

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLAÇ ARAŞTIRMA, GELİŞTİRME VE UYGULAMA ANABİLİM DALI

BAİCALEİN YÜKLÜ ASPAZOMAL FORMÜLASYONLARIN
GELİŞTİRİLEREK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan

Ecz. Fatih HOZAN

Danışmanlar

Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL

Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARTOPRAK

Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2024

KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLAÇ ARAŞTIRMA, GELİŞTİRME VE UYGULAMA ANABİLİM DALI

BAİCALEİN YÜKLÜ ASPAZOMAL FORMÜLASYONLARIN
GELİŞTİRİLEREK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan

Ecz. Fatih HOZAN

Danışmanlar

Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL

Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARTOPRAK

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2023-13220 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2024

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Fatih HOZAN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Baicalein Yüklü Aspazomal Formülasyonların Geliştirilerek Etkinliğinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ecz. Fatih HOZAN

Danışman

Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. M. Betül AYCAN

Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL danışmanlığında **Ecz. Fatih HOZAN** tarafından hazırlanan “**Baicalein Yüklü Aspazomal Formülasyonların Geliştirilerek Etkinliğinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İlaç Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

27.12.2024

JÜRİ

İmza

Danışman: Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL

Üye: Doç. Dr. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba EREN BÖNCÜ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır. / /

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL'e teşekkürlerimi sunarım.

İlaç Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Anabilim Dalı çatısı altında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN'a, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Ayrıca, danışman hocam Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL'in yürütücülüğünü yaptığı (TYL-2023-13220) kodlu Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında yapabilmeme imkân veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ecz. Fatih HOZAN

Kayseri, Aralık 2024

BAİCALEİN YÜKLÜ ASPAZOMAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLEREK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Fatih HOZAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İlaç Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2024
Danışman: Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL

ÖZET

Günümüzde kontrollü salım sistemleri, yüksek ilaç dozu azaltmak, oluşabilecek yan ve zararlı etkilerden korunmak, yaşam kalitesini artırmak, dozlama aralığını uzatmak gibi amaçlara hizmet etmekte ve üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Yakın zamanda tanımlanmış olan aspazomlar, askorbil palmitatın çift tabakalı oluşturduğu veziküler sistem olarak tanımlanmaktadır ve ilk olarak 2004 yılında keşfedilmiştir. Bileşiminde bulunan askorbil palmitat, C vitamini olarak da bilinen askorbik asitin ester formudur. Yüksek antioksidan etkili ve ilaç çözünürlüğünü artırıcı askorbil palmitatın varlığı sistemi avantajlı hale getirmektedir.

Güçlü antioksidan ve antienflamatuar etkili flavonoid yapısındaki baicalein, enflamatuvar mediatörlerin salınımını baskılayarak, enflamasyonu etkili bir şekilde azaltmakta ve ilişkili semptomları hafifletmektedir.

Çalışmamızda, güçlü antioksidan ve antienflamatuar etkileriyle son zamanlarda sıklıkla kullanılan ve ilgi çeken baicaleinin aspazomal formülasyonlar hazırlanmış, *in vitro* karakterizasyonu, stabilite çalışmaları yapılmış, RAW 264.7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Baicalein yüklü aspazomal formülasyonların çözelti formu ile karşılaştırmalı olarak salım çalışması yapılmış ve salınan baicalein miktarının antioksidan ve antienflamatuar etkileri belirlenmiştir. Antioksidan aktivite çalışmaları kapsamında, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH●) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzathiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS+●) radikal süpürücü etki tayinleri yapılmış, antienflamatuar etki tayininde hücre içi ve besi ortamına salınan NO, TNF- α ve PGE 2 düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda gerekli hesaplar ve değerlendirmeler yapılarak formülasyonların etkinliği yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antienflamatuar Etki; Antioksidan Etki; Aspazom; Baicalein.

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF BAICALEIN-LOADED ASPASOMAL FORMULATION

Fatih HOZAN

Erciyes University, Graduate School of Healthy Sciences
Department of Pharmaceutical Research, Development and Application
M.Sc. Thesis, December 2024
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Çiğdem YÜCEL

ABSTRACT

Nowadays, controlled release systems serve the purposes of reducing high drug doses, protecting against possible side and harmful effects, improving quality of life, and extending the dosing interval, and intensive studies are being conducted on them. Recently defined aspassomes are defined as a vesicular system formed by a double layer of ascorbyl palmitate and were first discovered in 2004. The ascorbyl palmitate in its composition is the ester form of ascorbic acid, also known as vitamin C. The presence of ascorbyl palmitate, which has a high antioxidant effect and increases drug solubility, makes the system advantageous. Baicalein, a flavonoid with strong antioxidant and anti-inflammatory effects, suppresses the release of inflammatory mediators, effectively reducing inflammation and alleviating associated symptoms. In our study, aspasomal formulations of baicalein, which has been frequently used and attracted attention recently due to its strong antioxidant and anti-inflammatory effects, were prepared, in vitro characterization and stability studies were conducted, and its cytotoxic effect on the RAW 264.7 cell line was determined. A comparative release study was conducted with the solution form of baicalein-loaded aspasomal formulations, and the antioxidant and anti-inflammatory effects of the released baicalein amount were determined. Within the scope of antioxidant activity studies, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH●) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+●) radical scavenging effects were determined, and NO, TNF- α and PGE 2 levels released into the intracellular and nutrient medium were determined in the anti-inflammatory effect determination. At the end of the study, the necessary calculations and evaluations were made and the effectiveness of the formulations was interpreted.

Key Words: Anti-Inflammatory Effect; Antioxidant Effect; Aspasome; Baicalein.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
TABLOLAR LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Aspazomlar.....	3
2.1.1 Aspazomların avantajları.....	4
2.2. Flavonoidler.....	5
2.3. Baicalein.....	6
2.3.1. Farmakokinetik Özellikleri.....	8
2.3.2. Baicalein Farmakolojik Etkileri.....	8
2.3.2.1. Antioksidan Etki.....	8
2.3.2.2. Antienflamatuar Etki.....	10
2.3.2.3. Diğer Etkileri.....	11
2.4. Hücre Kültürü.....	11
2.4.1. Hücre Kültürünün Avantajları.....	11
2.4.2. RAW 264.7 Hücre Hattı.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereç.....	13
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	13
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler.....	14
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Çözünürlük Çalışması.....	14

3.2.2. Etkin madde miktar tayini	14
3.2.3.Sitotoksisite testi.....	15
3.2.4. Formülasyon geliştirme ve karakterizasyon.....	16
3.2.5.Stabilite çalışmaları	17
3.2.6. Antienflamatuar Etki Testi	17
3.2.7. Antioksidan Etki Testi	18
4. BULGULAR.....	20
4.1 Çözünürlük Çalışması	20
4.2 Etkin Madde Miktar Tayini	20
4.3. Sitotoksisite testi	21
4.4 Formülasyon geliştirme ve karakterizasyon.....	22
4.5. Stabilite çalışmaları	24
4.6 Antienflamatuar Etki Testi	26
4.7. Antioksidan Etki Testi.....	27
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	34
7. KAYNAKLAR	35
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit
BHT	: Bütil hidroksi toluen
CO ₂	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	: Dimetil formamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 1, 1, -difenil-2-pikrilhidrazil
EE	: Enkapsülasyon etkinliği
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IL-6	: İnterlökin 6
LOD	: Minimum Tespit Edebilme Limiti
LOQ	: Minimum Hesaplayabilme Limiti
LOX	: Lipooksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MTT	: 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolyum bromür
NED	: N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorit
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NO	: Nitrik Oksit
O ₂	: Oksijen
PB	: Partikül boyutu
PDI	: Polidispersite indeksi
PGE ₂	: Prostaglandin E2
RAW 264.7	: Fare makrofaj hücre hattı
SMMEDS	: kendinden mikroemülsifiye ilaç sistemi
TEAC	: Trolox equivalent antioxidant capacity
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
ZP	: Zeta potansiyeli

TABLÖLAR LİSTESİ

- Tablo 4.1.** Farklı formülasyon bileşenleri ile geliştirilen aspazomlara ait karakterizasyon parametreleri (n=3).....22
- Tablo 4.2.** Baicalein yüklü aspazomların farklı sıcaklıklardaki uyum ölçütleri (1.kinetik) ve raf ömürleri26
- Tablo 4.3** Aspazomal formülasyondan salınan baicalein'in oluşturduğu antioksidan etki28



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Aspazom yapısı	4
Şekil 2.2.	Aspazomların mikroskop altındaki (450x) görüntüsü.....	4
Şekil 2.3.	Flavonoid Genel Molekül Yapısı	6
Şekil 2.4.	<i>S. baicalensis</i> kurutulmuş kökleri	7
Şekil 2.5	<i>S. baicalensis</i> 'te Baicalein Sentez Basamakları	7
Şekil 2.7.	Baicalein'in 3 tane Fe ²⁺ iyonunu bağlaması	10
Şekil 2.8.	RAW 264.7 hücre hattı (ATCC) ("RAW 264.7" 2024).....	12
Şekil 4.1.	Baicalein ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n=3).....	20
Şekil 4.2.	Baicaleinin farklı konsantrasyondaki çözeltisi ve geliştirilen aspazomla formülasyonun RAW 264.7 hücre hattı üzerine sitotoksikite testi sonuçları (HK: Hücre kontrol) (n=6)	22
Şekil 4.3.	Aspazomların SEM mikroskop görüntüsü	23
Şekil 4.4.	Baicalein yüklü aspazomların partikül büyüklüğü değişimi (n=3)	24
Şekil 4.5.	Baicalein yüklü aspazomların zeta potansiyel değişimi (n=3).....	24
Şekil 4.6.	Baicalein yüklü aspazomların polidispersite indeksi değişimi (n=3).....	25
Şekil 4.7.	Baicalein yüklü aspazomların etkin madde miktar değişimi (n=3).....	25
Şekil 4.8.	Aspazomal formülasyondan salınan Baicaleinin PGE 2 düzeyine olan etkisi (İndometazin: pozitif kontrol grubu, *p<0,001, **p<0,01, ***p<0,05) (n=3)	26
Şekil 4.9.	Aspazomal formülasyondan salınan Baicaleinin TNF-α düzeyine olan etkisi (İndometazin: pozitif kontrol grubu, *p<0,001, **p<0,01, ***p<0,05) (n=3)	27
Şekil 4.10.	Aspazomal formülasyondan salınan Baicaleinin NO düzeyine olan etkisi (İndometazin: pozitif kontrol grubu, *p<0,001, **p<0,01, ***p<0,05) (n=3).....	27

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yeni bir ilaç molekülü geliştirmek tüm önformülasyon ve formülasyon aşamaları dikkate alındığında, son derece pahalı ve uzun süren bir süreçtir. Bu nedenle birçok ilaç Ar-Ge firması, mevcut moleküllerin etkinliğini artırmayı ve yan etkilerini düşürmeyi düşünmektedir. Bir etkin maddenin etkinliğini artırmanın en kolay yöntemlerinden birisi etkin maddenin biyoyararlanımını artırmaktır. Biyoyararlanım artırma yollarından biri de çözünürlüğü artırmak olup son yıllarda üzerinde aktif şekilde çalışmaların devam ettiği ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddenin çözünürlüğünü iyileştirirken biyoyararlanım ve stabilite değerlerini, farmakokinetik özellikleri iyileştirmektedir.

Yakın zamanda tanımlanmış olan aspaazomlar, askorbil palmitatın çift tabakalı oluşturduğu veziküler sistem olarak tanımlanmaktadır ve ilk olarak 2004 yılında keşfedilmiştir. Bileşiminde bulunan askorbil palmitat, C vitamini olarak da bilinen askorbik asitin ester formudur. Yüksek antioksidan etkili ve ilaç çözünürlüğünü artırıcı askorbil palmitatın varlığı sistemi avantajlı hale getirmektedir.

