



## Farmasötik Geliştirme ve Teknoloji

ISSN: (Yazdır) (Çevrimiçi) Dergi ana sayfası : <https://www.tandfonline.com/loi/iphd20>

Oral birlikte kapsüllenmiş resveratrol hümkik asit koloidal polimerik nano taşıyıcıları n formülasyon tasarımı , optimizasyonu ve in vivo değerlendirmesi

Rahul Hasija, Sundeep Chaurasia ve Swati Gupta

Bu makaleden alıntı yapmak için: Rahul Hasija, Sundeep Chaurasia & Swati Gupta (2021): Oral birlikte kapsüllenmiş resveratrol-hümkik asit koloidal polimerik nano taşıyıcıları n formülasyon tasarımı , optimizasyonu ve in vivo değerlendirmesi, Farmasötik Geliştirme ve Teknoloji, DOI: [10.1080/10837450.2021.1966442](https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1966442)

Bu makaleye bağlantı için: <https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1966442>



Çevrimiçi yayımlandı : 19 Ağu 2021.



Makalenizi bu dergiye gönderin [↗](#)



Makale görüntüleme sayısı : 15



İlgili makaleleri görüntüleyin [↗](#)



Çapraz İşaret verilerini görüntüle [↗](#)

## ARAŞTIRMA MAKALE



## Oral birlikte kapsüllenmiş resveratrol-hüyük asit kolloidal polimerik nanotaşı yı cı ları n formülasyon tasarımı , optimizasyonu ve in vivo değerdendirilmesi

Rahul Hasijaa,b , Sundeep Chaurasiab,c ve Swati Gupta

<sup>a</sup>Eczacı lı k Bölümü, Amity Eczacı lı k Enstitüsü, Amity Üniversitesi Uttar Pradesh, Noida, Hindistan;

<sup>b</sup>Formülasyon Araştırması ve Geliştirme, İnsanlık Araştırma Merkezi, Gurgaon, Hindistan <sup>c</sup>İnovasyon ve İlaç Ar-Ge, Ashland Özel Malzemeler, Shamirpet, Hindistan;

## SOYUT

Çalı şma, suda çözünmeyen resveratrolün stabilitesini, oral biyoyararlanımı nı ve antiradikal aktivitesini iyileştirmek için resveratrol ve hüyük asitle birlikte kapsüllenmiş kolloidal polimerik nanotaşı yı cı ları n formülasyonunu ve optimizasyonunu amaçlamaktadır. Eudragit E100 polimerik malzeme, emülsifikasyon-difüzyon-buharlaştırma yöntemi kullanılarak resveratrol ve hüyük asit birlikte kapsüllenmiş oral kolloidal polimerik nanotaşı yı cı ları (Res-HA-co-CPN'ler) imal etmek için kullanıldı. Taguchi ortogonal dizi tasarımı , formülasyon faktörlerinin in vitro fizikokimyasal özellikler üzerindeki etkisini kontrol etmek için kullanıldı. Optimize edilmiş formülasyon ayrıca oral biyo mevcudiyet ve ayrıca antiradikal potansiyel açısı ndan değerdendirildi. Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, ortalama parçacı k boyutu, 120,56 ± 18,8 nm; polidispersite indeksi, 0.122; zeta potansiyeli, +38,25 mV; ve yakalama verimliliği, %82,37 ± 1,49. Katı hal karakterizasyonu, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin amorf karakteristiğini doğruladı. Res-HA-co-CPN'lerin in vitro salı m profili, 48 saate kadar sürekli salı m davranışı gösterdi ve CPN'lerin buzdolabı nda 6 ay boyunca stabil kaldığı bulundu. İn vivo farmakokinetik çalı şmalar, oral biyoyararlanı mda 62.76 katlı k önemli (p < 0.05) iyileşme olduğunu ortaya koydu. Radikal yakalama aktivitesinin zamanla arttığı ve 72 saat sonra saf Res'e benzer olduğu bulundu. IC50 değerdelerinin zamanla azaldığı bildirildi. Bundan böyle, geliştirilmiş Res-HA-co-CPN'lerin, resveratrolün stabilitesini, oral biyoyararlanımı nı ve antiradikal aktivitesini arttı rmak için yeterli bir dozaj formu olduğu kanıtlandı.

## ÖNE ÇIKANLAR

Resveratrol-hüyük asit birlikte kapsüllenmiş kolloidal polimerik nanotaşı yı cı lar (Res-HA-co-CPN'ler), emülsifikasyon-difüzyon-buharlaştırma yöntemiyle üretildi ve Taguchi ortogonal dizi tasarımı ile optimize edildi.

Res-HA-co-CPN'ler, küresel ve pürüzsüz bir yüzey ile elverişli ortalama parçacı k boyutu ve yüzde kapsülleme verimliliği ortaya koydu. Res-HA-co-CPN'ler, Res'in difüzyon kontrollü salı mı gösterdi ve buzdolabı nda 6 ay boyunca stabil olduğu bulundu.

Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, saf Res ve PM'ye göre önemli ölçüde (p < 0.05) daha yüksek oral biyoyararlanı mı gösterdi.

Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, zamana göre daha yüksek radikal temizleme aktivitesi gösterdi.

## MAKALE GEÇMİŞİ

30 Ocak 2021'de alını ndı  
6 Ağustos 2021'de revize edildi  
6 Ağustos 2021'de kabul edildi

## ANAHTAR KELİMELER

resveratrol; hüyük asit; kolloidal polimerik nanotaşı yı cı lar; oral biyoyararlanı m; radikal süpürme etkinliği

## 1. Giriş

Hüyük asit (HA), zengin bir shilajit kaynağı ve doğal organik maddelerin en hakim kı smı olarak hüyük maddeler kategorisine girer (Kong ve diğerdeleri , 1987; Acharya ve diğerdeleri , 1988).

Hüyük maddeler her yerde bulunur: toprakta, nehirde ve kanalizasyon suyunda ve makromoleküler negatif yüklü polielektrolitlerde. Yoğun çalı şmalar, hüyük maddeleri, temel olarak yaklaşık k %60-80 oranı nda humustan ve benzoik asit, hippurik asit, yağ asidi, ellagik asit, reçine, triter kalemler, steroller, aromatik karboksilik asit, amino gibi diğerdeleri bileşenlerden oluşan kurucu bileşenler olarak vurgulandı. asitler, 3-4 benzo kumarinler ve fenolik lipitler (Agarwal ve ark. 2007; 2010). HA'nı n ortalama moleküler ağı rlı ğı nı n 6500 Da olduğu bildirilmektedir (Ghosal 2003). HA, suda az çözünen aktif moleküller için güçlü bir biyo-güçlendirici olarak hizmet eder. HA koyu kahverengiden oluşur

siyahı mısı renktedir ve asidik koşullar altı nda (pH < 2) çözünmez, ancak daha yüksek pH'ta serbestçe çözünür.

Resveratrol (Res), doğal olarak oluşan, flavanoid olmayan bir poli fenolik fitoaleksindir ve üzüm, yemiş, yer fı stığı gibi çok sayı da bitki türü ve çok çeşitli yiyecek kaynakları tarafı ndan zararlı veya mantar saldırı sı na karşı tepki olarak sentezlenir (Fremont 2000).

Son zamanlarda Res'in antioksidan aktivite (Kristl ve ark. 2009), kardiyovasküler (Vella ve ark. 2008), trombosit agregasyonu (Pace-Asciac ve ark. 1995), inflamatuvar hastalı klar ( Kang ve ark. 2009) ve güçlü kanser önleme (Jiang ve ark. 2017). Bununla birlikte Res'in , zayı f suda çözünürlüğü (3 mg/100 ml) nedeniyle (Lu et al. 2009 ; Shah et al. 2009; Shah et al. 2009; Shah et al. al. 2014), hızlı metabolizma ve zayı f oral

biyoyararlanımı (yaklaşık %1) (Baur ve Sinclair 2006). Oral uygulamadan sonra Res'in plazma yarı ömrünün 15 dakika olduğu rapor edilmiştir (Emilia Juan ve diğerleri 2002; Walle ve diğerleri 2004), bu da ilaç endüstrisindeki kullanımı nispeten sınırlıdır.

Sonuç olarak, Res'in yukarıda belirtilen sınırlamaları nedeniyle üstesinden gelmek için, terapötik uygulamasını geliştirmek için biosiklodekstrin dahil etme kompleksleri, lipozomlar, mikro- ve nanoemülsiyonlar tekniği, katı lipid nano-taşıyıcılar ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanoparçacıklar gibi çeşitli stratejiler dikkate alınmıştır. (Amri ve diğerleri 2012; Gupta ve Gupta 2017). Bu stratejilerin, Res'in sulu çözünürlüğünü ve biyoyararlanım yeteneğini bir dereceye kadar iyileştirdiği bulunmuştur. Bununla birlikte, çömelme kapsülleme verimliliği, yüksek sızdırmazlık oranı, minimum stabilite çalışmaları ve güvenlik endişesi, açığı optimize etmek için en önemli zorluklardır (Intagliata ve ark. 2019). Bu nedenle, bu çalışmada, suda çözünmeyen aktif moleküller (Res ve HA) ile birlikte kapsüllenmiş yenilikçi polimerik nanotaşıyıcılar geliştirildi, bu da Res'in çözünürlüğünün ve oral biyoyararlanımını artırmasına neden oldu. Kolloidal polimerik nanotaşıyıcılar (CPN'ler), oral biyoyararlanımı, stabilizeyi, tolere edilebilirliği ve içinde kapsüllenmiş suda çözünürlüğü az olan ilaçların etkinliğini arttırmadaki önemli başarılarından dolayı yeni ilaç taşıyıcıları arasında önemli bir ilgi uyandırdı (Anderson ve diğerleri, 1989; Barzegar-Jalali ve diğerleri 2012; Gupta ve diğerleri.

2012). CPN'lerin küçük boyutları, büyük bir yüzey alanı/hacim oranı sağlar ve ilacın gastrointestinal ortamdan korunmasını, biyoaktivitenin iyileştirilmesi ve oral biyoyararlanım gibi hedef dokuda etkiyi daha da sürdüren oral biyoyararlanım gibi sayısız avantaj sunar. Ödeyen yamaları M-hücreleri yoluyla lenfatik alımı artırır ve ilk geçiş metabolizması (Sharma ve ark. 2015; Tari k ve ark. 2015).

CPN'lerin geliştirilmesinde, polimerler, Res'in yanısıra HA'nı da içerir ve birlikte kapsüllemesi için bir CPN olarak hareket etmek için kullanılır. Eudragit E100 (EE100), oral ilaç dağıtım için CPN'leri formüle etmek için tekrar tekrar kullanılmaktadır. EE100, sırasıyla 1:2:1 oranında metil metakrilat, N, N-dimetilaminoetil metakrilat ve bütül metakrilat monomerlerinin pozitif yüklü, biyolojik olarak parçalanamayan bir kopolimeridir (Chaurasia ve diğerleri 2016). Kontrollü salınımlı ve mukoadesif davranışı nedeniyle, Res'in biyoyararlanımını ve radikal yakalama potansiyelini iyileştirmek için hem Res hem de HA'yı birlikte kapsülleyen geç oral CPN'leri formüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, anladığı kadarıyla, CPN'ler içinde birlikte kapsüllenmiş Res'in biyoyararlanımını ve radikal süpürme aktivitesini arttırmak için bir biyo-güçlendirici olarak HA'yı içeren hiçbir bilimsel literatür yoktur.

Bu perspektifte, mevcut araştırma, oral biyoyararlanımın yanısıra antiradikal aktivitenin arttırılması için Taguchi ortogonal dizi (TOA) tasarımı kullanılarak Res-HA ko-kapsüllü CPN'lerin (Res-HA-co-CPN'ler) geliştirilmesi ve değerlendirilmesine odaklanmıştır. Res. TOA, Res-HA-co CPN'leri optimize etmek için bağımsız değişkenlerin bağımlı faktörler üzerindeki etkisini incelemek için kullanıldı. Ayrıca optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler morfoloji, fiziksel durum, in vitro salınımlı, stabilize çalışması, in vivo farmakokinetik çalışması ve ayrıca antiradikal aktivite açısından değerlendirildi.

## 2. Malzemeler ve yöntemler

### 2.1. Malzemeler

Resveratrol, Cayman Chemical Company, ABD tarafından sağlandı. Hüyük asit, ABD'de Alfaaaser'den satın alınmıştır. EE100 ve Poloxamer 188 (PLX188), sırasıyla Evonik Degussa, Mumbai ve Mankind Pharma Ltd., Okhla, Hindistan'dan hediye numunesi olarak alınmıştır. Tüm çalışmalarında Nanofree™ derceli su (Barnstead, Dubuque, IA) kullanıldı. ABTS+ ve potasyum persülfat

Sigma-Aldrich, ABD'den satın alınmıştır. Kullanılan diğer tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktaydı.

### 2.2. Fiziksel karışımın hazırlanması

Homojen bir PM elde etmek için Res, HA, EE100 ve PLX188'i 10 dakika boyunca elle karıştırarak eşit molar kütle oranında fiziksel karışımı (PM) hazırlamak için harç ve tokmak yöntemi kullanıldı. Hazırlanan homojen PM, 40# elekten geçirildi ve bir sonraki işleme kadar bir desikatörde saklandı.

