



## Kafeik Asit İçeren Kitozan Kaplı Lipozomların Geliştirilmesi ve Antioksidan Etkinliğinin İncelenmesi

Çiğdem YÜCEL <sup>1</sup>, Gökçe ŞEKER KARATOPRAK <sup>2</sup>

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, güçlü antioksidan etkisi bilinen kafeik asitin kaplı olmayan ve kitozan kaplı lipozom formülasyonlarının geliştirilmesi, *in vitro* karakterize edilmesi, salım ve hücre geçiş çalışmaları yapılarak kitozan kaplamanın, kafeik asitin deriden geçişini artırmadaki katkısının incelenmesi ve bu sayede uzatılmış antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Yeni geliştirilen kitozan kaplı ve kaplı olmayan lipozomların karakterizasyon parametreleri (partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel, polidispersite indeksi ve yükleme etkinliği) ölçülmüş, farklı kitozan konsantrasyonları ile hazırlanan kaplı lipozomlardan optimum formülasyon belirlenmiştir. *In vitro* salım çalışmaları yapılmış ve formülasyonların stabiliteleri tayin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında, fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılarak sitotoksitesite testi ve hücre geçiş çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen formülasyonların antioksidan aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) ve (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit) (ABTS<sup>•+</sup>) radikal süpürücü etki ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Kafeik asit yüklü lipozomal formülasyonlar başarıyla geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Toksikite çalışmasına göre, kafeik asit çözeltisi (250 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlar) ve kafeik asit yüklü geliştirilen lipozomal formülasyonlar toksik bulunmamıştır. *In vitro* salım ve hücre geçiş çalışması sonucu elde edilen kafeik asit miktarlarının, DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> radikallerini süpürücü etkisi ispatlanmıştır.

**Sonuç:** Sonuç olarak, toksik etkisi bulunmayan, yeni, kafeik asit yüklü kaplı olmayan ve kitozan kaplı lipozomlar başarıyla geliştirilmiş, kitozan kaplamanın deriye olan yüksek afinitesi ve uzatılmış antioksidan etkinliği kanıtlanmış ve topikal uygulama için potansiyel oluşturabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fenolik asit; lipozom; antioksidanlar.

## Development and Evaluation of Antioxidant Effectiveness of Chitosan Coated Liposomes Containing Caffeic Acid

### ABSTRACT

**Aim:** In this study, it was aimed to develop uncoated and chitosan-coated liposome formulations containing caffeic acid which has a strong antioxidant effect, to characterize *in vitro* and to investigate of the contribution of chitosan coating to increase the permeation of caffeic acid through by skin release and permeation studies, and to evaluate its sustained antioxidant effect.

**Material and Methods:** Characterization parameters (particle size and distribution, zeta potential, polydispersity index and encapsulation efficiency) were measured, The optimum formulation was determined from coated liposomes prepared with different concentrations of chitosan. *In vitro* release studies of newly developed chitosan coated and uncoated liposomes were performed and stabilities of formulations were determined. Within the scope of cell culture studies, cytotoxicity test and cell permeation study were performed with using L929 mouse fibroblast cell line. Antioxidant activities of liposomal formulations were measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) ve 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS<sup>•+</sup>) radical scavenging effect.

**Results:** Caffeic acid loaded liposomes were developed successfully and characterized. According to the toxicity study,

1 Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

2 Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

caffeic acid solution (250µg/mL and below concentrations) and liposomal formulations were not toxic. The scavenging effects of DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals of the amounts of caffeic acid obtained as an end of result of the *in vitro* release and cell permeation studies were proven.

**Conclusion:** In conclusion, novel uncoated and chitosan coated liposomes containing caffeic acid have been successfully developed, high affinity to the skin of chitosan coating and the sustained antioxidant effects of liposomes were proven and are thought to be potential for topical application.

**Keywords:** Phenolic acid; liposom; antioxidants.

## GİRİŞ

Mikro ve nanopartiküler ilaç şekilleri konvansiyonel ilaç şekilleriyle sağlanan tedavi etkinliğinin artırılması, tedavide kullanılan terapötik dozun ve yan etkilerin azaltılması ve yaşam kalitesinin artırılması amacıyla üzerinde yoğun olarak çalışılan bir gruptur. Lipozomlar, lipit çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşan kolloidal lipit yapısında küresel veziküllerdir. Lipozomların ilaç taşıyıcı sistem olarak yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedeni, yapılarında fosfolipit taşıdıkları için biyolojik membrana benzer özellik göstermeleri ve bu sayede biyoyeçimli ve biyoparçalanabilir özellikte olmalarıdır. Ayrıca lipit çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşan veziküler yapıdaki lipozomlar, hidrofilik ve lipofilik yapıdaki ilaçlar için taşıyıcı sistemdir. Vücutta immunojenik ve toksik etki göstermezler. Düşük olan biyoyararlanımı iyileştiren lipozomlar yarı ömrü kısa ilaçların vücutta kalış süresini artırarak hastanın ilaçtan yararlanmasını en üst düzeye ulaştıran sistemlerdir. Bu nedenlerle lipozomlar, kozmesötik ve farmasötik alanda geniş kullanım alanına sahiptirler (1-3).

Kitozan, hidrofilik, biyoyumlu, biyoparçalanır ve polikationik polimer olup hidrofilik bileşiklerin topikal uygulanmasında, deriden geçişi artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (4,5). Pozitif yüklü kitozan ile kaplama, lipozomların yüzeyini değiştirerek deriden geçişini, deriye uygulanabilirliğini artırmaktadır (5).