Scuteellaria baicalensis bitkisinden elde edilen flavonoid yapısındaki baicalein, antibakteriyel, antiviral, antitümöral ve antienflamatuar etkilerinden ötürü dikkat çeken bir bileşiktir. Baicalein, enflamatuvar mediatörlerin salınımını baskılayarak, enflamasyonu etkili bir şekilde azaltmakta ve ilişkili semptomları hafifletmektedir. Kararlılığını artıracak kimyasal yapısını koruyacak ve etkinliğini gösterebilecek formülasyon ile baicaleinin etkinliğinin artırılması mümkündür.

Hücre kültürü çalışmaları, hücrelerin, kontrollü koşullar altında canlılık özellikleri korunarak yaşatılması ve ilaç absorpsiyonunun *in vitro* değerlendirilmesi için yaygın olarak yapılmaktadır. Kullanılan hücre hatları *in vivo-in vitro* arası özellik

göstermektedir. Bu sebeple, ilaç-absorpsiyon çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilirler ve *in vivo-in vitro* korelasyonları da oldukça yüksektir.

Çalışmamızda amacımız, güçlü antioksidan ve antienflamatuar etkileriyle son zamanlarda sıklıkla kullanılan ve ilgi çeken baicaleinin aspazomal formülasyonlarının hazırlanması, karakterize edilmesi, stabilite ve raf ömrünün belirlenmesi, antioksidan ve RAW 264.7 hücre hattı üzerinde antienflamatuar etki potansiyelinin belirlenmesidir.



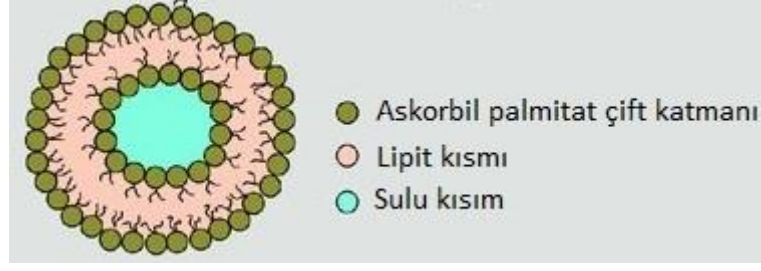
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aspazomlar

Yirmi birinci yüzyıla kadar gelişen nanoteknolojinin insan yaşamında birçok alanda olumlu etkileri görülmektedir. Geliştirilen çok sayıdaki ilaç taşıyıcı sistemler, tanı ve tedavide daha etkin olması yönüyle önemli çalışma konusu olarak günümüzde güncelliğini korumaktadır (Zırh-Gürsoy, A. 2014).

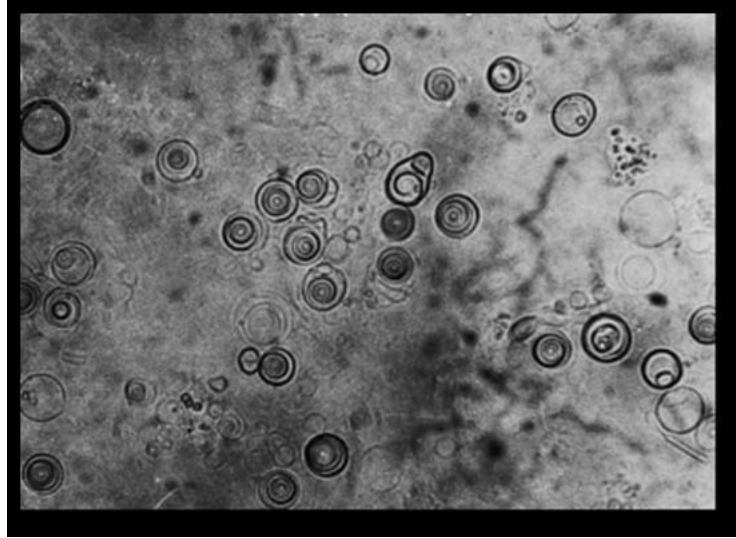
Yakın zamanda keşfedilen aspazomlar, askorbik asitin ester formu olan askorbil palmitat ile geliştirilen çift tabakalı veziküler sistemler olarak tanımlanmaktadır. Askorbik asit, vücudumuzdaki temel antioksidanlardan birisidir. Serum peroksit düzeylerini düşürmede en etkili antioksidan olan, diğer bir adıyla C vitamini, birçok insanın günlük hayatının bir parçasıdır (Wartanowicz ve ark., 1984). Askorbik asit son derece hidrofilik bir maddedir ve bundan dolayı lipofilik bölgelerde antioksidan etkinliği düşüktür. Buna ek olarak askorbik asit, oksidasyona son derece açıktır. Bundan dolayı mevcut formuyla kullanımında stabilite sorunları yaşanmaktadır. Hem stabilitesinin artırılması hem de lipofilik bölgelerde etki göstermesi amacıyla askorbil palmitat gibi birçok ester formu sentezlenmiştir (Şpiclin ve ark., 2001).

Askorbil palmitat, C vitamini olarak da bilinen askorbik asite göre daha lipofilik, daha kararlı ve biyoyararlanımı daha yüksek olan ester formudur. Bunun yanı sıra, antioksidan etkisi yüksek ve ilaç çözünürlüğünü artırıcı, aspazomların yapısını oluşturan önemli role sahip bir bileşiktir. Askorbil palmitata ek olarak kolesterol ve disetil fosfat gibi negatif yüklü fosfolipitler aspazomal formülasyon bileşenleri olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Yapıda kolesterol ve disetil fosfat varlığı aspazomun kararlılığına katkı sağlamaktadır (Chen, 2023).



Şekil 2.1 Aspazom yapısı (Singh ve ark., 2023)

Aspazom yapısı itibariyle hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddeleri yapısında taşıma yeteneğine sahiptir. Aspazomlarla ilgili kısıtlı sayıdaki çalışmalara bakıldığında, özellikle topikal kullanıma yönelik çalışmalar bulunmakta olup, ciltten birçok etkin maddenin geçişini kolaylaştırdığı, ışıktan koruyucu etki yaptığı; psöriasis, melazma, romatoit artirit gibi hastalıklarda deri rengini açıcı ve deriyi iyileştirici etki yaptığı için geliştirildiği ve etkinliğinin belirlendiği görülmektedir. Hazırlanma genellikle yöntemleri diğer birçok çok katmanlı veziküler sistem gibi film hidrasyon metodudur (Gopinath ve ark., 2004; Yadav ve Lariya, 2018; Kar ve ark., 2020; Ghosh ve ark., 2018).



Şekil 2.2 Aspazomların mikroskop altındaki (450x) görüntüsü (Singh ve ark., 2016)

2.1.1 Aspazomların avantajları

- Çift katmanlı amfifilik yapıya sahip olmalarından dolayı birçok etkin maddenin taşınmasına olanak sunmaktadır.

- Askorbik asit (C vitamini)'in daha stabil formu olan askorbil palmitatın veziküler formu olan as pazomlar, veziküler sistemlerin ve C vitaminin avantajlarını bünyesinde barındırmakta ve stabilite problemi dezavantajının önüne geçebilmektedir.
- Askorbik asit türevi bir yapı olduğu için yüksek antioksidan ve yüksek antienflamatuar özellik göstermektedir.
- Kontrollü salım için modifiye edilebilir uygun bir taşıyıcı sistemdir.
- Vücut tarafından tolere edilebilirliği de son derece iyidir, herhangi bir yan etki bırakmazlar. Bu da as pazomları güvenli ve yan etkisiz bir ilaç taşıyıcı sistem yapmaktadır.
- İnsanlar tarafından sıkça kullanılan askorbik asitin stabil ve daha güvenle kullanılabilir bir formu ilaç taşıyıcı sistem olarak sunulabilmektedir (Lamie, 2022)

Gelecekte as pazomlar, özellikle kronik cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Yüksek stabilite, kontrollü salım yapabilme yetenekleri, iyi tolere edilebilirlikleri ve taşıdıkları etkin maddeden bağımsız olarak sağladıkları antienflamatuar ve antioksidan özellikler düşünüldüğünde güçlü bir seçenek olarak önümüzde durmaktadır.

2.2. Flavonoidler

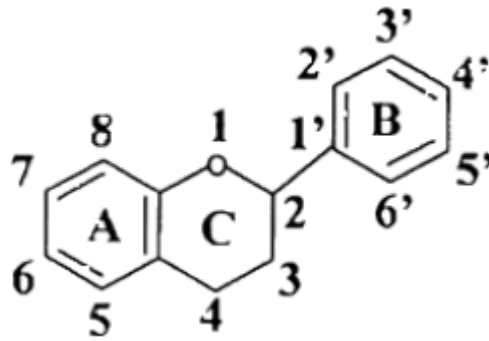
Ülkemizde ve dünyada tıbbi amaç gözetilerek tüketilen birçok bitki vücuda yararlı etkilerde bulunabilecek çeşitli maddeler içermektedir. Bu madde gruplarından en geniş ve üzerinde çalışılanlarından birisi flavonoidlerdir. Fenolik fitokimyasallar olarak isimlendirilen grubun en büyük üyesi olan flavonoidler, çok güçlü antioksidan aktiviteye sahiptirler. (King ve Young, 1999)

Vücutta oluşan serbest oksijen türevi maddelere karşı antioksidan bileşikler etkili olmakta ancak bu radikaller antioksidan maddelerin etkinliğine göre çok yüksek miktarlara çıktıklarında vücutta başta nükleik asitler ve proteinler olmak üzere birçok yapıya hasar vermektedir. Bu hasarlar da birçok hastalığa yol açmaktadır. Bundan dolayı hem vücudun kendisi birçok antioksidan madde sentezler hem de diyetle birçok antioksidan madde alınmalıdır. (Bayr, H. 2005)

Flanovoidler bitkilerde mikrobiyal aktiviteye karşı sentezlenen bileşiklerdir. Birçok flavonoid aldoz redüktaz, COX, LOX ve fosfoinositid 3-kinaz inhibitörü etki gösterir. Bu sayede yüksek antioksidan etkinlik sunarlar. (Karak, P. 2019)

Flavonoidler, halka yapılarına bağlı fenolik hidroksil gruplarının sayısı ve düzeni sayesinde antioksidan etkinlik gösterirler. Serbest oksijen taşıyan bir bileşiğe elektron vererek bileşikteki serbest radikalleri indirgerler. Bu sayede vücutta önemli hasarlara yol açan birçok serbest radikalın süpürülmesini sağlarlar. (Rice-Evans, C. 2001) Flavonoidlerin lipid peroksidasyonu ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonu inhibe etmedeki güçlü peroksil radikal temizleme yetenekleri çalışmalarda açıkça ispatlanmıştır. LDL'nin oksidasyonunun, koroner kalp yetmezliğinin temel sebeplerinden birisi olduğu düşünüldüğünde antioksidan etkilerinin önemi ve gücü daha da iyi anlaşılabilir. (Holvoet, P. 2004)

Flavonoidler fenol ve piran halkalarından oluşan yapılardır. İki adet fenol grubuna ve bir adet piran halkasına bağlanan fonksiyonel gruplara göre yapıları ve aktiviteleri değişir. Yapılan çalışmalara göre, flavonoidlerin antioksidan aktivitesi moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı ve konumuyla ilişkilidir. B halkasında 2 adet hidroksil grubu varlığı (kateşol yapısı), doymamışlık ve C halkasında fonksiyonel grup olarak 4-okso varlığının da antioksidan kapasiteyi artırdığı görülmüştür. (Heim ve ark., 2002)



Şekil 2.3. Flavonoid Genel Molekül Yapısı (Redrejo-Rodriguez ve ark., 2004)

2.3. Baicalein

Baicalein, Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasının bir üyesi olan *Scutellaria baicalensis* bitkisinden elde edilen flavon yapısında flavonoiddir. *S. baicalensis* Çince “Huang Qin” olarak tanınmaktadır. Milattan önce 200’lü yıllardan beri

