



Madde

Floresan Spektrumunda İkinci Dereceden Saçılma Söndürme Ahır Oluşum İzleyicisi Olarak Doğal Humatlar

Zayıf Çözünürlüğün Verilmesi için Supramoleküler Sistem Mangiferin ve Favipiravir Örneği Üzerine Antiviral İlaçlar

Mariya A. Morozova *  Vladimir N. Tumasov, İlahı V. Kazımova, Tatiana V. Maksımova, Elena V. Uspenskaya ve Anton V. Syroeshkin 

Farmasötik ve Toksikolojik Kimya Bölümü, Tıp Enstitüsü, Rusya Halkların Dostluk Üniversitesi (RUDN Üniversitesi), 6 Miklukho-Maklaya Caddesi, 117198 Moskova, Rusya; vyldemar@mail.ru (VNT); kazymova-iv@rudn.ru (IVK); maximova-tv@rudn.ru (TVM); uspenskaya-ev@rudn.ru (EVU); syroeshkin-av@rudn.ru (AVS)

* Yazışma: gor-mariya@yandex.ru; Tel.: +7-915-460-83-18

Özet: Mevcut çalışmada, potansiyel bir ilaç dağıtım sistemi olarak hümit maddeler kompleksinin (HC) sulu seyreltilerinin optik özelliklerini incelemek için dinamik ışık saçılımı ve floresans spektroskopisi yöntemleri uygulandı. Hümit solüsyonundaki supramoleküler yapılar, kuru madde konsantrasyonunda bir azalma ile partikül boyutunda azalma eğilimi gösteren mikron altı aralığı monodispers sistemleri olarak karakterize edildi. Üzerinde çalışılan sulu HC seyreltilerinin hafif alkali ortamı (8.3), 400 ila 500 nm arasındaki bölgede belirgin bir maksimum floresans olmamasına neden olur. Bununla birlikte, $2\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{em}}$ 'de analitik olarak anlamlı, konsantrasyonla ters orantılı ikinci dereceden saçılma (SOS) sinyalinin varlığı gösterilmiştir. Antiviral maddeler mangiferin ve favipiravir örneklerinde, hümit kompleksin bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasının çözünürlüğü birkaç kat artırmayı ve aynı anda daha küçük bir dağılmış faz parçacık boyutuna sahip bir sistem elde etmeyi mümkün kıldığı gösterilmiştir. HC'nin mangiferin ve favipiravir ile etkileşerek kararlı yapılar oluşturabildiği ve bunun da HC SOS spektrumları üzerindeki SOS yoğunluklarında önemli bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Saçılma dalga boyları, $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ sırasıyla mangiferin için 350 nm/750 nm ve favipiravir için 365 nm/730 nm'de kaydedildi.

Saçılma yoğunluklarındaki (I0/I) artışların, belirli bir konsantrasyon aralığında antiviral bileşenlerin konsantrasyonu ile orantılı olduğu ortaya çıktı.

Anahtar Kelimeler: hümit madde; İlaç dağıtım sistemi; nanoparçacıklar; antiviral ilaçlar; mangiferin; favipiravir; ikinci dereceden saçılma söndürme



Atf: Morozova, MA; Tumasov,

VN; Kazımova, İV; Maksımova,

TELEVİZYON; Uspenskaya, EV; Syroeshkin,

AV'nin Floresan Spektrumunda İkinci Derece

Saçılma Söndürme

İz Olarak Doğal Humatlar

Mangiferin ve Favipiravir Örneği Üzerine

Zayıf Çözünen Antiviral İlaçların Verilmesi

İçin Kararlı Supramoleküler Sistem

Oluşumu. Eczacılık 2022, 14, 767. [https://](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040767)

doi.org/10.3390/pharmaceutics14040767

Akademik Editör: Ja-Hyoung Ryu

Geliş tarihi: 26 Şubat 2022

Kabul tarihi: 29 Mart 2022

Yayın tarihi: 31 Mart 2022

Yayıncının Notu: MDPI, yayımlanan haritalardaki

ve kurumsal bağlantılardaki yetki iddiaları

konusunda tarafsız kalır

ilişkiler.



Telif hakkı: © 2022 yazarlara aittir.

Lisans Sahibi MDPI, Basel, İsviçre.

Bu makale açık erişimli bir makaledir

şartlar altında dağıtılır ve

Creative Commons koşulları

Atf (CC BY) lisansı ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

1. Giriş

Hedefli ilaç dağıtımı, kimyagerler ve farmakologlar için yeni bir araştırma ve üretim görevi olmaktan çok uzak, ancak yine de çok alakalı görünüyor; Etkili ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımı ve sentezi, tıp ve sağlık hizmetleri için hayati öneme sahiptir [1].

Genel olarak, taşıyıcı moleküller, ücretsiz terapötiklerin sınırlamalarının üstesinden gelmelerine ve farklı seviyelerde biyolojik engelleri aşmalarına izin veren nanometre doğrusal boyutları ile karakterize edilir [2]. Nanosistemler çeşitli morfolojilerle temsil edilir: nanokapsüller, nanoküreler, lipozomlar, dendrimerler, hidrojel, vb., ancak yapısından bağımsız olarak hepsinin amacı terapötiklerin toksisitesini azaltmak ve zayıf biyoyararlanım ve düşük doku absorpsiyonunun üstesinden gelerek bunların dağıtımını iyileştirmektir [3-6]. Dağıtım sisteminin seçimi, nihai ürünün özelliklerini büyük ölçüde belirler. Yapay malzemelerle karşılaştırıldığında, doğal malzemeler biyoyoumluluk, kolay erişilebilirlik ve modifikasyon açısından üstünlük gösterir, genellikle düşük toksisiteye ve potansiyel olarak uygun farm

Bununla birlikte, ilaç taşıyıcıları olarak doğal polimerlerin muazzam potansiyeli hala yetersiz temsil edilmektedir ve daha fazla ilgiyi hak etmektedir [1].

Doğal polimerler arasında , doğal kalıntıların çürümesi sonucu karasal toprakta, doğal sularda ve tortullarda yaygın olarak bulunan hümitik maddeleri içeren hümitik asitlerin (HA'lar) makromolekülleri ayırt edilebilir [9]. HA'ların karmaşık ve heterojen doğası, kimyasal bileşimlerinin doğru bir şekilde karakterize edilmesini engellese de, bu karbon içeren bileşiklerin, ana fonksiyonel gruplar olarak karboksil ve fenol ile esnek doğrusal polimerler olduğu kabul edilir, bu nedenle nötr pH'ta HA'ların olduğu bilinmektedir. hidrofobik etki ve moleküller arası hidrojen bağları ile stabilize edilmiş kümeler [10]. HA polimerlerindeki çevresel gözeneklerin, klatrat tipi bir düzenlemede doğal ve sentetik organik kimyasalları barındırabileceğine inanılmaktadır. [11]' e göre , Has gibi biyomalzemeler, çeşitli ilaç kombinasyonlarında çözünürlüğü, geçirgenliği ve çözünmeyi uzatır . Örneğin, [12]' de, karbamazepinin biyoyararlanımı, hümitik maddelerle kompleks oluşumu yoluyla iyileştirildi, ketokonazolün çözünme hızı, miselleşme doğası [13], hümitik asit tuzları ve papaverin arasındaki etkileşim nedeniyle hümitik asitle bir kompleks içinde önemli ölçüde arttı. hidroklorür, benzoheksonyum ve B-grubu vitaminleri deneysel olarak [14]'te keşfedilmiştir, vb.

Aynı zamanda, HA'lar basitçe aktif bir ilacın inert bir taşıyıcısı olarak kabul edilemez; bu bileşikler, farmakolojik aktivitelerinin çeşitliliği açısından olağanüstüdür ve sıklıkla verilen terapötikler üzerinde güçlendirici bir etkiye sahip olabilir [15]. Hem çıplak hem de zarflı DNA virüslerine karşı HA aktivitesi , Coxsackie A9 virüsü, Influenza A virüsü, Herpes simpleks virüsü tip 1, immün yetmezlik virüsü tip 1 ve tip 2 ve sitomegalovirüs [11] ile ön in vitro çalışmalarda kanıtlanmıştır. HA'ların yeni bir şiddetli akut solunum sendromu olan koronavirüs 2'ye (SARS-CoV-2) [16] karşı yakın zamanda belirlenen spesifik virüsidal aktivitesi, bu doğal polimerleri özellikle ilgi çekici hale getirmektedir, çünkü HA'lar aynı anda antiviral ilaçlar için bir taşıma sistemi olarak hareket edebilir ve aynı zamanda kendi aktif özelliklerinden dolayı terapötik etkilerini arttırlar. Bu, aktif içeriklerinin düşük çözünürlük/geçirgenlik nedeniyle oral biyoyararlanımının zayıf olmasına rağmen, şu anda piyasada bulunan antiviral ilaçların çoğunun oral tabletler olduğu gerçeği göz önüne alındığında öz Bu nedenle, antiviral ilaçların HA'lar gibi gelişmiş dağıtım sistemlerine yüklenmesi , yukarıda belirtilen dezavantajların üstesinden gelinmesine yardımcı olabilir.

Bu makale , HA kompleksi ile farklı moleküler yapılarla sahip iki antiviral farmasötik arasındaki etkileşim sürecini açıklayan bazı yeni sonuçlar sunmaktadır . İlki, favipiravir (5-floro-2-okso-1H-pirazin-3-karboksamid), nihayetinde viral transkripsiyonu önleyen RNA'ya bağımlı RNA polimerazı bağlama ve inhibe etme yeteneğine sahip sentetik bir ilaç ve bir nükleosid analogudur. ve çoğaltma. Favipi ravir, bazı COVID-19 vakalarında iyi iyileşme gösterdi [18], ancak optimal uygulama zamanlaması, dozajı ve tedavi süresi dahil olmak üzere koronavirüs için bir terapi olarak tam potansiyeli henüz belirlenmedi [19-21]. İkincisi, mangiferin (1,3,6,7-tetrahidroksi-C2-β-D-glukozit), çeşitli cinslerin yüksek bitkilerinde önemli bir seviyede bulunan bir ksanton glukozittir ; çeşitli bozukluklarda farklı oksidatif mekanizmalar üzerinde immün modüle edici etkilere sahiptir [22]. Rusya Federasyonu'nda bu madde, Alpizarin® adı altında Herpes simpleks tip 1 ve 2, Herpes zoster, Varicella zoster ve sitomegalovirüsler. Koronavirüs tedavisine gelince, mangiferin, SARS-CoV-2 için güçlü bir moleküler reseptör olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 ile siliko bağlanma afinitesi gösteren fenolik bileşiklerden biriydi [23,24].

