF) veya diyaliz membranı (DM) yöntemleri ve örnekten ayırma yöntemi (SS) kullanılarak belirlenmektedir (D'Souza, 2014). CF

yönteminde USP aparatı IV kullanılır ve nanopartiküllerin *in vitro* salım çalışmasına uygulanmasına ilişkin çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Maliyetli bir yöntemdir. Sabit bir akış hızı kurmak ve sürdürmek de zordur (D'Souza ve De Luca, 2006). DM yöntemi, nanopartiküllerin *in vitro* salım kinetiğini test etmek için en popüler yöntemdir. nanoparçacık ve serbest ilacın fiziksel olarak ayrılması sağlamak için yarı geçirgen bir zar kullanılmaktadır (Modi ve Anderson,2013;Yu vd.,2019). SS yöntemi, salım kinetiğini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan başka bir yaklaşımdır (Cetin vd., 2010).

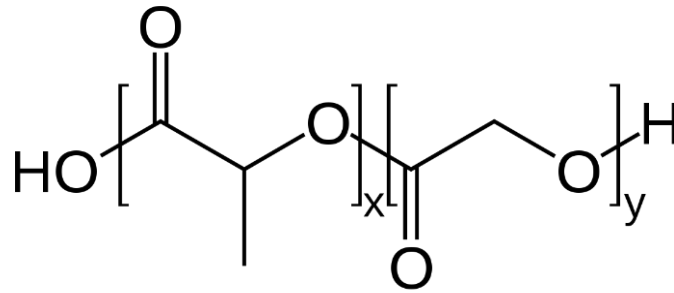
2.4.3 Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler

Doğal ya da sentetik polimerler nanopartikül hazırlanmasında kullanılmaktadır. Genellikle doğal polimerler biyoparçalanabilirken çoğu sentetik polimerler biyoparçalanmazlar. Bu nedenle, polimer nanoparçacıklarının hazırlanmasında çoğunlukla doğal polimerler tercih edilmektedir (Elmowafy vd., 2023). Polimer nanopartiküllerinin hazırlanması için kullanılan doğal polimerler arasında nişasta, polipeptitler, albümin, sodyum aljinat, kitin, jelatin, selüloz ve polihidroksiyoalkanoatlar (fazlar) bulunurken, polietilen glikol (PEG), poli-laktik asit-ko-glikolik asit (PLGA), polivinil alkol (PVA), polivinilpirolidon (PVP), polietilen (PE), polianhidritler ve polyorthoesterler yaygın kullanılan sentetik polimerlerdir (Lu vd., 2011). Farklı özelliklere sahip pek çok polimer ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Tezin bu kısmında tez çalışmalarında kullanılan polimerlerin özelliklerine değinilecektir.

2.4.3.1 Poli(laktik-ko-glikolik asit)

PLGA, fiziksel olarak güçlü ve oldukça biyoyumlu olan ve ilaçlar, proteinler ve DNA, RNA ve peptitler gibi çeşitli diğer makromoleküller için dağıtım araçları olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmış FDA onaylı biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir (Bouissou vd., 2006; Ruhe vd., 2003). Polimer-ilac matrisinin özelliklerini, moleküler ağırlığı, laktidin glikolide oranı ve ilac konsantrasyonu gibi ilgili parametreleri kontrol ederek, ilac tipine bağlı olarak istenen dozaj ve salım aralığını elde edilebilmektedir (Mohamed ve van der Walle, 2008). PLGA, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asidin (PGA) bir kopolimeridir. Tasarım ve performans açısından ilac dağıtımı için mevcut en iyi tanımlanmış biyomateryaldir. Poli laktik asit, tipik olarak klasik stereokimyasal

terimlerle D veya L formu ve bazen sırasıyla R ve S formu olarak tanımlanan asimetric bir a-karbon içerir. Polimer PLA'nın enantiyomerik formları poli D-laktik asit (PDLA) ve poli L-laktik asittir (PLLA). PLGA çoğunlukla D- ve L-laktik asit formlarının eşit oranda olduğu poli D, L-laktik-ko-glikolik asidin kısaltmasıdır (Makadia ve Siegel, 2011). PLGA kopolimerlerinin Tg'sinin (cam geçiş sıcaklığı) fizyolojik sıcaklığın 37 °C'nin üzerinde ve camsı yapıda olmasından dolayı yapısı sert zincirlidir. PLGA'nın yapısındaki laktit içeriği ve moleküler ağırlığı düştükçe PLGA Tg'si düşmektedir (Passerini ve Craig, 2001). PLGA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.10'da gösterilmiştir (Martins vd., 2018).



Şekil 2.10. Poli laktik-ko-glikolik asidin yapısı [x, laktik asit birimlerinin sayısı ve y, glikolik asit birimlerinin sayısıdır] (Martins vd., 2018)

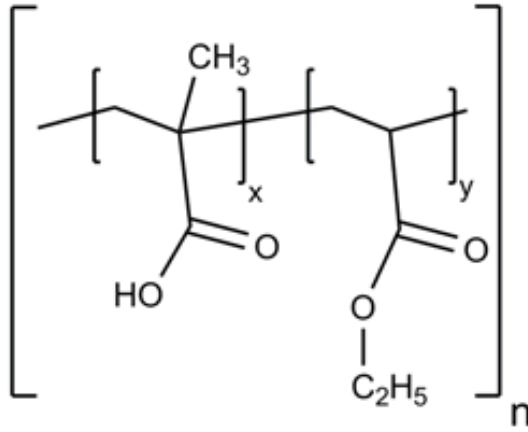
PLGA'dan ilaç salınımının ilk aşaması, difüzyondan geçer, ikinci aşama ise yapı kaybının başlangıcı ile karakterize edilmektedir. Önerilen bir polimer bozunma difüzyon modeli, polimer bozunmasının polimerdeki ilaç difüzivitesi üzerindeki etkisini ve bu ilacın formülasyon içindeki homojen olmayan dağılımını içerir. Serbest bırakmayı tanımlayan denklem, ortak difüzyon denklemidir (Berchane vd., 2007).

2.4.3.2 Eudragit L-30 D-55

Eudragit® polimerleri, fizikokimyasal özellikleri fonksiyonel gruplar (R) tarafından belirlenen akrilik ve metakrilik asit esterlerinden türetilen kopolimerlerdir. Eudragit® polimerleri sulu dispersiyon, organik çözelti granülleri ve toz gibi farklı formülasyonlara sahiptir. Poli(met)akrilatlar; asitli veya alkali gruplu Eudragit® L, S, FS ve E polimerlerinin tuz oluşumu ile sindirim sıvılarında çözünerek aktif bileşenin pH'a bağlı salınımını sağlamaktadır (Nikam vd., 2011). Etkin maddenin mide sıvısından korunması ve biyoyararlanım artırılmak isteniyorsa Eudragit® L ve S polimerleri kullanılmalıdır. Bağırsağın belirli bölgelerini hedeflemeyi sağlarlar. Ayrıca Eudragit® L

ve S polimerlerinin gastrozistansı, oral dozaj formunun hastaya uyumlu olmasını sağlar (Wathoni vd., 2020).

Eudragit L-30 D-55 (EU), Metakrilik Asit - Etil Akrilat Kopolimerinden oluşan (1:1) %30 oranında beyaz renkli sulu dispersiyon şeklinde bulunmaktadır. Serbest karboksil gruplarının ester gruplarına yaklaşık 1:1 oranında bulunmaktadır. EU'nun ağırlık ortalama molar kütlesi (Mw) yakl. 320.000 g/mol'dür (Evonik Industries AG, 2012). Ph 5.5'in üzerinde çözünme göstermektedir. EU'nun, toksisite göstermemesi, anyonik yapıda olması ve kontrollü salım profili gibi olumlu davranışlar sergilemesi, oftalmik uygulama için uygun hale getirmektedir (Duarte vd., 2007). EU'nun kimyasal yapısı Şekil 2.11'de gösterilmiştir (Evonik Industries AG, 2012).

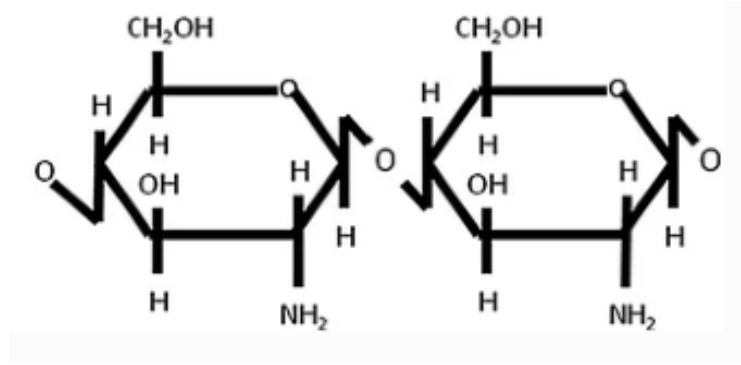


Şekil 2.11. Eudragit L-30 D-55'in kimyasal yapısı (Evonik, 2012)

2.4.3.3 Kitosan

CTS, katyonik bir polisakkarittir: biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, mukozaya yapışabilen ve toksik değildir ve antimikrobiyal, antiviral ve immünoadjuvan özellikler sergilemektedir. Kitosan nanopartikülleri, gelişmiş biyolojik dağılıma ve artan özgüllük ve duyarlılığa ve azaltılmış farmakolojik toksisiteye sahip yeni farmakolojik ve terapötik ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi için polimerik platformlar olarak büyük ilgi görmüştür (Hazel ve Carlos Peniche, 2011). CTS, esasen β (1 $\rightarrow$ 4) bağlantılı glukozamin birimlerinden ve bir miktar N-asetilglukozamin birimlerinden oluşan doğal bir polisakkarittir. Şekil 2.12'de kitosanın kimyasal yapısı sunulmuştur. CTS doğada nadiren görülür, ancak genellikle kabukluların ve yumuşakçaların kabuklarında, mantarların hücre duvarlarında ve böceklerin kütikülünde bulunan β (1 $\rightarrow$ 4) bağlantılı N-

asetil-D-glukozaminin bir homopolimeri olan kitinin deasetillenmesi ile ortaya çıkarılmaktadır (Naghdı vd., 2020). CTS'nin yapısı, deasetilasyonun homojen veya heterojen koşullar altında gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine bağlıdır (Harish Prashanth vd., 2002). Bu yapısal fark, kitosanın birçok özelliğinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Heterojen koşulda elde edilen kitosan, asidik ortamda çözünebilir ve suda çözünmez. Suda çözünen CTS, kitinin homojen deasetilasyonu ile elde edilebilmektedir (Novikov vd., 2023). Şekil 2.12.'te CTS'nin kimyasal yapısı verilmiştir (Divya ve Jisha, 2018).



Şekil 2.12. Kitosan'ın kimyasal yapısı (Divya ve Jisha, 2017)

2.4.4 Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri

Nanopartiküller, bölgeye özgü ilaç dağıtımını sağlayan kolloidal parçacıklardır. Başlıca üstünlükleri arasında boyut üzerinde iyi kontrol, daha uzun uzaklaştırılma süresi, iyileştirilmiş terapötik etkinlik ve düşük toksisite bulunmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin basit hazırlama yöntemleri, partikül boyut dağılımının kontrolünün kolay olması, ilacın yüksek oranda yüklenmesi ve ilacın stabilitesindeki artış nedeniyle tercih edilmektedir (Sur vd., 2019). Polimerik nanopartiküller, akıllı polimerler ile hazırlanarak hedef özgüllüğü ve düşük yan etkileri sebebiyle kullanımları daha da artmıştır. Polimerik nanopartiküller etkin maddeyi yalnızca belirli bir bölgeye hedeflemez, aynı zamanda ilacın belirli bir hızla açığa çıkmasını sağlamaktadır. Polimerler, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar vb. gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç salım sistemleri olarak çok önemli bir rol oynamaktadır (Banik vd., 2016). Polimerik nanopartiküller, ligandlar gibi çok sayıda

yüzey fonksiyonel grubunun bağlanmasına izin veren geniş bir yüzey alanına sahiptir. Daha küçük boyutları, daha küçük kılcal damarlara girmelerine ve böylece hücrelere kolayca hedeflemelerine yardımcı olmaktadır (Dey vd., 2016). Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler ile karşılaştırıldığında, daha uzun geçiş zamanına sahiptirler, bu da daha iyi terapötik etkinlik ve düşük toksisite göstermek için az miktarda ilacın kullanımının yeterli olduğunu göstermektedir (Ruiz-Gatón vd., 2018; E-E. Aly vd., 2019). Polimerik nanopartiküller, penetrasyonun oldukça güç olduğu beyne de hedeflenebilmekte ve gen terapisi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Son yıllarda, ilacın dış uyaranlara dayalı salınımı, hedeflenebilmesi, nanojel olarak da kullanılabilmesi ve diğer birçok alanda gelişim göstermiştir (Kumar Patra vd., 2018).

3. GEREÇLER:

3.1 Kullanılan Malzemeler

Asetik Asit	: Merck, Almanya
Aseton	: Merck, Almanya
Asetonitril	: Merck, Almanya
Diyaliz membran	: Sigma, Almanya
Dötorokloroform	: Merck, Almanya
Etanol	: Merck, Almanya
Eudragit® L-30 D-55	: Röhm Pharma, Almanya
Kitosan	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Moviol 4.88	: Sigma, Almanya
Norfloksasin	: Sigma, Almanya
O-fosforik asit	: Sigma, Almanya
PLGA	: Sigma, Almanya
Sodyum bikarbonat	: Merck, Almanya
Kalsiyum klorür dihidrat	: Merck, Almanya
Potasyum klorür	: Merck, Almanya

3.2 Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik No Frost, Türkiye
Çeker Ocak	: Hedlab, Türkiye
Derin Dondurucu	: Liebherr, Almanya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	: Shimadzu DSC-60, Japonya
Distile su cihazı	: MilliQ Milipore, Fransa
Etüv	: Elektro-mag M 5040BD, Türkiye
Fourier Dönüşümlü İnfrared	
Spektrofotometresi	: Perkin Elmer Spektrum 2000, İngiltere
Hassas Terazi	: Ohaus, İsviçre
Liyofilizatör	: Operon, Güney Kore
Manyetik Isıtıcı	: Heidolph MR 3001K, Almanya IKA®- Werke, Almanya
Mikropipet Seti	: Eppendorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: IKA, Almanya
Nükleer Manyetik Rezonans	
Spektrofotometresi	: Ultra Shield CP MAS NMR, Bruker, Almanya
Otoklav	: Eryiğit A.Ş. Türkiye
Parçacık Büyüklüğü Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere
pH Metre	: WTW Profi Lab pH 597, Weilheim, Almanya
Püskürterek Kurutma Cihazı	: Büchi B-90, İsviçre
Santrifüj	: Hettich-Rotina 420 R, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu	: Carl Zeiss SUPRA 50VP, Almanya
Ultrasonik Banyo	: Elma T470/H, Almanya
Vorteks karıştırıcı	: Jeiotech VM96B, Kore
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	: Shimadzu 20-A, Japonya
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere

4. YÖNTEMLER

4.1 Norfloksasin ile Yapılan Çalışmalar

4.1.1 Termal analiz

NFX'in termal analizi diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı (DSC; DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI, ABD) kullanılarak, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referans kabı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.2 FT-IR analizi

NFX'in FT-IR analizi (IR Prestige- 21 Shimadzu, Tokyo, Japonya) 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında analiz edilmiştir.

4.1.3 Proton NMR analizi

NFX'in yapısal özellikleri, ¹H-NMR cihazı ile (Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Bruker, Rheinstetten, Almanya) 25°C'de, dötorokloroform kullanılarak tayin edilmiştir.

4.1.4 Norfloksasin miktar tayini

Tez kapsamında yapılan NFX miktar tayini çalışmalarında YBSK (Shimadzu, Japonya) cihazı kullanılmış olup, analiz şartları Tablo 4.1'te sunulmuştur.

Tablo 4.1 YBSK analiz şartları

Cihaz	Shimadzu-20A
Kolon	VDSpher 100 C18-E, 250 x 4.6 mm, 5µm
Mobil Faz	Asetonitril/Distile Su/o-fosforik asit (80:20:1 h/h)
Dedektör	Shimadzu Fotodiyot Dizisi
Fırın Sıcaklığı	30°C
Dalga Boyu	278 nm
Akış Hızı	1 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Kullanılan YBSK yöntemi Uluslararası Harmonizasyon Konseyi'nin (ICH) Q2(R1)-Analitik İşlem Validasyonu başlıklı uluslararası harmonizasyon kılavuzu doğrultusunda valide edilerek kullanılmıştır (ICH Q2A, 2005).

4.1.4.1 Doğrusallık

Çalışmamızda NFX'e ait standart eğrinin bulunması amacı ile 500 µg.mL⁻¹ derişime sahip stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 5-100 µg.mL⁻¹ arasında derişimlere sahip 12 farklı numune hazırlanmıştır. Her test altı kez tekrar edilmiş ve analiz sonucunda 12 nokta için NFX derişimine karşılık gelen alan değerleri belirlenerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

4.1.4.2 Doğruluk

Çalışmamızda kullanılan yöntemin doğruluğunun belirlenmesi amacı ile üç farklı derişimde (20 µg.mL⁻¹, 40 µg.mL⁻¹, 80 µg.mL⁻¹) içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Her çözelti için altı kez ölçüm gerçekleştirilmiştir.

4.1.4.3 Kesinlik

YBSK'de, kesinlik belirli koşullar altında aynı veya benzer örnekler üzerinde tekrarlanan ölçümlerle elde edilen ölçülen değerler arasındaki uyumun yakınlığını karakterize etmektedir. Kesinlik, bir ölçüm sisteminin rastgele hatasıyla ilgilidir ve ölçüm belirsizliğinin bir bileşenidir. Tekrarlanabilirliği tespit etmek için, aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümü tekrarlanır. Çalışmamızda, farklı NFX konsantrasyona (20 µg.mL⁻¹, 40 µg.mL⁻¹ ve 80 µg.mL⁻¹) sahip çözeltiler ile üç farklı günde, altı tekrarlı çalışmaları yapılmıştır.

4.1.4.4 Duyarlılık

Analitik yöntemlerde duyarlılık, bir numunedeki tespit edilebilen, ancak kesin olarak nicelleştirilemeyen en düşük analit miktarıdır. Bir analitin belirli bir değerin üstünde veya altında olup olmadığını belirtmektedir. Prosedürün enstrümantal olmayan

veya enstrümantal olup olmadığına bağlı olarak, tespit sınırını belirlemek için çeşitli yaklaşımlar mümkündür. Saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) ile birlikte değerlendirilerek duyarlılık parametresi hesaplanmaktadır (Saho vd., 2018). Duyarlılık çalışmalarında doğrusallık çalışmaları ile belirlenen aralığın içinde yer alan üç farklı konsantrasyonda altı örnek hazırlanarak ölçüm yapılmış ve sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak hesaplanmıştır (ICH Q2A, 2005).

LOD değeri ICH klavuzunda yer alan denklem (4.1)'e göre hesaplanır.

$$LOD = \frac{[3.3 \times SS]}{m} \quad (4.1)$$

SS, y eksenini kesim değerinin standart sapmayı, m ise korelasyon denkleminin eğimini göstermektedir (ICH Q2A, 2005).

LOQ değeri ICH klavuzunda yer alan eşitlik (4.2) ile hesaplanabilir.

$$LOQ = \frac{10 \times SS}{m} \quad (4.2)$$

Eşitlik (4.2)'de yer alan SS y eksenini kesim noktasının standart sapmasını ve m değeri de korelasyon eşitliğinin eğimini göstermektedir (ICH Q2A, 2005).

4.1.4.5 Seçicilik

Kullanılan yöntemin seçiciliğinin belirlenebilmesi amacıyla formülasyonda kullanılan NFX ve diğer yardımcı maddelerin 225 nm'de YBSK sinyallerinin birbirleri ile çakışma durumları analiz edilmiştir.

4.1.5 Çalışma koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin formülasyon hazırlama basamaklarından ve analiz koşullarından etkilenip etkilenmediğini belirlemek amacı ile hazırlanan çözeltileri 1 ml asetonunda 25°C ve *in vitro* salım ortamı olan pH 7.4 fosfat tamponun (PBS) 37 °C'de formülasyon ve analiz süreleri dikkate alınarak üç gün süre ile incelenmiştir (n=3).

4.2 Polimerik Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

Polimerik nanopartikülleri oluşturmak amacıyla PLGA, EU ve CTS polimer olarak belirlenmiştir. Nanopartiküller nanoçöktürme metoduyla üretilmiştir (Honig vd., 2009). NP1, NP2 ve NP3 olarak adlandırılan nanopartiküller sırasıyla aşağıda açıklamaları sunulan yöntemler ile hazırlanmış ve karakterizasyon analiz sonuçları değerlendirilerek en uygun olan formülasyon belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.2.1 NP1 hazırlanışı

Tam tartım alınan PLGA 5 mL Aseton'da çözündürülmüştür. Moviol 4-88 ile sulu faz olan %2 (a/a) PVA çözeltisi 70-80 °C'de 2-2.5 saat karıştırılarak hazırlanmıştır. Organik faz, %2 PVA içeren su fazı içine 1 mL.dk⁻¹ akış hızında manyetik karıştırıcı kullanılarak (300 rpm) eklenmiştir. Elde edilen karışım çeker ocak içinde 4 saat boyunca 400 rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılıp organik faz uçurulmuştur. Elde edilen nanopartiküller ise 30 dakika boyunca 11000 rpm'de santrifüjlenmiş, sulu faz enjektör yardımıyla çökeltiden uzaklaştırılmıştır. Çökeltiye 1 mL distile su eklenerek yıkanmıştır. Tekrar santrifüje konan çökelti 10 dakika boyunca 11000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstte kalan sulu kısım enjektör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen nanopartiküller 2 mL distile su eklenerek süspande edilmiş ve -20 °C'de 24 saat boyunca dondurulmuş ve sonrasında liyofilize edilerek (Operon, Güney Kore) PNP'ler kuru halde elde edilmiştir.

4.2.2 NP2 hazırlanışı

Tam tartım alınan PLGA 5 mL asetonda çözündürülmüştür. %2 PVA içeren sulu fazına 0,333 mL Eudragit eklenerek çözünürlüğünü artırmak amacıyla 0.2 mL 1N NaOH ilave edilmiştir. PLGA-Aseton çözeltisi sulu faza 1 mL.dk⁻¹ akış hızında manyetik karıştırıcı kullanılarak (300 rpm) eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan dispersiyon çeker ocakta 4 saat boyunca 400 rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılıp organik faz uçurularak partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen nanopartiküller ise 30 dk boyunca 11000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sulu faz enjektör yardımıyla çökeltiden uzaklaştırılmıştır. Çökeltiye 1 mL distile su eklenerek yıkanmıştır. Tekrar santrifüje konan dispersiyon 10 dakika boyunca 11000 rpm'de santrifüj edilerek partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Üstte kalan sulu kısım enjektör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Elde

edilen nanopartiküllerin üzerine 2 mL distile su eklenerek disperse edilmiş ve -20 °C’de 24 saat boyunca bekletilerek dondurulmuştur. Daha sonra liyofilize edilerek PNP’ler kuru halde elde edilmiştir.

4.2.3 NP3 hazırlanışı

Tam tartım alınan PLGA 5 mL asetonda çözündürülmüştür. %2 PVA içeren sulu faza 20 mg Kitosan eklenmiş olup, çözünürlüğünü artırmak amacıyla 0.2 mL %99 Asetik Asit eklenmişti. PLGA-Aseton çözeltisi sulu faza 1 mL.dk⁻¹ akış hızında manyetik karıştırıcı kullanılarak (300 rpm) eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan PNP’ler çeker ocakta 4 saat boyunca 400 rpm’de manyetik karıştırıcı yardımı ile organik faz uçurulmuştur. Elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca 11000 rpm’de santrifüj edilmiş ve üstte kalan sulu faz enjektör yardımıyla elde edilen çökeltiden uzaklaştırılmıştır. Çökeltiye 1 mL distile su eklenerek yıkanmış ve dispersiyon 10 dakika boyunca 11000 rpm’de santrifüj edilmiş üstte kalan sulu kısım enjektör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen partiküller 2 mL distile su eklenerek süspande edilmiş ve -20 °C’de 24 saat boyunca bekletilerek dondurulmuştur. Daha sonra liyofilize edilerek PNP’ler kuru halde elde edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlara ait içerikler Tablo 4.2’de sunulmuştur.

Tablo 4.2 Hazırlanan nanonartikül formülasyonlarının içerikleri

Kod	NFX (mg)	PLGA (mg)	EU (mL)	CTS (mg)	Aseton (mL)	99% Asetik Asit (mL)	1 N NaOH (mL)	PVA 2% (mL)
NP1	5	100	-	-	5	-	-	20
NP2	5	100	0.333	-	5	-	0.2	20
NP3	5	100	-	20	5	0.2		20

4.3 Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.3.1 Parçacık şekli, büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan PNP’lerin parçacık şekilleri SEM (Hitachi TM 3030 Plus, Japonya) ve AFM (JPK/Bruker, Berlin, Almanya) ile analiz edilmiştir. Parçacık büyüklüğü ve

parçacık büyüklük dağılımı PCS cihazı (Malvern Nano ZS, İngiltere) ile tayin edilmiştir. Analizler 20 analizin ortalaması olmak koşulu ile üç kez tekrarlanmıştır.

4.3.2 Zeta potansiyel

Formülasyonlarının Zeta Potansiyel değeri Malvern Zetasizer cihazı (Malvern Nano ZS, İngiltere) ile ölçülmüştür. İşlemler, 25°C’de zeta hücrelerinde, distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Analizler 20 analizin ortalaması olmak koşulu ile üç kez tekrarlanmıştır.

4.3.3 Termal analiz

Tam tartım alınmış formülasyonların termal analizi DSC (Shimadzu DSC-60, Japonya) cihazı kullanılarak, alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı termogramlar elde edilmiştir.