### 2.3. Res-HA-co-CPN'lerin hazırlanma yöntemi

Res-HA-co-CPN'leri hazırlamak için çift emülsifikasyon-difüzyon-buharlaştırma yöntemi benimsenmiştir (Gupta ve Kumar 2012; Chaurasia ve diğ. 2014; 2016; Kumar ve diğ. 2017). Kırsaca, eşit oranda Res:HA ve belirli miktarda EE100, 4 ml etil asetat içinde çözüldü. Dahili organik faz solventi (etil asetat), PLX 188 solüsyonu içeren harici sulu faza enjeksiyon yoluyla yavaşça ilave edildi ve karışım daha sonra bir dijital üst karıştırıcı (Dhian Scientific, M30, Güney Kore) kullanılarak 8000-10 000 rpm'de karıştırıldı. 10 dakika Ek olarak karışım, y/s emülsiyonu oluşturmak üzere etil asetatı tamamen buharlaştırmak için manyetik karıştırıcı kullanılarak oda sıcaklığında 24 saate kadar sürekli olarak karıştırıldı. Res-HA-co-CPN'ler, 0.45 mm'lik bir filtreden süzüldü ve süpernatanı ayırmak için 60 dakika boyunca 12 000 g'de santrifüjlendi (Soğutmalı santrifüj RC 4100 F, Eltek, Mumbai, Hindistan). Res-HA-co-CPN'ler daha sonra Nanopure™ su kullanılarak üç kez yıkandı. Son olarak, taze hazırlanmış Res-HA-co-CPN'ler, bir derin dondurucu (86 C ULT dikey dondurucu, Thermo Scientific, Almanya) kullanılarak 50°C'de 12 saat boyunca derin dondurulmuş ve daha sonra liyofilize edilmiştir (LABCONCO, ABD) 45 C sıcaklık ve 36 saate kadar 0,08 mbar basınç. Ayrıca liyofilize edilmiş Res HA-co-CPN'ler sonraki işlemlere kadar amber renkli cam şişede saklandı.

### 2.4. L9 Taguchi ortogonal dizi tasarımı

Ön denemelere dayanarak, Taguchi ortogonal dizi tasarımı (L9; 34) kullanılarak bağımsız ve bağımlı faktörler seçildi ve Tablo 1'de gösterildi. Geliştirilen tasarımlar düzenlendi ve anahtar bağımsız faktörlerin etkileri araştırılarak formüllerin istatistiksel optimizasyonu için yanıtları tahmin edildi. En az sayıda deneysel ile birlikte arzu edilen tepkiler üzerindeki faktörler (Jahanshahi ve ark. 2008). En olumlu yanıtlara sahip tüm anahtar bağımsız faktörler, varyans analizi (ANOVA) tabloları kullanılarak en az değişkenliğe sahip deneysel ayarların tahmin edilmesiyle belirlendi. Bağımlı faktörlerin tepkisi, bireysel deneysel ortamın sinyal gürültü (S/N) oranları şeklinde tahmin edildi ve ardından, her bir seviyeye (ana etkiler) karşı çizilerek bireysel faktör S/N oranlarını önemi belirlemek için uygulanan ANOVA uygulandı. Yanıtlar üzerindeki bireysel anahtar bağımsız faktörün etkisini ortaya koyan çizim). Ayrıca, optimize edilmiş bir formülasyon bileşimi oluşturmak için kullanılması gereken her bir bağımsız faktörün optimum seviyesini ortaya çıkardı. Ayrıca, tasarımı sağlamlığı, uygunluğu ve güvenilirliğinin, Res-HA-co-CPN'leri optimize edilmiş bağımsız faktörler seviyesinde ve bunların bağımlı yanıtlarında hazırladığı ve değerlendirdiği tahmin edilmiştir.

### 2.5. CPN'lerin in vitro karakterizasyonu

Geliştirilmiş Res-HA-co-CPN'lerin ortalama partikül boyutu (MPS) ve polidispersite indeksi (PDI), lazer ışığı kullanılarak incelenmiştir.

Tablo 1. Taguchi ortogonal dizi tasarımı ve bunlara karşı gelen yanıtlar (Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD; n = 3 olarak rapor edilmiştir).

Formülasyon kodları	Bağımsız değişkenler Yanıtlar $\pm$ SS (n = 3)					S / N Oranı		
	A	B	CD	Y1	Y2	Y1	Y2	
RH-E1	0,5	8000	10	0,25	260,56 $\pm$ 17,8	60,65 $\pm$ 1,43	1,74368	2,60063
RH-E2	0,5	10 000	12	0,30	190,56 $\pm$ 20,8	41,56 $\pm$ 1,09	1,22016	2,55458
RH-E3	0,5	12 000	14	0,35	145,24 $\pm$ 12,2	20,81 $\pm$ 1,67	1,64227	1,61321
RH-E4	1,0	8000	12	0,35	244,56 $\pm$ 21,8	40,97 $\pm$ 1,89	1,12405	2,20835
RH-E5	1,0	10 000	14	0,25	188,58 $\pm$ 18,2	45,66 $\pm$ 0,92	1,32850	2,66023
RH-E6	1,0	12 000	10	0,30	150,67 $\pm$ 14,7	70,98 $\pm$ 1,16	1,31003	2,72637
RH-E7	1,5	8000	14	0,30	210,34 $\pm$ 22,4	49,88 $\pm$ 1,53	1,15326	2,47728
RH-E8	1,5	10 000	10	0,35	120,56 $\pm$ 18,8	82,37 $\pm$ 1,49	0,28182	0,69705
RH-E9	1,5	12 000	12	0,25	101,45 $\pm$ 27,8	45,22 $\pm$ 1,52	0,24293	2,42615

A: PLX188 konsantrasyonu (%w/v); B: homojenleştirme hızı (rpm); C: Polimer miktarı (mg); D: Organik: Sulu faz oranı (v/v); Y1: MPS; Y2: E.E.

bir Delsa Nano C analiz cihazı (Beckman Coulter, BK) ile foton korelasyon spektroskopisi dahil olmak üzere önceden belirlenmiş 165'lik bir açı da standart He-Ne lazer tarafı ndan üretilir. Res-HA-co-CPN'lerin zeta potansiyeli (ZP), aynı cihaz tarafı ndan üretilen elektroforetik işi k saçı lı mı kullanı larak belirlendi. CPN'ler, deneyden önce NanopureTM su içinde süspanse edildi (Chaubey ve ark.

2014). Üç kopyanı n ortalama değerleri hesaplandı .

İlaç içeriği doğrudan CPN'lerde kapsüllenmiş Res miktarı ölçülerek belirlendi. Kı saca, 10 mg dondurularak kurutulmuş CPN tozu, CPN'lerin parçalanması için 1 ml metanol içinde eritildi, ardı ndan mobil faz (metanol: fosfat tamponu, pH 6.8) ile seyreltildi. 14 000 rpm'de 30 dakika santrifüjlemeden sonra çözelti, 0.45 mm'lik bir şı rı nga filtresinden süzüldü. Numunelerin res içeriği, hat içi gaz giderici, 515 HPLC ikili pompa (Waters, ABD), Rheodyne 7725i manuel enjektör, C18 ters fazlı (250 4,6 mm, 5 mm) ODS2 kolonundan oluşan ve bir koruma kolonu ile korunan HPLC ile belirlenmiştir. (12 4.6 mm, 5 mm) aynı malzemeden ve fotodiyot dizisi dedektörü. Mobil faz, 63:37 (v/v) metanol: fosfat tamponu karı şı mı ndan oluşuyordu, pH 6.8 (%0.5 v/v ortofosforik asit çözeltisi ile pH ayarlanmı ş). Detektör dalga boyu, akı ş hı zı ve kolon sı caklı ğı sı rası yla 306 nm, 1.0 ml/dk ve 25°C'ye ayarlanmı ştı r. HPLC çalı ş ma süresinin 6.4 dakika olduğu bulundu. HPLC yöntemi, doğrusallı k, tekrarlanabilirlik, kantitasyon limiti ve tespit limiti açı sı ndan doğrulanmı ştı r.

CPN'lerde Res'in kapsülleme verimliliği (EE), aşağı da belirtildiği gibi üç kez hesaplandı :

$$\%EE = \frac{\text{CPN'lerin hazı rlanması nda Yeniden Kapsüllenen toplam Yeniden Kullanı lan miktarı}}{100}$$

## 2.6. CPN'lerin morfolojik analizi

Res-HA-co-CPN'lerin yüzey morfolojisi, atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ve ayrı ca transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile araştır ıldı . Yaklaş ık olarak 10 ml Res-HA-co-CPN, taze yar ı lı mı ş mika levha üzerine döküldü, ardı ndan ince bir film oluşturmak üzere havayla kurutuldu. Sonuç olarak, sı rası yla AFM taray ıcı nı n (NT-MDT, Moskova, Rusya) ve Solver Next yazı lı mı nı n (Chaurasia ve ark. 2016) tarama hı zı 0,5 Hz olan temass ız mod kullanı larak ortam koşulları nda görüntüler al ınmı ştı r.

Öte yandan, Res-HA-co-CPN'lerin dağı lı mı , %2 fosfo tungstik asit ile boyanmı ş, oda sı caklı ğı nda kurutulmuş ve daha sonra TEM (Technai-20G2, Philips) altı nda görüntülenmiş, karbon kaplı bir bakı r ağ ı üzerinde bir kenara bı rakı lmı ştı r. , Hollanda) 200 kV hı zlanma gerilimi ile. Ayrı ca, CPN'lerin elektron kı rı nı mı (ED), doğrulayan amorf kı rı nı m halo modelini ortaya ç ıkardı .

CPN'lerin polimer matrisi içinde Res'in homojen dağı lı mı ve y ı ldı z şeklindeki serbest Res parçacı kları nı n olmaması (Sharma ve diğerleri 2011; Gupta ve diğerleri. 2012).

## 2.7. Res HA-co-CPN'ler içinde Res-HA'nı n ilaç dağı lı mı nı n gözlemlenmesi

CPN'ler içindeki HA ile çevrili Res'in dağı lı mı , konfokal lazer tarama mikroskopu (CLSM 510 Meta, Carl Zeiss, ABD) ile gözlemlendi. Res, hafif sarı bir tonla beyaz bir toz olarak gözlemlendi, bu nedenle net görüş için sarı bir flüoresan görevi görebilir.

Res-HA-co-CPN'lerin dağı lı mı , cam slayt üzerine yerleştirildi, oda sı caklı ğı nda havayla kurutuldu ve daha sonra 488 nm'de sarı flüoresans uyarma dalga boyunda gözlemlendi.

## 2.8. Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin katı hal karakterizasyonu

Uyumluluk çalı ş ması , gelişim aşamaları nda dikkate al ınması gereken önemli bir parametredir. Pure Res, HA, PM ve Res-HA-co CPN'ler, diferansiyel tarama kalorimetrisi (TGA/ DSC-1, y ı ldı z sistemi, Mettler Toledo, İsviçre) ve toz X-ış ını kı rı nı mı (X-ış ını difraktometresi, Rigaku, Japonya) ile analiz edildi. çalı ş mak. Her numune, standart bir alüminyum kap üzerinde tutuldu ve 30°C ile -275°C arası nda, 50 ml/dak'lı k bir oranda sabit bir nitrojen tasfiyesi ile 10°C/dak'lı k sabit bir hı zda sı tı ldı . Her numunenin moleküler düzenini 40 kV'da değerlendirmek için bir Cu anotlu p-XRD uygulandı . Taramanı n adı m boyutu 0,02 ve adı m süresi 5 s ile 10 ila 50 (2 saat) aralı ğı nda olduğu bulundu.

## 2.9. In vitro salı m çalı ş maları

MWCO 12 kDa-14 kDa (Himedia Labs, Mumbai, Hindistan) (Yadav ve Gupta 2015) diyaliz membranlı diyaliz torbası difüzyon tekniği, ağı rlı kça %0,1 içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 7,4) kullanan CPN'lerden ilaç salı nı mı nı değerlendirmek için kullanı ldı . Seyreltme ortamı olarak / v tween 80. Diyaliz membranı %5 gliserin solüsyonu ile 24 saat doyuruldu, ardı ndan kullanı mdan önce NanopureTM su ile y ıkandı . 2 mg Res'e eşdeğer formüle edilmiş CPN süspansiyonu, bir membran torbaya dolduruldu ve daha sonra pamuk ipliklerle kapatı ldı . Sı zdı rmaz torba, 100 rpm'de manyetik karı ştı rma altı nda ve termostatik kontrollü koşullarda (37°C  $\pm$  0.5°C) 250 ml'lik bir beher içinde 50 ml fosfat tamponuna karşı diyalize edildi.

Numuneler (1 ml) önceden belirlenmiş zaman aralı kları nda (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 ve 48 saat) çekildi ve eşit miktarda taze fosfat tamponu ilavesiyle değiştirildi. lavabo durumunu korumak için. Aynı çalı ş ma, %0.25 a/h sodyum karboksimetil selüloz içinde dağı tı lmı ş saf Res için de yapı ldı . İlaç, 306 nm'de HPLC kullanı larak ölçüldü. Salı m çalı ş ması ndan elde edilen veriler, salı m kinetiğinin tipini değerlendirmek için çizildi

sı fı r derece, birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modeli gibi ilaç salı m mekanizması gibi (Chaurasia ve ark. 2014).

## 2.10. Depolama kararlı lı ğı çalı şması

ICH yönergelerine göre, optimize edilmiş formülasyonun depolama stabilitesi, buzdolabı nda (4 C±1 C), oda sı caklı ğı nda (25 C±2 C/%60±%5 BN) ve hı zlandı rı lmı ş durumda (40 C) 6 ay boyunca değerlendirildi. ±2 C/75%±5%RH). Liyofilize CPN'ler cam şişelerde saklandı ve farklı çevre koşulları nda muhafaza edilen bir stabilite odası na yerleştirildi. Numuneler önceden belirlenmiş bir frekansta (0, 1, 2, 3 ve 6 M) alı ndı ve fizikokimyasal özellikler, yani MPS, PDI ve EE açı sı ndan değerlendirildi.

