



KORNEA AMELİYATLARI SONRASINDA KULLANILABİLECEK GÖZ KURULUĞUNU ÖNLEYİCİ *İN-SİTU* HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ TASARIMI VE *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU

DESIGN AND CHARACTERIZATION OF IN-SITU HYDROGEL FORMULATIONS TO PREVENT DRY EYE AFTER CORNEAL SURGERIES

Şevval DEMİR¹ , Aylin DELJAVAN GHODRATI^{1,2} , Tansel ÇOMOĞLU^{1*} ,
Kader ÇÖMLEKÇİ³

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 06110, Ankara, Türkiye

³Argis İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş., 06370, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Göz kuruluğunu önlemek için kullanılan göz damlalarının gözde kalış süresinin kısa olmasıyla alternatif dozaj şekillerinin araştırılmasını gerektirmiştir. İn-situ hidrojeller, saklama sırasında sol fazında olup çevresel koşullarda jel fazına geçerek hedef bölgede daha uzun süre kalabilmektedir. Bu çalışmada, doğal ve biyouyumu polimerler kullanılarak göz sıcaklığında sol-jel geçişi yapabilen in-situ hidrojel formülasyonları geliştirilmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: HA, CMC, PAA ve sitrik asit, fiziksel karıştırma yöntemi esas alınarak 37°C sıcaklıkta distile su içerisine serpilerek homojen dağılımı sağlanmıştır. Göz fizyolojisine uygunluğu karakterizasyon çalışmaları ile kontrol edilmiştir. pH ölçümü, şişme/erozyon ve sol-jel geçiş sıcaklığı değerlendirilmesi ve viskozite ölçümü karakterizasyon çalışmaları altında gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler değerlendirilerek optimum özelliklere sahip en uygun formülasyon/lar seçilerek hızlandırılmış stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Su tutma kapasitesi yüksek, biyouyumlu, gözde uzun süre kalabilen in-situ hidrojel formülasyonları için hyaluronik asit, poliakrilamid ve karboksimetil selüloz kombinasyonu uygun bulunmuştur. 7 günlük hızlandırılmış in vitro stabilite çalışmasında, formülasyonların pH ve viskozite değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik asit, in-situ hidrojel, karboksimetil selüloz, kornea, poliakrilamid

ABSTRACT

Objective: The short retention time of eye drops used to prevent dryness has necessitated the exploration of alternative dosage forms. İn-situ hydrogels remain in a sol phase during storage but transition to a gel phase under environmental conditions, allowing prolonged retention at the target site. In this study, in-situ hydrogel formulations capable of sol-gel transition at ocular temperature were developed using natural and biocompatible polymers, and their characterizations were performed.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Tansel Çomoğlu

e-posta / e-mail: comoglu@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033164

Gönderilme / Submitted : 27.11.2024

Kabul / Accepted : 29.01.2025

Yayınlanma / Published : erken görünüm

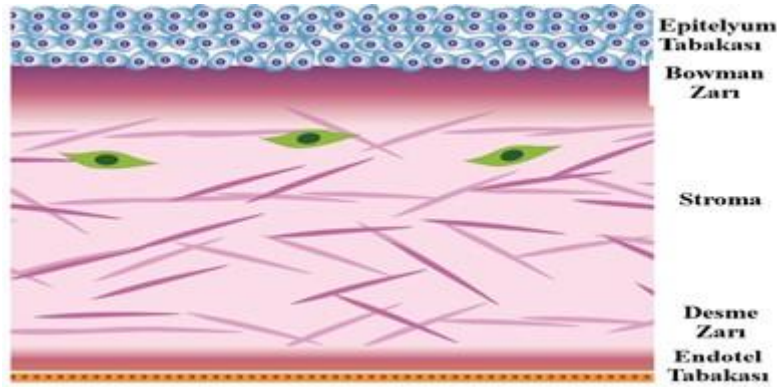
Material and Method: HA, CMC, PAA, and citric acid were homogeneously dispersed in distilled water at 37°C by the physical mixing method. The suitability for ocular physiology was verified through characterization studies. pH measurement, swelling/erosion assessment, sol-gel transition temperature evaluation, and viscosity measurement were conducted as part of the characterization studies. Based on the evaluation of all data, the most suitable formulation(s) with optimal properties were selected, and accelerated stability studies were performed.

Result and Discussion: The combination of hyaluronic acid, polyacrylamide, and carboxymethyl cellulose was found suitable for in-situ hydrogel formulations with high water retention capacity, biocompatibility, and prolonged ocular residence time. During the 7-day accelerated in vitro stability study, no significant changes were observed in the pH and viscosity values of the formulations.

Keywords: Carboxymethyl cellulose, cornea, hyaluronic acid, in-situ hydrogel, polyacrylamide

GİRİŞ

Kornea, göz küresinin ön kısmında yer alan şeffaf, damar bulunmayan, göz içeriğini koruyan, ışığın kırıldığı ilk tabakadır. Şekil 1’de gösterilen beş farklı katmandan meydana gelen doğal bir bariyer görevi görmektedir [1]. Özellikle cerrahi işlem sonrasında bu yapının iyileşmesi ve kendini onarım sürecinde göz saydamlığını koruyarak bulanık görmeyi önleyecek, kornea üzerini nemli tutarak üzerinde oluşabilecek kırılma ve basıncın önüne geçebilecek tedavi yaklaşımları epitelizeasyonu hızlandırmaktadır. Bu yapının nemli kalması için güncel tedavi yaklaşımları arasında gözyaşı filminin viskozitesini artırmak ve nem kaybını önlemek yer almaktadır. Bu doğrultuda, yapay gözyaşı ürünlerinin kullanımı, viskozite artırıcı maddeler, yağlı maddeler gibi bileşenlerden oluşan ürünlerin kullanımı karşımıza çıkmaktadır [2,3]. Geleneksel topikal uygulama olarak göz damlalarının göz kırpması ve nazolakrimal drenaj gibi nedenlerle göz yüzeyinden hızla akararak uzaklaşması, gözyaşı ile seyrelerek istenilen konsantrasyonda kalamaması, enzimatik bozulmaya uğraması gibi birçok dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan dolayı deneysel çalışmalar göz yüzeyinde daha uzun süre kalabilen, hastaya minimum rahatsızlıkla daha az dozda ilaç uygulamayı hedefleyen yenilikçi sistemler üzerine yoğunlaşmaktadır [4].



Şekil 1. Korneayı oluşturan 5 tabakanın anatomik görseli [1]

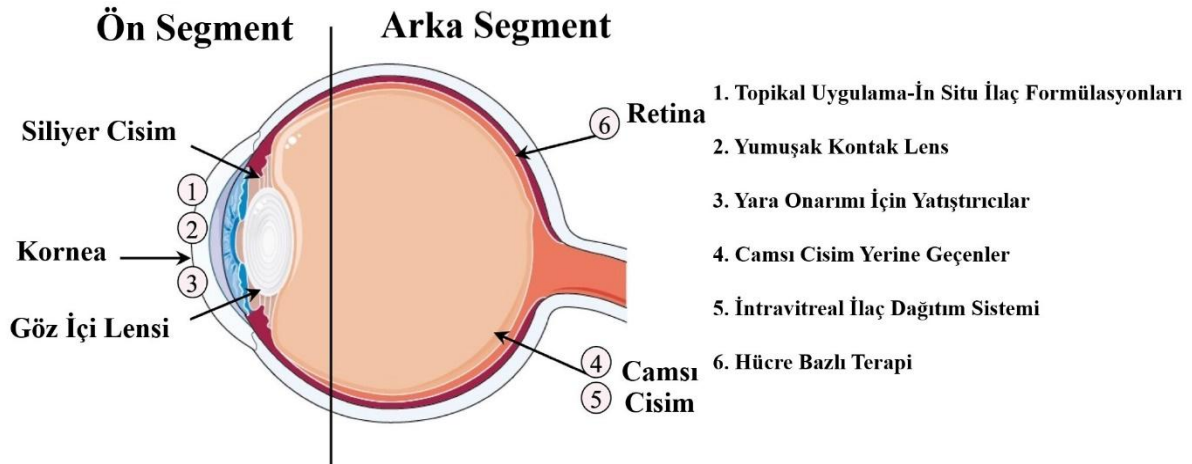
Hidrojeller yapısında önemli miktarda suyu muhafaza edebilen, üç boyutlu hidrofilik polimerik ağ yapısına sahip, çeşitli özelliklerine göre birçok alt gruba ayrılan, hedeflenmiş ve kontrollü ilaç salımı sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlere entegre edilebilen jel yapıdadır [5,6]. En önemli avantajları arasında yumuşak ve esnek yapıları ile kolay şekillenebilmeleri, canlı dokuya benzer profil oluşturmaları, şişme davranışlarının pH, sıcaklık, iyonik/elektromanyetik kuvvetler gibi faktörlerle kontrol edilebilmeleri yer almaktadır. Böylelikle hidrojellerin şekil, mekanik ve kimyasal özellikleri uygulanması istenilen hedef bölgeye göre ayarlanabilmektedir [6,7]. Geniş uygulama alanına sahip olan hidrojeller, farklı fiziksel ve kimyasal yöntemlerle elde edilebilmektedirler. Fiziksel yöntemlerle oluşturulan hidrojeller kovalan olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler gibi) meydana

geldiğinden tersinir jeller olarak da kabul edilmektedirler [8]. Kimyasal yöntemlerle oluşturulan hidrojeller kovalan çapraz bağlı ağlardan oluşmasından ötürü kalıcı/kimyasal jeller olarak da isimlendirilmektedirler [9].

Hidrojeller, “Önceden Jelleştirilmiş Sistemler” ve “İn-situ Jelleşen Sistemler” olmak üzere iki temel mekanizma ile jelleşme göstermektedirler. Önceden jelleştirilmiş sistemler, hali hazırda jelleşmiş bir yapının basit viskoz özelliklere sahip jeller halinde paketlenmesiyle oluşturulmaktadır [10]. İn situ jelleşen hidrojeller ise uygulama sırasında pH, sıcaklık, iyon dengesi, enzim gibi faktörler ile karşılaşması sonucu jelleşen sistemlerdir. İn-situ jelleştirme sisteminin parenteral olmayan yollardan (oküler, nazal, bukkal, vajinal, gastrointestinal, intravezikal) uygulanan lokal veya sistemik ilaçların etkinliğinin artırılması, bunların etki/absorpsiyon bölgesinde kalış sürelerinin uzatılması gibi faktörlerde oldukça başarılı olduğu kanıtlanmıştır [11].

