

GAMZE ERGIN KIZILÇAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**GLİSİRİZİK ASİDİN RESVERATROLÜN
BİYOYARARLANIMI ÜZERİNE ETKİSİ**

GAMZE ERGİN KIZILÇAY

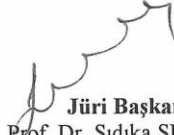
**DANIŞMAN
PROF.DR.SIDIKA ERTÜRK TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora öğrencisi Gamze ERGİN KIZILÇAY tarafından Prof. Dr. Sıdika TOKER'in danışmanlığında hazırlanan "GLİSİRİZİK ASİDİN RESVERATROLÜN BİYİYARARLANIMI ÜZERİNE ETKİSİ" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 13/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

Prof. Dr. Sıdika SUNGUR

T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

Prof. Dr. Sıdika TOKER

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı**Jüri**

Prof. Dr. Murat KARTAL

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı**Jüri**Prof. Dr. Ahmet Olcay SAĞIRLI
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı**Jüri**Prof. Dr. Armağan ÖNAL
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gamze ERGİN KIZILÇAY



İTHAF



Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına imkan sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, motive eden, samimiyeti ile hep yanımda olan çok değerli Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Prof. Dr. Sıdika ERTÜRK TOKER'e;

Destek ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen ve sunduğu imkanlar için Bezmialem Fitoterapi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü değerli Hocam Prof. Dr. Murat KARTAL'a;

Hayvan deneylerinde yanımda olan ve uygulama kısmında büyük bir özveri ile yardım eden, manevi desteğiyle güç veren ve bilgilerini esirgemeyen dostum Biyokimyager Nihal ZORLU'ya; manevi desteklerini hep hissettiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen dostlarım Mikrobiyolog Damla BİNGÖL, Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ, Dr. Demet DİNCEL, Dr. Burcu BÜTÜN, Dr. Öğr. Üyesi Tuba KUŞMAN, Dr. Seda Damla ÇAKMAR ve Uzman Eczacı Esin ERÇİN'e;

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki veteriner hekim Mert ÇELİKTEN, veteriner teknikeri Nurhayat DÖNEK ve araştırma asistanı Önder HÜSEYİNBAŞ'a;

Bugüne kadar bana emeği geçen tüm hocalarıma;

Hayatım boyunca bana emek veren, her zaman yanımda olan annem Meral ERGİN, babam Hıdır ERGİN, kardeşim Hande ERGİN ESEN ve anneannem Saadet YAYLA'ya; bana daima destek olan sevgili eşim Teoman KIZILÇAY'a ve canım eniştem Kemal Mert ESEN'e, manevi desteğiyle hep yanımda olan Sayın Prof. Dr. Sedef ATMACA'ya ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Resveratrol	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	4
2.1.3. Biyoyararlanım Çalışmaları	8
2.2. Glisirizik Asit.....	26
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	26
2.2.2. Farmakolojisi	26
2.2.3. Biyoyararlanımı Arttırıcı Etkisi ile ilgili Çalışmaları	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	36
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	36
3.1.2. Çözeltiler.....	36
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	37
3.3. Resveratrolün HPLC ile Analizi için Yapılan Çalışmalar	38
3.3.1. Kolon, Mobil Faz, Dedektör Dalga Boyları ve Hassasiyet Seçimi.....	38
3.3.2. İç Standart (IS) Seçimi	38
3.3.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması.....	38
3.3.4. Resveratrolün Plazmadan Ekstraksiyonu.....	39

3.3.5. Plazmada Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	40
3.3.6. Geliştirilen Yöntemin Plazmadan Geri Kazanım Oranının Hesaplanması	40
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	40
3.4.1. Seçicilik.....	40
3.4.2. Aralık ve Doğrusallık.....	41
3.4.3. Doğruluk	41
3.4.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Kesinlik).....	41
3.4.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	42
3.4.6. Stabilitate	42
3.5. Biyoyararlanım Çalışması.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Resveratrolün HPLC ile Analizi için Yapılan Çalışmalar	44
4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	44
4.1.2. IS Seçimi	44
4.1.3. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi	44
4.1.4. Plazmadan Örnek Hazırlama İşlemi	46
4.1.5. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi	47
4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Plazmadan Geri Kazanım Oranının Hesaplanması	49
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	49
4.2.1. Seçicilik.....	49
4.2.2. Aralık ve Doğrusallık.....	51
4.2.3. Doğruluk	51
4.2.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Kesinlik).....	52
4.2.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	54
4.2.6. Stabilitate	54
4.3. Biyoyararlanım Çalışması.....	54
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	61
ETİK KURUL KARARI	69
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	70
ÖZGEÇMİŞ	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1: RES'in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri	45
Tablo 4.2: Tablo 4.1'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	46
Tablo 4.3: Çözücüler ve bunlardan elde edilen alan değerleri.....	47
Tablo 4.4: RES'in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı plazmada hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri	48
Tablo 4.5: Tablo 4.4'teki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	48
Tablo 4.6: RES'in plazmadan geri kazanımı	49
Tablo 4.7: Plazmada doğruluk ve geri kazanım değerleri	52
Tablo 4.8: Aynı gün içinde plazmada yapılan RES analizlerinin tekrarlanabilirliği.....	53
Tablo 4.9: Farklı günlerde plazmada yapılan RES analizlerinin tekrarlanabilirliği	53
Tablo 4.10: 4°C'de karanlıkta bekletilen RES'in stabilitesi.....	54
Tablo 4.11: Plazmadaki RES ve RES+GA konsantrasyonlarının zaman karşı değişimi	56
Tablo 4.12: RES için hesaplanan farmakokinetik parametreler	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: RES'in kimyasal formülü	3
Şekil 2.2: RES'in artan gliserol oranlarıyla sulu çözeltilerdeki floresan spektrumu.....	3
Şekil 2.3: GA'nın kimyasal formülü.....	26
Şekil 4.1: Kersetinin kimyasal formülü	44
Şekil 4.2: RES'in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi.....	46
Şekil 4.3: RES'in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı plazmada hazırlanan ölçü eğrisi.....	49
Şekil 4.4: Boş sulu çözeltiye ait kromatogram	50
Şekil 4.5: 100 ng/mL RES ve 100 µg/mL IS katkılı sulu çözelti örneğine ait kromatogram.....	50
Şekil 4.6: Boş plazma örneğine ait kromatogram.....	50
Şekil 4.7: 100 ng/mL RES ve 100 µg/mL IS katkılı plazma çözelti örneğine ait kromatogram.....	51
Şekil 4.8:Plazmadaki RES ve RES+GA'nın Konsantrasyonlarının Zamana Karşı Değişimi.....	55
Şekil 4.9: 100 mg/kg tek doz RES verilen tavşandan 2 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram.....	57
Şekil 4.10: 100 mg/kg tek doz RES verilen tavşandan 5 dakika sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram.....	57
Şekil 4.11: 100 mg/kg RES ve 100 mg/kg GA tek doz birlikte verilen tavşandan 10 dakika sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram	57
Şekil 4.12: 100 mg/kg RES ve 100 mg/kg GA tek doz birlikte verilen tavşandan 1 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram	58

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

RES: Resveratrol

GA: Glisirizik Asit

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

C_{maks}: Maksimum Plazma Konsantrasyonu

AUC_{0-t}: Sıfırdan “t” Zamana Kadar Olan Plazma Konsantrasyonu Zaman Eğrisi Altında Kalan Alan

AUC_{0-∞}: Sıfırdan Sonsuza Kadar Plazma Konsantrasyonu Zaman Eğrisi Altında Kalan Alan

T_{maks}: C_{maks}’a Ulaşma Zamanı

t_{1/2}: Eliminasyon Yarı Ömrü

SPE: Katı-Faz Ekstraksiyon

IS: İç Standart

LOD: Gözlenebilme Sınırı

LOQ: Tayin Sınırı

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

RME: Bağlı Ortalama Hata

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

MS: Kütle Spektrometrik

LC-MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografik

UV: Ultraviyole

DAD: Diyot Serili Dedektör

FL: Floresans

i.v.: İntravenöz; p.o.: Per Oral

CMC: Karboksimetilselüloz

PEG: Polietilen Glikol

PLGA: Poli (laktik-ko-glikolik asit)

SNEDDS: Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler

kBq: Kilobekerel (Radyoaktivite Ölçü Birimi)

ÖZET

Ergin Kızılçay, G. (2019). Glisirizik Asidin Resveratrolün Biyoyararlanımı Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada doğal bir biyo-arttırıcı olan glisirizik asidin yine doğal ve faydalı bir fitosterol olan resveratrolün oral biyoyararlanımı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bunun için 12 adet erkek *Oryctolagus cuniculus* Yeni Zelanda Beyaz tavşan üzerinde biyoyararlanım çalışması yapılmıştır. Bir grup tavşana gavajla tek doz 100 mg/kg resveratrol diğer gruba ise 100 mg/kg resveratrol ile birlikte 100 mg/kg glisirizik asit verilmiştir. Tavşanlardan 0; 2,5; 5; 10; 15; 30. dakika ve 1; 2; 4; 6; 8; 10; 24. saatlerde kan alınmış ve plazmalar elde edilmiştir. Örneklerin analizi için yeni bir floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin örnek hazırlanma aşamasında mobil faz ile çöktürme işlemi kullanılmış ve plazmalardaki resveratrol miktarı C₁₈ kolonda (250 x 4,6 mm, 5 µm i.d.) asetonitril-%0,2 formik asit (35:65) mobil faz sisteminin izokratik uygulanması ile 30°C’de 1 mL/dk akış hızında analiz edilmiştir. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 320 nm ve 400 nm olarak belirlenmiş ve yöntemde internal standart olarak kersetin kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin validasyonu ICH kurallarına göre yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 10-800 ng/mL aralığında doğrusallık göstermiş ve LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,17 ng/mL ve 7,25 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile çalışılan plazma örneklerinde resveratrol ve resveratrolün glisirizik asit ile kombine verilmiş hali için C_{max} değerleri sırasıyla 100,14 ng/mL ve 270,16 ng/mL; AUC_{0-∞} değerleri sırasıyla 8,97 ng.saat/mL ve 38,59 ng.saat/mL olarak bulunmuştur. Farmakokinetik veriler birbiri ile kıyaslandığında resveratrolün glisirizik asit ile kombinasyonundan elde edilen AUC_{0-∞} ve C_{max} değerlerinde sırasıyla % 430 ve % 270 oranında artış tespit edilmiştir. Bu değerler bize glisirizik asidin resveratrolün biyoyararlanımını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoyararlanım, Resveratrol, Glisirizik asit, Kantitatif tayin, HPLC

ABSTRACT

Ergin Kızılçay, G. (2019). Effect of Glycyrrhizic Acid on The Bioavailability of Resveratrol. İstanbul University, Institute of Health Science, Analytical Chemistry Department. Doktora Tezi. İstanbul.

In this study, the effect of glycyrrhizic acid, a natural bio-enhancer, on the oral bioavailability of resveratrol, a natural and useful phytosterol, was investigated. Bioavailability study was performed on 12 male *Oryctolagus cuniculus* New Zealand White rabbits. One group of rabbits received 100 mg/kg resveratrol and 100 mg/kg resveratrol and 100 mg/kg glycyrrhizic acid. The rabbits were 0; 2.5; 5; 10; 15; 30 minutes and 1; 2; 4; 6; 8; 10; 24 hours blood was collected and plasmas were obtained. A new HPLC-FL method was developed for the analysis of the samples. In the sample preparation of the method, mobile phase precipitation was used and the amount of resveratrol in the plasma was measured in the C18 column (250 x 4,6 mm, 5 μ i.d.) by isocratic application of acetonitrile-0.2% formic acid (35:65) mobile phase system with 30°C was analyzed at a flow rate of 1 mL/min. Excitation and emission wavelengths were determined as 320 nm and 400 nm, respectively, and quercetin was used as the internal standard in the method. The validation of the developed method was performed according to ICH rules. The calibration curve showed a linearity of 10-800 ng/mL and LOD and LOQ values were determined as 2,17 ng/mL and 7,25 ng/mL, respectively. In the plasma samples studied, C_{max} values of resveratrol and resveratrol combined with glycyrrhizic acid were 100,14 ng/mL and 270,16 ng/mL, respectively; The $AUC_{0-\infty}$ olarak values were 8,97 ng.h/mL and 38,59 ng.h/mL, respectively. When the pharmacokinetic data were compared with each other, the increase in $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} values obtained from the combination of resveratrol with glycyrrhizic acid was 430% and 270%, respectively. These values showed us that glycyrrhizic acid significantly increases the bioavailability of resveratrol.

Key Words: Bioavailability, Resveratrol, Glycyrrhizic acid, Quantitative determination, HPLC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Resveratrol (trans-3,4',5-trihidroksistilben) başta üzüm olmak üzere pek çok farklı bitkide varolan ve sağlığa yararlı birçok etkisi bulunan doğal bir fitoaleksindir [1]. Bilim adamları RES'in sağlığa yararlı potansiyel etkilerini araştırmaya ilk kez 1992 yılında kırmızı şaraptaki varlığı ilk kez bildirildiğinde başlamışlardır. Son yıllarda RES'in kanser gelişimini inhibe ettiğinin, hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde yaşam süresini uzattığının iddia edilmesi ile RES üzerindeki bilimsel ilgi artmış ve buna bağlı olarak yapılan çalışmalar da artış göstermiştir [2].

RES insanda oral yoldan alındığında iyi absorbe olmasına rağmen, metabolizma ve eliminasyonunun hızlı olması nedeniyle biyoyararlanımı göreceli olarak düşük bir bileşiktir [2]. Şu ana kadar tehlikeli bir yan etki gösterdiğine dair herhangi bir kanıt olmamasına rağmen etkili bileşiklerin vücuda alınmasında az ilaç ile daha çok etki elde edilebilmesi temel ilkesi kapsamında RES'in biyoyararlanımının incelenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda da artış gözlenmiştir. Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda RES'in farmakokinetik parametreleri birbirine tam uyum göstermemesine rağmen elde edilen C_{max} , t_{max} ve AUC değerleri saf madde olarak tek başına kullanıldığında biyoyararlanımının düşük olduğunu kanıtlar niteliktedir [3-6]. Bu nedenle sağlığa bu kadar yararlı olduğu bilinen RES'in biyoyararlanımının artırılması araştırmacıların hedefi haline gelmiş ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Tezin giriş kısmında daha ayrıntılı olarak anlatılan bu çalışmalarda doğal halde (üzüm, üzüm suyu, şarap vs gibi) alınan RES'in küçük dozlardaki biyoyararlanımı [7], dokulardaki dağılımı [8,9], etkinin doza bağımlılığı [10,11], RES'in biyoyararlanımına gıdaların etkisinin olup olmadığı [12,13], bazı bileşiklerle [14] ve biyoyararlanım artırıcı etkisi olduğu bilinen bazı bitkilerle [15] veya doğal etkin maddelerle birlikte alındığında [16,17] biyoyararlanımının nasıl etkilendiği araştırılmıştır. RES çalışmalarının büyük çoğunluğu ise biyoyararlanımın farklı ilaç şekilleri ve formülasyonlarla artırılıp artırılamayacağını incelenmesi üzerinedir [18-37].

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışması, RES'in bir doğal etkili bileşik olan, meyan kökü ekstresi içerisinde ülkemizde sıkça tüketilen ve daha önce biyoyararlanımı artırıcı etkisi pek çok çalışma ile kanıtlanmış [38-43] GA ile birlikte alındığında biyoyararlanımının ne şekilde etkileneceği üzerine tasarlanmıştır.

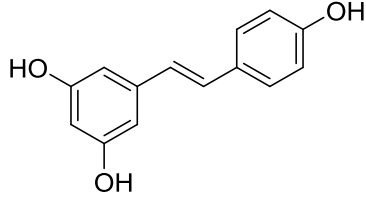
Bu amaçla erkek *Oryctolagus cuniculus* Yeni Zelanda Beyaz tavşanlar üzerinde biyoyararlanım çalışması planlanmış, bir grup tavşana tek başına suda süspansiyon halinde RES, diğer gruba ise yine suda süspansiyon halinde GA ile birlikte RES verilerek toplanan plazma örneklerinin tarafımızdan geliştirilecek yeni bir HPLC yöntemi ile analiz edilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

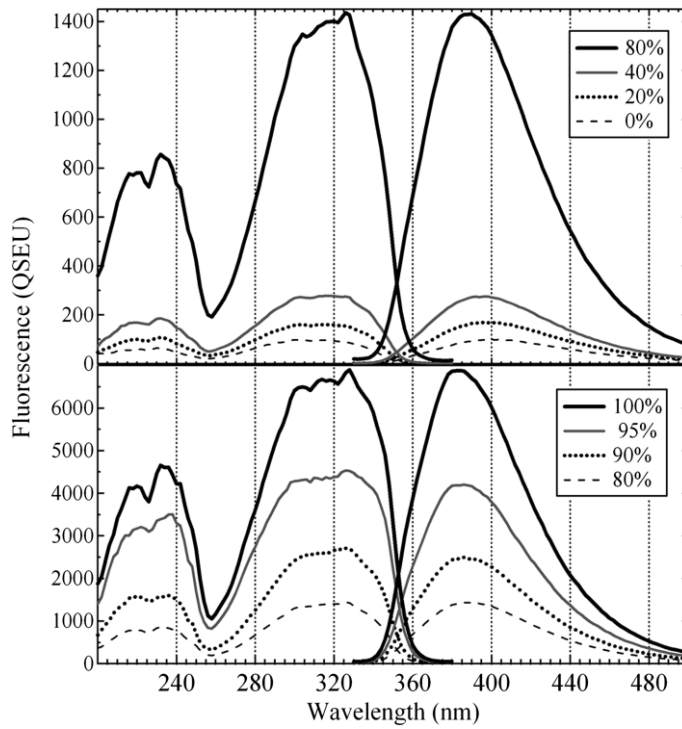
2.1. Resveratrol

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2.1: RES'in kimyasal formülü

Kimyasal adı 5-[(1E)-2-(4-Hidroksifenil)etenil]benzen-1,3-diol olan RES (3,4',5-trihidroksistilben) stilbenler olarak bilinen bir polifenolik bileşik grubuna dahildir (Şekil 2.1) [2]. Hafif grimsi beyaz renkte, kokusuz olan RES'in kapalı formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ve molekül ağırlığı 228,24 g/mol'dür. Etanol, DMSO gibi organik çözücülerde kolay çözünür, sudaki çözünürlüğü 3 mg/100 mL'dir [44]. Cis ve trans konfigürasyonları yağda kolay çözünür [2]. Artan gliserol (v/v) oranlarıyla 20°C'de sulu çözeltilerdeki RES'in (10 μ M) floresan spektrumu Şekil 2.2'de verilmiştir [70].



Şekil 2.2: RES'in artan gliserol oranlarıyla sulu çözeltilerdeki floresan spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

RES, trans-resveratrol (trans-3,4',5-trihidroksistilben) başta üzüm olmak üzere pek çok farklı bitkide varolan doğal bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler, bitkilerde UV ışını, stres, zedelenme ve enfeksiyonlara karşı gelişen ikincil yapılardır. RES, bitkilerde özellikle kırmızı ve siyah üzümde, yer fıstığında ve ananasta yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. RES, kırmızı ve siyah üzümün soğuk hava koşulları, mantar enfeksiyonları gibi etkenlere bağlı olarak kendini korumak için ürettiği bir maddedir [1].

Cis- ve trans-RES'in her ikisi birden glukozit halinde (glukoz molekülüne bağlı) bulunurlar. Resveratrol-3-O-beta-glukozit "piceid" olarak da isimlendirilir. Bilim adamları RES'in sağlığa yararlı potansiyel etkilerini araştırmaya ilk kez 1992 yılında "Fransız Paradoksu"nu açıklayabileceği yönünde spekülasyonlara yol açan kırmızı şaraptaki varlığı ilk kez bildirildiğinde ilgilendiler. Kısa bir süre önce, RES'in kanser gelişimini inhibe ettiğinin ve hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde yaşam süresini uzattığının gösterilmesi üzerindeki bilimsel ilginin artmasına yol açmıştır [2].

Trans-RES insanda oral yoldan alındığında iyi absorbe olmasına rağmen, metabolizma ve eliminasyonunun hızlı olması nedeniyle biyoyararlanımı göreceli olarak düşüktür. Trans-RES sağlıklı erkek ve kadınlara oral yoldan 25 mg dozda verildiğinde plazmada (kanda) saptanan RES miktarı sadece eser düzeyde olurken, RES metabolitlerinin plazma konsantrasyonları ilacın alınmasından 30-60 dakika sonra 2 µM/L civarındaki konsantrasyon düzeylerine çıkar. Çoğunlukla RES glukozitleri (piceid) içeren üzüm suyundaki RES'in biyoyararlanımı trans-RES'den de düşük olabilir. RES'in insanlardaki biyoyararlanımına ilişkin bilgiler önemlidir. Bunun nedeni araştırmaların metabolize olmamış RES'e maruz kalan hücre kültürlerinde yapılmış olması ve araştırılan RES konsantrasyonlarının insanda oral yoldan alındığında ulaşılan doruk RES konsantrasyonlarından 10-100 kat daha yüksek olmasıdır. Sindirim sistemindeki hücreler çoğunlukla metabolize olmamış RES'in etkisinde kalmasına rağmen insanlarda yapılan çalışmalar diğer dokuların esas olarak RES'in metabolitlerinin etkisi altında kaldığına işaret etmektedir. RES metabolitlerinin biyolojik aktivitelerine ilişkin bilgiler çok kısıtlıdır ve bazı dokuların RES metabolitlerini tekrar RES'e dönüştürüp dönüştürmediği bilinmemektedir [2].

RES için kullanımda güvenliği veya kabul edilebilir günlük alımı (ADI) belirlemek için hayvan ve insan verileri dahil olmak üzere yeterli niteliksel ve niceliksel bilimsel kanıtlar vardır. Deneysel veriler ve bir belirsizlik faktörü (insanlarda güvenlik bilgisinin eksikliğini gidermek için) kullanılarak insan kullanımı için RES ADI belirlenebilir. Kısa süreli (28 günlük) toksisite çalışmaları, 300 mg/kg/gün'e kadar olan dozlarda olumsuz etkileri göstermemiştir. Farelerde yapılan bir yıllık kronik bir çalışmada, 22,4 mg/kg/gün doz seviyesinde RES herhangi bir yan etkiye neden olmamıştır. RES'in fare çalışmalarında kanserojen bir etkisi de tespit edilmemiştir. Bu çalışmalarda, 45 organın klinik patolojisi ve histolojisi gibi güvenlikle ilgili parametreler, 1000 mg/kg/gün'e kadar olan dozlarda toksisite göstermemiştir. Mevcut kanıtlar, düşük doz seviyelerinde RES'in üreme ve gelişimsel toksisiteye neden olma ihtimalinin düşük olduğunu desteklemektedir [45].

Smoliga ve Blanchard [3] RES'in biyoyararlanımının düşük olması dolayısıyla insanlarda verimini arttırma yönünde çözümün ne olacağına dair bir derleme yapmışlardır. RES'in, yaşlanma sürecini potansiyel olarak yavaşlatarak ve kronik hastalıkları önleyerek sağlıklı yaşam süresini geliştirmede önde gelen madde olarak ortaya çıktığını vurgulamışlardır. İnsanlarda RES'in zayıf biyoyararlanımı, temel bilim bulgularını klinik faydaya dönüştürmek için büyük bir endişe kaynağı olmuştur. Her ne kadar insan klinik denemelerinden bir takım olumlu bulgular ortaya çıksa da, kısmen kullanılan dozaj protokollerine dayandırılacak sonuçların birçoğunun çelişkili olduğunu rapor edilmiştir. RES'in biyoyararlanımını arttırmak için çeşitli gıdalarla, mikronize tozlarla tüketimini, ilave fitokimyasallar, kontrollü salım preparatları ve nanoteknolojik formülasyonlar ile kombinasyonunu içeren bir dizi teorik çözüm geliştirilmiştir. Laboratuvar modelleri bu yaklaşımların hepsinin RES'in biyoyararlanımını arttırma ve klinik faydasını optimize etme potansiyeline sahip olduğunu gösterirken, RES'in insanlarda biyoyararlanımı ile ilgili şaşırtıcı bir şekilde çok az veri vardır. Biyoyararlanım gerçekten RES'in klinik kullanımında bir sınırlama ise, insanlarda biyoyararlanımı optimize etmek için yöntemleri araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu derlemede mevcut biyoyararlanım verileri özetlenmiş ve daha çok insanlardan gelen verilere odaklanılmış ve bu alanda gelecekteki araştırmalar için önerilen talimatlar sunulmuştur.

