



Deriye İlaç Uygulanması için Transetozomların Formülasyonu ve *In vitro* Karakterizasyonu

Formulation and *in vitro* Characterization of Transethosomes for Dermal Drug Delivery

Aslı Gürbüz¹ , Sevgi Güngör² , Meryem Sedef Erdal³ 

¹ Arş. Gör., ²Prof. Dr., ³Doç. Dr., İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: A.G. 0000-0002-1389-1581;
S.G. 0000-0002-8199-3010;
M.S.E. 0000-0001-6220-2036

Sorumlu yazar/Corresponding author:

Aslı Gürbüz,
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
34116 Beyazıt, İstanbul, Türkiye
E-posta: asli.gurbuz18@gmail.com

Başvuru/Submitted: 08.05.2019

Revizyon Talebi/Revision Requested: 10.05.2019

Son Revizyon/Last Revision Received: 16.05.2019

Kabul/Accepted: 20.05.2019

Atıf/Citation: Gurbuz A., Gungor S., Erdal M.S. (2019): Formulation and *in vitro* characterization of transethosomes for dermal drug delivery, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(2): 51-59. <https://doi.org/10.26650/JARHS2019-616323>

Öz

Deriye ilaç taşınmasını modifiye eden topikal taşıyıcılara olan ilgi son dönemlerde oldukça artmıştır. Etken maddelerin penetrasyonunda, derinin en dış tabakası olan *stratum corneum* önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Bu bariyeri aşmaya yönelik birçok formülasyon yaklaşımı denenmiştir. Bu yaklaşımlar arasında veziküler taşıyıcılar olan lipozom, etozom, transferzom ve son dönemlerde transetozomların kullanılması ile özellikle lipofilik etken maddelerin derideki lokalizasyonunun iyileştirilmesi hedeflenmektedir. Fosfolipit, yüzey etken madde ve yüksek oranda etanol içeren transetozomlar, transferzom ve etozomların avantajlarını kombine eden sistemlerdir. Bu çalışmada, model lipofilik etken madde olarak fluvastatin ile yüklenmiş transetozomlar geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Fluvastatinin domuz derisine *in vitro* penetrasyonu oklüzif olan ve oklüzif olmayan koşullar altında çalışılarak bantla soyma yöntemi ile kantitatif tayin gerçekleştirilmiştir. Transetozomların deri ile etkileşimi ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, oklüzif olmayan koşullarda uygulandığında derideki etken madde lokalizasyonunu iyileştiren bir transetozom formülasyonu hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Transetozom, veziküler ilaç taşıyıcı sistem, fluvastatin, deriye ilaç uygulanması

ABSTRACT

There has been increased interest during recent years in the use of topical vehicles that may modify drug penetration into the skin. However, the complex structure of the skin and especially its uppermost layer, the stratum corneum, function as a rate limiting barrier for topical drug delivery. Various strategies have been employed to achieve the delivery of drugs into the skin. Among these strategies, vesicular carriers such as liposomes, ethosomes, transfersomes, and, more recently, transethosomes have been suggested to serve as efficient promoters of drug localization within the skin. Transethosomes contain phospholipids, surfactants, and a high percentage of ethanol. They have shown to enhance the skin penetration of lipophilic drugs. In this study, transethosomes have been developed, characterized, and loaded with a model lipophilic drug, fluvastatin. The *in vitro* pig skin penetration of fluvastatin from transethosome dispersion under occlusive and non-occlusive conditions have been determined quantitatively by using the tape stripping method. An ATR-FTIR spectroscopy has been used to study the interaction of transethosomes with the skin lipids. As a result, a topical transethosomal carrier which optimizes drug localization within the skin when applied under non-occlusive conditions has been developed.

Keywords: Transethosome, vesicular drug carrier system, fluvastatin, drug delivery to skin

GİRİŞ

Topikal/transdermal ilaç uygulanması diğer uygulama yolları ile kıyaslandığında önemli avantajlar (karaciğerden ilk geçiş etkisinin önlenmesi, yan etkilerin azalması ve hasta uyuncunun artması) taşımakla birlikte, tedavide en büyük engellerden bir tanesi derinin en dış tabakası olan *stratum corneum*'un permeabiliteye karşı oluşturduğu bariyerdir.⁷ Seramitler, serbest yağ asitleri, kolesterol, kolesterol sülfat ve minör lipitlerin oluşturduğu hücrelerarası lipit matris, moleküllerin deriden geçişinde *stratum corneum*'un üstlendiği bariyer fonksiyonunda majör rol oynamaktadır. Özellikle derinin daha alt tabakalarını etkileyen deri enfeksiyonlarında konvansiyonel topikal formülasyonların taşıdığı en büyük dezavantaj, formülasyondan serbestleşen etken maddenin deriden penetrasyon kapasitesinin düşük olmasıdır.¹⁸ Ayrıca deriden penetrasyonda etken maddenin fizikokimyasal özellikleri de ön plana çıkmaktadır. Yüksek lipofiliteye sahip moleküller *stratum corneum*'da birikmeye meyilli olduklarından düşük permeasyon gösterirler.^{12,15}