Günümüzde biyomedikal uygulamalar için biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerin kullanımı üzerine araştırma ve geliştirme çalışmalarına yoğunlaşıldığı görülmektedir. Bu çalışmalardan biri de *in-situ* hidrojellerin ilaç taşıyıcı sistemlere entegre edilmesidir. İn-situ implantlar, biyolojik olarak parçalanabilen biyouyumlu çözücü sistemlerde polimer çözeltisi içerisinde çözünen veya süspansiyon edilen aktif madde taşıyan sistem olarak tanımlanmaktadır [12]. Hidrojellerin düşük invaziv yöntemler kullanılarak yüksek ilaç etkinliği göstermeleri ve istenilen hedef bölgede sürekli salım sağlamalarıyla implante sistemlerde sıklıkla kullanıma sahip olmaktadır. Ayrıca biyolojik sıvıda parçalanmaları sonucu toksik madde oluşturmamaları da onları diğer sistemlere göre daha fazla ön plana çıkartmaktadır [13].

İn-situ jelleşen ilaç taşıyıcı sistemlerin sıklıkla kullanımı tercih edilen uygulama bölgelerinden biri oküler bölgedir. Uygulamadan önce sol halinde bulunan jel, oküler bölgedeki sıcaklık, gözyaşı sıvısındaki iyonlar ve pH gibi çevresel uyaranlar ile faz geçişine uğrayarak o bölgede kalış süresinin uzun olduğu viskoelastik jellere dönüşmektedir [14]. Akıllı hidrojellerin Şekil 2’de göz anatomisi üzerinde uygulama bölgeleri sunulmaktadır [15].



Şekil 2. Akıllı hidrojellerin göz anatomisi üzerinde uygulama bölgeleri [15]

Hidrojellerin oküler tedavide topikal uygulama, intrakameral enjeksiyon, intravitreal enjeksiyon gibi çoklu uygulama yollarıyla farklı etki bölgelerine uygulanabilmektedir [16]. Araştırma ve geliştirme çalışmalarının ilerlemesiyle birlikte hidrojel içerisine hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddelerin eş zamanlı yüklenmesine imkân tanıyan kapsüllenebilir nanokompozit hidrojel oluşturulmuş böylelikle farklı ilaçların eş zamanlı verilebilmesine olanak tanıyan sistemler geliştirilmiştir [17].

Hidrojellerin biyolojik sıvıda uyumlu olmaları onları doku mühendisliğinde enjekte edilebilir hidrojeller olarak gelişmesine de olanak tanımaktadır. Enjekte edilebilir hidrojeller, uygulama alanına uyum sağlarken minimum rahatsızlıkla vücudun çeşitli bölgelerine verilebilmekte, böylece ilaç salımı ve doku mühendisliği uygulamaları için çok yönlü bir sistem sağlamaktadır [18].

Ahsan ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları disülfiram taşıyan ısıya duyarlı kitosan bazlı hidrojeller, kanser tedavisi için enjekte edilebilir antikanser bir formülasyon örneği olarak sunulmuştur [19]. Kemoterapötik ajanların tümörlere uygulanmasında hidrojel bazlı ilaç taşıyıcıların kullanılması hedef dışı olan sağlıklı hücreler ve dokular üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için umut verici adaylar arasında yer almaktadır [20].

Fathi ve arkadaşları kitosanın ısıya ve pH'a duyarlı enjekte edilebilir doksorubisin yüklü hidrojel formülasyonu meme kanseri tedavisi için enjekte edilebilir ilaç taşıyan bir diğer örnek olarak verilebilir [21].

Ren ve arkadaşları Parkinson hastalığının tedavisi için dopamin ve bir anti-inflamatuar ilaç olarak enkapsüle halde metronidazol içeren uzun etkili hidrojel sistemini parenteral kullanım için hazırlamışlardır [22].

FDA/EMA tarafından onaylı enjekte edilebilir hidrojel sistemleri arasında SpaceOAR® Hidrojel, Vantas®, Radiesse®, Artefill®, Sculptra®, Belotero Balance® (+) Lidokain, Teosyal® RHA, Belotero Balance® gibi preparatlar yer almaktadır [18].

Göz yapısındaki gözyaşı içeriği, pH'sı ve göz içi sıcaklığı gibi fizyolojik faktörlerden dolayı *in-situ* jelleşen hidrojellerden sıcaklığa, iyon ve pH'ya duyarlı olan hidrojeller oküler tedavide sıklıkla tercih edilmektedir [23].

Yukarıda açıklanan bilgiler doğrultusunda, çalışmanın temel hedefi; farklı *in-situ* jelleşen polimer gruplarından seçilen bileşenlerle, kornea ameliyatları sonrasında gözün nem dengesini sağlayarak oküler onarıma destek olabilecek hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesidir. Bu kapsamda, HA, PAA ve CMC polimerleri kullanılarak, göz pH'sına ve izotonisite değerlerine uygun, steril bir *in-situ* hidrojel ürününün formüle edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, geliştirilen formülasyonların *in vitro* karakterizasyon çalışmalarıyla viskozite, şişme/erozyon davranışı ve jelleşme kapasitesi gibi önemli parametrelerinin değerlendirilmesiyle, optimum özelliklere sahip formülasyonun belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızın yenilikçi yönü ise, oküler yüzeyde jelleşme yeteneğine sahip *in-situ* hidrojel formülasyonlarının tasarlanmasıdır. Bu formülasyonlar, göze damlatıldığında sıvıdan jel fazına geçerek göz yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturmada ve gözyaşı kaybını önlemeye yardımcı olmaktadır. Çalışma kapsamında, kornea ameliyatlarından sonra ortaya çıkan göz kuruluğunun önlenmesi ve hastaların nem ihtiyacının uzun süreli karşılanması için yenilikçi *in-situ* hidrojel formülasyonları geliştirilmesi planlanmaktadır. Bununla birlikte, bu çalışmada kullanılan polimerlerin gözyaşının doğal biyoaktif bileşenlerinden olması nedeniyle, hazırlanan hidrojel formülasyonlarının göz kuruluğu kaynaklı rahatsızlıkları azaltacağı ve göz yüzeyinin iyileşmesine destek sağlayacağı düşünülmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında kullanılan malzemeler; Hyaluronik asit (HA) Bloomage BioTechnology Corporation Limited; Sitrik asit Vasa Pharmachem Pvt. Ltd; Karboksimetil selüloz (CMC) Yiğitoğlu Kimya A.Ş.; Poliakrilamid (PAA) Sigma Aldrich'ten proje sanayi ortağımız Argis İlaç San. & Tic. A.Ş. tarafından tarafımıza temin edilmiştir. Hazırlanan tüm *in-situ* hidrojellerde distile su kullanılmıştır.

Fiziksel karıştırma esas alınarak hazırlanan *in-situ* hidrojellerin göz fizyolojisine uyumluluğu pH ve viskozite ölçümü, sol-jel geçiş sıcaklığı ve şişme/erozyon değerlendirmesi çalışmaları yapılarak kontrol edilmiştir. Göz yapısına en yakın ve kalış süresi en uzun olabilecek optimum özelliklere sahip formülasyonların hızlandırılmış *in vitro* stabilite çalışmaları gerçekleştirilerek saklama koşulları belirlenmiştir.

In-Situ Hidrojel Hazırlanışı

Çalışmada HA %0.1, %0.25, %0.5; CMC %0.5; %1.0; PAA %0.1; %0.2; Sitrik asit %0.01 konsantrasyonlarında olacak şekilde 12 adet *in-situ* hidrojel formülasyonu Tablo 1'de gösterildiği gibi tasarlanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere her bir formülasyondan 50 ml olacak miktarda fiziksel karıştırma yöntemi esas alınarak hazırlanmıştır [24].

Darası alınmış beher içerisine hesaplı miktarda distile su alınmıştır ve 37°C sıcaklığa getirilmiştir. Hesaplanan HA beher içerisine serpiştirilerek manyetik karıştırıcıda homojen karışması sağlanmıştır. Homojen karışım gerçekleşikten sonra CMC, sitrik asit ve PAA aynı şekilde sırayla beher içerisine

serpiştirilmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Karışım sırasında su kaybını minimuma indirmek için saat camı ile beherin ağzı kapatılmıştır [25].

Tablo 1. Hidrojel formülasyonların içerik tablosu

Formülasyon Kodu	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Hyaluronik asit (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
Karboksimetil Selüloz (%)	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5
Poliakrilamid (%)	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
Sitrik asit (%)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Distile su	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m	y.m

***In Vitro* Karakterizasyon Çalışmaları**

Hazırlanan *in-situ* hidrojellerin pH ölçümü, viskozite ölçümü, sol-jel geçiş sıcaklığı ve şişme/erozyon değerlendirmesi gibi literatürde tanımlanan karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda göze uygulanabilecek optimum özellikteki formülasyonlar seçilerek hızlandırılmış *in vitro* stabilite değerlendirmeleri yapılmıştır.

pH Ölçümü

F1 formülasyonundan başlayarak, her formülasyon için pH ölçümü dijital pH metre (Mettler Toledo) ile üç kez tekrarlanmış ve bu tekrarlardan elde edilen değerlerin ortalamaları alınmıştır (n=3). Ölçüm sonuçlarına göre formülasyonların pH değerlerinin, belirlenen 6.5-7.5 aralığına uyum sağlaması için nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların pH değerlerini 6.5-7.5 aralığına getirmek amacıyla, 1N NaOH çözeltisi kullanılarak nötralize edilen hidrojellerin pH ölçüm işlemi için 3:10 (3 g hidrojel:10 g distile su) oranında seyreltilmiş numune hazırlanmıştır. Seyreltilen formülasyonların pH değerleri tekrar ölçülmüş ve elde edilen değerler Tablo 2’de verilmiştir [26].