Wenzel ve Somoza [4] trans-RES'in metabolizması ve biyoyararlanımı hakkında bir derleme yapmışlardır. RES'in bitkilerdeki çoğu stilben antifungal fitoaleksinler gibi davrandığını, genellikle sadece enfeksiyon veya yaralanmaya yanıt olarak sentezlenen bileşiklerden biri olduğunu, ağaçlarda, birkaç çiçekli bitkide, yer fıstığında ve üzüm bağlarında tespit edildiğini rapor etmişlerdir. RES'in başlıca besin kaynaklarının üzüm, şarap, yerfıstığı ve yerfıstığı ürünleri olduğunu belirtmişlerdir. Çok sayıda in vitro çalışma, RES'in farklı biyolojik etkilerinin tarif edildiğini, başlıca etkilerinin antioksidan, anti-enflamatuar, östrojenik, antikanser ve kemopreventif etkiler olduğunu özetlemişlerdir. Absorpsiyon, metabolizma ve bunun sonucu olarak RES'in biyoyararlanımı hakkında bilgi vermek için, bu derlemede ele alınan in vitro, ex vivo ve in vivo modeller dahil olmak üzere farklı araştırma yaklaşımlarını rapor etmişlerdir. Veriler özetlendiğinde RES'in emilim ve metabolizasyonunu takiben yaklaşık % 75'inin dışkı ve idrarla atıldığını belirtmişlerdir. RES'in oral biyoyararlanımının, hızlı ve kapsamlı metabolizma ve bunun sonucu olarak RES glukuronitler ve RES sülfatlar olarak çeşitli metabolitlerin oluşumu nedeniyle neredeyse sıfır olduğunu rapor etmişlerdir. RES'in konjugatlarının potansiyel biyolojik aktivitesinin gelecekteki araştırmalarda dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır.

Perrone ve arkadaşları [5] RES'in bazı hastalıklarda özelliklerini anlatan bir derleme yapmışlardır. Sağlığı geliştirme stratejileri ve yaşam tarzı değişiklikleri hastalıkların önlenmesinde önemlidir. Bu nedenle, diyet, sağlık ve gıdadaki biyoaktif bileşiklerin varlığı arasındaki ilişkilerin incelenmesi önemli derecede dikkat çekmektedir. Bu derlemede RES'in etkilerini ve hedeflerini belirlemişlerdir ve RES'in sağlığını arttırmada gelecekteki umutlarını göz önünde bulundurmuşlardır. RES'in anti-enflamatuar, anti-viral, anti-mikrobiyal, östrojenik, antikanser, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve immüno-modülatör fonksiyonları sergilediği iddiasını belirtmişlerdir. Bu derlemede RES ve RES glukozitlerinin biyokimyasını belgeleyen bir girişin ardından RES'nin biyoyararlanımını ve farmakokinetiğini açıklamışlardır. Çoklu özellikleri göz önüne alındığında, bu derlemenin, RES'in bir antioksidan ve kemopreventif ajan olarak potansiyel yararlarına odaklandığını belirtmişlerdir.

Almeida ve arkadaşları [46] trans-RES'in farmakokinetiğini ve güvenliğini araştırmak için çift kör, randomize, plasebo kontrollü bir çalışma yapmışlardır. On sağlıklı yetişkin denekten dört grupta (5 erkek ve 5 kadın), iki denek plasebo ve sekiz

denek on üç doz için günde 6 kere trans-RES'ten 25, 50, 100 veya 150 mg almak üzere randomize edilmiştir. Doz sonrası 0,8-1,5 saatte trans-RES'in pik plazma konsantrasyonlarına ulaşmışlardır. 13.trans-RES 25, 50, 100 ve 150 mg dozu takiben, ortalama pik plazma konsantrasyonu (C_{max}) 3,89; 7,39; 23,1 ve 63,8 ng/mL ve plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan ortalama alan ($AUC_{0-\tau}$) 3,1; 11,2; 33,0 ve 78,9 ng.saat/mL olarak bulmuşlardır. Bireyler arası değişkenlik yüksek ve değişkenlik katsayıları $> \% 40$. Trans-RES'in yarı ömrü, tekli dozların ardından 1-3 saat ve tekrarlanan dozu takiben 2-5 saattir. Konsantrasyonlar üzerinden (C_{min}) 25 ve 50 mg'dan sonra < 1 ng/mL, 100 mg'dan sonra 3 ng/mL ve 150 mg'dan sonra < 10 ng/mL idi. Trans-RES'in farmakokinetiği 24 saatlik değişkenlik gösterdiğini ve olumsuz olguların ciddiyeti hafif ve gruplar arasında benzer olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak, tekrar tekrar verilmesi iyi tolere edilmiştir, ancak kullanılan yüksek doz ve kısa doz aralığı rağmen, trans-RES nispeten düşük plazma konsantrasyonları üretmiştir. Biyoyararlanım sabah tatbikatından sonra daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Azarin-Ortuno ve arkadaşları [47] domuzlar ve insanlar arasındaki fizyolojik benzerliği temel alarak domuz plazmasında RES'in metabolik profilini ve farmakokinetiğini karakterize etmek ve elde ettikleri değerleri insanlarda rapor edilen değerlerle karşılaştırmak amacıyla bu çalışmayı yapmışlardır. Domuzlara oral yoldan 5,9 mg/kg olacak şekilde RES vermişlerdir. Plazmada RES ve RES'in metabolitleri olan RES-diglucuronid (1) , iki RES-sülfoglukuronid izomeri (2,3), iki RESglucuronid izomeri (4,5), RES-sülfat (6) ı HPLC-MSMS kullanarak tanımlamışlardır. En çok bulunan metaboliti 2,5 (resveratrol 3-0-glukuronid) ve 6 olarak tespit etmişlerdir. T_{max} 'ı bileşik 2 ve 5 için 0,9 saat; bileşik 3 için 2 saat olarak bulmuşlardır. En yüksek C_{max} değeri, metabolit 5 için 2223 ng/mL (5.5 μ M); bu, sırasıyla 6, 2 ve 3 numaralı metabolitler için 2,6; 3,3 ve 12 kat daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. RES alımından 0,5 saat sonra RES'in pik plazma seviyelerini (53 ng/mL; 0,23 μ M) tespit etmişlerdir. Düşük RES aglikon seviyelerinin yanı sıra, domuzlardaki RES metabolik profili, insanlarda bulunanlardan farklı olduğunu, gerçek aktif RES metabolitlerinin tanımlanması, yaş, cinsiyet ve metodolojik yaklaşımlar gibi olası birçok etkileyici faktörü göz önünde bulundurması gereken daha kapsamlı çalışmalar gerektirdiği sonucuna varmışlardır.

La Porte ve arkadaşları [48] sağlıklı insan deneklerde günde iki kez 2000 mg trans-RES'in gıda, kersetin ve alkol (etanol) ile birlikte alındığında stabil farmakokinetiği ve tolere edilebilirliği konusunda çalışmışlardır. Günde iki kez trans-RES 2000 mg'lık sabit durumlu 12 saatlik farmakokinetik, standart bir kahvaltı, yüksek yağlı bir kahvaltı, günde iki kez 500 mg kersetin ve % 5 alkol 100 mL ile çalışmışlardır. Trans-RES plazma konsantrasyonlarını, tandem kütle spektrometrisi ile sıvı kromatografi kullanılarak belirlemişlerdir. Standart kahvaltıdan sonra trans-RES için $AUC_{0-12\text{saat}}$ ve C_{max} değerleri 3558 ng.saat/mL ve 1274 ng/mL'dir. Yağlı kahvaltıdan sonra standart kahvaltıya kıyasla C_{max} ve $AUC_{0-12\text{saat}}$ değerlerinde sırasıyla % 46 ve % 45 oranında azaltmış olduğu tespit edilmiştir. Kersetin 500 mg günde iki kez veya %5 alkol 100mL trans-RES farmakokinetiğini etkilemediğini bulmuşlardır. Sekiz denekten altısında ishal bildirimi olduğu belirtilmiştir.

Nunes ve arkadaşları [49] sağlıklı yaşlı ve genç bireylerde tekrarlanan uygulama sonrası trans-RES'in farmakokinetiğini incelemişlerdir. Tek bir doz periyodundan ve ardından çoklu doz periyodundan oluşuyordu; bu süre zarfında katılımcılara, 3 gün boyunca 8 saatlik aralıklarla 200 mg'lık bir doz oral yoldan verilerek denemeyi yapmışlardır. $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 ve 24 saatlerde kanları toplamışlardır. Toplanan plazma örneklerini HPLC-MS ile analiz etmişlerdir. Sonuç olarak, günde üç kez 200 mg oral uygulamadan sonra trans-RES farmakokinetiği yaştan bağımsız olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, kullanılan nispeten yüksek doz ve sık doz rejimine rağmen, nispeten düşük plazma konsantrasyonlarında trans-RES ürettiğini bulmuşlardır.

2.1.3. Biyoyararlanım Çalışmaları

Walle ve arkadaşları [6] altı gönüllü insanda 14C-RES'in oral ve i.v. uygulamadan sonra absorpsiyonunu, biyoyararlanımını ve metabolizmasını incelemişlerdir. 25 mg'lık oral dozun emilimini en az %70, RES ve metabolitlerinin en yüksek plazma seviyelerini 491 ± 90 ng/mL (yaklaşık 2 μM) ve plazma yarı ömrünü $9,2 \pm 0,6$ saat olarak bulmuşlardır. Bununla birlikte plazmada sadece eser miktarda değişmemiş RES (<5 ng/mL) tespit etmişlerdir. Oral dozun çoğu idrarda geri kazanılmıştır. Yapılan LC-MS analizi, üç metabolik yolu, yani fenolik grupların sülfat ve glukronik asit konjugasyonunu ve ilginç şekilde, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen yol olan alifatik çift bağın hidrojenlenmesini tanımlamıştır. Bağırsak/karaciğer

ile aşırı hızlı sülfat konjugasyonu, RES'in biyoyararlanımında hız sınırlayıcı bir adım gibi görünmektedir. Plazma verilerinden elde edilen değişmemiş RES'in oral biyoyararlanımını sıfıra yakın olarak bulmuşlardır.

Ortuno ve arkadaşları [7] insanlarda RES'in biyoyararlanımı üzerindeki matriks etkilerini araştırmışlardır. Bunun için 11 sağlıklı erkek gönüllüde RES'in farmakokinetiğini kırmızı şarap (250 mL), üzüm suyu (1/L) veya tabletler (trans-RES ile zenginleştirilmiş kırmızı şarap ekstreleri) olmak üzere üç üzüm ürününün uygulamasından sonra randomize, çapraz kontrollü, kontrollü klinik deneylerle değerlendirmişlerdir. Uygulanan üründen bağımsız olarak trans-RES dozları yaklaşık olarak 14 µg/kg olarak hesaplanmıştır. Numunelerin analizleri kapiler gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi ile yapılmış ve plazma ve idrarda cis-RES, trans-RES ve dihidroresveratrol belirlenmiştir. İdrar numunelerinde trans-RES, cis-RES ve dihidroresveratrol için LOD değerleri sırasıyla 2,6; 2,1 ve 3,1 ng/mL; LOQ değerleri 7,86; 6,35 ve 9,38 ng/mL; plazmada numunelerinde ise aynı sırayla LOD değerleri 0,51; 1,0 ve 0,71 ng/mL; LOQ değerleri 1,53; 3,04 ve 2,16 ng/mL olarak bulunmuştur. C_{max} değerleri ise trans-RES ve cis-RES için sırasıyla şarapta 29,2 ve 18,4 ng/mL; meyve suyunda 32,1 ve 6,8 ng/mL; tabletlerde ise sadece trans-RES değeri 6,2 ng/mL; t_{max} değerleri ise trans-RES ve cis-RES için şarapta 2 saat, meyve suyunda 4 saat ve tablette sadece trans-RES için 1 saattir. $AUC_{0-10saat}$ değerleri trans-RES ve cis-RES için sırasıyla şarapta 172,9 ve 94,4 ng.saat/mL; meyve suyunda 185,7 ve 47,9 ng.saat/mL; tabletlerde ise sadece trans-RES değeri 27,2 ng.saat/mL'dir. Hidroliz sonrası trans-RES'in plazma konsantrasyonunun, tüm üzüm ürünlerine ve cis-RES'in şarap ve üzüm suyundan gelen miktarına bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Bu fenolik bileşiklerin serbest formlarının, plazmada saptanamadığı kabul edilmiş benzer trans-RES dozları uygulanmasına rağmen, şarap ve üzüm suyundaki biyoyararlanımın tabletlerden 6 kat daha yüksek olduğunu bulunmuştur. RES'in doğal üzüm ürünlerinde tabletlerden daha iyi emildiği, bu sonucun matriksin biyoyararlanımdaki önemini gösterdiği kanısına varılmıştır. RES'in in vivo biyoyararlanımının, doğal ürünlerde bulunan diğer bileşenler tarafından artırıldığı ve matrisin RES emiliminde kilit rolü vurgulanmıştır.

Vitrac ve arkadaşları [8] bir kanser kemopreventif polifenol olan [14C]-trans-RES'in, ağızdan uygulamadan sonra fare dokularında dağılımı ve emilimi üzerine çalışma yapmışlardır. 14C etiketli malzeme 0,4 mL propilen glikol:su (3:2) ile

çözölmüştür. 1.gruba 7,4 kBq 14C-trans-RES 5 mg/kg; 2. ve 3.gruba 74 kBq 14C-trans-RES 50 mg/kg; 4.gruba 92,5 kBq 14C-trans-RES 66 mg/kg verilmiştir. Erkek farelere tek bir oral doz 14C-trans-RES verilmiştir. 1. ve 2. grup 1,5;3;6. saatlerden sonra; 3. ve 4. grup 3 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Radyoaktivitenin dokularda dağılımı tüm vücut otoradyografisi, kantatif organ düzeylerini belirleme ve mikrootoradyografi ile değeriendirmişlerdir. Ayrıca, böbrek ve karaciğeriindeki radyoaktif bileşikleri tanımlanması HPLC ile yapılmıştır. Farelerin otoradyografik olarak incelenmesi ve çeşitli organlardaki radyoaktivite miktarının belirlenmesi, organlarda ve biyolojik sıvılarda emilim ve eliminasyonda (mide, karaciğeri, böbrek, bağırsak, safra, idrar) tercih edilen bir 14C-trans-RES fiksasyonu ortaya çıkarmıştır. Bundan başka, 14C-trans-RES kaynaklı radyoaktivitenin, mikrootoradyografi ile desteklenen bir bulgu olan karaciğeri ve böbreğinin dokularına nüfuz edebileceğini gösterilmiştir. Bu dokularda glukurono ve/veya sülfokonjugatlarla birlikte bozulmamış 14C-trans-RES'in varlığı da gösterilmiştir. Bu çalışma, trans-RES'in oral uygulamadan sonra biyoyararlı olduğunu ve çoğunlukla bozulmamış formda kaldığını göstermektedir.

Vitaglione ve arkadaşları [9] trans-RES'in besin kaynaklarındaki biyoyararlılığını ve bunun karbon tetraklorür (CCl₄) kaynaklı karaciğeri lipid peroksidasyonunun bir hayvan modeli üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 10 sıçana 14 gün boyunca trans-RES 3 mg/kg olacak şekilde üzüm sapı ekstresi (hidro-alkolik çözelti: %2 etanol ile hazırlanmış 0,6 mg trans-RES içeren) oral olarak uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak da on sıçana üzüm sapı ekstresi olmadan sadece çözöcüsü hidro-alkolik çözelti enjekte edilmiştir. 1 hafta sonra, CCl₄ enjeksiyonu ile karaciğeri lipid peroksidasyonunun indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Serum ve karaciğeri örnekleri farklı zaman aralıklarında trans-RES içeriğini değeriendirmek için HPLC-UV-DAD ve LC-MS-MS ile analiz edilmiştir. Ayrıca oksidatif stresin belirteci olarak karaciğeri malondialdehit (MDA) te ölçölmüştür. Trans-RES'in karaciğeri 7 gün sonra 49,8±10,2 ng/g'ye ve 14 gün sonra 191,8±15,3 ng/g'ye ulaştığını tespit edilmiştir. Serumda trans-RES tespit edilememiştir. 24 saat ve 1 hafta sonra CCl₄ enjeksiyonuna bağılı MDA karaciğeri konsantrasyonundaki artış, trans-RES özütü ile yapılan işleme sırasıyla % 38 ve % 63 oranında azalmıştır. Böylece trans-RES tüketiminin in vivo olarak CCl₄ ile indüklenmiş karaciğeri lipid peroksidasyonunu önleyebildiği ve böylece trans-RES'in hepatoprotektif özellik gösterdiği bulunmuştur.

Das ve arkadaşları [10] RES'in sudaki çözünürlüğünün ve doz manipülasyonunun farmakokinetiği üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Suda çözünen intravenöz ve oral RES formülasyonları sırasıyla hidrokisipropil- β -siklodekstrin (HP- β -CD) ve rastgele metillenmiş- β -siklodekstrin (RM- β -CD) ile hazırlanmıştır. Sodyum tuzu ve RES'in karboksimetil selüloz (CMC) içindeki süspansiyonu sırasıyla referans intravenöz ve oral formülasyonlar olarak kullanılmıştır. RES'in farmakokinetiği Sprague-Dawley sıçanlarında değerlendirilmiştir. Plazma RES konsantrasyonları HPLC ile ölçülmüştür. Hem HP- β -CD hem de RM- β -CD RES'in sudaki çözünürlüğünü arttırmıştır. İntravenöz uygulamadan sonra, formülasyon tiplerinden bağımsız olarak test edilen tüm dozlarda (5, 10 ve 25 mg/kg) RES'in 25 mg/kg dozunda meydana gelen ve doğrusal olmayan eliminasyon ile hızlı bir şekilde elimine edildiği gözlenmiştir. RM- β -CD, oral yoldan uygulanan RES'in maksimum plazma konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırmıştır, ancak CMC süspansiyonuna kıyasla oral biyoyararlanımı arttırmamıştır. Ayrıca, oral biyoyararlanım test edilen tüm dozlar (15, 25 ve 50 mg/kg) arasında değişmeden kalmıştır. Sudaki çözünürlük engeli hızı etkileyebilir ancak RES'in emilimini etkilemez. Ayrıca, doz manipülasyonunun (50 mg/kg'a kadar) RES'in oral biyoyararlanımı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Ancak bir formülasyonda C_{max} değerinde 25 kat artış gözlenmiştir.

Kothari ve Troxel [11] RES ve arginin konjugatlarının memelilerde glikoz toleransını, yeniden saç çıkmasını ve RES'in biyoyararlanımını geliştirmesi üzerine yaptıkları çalışmanın patentini almışlardır. Sıçanlarda yapılan RES'in biyoyararlanım çalışmasında deneklere RES-arginin içeren tablet, kapsül veya kapsülüsü tablet formunda kilogram başına 10 mg ile 500 mg en az iki haftalık süre boyunca verilmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, RES-arginin konjugatının etkili dozu, en az iki haftalık bir süre boyunca kilogram vücut ağırlığı başına 10 ila 250 mg olarak bulunmuştur.

Vaz-da-Silva ve arkadaşları [12] oral yoldan verildikten sonra gıdanın trans-RES'in biyoyararlanımı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 24 sağlıklı bireyle yapılan deneyde bir gruba standart yüksek yağ içerikli öğün diğer gruba 8 saatlik açlık ardından tek bir doz 400 mg trans-RES uygulanmıştır. Doz öncesi ve doz sonrası 1/4, 1/2, 3/4, 1, 1 1/2, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 ve 24. saatlerde kan alınmıştır. Katı faz ekstraksiyonu ile temizlenen plazma örnekleri HPLC-MS ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda trans-

RES'in farmakokinetik parametrelerinde bireyler arası büyük değişkenlikler olduğu ortalama $\pm$ SD maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}), beslenenlerde $42,2 \pm 36,6$ ng/ml ve açlık koşullarında $47,3 \pm 30,0$ ng/ml olduğu bulunmuştur. Ortalama C_{max} (t_{max}) süresinin beslenme ile 2,0 saat; açlıkta 0,5 saat olduğu ($p < 0,0001$). Beslenen ve açlık % 90 güven aralığında bulunan değerler C_{max} için sırasıyla 79,4 ve 53,8 (artış %117,0) ve $AUC_{0-\infty}$ için sırasıyla 106,0 ve 86,8 (artış % 128,0) olarak bulunmuştur. Tek doz 400 mg oral dozu takiben trans-RES'in absorpsiyon oranı, C_{max} ve t_{max} değerinden de anlaşılacağı gibi gıda varlığı ile önemli ölçüde geciktirilmiştir.

Vitaglione ve arkadaşları [13] insanlar üzerinde kırmızı şaraptan gelen trans-RES'in biyoyararlanımı üzerinde çalışmışlardır. Biyoyararlanım çalışmalarının temel olarak hayvanlarda veya insanlarda çok yüksek dozlarda saf bileşik kullanılarak gerçekleştirildiği, ancak bu çalışmada 25 sağlıklı insanda ılımlı bir kırmızı şarap tüketiminden kaynaklanan trans-RES biyoyararlanımının üç farklı deneyde incelenmesi üzerine çalışmalarda bulunulmuştur. Açken, standart bir yemek, yüksek ve düşük miktarda lipid içeren bir yemek olmak üzere üç farklı şekilde şarap alımını gerçekleştirilmiştir. Trans-RES 3- ve 4-glukuronitler sentezlenmiş, saflaştırılmış ve saf standartlar olarak tanımlanmıştır. Biyoyararlanım verileri, kırmızı şarap uygulamasından sonra farklı zamanlarda alınan serum numunelerinde serbest, 3-glukuronid ve 4-glukuronid trans-RES konsantrasyonu HPLC ile hem UV hem de MS dedektörü kullanılarak ölçülmesiyle elde edilmiştir. Sadece kırmızı şarap alımından 30 dakika sonra toplanan bazı serum örneklerinde serbest trans-RES eser miktarda bulunurken, uzun süreler sonra RES glukuronidlerinin daha baskın olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, trans-RES'in mevcut biyoyararlanım çalışması insanlarda, ilk kez, bileşiğin, ılımlı bir şarap tüketiminden (300 veya 600 mL) sonra da gerçekten absorbe edilebileceğini göstermiştir. Deneylere toplam 25 denek katılmıştır ve şarap tüketiminden sonra RES emiliminin oldukça değişken olduğu görülmüştür. Bileşik, deneye katılan deneklerin yaklaşık yarısının serumunda, serbest veya glukuronide edilmiş halde ve çok farklı konsantrasyonlarda bulunmuştur. Verilerden ortaya çıkan bir başka kanıt, şarap tüketimine bağlı trans-RES absorpsiyonunun biyoyararlanımının, ne yemekten ne de tüketilen lipidlerin cinsinden ve/veya miktarından genellikle etkilenmemesidir. Bu çalışma ile trans-RES biyoyararlanımının, yemekten veya lipid içeriğinden bağımsız olduğu gösterilmiştir.