Ek olarak, mangiferinin, makrofajlarda NLRP3 inflammatuar aktivasyonunu inhibe ederek akciğer hasarına ve inflammatuar cevaba karşı koruduğu için, solunum yolu enflamasyonunu tedavi etme ve yönetme konusunda ümit verici bir terapötik etki sağladığı bulunmuştur [25,26].

Bu ilaç maddeleri, sınırlı çözünürlükleri nedeniyle her ikisinin de verilmesinin zor olması ve yaygın organik çözücüler ve su ile formüle edilmelerinin zor olması açısından birbirine yakındır [27]. Mangiferin, biyofarmasötik sınıflandırmayı takiben, düşük çözünürlüğe ve düşük biyoyararlanıma sahip bir sınıf IV bileşik olarak sınıflandırılabilir [28]. Belirli çözünürlük-

nanoemülsiyonlar, fosfolipid kompleksi, siklodekstrin inklüzyon kompleksi ve lipozom gibi teknolojiler, mangiferinin çözünmesini ve biyoyararlanımını artırabilir, ancak çok sayıda ekşiyan, potansiyel toksisite sorunlarına yol açabilir [29]. Favipiravir ayrıca zayıf suda çözünürlüğe sahiptir, ancak in vitro çalışmalardan elde edilen verilere göre, sınıf I bileşiklerin bir temsilcisi olarak kabul edilebilir [17,30]. Oral uygulamada, %90'dan fazla biyoyararlanıma sahip olarak iyi emilir; bununla birlikte, yüksek dozlarda oral uygulanan tabletler (3600 mg/gün) yan etki riskini artırabilir [27,31].

Bu nedenle, favipiravir veya mangiferinin çok yönlü, düşük toksik bir dağıtım sistemi oluşturmak için basit ve etkili bir yaklaşımın geliştirilmesi gerekir. Bu amaçlar için, HA'ların doğal makromoleküllerini kullanmayı öneriyoruz, çünkü bunlar konuk moleküller için ortamın modifikasyonunu sağlayarak özelliklerini değiştiriyorlar.

2. Gereç ve Yöntemler 2.1.

Reaktifler 2.1.1. Sahip olmak

VimaVita şirketinin (LLC System BioTechnologies, Moskova, Rusya) patentli teknolojisine göre alçak arazi turbasından izole edilmiş sıvı konsantre hümik-fulvik asit kompleksi kullandık. Arıtılmış su ve aktif bileşenleri (HA'lar, himatomelanik asitler, fulvik asitler ve hümik maddelerin yapısal analogları) içeren konsantre hümik kompleks (HC), lignin içeren ham maddelerin oksidatif-hidrolik bozunması ve ardından yüksek yoğunluklu akustik temizleme ile elde edildi. Test hazırlığı, pH = $7,98 \pm 0,1$ ve kuru madde içeriği 7,34–10 g/mL olan konsantre koyu kahverengi viskoz bir sıvıydı [16]. Antiviral ilaçlar için bir dağıtım sistemi olarak hümik kompleksin özelliklerini incelemek için, orijinal preparasyon kullanılmadı, hacimce 1:500 ila 1:3000 oranındaki sulu seyreltileri kullanıldı. Seyreltme için, Milli-Q® saflaştırma sistemi (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılarak elde edilen yüksek düzeyde saflaştırılmış su kullanıldı. Araştırılan tüm çözeltiler, oda sıcaklığında 24 saatten fazla saklanmadı.

2.1.2. Sığır Serum Albümini (BSA)

Küçük, kararlı ve orta derecede inert protein BSA, bir koloidal dağılım referansı olarak kullanıldı (CAS 9048-46-8, moleküler ağırlık 66 kDa, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD). Solüsyonun konsantrasyonuna bağlı olarak flüoresan söndürmeyi incelemek ve dispersiyon bileşimini değerlendirmek için numuneler, kuru BSA'nın maksimum 10 mg/mL konsantrasyondan başlanarak suda (Milli-Q® saflaştırma sistemi) çözülmesiyle hazırlandı.

2.1.3. Farmasötik Maddeler

HC'ye dayalı dağıtım sisteminin işlevselliği, iki antiviral madde - favipiravir (LLC "CHROMIS", Moskova, Rusya) ve Pharmcenter VILAR CJSC (Moskova, Rusya) tarafından üretilen mangiferin kullanılarak belirlendi. Her iki madde de tüm kontrol aşamalarından geçti ve uygun kalitedeydi. Test edilen maddeler için solüsyon konsantrasyonu düzenleyici belgelerde sunulan çözünürlük değerlerine göre seçilmiştir: sırasıyla suda az çözünür (100–1000 mL/g) ve pratik olarak çözünmez (10.000 mL/g'den fazla) favipiravir ve mangiferin.

2.2. Floresan ve Saçılma Spektroskopisi

Floresan spektroskopisi yöntemi, seyreltme sırasında albümin ve hümik kompleksin koloidal sistemlerinin özelliklerinin karşılaştırmalı bir çalışması için ve ayrıca aktif maddelerin bir dağıtım ile etkileşimi sırasında ikinci dereceden saçılma (SOS) söndürme olgusunu incelemek için uygulandı. humatlara dayalı sistem. Floresans ölçümleri, iki ultra hızlı tarama monokromatörü ile bir Cary Eclipse spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, ABD) üzerinde 1 cm'lik bir kuvars hücre kullanılarak yapıldı. Uyarma ve emisyon yarığının genişliği 5 nm'de ayarlandı. Heyecan verici dalga boyları literatür verileri ve analiz sonuçları dikkate alınarak se

absorpsiyon spektroskopisi yöntemiyle (Cary 60, Agilent Technologies , Inc., ABD) [32,33] test bileşiklerinin. Uyarma ve emisyon/saçılma dalga boyları sırasıyla HC $\lambda_{\text{lex}} = 350 \text{ nm}$, BSA $\lambda_{\text{lex}} = 460/700 \text{ nm}$ ve favirovir $\lambda_{\text{lex}} = 280 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{sos}} = 340/360 \text{ nm}$. mangiferin $\lambda_{\text{sos}} = 700 \text{ nm}$.

2.3. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Çözünmüş antiviral ilaçlarla albümin, hümk kompleks ve HC'nin koloidal sistemlerindeki nanopartiküllerin boyutunu ölçmek için dinamik ışık saçılımına dayalı bir Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Worcestershire, BK) kullanıldı. Bu amaçla , sırasıyla HC için $1,47 \times 10^{-4}$ ila $2,45 \times 10^{-5}$ g/mL ve BSA için 1×10^{-2} ila 1×10^{-5} g/mL konsantrasyonlara sahip koloidal polielektrolit nanopartiküllerin sulu dispersiyonları hazırlandı. tedarikli. Test edilen maddelerin deneyde elde edilmesi mümkün olan maksimum konsantrasyonlarda (mangiferin için 1×10^{-4} g/mL ve favirovir için 2×10^{-3} g/mL) HC içindeki çözeltileri de incelenmiştir. nanoyapıların ve 1 mL numune ile doldurulmuş tek kullanımlık polistiren küvetler kullanıldı. Her boyut tespiti için, üç tekrarlı ölçüm yapıldı ve ortalama boyut değeri hesaplandı. Her ölçüm 12 çalışmadan oluşuyordu. kırılma indisi değeri 1.334 idi.

2.4. Veri İşleme Veri

analizi, n = 3 bağımsız deneyden elde edildi ve ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunuldu. Veri işleme ve çizim, OriginPro 2017 (OriginLab, Northampton, MA, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

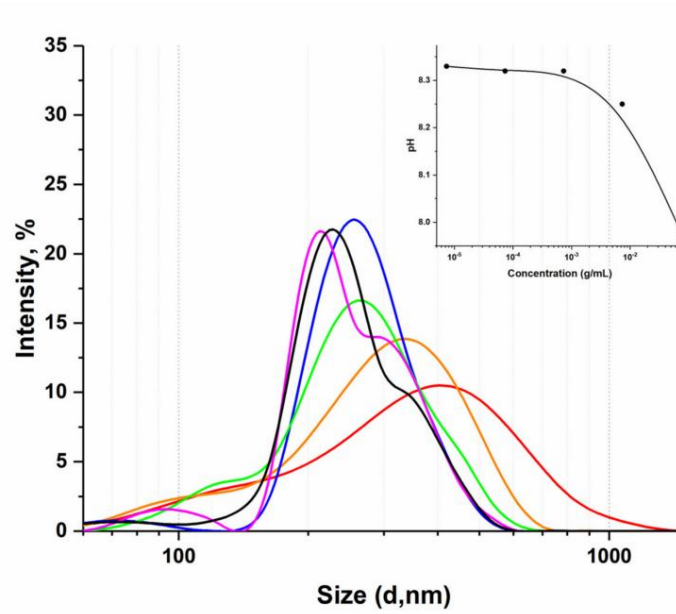
3. Sonuçlar ve tartışma

3.1. HC'nin Sulu Seyreltmelerinin Supramoleküler Yapısının DLS Yöntemi ile Dispersiyon Analizi

Bu çalışmanın amacı, seyreltik hümk solüsyonlarda bile çözünmüş ilaçlarla kararlı bir sistem oluşumunun mümkün olduğunu sıvı bir hümk kompleks örneği üzerinde göstermekti. Teknoloji , özellikle parçacık boyutu optimizasyonu ve konsantrasyon yükseltici konularında, aynı maddelerin sulu çözeltilerine kıyasla ilaç dağıtımında belirli avantajlar sağlamalıdır . Bunu yapmak için, HC'nin başlangıç konsantrasyonu, ağızdan uygulamaya hazır bir çözelti elde etmek için üreticinin talimatları doğrultusunda su ile seyreltildi. Deney için uygun bir dilüsyon seçerken, bunu HC'nin daha önce belirlenen [16] fizikokimyasal ve virüsidal özelliklerine dayandırdık ve ek olarak , seyreltmeye bağlı olarak değişen bitmiş dispers sistemin boyutsal özelliklerini de göz önünde bulundurduk. Bu nedenle, bir ortamda rastgele hareket eden makromoleküllerin boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılan dinamik ışık saçılımı yöntemi (foton korelasyon spektroskopisi) kullanılarak [34,35], hümk kompleksin parçacıklarının çapının seyreltme ile azaldığı gösterilmiştir. (Şekil 1).