## 2.11. İn vivo farmakokinetik çalı şma

### 2.11.1. Hayvanlar ve dozlama

İN vivo farmakokinetik çalı şma protokolü, Merkezi Hayvan Etik Komitesi (CPCSEA) tarafı ndan onaylanmı ştı r. Sağlı klı Charles Foster sı çanları (her iki cinsiyette, 150–200 g), deneylerden 1 hafta önce 25 C±2 C'de ve %40–70 bağı l nemde 12 saat aydı nlı k/karanlı k döngüsüne sahip polipropilen kafeslere yerleştirildi. Hayvanlar sı çan yemi ve istenildiği kadar su ile beslendi (Singh ve ark. 2012; Patel ve ark. 2015). Sı çanlar, her grupta altı sı çan olacak şekilde üç gruba ayrı ldı . Grup I, Grup II ve Grup III , oral yoldan sı rası yla Pure Res, PM (%0.3 sodyum karboksimetil selüloz içinde dağı lmı ş) ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler (25 mg/kg 1 Res'e eşdeğer) ile uygulandı . Sı çanlara anestezi uygulandı ve önceden belirlenmiş zaman aralı kları nda (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12 ve 24 saat) heparinize edilmiş Eppendorf tüplerinde retro-orbital pleksus yoluyla kan örnekleri (200 mL) toplandı .

Numuneler, son olarak bir sonraki analize kadar 20°C'de saklanan plazmayı ayrı rmak için 5.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi.

### 2.11.2. Ekstraksiyon prosedürü

İlacı n plazmadan ekstraksiyonu, sı vı sı vı ekstraksiyon yöntemiyle yapı ldı (Wan ve ark. 2011). Plazma ve dahili standart (Kafein, 0.436 mg/ml) ile ilaç çözüldü. İlaç karı şı mı (100 ml), plazma proteinlerini çöktürmek için 900 ml mobil faz ile birlikte Eppendorf tüpüne aktarı ldı . Karı şı m 5 dakika daha vortekslendi, ardı ndan 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi; süpernatant bir cam tüpe aktarı ldı ve 40°C'de vakumlu bir fı rı nda buharlaştı rı ldı . Kalan tortu, 100 ml mobil fazda sulandı rı ldı ve bu numunenin 20 ml'si, 0.2 mm'lik bir şı rı nga filtresinden (PES sı nı fı , Millipore, Bedford) süzüldü. , ABD) ardı ndan ilaç içeriğinin HPLC tahmini (Buchanan ve ark. 2007).

## 2.12. In vitro antiradikal aktivite

Saf Res, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co CPN'lerin antiradikal aktivitesi katyon radikali ABTS+ ile değerlendirildi. ABTS+ (7 mM) ve potasyum persülfat (2.45 mM) karı ştı rı ldı ve oda sı caklı ğı nda tutuldu. ABTS+ solüsyonu, 50 mM fosfat tamponu, pH 7.4 ile seyreltildi ve standart absorbanı 0.70'te tutmak için 734 nm'de ölçüldü (Re et al. 1999; Kurin et al. 2012). Pure Res, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, 1 ila 25 mM arası nda değişen farklı konsantrasyonlarda kullanı ldı . Numuneler 37°C'de sürekli çalkalanarak inkübe edildi ve 0, 24, 48 ve 72 saatlik farklı sürelerde ı şı ktan korunarak karanlı k ortamda tutuldu.

Numuneler ayrı ca 30 dakika ABTS+ ile inkübe edildi ve

absorbans 734 nm olarak tahmin edilmiştir. Bu tahlil için bir kontrol olarak tampon çözeltisi kullanı ldı . İnhibisyon yüzdesini hesaplamak için aşağı daki denklem kullanı lmı ştı r: burada Ac, kontrolün absorbanı sı dı r ve At, testin absorbanı sı dı r.

$$\% \text{ İnhibisyon } = \frac{\text{Bir kedi} - \text{Ve}}{\text{Bir kedi}} \times 100$$

IC50 , ABTS+ inhibisyon eğrilerinin yüzdesine karşı Res konsantrasyonunun lineer regresyonu ile hesaplandı .

## 2.13. İstatistiksel hesaplama

Varyans analizini hesaplamak için Graph pad Prism yazı lı mı kullanı ldı . 0.05'ten küçük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Standart sapmalar şekillerde hata çubukları ile gösterilmiştir.

## 3. Sonuçlar ve tartışma

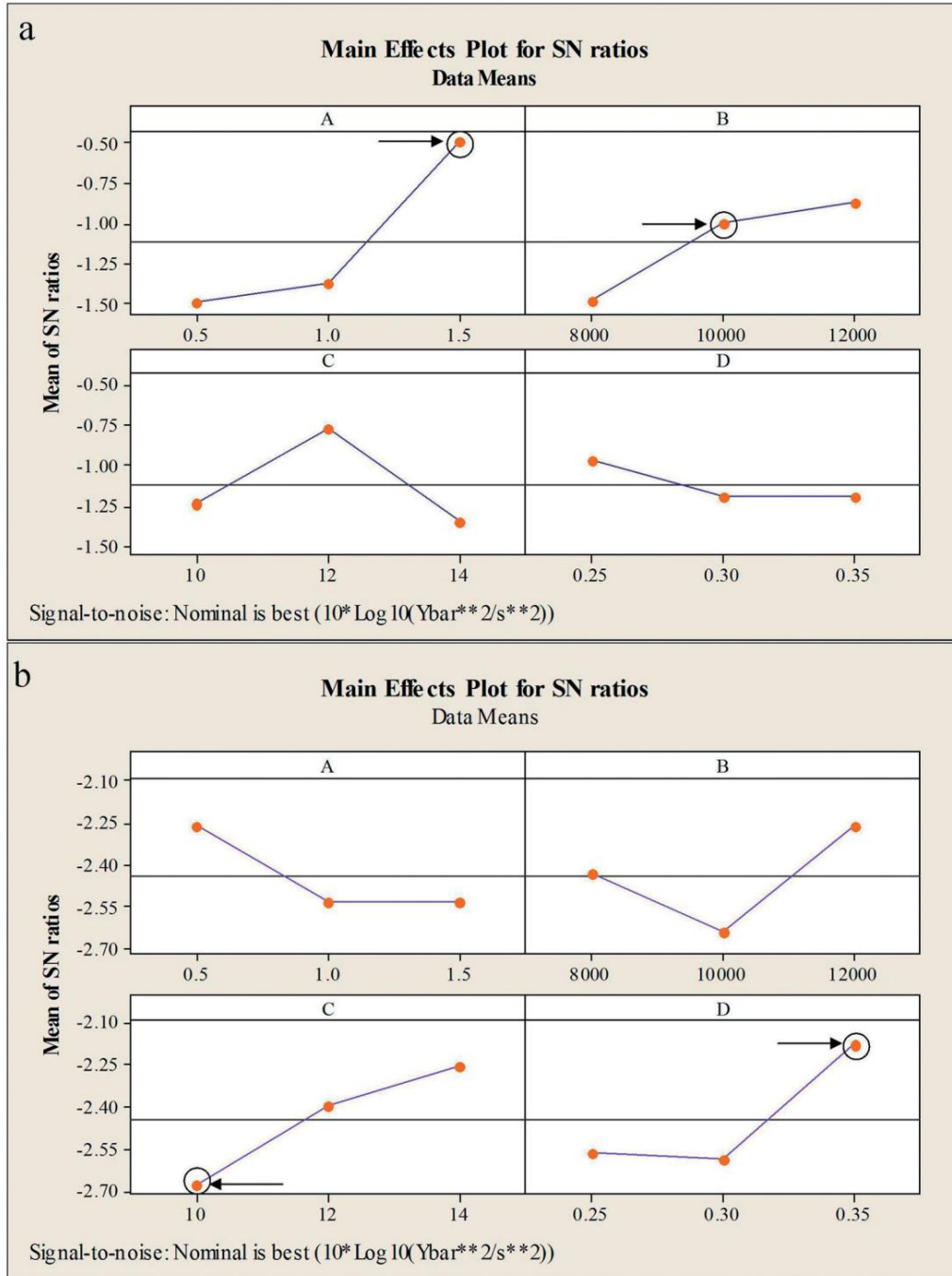
Nihai ürün performansı üzerinde etkili olan bağı msı z faktörleri ve bunları n etkili aralı ğı nı seçmek için ön deneyler dikkate alı nmı ştı r. Formülasyon sı rası nda, iç organik faz (etil asetat) her zaman çözücülerden oluşur, bu da aktif biyo-arttı rı cı yı ve polimeri tamamen çözünür hale getirir ve harici sulu faz, sulu bir çözelti içerir. Sürfaktan, stabil CPN'ler oluşturmak için emülsifikasyon-difüzyon işlemi sı rası nda HA ile birlikte kapsüllenmiş Res'e nüfuz edebildi. PLX188 konsantrasyonu, homojenleştirme hı zı , polimer miktarı ve organik-sulu faz oranı nı n deneme limitleri %0,5–%1,5 (w/v), 8000–12 000 rpm, 10–14 mg ve 0,25– olarak bulunmuştur. 0,35 (v/v), sı rası yla.

Her seferinde bir bağı msı z faktördeki değişiklik, deney sayısı sı nı artı rı r, bu da büyük miktarlarda ilaç ve diğer katkı maddelerinin tüketilmesine ve ayrı ca herhangi bir formülasyonu optimize etmek için zaman alan bir sürece yol açar. Bu nedenle, deney sayısı sı nı azaltmak ve tüm gelecek vaat eden kombinasyonlarda bağı msı z faktörlerin etkisini gözlemlemek için, formülasyonumuzu optimize etmek üzere bağı msı z faktörlerin aralı ğı için Taguchi ortogonal dizi tasarımı kullanı ldı .

### 3.1. Tasarım yanı tları nı n analizi

Yine de, deneylerin tasarımı iyi EE ve MPS yarattı , ancak mükemmel formülasyon bileşimini seçmek karmaşık tı . Dolaylı sı yla bağı mlı parametreler (Y1 ve Y2) , her bir formülasyon deneyinin S/N oranı na (Tablo 1) yanı t olarak eş zamanlı olarak her iki tepki için tahmin edildi . Ayrı ca, nihai formülasyonu optimize etmek için her bir faktörün önemini (p < 0,05) ve bunları n en uygun seviyelerini destekler. S/N oranı değerleri, MPS (Y1) ve EE (Y2) gibi bağı mlı yanı tları daha fazla etkileyen bağı msı z faktörleri etkiler . Bağı mlı yanı tları n değerleri, hesaplanan değerlerin üstün doğruluğu için nominal S/N oranı na göre yorumlanmı ştı r. Maksimum S/N oranı değeri şuydu:

MPS'ye sahip RH-E9, Y1: 101,45 ± 27,8 nm (S/N oranı ; 0,24293) ve EE'ye sahip RH-E8, Y2: %82,37 ± 1,49 (S/N oranı ; 0,69705) formülasyon kodları için elde edilmiştir ( Tablo 1). Birçok formülasyon için elde edilen yanı tlar sonucunda S/N oranı için elde edilen sonuçlar, S/N oranı nı n yanı tları n analizi için uygun bir parametre olduğunu göstermektedir. S/N oranları için ana etki grafikleri, seviyeleri X koordinatları olarak ve S/N oranı nı Y koordinatları olarak tutarak, sı rası yla ortalama parçacı k boyutunu ve kapsülleme verimliliğini optimum bir seviyede belirlemek için çeşitli seviyelerde her bir bağı msı z faktör için çizildi. resimli



Şekil 1. "Nominal en iyisidir" (A) PLX188 Konsantrasyonuna, (B) Homojenizasyon hızına, (C) Polimer miktarına ve (D) MPS (a) ve EE'de Organik: sulu oranına göre ana etkiler grafiği (b), sırasıyla.

Şekil 1(a,b). Ana etki grafikleri, bireysel faktörlerin S/N oranları açısından çeşitli yanıtlar üzerindeki etkilerini gösterir. Bağımlı faktörler (Y1 ve Y2) tek bir eğri ile temsil edildiğinden, bağımsız faktörlerin Y1 ve Y2 üzerindeki etkisini bağımsız olarak tasavvur etmek karmaşıktır çünkü eğri, uygun MPS ve Optimize edilmiş formülasyonda EE.

### 3.1.1. Stabilizatör konsantrasyonunun etkisi

Stabilizatörün (PLX188) etkisi, konsantrasyonunun arttırılmasıyla, EE'de bir artış veya azalma ile birlikte MPS'yi azalttığı gösterir. Çok düşük bir dengeleyici konsantrasyonu, kümeleşmeden daha fazla sorumlu olan kararlı CPN oluşumuyla sonuçlandı.

ve yüksek ilaç kapsülleme (Mainardes ve Evangelista 2005).

Aksine, yüksek dengeleyici konsantrasyonu, dengeleyici adsorpsiyonunun bir sonucu olarak CPN'ler arasında azalan arayüzey gerilimi nedeniyle CPN'lerin düşük EE'sine sahip küçük MPS ile sonuçlandı (formülasyon, RH-E9;  $101.45 \pm 27.8$  nm ve  $\%45.22 \pm 1.52$ , sırasıyla). CPN'ler yüzeye çıkar. Bu nedenle, artan stabilizatör konsantrasyonunda, S/N oranı da arttı ve bu, Şekil 1(a)'da gösterildiği gibi yüksek stabilizatör konsantrasyonunda mükemmel yanıt sergiliyor (A; oklu siyah daire, yüksek stabilizatör konsantrasyonunu gösterir).

### 3.1.2. Homojenleştirme hızının etkisi S/N

oranı değeri ve seviyeleri, değişen (ortadan yükseğe) homojenleştirme hızında mükemmel tepkiler gösterdi.