Uberty ve arkadaşları [14] RES ve vitamin D3'ü kombine ederek yumurtalık dokusu üzerindeki biyolojik etkilerini araştırmışlardır. Amaçları RES'in vitamin D3 ile birlikte over hücreleri ve dokularında ve diğer bazı organlarda kooperatif etkilerini değerlendirmektir. Deneyler, hücre canlılığını, radikal oksijen türlerinin üretimini, Western Blot yoluyla sinyal iletimini ve HPLC ile RES miktarını analiz etmek için hem in vitro hem de in vivo olarak yapılmıştır. Sıçanlara RES (0,5 mg) lipofilik formülü, RES+vitamin D (0,4µg) lipofilik formülü ve vitamin D tek başına (0,4µg) oral olarak uygulanmıştır. Her uygulama için 2, 5, 15, 30, 60, 180, 360, 720, 1440 dakikalarda kan toplanmış, sıçan plazma ve doku numunelerinde (karaciğer, mide, bağırsak, kalp, böbrekler ve yumurtalıklar) RES ölçümü, HPLC-MS analizi ile gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı, radikal oksijen türlerinin üretimi ve hücre içi yollar incelenmiştir. Ayrıca, dişi sıçanlarında ağızdan alım sonrasında hayvan modeli olarak aktive edilen nispi mekanizma araştırılmış, kalp, böbrek, karaciğer ve yumurtalık dokularında biyoyararlanım, biyolojik dağılım ve sinyal iletimi değerlendirilmiştir. Hem in vitro hem de in vivo deneylerde RES, over hücrelerinde vitamin D ile kombinasyon halinde uygulandığında daha belirgin etkiler yaratmış ve bifazik ortak etki göstermiştir. Böylece D3 vitaminin RES'in biyolojik aktivitesini sürdürme ve desteklemedeki rolü açıkça gözlenmiştir. Dahası, RES ile birlikte alınan vitamin D3 kan konsantrasyonlarının bifazik absorpsiyon göstermesi nedeniyle bu çalışmada ilk kez RES ve vitamin D'nin yumurtalık hücresi ve dokusu üzerinde ortak fizyolojik hücre içi mekanizmaların aracılık ettiği ortak bir etkisi olduğunu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, menopoza bağlı ateş basmaları gibi jinekolojik durumlar için yeni tedavilerin geliştirilmesinde temel bir veri olarak kullanılabilir niteliktedir.

Cong ve arkadaşları [15] üç Çin bitki özünün Ganoderma, Rhodiola ve üzüm çekirdeğinin, glukuronidasyonun in vitro ve in vivo inhibisyonu ve RES'in in vivo biyoyararlanımı üzerindeki etkisini incelemek için RES'i model bir ilaç olarak kullanmışlardır. Bitki özlerinin, in vitro olarak UDP glukuronosiltransferazların (UGT) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Üç bitki özünün sıçanlarda RES'in oral biyoyararlanımı üzerindeki etkileri test edilmiştir. Bu çalışma, üzüm çekirdeği, Ganoderma ve Rhodiola özütlerinin, hem in vitro hem de in vivo olarak, bir UGT substratının glukuronidasyonu üzerindeki potansiyel etkilerini belgeleyen ilk rapordur. Sonuçlar, üzüm çekirdeği ve Rhodiola ekstrelerinin, RES'in in vitro ve in vivo olarak glukuronidasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Üzüm çekirdeğinde

serbest RES ile karşılaştırıldığında önemli bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Serbest RES ve üzüm çekirdeğindeki $AUC_{0-6\text{saat}}$ değerleri sırasıyla $2,05 \pm 0,62$ ve $1,27 \pm 0,39$ $\mu\text{g.saat/mL}$ 'dir. Ek olarak, birlikte uygulanan üzüm çekirdeği ekstresi tarafından sağlanan bağırsak glukuronidasyonu inhibisyonunun, in vivo biyoyararlanımda iyileşme sağladığı bulunmuştur. Genel olarak, her ne kadar bitki özleri, in vitro ve in vivo olarak RES'nin glukuronidasyonu için inhibisyon gösterse de, glukuronidasyonun inhibisyonu mutlaka RES'in in vivo biyoyararlanımını arttırması anlamına gelmediğini vurgulanmıştır.

Wightman ve arkadaşları [16] piperin ile RES'in birlikte kullanımının, RES'in bilişsel ve serebral kan akışı (CBF) açısından biyoyararlanımı ve etkinliğini etkileyip etkilemediğini tespit etmek amaçlı çalışmışlardır. Bu çalışmada randomize, çift-kör, plasebo kontrollü, denek içi tasarım kullanılmıştır, burada yirmi üç yetişkine plasebo, trans-RES (250 mg) ve piperinli (20 mg) trans-RES ayrı günlerde en az bir hafta arayla oral olarak kapsül şeklinde verilmiştir. 45, 90 ve 120 dakikakalarda kanlar alınmış ve elde edilen plazma örnekleri LC-MS ile analiz edilmiştir. LOQ değerleri glukuronitler için 16 nM, sülfatlar için 22nM, cis- ve trans-aglikon RES için sırasıyla 145nM ve 290nM olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, piperine bağlı biyo-geliştirme hipotezinin aksine, bu çalışmada gözlemlenen etkilerin şekli, aslında plazma konsantrasyonlarının arttırılmasından ziyade inhibisyonunu göstermektedir; örneğin, 250mg RES ile muameleden sonra toplam metabolitlerin C_{max} 'ı 9,98 μM iken piperin ile kombine durumdaki 4,82 μM bulunmuştur. 40 dakikalık bir dinlenme/absorpsiyon süresinden sonra, katılımcılar çeşitli bilişsel görevler gerçekleştirmişler ve CBF, yakın IR spektroskopisi kullanılarak, frontal kortekste periyod boyunca değerlendirilmiştir. RES ve konjugatlarının plazmada varlığı, aynı dozların ayrı bir grupta uygulanmasından sonra gerçekleştirilen LC-MS analizi ile doğrulanmıştır. Sonuçlar, kombine piperin ve RES'in, sadece plasebo ve RES ile karşılaştırıldığında görev performansı sırasında CBF'yi önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Bilişsel işlev, ruh hali ve kan basıncı piperinden etkilenmemiştir. RES ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarında tedaviler arasında anlamlı farklılık görülmemiştir. Sonuçlar piperin ile RES'in birlikte takviye edilmesinin, RES'in CBF etkileri açısından biyo-etkinliğini arttırdığını, ancak bilişsel performansı arttırmadığını ve biyoyararlanımı değiştirmeden bunu yaptığını göstermiştir. Bu çalışmada biyoyararlanımı arttırıcı olarak iyi bilinen piperinin, sağlıklı

insan deneklerde birlikte desteklendiğinde polifenol RES'in biyo-etkinliğini arttırabileceği gösterilmiştir.

Johnson ve arkadaşları [17] piperinin RES'in glukuronidasyonunu inhibe ederek farmakokinetik parametrelerini arttıracak ve dolayısıyla eliminasyonunu yavaşlayacağı hipotezinde bulunmuşlardır. Bunun için farelerde çalışma yapmışlardır. 24 tok fareye gavajla tek doz 100 µL DMSO içinde 100 mg/kg RES, diğer 24 tok fareye gavajla 50 µL DMSO içinde 100 mg/kg RES+50 µL DMSO içinde 10 mg/kg piperin kombine olarak uygulamışlardır. Farelerden 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 12 ve 24. saatlerde kan alınmış ve katı-faz ekstraksiyonu (SPE) nu takiben serumda RES ve resveratrol-3-O-β-D-glukuronid miktarı LC/MS ile ölçülmüştür. Araştırmacılar kalibrasyon eğrisini RES ve resveratrol-3-O-β-D-glukuronid için sırasıyla 10-10.000 ng/mL ve 33,3-33.333 ng/mL aralığında çalışmışlar; RES ve resveratrol-3-O-β-D-glukuronid için sırasıyla C_{max} değerlerini 2277,27 ng/mL ve 17.544,26 ng/mL bulmuş iken piperinle kombine verilmiş değerleri sırasıyla 35.169,07 ng/mL ve 32.400,54 ng/mL bulmuşlardır. Benzer sıra ile $AUC_{0-\infty}$ değerlerini yalın halde 5046,3 ng.saat/mL ve 89.793,70 ng.saat/mL bulurken piperinle kombine halde sırasıyla 11.583,70 ng.saat/mL ve 73.446,60 ng.saat/mL olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada RES'in piperinle olan kombinasyonunda AUC değerinin %229 ve C_{max} değerinin % 1544 oranında arttığı rapor edilmiştir.

Alfaras ve arkadaşları [18] göğüs kanserinde direnç proteininin (ABCG2/BCRP) konjuge formlarının önemli bir rolü olduğundan; BCRP1'in farelerde oral yoldan 60 mg/kg uyguladıktan sonra trans-RES ve metabolitlerinin biyoyararlanımını ve doku dağılımını araştırmışlardır. Trans-RES ve metabolitlerini bağırsak içeriği, plazma ve dokularda HPLC ile ölçmüşlerdir. Uygulamadan 30 dakika sonra, bağırsak içeriğinde BCRP1'de sırasıyla % 71 ve % 97 oranında RES glukuronid ve sülfatta azalma ve enterositlerden daha düşük bir geçiş olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, bu metabolitlerin AUC'leri sırasıyla %34 ve %392 artarken trans-RES'de bir azalma tespit etmişlerdir. Sonuç olarak BCRP1'in RES konjugatlarının geçişinde önemli bir rol oynadığını, bunun da biyoyararlanıma, doku dağılımına ve eliminasyona katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.

Amiot ve arkadaşları [19] trans-RES'in kuru toz olarak düşük emiliminin üstesinden gelmek için geliştirdikleri çözünabilir galenik formunun (çözünür formülasyon) tedavi edilen gönüllü insanlardaki farmakokinetiğini, biyoyararlanımını

ve toksisitesini araştırmış ve ayrıca kemirgenlerdeki biyolojik etkileri hakkında verileri incelemişlerdir. Her iki cinsiyetten on beş sağlıklı gönüllü, bir çaprazlama tasarımda, iki şekilde 40 mg trans-RES çözünür formülasyon (kapsülüsü tablet) ve orijinal toz içeren kapsüller almışlardır. Kan örnekleri 15 dakika, 30 dakika ve 5 saat boyunca her saat toplanmış; trans-RES ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarının LC-MS ile analizleri yapılmıştır. Çözülebilir tek doz (40 mg) trans-RES'in iyi emildiği ve renal eliminasyonda glukuronid ve sülfat konjugatlarının da metabolize olmasına rağmen, birkaç saat boyunca biyolojik olarak etkili kan seviyeleri (0,1-6 μ M) ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, kuru toz halinde tatbik edilen trans-RES'in, kısa bir süre için etkili kan seviyelerini çok çok az ortaya çıkardığı bulunmuştur. Yeni formülasyonun, toza karşı plazma içinde 8,8 kat daha yüksek trans-RES seviyelerine yol açtığı bulunmuştur. Çözünür formülasyon ve orijinal tozdan eşit olarak erkeklere 0,59 mg/kg ve kadınlara 0,80 mg/kg olarak verilmiştir. Çözünür formülasyon ve orijinal tozda sırasıyla C_{max} 5707 nM ve 470 nM; t_{max} her iki formda da 30 dakika; $t_{1/2}$ 78 dakika ve 49 dakika; $AUC_{0-\infty}$ 334,22 μ mol.dakika/L ve 39,17 μ mol.dakika/L sonuçları bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada, trans-RES'in biyoyararlanımı ve verimliliğindeki önemli gelişmelerin bu çözünür galenik form ile elde edilebileceği ve bu sayede daha düşük dozların kullanılabileceği gösterilmiştir.

Blanchard ve arkadaşları [20] RES'in ekspiyan matriksten oluşan bir pastil kullanılarak oral transmukozal verilişinde kana hızla absorbe edilebileceği hipotezini geliştirmişler ve bu hipotezin ispatını sağlamışlardır. Bu çalışmada trans-RES'in su içindeki ve 2,0 M dekstroz, fruktoz, riboz, sukroz ve ksilitol çözeltilerindeki çözünürlüğünü HPLC kullanılarak belirlemişler ve riboz çözeltilisinde daha iyi çözüldüğünü tespit etmişlerdir. Her biri 2000 mg pastil kütlesi başına $146 \pm 5,5$ mg trans-RES içerecek şekilde hazırladıkları pastilleri iki sağlıklı gönüllü üzerinde denemişler, pastil uygulamasından hemen önce ve 15, 30, 45 ve 60 dakika sonra alınan kanlarda trans-RES'in maksimum plazma konsantrasyonlarını uygulamadan 15 dakika sonra iki katılımcı için sırasıyla 325 ve 332 ng/mL olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlarla, RES-riboz matriks pastili ile daha fazla C_{max} elde edebileceğini ve kan dolaşımına gastrointestinal emilim için önceden bildirilmiş dozaj formlarından daha hızlı girebileceğini göstermişlerdir.

Calvo-Castro ve arkadaşları [21] misel oluşumundan yararlanarak trans- ϵ -viniferin ile birlikte alınan trans-RES'in biyoyararlanımını arttırmak için çalışma yapmışlardır. On iki sağlıklı gönüllü (6 erkek, 6 kadın) rastgele doğal bir toz veya sıvı misel olarak tek doz 500 mg vineatrolü (30 mg trans-RES, 75 mg trans- ϵ -viniferin) oral yol ile almışlar ve gönüllülerin plazma ve idrarları başlangıçta ve alımdan 24 saat sonra toplanmıştır. RES ve viniferinin plazma ve idararda analizlerini sıvı-sıvı ekstraksiyonunu takiben HPLC-FL dedektör ile (Ex:313 nm, Em: 400 nm) C8 kolonda ($150 \times 4,6$ mm, 3 μ m) yapmışlardır. Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki alanın (AUC) ve ortalama maksimum plazma trans-RES konsantrasyonlarının, doğal toza göre misel takviyesinden sonra sırasıyla 5,0 kat ve 10,6 kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Chang ve arkadaşları [22] üzüm kabuğu özündeki (GPE) RES'in çözünürlüğünü ve oral emilimini arttırmak için yeni bir katı dağılımlı salım sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen damlama hâpi (DP) (dripping pill) oral salım sistemi, sıcak eritmeli yöntem kullanılarak oluşturulmuş ve optimal formülasyon GPE, propilen glikol monokaprilat, poloksamer 188, polioksil 35 hint yağı ve polietilen glikol 6000'den oluşmuştur. Oluşturulan DP'lerde RES'in çözünürlüğünün $23,3 \pm 1,0$ 'den $67,8 \pm 0,4$ 'e çıktığı gözlenmiştir. Sıçanlara saf RES çözeltisi (30 mg/kg;i.v.), formüle edilmemiş GPE (300 mg/kg;p.o.) ve optimal formüle edilmiş GPEDP (50 mg/kg;p.o.) uygulanmıştır. Saf RES, GPE ve GPEDP için C_{max} sırasıyla $21,5 \pm 1,3$; $0,17 \pm 0,03$; $1,19 \pm 0,07$ μ g/mL ; $t_{1/2}$ sırasıyla $28,8 \pm 0,3$; $59,9 \pm 1,5$; $54,4 \pm 0,5$ dakika; $AUC_{0-\infty}$ sırasıyla $241,9 \pm 14,7$; $24,6 \pm 2,7$; $46,0 \pm 4,1$ μ g.dakika/mL olarak bulunmuştur. Sıçanlardaki farmakokinetik profiller, DP'lerin RES'in oral biyoyararlanımını $0,9 \pm 0,1$ 'den $10,5 \pm 0,9$ 'a arttırdığını ortaya koymuştur, bu da absorpsiyonda yaklaşık 12 kat artışı göstermiştir. Sonuçlar DP formülasyonunun RES'in çözünmesini ve oral biyoyararlanımını arttırdığını göstermiştir.

Frozza ve arkadaşları [23] trans-RES'i lipid çekirdekli nanokapsüllere doldurmuş ve partikül büyüklüğü, çoklu dağılım ve zeta potansiyel açısından analiz etmişlerdir. Beyin dokusundaki nanokapsül dağılımı intraperitoneal (i.p.) ve gavaj ile sağlıklı sıçanlarda değerlendirilmiştir. Lipid çekirdekli nanokapsüller içindeki trans-RES'in yüksek oranda tutulduğunu ve trans-RES konsantrasyonunun günlük i.p. veya gavaj uygulamadan sonra beyinde, karaciğerde ve böbrekte serbest trans-RES için

gözlenenden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Trans-RES güçlü bir siklooksijenaz-1 inhibitörü olduğundan, gastrointestinal hasarı da değerlendirmişlerdir. Trans-RES'in yüklü lipid çekirdekli nanokapsüllerle tatbik edildiği hayvanlar, serbest trans-RES'in tatbik edildiği hayvanlara kıyasla önemli ölçüde daha az hasar görmüştür. Özetle, lipid çekirdekli nanokapsüller, büyük trans-RES enkapsülasyon verimliliği sergilemiştir. Trans-RES yüklü lipid çekirdekli nanokapsüller, beyin dokusundaki trans-RES konsantrasyonunu arttırmıştır. Gastrointestinal güvenlik, serbest trans-RES ile karşılaştırıldığında daha iyi bulunmuştur. Bu nedenle, trans-RES'in yüklü lipid çekirdekli nanokapsüllerinin, çeşitli beyin dokusu hastalıklarında, Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere alternatif potansiyel bir tedavi edici olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Gao ve arkadaşları [24] nanopartikül RES ve RES β -siklodekstrin inklüzyon kompleksi arasındaki biyoyararlanım karşılaştırması için çalışma yapmışlardır. Biyoyararlanım farkını kan plazmasındaki RES içeriğini tayin ederek araştırmışlardır. İki çeşit RES preparatının tatbik edildiği sıçanların plazmasındaki RES konsantrasyonu, HPLC kullanılarak tayin edilmiş ve farmakokinetik parametreleri hesaplanmıştır. Nanopartikül RES için farmakokinetik parametrelerin değerleri AUC 315,89 $\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$, t_{max} 40,44 dk ve C_{max} 3,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$. RES β -siklodekstrin inklüzyon kompleksi için ise AUC 185,83 $\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$, t_{max} 79,71 dk ve C_{max} 1,69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Bu çalışmada nanopartikül RES'in biyoyararlanımının RES β -siklodekstrin inklüzyon kompleksinden daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Kapetanovic ve arkadaşları [25] sıçanlara RES ve pterostilbeni eşit dozlarda oral yoldan verdikten sonra biyoyararlanımını, farmakokinetiğini ve metabolizmasını karşılaştırmışlardır. 14 gün boyunca erkek sıçanlara oral yoldan gavajla RES ve pterostilben sırasıyla 50 ve 150 mg/kg/gün ve 56 ve 168 mg/kg/gün olarak verilmiştir. Ayrıca iki ek gruba intravenöz olarak RES ve pterostilben sırasıyla 10 ve 11,2 mg/kg olarak uygulanmıştır. Oral yoldan verilen formülasyon %0,2 (w/v) Tween 80 içeren %0,5 (w/v) sulu metilselüloz ile; intravenöz olarak uygulanan formülasyon DMSO:PEG-300 (15:85;v/v) ile hazırlanmıştır. Dozajlar oral formülasyon için 10 mL/kg, intravenöz için 2,5 mL/kg olarak uygulanmıştır. Ajanların ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonları HPLC-tandem MS kullanılarak ölçülmüştür. RES ve pterostilben sırasıyla 50 mg/kg ve 56 mg/kg olarak verildiğinde 1 gün sonuçlarına göre

C_{max} sırasıyla 76,7 ve 2820 ng/mL , $AUC_{0-\infty}$ değerleri 1350 ve 13.700 ng.saat/mL, $t_{1/2}$ için 11,8 ve 1,5 saat olarak bulunmuş; 14 günlük sonuçlarda ise C_{max} sırasıyla 176 ve 2550 ng/mL, $AUC_{0-\infty}$ değerleri 902 ve 15.000 ng.saat/mL, $t_{1/2}$ için 5,5 ve 1,6 saat olarak tayin edilmiştir. RES ve pterostilben sırasıyla 150 mg/kg ve 168 mg/kg olarak verildiğinde ise 1 günlük sonuçlarda C_{max} sırasıyla 847 ve 7880 ng/mL, $AUC_{0-\infty}$ 2580 ve 57.700 ng.saat/mL, $t_{1/2}$ ise 3,6 ve 1,9 saat; 14 günlük sonuçlarda C_{max} sırasıyla 494 ve 5560 ng/mL, $AUC_{0-\infty}$ 2370 ve 49.600 ng.saat/mL, $t_{1/2}$ de 1,8 ve 1,9 saat olarak bulunmuştur. RES ve pterostilben sırasıyla yaklaşık olarak %20 ve %80 oranında biyoyararlanıma uğramıştır. Oral olarak verildiğinde, pterostilbenin hem ana bileşik hem de metabolitlerinin RES'den daha fazla biyoyararlanım ve toplam plazma seviyeleri sergilediği bulunmuştur.

Pandita ve arkadaşları [26] düşük ve değişken biyoyararlanıma sahip doğal bir polifenol olan RES'in oral verilmesi için katı lipid nanopartiküllerin (SLN'ler) potansiyelini araştırmak amaçlı bir çalışma yapmışlardır. Poloksamer 188 ile kaplanmış RES yüklü stearik asit bazlı SLN'leri (RLN'ler) başarıyla üretmişlerdir. Farmakokinetik parametreleri Wistar erkek sıçanlarda oral olarak RNL'ler ve kontrol grubu RES uygulamasından sonra ters faz (RP)-HPLC-DAD kullanarak değerlendirmişlerdir. Bir gruba %1 polisorbata 80 çözeltisinde dağılmış 1 mg/mL RES bulunan serbest ilaç süspansiyonu, diğer gruba ise 1 mg/mL olan RLN'ler oral gavajla 20 mg/kg olarak verilmiştir. Kanlar toplanmış ve SPE kullanılarak numuneler hazırlanmıştır. 0,0156-10 µg/mL aralığında kalibrasyon eğrisi çalışılmış ve sıçan plazmalarında bulunan C_{max} değerleri saf RES ve RLN'ler için sırasıyla $4,554 \pm 0,48$ ve $7,343 \pm 1,14$ µg/mL; t_{max} değerleri sırasıyla 15 ve 60 dakika; $t_{1/2}$ değerleri $2,37 \pm 0,12$ ve $11,51 \pm 1,16$ saat; $AUC_{0-\infty}$ değerleri ise sırasıyla $5,778 \pm 1,4$ ve $46,429 \pm 2,8$ µg.saat/mL olarak bulunmuştur. Lipit formülasyonunun, RES'in süspansiyonuna kıyasla oral biyoyararlanımında önemli olan 8,035 kat iyileşme sağladığı bulunmuş bu nedenle, stearik asit bazlı RLN'lerin, oral uygulamadan sonra RES için daha iyi biyoyararlanıma sahip umut verici sürekli salım sistemi olarak işlev görebileceği kanaatine varılmıştır.

Penalva ve arkadaşları [27] kazein nanopartiküllerinde RES'in enkapsülasyonu ile oral taşıyıcı olarak kapasitesini değerlendirilmek amaçlı çalışmışlardır. 30 µg/mg'a yakın RES yüklü nanopartiküllerin ortalama büyüklüğü 200 nm'dir. Nanopartiküller fareye oral yoldan verildiğinde bağırsakta kaldıkları ve bağırsak epiteline ulaşmada önemli bir

yetenek sergiledikleri bulunmuştur. RES plazma seviyeleri yüksek ve plazmadaki majör metabolitlerin varlığı gözlenmesi için benzer bir profille en az 8 saat sürdürülmüştür. RES sulu süspansiyonu (RES-Susp), PEG 400: su (1:1) ile hazırlanmış RES solüsyonu (RES-Sol) ve kazein nanopartikülü (RES-NP-C) farelere oral yoldan, kontrol grubu olarak farelere RES-Sol intravenöz (RES-IV) yoldan 15 mg/kg olacak şekilde tek doz uygulanmıştır. 0., 10. ve 30. dakikalarda, 1, 2, 4, 6, 8, 24 ve 48. saatlerde kan alınmıştır. Çöktürme yöntemi kullanılarak plazmada HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi RES için 50-3000 ng/mL aralığında ve LOQ değeri 70 ng/mL'dir. RES-IV, RES-Sol ve RES-NP-C için sırasıyla C_{max} değerleri $15,2 \pm 5,18$; $0,2 \pm 0,02$ ve $0,29 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Yine sırasıyla AUC değerleri $10,4 \pm 3,8$; $0,28 \pm 0,13$ ve $2,76 \pm 1,64$ $\mu\text{g.saat/mL}$ 'dir. Sırasıyla $t_{1/2}$ değerleri $2,0 \pm 0,5$; $0,3 \pm 0,2$ ve $2,7 \pm 0,7$ saattir. RES-Susp için oral yoldan uygulamada farelerin plazmasında ölçülebilir düzeyde polifenole rastlanmadığı saptanmıştır. Kazein nanopartikülleri yüklendiğinde RES'in oral biyoyararlanımı, polifenolün oral çözelti halinde uygulanmasından 10 kat daha yüksek % 26,5 olarak hesaplanmıştır.