4.3.4. FT-IR analizi

PNP’lerin FT-IR analizi 4000-500 cm⁻¹ dalga boyları arasında FT_IR spektrofotometresi (Perkin Elmer Spektrum 2000, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saf etkin maddenin ve saf polimerlerin FT-IR spektrumları, formülasyonların analiz sonuçlarının incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.3.5. NMR analizi

PNP’lerin yapısal özellikleri, ¹H-NMR cihazı (Ultra Shield CP MAS NMR, Bruker, Almanya) ile 25°C’de polimerlere uygun farklı çözücüler kullanılarak tayin edilmiştir. Saf etkin maddenin ve saf polimerlerin ¹H-NMR spektrumları, formülasyonların analiz sonuçlarının incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.3.6. Enkapsülasyon etkinliği

Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarı, tam tartımı alınmış nanopartiküllerin uygun çözücülerde çözündürülmelerinin ardından yapılan etkin madde miktar tayinleri ile belirlenmiştir. Her bir formülasyon için işlem üç kez tekrar edilmiştir.

4.4 *In vitro* Salım

Nanopartiküllerden NFX salımı diyaliz membran yöntemi ile belirlenmiştir (Moreno-Bautista ve Tam,2011). 70 mL salım ortamında, $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızı ile çalışmalar yapılmıştır. NFX içeren 2 mg nanopartiküller molekül ağırlığı 12-14 kDa olan selüloz asetat diyaliz membrana yerleştirilmiş ve 1 mL dissolüsyon ortamı da eklenerek membran uygun bir şekilde kapatılmıştır. Membranlar pH 7.4 fosfat tamponu içersinde $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'de ve 100 rpm'de karıştırılan ortama konmuş ve buharlaşmanın önlenmesi için sistemin üzeri kapatılmıştır. Kapalı tutulan sistemlerden 72 saat boyunca 1 mL hacminde örnekler alınmış ve aynı miktarda taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örneklerdeki NFX miktarları belirlenerek değerler % kümülatif miktarlar olarak zamana bağlı grafiklere aktarılmıştır. Analizler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1 Hücrelerin çoğaltılması

Sağlıklı insan fibroblast hücresi (BJ-ATCC CRL-2522) %10 fetal sığır serum, %1 penisillin/streptomisin, %1 L-glutamin ve %1 amfoterisin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO₂'li etüvde 37°C 'de süspansiyon kültür ortamında çoğaltılmıştır.

4.5.2 WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve suda çözünmeyen formazan tuzlarına dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerde nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeride artış gösterir (Carmicheal ve vd., 1987; Lian ve vd., 2003).

4.5.3 Metodun uygulanması

Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Bütün hücreler yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerden hazırlanan stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler (500, 125, 62,5, 31,25 ve 15,625 µg/mL) yapılarak farklı konsantrasyonlar taze olarak hazırlanmış ve hücreler üzerine uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit prosedürü talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilmiş, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar 420 nm dalga boyunda ELİZA cihazında okunmuştur. Deneyler bir birinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilip, % canlılık değerleri belirlenerek antiproliferatif etki değerlendirilmiş ve IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

4.5.4 Mikrobroth dilüsyon yöntemi ile antikandida aktivite testi

Örneklerin antikandida aktivitesi 0-800 µg/mL (800, 400, 200, 100, 50, 25) değerleri arasındaki konsantrasyonlar ile test edilmiştir. Örnekler metanolde çözüldükten sonra antikandida aktivitesi değerlendirilmiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiştir. (Cappuccino ve Sherman, 2004). Kandidalara karşı üremeyi durduran en küçük konsantrasyon nanopartiküllerin MİK değeri olarak kabul edilmiştir (Kavitha vd., 2010). Kullanılan test mikroorganizmaları; *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258) ve *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) dir. Mikroorganizma sayısı maya kültürleri için ise SDB içerisinde Mc Farland 0,5 (10⁸ KOB/mL) standartına göre ayarlanmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda; nanopartiküllerin seri konsantrasyonlarının bulunduğu kuyucukların üzerine 100 µL mikroorganizma inoküle edilmiştir. Plakalar 24 saat, 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda kuyucuklara 20 µL MTT boyası eklenip 4 saat daha inkübe edilmişlerdir. Bu deneyde pozitif kontrol grubu olarak NFX, negatif kontrol grubu olarak ise SDB besiyeri ayrıca mikroorganizmalar için de

büyüme kontrol grupları 96'lık plakaya aktarılmıştır. Deneyler 2 tekrarlı şekilde yapılmış ve aritmetik ortalamaları verilmiştir (Tablo 5.16).

4.5.5 Anneksin V-PI yöntemi ile kandidal apoptozisin belirlenmesi

Antikandidal aktivite testi ile MİK değerleri belirlenen nanopartiküllerden NP1, NP2, NP3, NFXEU, NFXCTS ve pozitif kontrol olarak NFX'in en düşük konsantrasyonlarda etki gösterdiği suşun *Candida albicans* olması nedeniyle kandidal apoptozis testi *Candida albicans* üzerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.34). Nanopartiküllerin MİK değerlerinin apoptoza neden olup olmadığını değerlendirmek için Annexin V-PI ile akış sitometre apoptoz testi yapılmıştır (Engeland vd., 1998). Bunun için *Candida albicans* ve nanopartiküller 96 kuyucuklu plakalarda belirtilen konsantrasyonlarda 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki örnekler eppendorf tüplere toplanmış ve 1200 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında besiyerinin uzaklaştırılabilmesi için süpernatant uzaklaştırılmış ve 2 ml PBS ile yine santrifüjlenerek yıkama yapılmıştır.

Temiz eppendorf tüplere 5 µL Annexin V ve 5 µL PI konulmuş üzerine yıkama sonrası 100 µL PBS ile resüspanse edilmiş örnekler eklenmiştir. 20 dk, karanlıkta ve oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örneklerin üzerine 1x Anneksin bağlama tamponundan 100 µL ilave edilmiştir. Daha sonra flow sitometri (Accuri C6-BD) cihazında 1×10^5 hücre sayılarak canlı, nekrotik, erken ve geç apoptotik *Candida albicans* yüzdeleri belirlenmiş, analiz sonuçları Şekil 5.32'de ve tablo olarak Tablo 5.17'de sunulmuştur (Engeland vd., 1998).

Apoptoz, homeostazi ve organizmanın hayatta kalmasını destekleyen önemli ve gerekli bir hücre ölüm programıdır. Sağlıklı hücrelerde plazma zarında bulunan Fosfatidilserin (PS), programlanmış hücre ölümünün erken aşamaları için iyi doğrulanmış bir markör olması sebebiyle PS maruziyeti ile orantılı ışıldayan sinyaller ve membran bütünlüğünün kaybı sonucu oluşan floresan sinyaller, daha sonra maruziyet boyunca planlanan aralıklarla standart çok modlu bir plaka okuyucu kullanılarak toplanır. Elde edilen ışıldayan ve flüoresan veriler daha sonra bir apoptotik yanıtın kinetiğini ve büyüklüğünü tanımlamak için kullanılır (Kupcho vd., 2019).

PS, tipik olarak floresan etiketli Annexin V konjugatları ile ölçüldüğü apoptoz sırasında plazma zarının dış kısmına doğru yer değiştirir. Bu yer değiştirme apoptotik hücrelerde henüz membran bütünlüğünün bozulmadığı yani ölümün erken dönemlerinde meydana gelir (Ulukaya, 2013).

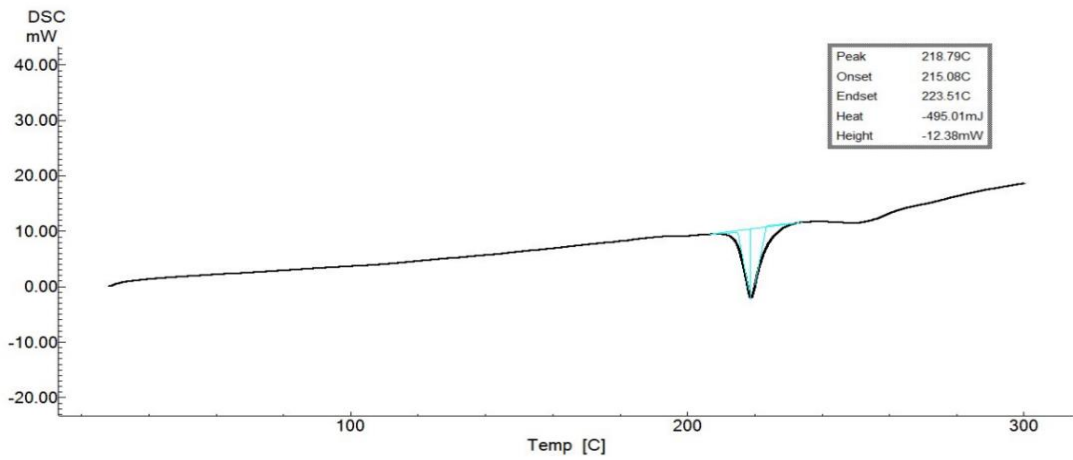
Anneksin V, yüksek, kalsiyuma bağlı afinitesi ve lipit için seçiciliği nedeniyle PS maruziyeti için tercih edilen bir probdur. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. PI sadece membran bütünlüğü bozulan hücrelere girebilen, dolayısıyla ölmüş hücreleri boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır (Güleş ve Eren 2008).

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1 NFX ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1 Termal analiz

NFX'in, DSC analiz cihazı kullanılarak 30-300°C aralığında gerçekleştirilen termal analizinde, erime sıcaklığı 218,79°C olarak tespit edilmiştir. Analiz sonuçları, literatür taramalarındaki bulunan değerler ile uygunluk göstermektedir (Gunnam ve Nangia, 2023). NFX'e ait DSC termogramı Şekil 5.1'de verilmiştir.

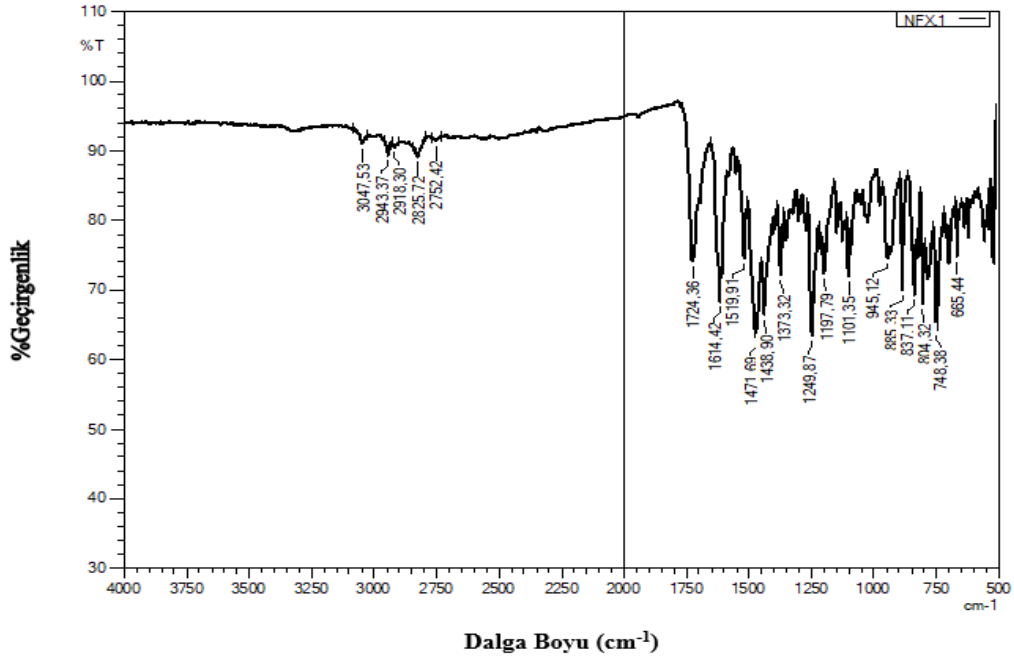


Şekil 5.1. Norfloksasin'e ait DSC Termogramı

5.1.2 FT-IR analizi

NFX'e ait FT-IR spektrumu Şekil 5.2'de sunulmuştur. NFXin FT-IR spektrumlarında, OH grubunun gerdirme titreşimine ve moleküller arası hidrojen bağına tek bir köprü ile atanan 3550 ila 3500 cm^{-1} arasında belirgin bir karakteristik tepe noktası bulunmuştur. 3500-3300 cm^{-1} 'deki bir bant, piperazinil gruplarının imino kısmının N-H germe titreşimidir. 2750-2700 cm^{-1} 'deki tepe, etil grubunun varlığını göstermiştir. 2500 cm^{-1} 'deki bant, karboksilik asidin OH grubuna bağlıdır. 1700 cm^{-1} 'deki tepe noktası, karbonil C = O gerilmesidir. 1650-1600 cm^{-1} 'deki bant, kinolonların C-H bağıdır. 1500-1450 cm^{-1} 'deki zirveler, asitlerin O-C-O bağına temsil etmektedir ve 1300-1250 cm^{-1} 'de, karboksilik asidin varlığını gösteren O-H grubunun bükülme titreşimidir. Ek olarak, C-F grubuna 1050 ila 1000 cm^{-1} arasında rastlanılmıştır. 950-900 cm^{-1} bölgesindeki zirve, aminlerin N-H bükülme titreşimidir. 800 cm^{-1} 'deki bant, aromatik protonların meta

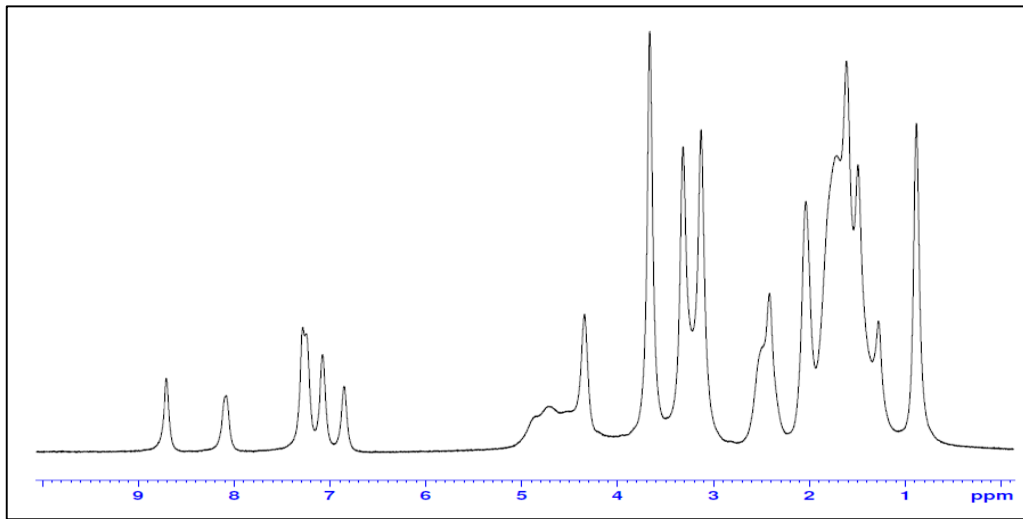
dağılımından kaynaklanmaktadır (Sahoo vd., 2012; Sateesha vd., 2010; Al-Mustafa, 2002).



Şekil 5.2. NFX' e ait FT-IR spektrumu

5.1.3 Proton NMR analizi

NFX Spektrumunda NFX metil grubu CH_3 protonları 1.18 ppm'de ve CH_2 protonları 1.31 ppm'de, NFX aromatik protonları 7.54 ila 8.64 ppm arasında ve asit grubu O-H protonu 15.20 ppm'de saptanmıştır (Dhevaraj vd., 2019). NFX'e ait ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.3'de sunulmuştur.



Şekil 5.3. NFX'e ait ^1H -NMR analizi

5.1.4 NFX'in YBSK ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları

Analitik yöntem validasyonunun amacı kullanılan yöntemin uygun ve her seferinde aynı yöntemin kullanılıp aynı verilere ulaşılabilir olduğu teyit etmektir. Kullanılan yöntem doğruluk, doğrusalılık, kesinlik ve duyarlılık analizleri ile yöntem güvenilirliği ispat edilir. Bu bölümde çalışmada kullanılan yöntemin güvenilirliği açısından doğrusalılık, kesinlik, seçicilik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.1.4.1 Doğrusallık

Analitik bir prosedürün doğrusalılığı, numunedeki analitin miktarı ile doğru orantılı olan test sonuçlarını belirli bir aralık içinde elde etme yeteneğidir. Doğrusallığın oluşturulması için en az 5 farklı konsantrasyon önerilmektedir (ICH,2005). NFX'e ait standart eğrinin bulunabilmesi için aseton ile stok çözelti hazırlanmıştır. 5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NFX aralığında değişen konsantrasyonlarda 3 farklı kalibrasyon seti hazırlanmış ve Tablo 4'te verilen koşullarda YBSK analizleri yapılmıştır. NFX konsantrasyonlarına göre alan değerleri hesaplanmıştır. Konsantrasyonlara göre alan/tutulma zaman (R_t) değerleri Tablo 5.1-5.4'de sunulmuştur.

Tablo 5.1 Seri 1 YBSK sonuçları ve değerlendirilmesi

Seri 1	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Alan	R_t	Alan/ R_t
1	0,20	32012	5,3660	5965,7100
2	0,40	61080	5,3630	11389,1479
3	0,60	98026	5,3670	18264,5798
4	1	134555	5,3660	25075,4752
5	2	296590	5,3720	55210,3500
6	5	735493	5,3740	136861,3700
7	10	8712	5,4240	1606,1947
8	20	3015241	5,3760	560870,7220
9	40	5940813	5,3750	1105267,5300
10	60	8890659	5,3740	1654383,8900
11	80	11764589	5,3780	2187539,7900
12	100	14532857	5,3750	2703694,3300

Tablo 5.2 *Seri 2 YBSK sonuçları ve değerlendirilmesi*

Seri 2	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Rt	Alan/ Rt
1	0,20	36370	5,3840	6755,2006
2	0,40	54550	5,3870	10126,2298
3	0,60	92271	5,3880	17125,2784
4	1	134615	5,3930	24961,0606
5	2	290859	5,3860	54002,7850
6	5	746170	5,3870	138513,0870
7	10	1487877	5,3930	275890,4130
8	20	3008149	5,3900	558098,1450
9	40	5940118	5,3980	1100429,4200
10	60	8870100	5,4020	1642002,9600
11	80	11742743	5,4010	2174179,4100
12	100	14491686	5,3940	2130457,1700

Tablo 5.3 *Seri 3 YSBK sonuçları ve değerlendirilmesi*

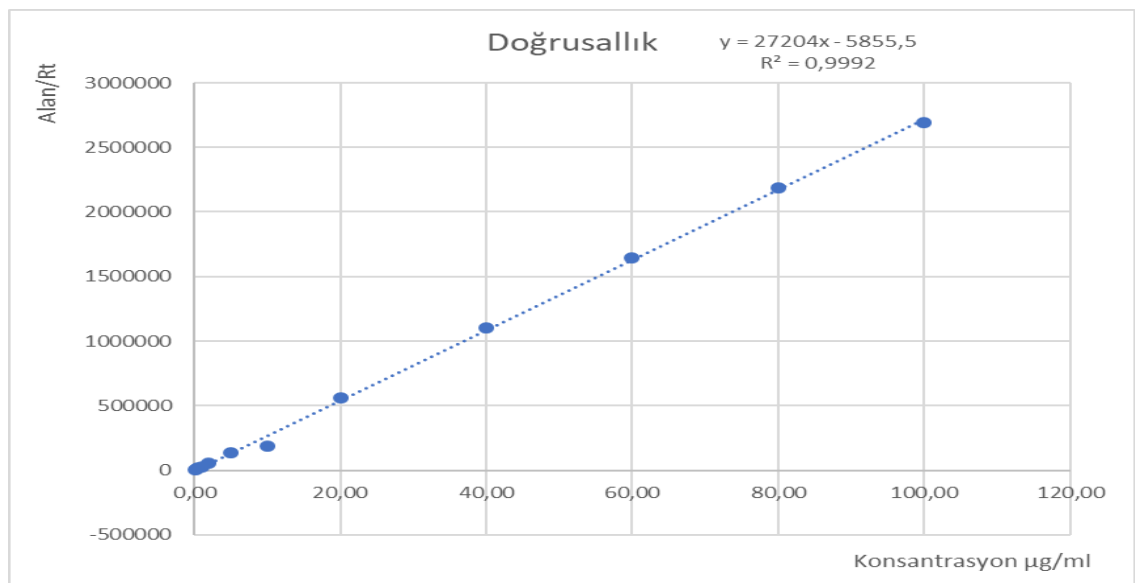
Seri 3	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Rt	Alan/ Rt
1	0,20	27336	5,4000	5062,2222
2	0,40	69538	5,4100	12853,6044
3	0,60	84037	5,4030	15553,7664
4	1	148883	5,4100	27519,9630
5	2	279208	5,4020	51686,0422
6	5	745127	5,4020	137935,3940
7	10	1498718	5,4110	276976,1600
8	20	3006449	5,4160	555105,0590
9	40	5926044	5,4140	1094577,7600
10	60	8861929	5,4180	1635645,8100
11	80	11725839	5,4150	2165436,5700
12	100	14499052	5,4140	2678066,4900

3 seriye ait ortalama değerlerin hesaplamaları Tablo 4.5'te verilmiştir. Yapılan doğrusallık çalışması sonucunda, NFX etkin maddesinin konsantrasyon hesabı için kullanılacak doğru denklemi $y=27204x-5855,5$ [y: alan/Rt; x: konsantrasyon (µg/mL)]

olarak bulunmuştur (Şekil 5.4). Doğrusallık için 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Elde edilen doğru denklemi NFX etkin maddesinin miktar tayini çalışmalarında kullanılmıştır.

Tablo 5.4 Doğrusallık hesabı için 3 seriden elde edilen ortalama Alan/Rt değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Seri 1	Seri 2	Seri 3	ORT (n=3)
0,2	5965,7100	6755,2006	5062,2222	5927,7109
0,4	11389,1479	10126,2298	12853,6044	11456,3274
0,6	18264,5798	17125,2784	15553,7664	16981,2082
1	25075,4752	24961,0606	27519,9630	25852,1663
2	55210,3500	54002,7850	51686,0422	53633,0590
5	136861,3700	138513,0870	137935,3940	137769,9500
10	1606,1947	275890,4130	276976,1600	184824,2560
20	560870,7220	558098,1450	555105,0590	558024,643
40	1105267,5300	1100429,4200	1094577,7600	1100091,5700
60	1654383,8900	1642002,9600	1635645,8100	1644010,8900
80	2187539,7900	2174179,4100	2165436,5700	2175718,5900
100	2703694,3300	2130457,1700	2678066,4900	2504072,6600



Şekil 5.4. NFX'e ait doğrusallık grafiği ($\bar{x} \pm SH$, n=3)

5.1.4.2 Doğruluk

Analitik bir prosedürün doğruluğu, geleneksel bir gerçek değer veya kabul edilen bir referans değer olarak kabul edilen değer ile bulunan değer arasındaki farkın birbirine yakınlığını ifade etmektedir (ICH,2005). Doğruluk çalışması için çalışma aralığı 0.2-100 µg/mL olan ve 20, 50 ve 80 µg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda NFX içeren örnekler hazırlanmıştır. Analiz sonucunda bulunan yüzde geri kazanım değerlerinin % 98-102 aralığında olması gerekmektedir. Kabul limiti geri kazanım değerinin $\pm$ % 2 çıkması gerekmekte olup, sonuçlara göre yöntem iyi geri kazanım göstermektedir (Tablo 5.5-5.7) (ICH, 2005).

Tablo 5.5 20 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

20 µg/mL	1	2	3
Alan	3004692	3017592	3009911
Rt	5,432	5,432	5,436
Alan/Rt	553146,5390	555521,3549	553699,5953
Konsantrasyon (µg/mL)	20,5485237	20,6358203	20,56885367
% geri kazanım	102,7425	103,179	102,8445
% geri kazanım ORT		102,922	
% fark		2,922	
SS		0,2283	
% BSS		0,2219	
SH		0,1318	

Tablo 5.6 40 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

40 µg/mL	1	2	3
Alan	5954296	5948897	5952037
Rt	5,423	5,427	5,435
Alan/Rt	1097970,8600	1096166,7600	1095131,0000
Konsantrasyon (µg/mL)	40,5759	40,5096	4,4715
	101,43975	101,274	101,1788
% geri kazanım			
% geri kazanım ORT		101,2975	
% fark		1,2975	
SS		0,1321	
% BSS		0,1304	
SH		0,0763	

Tablo 5.7 80 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

80 µg/mL	1	2	3
Alan	11794710	11776342	11797593
Rt	5,424	5,426	5,417
Alan/Rt	2174540,9300	2170354,2200	2177883,1500
Konsantrasyon (µg/mL)	80,1498	79,9959	80,2727
% geri kazanım	100,1873	99,9949	100,3409
% geri kazanım ORT		100,1743	
% fark		0,1743	
SS		0,1734	
% BSS		0,1731	
SH		0,1001	

5.1.4.3 Kesinlik

Analitik bir prosedürün hassasiyeti, öngörülen koşullar altında aynı numunenin birçok kez örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki dağılım derecesinin yakınlığını ifade eder. Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik parametreleri kesinlik tayini için önemlidir (ICH, 2005). Gün içerisinde yöntemin tekrarlanabilirliğinin gösterilebilmesi için NFX içeren 20 µg/mL, 40 µg/mL ve 80 µg/mL şeklinde 3 farklı konsantrasyon hazırlanmış olup, her bir konsantrasyonda 4 tekrar yapılmıştır. Yöntemin tekrar edilebilirliğinin teyit edilebilmesi için farklı günlerde aynı seriler tekrardan hazırlanmış ve gerekli ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar SS ve BSS olarak verilmiştir (Tablo 5.8-5.11).

ICH klavuzuna göre edinilen bulgular değerlendirildiğinde, BSS değerleri %2'den düşük olduğu için yöntemimizin kesinliği doğrulanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçlarının değerlendirildiği üç farklı konsantrasyonda ise BSS değerleri %2'yi aşmamıştır. Yapılan yöntemin kesinliği doğrulanmıştır (ICH, 2005).

