

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞI İÇİN POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI
PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Gizem İĞDELİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Binnur TEMEL

MAYIS 2025

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞI İÇİN POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI
PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Gizem İĞDELİ
195314002**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Binnur TEMEL

MAYIS 2025

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195314002 numaralı Doktora Öğrencisi Gizem İĞDELİ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "ALZHEİMER HASTALIĞI İÇİN POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Binnur TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Deniz CEYLAN
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Ali Asram SAĞIROĞLU
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Dr. Öğr. Üyesi Burak ÇELİK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 28 Mayıs 2025
Savunma Tarihi : 8 Mayıs 2025



Canım Aileme,

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca kişisel ve mesleki hayatımda her zaman bana yol gösterecek deneyim ve bilgilerini hoşgörüsüyle benimle paylaşan tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Binnur TEMEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamda yer alan hücrel çalışmaları yaptığım, ilerlememde büyük katkıları olan, ilgisini hiç eksik etmeden her konuda hoşgörüsü ve özverisiyle bana yardımcı olan çok değerli hocam Prof. Dr. Claus U. PIETRZIK ve tüm ekibine çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında tez izleme komitesi üyeliğini gerçekleştiren ve değerli tavsiyeleriyle yanımda bulunan Prof. Dr. Fahri AKBAŞ ve Prof. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ'ye teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ve 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı 20220207 numaralı proje ile destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda kullandığım Donepezil.HCl'in teminini sağlayan Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Tic A. Ş.'ye teşekkür ederim.

Doktora eğitim hayatım boyunca her zaman yanında olan ve güvenle beni her konuda dostluklarıyla destekleyen, yardımlarını hiç esirgemeyen Zehra DEMİR, Esmâ SAMUK ve Hatice Kübra BATU'ya teşekkür ederim. Çalışma ortamında bana eşlik eden ve desteklerini esirgemeyen tüm BATMACRO ekibine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, her konuda bana en büyük desteği sağlayan, sevgilerini esirgemedi her zaman yanımda olan annem Rukiye İĞDELİ, babam Mehmet İĞDELİ ve ailemizin neşesi Yaman'a çok teşekkür ederim.

2025

Gizem İĞDELİ
(Eczacı)

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 olmadığını beyan ederim.

Gizem İĞDELİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	x
ÖZET.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1 AH.....	4
2.1.1 AH'nin tanımı ve tarihçesi	4
2.1.2 AH'nin prevalansı	4
2.1.3 AH'nin klinik belirtileri	5
2.1.4 AH'nin evreleri	5
2.1.5 AH'nin nedenleri ve risk faktörleri	6
2.1.6 AH'de epigenetik	6
2.1.7 AH'nin patofizyolojisi ve hipotezleri	9
2.1.7.1 Amiloid kaskadı hipotezi	10
2.1.7.2 Tau hiperfosforilasyon hipotezi	10
2.1.7.3 Kolinerjik hipotez.....	11
2.1.8 AH'nin tanı ve tedavi stratejileri.....	12
2.1.9 AH'de kullanılan ilaçlar	14
2.1.10 AH'de DZP etken maddesi ve etkinliği	15
2.2 AHve KBB	16
2.2.1 KBB fizyolojisi	18
2.2.2 KBB geçiş mekanizmaları ve ilaç taşınmasındaki rolü.....	20
2.2.3 <i>In vitro</i> KBB modelleri	21
2.2.4 KBB'yi aşmak için geliştirilen stratejiler.....	25
2.2.5 KBB engelinden geçişi artırmak için kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler	27
2.3 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler	34
2.3.1 Polimerler.....	35
2.3.2 Polimerizasyon.....	38
2.3.2.1 Katılma (zincir büyümesi) polimerizasyonu	38
2.3.2.2 Kondenzasyon (basamaklı) polimerizasyonu	38
2.3.2.3 Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon	39
2.3.3 Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT)	40
2.3.3.1 RAFT polimerizasyon adımları.....	41
2.4 Polimerik Miseller ve Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	45
2.4.1 Polimerik misellerin ilaç taşıma ve salım özellikleri	46
2.4.2 Polimerik misellerin avantajları	47