Polans ve arkadaşları [28] RES'in suda çözünebilir formülasyonları ve bunların kullanımı ile ilgili olarak çalışma yapmışlar ve bunun patentini almışlardır. 1 mg RES içeren RES-poloksamer 334 (R-P 104) ve RES-Neobee M5 yağı (hindistancevizi yağı trigliseridi) formülasyonlarını oral yoldan, periton içine (IP) veya intravenöz (i.v.) enjeksiyon ile farelere uygulamışlardır. Elde edilen serum örneklerinde RES tayinini HPLC ile gerçekleştirmişler ve maksimum serum konsantrasyonlarına ilk 5 dakika içinde ulaşmışlardır. İlk 5 dakika içinde R-P 104 için oral, IP ve i.v. değerleri sırasıyla 3,7; 8,3 ve 15,0 μM ; RES-Neobee için oral ve IP değerleri sırasıyla 9,4 ve 6,7 μM olarak bulunmuştur. R-P 104 formülasyonunun birkaç hafta boyunca stabil olduğu ve RES'in sulu ortamdaki çözünürlüğünü tümör hücrelerine karşı in vitro ortamda en az 1000 kat arttırdığı bulunmuştur. Daha da önemlisi, modifiye edilmiş ve edilmemiş RES konsantrasyonlarının oral veya IP dozları karşılaştırıldığında daha yüksek pik serum seviyelerinin elde edildiği bulunmuştur.

Singh ve arkadaşları [29] oral uygulama için trans-RES nanokristallerin (t-RES-NC) hazırlanması ve in vitro / in-vivo karakterizasyonu için çalışma yapmışlardır. t-RES-NC'ler, prob sonikasyon metodu ile üretilmiş ve partikül ebadı, poli dispersif indeks ve zeta potansiyel ile optimize edilmiştir. t-RES-NC'lerin farmasötik

karakterizasyonu ayrıca sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. t-RES-NC'lerin in vitro hücresel etkinliği ve in vivo farmakokinetiği de değerlendirilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü, t-RES-NC'lerin morfolojisinin düzenli ve çubuk şeklinde olduğunu göstermiştir. Bu arada, geliştirilen t-RES-NC'lerin MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerine karşı düz t-RES'ten in vitro hücresel etkinlik açısından daha etkili ve kuvvetli olduğu da ($p < 0.05$) ortaya çıkarılmıştır. Sıçanlara düz t-RES (%0,5 Tween 80 ile sodyum CMC'de hazırlanmış) ve t-RES-NC (TDW'de hazırlanmış) 20 mg/kg tek doz oral yoldan verilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonla hazırlanan plazma örnekleri UHPLC-PDA ile analiz edilmiştir. Yapılan validasyonda t-RES 20-10000 ng/mL aralığında çalışılmıştır. t-RES-NC için C_{max} ve $AUC_{0-\infty}$ değerleri sırasıyla $8,4 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$ ve $43,38 \pm 11,2$ $\mu\text{g.saat/mL}$; düz t-RES için aynı değerler sırasıyla $3,8 \pm 0,8$ $\mu\text{g/mL}$ ve $12,95 \pm 4,12$ $\mu\text{g.saat/mL}$ bulunmuştur. Düz t-RES ile karşılaştırıldığında, t-RES-NC'ler $AUC_{0-\infty}$ (3,5-kat) ve C_{max} 'ta (2,2 kat) belirgin bir artış sergilemişlerdir, bu da NC'lerin t-RES'in oral biyoyararlanımını arttırdığını göstermiştir. Gelişmiş t-RES-NC'lerin oral biyoyararlanımındaki önemli artış, nihayetinde t-RES'in klinik etkinliğini yansıtan t-RES'in ağız yoluyla verilmesi için ideal bir yol olabileceği sonucuna varılmıştır.

Singh ve S.Pai [30] optimize edilmiş PLGA nanopartikül ile oral olarak trans-RES'in biyoyararlanımı üzerine çalışmışlardır. Trans-RES yüklü PLGA nanopartikülleri nanoçöktürme metodu ile hazırlanmıştır. Optimize edilmiş nanofarmülasyonun in vivo biyo dağılımını ve in situ tek geçişli bağırsak perfüzyonu (SPIP) çalışmaları farmakokinetik olarak erkek sıçanlarda incelenmiştir. Saf ilaç, pazarlanan ürün ve optimize nano partikül formülasyonu 1 mL suda dağıtılmış ve 20 mg/kg olacak şekilde oral yoldan sıçanlara verilmiştir. Belli zamanlarda toplanan kanlardan elde edilen plazma örnekleri HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Trans-RES için LOD 0,005 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ 0,007 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. K_a (7,17 kat) ve $AUC_{0-\infty}$ (10,6 kat) artmış, nano formülasyon ile saf ilaç ve pazarlanan ürüne kıyasla biyoyararlanım oranında ve boyutunda önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Nano formülasyon karaciğerde trans-RES konsantrasyonlarında 2,78 kat artış göstermiştir. Yerinde SPIP çalışmaları ile optimize nanopartiküllerinin Peyer plakları boyunca taşınması için emicilik ve geçirgenlik parametrelerinde önemli bir artışa neden olduğunu saptamışlardır.

Singh ve S.Pai [31] trans-RES'in kendiliğinden self-nanoemülsifiye ilaç salınım sistemi (SNEDDS) ile biyoyararlanım potansiyelinin artırılması üzerine optimizasyon, farmakokinetik ve in situ tek geçişli bağırsak perfüzyonunda (SPIP) çalışmalarını yapmışlardır. Trans-RES'in uzun zincirli trigliseritler kullanarak SNEDDS preparatlarını geliştirmişlerdir. Optimize formülasyon ve saf ilaç % 0,3 CMC ile süspansiyon olarak 20 mg/kg olacak şekilde sıçanlara oral yoldan uygulanmıştır. 0; 0,33; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 ve 8. saatlerde toplanan kanlardan elde edilen plazma örnekleri HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Genel olarak C_{max} ve AUC değerleri saf ilaç ile optimize formülasyon karşılaştırıldığında optimize formülasyonda saf ilaca kıyasla sırasıyla 2,34 kat ve 4,31 katına yükseldiği biyoyararlanım derecesinde belirgin bir iyileşme olduğu bulunmuştur. Oral ilaç emiliminin hızı ve kapsamındaki önemli artış, t-RES'in biyoyararlanımını arttırmada SNEDDS'nin daha iyi performans gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Siu ve arkadaşları [32] RES'i bir ligand (galaktoz) ile kombine etmek suretiyle oral yolla verilen nanotaşıyıcı formlarda uygulayarak biyoyararlanımını ve farmakolojik aktivitesini geliştirmeye çalışmışlardır. RES yüklü galaktoz içeren nanopartiküller (RES-GNP'ler), poli (laktik-ko-glikolik asit), sentezlenen N-oleoil-d-galaktozamin ve Tween 80 kullanılarak çözücü difüzyon tekniği ile hazırlanmıştır. RES-GNP'ler partikül büyüklüğü, morfoloji, tutma etkinliği (EE) ve in vitro salınımla karakterize edilmiştir. Sıçanlarda ve lipopolisakaritlerin indüklediği RAW 264.7 hücrelerinde oral biyoyararlanım ve in vitro anti-enflamatuar aktivite araştırılmıştır. Sıçanlara RES süspansiyonu (%0,3 CMC sodyum ile hazırlanmış), RES-NP (RES nanopartikül RES-GNP gibi hazırlanmış), RES-GNP oral yoldan gavajla 40 mg/kg ve RES çözeltisi (su:etanol:PEG 400; 20:40:40; h:h:h ile hazırlanmış) intravenöz olarak 8 mg/kg uygulanmıştır. 0,133; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 8 ve 12. saatlerde toplanan kanlardan elde edilen plazma örnekleri sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak UPLC-QTOF-MS ile analiz edilmiştir. RES çözeltisi (iv), RES süspansiyonu, RES-NP ve RES-GNP için sırasıyla C_{max} değerleri 974,3; 553; 1311 ve 2393 ng/mL ; t_{max} değerleri 0,133; 0,252; 0,137 ve 0,135 saat; AUC_{0-t} değerleri 902,5; 564,1; 934,9 ve 1894 ng.saat/mL olarak hesaplanmıştır. RES-GNP'lerin yüksek bir EE'ye ve suda yavaş bir ilaç salımına sahip olduğu görülmüştür. Oral uygulamadan sonra, RES-GNP'lerin, RES süspansiyonlarına kıyasla, % 335,7'ye kadar RES'in oral biyoyararlanımını arttırdığını görmüşlerdir.

Ayrıca RAW 264.7 hücre modelinde RES-GNP'lerin anti-enflamatuar etkinliğinin, serbest RES ve RES-NP'lerden daha üstün olduğu bulunmuştur.

Spogli ve arkadaşları [33] magnezyum di-hidroksit ile desteklenen mikropartiküllerde RES'in (RES@MDH) katı dağılımının oral biyoyararlanımı arttıracak varsayımında bulunmuşlardır. RES, sudaki düşük çözünürlüğü ve yüksek membran geçirgenliği nedeniyle, çözünme hızından dolayı sınırlı biyoyararlanıma sahip, biyofarmasötik sınıflandırma sisteminin ikinci sınıfında yer almaktadır. RES@MDH şeklindeki RES'in katı dispersiyonu, çözünürlüğü geliştirmek ve RES'in biyoyararlanımını arttırmak için değerlendirilmiştir. Florimetrik mikroskopi analizleri, benzer büyüklükte üç tip mikro partikül göstermiştir: Tip 1; 50 nm bant genişliğiyle tercihen 445 nm'de floresans veren ya da Tip 2; 70 nm bant genişliğiyle tercihen 605 nm'de floresans veren ve Tip 3 floresans özelliği olmayan mikropartikülleri gösterir. Mikronize saf RES, sadece tip 1 mikropartikülleri gösterirken, tip 3 saf magnezyum dihidroksit ile ilişkilendirilmiştir. Simüle edilmiş gastrik ortamdaki çözünme testinde RES@MDH'den türetilmiş olan RES daha iyi çözünürlük göstermiştir. Tavşanlara RES@MDH ve saf RES 50 mg/kg olacak şekilde glukoz çözeltisi ile oral uygulamadan sonra 0; 5; 15; 30; 45; 90; 120 ve 180. dakikalarda kan alınmıştır. Plazma örnekleri HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Saf RES ve RES@MDH için sırasıyla C_{max} değerleri 76,3 ve 101,3 ng/mL; AUC değerleri 2698 ve 8944 ng.dakika/mL; t_{max} değerleri 15 ve 30 dakikadır. Veriler sonucu RES'in biyoyararlanımında 3 kat artış gözlenmiştir. Tip 2 mikropartiküllerinin bir RES magnezyum dihidroksit mikropartiküllerini temsil ettiğini ve RES@MDH'nin RES'in çözünürlüğünün ve biyoyararlanımını geliştirilmesinden sorumlu olduğu varsayılmıştır.

Tian [34] RES biyoyararlanımını arttırmak için bir mikro formülasyon tablet geliştirmiş ve bu formülasyonla elde ettiği biyoyararlanımı incelemiştir. Biyoyararlanımı geliştirilmiş RES mikro formülasyon tableti hazırlanırken ağırlıkça RES'ten %10-50; yardımcı maddeden %49-85; bağlayıcı maddeden %1-5 oranlarında kullanılmış; RES ve yardımcı madde mikro toz haline getirilmiş ve sonra bağlayıcı madde çözeltisi ile ıslatılarak karıştırılmış ve mikro tablet haline getirilmiştir. Bu formülasyonda sakkaroz, dekstrin, nişasta, laktoz, metil selüloz, CMC-Na, etil selüloz vb'lerinden bir veya daha fazlası yardımcı madde olarak; PVP, etanol, distile su, CMC-Na vb'lerinden bir veya daha fazlası bağlayıcı madde olarak kullanmıştır. Geliştirilen

formülasyonun kararlı, kaliteli ve iyileştirici etkilerinin yüksek olmasının yanında yan etkilerinin görülme sıklığının düşük olduğu bulunmuştur. Bu formülasyonun biyoyararlanımı % 76,75 ila % 85,42 arasında geliştirmiş olduğu ve lokal tahrişi azalttığı tespit edilmiştir.

Yang ve arkadaşları [35] oral uygulamadan sonra RES 2-hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP β CD) kompleksi ile RES süspansiyonu arasında prelinik farmakokinetik karşılaştırmayı yapmışlardır. Farelere 15 mg/kg oral yoldan HP β CD bazlı RES kompleksi (RES etanol çözeltisi PBS ile seyreltilerek üzerine %0,05 hidroksietil selüloz eklenerek hazırlanmış) ve RES nanosüspansiyonu (su ile hazırlanmış) verilerek RES'in biyoyararlanımını geliştirmesi karşılaştırılmıştır. HP β CD içerisindeki RES diferansiyel tarama kalorimetrisi, Fourier dönüştürülmüş kızılötesi spektroskopisi ve faz çözünürlük çalışması ile doğrulanmıştır. Süspansiyonların farelere uygulanmasından sonra farklı zamanlarda (0-120 dakika) elde edilen plazma örnekleri HPLC-UV ile analiz edilmiştir. RES kompleksi, RES nanosüspansiyonu ile karşılaştırıldığında plazmada yaklaşık olarak C_{max} 'ın dört kat ve $AUC_{0-120dk}$ 'nin iki kat artışına neden olduğu bulunmuştur. Kalp, karaciğer, böbrek ve bağırsakta benzer konsantrasyonlarda artış gözlenmiştir. Özellikle HP β CD kompleksi, nanosüspansiyonla karşılaştırıldığında RES konsantrasyonunun bağırsakta 5,5 kat arttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, HP β CD kompleksinin RES'in oral biyoyararlanımını arttırmak için umut verici bir yaklaşım olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca bağırsakta yüksek konsantrasyonların elde edilmesi, bu dokuda anti-enflamatuvar/kemopreventif bir ajan olarak oral RES-HP β CD'nin potansiyel kullanımını destekler niteliktedir.

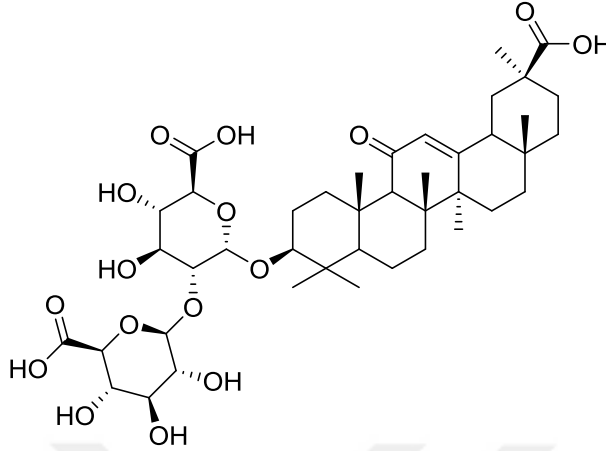
Yang ve arkadaşları [36] intestinal metabolizmayı inhibe ederek RES'in biyoyararlanımını arttırmak için UGT inhibe edici eksipiyenlerle (kontrol olarak self-mikroemülsiyon sistem (SME) olarak adlandırılan ve inhibe edici aktivitesi olmayan eksipiyenler (SME-2)) SME-1 hazırlamışlardır. Sıçanlara i.v. yoldan serbest RES; oral yoldan SME-1, SME-2 ve serbest RES 10 mg/kg RES olacak şekilde uygulanmıştır. 5-720 dakikalar arasından toplanan kanlardan elde edilen plazma örnekleri UPLC ile analiz edilmiştir. Serbest RES, SME-1, SME-2 ve i.v. serbest RES için sırasıyla AUC değerleri 873, 10100, 1700 ve 13200 ng.saatt/mL; C_{max} değerleri 158, 3020, 799 ve 45300 ng/mL; t_{max} değerleri 33, 37, 32 dakika (i.v. için değer yoktur); $t_{1/2}$ değerleri 5,40; 5,46; 6,88 ve 3,61 saat olarak bulunmuştur. Sonuçlarda, büyüklük, çoklu dağıtım

indeksi ve in vitro salım, Caco-2 hücrelerinde hücresel alım ve geçirgenlik gibi in vivo lenfatik dağılımla birlikte inhibe edici SME-2 ve inhibe edici olmayan SME-2 arasında benzer fizikokimyasal özellikler gözlemlendiği bulunmuştur. İn vivo çalışmada, RES-G (RES 4-O-glukuronid)/RES molar oranlarının serbest ilaç ve SME-2 için sırasıyla $7,25 \pm 0,48$ ve $5,06 \pm 2,42$ olduğunu ve molar oranın SME-1 grubunda $0,36 \pm 0,10$ 'a düştüğünü tespit etmişlerdir. Farmakokinetik çalışma, SME içeren önleyici yardımcı maddelerin, UGT önleyici yardımcı maddeler tarafından glukuronidasyonun modüle edilmesi yoluyla, RES'in biyoyararlanımını serbest RES için % 6,5 ve SME-2 için % 12,9'dan SME-1'de %76,1'e artırma potansiyeli gösterdiğini bulmuşlardır.

Yen ve arkadaşları [37] RES'in biyoyararlanımı arttırmak için self-nanoemülsifying ilaç salınım sistemi (self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS)) geliştirmişler ve yorgunluk ile ilgili parametreleri; yani laktat, amonyak, plazma kreatinin fosfokinaz ve glukoz seviyelerini ve tükenmeye kadar yüzmeye süresini ölçerek yorgunluk önleyici aktivitesini ve sıçan egzersiz performansını değerlendirmişlerdir. Çözünürlük ve emülsifikasyon testi ile Capryol 90, Cremophor EL ve Tween 20'den oluşan optimize edilmiş SNEDDS geliştirmişler ve uygun self-emülsifying kabiliyete sahip olan bu formülasyondaki ortalama parçacık büyüklüğünü yaklaşık $41,3 \pm 4,1$ nm olarak bulmuşlardır. Farmakokinetik çalışmalar, optimize edilmiş RES-SNEDDS'lerin oral biyoyararlanımının, formüle edilmemiş RES çözeltisine (%0,25 w/v karboksimetil selüloz sulu çözeltisi) kıyasla 3,2 kat arttığını ortaya koymuştur. Optimize edilmiş RES-SNEDDS formülasyonu ve RES çözeltisi sıçanlara oral olarak 50 mg/kg, intravenöz olarak tek doz 1 mg/kg verilmiştir. Çöktürme yöntemi ile plazmada kirliliklerinden arındırılan örnekler HPLC-elektrokimyasal dedektörle C18 (100 mm $\times$ 2,1 mm i.d., 2,6 μ m) kolonda tayin edilmişlerdir. Çalışmada 10-1500 ng/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrisi hazırlamışlardır. LOQ değerini 10 ng/mL olarak bulmuşlardır. C_{max} 'ın optimize RES-SNEDDS'in RES çözeltisinden 2,2 kat daha fazla olduğunu ($869,2 \pm 112,2$ ve $386,2 \pm 68$ ng/mL sırasıyla), yarılanma süreleri açısından önemli bir fark olmadığını, eğri altında kalan alanın (AUC) optimize RES-SNEDDS ve RES çözeltisinde sırasıyla $77055,4 \pm 4857,7$ ve $23950,5 \pm 3691,3$ ng.dakika/mL olduğunu bulmuşlardır. RES-SNEDDS'in ($9,5 \pm \%1,5$) oral biyoyararlanımının RES çözeltisine ($3,0 \pm \%0,8$) göre önemli ölçüde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

2.2. Glisirizik Asit

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2.3: GA'nın kimyasal formülü

Glisirizik asit (glisirizin veya glisirizinik asit) *Glycyrrhiza glabra* (Meyan) kökünün tatlı-tatlandırıcı bileşenidir. Yapısal olarak, gıda maddelerinde ve kozmetiklerde emülgatör ve jel oluşturucu madde olarak kullanılan bir saponindir. Kimyasal adı (3 β , 20 β) -20-karboksi-11-okso-30-norolean-12-en-3-il 2-O- β -D-glukopirananuronosil-a-D-glukopiranosiduronik asit (Şekil 2.2), kapalı formülü C₄₂H₆₂O₁₆ olup GA'nın molekül ağırlığı 822,942 g/mol'dür [50]. Katı, beyaz renkte olan GA sakkarozdan 60 kez daha tatlı bir bileşiktir [51]. Suda, alkolde kolayca çözünürken eter içerisinde de belli belirsiz çözünür [52].

2.2.2. Farmakolojisi

GA, doğal tatlandırıcı olarak gıdalarda yaygın bir şekilde uygulanır. Terapötik bir ajan olarak anti-enflamatuar, anti-ülser, anti-alerjik, antioksidan, anti-tümör, anti-diyabetik ve hepatoprotektif olduğu rapor edildiğinden çok çeşitli formülasyonlarda kullanılmıştır. Bu özelliklerden dolayı endikasyonları, adet öncesi sendromunun ve viral enfeksiyonların tedavisi, anti-lipidemik ve antihiperglisemik tedavilerdir. Peptik ülser ve diğer mide hastalıkları için kullanıldığı da bilinmektedir [53].

Gerek GA gerekse amonyum ve potasyum tuzları öksürük, viral enfeksiyonlar, gastrointestinal sistem, karaciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Amonyum glisirizat tatlandırıcı ve lezzet verici olarak kullanılır. Ayrıca gıda ve kozmetiklerde emülsifiyan ve jel oluşturucu ajan olarak da kullanılır [2].

Meyan kökünden 6 haftadan uzun bir süre ve günde 50 g'dan fazla olmak üzere kullanıldığında su tutulmasını arttırarak ellerin ve ayakların şişmesine neden olabilir. Sodyum salgılanmasını azaltır ve potasyum salgılanmasını arttırır. Kan basıncını yükseltebilir. Ayrıca sodyum ve su atılımını azalttığı için, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların etkinliğini azaltabilir. Potasyum kaybını arttırdığı için de tiyazid ve loop diüretikler veya kardiyak glikositlerle uzun süreli kullanım için uygun değildir. Ayrıca spironolakton veya amilorid ile birlikte de uygulanmamalıdır [54].

Aksi belirtilmedikçe, günlük ortalama ham bitki materyali dozu (5-15 g) 200-800 mg GA'ya karşılık gelir. Tıbbi tavsiye olmadan 4-6 haftadan daha uzun süre kullanılmamalıdır [54].

Sıçanlarda 90 gün boyunca günde %48-58 GA içeren meyan kökü ekstresinin oral olarak 0,31-0,63 g/kg uygulandığında hiç toksik etki gözlenmemiştir. Farelerde ve sıçanlarda %48-58 GA içeren kuru meyan kökü ekstresinin oral, intraperitoneal ve subkutan uygulanmasında LD₅₀ sırasıyla 14,2-18,0 g/kg, 1,42-1,70 g/kg, 4,0-4,4 g/kg olarak bulunmuştur. Farelerde GA'nın LD₅₀ değeri 560 mg/kg bulunmuştur [55].

2.2.3. Biyoyararlanımı Arttırıcı Etkisi ile ilgili Çalışmaları

GA'nın biyoyararlanımı arttırıcı etkisi üzerine araştırmacılar 2001 yılından bu yana pek çok çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaların bazıları aşağıdaki derlemelerde ve yayınlarda özetlenmiştir.