Tablo 5.8 Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün (n=4)

Gün 1	Alan	Rt	Alan/Rt	Konsantrasyon (µg/mL)
20 µg/mL	3014988	5,454	552803,0800	20,5359
	3013844	5,461	551885,0030	20,5022
	3016700	5,459	552610,3680	20,5288
	3015958	5,452	553183,7860	20,5499
40 µg/mL	5913246	5,460	1083012,0900	40,0260
	5914973	5,464	1082535,3200	40,0085
	5913432	5,459	1083244,5500	40,0346
	5909859	5,467	1081005,8500	39,9523
80 µg/mL	11788356	5,448	2163795,1500	79,7548
	11790425	5,449	2163777,7600	79,7542
	11788271	5,455	2161002,9300	79,6522
	11788897	5,450	2163100,3700	79,7293

Tablo 5.9 Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün (n=4)

Gün 2	Alan	Rt	Alan/Rt	Konsantrasyon (µg/mL)
20 µg/mL	3016552	5,450	553495,7800	20,5614
	3017761	5,446	554124,3110	20,5845
	3016384	5,428	555708,1800	20,6427
	3017196	5,426	556062,6610	20,6557
40 µg/mL	5965264	5,469	1090741,2700	40,3101
	5968015	5,466	1091843,2100	40,3506
	5968623	5,472	1090757,1300	40,3107
	5968877	5,466	1092000,9100	40,3564
80 µg/mL	11756347	5,455	2155150,6900	79,4371
	11756529	5,450	2157161,2800	79,5110
	11756271	5,456	2154741,7500	79,4133
	11751823	5,458	2153137,2300	79,3631

Tablo 5.10 Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün (n=4)

Gün 3	Alan	Rt	Alan/Rt	Konsantrasyon (µg/mL)
20 µg/mL	3034206	5,420	559816,6050	20,7937
	3030592	5,415	559666,1130	20,7882
	3032751	5,416	559961,4110	20,7990
	3033837	5,417	560058,5190	20,8026
40 µg/mL	5975058	5,461	1094132,5800	40,4348
	5979704	5,459	1095384,5000	40,4808
	5981083	5,458	1095837,8500	40,4975
	5979877	5,461	1095015,0200	40,4672
80 µg/mL	11750229	5,455	2154029,1500	79,3958
	11751805	5,456	2153923,2000	79,3920
	11750691	5,457	2153324,3500	79,3699
	11748781	5,459	2152185,5700	79,3281

Tablo 5.11 Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün	2.Gün	3.Gün	
20 µg/mL				
ORT	20,5292	20,6111	20,7959	20,6454
SS	0,0200	0,0454	0,0063	0,0198
%BSS	0,0974	0,2203	0,0303	0,0959

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün	2.Gün	3.Gün	
40 µg/mL				
ORT	40,0053	40,3320	40,4701	40,2691
SS	0,0370	0,0250	0,0266	0,0065
%BSS	0,0925	0,0620	0,0657	0,0161

	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün	2.Gün	3.Gün	
80 µg/mL				
ORT	79,7226	79,4311	79,3714	79,5084
SS	0,0484	0,0615	0,0311	0,0153
%BSS	0,0607	0,0774	0,0392	0,0192

5.1.4.4 Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri “4.1.5.4 Duyarlılık” bölümünde sunulmuş olan Denklem (4.1) ve Denklem (4.2) kullanılmış ve LOD değeri 0,0570 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve LOQ değeri 0,1727 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kullanılan en düşük NFX konsantrasyonu 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ’dir. Buna göre hesaplanan LOD ve LOQ değerleri belirtilen konsantrasyondan düşük olması sebebiyle yöntemin duyarlılığı doğrulanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.12’de verilmiştir.

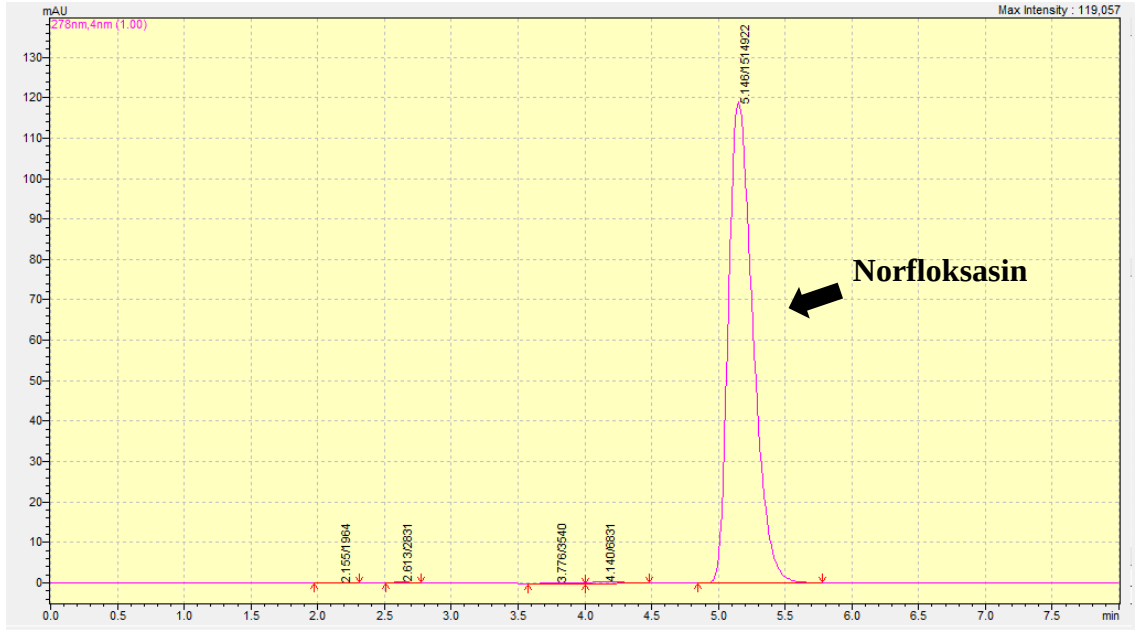
Tablo 5.12 LOD ve LOQ değerleri

Denklem	Kesim noktası	Eğim (m)
1	4627,4	27211
2	4365,9	27134
3	5274,7	26932
Ortalama	4756	27092,3333
Standart Sapma	467,8492	144,0914
Standart Hata	270,1052	83,1889
LOD		0,0570
LOQ		0,1727

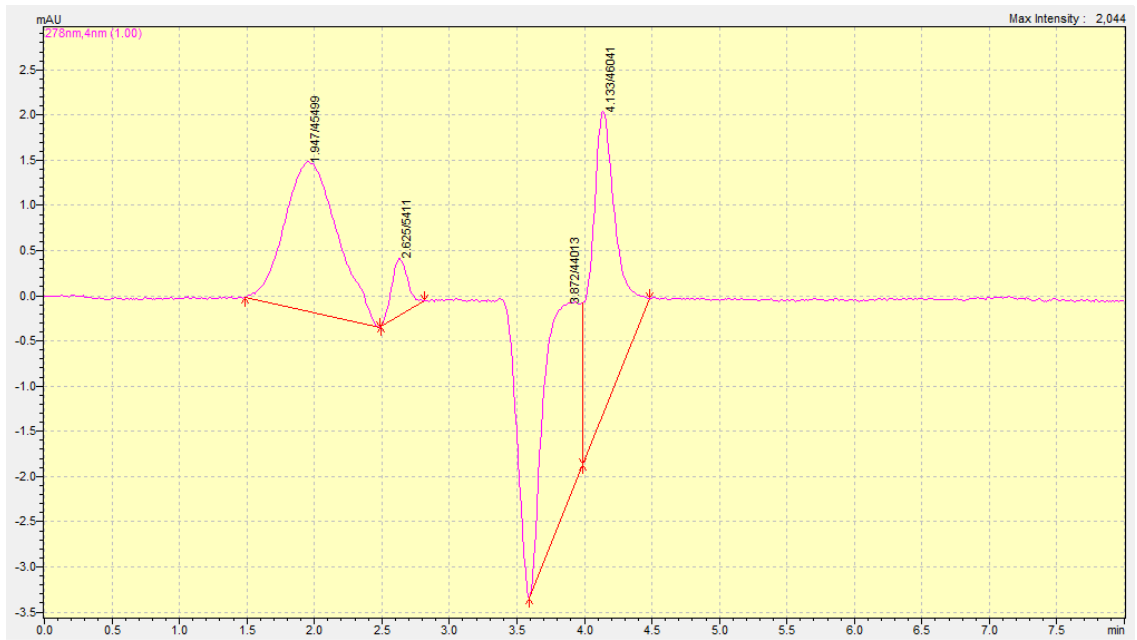
5.1.4.5 Seçicilik

Seçicilik, mevcut olması beklenebilecek bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak değerlendirme yeteneğidir. Tipik olarak bunlar safsızlıkları, parçalayıcıları, matrisleri vb. içerebilir. Bir analitik prosedürün özgüllüğünün olmaması, diğer destekleyici analitik prosedürler ile telafi edilebilir (ICH Q2A, 2005). Kullanılan yöntemin seçiciliğinin belirlenebilmesi amacıyla formülasyonda kullanılan NFX ve diğer yardımcı maddelerin 225 nm’de YBSK sinyallerinin birbirleri ile çakışma durumları analiz edilmiştir. Yapılan çalışmalar kapsamında formülasyonların plaseboları ve salım ortamında analitik yöntemin seçiciliği incelenmiştir (Şekil 5.5-5.9).

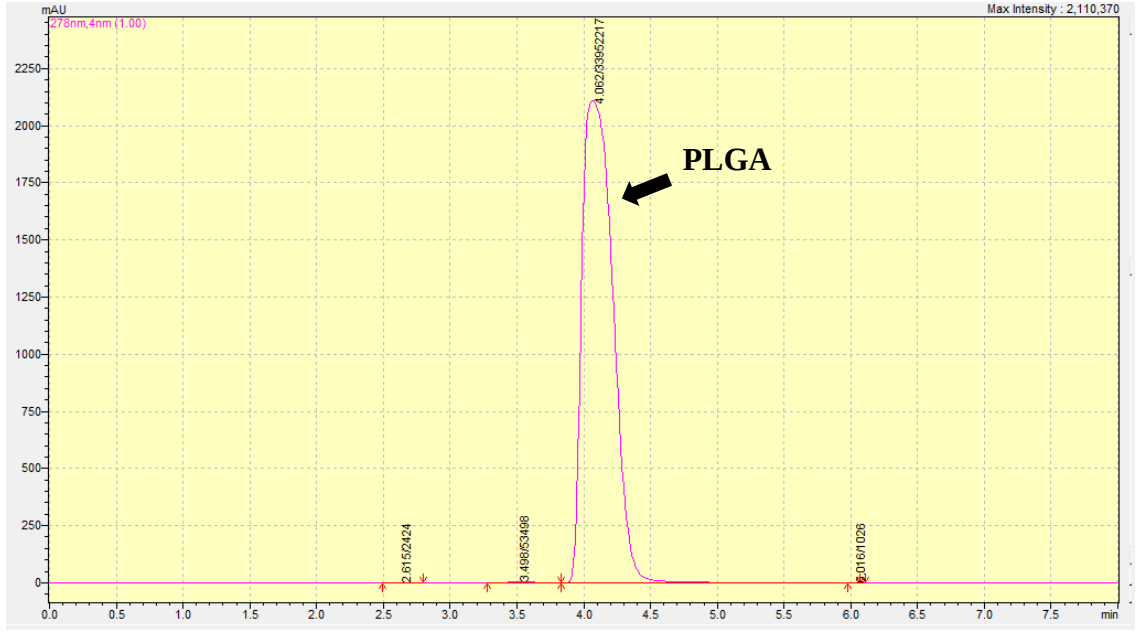
Elde edilen sonuçlara bakıldığında, NFX’in asidik ve bazik ortamlarda sinyal verdiği, formülasyona konan PLGA’ların diğer sinyallerden ayrıştığı gözlenmiştir. Şekil 5.13 ve 5.14’te ise EU ve CTS sinyallerine rastlanılamamıştır.



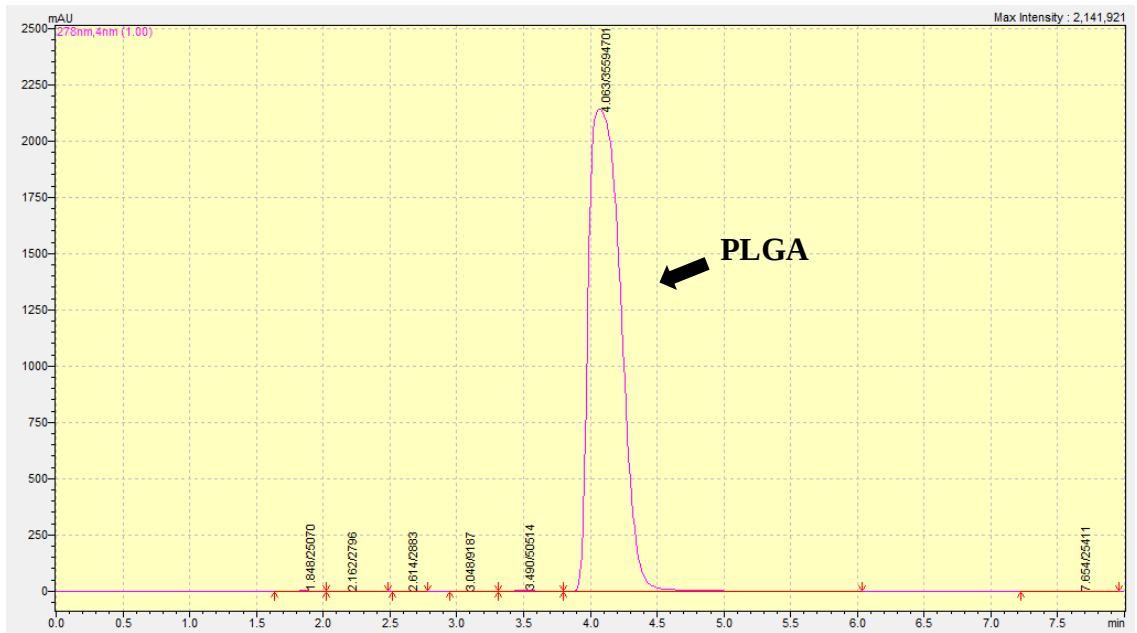
Şekil 5.5. Norfloksasin'e ait referans kromatogram



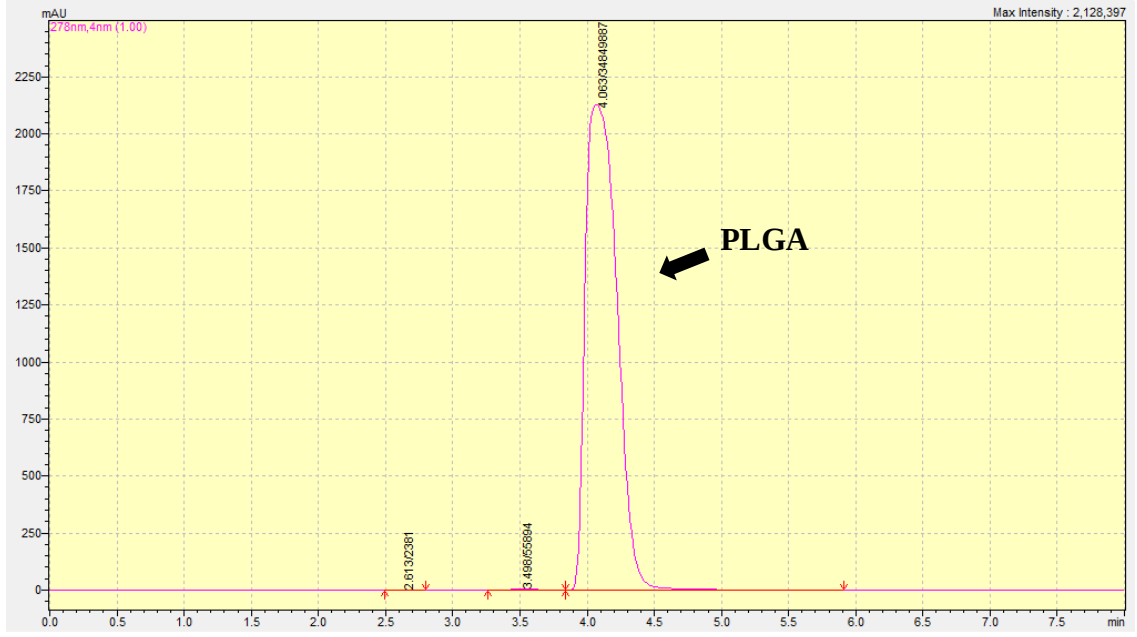
Şekil 5.6. Fosfat tampona (pH 7.4) ait referans kromatogram



Şekil 5.7. PLGA mobil faza ait referans kromatogram



Şekil 5.8. PLGA-EU mobil faza ait referans kromatogram



Şekil 5.9. PLGA-CTS mobil faza ait referans kromatogram

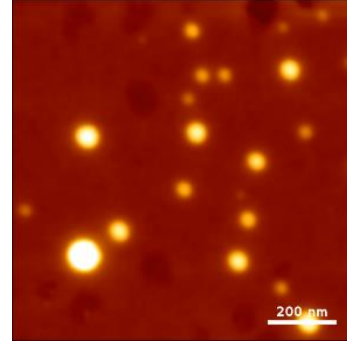
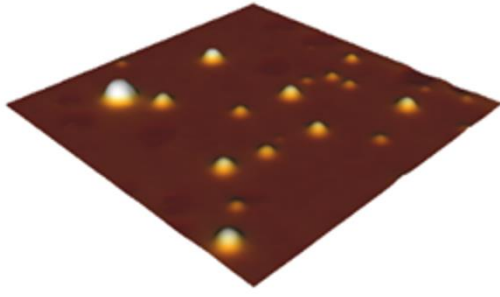
5.1.5 Çalışma şartlarındaki kararlılık

Etkin maddenin PNP hazırlama koşullarında incelenmesi, ‘‘NFX’in YBSK ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları’’ kısmında belirtilen analiz şartlarında NFX’in miktar tayinine dayanmaktadır. YBSK kullanılarak yapılan analizlerde etkin maddenin bozunmadan kaldığı bulunmuştur. Kullanılan koşulların uygun olduğu gözlenmiştir. Etkin maddenin kararlılığı pH 7.4’te incelenmiş ve aktif maddenin bozunmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, *İn vitro* salım deneylerinde kullanılan koşulların NFX kararlılığı açısından uygun olduğuna karar verilmiştir.

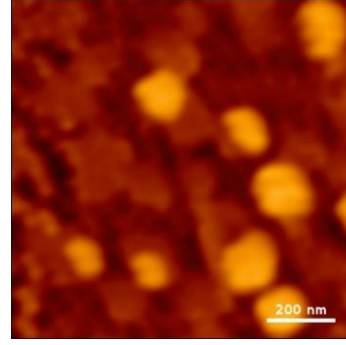
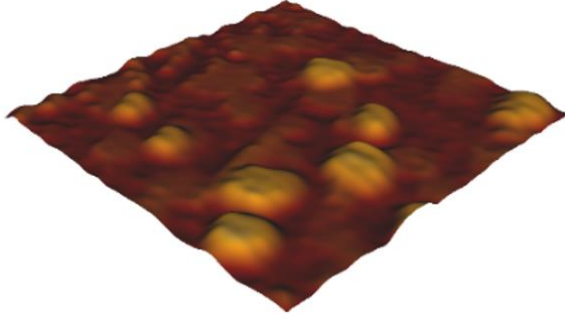
5.2 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması

5.2.1 Parçacık şekli, büyüklüğü ve dağılımı

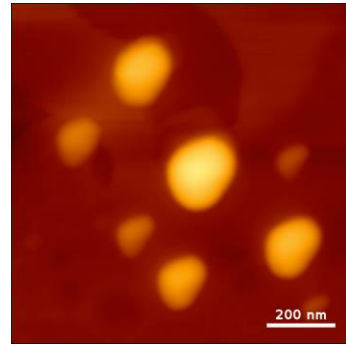
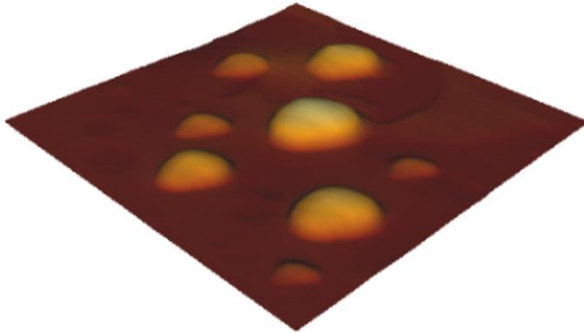
PNP’leın parçacık şekli ve yüzey özelliklerine ilişkin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri sırası ile Şekil 5.10-5.12 Şekil 5.13-5.15’te sunulmuştur.



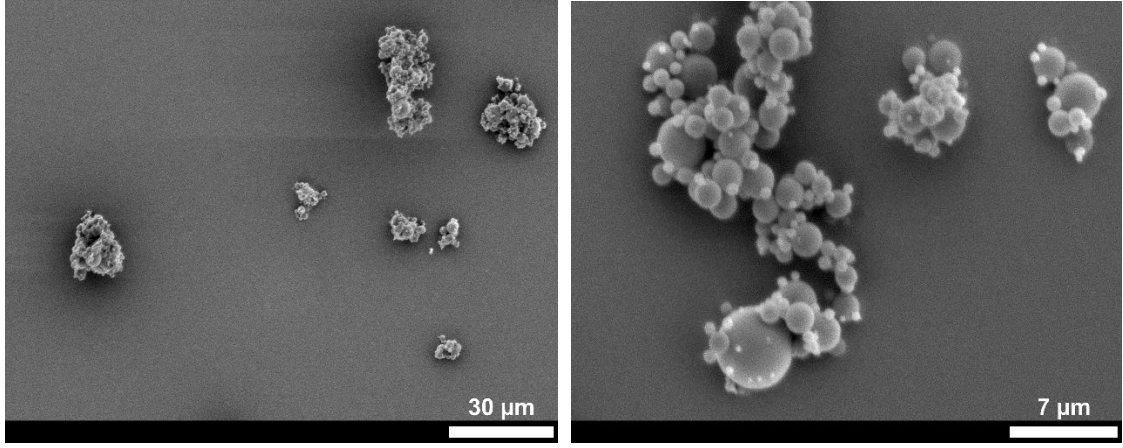
Şekil 5.10. NP1 nanopartiküllerine ait AFM görüntüleri



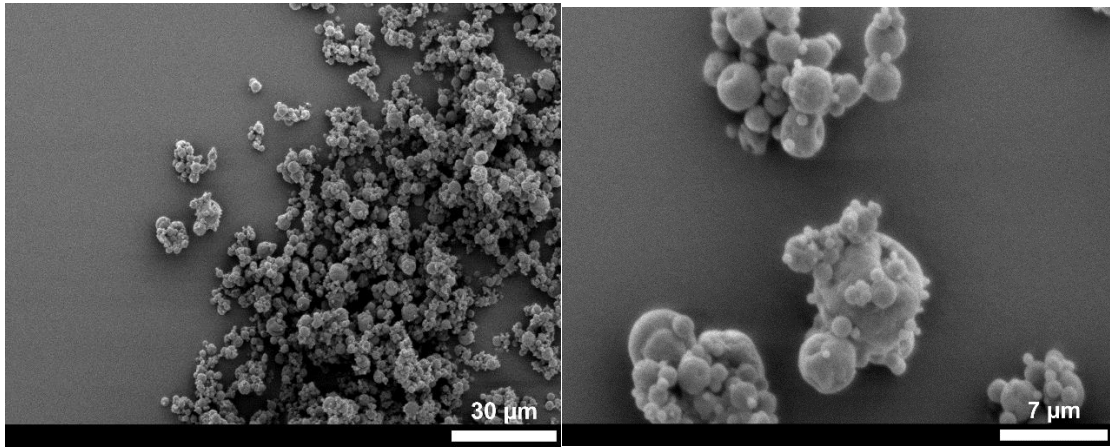
Şekil 5.11. NP2 nanopartiküllerine ait AFM görüntüleri



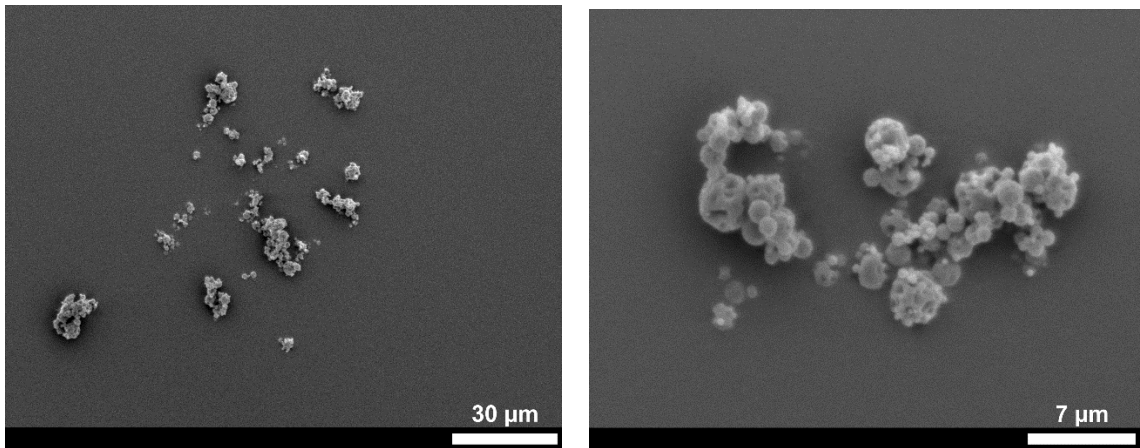
Şekil 5.12. NP3 nanopartiküllerine ait AFM görüntüleri



Şekil 5.13. NP1 nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri



Şekil 5.14. NP2 nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri



Şekil 5.15. NP3 nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri

AFM analizleri ile elde edilen 3 boyutlu görüntüler partiküllerin yüzey özelliklerini detaylı olarak göstermektedir. Elde edilen görüntüler düzgün yüzeye sahip ve nanometre boyutunda küresel partiküllerin başarı ile elde edildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 5.10-5.12). SEM ile elde edilen görseller de AFM analizleri ile benzer sonuçları ortaya koymuştur (Şekil 5.12-5.15). Kullanılan polimerlerin küresel yapının oluşmasında bir değişikliğe neden olmadığı ve yüzey özelliklerinin de benzer olduğu görülmektedir. Her iki analiz sonucu da nispeten homojen olmayan bir partikül boyutu dağılımını, mikron boyutlu partiküllerin yanısıra oldukça küçük partiküllerin de olduğu görülmektedir (Şekil 5.10-5.15).