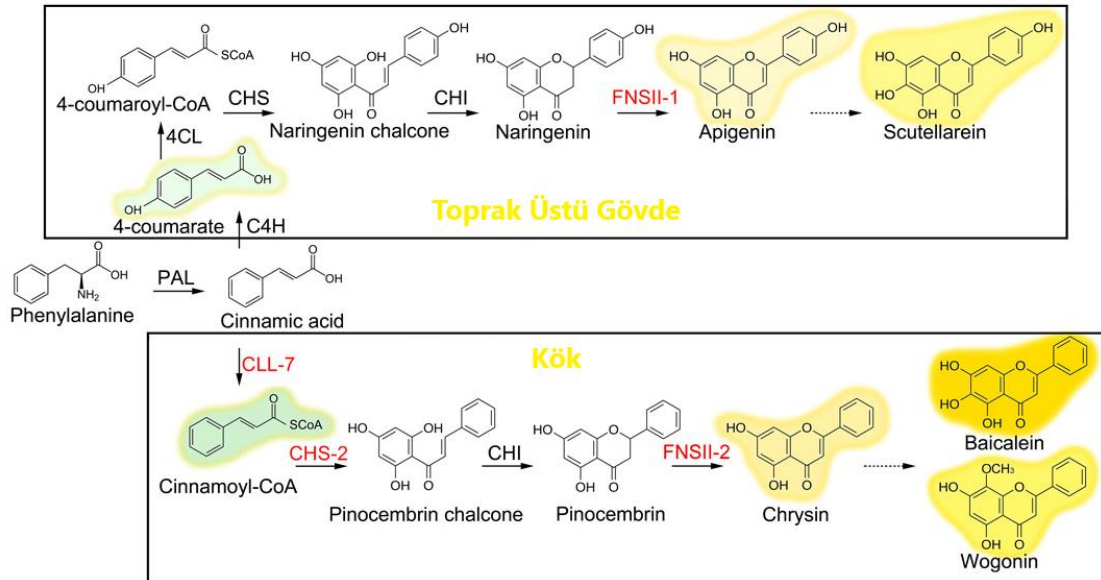
kayıtları bulunan bu bitki, özellikle Çin coğrafyasında kullanıma sahiptir. Soğuk algınlığı, ateş ve açık yaraların tedavisi temel kullanım alanları arasındadır. Günümüzde daha çok antioksidan ve antienflamatuvar etkileri sebebiyle ilgi çekmektedir.



Şekil 2.4. *S. baicalensis* kurutulmuş kökleri (Princeherb, 2024)

Çok uzun yıllardır bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar nedeniyle içeriklerindeki etkinlik sağlayan bileşikler aydınlatılmaktadır. *S. baicalensis* bitkisinin köküne özel flavonlar (root-specified flavones) olduğu görülmüştür. Baicalein, bu flavonoidlerden biridir.

S. baicalensis türünde baicalein sentezi sinamik asitten başlamaktadır (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 *S. baicalensis*'te Baicalein Sentez Basamakları (Pei ve ark., 2022)

Baicalein, Çin, Nepal, Moğolistan bölgeleri başta olmak üzere Asya ve Kuzey Amerika'daki birçok bölgede kullanılmaktaydı ve günümüzde hala kullanılmaktadır. Avrupa ve Kuzey Amerika'da toprak üstü kısımlarının çayı yapılmaktadır. (Zhao ve ark., 2019)

2.3.1. Farmakokinetik Özellikleri

Baicalein suda düşük çözünürlüğe sahip bir maddedir. Sudaki çözünürlüğü yaklaşık 17 µg/mL'dir. Buna karşılık etanol içerisindeki çözünürlüğü bunun yaklaşık 10 katıdır. Bu kadar düşük bir çözünürlüğe sahip olması biyoyararlanım sorunlarına yol açmaktadır (Li ve ark., 2018.) Baicalein mide ve ince bağırsaktan iyi derecede emilir. Temel metabolizması konjugasyon üzerinden olmaktadır. İntravenöz enjeksiyonunun ardından yaklaşık ¾'ü metabolize olmaktadır. Plazmada glukronid ve sülfat konjugatları baicalein alımından sonra görülebilmektedir. Baicaleinin düşük çözünürlüğünün üstüne yüksek oranda metabolize olması baicaleinin biyoyararlanımını oldukça düşük olmasına sebep olmaktadır (Xing ve ark., 2005).

2.3.2. Baicalein Farmakolojik Etkileri

2.3.2.1. Antioksidan Etki

Reaktif oksijen türevleri vücutta fizyolojik süreçler sonucunda ortaya çıkan ve protein, yağ veya diğer yapılara zarar verme potansiyeli bulunan oksijen temelli bileşikler ifade etmektedir. Bu bileşikler vücutta gerçekleşen sentezler ve yıkımlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu oksijen temelli bileşiklere karşı savaşan enzimler, antioksidan bileşikler gibi birçok koruyucu faktör bulunmaktadır. Dışarıdan bu dengenin bozulması sonucunda vücuttaki antioksidan faktörler, oksidatif faktörlere göre etkisiz kalır ve oksidatif stres artmaya başlamaktadır. Bu da başta enzimlerin, nükleik asitlerin, proteinlerin zarar görmesine sebep olmaktadır. (Liochev, S. I. 2013) Fizyolojik sistemler peroksidaz enzimleri gibi vücudun kendi sentezlediği faktörleri ve C vitamini gibi dışarıdan alınan faktörleri oksidatif stresle savaşmak için kullanabilmektedir (Liang ve ark., 2017)

Vücutta serbest oksijen radikalleri temel olarak tekli oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil gibi sınıflandırılabilir. Bunlar dışında kloroaminler ve nitrit türevleri diğer önemli serbest radikallerdir. (Bergamini ve ark., 2004) Bu radikaller

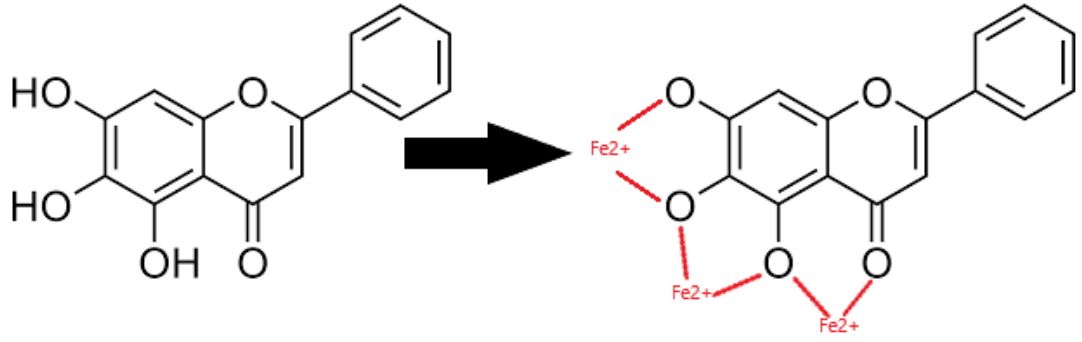
etkilerini nükleik asitlerin, proteinlerin, metal iyonlarının vs. pozitif uçlarına bağlanarak ve bu şekilde yapılarını bozarak ve işlev göstermelerini engelleyerek göstermektedirler. Birçok antioksidan madde ise bu yapılara kendileri bağlanarak oksidatif bileşiklerin bağlanmasını önleyerek, reaktif radikallerin oluşmasına sebep olacak madde ve reaksiyonları azaltarak ya da ortamda bulunan radikallere bağlanarak vücudu oksidatif strese karşı korumaktadırlar. (Chapple, I. L. C. 1997)

Baicalein, vücuda dışardan alınan önemli antioksidan etkili bileşiktir. Baicalein'in antioksidan etki mekanizması OH⁻ radikallerini süpürücü etkisine dayanır. Bitkisel kökenli moleküllerin antioksidan etkilerini ölçmede kullanılan temel metotlardan birisi olan Deoksiriboz Degradasyon Tayini yöntemi ile yapılan çalışmalarda, Trolox'a (E-Vitamini analogu) göre Baicalein'in çok daha yüksek hidroksil radikali süpürücü etkisi olduğu görülmüştür. (Tian ve ark., 2018)

Direkt hidroksil radikali süpürücü etkisinin yanı sıra Baicalein'in indirekt etkileri de vardır. Bunu Fe²⁺ iyonunun şelasyonu ile gerçekleştirir. Yapısında bitişik üç adet hidroksil grubu barındıran Baicalein, 3 adet Fe²⁺ iyonunu yapısına bağlar. Serbest Fe²⁺ iyonlarının Baicalein'e bağlanması, Şekil 2.7'de verilen Fenton Reaksiyonu ile Hidrojen Peroksit ile reaksiyona giren Fe²⁺'nin hidroksil radikali oluşturmasını engeller ve bu şekilde indirekt antioksidan etkinlik görülmüş olur. (Tian ve ark., 2018)



Şekil 2.6. Fenton Reaksiyonu (Tian ve ark., 2018)



Şekil 2.7. Baicalein'in 3 tane Fe^{2+} iyonunu bağlaması (Tian ve ark., 2018)

Baicalein'in bir diğer indirekt antioksidan etki mekanizması ise oksidatif radikalleri süpüren antioksidan mekanizmaları harekete geçirmesidir. Bunu hücredeki bazı faktörleri indükleyerek gerçekleştirmektedir. Nükleer Faktör Eritroid 2 (NRF 2), NFE2L2 geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. NRF 2, hücre içerisindeki antioksidan proteinlerin ekspresyonunu oksidatif strese karşı düzenler. Mitokondriyel Süperoksit Dismutaz 2 (MnSOD), Glutamat-sistein ligaz, hem oksijenaz-1 gibi enzimler, NRF 2 faktörü tarafından kontrol edilir. Baicalein, hücre içerisinde NRF 2 ekspresyonunu artırarak antioksidan enzimlerin up-regülasyonunu sağlar ve bu sayede indirekt antioksidan etkinlik göstermektedir. (Lee ve ark. 2011)

2.3.2.2. Antienflamatuar Etki

İnflamasyon, vücudun enfeksiyon, yaralanma gibi durumlara karşı verdiği savunma tepkilerinin tamamını ifade etmektedir. İnflamasyon, normal fizyolojik dengede zararlı durumla karşılaşınca başlatılır, bu durum ortadan kalktığında sonlandırılır. Ancak çeşitli hastalıklar, kötü beslenme gibi durumlar sonucunda bu durum tersine dönebilir ve bu da gereksiz inflamatuvar maddelerin salgılanmasına, dolayısıyla vücutta çeşitli bozuklukların meydana gelmesine sebep olur. (Ahmed, A. U. 2011)

Vücuttaki inflamatuvar etkinin sonlanması ve tersine döndürülmesi için antienflamatuar maddeler kullanılmaktadır. Baicalein de antienflamatuar etkiye sahip bir bileşik olup, T lenfositlerin ekspresyonunu baskılar, sitokin salımını azaltır ve bu sayede antiinflamatuvar etki oluşturmaktadır. (Patwardhan ve ark., 2016)

Baicaleinin makrofaj hücrelerinde NO salımını azalttığı ve PGE₂ üretimini düşürdüğü, ayrıca kas içine enjeksiyonda kaslarda bulunan ödemi de büyük oranda azalttığı tespit edilmiştir. (Varia ve ark., 2023)

2.3.2.3. Diğer Etkileri

Baicalein, kardiyak iskemi sonucu görülen hücre ölümünü azaltarak kardiyovasküler sistemlerde koruma sağladığı, matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) enzimini inhibe ederek karaciğer kanser hücrelerinde ve meme kanser hücrelerinde antikanser etki oluşturduğu, mide kanser hücrelerinde Bcl-2 gen ekspresyonunu artırarak kanserli hücrelerin hücre apoptozunu sağladığı ve mide kanser hücrelerinin çoğalması sırasında hücre bölünmesini S fazında tutarak hücrelerin çoğalmasını engelleyebildiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. (Hamada ve ark., 1993)

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Temel olarak, orijinal bir dokudan alınan disperse hücrelerden, primer kültürlerden veya bir hücre serisinden/soyundan, enzimatik, mekanik veya kimyasal disagregasyonla elde edilen hücrelerin çoğaltılması işlemi olarak ifade edilebilir (Freshney, 1994).