Nanoteknolojinin son yıllarda kozmetik alanında kullanımı ve nanokozmetikte öncü firmaların piyasada var olan ürün sayıları artmaktadır. Kozmetikte, nemlendiriciler ve yaşlanma karşıtı ürünler olarak iki temel alanda nanoteknoloji yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Yaşlanma karşıtı ürünlerde, antioksidan etkili bileşikler yaygın olarak oksidatif hasarı hafifleterek genç görünüşlü cilt oluşturmak için kullanılan bileşiklerdir (6).

Dokularda meydana gelen serbest radikaller; protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar vererek DNA hasarı, zar yapısının ve fonksiyonlarının bozulması gibi hasarlar oluştururlar. Serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip antioksidanlar ile bu durum kontrol altına alınabilmektedir (7-9).

Kafeik asit (3,4-dihidroksisinnamik asit) bitkilerde sekonder metabolizma ile oluşan ve birçok bitkide yaygın olarak bulunan fenolik bir bileşiktir. Farklı birçok biyolojik etkilerinin yanı sıra, topikal uygulanan

formülasyonlarda kullanılan kafeik asit, antioksidan etkisiyle öne çıkmaktadır (10,11).

Çalışmamızda, kafeik asit yüklü, topikal uygulama sonrası deriden geçişini artırmaya yönelik olarak kaplı olmayan ve çeşitli kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom ilaç şekilleri geliştirilmiş, karakterize edilmiş, stabilite çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca formülasyonların fare fibroblast hücre hattı (L929) üzerindeki hücre canlılığına olan etkisi incelenmiştir. Kitozan kaplı lipozomlardan optimum seçilen formülasyon, kaplı olmayan lipozom ve kafeik asit çözeltisi ile *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışmaları ile kitozan kaplamanın etkinliği değerlendirilmiştir. Salım ve hücre geçiş çalışmasında elde edilen kafeik asitin antioksidan aktivitesi DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> radikalleri süpürücü etkisi testleri ile değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma kapsamında etkin madde olarak kafeik asit (Sigma, Almanya), lipozomların hazırlanmasında lipit olarak, dipalmitoil fosfatidil kolin (DPPC) ve kolesterol, lipozomların kaplanması kitozan (Sigma-448869, Almanya), kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında fare fibroblast hücre hattı L929 (ATCC® CCL-1™) ve steril hücre kültürü malzemeleri (Corning®) kullanılmıştır. Diğer kimyasalların tümü analitik özelliktedir. Bu çalışma, Araştırma ve Yayın Etiğine uyularak, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM) bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

### Kafeik asit'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini

Kafeik asitin miktar tayini, dalga boyu taraması yapılmasının ardından yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın başında 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan distile su: etanol (70:30 h/h) (12) içerisinde kafeik asit çözeltisi ile 200-550 nm arasında UV spektrofotometre kullanılarak dalga boyu taraması yapılmış ve kafeik asitin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu belirlenmiştir. YBSK çalışma koşulları; C18 analitik kolon (250 x 4,6 mm, 5 µm partikül çapı), akım hızı 1 mL/dak, enjeksiyon miktarı 10µL olarak belirlenmiştir. Hareketli faz olarak, %2 asetik asit içeren asetonitril:su (18:82) karışımı kullanılmıştır (10). Analitik metod validasyonu kapsamında kafeik asitin bir seri (10-1000 µg/mL) etanolik sulu çözeltisi kullanılarak yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.

### Hücre Kültürü Çalışmaları

#### Toksosite Testi

Çalışmamızda, L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki etkin maddemiz kafeik asitin bir seri çözeltisi ve yeni geliştirilen kafeik asit yüklü lipozom formülasyonlarının toksik etkisi belirlenmiştir. Toksikite testleri arasında sıklıkla kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromit) testi kullanılmıştır. Kafeik asitin 10-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde çözeltileri ve boş ve etkin madde yüklü lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler deney yapılmaya kadar +4°C'de saklanmış ve test için 37±0,5°C'ye getirildikten sonra kullanılmıştır.

Test için kullanılacak L929 hücreleri 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında üretilmiştir. Test maddeleri, hücre

kültür ortamı EMEM ile hazırlandıktan sonra kuyucuklara eklenmiş (100 µL) ve 24 saat 37±0,5°C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletilmiştir. Dört saatin sonunda kaplardaki içerik boşaltılarak, tüm kuyucuklara 100 µL taze hücre kültür ortamı ile 13 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Kültür kapları hemen alüminyum folyoyla sıkıca sarılmış ve dört saat 37±0,5 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletilmiştir. Dört saatin sonunda etüvden çıkarılan kaplar boşaltılmış ve kuyucuklara 100'er µL Dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilmiştir. Oluşan mor rengin absorbansı spektrofotometrik olarak 570 nm'de tayin edilmiştir. Farklı derişimlerdeki maddeler için farklı absorbans değerleri elde edilmiş ve bu değerlerden hareketle yüzde canlılık hesapları aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır. Ölçümler 6 paralel olarak yapılmıştır.

#### Eşitlik 1:

$$\% \text{canlılık} = \left( \frac{\text{Absorbans}_{\text{örnek}} \times 100}{\text{Absorbans}_{\text{Hücrekontrol}}} \right)$$

#### Kaplı Olmayan Lipozomların Hazırlanması

Çalışmamızda, fosfolipit olarak DPPC, stabilite artırıcı olarak kolesterol kullanılarak Bangham (film) yöntemi (13) ile kaplı olmayan lipozomlar hazırlanmıştır. DPPC ve kolesterol (1:1 molar derişimde) kloroform:metanol (3:1 h/h) karışımında çözülmüştür. Yaklaşık 42-44°C'de rotavapotarda organik solvan uçurulmuş ve kuru lipit film elde edilmiştir. Elde edilen kuru lipit filmi hidrate etmek için sitotoksitesite testi ile belirlenen toksik olmayan doz 250 µg/mL konsantrasyonda kafeik asitin etanolik çözeltisi (70:30 h/h) ilave edilmiş, 10 dk vortekle karıştırılmış ve 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Lipozom süspansiyonu elde edilmiştir. Lipozom süspansiyonu 4°C'de 30 dakika boyunca 15,000 rpm'de santrifüj edilerek üstteki berrak kısım ve lipozomlar ayrılmıştır.

