

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

**KURU GÖZ HASTALIĞI TEDAVİSİNE YÖNELİK
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT (EGCG) YÜKLÜ
NANOPARTİKÜL İÇEREN TABLET
FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Önder SARP

Referans no: 10185261

EDİRNE-2019

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

**KURU GÖZ HASTALIĞI TEDAVİSİNE YÖNELİK
EPİGALLOKATEŞİN GALLAT (EGCG) YÜKLÜ
NANOPARTİKÜL İÇEREN TABLET
FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Önder SARP

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/161

Tez No:

EDİRNE-2019

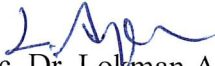
T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Önder SARP tarafından tez başlığı “**Kuru Göz Hastalığı Tedavisine Yönelik Epigallokateşin Gallat (EGCG) Yüklü Nanopartikül İçeren Tablet Formülasyonunun Geliştirilmesi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 26/08/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR
JÜRİ BAŞKANI




Doç. Dr. Lokman AYZAZ
ÜYE


Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Gülşah GEDİK'e, bugünlere gelmemi sağlayan her zaman yanımda olan babam Ali SARP'a, annem Zekiye SARP'a, abim Özgür SARP ve ailesine, her koşulda beni destekleyen ve yanımda olan Serra Serap SIRMAN'a, laboratuvar çalışmalarını beraber yürüttüğümüz Arş. Gör. Hakan NAZLI'ya, FT-IR sonuçları yorumlanmasında yardımcı olan Doç. Dr. Esra TATAR hocama, çalışmalarımdayardımcı olan Kübra KESMEZ ve Hakan GEDİK'e, gerekli desteği sağlayan DEVA ve FARMATEK firmalarına, projemi destekleyen TÜBAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GÖZ	3
KURU GÖZ HASTALIĞI	5
KATEŞİNLER	22
NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER	26
TABLETLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER	36
GEREÇ VE YÖNTEMLER	42
BULGULAR	58
TARTIŞMA	85
SONUÇLAR	95
ÖZET	97
SUMMARY	99
KAYNAKLAR	101
ŞEKİLLER LİSTESİ	120
ÖZGEÇMİŞ	123

SİMGE VE KISALTMALAR

BSS	: Bağlı Standart Sapma
DD	: Deasetilasyon Derecesi
EBF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGCG	: Epigallokateşin Gallat
EGK	: Epigallokateşin
EK	: Epikateşin
EKG	: Epikateşingallat
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorbent Yöntemi
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
GFI	: Gözyaşı Fonksiyonu İndeksi
GFKZ	: Gözyaşı Filmi Kırılma Zamanı
GK	: Gallokateşin
GKG	: Gallokateşingallat
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
Ig	: İmmüoglobulin
IL	: İnterlökin
K	: Kateşin
KG	: Kateşingallat
KGH	: Kuru Göz Hastalığı
KKS	: Keratokonjunktivitis Sikka

KNP	: Kitosan Nanopartikül
KSC	: Kitosan Çözeltisi
LOD	: Limit of Dedection
LOQ	: Limin of Quantification
MBD	: Meibom Bezi Disfonksiyonu
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaTPP	: Sodyum Tripolifosfat
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
OTC	: Over the Counter
OYHI	: Oküler Yüzey Hastalığı İndeksi
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
SS	: Standart Sapma
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacim/Hacim
w/v	: Ağırlık/Hacim

GİRİŞ VE AMAÇ

Keratokonjunktivitis sikka (KKS) veya kuru göz hastalığı (KGH), buharlaşmanın artması veya gözyaşının azalması sonucu çeşitli rahatsızlıklarla göz yüzünün hasarına neden olan gözyaşı filmi bozukluğudur. Gözyaşı bileşiminde oluşacak herhangi bir değişiklik göz yüzeyindeki yangıyı arttırabilmektedir. Çevresel ve sistemsel etkiler, gözyaşı salgı bezlerindeki (lakrimal bezler) yangıyı arttırarak kuru gözün olmasına neden olmaktadır. Kuru göz hastaları, gözlerinde meydana gelen yanma, bulanık görme, batma, kaşıntı, yabancı cisim etkisi ve ışıktan yakınmaktadırlar. Hastalığın süresine ve şiddetine bağlı olarak göz yüzeyleri hasar görebilmektedir. Tedavi görmeyen hastalarda enfeksiyon riski artarak kornea ülseri oluşabilmekte ve bu durum körlüğe kadar ileri gidebilmektedir. Topikal olarak göze uygulanan yapay gözyaşı formülasyonları, KGH'nin en çok başvurulan tedavi yöntemidir. Ancak hastalığı tam olarak tedavi edebilecek ideal bir yapay gözyaşı preparatı yoktur. Preparatlar şiddetli kuru göz hastalarında yetersiz kalmaktadır ve aynı zamanda içerdikleri koruyucular gözde duyarlılık oluşturmakta ve damlatıldıktan sonra uzun süre gözde kalmamaktadır. Oküler sistem tedavilerinde önemli problemlerden biri de yeterli ilaç konsantrasyonu sağlayamamaktır (1,2).

Oral kuru göz tedavisinde Omega 3 yağ asitleri içeren kapsül formları mevcut olup bu konuda yapılan literatür çalışmasında başka dahili kullanımı olan preparata rastlanmamıştır. Epigallokateşin gallat (EGCG), yeşil çayın yapısında olan bir fenolik bileşiktir. Çeşitli araştırmalar EGCG'nin otoimmün bozukluklarla ilgili iltihap üzerinde bir inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir. Topikal EGCG tedavisinin, yangılı sitokinlerin ekspresyonunu ve korneada CD11b+ hücrelerinin infiltrasyonunu baskılayarak KGH'daki klinik bulguları ve yangılı değişiklikleri azaltabileceği gösterilmiştir (3). Yapılan literatür çalışmasında uzun

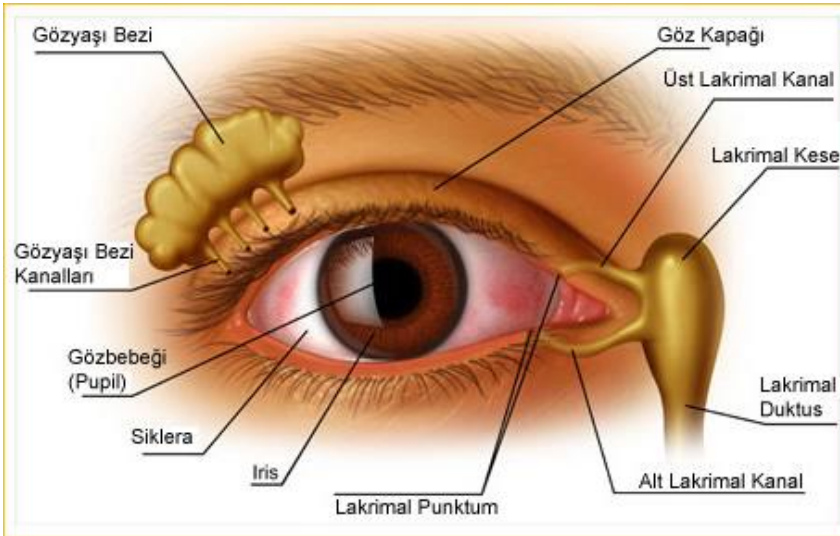
zamandır içecek olarak tüketilen yeşil çayın ana polifenol olan EGCG ile yapılmış KGH'a yönelik dahili bir preparata rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, yukarıda belirtilen araştırma sonuçlarına dayanarak EGCG yüklü nanopartiküler sistemin oluşturulması, oral kullanılacak tablet formülasyonunun geliştirilmesi ve *in vitro* karakterizasyon çalışmalarının yapılmasıdır.



GENEL BİLGİLER

GÖZ

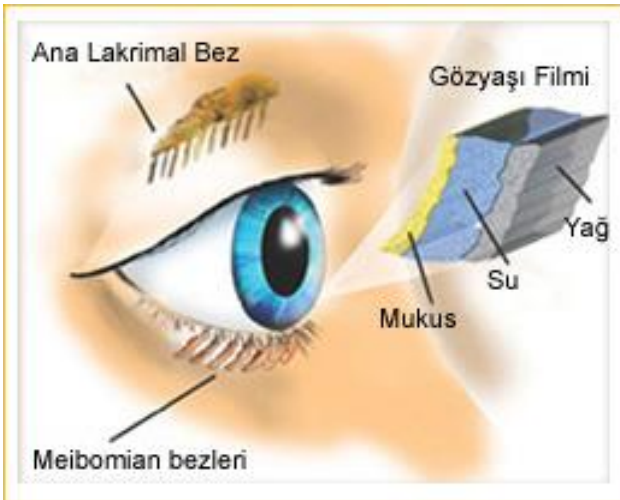
Göz, çevremizdeki dünyayı algılamamızı sağlayan organdır. Göz yüzeyi, görsel sistemin vazgeçilmez bir bileşenidir. Çünkü gözün yaşamsal bölümlerini korur ve göze giren ışınlar için uygun kırma yüzeyi sağlamaktadır. Oküler yüzey kornea, konjonktiva, lakrimal bezler, meibom bezleri ve diğer yardımcı bezlerden oluşmaktadır (Şekil 1.) (1). Göz ve göz yüzeyleri diğer organ sistemleriyle yakından ilişkilidir. Sinir ve endokrin sistemler oküler yüzeydeki çoklu bezlerin salgılanmasını kontrol eder ve etkiler; bağışıklık hücreleri enfeksiyon ve yangı sırasında konjonktivaya göç eder; vasküler sistem oküler yüzey için gerekli besin maddelerini sağlar ve gözyaşı sıvı metabolizmasından sorumludur.



Şekil 1. Oküler yüzeyin gösterimi

Gözyaşı Filmi

Gözyaşı filmi, üç ana katmandan oluşur (Şekil 2.). En içteki müsin veya mukus katmanı, konjonktiva hücrelerinin ürettiği en ince katmandır. Mukus, üstündeki sulu tabakanın göze eşit şekilde yayılmasına yardımcı olur. Orta veya sulu katman, üst kapakların bezleri tarafından üretilen en büyük ve en kalın katmandır ve yardımcı gözyaşı bezleri ve esasen çok seyreltilmiş bir tuzlu su çözeltisi içerir (2). Bu katman, gözü nemli tutar ve toz, kalıntı veya yabancı parçacıkların giderilmesine yardımcı olur. Bu tabakanın kusurları çoğu durumda KGH'a neden olur (4). Gözyaşı filminin en üst katmanı çok ince bir lipid tabakasıdır. Bu lipitler, meibom bezleri ve Zeiss bezleri (göz kapaklarındaki yağ bezleri) tarafından üretilir. Bu katman, altındaki sulu katmanın buharlaşmasını azaltmaya yardımcı olur. Mukoza, gözyaşı filminin lipit tabakası ve su tabakası arasındaki yüzey gerilimini de azaltır, böylece gözyaşı filminin stabilitesine katkıda bulunur (5-7). Gözyaşı sıvısı ayrıca protein, immünoglobulin (Ig), müsin, elektrolit, sitokin, lizozim, laktoferrin ve büyüme faktörlerinin kompleks karışımından oluşur (2,8). Lizozim, bakterilerin parçalanmasında IgA ile sinerjistik olarak etki edebilir. Gözyaşları ayrıca, bazı antibakteriyel etkiye sahip laktoferrin içerir (9,10). Gözyaşlarının ortalama glikoz konsantrasyonu 2,5 mg/dL ve ortalama gözyaşı üre seviyesi 0,04 mg/dL'dir. Potasyum, sodyum ve klor gibi elektrolitler, gözyaşlarında kandan daha yüksek konsantrasyonda ortaya çıkar. Gözyaşı osmolaritesi 309 mOsm/litredir (11). Gözyaşlarının ortalama pH değeri 7,25 ve gözyaşı filminin kırılma indisi 1,336'dır (8,11,12). Gözyaşı 1,5 mL/dk oranında üretilmektedir. Lakrimal bezlerden üretilen gözyaşı konjonktiva üzerine boşaltılmaktadır. Göz kırpmaya olayı gerçekleştiğinde gözyaşı kesesi baskılanır ve her kırpmada yaklaşık 2 µL gözyaşı nazolakrimal kanala geçmektedir (13).



Şekil 2. Gözyaşı filmi bileşenleri

KURU GÖZ HASTALIĞI

KGH, oküler yüzeye zarar veren ve oküler rahatsızlık semptomlarıyla ilişkili preoküler gözyaşı filminin bir hastalığıdır. KGH aynı zamanda KKS, keratit sikka, sikka sendromu, kseroftalmi, KGH, oküler yüzey hastalığı veya disfonksiyonel gözyaşı sendromu veya sadece kuru gözler olarak da adlandırılır (14). Keratokonjunktivitis sikka Latince bir kelimedir ve kelimenin tam anlamıyla çevirisi “kornea ve konjonktiva kuruması”dır. “Sikka”nın “kurutucu” kelimesinin bir parçası olduğunu bilmek yardımcı olabilir (15).

Kuru göz yaygın olup nüfusun yaklaşık % 10-20'sini etkilemektedir (9). Göz rahatsızlığı, görme bozukluğu ve oküler yüzey hasarı ile sonuçlanan, gözyaşı filmi ve oküler yüzeyin çok faktörlü bir bozukluğudur. Gözyaşı hiperosmolaritesi ve gözyaşı filmi dengesizliği nedeniyle göz yüzeyinde bozulma meydana gelmektedir. Gözyaşı filmi; gözyaşı üretiminin azalması, gözyaşı bileşiminde değişiklik, göz yüzeyinin zarar görmesi ve iltihaplanma ile bozulabilir (16). Oküler yüzey epitelinin kuruluğu, epitelyal hücrelerin apoptozuna sebep olur, bu da nihayetinde kuru gözün şiddetlenmesine yol açmaktadır (17). 2007 International Dry Eye WorkShop raporuna göre kuru göz “göz rahatsızlığı, görme bozukluğu ve göz yüzeyine potansiyel hasar verecek şekilde gözyaşı filmi dengesizliği semptomlarına neden olan gözyaşının ve göz yüzeyinin çok faktörlü bir hastalığıdır” olarak belirtilmiştir (16).

KGH, oküler yüzeyin iltihaplanması ile ilişkilidir ve gözyaşı hiperosmolaritesi bu iltihaplanmada önemli bir mediyatördür (3,18). Kuru göz hastalarında proyangılı sitokinlerin oküler yüzey üzerinde aşırı ekspresyonu gözlenmektedir (19,20). İnterlökin(IL)-1 β , IL-6, IL-17, interferon- γ , tümör nekroz faktörü α , kemokin (C-C motifi) ligandı 2 ve matriks metalloproteinazlar gibi farklı yangılı mediyatörler oküler yüzeyin KGH ile ilişkili yangıda rol oynamaktadır (21,22).

Kuru Göz Hastalığının Sınıflandırılması

KGH, etyolojik sınıflama olarak aköz gözyaşı yetmezliği ve buharlaşmaya bağlı oluşan (evaporatif) kuru göz olarak ikiye ayrılmaktadır. Aköz gözyaşı yetmezliği, lakrimal gözyaşı sekresyonunun azalmasından kaynaklanır, Sjögren sendromu ve non-Sjögren sendromu olarak iki alt gruba ayrılabilir.

Sjögren sendromu, aktive edilmiş T lenfositlerinin lakrimal ve tükürük bezlerine sızarak asiner ve duktal hücrelerin apoptozuna ve daha sonra işlev bozukluğuna neden olduğu bir otoimmün ekzokrinopatidir. Kuru göz, bez hiposekresyonu, bezlerin muskarinik reseptörlerine karşı yönlendirilen antikörlerin veya gözyaşı filmindeki yangılı sitokinlerin neden olabileceği

nörosekretuar bloğu ile daha da kötüleşmektedir. Klinik olarak, hastalar hem göz kuruması hem de ağız kuruluğu (kserostomi) belirtileri göstermektedir. Tanı; yüzey epitel hücreleri (anti-Ro ve anti-La) tarafından açıklanan otoantijenler için laboratuvar testleri ile desteklenebilmektedir. Sjögren sendromu birincil hastalık olarak ortaya çıkabilir ancak daha sık bilinen sekonder otoimmün durumudur ve en yaygın olarak sistemik lupus eritematozus, poliarteritis nodoza, polianjiyomatozlu granülomatoz, sistemik skleroz, primer biliyer siroz veya karışık bağ dokusu hastalıkları görülmektedir.

Non-Sjögren sendromu dört ana kategoriye ayrılır. Bunlar; primer lakrimal bez eksiklikleri, sekonder lakrimal bez eksiklikleri, lakrimal bez kanallarının tıkanması ve refleks hiposekresyonu şeklindedir. Primer lakrimal bez eksiklikleri; yaşa bağlı kuru göz, konjenital alakrime, familial disotonomi (Riley Day Sendromu) olarak sekonder lakrimal bez eksiklikleri; gözyaşı bezinin infiltrasyonu, denervasyonu, ablasyonu olarak bilinmektedir (16,23).

Evaporatif kuru göz, patolojik açıdan yüksek düzeyde gözyaşı buharlaşması ile karakterizedir. İç koşullardan veya çevresel faktörlere maruz kalmaktan kaynaklanabilmektedir. İçsel bir nedene örnek olarak, araba kullanmak, televizyon izlemek, okumak ve bilgisayar işlerinden kaynaklanan göz kırpm oranının düşmesi verilebilir. Buna karşın, çevresel faktörler doğrudan dış yüzey üzerinde etkin olmaktadır. Bunlar; merkezi ısıtma, kuru iklim, hava kirliliği, rüzgâr, kimyasal yanıklar ve kontakt lens takma şeklindedir.

Meibom bezlerinin fonksiyon bozukluğundan kaynaklanan evaporatif kuru gözün en yaygın nedeni skuamöz debris, terminal bezi tıkanıklığı ve glandüler sekresyonda niteliksel veya niceliksel değişikliklerin eşlik edebileceği gri çizginin arkasında göz kapağı marjının kronik yangıdır. Meibom bezi disfonksiyonu (MBD), göz kanalı tıkanmasının morfolojik özelliklerine göre salgının artan viskozitesine ve bezlerden yağ eksprese edilememesine yarıklık lamba üzerinde bakılarak tanımlanabilir (Şekil 3.) (23). Şekil 3 soldaki görselde göz kapağı marjında telenjiektaziler, madarozis ve marjın kalınlaşması ve düzensizliği, oküler rozasea gibi iltihaplanma koşulları ile karakterizedir. Sağdaki görselde ise kronik şiddetli yangı konjonktival fibrozise neden olabilir.

Kalitatif sınıflandırma ile değerlendirme için kapak marjı rezervuarındaki yağ miktarını ölçmek amacıyla meibometri ve bez bırakma derecesini ölçmek için meibografi kullanılmaktadır. Nedenleri lokal, sistemik veya sendromal olabilmektedir (16,24).



Şekil 3. Göz kanalı tıkanmasının yarık lamba üzerinde incelenmesi

Kuru Göz Hastalığının Risk Faktörleri

- Yaşlı bireylerde lakrimal bezlerin kapasitelerinde meydana gelen azalma ile daha fazla görüldüğü bilinmektedir (25).
- Kadınlarda menopozdan sonra östrojen ve androjen seviyelerinde meydana gelen azalmayla erkeklere göre daha yüksek oranda görülmektedir (26).
- Nem, sıcaklık, hava akımı ve hava kalitesi çevresel faktörlerde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda tozlu, rüzgârlı ve uzun süre güneşe maruz kalan topikal iklim bölgelerindeki insanların KGH'a eğilimi yüksektir (27).
- Bilgisayar kullanımı, televizyon izleme, gece araç kullanma birçok oküler rahatsızlığı beraberinde getirir ve gözde yorgunluk, yanma, kızarıklık, yabancı cisim hissi, yaşarma, görmede bulanıklık gibi şikâyetler meydana gelebilmektedir (16).
- Diyetteki dengesizlikler, gıdalarda bulunan omega-3 yağ asitleri ile omega-6 yağ asitleri oranları, vücuttaki anti-yangılı aktiviteleri primer olarak etkilemektedir (28). Öte yandan A vitamini eksikliği lakrimal bezde hasar oluşturup goblet hücrelerin gelişimini bozarak KGH'a neden olabilmektedir (29).
- Sjögren sendromu (özellikle kadınlarda), menepoz, yaşlanma (her iki cinste) ve antiandrojenik ilaç kullanımı gibi etkilerim bu hormonların sentezinde azalmaya yol açarak KGH'a sebebiyet verebilmektedir (30).
- Sistemik ilaçlar, insanlarda yaşın ilerlemesiyle ortaya çıkan sistemik hastalığın tedavisinde kullanılan antikolinergikler, diüretikler, antihistaminikler, antiaritmikler, β -blokörler, postmenapozal hormon takviyeleri ve antiandrojeniklerin gözyaşı üretimini baskılayarak KGH'a neden olabileceği veya var olan hastalığı kötüleştirebileceği bildirilmiştir (26,30,31).

- Kontakt lens kullanımı, gözyaşının dinamiklerini bozarak oküler rahatsızlık ve kuruluk gibi durumlara neden olmaktadır. Lens kullanan bireylerin yarısından fazlasının KGH semptomlarından rahatsız olduğu bildirilmiştir (32).
- Otoimmün hastalıklar, hepatit-C, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV), radyasyon tedavisi ve kemik iliği transplantasyonu KGH'ın diğer önemli risk faktörleri arasında görülmektedir (16).

Kuru Göz Hastalığı Teşhisi

Tanısal testler, klinik bir denemede uygunluğun değerlendirilmesi ve değişikliklerin nicel olarak izlenmesi, oftalmologlar tarafından her gün klinik uygulamada teşhis yapılması ve Sjögren sendromu gibi klinik sendromun bir parçası olarak kuru gözün tanımlanması gibi farklı amaçlar için kullanılır (16,33-38). Gözyaşı filmi kırılma zamanı (GFKZ), epitel boyama ve oküler yüzey hastalığı indeksi (OYHI) gibi son zamanlarda yapılan testler, örneğin meibom bezi işlev bozukluğu, kuru gözler ve ömür boyu bilgisayar kullanımı/konfor düzeyleri gibi oküler yüzey bozukluğu arasındaki ilişkiyi bulmak için kullanılmaktadır (39). KKS tanısı, fiziki muayeneden elde edilen bilgiler birleştirilerek ve tanısal testler yapılarak konulur. Klinik bulgular ve hasta semptomları arasındaki zayıf korelasyon, çoklu testlerin kullanılmasını gerektirir. Genellikle KGH'ın kesin bir teşhisine izin vermek için 2 veya daha fazla test yapılır. Semptom anketleri, KGH'ın teşhisini koymaya yardımcı olmak ve tedavilerin etkilerini değerlendirmek veya hastalığın ciddiyetini değerlendirmek için de kullanılabilir.

Gözyaşı filmi kırılma zamanı: Gözyaşı filminin bir göz açıp kapayınca kadar dağılması için gereken zaman GFKZ olarak adlandırılır. Gözyaşı filmi stabilitesinin ölçümü için nicel bir testtir (16). GFKZ için normal süre 15-20 sn'dir. Bir floresein bant salinle nemlendirilir ve gözün alt kısmına uygulanır. Birkaç göz açıp kapama sonrası gözyaşı filmi, korneadaki ilk kuru lekelerin ortaya çıkması için mavi filtreli geniş bir yarıklı lambası kullanılarak incelenir. 5-10 saniyeden daha düşük GFKZ değerleri gözyaşı instabilitesini gösterir ve hafif-orta dereceli KGH olan hastalarda gözlenir (40). GFKZ, gözyaşı filmine floresein eklenmeden de ölçülebilir ve noninvaziv GFKZ olarak adlandırılır. Görüntü distorsiyonunu gözlemlemek için preorneal gözyaşı filmine yönelik bir ızgara veya başka desenler kullanılır ve gözlerin açılmasından ilk görüntü distorsiyonunun ilk belirtisine kadar geçen süre saniyeler içinde ölçülür (41).

Epitel boyama: Bir boyama yönteminde, göz yüzeyi yüzeyindeki anormallikleri, gözyaşı filminin kalitesini ve kuruluk şiddetini belirlemek için Rose Bengal, lisamin yeşili ve floresein gibi özel boyalar kullanılır (42). Kuruluk ciddiyetini anlamak için basit ve kolay bir yoldur. KGH'ın hafif vakaları Rose Bengal kullanılarak floresein lekесinden ziyade kolayca saptanır ve konjonktiva korneadan daha yoğun lekelenir (34,43). Boyama deseni, çeşitli skora sistemlerinden biri kullanılarak fotoğraflanıp derecelendirilebilir (42).

Epitel erozyonlarında floresein havuzları, dejenere veya ölü hücreleri lekeler ve korneayı konjonktivadan daha fazla lekeler. Lissamine yeşili Rose Bengal'e tercih edilir, çünkü Rose Bengal'le ilişkili ağrı, rahatsızlık ve kornea toksisitesinden kaçınır. Bununla birlikte, biraz daha az hassas ve daha geçicidir ve bu nedenle yarı lamba incelemesinde değerlendirilmesi daha zordur (42).

Schirmer testi: Schirmer testi, sabit zaman periyodu sırasında lakrimal bez tarafından gözyaşı üretimini kantitatif olarak ölçmektedir. Temel test topikal anestezi uygulanır ve daha sonra göz kapağının alt kısmına ince bir filtre kâğıdı bant yerleştirilerek yapılmaktadır (38,44). Hastanın gözleri 5 dakika boyunca kapalıdır ve kâğıdı ıslatan gözyaşı miktarı, ıslak şerit uzunluğu bakımından ölçülmektedir. Bu Schirmer II testi, lakrimal refleks arkının (45) uyarılmasıyla lakrimal bezin yırtılmasını ölçer ve 5 dakika sonra <15 mm ıslatılması anormal olarak kabul edilir. Sonuçlar, göz kapağının herhangi bir manipülasyonunun test sonuçlarını değiştirebileceği için değişkendir. Daha fazla yırtılma drenajı sonuçları etkileyebilir. Aköz gözyaşı eksikliği için 5 dakikada 6 mm'den daha az şerit ıslatma değeri, tanısız belirteç olarak kabul edilir. Schirmer I, hem temel hem de refleks yırtılmasını test eder ve temel teste benzer şekilde fakat topikal anestezi kullanılmadan gerçekleştirilebilir (46).

Gözyaşı fonksiyon indeksi (GFI): Gözyaşlarının nicel ölçümü için daha spesifik ve hassas bir testtir (38,42). Üretim ve drenajın gözyaşı dinamiklerini değerlendirir ve kuru gözden mustarip kişilerin tespit edilmesine yardımcı olur. Sayısal değeri Schirmer II test değeri milimetre cinsinden gözyaşı temizleme oranına bölünerek elde edilir. GFI'nın sayısal değeri ne kadar yüksek olursa, oküler yüzey o kadar iyidir. 96'nın altındaki değerler kuru gözler olduğunu gösterir. Aynı zamanda Liverpool modifikasyonu(değişikliği) olarak da adlandırılır (47).

Gözyaşı osmolaritesi: Normal gözün osmolaritesi 309-312 mOsm/L'dir ve KGH'ın ciddiyeti ile değer artar. Gözyaşı üretiminin nitel bilgilerini verir. Çok hassas bir testtir ancak

özgünlüğü yoktur. Lemp ve ark. (48), çok merkezli bir çalışmadan, GFKZ, boyama, Schirmer testi ve meibom bez derecelendirme gibi diğer testlerle karşılaştırıldığında, KGH'ın tanı ve şiddetinin belirlenmesinde en iyi tek yöntem gözyaşı osmolarite testinin olduğu sonucuna varmışlardır.

İmpresyon sitolojisi: Hastalığın etiyolojisi bilgisi, konjonktival ve lateral lakrimal bezlerin biyopsisinden elde edilebilir (49). İmpresyon sitolojisi, oküler yüzey biyopsisine asgari derecede invaziv bir alternatif olarak hizmet eder. Goblet hücre sayısındaki belirgin azalma ve keratinizasyon gibi oküler yüzey değişikliklerinin ilerlemesi yüzeysel tabakalar toplanarak mikroskopik olarak incelenir. (50). Çok duyarlı bir yöntemdir ancak uygun boyama ve uzman mikroskopik değerlendirme gerektirir.

Semptom anketleri: Anketler, KGH'ın farklı yönlerini, teşhis, yağış faktörlerinin tanımlanması ve yaşam kalitesi üzerine etki de dahil olmak üzere, farklı derinliklerde araştırır (51). Farklı anketlerde verilen soru sayısı 3 ila 57 arasında değişebilir. Belirti anketlerinin örnekleri arasında Begley ve ark. (51) kapsamlı kuru göz anketi, Schein ve ark. (52) anketi ve Schiffman ve ark. (53) OYHI anketi bulunur. Hastalara yönelik yapılandırılmış bir anket, klinisyenlerin potansiyel KGH olan hastaları taramasında yardımcı olur. Belirli bir anket, hastaları klinik bir çalışmaya almak veya tedavi için, yalnızca tanı amaçlı kullanım için verinin amaçlanan kullanımına bağlı olarak seçilebilir (54).

OYHI anketi 3 bölüm içermektedir; bölüm 1, her bir semptomun göreceli olarak ortaya çıkma sıklığına dayanmaktadır (örneğin, gözdeki kum hissi, ışığa duyarlılık ve bulanık görme), bölüm 2, belirli faaliyetlerde sınırlamaları belirten soruları içermektedir (okuma, gece sürüş, televizyon izleme) ve bölüm 3, çevresel koşulların (rüzgâr, düşük nem ve klima) gözler üzerindeki etkisine dayanır (55). Diğer sık kullanılan anketler;

- McMonnies Kuru Göz Anketi
- Kanadalı Kuru Göz Epidemiyolojisi Çalışma Anketi
- Kuru Göz Epidemiyolojisi Projeleri Anketi
- Kadınların Sağlık Çalışması Anketi
- Ulusal Göz Enstitüsü Görsel Fonksiyon Anketi
- Kontakt Lens Kuru Göz Anketi
- Kuru Göz Hastalığı Etki Anketi
- Oküler Konfor İndeksi (29)

Fluorofotometri: Bu yöntem pahalıdır ve gözyaşı akışının ve hacminin ölçülmesi için sodyum floresein bozulmasını kullanır. Gözyaşı içindeki floresein konsantrasyonunun aşılardan sonra dakika başına azaldığı yüzde olarak tanımlanan yırtılma devir hızı semptomatik KGH hastalarında da azalır (36). Gecikmeli klirens, kronik yangıya katkıda bulunabilecek artan gözyaşı sitokin konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (44).

Gözyaşı sıvısı protein immün testi: Gözyaşlarının protein bileşeni, lizozim, laktoferrin, epidermal büyüme faktörü (EBF), akuaporin 5, lipokalin ve IgA konsantrasyonlarının, enzime bağlı immünosorbent yöntemi (ELISA) teknikleriyle ölçülebilir (56). Gözyaşı lizozimi, toplam gözyaşı proteinin % 20-40'ını oluşturur ve lizozim reaktivite testi, miktar tayini için kullanılır; bununla birlikte en büyük dezavantajı bazı göz hastalıklarında özgüllüğü olmamasıdır. Kolorimetrik katı faz ve ELISA teknikleri laktoferrin analizi için kullanılır.

Gözyaşı mukus fering testi: Gözyaşı fering testi, gözyaşı/müsin, KGH ve hiperosmolaritenin kalitesini teşhis etmeye yardımcı olmak için kullanılabilir. Bir damla gözyaşı sıvısı alt göz kapağından toplanır ve daha sonra mikroskop lamı üzerine yerleştirilir ve buharlaştırılarak kurumaya bırakılır. Farklı dallanma kristalizasyon desenleri gözlemlenir ve sınıflandırılır. Test, kuru gözleri, fering modellerine dayanarak teşhis eder (57).

Diğer Testler: MBD, meibometri, meibografi veya meiboskopi gibi tekniklerle teşhis edilir (58). Gözyaşı buharlaşması, evaporimetri ile test edilir. Sjögren sendromunun teşhisi için lakrimal bez veya minör (tükürük) bez biyopsisi kullanılabilir. Histopatolojik bulgular KGH ve MBD'yi karakterize etmeye de yardımcı olur. Azalan gözyaşı akışı ve temizleme hareketi gözyaşı filmi döküntülerinin(debris) mikroskobik incelenmesi ile belirlenir.

Kuru Göz Hastalığı Tedavisi

Oküler yüzey hastalıklarının tedavisindeki amaçlar; semptomların rahatlatılması, net olarak görme ve yaşam kalitesinin artırılması, oküler yüzeydeki hasarın onarılması, gözyaşı filminin hemostatik seviyenin normale getirilmesi ve altta yatan nedenin düzeltilmesi üzerinedir (59).

KKS tedavisi çeşitlidir. Tedavinin amacı, kuru göz semptomlarını hafifletmek, hastanın rahatını arttırmak, oküler yüzeyi ve gözyaşı filmini normal duruma getirmek ve mümkün

olduğunda korneanın zarar görmesini önlemektir (42). Tedavi eğitimden, çevresel veya diyet değişikliklerinden, yapay gözyaşı ikameleri, punktal tıkaçlar ve topikal ve/veya sistemik anti-yangılı ilaçlardan cerrahiye kadar değişebilir.

Kuru göz şiddetinin derecesine göre tedavi seçenekleri;

1. Derece

- Eğitim ve tavsiyeler, çevresel faktörlerin düzenlenmesi
- Kuru göze neden olabilecek sistemik ilaçların kesilmesi
- Suni gözyaşı, damla ve jelleri
- Göz kapağı ile ilgili bozuklukların tedavisi

2. Derece

1. derecedeki tedaviler yeterli olmazsa:

- Anti-yangılı ilaçlar (kortikosteroidler, siklosporin)
- Tetrasiklinler (meibomianit ve rozasea için)
- Punktum tıkaçları
- Gözyaşı sekresyonunu uyaran ilaçlar eklenmelidir.

3. Derece

2. derecedeki tedaviler yeterli olmazsa:

- Otolog serum
- Kontakt lens
- Kalıcı punktal oklüzyon eklenmelidir.

4. Derece

3. derecedeki tedaviler yeterli olmazsa:

- Sistemik anti-yangılı ilaçlar
- Cerrahi (kapak cerrahisi; tarsorafî; mukoz membran, tükruk bezi, amniyon zar transplantasyonu) eklenmelidir (60).

Yapay gözyaşları: Yapay gözyaşları, KKS'deki eksik gözyaşı üretimiyle ilişkili kuruluk ve tahrişî tedavi etmek için kullanılan yağlayıcı göz damlasıdır. Yağlayıcı gözyaşları, OTC (over the counter) ürünleri olarak mevcuttur ve genellikle ilk tedavi hattıdır. Hafif hastalık koşulları, günde dört kez yağlayıcı madde damlalarının uygulanmasını gerektirirken, ciddi vakalarda daha sık (günde 10-12 kez) uygulama gerekir. Bu OTC ürünleri esas olarak içerikleri, endikasyonları ve koruyucuların mevcudiyeti bakımından çeşitlilik gösterir. Selüloz ve

polivinil türevleri, kondroitin sülfat ve sodyum hyaluronat gibi maddeler viskozitelerini, alikonma zamanlarını ve oküler yüzeye yapışmalarını belirler (61).

Gözyaşı damlalarının viskozitesindeki artış, etki süresini uzatır; ancak geçici bulanık görme ile sonuçlanır (62). Bakteriyel kontaminasyon riskini azaltmak ve raf ömrünü uzatmak için çok dozlu yapay gözyaşı kaplarına koruyucu maddeler eklenir. Birçok oftalmik ürün koruyucu madde içerir ve yan etki riski günlük uygulama sıklığı ve kullanım süreleri arttıkça artar (63). Klinisyen, hastanın koruyuculara duyarlılığını, kullanım sıklığını, hastalığın ciddiyetini, koruyucu madde içermeyen kontaminasyon riskini ve suni gözyaşı ürünü önerirken maliyeti göz önünde bulundurmalıdır.

Allergan'ın "Refresh Tears" ve Alcon tarafından "Tears Naturale" ve "Bion Tears" piyasada bulunan koruyucu içermeyen birkaç suni gözyaşıdır (63). Birçok oftalmolog, belirtileri ve semptomları azaltmak için orta ve şiddetli kuru göz şekillerinde yapay gözyaşlarıyla birlikte, diğer gözlerden, siklosporin, kortikosteroidler ve tetrasiklin gibi tedaviler kullanır. Yağlayıcı gözyaşı merhemleri gün boyunca kullanılabilir, ancak uygulamadan sonra zayıf görüş nedeniyle genellikle yatmadan kullanılırlar. Ek olarak her sabah hidroksi propil selüloz içeren Lacrisert gibi yapay bir gözyaşıda kullanılabilir (11).