Bu sonuç, hümk maddelerin moleküler ve supramoleküler yapısına ilişkin çağdaş kavramları doğrulamaktadır: bunlar, makromoleküler polimerler değil, daha ziyade, büyük ölçüde hidrofobik dispersiyon kuvvetleri tarafından bir arada tutulan nispeten küçük heterojen moleküller tarafından kendiliğinden bir araya getirilen, görünürde büyük boyutlu üst yapılarıdır [36,37].

Başka bir uyumlu teori , amfifilik hümk moleküllerin iç hidrofobik bölgeleri ve dış hidrofilik bölgeleri ile miseller oluşturarak hümk moleküllerin sürfaktan benzeri bir agregasyonunu tarif eder [38]. Amfifilik doğası nedeniyle, humatlar sulu bir çözelti içinde kendiliğinden organize olma eğilimindedir ve sentetik yüzey aktif maddeler tarafından oluşturulanlara benzer misel benzeri yapılar oluşturur. Bununla birlikte, hümk miseller özdeş monomerlerden değil, farklı moleküler boyutlardaki çeşitli türlerden oluşur [39].



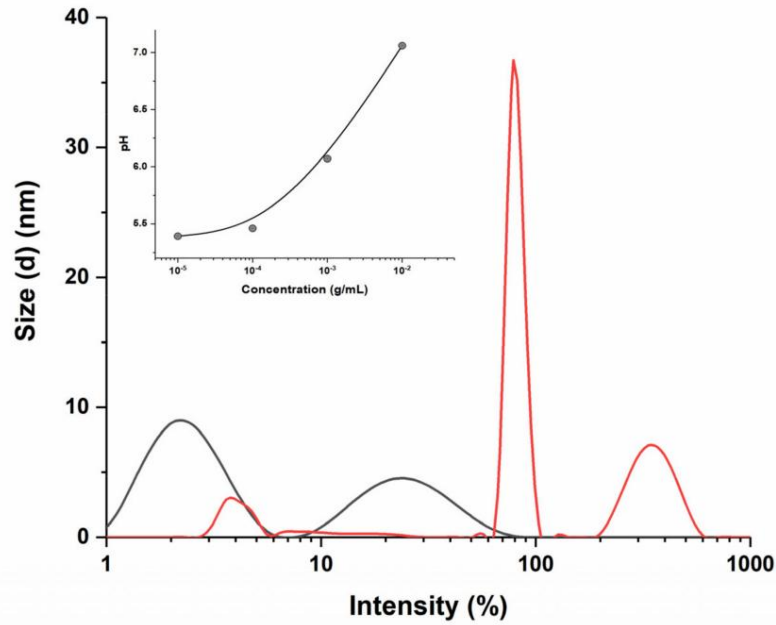
Şekil 1. HC dilüsyonlarının (v/v) nano dağılımındaki parçacık boyutu dağılımı: kırmızı—1:500 ($14,7 \times 10^{-3}$ g/mL); turuncu—1:1000 ($7,34 \times 10^{-3}$ g/mL); mavi—1:1500; yeşil—1:2000 ($3,67 \times 10^{-3}$ g/mL); siyah—1:2500 ($2,94 \times 10^{-3}$ g/mL); mor—1:3000 ($2,45 \times 10^{-3}$ g/mL); Konsantrasyona (g/mL) pH bağımlılığı ekte gösterilmiştir.

Şekil 1'den, hümitik kompleks seyreltildiğinde, bir sıra içinde bile, supramoleküler yapının daha küçük parçacıkların salınmasıyla bozulduğu sonucu çıkar. Böylece, konsantrasyonun $1,47 \times 10^{-4}$ (1:500)'den $2,45 \times 10^{-5}$ (1:3000) g/mL'ye düşmesi, mevcut parçacıkların çapında 150 nm azalmaya yol açar. HC'nin 1 ila 2000 ($3,67 \times 10^{-3}$ g/mL) hacim oranında seyreltilmesi, monomodal bir dağılımı korurken en küçük parçacık boyutuna ($d = 296 \pm 23$ nm) karşılık gelir; müteakip seyreltmeler (1:2500, 1:3000), belirgin iki maksimum boyuta sahip bir çoklu dağılım sistemi verir.

Parçacık boyutunda azalma eğilimini korurken monodispersite, bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kabul edilen hümitik kompleksin açık bir avantajıdır. Bu nedenle, örneğin, hümitik maddeler gibi proteinler, ancak yapılarında amino asit moleküllerinin iyonize kalıntılarından dolayı, sulu polielektrolit çözeltilerinde ortak olan bazı özellikler sergilerler [40]. Sonuç olarak, geleneksel tedavinin çeşitli sınırlamalarının üstesinden gelen potansiyel ilaç dağıtım sistemleri olarak da ortaya çıkabilirler [41,42]. Ancak, BSA'nın standart bir koloidal çözeltisinin su ortamındaki davranışını araştırırken, protein çözeltisinin dağılım stabilitesi ve parçacık boyutu dağılımı hakkında sorgulandı [43].

BSA, birçok yaygın globüler protein gibi, yaklaşık 7 nm'lik bir monomer çapıyla hidrodinamik boyut olarak çok küçüktür [44]. Dinamik ışık saçılımı verileri, ilk protein çözeltisinde 10 nm'den daha küçük parçacıkların varlığını doğruladı, ancak aynı zamanda protein çözeltisinde iki sıra seyreltmeden sonra ortaya çıkan agregaların varlığını da belirledik (Şekil 2).

İlk albümin çözeltisi (1×10^{-2} g/mL) pratik olarak nötr bir pH değerine sahiptir; ancak çözelti sırayla seyreltildiğinde, proteinin yetersiz tampon kapasitesi nedeniyle ortamın asitlenmesi gözlenir. İsoelektrik noktaya yaklaştıkça (IEP_{BSA} = 4.5–5.0), protein molekülünün negatif yükü yavaş yavaş nötrale olur ve bu da sistemin agregatif stabilitesinin kaybına yol açar [45]. Şekil 2'de gösterildiği gibi, pH 7.0'da, stoktaki solüsyonda, hidratlı BSA molekülleri, elektrostatik itmeler nedeniyle toplanmaz ve 2 ve 24 nm'lik bir boyut dağılımına sahiptir; bu, tek tek BSA moleküllerinin boyutu ve şekliyle karşılaştırılabilir ($14 \text{ nm} \times 4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$) [46]. pH 5.40'ta, maksimum seyreltmede, DLS, BSA moleküllerinin toplandığını ve çoklu boyut dağılımları gösterdiğini orta-



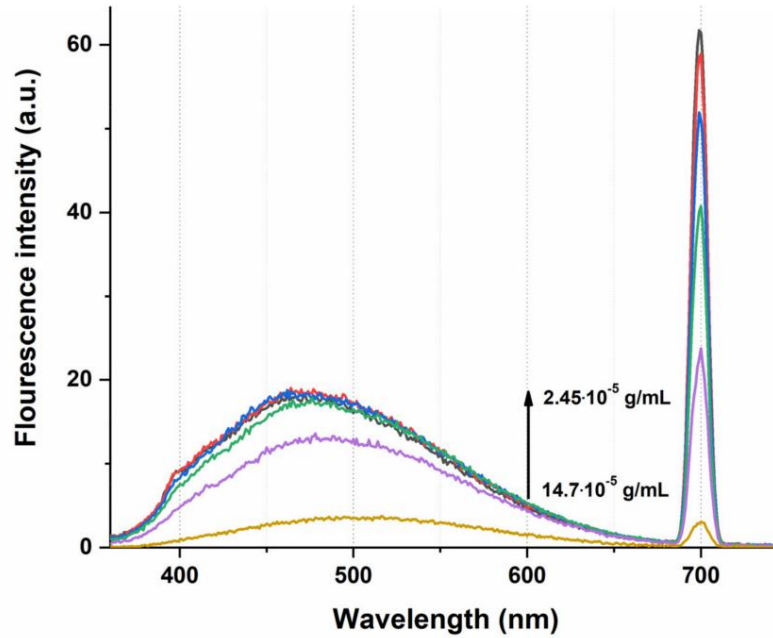
Şekil 2. Protein konsantrasyonuna (g/mL) bağlı olarak BSA kolloid sisteminde partikül boyutu dağılımı: kırmızı çizgi— 1×10^{-5} (0,15 μ M), siyah çizgi— 1×10^{-2} (150 μ M); Konsantrasyona (g/mL) pH bağımlılığı ekte gösterilmiştir.

Hümik kompleksi 1:100 ila 1:10.000 aralığında seyreltirken, çözeltinin pH'ında herhangi bir değişiklik olmaz - 8.33'lük sabit bir değer kalır (Şekil 1). Bu nedenle, BSA'dan farklı olarak hümik maddelerin yapısal özellikleri, seyreltme sırasında pH değerini stabilize etmeyi ve tek dağılımlı bir sistem oluşturmayı mümkün kılar : HC'nin seyreltmeleri, I, %—d, nm eğrisi üzerindeki maksimum dağılımın sola doğru kaymasını gösterir. negatif ζ -potansiyelinin mutlak değerindeki bir artış ise kararlılığın korunduğunu gösterir [16]. Bunun nedeni , polielektrolit çözeltilerinin difüzyon tabakasındaki karşı iyon konsantrasyonundaki azalma nedeniyle çift elektrik tabakasının kalınlığındaki bir artış olabilir [16]. Elde edilen sonuçlar, hümik maddelerin bir ilaç verme sistemi olarak kullanımları açısından avantajlarını doğrulamayı mümkün kılmaktadır .