Parçacık büyüklüğü analizi, partiküler sistemlerin karakterizasyon yöntemleri arasında çok önemli parametredir. Parçacık büyüklüğü, ürünün nihai uygulamalarına ve sonuçlarına karar vermek için kritik öneme sahip olduğu oldukça önemli bir kalite kontrol aracıdır (Mukesh Kumar ve Annika Singh, 2022). Polidispersite indeksi (PDI), bir numunenin boyutuna göre heterojenliğinin bir ölçüsüdür. Polidispersite, bir numunedeki boyut dağılımı veya izolasyon veya analiz sırasında numunenin toplanması veya toplanması nedeniyle oluşabilmektedir (Mudalige vd., 2019). Formülasyonda kullanılan farklı çözücüler, PDI değerini önemli ölçüde etkilemektedir. Çeşitli çözücüler yüzeyi farklı şekilde çözer; polarizasyon ve diğer fizikokimyasal özelliklerde farklılık göstermektedirler (Dembek vd., 2022). 0'a yakın bir PDI değeri homojen bir dağılıma işaret ederken, 1'e yakın bir PDI değeri tamamen heterojen ve çok dağınık bir popülasyonu tanımlamaktadır (Al-mahallawi vd., 2015). Bulduğumuz değerler 0.12 ± 0.01 ile 0.24 ± 0.03 arasındadır. Hazırlanan nanopartiküllere ait parçacık büyüklüğü ve dağılım sonuçları Tablo 5.13'te sunulmuştur.

Tablo 5.13 Parçacık büyüklüğü ve dağılımı (ORT: Ortalama. PDI: Polidisperslik indisi. SH: Standart hata)

Parçacık Büyüklüğü (nm)		
Kod	ORT+SH	PDI+SH
NP1	174.03±10.73	0.12±0.01
NP2	157.82±25.25	0.24±0.03
NP3	303.17±31.46	0.19±0.02

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde oküler uygulamalar için en önemli parametrelerden biri olan nano boyutlu partiküllerin elde edildiği, morfolojik analizlerde

de gözlenen partiküllerin büyük bir kısmının nano boyutta oldukları ve oldukça homojen bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğu gözlenmektedir.

5.2.2 Zeta potansiyel

ZP, parçacıklar arasındaki elektrostatik itme veya çekimin ölçüsüdür ve dağılımların kararlılığı için en iyi göstergedir. Partiküllerin bir araya gelmesini önlemek için negatif veya pozitif yüksek zeta potansiyeli değerlerine ulaşılmalıdır (İlhan vd., 2022). Parçacıkların, ≥ 30 mV büyüklüğünde pozitif veya negatif yüklü olmaları durumunda bir araya gelme olasılığı daha düşüktür (Khalil vd., 2017). Çalışmalar sonucunda hazırlanan nanopartiküllere ait ZP değerleri 20 analiz ortalaması alınarak üç tekrarlı şekilde yapılmış ve sonuçlar Tablo 5.14’de sunulmuştur.

Tablo 5.14 Zeta potansiyel değerleri (ORT: Ortalama, SH: Standart hata; SS: Standart sapma; ZP: Zeta potansiyel; n=3)

Zeta Potansiyel (mV)			
Nanopartikül	ORT	SS	SH
NP1	-5.78	3.73	1.08
NP2	-25.82	4.91	1.64
NP3	21.5	11.79	4.81

Polimer tipi ZP üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. PLGA, laktik asit ve glikolik asidin bir kopolimeridir, NFX ise bir kinolin monokarboksilik asittir ve bu nedenle NP3 hariç diğer iki nanopartikül negatif zeta potansiyel değerlerine sahiptir (Gabreel vd., 2022). NP3 katyonik iyonla sahip CTS’yi içermesinden dolayı pozitif değerdedir (Venkatesan ve Kim, 2010). Elden edilen sonuçlara bakıldığında NP2 ve NP3 formülasyonların 30 mV’a yakın değerler alması formülasyonların kararlılıklarının yüksek olacağını göstermektedir (Tablo 5.14).

5.2.3 Enkapsülasyon etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği (%EE), nanoparçacığa başarıyla hapsedilen ilacın yüzde olarak ifadesidir. Enkapsülasyon etkinliği, toplam ilaç miktarından enkapsüle olmamış

miktarın çıkarılıp, toplam ilaç miktarına bölünmesiyle çıkan sonucun yüz ile çarpılması ile eşitlik 5.1’de sunulan şekilde hesaplanmaktadır (Merck, 2023). Hazırlanan formülasyonların etkin madde içerikleri Tablo 5.15’de sunulmuştur.

$$\%EE = \frac{(\text{Toplam etkin madde} - \text{serbest haldeki etkin madde})}{\text{Toplam etkin madde}} \times 100 \quad (5.1)$$

Tablo 5.15. Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarları (Ort ±SE; n=3)

Nanopartikül	%EE
NP1	18,62±0,00
NP2	15,2±0,00
NP3	11,89±0,00

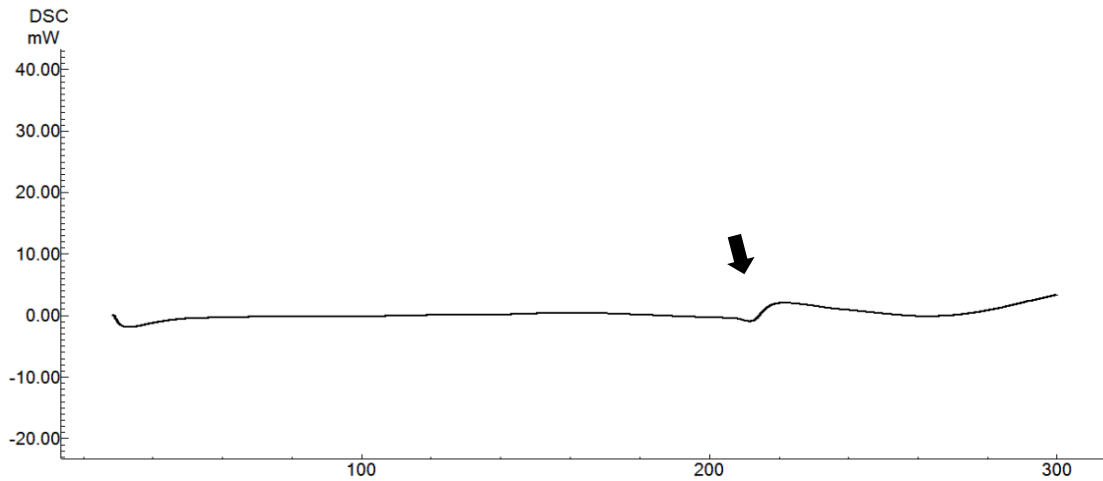
Seçilen polimerler enkapsülasyon etkinliğini etkilemektedir. Nanopartiküllerin %EE verimliliği, %11,89 ile %18,62 arasında değişmektedir ve en yüksek %EE değeri 18,62 ile NP1’e aittir. Nanopartiküllerin %EE değerleri arasındaki sıralama NP1>NP2>NP3 şeklindedir. Sonuçlar daha önce yapılan çalışma değerlerine uygundur (Mandal vd., 2013). Rosca ve arkadaşlarına göre (2004), %EE, çözücünün dışarı atılması sırasında hapsolmuş ilacın drenajından etkilenmektedir. Muhtemelen ilacın polimer zincirleriyle uzun süre çevrelenmesinin yanı sıra çözücünün dışarı atılması sırasında hapsolmuş ilacın yavaş salınması ve/veya drenajı nedeniyle ilaç EE%’si iyileşmektedir. PNP’lerin %EE değerleri, sulu faza düşük bir afiniteye sahip olan ve PLGA ile birlikte organik alanda kalma eğiliminde olan NFX’in lipofilik doğası ile ilişkili olabilir. Poli vinil alkol (PVA) stabilize edici etki üretir ve ilaç sızıntısını azaltarak %EE değerine katkıda bulunur (Dave vd., 2017).

5.2.4 Termal analiz

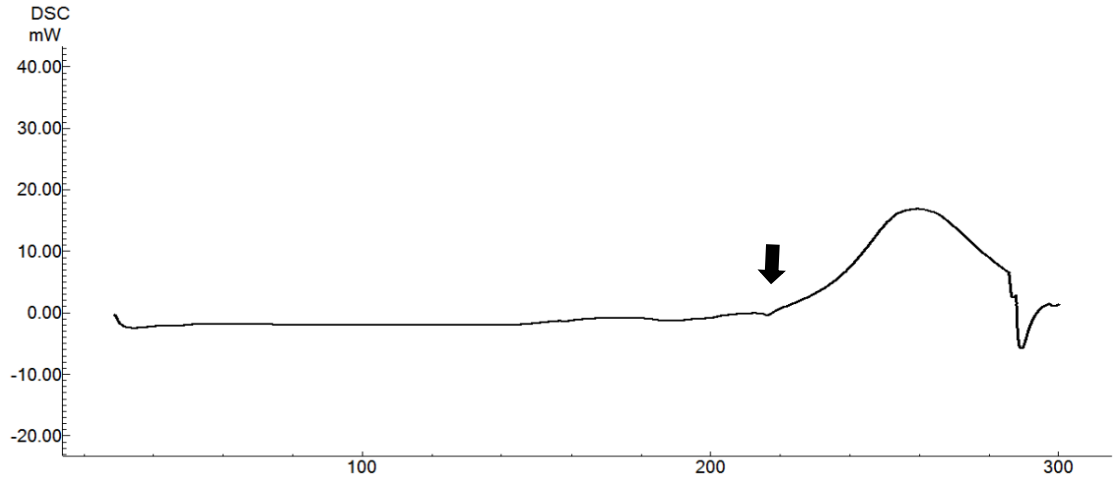
Termal analiz, bir malzemenin özelliklerindeki olası değişikliklerin kontrollü sıcaklık değişimi ile nicelleştirilmesine izin veren hassas kontrollü bir analiz yöntemidir (Lewis ve Gagg, 2010). NFX içeren nanopartiküllerin, DSC analiz cihazı ile 30-300 °C aralığında gerçekleştirilen termal analizlerine ait DSC termogramları Şekil 5.16-5.20’de

sunulmuştur. 30-300°C aralığında yapılan termal analizde erime sıcaklık derecesi 218,79 °C olarak bulunmuştur (Şekil 5.1). Çalışmamızda formülasyonların hazırlanmasında kullanılan tüm maddelerin birarada bulunduğu fiziksel karışımların DSC analizleri yapılarak formülasyonların termal davranışlarını değerlendirmede referans olarak kullanılmıştır. Değerlendirmeler için NP1’de yalnızca PLGA bulunduğu için, NP2 (EPNFX) ve NP3 bileşenlerine (CPNFX) ait fiziksel karışımların termal analizleri gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları sırası Şekil 5.16 ve Şekil 5.17’de sunulmuştur. Fiziksel karışımlarda literatür bilgisinin aksine polimerlerin amorf yapıya sahip oldukları ve buna bağlı olarak polimerlere ait herhangi bir erime pikinin ortaya çıkmadığı görülmüştür. Karışımlarda NFX’e ait küçük erime pikleri gözlenmiş ve polimerler ile herhangi bir geçimsizlik problemi olmadığı ve karışım içinde kristal yapısını koruduğu gözlenmiştir.

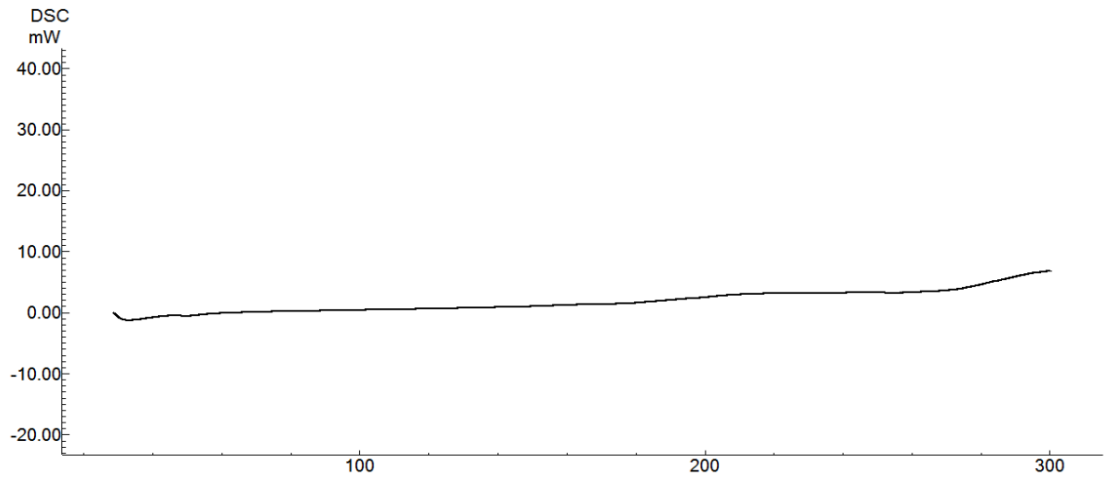
NFX yüklü nanopartikül formülasyonları incelendiğinde ise, NFX’e ait pikin kaybolduğu görülmüştür. NFX’e ait pikin termogramda kaybolması amorf yapı oluştuğunu ve maddenin polimer yapı içinde homojen bir şekilde moleküler olarak dağıldığını göstermektedir (Şekil 5.18-5.20) (Yurtdaş-Kırımlıoğlu ve Öztürk, 2021).



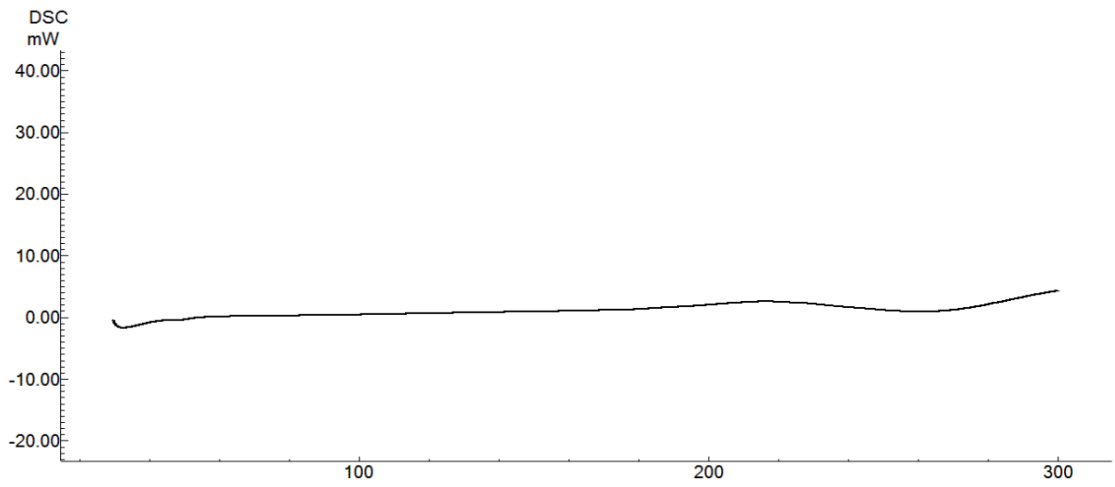
Şekil 5.16. EPNFX’e ait DSC termogramı



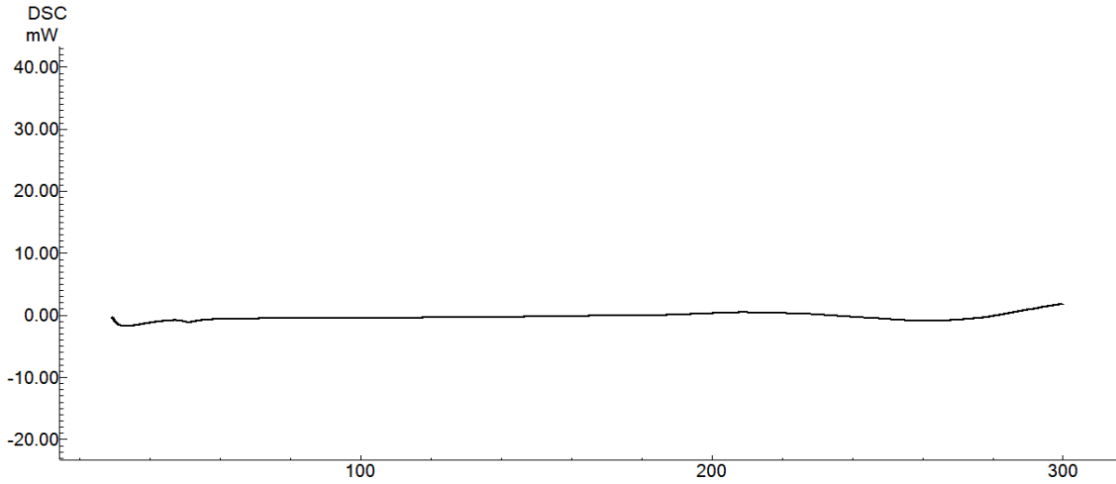
Şekil 5.17. CPNFX'e ait DSC termogramı



Şekil 5.18. NP1'e ait DSC termogramı



Şekil 5.19. NP2'ye ait DSC termogramı



Şekil 5.20. NP3'e ait DSC termogramı

5.2.5 FT-IR analizi

FT-IR spektroskopisi, belirli bir dalga boyu aralığında kızılötesi radyasyonla uyarılan bir molekülün titreşiminin ölçülmesine dayanan fizikokimyasal bir yöntemdir (Ercolini, 2014). Genellikle maddelerin yapısal özelliklerini, kalitelerini, safsızlıklarını ve değişikliklerini belirlemek için kullanılmaktadır (Tranter, 2017).

Tez kapsamında sap polimerler ve hazırlanan NP1, NP2 ve NP3 formülasyonlarına ait FT-IR analiz spektrumları Şekil 5.20-5.25'te sunulmuştur. Şekil 2'de sunulan NFX'in FT-IR spektrumlarında, O-H grubunun gerilme titreşimine ve moleküller arası hidrojen bağına tek bir köprü ile atanan $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ arasında belirgin bir karakteristik tepe noktası bulunmuştur. $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ 'lik bir bant, piperazinil gruplarının imino kısmının NH gerilme titreşimine aittir. $2750-2700\text{ cm}^{-1}$ 'deki tepe, etil grubunun varlığını göstermiştir. 2500 cm^{-1} 'de gözlenen bant karboksilik asitin O-H grubuna aittir. 700 cm^{-1} 'deki tepe, karbonil C=O gerilmesini temsil etmektedir. $1650-1600\text{ cm}^{-1}$ 'deki bant, kinolonların N-H bükülme titreşimidir. $1500-1450\text{ cm}^{-1}$ 'deki tepeler asitlerin O-C-O bağlarını göstermekte ve $1300-1250\text{ cm}^{-1}$, karboksilik asidin varlığını gösteren O-H grubunun bükülme titreşimine aittir. Ek olarak, C-F grubuna $1050\text{ ila }1000\text{ cm}^{-1}$ arasında güçlü bir absorpsiyon bandı bulunmaktadır. $950-900\text{ cm}^{-1}$ 'deki tepe, aminlerin N-H bükülme titreşimi ve 800 cm^{-1} 'deki bant, aromatik protonların dağılımından kaynaklanmaktadır (Şekil 5.2) (Saho vd., 2012).

PLGA spektrumunda, C-O-C gerilmesinin zirvesi 1088 cm^{-1} 'de, Metil gruplarında C-H gerilmesi 1460 cm^{-1} 'de, C = O'da 1750 cm^{-1} 'de, CH, CH₂ ve CH₃

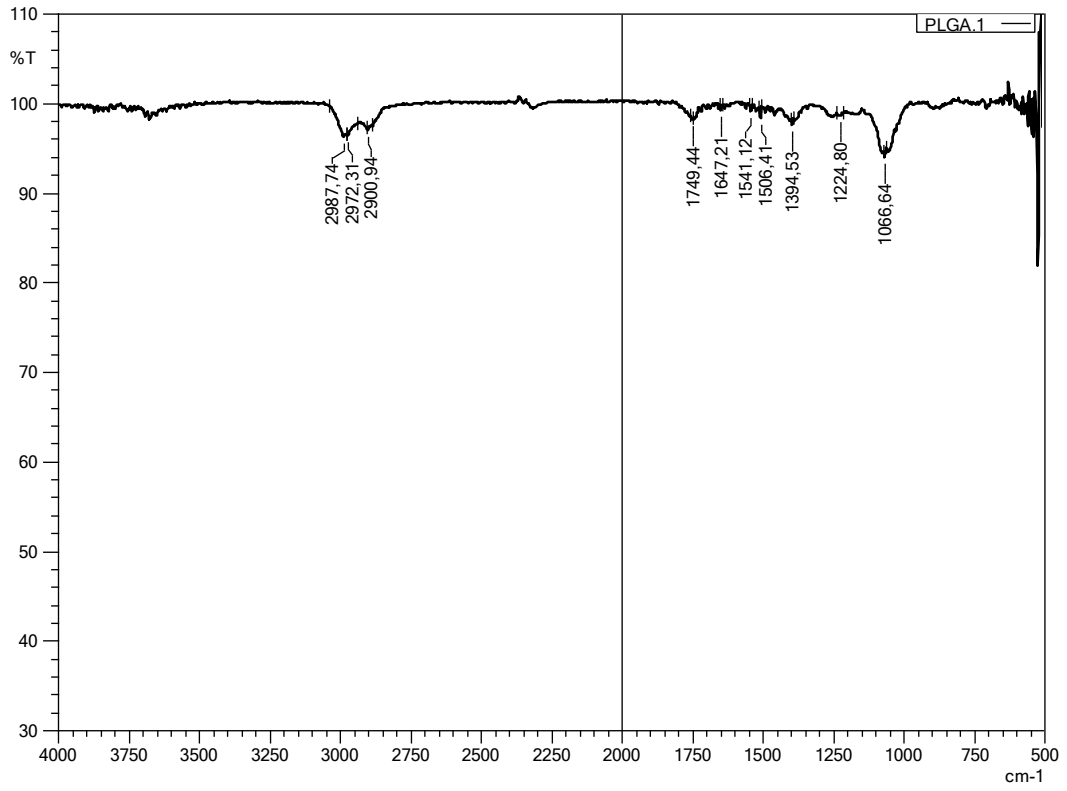
esneme titreşimlerinde 2850 ile 3000 cm^{-1} arasında ve OH gerilmesi yaklaşık 3500 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Şekil 5.21) (Wang vd., 2013). EU'ya ait FT-IR analizleri ise, 3100 ve 2850 cm^{-1} O-H gerilme bantlarına aittir. 1850 ile 1650 cm^{-1} arasındaki tepe noktası C=O gerilmesi sebebinden dolayı oluşmaktadır. 3100 ile 2850 cm^{-1} aralığındaki tepe, O-H gerdirme bantları ile alakalı, 1850 ile 1650 cm^{-1} aralığındaki tepe, C=O gerdirme titreşim gruplarından kaynaklanmaktadır ve 1350 ile 900 cm^{-1} aralığındaki tepe, C-O gerdirme titreşim bandına aittir (Şekil 5.22) (Li ve Yu, 1999). CTS'nin FT-IR analizinde ise 1654 ve 1597 cm^{-1} 'deki yoğun tepe noktaları, kitosanın kimyasal yapısında amid I ve amid II'nin varlığını doğrulamaktadır. C-H gerilmesinin zirvesi 2900 cm^{-1} ve C-H bükülmesi 1360–1440 cm^{-1} 'dir. Kitosanın 3500 cm^{-1} 'deki zirvesi, O-H esnemesiyle örtüşen N-H esnemesine karşılık gelmektedir (Şekil 5.23) (Wang vd., 2013).

Formülasyonlara ait spektrumlar değerlendirildiklerinde saf maddelerden çok da farklı değerler oluşturmadıkları, karakteristik sinyallerin şiddetlerinde miktara bağlı olarak azalma olsa da yine karakteristik aralıkta sinyal oluşturdıkları görülmüştür (Şekil 5.24-5.26).

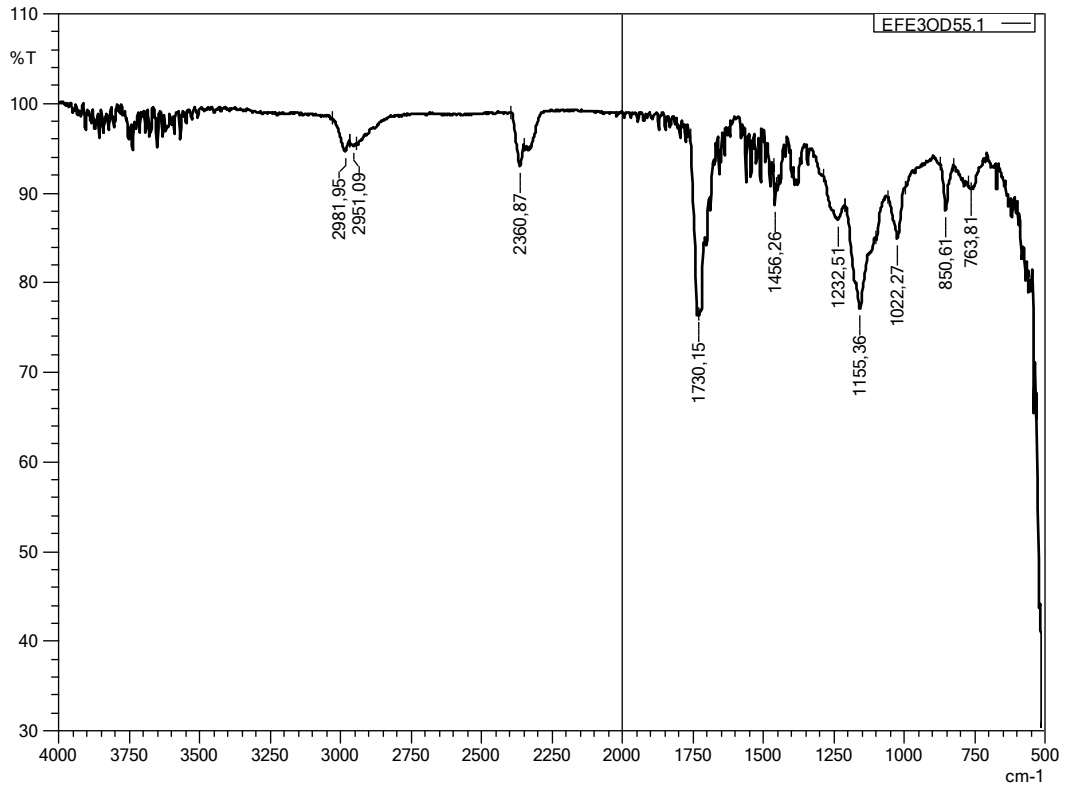
5.2.6 ^1H -NMR analizi

NFX yüklü polimerik nanopartiküllerde oluşabilecek moleküler düzeydeki etkileşimleri belirleyebilmek amacıyla ^1H -NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. NFX spektrumunda NFX metil grubu CH_3 protonları 1.18 ppm'de ve CH_2 protonları 1.31 ppm'de, NFX aromatik protonları 7.54 ila 8.64 ppm arasında ve asit grubu O-H protonu 15.20 ppm'de saptanmıştır (Şekil 5.3) (Dhevaraj vd., 2019). Saf polimerler ile NP1, NP2 ve NP3 formülasyonlarına ait ^1H -NMR spektrumları Şekil 5.27-5.32'da sunulmuştur.