Otolog serum göz damlası: Otolog serum göz damlası, sağlıklı oküler yüzeyi korumak için önemli olan hepatosit büyüme faktörü, EBF, A vitamini ve fibronektin gibi farklı gözyaşı bileşenleri içerir. Bütün bu bileşenler ticari ürünlerde mevcut değildir ve bu göz damlalarının KKS tedavisi için kullanımı tartışmalıdır (64).

Steroid olmayan anti-yanıklı ilaçlar ve antibiyotikler: Diklofenak sodyum ve ketorolak gibi ilaçlar içeren steroid olmayan anti-yanıklı damlaları, KGH ile ilişkili yangıyı azaltır. Eritromisin ve basitrasin gibi antibiyotikler içeren oftalmik merhemler, meibom bezi işlev bozukluğunun tedavisi için kullanılır (65).

Kronik KGH için topikal oftalmik sulu tetrasiklin çözeltisi geliştirilmiştir. KGH'da tetrasiklinler, antibakteriyel etkilerden ziyade, öncelikle iltihap önleyici etkileri için kullanılmaktadır (46).

Punktal tıkaç: Kanalin tıkanması ve böylece gözlerin gözlerin nazolakrimal drenajının önlenmesi ve böylece gözlerin kurumaması için "punktal tıkaç" adı verilen küçük bir tıbbi cihaz göze punkta yerleştirilir. Klinik çalışmalar, tıkanma tıkaçları olan punktal tıkaçların KGH

semptomlarını ve bulgularını iyileştirdiğini göstermiştir (66). Puntkal tıkaçlar genellikle orta ila şiddetli KKS'li kişiler için ayrılmıştır ve yapay tıkaç yerleştirilmesinden sonra yapay gözyaşı kullanımı gereklidir.

Kortikosteroidler: Loteprednol etabonat, deksametazon, prednizolon ve florometolon gibi topikal kortikosteroidlerin KKS ile ilişkili yangılı koşullarda etkili olduğu ve bunların konjonktiva, kornea ve anterior dünyanın yangılı koşullarının tedavisinde Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylandığı görülmüştür (26,46,67). Genellikle uzun süreli kullanım için oküler enfeksiyon, glokom ve katarakt gibi olumsuz etkilere yol açtığı için kısa süreli kullanım için önerilmektedir.

Siklosporin: Siklosporin A, birkaç oküler immün patolojide etkilidir. İlacın sistemik uygulaması, korneal greft reddi, otoimmün üveit ve KGH gibi sitokinleri içeren lokal oftalmik koşulların tedavisinde kullanılır; ancak ciddi böbrek ve kardiyovasküler komplikasyonlara neden olur (68). Yerel uygulama, bu ilaca geniş bir güvenlik profili kazandıran sistemik dağıtım ile ilgili çeşitli yan etkilerden kaçınır. Topikal siklosporin A, sulu üretim yetersizliği kuru gözü olan hastaların tedavisi için belirtilen ilk FDA onaylı ilaçtır ve uzun süreli tedavi için daha iyidir. % 0,05 oftalmik topikal emülsiyon "Restasis" olarak ve Hindistan'da Sun Pharma tarafından CycloMune olarak pazarlanmaktadır.

T lenfositlerin aktivasyonunu önleyen ve goblet hücrelerinde bir artış ile konjonktival epitelde yangılı sitokin seviyelerini önemli ölçüde azaltan oldukça spesifik bir immünomodülatördür (69). Ayrıca, aptoktozun mitokondriyal aracılı yollarını da inhibe eder (70).

Yapay gözyaşı tedavisine cevap vermeyen ılımlı, orta ve şiddetli KGH'nin tedavisinde topikal siklosporin kullanımını gösteren deneysel çalışma, topikal siklosporinin tüm KGH kategorilerinde yararlı etkiler gösterdiği sonucuna varmıştır (71). Yüksek hidrofobik özelliklerden dolayı, siklosporin A'nın topikal formülasyonu, farklı bitkisel yağlar kullanılarak hazırlanır, hastalar tarafından zayıf bir yerel tolerans ve düşük biyoyararlanım ile sonuçlanır (72). Birçok çalışma, yetersiz gözyaşı üretiminden kaynaklanan KGH'ı tedavi etmek için topikal siklosporin kullanımını desteklemiştir (73,74). Miseller, nanopartiküller ve lipozomlar gibi koloidal taşıyıcıların kullanılması, daha iyi tolerans ve oküler biyoyararlanım elde etmek için umut verici bir yaklaşımdır.

A vitamini: A vitamini, sağlıklı gözlerin gözyaşı filminde doğal olarak bulunan önemli bir besindir. A vitamini, sağlıklı bir gözyaşı filmi için çok önemli olan gözyaşı filminin en içten kayganlaştırıcı tabakası olan müsin tabakasının üretiminde önemli bir rol oynar. A vitamini eksikliği, müsin tabakası kaybına ve goblet hücresi atrofisine yol açar (75). A vitamini damlaları, gözleri serbest radikallerden, toksinlerden, alerjenlerden ve iltihaplardan korur. Kseroftalmi tedavisinde A vitamini sistemik uygulamasıyla birlikte yapılan topikal retinoik asit tedavisi araştırıldı (76). Tek başına etkili miktarda bir veya daha fazla retinoid, farmasötik olarak kabul edilebilir bir oftalmik araç içinde dağıtılabılır ve kuru göz bozukluklarının etkin tedavisi için topikal olarak uygulanabilir.

Omega-3 yağ asitleri: Günümüzde, göz doktorları tarafından esansiyel yağ asitleri ile oral destek önerilmektedir (46,77). Esansiyel yağ asitleri eikosanoidlerin öncüleridir, yerel olarak etki gösteren hormonlar, yangılı süreçlerde rol oynamaktadır (78). Esansiyel yağ asitleri, iltihabı azaltarak ve meibom lipidlerinin bileşimini değiştirerek KGH hastalarına fayda sağlayabilir. Klinisyenler KGH'ın rahatlamasını sağlamak için omega-3 yağ asidi diyetinin alımını önerebilirler (79).

Rashid ve ark. (28) Massachusetts Göz Araştırma Enstitüsü'nde ilk kez, belirli bir yağ asidinin topikal olarak uygulanmasının, KGH belirtilerinin tedavisinde yararlı olduğunu göstermiştir. Topikal alfa-linolenik asit tedavisinin hem göz hem de moleküler seviyelerde kuru göz ve iltihaplanma değişikliklerini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Bu nedenle, alfa-linolenik asitin topikal uygulaması, KKS'deki klinik bulguları ve yangılı değişiklikleri tedavi etmek için yeni bir tedavi olabilir.

KGH'da kullanılan bazı ilaçlar ile ilgili çalışmalar firma, dozaj ve ilaç formları ile birlikte Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kuru göz hastalığı için kullanılan ilaçlar

İlaç	Firma	Dozaj	Form	Yıl	Referans
% 0,18 Sodyum Hiyalüronat (Vismed®)	TRB Chemedica	Günde iki kez 2-6 damla	Göz damlası	2017	(80)
% 5 Lifitegrast (Xiidra™)	Shine	Günde 2 kez 1 damla	Oftalmik solüsyon	2017	(81)
% 5 Lifitegrast (Xiidra™)	Shine	Günde 2 kez 1 damla	Oftalmik solüsyon	2016	(82)
Kombine Terapi Göz Damlası (TheraTears® Lubricant Eye Drop)	Advanced	Günde en az 2-4 kez	Göz damlası	2017	(83)
Göz Hijyeni (TheraTears® SteriLid)		Günde 1-2 kez	Köpük		
Oral Omega-3 Takviyeleri (TheraTears® Nutrition)		Günde 1 kez 3 kapsül	Yumuşak jel kapsül		
% 2 Rebamipid	Otsuka	Günde 4 kez	Oftalmik süspansiyon	2015	(84)

Tablo 1. (devamı) Kuru göz hastalığı için kullanılan ilaçlar

İlaç	Firma	Dozaj	Form	Yıl	Referans
% 0,9 Serum Fizyolojik (Fizyol)	Vilsan	Günde 2 kez 5 µL	Oftalmik Solüsyon	2016	(85)
% 0,3 Sodyum Hiyalüronat (Vismed® Gel)	TRB Chemedica		Oftalmik Hipotonik solüsyon		
% 0,1 Diklofenak Sodyum (Inflased®)	Bilim		Oftalmik solüsyon		
% 0,1 Olopatadin (Patanol®)	Alcon		Oftalmik solüsyon		
% 1 Florometanol (FML®)	Allergan		Oftalmik süspansiyon		
% 0,05 Siklosporin A (Restasis®)	Allergan		Oftalmik emülsiyon		
% 3 Dikuafosol Tetrasodyum (Diquas®)	Santen	Günde 6 kez	Oftalmik solüsyon	2016	(86)
% 0,1 Sodyum Hiyalüronat (Hyalein®)	Santen		Oftalmik solüsyon		

Tablo 1. (devamı) Kuru göz hastalığı için kullanılan ilaçlar

İlaç	Firma	Dozaj	Form	Yıl	Referans
% 0,1 Vitamin A göz jeli	Sinqi	Günde 2 kez	Oftalmik jel	2016	(87)
Karbomer Göz Jeli (% 0,2 Karbomer 940, Liposic®)	Bausch & Lomb		Oftalmik jel		
Bevasizumab (100 µL, 2,5 mg/0.1 mL, Avastin™)	Genentech	100 µL 25 mg/mL subkonjonktival enjeksiyon	İntravenöz infüzyon için solüsyon	2015	(88)
% 0,05 Siklosporin A (Restasis®)	Allergan	Günde 2 kez	Oftalmik emülsiyon	2015	(89)
% 3 Dikuafosol Sodyum (Diquas)	Santen	Günde 6 kez	Oftalmik solüsyon		
% 0,5 Karmeloz Sodyum ve % 0,1 Hiyalüronik Asit	Allergan	Günde en az 2 kez	Oftalmik solüsyon	2015	(90)
% 0.5 Karmeloz Sodyum ve % 0,15 Hiyalüronik Asit	Allergan	Günde en az 2 kez	Oftalmik solüsyon		

Tablo 1. (devamı) Kuru göz hastalığı için kullanılan ilaçlar

İlaç	Firma	Dozaj	Form	Yıl	Referans
% 0,5 Karboksimetil Selüloz + % 0,1 Hiyalüronik Asit (Optive Fusion™)	Allergan	Günde 4 kez	Göz damlası	2015	(91)
% 0,5 Karboksimetil Selüloz (Refresh Tears™)	Allergan		Göz damlası		
% 0,1 Hiyalüronik Asit (Hycosan®)	Ursapharm		Göz damlası		
% 0,1 Siklosporin A (Ikervis®)	Santen	Günde 1 kez 1 damla	Oftalmik emülsiyon	2016	(92)
% 0,1 Hiyalüronik Asit	Taejoon	Günde 5-6 kez 1 damla	Oftalmik süspansiyon	2017	(93)
% 0,15 Hiyalüronik Asit	Taejoon	Günde 5-6 kez 1 damla	Oftalmik süspansiyon		
% 0,3 Hiyalüronik Asit	Taejoon	Günde 5-6 kez 1 damla	Oftalmik süspansiyon		
% 0,05 Siklosporin A (Restasis®)	Allergan	Günde iki kez 1 damla	Oftalmik emülsiyon		

Doğal Ürünlerle Yapılan Çalışmalar

İlaç geliştirme için doğal ürünlere olan ilgi, sentetik bileşiklerin olası olumsuz etkileri nedeniyle artmaktadır. KGH için doğal ürünlerle yapılan çalışmalara örnek olarak; zerdeçal (94), yaban mersini (95), Trabzon hurması (96), aloe vera (97), küt yapraklı yalancı servi (98), kayısı çekirdeği (99), anne sütü (100), yeşil çay (3) ve bal (101) verilebilir.

Kurkumin (diferuloylmethane) zerdeçal (*Curcuma-Longa*) bitkisinden izole edilen sarı renkli bir polifenoldür. Düşük çözünürlük ve oral biyoyararlanımı nedeniyle kurkuminin biyomedikal potansiyelinin kullanılması kolay değildir (94). Çalışmalarda kurkuminin antioksidan, anti-yangılı, anti-anjiyojenik ve yara iyileştirici etkilerinin olduğu gösterilmektedir (102,103). *In vitro*, *in vivo* ve insan klinik çalışmaları kurkuminin çoklu hücrel sinyal yollarıyla etkileşime girdiği ve sayısız moleküler hedefleri modüle ettiğini desteklemektedir. Kurkuminin zararsız yapısı, düşük maliyeti ve çoklu hedefleme potansiyeli, çeşitli göz hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde umut verici bir ajan haline getirmektedir. Kanıtların birikimi ön segment göz hastalıklarının tedavisinde güçlü bir terapötik aday olarak gösterilir ve KGH'da iltihap önleyici olarak kullanılmaktadır (94).

Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*) antioksidan özellikleri, kılcal damarların korunması ve göz rahatsızlıklarının tedavisi için araştırılmaktadır. Yaban mersini özündeki farmakolojik olarak en önemli aktif bileşen antosiyanozit flavonoidleri (antosiyeninler) olmasına rağmen vitaminler, şekerler, pektinler ve tanenler gibi diğer aktif bileşenler biyolojik etkilerini etkileyebilmektedir (104). Riva ve ark. (95) yaptığı çalışmada, standardize yaban mersini özütünün (Mirtoselect®) gözyaşı salımını iyileştirip antioksidan potansiyelini artıracaklarını göstermektedir. Özellikle artmış antioksidan potansiyeli ile yaban mersini ekstraktının ana aktif bileşenleri olan antosiyaninler arasındaki ilişki doğrulanmaktadır.

Trabzon hurması (*Diospyros kaki*) anti-ateroskleroz, anti-diyabet, anti-yangılı ve anti-nörodejeneratif etkiler gibi faydalı özellikleri nedeniyle geleneksel olarak bitkisel ilaçta kullanılmaktadır (105-109). Trabzon hurmasının yaprakları flavonoidler, terpenoidler, reçineler, polisakkaritler, klorofil, karoten ve benzeri gibi polifenolik bileşiklerin en yaygın grupları dahil olmak üzere aktif bileşenler içermektedir (110,111). Kim ve ark. (96) çalışmalarında, benzalkonyum klorür ile indüklenen fare kuru göz modelinde, Trabzon hurmasının etanol ekstraktının oral yoldan verilmesiyle yararlı etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, kuru göz koşullarında gözyaşı filmini stabilize edeceğini ve epitelin bütünlüğünü koruyabileceğini fare kuru göz modelinde iyileşmeler göstererek ve histolojik değerlendirmelerle desteklemişlerdir.

Aloe vera [*Aloe barbadensis* Miller (Liliaceae)] yara ve yanık iyileştirici etkileri ifade ettiği ve immün modülatör, anti-yangılı, antiparazitik, Ultraviyole (UV) koruyucu, antioksidan, antiviral, antitümör ve antidiyabetik aktiviteler gösterdiği gösterilmiştir (112-117). Woźniak ve ark. (97) yaptığı çalışmada, insan kornea hücreleri üzerindeki Aloe vera ekstraktının aktivitesi incelenmiştir. Aloe veranın etanol ve etil asetat ekstraktının göz damlalarında kullanılabileceğini savunmuşlardır. Kornea hücreleri için toksik olmadığı, immün modülatör aktivite gösterdiği ve anti-yangılı bir etkiye sahip olabileceğini söylemişlerdir.

Küt yapraklı yalancı servi (*Chamaecyparis obtusa*) Japonya'da ve Güney Kore'nin güney bölgelerinde bulunan tropik bir ağaç türüdür. Sitotoksik, antibakteriyel, antifungal, antioksidatif, antiapoptotik ve anti-yangılı etkiler de dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik etkinliklere sahiptir (118-125). Cui ve ark. (98) KGH'da küt yapraklı yalancı servi ekstraktlarının insan korneal epitel hücreleri üzerindeki etkileri ve antioksidan etkinliğini araştırmışlardır.

Kayısı (*Prunus armeniaca*) Türkiye, Çin, Japonya ve Kore'de yetişmektedir. Bu bitkinin taze ve kurutulmuş meyveleri dünya çapında bir gıda maddesi olarak kullanılmaktadır. Kayısı çekirdeği susuzluk, öksürük ve ateş yönetimi için birçok farmakolojik avantaja sahip olduğu bilinmektedir (126). Kim ve ark. (99) kayısı çekirdeği ekstraktının kuru göz üzerindeki terapötik etkisini ve ekzorbal lakrimal bez eksizyonu ile oluşturulan fare modelinde olası etki mekanizmasını saptamışlardır. Kayısı çekirdeği ekstraktının topikal olarak uygulanması gözyaşı sıvısı ve müsin salımını teşvik ederek tüm klinik göz kuruması belirtilerinin doz bağımlı olarak geliştirildiğini vurgulamışlardır.

Anne sütü, KGH tedavisinde daha önce incelenmiş çok sayıda bileşen içermektedir. Bu bileşenler epitelyal büyüme faktörü, vitamin A, laktoferrin, oligosakaritler ve omega-3 ve omega-6 yağ asitlerini içermektedir (28,127-130). Anne sütü ayrıca lizozimler, IgA ve IgG, IL-10 ve β -defensin-2 gibi sitokinler de dahil olmak üzere enfeksiyona karşı koruyan bileşenleri içermektedir (131-133). Asena ve ark. (100) anne sütünün korneal epitel yara iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmalarında, anne sütünün zengin içeriği epitelyal iyileştiricilere ve suni gözyaşlarına alternatif olabileceğini savunmuşlardır.

Geniş çaplı rahatsızlıklar için geleneksel bir tedavi olan bal, yakın zamanda antibakteriyel özellikleri ve etkili yara iyileşmesini teşvik etme kabiliyeti nedeniyle konvansiyonel tıpta kabul edilmektedir (134). Bal, asidik pH, yüksek osmolarite ve düşük su içeriğine sahip, aşırı doygun bir şeker çözeltisidir. Bu özellikler, mikroorganizmaların büyümesini engeller, ödemi azaltır ve epitelizasyonunu teşvik ettiği görülmüştür (135). Bal,

gerekli terapötik, antimikrobiyal ve anti-yangı özelliklere sahip olduğundan, KGH'ın tedavisinde uygun bir aday olabilmektedir. Jankauskiene ve ark. (101) KGH olan hastalarda korneanın ve konjonktivanın durumuna % 20 polifloral bal göz damlalarının olumlu etkilerini göstermişlerdir.

Yeşil çay (*Camellia sinensis*), antioksidatif, antibakteriyel, antiandrojen ve immünomodülatör özelliklere sahiptir. Yeşil çaydan çıkarılan ana bileşenlerden biri EGCG'dir (136). Çeşitli araştırmalar EGCG'nin otoimmün bozukluklarla ilgili iltihap üzerinde bir inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir (137-139). Lee ve ark. (3) topikal EGCG tedavisi, yangılı sitokinlerin ekspresyonunu ve korneada CD11b+ hücrelerinin infiltrasyonunu baskılayarak KGH'daki klinik bulguları ve yangılı değişiklikleri azaltabileceğini savunmuşlardır.

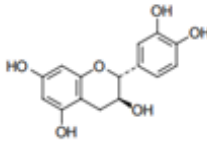
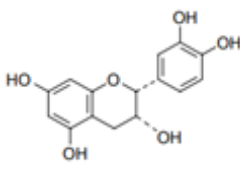
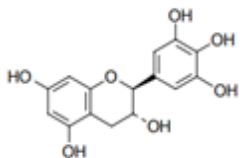
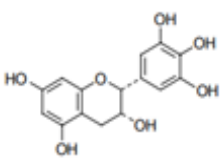
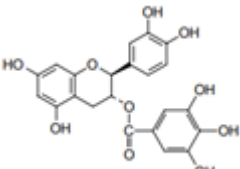
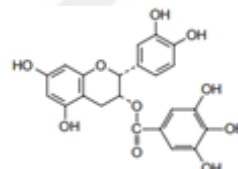
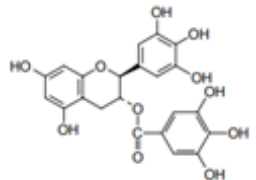
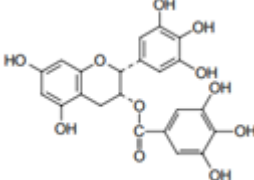
KATEŞİNLER

Yeşil çay; *Camellia sinensis* yapraklarının dehidrasyonu ile hazırlanır ve böylece polifenol içeriğinin oksidasyonu önlenir. Bu nedenle yeşil çay, monomerik polifenoller olan kateşin grubundan yüksek miktarda polifenol içerir.

Kateşinler, şarapta, meyvede ve çayda bulunan polifenol grubu flavanollerdir. Bu flavonoller grubu, kateşin (K), epikateşin (EK), epigallokateşin (EGK) alt gruplarını içerir. Kateşinler, doğal antioksidan etkinlikleri ile bilinir ve bitkilerde bulunan bu polifenoller, vasküler, viral, gastrointestinal ve yangılı hastalıkların tedavisinde kullanılır. Kateşinler yeşil çay yapraklarının temel biyoaktif bileşenlerini oluşturur (kuru ağırlığın % 25-35'i). Bir bardak yeşil çayda yaklaşık olarak 100-200 mg aralığında kateşin mevcuttur (140,141). Siyah çayda yeşil çaya göre daha az kateşin mevcuttur. Yapılan *in vivo*, *in vitro* ve klinik çalışmalarla kateşinlerin sağlığa yararlı birçok etkisi olduğu gösterilmiştir (142). Mercimek, fasulye çilek, elma, şeftali, kiraz, kakao, siyah ve yeşil çay kateşince zengin besinlerdir. Siyah çayda 250 mg/L, yeşil çayda 420 mg/L oranlarında kateşin bulunmaktadır (143).

Flavan-3-oller (kateşinler) flavanoid gurubunun bir üyesidir. Benzo- γ -piron türevi olup fenolik ve piron halkaları içermektedir (144). Flavonoidlerde bulunan çift bağ nedeniyle 8 farklı stereoizomeri vardır (Tablo 2).

Tablo 2. Kateşinlerin yapısı (145)

1. (+) Kateşin (K) 	2. (-) Epikateşin (EK) 
3. (+) Gallokateşin (GK) 	4. (-) Epigallokateşin (EGK) 
5. (+) Kateşingallat (KG) 	6. (-) Epikateşingallat (EKG) 
7. (+) Gallokateşingallat (GKG) 	8. (-) Epigallokateşingallat (EGCG) 

Özellikle çaydaki kateşinler, kimyasal olarak suda çözünen renksiz moleküllerdir. Moleküllerin kimyasal farklılıkları, molekül içindeki heterosiklik oksijen halkasının konformasyonuna dayanır. Fermantasyon sırasında, kateşinler, özel bir renk, aroma ve tat veren siyah çay formuna oksitlenir. Kateşinlerin antioksidan potansiyeli EGCG>EGK>EKG>EK olarak sıralanmaktadır (146).

Kateşinlerin gıdalarda bulunma miktarları dikkate alındığında (Tablo 3) geniş terapötik potansiyelleri ve ucuz maliyetleri, birçok hastalığın tedavisinde kullanımını cazip hale getirmektedir. Her bir kateşinin deneysel bulguları da klinik çalışmalarda elde edilmiş ve etkin dozlarda kullanımının toksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir (143).

Tablo 3. Yiyeceklerin içerdiği kateşin miktarı (143)

Yiyecekler	Kateşin İçeriği
Elma	17 mg/kg K + 129 mg/kg EK
Bitter Çikolata	610 mg/kg K + EK
Sütlü Çikolata	159 mg/kg K+ EK
Kakao	78 mg/L K + 132 mg/kg EK
Üzüm	1892 mg/kg K + 988 mg/kg EK + 353 mg/kg EKG
Kivi	4,5 mg/kg K + EK
Çilek	10-70 mg/kg K + 1 mg/kg EK
Siyah Çay	20 mg/L K + 37 mg/L EK + 73 mg/L EKG + 42 mg/L EGK + 128 mg/L EGCG
Yeşil Çay	21 mg/L K + 98 mg/L EK + 90 mg/L EKG + 411 mg/L EGK + 444 mg/L EGCG

Polifenoller, çayın en önemli kimyasal bileşenleridir ve taze çay yapraklarının kuru ağırlığının % 30'unu oluşturur (Tablo 4) (147).

Tablo 4. Çay yaprağının bileşimi ve kuru çaydaki yüzdesi (147)

Bileşen	(%)	Bileşen	(%)
Flavanoller	17-30	Kafein	3-4
EK	1-3	Aminoasit, Protein	15-19
EKG	3-6	Karbonhidratlar	4
EGK	3-6	Polisakkaritler	13
EGCG	9-13	Kül	5
K	1-2	Selüloz	7
GK	3-4	Lignin	6
Flavanol glikozitleri	3-4	Lipit	2-3
Polifenolik asitler	5	Organik asit	0,5-1,5
Antosiyaninler	2-3	Pigmentler	0,5
Toplam polifenoller	30-36		

EGCG Hakkında Genel Bilgiler

EGCG, çayda en fazla bulunan flavonoid olup yeşil çay aktivitesinin ana sorumlu bileşenidir. Flavonoidlerin, fenolik hidrojen atomları ile serbest radikalleri yakalayarak antioksidan aktiviteler gerçekleştirdikleri bilinmektedir (148). Çay kateşinleri, hidrojen atomundan serbest bir radikal reseptörü olarak hareket ederek zincir oksidasyon reaksiyonunu keserek antioksidan etkilerini sergilerler (146).

Kateşinler ince barsakta absorbe olmaktadır. EK ve EKG safra ve idrar yoluyla atılırken EGCG safra yoluyla atılmaktadır. Düşük absorpsiyon ve yüksek eliminasyon özelliklerinin olması sebebiyle biyoyararlanımları sınırlıdır. EGCG, 173 dk ile yarı ömrü en fazla olan kateşindir (149). Tarım ve Orman Bakanlığı'nın yayınladığı takviye edici gıdalar kısıtlı maddeler listesinde yer alan yetişkin günlük maksimum dozu 540 mg/gün'dür. 2D ve 3D yapıları Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir.

Epigallokateşin gallatın genel özellikleri (150);

Sinonim: (-)-*cis*-2-(3,4,5-Trihidroksifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3,5,7-triol 3-gallat,
(-)-*cis*-3,3',4',5,5',7-Heksahidroksi-flavan-3-gallat,
EGCG

IUPAC ismi: [(2R, 3R)-5,7-dihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-kromen-3-il] 3,4,5-trihidroksibenzoat

CAS kayıt numarası: 989-51-5 (Sigma-Aldrich)

Moleküler Formül: C₂₂H₁₈O₁₁

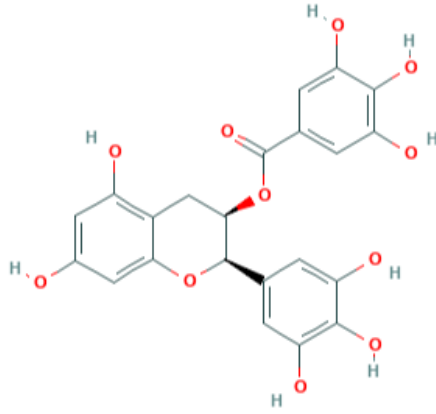
Moleküler Ağırlık: 458,4 g/mol

Saklama Sıcaklığı: 2-8 °C

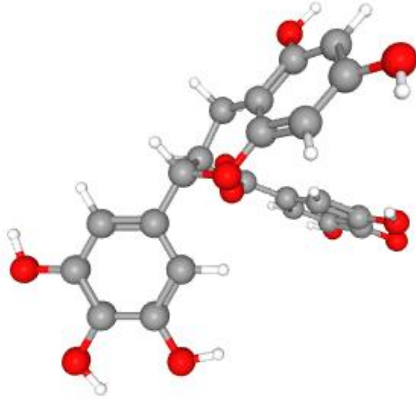
Görünüm: Toz

Erime Noktası: 218 °C

Suda Çözünürlüğü: Soluk sarı renkli çözelti, 5 mg/mL



Şekil 4. EGCG'nin 2D yapısı (150)



Şekil 5. EGCG'nin 3D yapısı (150)

NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER

Nanopartiküler sistemler, boyutları 10 ile 1000 nm arasında değişen katı kolloidal partiküllerdir. Hapsolmuş ya da adsorbe edilmiş şekilde bulunan etkin maddenin kontrollü olarak salımını gerçekleştirmek için geliştirilmiştir. Nanoteknoloji terimi 1974 yılında ilk kez nano ölçekli materyalleri açıklamak için Tokyo Üniversitesi'nden Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. Malzemelerin boyutları nano seviyeye düştükçe, nanomalzemelerin önceki koşullarına göre farklı ve gelişmiş özellikler gösterdiği belirlenmiştir (151). Eczacılık alanında, nanopartiküler sistemler üzerine ilk çalışmalar kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve aşılar kullanılarak yapılmıştır. Etkin madde veya maddelerin etkinliğini artırma, yan etki/toksisiteyi azaltma, stabilite sağlama/arttırma açısından nanopartiküler sistemlerden olumlu sonuçlar elde edilmiştir (152,153).

Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin fizyolojik ortamda parçalanması, etkin maddeyi veya maddeleri oluşabilecek çevresel etkilere karşı koruması, etkin maddeyi başarılı bir şekilde

hedef alana taşınması ve kontrollü bir şekilde salımının gerçekleştirilmesi beklenmektedir. Ek olarak bu sistemlerin gerektiğinde sterilize edilebilir ve dayanıklı olması gerekmektedir (154). Partikül büyüklüğü ilaç taşıyıcı sistemlerinin uygulanmasında ve özellikle pasif hedeflemede önemli bir rol almaktadır. Hazırlanan nanopartiküler sistemin; kararlılığı, partikül büyüklüğü, dağılım, yüzey ve salım özellikleri, biyolojik dağılımı ve toksisite açısından uygun olmalıdır. Nanopartiküler sistemlerin olumlu teknolojik avantajları aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- Taşıma kapasitesinin yüksek olması ve alana özgü hedefleme yapabilmesi,
- Hem hidrofobik hem de hidrofilik etkin maddeler hapsedilmek,
- Kan beyin bariyerini aşmak için uygun nanopartiküler sistemlerin hazırlayabilmesi,
- Nazal, parenteral, pulmoner ve oral gibi yollarla uygulanabilmesi,
- Etkin maddenin stabilitesinin sağlanması,
- İlaç etkinliğinin artırılmasının yanı sıra istenmeyen yan etki ve toksisitesinin azaltılmasıdır (155).

Nanopartikül Sentez Yöntemleri

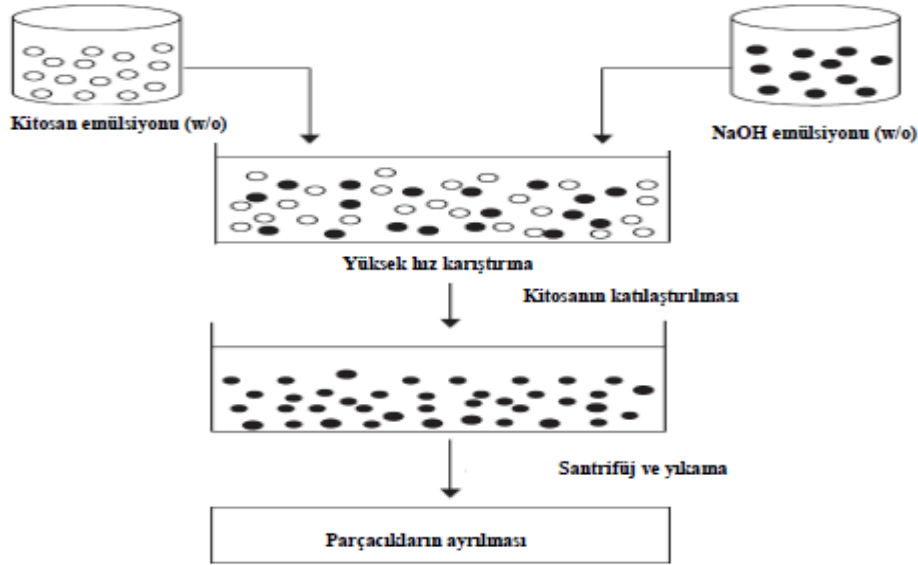
Boyutu genellikle 0,1 ve 10 mm arasında değişen kitosan endüstriyel alanlardaki kullanım için uygun boyutta değildir. Kitosan parçacıklarının boyutunun küçülmesi ile sahip olduğu özelliklerin arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla araştırmacılar kitosanın sahip olduğu özelliklerinden en verimli şekilde yararlanabilmek için boyutunun küçültülmesi ile ilgili çalışmalara yönelmişlerdir. Sonuç olarak mikro ve nano boyutta kitosan parçacıklarının üretilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (156). Bunlar;

- ❖ Emülsiyon Çapraz-Bağlama Yöntemi
- ❖ Çöktürme/Toplanma Yöntemi
- ❖ Sprey Kurutma Yöntemi
- ❖ Emülsiyon Damlacık Birleşme Yöntemi
- ❖ Ters Misel Yöntemi
- ❖ İyonik Jelleşme Yöntemi şeklindedir.

Emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi: Bu yöntem, çapraz bağlama ajanının aldehit gruplarıyla çapraz bağlanma için kitosanın reaktif fonksiyonel amin grubu kullanılarak gerçekleştirilir. Şekil 6'da emülsiyon çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi yer almaktadır. Yöntem, kitosanın sulu çözeltisinin yağ fazında emülsifiye edilerek bir su/yağ (yağ

İstenilen parçacık büyüklüğünü elde etmek için çeşitli parametrelere bağlıdır. Bunlar; nozzle büyüklüğü, atomizasyon basıncı, sprey akış hızı, giren hava sıcaklığı ve çapraz bağlanma derecesi şeklindedir.

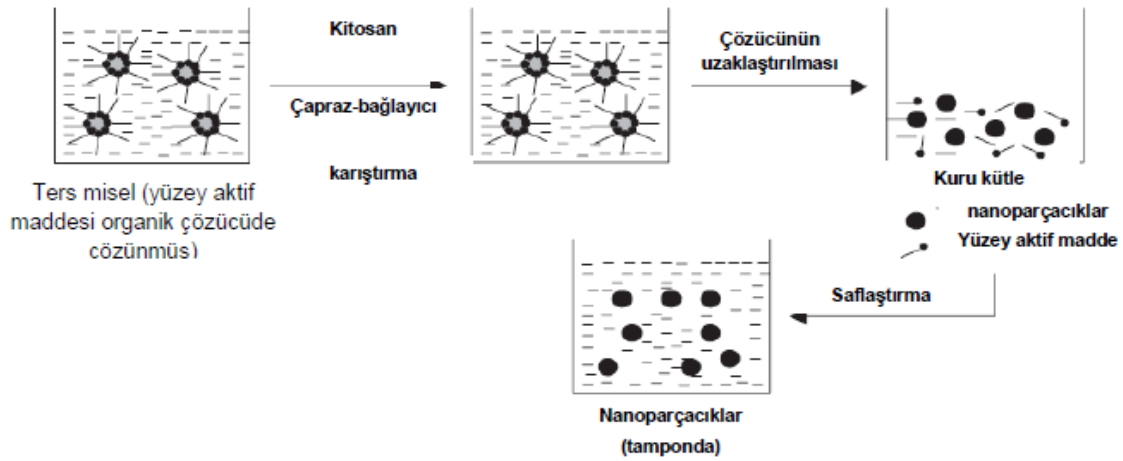
Emülsiyon-damlacık birleşme yöntemi: Emülsiyon-damlacık birleşme yöntemi, hem emülsiyon hem de çöktürme yöntemlerinin özelliklerinden yararlanılarak uygulanan bir yöntemdir. Bununla birlikte, bu yöntemde, kararlı damlacıkların çapraz bağlanması yerine, kitosan damlacıklarının NaOH damlacıkları ile birleşmesiyle çökme olayı gerçekleştirilir. İlk olarak, ilaçla birlikte sulu kitosan içeren stabil bir emülsiyon parafin içerisinde hazırlanır ve daha sonra aynı şekilde NaOH içeren kitosan sulu çözeltisini içeren başka bir kararlı emülsiyon hazırlanır. Her iki emülsiyon yüksek hızlı karıştırma altında birleştirilir ve her emülsiyonun damlacıkları rastgele çarpışır. Böylece küçük boyutlu parçacıklar vermek üzere kitosan damlacıkları çöker. Emülsiyon damlacık birleşme yöntemi şematik olarak Şekil 9'da gösterilmiştir (156).



Şekil 9. Emülsiyon-damlacık birleşme yönteminin şematik gösterimi

Parçacık büyüklüğü, kitosanın tipine bağlıdır, kitosanın % deasetilasyon derecesi (DD) azaldıkça, parçacık büyüklüğü artar, ancak yüklenebilecek ilaç miktarı azalır. Bu yöntemle yüksek deasetilasyon derecelerinde parçacık boyutu yaklaşık 400 nm olan ilaç yüklü nano parçacıklar üretilmektedir (156).