Hücre kültürleri, günümüzde ilaç absorpsiyonunun *in vitro* değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Ayrıca *in vitro/in vivo* korelasyonu yüksektir.

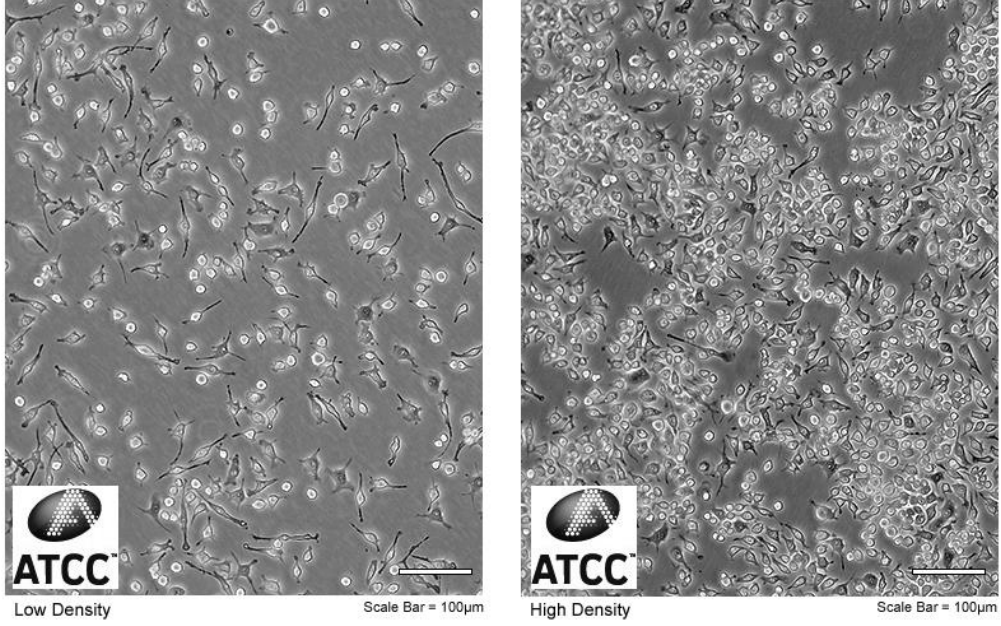
2.4.1. Hücre Kültürünün Avantajları

- Hücre kültürü ortamında sıcaklık, pH, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ varlığı gibi fizikokimyasal koşullar daha kolay sağlanmaktadır.
- Homojenite sağlanabilir. Heterojen olan doku örnekleri birkaç pasajdan sonra homojen hale gelmektedir.
- Hücre kültürleri ekonomiktir. Zaman kaybı ve masraflı hayvan çalışmalarından kaçınılabilmektedir.
- Endüstriyel ürün üretimlerinde standart olarak kullanılabilmesidir. Son yıllarda, geliştirilen teknikler ile bu çok daha kolay başarılabilmektedir (Mutlu, 2003; Shen ve Lin, 1994)

2.4.2. RAW 264.7 Hücre Hattı

RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattıdır. Tez çalışmamız kapsamında, RAW 264.7 hücre hattı hem sitotoksisite çalışmalarında hem de antienflamatuvar etki tayini çalışmalarında kullanılmıştır.

ATCC Number: **TIB-71**™
Designation: **RAW 264.7**



Şekil 2.8. RAW 264.7 hücre hattı (ATCC) (“RAW 264.7” 2024)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Baicalein	Sigma
Askorbil palmitat	Sigma
Kolesterol	Sigma
Disetil fosfat	Sigma
RAW 264.7 hücre hattı	ATCC TIB-71
Hücre ortamı	DMEM, Sigma
Hücre kültürü sarf malzemeleri	Corning
TNF- α ölçüm kiti	Reed Biotech
PGE2 ölçüm kiti	Reed Biotech
Etanol	Merck
Kloroform	Merck

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

UV-VİS spektrofotometre	Shimadzu
Hot plate-Isıtıcı/Karıştırıcı	Heidolph
Partikül büyüklüğü ölçüm aleti	Malvern-Zeta Sizer
Zeta potansiyel ölçüm aleti	Malvern-Zeta Sizer
Rotary evaporatör	Heidolph
Laminar akış kabin	Nüve
Hücre sayım cihazı	Roche Innovatis Cedex Xs
Su banyosu	Nüve
Ultrasonik banyo	Wise Clean
Vorteks	WiseMix
Analitik hassas terazi	Pioneer
Ultrasantrifüj	Thermo

3.2. Yöntem

3.2.1. Çözünürlük Çalışması

Baicalein çözünürlük çalışması kapsamında 1:1, 1:2 ve 1:3 h/h oranlarında Su:Etanol karışımları içerisinde çözünürlük çalışması yapılmıştır. 10 mL su:etanol karışımına 10'ar mg Baicalein eklenmiş ve 48 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırma sonunda maksimum çözünme miktarları UV-VİS spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.2. Etkin madde miktar tayini

Çalışmamızın ilk bölümünde etkin maddemiz, Baicalein validasyon çalışmaları UV-VİS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen aspazomlara yüklenen ve *in vitro* salım ve hücre kültürü çalışmalarında alınan örneklerdeki etkin madde miktarının belirlenmesi için UV-VİS spektrofotometreden yararlanılmıştır.

Literatür taraması sonrası, 200-550 nm arası tarama yapılmasına karar verilmiştir. Baicaleinin etanol:su (2:1 h/h) karışımı içerisinde 1000 µg/mL derişimde çözeltisi

hazırlanmış ve bu stok çözeltiden hareketle 100 µg/mL çözeltisi ile maksimum absorbans verdiği dalga boyu 323 nm olarak belirlenmiştir. Dalga boyu taraması 1cm'lik kuvartz küvetler kullanılarak köre (Su:Etanol 1:2 karışımı) karşı yapılmıştır.

Baicalein'in stok çözeltisinden hareketle 2,5-20 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Bütün standart ve örnek çözeltiler üçer kere analiz edilerek ortalama değerler ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Bu şekilde doğrusallık parametresi valide edilmiştir.

Aspazomu oluşturan maddelerin girişim yapıp yapmadığının tespiti için tüm maddeler tek tek analiz edilerek seçicilik validasyonu yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik validasyonu için ise doğrusallık analizi farklı bir günde tekrarlanmıştır.

3.2.3.Sitotoksisite testi

Formülasyon geliştirme sırasında kullanılacak baicalein etkin maddesinin ve aspazomda kullanılan maddelerin hücrelerin canlılığını koruyarak güvenle kullanılacakları maksimum miktarları belirlemek amacıyla sitotoksisite testi yapılmıştır. Çalışmada, antiinflamatuvar etkinin tayininde kullanılacak RAW 264.7 hücre hattı üzerinde sitotoksisite testi yapılmış ve kullanılacak madde miktarları belirlenmiştir. Hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit (MTT) testi uygulanmıştır.

MTT testinin esası, 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 getirilmekte ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Baicalein'in çeşitli konsantrasyonlarda (2,5-100 µg/mL) DMEM içerisindeki bir seri çözeltisi kullanılarak öncelikle sitotoksisite testi ile formülasyonlarda kullanılacak konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca aspazomların da güvenle kullanımını tayin etmek için hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Hazırlanan numuneler deney yapıncaya kadar +4°C'de saklanmış ve test için 37°C'ye getirildikten sonra kullanılmıştır.

Çalışmada, test için kullanılacak RAW 264.7 hücre hattı 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde (Yücel ve ark., 2019) 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında üretilmiştir. Kuyucuklara 100'er μL DMEM eklendi ve 24 saat 37°C 'de CO_2 'li etüvde bekletilmiştir. Hiçbir madde içermeyen kontrol grupları belirlendikten sonra plaklar boşaltılmış ve değişen derişimlerde test maddelerinin DMEM içerisindeki çözeltileri ($100 \mu\text{L}$) kuyucuklara eklenerek 24 saat 37°C 'de CO_2 'li etüvde bekletilmiştir. Yirmi dört saatin sonunda plaklardaki içerik boşaltılarak, tüm kuyucuklara $100 \mu\text{L}$ taze DMEM ile $13 \mu\text{L}$ MTT çözeltisi (Fosfat tamponu içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonda) eklenmiştir. Kültür kapları hemen alüminyum folyoyla sıkıca sarılmış ve 2 saat 37°C 'de CO_2 'li etüvde bekletilmiştir. İnkübatörde 2 saat bekletildikten sonra plaktaki besiyeri boşaltılarak $100 \mu\text{L}$ DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenmiştir. Çalkalama sonrası plakalardaki hücrelerin absorbans değerleri ELISA cihazında (Bio-Rad, ABD) 570 nm dalga boyunda okunmuştur (Ökdem ve ark., 2018; Yücel ve ark., 2019).

3.2.4. Formülasyon geliştirme ve karakterizasyon

Askorbil palmitat, kolesterol ve disetil fosfat maddeleriyle 5 farklı aspazom formülasyonu (askorbil palmitat: kolesterol oranları 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:4 (a/a)) hazırlanmıştır. Hazırlama yöntemi olarak film hidrasyon metodu kullanılmıştır (Gopinath ve ark., 2004). Hazırlanan aspazomların karakterizasyonunda, partikül büyüklüğü (PB) ve dağılımı, zeta potansiyeli (ZP), polidispersite indeksi (PDI), enkapsülasyon etkinliği (EE) ve *in vitro* salım parametreleri belirlenmiştir. Hazırlanan aspazomların yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir.

Aspazomlar hidrate edilirken $50 \mu\text{g/mL}$ dozunda baicalein çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltinin ne kadar aspazom içine hapsedildiği ise enkapsülasyon etkinliği ile bulunmuştur.

Enkapsülasyon etkinliği için hazırlanan baicalein içeren aspazomlardan bir kısım alınmıştır ve absorbansı (A_0) ölçülmüştür. Ardından bu çözeltiden bir miktar alınıp 1 saat boyunca 10.000 rpm hızında 4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Buradaki süpernatatın absorbansı (A_s) ölçülmüştür. Santrifüj öncesi absorbans (A_0) ve santrifüj

sonrası absorbans (A_s) aşağıdaki formülle hesaplanıp %Enkapsülasyon Etkinliğı bulunmuştur.

$$EE = \frac{C_0 - C_s}{C_0} \times 100$$

In vitro salım alışmaları Franz difüzyon hücreleri ile yapılmıştır. Hücrelerin üst kısmına salımı incelenen formülasyon, alt kısmına da pH 7,4 fosfat tamponu konmuştur. 12.000 dalton membran filtre kullanılmıştır. Ortam sıcaklığı 37°C'de tutulup, sabit hızda karıştırma deney süresince devam etmiştir. Yirmi dört saat devam eden çalışmanın sonunda alınan örneklerden baicalein miktarları UV-VİS spektrofotometre ile tayin edilmiştir (n=3).

3.2.5.Stabilite alışmaları

Stabilite alışmaları kapsamında hazırlanan aspazomal formülasyonlar farklı sıcaklık ve bağıl nem ortamında (4°C ve 25°C±%60 bağıl nem) flakon içerisinde muhafaza edilerek saklanmıştır. Süre sonunda karakterizasyon parametreleri incelenmiş, formülasyon stabilitesi ve raf ömrü belirlenmiştir.