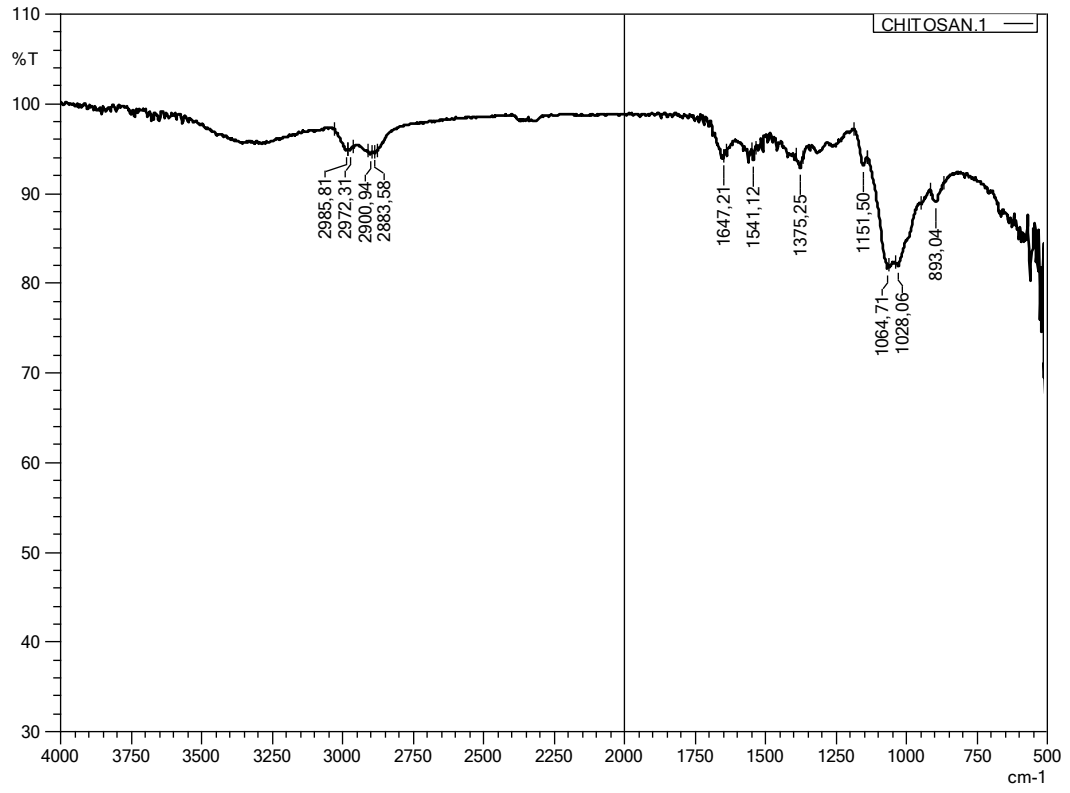
Etkin madde ile polimerler arasında herhangi bir kimyasal etkileşim gözlenmezken, PLGA'nın ^1H -NMR analizinde 1.8 ppm'de C-H grubu sinyal vermektedir. 1.6 ppm'de ise laktik asitte bulunan CH_3 bulunur. 5.2 ve 4.8 ppm'de görülen sinyaller glikolik asitte bulunan CH- CH_3 ve CH-H gruplarıdır (Zuhour vd., 2023). Kitosan ise Glukozamin'de bulunan 2 ppm'de CH_3 pikini ve 3.2 ppm'de H_2 pikini vermektedir. Yaklaşık 3.9 ppm'de H_3 - H_6 piklerine ve 4.9 ppm'de H_1 pikine denk gelmektedir (Pereira vd., 2015).



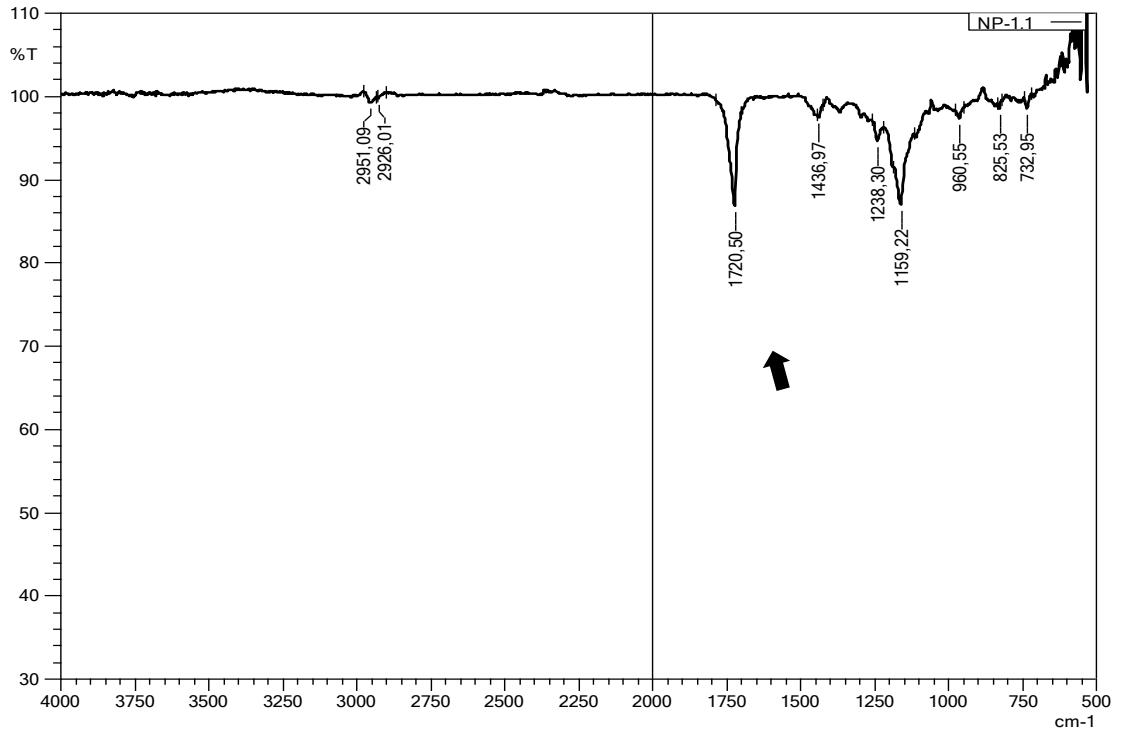
Şekil 5.21. PLGA'ya ait FT-IR analiz spektrumu



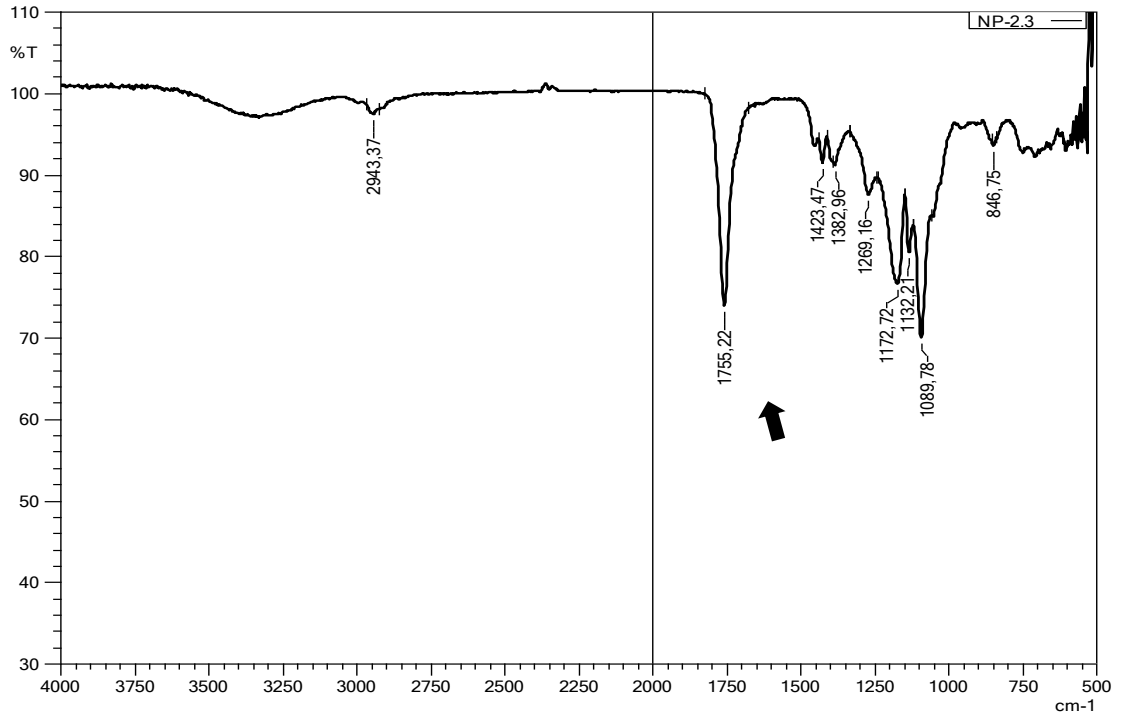
Şekil 5.22. Eudragit L-30 D-55'e ait FT-IR analiz spektrumu



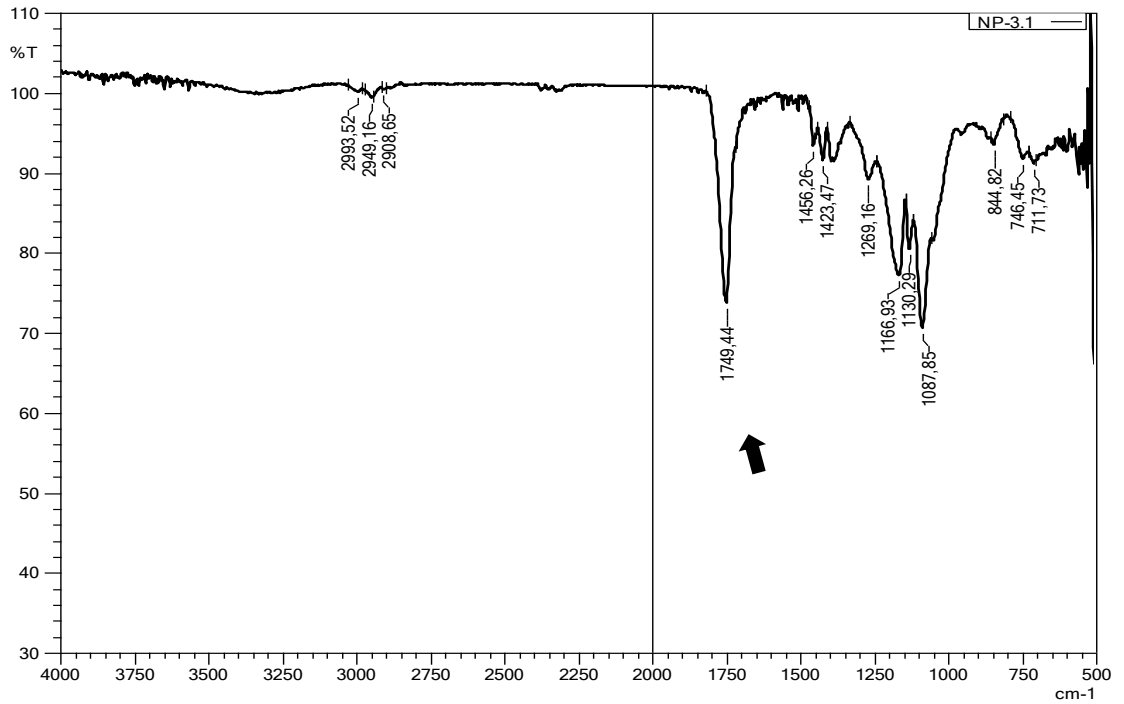
Şekil 5.23. Kitosan'a ait FT-IR analiz spektrumu



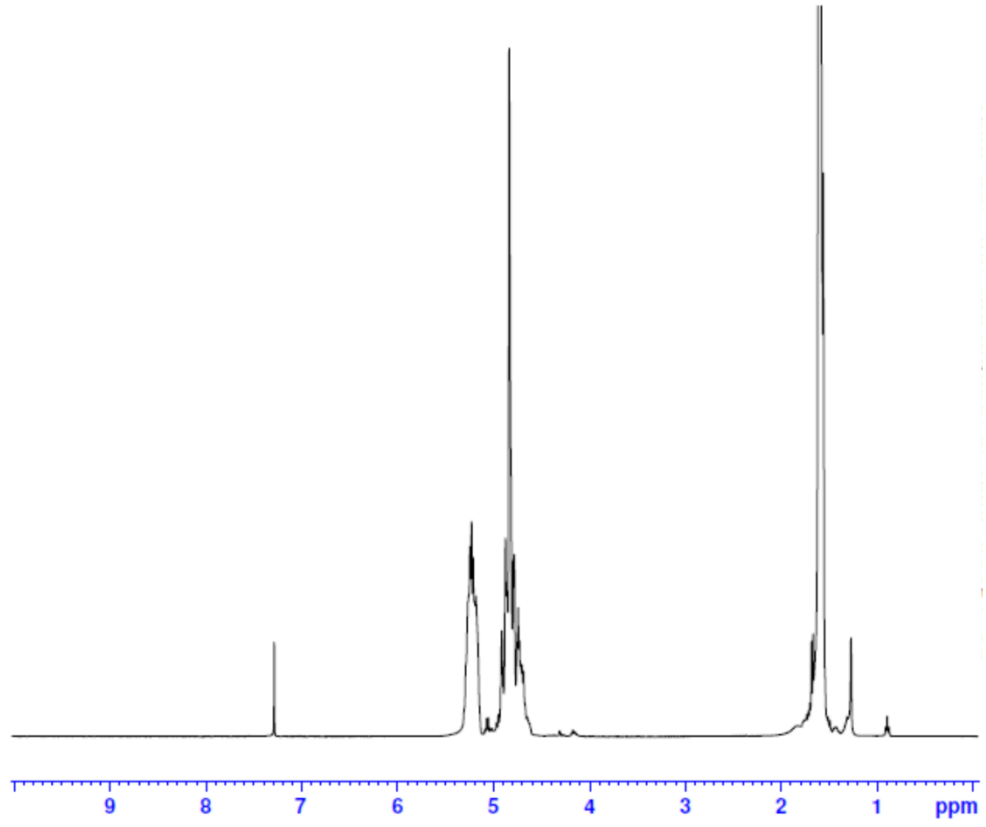
Şekil 5.24. NP1'e ait FT-IR analiz spektrumu



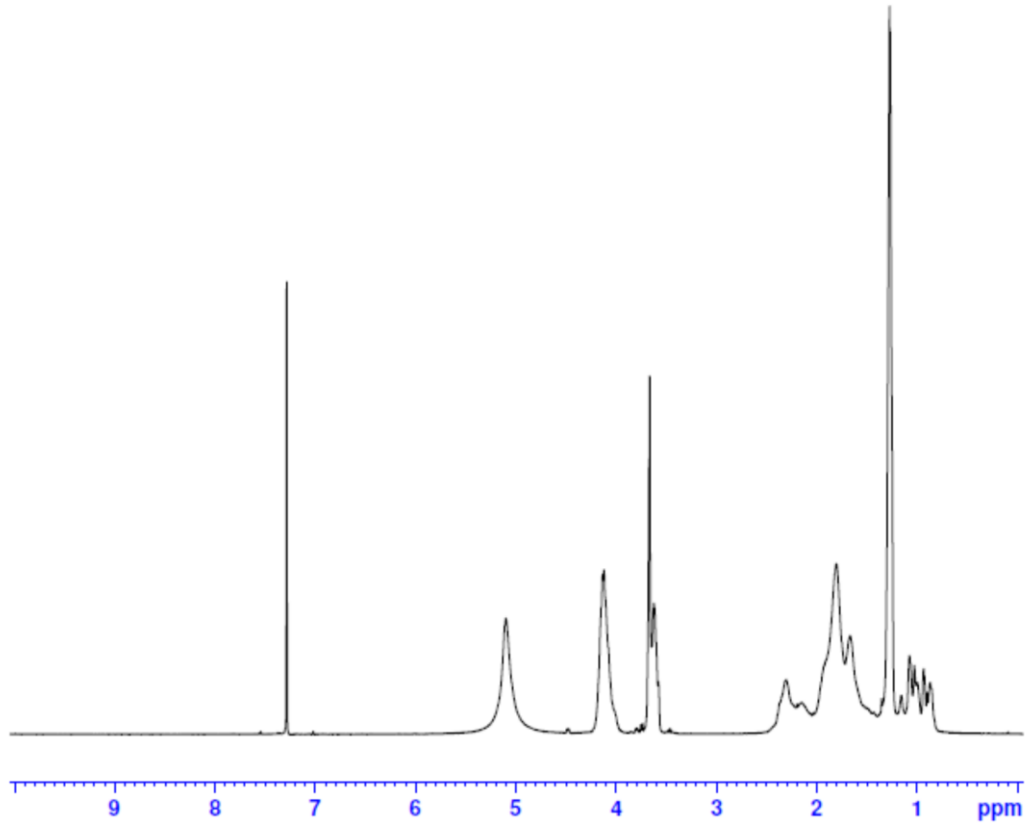
Şekil 5.25. NP2'ye ait FT-IR analiz spektrumu



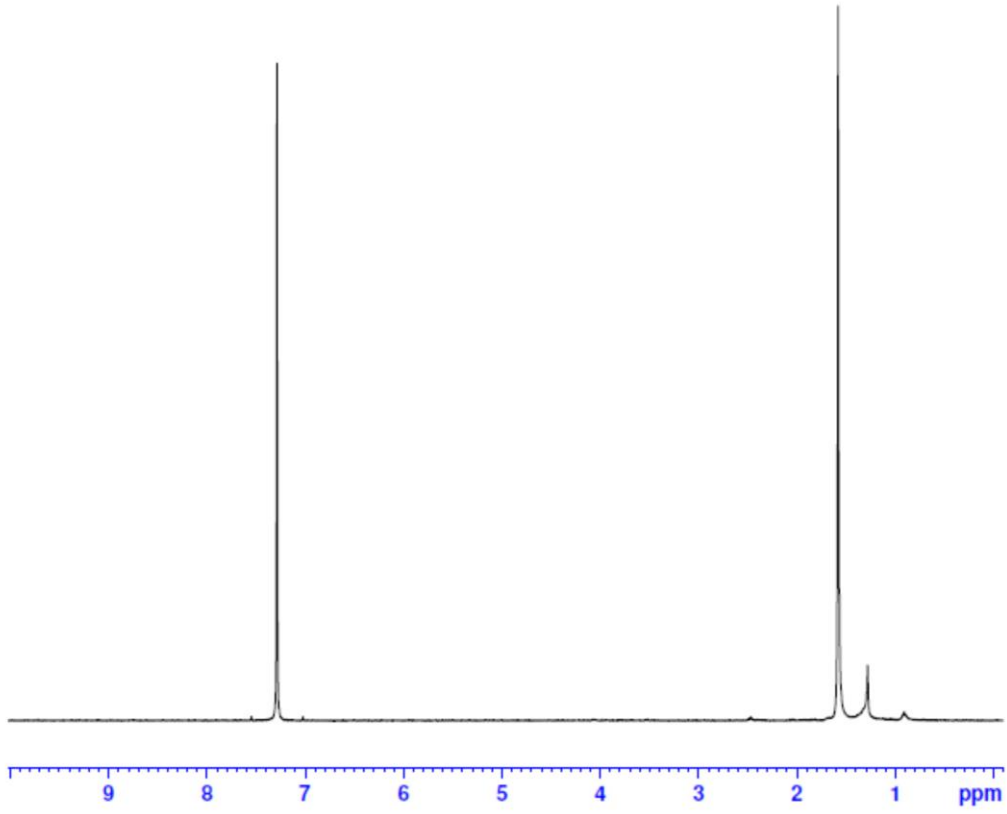
Şekil 5.26. NP3'e ait FT-IR analiz spektrumu



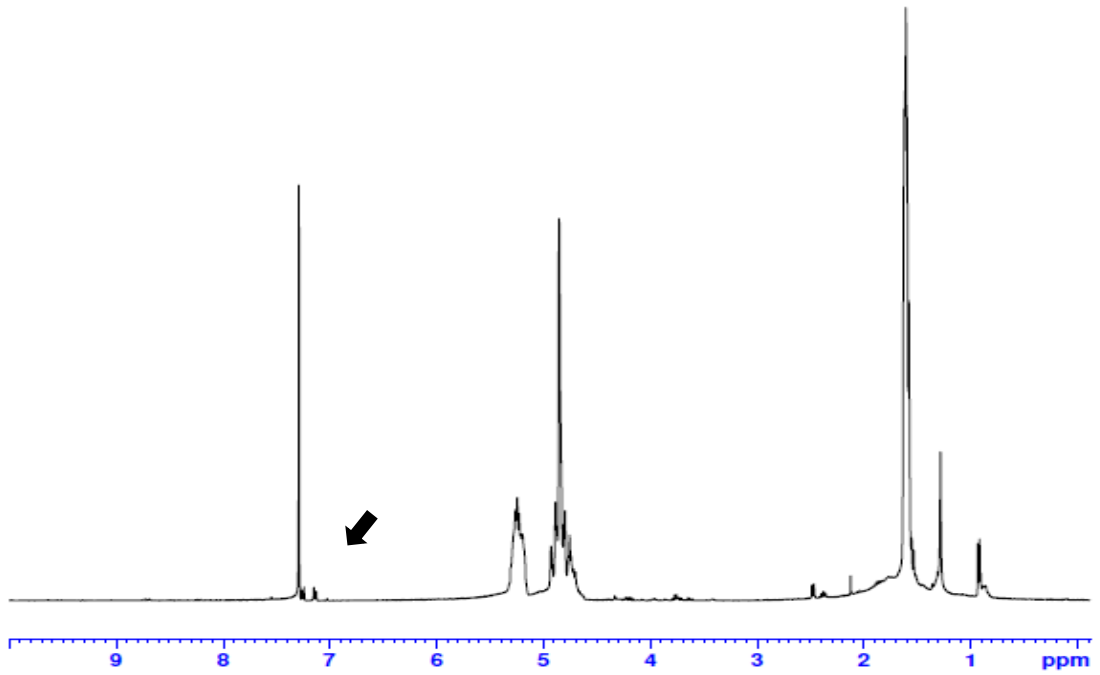
Şekil 5.27. PLGA'ya ait ¹H-NMR analiz spektrumu



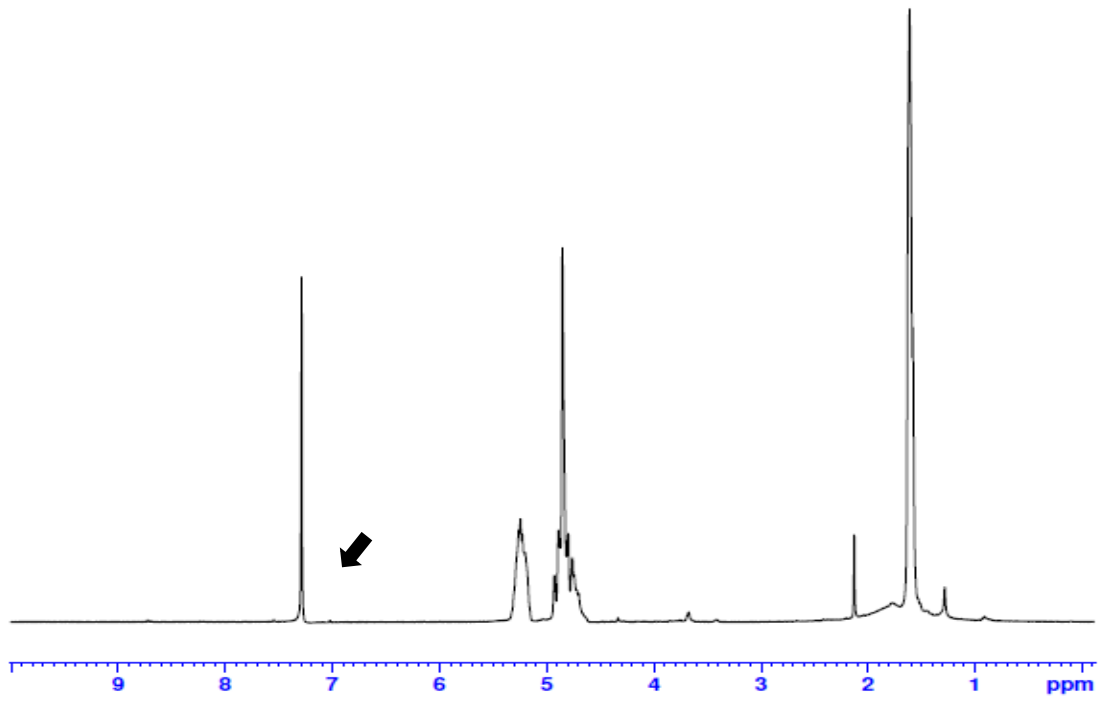
Şekil 5.28. Eudragit L 30 D 55'e ait ¹H-NMR analiz spektrumu