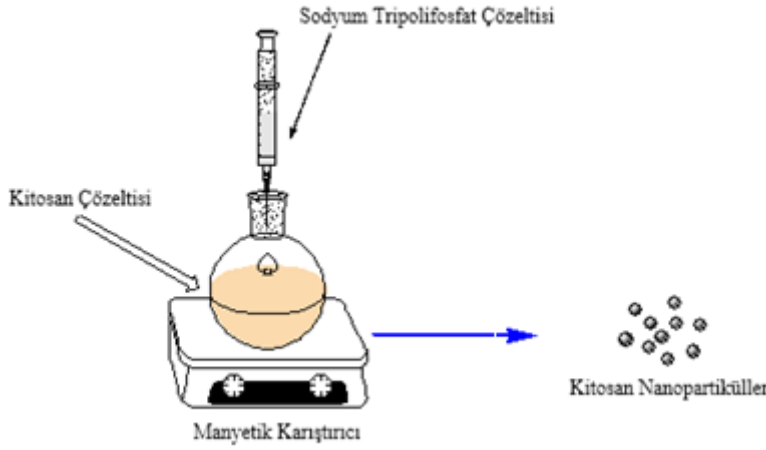
Ters misel yöntemi: Ters miseller, termodinamik olarak kararlı yapıya sahip su, yağ ve yüzey aktif maddelerin sıvı karışımlarıdır. Makroskopik olarak, homojen ve izotropiktirler, mikroskobik bir ölçekte yüzey aktif madde bakımından zengin filmler ile ayrılan sulu ve yağ mikrodomenleri halinde yapılandırılmışlardır. Ters misel barındıran sistemlerin en önemli yönlerinden biri dinamik davranışlarıdır. Geleneksel emülsiyon polimerizasyon yöntemleri ile sentezlenen nanopartiküller sadece büyük değildir (>200 nm), aynı zamanda geniş bir büyüklük aralığına sahiptir. Ters misel damlacıklarının sulu çekirdeği bu parçacıkları hazırlamak için bir nanoreaktör olarak kullanılır. Ters misel damlacıklarının boyutu genellikle 1 ile 10 nm arasında olduğundan ve bu damlacıklar oldukça monodispers olduğundan, ters misellerde ilaç yüklü nanopartiküllerin sentezlenmesi, dar bir boyut dağılımına sahip son derece ince parçacıklar üretimine olanak sağlar. Ters misel yöntemine ait şematik gösterim Şekil 10'da gösterilmektedir. Bu yöntemde yüzey aktif madde, ters miseller hazırlamak için bir organik çözücü içinde çözülür. Hazırlanan çözeltiye, KSC ve çapraz bağlayıcı madde eklenir. Elde edilen şeffaf haldeki çözeltiden çözücü buharlaştırılır ve geride yüzey aktif maddeyi ve nanopartikülleri içeren katı bir kütle kalır. Yüzey aktif madde saflaştırma işlemiyle ortamdan uzaklaştırılarak nano parçacıklar elde edilir (156).



Şekil 10. Ters misel yönteminin şematik gösterimi

İyonik jelleşme yöntemi: Reaktiflerin ve diğer istenmeyen etkilerin olası toksisitesini önlemek için kimyasal çapraz bağlama yerine elektrostatik etkileşimle tersinir fiziksel çapraz bağlayıcı maddelerin kullanıldığı bir yöntemdir. Sodyum tripolifosfat (NaTPP), katyonik haldeki kitosan ile elektrostatik kuvvetlerle etkileşime girebilen bir polianyondur ve genellikle çapraz bağlayıcı olarak kullanılır. İyonik jelleşme yönteminde, kitosanın katyonunu elde etmek

için kitosan, sulu asidik çözelti içinde çözülür. Elde edilen çözelti daha sonra polianyonik NaTPP çözeltisine sürekli karıştırılarak damla damla eklenir. Karşılıklı olarak yüklü türler arasındaki etkileşime bağlı olarak kitosan, iyonik jelasyona uğrar ve küresel parçacıklar oluşturmak üzere çöker. Oluşan NaTPP/kitosan nanopartikülleri (KNP), zayıf mekanik kuvvete sahip ve küresel yapıdadır (156). İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11. İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi

Nanopartiküllerin Sentezinde Kullanılan Polimerler

Nanopartiküllerin sentezinde doğal veya sentetik polimerler kullanılmaktadır. İlk sentezlenen nanopartiküller albümin gibi doğal polimerlerden ya da poli(metil metakrilat) gibi biyobozunur olmayan sentetik polimerden sentezlenmiştir. Proteinler ile sentezlenen nanopartiküllerde antijenik reaksiyonların oluşması gibi olumsuz sonuçlar meydana gelebilmektedir. Sentetik polimerler ile sentezlenen nanopartiküllerin biyobozunur olmaması toksisite açısından bir risk oluşturmaktadır. Nanopartiküllerin sentezinde yaygın olarak kullanılan polimerler Tablo 5’te gösterilmektedir. Bu tez çalışmasında doğal bir polimer olan kitosan kullanılmıştır.

Tablo 5. Nanopartikül sentezinde kullanılan bazı polimerler (157,158)

Polimer Tipleri	Polimer İsimleri
Sentetik Polimerler	Poli(laktid), Poli(n-bütilsiyanoakrilat), Poli(laktid-ko-glikolid), Poli(izobütilsiyanoakrilat), Poli(akrilat), Poli(metakrilat),
Doğal Polimerler	Aljinat, Albümin, Jelatin, Kitosan
Blok Kopolimerler	Poli(epsilon-kaprolakton)-poli(etilen glikol) Poli(laktid)-poli(etilen glikol)
Kolloidal Stabilizanlar	Dekstran, Poli(vinil alkol), Tween® 20 veya Tween® 80

Kitosan ve Özellikleri

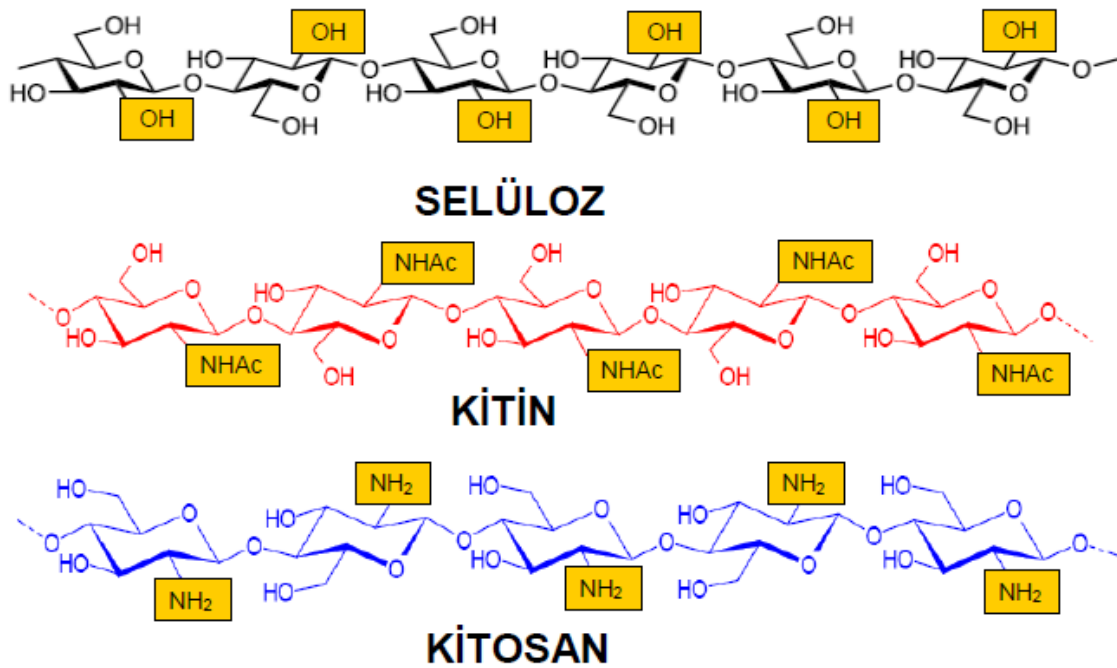
Kitosan, kitinin deasetillenmiş bir türevi olup katyonik türde bir polisakkarittir. Ayrıca β -(1,4)-2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeridir. Yapısal olarak selüloza beneyen kitosan aynı zamanda selüloz gibi bir fiberdir. Mantarların ve çeşitli kabuklu hayvanların hücre duvarı yapısında kendiliğinden bulunabilen bir bileşendir. Kabuklu hayvanların çevre atıkları % 14-35 arasında kitosan içermektedir. Aynı zamanda yenilebilir deniz ürünü işletim şirketlerinde yıllık $1,2 \times 10^5$ tondan fazla atık ürettiği bilinmektedir. Kitosanın sudaki çözünürlüğünün az olması birçok yararlı özelliğinin yeni bulunmasına neden olmuştur. Kitosanın formik asit, laktik asit ve asetik asit gibi farklı asit çözeltilerinde çözünebilir ve böylece polikasyonik polimer haline gelir (156,159,160).

Kuvvetli adsorbent özelliği gösteren kitosanın kullanım amacı da genellikle bu özelliği üzerinedir. Örneğin atık sularda bulunan ve çöktürme işlemiyle ortamdan uzaklaştırılması zor olan krom(VI) gibi ağır metallerin kitosan yüzeyine adsorbe edilerek uzaklaştırılması mümkündür. Medikal uygulamalarda ve ilaç sanayisinde de toksik özellik göstermemesi ve biyoaktif özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosanın günümüzdeki en yaygın kullanım alanı sindirim sisteminde bulunan yağları tutması nedeniyle zayıflama ilaçlarıdır. Kitosan aynı zamanda yaralanmalar durumunda eritrosit hücrelerini yara yüzeyine doğru çekmesi özelliği nedeniyle tıp ve askeri alanda pıhtılaşmayı sağlaması amacıyla kullanılır.

Kitosandaki azot içeriği DD bağlı olarak % 5-8 arasında değişmektedir. Kitosanın yapısında ağırlıklı olarak primer alifatik amino grupları bulunmaktadır. Bu amino gruplarının varlığı kitosanı kimyasal modifikasyona uygun hale getirir. Selüloz, kitosan ve kitinin kimyasal yapıları Şekil 12' de verilmiştir. Şekil 12'den de görüleceği gibi kitosan ve selülozun kimyasal

yapıları arasındaki tek fark C-2 konumundaki hidroksil grubu (-OH) yerine amin grubunun (-NH₂) bağlı durumda olmasıdır. Kitin ile selülozun kimyasal yapıları arasındaki tek fark ise; C-2 konumundaki hidroksil grubu yerine asetamido (NHCH₃CO) grubunun bağlı olmasıdır (160,161).

Kitinin uygulama alanları kitosana kıyasla sınırlıdır çünkü kitin kimyasal yapı olarak her ne kadar selüloza benzese de kimyasal olarak inerttir. Kitin; hegzafloaseton, dimetilasetamit ve hegzaflo-2-propanol gibi toksik özelliği yüksek olan organik çözücülerde çözünür ve bu durum kitinin çözünürlüğünü sınırlamaktadır (156).



Şekil 12. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları

Kitosanın molekül ağırlığı 50 ile 2000 kiloDalton arasında değişiklik gösterebilmektedir. Molekül ağırlığına bağlı olarak düşük, orta ve yüksek olarak molekül ağırlı olarak sınıflandırılabilir. Kitosan, kitinin deasetillenmesi sonucu elde edildiği için kitosanın DD de dikkate alınmalıdır. DD, % 40 ile % 100 arasında olabilir. Kitosan her ne kadar suda çözünmese de asidik ortamda (pH<6.5) oldukça iyi çözünmektedir. Ancak her asidik çözelti (örneğin; sülfürik asit, fosforik asit) kitosanın çözünmesi için uygun değildir. Bu yüzden çözünmesi amacıyla sitrik asit, formik asit ve asetik asidin seyreltik çözeltileri kullanılır. Asetik asit en yaygın olarak kullanılan standart çözücüdür. Kitosanın çözünürlüğü; derişime, asit

cinsine, DD'ye ve pH'a bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Asit derişimdeki azalma çözünlüğü doğrudan etkiler ve azaltır (162).

Kitosanın katyonik bir polisakkarit haline geçmesi yapısında kitin ve selülozdan farklı olarak bulunan amin grubunun çözünlme sırasında protonlanması sonucu pozitif yüklü hale gelmesiyle gerçekleşir. Kitosan yapısında bulunan zayıf bazik gruplardan dolayı pozitif yüklü hidrofilik özellikte bir polimerdir (163). Bu özelliğinden dolayı polianyonlarla, makromoleküllerle ve negatif yüklü polimerler gibi gruplarla kolay etkileşebilme yeteneğine sahiptir.

Kitosan; toksik olmaması, çözünlme sürecinde çevre kirletici organik çözücülere gerek duyulmaması, biyoyumlu ve biyobozunur durumda olması, bol miktarda bulunabilip yenilenebilir özellikte olması, katyonik yapıda bir polimer olmasından dolayı negatif yüklü yüzeyler ile kolay etkileşebilir olması, mikro ve nanopartiküllerin sentezindeki kolaylık ve antitümör, antimikrobiyal, antiülser, antioksidan gibi biyoetkileri olması nedeniyle birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (137).

Kitosanın sahip olduğu bütün özellikler araştırmacıların küçük boyutlardaki kitosan parçacıkları üzerindeki çalışmaları ile incelenmiş ve araştırılmıştır. Kitosanın boyutunun küçültülmesiyle ilgili 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalar sonucu mikro ve nano boyutta kitosan elde edilmiştir. Mikro ve nano boyutta boyutta elde edilen parçacıklar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, parçacık boyutunun küçülmesinin kitosanın sahip olduğu özellikler üzerinde büyük bir gelişme sağladığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar özellikle kitosanın antifungal, antimikrobiyal, antitümör ve antibakteriyel özelliklerinde önemli bir artışa sebep olmuştur (164).

Kitosan nanoapartiküllerin sahip oldukları yüzey alanı, mikro boyuttaki kitosan parçacıklardan ve deasetillenmeyle elde edilen kitosandan yüksektir. Bu yüzden KNP'ler bir avantaj olarak daha fazla aktif yüzey alanına sahiptir ve bu durum kitosanın bağlanma kapasitesini arttıran bir durumdur. Kitosanın biyoyumlu, biyobozunur, toksik özelliğe sahip olmaması ve KNP'nin boyutsal olarak getirdiğı özellikler, ilaç salım sistemlerinde kullanılmasını uygun hale getirmiştir. Nano boyutta kullanılan kitosan, ilaç yüklü parçacıkların kılcallara dahi girebilmesini sağlamakta ve hedeflenmiş ilaç salımını başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. Aynı zamanda kitosanın boyutlarının küçülmesi adsorbsiyon kapasitesini doğrudan arttırmaktadır (156).

Kitosanın Endüstriyel Uygulamaları

1990'lı yıllarda endüstriyel olarak kitosan, su arıtımı ve bitkilerin büyümesi gibi amaçlarla kullanılmıştır. Ancak ilerleyen yıllarda kitosan üzerinde yapılan çalışmalar artmış ve toksik özelliğe sahip olmaması, biyouyumluluk, biyobozunurluk, antibakteriyel ve antimikrobiyel etki gibi önemli özelliklerinin keşfi ile birçok alanda kullanılması mümkün olan bir polimer haline gelmiştir. Kitosanın kimyasal olarak yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar, nano boyutta partiküllerin sentezlenmesi ve katyonik bir polimer olması gıda, kozmetik, farmasötik, biyomedikal, biyoteknoloji, ürün ayırımı ve geri kazanımı, su arıtım sistemleri ve tarım gibi birçok alanda kullanımını arttırmıştır (165).

Su arıtma ve atık su iyileştirme işlemlerinde kitosanın sahip olduğu şelatlaşma özelliğinden yararlanır. Kitosan metal iyonları ile kompleks oluşturarak istenmeyen iyonların ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlar. Kitosanın endüstriyel alanda kullanımı yüksek geri kazanım oranı ve zaman tasarrufu sağlar. Kitosan, hücre ve enzim immobilizasyonu sırasında destek doku görevi görür ve aynı zamanda immobilizasyonu matrisidir. Destek doku olarak görev yapması hücre ve enzimlerin geri kazanımını ve daha fazla kullanımını sağlar (166,167).

Kitosanın proteinlerle kolayca film oluşturabilir özelliğe olması nedeniyle kozmetik alanında saç köklerinin ihtiyaç duyduğu protein ve vitaminlerin karşılanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca cilt bakımı, saç şekillendirici gibi diğer kozmetik uygulamalarda da kullanılabilir (168).

Katyonik yapıda bir polimer olması nedeniyle negatif yüklü heparin ile iyonik bağlı kitosan-heparin kararlı bileşimini oluşturur ve jel, film, boncuk ve fiber gibi farklı şekillerde hazırlanarak sargı bezi veya yara bandı gibi ürünlerde kullanılabilir hale getirilir.

Gıda endüstrisinde kullanılmak istenen kitosan; antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip olmalıdır. Aynı zamanda film oluşturma özelliğine sahip olmalı, yağ ve su bağlama kapasitesine sahip olmalıdır (168).

Biyomedikal alanda kitosan; gen tedavisi için ligand, yapay deri ve böbrek membranı, antitümör ilaç salımında ve kemik hasarlarının tedavisi gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

TABLETLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Günümüzde ağız yoluyla alınan ilaçlar içerisinde en sık kullanılanlar tabletler, aynı zamanda en çok tercih edilen farmasötik dozaj formlarını oluşturmaktadır. Kolay taşınabilir, uygulamasının kolay olması, üretim basamaklarındaki daha düşük maliyet, diğer kapsül formülasyonlarına göre daha yüksek dozlu etkin madde içeren durumlarda daha küçük bir

dozaj formuna sahip olma ve yüksek kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahip olmaları tabletlerin günümüzde en çok kullanılan dozaj formu olmasına açıklık getiren nedenlerden bazılarıdır (169).

Tanımı ve Özellikleri

Etkin madde ve farklı çeşitlerdeki yardımcı maddelerden meydana gelen homojen durumdaki toz karışımlarına özel bir makine ile basınç uygulanmasıyla elde edilen katı dozaj şekilleri tabletleri oluşturur. Tabletler istenilen büyüklükte ve oblong, yuvarlak, yarım bombeli, disk, mercimek veya silindir gibi şekillerde hazırlanabilirler. Aynı zamanda tabletler bağırsak veya mide kanalında su alıp şişebilir ve/veya dağılılabılır durumdadır.

Tabletlerin sahip olması gereken özellikler şunlardır (170):

- Aynı serideki tabletlerin ağırlık ve etkin madde içeriği aynı olmalıdır.
- Tablet bileşenleri birbiriyle ve etkin madde ile uyumlu olmalıdır.
- Beklenen farmakolojik aktiviteyi göstermelidir. Tablet bileşenleri ilacın biyoyararlanımını bozacak türde olmamalıdır.
- Zararlı mikroorganizma taşıyamamalıdır.
- Farmasötik standartlara uygun bir özellikte ve saflıkta olmalıdır.
- Basit formdaki tabletler 15 dakika içinde ve suda çözünür durumdaki film kaplı tabletler 30 dakika içinde dağılmalıdır.
- Fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı olmalıdır.
- Üretim, paketlenme, nakliye ve kullanım sırasında aşınmaya dayanıklı ve yeterince sağlam durumda olmalıdır.
- Friabilitesi % 1'den az olmalıdır.
- Belirli sertliklere sahip olmalıdır.

Farmasötik alanda; efervesan tabletler, kaplı tabletler, basit tabletler, çiğneme tabletleri, bukkal ve dilaltı tabletleri, katlı tabletler ve şeker kaplı tabletler olmak üzere farklı amaçlarda kullanılan pek çok tablet türü bulunmaktadır.

Tabletlerde Kullanılan Yardımcı Maddeler

Tabletlerde kullanılan etkin madde miktarına ve özelliklerine, hazırlama yöntemine, tabletin özelliğine ve kullanım amacına bağlı olarak seçilen pek çok yardımcı madde bulunmaktadır. Seçilen yardımcı maddeler tablet üretimi sırasında oluşabilecek problemleri

ortadan kaldıracak ve/veya azaltacak şekilde seçilmelidir. Aynı zamanda tabletin dağılmasını düzenleyip kullanılabilirliğini kolaylaştıracak şekilde olmalıdır (169). Yardımcı maddelerden; formülasyondaki diğer maddeler ile uyumlu olması, kararlı yapıya sahip olup aynı zamanda inert olması, farmasötik standartlara uygun özellikte olması, istenmeyen mikroorganizmaları ve/veya patojenleri içermemesi, kolay bulunabilir ve düşük maliyetli olması ve ilacın biyoyararlanımını değiştirmeden hedeflenen sürede salımını sağlaması özelliklerine sahip olması beklenir.

Kullanıldığı miktara bağlı olarak tablet içinde bir veya birden fazla, farklı işlevde yardımcı madde kullanılabilir. Yardımcı maddeler;

- Dolgu maddeleri
- Dağıtıcı maddeler
- Bağlayıcı maddeler
- Kaydırıcılar (Lubrikantlar)
- Akış düzenleyiciler (Glidantlar)
- Renklendirici, koku düzenleyici ve tatlandırıcılar
- Diğer maddeler (ıslanmayı sağlayıcı maddeler, asit-baz tamponlayıcılar, kaplama maddeleri vb.) şeklinde sınıflandırılabilir (169).

Dolgu maddeleri: Dolgu maddeleri tabletlerin yaklaşık olarak 2/3'ünü oluşturmaktadır ve düşük dozlardaki ilaçları uygun bir tablet boyutuna getirmesi amacı için kullanılır. Tabletten istenilen uygun basım ağırlığına getirilmesi dolgu maddesinin eklenmesi ile basımda kullanılacak toz karışımın yığın hacminin artırılması ile sağlanır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan modern dolgu maddeleri, aynı zamanda bağlayıcı olarak da kullanılabilmesi nedeniyle birden fazla görevi gerçekleştirebilir. Mikrokristalin selüloz bu duruma örnek olarak verilebilir. Laktoz en yaygın olarak kullanılan ve bilinen dolgu maddesidir. Doğrudan basımı için akış özelliği iyi olan püskürtmeli kurutulmuş tipi kullanılır. α -laktoz monohidrat ise yaş granülasyon amacıyla kullanılır. Susuz laktoz diğer laktozlarla karşılaştırıldığında basınç altında en sağlam tableti oluşturur. Laktoz dışında dolgu maddesi olarak dekstrin, toz edilmiş şeker, nişasta, mannitol, prejelatinize nişasta, sakaroz, kalsiyum sülfat ve kalsiyum fosfat da kullanılabilir (171).

Zaman içinde tabletlerde görülebilecek renklenmenin oluşmaması için amin grubu içeren maddeler laktoz ile amin tuzları da alkali kaydırıcı-laktoz kombinasyonu ile bir araya gelmemelidir. Sudaki çözünürlüğü az olan etkin maddelerde biyoyararlanım ile ilgili

problemlerle karşılaşmamak adına suda iyi çözünen dolgu maddelerinin kullanımını tercih edilir (171).

Dağıtıcı maddeler: Tabletın istenilen ortamda parçalanarak dağılmasını kolaylaştırması için kullanılan maddelerdir. Dağıtıcı maddeler su ile temas ettiklerinde genleşerek tabletlerin parçalanmasına neden olurlar. İlacın biyoyararlanımı ile dağıtıcı maddeler arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Dağıtıcı maddenin etkili olmasında konsantrasyonu, ilave ediliş şekli ve sıkıştırılma derecesi önemli rol oynamaktadır. En yaygın olarak kullanılan tablet dağıtıcı maddesi nişastadır. Bununla birlikte modifiye nişasta, mısır ve patates nişastaları, çapraz bağlı povidon, alijinik asit, hidroksipropil ve karboksimetil selüloz ve çapraz bağlı polimerler dağıtıcı maddeler örnek olarak verilebilirler (172,173).

Bağlayıcı maddeler: Toz parçacıklarının birbirlerine bağlanarak, tozlardan granül, granülden tablet oluşumunu sağlayan maddelerdir. Bağlayıcı maddeler kuru karışıma doğrudan eklenebileceği gibi aynı zamanda alkol veya su gibi çözücü yardımcı çözdürülerek eklenebilir. Bir tabletin tünlülüğü ve sağlamlığı bağlayıcı maddelere bağlıdır. En çok kullanılan bağlayıcı madde polivinilprolidondur. PVP hem suda hem de alkolde çözünebilir özellikte bir maddedir. Kullanımda genellikle % 2,5 ile % 5 arasında bir çözeltisi hazırlanır ve yaş granülasyonda kullanılır. Bağlayıcı maddeler hazırlama yöntemine bağlı olarak formülasyona dispersiyon/çözelti halinde veya kuru şekilde de ilave edilebilir. Tabletın dağılma ve çözünme süresini bağlayıcı madde miktarının etkilediği bilinmektedir (174). Nişasta müsilağı, arap zamkı, karaya zamkı, agar, Karboksimetil selüloz, jelatin, Hidroksipropil metilselüloz, mikrokristalin selüloz (Avicel) bağlayıcı olarak kullanılan maddelere örnek olarak verilebilir (174,175).

Kaydırıcılar (lubrikantlar): Tabletın mühreye yapışmasını önleyerek tablet presi ile tablet arasındaki sürtünme miktarını azaltırlar. Formüllere lubrikantların katılmasının amacı, tablet imalatındaki sürtünmeyi azaltacak bir yol bulunamamış olmasıdır. Yaygın olarak kullanılan ve en başarılı lubrikant magnezyum stearattır. Ayrıca sodyum benzoat, hidrojene bitkisel yağlar (Lubritab, Sterotex, vb.), talk, stearik asit, kalsiyum stearat ve sodyum laurilsülfattan oluşan Stearowet C gibi hafif mineral yağlar lubrikantlara örnek olarak verilebilir.

Lubrikantların çoğu suyu sevmeyen yapıda oldukları için tabletin dağılma ve çözünme miktarlarını azaltma ihtimalleri vardır. Bu durumu engellemek amacıyla lubrikantın yüksek konsantrasyonlarından kaçınılmalı ve lubrikant eklendikten sonra karıştırma süresi kısa tutularak hemen basım işlemi yapılması önerilir(169).

Akış düzenleyiciler (glidantlar): Granül ve tozların akış özellikleri, tabletin imalat sürecindeki en önemli etkilerden biridir. Akış özelliklerinin istenilen şekilde olmaması, tablet ağırlıklarında sapmaya, alt ve üst limitlerin dışına çıkılmasına ve sonuç olarak ta imalatın gecikmesine neden olur. Granül ve tozların birbiriyle temasında sürtünmeyi azaltmak için kullanılan ve yapışmayı engelleyen maddelere glidant denir. Glidantlar hem tozun akışını düzenleyici hem de yapışma önleyici özelliğe sahip oldukları için genellikle granülasyon basamağına ihtiyaç duyulmayan doğrudan basımda kullanılırlar. Kolloidal silikalar en önemli glidantlar olarak bilinirler. Kolloidal silikaların yanında sodyum lauril sülfat ve talk da aynı amaçla kullanılan diğer maddelerdir. Glidantlar toz karışımına veya granüleye sıkıştırma işleminden önce ilave edilen maddelerdir (176).

Renklendiriciler: Kolay yutulma ve tanınma, tadın maskelenmesi amaçlarıyla renkli filmlerle kaplanan tabletlerin sahip olduğu görünümün düzeltilmesi amacıyla kullanılan maddelerdir. Aynı zamanda farklı şekil ve renkteki tabletler tedavinin doğruluğunun kontrolünü sağlamak amacıyla yardımcı olabilirler. Tıbbi ürünlerde kullanılan renklendirici maddelerin yasal olarak kullanıma uygun olan boyalar olması gerekmektedir.

Tez Çalışmasında Kullanılan Yardımcı Maddeler

Laktoz monohidrat: Tabletler ve kapsüller içerisinde dolgu maddesi ve seyreltici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Partikül büyüklüğü dağılımı ve akış özellikleri gibi farklı fiziksel özelliklere sahip olan çeşitli laktoz monohidrat dereceleri piyasada bulunmaktadır. Genellikle, ince laktoz monohidrat dereceleri, tabletlerin hazırlanmasında ıslak granülasyon yöntemiyle veya işleme sırasında öğütme işlemi yapılırken kullanılır, çünkü diğer formülasyon bileşenleriyle daha iyi karışmasını sağlar ve bağlayıcıyı daha verimli kullanır. Laktoz monohidrat beyaz-beyaz kristalimsi parçacıklar veya toz halinde ortaya çıkar. Laktoz monohidrat kokusuzdur ve hafif tatlı bir tada sahiptir (177).

Avicel PH102: Mikrokristalin selüloz olarak bilinen Avicel PH102, tatsız, gözenekli, kokusuz ve beyaz bir tozdur. Higroskopik özelliğe sahip olup 20 kısım sodyum hidroksit çözeltisinde az çözünmektedir. Yüksek seyreltme potansiyeline sahip olup düşük kuvvet ve yoğunluğundan dolayı kolay basılabilmektedir. Partikül boyutu yaklaşık 90 mikrondur. Toz karışımlarına sıkışabilirlik ve iyi akış özelliği katmaktadır. Mikrokristalin selüloz direk basım işleminde bağlayıcı görevi görmektedir. Ayrıca tablet sertliği artırarak homojen tabletler hazırlanmasına imkân sağlamaktadır (177).

Magnezyum stearat: Öğütülmüş bir toz olup karakteristik renk ve kokuya sahip, beyaz renkli, ince partiküllü, düşük yığın özelliğine sahip bir tozdur. Etanol, eter ve suda çözünmeyip sıcak etanol ve sıcak benzende kısmen çözünmektedir. Formülasyonlarda genellikle % 0,25-1 aralığında lubrikant olarak kullanılmaktadır. Hidrofobik özellikte bir madde olduğundan etkin maddenin katı dozaj formdan serbestleşmesini geciktirebilmektedir (177).

Tozlarda Yapılan Kontroller

Tozlarda yapılan kontroller; nem içeriği tayini, küme dansite tayini, sıkıştırılmış dansite tayini, Housner oranı ve Carr indeks belirlenmesi, yığın açısı tayinidir (170).

Tabletlerde (Bitmiş Ürün) Yapılan Kontroller

Tabletlerde yapılan kontroller; görünüş tayini, tablet ağırlığı ve ağırlık tekdüzeliği tayini, kalınlık, çap ve sertlik tayini, friabilite (ufalanma-aşınma) tayini, dağılma zamanı tayini, miktar tayini ve içerik tekdüzeliği tayinidir (170).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER

Kimyasallar malzemeler;

- Kitosan (orta moleküler ağırlık) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Asetik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum tripolifosfat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Epigallokateşin gallat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- D-mannitol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Hidroklorik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Laktoz monohidrat (Supertab® 11SD) (DFE Pharma, Almanya)
- Avicel PH102 (Vivapur® 102) (JRS Pharma, Almanya)
- Magnezyum stearat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat (Merck, Almanya)
- Potasyum klorür (Merck, Almanya)
- Sodyum asetat (Merck, Almanya)
- Sodyum klorür (Tekkim, Türkiye)
- Etanol (Tekkim, Türkiye)

Araç ve gereçler;

- Analitik hassas terazi (Shimadzu AUW220D, Japonya)
- Saf su cihazı (Elga Micra, Birleşik Krallık)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Daihan MSH-20A, Kore)
- pH metre (Mettler Toledo IonS220, ABD)
- Çalkalayıcı su banyosu (Daihan Maxturdy-30, Kore)
- Soğutmalı santrifüj (Hermle Z326K, Almanya)
- Liyofilizatör (Christ Epsilon 2-4 LSCplus, Almanya)
- Vorteks (Daihan VM-10, Kore)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japonya)
- Zeta sizer (Malvern Nano-ZS, Birleşik Krallık)
- Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss EVO® LS10, Almanya)
- Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (Perkin Elmer Frontier, ABD)
- Termal gravimetrik analiz (Exstar Seiko 6300, Japonya)
- Nükleer manyetik rezonans (JEOL JNM-ECZ400S, ABD)
- Küp karıştırıcı (Pharma Test UAM UGD, Almanya)
- Dansite cihazı (Pharma Test PT TD200, Almanya)
- Nem tayin cihazı (Radwag MA50.R, Polonya)
- Ufalanma-aşınma tayin cihazı (Pharma Test PT F20E, Almanya)
- Disintegrasyon (dağılma) cihazı (Pharma Test PT ZS, Almanya)
- Tablet kalınlık, çap ve sertlik cihazı (Pharma Test PT B311E, Almanya)
- Tablet basma cihazı (TDP-5T Single Punch Tablet Press, Çin)
- 300 mg zımba-mühre seti (TDP-5T, Çin)
- Etüv (Daihan WON 50, Kore)
- Kuvartz küvet (TQP-Q-401, Türkiye)
- Buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- Otomatik pipet seti (Capp Bravo, Danimarka)

Bilgisayar programları;

- Microsoft Office Word
- Microsoft Office Excell
- EndNote X7

ETKİN MADDENİN UV-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM ile MİKTAR TAYİNİ

Epigallokateşin gallatın su ortamında stok çözeltisi (1 mg/mL) hazırlandı ve bu çözeltiden hareketle 10, 20 ve 40 µg/mL hazırlanan seyreltik çözeltilerin UV spektrumları 200-400 nm dalga boyu aralığında alındı. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu (λ_{max}) tespit edildi.

Epigallokateşin gallatın pH 7,4 fosfat tamponlu salin (PBS) ortamında stok çözeltisi (1 mg/mL) hazırlandı ve bu çözeltiden hareketle 10, 40 ve 80 µg/mL hazırlanan seyreltik çözeltilerin UV spektrumları 200-400 nm dalga boyu aralığında alındı. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu (λ_{max}) tespit edildi.

Epigallokateşin Gallata Ait Kalibrasyon Doğrularının Elde Edilmesi

Epigallokateşin gallatın kalibrasyon doğrusunu hazırlamak üzere su ortamında 1 mg/mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden yola çıkarak uygun seyreltmeler yapılarak 1-100 µg/mL konsantrasyon aralığında dokuz farklı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyon için 3 kez λ_{max} 'da absorbans değerleri okundu.

EGCG'nin kalibrasyon doğrusunu hazırlamak üzere pH 7,4 PBS ortamında 1 mg/mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden yola çıkarak uygun seyreltmeler yapılarak 1-80 µg/mL konsantrasyon aralığında sekiz farklı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyon için 3 kez λ_{max} 'da absorbans değerleri okundu.

Hazırlanan tüm konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonların absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu çizildi. Gerçekleştirilecek tüm analizlerde kullanılmak üzere doğru denklemi ($y=mx+n$) elde edildi.

Analitik Yöntem Validasyonu

Etkin maddenin miktar tayini için kullanılacak metot öncelikle güvenilir olması gerekmektedir. Güvenilir olmasının temel işlemi analitik yöntemin validasyonudur. Analitik yöntemin validasyonu, analiz edilecek etkin maddenin tayininde kullanılan analitik yöntemin, belirtilen şartlar altında doğru, özgün (spesifik) ve tekrarlanabilir olmasını sağlar (178).

Analitık yöntemin validasyon kriterleri;

- Özgünlük
- Duyarlılık
- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik)
- Stabilite ve
- Tutarlılıktır (179).

Doğrusallık: Bu çalışma, elde edilen deneysel sonuçlar ile analiz edilen aktif maddenin konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu aralığı belirlemek için yapıldı (178). Bu amaçla EGCG'nin su ortamında 1 mg/mL stok çözeltisi hazırlanmış, gerekli seyreltmeler yapılarak istenilen dokuz farklı konsantrasyona geçilmiş ve her bir konsantrasyonun absorbans değerleri okundu. Konsantrasyon değerlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilip doğru denklemi elde edildi.

Epigallokateşin gallatın pH 7,4 PBS ortamında 1 mg/mL stok çözeltisi hazırlandı, gerekli seyreltmeler yapılarak istenilen sekiz farklı konsantrasyona geçilmiş ve her bir konsantrasyonun absorbans değerleri okundu. Konsantrasyon değerlerine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilip doğru denklemi elde edildi.

Doğruluk: Analitik yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değerlere yakınlık derecesini gösteren önemli bir parametredir (178). Yöntemin gün içi (intra-assay) ve günler arası (inter-assay) doğruluğunu değerlendirmek için aşağıdaki denklem kullanıldı (180).

$$\text{Doğruluk} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

A = Ortalama tayin edilen konsantrasyon (µg/mL)

B = Hazırlanan konsantrasyon (µg/mL)

Kesinlik: Analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir göstergesidir (178). EGCG'nin su ortamında gün içi kesinlik ve doğruluğun tespiti için kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 3 farklı konsantrasyon (10, 20 ve 40 µg/mL) seçilerek aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri

gerçekleştirildi. Günler arası kesinlik ve doğruluğun tespiti içinde aynı 3 konsantrasyon (10, 20 ve 40 µg/mL) arka arkaya 3 gün boyunca absorbanları okundu. Yöntemin kesinliğinin sağlanması için ise ortalama, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları hesaplandı (181).