Viskozite Ölçümü

In-situ jelleşen hidrojel formülasyonlarının viskoziteleri, 22-23°C sıcaklık aralığında Brookfield DVI Prime viskometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sırasında S14 disk spindle ile sırayla önce 5, 10, 20, 50, 100 kayma hızında (rpm) daha sonra tekrar sırayla 100, 50, 20, 10, 5 rpm’de viskozite (cP) değerlerinin okuması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen okuma değerlerine dayanarak, viskozite (cP) ve kayma hızı (rpm) arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler Şekil 3,4 ve 5’te sunulmuştur [26,27].

Sol-Jel Geçiş Sıcaklığı

İçerisinde *in-situ* hidrojel formülasyonu bulunan bir test tüpü eğildiğinde, çözeltinin 30 saniye boyunca akış göstermesi durumunda sol fazı, akışın gözlemlenmediği durumda ise jel fazı olarak tanımlanmaktadır [28,29]. Santrifüj tüplerine alınan 1 mL’lik hidrojeller 25 °C sıcaklıktaki su banyosuna daldırılmış ve sıcaklık 2°C kademeli bir şekilde göz sıcaklığı olan 34 °C’ye kadar kontrollü bir şekilde artırılarak sol-jel geçişi gözlemlenmiştir [29,30]. Deneyin sol-jel geçiş sonuçları Şekil 6,7, 8, 9 ve 10’da sunulmuştur.

Şişme/Erozyon Değerlendirmesi

Darası alınmış flakonlara 1 ml sol-jel geçişi yapabilen hidrojel formülasyonları eklenmiş ve 60°C etüvde (NUVE FN500) ters çevrildiğinde akışın olmadığı ana kadar kurutulmuştur. Ardından, tartım yapılarak kuru jel ağırlığı not edilmiştir (W_0). Bu değer, T_0 anındaki ağırlık miktarı olarak tanımlanmaktadır [26]. Her bir flakon üzerine 1 ml pH 7.4 (PBS) tamponu akıtılarak, su banyosunda göz içi sıcaklık değeri olan 34°C’de bekletilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (0, 3 ve 7. gün) üstte kalan pH 7.4 fosfat tamponu çözeltisi alınarak hidrojellerin etüvde kuruması sağlanmıştır. Daha sonra tartım yapılarak zamana karşı % jel erozyon grafiği oluşturulmuştur [31,32].

% Ağırlık Kaybı (Jel Erozyonu): $\%100 \times (W_0 - W_t) / W_0$ eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır [33,34]. Elde edilen sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 11,12 ve 13’te sunulmuştur.

Optimum Özelliklere Sahip Formülasyon(lar)ın Seçimi

Karakterizasyon çalışmaları ve değerlendirmeler sonucunda, hazırlanan 12 *in-situ* hidrojel formülasyonunun pH ve viskozite değerleri, akış özellikleri, sol-jel geçiş sıcaklıkları ile şişme ve erozyon davranışları incelenmiş ve en uygun formülasyonlar F9 ile F12 olarak belirlenmiştir. Her iki formülasyon da göz ile uyumlu pH aralığında (6.5-7.5) kalarak oftalmik uygulamalar için kritik bir gerekliliği karşılamaktadır. Bu pH aralığı, gözde irritasyon riskini en aza indirerek uygulama sonrası hasta konforunu artırmaktadır. Ayrıca, F9 ve F12'nin viskozite değerleri, hem yüksek mekanik dayanıklılık sağlamakta hem de düşük kayma hızında yüksek viskozite göstererek gözde daha uzun süre kalabilme potansiyeline işaret etmektedir. Bu özellik, formülasyonların etkinliğini artırmaktadır. Akış özelliklerinin incelenmesi, uygulama sırasında rahatlık ve etkinlik açısından önemli bir diğer parametredir; F9 ve F12, uygun akış profilleri ile oftalmik kullanımda kolaylık sağlayacak şekilde değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra, bu formülasyonların göz sıcaklığında jel fazına geçiş yapabilme yetenekleri, tedavi etkinliğini artıran bir diğer önemli özelliktir. Şişme ve erozyon davranışlarının değerlendirilmesi, formülasyonların stabilitesini ve uzun süreli etkilerini belirlemek açısından kritik bir rol oynamış ve F9 ile F12'nin bu yönlerden de uygun sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu nedenle, seçilen formülasyonların stabilite testleri, oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında, ayrıca buzdolabında (4-8°C) muhafaza edilerek değerlendirilecektir. Stabilite testleri, formülasyonların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin zamanla nasıl değiştiğini belirlemek açısından önem taşımaktadır. Özellikle oftalmik uygulamalarda, formülasyonların stabilitesinin sağlanması, etkinliğin ve güvenliğin korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu testler sonucunda, F9 ve F12 formülasyonlarının hangi koşullarda en iyi performansı gösterdiği belirlenerek, gelecekteki uygulamalar için en uygun muhafaza koşulları tanımlanacaktır.

Stabilite Çalışmaları

Göze uygulanacak preparatların, raf ömrü boyunca fizyolojik sınırlar içinde kalması arzu edilmektedir [27]. Bu doğrultuda, karakterizasyon çalışmaları sonucunda en iyi performansı gösteren F9 ve F12 *in-situ* hidrojel formülasyonlarının stabilitesini değerlendirmek amacıyla, 1. gün (t_1) ve 7. gün sonunda (t_7) görünüm, viskozite ve pH ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler, formülasyonların farklı saklama koşullarına maruz bırakılmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Örnekler, karanlıkta 25°C'de, gün ışığında 25°C'de ve buzdolabında (4-8°C aralığında) saklanarak stabilite testleri değerlendirilmiştir [27,35].

F9 ve F12 hidrojel formülasyonlarının farklı saklama koşulları altındaki davranışlarının değerlendirilmesi, hangi saklama ortamının formülasyonların daha iyi performans göstermesine olanak sağladığını anlamak açısından önemlidir. Bu testler sayesinde, formülasyonların pH ve viskozite gibi temel parametrelerinin zamanla nasıl değişim gösterdiği izlenerek, preparatların güvenilirliğini destekleyecek değerli veriler elde edilmiştir. Özellikle pH seviyesinin korunması, göz dokularında tahrişe yol açmamak için kritik bir unsur olurken, viskozitenin uygun aralıkta kalması ise preparatın göz yüzeyinde tutunma süresi ve uygulanabilirliği açısından gereklidir. Elde edilen sonuçlar, formülasyonların stabilitesini korumak için en uygun saklama koşullarının belirlenmesine rehberlik etmiş ve klinik uygulamalarda hasta güvenliği ile etkinliğini artırmayı hedeflemiştir. Bu veriler, oftalmik ürünlerin raf ömrü boyunca etkinliğini ve güvenliğini optimize etmek için temel bir kaynak oluşturmaktadır.

Her bir formülasyondan, gün ışığında, karanlıkta ve buzdolabında saklanmak üzere ayrı ayrı 50 ml olacak şekilde toplamda 150 ml'lik numuneler hazırlanmıştır. Bu numunelerde, saklama koşullarına göre gerekli viskozite ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiş, elde edilen veriler doğrultusunda formülasyonların stabilitesi ve saklama koşulları hakkında kapsamlı değerlendirmeler yapılmıştır. Bu yaklaşım, formülasyonların stabilitesini ve performansını etkileyebilecek çevresel faktörlerin etkisini anlamak adına önemli bir adım olarak geliştirilmiştir. Stabilite değerlendirmesi, numunelerin 1. ve 7. günlerinde alınan pH ve viskozite ölçüm sonuçlarına dayandırılmıştır. Elde edilen bulgular, formülasyonların saklama koşullarına bağlı olarak nasıl değişiklikler gösterdiğini ortaya koymak amacıyla Tablo 4, 5, 6 ile Şekil 14-17'de sunulmuştur. Bu bulgular, özellikle oftalmik formülasyonların raf ömrü boyunca etkinlik ve güvenliğini koruyabilecek saklama koşullarının belirlenmesinde rehber

niteliği taşıyacak şekilde değerlendirilmiştir. Ayrıca, saklama koşullarının formülasyonların fiziksel özellikleri üzerindeki potansiyel etkilerini ve en ideal saklama koşullarının güvenilirliğe katkısını netleştirmek amacıyla değerli bilgiler sağlanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu bölümde, *in vitro* karakterizasyon çalışmalarından elde edilen bulgular detaylı bir şekilde değerlendirilmiş ve bu sonuçların formülasyonların etkinliği, stabilitesi ve klinik potansiyeli üzerindeki etkileri tartışılmıştır. Çalışma kapsamında formülasyonların pH, viskozite, akış özellikleri, sol-jel geçiş sıcaklıkları, şişme ve erozyon davranışları incelenmiş ve sonuçlar belirli kriterler doğrultusunda analiz edilmiştir.

pH Ölçümü Verilerinin Değerlendirilmesi

Formülasyonların göz ile uyumlu olması ve tahriş ya da rahatsızlık hissi oluşturmaması hedeflenmiştir. Bu bağlamda, hazırlanan hidrojellerin pH değerlerinin gözle uyumlu bir aralık olan 6.5-7.5 değerlerinde olması beklenmektedir [30]. Nötralizasyon işlemi sonrasında *in-situ* hidrojellerin pH değerleri 6.5-7.5 aralığında olduğu sonucu Tablo 2’de sunulmuştur. Yapılan bu ölçümler, formülasyonların göz ile uyumlu olmasını sağlayarak, göz sağlığını koruyacak şekilde tasarlandığını ve gözde tahriş veya rahatsızlık hissi oluşturmayacak nitelikte olduğunu göstermektedir. Bu tür bir uyum, özellikle oftalmik uygulamalar için kritik öneme sahiptir, zira gözün hassas yapısı nedeniyle pH dengesinin sağlanması, tedavi etkinliğinin artırılması ve kullanıcı konforunun temin edilmesi açısından son derece önemlidir [27].

Tablo 2. *In-situ* hidrojel formülasyonlarının pH değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu	pH±SS
F1	6.75±0.021
F2	7.36±0.007
F3	7.40±0.113
F4	6.59±0.035
F5	6.69±0.085
F6	6.68±0.042
F7	6.53±0.078
F8	6.67±0.007
F9	6.58±0.042
F10	6.83±0.021
F11	7.68±0.028
F12	7.07±0.092

*SS: Standard Sapma

Viskozite Ölçümü Verilerinin Değerlendirilmesi

Yapılan viskozite ölçümleri, formülasyonların akış özelliklerini ve jelleşme davranışını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler, hidrojel formülasyonlarının uygulama esnasında nasıl davrandığını anlamak için kritik öneme sahiptir. Özellikle, viskozite değerlerinin belirlenmesi, *in-situ* jelleşen sistemlerin hedef bölgeye uygulanabilirliğini ve bu süreçte kontrol edilebilirliği artırmaktadır [36-38].