Tablo 2. Ortalama parçacı k boyutu (MPS) ve kapsülleme verimliliği (EE) için S/N oranı nı n ANOVA'sı .

Faktörler	SS	MS	%PC	F <sup>A</sup>	pb
PS					
A	(2) (1,7851)	(0,8926)	58.6934	0,7445	0,007
B	(2) (0,6127)	(0,3064)	20.1453	0,2556	0,003
C	2 0,5457	0,2729	17.9423	yarı m	-
D	2 0,0979	0,0489	3.2189	ve yarı m	-
Havuzlanma ş Hata	(4) (2,3978)	(0,5994)	-	-	-
SSToplam	8 3,0414	-	100	-	-
%EE					
A	2 0,1528	0,0764	15.686	yarı m	-
B	2 0,2195	0,1098	22.533	yarı m	-
C	(2) (0,2789)	(0,1395)	28.632	0,4634	0,004
D	(2) (0,3229)	(0,1615)	33.149	0,5366	0,001
Havuzlanma ş Hata	(4) (0,6018)	(0,1505)	-	-	-
SSToplam	8 0,9741	-	100	-	-

DoF: serbestlik derecesi; SS: kareler toplamı ; MS: karelerin ortalaması ; %PC: katkı yüzdesi; F: balı kçı testi.

<sup>A</sup>F < 0,05 (2,4)=6,94

<sup>B</sup>p < 0,05; PSD için A ve B'de ve %EE için C ve D'de anlamlı .

Bu seviyeler, CPN'lerin parçacı k boyutunu en aza indirmek için kesme kuvveti ile sonuçları r (Kumar ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, dengeleyici konsantrasyonunun orta homojenleştirme hı zı yla birlikte birleşik etkisinin sı rası yla Tablo 1 ve Şekil 1(a)'da gösterildiği gibi daha küçük partikül boyutu (120.56 ± 18.8 nm) CPN formülasyonu, RH-E8 elde etmek için optimum olduğu bulundu. (B; oklu siyah daire orta homojenleştirme hı zı nı gösterir). Buna karşı lı k, çok yüksek homojenleştirme hı zı , CPN'lerin düzensiz şekil ve boyutları na yol açan CPN'lerin parçacı k boyutunu olumsuz etkileyebilir.

### 3.1.3. Polimer konsantrasyonunun etkisi

Faktör C (polimer miktarı ) için, S/N oranı için ana etkiler grafiği, Şekil 1(b)'de gösterildiği gibi azalan polimer miktarı (EE100) ile azalan S/N oranı nı göstermiştir (C; siyah daire ok, düşük miktarda polimeri gösterir). Polimerik çözeltinin viskozitesinin maksimum miktarla arttı ğı bulundu.

CPN'lerin PLX188 sulu solüsyonunda emülsifikasyona karşı artan direncine yol açan polimerin müteakip sulu fazda en aza indirgenmiş Res-HA-co-CPN dağı labilirliği ve sonuçta daha büyük partiküller (Formülasyon, RH-E7; 210.34 ± 22.4 nm) daha az EE'ye sahip ( Formülasyon, RH-E7; %49,88 ± 1,53 muhtemelen CPN solüsyonundan dı ş faza daha az ilaç difüzyonu nedeniyle (Fessi ve ark.

1989; Quintanar ve ark. 1998) (Tablo 1). Bu nedenle, azalan polimer miktarı ile azalan S/N oranı , Tablo 1'de gösterildiği gibi, formülasyon için yüksek kapsülleme verimliliği gösterdi, RH-E8: %82,37 ± 1,49 .

### 3.1.4. Organik-sulu faz oranı nı n etkisi

Bu faktör ve seviyeleri, S/N oran değeri için belirleyici etkilerdir, daha yüksek oranlarda daha iyi tepkiler göstermiştir (Şekil 1(b), D; oklu siyah daire, yüksek organik:sulu faz oranı nı gösterir). Yüksek organik:sulu faz oranı kullanan küçük boyutlu CPN'lerin formülasyonu, emülsifikasyon sı rası nda CPN partikülleri arası ndaki birleşmeye karşı dirence bağlandı (Dillen ve ark.

2006; Danhier ve ark. 2009; Kumar ve ark. 2017). Ayrıca, her bir bağı m sı z faktörün optimum seviyesinin, optimize edilmiş formülasyonun geliştirilmesi için kullanı labileceğini de doğrular.

### 3.1.5. Veri değerlendirme ve formülasyon optimizasyonu L9

(34 ) deneysel izler tepkileri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Parti RH-F9, sı rası yla 101,45 ± 27,8 nm ve %45,22 ± 1,52 ile en küçük MPS ve EE ile sonuçları rken, RH-F8, sı rası yla 120,56 ± 18,8 nm ve 82,37 ± 1,49 ile en yüksek MPS ve EE ile sonuçlandı .

Elde edilen veriler seçim yapmanı n çok karmaşı k olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. Farklı seviyelerde yanı t parametrelerinin deneysel S/N oranı .

Seviyeler	Bağı m sı z Faktörler			
	A	B	C	D
MPS1 0,969 MPS2 1,189 MPS3 1,4789	Delta değeri 1,365	0,999	0,774	0,774
Sı ra 4312	0,490	0,872	1,343	0,569
	1,002	0,606	0,569	
	2,256	2,429	2,675	2,562
	2,532	2,637	2,396	2,586
	2,533	2,255	2,250	2,173
	0,277	0,382	0,424	0,413

PSi ve EEi , MPS ve EE'nin ortalama değeridir.

Delta değeri, MPSi ve EEi'nin maksimum değeri ile minimum değeri arası ndaki farktı r .

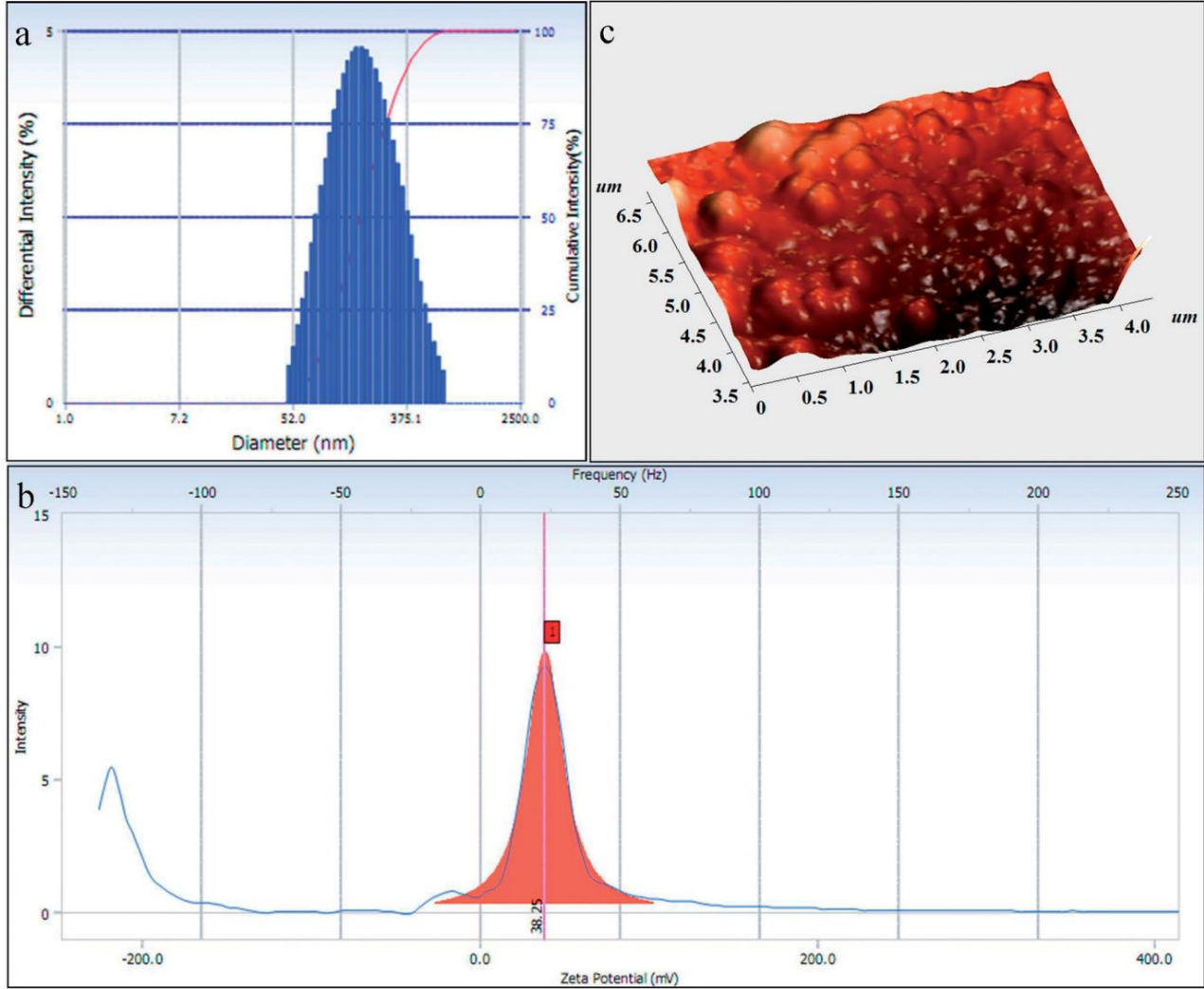
yüksek düzeyde EE'ye ve en küçük MPS'ye sahip olan ve kritik bir şekilde değerlendirilmesi gereken optimize edilmiş parti bileşimi. S/N oranı için hesaplanan veriler, her bir bağı m sı z faktörün önemli (p < 0.05) değerlerini ve optimum seviyelerini belirleyen Res-HA-co-CPN'lerin parti kompozisyonunu hazı rlamak ve optimize etmek için ANOVA kullanı larak değerlendirildi. Her bir faktör için belirlenen varyans derecesi, bağı m sı z faktörlerin 'A' ve 'B' (PLX188 konsantrasyonu, %58,69 ve homojenleştirme hı zı , %20,14) olarak CPN'leri etkileyen oldukça önemli (p < 0,05) faktörler olduğunu, bağı m sı z faktörlerin ise 'C'yi tavsiye etti. 'D' en hafif ve orta derecede öneme sahipti (p < 0,05) (polimer miktarı ; %28.63 ve organik: sulu faz oranı ; %33.15) (Tablo 2). Bu nedenle, stabilizatör konsantrasyonu ve homojenizasyon hı zı nı n, CPN'lerin MPS'sini etkileyen en önemli (p < 0.05) faktörler olduğu belirtildi. Her bir önemli (p < 0.05) bağı m sı z faktörün belirlenmesinden sonra, optimize edilmiş seri bileşiminin geliştirilmesi için bunları n optimum seviyelerinin tespit edilmesi zorunlu oldu. Bu, her seviyedeki bağı m sı z faktörlerin S/N oranları nı n ana etkiler grafiği'nin kapsamlı bir değerlendirmesi ve ortalama S/N oranları nı n araştırı lması yla başarı labildi.

### 3.1.6. Optimum seviye ayarı

Çeşitli seviyelerde (1-3) her bir bağı m sı z faktör (AD) için elde edilen ortalama S/N oranı nı n değerlendirilmesiyle doğrulanan ANOVA sonucuna ve "nominal değer" dikkate alı narak tahmin edilen faktörlerin etkisine dayalı dı r. S/N oranları nı n en iyisidir' yanı tları Tablo 3'te özetlenmiştir . Ortalama S/N oranı nı n yanı tı ayrı ca stabilizatör konsantrasyonu (A3) ve homojenleştirme hı zı nı n (B2) optimizasyon için en önemli (p < 0.05) faktör olduğunu doğrulamı ştı r. EE'yi optimize etmek için MPS'yi ve ardı ndan polimer konsantrasyonu (C1) ve organik: sulu faz oranı nı (D3) ayarlayı n. Sonuç olarak, faktör A3B2C1D3'ün (Formülasyon, RH-E8), optimize edilmiş yı ğı n kompozisyonunun geliştirilmesi için en uygun faktör seviyeleri olduğu bulundu.

### 3.2. Optimize edilmiş formülasyonun karakterizasyonu

Optimize edilmiş formülasyonun (RH-E8) EE, MPS ve PDI değerleri sı rası yla %82,37 ± 1,49, 120,56 ± 18,8 nm ve 0,122 olarak bulundu, bu da mükemmel bir homojenliği ve dar boyut dağı lı mı nı doğruladı (Şekil 2(a)). Ayrıca, optimize edilmiş formülasyonun ZP'sinin, Şekil 2(b)'de gösterildiği gibi +38,25 mV olduğu bulundu, bu da CPN'lerin mükemmel fiziksel kararlı lı ğı nı temsil eder (Chakraborty ve ark. 2010). Yüksek ZP değeri, CPN'lerin yüksek stabilitesi ile sonuçlanan yüksek yüzey yükünün varlı ğı na bağlandı . Bu, metallar arası ndaki elektrostatik itme nedeniyle topaklanma şansı nı daha da azaltı r.



Şekil 2. Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin (Formülasyon, RH-E8) MPS dağılımını (a) ZP (b) ve atomik kuvvet mikroskopisini (3 boyutlu görüntü) (c) temsil eden mikrograflar.

Benzer yüzey yüklerini taşıyan CPN'ler kolayca yeniden dağılılabilir kararlı koloidal sistemle sonuçlanır. Ayrıca, yüksek ZP değeri, CPN'lerin Peyer yamaları yoluyla mükemmel bir şekilde emildiğini ve bunların karaciğer tarafından alındığını da gösterir (Santos ve ark. 2012).