3.2. HC Supramoleküler Yapıların Çözeltilerinde Floresans ve Saçılma Söndürme

Spektral yöntemler, ilaçların düşük konsantrasyonlarda bağlanma afinitelerini ortaya çıkarmak için güçlü bir araçtır. Özellikle floresan söndürme tekniği, yüksek hassasiyeti, tekrar üretilebilirliği ve göreceli kullanım kolaylığı nedeniyle bağlanma afinitelerini ölçmek ve moleküler etkileşimleri izlemek için bir yöntem olarak kabul edilir [47]. Bu nedenle, konsantrasyon floresan söndürme, kuantum noktaları, protein etkileşimleri, bir ligand-reseptör bağı oluşumu, nanoparçacıkların oluşumu, lipozomlar vb. çalışmalarında kullanılır [48–50]. Bununla birlikte, bu yaklaşımı hümik komplekse dayalı çalışılan taşıma sistemine uygulamak için, kullanılan saf suyun yanı sıra çözücünün kendisinin ve sulu seyreltmelerinin floresan özelliklerini karakterize etmek gerekir. Hümik maddelerin, çoğunlukla polifenolik yapıya sahip bileşikler olarak, 380 ila 480 nm [51–53] aralığında uyarılma üzerine floresan yayma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Humatlar söz konusu olduğunda spektrumdaki emisyon bandının yoğunluğu ortamın pH'ına bağlıdır: fenollerin çoğu nötr veya asidik bir ortamda flüoresan verirken, alkalın bir ortamda fenolik hidroksillerin deprotonasyonu flüoresan olmayan fenolat iyonlarının oluşumuna yol açar . Bu nedenle, önceki çalışmada, sulu seyreltileri 6 ünitenin altında sabit bir pH değerine sahip olan fulvik asitlerle yapılan bir deney sırasında bu fenomeni gözlemledik ve floresans spektrumunda 460 nm bölgesinde belirgin bir yoğun maksimum gözlemlendi [16] . . HC su seyreltmeleri durumunda, çalışma pH aralığı 8 birimden fazladır. Şekil 3'ten de görülebileceği gibi , standart

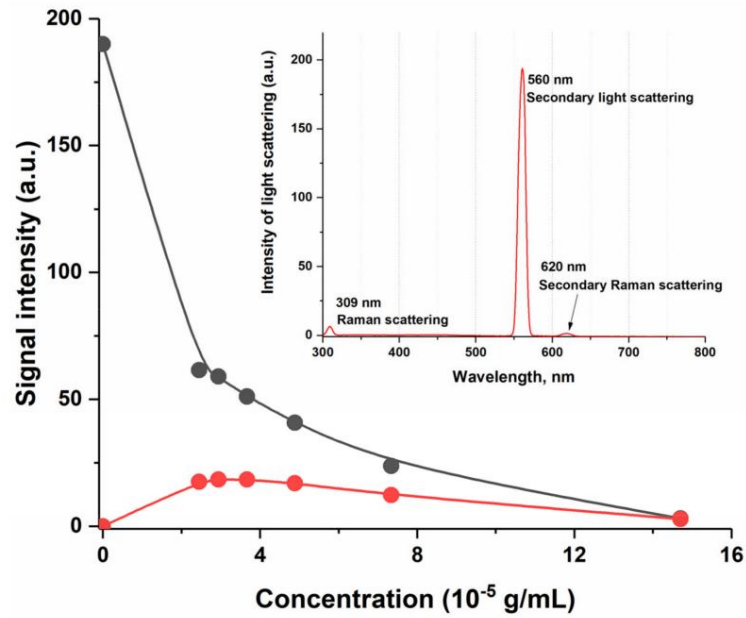
HC sulu dilüsyonlarının (1:500–1:3000) floresans spektrumları üzerindeki hümik bileşiklerin emisyon bandı, ters bir konsantrasyon bağımlılığına sahipken zayıf bir şekilde kendini gösterir.



Şekil 3. $14,7 \times 10^{-5}$ ila $2,45 \times 10^{-5}$ g/mL (1:500–1:3000), $\lambda_{exc} = 350$ nm konsantrasyon aralığında HC sulu dilüsyonlarının floresans spektrumu .

Tipik olarak, seyreltik çözeltilerde, flüoresan yoğunluğu flüorofor konsantrasyonu ile doğru orantılıdır , ancak burada , dinamik ışık saçılımı yöntemiyle elde edilen sonuçları doğrulayan kümeleşmenin neden olduğu söndürmeyi gözlemledik — hümik kompleksin ilk hazırlığının seyreltilmesi yol açar flüorofor nanopartiküllerin sayısında bir artışa . Bununla birlikte, gözlemlenen bağımlılık doğrusal değildir, maksimum floresans değeri, ilk hazırlık 1000 kat seyreltildiğinde elde edilir; bu, $2,94 \times 10^{-5}$ g/mL'lik bir kuru madde konsantrasyonuna karşılık gelir (Şekil 4, kırmızı çizgi); sonraki 2-3 kat seyreltmeler sinyal büyümesine yol açmaz. Çok düşük HC konsantrasyonlarında (10^{-14} g/mL) floresan bandının tamamen kaybolduğunu ve uyarma radyasyon uzunluğunun daha kısa bir dalga boyu bölgesine (280 nm) kaymasının bile floresan sinyalinin görünmesine yol açmadığını gösterdik . humat spektrumunda (Şekil 4, ek). Bu sonuç, hem çözeltideki düşük flüorofor içeriğiyle hem de muhtemelen pH'ın etkisiyle açıklanabilir.

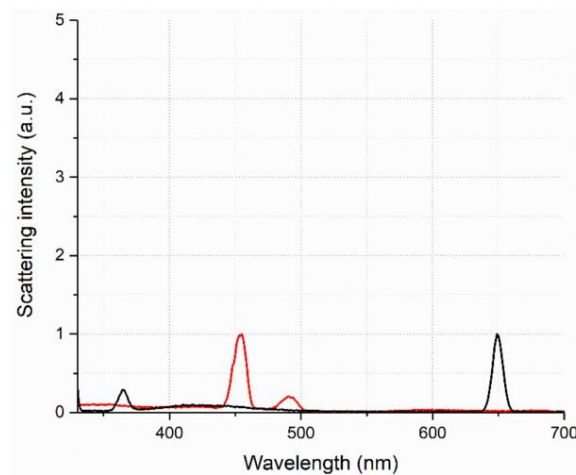
HC dilüsyonlarının emisyon spektrumlarında, $2\lambda_{exc} = \lambda_{em}$ olan başka bir yoğun maksimum bulundu . Bu sinyal flüoresansla ilgili değildir, daha ziyade modern flüorometrelerin teknik kapasitesinin ikinci dereceden saçılmanın kaydedilmesine izin verdiği elastik ışık saçılımı türlerinden birini ifade eder [54,55]. Uyarma dalga boyunun çift dalga boyunda ortaya çıkan ikinci dereceden saçılma , yaygın bir olgudur ve SOS'un özellikleri ve ilkeleri derinlemesine incelenmemişken, her zaman bir tür spektrofotometri girişimi olarak kabul edilmiştir [56]. Son on yılda, rezonans Rayleigh saçılması, ikinci dereceden saçılma ve frekansı ikiye katlayan saçılma analitik teknikleri, yüksek hassasiyetleri, basitlikleri ve hızları nedeniyle büyük ilgi görmüştür . Floresansa benzer şekilde, makromoleküller, nanopartiküller, kuantum noktaları, inklüzyon sabitinin belirlenmesi vb . çalışmalarında saçılma yöntemleri uygulanmıştır [57]. Yukarıdaki tüm argümanları ve hümik asitlerin seyreltme üzerine nanopartiküller oluşturan süper moleküllü yapılar olduğu gerçeğini göz önünde bulundurarak , elde edilen SOS verilerini daha detaylı analiz etmeye karar verdik.



Şekil 4. 460 nm'de floresans sinyalinin (kırmızı çizgi) ve 700 nm'de (siyah çizgi) ikinci dereceden saçılma sinyalinin sulu bir çözeltideki HC konsantrasyonuna bağlılığı, $\lambda_{ex} = 350$ nm; ek, $7,3 \times 10^{-14}$ g/mL, $\lambda_{ex} = 280$ konsantrasyonu HC'nin floresans/saçılma spektrumunu gösterir .

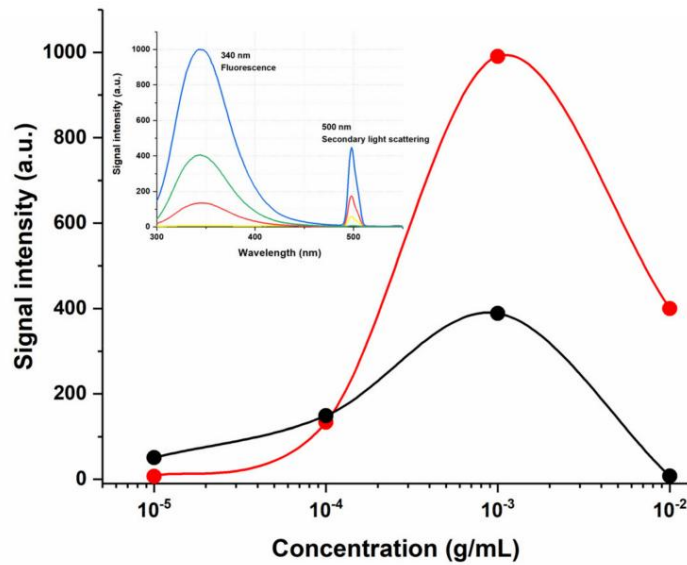
Tartışılan maksimum ve saçılma arasında gerçek bir bağlantı gösterilmiştir, çünkü heyecan verici radyasyonun dalga boyu 350 nm'den 280 nm'ye değiştirildiğinde, ikinci derece saçılma maksimumu eşzamanlı olarak 700 nm'den 560 nm'ye kaydırılmıştır, yani $2\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ oranı kalmıştır floresan için tipik olmayan sabit. Elde edilen SOS sinyalinin kesinlikle çözeltideki humatların içeriğine bağlı olduğu ve çok yüksek dilüsyonlarda sınır değerlere ulaştığı sonucuna vardık, bu muhtemelen saçılan nanoparçacıkların sayısındaki artıştan kaynaklanmaktadır (Şekil 4, siyah çizgi). 250 ila 365 nm arasındaki uyarma dalga boylarında saf suyun floresans spektrumunu incelerken, $2\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ 'de 1 au'yu aşan herhangi bir saçılma maksimumu bulmadığımızı belirtmek önemlidir.