Topikal/transdermal uygulanan ilaçlarının penetrasyonunun artırılması için *stratum corneum*'un bariyer özelliklerinin zayıflatılması amacı ile çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılabilir. Konvansiyonel tedavi ile karşılaşılan problemlerin aşılabilmesi için etken maddelerin deriye uygulamalarında yeni formülasyon yaklaşımları gelişen bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu

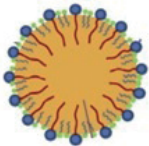
amaçla geliştirilen lipozom, niozom, etozom, transferzom gibi veziküler sistemler ile mikroemülsiyon, nanoemülsiyon ve nanopartiküler taşıyıcı sistemler (Şekil 1) etken maddenin uzatılmış ya da kontrollü serbestleşmesini sağladıklarından, uygulama bölgesindeki yan etkileri azaltmaları beklenmektedir. Doz sıklığının azalmasının yanı sıra topikal biyoyararlanımın artması da söz konusudur.

Bu yeni taşıyıcı sistemler arasında yer alan veziküler sistemlerin topikal ve transdermal uygulamalar açısından dikkat çekici olmalarının başlıca nedenleri olarak biyolojik bakımdan parçalanabilir olmaları, amfifilik karakterleri ve ilaç serbestleşmesini modifiye edebilmeleri sıralanabilmektedir. Veziküler sistemlerin etkinliği; bileşimleri, büyüklükleri, yükleri, çifte tabaka sayıları gibi fizyolojik özellikleri ile uygulama koşullarına çok yakından bağlıdır.⁷

Lipozomlar, fosfolipitlerin kullanılması ile hazırlanan, bir veya iç içe geçmiş birden fazla lipit çifte tabaka içeren, iç kompartımanda sulu faz bulunan, küresel veziküllerdir. Lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının en önemli nedenleri arasında farklı lipofiliteye sahip etken maddeleri taşıyabilmeleri ve yapı olarak biyolojik membranlara benzerlik göstermeleri başta gelmektedir. Ancak, konvansiyonel lipozomlar deriden permeasyonlarının zayıf olması, daha çok *stratum corneum*'un yüzeyinde ve üst kısımlarında birikmeleri, agregasyon ve veziküllerin füzyonu gibi nedenlerden

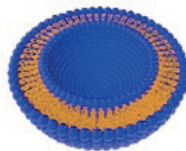
EMÜLSİYON SİSTEMLER

Mikroemülsiyonlar
Nanoemülsiyonlar



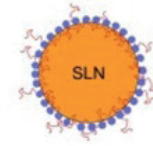
VEZİKÜLER SİSTEMLER

Lipozomlar
Etozomlar
Transferzomlar
Transetozomlar
Niozomlar



PARTİKÜLER SİSTEMLER

Katı lipit nanopartiküller
Nanoyapılı lipit taşıyıcılar



Şekil 1. Deriye uygulanan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler.

dolayı günümüzde topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok fazla tercih edilmemektedir.^{4,13} Lipozomların *stratum corneum*'un üst kısımlarında ve foliküllerde birikme eğilimi ve daha derin dokulara minimum düzeyde penetre olmaları gerek büyüklüklerine gerekse esneklikten yoksun olmalarına bağlanmıştır. Vezikül bileşimlerinin modifiye edilmesine dayanan yeni yaklaşımlarla etken maddeleri daha altta yer alan dokulara taşıyabilen sistemler olarak etozomlar ve transferzomlar (deforme olabilen lipit bazlı elastik veziküller) tasarlanmıştır. Konvansiyonel lipozomlarla kıyaslandıklarında, daha küçük boyutta olmaları ve elastik yapıları nedeniyle, gerek hidrofilik gerekse hidrofobik etken maddelerin *stratum corneum* bariyerini aşmasını sağlar, böylece etken maddelerin lokal ve sistemik taşınmalarını etkili kılar ve topikal tedavide hedef doku olan derideki ilaç lokalizasyonunu iyileştirebilirler.^{4,22,24} Etözomlar fosfolipitler, su ve etanolden oluşurken, transferzomlar genel anlamda fosfolipit matriks içinde yüzey etken maddeler (Tween 20, Tween 60, Tween 80, Span 60, Span 65, Span 80 dipotasyum glisirhizinat, sodyum kolat veya sodyum deoksikolat) kullanılarak hazırlanmaktadır.