Epigallokateşin gallatın pH 7,4 PBS ortamında gün içi kesinlik ve doğruluğun tespiti için kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 3 farklı konsantrasyon (10, 40 ve 80 µg/mL) seçilerek aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirildi. Günler arası kesinlik ve doğruluğun tespiti içinde aynı 3 konsantrasyon (10, 40 ve 80 µg/mL) arka arkaya 3 gün boyunca absorbanları okundu. Yöntemin kesinliğinin sağlanması için ise ortalama, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları hesaplandı (181).

Saptama ve miktar tayini limiti: Saptama limiti (limit of detection, LOD), deneysel koşullar altında analiz edilen maddenin en küçük konsantrasyonunu ifade etmektedir. Bu limit, bir dizi düşük konsantrasyonlu örneklerin analiz edilmesiyle belirlenmektedir.

Miktar tayini limiti (limit of quantification, LOQ), deneysel koşullar altında örnekteki maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle belirlenebilen en düşük miktarıdır. Bu limit, bir dizi düşük konsantrasyonlu numunelerin analiz edilmesiyle belirlenmektedir. LOD ve LOQ değerleri çizilen kalibrasyon doğru denkleminde yararlanılarak aşağıdaki eşitliklerle hesaplandı (182).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

y_i = Ortalama absorban

\hat{y}_i = Derişimi bilinen maddenin doğru denkleminde karşılık gelen ortalama absorban

n = Kalibrasyon grafiğinde belirtilen konsantrasyon sayısı

LOD = 3.3 s/m

LOQ = 3 LOD

LOQ = 10 s/m

$S_{y/x}$ = Denklemden hesaplanan standart sapma

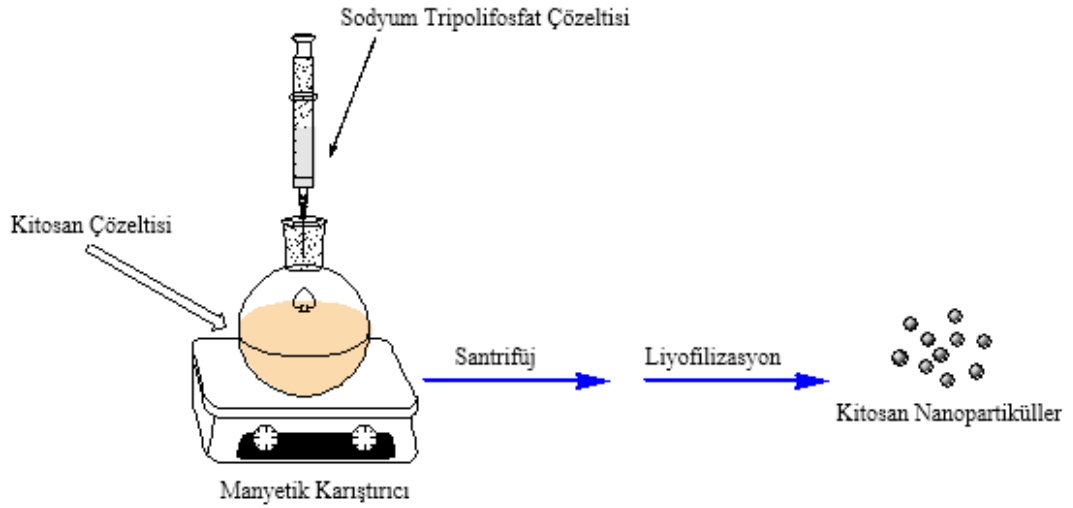
m = kalibrasyon doğrusunun eğimi

Özgünlük: Özgünlük, analitik bir yöntemin yalnızca amaçlanan maddeyi belirleme kabiliyetini gösterir (178).

Kitosan nanopartiküller ve EGCG yüklü manitollü KNP'lerin sentezinde kullanılan maddelerin (kitosan, NaTPP, mannitol gibi) istenilen dalga boyunda EGCG'nin aborbansını etkileyip etkilemeyeceğini ve bu yöntemin kullanılan etkin maddeye özgün olup olmadığı incelendi. Bu incelemede KNP'ler uygun ortamda çözündürülerek süpernatantların ve ortamın UV spektrumları alınarak incelendi.

NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI

Tez çalışmasında iyonik jelleşme yöntemi (Şekil 13.) kullanılarak manitolsüz/manitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP'ler aşağıda anlatıldığı gibi sentezlendi (183,184).



Şekil 13. İyonik jelleşme yöntemine göre KNP sentezi

2,2:1 Kitosan/NaTPP oranında mannitolsüz KNP'lerin sentezi (183);

- Asetik asit % 0,175 hacim/hacim (v/v)
- KSC₂ (% 0,1 ağırlık/hacim (w/v), % 0,175 v/v asetik asit; pH 3)
- NaTPP çözeltisi (% 0,1 w/v; pH 3)
- ❖ 50 mg kitosan 100 mL'lik beherde 50 mL % 0,175 v/v'lik asetik asit çözeltisi ilavesiyle bir gece boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen bir sıvı haline getirildi ve derişik asetik asit ile pH 3'e ayarlandı.
- ❖ % 0,1 w/v'lik NaTPP sulu çözeltisi hazırlandı ve derişik asetik asit ile pH 3'e ayarlandı.
- ❖ NaTPP çözeltisi, 30 saniye aralarla otomatik pipet yardımıyla 1 mL alınarak KSC₂'e bitene kadar eklendi.
- ❖ 4 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
- ❖ 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
- ❖ Santrifüj sonrası su ile yıkanarak vorteks yardımıyla liyofilizatör flakonuna alındı.
- ❖ 30 saat boyunca liyofilize edildi.

2,2:1 Kitosan/NaTPP oranında mannitollü KNP'lerin sentezi (183, 184);

- Asetik asit % 0,175 v/v
- KSC₂ (% 0,1 w/v, % 0,175 v/v asetik asit; pH 3)
- NaTPP çözeltisi (% 0,1 w/v; pH 3)
- Mannitol 2:1 oranında
- ❖ 50 mg kitosan 100 mL'lik beherde 50 mL % 0,175 v/v'lik asetik asit çözeltisi ilavesiyle bir gece boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen bir sıvı haline getirildi ve derişik asetik asit ile pH 3'e ayarlandı.
- ❖ % 0,1 w/v'lik NaTPP sulu çözeltisi hazırlandı ve derişik asetik asit ile pH 3'e ayarlandı.
- ❖ NaTPP çözeltisi, 30 saniye aralarla otomatik pipet yardımıyla 1 mL alınarak KSC₂'e bitene kadar eklendi.
- ❖ 4 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
- ❖ 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
- ❖ Santrifüj sonrası su ile yıkanarak vorteks yardımıyla liyofilizatör flakonuna alındı.
- ❖ Kriyoprotektan olarak 2:1 oranında 145,46 mg mannitol eklendi.
- ❖ 30 saat boyunca liyofilize edildi.

2,2:1 Kitosan/NaTPP oranında EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin sentezi (183,184);

- Asetik asit % 0,175 v/v
 - KSC (% 0,1 w/v , % 0,175 v/v asetik asit; pH 3)
 - EGCG (% 0,05 w/v)
 - NaTPP çözeltisi (% 0,1 w/v; pH 3)
 - Mannitol 2:1 oranında
-
- ❖ 50 mg kitosan 100 mL'lik beherde 50 mL % 0,175 v/v'lik asetik asit çözeltisi ilavesiyle bir gece boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen bir sıvı haline getirildi ve derişik asetik asit ile pH 3'e ayarlandı.
 - ❖ Tartılan 25 mg EGCG KSC'nin içine ilave edildi ve 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
 - ❖ % 0,1 w/v'lik NaTPP sulu çözeltisi hazırlandı ve derişik asetik asit ile pH 3'e ayarlandı.
 - ❖ NaTPP çözeltisi, 30 saniye aralarla otomatik pipet yardımıyla 1 mL alınarak kitosan-EGCG çözeltisine bitene kadar eklendi.
 - ❖ 4 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
 - ❖ 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
 - ❖ Santrifüj sonrası su ile yıkanarak vorteks yardımıyla liyofilizatör flakonuna alındı.
 - ❖ Kriyoprotektan olarak 2:1 oranında 145,46 mg mannitol eklendi.
 - ❖ 30 saat boyunca liyofilize edildi.

Liyofilizasyon programı Tablo 6'da gösterilmiştir;

Tablo 6. Liyofilizasyon programı

Yükleme	Dondurma	Birincil Kurutma	İkincil Kurutma
20 °C	-80 °C	-40 °C	-20 °C
	3 saat	24 saat	3 saat
		0,01 mbar	0,001 mbar

NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

İyonik jelleşme yöntemi kullanılarak sentezlenen manitolsüz/mannitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP'lerin karakterizasyonu yapı, morfoloji ve büyüklükleri üzerine yapıldı. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve yüzey potansiyelinin belirlenmesi için Zetasizer, yüzey morfolojisi için taramalı elektron mikroskobu (SEM), termal davranışları için termal gravimetrik analiz (TGA) ve kimyasal yapısının tayin edilmesi için fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile incelendi.

Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel

Mannitolsüz/mannitollü KNP'lerin ve EGCG yüklü manitollü KNP'lerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyellerinin belirlenmesi için Malvern Zetasizer Nano-ZS markalı cihaz kullanıldı. Liyofilize toz nanopartiküllerin seyreltik süspansiyonları (0,05 mg/mL) hazırlanarak ölçümler yapıldı(183).

Taramalı Elektron Mikroskobu İle Analiz

Mannitollü KNP'lerin ve EGCG yüklü manitollü KNP'lerin yüzey morfolojisi belirlenmesi için Zeiss EVO® LS10 markalı cihaz kullanıldı. Liyofilize nanopartiküller plakalara konularak 10 kV hızlandırma voltajında, 10000x ile yüzey görüntüleri alındı(184).

Termal Gravimetrik Analiz

Saf kitosan, manitolsüz/mannitollü KNP'lerin ve EGCG yüklü manitollü KNP'lerin termal davranışlarının belirlenmesi için Seiko Exstar TG/DTA 6300 markalı cihaz kullanıldı. Termogravimetrik analiz, 1 mL/dk bir akış oranı ile azot atmosferi altında 650 °C'ye kadar 30 ile 10 °C/dk aralığında bir ısıtma hızında yapıldı (185).

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi Analizi

Saf kitosan, manitolsüz/mannitollü KNP'lerin, EGCG yüklü manitollü KNP'lerin ve saf EGCG'nin kimyasal yapısının tayin edilmesi için Perkin Elmer Frontier cihazı kullanıldı. Spektrum aralığı olarak 4000-400 cm⁻¹ olup tarama toplamı ile spektrum kaydedildi (186).

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

Mannitollü KNP'lerin ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin kimyasal yapısının tayininde ¹H-NMR ve ¹³C-NMR'ları için JEOL JNM-ECZ400S cihazı kullanıldı. ¹H-NMR 400 MHz ve ¹³C-NMR 100 MHz'de çekildi. Solvan olarak dimetil sülfoksit-d6 (DMSO-*d*₆) kullanıldı.

NANOPARTİKÜL ÜRETİM VERİMİNİN HESAPLANMASI

Sentezlenen nanopartiküllerin üretim verimliliğini belirlemek için santrifüj sonrası çöktürülen nanopartiküller süpernatant kısımları atıldı, yıkama ile flakona alındı ve liyofilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Liyofilize edilmiş nanopartiküller tartılarak aşağıda verilen uygun formüle göre verim hesaplandı. Bu şekilde hem mannitollü KNP'lerin hem de EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin üretim verimliliği ayrı ayrı değerlendirildi.

$$\% \text{ Üretim Verimi} = \frac{\text{Nanopartiküllerin Ağırlığı}}{\text{Polimer ve Etkin Maddenin Ağırlığı}} \times 100$$

ETKİN MADDEİN YÜKLEME ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Sentezlenen EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin yükleme etkinliğini belirlemek için süpernatant kısmında serbest halde kalan etkin madde miktarına bakılarak bulunabilmektedir. Süpernatant 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek 0,2 µm filtreden geçirildi ve spektrofotometrik yöntem ile tayin edilerek nanopartiküllere yüklenen EGCG miktarı hesaplandı. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı (186).

$$\% \text{ YE} = \frac{(\text{Toplam eklenen EGCG miktarı} - \text{Süpernatandaki EGCG miktarı})}{\text{Toplam eklenen EGCG miktarı}} \times 100$$

IN VITRO ETKİN MADDE SALIM ÇALIŞMASI

In vitro etkin madde salım çalışması, ısıtıcılı ve yatay çalkalayıcılı Daihan Maxturdy-30 markalı su banyosunda gerçekleştirildi. Sıcaklığı 37 ± 0,5 °C, yatay çalkalayıcı 50 rpm olacak şekilde ayarlandı. Salım ortamı olarak pH 7,4 PBS hazırlandı. 50 mL'lik falkon tüplere 20 mg mannitollü KNP, 20 mg EGCG yüklü mannitollü KNP tartılarak üzerlerine 6 mL pH 7,4 PBS ortamı ilave edildi. EGCG için 3,3 mg tartılarak üzerine 20 mL pH 7,4 PBS ortamı ilave edildi. Belirli zaman aralıkların da (0, 15, 30, 60. dakikalarda, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168. ve devam eden saatlerde) salım ortamlarından 3'er mL alındı ve yerine aynı hacimde taze

ortam konuldu. Alınan örnekler, 4000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantta bulunan etkin madde miktarı UV-spektrofotometrik yöntem (274 nm) kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar % kümülatif salım değerleri hesaplanarak grafikler halinde gösterildi.

EPİGALLOKATEŞİN GALLAT YÜKLÜ MANNİTOLLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERDEN KURU GÖZ HASTALIĞI TEDAVİSİNE YÖNELİK TABLET FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Epigallokateşin gallat yüklü mannitollü KNP’lerden kuru göz hastalığı tedavisine yönelik tablet formülasyonunun geliştirilmesi için ön formülasyon çalışmaları yapıldı. Ön formülasyon (1. ve 2. formülasyon) çalışmalarında gerekli toz ve tablet kontrolleri yapılarak uygun formülasyon seçilip EGCG yüklü mannitollü KNP formülasyonuna geçildi.

Ön Formülasyon Çalışmaları

Etkin Madde (liyofilize ürün): Liyofilize edilmiş mannitollü KNP

Yardımcı Maddeler: Laktoz monohidrat

Avicel PH102

Magnezyum stearat

1. Formülasyon:

1 tablet için;

Rp

Laktoz monohidrat	196 mg	0,196 g
Magnezyum stearat	2 mg	0,002 g
<u>Liyofilize ürün</u>	<u>2 mg</u>	<u>0,002 g</u>
Toplam	200 mg	0,2 g

100 tablet için;

Rp

Laktoz monohidrat	19600 mg	19,6 g
Magnezyum stearat	200 mg	0,2 g
<u>Liyofilize ürün</u>	<u>200 mg</u>	<u>0,2 g</u>
Toplam	20000 mg	20 g

100 tablet için gerekli toz kütlesi hazırlandı. Hesaplanan miktar kadar yardımcı ve etkin madde hassas terazi kullanılarak tartıldı. Tartılan tozlar küp karıştırıcıda 200 rpm 15 dakika boyunca homojen olana dek karıştırıldı. Gerekli olan toz kontrolleri; nem içeriği tayini, küme dansite ve sıkıştırılmış dansite tayini, Housner oranı ve Carr indeksi belirlenmesi, yığın açısı tayini yapılarak tablet basımına geçildi. Tablet ağırlıkları 200 mg olması için uygun zımbamühre seti seçildi. Tablet cihazında gerekli ayarlamalar yapılarak tablet presinde manuel olarak tabletler basıldı.

2. Formülasyon:

1 tablet için;

Rp

Laktoz monohidrat	98 mg	0,098 g
Avicel PH102	98 mg	0,098 g
Magnezyum stearat	2 mg	0,002 g
<u>Liyofilize ürün</u>	<u>2 mg</u>	<u>0,002 g</u>
Toplam	200 mg	0,2 g

100 tablet için;

Rp

Laktoz monohidrat	9800 mg	9,8 g
Avicel PH102	9800 mg	9,8 g
Magnezyum stearat	200 mg	0,2 g
<u>Liyofilize ürün</u>	<u>200 mg</u>	<u>0,2 g</u>
Toplam	20000 mg	20 g

100 tablet için gerekli toz kütlesi hazırlandı. Hesaplanan miktar kadar yardımcı ve etkin madde hassas terazi kullanılarak tartıldı. Tartılan tozlar küp karıştırıcıda 200 rpm 15 dakika boyunca homojen olana dek karıştırıldı. Gerekli olan toz kontrolleri; nem içeriği tayini, küme dansite ve sıkıştırılmış dansite tayini, Housner oranı ve Carr indeksi belirlenmesi, yığın açısı tayini yapılarak tablet basımına geçildi. Tablet ağırlıkları 200 mg olması için uygun zımbamühre seti seçildi. Tablet cihazında gerekli ayarlamalar yapılarak tablet presinde manuel olarak tabletler basıldı.

Epigallokateşin Gallat Yüklü Mannitollü Kitosan Nanopartikül İçeren Tabletlerin Hazırlanması

İki formülasyon sonuçlarına bakılarak 2. formülasyona göre EGCG yüklü mannitollü KNP içeren tablet formülasyonuna geçildi.

Etkin Madde (Liyofilize ürün): Liyofilize edilmiş EGCG yüklü mannitollü KNP

Yardımcı Maddeler: Laktoz monohidrat

Avicel PH102

Magnezyum stearat

1 tablet için;

Rp

Laktoz monohidrat	98 mg	0,098 g
Avicel PH102	98 mg	0,098 g
Magnezyum stearat	2 mg	0,002 g
<u>EGCG yüklü liyofilize ürün</u>	<u>2 mg</u>	<u>0,002 g</u>
Toplam	200 mg	0,2 g

100 tablet için;

Rp

Laktoz monohidrat	9800 mg	9,8 g
Avicel PH102	9800 mg	9,8 g
Magnezyum stearat	200 mg	0,2 g
<u>EGCG yüklü liyofilize ürün</u>	<u>200 mg</u>	<u>0,2 g</u>
Toplam	20000 mg	20 g

100 tablet için gerekli toz kütlesi hazırlandı. Hesaplanan miktar kadar yardımcı ve etkin madde hassas terazi kullanılarak tartıldı. Tartılan tozlar küp karıştırıcıda 200 rpm 15 dakika boyunca homojen olana dek karıştırıldı. Gerekli olan toz kontrolleri; nem içeriği tayini, küme dansite ve sıkıştırılmış dansite tayini, Housner oranı ve Carr indeksi belirlenmesi, yığın açısı tayini yapılarak tablet basımına geçildi. Tablet ağırlıkları 200 mg olması için uygun zımbamühre seti seçildi. Tablet cihazında gerekli ayarlamalar yapılarak tablet presinde manuel olarak tabletler basıldı.

TOZLARDA YAPILAN KONTROLLER

Nem İçeriği Tayini

Final toz karışımının nem içeriği Radwag MA50.R nem tayin cihazı ile belirlenmiştir. Numune 105 °C’de kurutulularak sabit tartıma getirildi ve sabit tartım sonrası % nem içeriği belirlendi.

Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite, Housner Oranı Ve Carr İndeksinin Belirlenmesi

Final toz karışımının vuruş dansitesi Pharma Test PT TD200 vuruş cihazı ile belirlendi. Hazırlanan final toz karışımı mezür içine serbest akışla bırakılarak görünür hacmi belirlendi. Sıkıştırılmış dansite için vuruş sonrası okunan hacim değeri bizim için önemlidir. USP metoduna göre; ölçülen son iki hacim arasındaki fark % 2’den az olana kadar vuruşa devam edildi ve istenilen koşul sağlandığında vuruş sonrası okunan son hacim belirlendi. Aşağıdaki formüllere göre küme dansite ve sıkıştırılmış dansite özellikleri tayin edildi (187).

$$\text{Küme Dansite } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Tozun ağırlığı (g)}}{\text{Görünür hacim (mL)}}$$

$$\text{Sıkıştırılmış Dansite } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Tozun ağırlığı (g)}}{\text{Vuruş sonrası okunan hacim (mL)}}$$

Housner oranı ve Carr indeksi, görünür ve vuruş dansite değerleri kullanılarak aşağıdaki formüller yardımıyla tayin edildi. Kabul kriterleri Tablo 7’de verilmiştir (187).

$$\text{Housner Oranı} = \frac{\text{Sıkıştırılmış dansite}}{\text{Küme dansite}}$$

$$\text{Carr İndeksi} = \frac{(\text{Sıkıştırılmış dansite} - \text{Küme dansite})}{\text{Sıkıştırılmış dansite}} \times 100$$

Tablo 7. Carr indeksi ve Housner oranının kabul kriterleri

Carr İndeksi	Akış Özelliği	Hausner Oranı
≤ 10	Mükemmel	1,00 – 1,11
11 - 15	İyi	1,12 – 1,18
16 - 20	Serbest	1,19 – 1,25
21 - 25	Geçebilir	1,26 – 1,34
26 - 31	Zayıf	1,35 – 1,45
32 - 37	Çok Zayıf	1,46 – 1,59
> 38	Çok Çok Zayıf	> 1,60

YIĞIN AÇISI TAYİNİ

Yığın açısı tayini, milimetrik kağıt ile arasında 4 cm mesafe olacak şekilde bir huni yardımıyla yapıldı. Huninin alt kısmı kapatılarak toz numunesi konuldu. Alt kısmı açılmasıyla altına konulan milimetrik kağıt yardımıyla çapına ve cetvel ile yüksekliğine bakıldı ve aşağıdaki formül kullanılarak yığın açısı tayini gerçekleştirildi. Akış özellikleri ile ilgili yığın açıları Tablo 8’de verilmiştir (187).

$$\tan(\alpha) = \frac{\text{Yükseklik}}{\text{yarı çap}}$$

α : Yığın açısı

Tablo 8. Akış özellikleri ile ilgili yığın açıları

Akış Özelliği	Yığın Açısı (°)
Mükemmel	25 – 30
İyi	31 – 35
Serbest (İyileştirmeye ihtiyaç yok)	36 – 40
Geçebilir (Asılı kalabilir)	41 – 45
Zayıf (Karıştırılmalı, titreştirilmeli)	46 – 55
Çok Zayıf	56 – 65
Çok Çok Zayıf	> 66

TABLETLERDE YAPILAN KONTROLLER

Görünüş Tayini

Kapak atma, leke, yapışma veya kırılma gibi sorunların olup olmadığını belirlemek için 10 tabletin şekli ve yüzeyi görsel olarak kontrol edildi.

Tablet Ağırlıkları ve Ağırlık Tekdüzeliliği Tayini

Manuel olarak basılmış 20 tablet tek tek Shimadzu AUW220D markalı hassas terazide tartılarak ortalama tablet ağırlığı, SS ve % bağıl standart sapmaları (BSS) hesaplanarak bulundu. USP XXVIII'e göre iki tableten fazlası öngörülen % 5'lik sapmayı aşmamalı ve hiçbir tablette sapma öngörülen sapmanın iki katından fazla olmamalıdır.

Kalınlık, Çap ve Sertlik Tayini

Tabletlerin kalınlık, çap ve sertlik tayinleri Pharma Test PT B311E markalı cihazda gerçekleştirildi. Kalınlık ve çap kontrolleri 20 tablet, sertlik kontrolleri 10 tablette yapıldı. Elde edilen verilerin ortalamaları, SS ve % BSS'leri hesaplandı.

Friabilite (Ufalanma-Aşınma) Testi

Tozlarından kurtulan 10 adet tablet tartılarak Pharma Test PT F20E markalı friabilite cihazında dakikada 25 devir olarak 4 dakika boyunca friabilitörde bekletildi. İşlem sonrası tozlarından kurtulan 10 adet tablet tekrar tartıldı ve % cinsinden kayıp bulundu.

Ufalanma-aşınma miktarı % 1'i geçmemelidir.

Disintegrasyon (Dağılma Zamanı) Testi

200 mg olarak basılmış tabletlerden 6 tablet kullanarak 37 °C'de 900 mL su, 900 mL 0,1 N HCl, 900 mL pH 4,5 asetat tamponu ve 900 mL pH 6.8 fosfat tamponu içerisinde ayrı ayrı dağılma zamanı testine tabi tutuldu. Elde edilen verilerin ortalamaları, SS ve % BSS'leri hesaplandı. Tüm tampon ortamları Avrupa Farmakopesine göre hazırlandı.

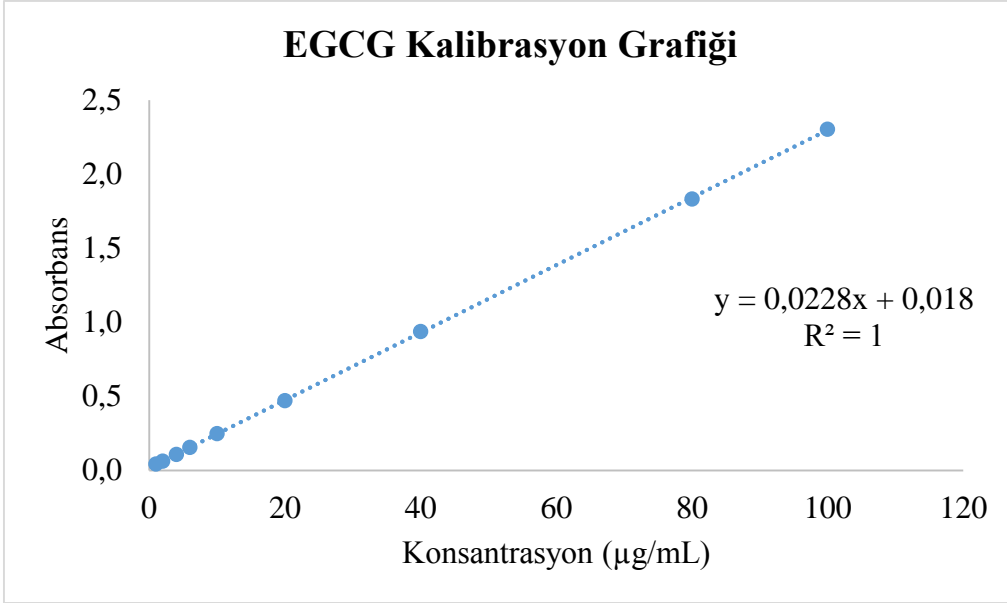
BULGULAR

ETKİN MADDEİNİN UV-SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ

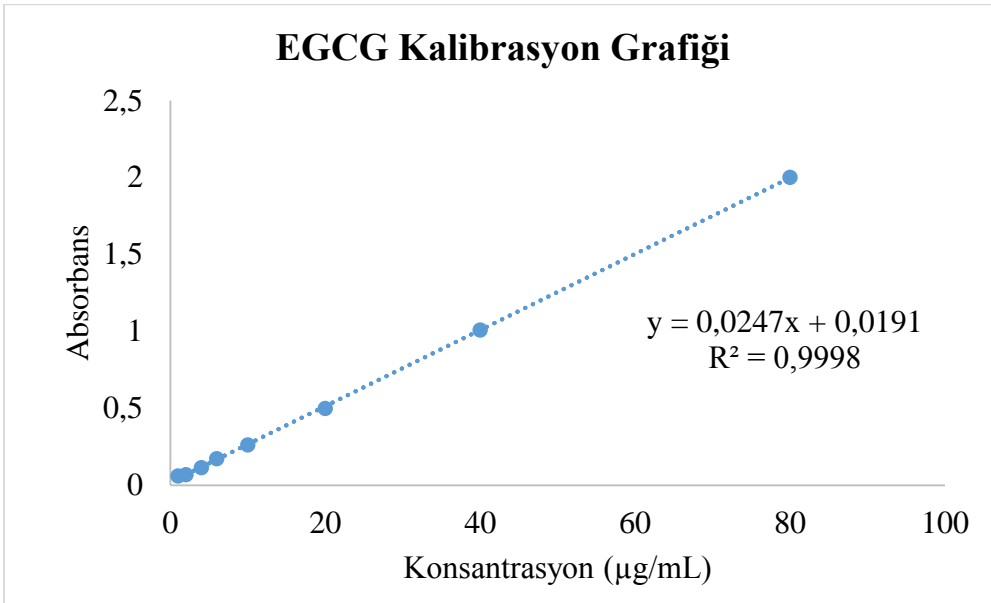
Epigallokateşin gallatın su ortamında ve pH 7,4 PBS ortamında stok çözeltileri (1 mg/mL) hazırlanmış ve bu çözeltilerden hareketle su ortamı için 10, 20 ve 40 µg/mL ve pH 7,4 PBS ortamı için 10, 40 ve 80 µg/mL hazırlanan seyreltik çözeltilerin UV spektrumları 200-400 nm dalga boyu aralığında alınmıştır. Maksimum absorbanstın elde edildiği dalga boyu 274 nm olarak tespit edilmiştir.

Epigallokateşin Gallata ait Kalibrasyon Doğruları

Epigallokateşin gallatın su ortamı için 1-100 µg/L aralığında hazırlanan dokuz farklı konsantrasyonu ve pH 7,4 PBS ortamında 1-80 µg/L hazırlanan sekiz farklı konsantrasyonunun absorbanst değerleri grafiğe geçirilmiştir. Regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğruları çizilmiştir (Şekil 14. ve Şekil 15.). Epigallokateşin gallatın su ortamı için $y=0,0228x+0,018$, pH 7,4 PBS ortamı için $y=0,0247x+0,0191$ doğru denklemleri elde edilmiştir.



Şekil 14. Su ortamındaki EGCG'ye ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi



Şekil 15. pH 7,4 PBS ortamındaki EGCG'ye ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi

Analitik Yöntem Validasyonu

Kullanılan analitik yöntemde gün içi (6 saat) ve günler arası (1, 2 ve 3. gün), doğruluk ve kesinliği bulmak için validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Su ve pH 7,4 PBS ortamı için kalibrasyon doğrularında sırasıyla bulunan 10, 20 ve 40 µg/mL ve 10, 40 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarına sahip standart çözeltiler alınarak gün içinde 6 saat arayla ve günler arasında 1, 2 ve 3. gün olacak şekilde ölçümleri yapılarak değerler bulunmuştur. Su ve pH 7,4

PBS ortamları için sırasıyla Tablo 9 ve Tablo 10'da doğruluk için bağıl hata (%), kesinlik için varyasyon katsayısı (%), gün içi ve günler arası n=6 olacak şekilde bulunmuştur.

Tablo 9. Su ortamındaki EGCG'nin gün içi (6 saat) ve günler arası (1, 2 ve 3. gün) doğruluk ve kesinlik sonuçları

	Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan	Doğruluk	Kesinlik
		Konsantrasyon (µg/mL) (Ortalama±SS)		
Gün içi (6 saat)	10	10,064 ± 0,005	0,643	0,051
	20	19,858 ± 0,004	-0,711	0,018
	40	40,284 ± 0,002	0,709	0,005
Günler arası (1,2 ve 3. Gün)	10	10,143 ± 0,071	1,425	0,699
	20	19,979 ± 0,107	-0,103	0,535
	40	40,339 ± 0,062	0,847	0,154

Tablo 10. pH 7,4 PBS ortamındaki EGCG'nin gün içi (6 saat) ve günler arası (1, 2 ve 3. gün) doğruluk ve kesinlik sonuçları

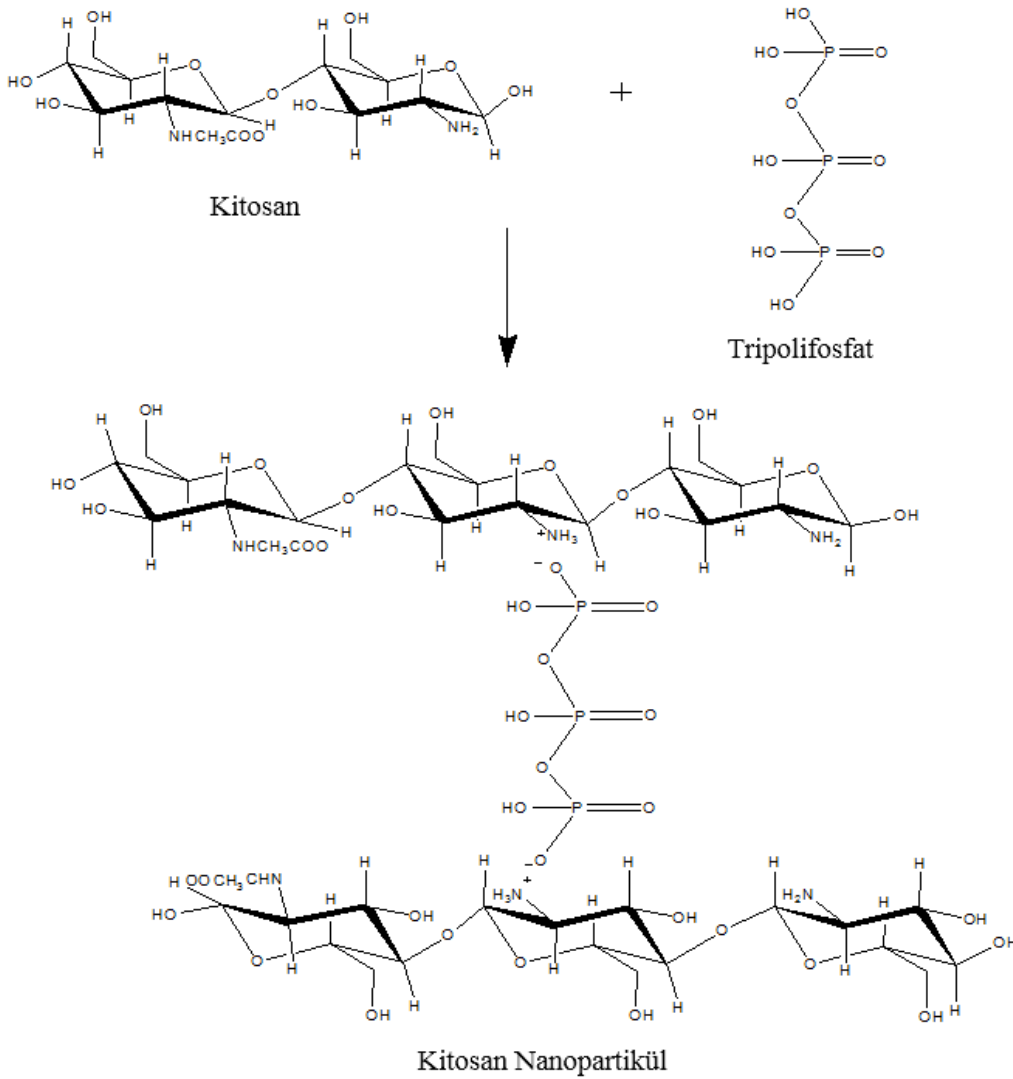
	Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan	Doğruluk	Kesinlik
		Konsantrasyon (µg/mL) (Ortalama ± SS)		
Gün içi (6 saat)	10	9,832 ± 0,084	-1,677	0,859
	40	40,015 ± 0,056	0,038	0,140
	80	80,254 ± 0,028	0,318	0,034
Günler arası (1,2 ve 3. Gün)	10	9,864 ± 0,032	-1,364	0,327
	40	40,056 ± 0,039	0,141	0,096
	80	40,251 ± 0,019	0,314	0,023

Analitik yöntemin duyarlılığı, doğru denklemlerinin yardımıyla standart sapma ve eğime göre hesaplanmıştır. Su ortamındaki EGCG için LOD 0,75 µg/mL, LOQ 2,24 µg/mL ve pH 7,4 PBS ortamındaki EGCG için LOD 1,24 µg/mL, LOQ 3,73 µg/mL olarak bulunmuştur.

Yöntemin özgünlüğü formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin EGCG ile aynı dalga boyunda absorbanans verip vermediğine UV spektrum sonuçlarına bakılarak karar verilmiştir. EGCG'nin maksimum absorbanans verdiği 274 nm dalga boyunda ortam bileşenleri ve yardımcı maddelerin absorbanans vermediği tespit edilmiştir.

KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZ MEKANİZMASI

İyonik jelleşme yöntemi kullanılarak sentezlenen KNP'lerin sentez mekanizması Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. KNP'nin sentez mekanizması

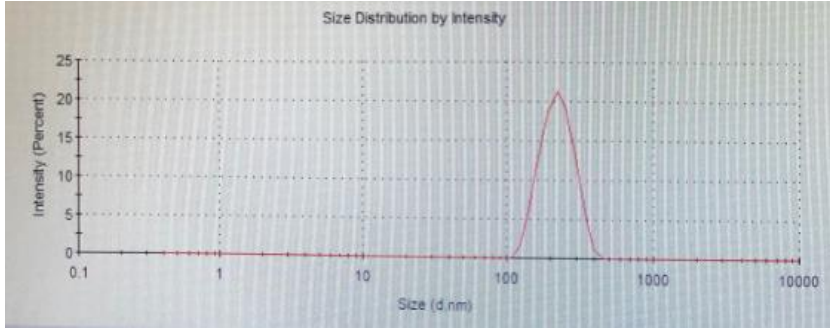
NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR

Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel

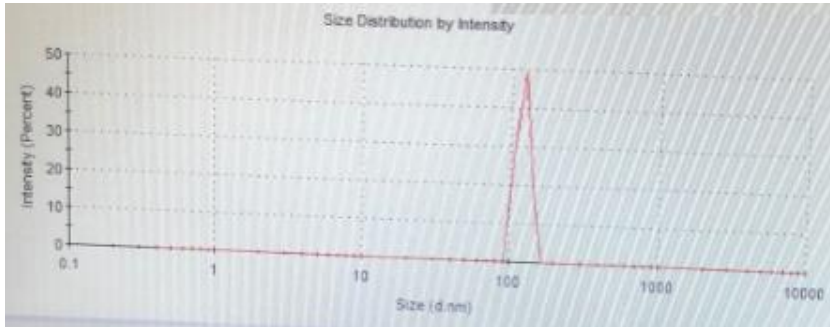
2,2:1 oranında sentezlenen liyofilize edilmiş mannitolsüz/mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 11 ve Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19'da gösterilmiştir.

Tablo 11. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitolsüz/mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin ortalama partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri

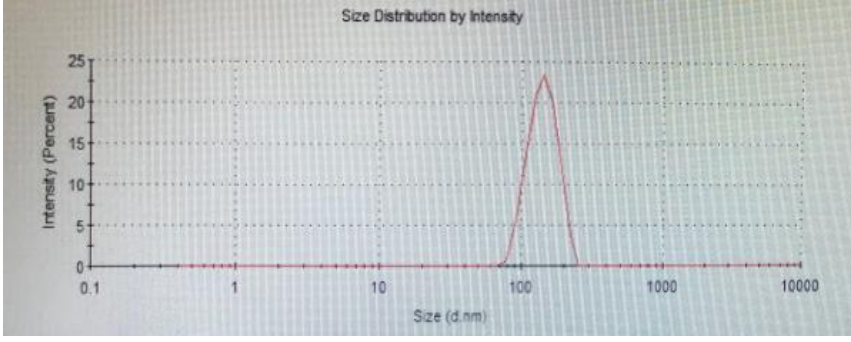
Formülasyon	Ortalama Partikül Büyüklüğü (d.nm; n=3)	Zeta Potansiyel (mV; n=3)	PDI (n=3)
Mannitolsüz KNP	417,30 ± 20,42	-18,38 ± 0,46	0,45 ± 0,03
Mannitollü KNP	125,53 ± 11,40	-24,43 ± 2,86	0,43 ± 0,06
EGCG yüklü mannitollü KNP	196,5 ± 21,03	-24,57 ± 0,55	0,32 ± 0,04



Şekil 17. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitolsüz KNP'lerin büyüklük dağılımları



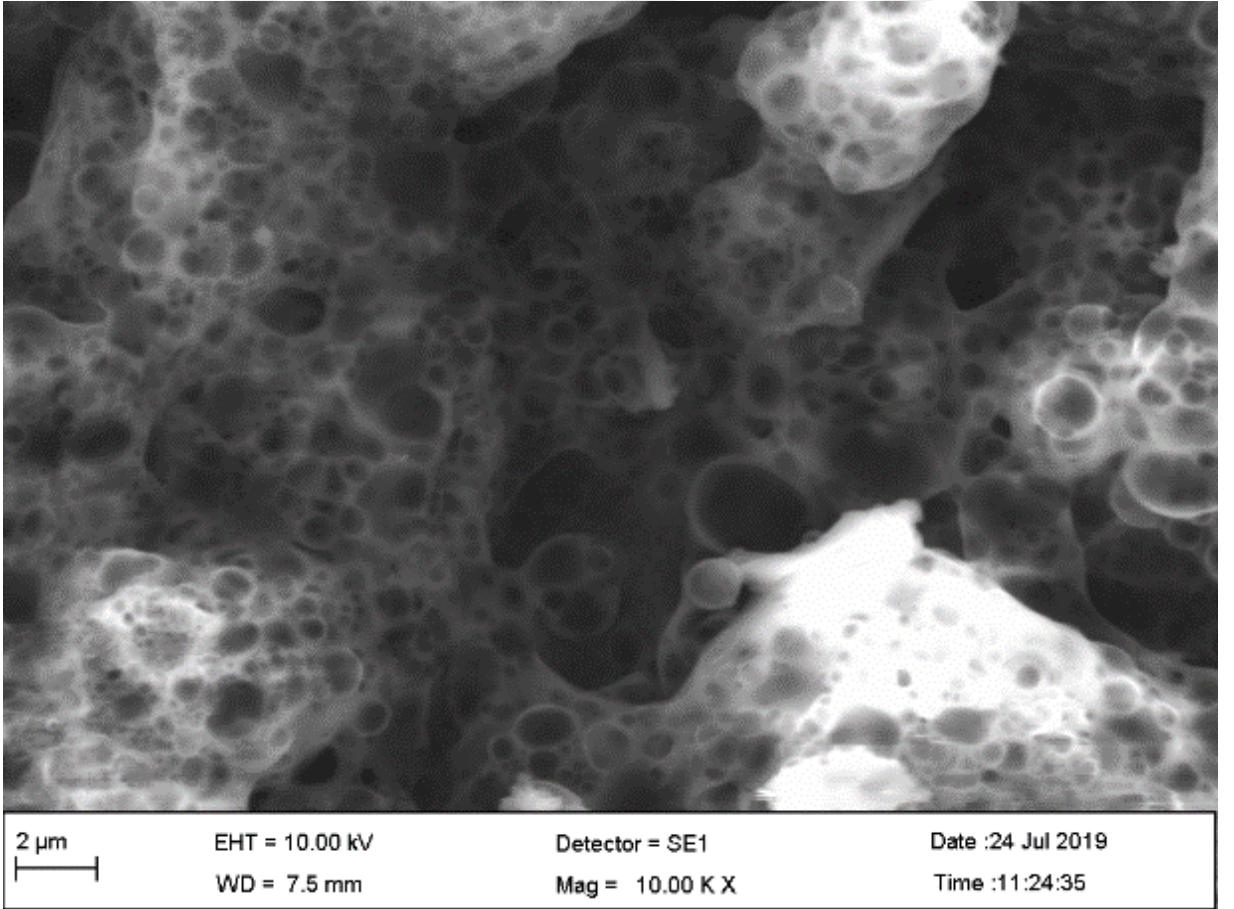
Şekil 18. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitollü KNP'lerin büyüklük dağılımları



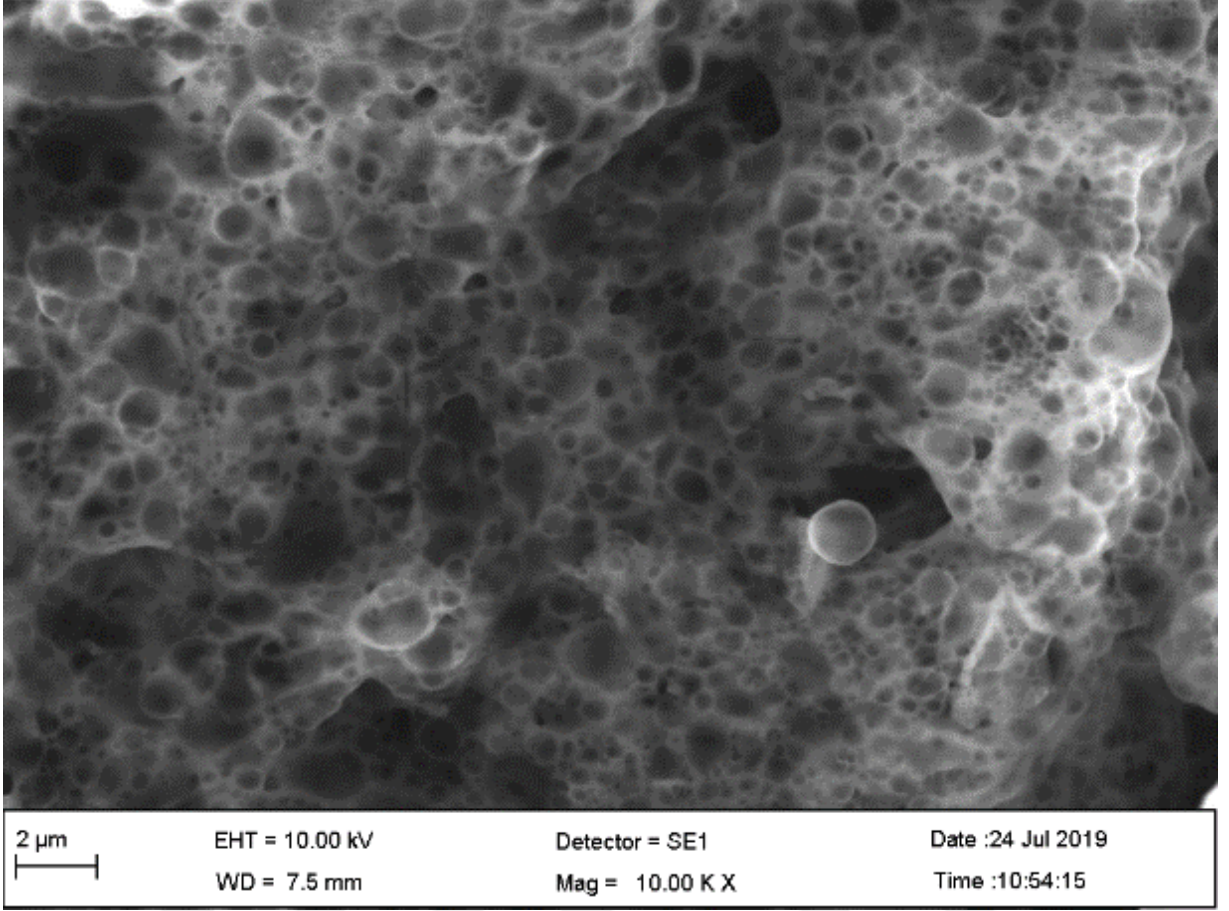
Şekil 19. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin büyüklük dağılımları

Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analiz

2,2:1 oranında sentezlenen liyofilize edilmiş mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin morfolojilerinin incelenmesi için SEM ile yüzey görüntüleri alınmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin yaklaşık küresel yapılar olduğu Şekil 20 ve Şekil 21'de gösterilmiştir.



Şekil 20. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitollü KNP'lerin SEM görüntüsü



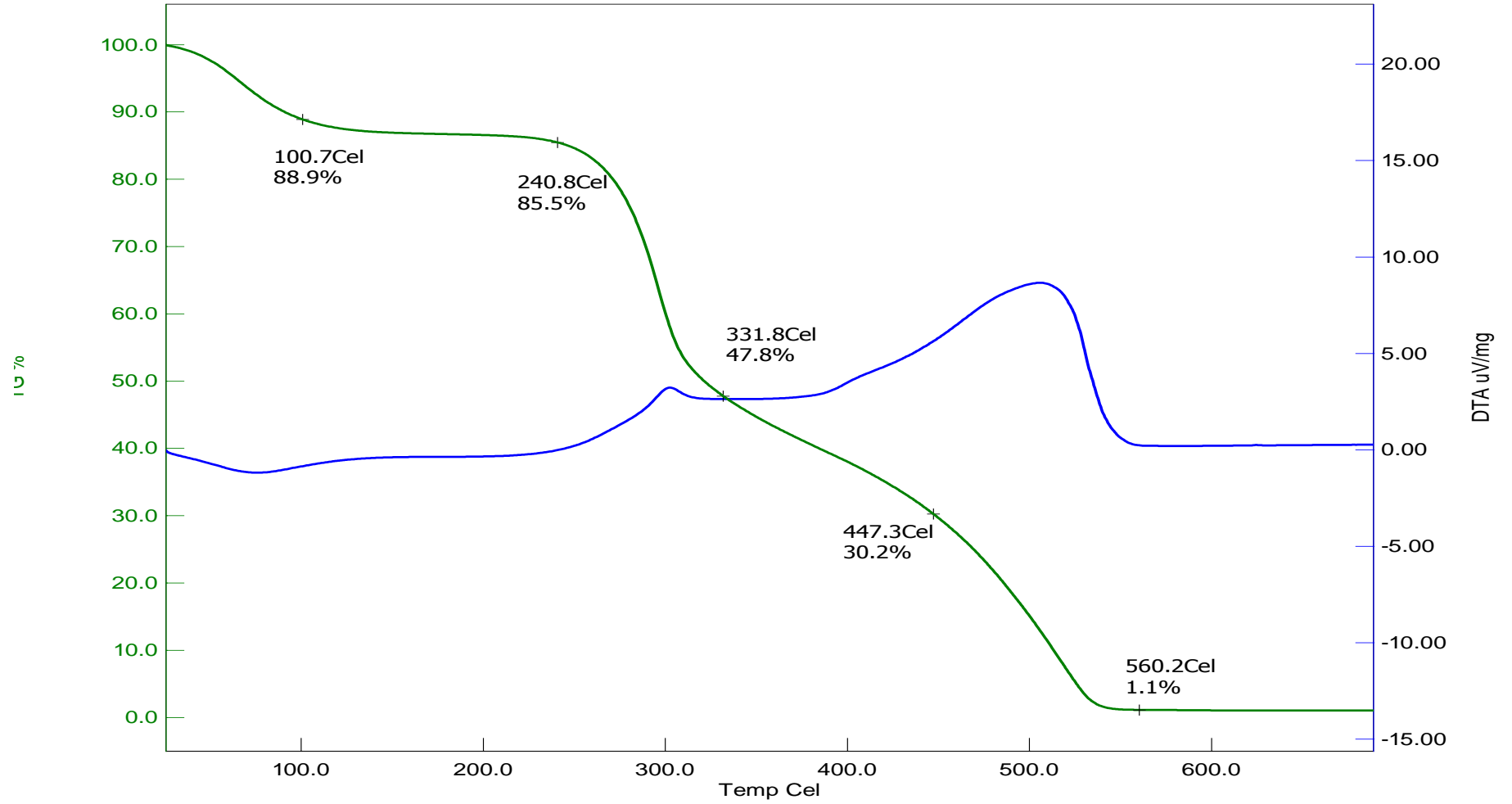
Şekil 21. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin SEM görüntüsü

Termal Gravimetrik Analiz

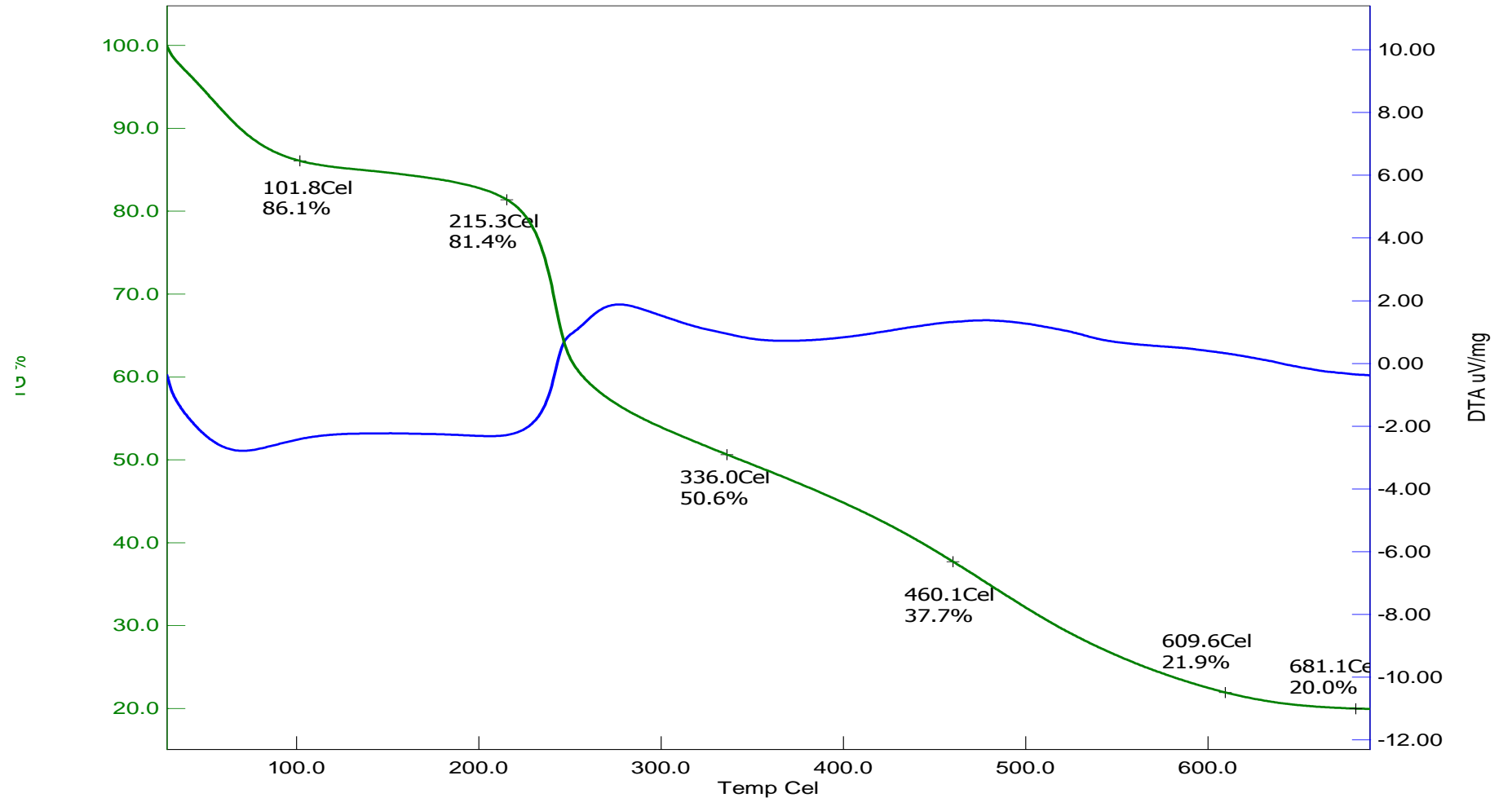
Saf kitosanın ve 2,2:1 oranında sentezlenen liyofilize edilmiş manitolsüz/mannitollü KNP, EGCG yüklü manitollü KNP'lerin termogramları alınmıştır. Bunlara ait TGA ve DTA termogramları Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25'te ve sonuçları Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Saf kitosan, iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen manitolsüz/mannitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP'lerin termogram sonuçları

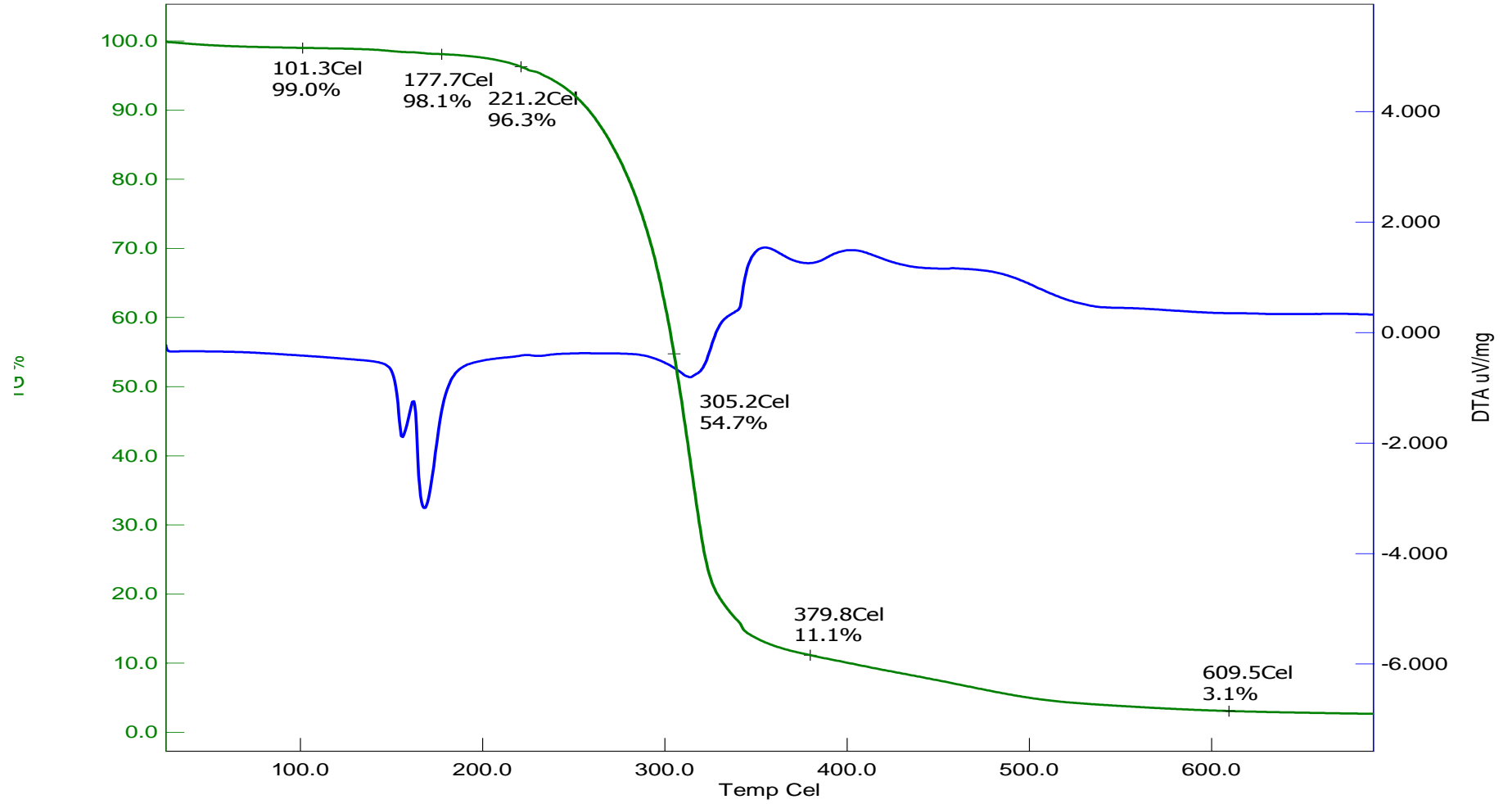
	Sıcaklık	Kütle Kaybı		Sıcaklık	Kütle Kaybı
Saf Kitosan	100,7 °C	% 11,1	Mannitollü KNP	101,3 °C	% 1
	240,8 °C	% 14,5		221,2 °C	% 3,7
	331,8 °C	% 52,2		305,2 °C	% 45,3
	447,3 °C	% 69,8		379,8 °C	% 88,9
	560,2 °C	% 98,9		609,5 °C	% 96,9
Mannitolsüz KNP	101,8 °C	% 13,9	EGCG Yüklü Mannitollü KNP	103,0 °C	% 1,2
	215,3 °C	% 18,6		214,1 °C	% 2,9
	336,0 °C	% 49,4		299,7 °C	% 81,2
	460,1 °C	% 62,3		409,3 °C	% 94,5
	609,6 °C	% 78,1		507,5 °C	% 99,8



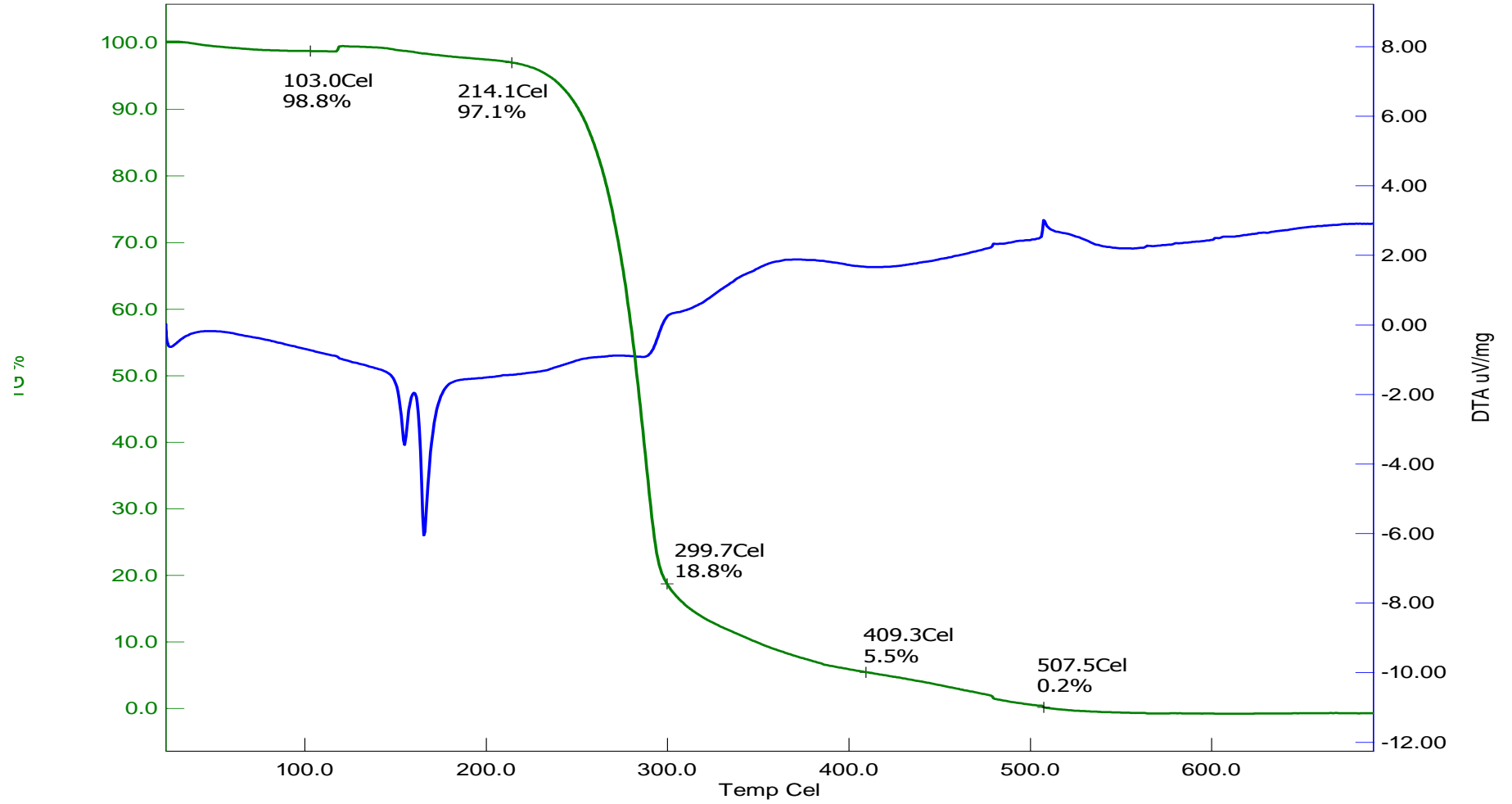
Şekil 22. Saf kitosana ait TGA ve DTA termogramı



Şekil 23. Mannitolsüz KNP'ye ait TGA ve DTA termogramı



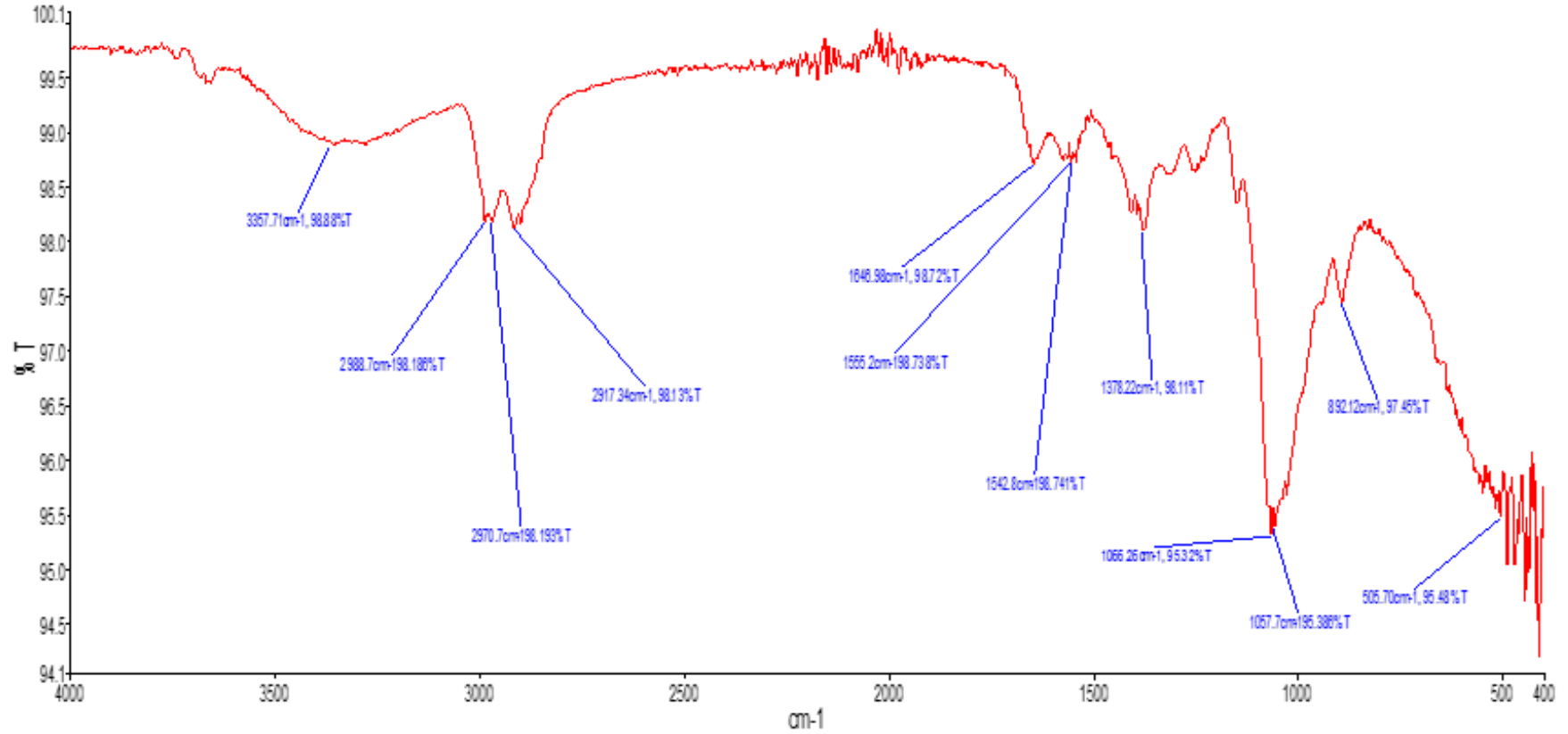
Şekil 24. Mannitollü KNP'ye ait TGA ve DTA termogramı



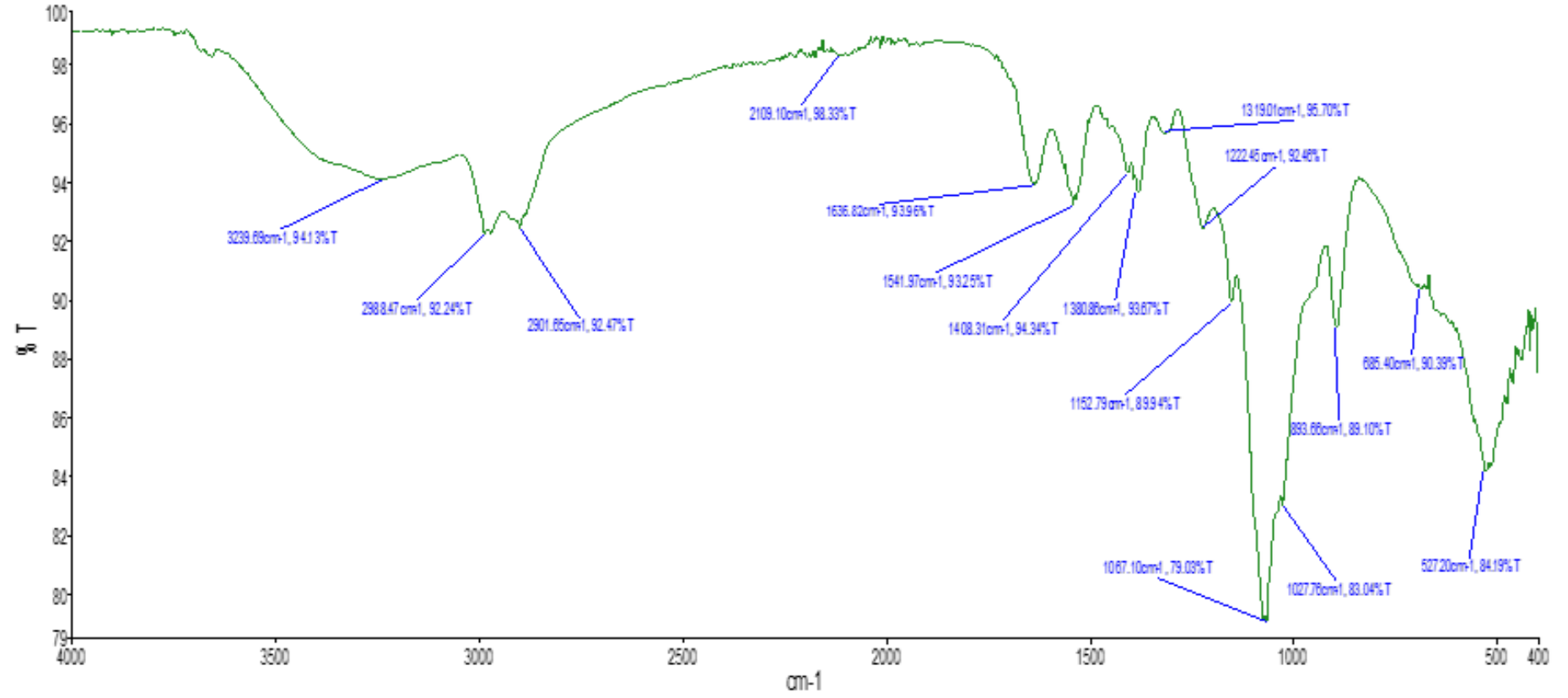
Şekil 25. EGCG yüklü mannitollü KNP'ye ait TGA ve DTA termogramı

Fourier Dönüümlü Infrared Spektroskopisi Analizi

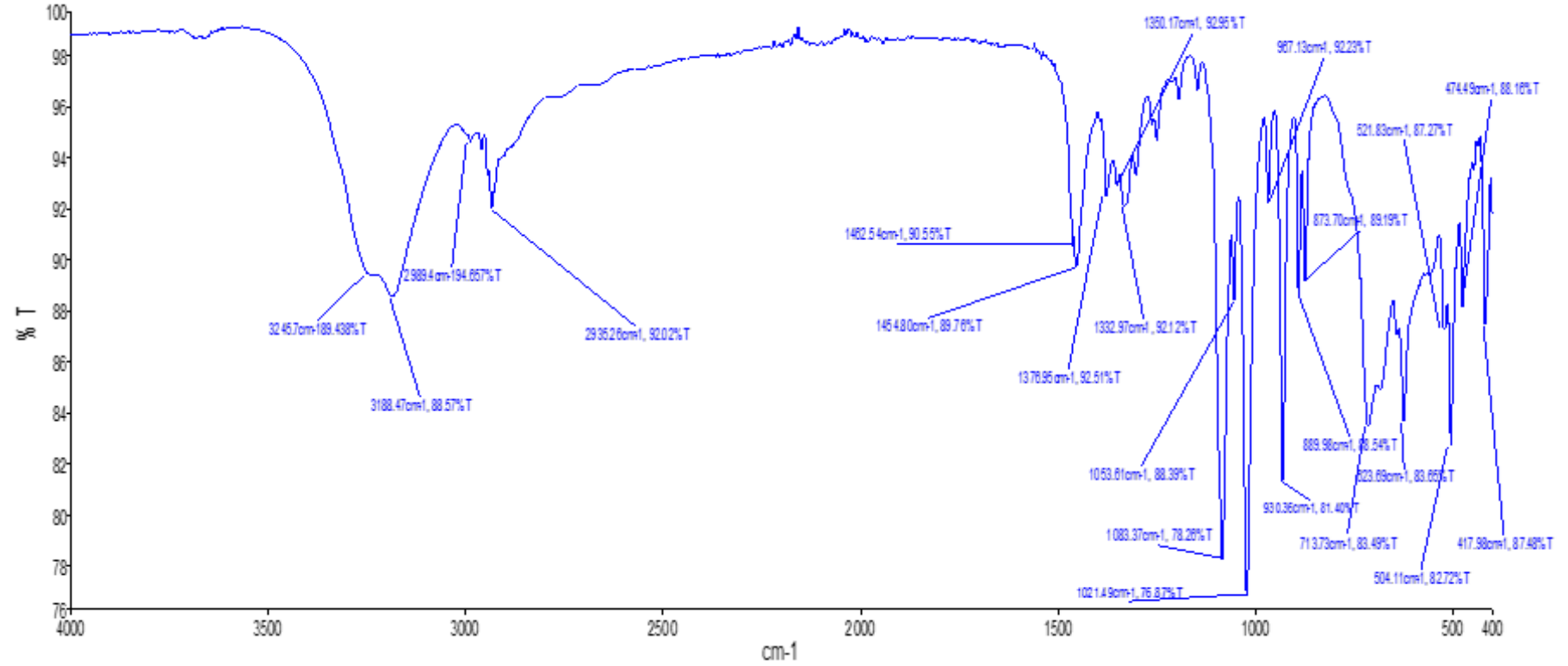
Saf kitosanın, 2,2:1 oranında sentezlenen liyofilize edilmiş mannitolsüz/mannitollü KNP, EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin ve saf EGCG'ye ait FT-IR spektrumları alınmıştır. Bunlara ait FT-IR spektrumları Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29 ve Şekil 30'da gösterilmiştir.