### 3.3. Morfolojik değerlendirme

Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin (Formülasyon, RH-E8) AFM mikrosafı, Şekil 2(c)'de (3-D Görüntü) gösterildiği gibi pürüzsüz yüzeylere sahip iyi ayrılmış küresel şekiller gösterir. Ayrıca, Şekil 2(a), Res-HA-co-CPN'lerin neredeyse tekdüze boyut dağılımına, en düşük PDI değerine ve  $120.56 \pm 18.8$  nm'lik ortalama çapa sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin yüzey morfolojisi, ayrılmış olarak bütünlüklerini gösteren homojen, pürüzsüz ve küresel CPN'lerin varlığını gösteren HR-TEM kullanılarak değerlendirildi (Şekil 3(a)). Elektron kırınım mikrosafı (Şekil 3(b)) Res'in CPN matrisi içinde homojen dağılımını ve halo şekilsiz kırınım modelini daha da kanıtlayan yıldıız şeklindeki Res parçacıklarını halka modelinin olmadığını gösterir (Singh ve Muthu 2008).

### 3.4. Res-HA'nın Res-HA içindeki dağılımının gözlemlenmesi ortak CPN'ler

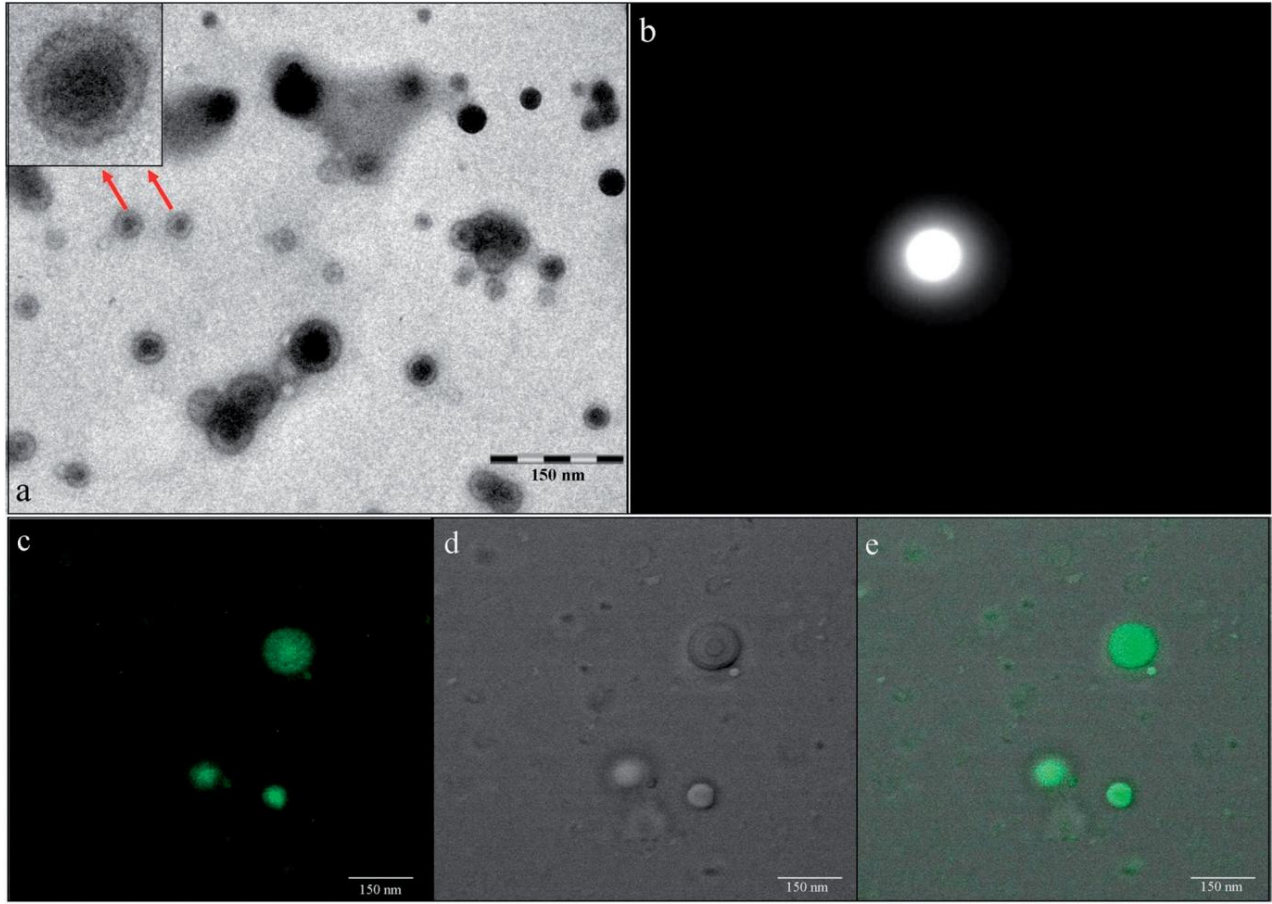
Birlikte kapsüllenmiş Res-HA'nın optimize edilmiş CPN'ler içindeki üniform dağılımını, CLSM kullanılarak araştırıldı. Şekil 3(c-e), CPN'lerin polimerik matrisi içinde Res-HA'nın birlikte kapsüllenmesini ve tek biçimli dağılımını doğrulamak için flüoresan görüntüsünü, diferansiyel girişim kontrastı (DIC) görüntüsünü ve flüoresan ve DIC mikrosafı nın birleşimini gösterir (Chaurasia et al. 2015).

### 3.5. Optimize edilmiş formülasyonun katı hal karakterizasyonu

DSC analizi: HA, saf Res, EE100, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin DSC termogramları Şekil 4'te [A] gösterilmiştir. Başka bir yerde bildirildiği gibi HA, 50-275 C (Pietro ve Paola 2004) bölgesinde donuk endoterm ve ekzoterm sergiler ve saf Res, 267.71 C'de keskin endotermik ayrışma tepesi gösterir (Kim ve ark.

2012). Bununla birlikte, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin termogramında bu endotermik tepesi yoktur, bu da Res-HA'nın amorf halde CPN'lerin içinde düzgün bir şekilde birlikte kapsülendiğini doğrular (Mirza ve ark. 2011).





Şekil 3. (a) 20.000 büyütmede (bar = 150 nm) yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu ve ek mikrograf, kırmızı oklarla gösterilen CPN'lerin içinde birlikte kapsüllenmiş Res-HA sergileri, (b) ED mikrografını temsil eder, (c) floresan görüntüsünü, (d) DIC görüntüsünü ve (e) 20 büyütmede Res-HA-co-CPN'lerin floresan ve DIC görüntülerinin kombinasyonunu gösteren konfokal lazer tarama mikrografları.

X-ışını kırınım analizi: pXRD çalışması, ilaç kristallliği kaybını doğrular. HA, saf Res, EE100, PM ve optimize edilmiş Res HA-co-CPN'lerin pXRD'si Şekil 4'te [B] gösterilmiştir. HA, daha önce bildirildiği gibi (Chilom ve Rice 2005; Visser ve Mendel 1971) kristal olmayan doğasıyla imaya eden 37.5 ve 43.5'te birkaç yoğun tepe noktası ile çok küçük dağılımlı tepe noktaları sergiler. Pure Res, Şekil 4[B] (b) 'de gösterildiği gibi 2 saatte 6.62, 13.2, 16.36, 19.18, 22.28, 23.54, 25.18, 28.26, 31.6, 38.32 ve 45.18'de keskin kristal diffraksiyon zirveleri sergiler (Zu ve diğerleri 2016). EE100, Şekil 4[B](c) 'de gösterildiği gibi 2 saatlik açılarda herhangi bir karakteristik pik sergilemez. PM durumunda, Şekil 4[B](d) 'de gösterildiği gibi zirvelerin hiçbiri kaybolmamasına rağmen. EE100, karakteristik tepe noktasını göstermediğinden, ancak sonuçlar, Res'in PM'de kısmen kristal formda mevcut olduğunu gösterdi. PM'nin hazırlanması sırasında, EE100'ün kısmi erimesi ve ardından küçük miktarda Res'in çözülmesi kristalden amorf duruma kısmi dönüşümle sonuçlanır. Buna karşılık, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, Şekil 4[B](e) 'de gösterildiği gibi herhangi bir yoğun karakteristik tepe noktası sergilemez. Yukarıdaki sonuç, ilacın DSC sonuçlarıyla iyi bir şekilde ilişkilendirilebilecek olan CPN'lerin polimerik matrisinde amorf bir forma dönüştürüldüğünü daha da destekler (Kumar ve ark. 2014).

### 3.6. In vitro salınım çalışmaları

In vitro salınım çalışması sırasında, serbest ilacı n, pH 7.4 olan fosfat tamponunda çözülmeden kaldığı bulundu, oysa optimize edilmiş Res HA-co-CPN'ler, Şekil 5(a) 'da gösterildiği gibi saf Res'e göre sürekli bir salınım davranışı (48 saat sonra >%90) sergiledi. ). Rağmen,

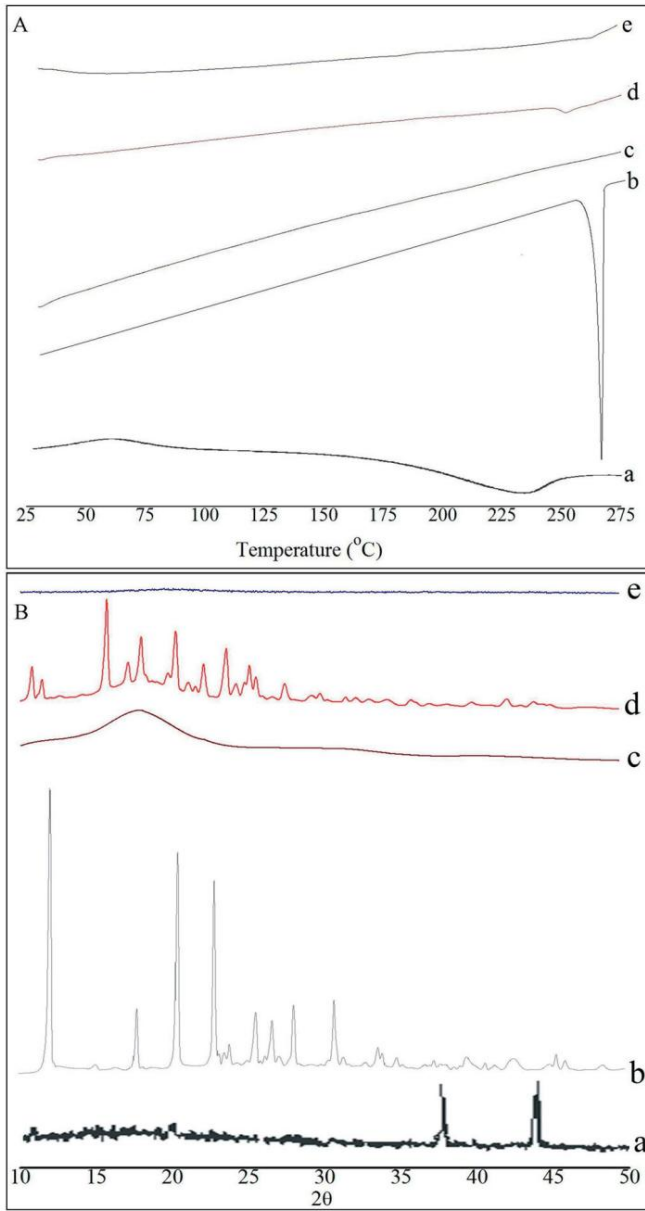
Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, başlangıçta ani ilaç salınımı (2 saatte %20.89  $\pm$  1.044) gösteren, ardından 48 saate kadar sürekli ilaç salınım profili gösteren iki fazlı salınım profili sergiledi. İlk patlama salınımı, çözünme ve difüzyona atfedildi.

CPN'ler ilacı yüzeye adsorbe etti, ardından hidrasyon ve polimer şişmesi/erozyonu izledi, bu da sonuçta difüzyon kontrollü sürekli ilaç salınım davranışını destekledi. Hidrasyon muhtemelen moleküllerin difüzyon yolunun uzunluğunu arttırdı, bu da daha sonra ilaç difüzyon hızını düşmesine neden olur (Wong ve ark. 1999). Ayrıca, HA'nın biyo-geliştirme etkisi, Res'in çözünmesini arttırdı.

polimer zinciri gevşemesi ve şişmesi sırasında polimerik matrisin içindedir (Wong ve diğerleri 1999; Mirza ve diğerleri 2011). Ayrıca, hızlı salınım takiben sürekli salınım, ilaç konsantrasyonunu daha uzun süre terapötik pencere içinde tutar (Bhagav ve ark. 2011).

#### 3.6.1. In vitro salınım kinetiği

In vitro salınım çalışmasıyla elde edilen sonuçlar, sıfır dereceli Hixon-Crowell (R2 = 0.878) ile karşılaştırıldığında maksimum korelasyon katsayısı (R2 = 0.999) ile daha da belirlenen ilaç difüzyon fenomeninin katkısını düşündüren Higuchi salınım kinetiğini sergiledi. (R2 = 0,689), birinci derece (R2 = 0,741) ve Peppas-Korsmeyer modeli (R2 = 0,987). Ayrıca, n-değeri (n = 0.4851), ilaç salınımının 'Fickian Difüzyon' mekanizmasını doğruladı. Bu ayrıca sürekli ilaç salınımının difüzyon ve erozyon mekanizmasını destekler (Chawla ve diğerleri 2014; Costa ve Sousa 2001).



Şekil 4. (a) Humik asit, (b) Pure Res (c) EE100 (d) PM ve (e) optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin [A] DSC termogramları ve [B] pXRD eğrileri (Formülasyon, RH-E8).