Ajazuddin ve arkadaşları [38] yapmış oldukları derlemede aktif ilaç içerikleri (API) için potansiyel biyoyararlanımı arttırıcı olarak bitkisel biyoaktiflerin rolünden bahsetmişlerdir. Bu derlemede piperin, kersetin, genistein, naringin, sinomen, kurkumin ve GA dahil olmak üzere bazı bitkisel bileşiklerin, birçok potansiyel API'nin farmakokinetik parametrelerini geliştirme kabiliyetini gösterdiğinden bahsetmişlerdir. GA'nın düşük konsantrasyonda toksik olmaması ve etkinliği nedeniyle, antikanser, antifungal, antibakteriyel ilaçlar ve nutrasötiklerin biyoyararlanımını arttırıcı olarak büyük etki potansiyeline sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca kemoterapötik ajanların doza bağımlı advers etkilerini azaltmaya ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimini azaltmaya yardımcı olduğunu da tespit etmişlerdir.

Asghar [39] yapmış olduğu derlemede ilaç endüstrisinde bitkisel biyoyararlanımı arttırıcıların büyüyen etkisini incelemiştir. Birçok bitkisel bileşiğin,

örneğin kersetin, genistein, naringin, sinomen, piperin, GA, nitril glikozit, allisin, gallik asit ve kapsaisin vb, çeşitli ilaçların biyoyararlanımı arttırıcı aktivitesini göstermek için belirlendiğini belirtmiştir. Bitkisel biyo-arttırıcılar, geniş spektrumlu etkiye sahip, güvenli, etkili, ekonomik ve kolayca üretilebilen moleküllerdir. Bununla birlikte, etki mekanizmalarına ilişkin olarak, kesin mekanizma hala açıklığa kavuşturulmamış ancak mevcut literatür bilgisi, etki mekanizmalarının esas olarak absorpsiyon, ilaç metabolizması ve doz azaltımı ile ilgili olduğunu göstermiştir. Bu derlemede GA için yapılmış olan araştırmalar diğer absorpsiyon arttırıcılara göre daha güçlü bir absorpsiyon arttırıcı aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Gram-pozitif bakterilere karşı rifampisin, ampisilin, tetrasiklin ve nalidiksik asitlerin biyoaktivitesini arttırdığı ayrıca *Candida albicans*'a karşı klotrimazol gibi azol antifungal ilaçların aktivitesini arttırdığı da rapor edilmiştir.

Chavhan ve arkadaşları [40] yapmış oldukları derlemede doğal biyo-arttırıcılardaki güncel eğilimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar doğal ilaçlar ve zencefil, kimyon, aloe, kersetin, GA, piperin, kurkumin gibi doğal ürünler kullanarak uygun dozda daha iyi bir terapötik yanıt elde etme kavramını araştırmak amaçlı bu derlemeyi yapmışlardır. Doğal ürünlerin kullanımının biyoyararlanımı arttırmanın en güvenli yolu olduğunu çünkü bunların güvenli, toksik olmayan, ekonomik, kolay tedarik edilen, bağımlılık yapmayan, farmakolojik olarak inert ve doğada alerjik olmayan maddeler olduğunu vurgulamışlardır. Bitkisel biyo-arttırıcılar, ani etkiler için nutrasötikler, antibiyotikler, antitüberküloz ve antikanser ilaçları ve kardiyovasküler ilaçlar gibi pek çok ilaç kategorisi için kullanılmaktadır. Biyo-arttırıcıların son zamanlarda lipozomlar, transferozomlar, ethosomlar gibi birçok yeni ilaç formülasyonunda kullanıldığını ifade etmişlerdir. Bu derlemede, bitki ve hayvan kaynaklarından gelen doğal ilaçları, mekanizmaları, in-vivo çalışmaları, pazarlanan formülasyonları ve gelecekteki potansiyelleri ile araştırmışlardır. GA için antikanser ilacın hücre bölünmesini inhibe edici aktivitesini arttırdığı; GA ile birlikte alınan taksolün hücre büyümesi inhibisyonunun sadece taksolden daha yüksek olduğunu; bu kombinasyonun meme kanserine karşı kullanıldığını ve antibiyotiklerin taşınmasını 2 ila 6 kat arttırdığının rapor edildiğini, Taksol ve Rifampisin, Tetrasiklin, Nalidiksik asit, Ampisilin gibi antibiyotikler ve Vitamin B1 ve B12 gibi ilaçlarla da birlikte kullanımının varlığını ifade etmişlerdir.

Dudhatra ve arkadaşları [41] bitkisel biyo-arttırıcıların üzerine kapsamlı bir derleme yapmışlardır. Bitkisel biyo-arttırıcıların, düşük dozlarda antibiyotikler, antitüberküloz, antiviral, antifungal ve antikanser ilaçlar gibi farklı ilaç sınıflarının biyoyararlanım ve biyolojik etkinliğini arttırdığını ifade etmişlerdir. Ayrıca vitaminler, mineraller, amino asitler ve bazı bitkisel bileşikler gibi nutrasötiklerin oral emilimini de geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Etki mekanizmaları temel olarak emilim süreci, ilaç metabolizması ve ilaç hedefi üzerindeki etkileridir. Piperin, zencefil, niaziridin, GA, kimyon, Frenk kimyonu, allicin, lysergol, aloe vera, şeker otu, kurkumin, sinomenine, genistein, ammannia multiflora, kapsaisin, kersetin, naringin gibi bitkisel biyo-arttırıcılar hakkında yapılan çalışmaları derlemişler. GA için GA etkin konsantrasyonunun, antibakteriyel bileşiklerin ağırlığının % 0.05 ila % 50'si arasında değiştiği, nutrasötik bileşiklerin ağırlığının % 0,10 ila % 10'u arasında olduğu, antifungal ajanların ağırlığının % 0,25 ila % 20'si arasında olduğu, kullanılan antikanser bileşiğinin ağırlığının 10 ila 10,000 katı arasında değişmekte olduğu yapılan çalışmalardan bulunmuştur. Ayrıca başka bir çalışmada GA'nın Taxol'ün MCF-7 kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını inhibe etme yönündeki antikanser aktivitesini 5 kat olacak şekilde arttırdığını, kanserli hücrelerin GA (1 µg/mL) varlığında Taxol (0,01 µg/mL) inhibisyonunun sadece Taxol (0,05 µg/mL) tedavisinden bile daha yüksek olduğunun bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *M. smegmatis* ve *Bacillus subtilis* gibi Gram pozitif bakterilere ve *E. coli* gibi Gram negatif bakterilere karşı yaygın olarak kullanılan antibiyotikler olan rifampisin, ampisilin, tetrasiklin ve nalidiksik asit gibi antibiyotiklerin biyoaktivitesini arttırdığını, *Candida albicans*'a karşı kullanılan klotrimazol gibi azol antifungal ilaçların da aktivitesini arttırdığını ifade etmişlerdir.

Kesarwani ve Gupta [42] bitkisel kökenli biyoyararlanımı arttırıcılar hakkında çalışmışlardır. İlerleyen teknoloji ile beraber yeni ilaç taşıma sistemlerinin biyoyarlanımı arttırmak için bitkisel ilaç taşıma sistemleri oluşturulmasına yol açtığını bulmuşlardır. Son on yılda çeşitli bitkisel ilaçların başarılı bir şekilde modifiye edilmiş taşınması için lipozomlar, nanopartiküller, yağ bazlı sistemler gibi birçok yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanıldığını bildirmişlerdir. Kersetin, naringin, genistein, piperin, GA, sinomenine ve nitril glikoziti içeren birçok bitkisel bileşiğin biyoyararlanımı artırma kapasitesinin bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Tatiraju ve arkadaşları [43] doğal biyo-arttırıcılar hakkında yapmış oldukları derlemede günümüzde kullanılan mevcut biyo-arttırıcıların piperin, sarımsak, karaman kimyonu, kimyon, lisergol, naringin, kersetin, niaziridin, GA, stevia olduğunu belirtmişler, bunların dışında kimyon ve niaziridin için geleceğin potansiyel biyo-arttırıcıları olabileceğinden bahsetmişlerdir. GA için yapılan çalışmalarda, GA içeren 1 µg/mL rifampisin biyoyararlanımını 6,5 kat; 1 µg/mL konsantrasyonda olan taksolün biyoyararlanımını 5 kat arttırdığını belirtmişlerdir.

Dai ve arkadaşları [56] GA periton makrofajlarında interlökin-12 üretimini arttırması üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada GA'nın periton makrofajları (PM) ile lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı IL-12 p40 ve IL-12 p70 (p40 ve p35'in heterodimeri) protein üretimi üzerinde doza bağlı bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Maksimum etkinin GA'nın PM toplanmasından 12 saat önce intraperitoneal olarak tatbik edildiğinde ve LPS ile in vitro olarak uyarıldığında gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Elde edilen bulgular GA'nın peritoneal makrofajlarla LPS kaynaklı IL-12 üretimini arttırma kabiliyetini göstermiştir.

Khanuja ve arkadaşları [57] antienfektif ve antikanser ajanlar dahil olmak üzere diğer ilaçların ve antibiyotiklerin aktivitesinde kuvvetli bir biyo-arttırıcı olarak yeni bir bitki kaynaklı glikozit GA'yı bularak bunun patentini almışlardır. Bulunan molekülün Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin yanı sıra bitki ve hayvan hücrelerinde hücre zarı boyunca antibiyotiklerin ve diğer moleküllerin emilimini/alımını kolaylaştırdığını ve bu nedenle ilaçların ve nutrasötik ajanların etkinliğini arttırmak için ilaç yardımcısı veya biyo-arttırıcı molekül olarak kullanılabilir olduğunu bulmuşlardır. Kendi başına antimikrobiyal veya sitotoksik aktivitesi olmayan bileşiğin ilaç direnci problemini ve anti-enfektif ve anti-kanser terapilerindeki diğer yan etkileri önlemeye yönelik ilaç dozajını azaltmak için güvenli bir aday olduğunu ifade etmişlerdir. *Glycyrrhiza glabra* bitkisinden elde edilen ekstre ve bileşiklerin çeşitli moleküller için biyo-arttırıcı ve biyoyararlanım yardımcıları olarak faydalı yeni bileşimler sağladığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, ilaçların, farmasötiklerin, nutrasötiklerin ve amino asitlerin, vitaminlerin ve diğer besin elementlerinin biyolojik mevcudiyetini, yeterliliğini ve etkinliğini arttırmak için de kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir. Mevcut molekülün, besin elementlerinin emilim etkinliğini arttırırken, antibiyotiklerin, ilaçların ve anti-kanser maddelerinin dozajını büyük ölçüde azaltmada yardımcı olacağı yönünde çıkarımda bulunmuşlardır.

Ahmad ve arkadaşları [58] beyinde CS-GA-PCL-NP'lerin (GA ile kapsüllenmiş-kitosan kaplı-PCL Nanopartiküller) biyoyararlanımının artırılması için bir çalışma yapmışlardır. CS-PCL-NP'lerin (Kitosan-kaplı-PCL-Nanopartiküller) geliştirilmesi için emülsiyonlaştırarak çözücüyü buharlaştırma metodu kullanmışlar ve ardından partikül ebadı, zeta potansiyeli, kapsülleme verimi ve ilaç salımını (in vitro) ve dissolüsyon karakterizasyonunu incelemişlerdir. Beyindeki ve plazmadaki ilaç miktarını ve farmakokinetik profilini belirlemek için UHPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Sıçanlarda yapılan farmakokinetik çalışmada GA-çözeltilisi (GA-S) ve CS-GA-PCL-NP tek doz intranasal (i.n.) ve i.v. olarak verilmiştir. GA-S ve CS-GA-PCL-NP için sırasıyla C_{max} değerleri $123,81 \pm 6,80$ (i.v.) ve $189,21 \pm 7,80$ ng/mL (i.n.); $321,67 \pm 12,61$ ng/mL (i.v.) ve $1065,21 \pm 26,43$ ng/mL (i.n.) olarak bulunmuştur. Aynı sırayla $AUC_{0-\infty}$ değerleri $1081,84$ (i.v.) ve $3389,16$ (i.n.) ng.saät/mL; $6975,29$ (i.v.) ve $24458,72$ (i.n.) ng.saät/mL olarak tespit edilmiştir. CS-GA-PCL-NP'leri hem i.v. hem de i.n. verilmiş yolu açısından GA-S ile karşılaştırıldığında C_{max} artışı ve yavaş eliminasyon hızından dolayı i.n. AUC değerlerinin daha fazla gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada intranasal uygulandığında CS kaplı-GA yüklü PCL-NP'lerin ilacın sıçan beyindeki biyoyararlanımını i.v.'ye göre daha fazla arttırdığı bulunmuştur.

Kong ve arkadaşları [59] simvastatinin (SIM) çözünürlüğünü ve oral biyoyararlanımını arttırmak için bir çalışma yapmışlardır. Bunun için SIM ile polisakkarit arabinogalaktan (AG) veya GA'nın disodyum tuzu (Na_2GA) komplekslerini mekanik kimya tekniği kullanılarak hazırlamışlardır. SIM'in AG veya Na_2GA ile etkileşimlerini FTIR, DSC, XRD ve SEM ile incelemişlerdir. Paralel yapay membran geçirgenliği deneyi (PAMPA), kontrol olarak kullanılan saf SIM ile karşılaştırıldığında, Na_2GA varlığında güçlü bir SIM geçirgenliği artışı ortaya çıkarmıştır. Öte yandan, hızlı depolama deneyi (3 ay boyunca $+40^{\circ}C$), SIM/AG komplekslerinin kimyasal stabilitesinin, saf SIM'e benzer olduğunu göstermiş, ancak SIM/ Na_2GA komplekslerinin artan bir stabiliteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Laboratuvar hayvanları üzerinde in vivo farmakokinetik testlerde Na_2GA veya AG ile kompleks olarak kullanılmasından sonra SIM'in biyoyararlanımında önemli bir artış bulunmuştur. Ayrıca SIM/AG içeren kompleksin toplam kolesterol seviyesini düşürmede SIM'den daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, mekanik olarak sentezlenen SIM kompleksleri AG veya Na_2GA ile hiper-kolesterolemi

tedavisi için yeni formülasyonlar olarak ümit verici bir geleceğe sahip olabileceğini bildirmişlerdir.

Meteleva ve arkadaşları [60] bitki saponini GA'nın sodyum tuzu ile praziquantel katı bileşimlerinin mekanokimyasal olarak hazırlayarak fizyokimyasal özellikleri ve anti-opisthorchosis etkisi üzerine çalışmışlardır. Bazı fizikokimyasal parametrelerin incelenmesi, katı bileşimlerin su içinde çözülmesinin, praziquantel moleküllerin GA disodyum tuzu çözeltisinde oluşan misellere dahil edilmesinin eşlik ettiğini bulmuşlardır. Opisthorchis felineus'un neden olduğu opisthorchiasis modelini kullanarak, kompozisyonadaki, praziquantelin antihelmintik aktivitesinde praziquantele kıyasla 4 ila 11 kat artış olduğu, farmakokinetik verilere göre de, bileşimin kullanımının, praziquantelin biyoyararlanımını 3 kat arttırdığı bulunmuştur.

Meteleva ve arkadaşları [61] praziquantelin (PZQ) katı bileşimlerinin GA'nın disodyum tuzu (Na_2GA) ile mekanik olarak hazırlanması sayesinde PZQ'nun çözünübilirliğini ve biyoyararlanımını arttırmak amacıyla çalışma yapmışlardır. PZQ geçirgenliği, paralel yapay membran geçirgenliği deneyi ve bir tek Caco-2 hücre tabakası ile incelenmiştir. PZQ ve bileşimlerinin farmakokinetik özellikleri ve akut toksisitesi farelerde incelenmiştir. PZQ'nun bileşimlerdeki çözünürlüğünün 3,5 kata kadar arttığı bulunmuştur. PZQ geçirgenliğinin, başlangıç PZQ ile karşılaştırıldığında, Na_2GA ile bileşiminden çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Laboratuvar farelerinde PZQ biyoyararlanımında 3 kat oranında artış ve farmakokinetik eğri üzerindeki değişiklikler, Na_2GA ile bileşiminin oral uygulaması için gösterilmiştir. Katı kompozisyonlar hızlı depolama testi uygulandığında yüksek kimyasal stabilite göstermiştir.

Qiao ve arkadaşları [62] anti-diyabetik bir Çin tıbbi formülü olan Gegen-Qinlian Decoction'da (GQD) farmakokinetiği değiştirecek sinerjistik etkileşimlerini araştırmışlardır. GQD ve tekil bitkilerin çok bileşenli bir farmakokinetik çalışması LC/MS/MS kullanılarak sıçan plazmasında 42 majör biyoaktif bileşiğin eşzamanlı olarak izlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. GQD'un Huang-Lian'daki berberin (BER) ve diğer alkaloidlerin plazma konsantrasyonlarını en az %30 artırabilir olduğu ve bu artışın Gan-Cao'dan gelen GA ile alakalı olduğu tespit edilmiştir. Bir Caco-2 hücre monolayer testi ile GA'nın, P-glikoproteini inhibe ederek BER'in geçirgenliğini arttırdığını bulmuşlardır. Tek başına GA gözlemlenebilir etkiler göstermese de, GA'nın (örneğin 50

veya 80 mg/kg) birlikte uygulanması, bir dozda farelerde BER'in (örneğin 50 mg/kg) anti-diyabetik etkilerini farkedilir derecede artırdığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kan şekeri %46,9 azalırken, insülin düzeyi kontrol grubuna göre %40,8 artış göstermiştir.

Radwan ve arkadaşları [63] sıçanlarda oral uygulama ile Amfoterisin B (AMB) nanopartiküllerinin antifungal aktivitesini, biyoyararlanımını ve toksisitesini çalışmışlardır. AMB'nin yeni PEG ile elde edilmiş polilaktik-poliglikolik asit kopolimeri (PLGA-PEG) nanopartikül (NP) formülasyonlarının *Candida Albicans*'ı öldürme kabiliyetlerini ölçmek için çalışmışlardır. AMB formülasyonlarının antifungal aktivitesi *C. albicans*'ta değerlendirmişlerdir. Biyoyararlanımı dokuz sıçan grubunda araştırmışlardır (n = 6). PLGA PEG NP'lere yüklenen yeni oral AMB verimi, sıçanlarda Fungizone'ye kıyasla belirgin bir şekilde sistemik olarak mevcut olduğunu bulmuşlardır. GA'nın %2'sinin AMB formülasyonuna eklenmesinin biyoyararlanımı %1,5'den %10,5'e yükselttiğini ve Fungizone'un bağıl biyoyararlanımının %4790 oranında arttığını bulmuşlardır. Yeni AMB formülasyonları, Fungizon'a kıyasla minimal toksisite ve daha iyi etkinlik göstermiştir. Daha iyi etkinlik ve asgari toksisite için PLGA-PEG NP'lere AMB yüklü bir oral dağıtım sistemi formüle etmişlerdir. AMB NP'lerin formülasyonuna GA'nın eklenmesinin farelerde önemli bir oral emilim ve gelişmiş biyoyararlanım ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir.

Selyutina ve arkadaşları [64] ilacın GA ile artan biyoyararlanımının, yalnızca çözünürlüğün artmasından değil, aynı zamanda hücre zarları yoluyla ilaç geçirgenliğinin artırılmasından da kaynaklandığı varsayımından yola çıkarak GA'nın POPC lipozomları ve model DOPC, POPC ve DPPC çift katmanları ile etkileşimini NMR ile kaydırma reaktifleri ve moleküler dinamik (MD) simülasyonları inceleyerek araştırmışlardır. Üç tip lipit için moleküler dinamik simülasyonları yapmışlardır: Bunlar dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) ve 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC) dir. Bu çalışmanın GA varlığında gelişmiş ilaç biyoyararlanımı mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağını belirtmişlerdir. NMR ve MD, GA'nın lipit çift katmanına nüfuz ettiğini ortaya çıkarmış ayrıca NMR, GA'nın lipitlerin hareketliliğini değiştirdiğini de göstermiştir. GA, ağırlıklı olarak lipozomun dış "yarı tabakası"na ve hidrofobik kuyrukların ortasına yerleştirilmiş, GA'nın iki tabakalı yüzeyden serbestçe geçerken birkaç su molekülünü

de birlikte getirmiş olduğunu, ayrıca GA varlığında gözenek oluşumunu da gösterdiğini tespit etmişlerdir. Membranlarla GA etkileşiminin GA-bazlı ilaç dağıtım sistemlerinin biyolojik aktivitesinin anlaşılmasına yardımcı olduğunu belirtmişlerdir.

Selyutina ve arkadaşları [65] potansiyel bir ilaç dağıtım sistemi olarak kabul edilen GA'nın hücre zarının geçirgenliği ve elastikiyeti üzerine etkisini incelemişlerdir. GA'nın çeşitli ilaçların terapötik etkisini arttırdığının bulunduğunu ancak, bu etkilerin ayrıntılı mekanizmasının hala bilinmemekte ve araştırmacıların dikkatini çekmekte olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada GA'nın aktivitesinin mekanizmasını moleküler ve hücresel düzeyde açıklığa kavuşturmaya çalışmışlardır. GA'nın biomembranların fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisini, bir model sistem olarak insan eritrositleri kullanarak NMR spektroskopisi ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ile incelemişlerdir. GA'nın geçirgenliği arttırdığı (yaklaşık %60) ve mikromolar konsantrasyonlarda bile hücre zarlarının elastikiyet modülünü (büyüklük sırasına göre) azalttığı bulmuşlardır. Eritrosit yüzeyindeki değişiklikleri de AFM ile tespit etmişlerdir. Bu sonuçların, bazı ilaçların GA mevcudiyetindeki biyoyararlanım artışının mekanizmasının yanı sıra kendi biyolojik aktivitesinin mekanizması hakkında da yeni fikirler verebileceğini belirtmişlerdir.

Shobha ve Gurucharan [66] antibiyotikler için biyo-arttırıcı olarak *Glycyrrhiza glabra*'yı kullanarak bir çalışma yapmışlardır. *Glycyrrhizin glabra*'nın ticari antibiyotiklerle birleştirilmesi ile in vitro bioassay yöntemleriyle ümit verici biyo-arttırıcı aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Sipprofloksasin, Gatifloksasin, Ofloksasin, Eritromisin (Antibakteriyel) ve Flucanazol (Antifungal) gibi antibiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesinde gelişme sağlamışlardır. *Glycyrrhiza glabra*'nın butanol ekstresinin antibakteriyel antibiyotiklerin ve sulu ekstresi antifungal antibiyotiklerin biyoyararlanımını arttırdığını tespit etmişlerdir. % 10 Butanol glabra ekstresi, *Proteus vulgaris*'e karşı Sipprofloksasinin 4 mm ve Gatifloksasin'in antibakteriyel aktivitesini 7 mm arttırdığını; Ofloksasin'in artışını ise *Bacillus subtilis* (2mm), *Proteus vulgaris* (3mm), *Staphylococcus aureus* (1mm), *Pseudomonas fluorescens* (7mm) gibi tüm bakterilerde gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Eritromisinin, *Staphylococcus aureus* (5mm) ve *Proteus vulgaris*'e (2mm) e karşı bir artış gösterdiği, *Pseudomonas fluorescens* için ise antibiyotik içinde değil ama sadece kombinasyonda 7 mm'lik inhibisyon bölgesi gösterdiğini bulmuşlardır. Glabra'nın su ekstraktı *C.lipolytica* (4mm)

ve *C.neoformens* (5mm) 'de antifungal aktivitesini arttırırken, butanol ekstresi *C.albicans* için Flucanazol antibiyotikte maksimum 11 mm artış göstermiştir.