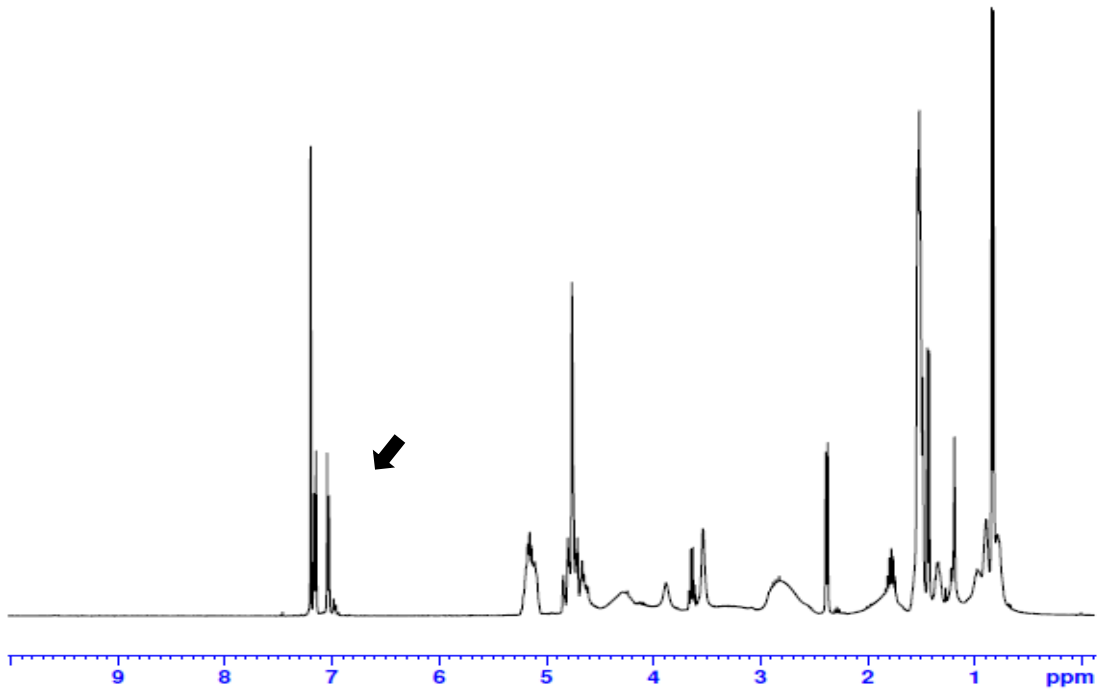
Şekil 5.29. Kitosan'a ait ^1H -NMR analiz spektrumu



Şekil 5.30. NPI'e ait ^1H -NMR analiz spektrumu



Şekil 5.31. NP2'ye ait ^1H -NMR analiz spektrumu

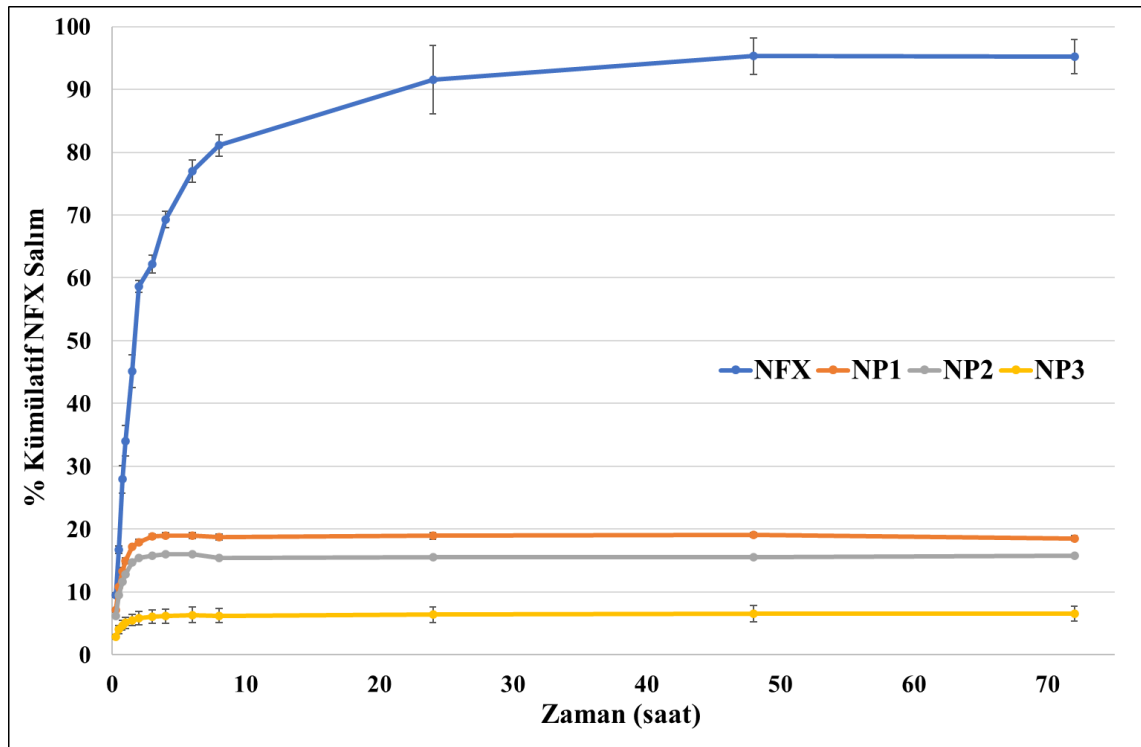


Şekil 5.32. NP3'e ait ^1H -NMR analiz spektrumu

5.3 *In vitro* Salım Çalışmaları

NFX'in hazırlanan polimerik nanopartiküllerden salım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlacın *in vivo* davranışını ve etkin maddenin biyodağılımını tahmin etmek için *in vitro* salım çalışmaları kullanılmaktadır (Balzus vd., 2016). *In vitro* çözünme/salım testleri, ürün geliştirme aşamasında, kalite kontrolünde ve onay işlemleri sürecinde önemli bir araçtır (Jug vd., 2018).

Tez kapsamında *in vitro* salım çalışmaları $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 200 rpm karıştırma hızında diyaliz membran kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen salım profilleri Şekil 5.33'de sunulmuştur.



Şekil 5.33. Hazırlanan nanopartiküllere yüklenen NFX'in *in vitro* salım çalışmaları

Profiller incelendiğinde salım çalışmasının başlangıç zamanlarında nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan NFX açığa çıkmış fakat daha sonrasında etkin maddenin sudaki düşük çözünürlüğüne bağlı olarak 72 saatlik salım çalışması sonunda dahi ancak en yüksek ~%20 konsantrasyona ulaşabilmiştir.

Saf etkin madde difüzyon membranından geçişte zorlanmadan 24 saat sonunda ~ % 90 oranında salınırken diğer tüm sistemlerde salınan etkin madde miktarı 72 saatlik süre zarfında kayda değer bir artış göstermemiştir (Şekil 5.33).

İlk hızlı ilaç salımı, antibakteriyel aktivite açısından minimum etkili ilaç konsantrasyonuna hızlı bir şekilde ulaşmak için istenen bir özelliktir. Düşük çözünürlüğe bağlı olarak NFX için uzatılmış bir ilaç salım aşamasına ulaşıldı. Her ne kadar düşük etkin madde konsantrasyonu elde edilse de etkili bir tedavi için uzatılmış salıma ihtiyaç duyulmaktadır (Gebreel ve vd., 2021).

5.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

5.4.1 WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

NP1 örneğinin BJ sağlıklı insan fibroblast hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değeri 305.55 µg/mL bulunmuş olup diğer örnekler sitotoksik olarak bulunmamıştır ve tümünün IC₅₀ değeri 500 µg/mL olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre sentezlenen örneklerin, sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki yapmaması sebebiyle güvenli olduğu saptanmıştır. Literatürde, NFX ile yapılmış sağlıklı fibroblast hücre hattı olan BJ hücreleri üzerinde yapılan benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.4.2 Antifungal Aktivite Çalışmaları

Çalışmamızda Mikrobroth dilüsyon yöntemi ile antifungal aktivite testi *Candida* türleri kullanılarak Anneksin V-PI yöntemi ile de kandida apoptos miktar belirlenmiştir. Mikrobroth dilüsyonu, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu (MIC) belirlemek için bir dizi ikiye katlanan seyreltme antibiyotik konsantrasyonlarına sahip, sıvı besiyeri dolu mikrotitre kuyucukları kullanır. Genellikle 96 kuyucuklu bir formatta gerçekleştirilir ve aynı anda 12-15'e kadar antibiyotiğin test edilmesine olanak tanır. Testler manuel olarak veya özel makineler kullanılarak otomatik bir şekilde okunabilmektedir (Mahon vd., 2011).

Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonların antikandida aktivitesi 0-800 µg/ml. (800, 400, 200, 100, 50, 25 µg/ml) değerleri arasındaki konsantrasyonlar ile test edilmiştir. Örnekler metanolde çözündürüldükte sonra antikandida aktivitesi

değerlendirilmiş ve MIC değerleri belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2004). Kandidalara karşı üremeyi durduran en küçük konsantrasyon nanopartiküllerin MIC değeri olarak kabul edilmiştir (Kavitha vd., 2010). Çalışmada *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258) ve *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) mikroorganizmaları kullanılmıştır. Mikroorganizma sayısı maya kültürleri için ise Sabouraud-Dextrose Broth (SDB) içerisinde Mc Farland 0.5 (108 KOB/mL) standartına göre ayarlanmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda; nanopartiküllerin seri konsantrasyonlarının bulunduğu kuyucukların üzerine 100 µL mikroorganizma inoküle edilmiştir. Plakalar 24 saat, 37°C sıcaklıkta inkübasyona 32 bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklara 20 µL MTT boyası eklenerek 4 saat daha inkübe edilmişlerdir. Bu deneyde pozitif kontrol grubu olarak NFX, negatif kontrol grubu olarak ise SDB besiyeri ayrıca mikroorganizmalar için de büyüme kontrol grupları 96'lık plakaya aktarılmıştır.

Tablo 5.16 Antikandidal aktivite analiz sonuçları

Kod	MİK DEĞERLERİ (µg/mL)				IC ₅₀ (µg/mL)
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i>	BJ Hücre hattı
NPL	800	800	800	800	>500
NP1	25	50	100	100	305.55
NP2	50	100	100	100	>500
NP3	100	200	200	200	>500
NFXEU	200	200	400	400	>500
NFXCTS	200	200	400	400	>500
NFX	200	200	200	200	>500
CTS	200	200	400	400	>500
EU	400	400	400	400	>500

NPL yalnızca PLGA'dan oluşmaktadır. Bu nedenle herhangi bir etki gözlenmemiştir. Düşük konsantrasyonda en iyi etkiyi gösteren 25 µg/mL ile NP1 formülasyonu olmuştur. Kitosan antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.parapsilosis* üzerinde çalışılmış olup, *Candida* çeşitleri incelendiğinde en iyi etkinin *C. Albicans* üzerinde olduğu gözlenmiştir.

C.albicans üzerinde etki sıralaması sırasıyla NP1 (25), NP2 (50), NP3 (100) olup, NFXEU, NFXCTS, NFX ve CTS (200) aynı etki değerini göstermiş ve EU (400)

diğerlerine göre daha düşük etki sonucu vermiştir. *C.glabrata*'ya ait etki sıralaması ise NP1 (50), NP2 (100) ve aynı etki değerine sahip NP3, NFXEU, NFXCTS, NFX, CTS (200) ve en son olarak EU (400)'ya aittir. *C.krusei* etki değerleri ise, NP1 ve NP2 (100) eşit olup, aynı etki değerindeki NP3 ve NFX'ten (200) büyüktür. En düşük etki değerleri ise NFXEU, NFXCTS, CTS ve EU'dur (400). *C. Parapsilosis* etki değerleri kıyaslandığında ise NP1 ve NP2'den (100) sonra NP3 ve NFX (200) ve son olarak NFXEU, NFXCTS, CTS ve EU (400) gelmektedir.

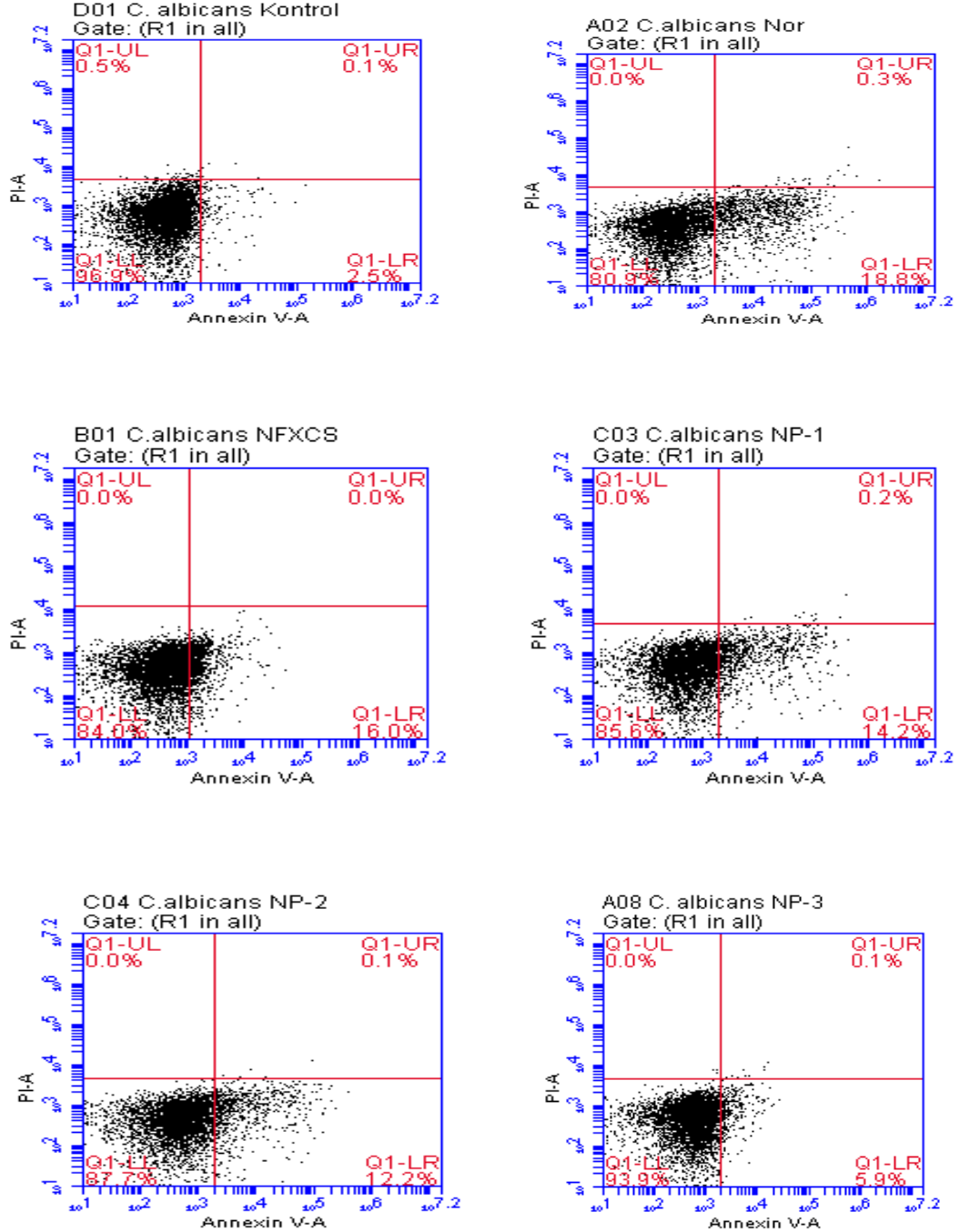
NP1, NP2 ve NP3 antikandidal etki değerlerine bakıldığında sırasıyla *C.albicans* *C.glabrata* gelmekte olup *C.krusei* ve *C.parapsilosis* arasında anlamlı bir fark bulunmadığı anlaşılmaktadır.

Grüger ve vd. (2008), *C.albicans* ve florokinonlar ile mikro dilüsyon yöntemi kullanarak *C.albicans*'a antikandidal aktivite testi yapmışlar ve MIK değerini 1500 µg/mL bulmuşlardır. Moneib'in (1995) yaptığı çalışmada ise, NFX'in *C.albicans* antikandidal aktivitesi için MIK değerinin 100 µg/mL olduğu gösterilmiştir. Zhang (2019), yaptığı çalışmada *C. albicans* antifungal aktivite testi için NFX-Siprofloksasin-Nalidiksik asit hibritlerini kullanmış ve MIK değerlerini 250, 500, 125 ve 250 µg/mL olarak bulmuştur. NFX-Siprofloksasin-Benzimidazol hibridinin 50 µg/mL'de *C.albicans*'a karşı inaktif olduğunu göstermiştir. Guri ve vd. (2014), yaptıkları deneylerde NFX'in *C.albicans*'a karşı inaktif mikrobiyolojik etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmalara göre NP1'in MIK değeri 25 µg/mL olarak bulunmuştur. Deneyimizde yaptığımız nanopartiküllerin diğer deneylerde çalışılan partiküllere göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Literatür taramasında *C.glabrata*, *C. krusei* ve *C.parapsilosis*'in NFX ile birlikte kullanıldığı bir çalışma bulunamamıştır.

5.4.3 Anneksin V-PI yöntemi ile kandidal apoptozisin belirlenmesi

Apoptoz test sonuçlarına göre en iyi etki %18.8 ile NFX'e aittir. Buna en yakın değer %16.0 ile NFXCTS ve %14.2 ile NP1'e aittir. Nanopartikül etki sıralamaları ise NP1, NP2 ve NP3 olduğu gözlenmektedir. Canlı hücre sayıları sırasıyla NP3 (%93.9), NP2 (%87.7), NFXEU (%87.2), NP1(85.6), NFXCTS(84.0) ve NFX (%80.9) olduğu gözlenmektedir. Hücreler sadece NFXEU (%8)'da nekroza uğramıştır. Erken apoptoza değerleri sırasıyla NFX(%18.8), NFXCTS (%16.0), NP1 (%14.2), NFXEU (%12.8), NP2

(%12.2), NP3 (%5.9)'tür. Geç apoptoz ise sırasıyla %0.3 ile NFX, %0.2 ile NP1 ve %0.1 ile NP2, NP3'tür. Hücreler NFXEU ve NFXCTS ile geç apoptoza uğramamıştır (Şekil 5.34).



Şekil 5.34 Mikrobrot dilüsyon yöntemi ile antikandida aktivite testi analiz sonuçları

Tablo 5.17 *Kandidal apoptoz analiz sonuçları*

	Canlı %	Nekrotik %	Erken Apoptotik %	Geç Apoptotik %
Kontrol	96.9	0.5	2.5	0.1
NP-1	85.6	0	14.2	0.2
NP-2	87.7	0	12.2	0.1
NP-3	93.9	0	5.9	0.1
NFXEU	87.2	8	12.8	0
NFXCTS	84.0	0	16.0	0
NFX	80.9	0	18.8	0.3

Literatür taramasında *C.albicans*'ın NFX ile yapılan antikandida apoptoz çalışması bulunmamaktadır. Sadece iki farklı örnekte farklı etken maddelerin Annexin V-PI yöntemi kullanılarak yapılan deneyler bulunmaktadır. Hao ve vd. (2013)'nın yaptığı çalışmada NFX ile aynı etki mekanizmasına sahip Kaspofungin'in *C.albicans* üzerinde Annexin V-PI testi uygulanmış ve 0.06, 0.125 ve 0.5 µg/mL'de Kaspofungin, 3 saat sonra hücrelerin % 20-25'inde erken apoptoza neden olduğu, üç konsantrasyonda da erken apoptotik hücrelerin yüzdeleri arasında önemli farklılıklar bulunmadığı gözlenmiş ve geç apoptotik/nekrotik hücrelerin yüzdeleri, üç kaspofungin konsantrasyonunda da % 5-7 arasında olduğu anlaşılmıştır. Yaptığımız çalışmada, NP1'e ait erken apoptoza uğrayan hücre yüzdesi %14.2, geç apoptoza uğrayan hücre yüzdesi ise % 0.2 olarak bulunmuştur (Şekil 5.34). Buna göre Kaspofungin ile yapılan çalışmanın NFX'ten daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Zore ve vd. (2022), NFX ile aynı etki mekanizmasına sahip Mentol'ün *C.albicans* antikandida apoptoz testi için Annexin V/PI yöntemi uygulamış, 0.5 ve 1 mM mentolün, sırasıyla % 11.1 ve % 15.2 *C. albicans* hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir. NP1 ile yapılan antikandida aktivite çalışmasının, 0.5 mM Mentol antikandida apoptoz sonucunun daha etkin olduğu fakat 1 mM Mentol'e göre de daha düşük aktivite gösterdiği anlaşılmıştır.

6. SONUÇ

Tez çalışmamızda, etkin maddenin göze hedeflenerek salım süresinin uzatılması, hasta uyuncunun artırılması ve hasta konforunun artırılması amaçlanmış ve bu amaçları gerçekleştirebilecek formülasyonlar başarıyla hazırlanmıştır. NFX, formülasyon basamaklarında etkilenmeyerek kararlılığını korumuştur. Elde edilen %EE sonuçları nanopartikül yüklenme kapasiteleri dikkate alındığında hedeflenen oranda etkin maddenin yüklenebildiği görülmektedir. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller, istenen partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve iyi salım profili göstermiştir.

Antifungal aktivite çalışmaları, NFX'nin en iyi antifungal aktiviteyi *C.albicans* üzerine gösterdiği, ikinci büyük etkinliğin ise *C.glabrata*'da sağlandığı ve kalan iki suşta da anlamlı bir fark gözlenmediği anlaşılmıştır. Hiçbir formülasyon nekroza sebep olmayıp, tüm fungal hücreler erken apoptoza uğramıştır.

Çalışma sonuçlarına bağlı olarak oküler uygulamaya uygun, özellikle *C.albicans*'a bağlı olarak gerçekleşebilecek enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek etkin formülasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan partiküler sistemlerin gerçek potansiyellerini belirlemek amacıyla in vivo çalışmalar tez çalışmalarının devamı olarak planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdel-Mottaleb , M., Mortada , N., Elshamy, A., & Awad, G. (2007). Preparation and evaluation of fluconazole gels. *Egypt. J. Biomed. Sci.*, 23(1), 266 - 286.
- Achouri, D., Alhanout, K., Piccerelle, P., & Andrieu, V. (2012). Recent Advances in Ocular Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1–19.
- Addo, E., Bamiro, O. A., & Siwale, R. (2016). *Anatomy of the Eye and Common Diseases Affecting the Eye. Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications* (s. 11–25) Jackson, TN: Springer.
- AG, E. I. (2012, 05 01). EUDRAGIT® L 30 D-55. (Evonik Industries AG) 08 05, 2023 tarihinde https://www.stobec.com/DATA/PRODUIT/1598~v~data_8595.pdf adresinden alındı
- Agarwal , R., Iezhitsa , I., Agarwal , P., Nasir, N. A., Razali , N., Alyautdin, R., & Ismail , N. M. (2016). Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Deliv.*, 23(4), 1075–1091.
- Ahmed, S., Amin, M. M., & Sayed, S. (2023). Ocular drug delivery: a comprehensive review. *AAPS PharmSciTech*, 24(2), 66.
- Ahn, J.H. (2017). Intracorneal melatonin delivery using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin ophthalmic solution for granular corneal dystrophy type 2. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1-2), 608-616.
- Akhter, M. H., Ahmad, I., Alshahrani, M. Y., Al-Harbi, A. I., Khalilullah, H., Afzal, O., ... & Karim, S. (2022). Drug delivery challenges and current progress in nanocarrier-based ocular therapeutic system. *Gels*, 8(2), 82.
- Alany, R. G., Rades , T., Nicoll, J., & et al. (2006). W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *J. Control. Rel.* , 111(1-2), 145–152.
- Ali, Y., & Lehmussaari, K. (2006). Industrial perspective in ocular drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 58(11), 1258-1268.
- Almeida, H., Amaral, M. H., Loba~o, P., & Sousa Lobo, J. (2013). In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discovery Today*, 1-13.

- Almeida, H., Amaral, M. H., Lobão, P., Silva, A. C., & Lobo, J. M. (2014). Applications of polymeric and lipid nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: Present and future considerations. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 17, 278–293.
- Almeida, H., Amaral, M., Lobão, P., & Sousa Lobo, J. (2013). Applications of poloxamers in ophthalmic pharmaceutical formulations: an overview. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 1223-1237 .
- Almeida, H., Lobão, P., Frigerio, C., Fonseca, J., Silva, R., Palmeira-de-Oliveira, A., . . . Helena Amaral, M. (2016). New Thermoresponsive Eyedrop Formulation Containing Ibuprofen Loaded-Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Development, Characterization and Biocompatibility Studies. *Current Drug Delivery*, 13(18), 953-970.
- Al-mahallawi, A., Abdelbary, A., & Aburahma, M. (2015). Investigating the potential of employing bilosomes as a novel vesicular carrier for transdermal delivery of tenoxicam. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1-2), 329-340.
- Al-Mustafa , J. (2002). Magnesium, calcium and barium perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin. *Acta Chim Slov.* , 49, 457-466.
- Al-Mustafa , Z., & Al-Ghamdi , M. (2000). Use of norfloxacin in poultry production in the eastern province of Saudi Arabia and its possible impact on public health. *International Journal of Environmental Health Research*, 10(4), 291 - 299.
- Ambati, J., & Adamis, A. P. (2002). Transscleral Drug Delivery to the Retina and Choroid. *Progress in Retinal and Eye Research*, 21(2), 145-151.
- Ameeduzzafar, J., Mohd Fazil, M., Nazia , K., & Asgar , A. (2016). Colloidal drug delivery system: amplify the ocular delivery. *Drug Delivery*, 23(3), 700-716.
- Amo, E.M. (2022). Topical ophthalmic administration: Can a drug instilled onto the ocular surface exert an effect at the back of the eye? *Front. Drug Deliv.*, 1-16.
- Ari, F., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., & Yilmaz, V. (2013). Palladium (II) saccharinate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorg Med Chem*, 1(21), 3016-3021.
- Aronson, J. (2016). Norfloxacin. *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)* (s. 274-275). içinde Elsevier.
- Arredondo, G., Figueroa , D., & Rosas , A. (2004). Comparison of short-term treatment regimen of ciprofloxacin versus long term treatment regimens of trimethoprim/sulfamethoxazole or norfloxacin for uncomplicated lower urinary tract

- infections: a randomized, multicentre, open-label, prospective study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 4(54), 840–843.
- Ashok Kumar Bera, , A. (2014). Validated and Precise Reverse Phase-HPLC Method for the Quantitative Estimation of Norfloxacin from Marketed Formulation. *International Journal of PharmTech Research*, 6(4), 1189-1194.
- Atchison, D. A. (2023). *Optics of Human Eye*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Badawy, A., Luxton, T., Silva, R., Scheckel, K., Suidan, M., & Tolaymat, T. (2010). Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environmental Science & Technology*, 44, 1260-1266.
- Baeyens, V., Percicot, C., Zignani, M., Deshpande, A., Kaltsatos, V., & Gurny, R. (1997). Ocular drug delivery in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(3), 335-361.
- Balnois, E., Papastavrou, G., & Wilkinson, K. (2007). Force microscopy and force measurements of environmental colloids. 10, 405 - 467.
- Balzus, B., Colombo, M., Sahle, F. F., Zoubari, G., Staufenbiel, S., & Bodmeier, R. (2016). Comparison of Different In Vitro Release Methods Used To Investigate Nanocarriers Intended for Dermal Application. *International Journal of Pharmaceutics*, 513((1–2)), 247–254.
- Banik, B., Fattahi, P., & Brown, J. (2016). Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. *Nanobiotechnol.*, 8, 271-299.
- Baranowski, P., Karolewicz, B., Gajda, M., & Pluta, J. (2014). Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Barar , J., Asadi, M., Mortazavi, T. S., Et al., & et al. (2009). Ocular drug delivery; Impact of in vitro cell culture models. *J. Ophthalmic Vis. Res.*, 4(4), 238–252.
- Başaran, E., & Yazan, Y. (2012). Ocular Application of Chitosan. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 701-712.
- Bera, A. K., De, A. K., & Pal, B. (2014). Validated and Precise Reverse Phase-HPLC Method for the Quantitative Estimation of Norfloxacin from Marketed Formulation. *International Journal of PharmTech Research*, 6(4), 1189-1194.
- Berchane, N., Carson, K., & RICE-FICHT, A. C. (2007). Effect of mearl diameter and polydispersity of PLGA microspphere on dmg release: Experiment and theory. *Inte Onal Journal of Pharmaeetics*, 337, 1-18.