Son yıllarda etken maddelerin *stratum corneum* tabakasını geçerek canlı epidermise ulaşabilmeleri ve böylelikle daha etkili bir tedavi sağlanabilmesi için hem yüzey etken madde hem de yüksek oranda etanol içeren yeni taşıyıcı sistemler olan transetozomlar hazırlanmıştır.²² Transetozomların topikal uygulamalarda vorikonazol, ketorolak trometamin, E vitamini ve kafein gibi etken maddelerin permeasyonunun arttırılmasında konvansiyonel lipozomlar, etozomlar ve transferzomlara olan üstünlüğü yapılan çalışmada gösterilmiştir.¹⁹ Olmesartan medoksomilin deriden permeasyonunu arttırmak için ince film hidrasyon tekniği ile transetozom formülasyonu hazırlanmış ve sıçan ve yılan derisinden *ex vivo* permeasyon incelenmiştir. Transetozomların etken maddenin her iki model membrandan geçişini transferzomlara göre arttırmıştır.¹ Bir başka çalışmada progesteron yüklü transetozomlar enjeksiyon-sonikasyon yöntemi ile hazırlanarak jelleştirilmiş ve bu transetozomal jelin vajina mukozasından permeas-

yonu çalışılmıştır. Serbest etken madde içeren kontrol jel formülasyonu ile karşılaştırıldığında transetozomal jelden progesteron permeasyonunun daha fazla ve kontrollü olarak gerçekleştiği bildirilmiştir.²¹

Deforme olabilen veziküller sistemlerin, deri yüzeyine uygulandıklarında, *stratum corneum*'un hücrelerarası lipit tabakaları arasından transepidermal su-aktivite değişimi sayesinde bozulmadan geçebildiğini savunan çalışmalar mevcuttur.^{5,10,24} Bu anlayışa göre elastik veziküller, *stratum corneum*'un %15 su içeriğine sahip üst kısmında dehidratasyonla deformasyona uğramakta, yapılarından su kaybederek boyutları küçülmekte ve interselüler boşluklardan geçebilir boyuta ulaşmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemin, *stratum corneum*'un %75 su içeriğine sahip alt kısımlarına ulaştığında rehidratasyonla tekrar eski boyutuna kavuştuğu var sayılmaktadır. Etkili bir penetrasyon sağlanması için ilaç taşıyıcı sistemin oklüzyon olmadan (uygulama bölgesinin üstü açık bırakılarak) deriye uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Oklüzif koşullar elastik veziküllerin deriden geçişini yavaşlatmaktadır. Oysa topikal uygulamanın ardından veziküllerin kısmen dehidrate olmalarının, canlı epidermisin hidrate ortamına daha fazla penetre olmalarını sağladığı öne sürülmektedir.⁵

Bu çalışmanın amacı, deriye topikal uygulamaya yönelik bir transetozom formülasyonu geliştirilerek fizikokimyasal özelliklerinin tayin edilmesi, hazırlanan sisteme lipofilik model bir etken madde (fluvastatin, log P: 3.83) yüklenmesi ve *in vitro* koşullar altında domuz derisine penetrasyonunun araştırılmasıdır. Model etken madde olarak seçilen fluvastatin, kolesterol düşürücü etkisi olan statin grubu bir etken maddedir. Klinik çalışmalarda, fluvastatinin lipit düşürücü etkisinin yanı sıra psoriasis hastalığında deri lezyonlarını iyileştirdiğine yönelik bulgular elde edilmiştir.¹⁶ Çalışmamızda, optimize edilmiş transetozom formülasyonundan fluvastatinin deriye penetrasyonu, oklüzyon uygulanarak ve oklüzyon uygulanmadan iki farklı koşulda çalışılmış ve derideki etken madde miktarındaki farklılık saptanmıştır. Transetozom formülasyonunun deri ile etkileşiminin incelenmesinde ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Phospholipon 90G (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Almanya). Tween 80 (Sigma Aldrich, ABD). Fluvastatin (Aurobindo Pharma, Hindistan). Kullanılan diğer kimyasallar ve reaktifler analitik saflıktadır.

Transetozomların Hazırlanması

Transetozomların hazırlanmasında literatürde kayıtlı olan konvansiyonel lipit film hidrasyonu (mekanik dispersiyon) yöntemi kullanılmıştır.^{8,9,22,23} Bu amaçla, fosfolipit (Phospholipon 90G, P90G) ve yüzey etken maddenin (Tween 80), organik çözücü karışımındaki [kloroform: metanol (2:1) (v/v)] çözeltisi hazırlanarak, organik çözücünün rotaevaporatörde (Büchi R210, Büchi Labortechnik, İsviçre), 40°C'de (lipit geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıkta), 80 rpm'de ince bir lipit film tabakası bırakacak şekilde uzaklaştırılması sağlanmıştır. Oluşan lipit film, organik çözücü artıklarının tamamen uzaklaşması için bir gece vakum altında bekletilmiştir. Daha sonra bu kuru lipit film, pH 3.5 sitrat tamponu:etanol (70:30) karışımı ile 2 saat süre ile oda sıcaklığında hidrate edilmiştir. Oluşan transetozom süspansiyonu yine oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek veziküllerin şişmeleri sağlanmıştır. Bir sonraki adımda, ultrasonik prob (20 kHz, Çap: 3 mm, Sonics VibraCell, Newtown, CT, ABD) kullanılarak 4°C'de sonikasyon uygulanmış ve bu şekilde transetozom süspansiyonu homojenize edilmiştir. Ultrasonikasyon süresi olarak 2-15 dakika aralığında farklı süreler denenmiştir. Etken madde yüklü transetozomlar hazırlanırken, etken madde fosfolipit ve yüzey etken madde ile birlikte organik çözücü karışımında çözülmüştür.