Hidrojel formülasyonlarının viskozitesinin sıcaklık değişimi ile nasıl etkilendiği de göz önünde bulundurulmalıdır; çünkü sıcaklık artışı genellikle viskoziteyi azaltırken, sıcaklık düşüşü viskoziteyi artırabilir. Bu özellik, oftalmik uygulamalarda ve diğer hedeflendirilmiş tedavi yöntemlerinde, formülasyonun uygun viskozitede olup olmadığını ve gerektiğinde jelleşme sürekliliğini sağlamaktadır [35].

Tüm *in-situ* jelleşen hidrojel formülasyonları, tiksotropik özellikler sergileyerek kayma ile incelen (shear-thinning) davranış göstermektedir. Bu akış durumunda, görünür viskozite değerleri belirli zaman aralıklarında azalma göstermektedir. Ayrıca, kayma durduktan bir süre sonra dinlenmiş akışkanlar, başlangıçtaki yapılarına kısmen veya tamamen geri dönebilirler [26,36,37]. Şekil 3,4 ve 5'te formülasyonların HA yüzdelere göre kayma hızına göre viskozite değerlerini içeren reogramları gösterilmektedir.

Tüm hidrojel formülasyonlarının karşılaştırmasının daha kolay ve anlaşılır olması açısından grafikler HA yüzdesi değişimine göre gruplandırılmıştır. Hidrojel formülasyonlarının sınıflandırılmasında temel kriter olarak HA yüzdesinin temel alınmasının nedeni, CMC ve PAA yüzdesindeki değişimlerin viskozite değerlerine olan etkisinin, HA yüzdesindeki değişimlere kıyasla daha sınırlı olmasıdır.

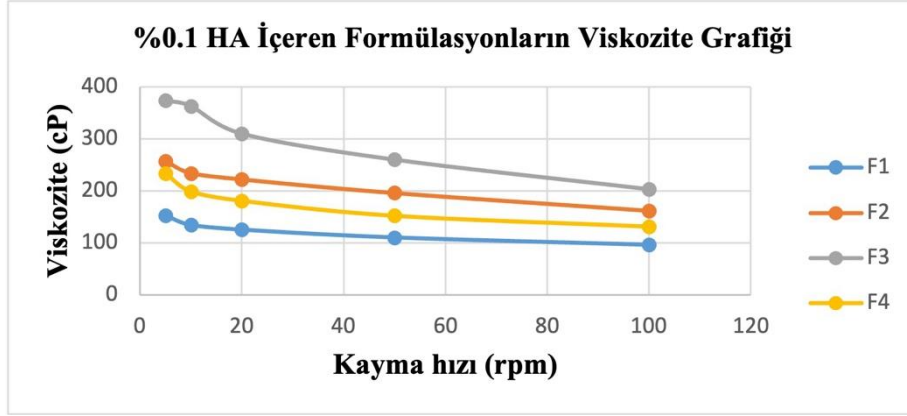
F1 ve F2 formülasyonlarının kıyaslanmasında, F1'in viskozitesi 152 cP iken, F2'nin viskozitesi 257 cP olarak ölçülmüştür. Bu fark, CMC oranının %0.5'ten %1.0'a çıkarılmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, F1 ve F4 formülasyonlarının karşılaştırılması sonucunda, F1'in viskozitesi 152 cP, F4'ün viskozitesinin ise 243 cP olduğu belirlenmiştir ve bu artış, PAA oranının %0.1'den %0.2'ye yükseltilmesiyle ilişkilidir. F1 ve F5 formülasyonlarının değerlendirilmesinde ise, F1'in viskozitesi 152 cP, F5'in viskozitesi ise 562 cP olduğu gözlemlenmiştir ve bu büyük fark, HA oranının %0.1'den %0.25'e çıkarılması sonucunda meydana gelmiştir.

Yapılan analizler, hidrojel formülasyonlarının viskozite değerlerindeki değişimlerin en güçlü şekilde HA yüzdesindeki artışlarla ilişkilendirildiğini ortaya koymaktadır. CMC ve PAA oranlarındaki değişikliklerin de viskozite üzerinde etkisi bulunmakla birlikte, bu etkiler HA yüzdesindeki değişimlerle karşılaştırıldığında sınırlı kalmaktadır. Bu durum, HA'nın hidrojel yapısındaki kritik rolünden ve polimer ağlarının su tutma kapasitesine olan etkisinden kaynaklanmaktadır. HA, yüksek molekül ağırlığına sahip bir biyopolimer olarak, hidrojel matrisinde su molekülleriyle güçlü etkileşimler kurarak viskozitenin artmasını sağlar. HA'nın hidrofilik yapısı, suyu daha fazla hapsederek polimer zincirlerinin arasındaki kayganlığı azaltır ve böylece viskozite değerlerinin daha keskin şekilde yükselmesine neden olur. Bu etki, özellikle düşük HA oranlarında bile belirgin bir fark yaratmaktadır.

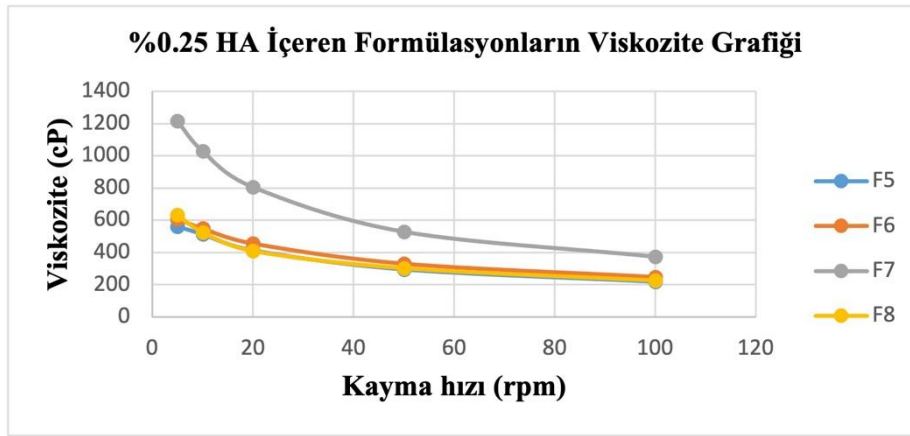
CMC, PAA ve HA oranlarındaki değişimlerin viskozite üzerindeki etkisi, formülasyonların kıyaslanmasıyla net bir şekilde ortaya konmuştur. F1 ve F2 formülasyonları arasında, CMC oranının %0.5'ten %1.0'a çıkarılması viskoziteyi 152 cP'den 257 cP'ye yükseltmiştir. Benzer şekilde, F1 ve F4 formülasyonlarında PAA oranının %0.1'den %0.2'ye çıkarılması viskoziteyi 152 cP'den 243 cP'ye yükseltmiştir. Her iki durumda da viskozitedeki artış önemli olmakla birlikte, sınırlı bir seviyede kalmıştır.

Buna karşılık, F1 ve F5 formülasyonlarının kıyaslanmasında, HA oranının %0.1'den %0.25'e çıkarılması, viskozitede dramatik bir artışa neden olmuş ve değer 152 cP'den 562 cP'ye ulaşmıştır. Bu sonuç, CMC ve PAA değişimlerine kıyasla HA'nın viskozite üzerinde çok daha belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir. HA'nın bu belirgin etkisi, polimer ağının reolojik özelliklerini değiştirme kapasitesine bağlanabilir. HA, yüksek moleküler ağırlığı ve dallanmış yapısı sayesinde çözelti içinde daha yoğun bir polimer ağı oluşturur ve bu ağı su tutma kapasitesini artırır. HA molekülleri, çözelti içindeki serbest su molekülleriyle hidrojen bağları oluşturarak hareketliliklerini sınırlar. Bu durum, polimer zincirlerinin birbirine yaklaşmasını ve daha sıkı bir yapı oluşturmalarını sağlar.

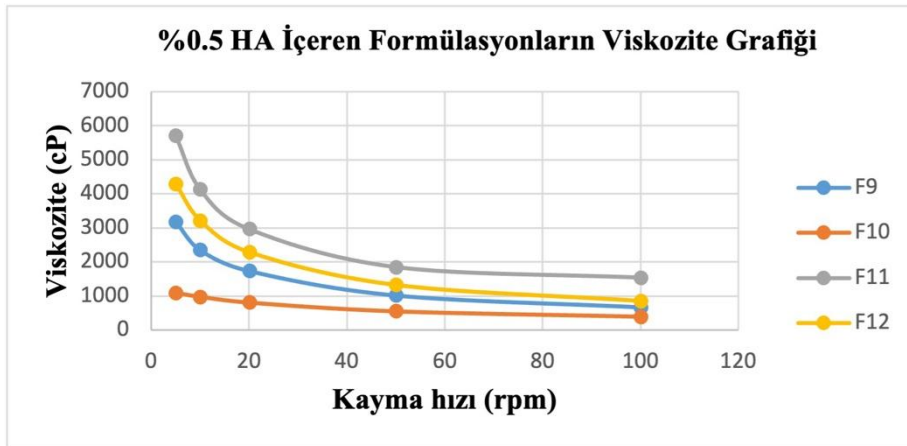
CMC ve PAA gibi diğer polimerler de hidrojel viskozitesine katkıda bulunmakla birlikte, bu polimerlerin düşük konsantrasyonlardaki etkileri daha sınırlıdır. Özellikle PAA, yüksek iyonik yapısı nedeniyle pH ve iyonik güç gibi çevresel faktörlere daha duyarlıdır. Ancak HA'nın viskozite üzerindeki etkisi daha doğrudan ve güçlüdür, çünkü HA yalnızca çözeltinin viskozitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda çözeltinin elastikiyet ve kayma direnci gibi reolojik özelliklerini de önemli ölçüde değiştirir.