(Şekil 5). Böylece, UV bölgesinde zayıf bir şekilde flüoresan yayan hümitik maddelerin , ters sırada konsantrasyona neredeyse doğrusal olarak bağlı olan, yüksek yoğunluklu bir ikinci dereceden saçılma sinyaline sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 5. Su saçılma sinyali, kırmızı— $\lambda_{ex} = 225$ nm, siyah— $\lambda_{ex} = 325$ nm.

Dispersiyon analizinde olduğu gibi yine hümit kompleks için elde edilen sonuç, BSA'ya dayalı geleneksel koloidal sistem için elde edilen sonuçlarla örtüşmemektedir. Şekil 6'daki ek, 10^{-5} – 10^{-2} g/mL konsantrasyon seviyelerinde normalleştirilmiş içsel BSA emisyonunu gösterir. Triptofan emisyonu, 340 nm'ye yakın λ_{max} ile UV bölgesinde BSA floresan spektrumlarına hakimdir. Floresansı, 10^{-3} g/mL'ye kadar BSA konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar ve daha yüksek konsantrasyonlarda azalmaya başlar (Şekil 6, kırmızı çizgi). Büyük olasılıkla, triptofan florofor miktarında bir artış ile floresanın konsantrasyon söndürme sürecini gözlemliyoruz [58]. Saçılmanın flüoresandan birçok kez daha yaygın olduğu iyi bilinen bir gerçektir; bununla birlikte, molekül floresansı çok yüksekse, saçılma sinyallerini gözlemek neredeyse imkansızdır. Öte yandan, zayıf flüoresan moleküllerde, saçılma sinyalleri flüoresanla karşılaştırılabilir ve hatta bazen ondan daha yüksektir [59]. Bu nedenle, BSA molekülünde ifade edilen triptofan floresansı oldukça yoğundur ancak yine de 500 nm'de ikinci dereceden saçılma sinyalini görmemizi sağlar. Değeri aynı zamanda protein konsantrasyonuna da bağlıdır, ancak humatlarda olduğu gibi değil, floresan sinyalinin davranışını kesinlikle tekrar eder - önce artan konsantrasyonla büyüme, sonra söndürme (Şekil



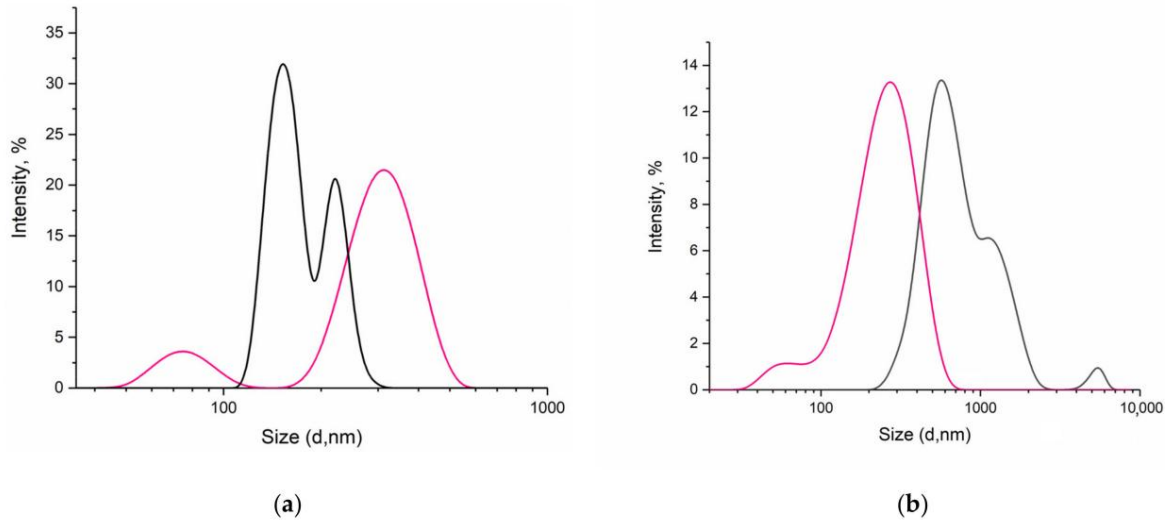
Şekil 6. Sulu bir çözeltideki BSA konsantrasyonuna bağlı olarak 340 nm'de (kırmızı çizgi) floresan sinyalinin ve 500 nm'de (siyah çizgi) ikinci dereceden saçılma sinyalinin bağımlılığı, $\lambda_{exc} = 250$ nm; BSA dilüsyonlarının floresan spektrumları ekte gösterilmiştir: sarı- 10^{-5} , kırmızı- 10^{-4} , yeşil- 10^{-3} , mavi- 10^{-2} g/mL, $\lambda_{exc} = 250$.

Proteinlerin triptofan floresansı çalışmasının, moleküllerin yapısal durumunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanıldığı açıktır, ancak proteinlerin SOS'unu ölçmeye dayalı yöntemler de başarılı bir şekilde mevcuttur [56]. Bu nedenle, floresansın kendisinden çok daha belirgin olan hümit kompleksin floresan spektrumları üzerindeki saçılma sinyalinin, sistemdeki süreçler hakkında önemli bilgiler taşıması ve bağlanma afinitesini değerlendirmek için kullanılabilmesi oldukça muhtemeldir. HC'nin. HC'nin sulu seyreltmelerinin spektral ve boyutsal karakterizasyon aşamasını tamamlayarak, antiviral ilaçlarla daha fazla çalışmak için 1 ila 2000 arasında bir seyreltme seçtik çünkü tek modlu bir dağılımda en küçük boyutta parçacıklar içerir (Şekil 1) ve konsantrasyon bağımlı SOS sinyali ile çalışacak kadar önemlidir (

3.3. Sıvı HC'nin (Dilüsyon 1:2000) Antiviral İlaçlarla Kompleksleşmesi

Hümit kompleksin, sulu bir ortamdaki bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak, taşıyıcı sistemin özelliklerini sergileme yeteneği, örnek olarak antiviral ilaçlar mangiferin ve favipiravir kullanılarak incelenmiştir.

Mangiferin pratik olarak suda çözünmez, bu da Avrupa farmakopesinin derecelendirmesi altında şu madde kütlesi ve çözücü hacmi oranı anlamına gelir: g başına 10.000 mL'den fazla. Suda elde edebildiğimiz maksimum mangiferin gerçek çözeltisi konsantrasyonu, mikron parçacıklarının olmadığını kanıtlayarak sadece 0,02 mg/mL idi (Şekil 7a, siyah çizgi). Ortaya çıkan konsantrasyon, farmakopede verilen madde kütlesi-çözücü hacmi oranının sınır değerinden daha düşüktür ve bu, mangiferinin çözünürlükte farklılık gösteren polimorfik formlarının varlığıyla açıklanır [60]. Aynı dış koşullar altında, ancak çözücü olarak hümitik kompleksin 1:2000 sulu seyreltmesi kullanılarak, mikron parçacıklarının yokluğunda mangiferin konsantrasyonunu beş kat artırmak mümkün olmuştur (Tablo 1). Dinamik ışık saçılımı yöntemi, 250-300 nm'lik parçacıkların maksimum yoğunluğunu korurken, HC'deki bir madde çözeltisinde (0,1 mg/mL) kararlı (n = 3) parçacıkların d = 50 nm tespit edilmesini mümkün kılmıştır. 1:2000 dilüsyonda HC'de doğaldır (Şekil 7a, pembe çizgi).



Şekil 7. Mangiferin (a) ve favipiravir (b) solüsyonlarında partikül boyutu dağılımı: suda siyah çizgi, HC 1:2000'de pembe çizgi.

Tablo 1. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen maksimum mangiferin ve favipiravir çözeltileri konsantrasyonları .

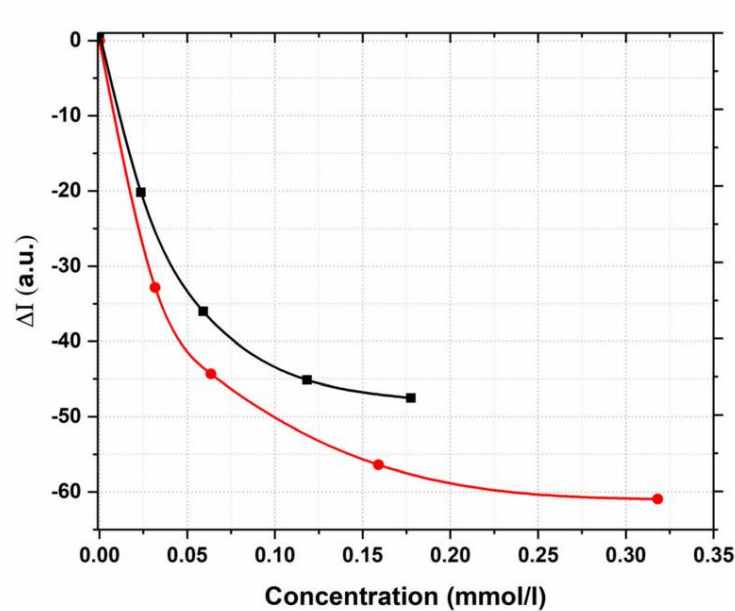
Madde	Maksimum Konsantrasyon			
	Suda		HC'de (1:2000)	
	mg/mL	mmol/L	mg/mL	mmol/L
Mangiferin	0,02	0,05	0,1	0,64
Favipiravir	2	4,74	2	4,74

Favipiravir, suda mangiferin kadar az çözünür değildir, bu nedenle solvent değiştirildiğinde konsantrasyonda artış olmamıştır (Tablo 1). Bununla birlikte, dispersiyon analizi dikkate değer bir sonuç gösterdi: sulu bir favipiravir solüsyonunu bir hümitik kompleks içinde bir favipiravir sistemiyle değiştirirken partikül çapında neredeyse üç kat azalma (Şekil 7b). Tedavi için onaylanmış favipiravir ilaç rejimi, büyük yükleme dozlarını (1600-1800 mg) ve ardından günde iki kez 600-800 mg ile oldukça uzun bir toplam tedavi süresini içerir. Ek olarak, iyi toleransına ilişkin verilere rağmen, bu kadar yüksek dozlar, yan etkilerin gelişmesi konusunda endişe uyandırmaktan başka bir şey yapamaz. Potansiyel olarak, HC bazlı bir taşıma sisteminin kullanılması, ilacın etkinliğini yalnızca nanopartiküllerin daha iyi penetrasyonu nedeniyle değil, aynı zamanda HC'nin içsel aktivitesi nedeniyle birleşik bir antiviral etki yoluyla da artırılabilir. Ek olarak, favipiravir molekülü yapısında iki tane içe

sulu bir ortamda hidrolize uğrayan amid bağları, 3.26 gibi düşük bir pH değerine neden olur. Favipiraviri hümkik kompleks içinde çözerken bu değeri 3.34 birime çıkarmak mümkündür.