#### Kitozan Kaplı Lipozomların Hazırlanması

Çeşitli kitozan çözeltilerinin (% 0,1, 0,3 ve 0,5 a/h) asetik asitin sulu çözeltisi (%1 h/h) içinde hazırlanmasının ardından lipozom süspansiyonu, kitozan çözeltilerine eşit hacimde olacak şekilde damla damla ilave edilmiştir. Daha sonra, karışım 1 saat süreyle sürekli karıştırılmış ve daha sonra 4°C'de gece boyunca bekletilmiştir. Kitozan kaplı lipozomlar, 4°C'de 30 dakika boyunca 15,000 rpm'de santrifüj sonrası elde edilmiştir.

#### Lipozomların Karakterizasyonu

Geliştirilen lipozomların karakterizasyon çalışması kapsamında partikül büyüklüğü ve dağılımı, şekli, zeta potansiyel değerleri, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon (yükleme) etkinliği ölçümleri yapılmıştır.

#### Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Tayini

Lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçümünde Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Aletin çalışma prensibi; dinamik ışık saçılımı ve foton korelasyon spektroskopisi ile Brown hareketlerin ölçülmesi ve bu ölçüm sonucunun damlacık boyutu ile ilişkilendirilmesine dayanmaktadır. Ölçümler 6 paralel olarak yapılmıştır.

#### Lipozomların Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi

Lipozomların zeta potansiyel ölçümlerinde de Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer, İngiltere) cihazından yararlanılmıştır. Zeta potansiyel ölçümü elektroforez prensibine dayanmaktadır. Buna göre; ortamda bulunan

yüklü partiküllerin elektriksel alandaki hareketi esas alınarak ölçüm yapılır. Bu çalışmada ölçümler 6 paralel olarak yapılmıştır.

#### Lipozomlara Hapsedilen Etkin Madde Miktar (Yükleme Etkinliği) Tayini

Etkin madde yüklenen kaplı olmayan ve çeşitlik konsantrasyonlarda kitozan çözeltisi ile kaplanana lipozomların süspand halde elde edilmesi sonrası santrifüj edilip üstteki berrak kısımdan (süpernatant) yöntem bölümünde belirtilen YBSK metodu ile yükleme etkinliği (YE) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

#### Eşitlik 2:

$$\% \text{YE} = \frac{\text{Toplam kafeik asit miktarı} - \text{yüklenmemiş kafeik asit miktarı}}{\text{Toplam kafeik asit miktarı}} \times 100$$

#### Lipozomların Şekli

Hazırlanan kitozan kaplı lipozomların şekli taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy-SEM) ile Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda görüntülenmiştir.

#### Lipozomların Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Geliştirilen lipozomlar, 4°C ve 25°C±%60 bağıl nem ortamlarında 3 ay süreyle muhafaza edilmiştir. Bu sıcaklıklarda saklanan lipozomların her ay partikül büyüklüğü ve dağılımı ve zeta potansiyelindeki değişim incelenmiştir. Bu çalışmada ölçümler 3 paralel olarak yapılmıştır.

#### İn Vitro Salım Çalışması

*In vitro* salım çalışması, diyaliz membran (12000 Da) kullanılarak pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılmıştır. Bu pH'nın seçilmesinin nedeni hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kültür ortamı (Eagle's Minimum Essential Medium ATCC® 30-2003™)'nin pH'sının 7,39 olarak ölçülmesidir.

Kullanılan diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7,4 fosfat tamponunda ıslatılmıştır. Diyaliz membran geçişleri Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapılmış, diyaliz membran bu Franz hücrelerinin arasına yerleştirilmiştir. Hücrelerin alt kısmına 2 mL pH 7,4 fosfat tamponu, üst kısmına ise 2'şer mL kafeik asit çözeltisi (250 µg/mL) ve salımı incelenecek kaplı olmayan lipozomlar ve optimum formülasyon olarak belirlenen kitozan kaplı lipozomlar konulmuştur. Ortam sıcaklığı 37°C'de tutulmuş, sabit hızda karıştırma deney süresince devam etmiştir. Belirlenen zaman sonunda (24 saat sonunda) örnekler alınarak kafeik asit miktar tayini YBSK ile yapılmıştır. Ölçümler 3 paralel olarak yapılmıştır.

#### Hücre Geçiş Çalışması

Hücre geçiş çalışmalarında L929 hücreleri 0,4 µm por çaplı, 6 kuyucuklu özel hücre kapları (Transwell®, Corning, ABD) üzerinde tek tabaka halinde üretildikten sonra deney başlatılmıştır. Hücreden geçiş çalışmaları için bazolateral kısma 1 mL hücre kültür ortamı, apikal kısma ise hazırlanan 1'er mL kafeik asit çözeltisi (250 µg/mL) ve geçişi incelenecek kaplı olmayan lipozomlar ve optimum formülasyon olarak belirlenen kitozan kaplı lipozomlar uygulanmıştır. Daha sonra belirlenen süre (24 saat sonunda) sonunda bazolateral kısma geçen kafeik

asit tayini YBSK metodu ile yapılmıştır. Ölçümler 3 paralel olarak yapılmıştır.