Yang ve arkadaşları [67] GA yüklenmiş paklitaksel (PTX, taksol) misellerini kullanarak yeni bir oral ilaç verme sistemi aracılığı ile PTX'in biyoyararlanımındaki artışı izlemişlerdir. Oral biyoyararlanımı zayıf olan PTX'in biyoyararlanımını arttırmak için GA'yı taşıyıcı olarak kullanmışlardır. Yapılan çalışmalar sonrasında enkapsülasyon verimliliği yaklaşık %90 ve ilaç yükleme oranını %7,9'a oranında arttırılmıştır. PTX yüklü GA misellerinin in vitro serbest bırakma deneyinde Taxol'e kıyasla kontrollü bir ilaç salımı gösterdiği bulunmuştur. Oral uygulama yoluyla yapılan farmakokinetik çalışmada, PTX yüklü GA misellerinin plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alanın ($AUC_{0-24\text{saat}}$), Taxol'den yaklaşık altı kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. PTX-yüklü GA misellerinden PTX'in belirgin oral emilim artışının, büyük ölçüde deodonom ve ince bağırsaktan emilimin artmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Tüm bu sonuçlarla GA'nın, PTX'in oral alınması için umut verici bir taşıyıcı olacağını gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Zhang ve arkadaşları [68] mekanokimya ile kurkumin (Cur) katı misel dispersiyonu hazırlamışlar, arttırılmış biyoyararlanımını ve sitotoksik aktivitesini incelemişlerdir. Mekanik bilyalı öğütme ile disodyum GA (Na_2GA) den amorf bir katı dispersiyon (SD) Cur hazırlamışlardır. Cur yüklü miseller, SD suda çözündüğünde Na_2GA tarafından kendiliğinden oluşmuştur. Cur SD'nin katı haldeki fiziksel özelliklerini, diferansiyel taramalı kalorimetri, X ışını kırınımı çalışmaları ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize etmişlerdir. Numune çözeltilerinin özellikleri, ters faz HPLC, UV-görünür spektroskopisi, ^1H NMR spektroskopisi, jel geçirgenliği LC ve transmisyon elektron mikroskobu ile analiz edilmiştir. İn vitro sitotoksik testler de yapılmıştır. Sıçandaki bu SD formülasyonunun farmakokinetik incelemesinde, serbest Cur'a kıyasla yaklaşık 19 kat daha fazla biyoyararlanım artışı gözlemlendiği bulunmuştur. Bu nedenle, Cur SD'nin Cur'un oral yoldan alımı için daha güçlü ve etkili bir formülasyon sağladığını rapor etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Tez çalışması süresince kullanılan çözücü ve kimyasal maddeler aşağıda listelenmiştir.

RES (HPLC saflıkta, Hunan Huakang Biotech Inc.),

GA (HPLC saflıkta, Sigma),

Kersetin (HPLC saflıkta, Sigma),

Asetonitril (HPLC saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya),

Formik asit (%98-100, Analitik saflıkta, Sigma),

Etanol (%99,5, Analitik saflıkta)

Metanol (HPLC saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya),

Ultra saf su (HPLC saflıkta)

3.1.2. Çözeltiler

1. Resveratrol Çözeltileri

Stok Çözelti:

2 mg RES analitik terazide tam olarak tartıldı ve 2 mL'lik balon jode etanol ile çözüldürölüp hacmine tamamlandı (1 mg/mL). RES stok çözeltisi yaklaşık 1 ay süre boyunca +4°C'de dayanıklıdır.

Stok çözeltisinin mobil faz ile seyreltilmesi sonucu hazırlanan RES standart çözeltileri:

Standart çözelti 1: Stok RES çözeltisinden uygun miktarda alınarak mobil faz ile seyreltilmesiyle 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Standart çözelti 2: Standart 1 çözeltisinden uygun miktarda alınarak mobil faz ile seyreltilmesiyle 200 ng/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Standart çözelti 3: Standart 1 çözeltisinden uygun miktarda alınarak mobil faz ile seyreltilmesiyle 1000 ng/mL konsantrasyonda hazırlandı.

2. Kersetin Çözeltisi

10 mg kersetin analitik terazide tam olarak tartıldı ve 2 mL'lik balon jodede metanol ile çözündürülüp hacmine tamamlandı (5 mg/mL). Bu stok çözeltiden uygun miktarda alınarak mobil faz ile seyreltilmesiyle hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanıldı.

3. Formik Asit Çözeltisi

% 0,2 formik asit çözeltisi hazırlamak için formik asit çözeltisinden 1 mL alındı ve 500 mL'lik balon jodede hacmine tamamlandı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. HPLC Cihazı (Shimadzu LC 20A, LC Solution yazılımlı)

DGU-20A5 Vakumlu gaz giderici

LC 20 AT Pompa

SIL-20AC Otomatik numune örnekleyici

Analitik kolon: Phenomenex, C18, (5 μ m, 250 x 4,6 mm I.D.)

Koruyucu kolon: Phenomenex, C18, (4 x 3 mm I.D.)

CTO-10A Kolon fırını

RF-10AXL Fluorimetrik dedektör

2. Ultra saf su cihazı (Elga Purelab Option-Q)

3. Girdap karıştırıcı (Velp Scientifica vortex)

4. Santrifüj (Hettich Mikro 22R)

5. Terazi (Denver, TB 215D)

6. Ultrasonik banyo (Ultrasonic LC 30H)

7. Otomatik pipetler (Eppendorf 0,5-10 μ L, 10-100 μ L ve 100-1000 μ L)

8. Vida kapaklı, yuvarlak tabanlı cam tüpler (12 cm)

9. Balonjojeler (İsolab 5, 10 ve 500 mL)

10. Cam vial, septum, kapak

11. Enjektör (2 mL ve 5 mL)

12. PTFE şırınga ucu filtre (Sartorius)

3.3. Resveratrolün HPLC ile Analizi için Yapılan Çalışmalar

3.3.1. Kolon, Mobil Faz, Dedektör Dalga Boyları ve Hassasiyet Seçimi

Literatür çalışmaları incelendikten sonra HPLC çalışmaları için C₈; CN; 5;4 ve 2,7 µm partikül çaplı C₁₈ kolonlarda, çeşitli oranlarda asetonitril-asetik asit, asetonitril-10 mM fosforik asit, asetonitril-formik asit mobil faz sistemleri gradient ve izokratik olarak uygulanarak, farklı dedektör hassasiyetlerinde, değişik akış hızlarında ve kolon sıcaklığında denemeler yapıldı. Analiz edilen maddenin retensiyon zamanı ve çalışılacak eksitasyon-emisyon dalga boyları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.'de yer almaktadır.

3.3.2. İç Standart (IS) Seçimi

Ekstraksiyon gibi ön işlemlerden ve enjeksiyonlardan kaynaklanabilecek hataların minimuma indirilmesi amacı ile kafein, levofloksasin, moksifloksasin, enrofloksasin, kersetin, 2-metilantrakınon, 1,8-dihidroksiantrakınon, setirizin hidroklorid, nortriptilin, naproksen sodyum, deksketoprofen trometamol, sertralin, maprotilin hidroklorid, fenolftalein, vitamin A, ferulik asit, aloin gibi çeşitli maddelerin IS olarak metodumuzda kullanılıp kullanılamayacağı incelendi. Tüm maddeler RES için belirlenen analiz koşullarında HPLC ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.'de yer almaktadır.

3.3.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Standart çözelti 2'den sırasıyla 10, 20, 50 µL; standart çözelti 3'den sırasıyla 20, 40, 80, 160 µL hacimler ve 1 mg/mL konsantrasyondaki IS çözeltisinden 100 µL kapaklı cam tüplere alındı. Çözeltilerin hacimleri mobil faz ile 400 µL'ye tamamlandı. Bu çözeltilerin üzerine önce 300 µL asetonitril sonra 300 µL %0,2 formik asit ilave edilerek girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı. 10°C'de 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen çözeltiler 0,45µ'luk PTFE filtreden süzülerek viallere konuldu.

HPLC sistemine 50 µL enjekte edilerek 320 nm eksitasyon 400 nm emisyon dalga boylarında saptanan piklerin alanları ölçüldü.

Her konsantrasyon 6 kez çalışılarak elde edilen RES pik alanları kersetin pik alanlarına oranlandı. Ortalama pik alan oranı değerlerine karşılık gelen konsantrasyon

değerleri arasında ölçü eğrileri hazırlandı. Ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait sonuçlar Bölüm 4.1.3.'te yer almaktadır.

3.3.4. Resveratrolün Plazmadan Ekstraksiyonu

Plazma proteinlerinden gelebilecek olası girişimleri en aza indirmek için RES'in plazmadan ekstraksiyonunu gerçekleştirmek üzere bazı ön denemeler yapıldı. Asidik, bazik pH'larda plazma örneklerinden farklı çözücüler ve bunların belli orandaki karışımları ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon denemeleri, farklı çözücüler ile protein çöktürme denemeleri yapıldı.

Bu denemelerden sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi için her bir plazma örneğinden 200 µL alınarak üzerine standart 1 çözeltisinden 40 µL eklendi. Örnekler ayrı ayrı 50 µL, 100 µL ve 200 µL pH 9 borat tamponu, 10 µL 1M HCl, 50 µL pH 6 fosfat tamponu konulduktan sonra 30 saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Örnekler ayrı ayrı 1'er mL etilasetat ve diklormetan eklendi, 3'er dakika daha girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen örnekler 4500 rpm'de santrifüj edildi ve ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat konuldu, santrifüj sonrası elde edilen çözeltilerdeki organik fazlar azot altında 40°C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 1 mL mobil fazla çözündürükten sonra 0,45µ'luk PTFE filtreden süzülerek viallere konuldu. Örnekler 50'şer µL'lik enjeksiyonlarla HPLC sisteminde analiz edildi.

Çöktürme yöntemi plazma proteinlerini uzaklaştırmak için kullanılan bir diğer yöntemdi. Bu yöntemde her bir plazma örneğinden 200 µL alınarak üzerine standart 1 çözeltisinden 40 µL eklendi. Çözeltilerin hacimleri mobil faz ile 400 µL'ye tamamlandı. Örnekler ayrı ayrı 600 µL asetonitril, 600 µL metanol, 300 µL asetonitril ve 300 µL %0,2 formik asit, 400 µL asetonitril ve 200 µL %15'lik trikloroasetik asit eklendi ve 1'er dakika daha girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen örnekler 4500 rpm'de ve 10°C'de 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen karışımlar 0,45µ'luk PTFE filtreden süzildükten sonra 50'şer µL HPLC sistemine enjekte edildi.

Uygun ekstraksiyon yöntemi belirlendikten sonra bu sistemin IS olarak seçilen maddenin verimini nasıl etkilediğini araştırmak için 200 µL plazmaya standart 1 çözeltisinden 40 µL, 1 mg/mL konsantrasyondaki kersetin (IS) çözeltisinden 100 µL eklendi. Karıştırıcıda 30 saniye karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.3.3.'te anlatıldığı gibi devam edildi.

Plazmadan yapılan ekstraksiyon ile ilgili tüm çalışmalara ait elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.4.'te yer almaktadır.

3.3.5. Plazmada Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Kapaklı cam tüplere 200'er μL plazma örneklerinin üzerine standart çözelti 2'den sırasıyla 10, 20, 50 μL ; standart çözelti 3'den sırasıyla 20, 40, 80, 160 μL hacimler eklendi ve 1 mg/mL konsantrasyondaki IS çözeltisinden 100 μL ilave edildi. Çözeltilerin hacimleri mobil faz ile 400 μL 'ye tamamlandı. Örnekler önce 300 μL asetonitril sonra 300 μL %0,2 formik asit ilave edilerek girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı. Ardından 10°C'de 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen örnekler 0,45 μL 'luk PTFE filtreden süzülerek 50'şer μL 'si 1 mL/dk akış ile izokratik sistemde 30°C'deki C_{18} kolona uygulandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.5.'te yer almaktadır.

3.3.6. Geliştirilen Yöntemin Plazmadan Geri Kazanım Oranının Hesaplanması

RES'in plazmadan geri kazanım oranını hesaplamak amacıyla RES içermeyen plazma örneklerine 3 ayrı konsantrasyonda (20,100,400 ng/mL) RES katılarak elde edilen örneklerin analizi yapıldı. Analiz sonucu elde edilen pik alanları, aynı konsantrasyondaki RES'in sulu ölçü eğrisindeki pik alanları ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.6.'da yer almaktadır.

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra ICH kılavuzu Q2 (R2)/Q14'e göre analitik yöntemin validasyonu yapıldı [69].

3.4.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, plazmadaki çalışmalar için RES ve IS eklemeksizin (boş deneme) hazırlanan örnek aynı koşullarda HPLC'de analiz edildi. Böylece plazmadan ve mobil fazdan kaynaklanabilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Boş denemeye ait kromatogram Bölüm 4.2.1.'de yer almaktadır.

Kabul kriteri: Boş denemelerden gelebilecek pikler RES ve IS piklerinin geldiği retensiyon zamanlarında pik vermemelidir.

3.4.2. Aralık ve Doğrusallık

Doğrusallık aralığı; geliştirilen yöntemin kabul edilebilir tekrarlanabilirlik, doğrusallık ve duyarlılıkla sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır. RES için doğrusallık aralığı 10-800 ng/mL olarak çalışıldı.

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için RES 7 farklı konsantrasyonda hem sulu çözeltide Bölüm 3.3.3.'de hem de plazmada Bölüm 3.3.5'de anlatıldığı şekilde örnek çözeltileri hazırlandı. Kromatogramlardan elde edilen RES ve IS pik alanları birbirine bölünerek elde edilen pik alan oranlarının konsantrasyonlara karşılık doğrusallık grafikleri çizildi. Sulu çözelti ve plazma örnekleri için sonuçlar sırasıyla, Bölüm 4.1.3. ve 4.1.5.'te gösterilmiştir.

Kabul kriteri: Doğrusallık grafiğinden elde edilen korelasyon katsayısı (r) 0,99'dan küçük olmamalıdır.

3.4.3. Doğruluk

Yöntem için doğruluk çalışması; plazmada 20, 100, 400 ng/mL'lik konsantrasyonlarda madde ve sabit konsantrasyonda IS katılmasıyla elde edilen örneklerin analiz edilmesiyle gerçekleştirildi. Elde edilen pik alanları kullanılarak plazma kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon sonuçları hesaplandı. Bu konsantrasyon sonuçlarının teorik konsantrasyon sonuçlarına bölümü ile elde edilen yüzde geri kazanımlar aşağıda bulunan denkleme göre hesaplandı ve sonuçlar Bölüm 4.2.3.'te gösterilmiştir.

$$\% \text{ Geri kazanım (verim)} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$$

Geri kazanım sonuçlarının ortalaması, % RSD, % bağıl ortalama hata, SD değerleri hesaplandı.

3.4.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

Yöntemin tekrarlanabilirliği plazmada aynı günde ve farklı günlerde 20, 100, 400 ng/mL'lik konsantrasyonlarda madde ve sabit konsantrasyonda IS katılmasıyla elde edilen örneklerin analiz edilmesiyle gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrileri kullanılarak elde edilen pik alanlarından konsantrasyonlar hesaplandı. Hesaplanan sonuçların

%RSD, ortalama, SD değerleri bulundu. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4.’te gösterilmiştir.

3.4.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

RES için LOQ ve LOD değerleri kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m} \qquad LOD = \frac{3 \sigma}{m}$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y keşişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5.’te gösterilmiştir.

3.4.6. Stabilit 

RES’in plazma örneklerinde stabilitesinin tayini için hazırlanan katılmış rnekler 4°C’deki karanlıkta otosampler içerisinde 6 saat ve 24 saat sonra bekletilerek tekrar HPLC ile analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6.’da gösterilmiştir.

3.5. Biyoyararlanım alışması

Yöntemin klinik uygulanabilirliğini göstermek amacı ile erkek tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada RES’in farmakokinetiği ve biyoyararlanımı incelendi. RES’in maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}), bu konsantrasyona ulaşma süresi (T_{maks}), eliminasyon yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) ve konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) hesaplandı. $k_{eliminasyon}$ eğri altında kalan alanın eğiminden ve $t_{1/2}$, $k_{eliminasyon}$ ’dan hesaplandı.

GA’nın RES’in biyoyararlanımını arttırıp arttırmadığını test etmek amacıyla erkek tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada bir gruba 100 mg/kg RES (suda) diğer gruba 100 mg/kg RES ve 100 mg/kg GA (suda) birlikte gavaj yolu ile verildi. RES’in farmakokinetiğini incelenmek amacıyla tavşanlardan 0; 2,5; 5; 10; 15; 30. dakika ve 1; 2; 4; 6; 8; 10; 24. saatlerde EDTA’lı tüplere alınan kanlar örnekleri 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonunda elde edilen plazma rnekleri -20°C’de saklandı. Bu rnekler Bölüm 3.3.5.’te anlatıldığı gibi HPLC’de analiz edildi. Elde edilen pik alan oranları kalibrasyon eğrisinde yerine konularak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Kontrol grubu ile maddelerin birlikte verildiği grubun konsantrasyonları karşılaştırılarak

GA'nın RES'in biyoyararlanımına olan etkisi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3'te gösterilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Resveratrolün HPLC ile Analizi için Yapılan Çalışmalar

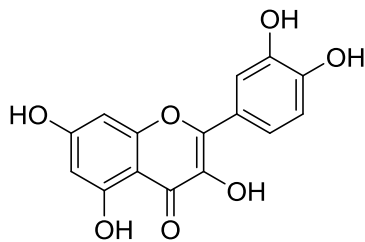
RES'in HPLC-FL ile analizini gerçekleştirmek için kolon, mobil faz sistemi, akış hızı, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyları ve hassasiyeti gibi kromatografik koşullar belirlendi. IS maddesi araştırıldı. Belirlenen koşullarda plazmadan RES analizleri yapıldı. Plazmadan analiz için uygun ekstraksiyon yöntemi tespit edildi. Bu bölümde belirlenen koşullar ve bu koşullarda elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı gibi yapılan denemeler sonucunda RES piki ve plazma kirliliklerinin en iyi şekilde rezolüsyonu 250 mm uzunluğunda, 5 µm partikül çaplı, 4,6 mm iç çapında C₁₈ kolonda; asetonitril-%0,2 formik asit (35:65) mobil faz sisteminin izokratik uygulanması ile 30°C'de 1 mL/dk akış hızında elde edilmiştir. Fluorimetrik dedeksiyonda eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 320 nm ve 400 nm olarak belirlenmiştir. Koşulları belirlenen bu sistemde RES'in retensiyon zamanı 7,8 dakika olarak bulunmuştur.

4.1.2. IS Seçimi

Bölüm 3.3.2.'de belirtilen etken maddeler ile yapılan denemelerde kersetin dışındaki maddelerin hepsi belirlenen sistemde plazma kirliliklerinin olduğu zamanlarda gelmiştir. RES piki ile rezolüsyonu iyi olan ve plazma kirliliklerinden ayrı bir zamanda gelen kersetin (Şekil 4.1) IS olarak seçildi. Retensiyon zamanı 9,6 dakikadır.



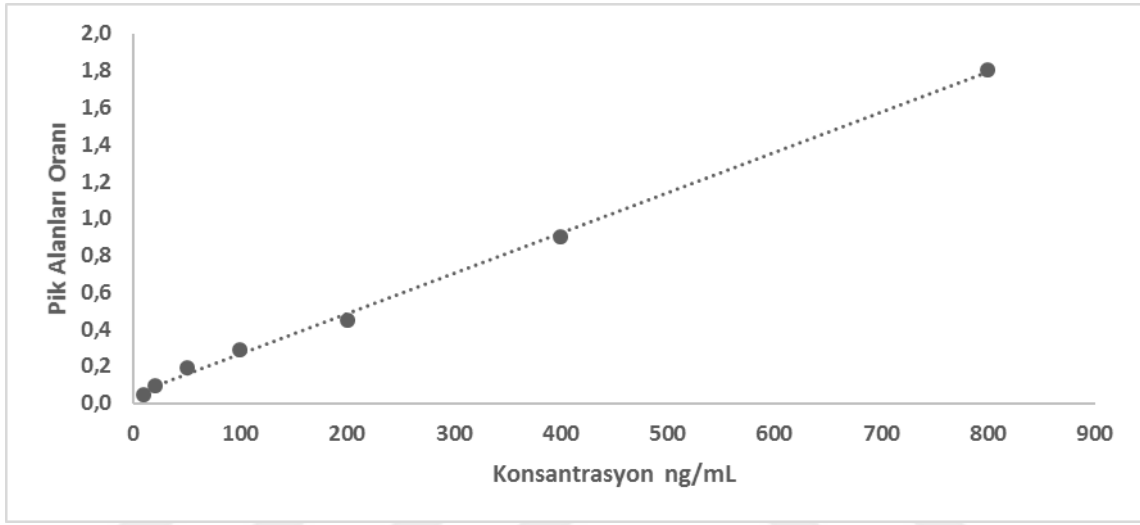
Şekil 4.1: Kersetinin kimyasal formülü

4.1.3. Sulu Çözeltilerde Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

Konsantrasyon aralığı 10-800 ng/mL olan standart çözeltiler 7 farklı konsantrasyonda Bölüm 3.3.3.'te anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde

Tablo 4.2: Tablo 4.1’deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,0021	0,0022	0,0022
Kesim noktası	0,0480	0,0476	0,0465	0,0478	0,0482	0,0476	0,0476
r	0,9984	0,9985	0,9986	0,9985	0,9984	0,9986	0,9985

**Şekil 4.2: RES’in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi****4.1.4. Plazmadan Örnek Hazırlama İşlemi**

Bölüm 3.3.4.’te anlatıldığı gibi plazma proteinlerinden gelebilecek olası girişimleri en aza indirmek için RES’in plazmadan ekstraksiyonunu gerçekleştirmek üzere sıvı-sıvı ekstraksiyon ve çöktürme yöntemi denendi. Yapılan deneyler sonucunda RES ve IS için en uygun örnek hazırlama işleminin asetonitril-%0,2 formik asit ile yapılan çöktürme işlemi olduğuna karar verildi. Ölçülen alan değerleri Tablo 4.3’te görülmektedir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde en uygun çözücünün asetonitril-%0,2 formik asit olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.3: Çözücüler ve bunlardan elde edilen alan değerleri

Çözücü	Pik Alanı
Asetonitril	9431056
Metanol	504989
Asetonitril-% 15 trikloroasetik asit	144512
Asetonitril-% 0,2 formik asit	11960215

4.1.5. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında bulunan 7 farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerin 200 µl plazma örneğine katılmasıyla hazırlanan çözeltiler ile Bölüm 3.3.5'te anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranı değerleri ile 10-800 ng/mL aralığında Şekil 4.3'te görülen ortalama ölçü eğrisi çizildi.