Transetozomların Karakterizasyonu

Vezikül Büyüklüğünün Ölçülmesi

Transetozomların büyüklüğü, dinamik ışık saçılımı yöntemi (Malvern Zetasizer, Malvern, İngiltere) kullanılarak analiz edilmiştir. Vezikül süspansiyonlarının optimum sinyal yoğunluğu elde edilene kadar seyreltilmesinin ardından 25°C sıcaklıkta en az üç ölçüm yapılarak ortalama sonuç \pm SD olarak

verilmiştir. Polidispersite indeksi vezikül büyüklüğü dağılımının homojenitesinin bir ölçütüdür ve 0.200'den küçük değerlerin homojen ve dispers bir dispersiyona işaret ettiği kabul edilmiştir.⁶

Zetapotansiyelin Ölçülmesi

Transetozomların zetapotansiyel değerlerinin tayininde elektrofonetik ışık dağılımı yöntemi (Malvern Zetasizer, Malvern, İngiltere) kullanılmıştır. En az üç ölçüm yapılarak ortalama sonuç \pm SD olarak verilmiştir.

pH Ölçümü

Transetozom dispersiyonlarının pH ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Oakton EuTech Instruments Bench 2700, ABD). En az üç ölçüm yapılarak ortalama sonuç \pm SD olarak verilmiştir.

Enkapsülasyon Veriminin Tayini

Transetozomlarda tutulan etken madde miktarı saptanırken, hazırlanmış olan dispersiyon 0.2 μ m (Minisart, Sartorius stedim, Almanya) filtreden geçirilerek %20 noniyonik Triton-X-100 sulu çözeltisi kullanılarak tahrip edilmiştir. Etken madde miktar tayininde HPLC yöntemi kullanılmış ve hesaplamada aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır:²²

$$\% \text{ Enkapsülasyon Verimi} = (F_t/F_i) \times 100$$

F_t = Veziküllerde yer alan toplam etken madde miktarı

$$F_i = \text{Başlangıçtaki etken madde miktarı}$$

In Vitro Penetrasyon Deneyleleri

Deri

Yerel bir kesimevinden alınmış olan domuz derisinin dorsal (sırt) bölgesine ait deri parçalarının subkütan yağ tabakası temizlenmiş ve bir cerrahi makas yardımı ile tüyler uzaklaştırılmıştır. Deri parçaları kullanılana kadar -35°C de en fazla üç ay süre ile saklanmıştır.

Transetozomlara Yüklenen Model Etken Maddenin Domuz Derisine Penetrasyonunun İncelenmesi

Dermatom edilmiş domuz derisinden daire biçiminde parçalar kesilerek *stratum corneum* tabakası yukarıda kalacak şekilde reseptör hacmi 12 mL ve difüzyon alanı 1.77 cm² olan Franz difüzyon hü-

relere (Permegear V6A Stirrer, Hellertown, ABD) yerleştirilmiştir. Deri parçaları 30 dakika %0.9 NaCl çözeltisinde bekletilerek hidrate edilmiştir. Reseptör faz olarak fizyolojik açıdan uygun bir ortam olan PBS pH 7.4 kullanılmıştır. Difüzyon hücrelerinin 37°C ye gelmesi sağlanarak reseptör faz, manyetik karıştırıcı ile devamlı olarak 250 rpm'de karıştırılmıştır. Donör kompartmanına etken madde yüklü transetozom dispersiyonu (2 mL) konulmuştur. Oklüzif koşul sağlanması için donör fazın bulunduğu kompartman çalışma süresince parafilm ile kapatılmış, oklüzif olmayan koşul içinse açık bırakılmıştır.