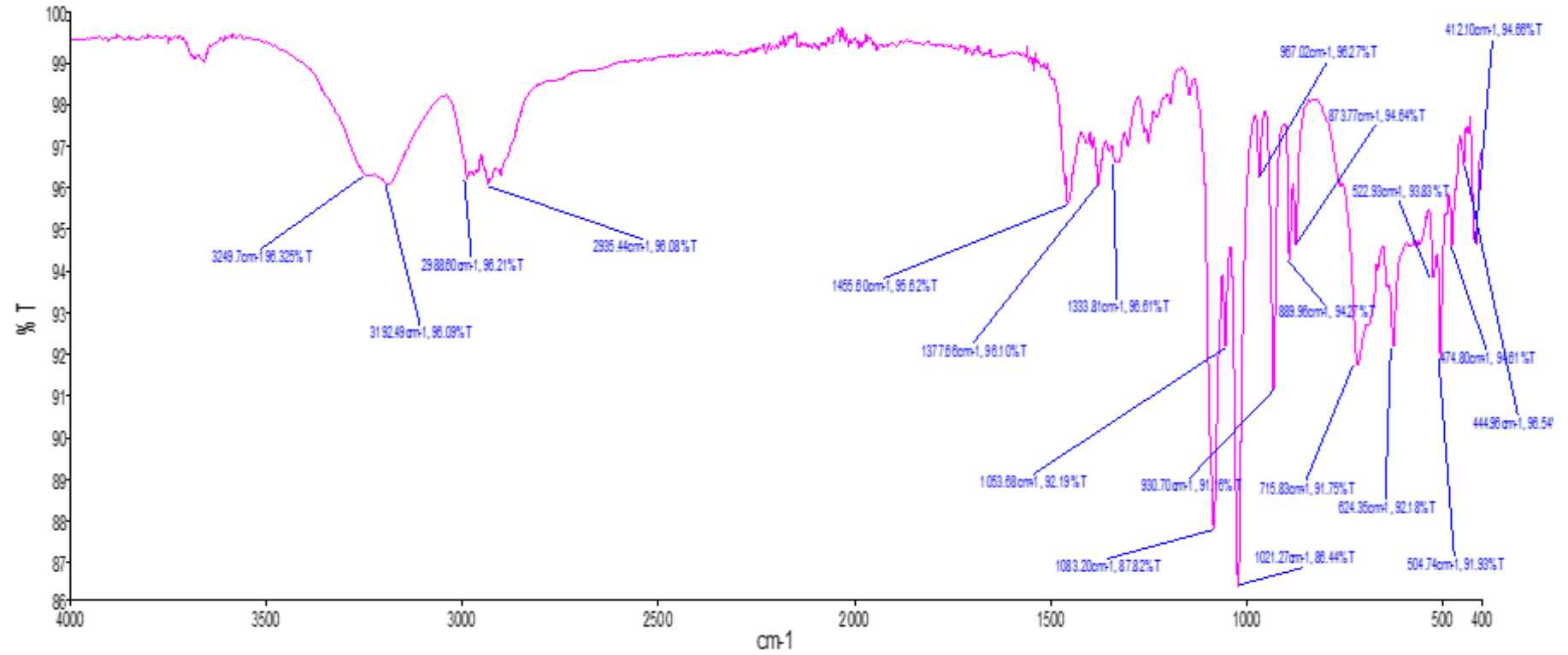
Şekil 26. Saf kitosana ait FT-IR spektrumu



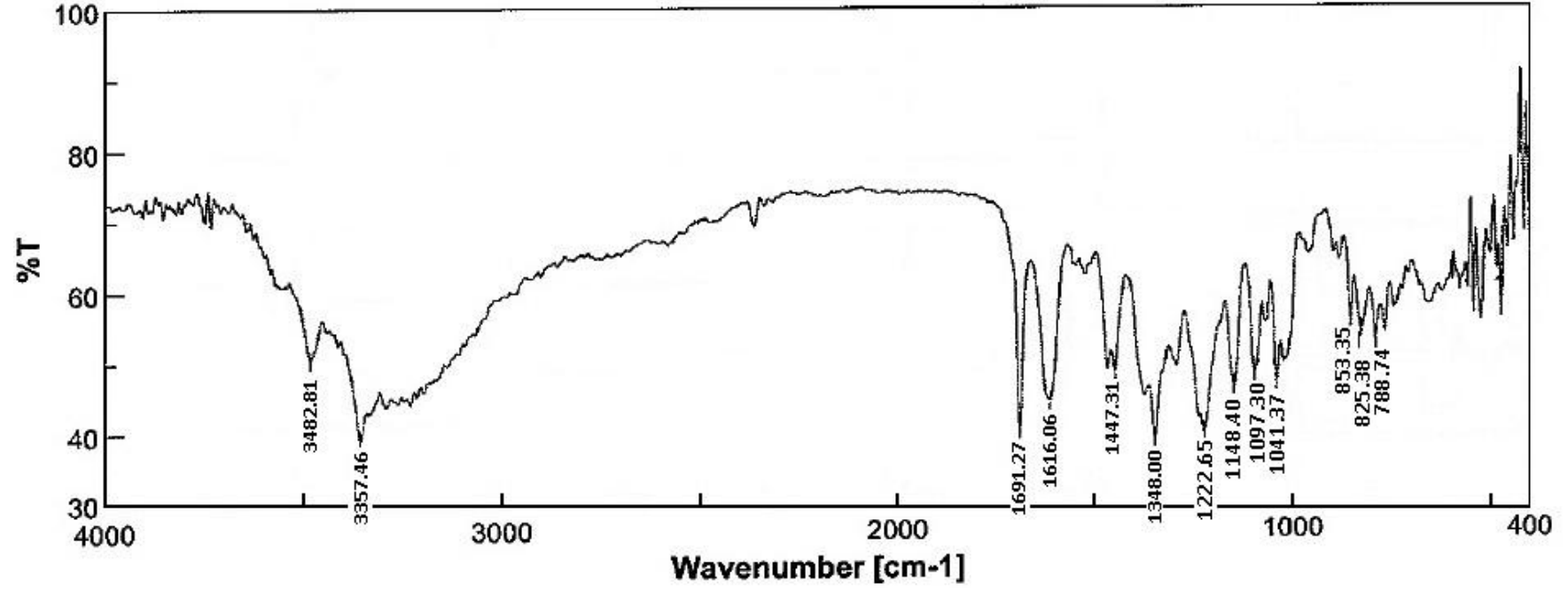
Şekil 27. Mannitolsüz KNP'ye ait FT-IR spektrumu



Şekil 28. Mannitollü KNP'ye ait FT-IR spektrumu



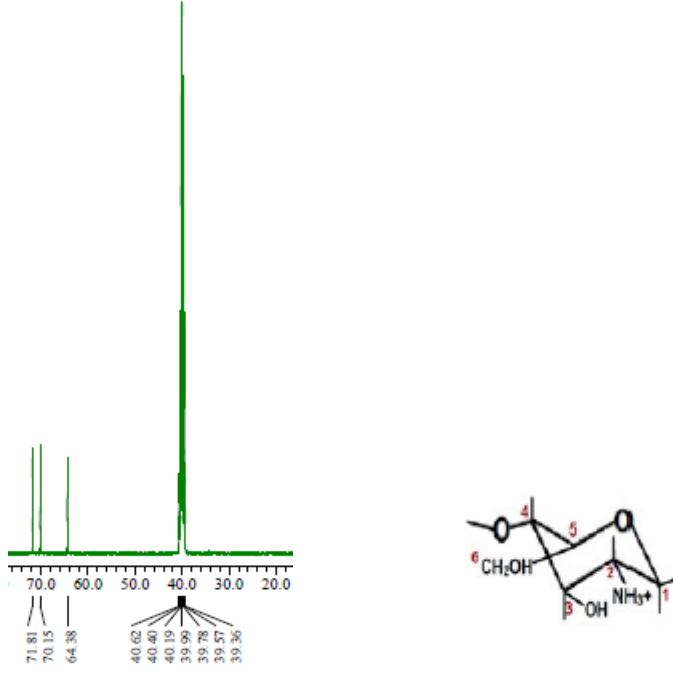
Şekil 29. EGCG yüklü mannitollü KNP'ye ait FT-IR spektrumu



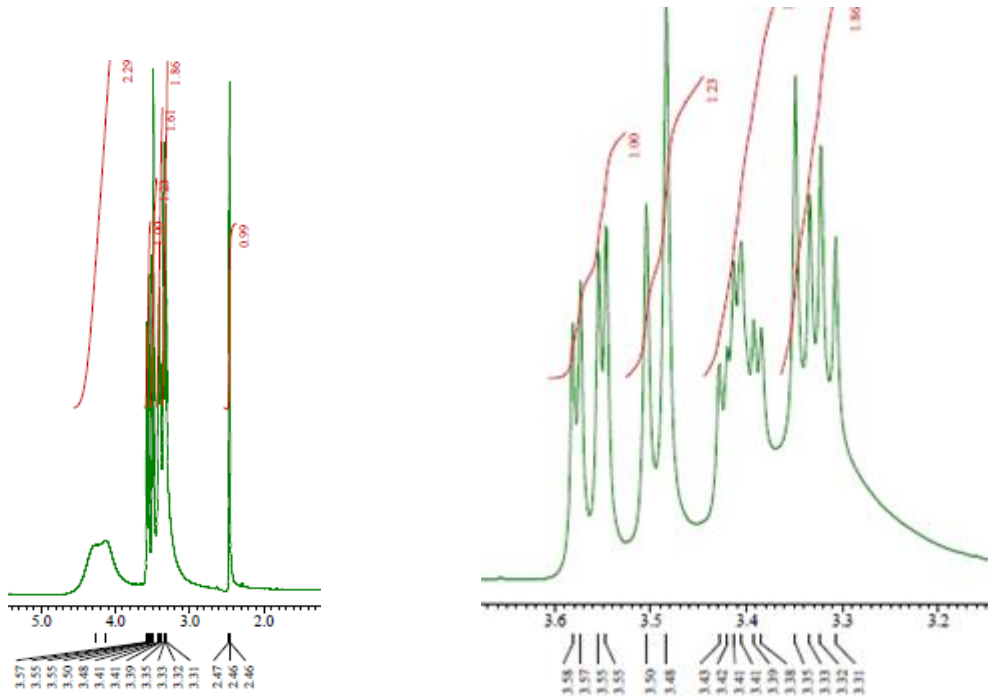
Şekil 30. Saf EGCG'ye ait FT-IR spektrumu

Nükleer Manyetik Rezonans Analizi

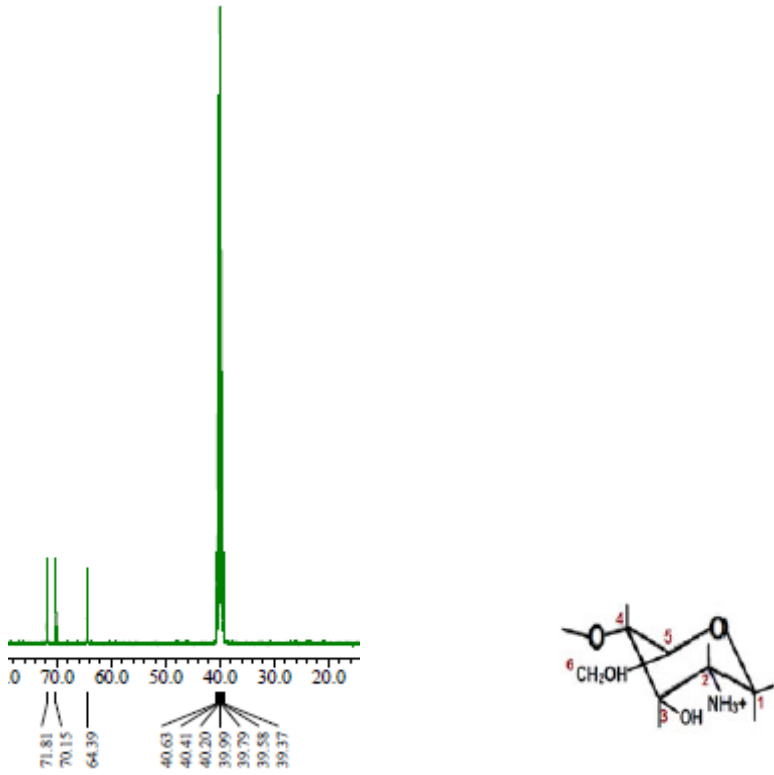
2,2:1 oranında sentezlenen liyofilize edilmiş mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ 'ları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 31, Şekil 32, Şekil 33 ve Şekil 34'de gösterilmiştir.



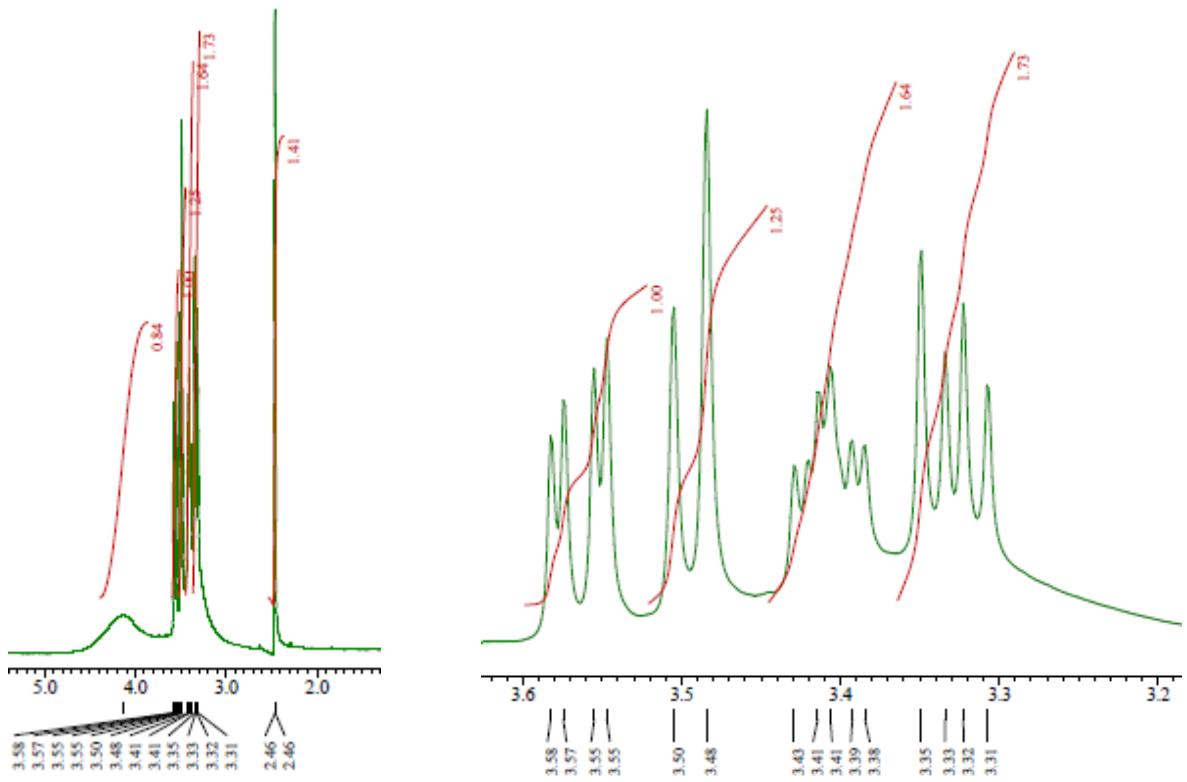
Şekil 31. Mannitollü KNP $^{13}\text{C-NMR}$



Şekil 32. Mannitollü KNP $^1\text{H-NMR}$



Şekil 33. EGCG yüklü mannitollü KNP ^{13}C -NMR



Şekil 34. EGCG yüklü mannitollü KNP ^1H -NMR

NANOPARTİKÜL ÜRETİM VERİMİNİN HESAPLANMASI

2,2:1 oranında sentezlenen manitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP formülasyonlarına ait üretim verimleri hesaplanmış ve Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. 2,2:1 oranında sentezlenen manitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP formülasyonlarına ait üretim verimleri

Formülasyon	Verim (%)
Mannitollü KNP	69,5
EGCG yüklü manitollü KNP	64,3

ETKİN MADDEİN YÜKLEME ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

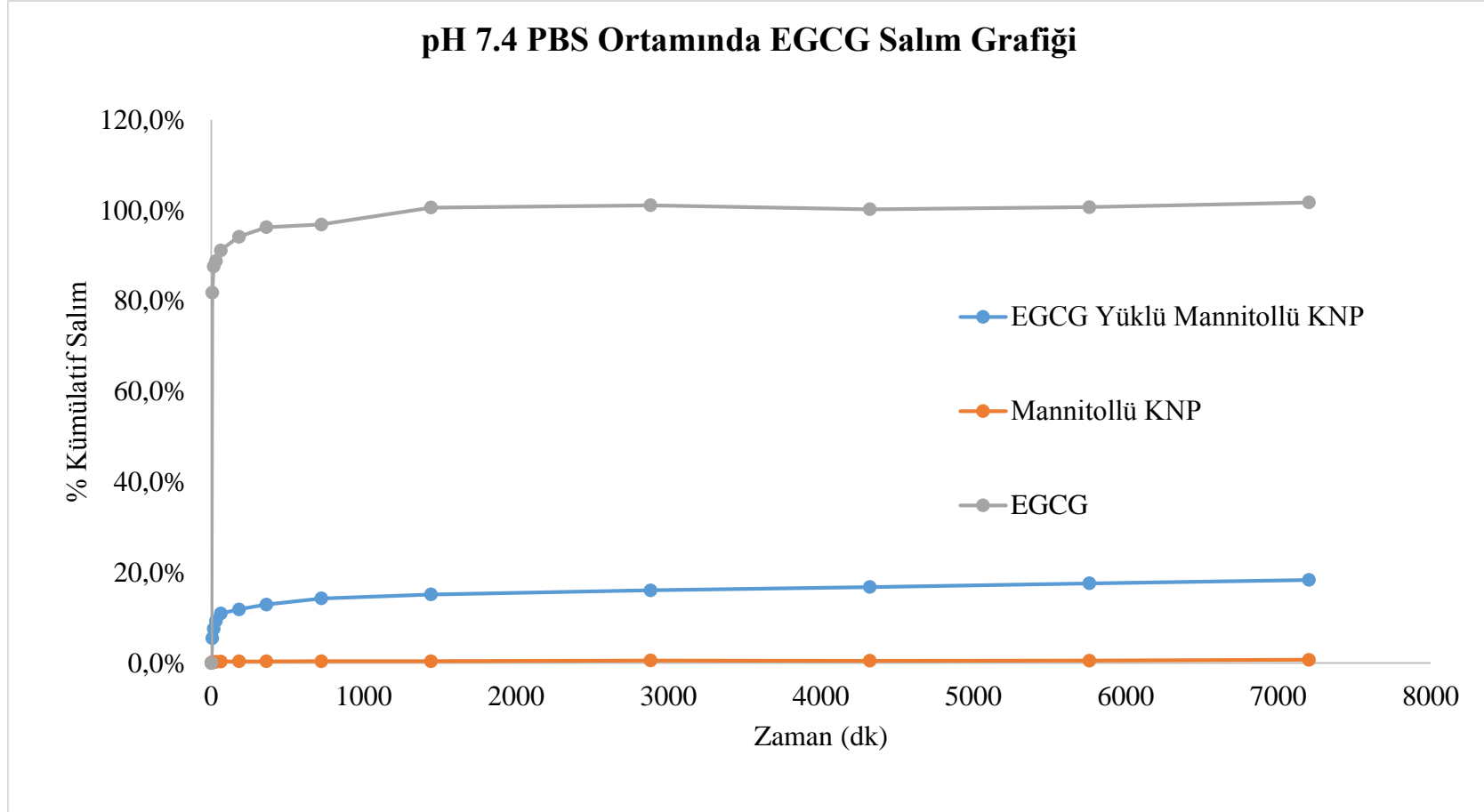
2,2:1 oranında sentezlenen EGCG yüklü manitollü KNP formülasyonuna ait yükleme etkinliği yapılmış ve Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. 2,2:1 oranında sentezlenen EGCG yüklü manitollü KNP formülasyonuna ait yükleme etkinliği

Formülasyon	EGCG yüklü manitollü KNP
Yükleme Etkinliği (%)	33
SS	3,46
% BSS	10,48

IN VITRO ETKİN MADDE SALIM ÇALIŞMASI

2,2:1 oranında sentezlenen manitollü KNP, EGCG yüklü manitollü KNP ve EGCG'ye ait *in vitro* salım çalışmaları pH 7,4 PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. Sonuç ve hesaplamalara göre elde edilen salım grafikleri Şekil 31'de gösterilmiştir.



Şekil 31. EGCG, EGCG yüklü mannitollü KNP ve mannitollü KNP'nin pH 7,4 PBS ortamındaki salım profilleri

EPİGALLOKATEŞİN GALLAT YÜKLÜ MANNİTOLLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERDEN KURU GÖZ HASTALIĞI TEDAVİSİNE YÖNELİK TABLET FORMÜLASYONLARININ TOZ KONTROLLERİ

Ön Formülasyonlar ve Epigallokateşin Gallat Yüklü Mannitollü Kitosan Nanopartikül İçeren Final Toz Karışımlarında Nem İçeriği Tayini

Final toz karışımlarının nem içeriği belirlenerek sonuçlar Tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 15. Final toz karışımlarının 105 °C'de nem miktarı (%)

	Süre	Max. Sıcaklık	Nem miktarı (%)
1. Formülasyon	2 dakika 24 saniye	105 °C	0,58
2. Formülasyon	2 dakika 57 saniye	105 °C	2,95
EGCG Yüklü Mannitollü KNP Formülasyon	2 dakika 45 saniye	105 °C	2,46

Tabletlerde Kullanılan Yardımcı Maddeler, Ön Formülasyonlar ve Epigallokateşin Gallat Yüklü Mannitollü Kitosan Nanopartikül İçeren Final Tozlarda Küme Dansite, Sıkıştırılmış Dansite, Housner Oranı ve Carr İndeksi

Tabletlerde kullanılan yardımcı maddeler ve formülasyonların final toz karışımlarının küme dansite, sıkıştırılmış dansite, Housner oranı ve Carr indeksleri belirlenerek sonuçları Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Tabletlerde kullanılan yardımcı maddeler ve formülasyonların küme dansite, sıkıştırılmış dansite, Housner oranı ve Carr indeksleri

	Küme Dansite	Sıkıştırılmış Dansite	Housner Oranı	Carr İndeks
Laktoz Monohidrat	0,59	0,78	1,33 Geçebilir	24,64 Geçebilir
Avicel PH 102	0,32	0,49	1,54 Çok Zayıf	35,21 Çok Zayıf
1. Formülasyon	0,69	0,85	1,24 Serbest	19,09 Serbest
2. Formülasyon	0,52	0,71	1,36 Zayıf	26,67 Zayıf
EGCG Yüklü Mannitollü KNP Formülasyon	0,44	0,60	1,36 Zayıf	26,32 Zayıf

Tabletlerde Kullanılan Yardımcı Maddeler, Ön Formülasyonlar ve Epigallokateşin Gallat Yüklü Mannitollü Kitosan Nanopartikül İçeren Final Tozlarda Yığın Açısı

Tabletlerde kullanılan yardımcı maddeler ve formülasyonların final toz karışımlarının yığın açısı belirlenerek toz akış özellikleri Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Tabletlerde kullanılan yardımcı maddeler ve formülasyonlarının yığın açısı tayinine göre toz akış özellikleri

	Laktoz Monohidrat	Avicel PH 102	1. Formülasyon	2. Formülasyon	EGCG Yüklü Mannitollü KNP Formülasyon
Toz Akış Özelliği	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel

**EPIGALLOKATEŞİN GALLAT YÜKLÜ MANNİTOLLÜ KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERDEN KURU GÖZ HASTALIĞI TEDAVİSİNE YÖNELİK
TABLET FORMÜLASYONLARININ TABLET KONTROLLERİ**

Görünüş Tayini

Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletler görsel olarak kontrol edilmiştir. 10 tabletin görünüş özellikleri;

- Beyaz renkli
- Yuvarlak,
- Bikonveks ve
- Kaplı değildir.

Tablet Ağırlıkları ve Ağırlık Tekdüzeliği Tayini

Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin ağırlıkları tek tek tartılarak belirlenmiştir. 20 tablet için elde edilen verilerin ortalamaları, SS ve % BSS'leri hesaplanarak Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin ağırlıkları ve ağırlık tekdüzeliği sonuçları

Numune	1. Formülasyon (g)	2. Formülasyon (g)	EGCG Yüklü Mannitollü KNP Formülasyon (g)
1	0,1938	0,1999	0,1957
2	0,1984	0,1962	0,1985
3	0,1966	0,1969	0,1937
4	0,1963	0,1935	0,1974
5	0,1963	0,1953	0,1983
6	0,1978	0,1957	0,1988
7	0,1939	0,1992	0,1939
8	0,1928	0,1950	0,1958
9	0,1939	0,1951	0,1968
10	0,1952	0,1965	0,1952
11	0,1927	0,1978	0,1999
12	0,1939	0,1942	0,1960

Tablo 18. (devamı) Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü manitolü KNP tabletlerin ağırlıkları ve ağırlık tekdüzeliği sonuçları

Numune	1. Formülasyon (g)	2. Formülasyon (g)	EGCG Yüklü Mannitolü KNP Formülasyon (g)
13	0,1930	0,1983	0,1944
14	0,1987	0,1931	0,1979
15	0,1952	0,1966	0,1965
16	0,1951	0,1931	0,1989
17	0,1972	0,1962	0,1995
18	0,1944	0,1932	0,1952
19	0,1967	0,1962	0,1976
20	0,1958	0,1945	0,1948
Ortalama (g)	0,1954	0,1958	0,1967
SS	0,0018	0,0020	0,0019
% BSS	0,9331	1,0072	0,9649

Kalınlık, Çap ve Sertlik Tayini

Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü manitolü KNP tabletlerin kalınlık, çap ve sertlik tayinleri yapılmıştır. Kalınlık ve çap kontrolleri için 20 tablet, sertlik kontrolleri için 10 tablet kullanılmıştır. Elde edilen verilerin ortalamaları, SS ve % BSS'leri hesaplanarak Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19. Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin kalınlık, çap ve sertlik sonuçları

Numune	1. Formülasyon			2. Formülasyon			EGCG Yüklü Mannitollü KNP Formülasyon		
	Kalınlık (mm)	Çap (mm)	Sertlik (N)	Kalınlık (mm)	Çap (mm)	Sertlik (N)	Kalınlık (mm)	Çap (mm)	Sertlik (N)
1	3,4	8,06	49,9	3,34	8,04	102,3	3,62	8,03	83,3
2	3,42	8,06	50	3,33	8,05	85,2	3,64	8,04	84,9
3	3,44	8,06	55,6	3,35	8,04	92,8	3,58	8,03	82,5
4	3,44	8,07	56,8	3,34	8,05	91,4	3,58	8,04	72,4
5	3,42	8,06	53,2	3,35	8,05	96,8	3,55	8,05	74,6
6	3,39	8,08	57,1	3,37	8,05	94,2	3,57	8,04	79,7
7	3,43	8,06	48,6	3,36	8,05	89,4	3,56	8,04	78,9
8	3,38	8,06	61,8	3,34	8,05	87	3,60	8,04	80,7
9	3,41	8,06	56,2	3,38	8,05	95,3	3,61	8,05	77,7
10	3,41	8,06	55,9	3,35	8,05	88,5	3,57	8,05	81,8
11	3,4	8,06	-	3,39	8,05	-	3,58	8,05	-
12	3,41	8,07	-	3,37	8,05	-	3,58	8,04	-
13	3,43	8,07	-	3,32	8,06	-	3,59	8,04	-
14	3,4	8,07	-	3,35	8,05	-	3,59	8,04	-
15	3,4	8,06	-	3,36	8,04	-	3,61	8,04	-
16	3,41	8,07	-	3,36	8,05	-	3,60	8,05	-
17	3,42	8,06	-	3,33	8,05	-	3,58	8,05	-
18	3,41	8,07	-	3,37	8,05	-	3,58	8,04	-
19	3,39	8,07	-	3,39	8,04	-	3,57	8,05	-
20	3,42	8,06	-	3,32	8,05	-	3,60	8,04	-
Ortalama	3,41	8,06	54,51	3,35	8,05	92,29	3,59	8,04	79,65
SS	0,02	0,01	4,07	0,02	0,00	5,11	0,02	0,01	3,90
% BSS	0,48	0,07	7,47	0,62	0,06	5,54	0,60	0,08	4,90

Friabilite(Ufalanma-Aşınma) Testi

Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin friabilite testi yapılmıştır. Friabilite testi için kullanılan tablet sayısı 10 tablet olup elde edilen veriler % cinsinden kayıp olarak hesaplanıp Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü manitolü KNP tabletlerin friabilite sonuçları

Numune	1. Formülasyon	2. Formülasyon	EGCG Yüklü Manitolü KNP Formülasyon
Friabilite (%)	% 1	% 0,25	% 0,4

Disintegrasyon (Dağılma Zamanı) Testi

Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü manitolü KNP tabletlerinde disintegrasyon testi yapılmıştır. Ön formülasyon tabletleri için sadece su ortamında, EGCG yüklü manitolü KNP tabletlerinde su, 0,1 N HCl, pH 4,5 asetat tamponu ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Verilerin ortalamaları, SS ve % BSS'leri hesaplanarak Tablo 21'de gösterilmiştir.

Tablo 21. Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü manitolü KNP tabletlerin disintegrasyon sonuçları

Numune	1.	2.	EGCG Yüklü Manitolü KNP			
	Formülasyon	Formülasyon	Formülasyon			
	Su	Su	Su	0.1 N HCl	pH 4.5	pH 6.8
1	338	100	35	24	34	15
2	325	88	29	29	30	17
3	330	95	28	30	28	16
4	335	93	30	27	33	20
5	345	90	38	26	31	19
6	343	80	32	32	27	17
Ortalama(sn)	336	91	32	28	30,5	17,33
SS	7,64	6,81	3,85	2,90	2,74	1,86
% BSS	2,27	7,49	12,02	10,35	8,98	10,74

TARTIŞMA

Nanopartiküler sistemler ile ilaç verim yollarının avantajları; etkin maddenin stabilitesinin sağlanabilmesi, oral biyoyararlanımın iyileştirilmesi/arttırılması, yüksek taşıma kapasitesine sahip olması ve alan spesifik hedeflendirme yapılabilmesi, hem hidrofobik hem de hidrofilik etkin maddelerin nanopartiküllere hapsedilmesi, kan beyin bariyerinin aşılabilmesi için uygun nanopartiküler sistemlerin hazırlanabilmesi, oral, pulmoner, parenteral ve nazalyol gibi farklı yollarla uygulanabilesidir. Bu avantajlardan dolayı nanopartiküler sistemlere başvurulmaktadır. Hazırlanan sistemlerin stabilitesi, salım özellikleri, biyodağılımı, etkinliği ve toksisitesi açısından partikül büyüklüğü, dağılımı ve yüzey özellikleri uygun olmalıdır (155).

Nanopartiküllerin sentezinde doğal veya sentetik polimerler kullanılmaktadır. Sentetik polimerler ile sentezlenen nanopartiküllerin biyobozunur olmaması toksisite açısından risk taşımaktadır. Polimer özellikleri göz önüne alındığında bu tez çalışmasında biyobozunur, biyoyumlu, doğal ve yenilenebilir bir polimer olan kitosan kullanılmıştır.

Kitosan nanopartiküller için birçok nanopartikül sentez yöntemi mevcuttur. İyonik jelleşme yönteminin seçilmesi, reaktiflerin ve diğer istenmeyen etkilerin olası toksisitesini önlemek için kimyasal çapraz bağlama yerine elektrostatik etkileşimle tersinir fiziksel çapraz bağlayıcı maddelerin (NaTPP) kullanıldığı basit, ucuz maliyetli ve pratik bir yöntem olmasıdır (156).

Kitosan nanopartiküller ile yapılan çalışmalar; Calvo ve ark. (188) kitosan ve NaTPP konsantrasyonlarının partikül büyüklüğü üzerine çalışmalar yapmıştır ve partikül büyüklüklerini 250-1000 nm aralığında bulmuşlardır. Qi ve ark. (164) KNP'lerin antibakteriyel etkilerini incelemiş ve partikül büyüklüğünü 28,3-48,7 nm aralığında bulmuşlardır. Qi ve ark.

(189) başlangıç derişimi, sıcaklık, adsorplayıcı boyutu, adsorplayıcı miktarı ve pH'ın adsorpsiyon yeteneği üzerine KNP'lerin özelliklerini incelemişlerdir. Partikül büyüklüklerini 40-100 nm aralığında bulmuşlardır. Lee ve ark. (190) KNP'lerin kan uyumluluğu özelliklerini incelemişlerdir. Partikül büyüklüklerini 260-300 nm aralığında bulmuşlardır. Lopez ve ark. (163) NaTPP ile çapraz bağlanmayla oluşan KNP'lerin şişme-büzölme fiziksel özelliklerini çalışmışlardır. Elektrokinetik özellikleri ve kolloidal kararlılığı, pH ve ortamın iyonik kuvvetinin bir fonksiyonu olarak incelemişlerdir. pH ve bekleme süresinin partikül boyutuna etkisini, asidik ortamda pH artmasıyla partikül boyutunun azaldığını ve bekleme süresinde asidik ortamda boyutunun değişmediği bazik ortamda ise partikül boyutunun arttığını bulmuşlardır. Elde edilen partikül büyüklüklerini 200-300 nm aralığında saptamışlardır. Bu tez çalışmasında da elde edilen partikül büyüklüğu mannitolsüz KNP $417,3 \pm 20,42$ nm, mannitollü KNP $125,5 \pm 11,40$ nm ve EGCG yüklü mannitollü KNP $196,5 \pm 21,03$ nm bulunmuştur. Bulunan sonuçların seçilen nanopartikül sentez yöntemlerine göre uyum içinde olduğu görülmüştür.

Epigallokateşin gallat, yeşil çayda en bol ve aktif bileşen olarak bulunan bir polifenoldür. EGCG ile ilgili yapılan çalışmalarda, antioksidan (191), anti-kanser (192), anti-yanlı (193), anti-bakteriyel ve antiviral (194) aktivite dahil olmak üzere yüksek bir potansiyel biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir. Geniş bir prelinik araştırma ve epidemiyolojik veriler topluluğu, özellikle EGCG olan polifenollerin, göğüs ve kolorektal kanser (195) gibi bazı kanserlerin tedavisinde ve önlenmesinde, kardiyovasküler hastalık (196), nörodejeneratif hastalıklar (197), diyabet (198), romatoid artrit (199) veya osteoporoz (200) risklerini azalttığını göstermektedir.

Çeşitli araştırmalar EGCG'nin otoimmün bozukluklarla ilgili iltihap üzerinde bir inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir (137-139). Lee ve ark. (3) topikal EGCG tedavisi, yanlı sitokinlerin ekspresyonunu ve korneada CD11b+ hücrelerinin infiltrasyonunu baskılayarak KGH'daki klinik bulguları ve yanlı değişiklikleri azaltabileceğini savunmuşlardır. Fanguero ve ark. (201) Oküler uygulama için EGCG lipit nanopartikülleri sentezleyerek fizikokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kador ve ark. (202) topikal uygulanan nutrasötik antioksidan formülasyonunun oküler oksidatif stresi azaltabileceği üzerine çalışmışlardır. Tseng ve ark. (203) Kuru göz hastalığı olan tavşanların tedavisinde EGCG ve hyaluronik asit içeren yapay gözyaşlarının sinerjik etkisini incelemişlerdir. Chen ve ark. (204) kuru göz hastalığı için tampon içinde bitkisel takviyeleri (herbal supplement) alışmışlardır. Luo ve ark. (205) kuru göz hastalığı tedavisinde topikal kullanım için yeni bir

oftalmik farmasötik formülasyon olarak EGCG yüklü jelatin-g-poli(N-izopropilakrilamid)'i geliştirmişlerdir.