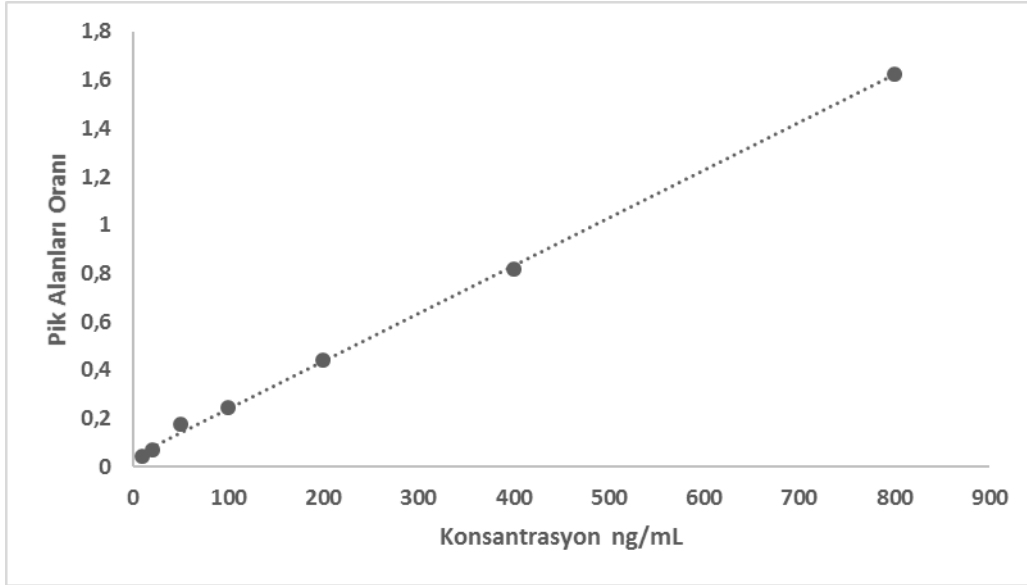
Pik alan oranlarının (A_{RES}/A_{IS}) ortalaması ($\bar{A}$), standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri Tablo 4.4'te, en küçük kareler yöntemi uygulanarak $\bar{A}$ değerlerinden hesaplanan doğru denkleminde ($A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası (intersept), C = konsantrasyon]) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.4: RES'in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı plazmada hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri

C (ng/mL) A_{RES}/A_{IS}	10	20	50	100	200	400	800
1	0,0460	0,0743	0,1748	0,2499	0,4345	0,8313	1,6337
2	0,0445	0,0732	0,1737	0,2350	0,4186	0,8003	1,5529
3	0,0453	0,0711	0,1729	0,2463	0,4539	0,8078	1,6177
4	0,0445	0,0748	0,1772	0,2527	0,4341	0,8072	1,6463
5	0,0473	0,0738	0,1758	0,2424	0,4515	0,8446	1,6403
6	0,0457	0,0698	0,1756	0,2508	0,4658	0,8123	1,6543
Ortalama	0,0456	0,0728	0,1750	0,2462	0,4431	0,8173	1,6242
SD	0,0011	0,0020	0,0015	0,0066	0,0171	0,0170	0,0371
RSD (%)	2,3140	2,6970	0,8845	2,6759	3,8537	2,0820	2,2822
Ortalama alan oran ($\bar{A}$) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $A = 0,0020C + 0,0448$ ($r = 0,9989$)							

Tablo 4.5: Tablo 4.4'teki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	0,002	0,0019	0,002	0,002	0,002	0,002	0,0020
Kesim noktası	0,0444	0,0456	0,0457	0,0421	0,046	0,0448	0,0448
r	0,9992	0,9991	0,9988	0,9985	0,9993	0,9984	0,9989



Şekil 4.3: RES'in 10-800 ng/mL konsantrasyon aralığında katkılı plazmada hazırlanan ölçü eğrisi

4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Plazmadan Geri Kazanım Oranının Hesaplanması

RES'in plazmadan geri kazanım oranını hesaplamak amacıyla üç farklı konsantrasyonda RES içeren plazma örnekleri Bölüm 3.3.6.'da anlatıldığı gibi çalışıldı. Analiz sonucu hesaplanan geri kazanım oranları Tablo 4.6'da verilmiştir.

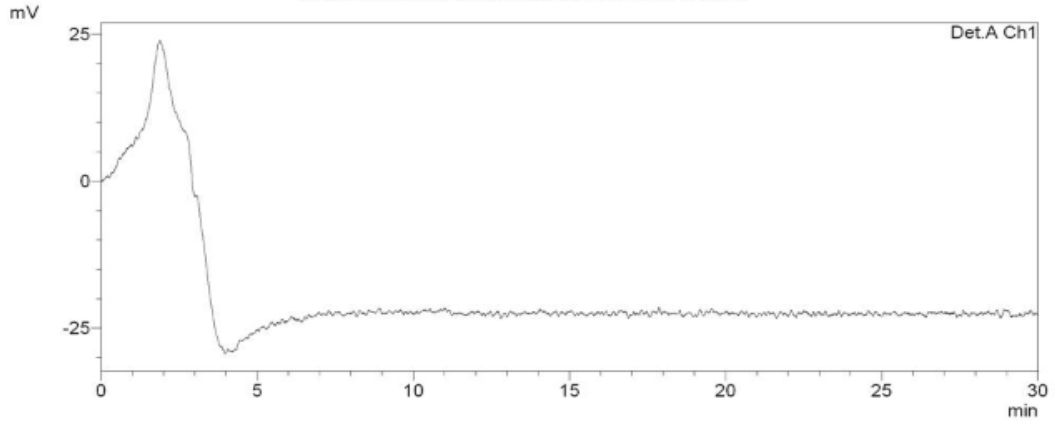
Tablo 4.6: RES'in plazmadan geri kazanımı

Plazmaya katılan RES miktarı (ng/mL)	% Geri kazanım	%RSD
20	88,15	0,790
100	85,66	1,279
400	93,55	1,307

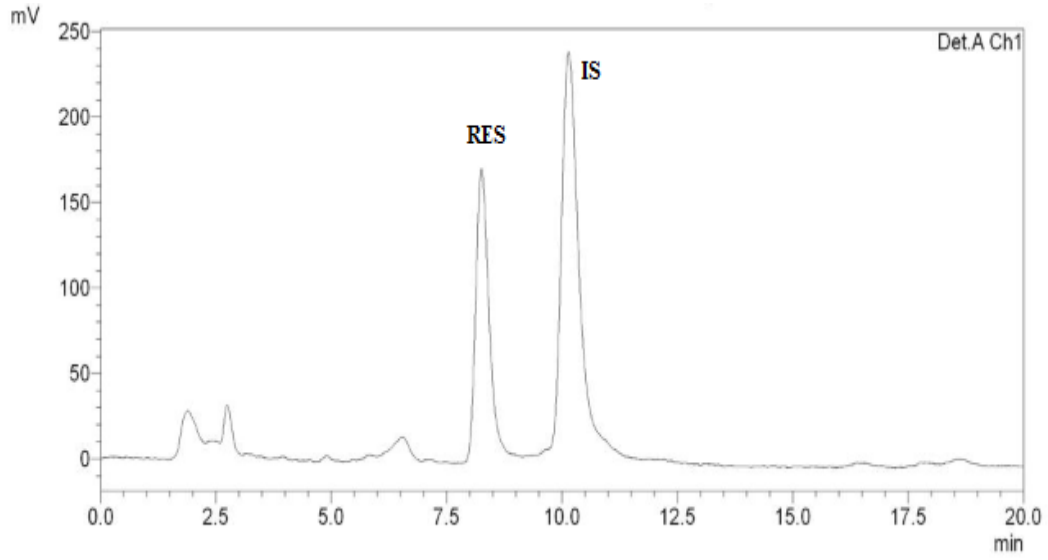
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

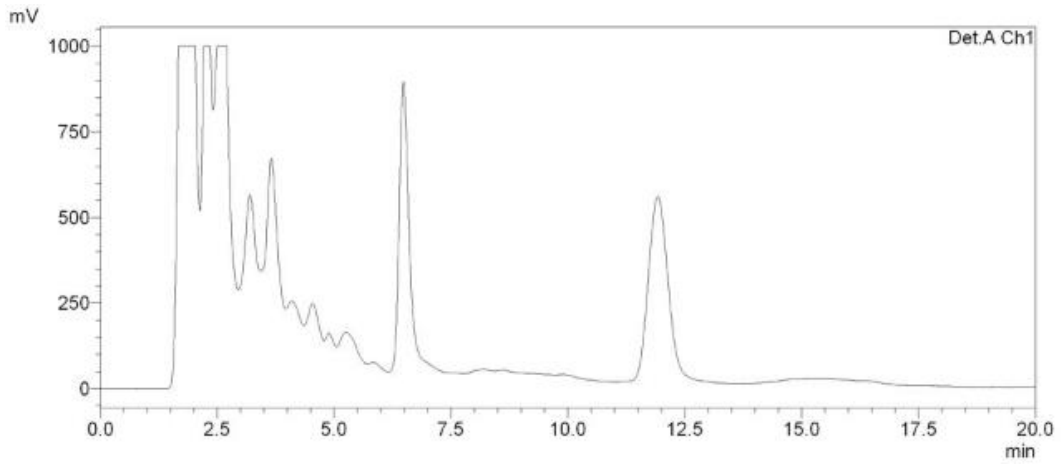
Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, HPLC'de yapılan analizler sonucunda RES ve IS piklerinin retensiyon zamanlarında ortamdaki kirliliklerden herhangi bir girişim olmadığı saptandı. Analize ait kromatogramlar Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7'de verilmiştir.



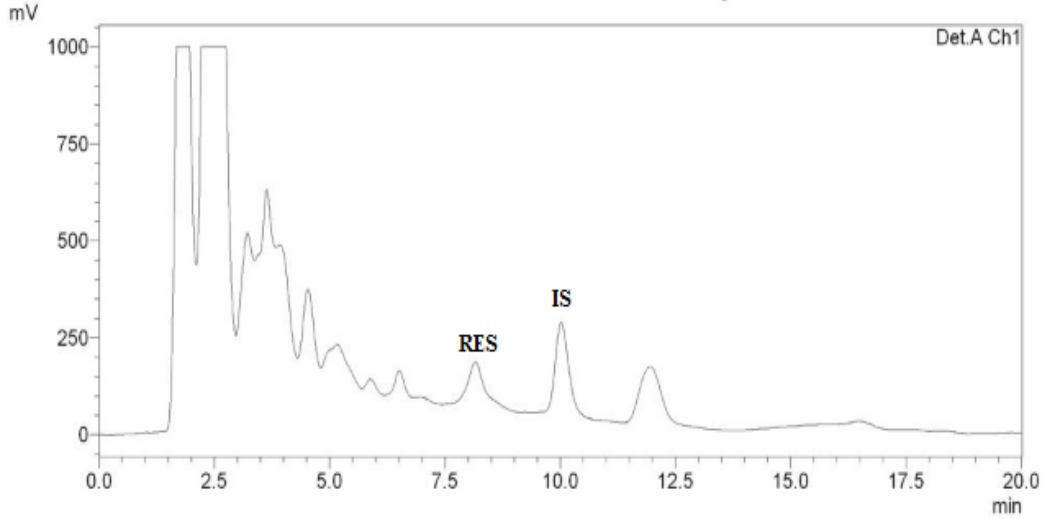
Şekil 4.4: Boş sulu çözeltiye ait kromatogram



Şekil 4.5: 100 ng/mL RES ve 100 µg/mL IS katkılı sulu çözelti örneğine ait kromatogram



Şekil 4.6: Boş plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 4.7: 100 ng/mL RES ve 100 µg/mL IS katkı plazma çözelti örneğine ait kromatogram

4.2.2. Aralık ve Doğrusallık

Doğrusallık aralığı 10-800 ng/mL olarak saptandı. Bu aralıkta 7 farklı konsantrasyonda yapılan analizler ile ilgili doğrusallık grafikleri ve parametreleri ile ilgili elde edilen sonuçlar sulu çözelti ve plazma için sırasıyla Bölüm 4.1.3. ve 4.1.5.'te verilmiştir.

4.2.3. Doğruluk

RES için plazmada 20, 100, 400 ng/mL'lik konsantrasyonlarda yapılan doğruluk çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. RSD ve RME değerleri sırasıyla %0,11-0,35 ve %(-0,05)-0,25 aralığında bulunmuştur.

Tablo 4.7: Plazmada doğruluk ve geri kazanım değerleri

	Plazmaya eklenen RES miktarı (ng/mL)		
	20	100	400
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	19,95	99,65	400,55
	20,00	100,05	400,45
	20,10	100,00	399,55
	20,05	100,55	400,30
	20,15	99,80	399,55
	20,05	99,65	400,30
Ortalama	20,05	99,95	400,12
SD	0,07	0,34	0,45
RSD (%)	0,35	0,34	0,11
RME (%)	0,25	-0,05	0,03
Geri kazanım (%) ort	100,25	99,95	100,03
Geri kazanım (%) RSD	0,35	0,34	0,11

4.2.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

20, 100, 400 ng/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda RES içeren plazma örnekleri Bölüm 3.3.5.'te anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde üç konsantrasyonun yapılan analizlerinde her bir örnek 6 kez çalışıldı. RSD değerleri %0,10-0,92 aralığında hesaplandı (Tablo 4.8).

Farklı günlerde üç konsantrasyonun yapılan analizlerinde elde edilen RSD değerleri %0,09-1,32 aralığında hesaplandı (Tablo 4.9).

Tablo 4.8: Aynı gün içinde plazmada yapılan RES analizlerinin tekrarlanabilirliği

	Plazmaya eklenen RES miktarı (ng/mL)		
	20	100	400
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	20,35	100,15	399,20
	19,85	100,10	400,35
	19,95	99,75	399,85
	20,25	100,55	400,15
	20,15	99,95	399,90
	20,10	100,35	400,05
Ortalama	20,11	100,14	399,92
SD	0,19	0,28	0,39
RSD (%)	0,92	0,28	0,10
RME (%)	0,54	0,14	-0,02

Tablo 4.9: Farklı günlerde plazmada yapılan RES analizlerinin tekrarlanabilirliği

	Plazmaya eklenen RES miktarı (ng/mL)		
	20	100	400
Bulunan konsantrasyon (ng/mL)	19,75	100,25	399,90
	19,85	99,80	400,25
	20,10	99,90	400,30
	20,35	100,15	399,45
	20,20	100,15	399,50
	19,70	99,55	400,05
Ortalama	19,99	99,97	399,91
SD	0,26	0,27	0,37
RSD (%)	1,32	0,27	0,09
RME (%)	-0,04	-0,03	0,01

4.2.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Yöntemin LOQ ve LOD değerleri Bölüm 3.4.5.'te verilen denklemlere göre hesaplandığında sırasıyla 7,25 ng/mL ve 2,17 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.2.6. Stabilité

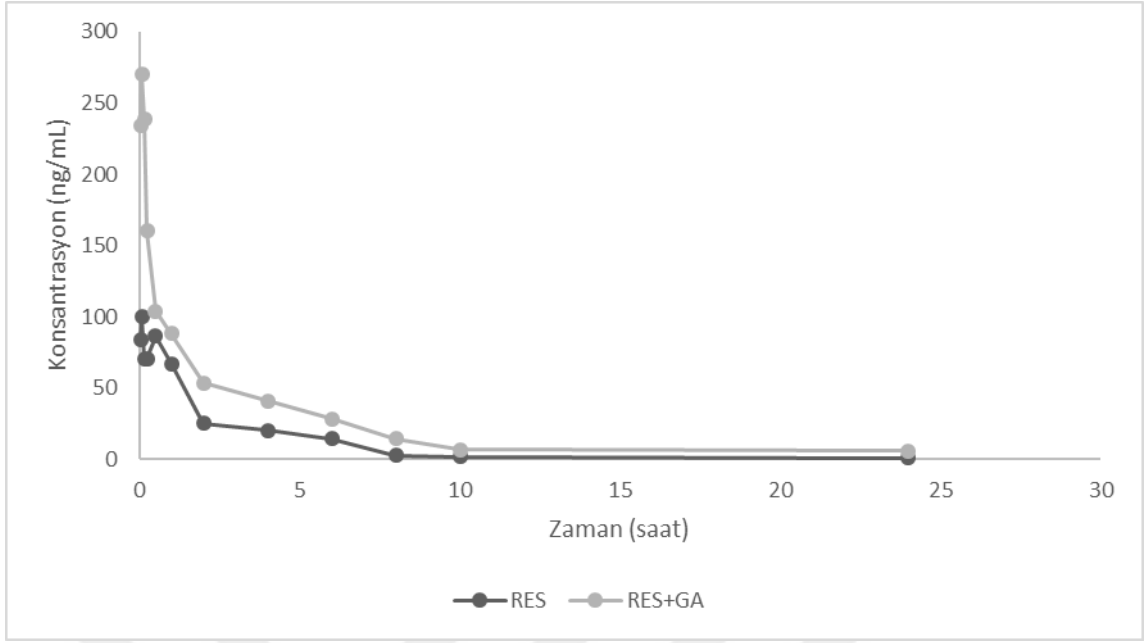
Bölüm 3.4.6.'da anlatıldığı gibi yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar RES'in 4°C'deki karanlıkta otosampler içerisinde 24 saat boyunca dayanıklı kaldığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.10: 4°C'de karanlıkta bekletilen RES'in stabilitesi

Zaman	Pik Alanı
Başlangıç	3172440
6 saat sonra	3210784
24 saat sonra	3148314

4.3. Biyoyararlanım Çalışması

Erkek tavşanlara RES'in tek başına ve GA ile birlikte oral olarak uygulanmasının ardından Bölüm 3.5.'te yazılan zaman aralıklarında toplanan kan örnekleri Bölüm 3.3.5.'te anlatıldığı gibi analiz edilmiştir. Bu örneklerin içerdiği RES miktarı plazma için hazırlanan ölçü eğrilerine ait olan ortalama doğru denkleminde bulunmuş (Tablo 4.11) ve plazma RES ve RES'in GA ile verildiğindeki konsantrasyonunun zamana karşı değişimini gösteren grafik birlikte çizilmiştir (Şekil 4.8). Bu grafikten de anlaşılağı gibi RES tek başına alındığında 5. dakikada (t_{maks}) maksimum plazma konsantrasyonuna ($C_{maks}=100,14$ ng/mL) ulaşıldığı görülmüş, eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 5,01 saat ve eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) 8,97 ng.saat/mL olarak hesaplanmıştır. RES GA ile birlikte alındığında 5.dakika (t_{maks}) sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ($C_{maks}=270,16$ ng/mL) ulaşıldığı görülmüş, eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 4,38 saat ve eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) 38,59 ng.saat/mL olarak hesaplanmıştır. RES'in tek başına ve GA ile birlikte verildiğinde elde edilen farmakokinetik parametreleri Tablo 4.12'te birlikte verilmiştir. Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de RES'in tek başına ve GA ile birlikte içilmesinden sonra toplanan kan örneklerinin analizine ait kromatogramlar görülmektedir.



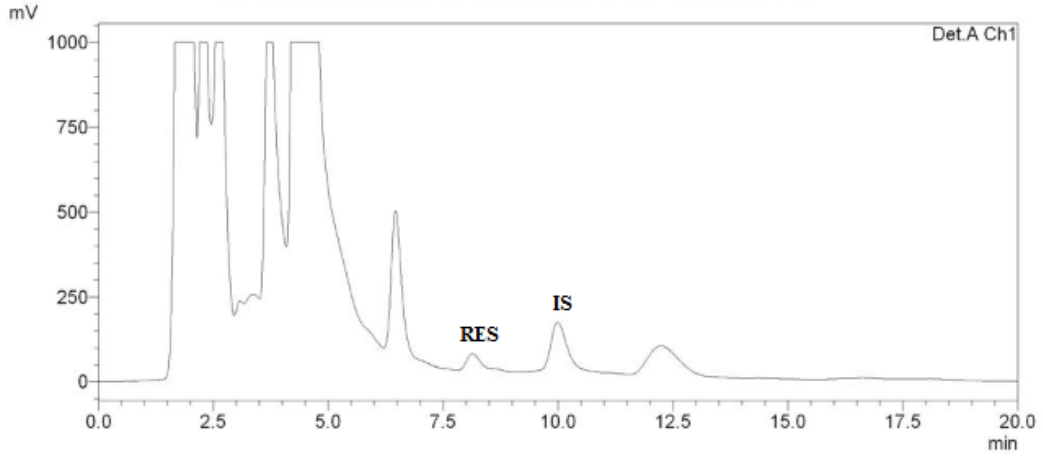
Şekil 4.8:Plazmadaki RES ve RES+GA'nın Konsantrasyonlarının Zamana Karşı Değişimi

Tablo 4.11: Plazmadaki RES ve RES+GA konsantrasyonlarının zaman karşı değişimi

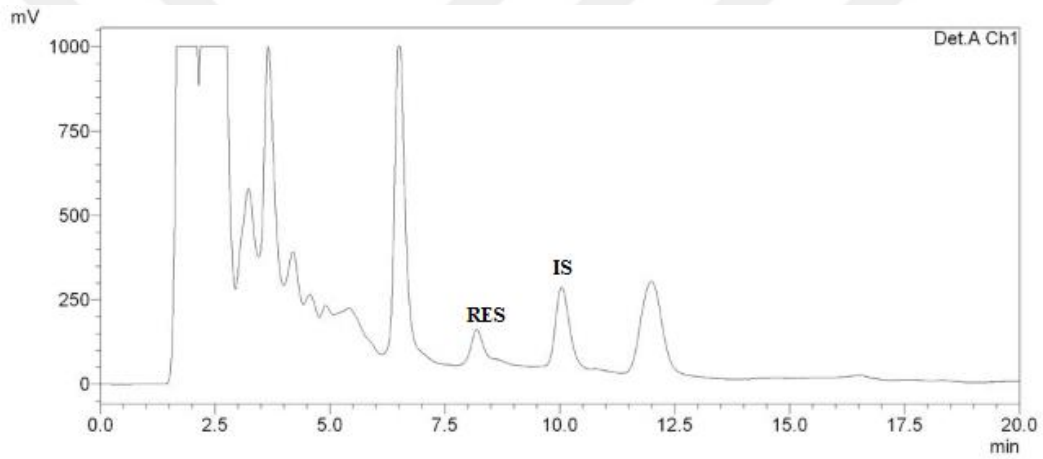
Zaman	RES (ng/mL)	RES+GA (ng/mL)
2,5 dakika	83,69	234,43
5 dakika	100,14	270,16
10 dakika	70,32	238,60
15 dakika	70,60	160,06
30 dakika	86,49	104,25
1 saat	67,03	88,07
2 saat	25,15	53,80
4 saat	20,28	40,90
6 saat	14,47	28,55
8 saat	2,87	14,56
10 saat	1,85	6,75
24 saat	1,24	6,11

Tablo 4.12: RES için hesaplanan farmakokinetik parametreler

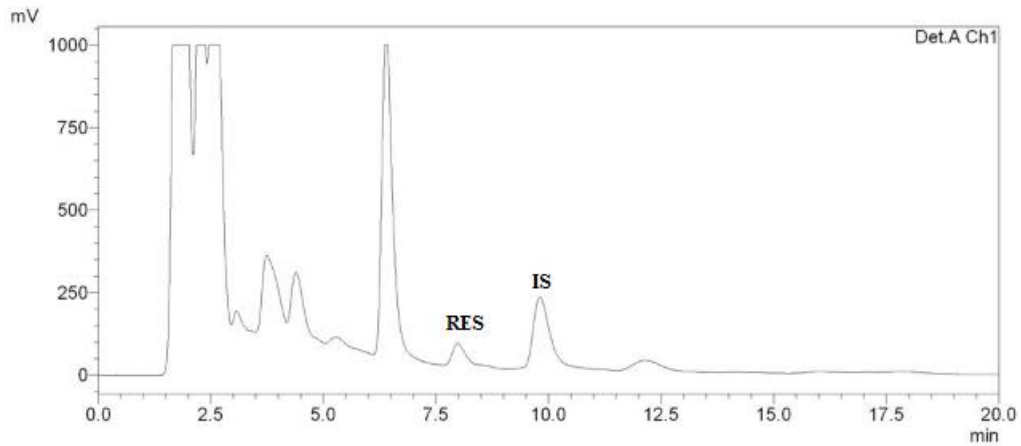
	RES	RES+GA
T_{maks} (dakika)	5	5
C_{maks} (ng/mL)	100,14	270,16
$t_{1/2}$ (saat)	5,01	4,38
$AUC_{0-24saat}$ (ng.saate/mL)	21,63	90,04
$AUC_{0-\infty}$ (ng.saate/mL)	8,97	38,59



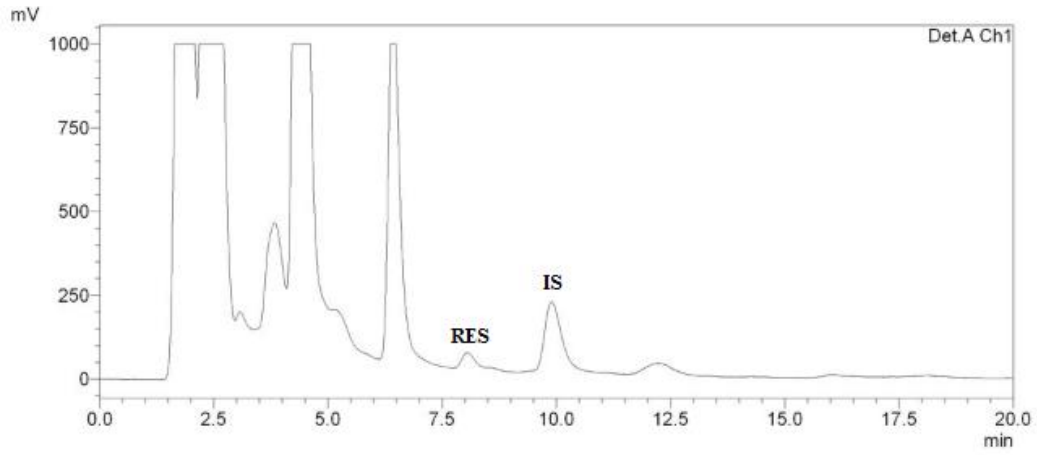
Şekil 4.9: 100 mg/kg tek doz RES verilen tavşandan 2 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 4.10: 100 mg/kg tek doz RES verilen tavşandan 5 dakika sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 4.11: 100 mg/kg RES ve 100 mg/kg GA tek doz birlikte verilen tavşandan 10 dakika sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 4.12: 100 mg/kg RES ve 100 mg/kg GA tek doz birlikte verilen tavşandan 1 saat sonra alınan plazma örneğine ait kromatogram

5. TARTIŞMA

RES başta özellikle kırmızı ve siyah üzüm olmak üzere yer fıstığı, ve ananas gibi pek çok farklı bitkide de bulunan ve sağlığa yararlı birçok etkisi olan doğal bir fitoaleksindir [1]. Son yıllarda RES'in antikanser, antihiperlipidemik, antienflamatuar, anti-viral, antioksidan, östrojenik, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve immüno-modülatör özellikleri gibi etkilerinin öne çıkması üzerine RES üzerindeki bilimsel ilgi artmış ve buna bağlı olarak yapılan çalışmalar da artış göstermiştir [2].