In vitro penetrasyon deneyinde 24 saatin sonunda deri parçaları Franz difüzyon hücrelerinden çıkarılarak deri yüzeyinde kalan transetozom süspansiyonu yavaş bir şekilde yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Etken maddenin kütan penetrasyonunun incelenmesi amacı ile bant ile soyma yöntemi kullanılmıştır.^{3,11,17} Bu amaçla deri parçaları, kâğıt havlu ile kurulandıktan sonra, *stratum corneum* tabakası üstte kalacak şekilde köpük levhalar üzerine iğnelerle sabitlenmiştir. Bantlar (Scotch Book Tape 845, 3M, ABD) 1.5x1.5 cm olarak kesilerek hazırlanmış ve deri yüzeyinde formülasyonla temas eden kısım toplam 20 kez bant ile soyulmuştur. İlk bant ayrı bir tüpe alınmış, kalan ilk 9 bant ve sonraki 10 bant iki ayrı grup olarak iki farklı tüpte bir araya getirilmiş ve üzerlerine 3 mL metanol ilave edilmiştir. 1 dakika vortekslenildikten sonra 8 saat süre ile oda sıcaklığında çalkalama uygulanmıştır (IKA Shaker, Staufen, Almanya). Çalkalamanın ardından örnekler 0.45 µm filtreden süzülerek doğrudan HPLC yöntemi ile analiz edilmişlerdir. Kalan deri küçük parçalar halinde kesilerek homojenizatörde (IKA T25, Staufen, Almanya) 8000 rpm de, 4°C de 1 dakika homojenize edilmiş ve metanol ile 8 saat ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 5 dakika 10000 rpm de uygulanan santrifüj işleminin ardından üstte kalan sıvı kısım 0.45 µm filtreden süzülerek buradaki etken madde miktarı HPLC yöntemi ile saptanmıştır.

HPLC Analizi

Model etken madde fluvastatinin HPLC analizinde kullanılan ve seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tayin sınırı ve ölçüm sınırı parametreleri

valide edilmiş olan yönteme ait bilgiler aşağıda verilmiştir. Kromotogramlarda etken madde pikleri ile deri ve bantlardan gelen pikler arasında herhangi bir girişim saptanmamıştır.

Fluvastatin HPLC Analiz Metodu

- Kolon: C18 (150 x 4.6 mm x 5µm)
- Mobil Faz: pH 7,2 Tampon: Asetonitril: Metanol (500: 240: 360)
- Maksimum UV absorpsiyonu: 305 nm
- Kolon sıcaklığı: 40 °C
- Akış hızı: 1,2 mL/dk
- Enjeksiyon hacmi: 50 µL
- Alıkonma zamanı: 10 dk

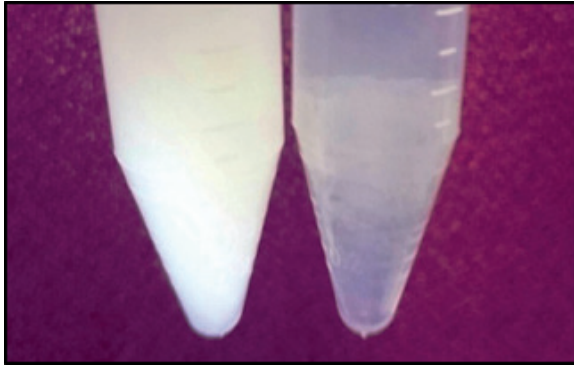
ATR-FTIR Spektroskopisi

ATR-FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilen analizlerde amaç, transetozomların *stratum corneum* tabakasının hücrelerarası lipit yapısında meydana getirdikleri farklılıkların saptanmasıdır. *In vitro* penetrasyon deneyinin sonunda Franz difüzyon hücrelerinden çıkarılan deri parçaları, formülasyon fazlası yüzeyden uzaklaştırıldıktan sonra vakum altında 12 saat kurutularak formülasyon ve reseptör fazdan kalabilecek artıkların tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Deri parçaları, Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR (Shelton, CT, ABD) spektrometrenin ATR kristal tablasına, *stratum corneum* yüzeyi kristal ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. 4000-650 cm⁻¹ aralığında kaydedilen her bir spektrum 40 taramanın birleşmesinden oluşmuş ve spektral rezolüsyon 4 cm⁻¹ olarak seçilmiştir. *Stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinin alkil zincirlerinin hareketliliği ve durumu, 2920 ve 2850 cm⁻¹ de asimetric ve simetric C-H gerilme bantlarından kaynaklanan absorpsiyonların konumları belirlenerek tayin edilmiştir. Pik konumlarının belirlenmesinde Perkin Elmer Spectrum Version 6.0.2 bilgisayar programı kullanılmıştır. Deri örneklerinin yüzeyinden uygulama öncesi alınan spektrum kayıtları kontrol spektrumu olarak kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Rotavaporatörde (Büchi R210, Büchi Labortechnik, İsviçre) oluşturulan ince lipit film tabakasının