Epigallokateşin gallat kısa yarı ömür ve düşük biyoyararlanım eksiklikleri olmasına rağmen klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin biyolojik sıvılarda kararsız olan ve mukozal bariyer boyunca kolayca dağılmayan ilaçları taşıdıkları ve sağladıkları iyi bilinmektedir (206). Oral nanopartiküller, gastrointestinal sistemde gelişmiş biyoyararlanım, hedeflenebilirlik, biyoadhezyon ve kontrollü ilaç salımı nedeniyle umut verici ilaç dağıtım sistemleridir (207). Doğrudan geçiş yapabilir ve/veya partiküllerin translokasyon işleminden önce önkoşul bir adım olan mukozaya yapışabilirler. Bu nedenle biyoadhezyon, ilaçların epitel boyunca dağıtılmasında kilit bir rol oynar ve hepatik ilk geçiş metabolizmasını ve gastrointestinal sistemde enzimatik bozulmayı önlemektedir (208). Anlatılan özelliklerden yararlanarak bu tez çalışmasında KNP'lere EGCG yüklenmesine karar verilmiştir.

Epigallokateşin gallat yüklü KNP'ler ile ilgili yapılan çalışmalar; Li ve ark. (184), Kumar ve ark. (186), Hu ve ark. (209) EGCG yüklü KNP'lerin sentez ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Dudhani ve ark. (208) kateşin yüklü biyoadhezif kitosan nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Liu ve ark. (210) EGCG yüklü KNP'lerin hazırlanması ve meme kanseri hücrelerinin büyümesi üzerine inhibe edici etkilerini çalışmışlardır. Dube ve ark. (183) KNP'lerin yeşil çay kateşinlerinin bağırsaktaki emilimini arttıran bir çalışma gerçekleştirmişlerdir.

Zhang ve ark. (211) iyonik jelleşme yöntemine göre sentezlenen KNP'lerin sentezinde pH, kitosan/NaTPP oranı, kitosan molekül ağırlığı ve DD gibi parametreler önemli rol aldığını söylemişlerdir. Kitosan zayıf bazlı bir polisakkarit olduğundan dolayı nötral ve bazik ortamda çözünür değildir. Asidik ortamda amin grupları pozitif yüke sahip olur. Bu durum kitosana bir yük yoğunluğu sağlar ve bu nedenle iyonik jelleşme yönteminin pH'a duyarlı bir yöntem olduğunu göstermişlerdir. Li ve ark. (184) KNP sentez işlemi tamamlanıp liyofilizasyon basamağından önce kriyoprotektan olarak mannitol kullanmışlardır. Kullanılan mannitolün sentezlenen nanopartikülleri koruyucu özellikte olduğunu savunmuşlardır. Bu tez çalışmasında Dube ve ark. (183) uyguladığı sentez yönteminde olduğu gibi orta moleküler ağırlıklı kitosan seçilerek EGCG yüklenmesinin gerçekleştirilmesi için kitosan/NaTPP oranı 2,2:1, ortam pH'ı 3 ve Li ve ark. (184) kriyoprotektan olarak eklediği mannitol kullanılarak nanopartikül sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Epigallokateşin gallat yüklü nanopartiküler sistemde miktar tayini için Dudhani ve ark. (208) UV spektrofotometrik yöntem kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında da etkin madde tayini

için su ve pH 7,4 PBS ortamları için UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. Su ortamındaki ve pH 7,4 PBS ortamındaki etkin madde için analitik yöntem validasyonu doğruluk çalışmaları sırasında 1-100 µg/mL, 1-80 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Elde edilen R² değerleri 1 ve 0,9998 olarak bulunmuştur. Analitik yöntemin gün içi (6 saat) ve günler arası (1, 2 ve 3. gün) kesinlik ve doğruluğunu tespit etmek için kalibrasyon doğrularında yer alan su ortamı için 10, 20, 40 µg/mL, pH 7,4 PBS ortamı için 10, 40, 80 µg/mL 3 farklı konsantrasyon seçilerek ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Su ortamı için Tablo 9'da 3 farklı konsantrasyon için gün içi ve günler arası hesaplanan konsantrasyon, doğruluk (% bağıl hata) ve kesinlik (varyasyon katsayısı) değerleri verilmiştir. Gün içi doğruluk değerleri -0,711-0,709 aralığında, kesinlik değerleri 0,005-0,051 aralığında, günler arası doğruluk değerleri -0,103-1,425 aralığında, kesinlik değerleri 0,154-0,699 aralığında bulunmuştur. pH 7,4 PBS ortamı için Tablo 10'da 3 farklı konsantrasyon için gün içi ve günler arası hesaplanan konsantrasyon, doğruluk (% bağıl hata) ve kesinlik (varyasyon katsayısı) değerleri verilmiştir. Gün içi doğruluk değerleri -1,677-0,318 aralığında, kesinlik değerleri 0,034-0,859 aralığında, günler arası doğruluk değerleri -1,364-0,314 aralığında, kesinlik değerleri 0,023-0,327 aralığında bulunmuştur. Shabir ve ark. (178) göre her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmış; karşılaştırma sonucunda genel kurala uygun olarak bağıl hata değeri <%2 ve varyasyon katsayısı değeri <%1 olarak saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve yöntemin özgünlüğü 274 nm dalga boyunda ortam bileşenleri ve yardımcı maddelerin absorbans vermediği tespit edilerek analitik yöntem geliştirilip validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Dube ve ark. (183) yaptığı çalışmada nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI (dağılım) ve zeta potansiyel ölçümlerinin dayandığı temel prensipleri açıklamışlardır. Partikül boyutu ve PDI'ya yönelik analizin dayandığı temel prensip, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin Brownian hareketine bağlı gelişen hareketliliğin ölçülmesidir. Zeta potansiyel, yüklü partiküller arasındaki elektrostatik itme davranışlarından dolayı nanopartikül süspansiyonlarının stabilitesi için son derece önemli bir rol oynamaktadır. Nanopartiküller için koloidal dağılımların kararlılığı, zeta potansiyel değeri (genellikle, ±30 mV) yüksek olduğunda sağlanmaktadır. Zeta potansiyel değeri düştüğünde yüklü nanopartikül süspansiyonu kararlı halini koruyamaz, bu durumda formülasyonların liyofilize edilmiş bir formda depolanması ve kullanılmadan önce sulandırılması stabilite için önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında da nanopartiküler sistemin kararlılığını koruması ve tablet formülasyonunun geliştirilmesi için liyofilize toz haline getirilmiştir.

Dube ve ark. (183) sentezledikleri EGCG yüklü KNP'lerin partikül boyutunu 440 ± 37 nm zeta potansiyelini 25 ± 1 olarak bulmuşlardır. Li ve ark. (184) sentezledikleri EGCG yüklü KNP'lerin partikül boyutunu $141,5 \pm 0,4$ nm zeta potansiyelini $-31,21 \pm 0,54$ olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında da Dube ve ark. (183) sentez yöntemine göre sentezlenen mannitolsüz KNP'lerin partikül boyutu $417,3 \pm 20,42$ nm zeta potansiyeli $-18,38 \pm 0,46$ bulunmuştur. Li ve ark. (184) sentez yöntemine göre sentezlenen mannitollü KNP'lerin partikül boyutu $125,53 \pm 11,40$ nm zeta potansiyeli $-24,43 \pm 2,86$, EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin partikül boyutu $196,5 \pm 21,03$ zeta potansiyeli $-24,57 \pm 0,55$ bulunmuş ve sonuçlar arasında yakınlık olduğu görülmüştür. Liyofilizasyon işlemi öncesinde kriyoprotektan olarak kullanılan mannitolün partiküllerin agregasyonu önleyerek partikül büyüklüğünün korunması ve daha kararlı bir yapının sağlanmasında etkili olduğu literatür ve deney sonuçları desteklenmiştir.

Partikül boyutunun taşıyıcı sistemin performansını etkileyen önemli bir faktördür. Taşıyıcı sistemin dolaşımında kalma süresi, hücre alımı, biyodağılımı, etkin madde salım kinetiği gibi birçok etkiye sahiptir. Xie ve ark. (212) nano boyutlu sistemlerin (özellikle 100 nm civarında) hücre alımı açısından önemli bir avantaja sahip olduğu ve hücreler tarafından alınımının mikron boyutundaki sistemlerden 15-250 kat daha fazla olduğu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da kuru göz hastalığı tedavisine yönelik geliştirilen EGCG yüklü KNP tablet formülasyonda etkin madde olarak kullanılan EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin 125-197 nm aralığında olduğu bulunmuş ve hücre alımı açısından önemli bir avantaja sahip olduğu gösterilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntü maddelerin yüzey morfolojilerinin belirlenmesi için kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. Li ve ark. (184) yaptığı çalışmada 30000x'te alınan SEM görüntüleri ile boyut ölçüm cihazıyla belirlenen partikül büyüklüklerinin uyum içinde olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında sentezlenen mannitollü KNP'lerin ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin SEM görüntüleri 10 kV, 10000x'te alınmış olup Şekil 20 ve Şekil 21'de gösterilmiştir. Görüntüler ile yüzey morfolojisi incelendiğinde küresel yapıların oluştuğu, aralarda porlara rastlandığı ve enkapsülasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Aynı zamanda SEM görüntüleri ile Zeta sizer Nano-ZS ile yapılan partikül büyüklüğü ölçümleri uyum içinde olduğu belirlenmiştir.

Termal gravimetrik analiz, madde veya reaksiyon ürünlerinin termal davranışlarının belirlenmesi için kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. Bu teknik, bir maddeye kontrollü bir şekilde artan sıcaklık programı uygulanarak meydana gelen ağırlık değişimlerini kantitatif olarak ölçülmesidir. Tağaç ve ark. (185) KNP'lerde bozunmanın 2 basamaklı olarak

gerçekleştiğini, yaklaşık 56 °C’de gerçekleşen ilk bozunma yapıda bulunan nem miktarına karşılık geldiğini ve çapraz bağlanma ile bu basamaktaki bozunma azaldığını belirtmişlerdir. İkinci basamaktaki bozunma yapının bozunmasına karşılık geldiğini, saf kitosan 250 °C de bozunurken çapraz bağlanma ile bu sıcaklığın düştüğü ama bozunmadan kalan miktarın arttığı gözlemlenmişlerdir. Bu tez çalışmasında da mannitolsüz KNP ile mannitollü KNP farkı bozunma sıcaklıkları yaklaşık 215 °C’lerde olduğu ve mannitolsüz KNP’lerin mannitollü KNP’lere göre daha fazla kütle kaybı yaşadığı sonucuna varılmıştır. Bununla farkının liyofilizasyon işleminde kullanılan kriyoprotektan olarak kullanılan mannitolün olduğu düşünülmektedir. KNP’lerin bozunması 2 basamaklı olarak gerçekleşmiştir. Saf kitosan 240,8 °C’de kütle kaybı %14,5, mannitollü KNP 221,2 °C’de kütle kaybı %3,7 ve EGCG yüklü mannitollü KNP 214,1 °C’de kütle kaybı %2,9 olarak bulunmuştur. Çapraz bağlanma ile bu sıcaklığın düştüğü ama bozunmadan kalan miktarın arttığı gözlemlenmişlerdir. Tagaç ve ark. (185) yaptığı çalışma ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Diferansiyel termal analiz reaksiyonun ekzotermik mi yoksa endotermik mi olduğunu ve aktarılan sıcaklık miktarının ölçülmesi için kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. DTA termogramlarında yukarı doğru olan pikler ekzotermik, aşağı doğru olan pikler endotermik olayları ifade etmektedir. Ekzotermik pikler genellikle kimyasal reaksiyonlara, polimerleşme veya kristellenme işlemlerini endotermik pikler ise faz değişimleri, dehidrasyon, indirgenme ve bozunmayı ifade etmektedir. Polisakaritler genellikle suya karşı güçlü bir afiniteye sahiptir ve katı halde bu moleküller düzensiz yapılara sahip olabilmektedir. İlk endotermik tepe, numunelerden bağlı suyun buharlaşmasına karşılık gelmektedir. Dudhani ve ark. (208) kitosan ve KNP’lerin ilk endoterminin 110 ila 125 °C arasındaki geçişin başlangıcını ve sonunu verdiği bulmuşlardır. Kateşin yüklü KNP’lerin endotermi, 125 ila 139 °C arasında daha yüksek bir sıcaklığa kayma olduğunu göstermişlerdir. Zhang ve ark (211) göre KNP’lerde, ikinci endoterm düşük sıcaklığa geçtiğini ve azalan kristallenme, çapraz bağlanma nedeniyle kitosanın katı hal yapısındaki değişikliği göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında da ilk endoterm kitosan için 100 °C civarında, mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP’ler için çapraz bağlanma ile etkileşimin artmasıyla 150-170 °C aralığında bulunmuştur.

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi, kimyasal yapının aydınlatılması için önemli bir karakterizasyon tekniğidir. Bu teknik kimyasal yapıda var olan bağların titreşim frekanslarını ölçer ve fonksiyonel gruplar hakkında bilgi vermektedir. Kumar ve ark. (186) yaptıkları çalışmada KNP FT-IR spekturumlarında 3418 cm⁻¹ olan bandın kitosanın hidroksil grubunun varlığını, 1639 cm⁻¹ olan bandın amino grubunun varlığını, 1153 cm⁻¹ olan

bandın fosfat grubunun olduğunu göstermişlerdir. EGCG yüklü KNP'lerin FT-IR spekturumunda 3418 cm^{-1} (kontrol KNP'lerde poli hidroksi grubunu temsil eden) olan band 3429 cm^{-1} 'e kaydığı gösterilmiştir. KNP'lerin aksine EGCG yüklü KNP'lerin FT-IR spekturumunda 1458 cm^{-1} 'de benzersiz bir band görmüşlerdir. EGCG'nin hidroksil gruplarının, kitosanın hidroksil grupları ile bağlanmış hidrojen bağları olduğu ve KNP sentezi sırasında onunla birlikte EGCG'yi kapsüle ettiği sonucuna varmışlardır. Hu ve ark. (209) yaptıkları çalışmada FT-IR spekturumlarında kitosandaki 3447 cm^{-1} 'deki bandın KNP'lerde 3394 cm^{-1} 'e kaydığını ve bu gruplar ile NaTPP arasındaki etkileşimlerinde hidrojen bağına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca EGCG yüklendikten sonra bu pikin daha belirgin olarak 3351 cm^{-1} 'e kaydığı ve EGCG yüklü KNP'lerde, muhtemelen kitosandaki çapraz bağlanmamış amino gruplarının etkileşime girmesi nedeniyle karşılık gelen KNP'lere kıyasla düzleştiğini ifade etmişlerdir. KNP'lerdeki 1083 cm^{-1} bandının, EGCG yüklü KNP'lerde 1079 cm^{-1} 'e kaydığı ve bu kaymanın C-O-C gerilmesiyle ilgili olduğunu söylemişlerdir. Bu tez çalışmasında da EGCG'nin FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29 ve Şekil 30'da gösterilmiştir. Şekil 26'da saf kitosanın, 1600 cm^{-1} 'deki bandı, primer aminin N-H eğilme titreşimlerini temsil eder. Amid artığına ait C-N gerilmesi (amid III bandı), N-H eğilme titreşimleri (amid II bandı) ve C=O (amid I bandı) gerilmesi, sırasıyla 1320 , 1420 ve 1650 cm^{-1} 'de bantlarla temsil edilmiştir. Ek olarak, $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ 'deki arasındaki genişlemiş bir O-H ve N-H gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. 1383 cm^{-1} 'deki band C-H eğilme bandıdır. 1100 cm^{-1} civarında ise C-O-C simetrik gerilimine ait band yer almaktadır. Şekil 26'da saf kitosanın 3357 cm^{-1} 'de olan bandı, Şekil 28'de manitollü KNP'de daha düşük bir dalga boyuna 3245 cm^{-1} 'e kaydığı ve bu gruplar ve NaTPP arasındaki etkileşimlerinde hidrojen bağına bağlı olduğu belirtilmiştir. Şekil 29'da EGCG yüklü manitollü KNP'lerde Şekil 28'deki manitollü KNP'lere kıyasla, muhtemelen kitosandaki EGCG'nin çapraz bağlı olmayan amino grupları ile etkileşiminden dolayı $3100\text{ cm}^{-1}-3300\text{ cm}^{-1}$ bandı ortadan kalkmıştır. $2900\text{ cm}^{-1}-3000\text{ cm}^{-1}$ EGCG yüklü manitollü KNP, saf kitosan ve manitollü KNP bakarak bandların farklılığından da anlaşılabilir. 1455 cm^{-1} bandında Şekil 29'da EGCG yüklü manitollü KNP ve Şekil 28'deki manitollü KNP arasında bir şiddet değişikliği görülmüştür. Bu band 1458 cm^{-1} 'de EGCG aromatik halkasına ait =C-H gerilme bandı olduğunu yorumlayabiliriz. Şekil 27'de $1500\text{ cm}^{-1}-1600\text{ cm}^{-1}$ arasında olan band Şekil 26'da da bulunmuş olup manitolün etkisiyle Şekil 28 ve Şekil 29'da gözükmemiş olabilir ve $1000\text{ cm}^{-1}-1100\text{ cm}^{-1}$ aralığında olan bandın yarılması dikkat çekmektedir.

Vaezifar ve ark. (213) iyonik jelleşme yöntemini kullanarak sentezledikleri KNP'lerin ¹H-NMR'ını almışlardır. N-asetilde bulunan CH₃ grubu için 1,9 ppm'de bir pik, C2'de H için 3 ppm'de, C3,4,5,6'da H için 3,47-3,75 ppm'de ve OH gruplarında H için 4,8 ppm'de pik görülmüştür. Bu nanopartiküllerin kimyasal yapısının kitosan olduğunu göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında da sentezlenen manitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP'ler için sonuçlara bakarak karşılaştırdığımızda nanopartiküllerin kimyasal yapısının kitosan olduğu görülmüştür.

Sentezlenen manitollü KNP ve EGCG yüklü manitollü KNP formülasyonlarının üretim verimleri Tablo 13'te verilmiştir. Mannitollü KNP üretim verimi % 69,5 olarak bulunmuşken EGCG yüklü manitollü KNP üretim verimi % 64,3 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda EGCG yüklü KNP'lerin yükleme etkinlikleri Kumar ve ark. (186) % 58,38, Hu ve ark. (209) % 24-53 aralığında, Dudhani ve ark. (208) % 88, Li ve ark. (184) % 33,8 olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında da EGCG yüklü manitollü KNP'lerin yükleme etkinliğine bakıldığında % 33 ± 3,46 olarak bulunmuştur. Yükleme etkinliğindeki farklılıklar polimerin tipi, polimer molekül ağırlığı, viskozite, sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörler etkili olabilmektedir.

In vitro etkin madde salım çalışması manitollü KNP, EGCG yüklü manitollü KNP ve EGCG üzerinde pH 7,4 PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. EGCG nin hızlı bir salım profiliyle % 100'ünü saldığı ve etkin madde bulunmayan manitollü KNP'nin bir salım profili olmadığı gösterilmiştir. EGCG yüklü manitollü KNP ise 1. gün % 15,2, 6. gün % 18,7 ve 12. günde % 21 olarak bulunmuştur.

Nanopartiküler sistemlerin sağladığı avantajlar göz önüne alınarak bu çalışmada kuru göz hastalığı tedavisine yönelik ilk defa EGCG yüklü KNP'ler ile tablet formülasyonu hazırlanmıştır. EGCG yüklü manitollü KNP'ler liyofilize edilip elde edilen kuru toz ve yardımcı maddeler ile direkt basım tekniği kullanılarak tabletler basılmıştır. Fujiki ve ark. (214) çalışmasında da olduğu gibi daha önce yaş granülasyon ve çeşitli polimerlerin kullanıldığı bitki ekstraktları ile tablet çalışmaları olsa da direkt basım yöntemi ile yapılmış EGCG yüklü KNP'lerin kullanıldığı bir literatüre rastlanmamıştır.

Ön formülasyonlar (1. ve 2. Formülasyon) ve EGCG yüklü manitollü KNP içeren final toz karışımında nem içeriği tayini yapılmıştır. 1. formülasyonun nem içeriği % 0,58, 2. formülasyonun nem içeriği % 2,95 ve EGCG yüklü manitollü KNP içeren final toz karışımının nem içeriği % 2,46 olarak bulunmuştur. Nem miktar limiti Avrupa Farmakopesine göre maksimum % 3 olmalıdır ve bulunan sonuçlar uygunluğunu göstermiştir.

Yardımcı maddeler, ön formülasyonlar (1. ve 2. Formülasyon) ve EGCG yüklü manitollü KNP içeren final toz karışımlarında küme ve sıkıştırılmış dansite, Housner oranı ve Carr indeksi hesaplanarak Tablo 16’da verilmiştir. Hesaplanan sonuçlar Tablo 16’da verilen Carr indeksi ve Housner oranının kabul kriterlerine bakılarak toz akış özelliklerine karar verilmiştir. Toz akış özellikleri; laktoz monohidrat geçebilir, avicel PH102 çok zayıf, 1. formülasyon serbest, 2. formülasyon zayıf, manitoolü EGCG yüklü KNP içeren formülasyon zayıf olarak bulunmuştur. Yığın açısı tayinine göre toz akış özellikleri değerlendirildiğinde, elde edilen sonuçlar Tablo 17’de verilen kriterlere bakılarak karar verilmiştir. Toz akış özellikleri yardımcı maddeler, ön formülasyonlar ve EGCG yüklü manitollü KNP içeren final toz karışımlarında mükemmel olarak bulunmuştur. Housner oranı sonuçlarına göre belirlenen toz akış özellikleri, yığın açısı tayini ile belirlenen toz akış özellikleriyle farklılık gösterebilmektedir.

Görünüş tayininde seçilen ve sentezlenen toz özelliklerine uygun beyaz renkli, zımbamühre setine uygun yuvarlak, bikonveks ve istenilen özellikte kapsız tabletler elde edilmiştir.

Tablet ağırlıkları ve tablet tekdüzeliği tayininden elde edilen sonuçlar Tablo 18’de ortalaması, SS’sı ve % BSS hesaplanıp verilerek tablet ağırlıklarının %5’ten az daha az değişim gösterdiği görülmüştür.

Tabletlerin kalınlık, çap ve sertlik tayinlerinde elde edilen sonuçlar Tablo 19’da ortalaması, SS’sı ve % BSS hesaplanıp gösterilmiştir. 1.ve 2. formülasyon ile basılan tabletler arasındaki fark kullanılan yardımcı maddeler ve manuel olarak ayarlanan tablet cihazı olduğu düşünülmektedir. EGCG yüklü manitollü KNP içeren tabletlerin basımı için 1 ve 2. formülasyonlar arasında seçim yapıldığında uygun formülasyonun ortalama ve SS’sı $92,29 \pm 5,11$ N olan 2. formülasyon olduğuna karar verilmiştir. 2. Formülasyona göre basılan EGCG yüklü manitollü KNP içeren tabletlerin sertlik ortalamaları da $79,65 \pm 3,90$ N olarak bulunmuştur. 2. formülasyon ile EGCG yüklü manitollü KNP içeren tabletlerin sertlik farkının manuel olarak ayarlanan tablet cihazından ve liyofilize tozun özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Friabilite (ufalanma-aşınma) testinde elde edilen sonuçlar Tablo 20’de verilmiştir. Uygunluk kriteri friabilitenin % 1’in altında olması istenir. EGCG yüklü manitollü KNP içeren tabletlerin basımı için 1 ve 2. formülasyonlar arasında seçim yapıldığında uygun formülasyonun friabilitesi % 0,25 olan 2. formülasyon olduğuna karar verilmiştir. 2. Formülasyona göre basılan EGCG yüklü manitollü KNP içeren tabletlerin friabilitesi % 0,4

olarak bulunmuştur. 2. formülasyon ile EGCG yüklü mannitollü KNP içeren tabletlerin % 0,15'lik friabilite farkının tablet basma cihazından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Disintegrasyon (dağılma zamanı) testinden elde edilen sonuçlar Tablo 21'de verilmiştir. Uygunluk kriteri kaplı olmayan tabletlerde 15 dakikanın altında dağılma özelliği göstermesi istenir. 1 ve 2. Formülasyonlar sadece su ortamında disintegrasyon testi uygulanmış ve formülasyonların her ikisinde istenilen kriteri sağlamıştır. Ancak hızlı dağılan bir tablet formülasyonu tasarımı düşündüğümüzden dolayı EGCG yüklü mannitollü KNP içeren tabletlerin basımı için 1 ve 2. formülasyonlar arasında seçim yapıldığında uygun formülasyonun ortalama ve SS'sı $91 \pm 6,81$ saniye olan 2. formülasyon olduğuna karar verilmiştir. 2. Formülasyona göre basılan EGCG yüklü mannitollü KNP içeren tabletlerin disintegrasyon zamanları; su ortamında $32 \pm 3,85$ saniye, 0.1 N HCl ortamında $28 \pm 2,90$ saniye, pH 4.5 asetat tampon ortamında $30,5 \pm 2,74$ saniye, pH 6.8 fosfat tampon ortamında $17,33 \pm 1,86$ saniye olarak bulunmuştur. EGCG yüklü mannitollü KNP içeren tabletlerin dağılma zamanı için ortamlar arasında karşılaştırma yapılacak olursa en hızlı dağılma zamanı pH 6.8 fosfat tampon ortamıdır.



SONUÇLAR

Epigallokateşin gallat yüklü KNP'lerin iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenmesi, *in vitro* olarak karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ve kuru göz hastalığı için geliştirilen EGCG yüklü mannitollü KNP'ler ile tablet formunun hazırlanmasına ait yüksek lisans tez çalışmasında;

- Biyobozunur, biyoyumlu, doğal ve yenilenebilir bir polimer olan kitosan, toksik olmayan çapraz bağlayıcı olan NaTPP ve kuru göz hastalığı tedavisinde kullanılan suda çözünürlüğü yüksek bir etkin madde olan EGCG ile iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak nanopartikül formülasyonlarının sentezlenebileceği bulunmuştur.
- Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları ile ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, kimyasal yapısı, yüzey morfolojileri, termal özellikleri bulunmuş ve uygun özelliklere sahip polimerik taşıyıcı bir sistem elde edilmiştir.
- İyonik jelleşme yönteminde bazik ortamda nanopartikül oluşumu gerçekleşmediği görülmüş ve asidik ortam pH 3'te çalışılmasına karar verilmiştir.
- Liyofilizasyon öncesi kriyoprotektan olarak kullanılan mannitolün, mannitollü liyofilize edilen nanopartiküllerin mannitolsüz liyofilize edilen nanopartiküllerden tablet basımı için daha iyi bir liyofilize toz olarak kullanılabilceği saptanmıştır.
- Epigallokateşin gallat tayini için UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Epigallokateşin gallat yüklü KNP tablet formülasyonu için uygun tablet yardımcı maddeleri ve etkin madde olarak kullanılan EGCG yüklü mannitollü KNP'ler ile tablet basılabileceği sonucuna varılmıştır ve kuru göz hastalığı için kullanılabilcek bir ürün

tasarımı yapılmaya çalışılmıştır. Ancak klinik verilere ihtiyaç bulunmaktadır. Çalışma bundan sonra kuru göz modeli oluşturulan sıçanlarda devam ettirilecektir.

- Bundan sonra gerçekleştirilmesi planlanan diğer çalışmalar; % $33 \pm 3,46$ olarak bulunan EGCG'nin yükleme etkinliğinin artırılması, nanopartiküler sistemin *in vitro* etkinliğinin incelenmesi ve farklı tablet formülasyonlarının geliştirilmesi şeklindedir.



ÖZET

Kuru göz hastalığı gözyaşı ve göz yüzeyinin çok faktörlü bir hastalığı olup görme bozukluğuna, göz yüzeyindeki olası hasara ve gözyaşı filmi dengesizliği semptomlarına neden olabilmektedir. Topikal olarak göze uygulanan yapay gözyaşı formülasyonları, kuru göz hastalığının en çok başvurulan tedavi yöntemidir. Ancak hastalığı tam olarak tedavi edebilecek ideal bir yapay gözyaşı preparatı yoktur. Preparatlar şiddetli kuru göz hastalarında yetersiz kalmaktadır ve aynı zamanda içerdikleri koruyucular gözde duyarlılık oluşturmakta ve damlatıldıktan sonra uzun süre gözde kalmamaktadır.

Oral kuru göz tedavisinde omega-3 yağ asitleri içeren kapsül formları mevcut olup bu konuda yapılan literatür çalışmasında başka dahili kullanımı olan preparata rastlanmamıştır. Epigallokateşin gallat, yeşil çayın yapısında olan bir fenolik bileşiktir. Otoimmün bozukluklarla ilgili iltihap üzerinde bir inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada nanopartiküler sistem, içecek olarak tüketilen yeşil çayın ana polifenolü olan epigallokateşin gallat ile oluşturulmuş ve kuru göz tedavisinde oral olarak kullanılmak üzere tablet formülasyonu geliştirilmiştir.

Nanopartikül sentez yöntemlerinden olan iyonik jelleşme metodu ile kitosan ve çapraz bağlayıcı sodyum tripolifosfat kullanılarak epigallokateşin gallat yüklü kitosan nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin *in vitro* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tablet formülasyonu için uygun yardımcı maddeler seçilerek ön formülasyonlar oluşturulmuştur. Ön formülasyonların toz kontrolleri (nem içeriği tayini, küme dansite, sıkıştırılmış dansite, Housner oranı, Carr indeksi, yığın açısı tayini) ve gerekli tablet kontrolleri (görünüş tayini, tablet ağırlıkları ve ağırlık tekdüzeliği tayini, kalınlık, çap ve sertlik tayini,

friabilite testi, disintegrasyon testi) gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak uygun formulasyona karar verilip epigallokateşin gallat yüklü mannitollü kitosan nanopartiküller ile yardımcı maddelerin gerekli toz kontrolleri yapılarak 200 mg ağırlığında tabletler basılmış ve gerekli tablet kontrolleri yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: kuru göz hastalığı, epigallokateşin gallat, kitosan nanopartikül, karakterizasyon, , tablet

Bu alışma, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2018/161



DEVELOPMENT OF TABLET FORMULATION CONTAINING EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) LOADED NANOPARTICLE FOR TREATMENT OF DRY EYE DISEASE

SUMMARY

Dry eye disease is a multifactorial disease of the tear and the surface of the eye, which can cause visual impairment, possible damage to the surface of the eye, and symptoms of tear film imbalance. Artificial tear formulations applied topically to the eye are the most commonly used treatment of dry eye disease. However, there is no ideal artificial tear preparation that can cure the disease completely. The preparations are insufficient in severe dry eye patients, and the preservatives they contain also cause eye sensitivity do not remain in the eye for a long time after instillation.

There are capsule forms containing omega-3 fatty acids in oral dry eye treatment and no other internally used preparations were found in the literature study on this subject. Epigallocatechin gallate is a phenolic compound in the structure of green tea. It is known to have an inhibitory effect on inflammation associated with autoimmune disorders. In this study, the nanoparticulate system was formed with epigallocatechin gallate, the main polyphenol of green tea consumed as a beverage, and tablet formulation was developed to be used orally in dry eye treatment.

Epigallocatechin gallate loaded chitosan nanoparticles were synthesized using chitosan and crosslinker sodium tripolyphosphate by ionic gelling method which is one of the

nanoparticle synthesis methods. *In vitro* characterization studies of synthesized nanoparticles were performed.

Pre-formulations were formed by selecting suitable excipients for the tablet formulation. Dust controls (determination of moisture content, cluster density, compressed density, Housner ratio, Carr index, heap angle determination) and necessary tablet controls (aspect determination, tablet weights and weight uniformity determination, determination of thickness, diameter and hardness, friability test, disintegration test) of the pre-formulations were performed. As a result, the appropriate formulation was decided and mannitol epigallocatechin gallate loaded chitosan nanoparticles and the necessary powder controls of the excipients were made and tablets weighing 200 mg were printed and required tablet controls were performed.

Key words: dry eye disease, epigallocatechin gallate, chitosan nanoparticle, characterization, tablet

This work was supported by the Trakya University Scientific Research Projects Unit. Project number: 2018/161.



KAYNAKLAR

1. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48(10):4391-8.
2. Prabha JL. Tear secretion-a short review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2014;6(3):155.
3. Lee HS, Chauhan SK, Okanobo A, Nallasamy N, Dana R. Therapeutic efficacy of topical epigallocatechin gallate (EGCG) in murine dry eye. *Cornea* 2011;30(12):1465.
4. Lemp A. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on clinical trials in dry eyes. *Eye & Contact Lens* 1995;21(4):221-32.
5. Craig JP, Tomlinson A. Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation. *Optometry and Vision Science* 1997;74(1):8-13.
6. McCulley JP, Shine WE. The lipid layer of tears: dependent on meibomian gland function. *Experimental eye research* 2004;78(3):361-5.
7. Tabery HM. *Keratoconjunctivitis Sicca and Filamentary Keratopathy: In Vivo Morphology in the Human Cornea and Conjunctiva: Springer Science & Business Media; 2012.*
8. Tiffany J. Tears in health and disease. *Eye* 2003;17(8):923.
9. Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in retinal and eye research* 2004;23(4):449-74.

10. Tsuji F, Kawazu K. Biomarker identification of tear fluid. *Metabolomics* 2012;2(105):2153-0769.
11. Jain NK. *Controlled and novel drug delivery*: CBS publishers & distributors; 1997.
12. Snyder C, Fullard RJ. Clinical profiles of non dry eye patients and correlations with tear protein levels. *International ophthalmology* 1991;15(6):383-9.
13. Reddy IK, Ganesan MG. *Ocular therapeutics and drug delivery: An overview*. Ocular therapeutics and drug delivery: CRS Press, Boca Raton, FL; 1995.
14. Lemp MA. Advances in understanding and managing dry eye disease. *American journal of ophthalmology* 2008;146(3):350-6.
15. Delaleu N, Jonsson R, Koller MM. Sjögren's syndrome. *European journal of oral sciences* 2005;113(2):101-13.
16. The definition and classification of dry eye disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf* 2007;5:75-92.
17. Yeh S, Song XJ, Farley W, Li D-Q, Stern ME, Pflugfelder SC. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003;44(1):124-9.
18. Hessen M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory ocular disease. *Journal of ophthalmic & vision research* 2014;9(2):240.
19. Wilson SE, Perry HD. Long-term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology* 2007;114(1):76-9.
20. Yoon K-C, De Paiva CS, Qi H, Chen Z, Farley WJ, Li D-Q, et al. Expression of Th-1 chemokines and chemokine receptors on the ocular surface of C57BL/6 mice: effects of desiccating stress. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48(6):2561-9.
21. Kalt W, Hanneken A, Milbury P, Tremblay F. Recent research on polyphenolics in vision and eye health. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010;58(7):4001-7.
22. Luo L, Li D-Q, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004;45(12):4293-301.

23. Whitcup SM, Azar DT. Pharmacologic Therapy of Ocular Disease: Springer; 2017.
24. Gayton JL. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2009;3:405.
25. Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary ophthalmology*: John Wiley & Sons; 2012.
26. Foulks GN. Pharmacological management of dry eye in the elderly patient. *Drugs & aging* 2008;25(2):105-18.
27. Khurana A, Choudhary R, Ahluwalia B, Gupta S. Hospital epidemiology of dry eye. *Indian journal of ophthalmology* 1991;39(2):55.
28. Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, Barabino S, Schaumberg DA, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Archives of ophthalmology* 2008;126(2):219-25.
29. Perry HD. Dry eye disease: pathophysiology, classification, and diagnosis. *Am J Manag Care* 2008;14(3 Suppl):S79-87.
30. Sullivan DA, Sullivan BD, Evans JE, Schirra F, Yamagami H, Liu M, et al. Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;966(1):211-22.
31. Erdem U, Ozdegirmenci O, Sobaci E, Sobaci G, Göktolga U, Dagli S. Dry eye in postmenopausal women using hormone replacement therapy. *Maturitas* 2007;56(3):257-62.
32. Chen Q, Wang J, Shen M, Cai C, Li J, Cui L, et al. Lower volumes of tear menisci in contact lens wearers with dry eye symptoms. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009;50(7):3159-63.
33. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Survey of ophthalmology* 2001;45:S221-S6.
34. Kaercher T, Bron AJ. Classification and diagnosis of dry eye. *Surgery for the Dry Eye*. 41: Karger Publishers; 2008. p. 36-53.
35. Murube J, Németh J, Hüh H, Kaynak-Hekimhan P, Horwath-Winter J, Agarwal A, et al. The triple classification of dry eye for practical clinical use. *European journal of ophthalmology* 2005;15(6):660-7.