Şekil 3. % 0.1 HA içeren formülasyonların reogramları



Şekil 4. % 0.25 HA içeren formülasyonların reogramları



Şekil 5. % 0.5 HA içeren formülasyonların reogramları

Oftalmik preparatların göze uygulandığında, gözyaşı filminin akış etkinliğini olabildiğince az etkilemesi beklenmektedir. Bu nedenle, düşük kayma hızında yüksek viskoziteye, yüksek kayma hızında ise düşük viskoziteye sahip viskoelastik sıvılar tercih edilmektedir. Bu özellikler, formülasyonların göz ile uyumlu olmasını sağlarken, aynı zamanda terapötik etkinliklerini de

artırmaktadır. Dolayısıyla, hidrojel formülasyonlarının tiksotropik davranışları, oftalmik uygulamalar için önemli bir parametre olarak öne çıkmaktadır [39].

Sol-Jel Geçiş Sıcaklığı Verilerinin Değerlendirilmesi

İn-situ hidrojel sistemlerinde sıcaklıkla jelleşme mekanizması, polimer-su etkileşimlerinin sıcaklık değişimine bağlı olarak yeniden düzenlenmesi esasına dayanmaktadır. Sıcaklık arttıkça polimer zincirlerinin konformasyonu değişir ve su molekülleri polimerden ayrılarak çözelti fazından jel fazına geçiş gerçekleşir. Bu süreçte PAA, belirli bir kritik jelleşme sıcaklığında çapraz bağlanma ile fiziksel bir ağ yapısı oluşturur ve hidrojin viskozitesini artırırken mekanik dayanıklılığını güçlendirir [21]. HA, su molekülleri ile hidrojen bağları kurarak hidrojin nem tutma kapasitesini artırır ve jel yapısının stabilitesine katkıda bulunur. Bu sayede formülasyonun elastikiyeti ve biyolojik yüzeylere yapışma potansiyeli artar [30,32,39]. CMC ise çözeltinin viskozitesini artırarak jelleşmenin fiziksel dayanıklılığına destek sağlar [40].

Yapılan çalışmada CMC ve PAA yüzdesindeki değişimlerin viskozitede artışa neden olduğu görülse de bu değişimlerin etkisi, HA yüzdesindeki artışla kıyaslandığında sınırlı kalmıştır. HA yüzdesindeki artış, hidrojin viskozitesinde belirgin bir yükselişe yol açtığından, formülasyonlar arasındaki karşılaştırmanın daha net yapılabilmesi ve sonuçların daha anlaşılır hale getirilmesi amacıyla gruplandırma kriteri olarak HA yüzdesi tercih edilmiştir.

Formülasyonların sol-jel geçiş durumlarına bakıldığında, HA yüzdesi yüksek olan formülasyonlarda jel geçişinin daha belirgin bir şekilde gözlemlendiği görülmektedir. HA yüzdesinin en düşük olduğu (% 0.1) F1, F2, F3 ve F4 formülasyonlarında jelleşme, akışın azalması ile gözlemlense de, Şekil 6'da da görüldüğü gibi tam bir jel fazına geçiş söz konusu değildir. Bu sonuçlar, HA formülasyonların jelleşme özellikleri üzerindeki etkisini vurgulamakta ve göz uygulamaları için gereken jel fazına geçişin sağlanmasında HA oranının önemini göstermektedir.

HA yüzdesinin % 0.25 olduğu F5, F6, F7 ve F8 formülasyonlarında ise % 0.1 olan formülasyonlara göre daha fazla jelleşmenin olduğu görülse bile net bir jel geçiş durumundan bahsedilememektedir. Şekil 7'de F5, F6, F7 ve F8 formülasyonlarının ters tüp yöntemi ile sol-jel durumları gösterilmiştir. HA yüzdesinin % 0.5 olduğu F9, F10, F11 ve F12 formülasyonları, Şekil 8'de görüleceği üzere belirli sıcaklıklarda sol fazında kalırken, sıcaklığın değişmesi ile jel fazına geçiş yapabilmektedir. Bu durum, yüksek hyaluronik asit içeriğinin, formülasyonların sıcaklığa bağlı jelleşme özelliklerini olumlu bir şekilde etkilediğini göstermektedir.



Şekil 6. F1, F2, F3 ve F4 Formülasyonların ters tüp yöntemi ile sol-jel durumları

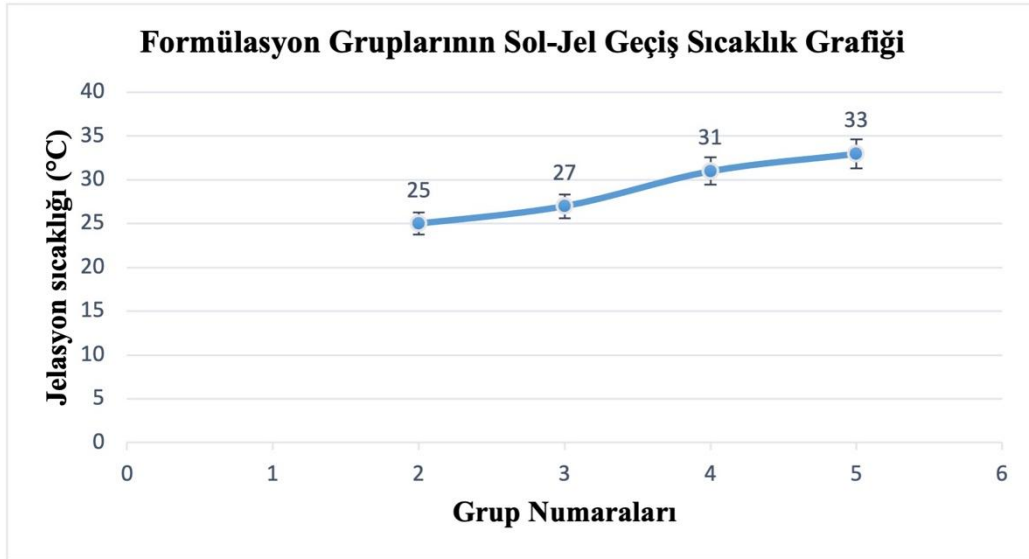


Şekil 7. F5, F6, F7 ve F8 Formülasyonların ters tüp yöntemi ile sol-jel durumları



Şekil 8. F9, F10, F11 ve F12 Formülasyonların ters tüp yöntemi ile sol-jel durumları

Şekil 9'da gösterilen geçiş, jelleşmenin sıcaklıkla tetiklenebildiğini ve dolayısıyla bu formülasyonların belirli bir sıcaklık aralığında etkili bir jel yapısı oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle oftalmik preparatlarda, sıcaklık değişimlerinin gözdeki jelleşme ve kalış süreleri üzerindeki etkisi önemlidir. Gözdeki sıcaklık genellikle 34°C civarında olduğundan, bu formülasyonların sıcaklık değişimleriyle jel fazına geçiş yapabilmesi, gözde kalış sürelerini artırma potansiyeli taşımaktadır [35].



Şekil 9. Formülasyon gruplarının jelasyon sıcaklıkları

- *Grup1: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F10 (Hiçbir sıcaklıkta jel fazına dönüşmeyen grup)
- *Grup 2: F11 (25°C'de jel fazındaki formülasyon grubu)
- *Grup 3: F9, F11, F12 (27°C'de jel fazındaki formülasyon grubu)
- *Grup 4: F9, F11 (31°C'de jel fazındaki formülasyon grubu)
- *Grup 5: F11, F12 (33°C'de jel fazındaki formülasyon grubu)

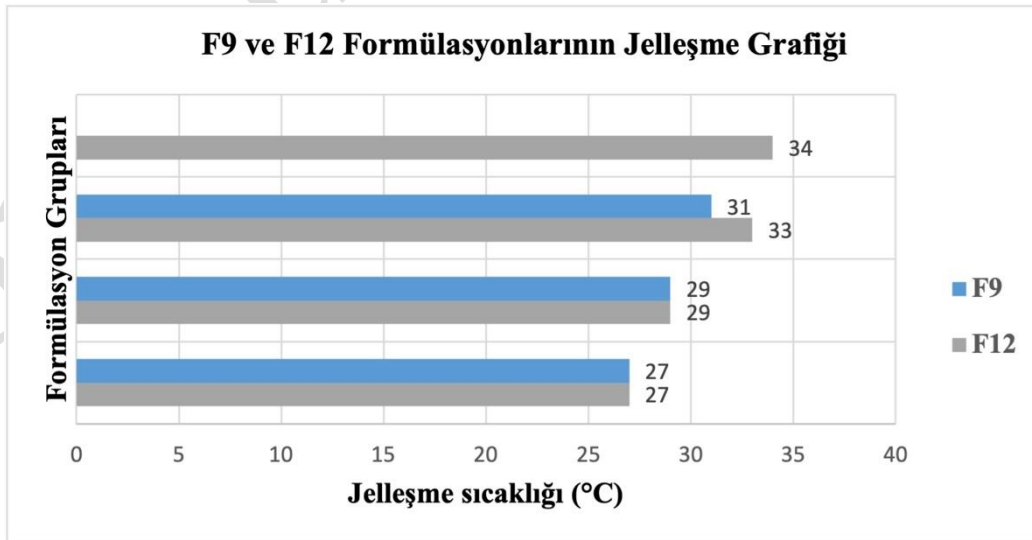
Grup 1'de yer alan formülasyonlar, belirli sıcaklıklarda oldukça yoğun bir viskozluğa sahip olmalarına rağmen, ters çevrilen tüplerde 30 saniye bekletildiğinde yavaş da olsa bir akış gözlemlenmiştir. Bu durum, söz konusu formülasyonların jel fazında olmadığını göstermektedir. Ayrıca, bu formülasyonların viskoziteleri, tam bir sol faz olarak tanımlanabilmesi için yeterince düşük değildir.

F11 formülasyonu, 25-34°C sıcaklık aralığında yapılan tüm deney basamaklarında jel fazında kalmaktadır. Bu durum, F11'in jelleşme özelliklerinin etkili olduğunu ve belirli bir sıcaklık aralığında stabil bir jel yapısı oluşturabildiğini göstermektedir. Göz uygulamaları için gerekli olan jel fazının elde edilmesi, formülasyonun gözde kalış süresini uzatabilir ve terapötik etkinliği artırabilir. Ayrıca, F11'in

bu sıcaklık aralığında jel fazında kalması, oftalmik preparatların gözde konforunu ve etkinliğini artırmak için önemli bir avantaj sunmaktadır. Yüksek sıcaklıkta bile jelleşme sağlanması, formülasyonun gözyaşı filmi ile etkileşimini optimize edebilir ve muhtemel irritasyon veya rahatsızlık hissini azaltabilir. Dolayısıyla, formülasyon içeriği Tablo 1’de belirtilmiş F11 formülasyonunun göz uygulamaları için uygun bir aday olduğunu söylemek mümkündür. Ancak, uzun süreli stabilite ve etkinlik açısından daha fazla inceleme yapılması gerekmektedir.