### Antioksidan Etki Tayini

Geliştirilen kaplı olmayan ve optimum formülasyon seçilen kitozan kaplı lipozom formülasyonlarından *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışması sonunda tayin edilen kafeik asit miktarları belirlenmiş ve antioksidan etkisi tayin edilmiştir.

Antioksidan aktivite için Braca ve ark. (14) uyguladığı metot kullanılarak DPPH• radikal süpürücü aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 500 µL örnek; ve 1,5 mL 0,1 mM metanolde hazırlanmış ve DPPH• çözeltisi ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm’de okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Analizler üç paralel yapılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

### Eşitlik 3:

$$\% \text{inhibisyon} = [(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100$$

Bir diğer test modeli olan ABTS<sup>•+</sup> radikal süpürücü aktivite tayini, Huang ve ark. (15) uyguladığı metot ile belirlenmiştir. ABTS<sup>•+</sup> radikali (7 mM) ABTS’in sulu çözeltisi ile K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45 mM, son konsantrasyon)’un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirilmiş ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm’de 0,700 (±0,030) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (3900 µL) örnek (100 µL) ile karıştırılmış ve 734 nm’de bir dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdesi Trolox’a eşdeğer olarak (TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) hesaplanmıştır.

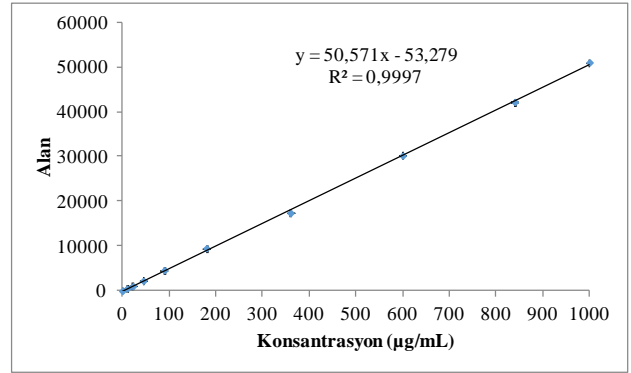
### İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 12 istatistik programı ile yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. Varyansların analizi tek yönlü ANOVA prosedürüne göre uygulanmıştır. Grupların varyans homojenliğini değerlendirmek için Levene testi kullanılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA (post hoc Tukey testi) uygulanmıştır.

### BULGULAR

#### Kafeik asit’in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini

Etkin maddemiz kafeik asitin dalga boyu taraması sonrası maksimum dalga boyunun (λ<sub>max</sub>) 305 nm olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, kalibrasyon eğrisi oluşturmak için hazırlanan bir seri kafeik asit çözeltisinin (10-1000 µg/mL) YBSK ile oluşturulan konsantrasyon- alan kalibrasyon doğrusu Şekil 1’de verilmiştir. Kalibrasyon denklemi olarak  $y=50,571x-53,279$  ve yüksek korelasyon ( $r^2=0,9997$ ) elde edilmiştir.



Şekil 1. Kafeik asite ait kalibrasyon doğrusu (n=6)

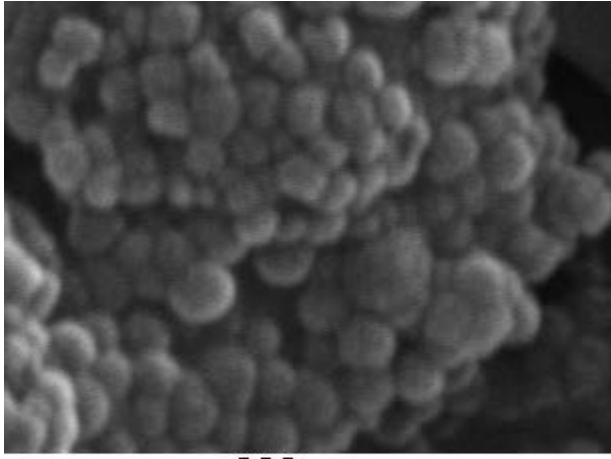
### Lipozomların Karakterizasyonu

Geliştirilen lipozomal formülasyonların karakterizasyon çalışmaları kapsamında partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel ve polidispersite indeks değerleri ölçülmüştür. Kaplı olmayan ve (0,1-0,5 a/h) kitozan kaplı lipozomlar 200-310 nm arasında partikül büyüklüğüne ve (-13,5±1,02 mV) – (+32,5±2,32 mV) arasında zeta potansiyele, 0,205±0,005-0,235±0,006 arasında polidispersite indeksi değerlerine sahip olarak bulunmuştur. Yükleme etkinliklerine bakıldığında, %49,0±1,25-54,1±0,94 aralığında değişen değerler elde edilmiştir (Tablo 1). Kitozan kaplı lipozomların şekli taramalı elektron mikroskobu ile Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Merkez Laboratuvar’nda görüntülenmiştir (Şekil 2).

Tablo 1. Lipozomal formülasyonların karakterizasyon parametreleri (n=6)

Formülasyon	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Polidispersite indeksi±SS	YE (%±SS)
Kaplı olmayan lipozom	188,7±4,58	-13,5±1,02	0,205±0,005	49,0±1,25
%0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom	202,7±3,62	32,4±1,51	0,190±0,001	53,0±1,45
%0,3 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom	264,3±3,72	38,4±1,63	0,212±0,002	53,2±1,02
%0,5 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom	300,3±4,50	45,7±2,01	0,235±0,006	54,1±0,98

\*Veriler ortalama değer±standart sapma kullanılarak ifade edilmiştir (SS:standart sapma, a/h: ağırlık/hacim, nm: nanometre, mV: milivolt, YE:Yükleme etkinliği)