3.4. Mangiferin ve Favipiravir'in HC Sistemine Dahil Edilme Sürecini Değerlendirme Yöntemi Olarak İkinci Derece Saçılma Söndürme Daha önce gösterildiği gibi (Şekil 4), hümkik kompleksin seyreltilmesi üzerine salınan nanoparçacıklar, $2\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ 'de güçlü SOS sinyallerine yol açar; bu hümkik maddenin karakteristik bir özelliğidir. HC'nin supramoleküler yapılarına diğer moleküller dahil edildiğinde, bu sinyalin moleküller arası etkileşimlere duyarlılığını incelemek ilgi çekicidir. HC ve antiviral ilaçlar arasındaki bağlanma afinitesini daha fazla değerlendirmek için bir SOS söndürme yöntemi uygulandı.

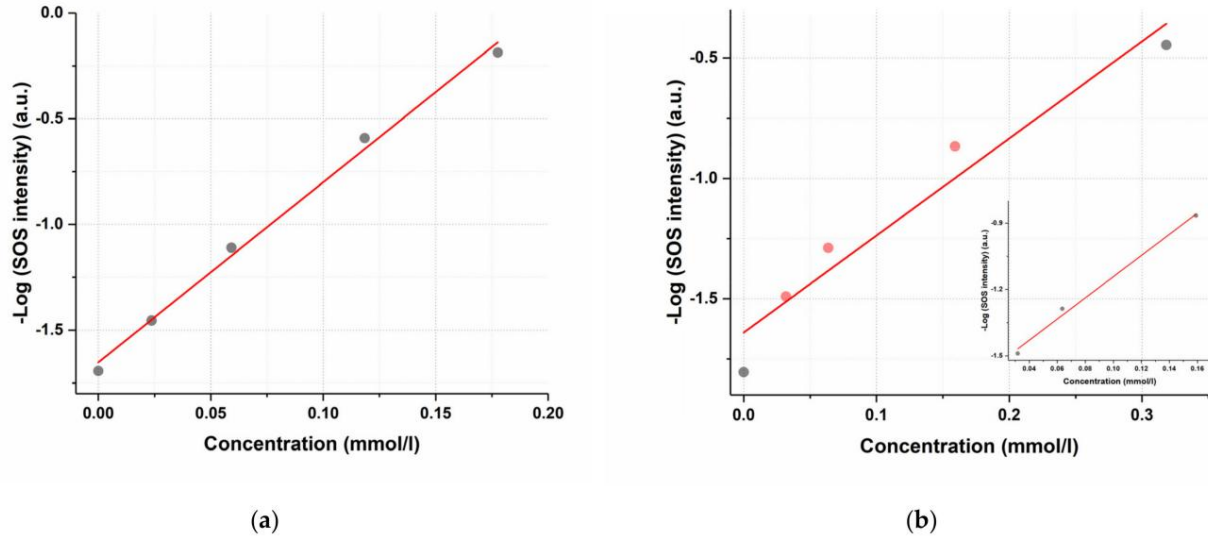
Çözücü olarak HC kullanıldı, dilüsyonu 1:2000'de sabitlendi, bu da kuru madde içeriği 3.67×10^{-3} g/mL'ye karşılık gelirken, ilaç konsantrasyonu mangiferin için 0.02 ila 0.18 mmol/L arasında ve 0.03 ila 0.03 ila 0.03 mmol/L arasında değişti. Favipiravir için 0,32 mmol/L. Kör HC çözeltisinin (I0) ve test edilen maddelerin HC (I) içindeki çözeltilerinin saçılma yoğunluğu, mangiferin için $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 350 \text{ nm}/700 \text{ nm}$ 'de ve favipiravir için $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 365 \text{ nm}/730 \text{ nm}$ 'de ölçülmüştür. İlaçların konsantrasyonu, numune çözeltisininin boz çözelti saçılma yoğunluğunun çıkarılmasıyla elde edilen pik yüksekliği (nispi saçılma yoğunluğu) aracılığıyla ölçüldü. Mangiferin veya favipiravir ile kompleks oluşturmanın HC'nin SOS sinyalini $2\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 'de söndürdüğünü gözlemledik (Şekil 8).



Şekil 8. Hümkik kompleksin artan konsantrasyonlarda çözünmüş mangiferin (siyah çizgi) ve favipiravir (kırmızı çizgi) ile SOS söndürmesi.

Her iki bileşik için $I-I_0$, mmol/l bağımlılığı üsteldir. Mangiferin veya favipiravir konsantrasyonunun yukarıda belirlenen maksimum değerlere daha fazla artmasıyla, hümkik kompleks içeren ilacın kararlı bir sisteminin etkili bir şekilde oluştuğunu gösteren, SOS'un tamamen söndürülmesi gözlemlendi. Çözücünün SOS sinyalindeki azalma, muhtemelen mangiferin ve favipiravirin hidrofobik moleküllerinin misel benzeri HC fragmanlarına dahil edilmesi ve saçılan hidrofobik kuyrukların tersine dönmesi nedeniyle saçılma sinyalindeki müteakip azalma ile ilişkilidir [61].

Önerilen SOS yöntemi, daha sonra humat bazlı bir dağıtım sisteminin karmaşık bir matrisindeki aktif maddenin içeriğini ölçmek için bu yaklaşımı uygulamak üzere doğrusallık açısından incelenmiştir. Eklenen maddelerin bir fonksiyonu olarak SOS sinyalindeki azalma, logaritmik olarak doğrusallaştırılmış HC saçılma yoğunluğu değeri kullanılarak incelenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Hümk kompleks ikinci dereceden saçılma sinyalinin çözünmüş müstahzarın konsantrasyonu üzerindeki lineerleştirilmiş bağımlılıkları: (a) mangiferin için ($R = 0.997$); (b) favipiravir için ($R = 0.972$). Şekil 9b'deki ek, favipiravir için lineer bağımlılığın analitik alanını gösterir – 0,03–0,16 mmol/L.

$-\log I$ olarak ifade edilen saçılma sinyalinin, 0.997 korelasyon katsayısı ile incelenen 0–0.18 mmol/L konsantrasyon aralığında çözünmüş mangiferin konsantrasyonuna doğrusal olarak bağlı olduğu gösterilmiştir. Favipiravir için 0–0,3 mmol/L analitik aralığının uygun olmadığı bulunmuştur. Değerlerin lineer bir bağımlılığa düşmesi için , konsantrasyon aralığını 0,03–0,16 mmol/L'lik daha dar bir değere düşürmek gerekiyordu (Şekil 9b), bu durumda korelasyon katsayısı 0,989'du (Şekil 9b, ek).

4. Sonuçlar

Doğal HA'lar, kaynağa ve ekstraksiyon işlemine bağlı olarak değişken bileşimlere sahiptir. Moleküler yapıları, onlara birden fazla işlevsellik kazandıran karboksilik asitler, fenol, enol, alkol, kinon, eter ve diğerleri dahil olmak üzere çok sayıda grup içerir. Floresan spektroskopi yöntemi, dinamik lazer ışığı saçılımının sonuçlarıyla birleştirildiğinde, hümk asitlerin özelliklerinin sistemin organizasyon düzeyi tarafından belirlendiğini bir kez daha kanıtlamayı mümkün kıldı . Ayrıca floresans, parçacık boyutu ve sulu HC çözeltilerinin saçılmasındaki değişikliklerin, sistemdeki kalitatif yeniden düzenlemelerin mevcudiyeti ile konsantrasyon bağımlılıkları ile karakterize edildiği gösterildi . Son olarak, büyük supramoleküler birlikteliklerden salınan hümk moleküllerin suda çözünürlüğü düşük bazı ilaçları nanoparçacıklara dahil ederek dispersiyon bileşimini etkileyebileceğini gösterdik. Bu sonuçlar , kanıtlanmış içsel antiviral aktiviteye sahip lipofilik ve pH'a duyarlı bir ilaç taşıyıcısı olarak karmaşık antiviral tedavide HA nanoparçacıklarının kullanılmasının uygulanabilirliğine işaret etmektedir. Spesifik olarak hümk kompleksin sulu seyreltilerinde bulunan ikinci dereceden saçılma söndürme olgusu, çeşitli kimyasal doğalardaki antiviral ilaçların taşıyıcı kompleksin bileşimine dahil edilme derecesini ölçmek için kullanılabilir . Yöntemin sınırlamaları, huminlere dayalı dağıtım sisteminin flüoresans ve saçılma özellikleri ile ilgilidir. Düşük HC dilüsyonlarında (kuru kalıntı içeriği $3,67 \times 10^{-3}$ g/mL'den fazla), HC floresan spektrumunda herhangi bir önemli SOS sinyali gözlemlenmedi . Mangiferin ve favipiravirin test edilen maddelerine gelince, yöntem oldukça düşük konsantrasyonlarıyla (0,2 mmol/L'ye kadar) sınırlıdır. Bu eşiği aşan konsantrasyonlarda, HC saçılma sinyalinin tamamen bastırıldığı gözlenir.