F9 ve F12 formülasyonları, belirli sıcaklıklarda sol fazında kalırken, belirli bir sıcaklığa ulaştıklarında jel fazına geçiş yapmaktadır. Bu durum, her iki formülasyonun sıcaklığa bağlı jelleşme özelliklerinin etkili olduğunu göstermektedir. Sıcaklık değişiminin jelleşme sürecindeki rolü, oftalmik preparatların etkinliği açısından kritik öneme sahiptir, çünkü gözde kalış süresini artırmak için sıcaklık etkisi ile uyumlu bir jelleşme sağlanması gerekmektedir.

Şekil 10’da belirtilen jelasyon sıcaklık değerleri, Tablo 1’de içeriği belirtilen F9 ve F12 formülasyonlarının hangi sıcaklık aralıklarında etkili bir jel yapısı oluşturduğunu göstermektedir. Bu bilgiler, formülasyonların tasarımında, özellikle göz uygulamaları için optimal sıcaklık aralığının belirlenmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, bu formülasyonların jelleşme özelliklerinin sıcaklıkla nasıl etkileşimde bulunduğunu anlamak, formülasyonların stabilitesini ve etkinliğini artırma potansiyelini de ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, F9 ve F12 formülasyonlarının sıcaklığa bağlı jelleşme özellikleri, oftalmik uygulamalar için önemli bir avantaj sunmakta olup, bu formülasyonların daha fazla araştırılması, göz tedavileri için potansiyel uygulamalarını geliştirebilir.



Şekil 10. F9 ve F12 formülasyonlarının jelleşme sıcaklık değerleri

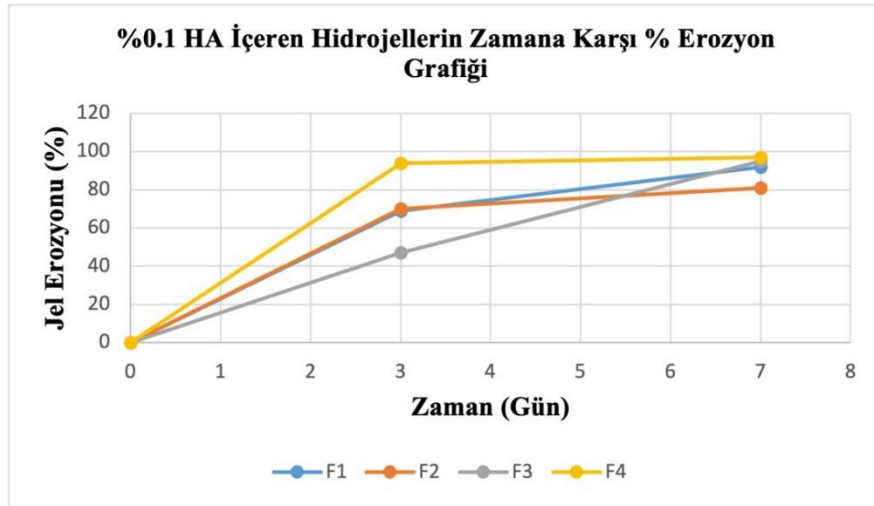
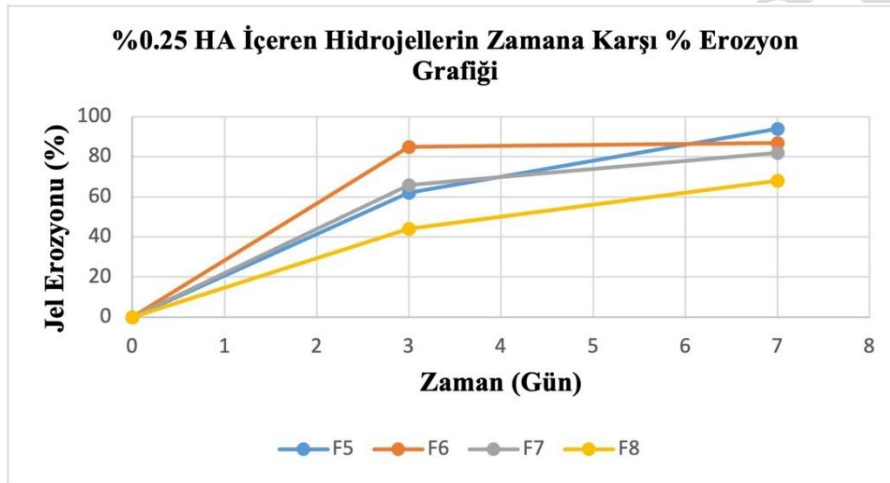
Şişme/Erozyon Verilerinin Değerlendirilmesi

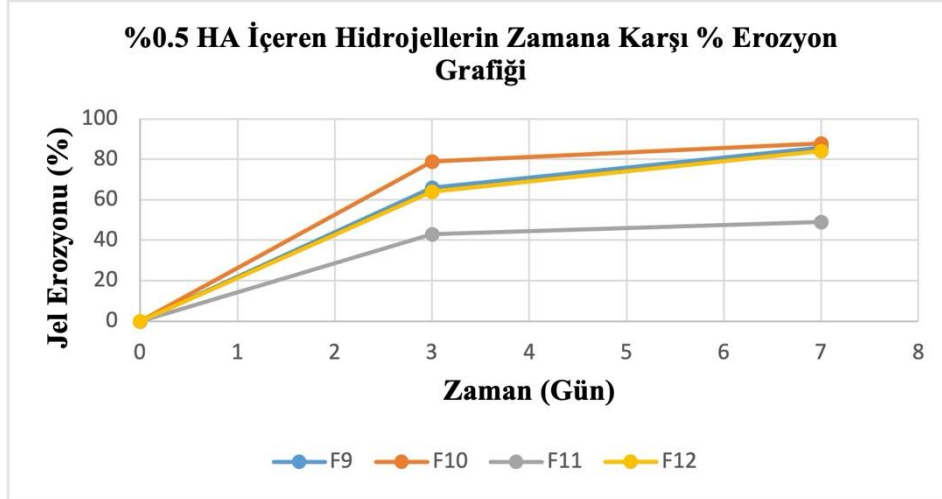
Bu deney, *in-situ* jelleşen hidrojellerin erozyon dayanıklılığını değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır. pH 7.4 fosfat tamponu ortamında jellerin zamanla ne ölçüde ağırlık kaybettiği, erozyon süreçlerinin ve jelleşme stabilitesinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Ağırlık kaybının zamanla izlenmesi, hidrojellerin biyouyumluluk ve etkinlik özelliklerini anlamak için kritik bir parametredir. Elde edilen veriler, farklı formülasyonların performansını karşılaştırarak, oftalmik uygulamalar için en uygun hidrojellerin seçilmesine yönelik bilgi sağlayacaktır. Ayrıca, zaman aralığına göre ağırlık kaybını incelemek, formülasyonların gözde kalış süresi ve etkinliğini artırmak için gerekli optimizasyonların yapılmasına olanak tanıyacaktır [33,34].

Tablo 3. Hidrojel formülasyonlarının % jel erozyon değerleri

Formülasyon Kodu	T ₀ (Başlangıç) % Jel Erozyonu	T ₁ (3.gün) % Jel Erozyonu	T ₂ (7.gün) % Jel Erozyonu
F1	0	69	92
F2	0	70	81
F3	0	47	95
F4	0	94	97
F5	0	62	94
F6	0	85	87
F7	0	66	82
F8	0	44	68
F9	0	66	86
F10	0	79	88
F11	0	43	49
F12	0	64	84

Tablo 3'te yer alan veriler ile Şekil 11,12 ve 13'te yer alan zamana karşı % jel erozyon grafiği oluşturulmuştur.

**Şekil 11.** % 0.1 HA içeren hidrojellerin zamana karşı % erozyon grafiği**Şekil 12.** % 0.25 HA içeren hidrojellerin zamana karşı % erozyon grafiği



Şekil 13. % 0.5 HA içeren hidrojelilerin zamana karşı % erozyon grafiği

Hyaluronik asit (HA) konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hidrojelilerin viskozitelerinin de arttığı bilinmektedir. Bu artış, hidrojinin moleküler yapısının yoğunlaşmasına ve daha karmaşık bir ağ yapısı oluşturmaya neden olur. Grafikler incelendiğinde, viskozitesi artan bir hidrojinin bozunma miktarının azaldığı, yani dayanıklılığının arttığı gözlemlenmektedir. Bu durum, yüksek viskoziteli hidrojelilerin, mekanik dayanıklılıkları ve dış etkenlere karşı dirençleri ile göz önünde bulundurulduğunda, oftalmik uygulamalarda daha iyi bir performans sergileyebileceğini göstermektedir. Dayanıklılığı artan hidrojel, gözde kalış süresini uzatabilir ve terapötik etkinliği artırabilir. Ayrıca, yüksek viskoziteli hidrojelilerin, uygulama sırasında gözde oluşabilecek rahatsızlık hissini azaltma potansiyeli bulunmaktadır [32].

Stabilite Çalışmaları

Formülasyonların stabilitesi, hızlandırılmış bir haftalık *in vitro* stabilite testleriyle değerlendirilmiştir. Bu testlerde, her bir formülasyondan gün ışığında, karanlıkta ve buzdolabında (+4°C ile +8°C aralığında) saklanmak üzere 50 ml'lik numuneler hazırlanarak toplamda 150 ml elde edilmiştir. Saklama koşullarına göre dağıtılan numunelerde gerekli viskozite ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

7 günlük hızlandırılmış *in vitro* stabilite çalışmasında, pH ve viskozite değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Ancak Şekil 17'de görsel değerlendirmeler sonucunda, F9 formülasyonunun gün ışığında daha az stabil olduğu anlaşılmaktadır. Verilere dayanarak, F9 formülasyonunun stabilitesini korumak için en uygun saklama koşullarının +4°C ile +8°C aralığında buzdolabında, UV ışığından koruyan amber renkli cam şişelerde saklanması olduğu belirlenmiştir. F12 formülasyonu da benzer koşullarda muhafaza edilebilir; ancak bu formülasyonun homojenliğini korumakta zorlandığı göz önüne alınarak, serin ve karanlık ortamlarda saklanması önerilmektedir. Bu saklama koşulları, formülasyonların uzun vadeli stabilitesini sağlayarak klinik uygulamalarda güvenilirliğini ve etkinliğini korumaya katkıda bulunacaktır.