200 nm

EHT = 25.00 kV WD = 6.5 mm

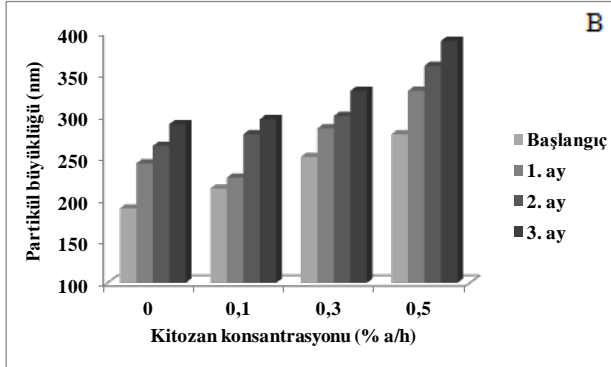
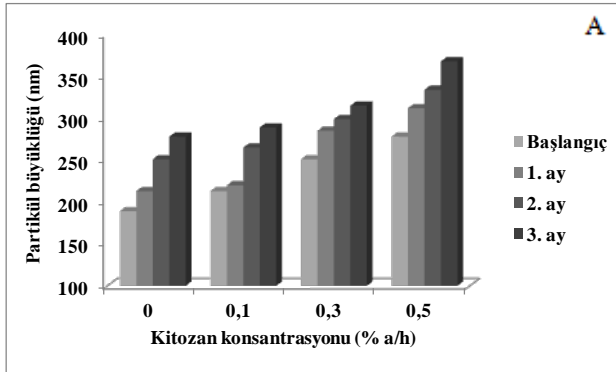
Mag = 50.00 K X Signal A = SE1



Şekil 2. Kitozan çözeltisi (0,1 a/h) kaplı lipozomlara ait SEM görüntüsü

#### Lipozomların Stabilitelerinin Belirlenmesi

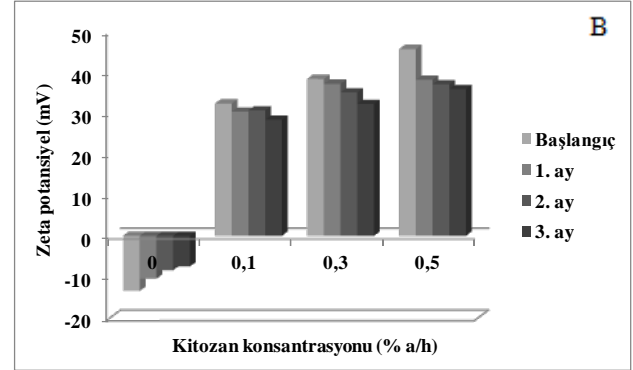
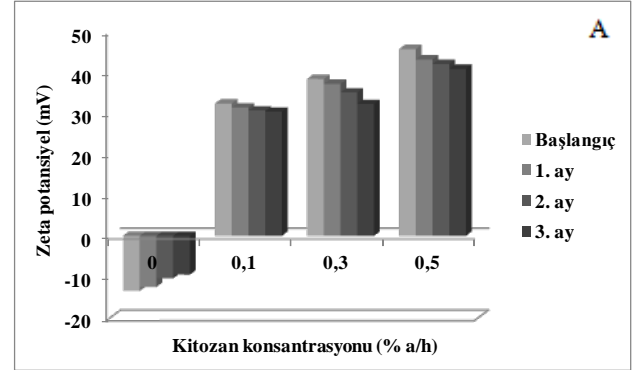
Kafeik asit ile hazırlanan kaplı olmayan ve farklı kitozan konsantrasyonları (%0,1-0,5) ile kaplı lipozomların ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı ve zeta potansiyellerinin zamanla değişimini incelemek için farklı iki sıcaklıkta bekletilen formülasyonların 0., 1., 2. ve 3. aylarda yapılan ölçümlerin sonuçları Şekil 3 ve 4'te verilmiştir.



Şekil 3. Kafeik asit yüklü kaplı olmayan ve çeşitli kitozan çözeltisi ile kaplı lipozomların 4°C'de (A) ve

25°C±%60 bağıl nem (B)'de bekletildiğindeki partikül büyüklüğü değişimi (n=3)

Üç farklı kitozan çözeltisi ile hazırlanan kaplı lipozomların tüm karakterizasyon parametreleri ve stabilite verileri değerlendirildiğinde, %0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom, optimum formülasyon olarak belirlenmiş ve *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışmalarında bu formülasyon ile devam edilmiştir.



Şekil 4. Kafeik asit yüklü kaplı olmayan ve çeşitli kitozan çözeltisi ile kaplı lipozomların 4°C'de (A) ve 25°C±%60 bağıl nemde (B) bekletildiğindeki zeta potansiyel değişimi (B) (n=3)

#### *In vitro* Salım Çalışması

Gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde 24 saatin sonunda alınan örneklerden kafeik asit miktarları YBSK ile tayin edilmiştir. Kafeik asit çözeltisi (250 µg/mL), kaplı olmayan lipozom ve %0,1 (a/h) kitozan kaplı lipozomlara ait salım değerleri sırasıyla %42,7±1,48, %50,1±2,05 ve %58,2±1,45 olarak belirlenmiştir.