3.2.6. Antienflamatuar Etki Testi

-Hücre içi ve besi ortamına salınan nitrik oksit düzeylerinin ölçümü

Nitrik oksit ölçümünde kullanılan Griess yöntemi nitritin, asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü meydana getirmesi esasına dayanır (Fidancı ve Tamer, 2011). 0,2 g boraks ($Na_2B_4O_7$) 100 mL distile suda çözölmüş, üzerine 0,069 gr sodyum nitrit ($NaNO_2$) eklenerek standart çözelti hazırlanmıştır. Standart eğıri hazırlamak için 5, 10, 20, 40, 80, 100 μ mol/L konsantrasyonlarda sodyum nitrit çözeltileri hazırlanmıştır. Deney gruplarına ait 50 μ L hacmindeki örneklerin üzerine 50 μ L Griess rejanı eklenmiş, renk meydana gelmesi için oda sıcaklığında 10 dakika beklenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sodyum nitrit çözeltileri de 50 μ L hacminde kuyucuklara eklendikten sonra Griess rejanı ilave edilerek reaksiyonun gerçekleşmesi için inkübe edilmiştir. Mikroplaka okuyucuda 540 nm'de ölçölmüştür. Örneklerde bulunan nitrit konsantrasyonu, standart sodyum nitrit kalibrasyon eğırisinden faydalanılarak hesaplanmıştır.

-Örneklerin TNF- α ve PGE 2 düzeylerine olan etkisi

Hücrelerde sitokin TNF- α , araşidonik asit metaboliti ve aynı zamanda siklooksijenaz-2 ürünü prostaglandin E2 (PGE 2) düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Uygun şartlar altında çoğaltılan RAW 264.7 hücresi 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 5×10^5 olacak şekilde ekilmiştir. Aspazomal formülasyondan salınan baicalein (17 $\mu\text{g/mL}$) lipopolisakkarit (LPS) uygulamasından 3 saat önce kuyucuklara besi yeri içinde dağıtılarak verilmiştir. LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulanmıştır. 24 saat sonunda plaktaki süpernatant toplanarak santrifüj edilmiştir. Örneklerin TNF- α , ve PGE 2 düzeylerine olan etkisi ticari kit ile ölçülmüştür. Deneylede pozitif kontrol olarak indol türevi nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç olan indometazin (25 μM) kullanılmıştır.

3.2.7. Antioksidan Etki Testi

İn vitro salım çalışmaları sonunda kümülatif salınan örneklere 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH \bullet), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzathiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS+ \bullet) radikalini süpürücü etki tayini uygulanmıştır.

-DPPH \bullet radikalini süpürücü etki tayini

Etki tayininde Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,4) ve 1 mL 0,1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH \bullet) ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak etkin madde içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm'de okunmuş ve inhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Gyamfi ve ark., 1999).

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs örnek})}{\text{Abs kontrol}} \times 100$$

-ABTS+ \bullet radikalini süpürücü etki tayini

ABTS+ \bullet radikali (7 mM) ABTS'in sulu çözeltisi ile $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2,45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirilmiş ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0,700 (\pm 0,030) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 μL) ile geçiş çalışmasından elde edilen örnek çözeltileri (10 μL) karıştırılmış ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika

süresince reaksiyon kinetiği ölçölmüştür. Konsantrasyona karşı ölçölen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplanmıştır (Re ve ark., 1999).



4. BULGULAR

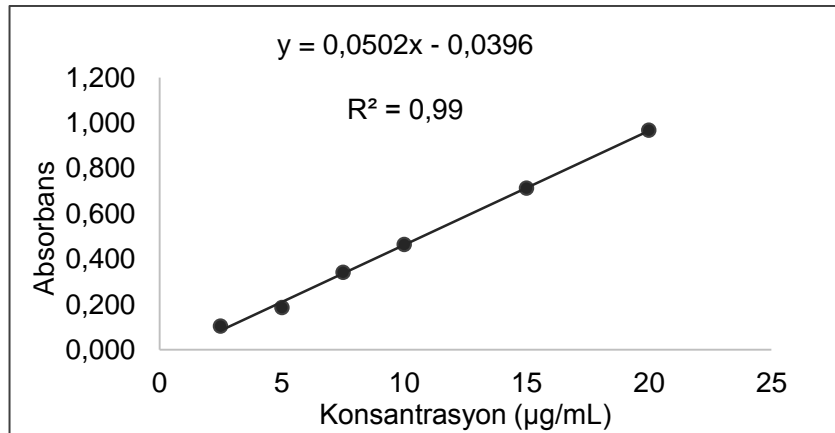
4.1 Çözünürlük Çalışması

Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde çözünürlük çalışması yapılmış ve en iyi çözünürlük 2:1 (h/h) etanol:su karışımında tayin edilmiştir. Etanol miktarını da düşük tutmak adına bu oran seçilmiştir.

Baicaleinin çözündüğü en düşük etanol içeriğine sahip karışım 1:2 Su:Etanol olarak bulunmuştur. Daha düşük etanol içeriğine sahip karışımlarda baicalein çökeltisi görülmüştür. Etanol miktarını düşük tutmak adına tüm çalışmada baicaleini çözmek için 1:2 Su:Etanol kullanılmıştır.

4.2 Etkin Madde Miktar Tayini

Bölüm 3.2.2’de belirtildiği üzere UV-VİS spektrofotometre kullanılarak etkin madde miktar tayini yapılmıştır. Çalışma yapılan tarama sonucu optimum değer olarak bulunan 323 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon çalışmasında 2,5 ile 20 µg/mL konsantrasyon aralığında 6 noktali olarak çalışılmış olup elde edilen doğru denklemi; $y=0,0502x - 0,0396$ ($r^2=0,999$) olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Baicalein ile elde edilen kalibrasyon eğrisi (n=3)

Doğrusallık dışında seçicilik ve tekrarlanabilirlik parametreleri de çalışılmıştır. Askorbil palmitat, kolesterol ve disetil fosfat, 323 nm dalga boyunda analiz edilmiş ve maddelerin bu dalga boyunda pik vermediği görülmüştür.

Doğrusallık analizinin başka bir gün tekrar yapıldığı tekrarlanabilirlik testinde ise sonuçlar arasındaki bağıl standart sapma (RSD) %0,48 olarak bulunmuştur.

Yapılan doğrusallık analizi sonuçlarına göre LOD (Minimum Tespit Edebilme Limiti) ve LOQ (Minimum Hesaplayabilme Limiti) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

σ : Kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

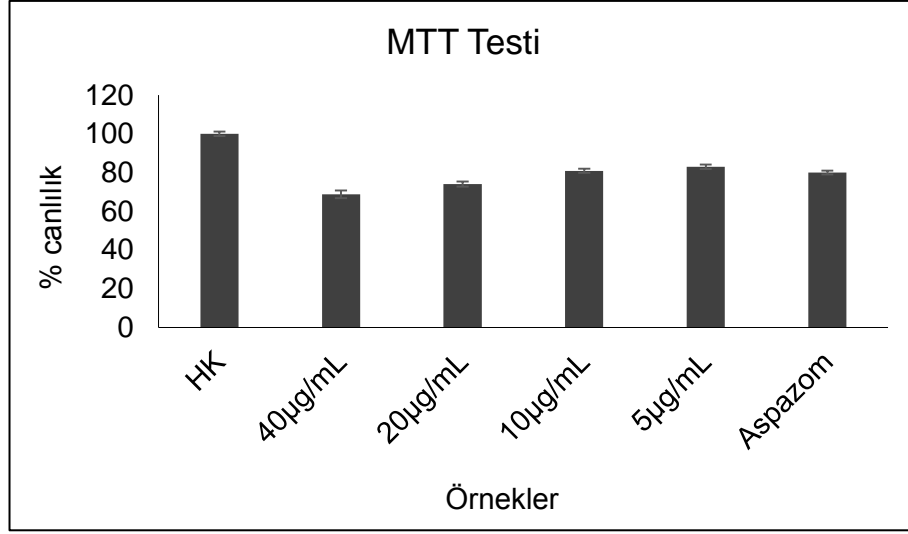
S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

LOD değeri 0,0537 $\mu\text{g/mL}$, LOQ değeri ise 0,1626 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Yapılan doğrusallık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik testleri ışığında metodun başarıyla valide edildiği görülmüştür.

4.3. Sitotoksisite testi

Bölüm 3.2.3'de belirtildiği şekilde MTT testi ile baicalein ve aspazomun RAW 264.7 hücre hattı üzerinde toksik etkileri incelenmiştir. Elde edilen yüzde canlılık değerlerine ait bulgular Şekil 4.2'de verilmiştir.



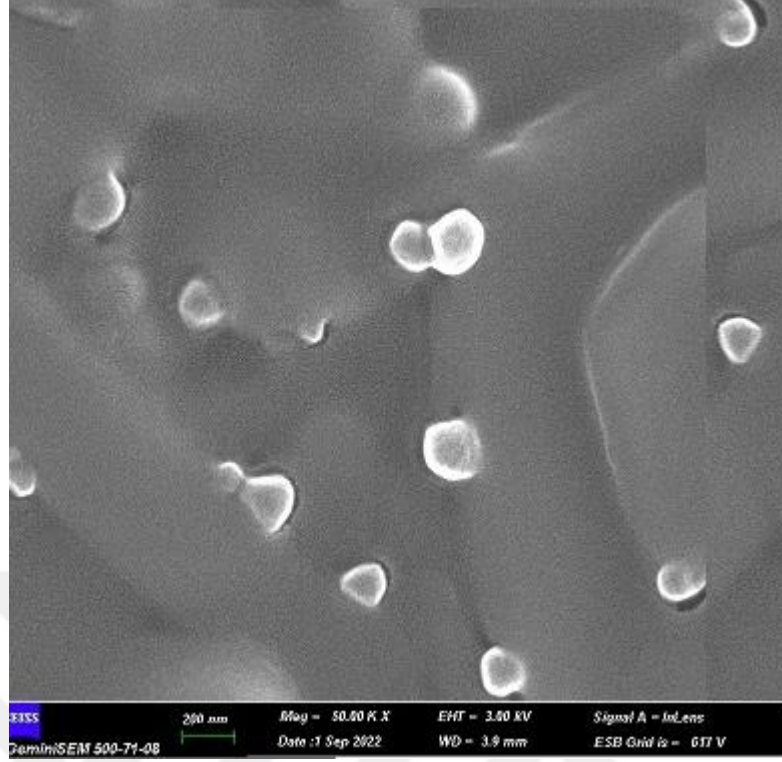
Şekil 4.2. Baicaleinin farklı konsantrasyondaki çözeltisi ve geliştirilen aspazomla formülasyonun RAW 264.7 hücre hattı üzerine sitotoksosite testi sonuçları (HK: Hücre kontrol) (n=6)

4.4 Formülasyon geliştirme ve karakterizasyon

Baicalein ile geliştirilen 5 farklı aspazomal formülasyona ait PB, ZP, PDI ve EE Tablo 4.1’de verilmiştir. Morfolojik incelemesi yapılan aspazomların SEM mikroskop görüntüsü Şekil 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı formülasyon bileşenleri ile geliştirilen aspazomlara ait karakterizasyon parametreleri (n=3)

Formülasyon	Askorbil palmitat: kolesterol oranları (a/a)	Disetilfosfat (toplam lipitin %10 molu)	PB (nm±SS)	ZP (mV±SS)	PDI (PDI±SS)	EE (%±SS)
F1	4:1	10	567±1,12	- 33.3±2,35	0,143±0,005	38±2,30
F2	2:1	10	425±1,00	- 38,1±1,31	0,207±0,015	40±1,02
F3	1:1	10	529±1,11	- 42.1±1,20	0,240±0,018	41±1,16
F4	1:2	10	582±1,15	- 41.7±2,13	0.574±0,014	42±1,09
F5	1:4	10	494±2,01	- 51.3±3,14	0.558±0,014	40±1,23



Şekil 4.3. Aspartomların SEM mikroskop görüntüsü

Tablo 4.1’deki incelenen veriler ile en iyi formülasyon olarak F2 kodlu formülasyon belirlenmiştir.