36. Petroustos G, Paschides C, Karakostas K, Psilas K. Diagnostic tests for dry eye disease in normals and dry eye patients with and without Sjögren's syndrome. *Ophthalmic research* 1992;24(6):326-31.
37. Pflugfelder SC, Tseng S, Sanabria O, Kell H, Garcia CG, Felix C, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea* 1998;17(1):38-56.
38. Yokoi N, Komuro A. Non-invasive methods of assessing the tear film. *Experimental eye research* 2004;78(3):399-407.
39. Rosenfield M. Computer vision syndrome: a review of ocular causes and potential treatments. *Ophthalmic and Physiological Optics* 2011;31(5):502-15.
40. Abelson MB, Ousler GW, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3*: Springer; 2002. p. 1121-5.
41. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Current eye research* 1985;4(1):1-7.
42. Bron AJ, Abelson MB, Ousler G, Pearce E, Tomlinson A, Yokoi N, et al. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocular Surface* 2007;5(2):108-52.
43. Watanabe H, Tanaka M, editors. Rose Bengal staining and expression of a mucin-like glycoprotein in corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 1996: Lippincott-Raven Publ 227 East Washington SQ, Philadelphia, PA 19106.
44. Afonso AA, Monroy D, Stern ME, Feuer WJ, Tseng SC, Pflugfelder SC. Correlation of tear fluorescein clearance and Schirmer test scores with ocular irritation symptoms. *Ophthalmology* 1999;106(4):803-10.
45. Tsubota K, Kaido M, Yagi Y, Fujihara T, Shimmura S. Diseases associated with ocular surface abnormalities: the importance of reflex tearing. *British journal of ophthalmology* 1999;83(1):89-91.
46. Javadi M-A, Feizi S. Dry eye syndrome. *Journal of ophthalmic & vision research* 2011;6(3):192.

47. Mackor A, Van Bijsterveld O. Tear function parameters in keratoconjunctivitis sicca with and without the association of Sjögren's syndrome. *Ophthalmologica* 1988;196(4):169-74.
48. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, del Castillo JMB, Geffen D, Tauber J, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *American journal of ophthalmology* 2011;151(5):792-8.
49. Rolando M, Terragna F, Giordano G, Calabria G. Conjunctival Surface Damage Distribution in Keratoconjunctivitis sicca An Impression Cytology Study. *Ophthalmologica* 1990;200(4):170-6.
50. Calonge M, Diebold Y, Sáez V, de Salamanca AEq, García-Vázquez C, Corrales RM, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Experimental eye research* 2004;78(3):457-72.
51. Begley CG, Caffery B, Chalmers RL, Mitchell GL. Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye. *Cornea* 2002;21(7):664-70.
52. Schein OD, Tielsch JM, Muñoz B, Bandeen-Roche K, West S. Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly: a population-based perspective. *Ophthalmology* 1997;104(9):1395-401.
53. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the ocular surface disease index. *Archives of ophthalmology* 2000;118(5):615-21.
54. Sahai A, Malik P. Dry eye: prevalence and attributable risk factors in a hospital-based population. *Indian journal of ophthalmology* 2005;53(2):87.
55. Perry HD, Donnenfeld ED. Dry eye diagnosis and management in 2004. *Current opinion in ophthalmology* 2004;15(4):299-304.
56. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea* 2004;23(3):272-85.
57. Vaikoussis E, Georgiou P, Nomicarios D. Tear mucus ferning in patients with Sjögren's syndrome. *Documenta ophthalmologica* 1994;87(2):145-51.
58. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52(4):1922-9.

59. Jackson WB. Management of dysfunctional tear syndrome: a Canadian consensus. *Canadian Journal of Ophthalmology* 2009;44(4):385-94.
60. Plugfelder S, Geerling G, Kinoshita S. Management and therapy of dry eye disease: report of the management and therapy subcommittee of the international dry eye workshop. *Ocul Surf* 2007;5(2):163-78.
61. Saettone MF, Monti D, Torracca MT, Chetoni P. Mucoadhesive ophthalmic vehicles: evaluation of polymeric low-viscosity formulations. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 1994;10(1):83-92.
62. Berdy GJ, Abelson MB, Smith LM, George MA. Preservative-free artificial tear preparations: assessment of corneal epithelial toxic effects. *Archives of ophthalmology* 1992;110(4):528-32.
63. Pray WS. *Nonprescription product therapeutics*: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
64. Geerling G, Hartwig D. Autologous serum-eye-drops for ocular surface disorders. A literature review and recommendations for their application. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 2002;99(12):949-59.
65. Perry HD, Doshi-Carnevale S, Donnenfeld ED, Solomon R, Biser SA, Bloom AH. Efficacy of commercially available topical cyclosporine A 0.05% in the treatment of meibomian gland dysfunction. *Cornea* 2006;25(2):171-5.
66. Balaram M, Schaumberg DA, Dana MR. Efficacy and tolerability outcomes after punctal occlusion with silicone plugs in dry eye syndrome. *American journal of ophthalmology* 2001;131(1):30-6.
67. De Paiva CS, Pflugfelder SC. *Diagnostic approaches to lacrimal keratoconjunctivitis. Dry Eye and Ocular Surface Disorders*, New York, NY: Marcel Dekker 2004:269-70.
68. Schein OD, Munoz B, Tielsch J, Roche KJB, West SK. An epidemiologic study of medication use and symptoms of dry eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1997;38(4).
69. Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith J, Gipson IK. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Archives of ophthalmology* 2000;118(11):1489-96.
70. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000;47(2-3):119-25.

71. Perry HD, Solomon R, Donnenfeld ED, Perry AR, Wittpenn JR, Greenman HE, et al. Evaluation of topical cyclosporine for the treatment of dry eye disease. *Archives of Ophthalmology* 2008;126(8):1046-50.
72. Gilbard JP. Non-toxic ophthalmic preparations. Google Patents; 1988.
73. Avramoff A, Khan W, Ezra A, Elgart A, Hoffman A, Domb AJ. Cyclosporin pro-dispersion liposphere formulation. *Journal of controlled release* 2012;160(2):401-6.
74. Gokce EH, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Güneri T, et al. Cyclosporine A loaded SLNs: evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *International journal of pharmaceutics* 2008;364(1):76-86.
75. Bron A, Mengher L. The ocular surface in keratoconjunctivitis sicca. *Eye* 1989;3(4):428.
76. Sommer A, Emran N. Topical retinoic acid in the treatment of corneal xerophthalmia. *American journal of ophthalmology* 1978;86(5):615-7.
77. Al Mahmood AM, Al-Swailem SA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye syndrome: A myth or reality? *Saudi Journal of Ophthalmology* 2014;28(3):195-7.
78. Rosenberg ES, Asbell PA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye. *The ocular surface* 2010;8(1):18-28.
79. Miljanovic B, Trivedi KA, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *The American journal of clinical nutrition* 2005;82(4):887-93.
80. Lambiase A, Sullivan BD, Schmidt TA, Sullivan DA, Jay GD, Truitt III ER, et al. A two-week, randomized, double-masked study to evaluate safety and efficacy of lubricin (150 µg/mL) eye drops versus sodium hyaluronate (HA) 0.18% eye drops (Vismed®) in patients with moderate dry eye disease. *The ocular surface* 2017;15(1):77-87.
81. Keating GM. Lifitegrast ophthalmic solution 5%: a review in dry eye disease. *Drugs* 2017;77(2):201-8.
82. Donnenfeld ED, Karpecki PM, Majmudar PA, Nichols KK, Raychaudhuri A, Roy M, et al. Safety of lifitegrast ophthalmic solution 5.0% in patients with dry eye disease: a 1-year, multicenter, randomized, placebo-controlled study. *Cornea* 2016;35(6):741.
83. Ngo W, Srinivasan S, Houtman D, Jones L. The relief of dry eye signs and symptoms using a combination of lubricants, lid hygiene and ocular nutraceuticals. *Journal of optometry* 2017;10(1):26-33.

84. Igarashi T, Fujita M, Yamada Y, Kobayashi M, Fujimoto C, Takahashi H, et al. Improvements in signs and symptoms of dry eye after instillation of 2% rebamipide. *Journal of Nippon Medical School* 2015;82(5):229-36.
85. Kilic S, Kulualp K. Efficacy of Several Therapeutic Agents in a Murine Model of Dry Eye Syndrome. *Comparative medicine* 2016;66(2):112-8.
86. Park DH, Chung JK, Seo DR, Lee SJ. Clinical effects and safety of 3% diquafosol ophthalmic solution for patients with dry eye after cataract surgery: a randomized controlled trial. *American journal of ophthalmology* 2016;163:122-31.
87. Cui X, Xiang J, Zhu W, Wei A, Le Q, Xu J, et al. Vitamin A palmitate and carbomer gel protects the conjunctiva of patients with long-term prostaglandin analogs application. *Journal of glaucoma* 2016;25(6):487-92.
88. Jiang X, Lv H, Qiu W, Liu Z, Li X, Wang W. Efficiency and safety of subconjunctival injection of anti-VEGF agent–bevacizumab–in treating dry eye. *Drug design, development and therapy* 2015;9:3043.
89. Yang JM, Choi W, Kim N, Yoon KC. Comparison of topical cyclosporine and diquafosol treatment in dry eye. *Optometry and Vision Science* 2015;92(9):e296-e302.
90. Simmons PA, Liu H, Carlisle-Wilcox C, Vehige JG. Efficacy and safety of two new formulations of artificial tears in subjects with dry eye disease: a 3-month, multicenter, active-controlled, randomized trial. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2015;9:665.
91. She Y, Li J, Xiao B, Lu H, Liu H, Simmons PA, et al. Evaluation of a novel artificial tear in the prevention and treatment of dry eye in an animal model. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2015;31(9):525-30.
92. Leonardi A, Van Setten G, Amrane M, Ismail D, Garrigue J-S, Figueiredo FC, et al. Efficacy and safety of 0.1% cyclosporine A cationic emulsion in the treatment of severe dry eye disease: a multicenter randomized trial. *European journal of ophthalmology* 2016;26(4):287-96.
93. Park Y, Song JS, Choi CY, Yoon KC, Lee HK, Kim HS. A randomized multicenter study comparing 0.1%, 0.15%, and 0.3% sodium hyaluronate with 0.05% cyclosporine in the treatment of dry eye. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2017;33(2):66-72.
94. Liu X-F, Hao J-L, Xie T, Mukhtar NJ, Zhang W, Malik TH, et al. Curcumin, a potential therapeutic candidate for anterior segment eye diseases: a review. *Frontiers in pharmacology* 2017;8:66.

95. Riva A, Togni S, Franceschi F, Kawada S, Inaba Y, Eggenhoffner R, et al. The effect of a natural, standardized bilberry extract (Mirtoselect®) in dry eye: a randomized, double blinded, placebo-controlled trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(10):2518-25.
96. Kim K-A, Hyun LC, Jung SH, Yang SJ. The leaves of *Diospyros kaki* exert beneficial effects on a benzalkonium chloride–induced murine dry eye model. *Molecular vision* 2016;22:284.
97. Woźniak A, Paduch R. Aloe vera extract activity on human corneal cells. *Pharmaceutical biology* 2012;50(2):147-54.
98. Cui L, Lee HS, Li Y, Choi J-H, Yun J-J, Jung JE, et al. Experimental and Clinical Applications of *Chamaecyparis obtusa* Extracts in Dry Eye Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017;2017.
99. Kim C-S, Jo K, Lee I-S, Kim J. Topical application of apricot kernel extract improves dry eye symptoms in a unilateral exorbital lacrimal gland excision mouse. *Nutrients* 2016;8(11):750.
100. Asena L, Suveren EH, Karabay G, Dursun Altinors D. Human breast milk drops promote corneal epithelial wound healing. *Current eye research* 2017;42(4):506-12.
101. Jankauskiene J, Jarushaitiene D, Cheksteryte V, Rachys J. Using 20% honey solution eye drops in patients with dry eye syndrome. *Journal of apicultural research* 2007;46(4):232-5.
102. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life sciences* 2006;78(18):2081-7.
103. Zhang N, Li H, Jia J, He M. Anti-inflammatory effect of curcumin on mast cell-mediated allergic responses in ovalbumin-induced allergic rhinitis mouse. *Cellular immunology* 2015;298(1-2):88-95.
104. Gizzi C, Belcaro G, Gizzi G, Feragalli B, Dugall M, Luzzi R, et al. Bilberry extracts are not created equal: the role of non anthocyanin fraction. Discovering the “dark side of the force” in a preliminary study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20(11):2418-24.
105. Bei W, Zang L, Guo J, Peng W, Xu A, Good DA, et al. Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from *Diospyros kaki* leaves. *Journal of ethnopharmacology* 2009;126(1):134-42.

106. Bei W-J, Xu A, Li C, Cabot P, Hermanussen S. Flavonoids from *Diospyros kaki* inhibit the adhesion between lymphocyte and dorsal root ganglion. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials* 2009;32(5):740-4.
107. Izuchi R, Nakai Y, Takahashi H, Ushiyama S, Okada S, Misaka T, et al. Hepatic gene expression of the insulin signaling pathway is altered by administration of persimmon peel extract: a DNA microarray study using type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 2011;59(7):3320-9.
108. Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, et al. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin– Ciocalteu assay. *Journal of agricultural and food chemistry* 2004;52(8):2391-6.
109. Kim H-H, Kim D-S, Kim S-W, Lim S-H, Kim DK, Shin T-Y, et al. Inhibitory effects of *Diospyros kaki* in a model of allergic inflammation: Role of cAMP, calcium and nuclear factor- κ B. *International journal of molecular medicine* 2013;32(4):945-51.
110. Gorinstein S, Zachwieja Z, Folta M, Barton H, Piotrowicz J, Zemser M, et al. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *Journal of agricultural and food chemistry* 2001;49(2):952-7.
111. Izuchi R, Takahashi H, Inada Y. Preparing a carotenoid polyphenol-enriched extract from the peel of persimmon, *Diospyros kaki* Lf. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2009;73(12):2793-5.
112. Lee KY, Weintraub ST, Yu BP. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free radical biology and medicine* 2000;28(2):261-5.
113. Choi S, Chung M-H, editors. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in integrative medicine*; 2003: Elsevier.
114. Sarkar D, Dutta A, Das M, Sarkar K, Mandal C, Chatterjee M. Effect of *Aloe vera* on nitric oxide production by macrophages during inflammation. *Indian journal of pharmacology* 2005;37(6):371.
115. Yoo EA, Kim SD, Lee WM, Park HJ, Kim SK, Cho JY, et al. Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aloe saponaria* Haw. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 2008;22(10):1389-95.

116. Kigundu EV, Rukunga GM, Keriko JM, Tonui WK, Gathirwa JW, Kirira PG, et al. Anti-parasitic activity and cytotoxicity of selected medicinal plants from Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;123(3):504-9.
117. Ozsoy N, Candoken E, Akev N. Implications for degenerative disorders: Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and β -tocopherol in *Aloe vera*. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2009;2(2):99-106.
118. Chien S-C, Chang J-Y, Kuo C-C, Hsieh C-C, Yang N-S, Kuo Y-H. Cytotoxic and novel skeleton compounds from the heartwood of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *Tetrahedron letters* 2007;48(9):1567-9.
119. Cheng S-S, Chang H-T, Wu C-L, Chang S-T. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource technology* 2007;98(2):456-9.
120. Marimuthu P, Wu CL, Chang HT, Chang ST. Antioxidant activity of the ethanolic extract from the bark of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008;88(8):1400-5.
121. Cheng S-C, Li W-H, Shi Y-C, Yen P-L, Lin H-Y, Liao VH-C, et al. Antioxidant activity and delayed aging effects of hot water extract from *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* 2014;62(18):4159-65.
122. An B-S, Kang J-H, Yang H, Jung E-M, Kang H-S, Choi I-G, et al. Anti-inflammatory effects of essential oils from *Chamaecyparis obtusa* via the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Molecular medicine reports* 2013;8(1):255-9.
123. Jeong EJ, Hwang L, Lee M, Lee KY, Ahn M-J, Sung SH. Neuroprotective biflavonoids of *Chamaecyparis obtusa* leaves against glutamate-induced oxidative stress in HT22 hippocampal cells. *Food and chemical toxicology* 2014;64:397-402.
124. Hong E-J, Na K-J, Choi I-G, Choi K-C, Jeung E-B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004;27(6):863-6.
125. Bae D, Seol H, Yoon H-G, Na J-R, Oh K, Choi CY, et al. Inhaled essential oil from *Chamaecyparis obtusa* ameliorates the impairments of cognitive function induced by injection of β -amyloid in rats. *Pharmaceutical biology* 2012;50(7):900-10.
126. Chang H-K, Yang H-Y, Lee T-H, Shin M-C, Lee M-H, Shin M-S, et al. *Armeniaca* semen extract suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005;28(3):449-54.

127. Xiao X, He H, Lin Z, Luo P, He H, Zhou T, et al. Therapeutic effects of epidermal growth factor on benzalkonium chloride-induced dry eye in a mouse model. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53(1):191-7.
128. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *British Journal of Ophthalmology* 1999;83(4):390-5.
129. Pflugfelder SC. *Antiinflammatory therapy for dry eye*. Elsevier; 2004.
130. Bucolo C, Musumeci M, Salomone S, Romano GL, Leggio GM, Gagliano C, et al. Effects of topical fucosyl-lactose, a milk oligosaccharide, on dry eye model: an example of nutraceutical candidate. *Frontiers in pharmacology* 2015;6:280.
131. Goldman AS, Smith CW. Host resistance factors in human milk. *The Journal of pediatrics* 1973;82(6):1082-90.
132. Garofalo R, Chheda S, Mei F, Palkowetz KH, Rudloff HE, Schmalstieg FC, et al. Interleukin-10 in human milk. *Pediatric research* 1995;37(4):444.
133. Baricelli J, Rocafull MA, Vázquez D, Bastidas B, Báez-Ramírez E, Thomas LE. β -defensin-2 in breast milk displays a broad antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Jornal de pediatria* 2015;91(1):36-43.
134. Albietz JM, Lenton LM. Effect of antibacterial honey on the ocular flora in tear deficiency and meibomian gland disease. *Cornea* 2006;25(9):1012-9.
135. Wong D, Albietz JM, Tran H, Du Toit C, Li AH, Yun T, et al. Treatment of contact lens related dry eye with antibacterial honey. *Contact Lens and Anterior Eye* 2017;40(6):389-93.
136. Nejabat M, Reza SA, Zadmehr M, Yasemi M, Sobhani Z. Efficacy of green tea extract for treatment of dry eye and meibomian gland dysfunction; A double-blind randomized controlled clinical trial study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2017;11(2):NC05.
137. Gillespie K, Kodani I, Dickinson DP, Ogbureke KU, Camba AM, Wu M, et al. Effects of oral consumption of the green tea polyphenol EGCG in a murine model for human Sjogren's syndrome, an autoimmune disease. *Life sciences* 2008;83(17-18):581-8.

138. Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel P-M, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF- κ B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 2004;173(9):5794-800.
139. Yoneyama S, Kawai K, Tsuno NH, Okaji Y, Asakage M, Tsuchiya T, et al. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008;121(1):209-14.
140. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life sciences* 2006;78(18):2073-80.
141. Łuczaj W, Skrzydlewska E. Antioxidative properties of black tea. *Preventive medicine* 2005;40(6):910-8.
142. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *The Journal of nutritional biochemistry* 2006;17(5):291-306.
143. Yilmaz Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology* 2006;17(2):64-71.
144. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 2002;13(10):572-84.
145. Goto T, Yoshida Y, Kiso M, Nagashima H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *Journal of Chromatography A* 1996;749(1-2):295-9.
146. Gramza A, Korczak J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology* 2005;16(8):351-8.
147. Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. *Nutrition Reviews* 2000;58(1):1-10.
148. Mendoza-Wilson AM, Glossman-Mitnik D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure: Theochem* 2006;761(1-3):97-106.
149. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology* 2006;72(11):1439-52.

150. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ - -Epigallocatechin gallate.](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/-Epigallocatechin_gallate) (19.08.2019).
151. Ochekpe NA, Olorunfemi PO, Ngwuluka NC. Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications. *Tropical journal of pharmaceutical research* 2009;8(3).
152. Kumar M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci* 2000;3(2):234-58.
153. Couvreur P, Kante B, Grislain L, Roland M, Speiser P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences* 1982;71(7):790-2.
154. Gutierro I, Hernandez R, Igartua M, Gascon A, Pedraz J. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine* 2002;21(1-2):67-77.
155. Athar M, Das AJ. Therapeutic nanoparticles: State-of-the-art of nanomedicine. *Adv Mater Rev* 2014;1(1):25-37.
156. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release* 2004;100(1):5-28.
157. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research* 2006;5(1):561-73.
158. Sahoo SK, Misra R, Parveen S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine in Cancer: Pan Stanford*; 2017. p. 73-124.
159. Chen F, Wang Z-C, Lin C-J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. *Materials letters* 2002;57(4):858-61.
160. Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park I-Y, Kim B-C, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology advances* 2008;26(1):1-21.
161. Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology* 2006;8(3):203.
162. Agboh O, Qin Y. Chitin and chitosan fibers. *Polymers for Advanced Technologies* 1997;8(6):355-65.

163. López-León T, Carvalho E, Seijo B, Ortega-Vinuesa J, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005;283(2):344-51.
164. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research* 2004;339(16):2693-700.
165. Dutta PK, Dutta J, Tripathi V. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. 2004.
166. Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon Y-J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology* 1999;10(2):37-51.
167. Agulló E, Rodríguez MS, Ramos V, Albertengo L. Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience* 2003;3(10):521-30.
168. Tokatlı K, Demirdöven A. Kitosan ve kitosan bazlı yenilebilir film uygulamaları. *Akademik Gıda* 2015;13(4):348-53.
169. Halaçoğlu MD, Uğurlu T. Tabletler ve tablet basımına etki eden kuvvetlerin belirlenmesinde kullanılabilecek bazı yeni eşitlikler. *Clinical and Experimental Health Sciences* 5(3):204-10.
170. Geçgil Ş. Parenteral preparatlar, Farmasötik Teknolojiye Başlangıç. İstanbul: Cihan Matbaacılık 1991:389-402.
171. Gürsoy A. Enjeksiyonluk Dozaj Şekilleri, Diğer Steril Çözeltiler Kan ve Kan Ürünleri, Farmasötik Teknoloji Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. İstanbul: Pıksel Bilişim Matbacılık Reklamcılık 2004:213-32.
172. Deshpande A, Panya L. Evaluation of sorghum starch as a tablet disintegrant and binder. *Journal of pharmacy and pharmacology* 1987;39(6):495-6.
173. Chebli C, Cartilier L. Cross-linked cellulose as a tablet excipient: A binding/disintegrating agent. *International journal of Pharmaceutics* 1998;171(1):101-10.
174. Hammouda Y, Salakawy S. Non-enzymic browning in solid-dosage forms: lactose-induced discoloration of neomycin tablets. *Die Pharmazie* 1971;26(10):636.

175. Ferrari F, Bertoni M, Bonferoni CM, Rossi S, Caramella C, Bolhuis GK. Dissolution enhancement of an insoluble drug by physical mixture with a superdisintegrant: optimization with a simplex lattice design. *Pharmaceutical development and technology* 1996;1(2):159-64.
176. Bassani V, González GO, Petrovick P. Influence of adjuvants on the dissolution profile of tablets containing high doses of spray-dried extract of *Maytenus ilicifolia*. *Die Pharmazie* 2001;56(9):730-3.
177. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. *Handbook of pharmaceutical excipients*: Pharmaceutical press London; 2006.
178. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A* 2003;987(1-2):57-66.
179. Van Zoonen P, Hoogerbrugge R, Gort SM, van de Wiel HJ, van't Klooster HA. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1999;18(9-10):584-93.
180. Tomiyama N, Tsuji H, Watanabe M, Takeda M, Harada T, Kobayashi H. High-performance liquid chromatographic method for determination of DDT and its degradation products in rat plasma, liver and brain: validation and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000;748(2):361-8.
181. Özlem SE, Kayalı A. An overview on analytical method validation. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2005;34(1):41-57.
182. <https://www.chem.utoronto.ca/coursenotes/analsci/stats/ErrRegr.html> (19.08.2019).
183. Dube A, Nicolazzo JA, Larson I. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010;41(2):219-25.
184. Li JL, Zu YG, Zhao XH, An ZG, Sui XY, Wang KL, et al., editors. *Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation of EGCG-Loaded Chitosan Nanoparticles*. *Advanced Materials Research*; 2011: Trans Tech Publ.
185. Tagaç AA, Sarp Ö, Yurdakoç K. Controlled Release of Vitamin C from Chitosan Nanoparticles. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 2018;46(1):69-77.

186. Kumar SA, Suresh M, Kumar SK, Kalaiselvi P. Synthesis and characterization of major green tea catechin nanoparticle. *Asian Journal of Chemistry* 2013;25(Supplementary Issue):343.
187. The United States Pharmacopoeia 34-The National Pharmacopoeia 29. The United States Pharmacopoeia Convention, Inc. 2011.
188. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso M. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science* 1997;63(1):125-32.
189. Qi L, Xu Z. Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2004;251(1-3):183-90.
190. Lee D-W, Powers K, Baney R. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2004;58(4):371-7.
191. Zhong Y, Ma C-M, Shahidi F. Antioxidant and antiviral activities of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives. *Journal of Functional Foods* 2012;4(1):87-93.
192. Du GJ, Wang CZ, Qi LW, Zhang ZY, Calway T, He TC, et al. The synergistic apoptotic interaction of panaxadiol and epigallocatechin gallate in human colorectal cancer cells. *Phytotherapy research* 2013;27(2):272-7.
193. Cavet ME, Harrington KL, Vollmer TR, Ward KW, Zhang J-Z. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Molecular vision* 2011;17:533.
194. Gordon NC, Wareham DW. Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *International journal of antimicrobial agents* 2010;36(2):129-31.
195. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition* 2005;81(1):317S-25S.
196. Li M, Liu J-T, Pang X-M, Han C-J, Mao J-J. Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin II and interleukin-6-induced C-reactive protein production in macrophages. *Pharmacological Reports* 2012;64(4):912-8.

197. Mähler A, Mandel S, Lorenz M, Ruegg U, Wanker EE, Boschmann M, et al. Epigallocatechin-3-gallate: a useful, effective and safe clinical approach for targeted prevention and individualised treatment of neurological diseases? *EPMA Journal* 2013;4(1):5.
198. Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology* 2010;17(1):55-9.
199. Riegsecker S, Wiczynski D, Kaplan MJ, Ahmed S. Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. *Life sciences* 2013;93(8):307-12.
200. Morinobu A, Biao W, Tanaka S, Horiuchi M, Jun L, Tsuji G, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2008;58(7):2012-8.
201. Fanguero JF, Andreani T, Fernandes L, Garcia ML, Egea MA, Silva AM, et al. Physicochemical characterization of epigallocatechin gallate lipid nanoparticles (EGCG-LNs) for ocular instillation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014;123:452-60.
202. Kador PF. Topical applied nutraceutical antioxidant formulation reduces ocular oxidative stress. *Functional Foods in Health and Disease* 2017;7(1):68-87.
203. Tseng C-L, Hung Y-J, Chen Z-Y, Fang H-W, Chen K-H. Synergistic effect of artificial tears containing epigallocatechin gallate and hyaluronic acid for the treatment of rabbits with dry eye syndrome. *PLoS One* 2016;11(6):e0157982.
204. Chen H-C, Chen Z-Y, Wang T-J, Drew V, Tseng C-L, Fang H-W, et al. Herbal supplement in a buffer for dry eye syndrome treatment. *International journal of molecular sciences* 2017;18(8):1697.
205. Luo L-J, Lai J-Y. Epigallocatechin gallate-loaded gelatin-g-poly (N-isopropylacrylamide) as a new ophthalmic pharmaceutical formulation for topical use in the treatment of dry eye syndrome. *Scientific reports* 2017;7(1):9380.
206. Prego C, Alonso-Sande M, Vila A, Torres D, Remuñán C, Alonso M, editors. *Nanomedicines for overcoming biological barriers: Nanoparticles as a carrier for intestinal drug absorption*. 2nd NanoSpain Workshop, Barcelona; 2005.

207. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2006;2(2):53-65.
208. Dudhani AR, Kosaraju SL. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate polymers* 2010;81(2):243-51.
209. Hu B, Pan C, Sun Y, Hou Z, Ye H, Hu B, et al. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan– tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(16):7451-8.
210. Liu Y, Hu S, Feng Y, Zou P, Wang Y, Qin P, et al. Preparation of chitosan-Epigallocatechin-3-O-gallate nanoparticles and their inhibitory effect on the growth of breast cancer cells. *Journal of Innovative Optical Health Sciences* 2018;11(04):1850018.
211. Zhang H, Oh M, Allen C, Kumacheva E. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules* 2004;5(6):2461-8.
212. Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journal of nanobiotechnology* 2010;8(1):18.
213. Vaezifar S, Razavi S, Golozar MA, Karbasi S, Morshed M, Kamali M. Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. *Journal of Cluster Science* 2013;24(3):891-903.
214. Fujiki H, Suganuma M, Imai K, Nakachi K. Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer letters* 2002;188(1-2):9-13.
215. Moreno-Vásquez MJ, Valenzuela-Buitimea EL, Plascencia-Jatomea M, Encinas-Encinas JC, Rodríguez-Félix F, Sánchez-Valdes S, et al. Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. *Carbohydrate polymers* 2017;155:117-27.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 1. Oküler yüzeyin gösterimi.....	3
Şekil 2. Gözyaşı filmi bileşenleri.....	4
Şekil 3. Göz kanalı tıkanmasının yarık lamba üzerinde incelenmesi.....	7
Şekil 4. EGCG'nin 2D yapısı.....	25
Şekil 5. EGCG'nin 3D yapısı.....	26
Şekil 6. Emülsiyon çapraz-bağlama yönteminin şematik gösterimi.....	28
Şekil 7. Çöktürme/ toplama yönteminin şematik gösterimi.....	29
Şekil 8. Sprey kurutma yönteminin şematik gösterimi.....	29
Şekil 9. Emülsiyon-damlacık birleşme yönteminin şematik gösterimi.....	30
Şekil 10. Ters misel yönteminin şematik gösterimi.....	31
Şekil 11. İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi.....	32
Şekil 12. Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	34
Şekil 13. İyonik jelleşme yöntemine göre KNP sentezi.....	47
Şekil 14. Su ortamındaki EGCG'ye ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemleri.....	59
Şekil 15. pH 7,4 PBS ortamındaki EGCG'ye ait kalibrasyon doğrusu ve denklemleri...	59
Şekil 16. KNP'nin sentez mekanizması.....	61
Şekil 17. İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitolsüz KNP'lerin büyüklük dağılımları.....	62

Şekil 18.	İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitollü KNP'lerin büyüklük dağılımları.....	62
Şekil 19.	İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin büyüklük dağılımları.....	63
Şekil 20.	İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitollü KNP'lerin SEM görüntüsü.....	63
Şekil 21.	İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin SEM görüntüsü.....	64
Şekil 22.	Saf kitosana ait TGA ve DTA termogramı.....	66
Şekil 23.	Mannitolsüz KNP'ye ait TGA ve DTA termogramı.....	67
Şekil 24.	Mannitollü KNP'ye ait TGA ve DTA termogramı.....	68
Şekil 25.	EGCG yüklü mannitollü KNP'ye ait TGA ve DTA termogramı.....	69
Şekil 26.	Saf kitosana ait FT-IR spektrumu.....	70
Şekil 27.	Mannitolsüz KNP'ye ait FT-IR spektrumu.....	71
Şekil 28.	Mannitollü KNP'ye ait FT-IR spektrumu.....	72
Şekil 29.	EGCG yüklü mannitollü KNP'ye ait FT-IR spektrumu.....	73
Şekil 30.	Saf EGCG'ye ait FT-IR spektrumu.....	74
Şekil 31.	Mannitollü KNP ¹³ C-NMR.....	75
Şekil 32.	Mannitollü KNP ¹ H-NMR.....	75
Şekil 33.	EGCG yüklü mannitollü KNP ¹³ C-NMR.....	76
Şekil 34.	EGCG yüklü mannitollü KNP ¹ H-NMR.....	76
Şekil 35.	EGCG, mannitollü EGCG yüklü KNP ve mannitollü KNP'nin pH 7,4 PBS ortamındaki salım profilleri.....	78

TABLolar

Sayfa No

Tablo 1.	Kuru göz hastalığı için kullanılan ilaçlar.....	16
Tablo 2.	Kateşinlerin yapısı.....	23
Tablo 3.	Yiyeceklerin içerdiği kateşin miktarı.....	24
Tablo 4.	Çay yaprağının bileşimi ve kuru çaydaki yüzdesi.....	24
Tablo 5.	Nanopartikül sentezinde kullanılan bazı polimerler.....	33
Tablo 6.	Liyofilizasyon programı.....	49
Tablo 7.	Carr indeksi ve Housner oranının kabul kriterleri.....	56
Tablo 8.	Akış özellikleri ile ilgili yığın açıları.....	56

Tablo 9.	Su ortamındaki EGCG'nin gün içi (6 saat) ve günler arası (1, 2 ve 3. gün) doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	60
Tablo 10.	pH 7,4 PBS ortamındaki EGCG'nin gün içi (6 saat) ve günler arası (1, 2 ve 3. gün) doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	60
Tablo 11.	İyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitolsüz/mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin ortalama partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri.....	62
Tablo 12.	Saf kitosan, iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen mannitolsüz/mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP'lerin termogram sonuçları.....	65
Tablo 13.	2,2:1 oranında sentezlenen mannitollü KNP ve EGCG yüklü mannitollü KNP formülasyonlarına ait üretim verimleri.....	77
Tablo 14.	2,2:1 oranında sentezlenen EGCG yüklü mannitollü KNP formülasyonuna ait yükleme etkinliği.....	77
Tablo 15.	Final toz karışımlarının 105 °C'de nem miktarı (%)......	79
Tablo 16.	Tabletlerde kullanılan yardımcı maddeler ve formülasyonların küme dansite, sıkıştırılmış dansite, Housner oranı ve Carr indeksleri.....	80
Tablo 17.	Tabletlerde kullanılan yardımcı maddeler ve formülasyonlarının yığın açısı tayinine göre toz akış özellikleri.....	80
Tablo 18.	Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin ağırlıkları ve ağırlık tekdüzeliği sonuçları.....	81
Tablo 19.	Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin kalınlık, çap ve sertlik sonuçları.....	83
Tablo 20.	Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin friabilite sonuçları.....	84
Tablo 21.	Ön formülasyon tabletleri ve EGCG yüklü mannitollü KNP tabletlerin disintegrasyon sonuçları.....	84

ÖZGEÇMİŞ

01 Ocak 1993 tarihinde Edirne’de doğdum. İlköğretimimi 50. Yıl İlköğretim Okulu’nda tamamladım. 2011 yılında Edirne İlhami Ertem Anadolu Lisesi’nden mezun olduktan sonra Ankara Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandım. 2015 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2015 Güz Yarıyılı döneminde Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programına başladım.

Uluslararası Hakemli Kongre ve Sempozyum Bildirileri

1. Gedik, G., Kesmez, K., Koç, B., Ziya, Y.N., Özlen, N., Ergin, M., Sarp, Ö.: Edirne İli Serbest Eczanelerinde Majistral İlaç Araştırması, 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi İVEK, 26-29 Nisan 2017, İstanbul.
2. Sarp, O., Kurtulus, Y. B., Topraksever, N., Bakircioglu, D.: Determination of Cu and Zn by AAS in Mint Samples Using Microwave, Wet and Dry Ashing Digestion Procedures, 1st International Balkan Chemistry Congress IBCC, 17-20 September 2018, Edirne.

Ulusal Hakemli Dergi Makaleleri

1. Altinisik Tagac, A., Sarp, Ö., Yurdakoc, K. Controlled Release of Vitamin C from Chitosan Nanoparticles. Hacettepe J. Biol. & Chem., 2018, 46(1), 69-77.

Ulusal Kongre ve Sempozyum Bildirileri

- 1.** Sarp, Ö., Altınışik, A., Yurdakoç, M.K.: Kitosan/Tripolifosfat Nanoparçacıkların Sentezi ve Karakterizasyonu, 5. Fiziksel Kimya Kongresi, 16-19 Mayıs 2015, Konya.
- 2.** Altınışik, A., Sarp, Ö., Yurdakoç, M.K.: Kitosan Nanoparçacıklar ile Vitamin C'nin InVitro Kontrollü Salımı, 5. Fiziksel Kimya Kongresi, 16-19 Mayıs 2015, Konya.
- 3.** Gedik, G., Sarp, Ö., Nazlı, H., Oltulu, Ç., Gündüz, Ö.: Farelerde Okzaliptin İle Nöropatik Ağrı Modeli Oluşturmada Yeni Yaklaşımlar, 1. Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi UMEK, 3-5 Kasım 2016, İstanbul.