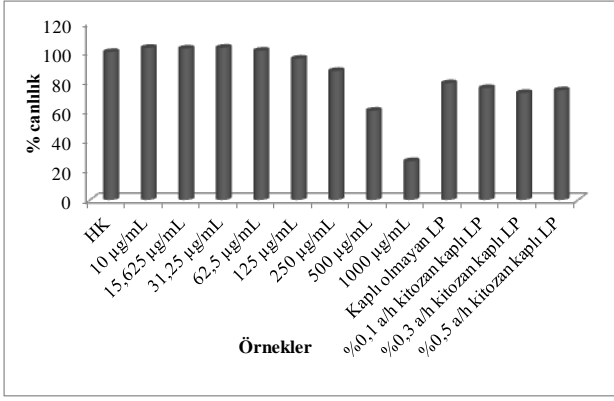
#### Hücre Kültürü Çalışmaları

##### Toksinite Testi

Gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği şekilde yapılan MTT testi sonucu farklı konsantrasyondaki kafeik asit çözeltilerinde (10-1000µg/mL) artan konsantrasyona bağlı olarak azalan hücre canlılığı görülmektedir. Uygun doz olarak belirlenen kafeik asit çözeltisi (250 µg/mL) ile geliştirilen tüm lipozomal formülasyonların hücre canlılığı %72,3-78,9 aralığında tespit edilmiştir (Şekil 5).

##### Hücre Geçiş Çalışması

Kafeik asit çözeltisi (250 µg/mL), kaplı olmayan ve %0,1 (a/h) kitozan kaplı kafeik asit yüklü lipozomların deriden geçişinin tahmin edilebilmesi amacıyla L929 hücre hattı üzerinde geçiş çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda (24 saatin sonunda), sırasıyla %35,2±1,01, %39,2±1,54 ve %42,4±1,02 kafeik asit geçişi ölçülmüştür.



**Şekil 5.** Farklı konsantrasyondaki kafeik asit çözeltilerinin ve kafeik asit yüklü lipozomal formülasyonların L929 fare fibroblast hücre hattındaki toksisitesi (n=6) (HK:Hücre kontrol, a/h:ağırlık/hacim, µg/mL:mikrogram/mililitre)

### Antioksidan Aktivite

Salım ve hücre geçiş örneklerinin Tablo 2’de görüldüğü üzere DPPH• radikalini 24 saatin sonunda %50’den fazlasını süpürebildiği tespit edilmiştir. ABTS•• radikali süpürücü aktivite tayininde ise Troloksa eşdeğer hesaplanan TEAC değeri 2,19±0,003-2,60±0,007 mmol/L/Trolox aralığında bulunmuştur. Salım ve hücre geçiş örneklerinin DPPH• ve ABTS•• radikali süpürücü aktivite sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

**Tablo 2.** Salım ve hücre geçiş çalışmalarından elde edilen kafeik asit örneklerinin antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar (n=3)

Formülasyonlar		TEAC (mmol/L/Trolox)±SS	DPPH (%İnhibisyon)±SS
Kaplı olmayan lipozom	Salım örneği	2,60±0,007	%91,15±1,2
	Hücre geçiş örneği	2,19±0,003	%74,85±2,7
%0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom	Salım örneği	2,59±0,008	%90,5±2,3
	Hücre geçiş örneği	2,36±0,001	%77,10±4,3

\*Veriler ortalama değer±standart sapma kullanılarak ifade edilmiştir (SS:standart sapma, mmol/L: milimol/litre, TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipozomal formülasyonlar uzun yıllardır deriden geçişi artıran formülasyonlar olarak öne çıkmaktadır. Etkin maddenin çözelti formuna nazaran ilaç geçişini, emilimini önemli ölçüde artıran formülasyonlardır (16). Özellikle biyoadeziv ve biyoparçalanır, katyonik yapıdaki polimer olan kitozan kaplama ile deriye olan artmış afinite sayesinde topikal tedavi uygulamada umut verici bulunmaktadır (5). Kafeik asitin birçok biyolojik etkisi yanı sıra özellikle antioksidan etkisi iyi bilinmektedir (8). Çalışmamızda, antioksidan etkili kafeik asit ile hem etkin

maddenin çözelti formundaki stabilite sorununu aşmak hem de uzun süreli antioksidan etkinliği sağlayabilmek için lipozomal formülasyonlar geliştirilmiş, *in vitro* karakterizasyonu, hücre canlılığı üzerindeki etkinliği, *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışmaları ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır.

Geliştirilen kaplı olmayan ve farklı kitozan konsantrasyonları (%0,1-0,5) ile kaplı lipozomal formülasyonlar, 200-310 nm arasında partikül büyüklüğüne ve (-13,5±1,02 mV) – (+32,5±2,32 mV) arasında zeta potansiyele, 0,205-0,235 arasında polidispersite indeksi değerlerine sahip olarak bulunmuştur. Yükleme etkinliklerine bakıldığında, %49,0-54,1 aralığında değişen değerler elde edilmiştir. Zeta potansiyel, koloidal sistemlerin stabilitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Zeta potansiyel değeri +30 mV’tan büyük ve -30 mV’tan küçük olan koloidal sistemlerin kararlı olduğu bilinmektedir (17). Karakterizasyon parametrelerine baktığımızda, %0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozom formülasyonu, küçük partikül büyüklüğü, +30 mV üzerinde zeta potansiyel değeri, daha düşük polidispersite indeksi ve diğer kitozan kaplı lipozomlara göre anlamlı farklı olmayan (p>0,05) yükleme etkinliği ile optimum formülasyon olarak belirlenmiştir. Kafeik asit çözeltisi ve geliştirilen lipozomal formülasyonlar ile ortam sıcaklığı 37±0,5°C’ye ayarlanmış pH 7,4 fosfat tamponu içinde diyaliz membrandan (12 kDa) *in vitro* salım çalışmalarında, 24 saatin sonunda kafeik asit çözeltisinden, kaplı olmayan ve optimum formülasyon kabul edilen 0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozomlardan salınan kafeik asit miktarı sırasıyla %42,7±1,48, %50,1±2,05 ve % 58,2±1,45 olarak tayin edilmiştir. Kafeik asit çözeltisine kıyasla lipozomal formülasyonlardan salınan kafeik asit miktarı 24 saatin sonunda daha fazladır (p<0,05).