hidratasyonunun ardından oluşan büyük çok tabakalı veziküler sistemler süt görünümünde transetozomal bir süspansiyondur. Bu transetozomal süspansiyon oda sıcaklığında 2 saat bekletilerek oluşan veziküllerin şişmeleri sağlanmıştır. Bir sonraki adımda, ultrasonik prob (20 kHz, Çap: 3 mm, Sonics VibraCell, Newtown, CT, ABD) kullanılarak transetozom süspansiyonunun homojenizasyonu sağlanmış ve böylelikle nanometre boyutundaki küçük çok tabakalı veziküler sistemler hazırlanmıştır. Fluvastatin yüklü transetozom dispersiyonunun (FVS-T80) ultrasonik proba homojenizasyon öncesi ve sonrası görünümü Şekil 2'de gösterilmektedir. Sonikasyon işleminde en uygun sürenin 5 dakika olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Hazırlanan transetozom dispersiyonunun ultrasonik proba yapılan homojenizasyonun öncesinde ve sonrasında görünüşü.

Ön formülasyon çalışmalarının sonunda optimize edilmiş ve etken madde yüklenmiş transetozom formülasyonunun bileşimi ve fizikokimyasal özelliklerine ait bilgiler Tablo 1'de gösterilmiştir. Etken

madde yüklü olmayan ve %4 lipit (Phospholipon 90 G), %0.5 yüzey etken madde (Tween 80) ve %30 etanol içeren boş transetozom fomülasyonu ile %0.05 fluvastatin yüklü transetozomların partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, pH ve zeta potansiyel değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

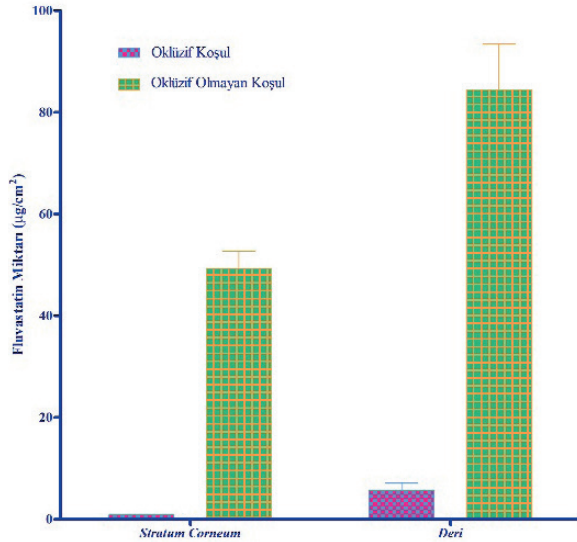
Lipit veziküllerin penetrasyon arttırıcı etkisinde taşıyıcı sistemin lipit çifte tabakalarının elastikiyeti önem taşımaktadır. Konvansiyonel lipozomlarla karşılaştırıldığında deforme olabilen veziküler sistemlerin elastikiyetinin yüksek olması bu sistemlerde etanol ve yüzey etken madde varlığına bağlanmıştır. Çalışmamızda, transetozom formülasyonunda yer alan Tween 80 ve etanolün yapıya esneklik kazandırdığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra gerek yüzey etken maddeler gerekse etanol, deriye uygulanan formülasyonlarda yer aldıklarında, *stratum corneum* lipitlerinin çifte tabakalı yapılarında düzensizlik yaratarak akışkanlığı arttırdıkları ve bu şekilde penetrasyon arttırıcı etki gösterdikleri bilinmektedir.^{1,22} Fluvastatinin transetozom formülasyonundan domuz derisine *in vitro* penetrasyonu Şekil 3'te gösterilmiştir. Oklüzif olan koşul ile oklüzif olmayan koşul altında etken maddenin deriye penetrasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Transetozom formülasyonu oklüzif koşullarda uygulandığında *stratum corneum* tabakasındaki etken madde miktarı $0.842\pm0.057 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, derinin kalan kısmındaki etken madde miktarı $5.625\pm1.569 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak saptanmıştır. *İn vitro* penetrasyon çalışması oklüzif olmayan koşullar altında yürütüldüğünde ise fluvastatinin *stratum cor-*

Tablo 1. Optimize edilmiş transetozom formülasyonunun (FVS-T80) bileşenleri ve fizikokimyasal özellikleri

Kod	FVS-T80	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyel	pH	%Enkapsülasyon verimi
Fosfolipit	Phospholipon 90 G (% 4)	92,38±0,60	0,06±0,02	0,36±0,07	3,56±0,01	% 89.56±3.04
Yüzey Etken Madde	Tween 80 (% 0,5)					
Etanol	% 30					
Etken Madde	Fluvastatin (% 0,05)					

Tablo 2. Transetozom formülasyonlarının uygulanmalarının 24 saat sonrasında deri lipitlerinin asimetric ve simetric gerilme absorbanlarına ait piklerin dalga numaraları

	Asimetric Gerilme Absorbansı (cm ⁻¹)	Simetric Gerilme Absorbansı (cm ⁻¹)
Kontrol Derisi	2919.50±0.01	2851.22±0.02
FVS-T80 (oklüzif koşul)	2921.03±0.02	2851.19±0.02
FVS-T80 (oklüzif olmayan koşul)	2925.06±0.01	2853.71±0.01