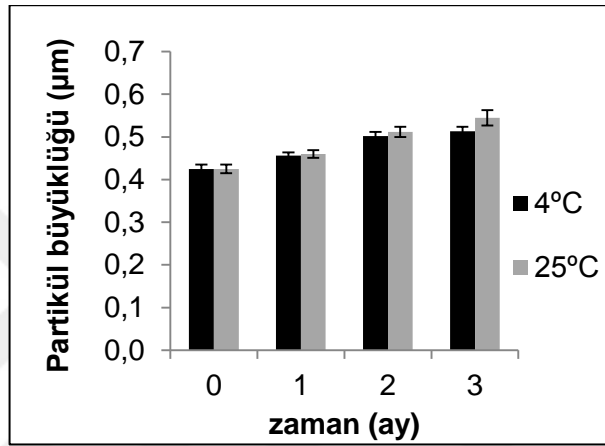
F4 ve F5 formülasyonları, yüksek polidispersite indeksleri yani düşük homojeniteleri sebebiyle elenmiştir. Geriye kalan üç formülasyondan ise F1 formülasyonunun zeta potansiyeli sınır olarak kabul edilen -30 mV değerine çok yakın bulunmuştur. Bu formülasyon bundan dolayı elenmiştir. Ayrıca hem F1 hem de F3 formülasyonlarının partikül boyutlarının F2 formülasyonlarına göre çok daha büyük olması F2 formülasyonunun seçilmesinin nedenidir. Düşük partikül boyutu, gelecekte geliştirilebilecek formülasyonların daha farklı şekillerde ve etkilerde sunulabilmesine ve ayrıca daha iyi emilime olanak sunmaktadır.

Bölüm 3.2.3’te belirtildiği şekilde yirmi dört saat süren ve optimum formülasyon olarak belirlenen F2 kodlu baicalein yüklü aspartomlar ile salım çalışmaları yapılmış ve yirmi dört saatin sonunda salınan baicalein miktarı % 85±0,95 olarak bulunmuştur.

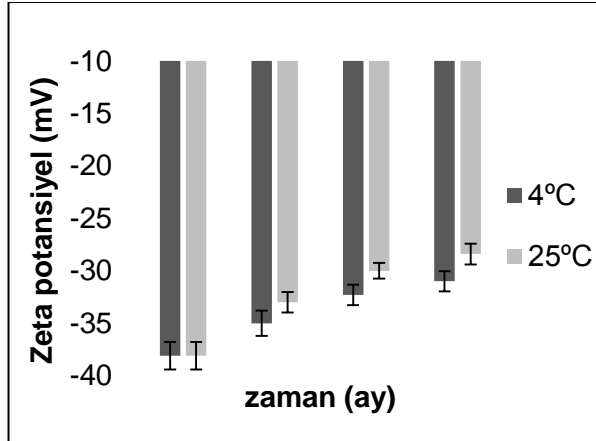
Aspazomlar hidrate edilirken kullanılan çözeltinin baicalein konsantrasyonu 50 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Enkapsülyasyon etkinliğinin yaklaşık %40 olduğu düşünülürse aspazom içerisindeki baicalein konsantrasyonu 20 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunur.

4.5. Stabilite çalışmaları

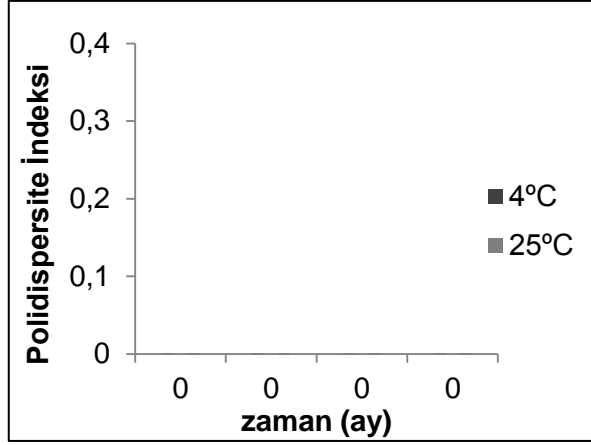
Bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde, hazırlanan aspazomal formülasyonları (F2) farklı sıcaklık ve bağıl nem ortamında (4°C ve $25^{\circ}\text{C}\pm\%60$ bağıl nem) muhafaza edilerek saklanması sonucu elde edilen veriler Şekil 4.4-4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.4. Baicalein yüklü aspazomların partikül büyüklüğü değişimi (n=3)

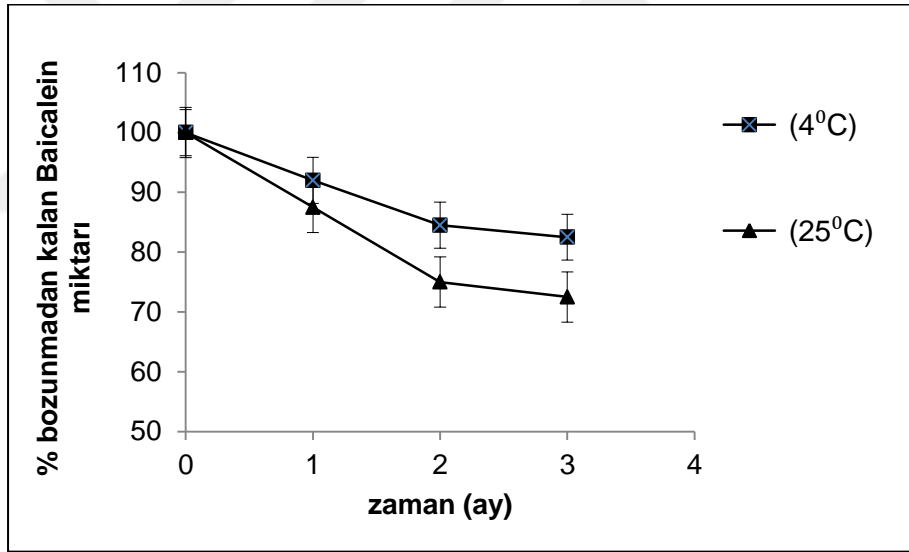


Şekil 4.5. Baicalein yüklü aspazomların zeta potansiyel değişimi (n=3)



Şekil 4.6. Baicalein yüklü aspazomların polidispersite indeksi değişimi (n=3)

Üç ay boyunca farklı sıcaklık ve bağıl nem ortamında (4°C ve 25°C±% 60 bağıl nem) aspazomların muhafaza edilerek formülasyonda bozunmadan kalan etkin madde miktarının zamanla değişimi Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Baicalein yüklü aspazomların etkin madde miktarı değişimi (n=3)

Uyum ölçütleri (determinasyon katsayısı, sapma kareleri toplamı) incelenerek elde edilen profiller kinetik açıdan incelenmiş ve bozunmanın birinci dereceden olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2).

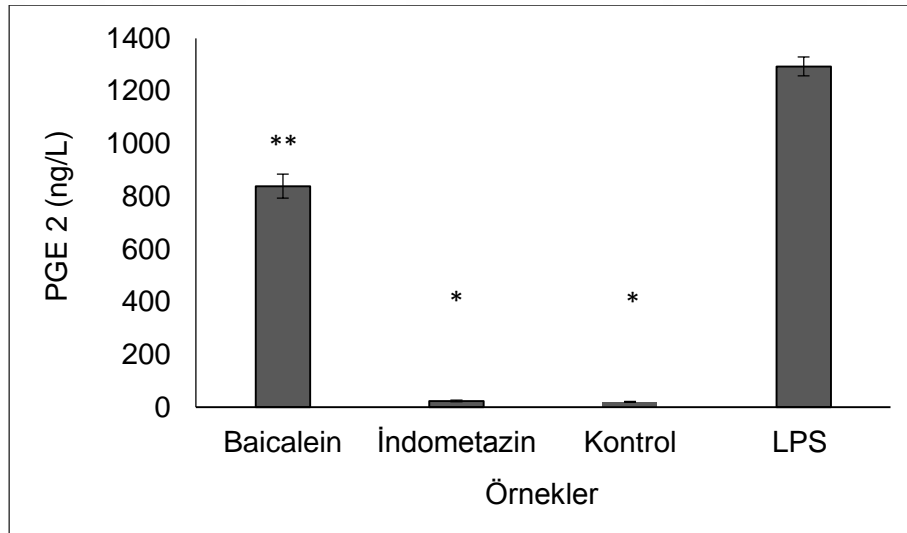
Tablo 4.2. Baicalein yüklü aspazomların farklı sıcaklıklardaki uyum ölçütleri (1.kinetik) ve raf ömürleri

Formülasyon	4°C			25°C		
	SKT	r ²	Raf ömrü (gün)	SKT	r ²	Raf ömrü (gün)
Baicalein yüklü aspazom	32,4	0,994	24	38,5	0,991	21

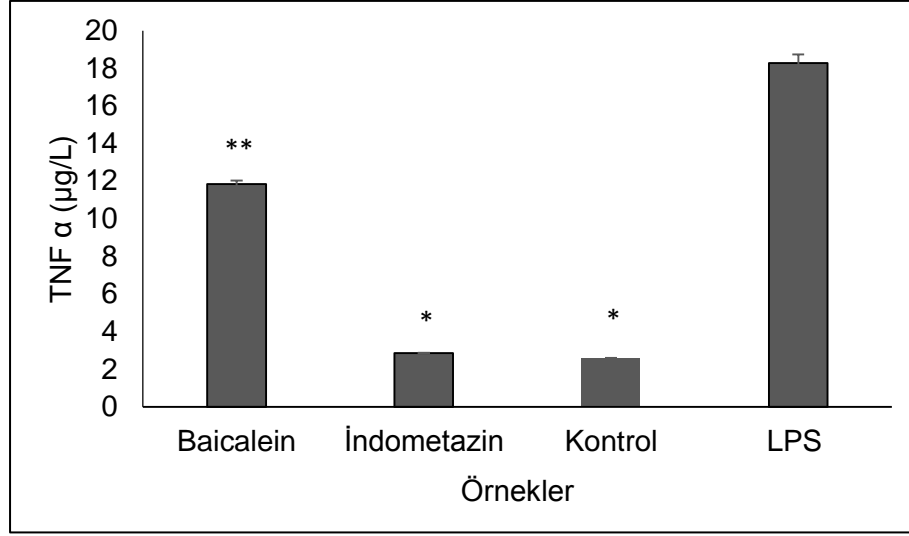
Stabilite sonucunda izlenen değişimlerde 4°C ve 25°C arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Geliştirilen formülasyonun 4°C’de saklandığında 25°C’ye daha stabil olduğu anlaşılmıştır. 4°C ve 25°C için tespit edilen raf ömürleri Tablo 4.2’de de sunulmuştur (p<0,05).

4.6 Antienflamatuar Etki Testi

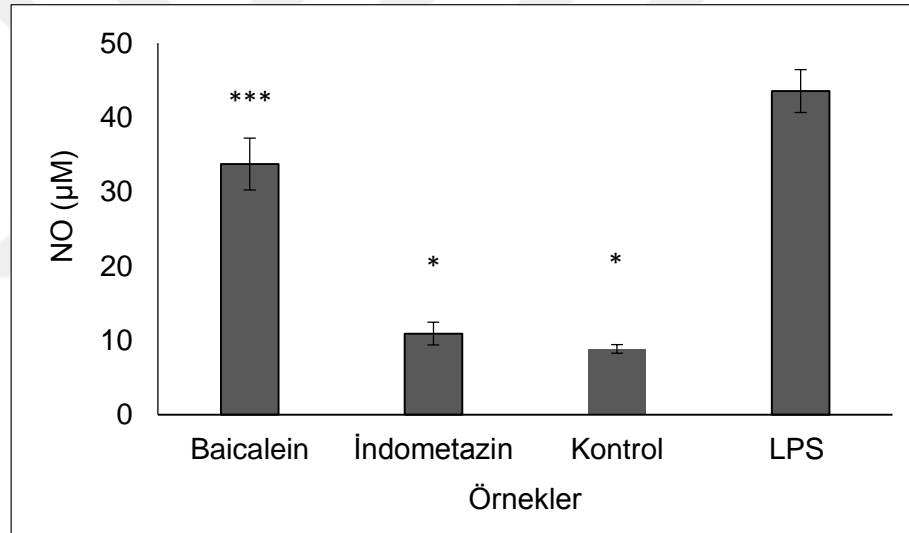
Bölüm 3.2.5’te açıklandığı şekilde aspazomal formülasyondan salınan baicaleinin antienflamatuar etkisinin değerlendirildiği PGE 2, TNF α ve NO düzeyleri üzerindeki etkisi belirlenmiş ve Şekil 4.8’ de verilmiştir.