Literatürde, Katuwavila ve ark. (18) yaptığı çalışmada, kafeik asitin lipozomal formülasyonu geliştirilmiş ve lipozomlardan sağlanan yavaş salım ve hücre membran yapısına olan benzerliğin avantajıyla deriden geçiş artırılmak istenmiştir. Karakterizasyon çalışması sonucu, ortalama partikül büyüklüğü ~100 nm ve zeta potansiyeli -55 mV olarak belirlenmiştir. *In vitro salım* çalışması yapılmış ve 24 saatin sonunda %71 oranında salım elde edilmiştir. Domuz kulak epidermisinden %41 oranında kafeik asit geçişi ölçülmüştür. Salım ve geçiş çalışmaları sonucunda kafeik asitin çözelti formuna göre uzun süreli artan geçişi ile DPPH radikal süpürücü etki (antioksidan etki) belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler literatürle örtüşmekte olup çalışmamızdaki farklılık olan kitozan kaplanmış lipozomların amacımıza uygun olarak daha başarılı olduğu ve kitozanın sağladığı avantajların sonuçlarımıza da yansıtıldığı görülmektedir.

Stabilite çalışmaları kapsamında geliştirilen lipozomal formülasyonların üç ay süreyle iki farklı ortamda bekletilerek, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değişimi incelenmiştir. Kitozan kaplı lipozom formülasyonlarının katyonik yapıları nedeniyle zeta potansiyelleri stabilite çalışmalarına başlarken pozitif olarak ölçülmüştür. Üçüncü ayın sonunda da pozitif zeta potansiyel değerlerine sahip olmalarına karşın özellikle 25°C±%60 bağıl nem ortamında bekletilen formülasyonlarda belirgin düşüş gözlenmektedir

( $p < 0,05$ ). Partikül büyüklüklerindeki değişimine bakıldığında ise, %0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozomlarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan partikül büyüklüğünde artış olmuştur ( $p > 0,05$ ). Diğer kitozan konsantrasyonları (0,3 ve 0,5 a/h) ile kaplı lipozomlardaki aylık değişimler birinci aydan itibaren belirgin olarak görülmektedir. Hem stabilite verileri hem de karakterizasyon parametrelerine göre belirlenen optimum formülasyon, %0,1 a/h kitozan çözeltisi ile kaplı lipozomlar olmuş ve *in vitro* salım ve hücre geçiş çalışmaları bu formülasyon ile yapılarak antioksidan etkinlik belirlenmiştir. Literatürde kitozan kaplı kafeik asit yüklü lipozomlara rastlanmamış olup karşılaştırabileceğimiz stabilite verilerine de ulaşamamıştır.

Hücre kültür çalışmalarında, formülasyon geliştirme aşamasında kullanılması düşünülen etkin ve yardımcı maddelerin hücreler üzerindeki toksik etkilerini incelemek, deneylerde kullanılacak miktarları belirlemek amacıyla toksisite testi yapılmaktadır. Toksisite testi sonucunda hücre canlılık oranları %50'nin üzerinde olmalıdır (19). Hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan metotlardan biri MTT testidir. MTT testi kolorimetrik bir yöntem olmakla birlikte esas, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan ürününe dönüşmesidir. Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

Çalışmamız kapsamında, MTT testinde fare fibroblast hücre hattı L929 hücreleri kullanılmıştır. Kafeik asit çözeltisi ve yeni geliştirilen lipozomal formülasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Şekil 5'te görüldüğü gibi, değişen konsantrasyonlardaki kafeik asit çözeltileri (10-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) ile hücre canlılığı %102,8 $\pm$ 0,008-26,14 $\pm$ 0,020 aralığında tespit edilmiştir. Formülasyonlarda ise; kaplı olmayan ve çeşitli kitozan çözeltisi ile kaplı lipozomlar %78,9 $\pm$ 0,024-74,1 $\pm$ 0,014 aralığında hücre canlılığı bulunmuştur (Şekil 5). Hücre canlılığının %50 ve üzerinde olduğu 250  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyona sahip kafeik asit çözeltisi uygun doz olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyondaki kafeik asit çözeltisi ile geliştirilen kaplı olmayan ve kitozan kaplı lipozomların hücre hattı üzerinde yüksek canlılık göstermesi, formülasyonların ve formülasyonda kullanılan kafeik asit miktarının (250  $\mu\text{g/mL}$ ) güvenle kullanılabilirliği sonucuna ulaştırmıştır.

Vücutta oluşan serbest radikaller; protein, karbonhidrat ve lipitler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar vererek DNA hasarı, zar yapılarının ve fonksiyonlarının bozulması gibi hasarlar oluştururlar. Ayrıca, yaşlanma, kalp hastalığı ve kanser gibi birçok biyolojik değişikliklere yol açan serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedirler. Hücre membran yapısında var olan doymamış yağ asitlerince zengin fosfolipitler, hidroksil radikali kaynaklı bozulmaya açıktırlar. Vücutta serbest radikallerin aşırı üretimi ile lipit peroksitler ve serbest oksijen radikalleri artarak hücre membran yapısını bozarlar. Serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip

antioksidanlar ile bu durum kontrol altına alınabilmektedir (7,8). Bu amaçla örneklerin antiradikal etkilerinin ölçülmesinde azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH• radikali ve mavi/yeşil renkli bir bileşik olan ABTS•+ radikali katyonu kullanılmıştır.