**Şekil 3.** *In vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda etken maddenin transetozomlardan deriye penetre olan miktarları (oklüzif olan ve oklüzif olmayan koşullar altında)

neum tabakasındaki miktarı $49.324 \pm 3.430 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, derinin kalan kısmındaki miktarı da $84.474 \pm 8.990 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulunmuştur. Etozomlar ve transfer-zomlar gibi deforme olabilen veziküler sistemlerin deriye penetrasyonlarında epidermisin doğal su gradientini takip ederek ilerledikleri ve etken maddelerin deriye penetrasyonunu iyileştirdikleri düşünülmektedir.^{1,20} Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar da bu bilgi ile uyumlu olarak, transetozomların penetrasyon artırıcı etkilerinin özellikle oklüzif olmayan koşullar altında deriye uygulandıklarında ortaya çıktığını göstermektedir.

ATR-FTIR spektroskopisi, *stratum corneum* tabakasının bariyer özelliklerinin araştırılması için kullanılan biyofiziksel bir yöntemdir. ATR-FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilen çalışmalarda formülasyon-deri etkileşimi hakkında en fazla bilgi sağlayan absorbanlar, *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerine ait C-H asimetric (2920 cm^{-1}) ve si-

metric (2850 cm^{-1}) gerilme absorbanlarıdır. Hücrelerarası lipitlerin alkil zincirlerinin düzeninde meydana gelen değişimler, C-H gerilme bantlarının dalga numaralarının daha yüksek değerlere kaymasına neden olur.¹⁴

In vitro penetrasyon çalışmasının sonrasında deri örneklerinden alınan ATR-FTIR spektrumlarında C-H asimetric ve simetric gerilme bantlarına ait piklerin dalga numaraları saptanmış ve uygulama yapılmamış deriden alınan spektrumdaki dalga numaraları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 2). Kontrol spektrumlarındaki değerler ile karşılaştırıldığında, oklüzif olmayan koşullar altında uygulanmış fluvastatin yüklü transetozomların, asimetric gerilme bantlarında yaklaşık 4 cm^{-1} ve simetric gerilme bantlarında yaklaşık 2 cm^{-1} kaymaya yol açtığı görülmüştür. Transetozomların yapısında yer alan yüzey etken madde ve etanolün, *stratum corneum* lipit bileşenleri ile etkileşime girerek, çifte tabakalı lipitlerin yapısal düzeninde geri dönüşümlü bir bozulmaya yol açtığı sonucuna varılmıştır.² Sıvı kristalize faza yakın olan akışkan düzenin, formülasyona yüklenen fluvastatinin derideki birikiminin fazla olmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Çalışmamızda, deriye topikal uygulamaya yönelik bir transetozom formülasyonu geliştirilerek fizikokimyasal özellikleri tayin edilmiştir. Optimize edilen transetozom formülasyonuna model etken madde olarak fluvastatin yüklenmiş ve *in vitro* koşullar altında domuz derisine penetrasyonu araştırılmıştır. *In vitro* penetrasyon çalışması oklüzif olmayan koşulda yürütüldüğünde transetozomlardan deriye etken madde penetrasyonunda anlamlı artış saptanmıştır. Bu bulgu, transetozomların etken maddelerin deriye penetrasyonunu arttırmalarının

da transepidermal su gradientini izleyerek derinin daha alt tabakalarına ulaştıkları bilgisi ile uyumlu bulunmuştur. ATR-FTIR spektroskopisi çalışması, transetozomların deri lipitleri ile etkileşerek derinin bariyer işlevini azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak, hazırlanan transetozom formülasyonunun deriye topikal yol ile ilaç uygulanması için uygun bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.G., M.S.E.; Veri Toplama- AG; Veri Analizi/Yorumlama- A.G., S.G., M.S.E.; Yazı Taslağı- A.G., M.S.E.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.G., M.S.E.; Son Onay ve Sorumluluk- A.G., S.G., M.S.E.; Malzeme ve Teknik Destek- A.G., S.G., M.S.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, TDK-2018-30432 numaralı Doktora Tez Projesi ile desteklenmektedir.