Yazar Katkıları: Veri iyileştirme, MAM, VNT, IVK ve EVU; Metodoloji, MAM ve VNT; Proje yönetimi, MAM; Kaynaklar, TVM; Denetim, AVS; Görseleştirme, MAM ve EVU; Yazma—Orijinal taslak, MAM; Yazma—İnceleme ve düzenleme, MAM Tüm yazarlar makalenin yayınlanan sürümünü okumuş ve kabul etmiştir.

Finansman: Bu makale, RUDN Üniversitesi Stratejik Akademik Liderlik Programı tarafından desteklenmiştir.

Veri Kullanılabilirlik Bildirimi: Uygulanamaz.

Çıkar Çatışmaları: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Referanslar

- Zhang, Y.; Chan, HF; Leong, KW İlaç dağıtımı için gelişmiş malzemeler ve işleme: Geçmiş ve gelecek. *Av. İlaç teslim Rev.* 2013, 65, 104–120. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mitchell, MJ; Billingsley, AA; Haley, RM; Wechsler, ME; Peppas, NA; Langer, R. İlaç dağıtımı için mühendislik hassas nanopartiküller. *Nat. Rev. Drug Discover.* 2021, 20, 101–124. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- Varol, C.; Mildner, A.; Jung, S. Makrofajlar: Gelişim ve doku uzmanlığı. *Annu. Bağışıklık.* 2015, 33, 643–675. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- Svenson, S.; Tomalia, DA Biyomedikal uygulamalarda Dendrimerler—Sahadaki yansımalar. *Av. Uyuşturucu Dağıtım* 2012, 64, 102–115. [[ÇaprazRef](#)]
- Gupta, U.; Ağaşe, HB; Asthana, A.; Jain, NK Dendrimerler üzerinde in vitro–in vivo araştırmaların gözden geçirilmesi: Yeni nano-skopik ilaç taşıyıcıları *Nanomed. Nanoteknoloji Biol. Med.* 2006, 2, 66–73. [[ÇaprazRef](#)] 6. Trucillo, P. İlaç taşıyıcıları: Sınıflandırma, uygulama, salım profilleri ve endüstriyel yaklaşım. *İşlemler* 2021, 9, 470. [[CrossRef](#)]
- Tong, X.; Pan, W.; Sü, T.; Zhang, M.; Dong, W.; Qi, X. Doğal polimer bazlı ilaç verme sistemlerindeki son gelişmeler. *Tepki. İşlev Polim.* 2020, 148, 104501. [[CrossRef](#)]
- Jain, A.; Singh, SK; Arya, SK; Kundu, SC; Kapoor, S. Protein nanoparçacıkları: İlaç dağıtım uygulamaları için umut vaat eden platformlar. *ACS Biyomater. bilim Müh.* 2018, 4, 3939–3961. [[ÇaprazRef](#)]
- Bahvalov, A.; Rozanova, M.; Trofimov, S. Güney taygadaki hümik asitlerin temel bileşimi ve amfilik özellikleri topraklar. *Moskova Üniv. Toprak Bilimi Bülteni* 2010, 65, 168–171. [[ÇaprazRef](#)]
- Tomaszewski, JE; Schwarzenbach, RP; Sander, M. Hümik maddelerle protein kapsülleme. *bilim Teknoloji* 2011, 45, 6003–6010. [[ÇaprazRef](#)]
- Kala, KJ; Prashob, PKJ; Chandramohanakumar, N. Terapötik ve ilaç dağıtımı için güçlü bir biyomalzeme olarak hümik maddeler sistem—Bir inceleme. *Int. J. Uygulama eczane* 2019, 11, 1–4. [[ÇaprazRef](#)]
- Mirza MA; Agarwal, SP; Rahman MA; Rauf, A.; Ahmed, N.; Alem, A.; İkbāl, Z. Hümik asidin ağızdan ilaç verilmesindeki rolü bir antiepileptik ilaç. *İlaç Dev. San. Ecz.* 2011, 37, 310–319. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- Agarwal, SP; Ansari, SH; Karmarkar, RR Yeni bir kompleks oluşturma yoluyla ketokonazolün çözünme hızının artırılması şilajit'ten ekstrakte edilen hümik asit ile. *Asya J. Chem.* 2008, 20, 879–888.
- Khilko, SL; Semenova, RG Hümik asit tuzlarının ilaç preparatları ile etkileşimi. *Katı Yakıt Kimyası* 2016, 50, 390–394. [[ÇaprazRef](#)]
- Zhernov, YV; Konstantinov, AI; Zhrebker, A.; Nikolaev, E.; Orlov, A.; Savinykh, M.I.; Kornilava, GV; Karamov, EV; Perminova, IV Doğal hümik maddelerin ve şilajit maddelerinin HIV-1'e karşı antiviral etkinliği: Yapıyla ilişkisi. çevre. *Res.* 2021, 193, 110312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Uspenskaya, EV; Syroeshkin, AV; Pleteneva, TV; Kazımova, IV; Grebennikova, TV; Fedyakina, BT; Lebedeva, VV; Latyshev, OE; Eliseeva, OV; Larichev, VF; et al. Hümik maddelere dayalı polielektrolitlerin nanodağılımları: İzolasyon, fiziko kimyasal karakterizasyon ve biyolojik aktivitenin değerlendirilmesi. *Eczacılık* 2021, 13, 1954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, R.; Wang, T.; Şarkı, J.; Pu, D.; O, D.; Li, J.; Yang, J.; Li, K.; Zhong, C.; Zhang, J. Geliştirilmiş biyoaktivite, daha iyi metabolizma ve farmakokinetik özellikler için antiviral ilaç verme sistemi. *Int. J. Nanomed.* 2021, 16, 4959–4984. [[ÇaprazRef](#)]
- Jomah, S.; Asdaq, KOBİ; Al-Yamani, MJ Antivirallerin yeni koronavirüse (COVID-19) karşı klinik etkinliği: Bir inceleme. *J. Bulaş. Halk Sağlığı* 2020, 13, 1187–1195. [[ÇaprazRef](#)]
- Srinivasan, K.; Rao, M. 2019 koronavirüs hastalığında favipiravirin (T-705) klinik faydasını anlamak: Bir inceleme. *orada. Av. bulaştırmak. Dis.* 2021, 8, 20499361211063016. [[CrossRef](#)]
- Kahverengi, LK; Freemantle, N.; Breuer, J.; Debi, HM; Chowdhury, K.; Jones, G.; Ikeji, F.; Ndoutoumou, A.; Santhirakumar, K.; Longley, N.; et al. COVID-19 (FLARE) ile ayakta tedavi gören hastalarda erken antiviral tedavi: Randomize kontrollü bir çalışma için çalışma protokolünün yapılandırılmış bir özeti. *Denemeler* 2021, 22, 193. [[CrossRef](#)]
- Hanna, CR; Blyth, KG; Burley, G.; Carmichael, S.; Evans, C.; Hinsley, S.; Khadra, I.; Khoo, S.; Lewsley, Los Angeles; Jones, R; et al. Erken evre COVID-19'lu yetişkinler için Glasgow erken tedavi kolu favipiravir (GETAFIX): Randomize kontrollü bir çalışma için çalışma protokolünün yapılandırılmış bir özeti. *Denemeler* 2020, 21, 935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Santhi, Başkan Yardımcısı; Masilamani, P.; Sriramavaratharajan, V.; Murugan, R.; Gurav SS; Sarasu, Başkan Yardımcısı; Parthiban, S.; Ayyanar, M. Ortaya çıkan viral enfeksiyonlarla mücadelede yenilebilir meyvelerin fito bileşenlerinin terapötik potansiyeli. *J. Gıda Biyokimyası.* 2021, 45, e13851. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Genç, AG; Tolouei, SEL; dos Reis Livero, FA; Gasparotto, F.; Boeing, T.; de Souza, P. ACE-2'yi modüle eden doğal ajanlar: SARS-CoV-2 enfeksiyonlarına karşı potansiyele sahip bileşiklerin gözden geçirilmesi. *Curr. eczane Des.* 2021, 27, 1588–1596. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ömer, HI; Yoşıya, SS; Saliu, TP; Jimoh, TO; Ajayi, A.; Danjuma, JB SARS-CoV-2 ana proteazın seçili Afrika bitkilerinden bazı aktif bileşikler tarafından inhibisyonunun in-silico analizi. *J. Taibah Üniv. Med. bilim* 2021, 16, 162–176. [[ÇaprazRef](#)]
25. Li, N.; Xiong, R.; O.; Liu, B.; Wang, B.; Geng, Q. Mangiferin, NLRP3 enflamatuar aktivasyonunu inhibe ederek lipopolisakarit kaynaklı akciğer hasarını hafifletir. *J. İltihap. Res.* 2021, 14, 2289–2300. [[ÇaprazRef](#)]
26. Timalisina, D.; Pokhrel, KP; Bhusal, D. Bitki kaynaklı doğal ürünlerin solunum yolu hastalıkları ve iltihaplar. *Biyomed. Res. Int.* 2021, 2021, 1636816. [[CrossRef](#)]
27. Moshikur, RM; Ali, MK; Wakabayashi, R.; Moniruzzaman, M.; Oral uygulama için güçlü antiviral ilaçlar olarak Goto, M. Favipiravir bazlı iyonik sıvılar : Sentez, çözünürlük ve farmakokinetik değerlendirme. *Mol. eczane* 2021, 18, 3108–3115. [[ÇaprazRef](#)]
28. Khurana, RK; Gaspar, BL; Welsby, G.; Katar, OP; Singh, KK; Singh, B. Mangiferinin biyofarmasötik özelliklerinin, vitamin E-TPGS ile birlikte yüklenen, kendinden montajlı fosfolipidik nano-karışık misel sistemleri kullanılarak geliştirilmesi. *Uyuşturucu Dağıtımı çeviri Res.* 2018, 8, 617–632. [[ÇaprazRef](#)]
29. Liu, M.; Li, Y.; Ge, Y.; Zhong, Z.; Wang, Z.; Wu, T.; Zhao, X.; Zu, Y. Süperkritik antisolvent yöntemi kullanılarak hazırlanan mangiferin mikropartiküllerinin çözünürlüğü, antioksidasyonu ve oral biyoyararlanımının iyileştirilmesi. *Eczacılık* 2020, 12, 90. [[CrossRef](#)]
30. Seda Timur, S.; Ataşeoğlu, M.; Öner, Y.; Ceren Karabulut, T.; Ero ğlu, H. Bir antiviral ajan olan favipiravir'in BCS sınıflandırması için in vitro çalışmalar. *J. Res. eczane* 2021, 25, 944–952. [[ÇaprazRef](#)]
31. Tejaswi, P.; Devaşış, K.; Prasad, RR Favipiravirin koronavirus üzerindeki farmakolojik etkileri: Bir güncelleme. *Biyomed. Eczane. J.* 2021, 14, 1087–1096. [[ÇaprazRef](#)]
32. Möller, M.; Denicola, A. Floresan söndürme ile incelenen protein triptofan erişilebilirliği. *biyokimya Mol. Biol. Eğitim* 2002, 3, 175–178. [[ÇaprazRef](#)]
33. Sierra, MMD; Giovanela, M.; Paranti, E.; Soriano-Sierra, EJ Tek tarama ve eksitasyon/emisyon matris teknikleriyle görüntülediği şekliyle çeşitli kökenlerden fulvik ve hümkik asitlerin floresan parmak izi. *Chemosphere* 2005, 58, 715–733. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lorber, B.; Fischer, F.; Bailly, M.; Roy, H.; Kern, D. Dinamik ışık saçılımı ile protein analizi: Yöntemler ve teknikler öğrenciler. *biyokimya Mol. Biol. Eğitim* 2012, 40, 372–382. [[ÇaprazRef](#)]
35. Stetefeld, J.; McKenna SA; Patel, TR Dinamik ışık saçılımı: Biyomedikal bilimlerde pratik bir rehber ve uygulamalar. *biyografiler. Rev.* 2016, 8, 409–427. [[ÇaprazRef](#)]
36. Piccolo, A. Hümkik maddelerin supramoleküler yapısı: Humus kimyasına dair yeni bir anlayış ve toprak bilimindeki çıkarımlar. *Av. Agron.* 2002, 75, 57–134. [[ÇaprazRef](#)]
37. Piccolo, A. Hümkik maddelerin supramoleküler yapısı. *Toprak Bilimi* 2001, 166, 810–832. [[ÇaprazRef](#)]
38. Palmer, NE; von Wandruszka, R. Sulu humikte parçacık boyutu gelişiminin dinamik ışık saçılımı ölçümleri malzemeler. *Fresenius J. Anal. kimya* 2001, 371, 951–954. [[ÇaprazRef](#)]
39. Gerke, J. Toprak organik maddesinin kararlı parçası olarak hümkik maddelere ilişkin kavramlar ve yanlışlar: Bir gözden geçirme. *Tarım Bilimi* 2018, 8, 76. [[ÇaprazRef](#)]
40. Hurija, DC; Matik, BV; Vojko, V.; Miha, L. Düşük molekül sığır serum albümininin sulu karışımlarının faz stabilitesi polietilen glikol varlığında kütle tuzları. *J. Mol. sıvı* 2022, 349, 118477. [[CrossRef](#)]
41. Singh, P.; Singh, H.; Castro-Aceituno, V.; Ahn, S.; Kim, YJ; Yang, DC Ginsenoside bileşik K'nin verimli bir şekilde verilmesi için bir nanotaşıyıcı olarak sığır serum albümini : Hazırlama, fizikokimyasal karakterizasyonlar ve in vitro biyolojik çalışmalar. *RSC Av.* 2017, 7, 15397–15407. [[ÇaprazRef](#)]
42. Li, Y.; Yang, G.; Mei, Z. Pterodotik asit ve sığır serum albümini arasındaki etkileşimin spektroskopik ve dinamik ışık saçılımı çalışmaları. *Açta Ecz. Günah. B* 2012, 2, 53–59. [[ÇaprazRef](#)]
43. Brahma, A.; Mandal, C.; Bhattacharyya, D. Altında sığır serum albüminin dimerik bir açılım ara ürününün karakterizasyonu hafif asidik durum. *Biyokimya. biyografiler. Açta* 2005, 1751, 159–169. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Squire, PG; Moser, P.; O'Konski, CT Sığır serum albümin monomeri ve dimerinin hidrodinamik özellikleri. *biyokimya* 1968, 7, 4261–4272. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Phan, HTM; Bartelt-Hunt, S.; Rodenhausen, KB; Schubert, M.; Bartz, JC Dağıtma (QCMD) ve spektroskopik elipsometri (SE) ile kombinatoriyal kuvars kristali mikro terazisi kullanılarak kendiliğinden oluşan tek tabakalara (SAM'ler) sığır serum albümini (BSA) ekinin araştırılması. *PLoS BİR* 2015, 10, e0141282. [[ÇaprazRef](#)]
46. Raghuvanshi, VS; Yu, B.; Browne, C.; Garnier, G. Geri dönüşümlü pH duyarlı sığır serum albümin hidrojel sünger nano tabaka. *Ön. Biyomüh. Bioteknoloji* 2020, 8, 573. [[CrossRef](#)]
47. Koly, SF; Kundu, SP; Kabir, S.; Amran MS; Sultan, MZ Prediktif, önleyici ve kişiselleştirilmiş tıp için floresan söndürme yöntemi kullanılarak aseklofenak ve sığır serum albümin etkileşiminin analizi. *EPMA J.* 2015, 14, 24. [[CrossRef](#)]
48. Rizvi, SB; Ghaderi, S.; Kestgar, M.; Seifalian, AM Yarı iletken kuantum noktaları, in vitro ve in vivo floresan problemler olarak biyo-moleküler ve hücrel görüntüleme. *Nano Rev.* 2010, 1, 5161. [[CrossRef](#)]
49. Dogra, N.; Li, X.; Kohli, P. Elektronik absorpsiyon spektroskopisi kullanılarak iki katmanlı yüzeyde ligand-reseptör etkileşimlerinin araştırılması ve floresan rezonans enerji transferi. *Langmuir* 2012, 28, 12989–12998. [[ÇaprazRef](#)]
50. Marqués-Gallego, P.; de Kroon, lipozomal nano taşıyıcıları hedeflemek için AIPM Ligasyon stratejileri. *Biyomed. Res. Int.* 2014, 2014, 129458. [[CrossRef](#)]