Salım örneği ile yapılan çalışmalar sonucunda fizyolojik pH'da DPPH• radikalini süpürücü etki belirlenmiştir. ABTS•+ radikali katyonu süpürücü aktivite tayini ile flavonoidler, hidroksisinnamik asitler, karotenoidler gibi hidrofilik ve lipofilik antioksidanların radikal süpürücü özellikleri belirlenebilmektedir. Kaplı olmayan ve kitozan kaplı olan lipozomlardan alınan salım örnekleri, çalışılan DPPH• ve ABTS•+ radikallerini güçlü süpürücü özellik göstermişlerdir. Singh ve ark. (20) yaptığı çalışmada kafeik asitin DPPH• radikalini süpürücü etkisi  $\text{IC}_{50}$ :6,34 $\pm$ 0,37  $\mu\text{g/mL}$ , ABTS•+ radikalini süpürücü etkisi  $\text{IC}_{50}$ :18,04 $\pm$ 0,68  $\mu\text{g/mL}$  bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçları ile kıyaslandığımızda kafeik asitin güçlü antioksidan etkisi teyit edilmiştir. Hücre geçiş örneklerinin DPPH• radikalini süpürücü % inhibisyon değerlerinin %50'nin üzerinde olması hem yükleme etkinliğinin hem de uzatılmış salım gösteren formülasyonların amacına uygun olarak geliştirildiğini göstermektedir. DPPH• ve ABTS•+ radikallerini süpürücü aktivite deneylerinde SPSS veri analiz istatistiği programında Levene istatistiği sonuçlarına göre değişken için varsayımın (normalliğin) sağlandığı gözlenmiştir (sırasıyla;  $p=0,150$ ,  $p=0,083$ ). Grupların çoklu karşılaştırıldığı Tukey testi sonuçları değerlendirildiğinde hem salım örneklerinin hem de hücre geçiş örneklerinin radikal süpürücü kapasiteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Anlamlı farklılık olmaması, Singh ve ark. (20) çalışmasında da değinildiği üzere kafeik asitin  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin 6,34-18,04  $\mu\text{g/mL}$  gibi düşük konsantrasyonlarda olmasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, antioksidan etkinliği yüksek kafeik asit ile yeni geliştirilen lipozomal formülasyonların başarıyla hazırlandığı, kitozan ile kaplanan lipozomların daha başarılı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Kitozan ile kaplı lipozomların deriden geçişi artırmada kitozanın deriye gösterdiği afinite sonucu daha başarılı olduğu, ölçülen uzatılmış antioksidan etkisi ile transdermal uygulamaya yönelik potansiyel taşıdığı ve bu çalışmanın literatüre önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

**Yazarların Katkıları:** Fikir/Kavram: Ç.Y.; Tasarım: Ç.Y.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Ç.Y., G.Ş.K.; Analiz ve/veya Yorum: Ç.Y., G.Ş.K.; Literatür Taraması: Ç.Y., G.Ş.K.; Makale Yazımı: Ç.Y., G.Ş.K.

## KAYNAKLAR

1. Chung TW, Yang MC, Tsai WJ. A fibrin encapsulated liposomes-in-chitosan matrix (FLCM) for delivering water-soluble drugs influences of the surface properties of liposomes and the crosslinked fibrin network. *Int J Pharm.* 2006; 311(1-2): 122-9.
2. Değim Z, Mutlu NB, Yılmaz Ş, Eşsiz D, Nacar A. Investigation of liposome formulation effects on rivastigmine transport through human colonic edencarcinoma cell line (Caco-2). *Pharmazie.* 2010; 65(1): 32-40.

3. Barenholz Y. Liposome application: Problems and prospects. *Curr Opin Colloid In.* 2001; 6(1): 66-77.
4. Büyüktuncel E, Yücel Ç, Kaynak MS, Aktaş Y. Development of a HPLC method for the determination of cyclosporine A from chitosan nanoparticles. *Lat Am J Pharm.* 2012; 31(8): 1083-8.
5. Park SN, Jo NR, Jeon SH. Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. *J Ind Eng Chem.* 2014; 20(4): 1481-5.
6. Tırnaksız F. Kozmetik ürünlerde kozmesötik olarak antioksidanların, peptit ve proteinlerin kullanımı ve önemi. *Int J Med Sci.* 2006; 2(17): 6-18.
7. Canelas V, Teixeira da Costa C. Quantitative HPLC analysis of rosmarinic acid in extracts of *Melissa Officinalis* and spectrophotometric measurement of their antioxidant activities. *J Chem Educ.* 2007; 84(9): 1502-4.
8. Gülçin İ. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-dopa. *Amino Acids.* 2007; 32(3): 431-8.
9. Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technol.* 1999; 53(2): 46-8.
10. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, De Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, et al. *In Vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm.* 2000; 199(1): 39-47.
11. Magnani C, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Anal Methods.* 2014; 6(10): 3203-6.
12. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* 2004; 87(2): 307-11.
13. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965; 13(1): 238-52.
14. Gyamfi M, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *Gen Pharmacol.* 1999; 32(6): 661-7.
15. Re R, Pellegrini NP, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9-10): 1231-7.
16. Akiladevi D, Basak S. Ethosomes A noninvasive approach for transdermal drug delivery. *Int J Curr Pharm Res.* 2010;2(4):1-4.
17. Pate K, Safier P. Chemical metrology methods for CMP quality. In: Suryadevara B, editor. *Advances in chemical mechanical planarization (CMP)*. Oxford: Woodhead Publishing; 2016. p. 299-325.
18. Katuwavila NP, Chandani Perera ADL, Karunaratne V, Amaratunga GAJ, Nedra Karunaratne D. Improved delivery of caffeic acid through liposomal encapsulation. *J Nanomater.* 2016; 9701870: 1-7.
19. Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int J Pharm.* 2002; 232(1-2): 183-92.
20. Singh DP, Verma S, Prabha R. Investigations on antioxidant potential of phenolic acids and flavonoids: The common phytochemical ingredients in plants. *Int J Plant Physiol Biochem.* 2018; 6(3): 1-5.