Şekil 4.8 Aspazomal formülasyondan salınan Baicaleinin PGE 2 düzeyine olan etkisi (İndometazin: pozitif kontrol grubu, *p<0,001, **p<0,01, ***p<0,05) (n=3)



Şekil 4.9 Aspazomal formülasyondan salınan Baicaleinin TNF- α düzeyine olan etkisi (İndometazin: pozitif kontrol grubu, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$) (n=3)



Şekil 4.10 Aspazomal formülasyondan salınan Baicaleinin NO düzeyine olan etkisi (İndometazin: pozitif kontrol grubu, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$) (n=3)

4.7. Antioksidan Etki Testi

Bölüm 3.2.6'da açıklandığı şekilde aspazomal formülasyondan salınan baicaleinin antioksidan etkisi Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 Aspazomal formülasyondan salınan baicalein'in oluşturduğu antioksidan etki

Örnek	DPPH % inhibisyon±SS	ABTS % inhibisyon±SS
Salım örneği	75,69±1,06	51,03±1,18

(SS: Standart sapma, n=3)



5. TARTIŞMA

Scuteellaria baicalensis bitkisinden elde edilen bir flavonoid olan baicalein, antibakteriyel, antiviral, antitümöral ve anti-enflamatuvar etkilerinden ötürü dikkat çeken bir bileşiktir. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-a), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinleri ve transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B'nin (NF-κB) inhibe ederek enflamasyonu etkili bir şekilde azaltmakta ve ilişkili semptomları hafifletmektedir. Bunun yanı sıra, güçlü antioksidan etkili baicalein, oksidatif stresi azaltmada önemli bir rol oynamaktadır. Hücre hasarına neden olabilen serbest radikalleri temizleyerek etki etmektedir (Zhang ve ark., 2021; Fan ve ark., 2013; Oh ve ark., 2016). Ancak, zayıf stabilite ve düşük çözünürlük sebebiyle yeterli biyoyararlanım gösterememektedir. Etkinliğinin artışı sağlamanın bir yolu olarak ilaç taşıyıcı sistemler tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda; çözünürlük ve biyoyararlanım problemlerinin, istenen terapötik etkinin sağlanamaması ve uygulama sıklığı, yüksek ilaç konsantrasyonu ve hasta uyuncunda düşüklük gibi problemleri beraberinde getirmesi nedeniyle veziküler ilaç taşıyıcı sistemlerin sağladığı avantajları kullanarak, baicalein yüklü aspozomların geliştirilmesi ve antioksidan ve anti-enflamatuvar etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre, Sınıf II'ye dahil olan (düşük suda çözünürlük ve yüksek permeabilite) baicalein, organik solvanlarda (etanol, DMSO, dimetil formamid (DMF)) çözünmektedir. Baicaleinin kararlılığını artıracak, kimyasal yapısını koruyacak ve etkinliğini gösterebilecek uygun formülasyon ile etkinliğinin artırılması mümkündür. Yapılan bir çalışmada, biyoaktif bir flavonoid olan baicaleinin biyoyararlılığını arttırmak için oral ve pulmoner nanokristal potansiyeli araştırılmış ve baicalein nanokristalinin ortalama bağıl biyoyararlanımı 1,67 kat artmış, pulmoner uygulanan nanokristal baicalein ile hızlı ve kapsamlı bir emilime ve intravenöz baicalein enjeksiyonuyla hemen hemen aynı farmakokinetik parametrelere sahip olduğu belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2011).

Bu noktada modern ve yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemin kullanımı önem arz etmektedir. Son yıllarda keşfedilen aspazomal ilaç taşıyıcı sistemler, askorbil palmitatın ve yapıyı stabil hale getirmesi için kullanılan steroid (kolesterol) ile birlikte oluşturduğu veziküler yapı olarak tanımlanmaktadır. Askorbil palmitat, C vitamini olarak da bilinen askorbik asitin ester formu olup stabilitesi daha yüksektir. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan askorbik asite nazaran askorbil palmitat, daha stabil yapısı ile dikkat çekmiştir. Askorbil palmitat ile ilk olarak 2004 yılında veziküler sistem oluşturma fikri hayata geçmiştir (Gopinath ve ark., 2004; Yadav ve Lariya, 2018; Kar ve ark., 2020).

Çalışmamızda geliştirilen 5 farklı aspazomal formülasyon (askorbil palmitat: kolesterol oranları 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:4 (a/a)) film hidrasyon metodu kullanılarak hazırlanmıştır. Aspazomların karakterizasyonuna bakıldığında, 2:1 a/a oranında askorbil palmitat: kolesterol kullanımıyla elde edilen optimum formülasyon olarak belirlenen F2 kodlu formülasyonun PB 425 nm, ZP -38,1±1,31 mV, PDI 0,207±0,015 ve enkapsülasyon etkinliği %40±1,02 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Nanoboyutta geliştirilen aspazomlar, kolloidal sistemlerin stabilitesinin değerlendirilmesinde etkili olan zeta potansiyel değeri açısından kararlı bulunmuştur. Zeta potansiyel değeri +30 mV'tan büyük ve -30 mV'tan küçük olan kolloidal sistemlerin kararlı olduğu ifade edilir (Eren Böncü ve ark., 2021). Geliştirilen sistemlerin monodispers yapıda olması önemlidir. Düşük polidispersite indeksi (<0,3) seçilen formülasyonun monodispers olduğunu göstermektedir. Enkapsülasyon etkinliği %40±1,02 bulunan F2 kodlu optimum formülasyonumuzda, *in vitro* salım çalışması sonrası, salınan baicalein miktarı %85±0,95 olarak bulunmuştur.

Yakın geçmişte keşfedilen aspazomal formülasyonlarla ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Web of Science (2024) tarandığında, aspazomal formülasyonlar hakkında 18 makale yer almaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında; boş aspazomların bile antioksidan etkinliğinin yüksek olduğu, bunun yanı sıra farklı aktif bileşikler kullanılarak yaşlanma karşıtı etki, foto koruma, deri rengini açıcı etki gibi farklı amaçlar için geliştirildiği görülmektedir (Yadav ve Lariya, 2018; Kar ve ark, 2020; Shinde ve ark, 2022; Yücel ve ark, 2023). Baicalein ile geliştirilen aspazomal formülasyona literatürde rastlanmamaktadır. Baicalein içeren diğer nanoformülasyonlar incelendiğinde, oral biyoyararlanımı ve çözünürlüğü artırmaya

yönelik hidroksipropil β -siklodekstrin ile geliştirilen inklüzyon kompleksi ve katı dispersiyonlarının geliştirildiği görülmektedir (Maeda, 2010; Liu ve ark., 2006). Liu ve ark. yapmış olduğu çalışmada, baicalein ile geliştirilen kendinden mikroemülsifiye ilaç sistemi (SMMEDS), serbest baicaleine kıyasla oral biyoyararlanımını ve lenfatik taşınmayı iyileştirdiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2019).

Baicalein'in nanolipozomal formülasyonu geliştirilen birkaç çalışmada, antitümör etkisi incelenmiş ve *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında sitotoksik etki oluşmuştur. Bunun yanı sıra, nanolipozomal formülasyonlar, serbest baicaleine kıyasla daha iyi antitümör etki ve ROS üzerine antioksidan etki oluşturmuştur. *In vivo* çalışmada, U-14 servikal tümör taşıyan fare modelinde formüle edilmemiş baicaleine kıyasla artan tümör inhibisyon oranı tespit edilmiştir (Liang ve ark., 2013; Li ve ark., 2016; Fang ve ark., 2018). Bu çalışmada, düşük oral biyoyararlanımı nedeniyle baicaleinin biyoyararlanımını iyileştirmek için nanolipozomlar film hidrasyon yöntemi ile geliştirilmiştir. *In vitro* karakterizasyon parametrelerine baktığımızda, PB, PDI, ZP ve EE% sırasıyla 194,6 \pm 2,08 nm, 0,170 \pm 0,025, -30,73 \pm 0,41 mV ve %44,3 \pm 2,98 olarak belirlenmiştir (Li ve ark., 2016). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında formülasyon geliştirmede kullanılan etkin ve yardımcı maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve aspozomal formülasyona yüklenecek etkin madde miktarı belirlenmiştir. Yaygın olarak tercih edilen MTT testi ile yapılan sitotoksikite testi sonunda kullanılan farklı derişimlerdeki baicalein ve aspozomal formülasyonunun % canlılık değerleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Optimum formülasyonda belirlenen enkapsülasyon etkinliğine göre aspozomlara yüklenen baicalein miktarı ortalama 20 μ g/mL için % canlılık değeri % 70'in üzerinde bulunmuştur. *In vitro* salım çalışmasında belirlenen aspozomal formülasyondan 24 saatin sonunda salınan baicalein miktarına bakıldığında % 75'in üzerinde canlılık elde edilmiştir. Bu elde edilen yüksek canlılık oranları, belirlenen etkin madde başlangıç konsantrasyonunun ve geliştirilen aspozomal formülasyonların güvenle kullanılabilceğini göstermiştir.

Radikal süpürücü etki, serbest radikallerin zararlı etkisi nedeniyle biyolojik sistemlerde önemli bir role sahiptir. Günümüzde bitkilerdeki fenolik bileşiklerin

antioksidan aktivitesini değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. DPPH• ve ABTS+• radikal süpürücü etki yöntemleri, bileşenlerin antioksidan kapasitelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik prosedürlerdir (Aksoy ve ark., 2016). Baicaleinin birçok çalışmada geniş çapta farklı deneylerle *in vitro* antioksidan etkisi incelenmiştir. Bizim çalışmamızla benzer metod kullanılarak yapılmış çalışmada, baicalaenin farklı antioksidan etki tayininde kullanılan yöntemler (Ferrik iyon (Fe^{3+}) indirgeme gücü, bakır iyon (Cu^{2+}) indirgeme gücü, DPPH• ve ABTS+• radikal süpürücü aktiviteleri) kullanarak üç farklı maddenin (baicalin, baicalein ve floridzin) *in vitro* antioksidan özelliklerini araştırılmış ve bütül hidroksianisol (BHA), bütül hidroksitoluen (BHT) ve α -tokoferol standart antioksidanlar olarak kullanılmıştır. Sonuçlara baktığımızda baicaleinin 75 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda DPPH• % inhibisyonu % 94 ve 60 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda ABTS+• % inhibisyonu %98,6 olarak hesaplanmıştır. Artan baicalein konsantrasyonuna bağlı olarak % inhibisyon değerinin de artış gösterdiği belirtilmiştir (Aksoy ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda Baicalein yüklü aspazomal formülasyondan salınan Baicalein konsantrasyonu 17 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiş olup, salım örneğinin antioksidan etkisi her iki radikal süpürücü etkide % 50'nin üzerine çıktığı görülmektedir (Tablo 4.3). Yine antioksidan etkinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, DPPH• ve ABTS+• radikallerini süpürücü etki incelenmiş ve baicaleinin doza bağlı olarak antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir. Baicaleinin IC_{50} değerleri sırasıyla $4,75\pm 0,14$ ve $1,38\pm 0,04$, $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Wang, 2011). Çalışmanın deneysel prosedürü incelendiğinde, kullanılan radikal ve örnek miktarlarının değişkenlik göstermesinden kaynaklı farklı sonuçlar alındığı görülmüştür.