- Bertino , J. J., & Fish, D. (2000). The Safety Profile of the Fluoroquinolones. *Clinical Therapeutics*, 22(7), 798-817.
- Bhaskaran, S., Lakshmi, P. K., & Harish, C. G. (2005). Topical ocular drug delivery:- A review. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 67(4), 404-408.
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 83-99.
- Biju, S. S., Talegaonkar, S., Mishra, P. R., & Khar, R. K. (2006). Vesicular systems: An overview. *Indian J Pharm Sci*, 68(2), 141-153.
- Bilati , U., Allemann , E., & Doelker , E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.*, 24, 67-75.
- Bolon, M. K. (2009). The Newer Fluoroquinolones. *Infect. Dis. Clin. North Am*, 23(4), 1027-1051.
- Borcherding, Shawn M., et al. "Quinolones: a practical review of clinical uses, dosing considerations, and drug interactions." *Journal of Family Practice*, vol. 42, no. 1, Jan. 1996, pp. 69+.
- Bouissou, C., Rouse, J., Price, R., & van der Walle, C. (2006). The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm. Res*, 23, 1295–1305.
- Bozzuto G, Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 10, 975-999.
- Bu, H. Z., Gukasyan , H. J., Goulet , L., Lou , X. J., Xiang , C., & Koudriakova , T. (2007). Ocular disposition, pharmacokinetics, efficacy and safety of nanoparticle-formulated ophthalmic drugs. *Current Drug Metabolism*, 8(2), 91–107.
- Bye, L., Modi, N., & Miles, S. (2013). *Therapeutics. Basic Sciences for Ophthalmology* (s. 229–246). içinde OXford University Press.
- Cal, K., & Centkowska, K. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 467-478..
- Calonge, M. (2001). The treatment of dry eye. *Surv. Ophthalmol*, 45 (2), 227-239.
- Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M., Prina-Mello, A. (2019) Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal

- measurements with increasing complexity, *Journal of Controlled Release*, 299, 31-43.
- Cappuccino, J., & Sherman, N. (2004). *Microbiology: A Laboratory Manual*. 10th ed. . Singapore: Pearson.
- Carafa, M., Santucci, E., & Lucania, G. (2002). Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 231, 21–32.
- Cardot, J., Beyssac, E., & Alric, M. (2007). In vitro-in vivo correlation: Importance of dissolution in IVIVC. *Dissolution Technol.*, 15, 14.
- Carmicheal, J., DeGrafit W. G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Research*, 47, 936-942 (1987).
- Carratalá MD, PhD, J., Roson, MD, B., Ferná'ndez-Sevilla, MD, PhD, A., Alcaide, MD, F., & Gudiol, MD, PhD, F. (1998). Bacteremic Pneumonia in Neutropenic Patients With Cancer. *ARCH INTERN MED*, 158, 868-872.
- Cetin, M., Atila, A., & Kadioglu, Y. (2010). Formulation and in vitro characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. *AAPS Pharmscitech*, 11, 1250-1256.
- Chang, A. Y., & Purt, B. (2022). *Biochemistry, Tear Film*. StatPearls
- Chatterjee, B., Amalina, N., Sengupta, P., & Mandal, U. K. (2017). Mucoadhesive polymers and their mode of action: a recent update. *J Appl Pharm Sci.*, 7, 195–203.
- Chen, Y. H., Ko, W. C., & Hsueh, P. R. (2012). The Role of Fluoroquinolones in the Management of Urinary Tract Infections in Areas with High Rates of Fluoroquinolone-Resistant Uropathogens. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 31(8), 1699-1704.
- Chenel, M., Marchand, S., Dupuis, A., Lamarche, I., Paquereau, J., Pariat, C., & Couet, W. (2009). Simultaneous central nervous system distribution and pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling of the electroencephalogram effect of norfloxacin administered at a convulsant dose in rats. *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 323-330.
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerolphosphate solutions. *Carbohydr. Polym.*, 46, 39–47.

- Chierentin, L., Nunes Salgado, H. (2013). Development and Validation of a Simple, Rapid and Stability-Indicating High Performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Norfloxacin in a Pharmaceutical Product. *J Chromat Separation Techniq*, 4(2), 1-5.
- Choi, K. Y., Lee , S., & Park , K. (2008). Preparation and characterization of hyaluronic acid-based hydrogel nanoparticles. *J Phys Chem Solids*, 69, 1591–1595.
- Cholkar, K., Dasari, S. R., Pal, D., & Mitra, A. K. (2013). Eye: anatomy, physiology and barriers. *Ocular transporters and receptors*, 1-36.
- Crucho , C., & Barros , M. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771-784.
- Crumplin, G. C., Kenworth, M., & Hirst, T. (1984). Investigation into the mechanism of action of the antibacterial agent norfloxacin. *Journey Antimicrob Chemother*, 13((Supple B)), 9-23.
- D'Souza , S. (2014). Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-sized Dosage Forms. *Adv. Pharm.*, 1-12.
- D'Souza , S., & DeLuca, P. (2006). Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm. Res.*, 23, 460-474.
- Dartt D.A., & Wilcox M. (2013). Complexity of the tear film: Importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Exp Eye Res*, 117, 1-3.
- Dadwal, M. (2014). Polymeric Nanoparticles as Promising Novel Carriers for Drug Delivery: An Overview. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 4(1), 20-30.
- Dave, V., Kushwaha, K., Yadav, R., & Agrawal, U. (2017). Hybrid Nanoparticles for the Topical delivery of Norfloxacin for the Effective Treatment of Bacterial Infection Produced after Burn. *Journal of Microencapsulation*, 1-35.
- Davies, J., & Binner, J. G. P. (2000). The role of ammonium polyacrylate in dispersing concentrated alumina suspensions. *Journal of the European Ceramic Society*, 20(10), 1539-1553.
- De Campos, A. M., Diebold, Y., Carvalho, E. L., Sánchez, A., & Alonso, M. J. (2004). Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: In Vitro Stability, In Vivo Fate, and Cellular Toxicity. *Pharm. Res.*, 21, 803–810.

- De Campos, A. M., Sanchez, A., Gref, R., Calvo, P., & Alonso, M. J. (2003). The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *Eur. J. Pharm. Sci*, 20(1), 73-81.
- De la Fuente, M., Raviña, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B., & Alonso, M. (2010). Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 100-117.
- DeAssis, D., Mosqueira, V., Vilela, J., Andrade, M., & Cardoso, V. (2008). Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99m Technetium – fluconazole nanocapsules. *Int J Pharm.* , 349, 152-160.
- Delgado, A., Gonzalez-Caballero, F., Hunter, R., Koopal, L., & Lyklema, J. (2007). Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science*, 309, 194-224.
- DelMonte, D. M., & Kim, T. M. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 37(3), 588-598.
- Dembek, M., Bocian, S., & Buszewski, B. (2022). Solvent Influence on Zeta Potential of Stationary Phase—Mobile Phase Interface. *Molecules*, 27(3), 968.
- Devasani, S., Dev, A., Rathod, S., & Deshmukh, G. (2016). An Overview of In Situ Gelling Systems. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, 3(1), 60-69.
- Dey, A., Koli, U., Dandekar, P., & Jain , R. (2016). Investigating behaviour of polymers in nanoparticles of Chitosan Oligosaccharides coated with Hyaluronic Acid. *Polymer*, 93, 44-52.
- Dhevaraj, J., Vembu, S., Pazhamalai, S., & Gopalakrishnan, M. (2019). esign and synthesis of some cyclic carbohydrates with norfloxacin as surface moiety. A study of sustained relax of drugs. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(2), 577-590.
- Divya , K., & Jisha, M. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters* , 16, 101-112.
- Dong, Y., Sun, D., Wang, Y., Du, Q., Zhang, Y., Han, R., Wang, T. (2022). Evaluation of the current guidelines for antibacterial therapy strategies in patients with cirrhosis or liver failure. *BMC Infect Dis.* , 22(1), 23.
- Dua, H. S., Faraj , L. A., Said , D. G., Gray , T., & Lowe , J. (2013). Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*, 120, 1778-1785.

- Ebrahim, S., Peyman, G. A., & Lee, P. J. (2005). Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv. Ophthalmol*, 50, 167-182.
- E-E. Aly, A., Harmon, B., Padegimas, L., Sesenoglu-Laird, O., Cooper, M., Yurek , D., & Waszczak , B. (2019). Intranasal delivery of hGDNF plasmid DNA nanoparticles results in long-term and widespread transfection of perivascular cells in rat brain. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 16, 20-33.
- Effa, E. E., Lassi, Z. S., Critchley, J. A., Garner, P., Sinclair, D., Olliaro, P. L., & Bhutta, Z. A. (2011). Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever). *Cochrane Database Syst Rev* , 10, 1-11.
- Eghrari, A. O., Riazuddin, S. A., & Gottsch, J. D. (2015). Chapter Two - Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134, 7-23.
- Ehlers, N., & Hjortdal, J. (2006). tHE Cornea Epitel and Stroma. *Advances in Organ Biology*, 10, 83–111.
- Elmowafy, M., Shalaby, K., Elkomy, M., Alsaidan, O., Gomaa, H., Abdelgawad, M., & Mostafa, E. (2023). Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges. *Polymers* 2023, 15(5), 1123.
- Engeland, M., Luc, J. W., Frans, C. S., & Chris, P. M. (1998). Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*, 31, 1-9.
- Epling, J. (2010). Bacterial conjunctivitis. *BMJ Clin Evid.* .
- Farjo, A., McDermott, M., & Soong, H. K. (2009). Corneal anatomy, physiology, and wound healing. *Ophthalmology*, 3, 203–208.
- Farkouh, A., Frigo, P., & Czejka., M. (2016). Systemic side effects of eye drops: a pharmacokinetic perspective. *Clin Ophthalmol.*, 10, 2433–2441.
- Fedorowicz, J., Cruz, C. D., Morawska, M., Ciura, K., Gilbert-Girard, S., Mazur, L., . . . Sączewski, J. (2023). Antibacterial and antibiofilm activity of permanently ionized quaternary ammonium fluoroquinolones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 254, 1-14.
- Fernández, J., Arbol, L., & Gómez, C. (2006). Norfloxacin vs Ceftriaxone in the Prophylaxis of Infections in Patients With Advanced Cirrhosis and Hemorrhage. *Gastroenterology*, 131, 1049-1056.

- Fernando, I., & Zhou, Y. (2019). Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297-305.
- Freitas, C., & Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. *International journal of pharmaceutics*, 168(2), 221-229.
- Gan, L., Wang, J., Jiang, M., Bartlett, H., Ouyang, D., Eperjesi, F., Gan, Y. (2013). Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discovery Today*, 18(5-6), 290-297.
- Gandhi, S., Jain, S. (2015). The Anatomy and Physiology of Cornea. In: Cortina, M., de la Cruz, J. (eds) *Keratoprotheses and Artificial Corneas*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ganguly, S., & Dash, A. K. (2004). A novel In Situ Gel for Sustained Drug Delivery and Targeting. *Int J Pharm*, 276, 83–92.
- Gauzit, R., & Lakdhari, M. (2012). Generic antibiotic drugs: is effectiveness guaranteed?. *Medecine et maladies infectieuses*, 42(4), 141-148.
- Gautam, N., & Kesavan, K. (2017). Development of Microemulsions for Ocular Delivery. *Therapeutic Delivery*, 8(5), 313-330.
- Gebreel, R. M., Edris, N. A., Elmofty, H. M., Tadros, M. I., El-Nabarawi, M. A., & Hassan, D. H. (2021). Development and Characterization of PLGA Nanoparticle-Laden Hydrogels for Sustained Ocular Delivery of Norfloxacin in the Treatment of Pseudomonas Keratitis: An Experimental Study. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 399-418 .
- Ghate, D., & Edelhauser, H. F. (2006). Ocular drug delivery. Expert opinion on drug delivery, 3(2), 275-287.
- Gibson, M. (2004) Ophthalmic Dosage Forms, in: *Pharmaceutical preformulation and formulation* (M. Gibson, ed.) CRC Press, Florida, pp. 461-91.
- Ginsburg, A. S., Grosset, J. H., & Bishai, W. R. (2003). Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis.*, 3(7), 432-442.
- Goldstein, D. E. (1987). Norfloxacin, a fluoroquinolone antibacterial agent: Classification, mechanism of action, and in vitro activity. *The American Journal of Medicine* Volume 82, 3-17.

- Grabovac, V., Guggi, D., & Bernkop-Schnürch, A. (2005). Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced drug delivery reviews*, 57(11), 1713-1723.
- Grüger, T., Mörlner, C., Schnitzler, N., Brandenburg, K., Nidermajer, S., Horré, R., & Zündorf, J. (2008). Influence of fluoroquinolones on phagocytosis and killing of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils. *Medical Mycology*, 46(7), 675–684
- Grüger, T., Nitiss, J. L., Maxwell, A., Lynn Zechiedrich, E., Heisig, P., Seeber, S., . . . Strumberg, D. (2004). A Mutation in *Escherichia coli* DNA Gyrase Conferring Quinolone Resistance Results in Sensitivity to Drugs Targeting Eukaryotic Topoisomerase II. *Antimicrob Agents Chemother* , 48(12), 4495-4504.
- Gulsen, D., & Chauhan, A. (2004). Ophthalmic drug delivery through contact lenses. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(7), 2342-2347.
- Gunnam, A., & Nangia, A. (2023). Novel Hydrate and Anhydrate Cocrystals/Salts of Norfloxacin and Their Physicochemical Properties. *Cryst. Growth Des.*, 23(6), 4198–4213.
- Gupta, C., Chauhan, A., Mutharasan, R., & Srinivas, S. P. (2010). Measurement and Modeling of Diffusion Kinetics of a Lipophilic Molecule Across Rabbit Cornea. *Pharmaceutical Research* , 27, 699–711.
- Güleş , Ö., & Eren , Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.
- Güneş, İ. (2020). Obstrüktif Uyku Apne Sendromu Hastalıklarında Oküler Yüzey Değerlendirmesi. 06 20, 2023 tarihinde <https://acikerisim.erbakan.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12452/5002/644289.pdf?sequence=1&isAllowed=y> adresinden alındı
- Hamdy, A., & Raid, G. A. (2012). Controlled and Continuous Release Ocular Drug Delivery Systems: Pros and Cons. *Current Drug Delivery*, 9(4), 421-430.
- Hao, B., Cheng, S., Clancy, C., & Nguyen, M. (2013). Caspofungin Kills *Candida albicans* by Causing both Cellular Apoptosis and Necrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 326-332.
- Harish Prashanth, K., Kittur, F., & Tharanathan, R. (2002). Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*, 50(1), 27-33.

- Hathout, R. M., Mansour, S., Mortada, N. D., & Guinedi, A. S. (2007). Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: In vitro and in vivo studies. *AAPS PharmSciTech*, 8(1).
- Hongtanee, Lalitphan, "Colorimetric detection of norfloxacin and ceftazidime by modified materials" (2022). Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD). 5783.
- Hooper, D.C., Jacoby, G.A. (2016). Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Sep; 6(9), 1-22.
- Hosoya, K.-i., Lee, V., & Kim, K.-J. (2005). Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 227-240.
- Hotze, E., Phenrat, T., Lowry, G., & Mellon, C. (2010). Nanoparticle Aggregation : Challenges Nanoparticle Aggregation : Challenges . *J Environ Qual*, 39(6), 1909-1924.
- (http-1) Zabekki. (2009, 10 20). Duyu Organları. (Scribd+SlideShare) 02 2023, 22 tarihinde <https://www.slideshare.net/zabekki/duyu-organlar> adresinden alındı
- (http-2) Diyabetim.net. (tarih yok). Göz Komplikasyonları. (Diyabetim.net) 02 22, 2023 tarihinde <https://diyabetim.net/goz-komplikasyonlari-2/> adresinden alındı
- (http-3) Heiting, O. (2021, 09 15). Göz Korneası. (Görmeye Dair Her Şey) 02 22, 2023 tarihinde <https://www.allaboutvision.com/tr/goz-anatomisi/kornea/> adresinden alındı
- (http-4) Op. Dr. Taşeli, M. (tarih yok). Retina Hastalıkları. (Op. Dr. Mustafa Taşeli Göz Merkezi) 02 22, 2023 tarihinde <http://www.taseligozmerkezi.com/template.asp?articleid=14&zoneid=3> adresinden alındı
- (http-5) Cleveland Clinic. (2020, 08 28). Corneal Disease. (Cleveland Clinic) 02 22, 2023 tarihinde <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/8586-corneal-disease> adresinden alındı
- (http-6) National Eye Institue. (2019, 06 26). Other Types of Corneal Disease. (NIH) 06 21, 2023 tarihinde <https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/eye-conditions-and-diseases/corneal-conditions/other-types-corneal-disease> adresinden alındı

- (http-7) Roat, Melvin I. (2022, 09). Introduction to Corneal Disorders. (MSD Manual) 02 22, 2023 tarihinde <https://www.msdmanuals.com/home/eye-disorders/corneal-disorders/introduction-to-corneal-disorders> adresinden alındı
- (http-8) Foundation, Vasculitis. (tarih yok). Cogan's Syndrome. (Vasculitis Foundation) 06 21, 2023 tarihinde <https://www.vasculitisfoundation.org/education/forms/cogans-syndrome/#1545131949963-fd2c9553-5ff9> adresinden alındı
- (http-9) Penn Medicine. (2022, 02 22). Corneal Ulcer. (Penn Medicine) 2 tarihinde alındı
- (http-10) CDC 24/7. (2023, 05 10). Shingles (Herpes Zoster). (CDC 24/7: Saving The Lives, Protecting People) 06 21, 2023 tarihinde <https://www.cdc.gov/shingles/hcp/clinical-overview.html> adresinden alındı
- (http-11) The eye care & surgery. (tarih yok). Keratoconus, Lattice, Fingerprint & Fuchs Corneal Dystrophy. (Prism Vision Group) 06 21, 2023 tarihinde <https://newjerseyvision.com/corneal-dystrophy-nj/> adresinden alındı
- (http-12) Drugbank Online. (tarih yok). Norfloxacin. (Drugbank) 06 21, 2023 tarihinde <https://go.drugbank.com/drugs/DB01059> adresinden alındı
- (http-13) Merck. (2023). What is FTIR Spectroscopy? (Merck) 07 28, 2023 tarihinde <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy> adresinden alındı
- Hutchenson, K. (2002). Organic chemical reactions and catalysis in supercritical fluid media. *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties, and applications* (s. 87-188). içinde New York: Marcel Dekker.
- ICH Expert Working Group. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology . ICH Harmonised Tripartite Guideline , 1-17
- Imam, M. E., Hornof, M., Valenta, C., Reznicek, G., & Bernkop-Schnuerch, A. (2003). Evidence for the interpenetration of mucoadhesive polymers into the mucous gel layer. *S.T.P. Pharma Sci*, 1, 171-176.
- Irimia, T., Violeta Ghica, M., Popa, L., Anuța, V., Arsene, A.-L., & Dinu-Pîrvu, C.-E. (2018). Strategies for Improving Ocular Drug Bioavailability and Corneal Wound Healing with Chitosan-Based Delivery Systems. *Polymers (Basel)*. 2018 Nov; 10(11): 1221., 10(11), 1-24.
- Irsch, K., & Guyton, D. L. (2009). Anatomy of Eyes. *Encyclopedia of Biometrics*, 1, 11-16.

- Jain Manu, S., Lohare Ganesh, B., Bari Manoj, M., Chavan Randhir, B., Barhate Shashikant, D., & Shah Chirag, B. (2012). Spray Drying in Pharmaceutical Industry. Research Journal of Pharmaceutical, 4(2), 74-79.
- Jacob, S., & Nair, A.B. (2018). Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. Drug development research, 79(5), 201-217.
- Järvinen, K., Järvinen, T., & Urtti, A. (1995). Ocular absorption following topical delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 16(1), 3-19.
- Jeong, B., & Gutowska, A. (2002). Lessons from nature: Stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. Trends in Biotechnology, 20(7), 305 - 311.
- Jiang , T., Zhang , Z., Zhang , Y., & et al. (2012). Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery. Biomaterials , 33, 9246–9258.
- Jores, K., Mehnert, W., Drecusler, M., Bunyes, H., Johan, C., & MAder, .. (2004). Investigation on the stricter of solid lipid nanopartuicles and oil-loaded solid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field flow fractionasition and transmission electron microscopy. J Control Release, 17, 217- 227.
- Joshi, J., & Patel, R. (2012). Role of biodegradable polymers in drug delivery. Int. J. Curr. Pharm. Res., 4 , 74-81.
- Jug, M., Hafner, A., Lovrić, , J., Kregar, M. L., Pepić, I., Vanić, Ž., & Filipović-Grčić, , J. (2018). An Overview of in Vitro Dissolution/Release Methods For Novel Mucosal Drug Delivery Systems. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 147, 350–366.
- Kadam, D., Bobade, N., Pophalkar, P., Hole, S., Suroshe, R., & Panchale, W. (2019). Design and In Vitro Characterization of Phase Transition System Using Risvastigmine Tartrate for Nasal Drug Delievery System. Word Journal of Pharmaceutical Research , 8(1), 8115-829.
- Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P., Radovic-Moreno, A., & Farokhzad, O. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. Chem. Soc. Rev., 41, 2971-3010.
- Kaplan, H. (2007). Anatomy and Function of the Eye. Immune Response and the Eye, 92, 4–10.
- Karthikeyan, D., & Pandey, V. P. (2009). Study on Ocular Absorbtion of Diclofenac Sodium Niosome in Rabbit Eye. Pharmacologyonline , 1, 769-779.

- Kassab, N., Singh, A., Kedor-Hackmam, E., & Miritello Santoro, M. (2005). Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(4), 507-513.
- Kavitha, A., Vijayalakshmi, M., Sudhakar, P., & Narasimha, G. (2010). Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. *African Journal of Microbiology Research*, 4(1), 027-032.
- Katzung, B. G. (2004). *Basic and Clinical Pharmacology* (s. 777). içinde Vol. IX: Mcgraw Hill (Tx).
- Kaur, I. P., & Smitha, R. (2002). Penetration Enhancers and Ocular Bioadhesives: Two New Avenues for Ophthalmic Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(4), 353-369.
- Kaur, I. P., Garg, A., Singla, A. K., & Aggarwal, D. (2004). Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 269(1), 1-14.
- Kaur, İ., & Kanwar, M. (2002). Ocular Preparations: The Formulation Approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(5), 473-493.
- KGa A,M. (2023,10,7). Drug Delivery FAQs. Merck: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/drug-delivery/drug-delivery-questions> adresinden alındı
- Khalil, R., Abdelbary, G., Basha, M., Awad, G., & El-Hashemy, H. (2017). Enhancement of lomefloxacin Hcl ocular efficacy via niosomal encapsulation: in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Liposome Research*, 27(4), 312-323.
- Kolb, H., Fernandez, E., Nelson, R., & Editors. (2005). *Gross Anatomy of the Eye. The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. içinde Utah: Webvision.
- Kondiah, P., Choonara, Y., Kondiah, P., Marimuthu, T., Kumar, P., du Toit, L., & et al. (2018). Nanocomposites for Therapeutic Application in Multiple Sclerosis. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*, 391-408.
- Kour, J., Kumari, N., & Sapra, B. (2021). Ocular prodrugs: Attributes and challenges. *Asian J Pharm Sci*, 16(2), 175-191.

- Krasia-Christoforou, T., & Georgiou, T. (2013). Polymeric theranostics: using polymer-based systems for simultaneous imaging and therapy. *J. Mater. Chem. B*, 1, 3002-3025.
- Kumar, D., Jain , N., Gulati , N., & Nagaich , U. (2013). Nanoparticles laden in situ gelling system for ocular drug targeting. *Adv Pharm Technol Res*, 4(1), 9-17.
- Kumar Patra, J., Das, G., Fraceto, L., Ramos Campos, E., Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, L., Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* , 16(71), 1-33.
- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I., & Mattiasson, B. (2007). Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Progress in Polymer Science*, 32(10), 1205-1237.
- Kumari, A., Yadav, S., & Yadav, S. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Kumazawa, J., & Yagisawa, M. (2002). The history of antibiotics: The Japanese story. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 8(2), 125-133.
- Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., Niles, A. (2019). A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis*, 24, 184–197 .
- L. Chierentin, N. S. (2014). Performance Characteristics of UV and Visible Spectrophotometry Methods for Quantitative Determination of Norfloxacin in Tablets. *J. Sci. Res.* , 6(3), 531-541.
- Lai, J.-Y. (2013). Corneal Stromal Cell Growth on Gelatin/Chondroitin Sulfate Scaffolds Modified at Different NHS/EDC Molar Ratios. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(1), 2036-2055.
- Lanier, O. L., Manfre, M. G., Bailey, C., Liu, Z., Sparks, Z., Kulkarni, S., & Chauhan, A. (2021). Review of Approaches for Increasing Ophthalmic Bioavailability for Eye Drop Formulations. *AAPS PharmSciTech*, 22, 107(1-16).
- Lanier, O. L., Manfre, M. G., Bailey, C., Liu, Z., Sparks, Z., Kulkarni, S., & Chauhan, A. (2021). Review of Approaches for Increasing Ophthalmic Bioavailability for Eye Drop Formulations. *AAPS PharmSciTech*, 22(107).
- Lawrence , M. J., & Rees , G. D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 45, 89-121.
- Laza-Knoerr, A. L., Gref, L., & Couvreur, P. (2010). Cyclodextrins for Drug Delivery. *Journal of Drug Targeting*, 18(9), 645-656.