### 3.7. Depolama kararlılığı çalışması nı n değerlendirilmesi

CPN sisteminin çevresel değişikliklere karşı stabilitesi, in vivo akciğete ilişkin tam nihai performansı nı doğrulamak için temel ön koşuldur. Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin stabilite çalışmaları sırasıyla oda sıcaklığında, hızlandırılmış ve soğutulmuş koşullarda 6 ay boyunca gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 5(b-d)'de gösterildi. Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, soğutulmuş sıcaklıkta ( $4 \pm 1$  C) MPS, PDI ve EE gibi fizikokimyasal özelliklerde önemsiz ( $p > 0.05$ ) değişiklikler sergiledi. Ancak, numuneler oda sıcaklığında ( $25 \pm 2$  C/ $60 \pm 5$  RH) saklandığında MPS'de anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir artış oldu.

Dikkat çekici bir şekilde, PDI ve EE iddiasız bir şekilde ısrar edildi ve formülasyonda bozulmadan korundu. Hızlandırılmış koşullarda ( $40 \pm 2$  C/ $75 \pm 5$  RH), optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, muhtemelen CPN'lerin toplanması nedeniyle MPS, PDI ve EE'ye doğru önemli ( $p < 0.05$ ) değişiklik gösterdi. CPN'lerin toplanması muhtemelen bozunmanı n, deformasyonun ve erimenin sonucuydu.

CPN'lerden ilacı n atılması ndan sorumlu olabilecek hızlandırılmış koşullardaki polimerik malzemeler (Patel ve ark.

2015). Yukarıda belirtilen sonuçlara dayanarak, soğutulmuş sıcaklığında ( $4 \pm 1$  C), optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin uzun süreli kullanımı için fizikokimyasal özelliklerini korumak üzere saklanması için en uygun koşul olduğu bulundu.

### 3.8 İn vivo farmakokinetik çalışma

Şekil 6, saf Res süspansiyonunun, PM'nin ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin tek doz oral uygulaması ndan sonra plazma ilaç konsantrasyonu-zaman profilini göstermektedir. Saf Res süspansiyonunun, PM'nin ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin (mulasyon için, RH-E8) çok sayıda farmakokinetik özelliği Tablo 4'te özetlenmiştir. Bölmesiz farmakokinetik analiz, maksimum plazma konsantrasyonunda 25,2 kat ve 55,6 kat artış gösterdi (Saf Res süspansiyonu ile karşılaştırıldığında sırasıyla PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler için Cmax). Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin Cmax'ındaki artış, başka bir yerde bildirildiği gibi küçük parçacık boyutu ve hidrofobik yüzeyi nedeniyle geçirgenliği artırılan ve böylece mide-bağırsak yolunda emilimi artırılan bir çözünürlük artışı olarak HA'nın varlığından kaynaklanmaktadı (Kumar ve ark. 2014) Chaurasia ve ark.

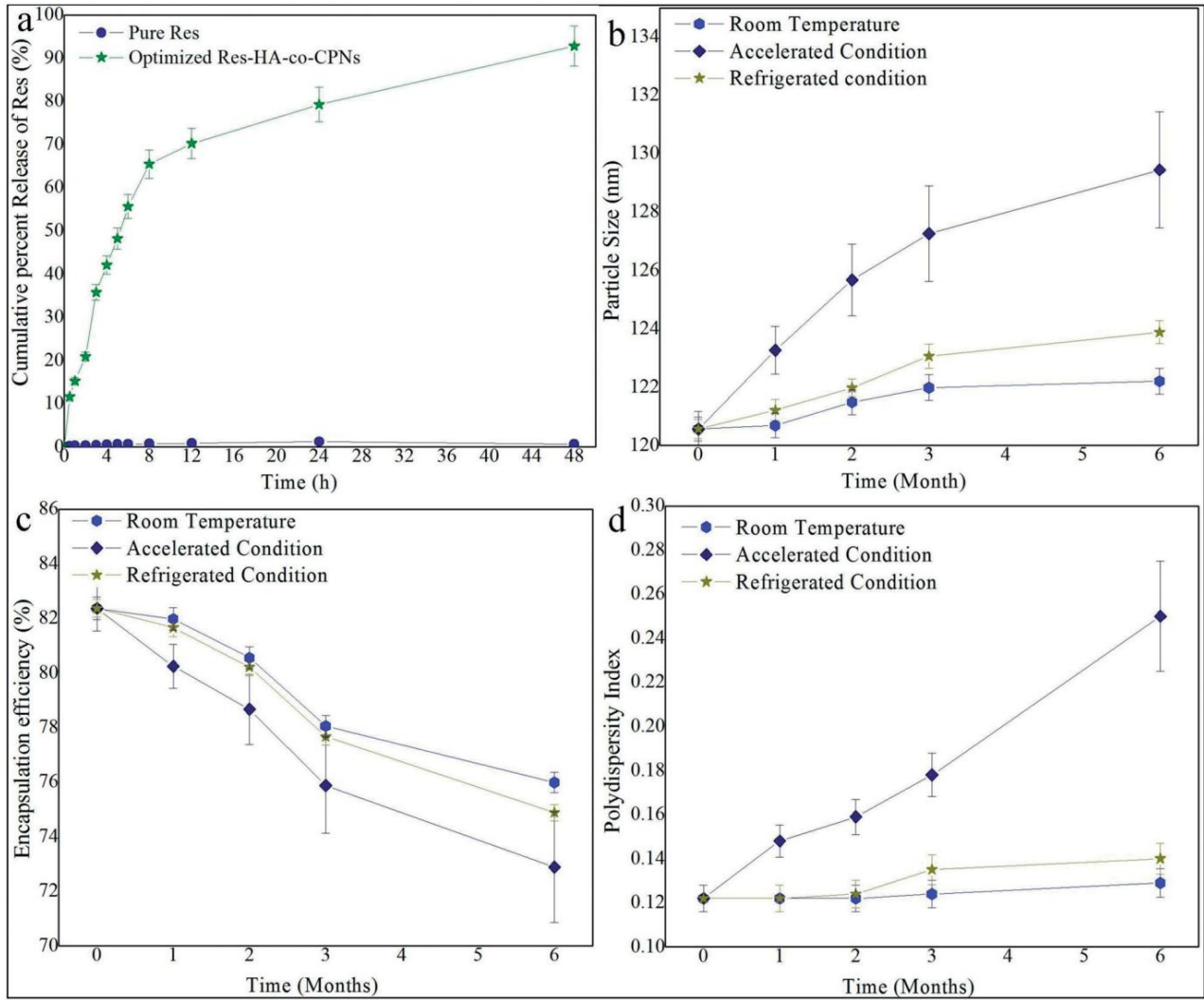
2015). Optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler ile elde edilen tmax, yarı ömür (t1/2) ve ortalama kalma süresine (MRT) karşı gelen değerlerin, PM ve saf Res süspansiyonundan elde edilenlerden önemli ölçüde ( $p < 0.05$ ) daha yüksek olduğu bulundu. Sırasıyla Res süspansiyonu. Bunun nedeni, CPN'lerin bağırsak mukozasında tutulması ve burada kapsüllenmiş Res'in sürekli salınması olabilir, bu da Res-HA-co-CPN'lerin sürekli bir dağılım sistemi olarak etkinliğini yineler (Seremeta ve ark. 2014; Tariq ve ark. 2015). AUC0-24h sonuçları nı n, PM ve saf Res süspansiyonu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde ( $p < 0.05$ ) daha yüksek olduğu bulundu. PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin nispi biyoyararlanımı nı n, tek doz uygulamadan sonra saf Res süspansiyonu ile karşılaştırıldığında 28.54 kat ve 62.76 kat daha yüksek olduğu bulundu. Oral biyoyararlanımdaki bu önemli ( $p < 0.05$ ) iyileşme, sırasıyla EE100 ve HA tarafı ndan sunulan biyo-yapı şkanlık ve biyo-arttırma etkisinin bir sonucu olarak, CPN'lerin artan sistemik absorpsiyonunun ardından absorpsiyon bölgesinde ilaç salınımına bağlı olabilir (Tabata ve Ikada 1990); Lopedota ve diğerleri 2009; Elshafeey ve diğerleri 2010; Mirza ve diğerleri 2011). Bozulmamış CPN'ler, sistemik dolaşımına ulaşmak için muhtemelen enterositler üzerinden paraselüler ve transselüler taşıma mekanizmaları ve Payer yamaları nı n M hücreleri yoluyla lenfatik yollar yoluyla absorbe edilmiştir (Des Rieux ve ark. 2006).

Ayrıca, CPN'lerden Res'in artan oral biyoyararlanımı şunlara atfedilebilir: (i) CPN'ler içinde nispeten yüksek Res-HA yüklenmesine rağmen, polimerik matris içinde amorf veya moleküler olarak dağılımı ş halde Res-HA'nın varlığı. (ii) kristal arayüzünde adsorpsiyonun bir sonucu olarak çekirdeklenmeyi veya kristal büyümesini engelleyen pH'a bağımlı taşıyıcı polimerin (EE100) varlığından dolayı bağırsak lümeni içinde aşırı doymuş Res-HA'nın varlığı. (iii) EE100 polimerinin varlığı, CPN'lere mide-bağırsak mukozasına doğru iyi bir yapılaşma ve bölgeye özgüllük sağlar (Wang ve ark. 2008).

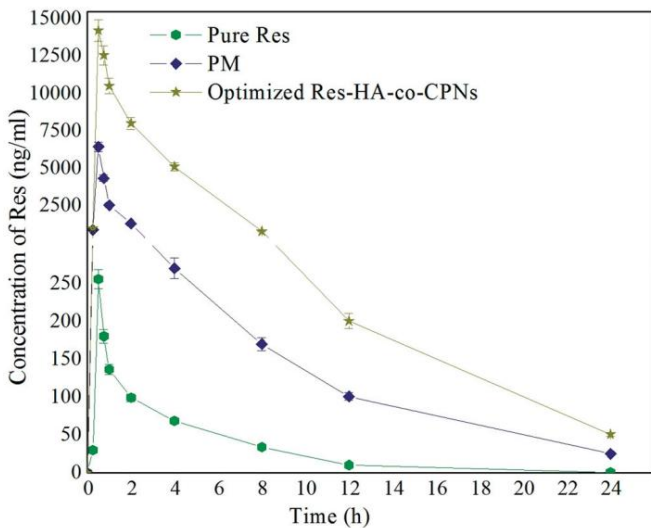
### 3.9. Antiradikal aktivite

Saf Res solüsyonları nı n, PM'nin ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin radikal inhibisyon yüzdesi, farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 20 ve 25 mM) ve farklı zaman noktalarında (0, 24, 48, ve 72 saat ve Şekil 7(a-d)'de gösterilmektedir.

0 saatte, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, test edilen tüm konsantrasyon aralığında ABTS+yi temizlemek için benzer bir yetenek gösterir.



Şekil 5. (a) PBS'de saf Res ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin in vitro salınım profili, pH 7.4, 48 saat ve çeşitli çevre koşullarında depolama sırasında optimize edilmiş partinin fizikokimyasal özelliklerinin etkisi (b) oda sıcaklığında (25 C±2 C/60 ± %5 RH) (c) hızlandırılmış durumda (40 C±2 C/75 ± %5 RH) ve (d) soğutulmuş durumda (4 C±1 C) 6 M boyuncada (deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi ve dikey çubuklar ortalama ± SD, n = 3) gösterir.



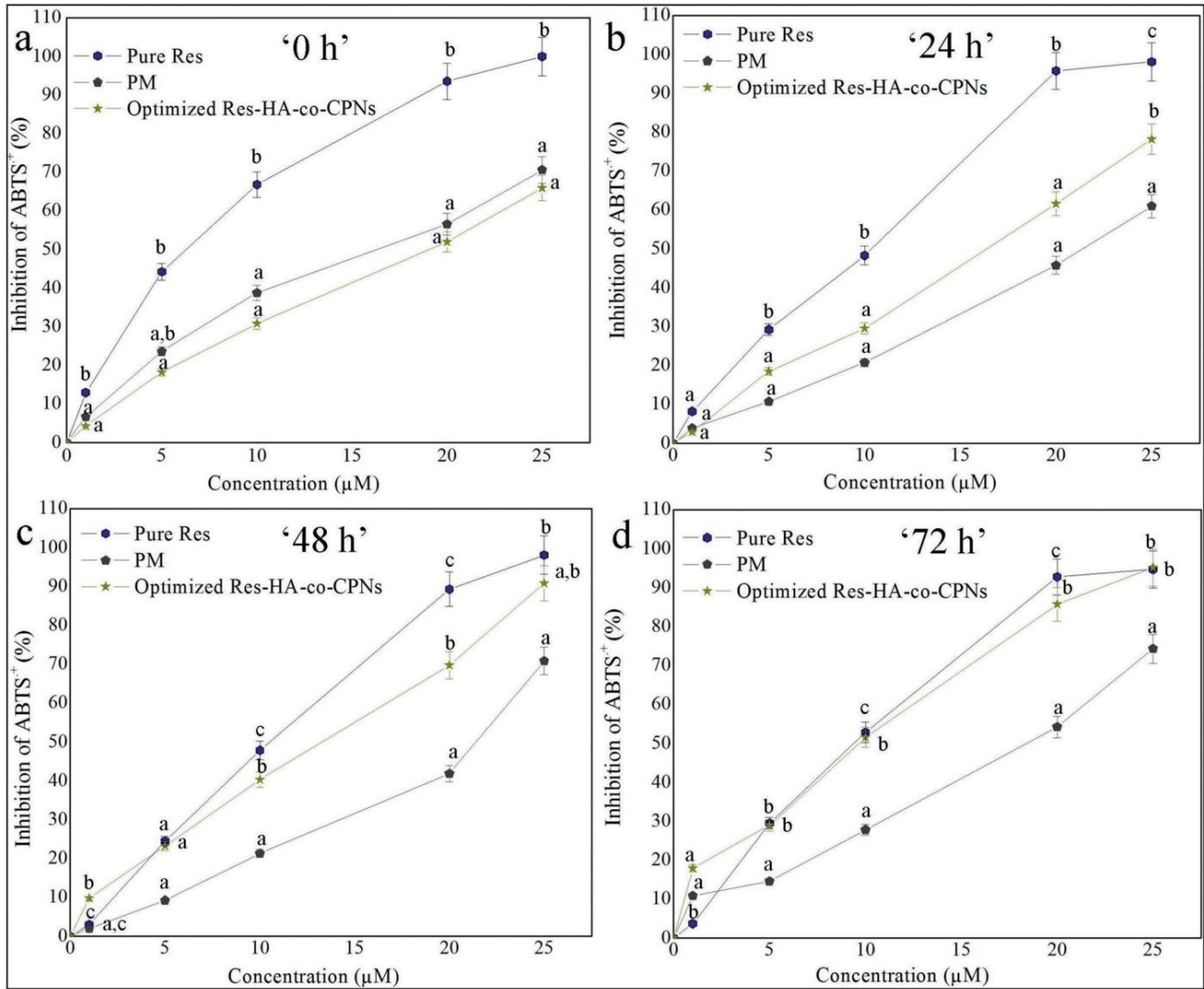
Şekil 6. Saf Res, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin (her grupta doz = 25 mg/kg) oral uygulamasından sonra farmakokinetik profil. Dikey çubuklar, kontrol (saf Res) ile ortalama ± SEM; n = 6, p < 0.05, PM ile karşılaştırıldığında p < 0.05, (Tersiyete ANOVA ile karşılaştırma testi).