Tablo 4. 25°C 'de karanlık ortamda bekletilen formülasyonların pH sonuçları (n=3)

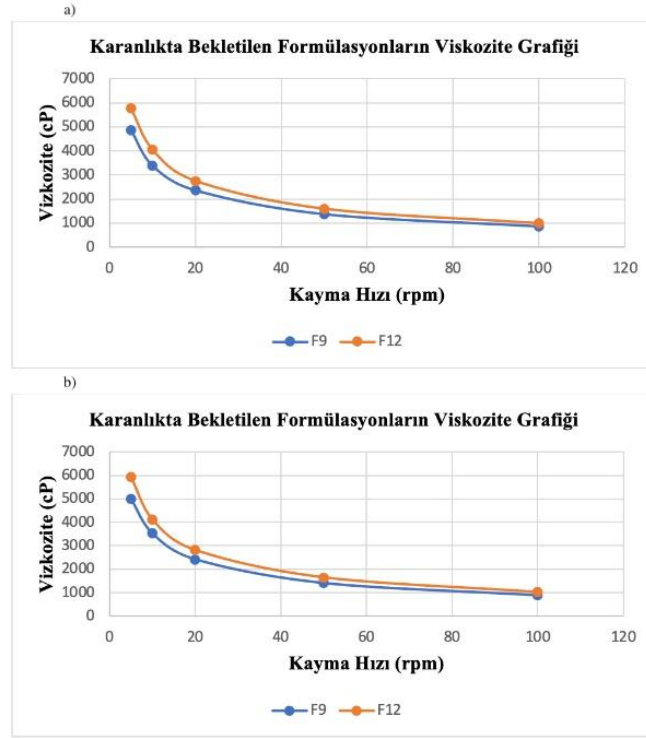
	1.GÜN	7.GÜN
Formülasyon Kodu	pH (Ortalama±SS)	pH (Ortalama± SS)
F9	6.44±0.03	6.54±0.03
F12	6.51±0.03	6.63±0.01

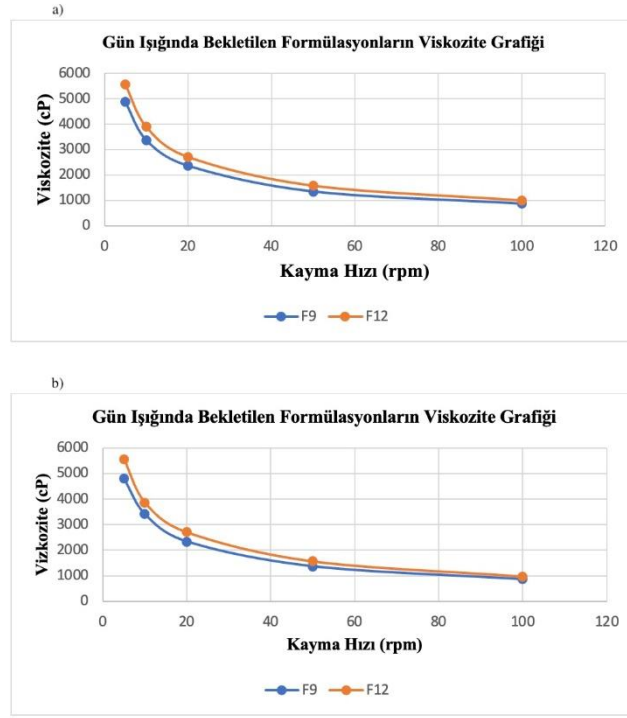
Tablo 5. 25°C’de gün ışığında bekletilen formülasyonların pH sonuçları (n=3)

	1.GÜN	7.GÜN
Formülasyon Kodu	pH (Ortalama±SS)	pH (Ortalama± SS)
F9	6.44±0.02	6.62±0.03
F12	6.50±0.03	6.53±0.02

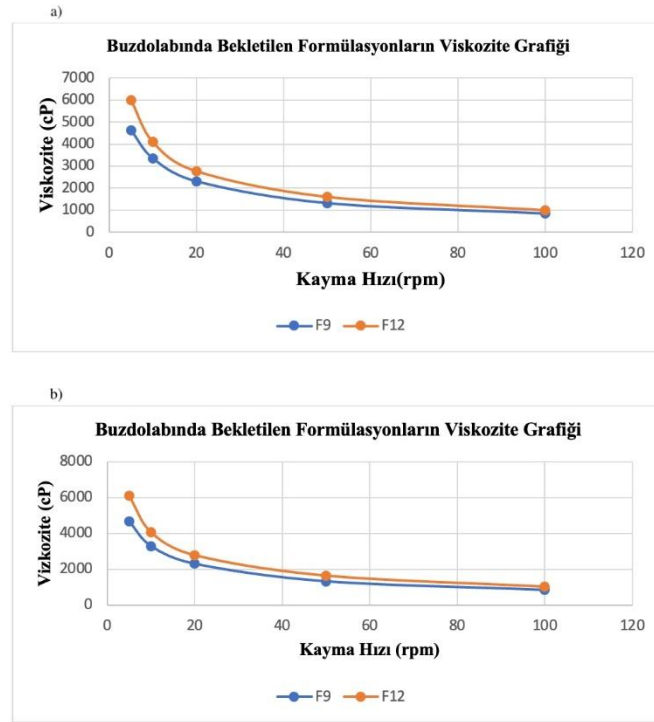
Tablo 6. 4-8°C’de buzdolabında bekletilen formülasyonların pH sonuçları (n=3)

	1.GÜN	7.GÜN
Formülasyon Kodu	pH (Ortalama±SS)	pH (Ortalama± SS)
F9	6.45±0.11	6.46±0.01
F12	6.60±0.01	6.50±0.02

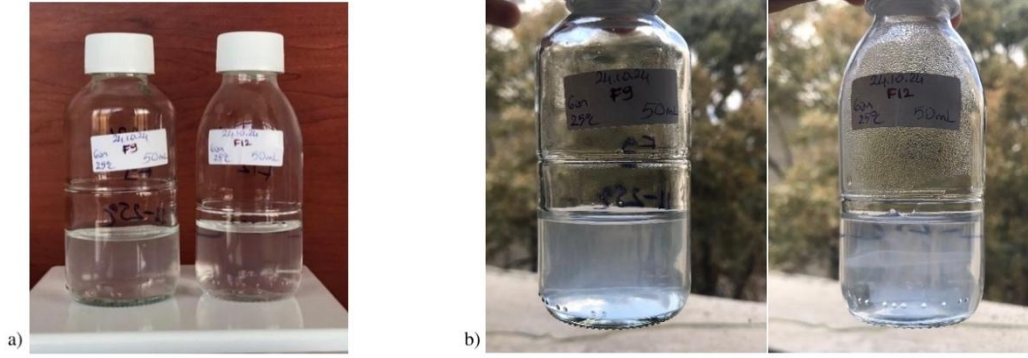
**Şekil 14.** 25°C’de karanlıkta bekletilen formülasyonların viskozite grafiği a) 1. gün, b) 7. gün



Şekil 15. 25°C’de gün ışığında bekletilen formülasyonların viskozite grafiği a) 1. gün, b) 7. Gün



Şekil 16. 4-8°C’de buzdolabında bekletilen formülasyonların viskozite grafiği a) 1. gün, b) 7. Gün



Şekil 17. 25°C’de gün ışığında bekleyen F9 ve F12 formülasyonların görseli a) 1. gün, b) 7. gün

SONUÇ

Çalışmamız kapsamında, kornea ameliyatları sonrasında göz kuruluğunu önlemek amacıyla *in-situ* hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. İnsan vücudunda doğal olarak bulunan ve yüksek su tutma kapasitesine sahip HA, suda çözünebilir ve şişme özellikleri gösteren PAA ile biyoyumlu ve biyobozunur bir selüloz türeği olan CMC, *in-situ* hidrojel oluşturmak için seçilmiştir. Bu polimerlerin kombinasyonu, göz sıcaklığında sol-jel geçişi yapabilen, uzun süre göz yüzeyinde kalabilen ve gözün nemli kalmasına katkıda bulunan göz dostu hidrojellerin hazırlanmasına imkân tanımaktadır.

Formülasyon çalışmalarında, polimerlerin göze uygulanabilir güvenli konsantrasyon aralıkları belirlendikten sonra pH ölçümü, şişme/erozyon çalışmaları, viskozite ölçümleri ve sol-jel geçiş sıcaklık değerlendirmesi yapılmıştır. Bu testler sonucunda, optimum özellikleri taşıyan *in-situ* hidrojel formülasyonları seçilmiştir. Göz uygulamaları için düşük kayma hızında yüksek, yüksek kayma hızında ise düşük viskozite sergileyen viskoelastik sıvılar tercih edilmektedir. Çalışma kapsamında hazırlanan *in-situ* hidrojellerin tiksotropik özellik gösterdiği, yani shear-thinning (kayma ile incelme) davranışı sergilediği gözlenmiştir. Bu özellik, formülasyonların gözle uyumunu sağlarken, uygulama kolaylığını ve terapötik etkinliği artırmaktadır.

Çalışmada test edilen 12 *in-situ* hidrojel formülasyonun bileşimini Tablo 1’de verilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, geliştirilen formülasyonlar arasından F9 ve F12 formülasyonun istenilen özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu formülasyonlar göz yapısının fizyolojik koşulları altında hedeflenen sıcaklık aralıklarında (34-37°C’de) sol-jel geçişi yapabilmesi, istenilen pH aralığında bulunmaları, viskoelastik bakımdan ve diğer formülasyonlara göre şişme/erozyon profillerinin daha uygun olması açısından seçilmiştir.