- Lee M.D., C., & Ronald M.D., A. (1987). Norfloxacin: Its potential in clinical practice. *The American Journal of Medicine*, 82(6), 27-34.
- Lee, J. W., Park, J. H., & Robinson, J. W. (2000). Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J Pharm Sci*, 89(7), 850-866.
- Lewis, P., & Gagg, C. (2010). 2 - Examination and analysis of failed components. *Forensic Polymer Engineering*, 42-88.
- Leppard, G. (2008). Nanoparticles in the environment as revealed by transmission electron microscopy: detection, characterisation and activities. *Curr. Nanosci.*, 4, 278-301.
- Li, C.-C., & Chauhan, A. (2006). Modeling Ophthalmic Drug Delivery by Soaked Contact Lenses. *ACS Publications*, 45(10), 3718–3734.
- Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H., Tamaya, T., Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line, *Cancer Detection and prevention*, 27: 147-154 (2003).
- Lin, S. Y., & Yu, H. L. (1999). Thermal Stability of Methacrylic Acid Copolymers of Eudragits L, S, and L30D and the Acrylic Acid Polymer of Carbopol. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2061-2067.
- Loftsson, T., & Stefánsson, E. (2002). Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 80(2), 144-150.
- Löscher, M., Seiz, C., Hurst, J., & Schnichels, S. (2022). Topical drug delivery to the posterior segment of the eye. *Pharmaceutics*, 14(1), 134.
- Lu, X.-Y., Wu, D.-C., Li, Z.-J., & Chen, G.-Q. (2011). Chapter 7 - Polymer Nanoparticles. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 104, 299-323.
- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1595-1639.
- Lv, F. F., Li, N., Zheng, L. Q., & et al. (2006). Studies on the stability of the chloramphenicol in the micro-emulsion free of alcohols. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62(3), 288–294.
- Ma, W. D., Xu, H., Wang, C., Nie, S. F., & Pan, W. S. (2008). Pluronic F127-g-poly (acrylic acid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm*, 350(1-2), 247-256.

- Mahaling, B., & Katti, D. S. (2016). Understanding the influence of surface properties of nanoparticles and penetration enhancers for improving bioavailability in eye tissues in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 501(1-2), 1-9.
- Mahon, C., Lehman, D., & Manuselis, G. (2011). *Textbook of diagnostic microbiology* (4 ed.) (Cilt (4 ed.)). Maryland Heights: Saunders Elsevier.
- Mainardes, R. M., & Silva, L. P. (2004). Drug Delivery Systems: Past, Present, and Future. *Current Drug Targets*, 5(5), 389-406.
- Mainardes, R. M., Cocenza Urban, M., Oliveira Cinto, P., Khalil, N., Vinícius Chaud, M., Evangelista, R., & Daflon Gremião, M. (2005). Colloidal Carriers for Ophthalmic Drug Delivery. *Current Drug Targets*, 6, 363-371.
- Majeed, A., & Khan, N. (2019). Ocular in situ gel: An overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1), 337-347.
- Majumder, P. (2008, 07 27). Anatomy of conjunctiva (eophtha homepage on the internet). (eOphtha) 07 15, 2023 tarihinde www.eophtha.com/eophtha/anatomy/anatomyofconjunctiva.html adresinden alındı
- Makadia, H., & Siegel, S. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3(3), 1377–1397.
- Malhotra, M., & Majumdar, D. K. (2001). Permeation Through Cornea. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 11-24.
- Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L., & Wood, G. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1-18.
- Martins, C., Sousa, F., Araújo, F., & Sarmento, B. (2018). Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. *Adv. Healthcare Mater.*, 7, 1-24.
- Maulvi, F. A., Ranch, K. M., Desai, A. R., Desai, D. T., & Shukla, M. R. (2021). Ophthalmic preparations. In Remington (pp. 565-575). Academic Press.
- Mayer, C. (2005). NMR Studies of Nanoparticles. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 55, 205-258.
- Mendes, C., Buttchevitz, A., Kruger, J., Bernardi, L., Oliveira, P., & Segatto Silva, M. (2015). Quantitative Analysis of Norfloxacin in β -Cyclodextrin Inclusion

- Complexes—Development and Validation of a Stability-indicating HPLC Method. ANALYTICAL SCIENCES, 31, 1083-1089.
- Merck & Co. Inc. (2000). Chibroxin. (Merck & Co. Inc) 06 20, 2023 tarihinde https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2001/19757S10lbl.pdf adresinden alındı
- Metzelaar-Blok, J.A.W., ter Huurne J.A.C., Hurks H.M.H., Keunen J.E. E., Jager M.J., Gruis N.A.; Characterization of Melanocortin-1 Receptor Gene Variants in Uveal Melanoma Patients. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001;42(9):1951-1954.
- Meziani MJ, P. P. (2005). Polymeric nanofibers from rapid expansion of supercritical solution. Ind Eng Chem Res, 44, 4594–4598.
- Mikov, M., Fawcett, J., Kuhajda, K., & Kevresan, S. (2006). Pharmacology of bile acids and their derivatives: absorption promoters and therapeutic agents. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 31, 237-251.
- Miller , N. R., Newman , N. J., & Et al. (2005). Embryology, anatomy, and physiology of the afferent visual pathway. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., & Kumar, M. R. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. Journal of controlled release, 119(1), 77-85.
- Miyazaki, S., Endo, K., Kawasaki, N., Kubo, W., Watanabe, H., & Attwood, D. (2003). Oral sustained delivery of paracetamol from in situ gelling xyloglucan formulations. Drug Dev. Ind. Pharm., 29(2), 113-119.
- Modi , S., & Anderson , B. (2013). Determination of drug release kinetics from nanoparticles: Overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. Mol. Pharm. , 10, 3076-3089.
- Mohamed, F., & van der Walle, C. (2008). Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. J. Pharm. Sci., 97, 71-87.
- Mohanambal , E., Arun, K., & Abdul Hasan, S. (2011). Formulation and evaluation of pH-triggered in situ gelling system of levofloxacin. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 45(1), 58 - 64.
- Molpeceres, J., Aberturas, M., & Guzman, M. (2000). Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. J Microencapsul, 17, 599-614.

- Moneib, N. A. (1995). In-vitro activity of commonly used antifungal agents in the presence of rifampin, polymyxin B and norfloxacin against *Candida albicans*. *Journal of chemotherapy*, 7(6), 525-529.
- Mansour, H. M., Sohn, M., Al-Ghananeem, A., & DeLuca, P. P. (2010). Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceutics and controlled release drug delivery aspects. *International journal of molecular sciences*, 11(9), 3298-3322.
- Moreno-Bautista, G., & Tam, K. (2011). Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389(1-3), 299-303.
- Mouton, J., Dudley, M., Cars, O., Derendorf, H., & Drusano, G. (2005). Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(5), 601-607.
- Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S., Paredes, A., & Ingle, T. (2019). Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. *Nanomaterials for Food Applications*, 313-353.
- Muhamad, I., Selvakumaran, S., & Lazim, N. (2014). Designing polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system. *Nanomedicine* (s. 287- 313). içinde Malezya: One Central Press (OCP).
- Musa K.A.K., Eriksson, L.A. Theoretical Assessment of Norfloxacin Redox and Photochemistry. *The Journal of Physical Chemistry A* 2009 113 (40), 10803-10810
- Naeem, A., Badshah, S., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*, 21(4), 268.
- Nagam, S. P., Jyothi, A. N., Poojitha, J., Aruna, S. A. N. T. H. O. S. H., & Nadendla, R. (2016). A comprehensive review on hydrogels. *Int. J. Curr. Pharm. Res*, 8(1), 19-23.
- Nagarwal, R., Kant, S., Singh, P., Maiti, P., & Pandit, J. K. (2009). Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 136(1), 2-13.
- Nagavarma, B., Hemant K.S., Y., Ayaz, A., Vasudha, L., & Shivakumar, H. (2012). Different Techniques for Preparation for Polymeric Nanoparticles-A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinacal Research*, 5(3), 16-23.

- Naghdi, T., Yousefi, H., Sharifi, A., & Golmohammadi, H. (2020). Chapter Nine - Nanopaper-based sensors. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 89, 257-312.
- Nanda, A., Sahoo, R. N., Pramanik, A., Mohapatra, R., Pradhan, S. K., & Thirumurugan, A. (2018). Drug-in-mucoadhesive type film for ocular anti-inflammatory potential of amlodipine: effect of sulphobutyl-ether-beta-cyclodextrin on permeation and molecular docking characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 172, 555–64.
- Narayana, S., & Ahmed, M. (2022). Design and evaluation of ocular hydrogel containing combination of ofloxacin and dexamethasone combination of ofloxacin and dexamethasone for the treatment of conjunctivitis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 1-12.
- Nassimbeni, L., & Báthori, N. (2017). Thermal Analysis. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 3-21.
- Nayak, A., Bhushan, B., & Kotnala, S. (2022). Fabrication of chitosan-hydroxyapatite nano-adsorbent for removal of norfloxacin from water: Isotherm and kinetic studies. *Materials Today: Proceedings*, 61(2), 143-149.
- Nerkar, T., Gujarathi, N., Rane, B., Bakliwal, S., & Pawar, S. P. (2013). In situ gel: Novel Approaches in sustained and controlled drug delivery system. 4, 4.
- Nguyen, K. H., Patel, B. C., & Tadi, P. (2022, 08 8). Anatomy, Head and Neck: Eye Retina. 06 20, 2023 tarihinde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542332/> adresinden alındı
- Nikam, V., Kotade, K., Gaware, V., Dolas, R., Dhamak, K., Somwanshi, S., Kashid, V. (2011). EUDRAGIT A VERSATILE POLYMER : A REVIEW. *Pharmacologyonline*, 1, 152-164.
- 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*, 2(1398-1408), 2.
- Nisha, S., & Deepak, K. (2012). An insight to ophthalmic drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Studies Research*, 3(2), 9-13.
- Novikov, V., Derkach, S., Konovalova, I., Dolgopyatova, N., & Kuchina, Y. (2023). Mechanism of Heterogeneous Alkaline Deacetylation of Chitin: A Review. *Polymers*, 15(7), 1729.
- Ohia, S., & Sharif, N. (2022). Bioavailability of Topical Drugs. *Handbook of Basic and Clinical Ocular Pharmacology and Therapeutics* (s. 121). içinde London: Elsevier.

- Ollinkangas, J. (2022). Problems Caused by Hypromellose During Sterile Filtration of Eye Drop Products in Pharmaceutical Industry. 06 29, 2023 tarihinde https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/342793/Ollinkangas_Joni_Master's_Thesis_2022.pdf?sequence=3 adresinden alındı
- Omerović, N., & Vranić, E. (2020). Application of nanoparticles in ocular drug delivery systems. *Health and Technology*, 10, 61–78.
- O'Neil, M. J. (2006). The Merck Index 14.th Edition (Cilt 14). Whitehouse Station, 873: Merck and Co.
- Pohlhaus , J., Kreuzer, K. N. (2005). Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block Escherichia coli replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol Microbiol*, 56(6), 1416-1429.
- Parekh, M., Ahmad, S., & Daniels., J. T. (2021). Challenges in corneal endothelial cell culture. *Regenerative Medicine*, 16(9), 871-891.
- Passerini, N., & Craig, D. (2001). An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *J. Control. Release*, 73, 111-115.
- Patel, A., Cholkar, K., Agrahari, V., & Mitra, A. K. (2013). Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol*, 2(2), 47-64.
- Patel, H.A., Patel, J.K., Patel, K.N., & R.Patel, R. (2010). Ophthalmic Drug Delivery system –A Review. *Der Pharmacia Lettre*, 2(4), 100-115.
- Patel, P., Shastri, D., Shelat, P., & Shukla, A. (2010). Ophthalmic Drug Delivery System: Challenges and Approaches. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(2), 113-119.
- Patel , V., & Agrawal, Y. K. (2011). Current Status and Advanced Approaches in Ocular Drug Delivery System. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 131-148.
- Patil, B. B., & Dowd, C. C. (2000). Physiological functions of the eye. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 11(6), 293-298.
- Peng, C. C., Bengani, L. C., Jung, H. J., & Leclerc, C. (2011). Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 21(1), 111-121.
- Peniche, H., & Peniche, C. (2011). Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*, 60(6), 883-889.

- Peppas NA, Huang,Y. Torres Lugo M., Ward, JH., Zhang, J. (2000). Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu Rev Biomed Eng*, 2, 9-29.
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. S., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 50(1), 27-46.
- Pereira, A., Muniz, E., & Hsieh, Y.-L. (2015). ¹H NMR and ¹H–¹³C HSQC surface characterization of chitosan–chitin sheath-core nanowhiskers nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 123, 46/52.
- Phillips, I., King, A., Shannon, K., & . (2000). Chapter 3 - Comparative In-Vitro Properties of the Quinolones. (V. T. Andriole, Dü.) Academic Press, 99-137.
- Pietzyk, B., & Henschke, K. (2000). Degradation of phosphatidylcholine in liposomes containing carboplatin in dependence on composition and storage conditions. *Int J Pharm*, 196, 215–218.
- Prausnitz, M., & Noonan, J. (2000). Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12), 1479-1488.
- Raj, V. K., Mazumder, R. U. P. A., & Madhra, M. O. N. I. K. A. (2020). Ocular drug delivery system: challenges and approaches. *Int J Appl Pharm*, 12, 49-57.
- Rajput, A., Sharma, P., Sharma, R., & Thakur, S. (2023). Novel Topical Drug Delivery Systems in Ophthalmic Applications. Dosage Forms (s. doi: 10.5772/intechopen.95734). içinde IntechOpen.
- Ramirez-Ronda, C., Colon , M., Saavedra, S., Sabbaj, J., & Corrado, M. (1987). Treatment of urinary tract infection with norfloxacin: Analysis of cost. *The American Journal of Medicine*, 82(6), 75-78.
- Rathore, K. S., & Nema, R. K. (2009). An insight into ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 1(1), 1-5.
- Redhead, H., Davis, S., & Illum, L. (2001). Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release*, 70(3), 353-363.
- Rolando, M., Zierhut, M. (2001). The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease. *Survey of Ophthalmology*, 45(2), 203-210.

- Rosca, I., Watari, F., & Uo, M. (2004). Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of Controlled Release*, 99(2), 271-280.
- Roner, M. R., Carraher Jr, C. E., Roehr, J. L., Bassett, K. D., & Siegmund-Louda, D. W. (2004). Anti-Viral Activity of Norfloxacin and Ampicillin and Dibutyltin Polymers Derived From Norfloxacin And Ampicillin Against Reovirus ST3, Vaccinia Virus, Herpes Simplex Virus(HSV-1) And Varicella Zoster Virus(VZV). *Polymeric Materials Science and Engineering*, 91.
- Ruhe, P., Hedberg, E., Hedberg, N., Spauwen, P., Spauwen, J., & Mikos, A. (2003). rhBMP-2 release from injectable poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *J. Bone Jt. Surg.*, 85, 75–81.
- Ruiz-Gatón, L., Espuelas, S., Larrañeta, E., Reviakine, I., Yate, L., & Irache, J. (2018). Pegylated poly(anhydride) nanoparticles for oral delivery of docetaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 118, 165-175.
- Kumar, K.P.S., Bhowmik, D., Paswan, S., & Srivastava, S. (2012). Recent Challenges and Advances in Ophthalmic Drug Delivery System. *The Pharma Innovation*, 1(4), 1-15.
- Singh, M. K., & Singh, A. (2021). *Characterization of Polymers and Fibers*. Woodhead Publishing..
- Sahoo, S., Chakraborti, C. K., Behera, P. K., & Mishra, S. C. (2012). FT-IR and Raman Spectroscopic Investigations of a Norfloxacin/Carbopol 934 Polymeric Suspension. *Journal of Young Pharmacists*, 4(3), 138-145.
- Sateesha, S., Rajamma, A., Shekar, H., Mutahar, R., & Jayanthi, A. (2010). Formulation and stability study of palatable norfloxacin dry syrup: Comparison among different preparation methods. *Asian J Pharma Sci.*, 5, 175-184.
- Se'choy, O., Tissie', G., Se'bastian, C., Maurin, F., Driot, J. Y., & Trinquand, C. (2000). A new long acting ophthalmic formulation of Carteolol containing alginate. *Int. J. Pharm.*, 207, 109 – 116.
- Segreti, J., Jones, R., & Bertino Jr, J. S. (2012). Challenges in Assessing Microbial Susceptibility and Predicting Clinical Response to Newer-Generation Fluoroquinolones. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 28(1), 3-11.
- Sekiwa, M., Tsutsui, K., Morisawa, K., Fujimoto, T., & Toyoshima, A. (2004). Electrophoretic mobility measuring apparatus. U.S. Patent Pub., 20040251134.

- Sharma , P. C., Saneja, A., & Jain, S. (2008). Norfloxacin: A therapeutic review. *Int. J. Chem. Sci.*, 6(4), 1702-1713.
- Sharma, P. H., Powar, P. V., & Sharma, S. S. (2014). Pharmacosomes: A novel drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 3(10, Part B), 94.
- Shi, H., Farber, L., Michaels, J., Dickey, A., Thompson, K., Shelukar, S., Kaufman, M. (2003). Characterization of crystalline drug nanoparticles using atomic force microscopy and complementary techniques. *Pharm Res.*, 20, 479-484.
- Shokri, J., & Adibkia, K. (2013). Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. *Cellulose* (s. 47-66). içinde Canada: Theo G.M. Van De Ven.
- Siddiqui, F., Arayne, M., Sultana, N., Qureshi, F., Mirza, A., & Shehnaz, H. (2009). Quantitative determination of fluoroquinolonic antibiotics: pefloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin in pharmaceutical preparations and human serum by high-performance liquid chromatography using multi-wavelength calibration technique. *Analitic Chemistry*, 54(6), 1465-1485.
- Silva, M., Calado , R., Marto , J., Bettencourt , A., Almeida , A. J., & Gonçalves , L. M. (2017). Chitosan Nanoparticles as a Mucoadhesive Drug Delivery System for Ocular Administration. *Mar. Drugs* , 15(370), 1-16.
- Singh, A., P. K. (2010). Hydrogels: A Review . *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* , 4(2), 2010.
- Singh, R. P., Gangadharappa , H. V., & Mruthunjaya , K. (2017). Phospholipids: unique carriers for drug delivery systems. *J Drug Deliv Sci Tec.*, 39, 166–179.
- Sinha, S., & Muthu, M. (2007). Preparation and Characterization of Nanoparticles Containing Anatypical anti-psychotic Agent. *Nanomedicine*, 2, 233-240.
- Smart , J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1556–1568.
- Souto , E. B., Doktorovova , S., Gonzalez-Mira, E., Egea , M. A., & Garcia , M. L. (2010). Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs. *Curr Eye Res*, 35(7), 537–552.
- Spencer, A. C., Panda , S. S. (2023). DNA Gyrase as a Target for Quinolones. *Biomedicines* , 11(2), 371.
- Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*. 2018 Feb;66(2):190-194.

- Srinivas, S. P. (2010). Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium . *Optom Vis Sci*, E239–54, 87.
- Sultana, Y., Jain, R., Aqil, M., & Ali, A. (2006). Review of ocular drug delivery. *Current drug delivery*, 3(2), 207-217.
- Supraja, B., & Mullangi, S. (2019). An updated review on pharmacosomes,a vesicular drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1-s), 393-402.
- Sur, S., Rathore, A., Dave , V., Raghava Reddy, K., Chouhan, R., & Sadhu , V. (2019). Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 20, 1-21.
- Tabcheh, J., Vergalli, J., Davin-Régli, A., Ganem, N., Pages , J.-M., Al-Bayssari , C., & Brunel, J. (2023). Rejuvenating the Activity of Usual Antibiotics on Resistant Gram-Negative Bacteria: Recent Issues and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* , 24(2), 1515.
- Thompson, A.M., (2007). Ocular toxicity of fluoroquinolones. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 35, 566–577.
- Toropainen, E., Fraser-Miller, S., Novakovic, D., Del Amo, E., Vellonen, K.-S., Ruponen, M., Urtti, A. (2021). *Biopharmaceutics of Topical Ophthalmic Suspensions: Importance of Viscosity and Particle Size in Ocular Absorption of Indomethacin*. *Pharmaceutics*, 13(4), 452.
- Tranter, G. (2017). FTIR Spectroscopy of Aqueous Solutions. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, 762-769.
- Umar, H., Idris, M., Kavaz, D., Ghali, U., Usman, A., & Rizaner, N. (2022, Pages 27-44). Chapter 2 - Nanoencapsulation of nutraceuticals and dietary supplements for effective delivery. *Applications of Nanotechnology in Drug Discovery and Delivery*, 27-44.
- Upton, D. A. (2021). Limiting the use of quinolone antibiotics. 06 21, 2023 tarihinde <https://bpac.org.nz/2021/docs/quinolone.pdf> adresinden alındı.
- Urtti, A. (2006). Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(11), 1131-1135.
- Van Der Waaij , V., Messerschmidt, O., & Van Der Waaij , D. (1989). A norfloxacin dose finding study for selective decontamination of the digestive tract in pigs. *Epidemiology and Infection*, 102(1), 93 - 103.

- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I. et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11, 328–330 (1995)
- Vandamme, T. F. (2002). Microemulsions as Ocular Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Challenges. *Prog. Retin. Eye Res.*, 21(1), 15–34.
- Venkatesan, J., & Kim, S. (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering—An overview. *Mar. Drugs*, 8, 2252–2266.
- Vijan, L. E., & Council, M. (2008). Absorption Study of Norfloxacin–DNA interaction. *Macromol. Symp.*, 265(1), 260–267.
- Vision RX Encyclopedia. (2005). Conjunctivae. 06 2023, 20 tarihinde www.visionrx.com/library/enc/enc_conjunctiva.asp adresinden alındı
- Walden, D. M., Khotimchenko, M., Hou, H., Chakravarty, K., & Varshney, J. (2021). Effects of Magnesium, Calcium, and Aluminum Chelation on Fluoroquinolone Absorption Rate and Bioavailability: A Computational Study. *Pharmaceutics*, 13(5), 594.
- Wagenlehner, F. M., Wullt, B., & Perletti, G. (2011). Antimicrobials in urogenital infections. *International journal of antimicrobial agents*, 38, 3–10.
- Wang, Y., Li, P., & Kong, L. (2013). Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles with Versatile Surface for Improved Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 14, pages 585–592.
- Wathoni, N., Nguyen, A., Rusdin, A., Umar, A., Abdelwahab Mohammed, A., Motoyama, K., Muchtaridi, M. (2020). Enteric-Coated Strategies in Colorectal Cancer Nanoparticle Drug Delivery System. *Drug Des Devel Ther.*, 14, 4387–4405.
- Weber, M., Thies, M., & Sun, Y. (2002). Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties and applications. Understanding the RESS process (s. 387–437). içinde New York: Marcel Dekker.
- Weiner, C. P., & Buhimschi, C. (2009). *N. Drugs for Pregnant and Lactating Women (Second Edition)* (s. 747–809). içinde Elsevier.
- Weller, J. M., Schlotzer-Schrehardt, U., Kruse, F. E., & Tourtas, T. (2016). Splitting of the recipient's descemet membrane in descemet membrane endothelial keratoplasty—ultrastructure and clinical relevance. *Am J Ophthalmol*, 1–6, 172.

- Weng, J., Tong, H., & Chow, S. (2020). In Vitro Release Study of the Polymeric Drug Nanoparticles: Development and Validation of a Novel Method. *Pharmaceutics*, 12(8), 732.
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2004). Penetration Enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 603-618.
- Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Aires Lobo, A., Landau, K., & Omid, Y. (2010). Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 38, 2-11.
- Wilson, C. (2004). Topical drug delivery in the eye. *Experimental Eye Research*, 78(3), 737-743.
- Wolfson, W., & Hooper, D. (1988). Norfloxacin: A new targeted fluoroquinolone antimicrobial agent. *Annals of Internal Medicine*, 108(2), 238 - 251.
- Wu, Y., Liu, Y., Li, X., Kebebe, D., Zhang, B., Ren, J., Liu, Z. (2018). Research progress of in-situ gelling ophthalmic drug delivery system. *Asian J Pharm Sci*, 14(1), 1-15.
- Xinming, L., Yingde, C., Lloyd, A. W., Mikhalovsky, S. V., Sandeman, S. R., Howel, C. A., & Liewen, L. (2008). Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 31(2), 57-64.
- Xu, R., Wu, C., & Xu, H. (2007). Particle size and zeta potential of carbon black in liquid media. *Carbon*, 45(14), 2806-2809.
- Yenice, I., Mocan, M. C., Palaska, E., & et al. (2008). Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp Eye*, 87, 162–167.
- Diebold Y., Calonge M. (2010). Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6), 596-609.
- Yu, M., Yuan, W., Li, D., Schwendeman, A., & Schwendeman, S. (2019). Predicting Drug Release Kinetics from Nanocarriers inside Dialysis Bags. *J. Control. Release*, 315, 23-30.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., & Öztürk, A. (2019). Preparation and in vitro characterization of lamivudine loaded nanoparticles prepared by acid and/or ester terminated PLGA for effective oral anti-retroviral therapy. *JOURNAL OF RESEARCH IN PHARMACY*, 897-913.

- Zhang, Q., Shen, Z., & Nagai, T. (2001). Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *Int J Pharm*, 80, 218-275.
- Zhu, H., & Chauhan, A. (2008). Effect of Viscosity on Tear Drainage and Ocular. *American Academy of Optometry*, 85(8), E715–E725.
- Zore, G., Thakre, A., Abdulghani, M., Bhosle, K., Shelar, A., Patil, R., Karuppayil, S. (2022). Menthol Inhibits *Candida albicans* Growth by Affecting the Membrane Integrity Followed by Apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.
- Zuhour, M., Güneş, C., Findık, S., Dünder, M., Gök, O., & Altuntaş, Z. (2023). Effect of methylprednisolone loaded poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) bioabsorbable nanofibers on tendon healing and adhesion formation. *Journal of Drug Delivery Science and technology*.