Peer Review: Externally peer-reviewed

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.G., M.S.E.; Data Acquisition- A.G.; Data Analysis/Interpretation- A.G., S.G., M.S.E.; Drafting Manuscript- A.G., M.S.E.; Critical Revision of Manuscript- S.G., M.S.E.; Final Approval and Accountability- A.G., S.G., M.S.E.; Technical or Material Support- A.G., S.G., M.S.E.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was funded by Istanbul University with the project number TDK-2018-30432

KAYNAKLAR

1. Albash R., Abdelbary A.A., Refai H., E-Nabarawi M.A. 2019. "Use of transethosomes for enhancing the transdermal delivey of olmesartan medoxomil: in vitro, ex vivo, and in vivo ealuation", International Journal of Nanomedicine, 14, 1953-1968.
2. Alberti I., Kalia Y.N., Naik A., Bonny J., Guy R.H. 2001. "Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, in vivo". International Journal of Pharmaceutics, 21, 11-19.
3. Cal K. Skin disposition of menthol after its application in the presence of drug substances. Biopharm Drug Dispos 2008; 29: 449-454.
4. Celia C., Cilurzo F., Trapasso E., Cosco D., Fresta M., Paolino D. 2012. "Ethosomes and transfersomes containing linoleic acid: physicochemical and technological features of topical drug delivery carriers for the potential treatment of melasma disorders", Biomed Microdevices, 14, 119-130.
5. Cevc G., Blume G. 2001. "New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes", Biochimica et Biophysica Acta, 1514, 191-205.
6. Chessa M., Caddeo C., Valenti D., Manconi M., Sinico C., Fadda A.M. 2011. "Effect of Penetration Enhancer Containing Vesicles on the Percutaneous Delivery of Quercetin through New Born Pig Skin", Pharmaceutics, 3, 497-509
7. Choi M.J., Maibach H.I. 2005. "Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems", Skin Pharmacology and Physiology, 18, 209-219.
8. Dubey V., Mishra D., Jain N.K. 2007. "Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 67, 398-405.
9. El Maghraby G.M.M., Williams A.C., Barry B.W. 2001. "Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in vitro", Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53, 1069-1077.
10. El Zaafarany G.M., Awad G.A.S., Holayel S.M., Mortada N.M. 2010. "Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesciles with enhanced skin delivery". International Journal of Pharmaceutics, 397, 164-17.
11. Erdal M.S., Peköz A.Y., Aksu B., Araman A. 2014. "Impacts of chemical enhancers on skin permeation and deposition of terbinafine", Pharmaceutical Development and Technology, 19, 565-570.
12. Funke A.P., Schiller R., Motzkus H.W., Gunther C., Muller R.H., Lipp R. 2002. "Transdermal delivery of highly lipophilic drugs: in vitro fluxes of antioestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations", Pharmaceutical Research, 19, 661-668.

13. Gangwar M., Singh R., Goel R.K., Nath G. 2012. "Recent advances in various emerging vesicular systems: an overview", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1176-1188.
14. Güngör S., Erdal M.S., Özdin D. 2011. "Derinin Yapısının Aydınlatılması ve Geçirgenliğinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Biyofiziksel Yöntemler", *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi*, 21, 25-39.
15. Güngör S., Erdal M.S., Aksu B. 2013. "New formulation strategies in topical antifungal therapy", *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 3, 56-65.
16. Kim T.G., Byamba D., Wu W.H., Lee M.G. 2011. "Statins inhibit chemotactic interaction between CCL20 and CCR6 in vitro: possible relevance to psoriasis treatment". *Experimental Dermatology*, 20, 855-857.
17. Klang V, Schwarz JC, Haberfeld S, Xiao P, Wirth M, Valenta C. 2012. "Skin integrity testing and monitoring of in vitro tape stripping by capacitance-based sensor imaging", *Skin Research and Technology*, 1, 1-14.
18. Kumar L., Verma S., Bhardwaj A., Vaidya S., Vaidya B. 2013. "Eradication of superficial fungal infections by conventional and novel approaches: a comprehensive review", *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1-15.
19. Koushlesh Kumar Mishra, Chanchal Deep Kaur, Shekhar Verma, Anil Kumar Sahu, Deepak Kumar Dash, Pankaj Kashyap and Saraswati Prasad Mishra. (2019). *Transethosomes and Nanoethosomes: Recent Approach on Transdermal Drug Delivery System, Nanomedicines*, Muhammad Akhyar Farrukh, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81152.
20. Pawar A.Y., Khanderao R. J., Laxmikant H. C. 2016. "Transfersome: A novel technique which improves transdermal permeability", *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10, 425-436.
21. Salem H.F., Kharshoum R.M., Abou-Taleb H.A., AbouTaleb H.A., AbouElhassan K.M. 2018. "Progesterone-loaded nanosized transethosomes for vaginal permeation enhancement: formulation, statistical optimization, and clinical evaluation in anovulatory polycystic ovary syndrome", *Journal of Liposome Research*, 13, 1-12.
22. Song C.K., Balakrishnan P, Shim C.K., Chung S.J., Chong S., Kim D.D. 2012. "A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 299-304.
23. Touitou E., Dayan N., Bergelson L., Godin B., Eliaz M. 2000. "Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties", *Journal of Controlled Release*, 65, 403-418.
24. Verma P., Pathak K. 2012. "Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation", *Nanomedicine*, 8, 489-496.