(p > 0.05). Saf Res, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lere (p < 0.05) kıyasla ABTS+ inhibisyonunun maksimum yüzdesini gösterdi. 24 saatte, hem PM hem de optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, 0 saatte gösterilene benzer profil sergiledi. Bununla birlikte, 25 mM'lik bir konsantrasyonda optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler gelişmiş bir ABTS+ süpürme sergilemiştir (p < 0.05). Üç düşük konsantrasyonda (1, 5 ve 10 mM) saf Res, azalmış ABTS+ radikal yakalama aktivitesi gösterdi (p < 0.05); ancak 20 ve 25 mM konsantrasyonlarda, yüzde radikal inhibisyon 0 saatte gösterilene aynı bulundu (p > 0.05). 48 saatte, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler tarafından radikal inhibisyonunda çok önemli bir artış olurken, PM, 24 saatte gözlemlenen neredeyse benzer bir profil sergiledi. 25 mM'de optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin saf Res kadar etkili olduğu bulundu (p > 0.05). 72 saat ve 25 mM konsantrasyonda, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler, saf Res ile benzer radikal yakalama aktivitesi gösterirken (p > 0.05), 20 mM konsantrasyonda, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler önemli ölçüde gösterdi (p < 0.05) düşük yanıt. Daha yüksek konsantrasyonda, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin nihai radikal yakalama aktivitesinin, başka bir yerde bildirildiği gibi zamanla arttığı bulundu (Re ve diğerleri 1999; Lu ve diğerleri 2009; Kim ve diğerleri 2016).

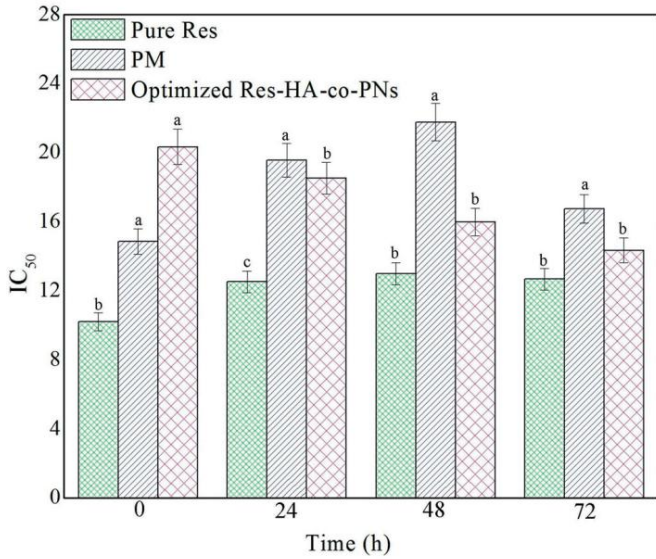
Tablo 4. PM'nin ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin (formülasyon, RH E8) sulu bir süspansiyon halinde saf Res ile karşılaştırılarak sıçanlara oral uygulanması ardından in vivo farmakokinetik parametreler; Tüm veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak belirtilmiştir; n = 6.

parametreler	Saf Çözünürlük (Kontrol)	—	optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'ler
Cmaks (mg/ml)	256.004 $\pm$ 12.80	6451.301 $\pm$ 322.565	0,5 $\pm$ 0,5
Tmaks (h)	0,5 $\pm$ 0,0	0,021	412.649 $\pm$
AUC <sub>0-24</sub> (mg/ml).h	750.268 $\pm$ 1.167	1070.632	78 327.47 $\pm$ 3916.374
AUMC <sub>0-24</sub> (ng/ml).h <sup>2</sup> t <sub>1/2</sub>	920.888 $\pm$ 55.112	3.134 $\pm$ 0.1567	3.658 $\pm$ 0.1829
(sa)	0,623 $\pm$ 0,022		8,978 $\pm$ 0,449
MRT (saat)	1,227 $\pm$ 0,112		

Cmaks: maksimum plazma konsantrasyonu; Tmaks: maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi; EAA: plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki alan; AUMC: birinci an plazma ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki alan; t<sub>1/2</sub>: yarı ömür; MRT: ortalama ikamet süresi.



Şekil 7. (a) '0 h' için 1, 5, 10, 20 ve 25 mM konsantrasyonlarda Pure Res, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerden (formülasyon, RH-E8) ABTS<sup>+</sup> radikalinin inhibisyonunun yüzdesi h', (b) '24 sa', (c) '48 sa' ve (d) '72 sa'; Satır başına hesaplanan ortalama  $\pm$  SD. Özdeş alfabeler, farklı alfabeler için istatistiksel olarak aynı ve farklı istatistiksel olarak anlamlıdır (ANOVA, Tukey'nin son testi ve ayrı-ayrı p < 0.05).



Şekil 8. Sodyum fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.4) ve oda sıcaklığında ışık yokluğunda (k=734) ABTS+ radikalinin yakalanması için saf Pure Res, PM ve optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin IC50'si (nm); a,b,cOrtalama ± SD satır başına hesaplanmıştır. Özdeş alfabeler, farklı alfabeler için istatistiksel olarak aynılık ve farklılık istatistiklerinin sunulduğu anlamına gelir (ANOVA, Tukey'nin son testi ve p < 0.05).

Res süpürücü ABTS+'ın IC50 değerlerinin zamana göre arttığı bulundu. Oysa, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin IC50 değerleri zamanla birkaç değişiklik gösterdi, ancak saf Res'e göre önemli ölçüde (p < 0.05) daha üstün olduğu bulundu.

Ayrıca, optimize edilmiş Res-HA-co-CPN'lerin IC50 değerlerinin zamanla azaldığı ancak 48 saat ve 72 saat sonra saf Res'e neredeyse benzer olduğu bulundu (p > 0.05) (Şekil 8).

#### 4. Sonuç

Res ve HA'yı birlikte kapsülleyen CPN'ler geliştirildi ve optimize edildi; bu, stabilitenin, oral biyoyararlanımını yanı sıra Res'in Res-HA-co-CPN'ler biçimindeki antiradikal potansiyelinin iyileştirilmesi için orijinal yaklaşımı gösterdi. Taguchi ortogonal dizi tasarımı na dayanan çeşitli optimizasyon parametreleri ve seviyelerinin, istenen MPS, yüksek S/N oranı ve önemli (p < 0.05) ANOVA ile birlikte Res-HA'nın yüksek birlikte kapsüllemesi için kesinlikle güvenilir olduğu bulundu. Res-HA-co-CPN'lerin olumlu fizikokimyasal özelliklerini de gösteren sonuçlar. Sonuçları mı z, suda çözünmeyen ilacı n CPN'ler içindeki biyo-güçlendirici ile birlikte kapsüllemesinin, çeşitli rahatsızlıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılan çeşitli suda çözünmeyen ilaçları biyoyararlanımını ve performansını artırmak için etkili oral uygulama için umut verici bir yaklaşım olduğunu açıkça göstermektedir.

#### teşekkürler

Yazarlar, Amity Üniversitesi Uttar Pradesh, Noida'daki Şansölye ve Rektör Yardımcısı'na bu araştırma çalışmasını yürütmek için gerekli tesisleri sağladığı için ve DSC ve XRD tesisi sağladığı için İnsanlık Araştırma Merkezi, Birim-3, Gurgaon, Hindistan'a teşekkür eder.

#### Açık kılama bildirimi

Yazar(lar) tarafı ndan herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bildirilmemiştir.

#### Referanslar

- Acharya SB, Frota MH, Goel RK, Tripathi SK, Das PK. 1988. Shilajit'in farmakolojik etkileri. *Indian J Exp Biol.* 26(10): 775-787.
- Agarwal SP, Anwer MDK, Khanna R, Ali A, Sultana Y. 2010. Shilajit'ten hüyük asit-a fiziko-kimyasal ve spektroskopik karakterizasyon. *J Sı r p Kimya Soc.* 75(3):413-422.
- Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. 2007. Shilajit: bir inceleme. *Fitoterapi Arş.* 21(5):401-405.
- Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. 2012. Resveratrol uygulaması : biyoyararlanımını nı rlamaları na hangi formülasyon çözümleri? *J Kontrol Serbest Bı rakma.* 158(2):182-193.
- Anderson HA, Bick W, Hepburn A, Stewart M. 1989. Hüyük maddeler II. İçinde: Hayes MHB, MacCarthy P, Malcolm RL, Swift RS, editörler. yapı arama. Chichester (Birleşik Krallık): Wiley-Interscience. P. 223.
- Baur AJ, Sinclair DA. 2006. Resveratrolün terapötik potansiyeli: in vivo kanı tlar. *Nat Rev İlaç Keşfi.* 5(6):493-506.
- Barzegar-Jalali M, Alaei-Beirami M, Javadzadeh Y, Mohammadi G, Hamidi A, Andalib S, Adibkia K. 2012. Diklofenak sodyum eudragit (R)RS100 nanoparçacı klarını nı n ve katı dispersiyonları n fizikokimyasal özelliklerinin ve ilaç salını mını n karşı laştı rması . *Toz Teknolojisi* 219:211-216.
- Buchanan CM, Buchanan NL, Edgar KJ, Little JL, Malcolm MO, Ruble KM, Wachter VJ, Wempe MF. 2007. Tamoksifen hidroksibutenil-beta-siklodekstrin formülasyonları nı n intravenöz ve oral dozlaması ndan sonra tamoksifenin farmakokinetiği. *J Eczacı lık Sci.* 96(3):644-660.
- Bhagav P, Upadhyay H, Chandran S. 2011. Brimonidin tartrat eudragit uzun etkili nanopartiküller: formülasyon, optimizasyon, in vitro ve in vivo değerlendirme. *AAPS PharmSciTech.* 12(4): 1087-1101.
- Chaurasia S, Chaubey P, Patel RR, Kumar N, Mishra B. 2016. Kolon-26 tümörü taşı yan farelere karşı kurkumin-polimerik nanopartiküller: sitotoksikite, farmakokinetik ve antikanser etkinlik çalışmaları . *İlaç Geliştirme San. Ecz.* 42(5):694-700.
- Chaurasia S, Kumar N, Patel RR, Mishra B. 2014. Taguchi sağlam tasarımı kullanılarak kurkumin yüklü polimerik nanopartiküllerin üretimi için parametrelerin optimizasyonu. *Adv Sci Lett.* 20(5): 1028-1038.
- Chaubey P, Patel RR, Mishra B. 2014. Visceral leishmaniasis tedavisinde yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılarak kurkumin yüklü mannosile kitosan nanopartiküllerin geliştirilmesi ve optimizasyonu. *Uyuşturucu Dağı tı mı na İlişkin Görüşler.* 11(8):1163-1181.
- Chakraborty S, Shukla D, Vuddanda PR, Mishra B, Singh S. 2010. Lipid bazlı nanoparçacı kları n oral dağı tım sisteminin geliştirilmesinde adsorpsiyon tekniğinin kullanılması . *Kolloidler Surf B Biointerfaces.* 81(2):563-569.
- Chaurasia S, Patel RR, Chaubey P, Kumar N, Khan G, Mishra B. 2015. Zerdeçal min. *Karbonhidrat Polim.* 130:9-17.
- Chilom G, Rice JA. 2005. Doğal organik maddede camısı geçiş ve kristalit erimesi. *Org Geochem.* 36(10):1339-1346.
- Chawla R, Jaiswal S, Mishra B. 2014. Merkezi bileşik faktör tasarımı kullanılarak antitüberküler ilaçları n polimerik nanoparçacı klarını n geliştirilmesi ve optimizasyonu. *Uzman Görüşü İlaç Dağı tı mı* 11(1):31-43.
- Costa P, Sousa JM. 2001. Çözünme profillerinin modellenmesi ve karşı laştı rılması . *Eur J Pharm Sci.* 13(2):123-133.
- Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jerome C, Marchand-Brynaert J, Feron O, Pr eat V. 2009. Paklitaksel yüklü PEGİlatlı PLGA