51. Wang, XY; Yang, QP; Tian, SJ; Şarkı, FH; Guo, F.; Huang, NN; Tan, WQ; Bai, YC Bir akuatik sistemdeki hümik maddelerin fotokimyasal reaktivitesi, uyarma-emisyon matrisi floresansı ile ortaya çıktı. Ön. kimya 2021, 9, 679286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Heo, J.; Yoon, Y.; Kim, D.-H.; Lee, H.; Lee, D.; Her, N. Çözünmüş organik madde (DOM) karakterizasyonu için bir floresan uyarma-emisyon matrisine sahip yeni bir floresan indeksi. Tuzdan arındırma Su Tedavisi. 2015, 57, 20270–20282. [\[ÇaprazRef\]](#)
53. Liu, D.; Yu, H.; Yang, F.; Liu, L.; Gao, H.; Cui, B. Floresans spektroskopisi ile paralel faktör analizi ve kanonik korelasyon analizi ile doğal halofit topraklarından hümik maddelerin karakterize edilmesi . Sürdürülebilirlik 2020, 12, 9787. [\[CrossRef\]](#)
54. Yu, D.; Liu, S.; Zhang, L.; Yang, J. Humik Asidin (HA) rezonans Rayleigh saçılma spektrumları üzerine bir çalışma. Çene. J. Geochem. 2012, 31, 24–29. [\[ÇaprazRef\]](#)
55. Zhou, J.-F.; Li, N.-B.; Luo, H.-Q. Sodyum aljinat-CTAB sistemi için rezonans rayleigh saçılması, frekansı ikiye katlayan saçılma ve ikinci dereceden saçılma spektrumlarının analitik uygulaması. Anal. Letonya 2011, 44, 637–647. [\[ÇaprazRef\]](#)
56. Yan, M.; Zhu, Y.; Ge, S.; Dai, P.; Yu, J.; Chen, C. Chrome'un İkinci Derece Saçılımı Üzerindeki Güçlendirme Etkisiyle BSA'nın Belirlenmesi Azurol, S. 3. Uluslararası Biyoinformatik ve Biyomedikal Mühendisliği Konferansı Bildiri Kitaplarında, Pekin, Çin, 11–13 Haziran 2009; s. 1–3. [\[ÇaprazRef\]](#)
57. Liu, JF; Li, NB; Luo, HQ Rezonans Rayleigh saçılması, ikinci dereceden saçılma ve frekans iki katına çıkan saçılma spektrumları ve bunun analitik eritrosinin Fe(fen)3 ile etkileşiminin incelenmesi 2011, 79, ²⁺ uygulaması. Spektrokim. Ağa A Mol. Biyomol. Spectrosc. 631–637. [\[ÇaprazRef\]](#)
58. Tan, M.; Liang, W.; Luo, X.; Gu, Y. Evodiamin ve sığır serumu arasındaki etkileşim üzerine floresan spektroskopisi çalışması albümin. J. Chem. 2013, 2013, 308054. [\[CrossRef\]](#)
59. Masilamani, V.; Ghaithan, HM; Aljaafreh, MJ; Ahmed, A.; al Thagafi, R.; Prasad, S.; Alsalhi, MS Bir spektrofloreometre kullanma organik moleküllerin rezonans raman spektrumları için. J. Spectrosc. 2017, 2017, 7. [\[CrossRef\]](#)
60. Yang, S.; Zhou, S.; Zhang, B.; Yang, D.; Yang, H.; Du, G.; Lu, Y. Mangiferinin taranması, karakterizasyonu ve değerlendirilmesi polimorflar. Nat. Üretim Biyoprospekt. 2020, 10, 187–200. [\[ÇaprazRef\]](#)
61. Zou, W.; Şarkı, M.; O, J.; Qiu, P.; Güneş, Z.; Sü, Z.; Bai, Y. Eosin Y. Anal. Biyoanal. kimya 2021, 413, 1429–1440. [\[ÇaprazRef\]](#)