Romatoid artrit, diyabet, solunum yolu hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, hepatit, otoimmün ensefalomyelit, böbrek hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserler gibi kronik inflamasyonla ilişkili hastalıkların tedavisinde baicaleinin anti-inflamatuvar etkinliği birçok çalışmada vurgulanmıştır. Farmakolojik çalışmalar, baicaleinin antiinflamatuvar etkideki moleküler mekanizmalarını, NF-kB aktivitesinin inhibisyonu ve ilgili sitokinlerin ve kemokinlerin, ROS'un ve hedef bölgelerden diğer enzimlerin aşağı regülasyonu yoluyla yaralı dokulardaki antioksidan durumu iyileştirerek ve oksidatif stresi

azaltarak kronik inflamasyonların şiddetini azalttığı şeklinde açıklamıştır (Dinda ve ark., 2017). Çalışmamızda, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin LPS ile indüklenmesi sonra aspozomal formülasyondan salınan baicalein'in oluşturduğu anti-inflamatuar etki tayininde, PGE-2, TNF- α ve NO düzeyleri belirlenmiştir (Şekil 4.9). İndometazinin pozitif kontrol olarak kullanıldığı deneylerimizde salım örneğinin (baicalein, 17 μ g/mL) LPS ile indüklenen hücrelerde bir miktar da olsa etkisini göstermiştir.



6. SONUÇ

Tez çalışmamızda, baicalein etkin maddesi ile literatürde ilk defa geliştirilen aspazomal formülasyon geliştirilerek *in vitro* karakterizasyonu, antioksidan ve antienflamatuar etkinliği değerlendirilmiştir. Antienflamatuar ve antioksidan etkileri bilinen baicaleinin uzun etkili farklı bileşenlere sahip aspazomal formülasyonları amaca uygun olarak geliştirilebilmiş, belirlenen optimum formülasyonun, antioksidan ve antienflamatuar etkisi uzun süreli gözlenebilmiştir.

Araştırmalara bakıldığında baicalein ile geliştirilen aspazomal formülasyon, bu çalışma ile literatürde ilk olacaktır. Geliştirilen aspazomal formülasyon ile elde edilen sonuçların hem literatüre önemli katkıda bulunacağı hem de ileri çalışmalar için temel oluşturacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Ahmed AU. An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 2011;6(4): 274-281.
- Bayr H. Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 2005;33(12): S498-S501.
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current pharmaceutical design*, 2004;10(14): 1611-1626.
- Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of clinical periodontology*, 1997;24(5): 287-296
- Chen Y. Research Progress of Ascorbyl Palmitate in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Highlights in Science, Engineering and Technology*, 2023;74:639-646.
- Dinda B, Dinda S, DasSharma S, Banik R, Chakraborty A, Dinda M. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, 2017;131: 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.004>
- Fan GW, Zhang Y, Jiang X, Zhu Y, Wang B, Su L, Cao W, Zhang H, Gao X. Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via estrogen receptor and NF- κ B-dependent pathways. *Inflammation*, 2013; 36(6):1584-1591.
- Fang CL, Wang Y, Tsai KHY, Chang HI. Liposome-encapsulated baicalein suppressed lipogenesis and extracellular matrix formation in Hs68 human dermal fibroblasts. *Front Pharmacol* 2018;9:155.

- Hamada H, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A. Free radical scavenging action of baicalein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1993;306(1): 261-266),
- Mu J, Liu T, Jiang L, Wu X, Cao Y, Li M Xu H. The traditional Chinese medicine baicalein potently inhibits gastric cancer cells. *Journal of Cancer*, 2016;7(4): 453-460.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2002;13(10): 572-584.
- Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta cardiologica*, 2004;59(5): 479-484.
- Junghanns JUAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomed*. 2008;3:295-309
- Kar M, Saquib M, Jain DK. Formulation development and evaluation of aspasomes containing skin whitening agent. *Manipal J Pharm Sci*, 2020; 6(1): 47-53.
- Karak P. Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 2019;10(4): 1567-1574.
- King AM. Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 1999;99(2): 213-218.
- Lee I. K, Kang KA, Zhang R, Kim BJ, Kang SS, Hyun JW. Mitochondria protection of baicalein against oxidative damage via induction of manganese superoxide dismutase. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2011;31(1): 233-241.
- Li K, Zhang H, Gao L, Zhai Y, Shi M, Li J, et al. Preparation and Characterization of Baicalein-Loaded Nanoliposomes for Antitumor Therapy. *J Nanomat*. 2016;2016:2861915.
- Li W, Pi J, Zhang Y, Ma X, Zhang B, Wang S, Liu Z. A strategy to improve the oral availability of baicalein: The baicalein-theophylline cocrystal. *Fitoterapia*, 2018;129: 85-93.

- Liang J, Wu W, Liu Q, Chen S. Long-circulating nanoliposomes (LCNs) sustained delivery of baicalein (BAI) with desired oral bioavailability in vivo. *Drug Deliv.* 2013;20:319-23.
- Liang W, Huang X, Chen W. The effects of baicalin and baicalein on cerebral ischemia: a review. *Aging Dis.* 2017; 8 (6): 850-867.
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free radical biology and medicine*, 60, 1-4.
- Liu J, Qiu L, Gao J, Jin Y. Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharmaceutics.* 2006;312:137-143
- Liu W, Tian R, Hu W, Jia Y, Jiang H, Zhang J, et al. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of baicalein. *Fitoterapia.* 2012;83:1532-1539.
- Maeda H. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem.* 2010;21:797-802.
- Mine A, İlhami G, Küfrevioğlu Öİ. In vitro antioxidant profiles of some flavonoids. *AIP Conference Proceeding.* 2016;3:1726, 020103
<https://doi.org/10.1063/1.4945929>
- Oh MC, Piao MJ, Fernando PM, Han X, Madduma Hewage SR, Park JE, Ko MS, Jung U, Kim IG, Hyun JW. Baicalein protects human skin cells against ultraviolet b-induced oxidative stress. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016; 24(6): 616-622.
- Patwardhan RS, Sharma D, Thoh M, Checker R, Sandur SK. Baicalein exhibits anti-inflammatory effects via inhibition of NF- κ B transactivation. *Biochemical Pharmacology*, 2016;108:75-89
- Pei, T, Yan M, Huang Y, Wei Y, Martin C, Zhao Q. Specific flavonoids and their biosynthetic pathway in *Scutellaria baicalensis*. *Frontiers in plant science*, 2022;13: 866282.

- Princeherb internet sitesi, 08.12.2024 tarihinde, Erişim adresi:
https://princeherb.com/products/scutellaria-baicalensis-chinese-skullcap-root?_pos=1&_sid=661a06338&_ss=r
- Raw 264.7, ATCC internet sitesi içerisinde. Erişim adresi
<https://www.atcc.org/products/tib-71>
- Redrejo-Rodriguez, M, Tejada-Cano, A, del Carmen Pinto, M, & Macías, P. (2004). Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 674(1-3), 121-124.
- Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 2001;8(7):797-807.
- Shinde G, Desai P, Shelke S, Patel R, Bangale G, Kulkarni D. “Mometasone furoate-loaded aspasomal gel for topical treatment of psoriasis: formulation, optimization, in vitro and in vivo performance.” *Journal of Dermatological Treatment*, 2022; 33(2): 885-896.
- Singh P, Ansari H, Dabre S. Niosomes-a novel tool for anti-ageing cosmeceuticals. *Journal of pharmaceutical research*, 2016;6(10): 6691-6703).
- Singh S, Sharma N, Zahoor I, Behl T, Antil A, Gupta S, Anwer MK, Mohan S, Bungau SG. Decrypting the Potential of Nanotechnology-Based Approaches as Cutting-Edge for Management of Hyperpigmentation Disorder. *Molecules*, 2023;28(1): 220-235.
- Špičlin P, Gašperlin M, Kmetec V. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *International journal of pharmaceutics*, 2001;222(2):271-279).
- Structure of Ascorbyl Palmitate Bilayers (Aspasomes) from Molecular Dynamics Simulation; Lamie vd, 2022
- Tian Y, Li X, Xie, H, Wang X, Xie Y, Chen C, Chen D. Protective mechanism of the antioxidant baicalein toward hydroxyl radical-treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecules*, 2018;23(1): 223-242.

- Varia RD, Patel JH, Modi FD, Vihol PD, Bhavsar SK. In vitro and in vivo anti-inflammatory, antibacterial and pharmacokinetic properties of baicalein. *Veterinarski arhiv*, 2023;93(1):117-128.
- Wang X, Li X, Li H. Reassessment of Antioxidant Activity of Baicalein in vitro. *Asian Journal of Pharmaceutical & Biological Research (AJPBR)*, 2011;1(2):32-41.
- Wartanowicz M, Panczenko-Kresowska B, Ziemiański Ś, Kowalska M, Okolska G. The effect of α -tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. *Annals of nutrition and metabolism*, 1984;28(3): 186-191
- Web of Science. "Aspasomes (All fields) or aspasome (all Fields)" <https://www.webofscience.com/wos/woscc/summary/51eb8d7b-0e7e-4d5e-8cdf-161cf9d08931-bfe83c25/relevance/1> Son erişim tarihi: 15.02.2024.
- Xing J, Chen X, Zhong D. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats. *Life sciences*, 2005;78(2): 140-146.
- Yadav P, Lariya N. Formulation and evaluation of nanocarrier drug delivery system for hyperpigmentation. *J Pharm Res*, 2018; 7(1): 13-18.
- Yücel Ç, Şeker Karatoprak G, Ilbasım-Tamer S, Değim İT. "Ferulic acid-loaded aspasomes: A new approach to enhance the skin permeation, anti-aging and antioxidant effects." *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023;86: 104748.
- Zhang J, Lv H, Jiang K, Gao Y. Enhanced bioavailability after oral and pulmonary administration of baicalein nanocrystal. *Int J Pharm*, 2011; 420(1): 180-188.
- Zhang X, Qin Y, Ruan W, Wan X, Lv C, He L, Lu L, Guo X. Targeting inflammation-associated AMPK/Mfn-2/MAPKs signaling pathways by baicalein exerts anti-atherosclerotic action. *Phytother Res*, 2021; 35(8): 4442-4455.
- Zhao Q, Chen XY, Martin C. (). *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Science bulletin*, 2016;61: 1391-1398.

Zhao T, Tang H, Xie L, Zheng Y, Ma Z, Sun Q, Li X. *Scutellaria baicalensis* Georgi.(Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2019;71(9): 1353-1369.

Zırh- Gürsoy A. *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*, Nobel Tıp Kitabevi Zırh Gürsoy, A. 2002. Sayfa 3. Kontrollü salım sistemleri. Editör: Zırh-Gürsoy, A. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 2014.



BAİCALEİN YÜKLÜ ASPAZOMAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLEREK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%**22**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**21**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**6**

YAYINLAR

%**8**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	%12
2	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%4
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
4	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
7	www.kkr.mlit.go.jp İnternet Kaynağı	<%1
8	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	Gündüz, Gizem. "Hiperglisemi Modeli Oluşturulmuş Zebra Balıklarında	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı soyadı : Fatih HOZAN

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

<u>DERECE</u>	<u>KURUMU</u>	<u>MEZUNİYET</u>
Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2021
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İlaç Ar-Ge ve Uygulama (Tezli)	2024

İŞ DENEYİMLERİ

<u>YIL</u>	<u>KURUM</u>	<u>GÖREV</u>
2021-2023	Labixir İlaç Ar-Ge Merkezi	Formülasyon Uzmanı
2023-2024	Sanovel İlaç	Formülasyon Uzmanı
2024-	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Birim Uzmanı

YABANCI DİL

İngilizce- İyi