- bazlı nanopartiküller: in vitro ve in vivo değerlendirme. *J Kontrol Serbest Bı rakma*. 133(1):11-17.
- Dillen K, Vandervoort J, Mooter GV, Ludwig A. 2006. Ciprofloxacin-loaded Eudragit RS100 veya RL100/PLGA nanoparçacı kları nı n değerlendirilmesi. *Int J Ecz*. 314(1):72-82.
- Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr ye V. 2006. Proteinlerin ve aşı ları n potansiyel oral dağı tı m sistemleri olarak nanopartiküller: mekanik bir yaklaşım. *J Kontrol Serbest Bı rakma*. 116(1): 1-27.
- Emilia Juan M, Buenafuente J, Casals I, Planas JM. 2002. Sı çanlarda plazmatik trans-resveratrol seviyeleri. *Gı da Res*. 35(2-3):195-199.
- Elshafeey AH, Kamel AO, Awad GA. 2010. Amonyum metakrilat birimleri polimer içeriği ve bunları n insan gönüllülerde asiklovir koloidal nanopartiküllerin özellikleri ve biyoyararlanı mı üzerindeki etkisi. *Kolloidler Surf B Biointerfaces*. 75(2):398-404.
- Fremont L. 2000. Resveratrolün biyolojik etkileri. *Hayat Bilimi* 66(8): 663-673.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammouy N, Benita S. 1989. Çözücü yer değiştirmesini takiben arayüzey polimer biriktirme ile nanokapsül oluşumu. *Int J Ecz*. 55(1):R1-R4.
- Gupta S, Dube A, Vyas SP. 2012. Deneysel visseral leishmaniasis'e karşı amfoterisin B yüklü katı lipid nanopartiküllerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu. *PNT*. 1(1):54-67.
- Gupta S, Gupta MK. 2017. Rahim ağzı kanserine karşı ilaç dağı tı mı nda nano taşı yı cı ları n olası rolü. *Nano Rev Exp*. 8(1):1335567.
- Gupta S, Kumar P. 2012. Nano taşı yı cı lar kullanı larak ilaç dağı tı mı : Hint perspektifi. *Proc Natl Acad Sci Hindistan Sect B Biol Sci*. 82(S1): 167-206.
- Gupta S, Kumar P, Gupta MK, Vyas SP. 2012. Koloidal taşı yı cı lar: tüberküloz tedavisi için yükselen bir araç. *Crit Rev Ther İlaç Taşı yı cı Sist*. 29(4):299-353.
- Ghosal S. 2003. Farmasötik, beslenme için dağı tı m sistemi ve kozmetik bileşenler. ABD patenti no. 6558712.
- Intagliata S, Modica MN, Santagati LM, Karadağ L. 2019. Resveratrol sistemik ve topikal biyoyararlanı m yeteneğini geliştirmeye yönelik stratejiler: Bir güncelleme. *antioksidanlar*. 8(8):244.
- [ PMC ücretsiz makalesi ] [ PubMed ] Jiang Z, Chen K, Cheng L, Yan B, Qian W, Cao J, Li J, Wu E, Ma Q, Yang W. 2017. Resveratrol ve kanser tedavisi: güncellemeler. *Ann NY Acad Sci*. 1403(1):59-69.
- Jahanshahi M, Najafpour G, Rahimnejad M. 2008. İlaç verme araçları olarak sı ğı r serum albümini (BSA) nanoparçacı kları nı n optimize edilmiş üretimi için Taguchi yöntemini uygulamak. *Afr J Biotechnol*. 7(4):362-367.
- Kong YC, Ama PPH, Ng KH, Cheng KF, Cambie RC, Malla SB. 1987. Napalese her derde deva ilaç üzerinde kimyasal araştı rmalar; Shilajit. *Int J Ham İlaç Arş*. 25(3):179-187.
- Kristl J, Teskac K, Caddeo C, Abramovic Z, Sentjunc M. 2009. Lipo bazı ları nda Resveratrol üzerindeki hücrel stres yanı tı nı n iyileştirilmesi. *Eur J Pharm Biopharm*. 73(2):253-259.
- Kang OH, Jang HJ, Chae HS, Oh YC, Choi JG, Lee YS, Kim JH, Kim YC, Sohn DH, Park H, Kwon DY. 2009. Aktif HMC-1 hücrelerinde resveratrolün anti-enflamatuvar mekanizmaları : NF-kappaB ve MAPK'nı n önemli rolleri. *Farmakol Arş*. 59(5):330-337.
- Kumar N, Chaurasia S, Patel RR, Khan G, Kumar V, Mishra B. 2017. Gelişmiş oral biyoyararlanı m, güvenlik ve etkinlik profili ile atorvastatin kalsiyum kapsüllü eudragit nanoparçacı kları . *Eczacı lı k Dev Technol*. 22(2):156-167.
- Kurin E, Mucaji P, Nagy M. 2012. Üç kı rrmı zı şarap polifenolünün ve karı şı mları nı n in vitro antioksidan aktiviteleri: bir etkileşim çalı şması . *moleküller*. 17(12):14336-14348.
- Kim S, Ng WK, Dong Y, Das S, Tan RBH. 2012. Hazı rlı k ve trans-resveratrol fizikokimyasal karakterizasyon de Iqgi
- sı cı klı k kontrollü antisolvent çökteltme ile nanopartiküller. *J Gı da Müh*. 108(1):37-42.
- Kumar N, Chaurasia S, Patel RR, Kumar V, Mishra B. 2014. Atorvastatin kalsiyum yüklü oral biyobozunur polimerik nanopartiküllerin merkezi bileşik tasarımı kullanı larak geliştirilmesi ve optimizasyonu. *Adv Sci Lett*. 20(5):984-993.
- Kim JH, Park EY, Ha HK, Jo CM, Lee WJ, Lee SS, Kim JW. 2016. Resveratrol yüklü nanopartiküller, oksidatif strese karşı antioksidan aktiviteyi indükler. *Asya-Avustralya J Anim Sci*. 29(2): 288-298.
- Lu Z, Cheng B, Hu YL, Zhang YH, Zou GL. 2009. Resveratrolün siklodekstrinlerle kompleks oluşturması : çözünürlük ve antioksidan aktivite. *Gı da Kimyası* 113(1):17-20.
- Lopedota A, Trapani A, Cutrignelli A, Chiarantini L, Pantucci E, Curci R, Manuali E, Trapani G. 2009. Glutatyonun transmukozal uygulaması için Eudragit RS 100/ siklodekstrin nanopartiküllerinin kullanı mı . *Eur J Pharm Biopharm*. 72(3):509-520 .
- Lu X, Ji C, Xu H, Li X, Ding H, Ye M, Zhu Z, Ding D, Jiang X, Ding X ve diğerleri. 2009. Resveratrol yüklü polimerik miseller, hücreleri Abeta kaynaklı oksidatif stresten korur. *Int J Ecz*. 375(1-2): 89-96.
- Mainardes RM, Evangelista RC. 2005. Prazikuantel içeren PLGA nanoparçacı kları : formülasyon değişkenlerinin boyut dağı lı mı üzerindeki etkisi. *Int J Ecz*. 290(1-2):137-144.
- Mirza MA, Agarwal SP, Rahman MA, Rauf A, Ahmad N, Alam A, Iqbal Z. 2011. Bir anti epileptik ilacı n oral ilaç iletiminde hümk asidin rolü. *İlaç Geliştirme San. Ecz*. 37(3):310-319.
- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamonds EP, Soleas G, Goldberg DM. 1995. Kı rrmı zı şarap fenolikleri trans-resveratrol ve quercetin, insan trombosit agregasyonunu ve eikosanoid sentezini bloke eder: koroner kalp hastalı ğı na karşı koruma için çı karı mlar. *Clin Chim Açta*. 235(2):207-219.
- Patel RR, Khan G, Chaurasia S, Kumar N, Mishra B. 2015. Kromolin sodyum için bir dağı tı m aracı olarak rasyonel olarak geliştirilen çekirdek-kabuk polimerik-lipid hibrit nanopartiküller: oral kullanı mda nanopartiküllerin in vitro ve in vivo davranı şı üzerinde lipid zarfı n etkileri yönetim. *RSC Av*. 5(93):76491-76506.
- Pietro M, Paola C. 2004. Kentsel katı atı k aerobik kompostlama işleminde organik madde gelişiminin değerlendirilmesi için termal analiz. *Termokim Açta*. 413(1-2):209-214.
- Quintanar D, All emann E, Fessi H, Doelker E. 1998. Hazı rlama teknikleri ve önceden oluşturulmuş polimerlerden biyobozunur nanoparçacı kları n oluşum mekanizmaları . *İlaç Geliştirme San. Ecz*. 24(12):1113-1128.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Geliştirilmiş bir ABTS radikal katyon renk giderimi testi uygulayan antioksidan aktivite. *Serbest Radik Biol Med*. 26(9-10): 1231-1237.
- Sharma U, Badyal PN, Gupta S. 2015. Beyne polimerik nanopartikül ilaç dağı tı mı : bir inceleme. *Int J Pharmacol Pharmaceut Sci*. 2(5):60-69.
- Sharma S, Kumar P, Jaiswal A, Dube A, Gupta S. 2011. Deneysel visseral leishmaniasis'e karşı doksorubisin yüklü mikropartiküllerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu. *J Biomed Nanoteknoloji* 7(1):135-136.
- Signorelli P, Ghidoni R. 2005. Bir antikanser besin maddesi olarak Resveratrol: moleküler temel, açı k sorular ve vaatler. *J Nutr Biochem*. 16(8):449-466.
- Şah Başkan Yardı mcı sı , Amidon GL. 2014. GL Amidon, H. Lennernas, VP Shah ve JR Crison. Bir biyofarmasötik ilaç sı nı flandı rması için teorik bir temel: in vitro ilaç ürününün korelasyonu

- çözünme ve in vivo biyoyararlanımı, *Pharm Res* 12, 413-420, 1995-BCS'nin geçmişi. *Aaps J.* 16(5):894-898.
- Singh G, Pai RS, Pandit V. 2012. Eklenmiş insan plazması nda trans-resveratrolün belirlenmesi için bir HPLC yönteminin geliştirilmesi ve doğrulanması. *J Adv Pharm Technol Res.* 3(2):130-135.
- Santos KCD, Silva MF, Pereira-Filho ER, Fernandes JB, Polikarpov I, Forim MR. 2012. Bir tiroid hormonu olan 3,5,3'-triyodotiroasetik asit (Triak) yüklü polimerik nanoparçacı klar: faktöriyel tasarımı, karakterizasyon ve salınım kinetiği. *Nanoteknoloji Bilim Uyg.* 5:37-48.
- Singh S, Muthu MS. 2008. Risperidonun biyobozunur polimerik nanopartikülleri üzerine çalışmaları: in vitro ve in vivo değerlendirme. *Nanoteknoloji (Londra).* 3(3):305-319.
- Seremeta KP, Reyes Tur MI, Perez SM, Hocht C, Taira C, Hernandez ODL, Sosnik A. 2014. Gelişmiş oral biyoyararlanımı için püskürtülerek kurutulmuş didanosin yüklü polimerik parçacı klar. *Kolloidler Surf B Biointerface.* 123:515-523.
- Tariq M, Alam MA, Singh AT, Iqbal Z, Panda AK, Talegaonkar S. 2015. Epirubisinin ağrı dandan verilmesi için biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanopartiküller: in vitro, ex vivo ve in vivo araştırmalar. *Kolloidler Surf B Biointerface.* 128:448-456.
- Tabata Y, Ikada Y. 1990. Makrofajlar tarafından polimer mikrokürelerin fagositozu. *Adv Polym Sci.* 94:107-141.
- Vella R, Bowen C, Fenning A. 2008. Resveratrol ile hipertansif sıçanlarda kardiyovasküler hasarı önlenmesi. *Kalp Akciğer Sirk.* 17S:S219-S41.
- Visser SA, Mendel H. 1971. Hüyük asitlerin kristal çizgileri ve moleküler ağırlıkları üzerine X-ışını kırınım çalışmaları. *Toprak Biol Biyokim.* 3(3):259-265.
- Walle T. 2011. Resveratrolün biyoyararlanımı. *Ann NY Acad Sci.* 1215:9-15.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. 2004. Oral resveratrolün insanlarda yüksek emilimi ancak çok düşük biyoyararlanımı. *İlaç Metab Bertarafı* 32(12):1377-1382.
- Wan L, Sun X, Wang X, Li Y, Yu Q, Guo C. 2011. Stereospesifik bir HPLC yöntemi ve bunun sıçanlarda iki naringenin enantiyomerinin farmakokinetik profilinin belirlenmesinde uygulanması. *J Chromatogr Sci.* 49(4):316-320.
- Wong CF, Yuen KH, Peh KK. 1999. Kontrollü salınım Eudragit yanak bantları nın formülasyonu ve değerlendirilmesi. *Int J Ecz.* 178(1): 11-22.
- Wang XQ, Dai JD, Zhang H, Zhang X, Wang JC, Zhang Q. 2008. Sıçanlarda siklosporin A yüklü pH'a duyarlı nanoparçacı kların emilim mekanizması. *J Nanosci Nanoteknol.* 8(5): 2422-2431.
- Yadav S, Gupta S. 2015. Göğüs kanseri tedavisinde potansiyel kullanımı için dosetaksel yüklü ligand ekli katı yağ nanoemülsiyonları nın geliştirilmesi ve in vitro karakterizasyonu. *Artif Hücreler Nanomed Biyoteknol.* 43(2):93-102.
- Zu Y, Zhang Y, Wang W, Zhao X, Han X, Wang K, Ge Y. 2016. Resveratrol yüklü karboksümetil kitosan nanoparçacı kları nın hazırlanması ve in vitro/in vivo değerlendirmesi. *Uyuşturucu Dağıtımı* 23(3): 981-991.