RES bu kadar yararlı etkilerine rağmen biyoyararlanımı göreceli olarak düşük bir bileşiktir [2]. Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda RES'in farmakokinetik parametreleri birbirine tam uyum göstermemesine rağmen elde edilen C_{max} , t_{max} ve AUC değerleri saf madde olarak tek başına kullanıldığında biyoyararlanımının düşük olduğunu kanıtlar niteliktedir [3-6]. Bu nedenle sağlığa bu kadar yararlı olduğu bilinen RES'in biyoyararlanımının artırılması araştırmacıların hedefi haline gelmiş ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Tezin giriş kısmında daha ayrıntılı olarak anlatılan bu çalışmaların büyük çoğunluğu biyoyararlanımın farklı ilaç şekilleri ve formülasyonlarla artırılıp artırılamayacağını incelemesi üzerinedir [18-37]. Diğer çalışmalarda ise RES'in doğal halde (üzüm, üzüm suyu, şarap vs gibi) ve küçük dozlarda alındığındaki biyoyararlanımı [7], dokulardaki dağılımı [8,9], etkinin doza bağımlılığı [10,11], RES'in biyoyararlanımına gıdaların etkisinin olup olmadığı [12,13], bazı bileşiklerle [14] ve biyoyararlanım arttırıcı etkisi olduğu bilinen bazı bitkilerle [15] veya doğal etkin maddelerle birlikte alındığında [16,17] biyoyararlanımının nasıl etkilendiği araştırılmıştır.

Bu bilgilerden yola çıkarak, bu tez çalışmasında, daha önce biyoyararlanımı arttırıcı etkisi pek çok çalışma ile kanıtlanmış [38-43] olan GA ile birlikte alınan RES'in biyoyararlanımındaki değişiklikler incelenmiştir.

Bu amaçla 12 adet erkek *Oryctolagus cuniculus* Yeni Zelanda Beyaz tavşan üzerinde biyoyararlanım çalışması yapılmıştır. Bir grup tavşana gavajla tek doz 100 mg/kg suda süspansiyon haline getirilmiş RES diğer gruba ise 100 mg/kg RES ile birlikte 100 mg/kg GA verilmiştir. Tavşanlardan 0; 2,5; 5; 10; 15; 30. dakika ve 1; 2; 4; 6; 8; 10; 24. saatlerde kan örnekleri alınmış ve elde edilen plazmalar analiz edilene kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. Bu örneklerin analizi için tarafımızdan yeni bir

floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin örnek hazırlama aşamasında mobil faz ile çöktürme işlemi kullanılmış ve örnekler C₁₈ kolonda (250 mm, 4,6 mm, 5 µm ıd) asetonitril-%0,2 formik asit (35:65) mobil faz sisteminin izokratik uygulanması ile 30°C’de 1 mL/dk akış hızında floresans dedektörlü HPLC ile analiz edilmiştir. Eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 320 nm ve 400 nm olarak belirlenmiş ve yöntemde internal standart olarak kersetin kullanılmıştır.

Geliştirilen yöntemin validasyonu ICH kurallarına göre yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 10-800 ng/mL aralığında doğrusallık göstermiş ve LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,17 ng/mL ve 7,25 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin kesinliği gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları ile incelenmiş ve elde edilen % RSD değerleri %5’in altında bulunmuştur. Yöntemin doğruluğu da plazmadan geri kazanım çalışmaları sonucunda % 89 nin üzerinde bulunmuştur.

Tavşanlardan yukarıda belirtilen saatlerde toplanan örnekler geliştirilen yöntemle analiz edilmiş ve yapılan analizler sonucunda resveratrölün saf haldeki ortalama C_{max} değeri 100,14 ng/mL, t_{max} değeri 5 dakika, AUC_{0-∞} değeri ise 8,97 ng.saat/mL olarak bulunmuştur. Bu değerler RES’in daha önce yayınlanmış farmakokinetik parametreleri ile uyum göstermektedir. RES’in GA ile kombinasyonundan elde edilen C_{max}, t_{max} ve AUC_{0-∞} değerleri ise sırasıyla 270,16 ng/mL; 5 dakika ve 38,59 ng.saat/mL olarak bulunmuştur.

RES’in sade olarak ve GA ile kombine halde verilmesi ile elde edilen farmakokinetik parametreler karşılaştırıldığında AUC_{0-∞} ve C_{max} değerlerinde sırasıyla %430 ve %270 oranında artış gözlendiği tespit edilmiştir. Bu değerler bize GA’nın RES’in biyoyararlanımını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Resveratrol, Erişim 21.05.2019, <http://www.wikizero.biz/index.php?q=aHR0cHM6Ly90ci53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvUmVzdmVyYXRyb2w>
2. Rx Media® 2019, İnteraktif İlaç bilgi kaynağı.
3. Smoliga JM, Blanchard O. Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution? *Molecules* 2014; **19**: 17154-17172.
4. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; **49**: 472 – 481.
5. Perrone D, Fuggetta MP, Ardito F, Cottarelli A, De Filippis A, Ravagnan G ve ark. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) and its properties in oral diseases (Review). *Exp. Ther. Med.* 2017; **14**: 3-9.
6. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 2004; **32**: 1377-1382.
7. Ortuño J, Covas MI, Farre M, Pujadas M, Fito M, Khymenets O ve ark. Matrix effects on the bioavailability of resveratrol in humans. *Food Chem.* 2010; **120**: 1123-1130.
8. Vitrac X, Desmoulie`re A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N ve ark. Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 2003; **72**: 2219–2233.
9. Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *JGHF* 2008; **24**: 618-622.
10. Das S, Lin HS, Ho PC, Ng KY. The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharm. Res.* 2008; **25**: 2593-2600.

11. Kothari S, Troxel G. Methods of improving glucose tolerance, hair regrowth, and bioavailability. United States Patent Application Publication US20170119693A1 2017; <https://patents.google.com/patent/US20170119693A1/en>
12. Vaz-da-Silva M, Loureiro AI, Falcao A, Nunes T, Rocha JF, Fernandes-Lopes C ve ark. Effect of food on the pharmacokinetic profile of trans-resveratrol. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2008; **46**: 564-570.
13. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP ve ark. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; **49**: 495 – 504.
14. Uberti F, Morsanuto V, Aprile S, Ghirlanda S, Stoppa I, Cochis A ve ark. Biological effects of combined resveratrol and vitamin D3 on ovarian tissue. *Journal of Ovarian Research* 2017; **10**: 61.
15. Cong Z, Zhou M, Yang F, Liu C, Pan R, Chang,Q ve ark. Effects of *Ganoderma*, *Rhodiola* and grape seed extracts on the glucuronidation and oral bioavailability of resveratrol in rats. *Nat. Prod. Res.* 2017; **33**: 767-771.
16. Wightman EL, Reay JL, Haskell CF, Williamson G, Dew TP, Kennedy DO. Effects of resveratrol alone or in combination with piperine on cerebral blood flow parameters and cognitive performance in human subjects: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over investigation. *Br. J. Nutr.* 2014; **112**: 203-213.
17. Johnson JJ, Nihal M, Siddiqui IA, Cameron O. Scarlett CO, Howard H. Bailey HH, Mukhtar H ve ark. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; **55**: 1169–1176.
18. Alfaras I, Perez M, Juan ME, Merino G, Prieto JG, Planas JM ve ark. Involvement of breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) in the bioavailability and tissue distribution of trans-resveratrol in knockout mice. *J. Agric. Food Chem.* 2010; **58**:4523-4528.
19. Amiot MJ, Romier B, Dao TMA, Fanciullino R, Ciccolini J, Burcelin R ve ark. Optimization of trans-resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie* 2013; **95**:1233-1238.

20. Blanchard OL, Friesenhahn G, Javors MA, Smoliga JM. Development of a lozenge for oral transmucosal delivery of trans-resveratrol in humans: proof of concept. *PLoS One* 2014; **9**: e90131.
21. Calvo-Castro LA, Schiborr C, David F, Ehrt H, Voggel J, Sus N ve ark. The oral bioavailability of trans-resveratrol from a grapevine-shoot extract in healthy humans is significantly increased by micellar solubilization. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018; **62**: 1701057.
22. Chang CW, Wong CY, Wu YT, Hsu MC. Development of a solid dispersion system for improving the oral bioavailability of resveratrol in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2016; **42**: 239-249.
23. Frozza RL, Bernardi A, Paese K, Hoppe JB, Silva T, Battastini AMO ve ark. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2010; **6**: 694-703.
24. Gao X, Xie W, Zhu J, Wan Z, Zhao Y, Liu D. Bioavailability comparison between nanometer resveratrol and resveratrol β -cyclodextrin inclusion complex. *Zhongcaoyao* 2011; **42**: 966-968.
25. Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; **68**: 593-601.
26. Pandita D, Kumar S, Poonia N, Lather V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Res Int.* 2014; **62**: 1165-1174.
27. Peñalva R, Morales J, González-Navarro CJ, Larrañeta E, Quincoces G, Peñuelas I ve ark. Increased oral bioavailability of resveratrol by its encapsulation in casein nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; **19**: 2816.
28. Polans AS, Subramanian L, Vakil R, Kwon GS. Water-soluble formulations of resveratrol and uses thereof. International application published under the patent cooperation treaty (PCT) 2010; <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2010059628>
29. Singh SK, Makadia V, Sharma S, Rashid M, Shahi S, Mishra PR ve ark. Preparation and in-vitro/in-vivo characterization of trans-resveratrol

- nanocrystals for oral administration. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2017; **7**: 395-407.
30. Singh G, Pai RS. Optimized PLGA nanoparticle platform for orally dosed trans-resveratrol with enhanced bioavailability potential. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014; **11**: 647-659.
 31. Singh G, Pai RS. Trans-resveratrol self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced bioavailability potential: optimization, pharmacokinetics and in situ single pass intestinal perfusion (SPIP) studies. *Drug Deliv.* 2015; **22**: 522–530.
 32. Siu FYK, Ye S, Lin H, Li S. Galactosylated PLGA nanoparticles for the oral delivery of resveratrol: enhanced bioavailability and in vitro anti-inflammatory activity. *Int. J. Nanomedicine* 2018;**13**: 4133–4144.
 33. Spogli R, Bastianini M, Ragonese F, Iannitti RG, Monarca L, Bastioli F ve ark. Solid dispersion of resveratrol supported on magnesium dihydroxide (Resv@MDH) microparticles improves oral bioavailability. *Nutrients* 2018; **10**: 1925.
 34. Tian T. Resveratrol micropill with improved bioavailability and preparation method thereof. Patent Park 2013; Patent no CN 102885780
https://content2-cas.org.ezp.ulakbim.gov.tr/v1/AUTH_9a355bb5cefd4c378bde0d541c6a11ce/patentpak-cdr-full-text-117/patent/70281422_1537160410.pdf?temp_url_sig=340a5d63f8a0a7426c85621b08e586855ee62392&temp_url_expires=1557180520&inline
 35. Yang Z, Argenziano M, Salamone P, Pirro E, Sprio AE, Scipio FD ve ark. Preclinical pharmacokinetics comparison between resveratrol 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex and resveratrol suspension after oral administration. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2016; **86**: 263–271.
 36. Yang FF, Zhou J, Hu X, Cong ZQ, Liu CY, Pan RL ve ark. Improving oral bioavailability of resveratrol by a UDP-glucuronosyltransferase inhibitory excipient-based self-microemulsion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018; **114**: 303-309.
 37. Yen CC, Chang CW, Hsu MC, Wu YT. Self-nanoemulsifying drug delivery system for resveratrol: enhanced oral bioavailability and reduced physical fatigue in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; **18**: 1853.

38. Ajazuddin, Alexander A, Qureshi A, Kumari L, Vaishnav P, Sharma M ve ark. Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients. *Fitoterapia* 2014; **97**: 1-14.
39. Asghar F. Growing impact of herbal bioenhancers in pharmaceutical industries: a comprehensive review. *Adv. Biomed. Pharma.* 2015; **2**: 154-158.
40. Chavhan SA, Shinde SA, Gupta HN. Current trends on natural bioenhancers: A Review. *Int J Pharmacogn Chinese Med.* 2018; **2**: 1-13.
41. Dudhatra GB, Mody SK, Awale MM, Patel HB, Modi CM, Kumar A ve ark. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. *SCI World J* 2012; **2012**: 1-33.
42. Kesarwani K, Gupta R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013; **3**: 253-266.
43. Tatiraju DV, Bagade VB, Karambelkar PJ, Jadhav VM, Kadam V. Natural Bioenhancers: An overview. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2013; **2**: 55-60.
44. Resveratrol, Erişim 21.05.2019, <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+501-36-0>
45. trans-Resveratrol, US Food and Drug Administration, Ağustos 2007, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GrASNotices&id=224>
46. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcao A, Soares E, Costa R, Loureiro AI ve ark. Pharmacokinetic and safety profile of transresveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; **53**: S7 –S15.
47. Azorin-Ortuno M, Yanez-Gascon MJ, Pallares FJ, Vallejo F, Larrosa M, Garcia-Conesa MT ve ark. Pharmacokinetic study of trans-resveratrol in adult pigs. *J. Agric. Food Chem.* 2010; **58**: 11165–11171.
48. La Porte C, Voduc N, Zhang G, Seguin I, Tardiff D, Singhal N ve ark. Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. *Clin Pharmacokinet* 2010; **49**: 449-454.
49. Nunes T, Almeida L, Rocha JF, Falcao A, Fernandes-Lopes C, Loureiro AI ve ark. Pharmacokinetics of trans-resveratrol following repeated

- administration in healthy elderly and young subjects. *J Clin Pharmacol* 2009; **49**: 1477-1482.
50. Glycyrrhizin, Erişim 21.05.2019, https://en.wikipedia.org/wiki/Glycyrrhizin#cite_note-3
51. Mukhopadhyay M, Panja P. A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Sep. Purif. Technol.* 2008; **63**: 539–545.
52. Glycyrrhizin, Erişim 21.05.2019, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycyrrhizic_acid
53. Glycyrrhizin, Erişim 21.05.2019, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13751>
54. Radix Glycyrrhizae, WHO monographs on selected medicinal plants Volume 1, 1999.
55. *Glycyrrhiza glabra* (Meyan), FFD Monografları Tedavide Kullanılan Bitkiler
56. Dai JH, Iwatani Y, Ishida T, Terunuma H, Kasai H, Iwakura Y ve ark. Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology* 2001; **103**: 235-243.
57. Khanuja SPS, Kumar S, Arya JS, Shasany AK, Singh M, Awasthi S ve ark. Composition comprising pharmaceutical/nutraceutical agent and a bio-enhancer obtained from *glycyrrhiza glabra*. United States Patent US 6,979,471 B1 2005; https://www.lens.org/lens/patent/US_6979471_B1
58. Ahmad N, Al-Subaie AM, Ahmad R, Sharma S, Alam MA, Ashafaq M ve ark. Brain-targeted glycyrrhizic-acid-loaded surface decorated nanoparticles for treatment of cerebral ischaemia and its toxicity assessment. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2019; **47**: 475-490.
59. Kong R, Zhu X, Meteleva ES, Chistyachenko YS, Suntsova LP, Polyakov NE ve ark. Enhanced solubility and bioavailability of simvastatin by mechanochemically obtained complexes. *Int. J. Pharm.* 2017; **534**: 108-118.
60. Meteleva ES, Chistyachenko YS, Suntsova LP, Tsyganov MA, Vishnivetskaya GB, Avgustinovich DF ve ark. Physicochemical properties and anti-opisthorchosis effect of mechanochemically synthesized solid compositions of praziquantel with glycyrrhizic acid disodium salt. *Biochemistry, Biophysics, And Molecular Biology* 2018; **481**: 228-231.

61. Meteleva ES, Chistyachenko YS, Suntsova LP, Khvostov MV, Polyakov NE, Selyutina OY ve ark. Disodium salt of glycyrrhizic acid – A novel supramolecular delivery system for anthelmintic drug praziquantel. *J. Drug Deliv. SCI Tec.* 2019; **50**: 66-77.
62. Qiao X, Wang Q, Wang S, Kuang Y, Li K, Song W ve ark. A 42-markers pharmacokinetic study reveals interactions of berberine and glycyrrhizic acid in the anti-diabetic chinese medicine formula Gegen-Qinlian Decoction. *Front. Pharmacol.* 2018; **9**: 622.
63. Radwan MA, AlQuadeib BT, Šiller L, Wright MC, Horrocks B. Oral administration of amphotericin B nanoparticles: antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats. *Drug Deliv.* 2017; **24**: 40–50.
64. Selyutina OY, Apanasenko IE, Kim AV, Shelepova EA, Khalikov SS, Polyakov NE. Spectroscopic and molecular dynamics characterization of glycyrrhizin membrane-modifying activity. *Colloids Surf., B* 2016; **147**: 459–466.
65. Selyutina OY, Polyakov NE, Korneev DV, Zaitsev BN. Influence of glycyrrhizin on permeability and elasticity of cell membrane: perspectives for drugs delivery. *Drug Deliv.* 2016; **23**: 848-855.
66. Shobha KS, Gurucharan DN. Glycyrrhizin glabra as a bioenhancer for antibiotics. *BTAIJ* 2014; **9**: 6-10.
67. Yang FH, Zhang Q, Liang QY, Wang SQ, Zhao BX, Wang YT ve ark. Bioavailability enhancement of paclitaxel via a novel oral drug delivery system: paclitaxel-loaded glycyrrhizic acid micelles. *Molecules* 2015; **20**: 4337-4356.
68. Zhang Q, Polyakov NE, Chistyachenko YS, Khvostov MV, Frolova TS, Tolstikova TG ve ark. Preparation of curcumin self-micelle solid dispersion with enhanced bioavailability and cytotoxic activity by mechanochemistry. *Drug Deliv.* 2018; **25**: 198-209.
69. ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

70. Bellow S, Latouche G, Brown SC, Poutaraud A, Cerovic ZG. In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* 2012; **63**: 3697-3708.



ETİK KURUL KARARI



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2016/150

27.05.2016

KONU: Sn. Arş.Gör.Gamze ERGİN

Sayın, Arş.Gör.Gamze ERGİN

“Glisirizik Asidin Bazı Bitkisel Etken Maddelerin Biyoyararlanımı Üzerine Etkisi” başlıklı projeniz 27.05.2016 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAS
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MİRAL
Üye

Prof. Dr. Serdar ÜŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Nasuhi GÜNAY
Üye

Hakan AKTÜRK
Üye

KATILMALI

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GLİSİRİZİK ASİDİN RESVERATROLÜN BİYİYARARLANIMI ÜZERİNE ETKİSİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 4	% 1	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	Veronika Somoza. "Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine", Molecular Nutrition & Food Research, 08/2011 Yayın	<% 1
3	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Niyaz Ahmad, Abeer M. Al-Subaiee, Rizwan Ahmad, Sonali Sharma et al. "Brain-targeted glycyrrhizic-acid-loaded surface decorated nanoparticles for treatment of cerebral ischaemia and its toxicity assessment", Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019 Yayın	<% 1
5	Submitted to Mehmet Akif Ersoy Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gamze	Soyadı	Ergin Kızılçay
Doğ.Yeri	Fatih/İstanbul	Doğ.Tar.	06.01.1986
Email	gamze.erginkizilcay@istanbul.edu.tr	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	Devam
Yük.Lis.	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2013
Lisans	Yıldız Teknik Üni. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2010
Lise	Fahrettin Kerim Gökay Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	2018-Halen
2.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2015-2017
3.	Mesul Müdür ve Kalite Güvence Sorumlusu	Bezmialem Fitoterapi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi	2014-2017
4.	Dr.Kimyager İ.Yanço Andre Yanço	Uygulama Kimyageri	2011-2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	YÖKDİL	73,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	76,969	71,858	64,553
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Projeler

- 2014-2015: Bezmialem Vakıf Üniversitesi İstanbul Fitoterapi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi Kurulması projesi İSTKA/TR10/14/YEN/0084, Mesul Müdür ve Kalite Kontrol Sorumlusu, Tamamlandı.
- "Piyasada bulunan bitkisel kaynaklı bazı uçucu ve sabit yağların kalite kontrol çalışmalarının yapılması ve bitkisel monograf hazırlanması", BAP Araştırma Projesi, 12.2015/33, Araştırmacı, Tamamlandı.
- "Bitkisel İçerikli Ağız Bakım Suyunun Geliştirilmesi, Formülasyonu ve İnsan Etik Kurul Başvurusu İçin Gerekli İşlemlerin Tamamlanması", BAP Araştırma Projesi, 6,2016/37, Yardımcı Araştırmacı, Devam Ediyor.
- "Saç Beyazlaması Probleminin Giderilmesine Yönelik Bitkisel İçerikli Nanoemülsiyonların Geliştirilmesi Ve In Vitro Etkinliğinin İncelenmesi", TÜBİTAK Projesi, 117S097, Devam Ediyor

Katıldığı Kurslar ve Eğitimler

- Sorumlu Müdürlük Eğitimi, Kimyagerler Derneği, 2017
- Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Bezmialem Vakıf Üniversitesi , 2016
- Claurus SQ8 GC/MS Training, Perkin Elmer Turkey, 2015
- Axion 2 QTOF-MS-HPLC Training, Perkin Elmer Turkey, 2015
- Advance Ion Chromatography Training, Metrohm AG, 2013
- IQOQ Training, Metrohm AG, 2012
- Basic Ion Chromatography Training, Metrohm AG, 2012
- Basic Service Training, Metrohm AG, 2012
- C Sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı , Bahçeşehir Üniversitesi, 2012
- Basic Titration Training, Metrohm AG, 2011

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

Ergin Kizilçay G., Çağlar Andaç S., Önal A., Toker S., "Spectrophotometric determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors in pharmaceutical preparations", TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY, vol.37, pp.171-181, 2013

Tebliğler (Uluslararası ve Ulusal Bildiriler)

- Ergin Kizilçay G., Toker S., "Spectrophotometric Determination of Statins with Pi-Acceptor Reagents in Pharmaceutical Preparations ", International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), ANKARA, TÜRKİYE, 26-27 Nisan 2018, pp.1302-1302
- Toker S., Altınbilek B. , Ergin Kizilçay G., "Stability Indicating High Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Naproxen and Esomeprazole in Pharmaceutical Formulation", 2. Uluslararası İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 27-29 Kasım 2015, pp.228-228

- Ergin Kizilçay G., Sağirli A.O., Toker S., "HPLC Determination of Levofloxacin in Human Breast Milk", ISOPS 11th International Syposium on Pharmaceutical Sciences, ANKARA, TÜRKİYE, 9-12 Haziran 2015, pp.80-81
- Ergin Kizilçay G., Çağlar Andaç S., Önal A., Toker S., "Spectrophotometric determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors in pharmaceutical preparations", XII.Ulusal Spektroskopi Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-22 Mayıs 2011,

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Seyahat, spor, müzik