Saklama koşulları hakkında fikir edinebilmek için gerçekleştirilen hızlandırılmış *in vitro* stabilite çalışmasında F9 ve F12 formülasyonları gün ışığında, karanlıkta ve buzdolabında (+4°C ile +8°C aralığında) 7 gün boyunca bekletilmiştir. Formülasyonların pH ve viskozite değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Gün ışığında saklanan F9 formülasyonunun saydamlığında farklılaşma belirlenmiş, F12 formülasyonunda ise jel orta tabakasında halka şeklinde dumanlaşma oluşarak homojen yapı bozulmuştur. Bu bulgu, jel formülasyonlarının stabilitesinin UV ışığı ile olumsuz etkilendiğini kanıtlamaktadır. F9 ve F12 formülasyonlarının stabilitesini korumak için en uygun saklama koşulunun, +4°C ile +8°C aralığında buzdolabında, UV ışığından koruyan amber renkli cam şişeler olduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-B Üniversite Öğrencileri Sanayiye Yönelik Araştırma Projeleri Desteği Programı kapsamında desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Ş.D., T.Ç.; Tasarım: Ş.D., A.D.G., T.Ç.; Denetim: Ş.D., T.Ç.; Kaynaklar: Ş.D., T.Ç.; Malzemeler: Ş.D., T.Ç., K.Ç.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ş.D., A.D.G., T.Ç.; Analiz ve/veya Yorumlama: Ş.D., A.D.G., T.Ç.; Literatür Taraması: Ş.D., T.Ç.; Makalenin Yazılması: Ş.D., T.Ç.; Kritik İnceleme: Ş.D., T.Ç.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Volatier, T., Cursiefen, C., Notara, M. (2024). Current advances in corneal stromal stem cell biology and therapeutic applications. *Cells*, 13(2), 163. [CrossRef]
2. Lv, Z., Li, S., Zeng, G., Yao, K., Han, H. (2024). Recent progress of nanomedicine in managing dry eye disease. *Advances in Ophthalmology Practice and Research*. 4(1), 23-31. [CrossRef]
3. Yusufoglu, E., Keser, S. (2024). The effect of sodium hyaluronate on dry eye and corneal epithelial thickness following cataract surgery. *International Ophthalmology*, 44(1), 211. [CrossRef]
4. Ch, S., Mishra, P., Bhatt, H., Ghosh, B., Roy, S., Biswas, S. (2021). Hydroxypropyl methacrylamide-based copolymeric nanoparticles loaded with moxifloxacin as a mucoadhesive, cornea-penetrating nanomedicine eye drop with enhanced therapeutic benefits in bacterial keratitis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112113. [CrossRef]
5. Ammar, N.E.B., Barbouche, M., Hamzaoui, A.H. (2020). Historical view of hydrogel characterization. *Hydrogels Based on Natural Polymers*, (pp. 459-479). Elsevier. [CrossRef]
6. Kaczmarek, B., Nadolna, K., Owczarek, A. (2020). The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers. *Hydrogels based on natural polymers*, 151-172. [CrossRef]
7. Mutlu, D., Karagöz, İ. (2023). Akıllı malzeme olarak polimerler ve uygulamaları. *Konya Journal of Engineering Sciences*, 11(1), 274-299. [CrossRef]
8. Parhi, R. (2017). Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(4), 515-530. [CrossRef]
9. Hoffman, A.S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 18-23. [CrossRef]
10. Chai, Q., Jiao, Y., Yu, X. (2017). Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. *Gels*, 3(1), 6. [CrossRef]
11. Viganı, B., Rossi, S., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Caramella, C.M., Ferrari, F. (2020). Recent advances in the development of *in situ* gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes. *Pharmaceutics*, 12(9), 859. [CrossRef]
12. Tsung, J., Burgess, D.J. (2012). Biodegradable polymers in drug delivery systems. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp. 107-123). Boston, MA: Springer US. [CrossRef]
13. Lev, R., Seliktar, D. (2018). Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. *Journal of the Royal Society Interface*, 15(138), 20170380. [CrossRef]
14. Chowhan, A., Giri, T.K. (2020). Polysaccharide as renewable responsive biopolymer for *in situ* gel in the delivery of drug through ocular route. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 150, 559-572. [CrossRef]
15. Kulbay, M., Wu, K.Y., Truong, D., Tran, S.D. (2024). Smart molecules in ophthalmology: Hydrogels as responsive systems for ophthalmic applications. *Smart Molecules*, e20230021. [CrossRef]
16. Dubald, M., Bourgeois, S., Andrieu, V., Fessi, H. (2018). Ophthalmic drug delivery systems for antibiotherapy- a review. *Pharmaceutics*, 10(1), 10. [CrossRef]
17. Huang, J., Wang, W., Yu, J., Yu, X., Zheng, Q., Peng, F., He, Z., Zhao, W., Zhang, Z., Li, X., Wang, Q. (2017). Combination of dexamethasone and Avastin® by supramolecular hydrogel attenuates the inflammatory corneal neovascularization in rat alkali burn model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 241-250. [CrossRef]

18. Mandal, A., Clegg, J.R., Anselmo, A.C., Mitragotri, S. (2020). Hydrogels in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(2), e10158. [\[CrossRef\]](#)
19. Ahsan, A., Farooq, M.A., Parveen, A. (2020). Thermosensitive chitosan-based injectable hydrogel as an efficient anticancer drug carrier. *ACS omega*, 5(32), 20450-20460. [\[CrossRef\]](#)
20. Selvaraj, S., Chauhan, A., Verma, R., Dutta, V., Rana, G., Duglet, R., Subbarayan, R., Batoo, K.M. (2024). Role of degrading hydrogels in hepatocellular carcinoma drug delivery applications: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105628. [\[CrossRef\]](#)
21. Fathi, M., Alami-Milani, M., Geranmayeh, M. H., Barar, J., Erfan-Niya, H., Omid, Y. (2019). Dual thermo- and pH-sensitive injectable hydrogels of chitosan/(poly (N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid)) for doxorubicin delivery in breast cancer. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 128, 957-964. [\[CrossRef\]](#)
22. Ren, Y., Zhao, X., Liang, X., Ma, P.X., Guo, B. (2017). Injectable hydrogel based on quaternized chitosan, gelatin and dopamine as localized drug delivery system to treat parkinson's disease. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 105, 1079-1087. [\[CrossRef\]](#)
23. Wu, Y., Liu, Y., Li, X., Kebebe, D., Zhang, B., Ren, J., Lu, J., Li, J., Du, S., Liu, Z. (2019). Research progress of *in-situ* gelling ophthalmic drug delivery system. *Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 1-15. [\[CrossRef\]](#)
24. Nitti, P., Demitri, C., Sannino, A., Ambrosio, L. (2024). Fundamentals of hydrogels II-architecture and biodegradability. *Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 13-28). [\[CrossRef\]](#)
25. Nguyen, L.T., Hsu, C.C., Ye, H., Cui, Z. (2020). Development of an *in situ* injectable hydrogel containing hyaluronic acid for neural regeneration. *Biomedical Materials*, 15(5), 055005. [\[CrossRef\]](#)
26. Sayiner, Ö. (2019). Master's Thesis. Development of hydrogel formulations of brain-targeted active substance-loaded nanoparticles. Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.
27. Başaran, B. (2008). Master's Thesis. The development and evaluation of the ophthalmic *in-situ* gel formulations containing Ciprofloxacin and Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.
28. Khodaverdi, E., Ganji, F., Tafaghodi, M., Sadoogh, M. (2013). Effects of formulation properties on sol-gel behavior of chitosan/glycerolphosphate hydrogel. *Iranian Polymer Journal*, 22, 785-790. [\[CrossRef\]](#)
29. Chung, Y.M., Simmons, K.L., Gutowska, A., Jeong, B. (2002). Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions. *Biomacromolecules*, 3(3), 511-516. [\[CrossRef\]](#)
30. Villapiano, F., Silvestri, T., Lo Gatto, C., Aleo, D., Campani, V., Graziano, S. F., Giancola, C., D'Aria, F., De Rosa, G., Biondi, M., Mayol, L. (2024). Thermosensitive *in situ* gelling poloxamers/hyaluronic acid gels for hydrocortisone ocular delivery. *Gels*, 10(3), 193. [\[CrossRef\]](#)
31. Fernandes-Cunha, G.M., Chen, K.M., Chen, F., Le, P., Han, J.H., Mahajan, L.A., Lee, H.J., Na, K.S., Myung, D. (2020). In situ-forming collagen hydrogel crosslinked via multi-functional PEG as a matrix therapy for corneal defects. *Scientific Reports*, 10(1), 16671. [\[CrossRef\]](#)
32. Lee, Y., Chung, H.J., Yeo, S., Ahn, C.H., Lee, H., Messersmith, P.B., Park, T.G. (2010). Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter*, 6(5), 977-983. [\[CrossRef\]](#)
33. Liu, Y., Yang, F., Feng, L., Yang, L., Chen, L., Wei, G., Lu, W. (2017). In vivo retention of poloxamer-based *in situ* hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(4), 502-509. [\[CrossRef\]](#)
34. Tan, H., Chu, C.R., Payne, K.A., Marra, K.G. (2009). Injectable *in situ* forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30(13), 2499-2506. [\[CrossRef\]](#)
35. Azari, Z., (2023). Master's Thesis. Preparation and evaluation of metronidazole containing hydrogel formulation. Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey.
36. Guo, C., Jiang, G., Guan, J., Huang, S., Guo, Y., He, Y., Yang, L., Dong, T. (2024). Preparation and performance evaluation of a thixotropic polymer gel for loss circulation control. *Fuel*, 371, 132148. [\[CrossRef\]](#)
37. Sağlanmak, Ş. (2015). Master's Thesis. Investigation of the viscosity of nanofluids. Department of Mechanical Engineering, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey.
38. Sheng, D., Yu, H., Li, H., Zhou, J., Zhang, H., Wang, W. (2022). Friction reduction mechanism of aqueous hydroxyethyl cellulose solution enhanced by synergistic effect of APTES. *Tribology Letters*, 70, 1-16. [\[CrossRef\]](#)

39. Balasubramaniam, J., Pandit, J.K. (2003). Ion-activated *in situ* gelling systems for sustained ophthalmic delivery of ciprofloxacin hydrochloride. Drug Delivery, 10(3), 185-191. [\[CrossRef\]](#)
40. Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50(1), 27-46. [\[CrossRef\]](#)