2.4.3 Polimerik misellerin özellikleri.....	47
2.4.4 Polimerik misellerim oluşumu	48
2.4.5 Polimerik misellerin karakterizasyonu.....	49
3. MATERYAL ve METOD	52
3.1 Malzemeler.....	52
3.2 Kullanılan Cihazlar	52
3.3 Deneysel Kısım	54
3.3.1 DZP yüklü poli(etilen glikol)- <i>b</i> -poli(<i>ter</i> -bütil metakrilat) (PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)) taşıyıcılarının geliştirilmesi	54
3.3.1.1 mPEG Makro-RAFT ajanının sentezi.....	54
3.3.1.2 RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)- <i>blok</i> -poli(<i>ter</i> -bütil metakrilat) (PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)) sentezi	54
3.3.1.3 PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) ile polimerik misel oluşturulması	55
3.3.1.4 Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) belirlenmesi.....	55
3.3.1.5 PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) ile DZP yüklü polimerik misel oluşturulması.....	55
3.3.1.6 İlaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme etkinliğinin (İYE) belirlenmesi	56
3.3.1.7 <i>İn vitro</i> ilaç salım testi.....	56
3.3.1.8 Stabilite çalışması	57
3.3.1.9 Hücre kültürü ve hücre canlılık testi	57
3.3.1.10 Hücresel alım çalışması.....	58
3.3.1.11 Endotel hücrelerin transendotel elektrik direncinin ölçülmesi.....	58
3.3.1.12 <i>İn vitro</i> KBB kültür modeli ve geçirgenlik testi	59
3.3.1.13 İstatistiksel analiz.....	60
3.3.2 DZP yüklü poli(<i>ter</i> -bütil metakrilat)- <i>b</i> -poli(poli(etilen glikol metakrilat)- <i>r</i> -folik asit) (PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)) taşıyıcılarının geliştirilmesi... 60	60
3.3.2.1 Poli(<i>tert</i> -bütil metakrilat) (PtBMA) makro-RAFT ajanının sentezi .	60
3.3.2.2 RAFT polimerizasyonu ile PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) sentezi 60	60
3.3.2.3 Folik asit konjuge polimer (PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)) sentezi.....	61
3.3.2.4 PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ve PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) amfifilik polimerleri ile polimerik misellerin oluşturulması	61
3.3.2.5 KMK'nın belirlenmesi	61
3.3.2.6 PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ve PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) amfifilik polimerleri ile DZP yüklü polimerik misellerin oluşturulması.....	62
3.3.2.8 <i>İn vitro</i> ilaç salım testi.....	62
3.3.2.9 Stabilite çalışması	63
3.3.2.10 Hücre kültürü ve hücre canlılık testi	63
3.3.2.11 Hücresel alım çalışması.....	64
3.3.2.12 Endotel hücrelerin transendotel elektrik direncinin ölçülmesi	65
3.3.2.13 <i>İn vitro</i> KBB kültür modeli ve geçirgenlik testi	65
3.3.2.14 Western blot analizi.....	66
3.3.2.15 İstatistiksel analiz.....	68
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	69
4.1 Poli(etilen glikol)- <i>b</i> -poli(<i>ter</i> -bütil metakrilat) (PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)) ile DZP Yüklü Taşıyıcılarının Geliştirilmesine Dair Bulgular	69
4.1.1 mPEG makro-RAFT ajanının sentezi ve karakterizasyonu	69
4.1.2 PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) amfifilik kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu 71	71

4.1.3 PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) amfifilik kopolimerleri ile oluşturulan misellerin karakterizasyonu	74
4.1.4 PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) amfifilik kopolimerleri ile oluşturulan misellere ilaç yüklenmesi ve karakterizasyonu	75
4.1.5 <i>In vitro</i> ilaç salımının belirlenmesi	78
4.1.6 Polimerik misellerin stabilitelerinin belirlenmesi	80
4.1.7 Hücre canlılığı ve hücre alımı	81
4.1.8 Polimerik misellerin KBB kültür modeli üzerinden geçirgenliğinin belirlenmesi	83
4.2 Folik Asit Konjuge Edilmiş Amfifilik Kopolimerler ile DZP Yüklü Taşıyıcılarının Geliştirilmesine Dair Bulgular	85
4.2.1 Poli(<i>tert</i> -bütil metakrilat) (P <i>t</i> BMA) makro-RAFT ajanının sentezi ve karakterizasyonu	85
4.2.2 P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) amfifilik kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu	89
4.2.3 Folik asit konjuge polimer (P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)) sentezi ve karakterizasyonu	98
4.2.4 P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ve P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) ile polimerik misellerin oluşturulması ve karakterizasyonu	102
4.2.5 P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ve P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) ile DZP yüklü misellerin oluşturulması ve karakterizasyonu	104
4.2.6 (P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)) ve P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ile amfifilik kopolimerleri ile oluşturulan misellerin <i>in vitro</i> ilaç salımının belirlenmesi	107
4.2.8 Hücre canlılığı ve hücre alımı	108
4.2.9 P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ve P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) ile oluşturulan misellerin KBB kültür modeli üzerinden geçirgenliğinin belirlenmesi ve karakterizasyonu	111
5. SONUÇ	117
KAYNAKLAR	120
ÖZGEÇMİŞ	136

KISALTMALAR

¹H NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
AChE	: Asetilkolinesteraz
AChEI	: Asetilkolinesteraz inhibitör
AH	: Alzheimer hastalığı
APP	: Amiloid prekürsör protein
Aβ	: Amiloid beta
ChAT	: Asetiltransferaz
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
DZP	: Donepezil
FA	: Folik asit
FT-IR	: Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
Papp	: Görünür geçirgenlik katsayısı
PDI	: Polidispersite indeksi
RAFT	: Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer
TEER	: Transendotelial elektrik direnci
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
T_g	: Camı geçiş sıcaklığı
T_m	: Erime sıcaklığı
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyonu

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$: Derece santigrat
\AA	: Angstrom
Da	: Dalton
g	: Gram
g/mol	: Gram bölü mol
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mL/dk	: Mililitre bölü dakika
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
M_n	: Sayıca ortalama molekül ağırlığı
M_w	: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
M_w/M_n	: Moleküler Ağırlık Dağılımı
nm	: Nanometre
nmol/L	: Nanomol bölü litre
v/v	: Hacimce yüzde
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
$\Omega \cdot \text{cm}^2$: Ohm santimetrekare

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1	: AH risk faktörleri	8
Tablo 2.2	: AH tedavisinde kullanılan ilaçlar.....	15
Tablo 2.3	: AH’de KBB bileşenlerinin özellikleri.....	17
Tablo 2.4	: Polimerin sınıflandırılması.....	37
Tablo 4.1	: RAFT polimerizasyonu ile elde edilen PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) amfifilik kopolimerlerin sentezlenme koşulları ve sonuçları.....	72
Tablo 4.2	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) polimerleri ile oluşturulan misellerin DLS ile elde edilen partikül boyutları ve PDI değerleri.....	74
Tablo 4.3	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3 polimeri ile farklı miktarda DZP yüklemesi yapılarak oluşturulan polimerik misellerin teorik ilaç yükleme kapasiteleri (%), ilaç yükleme kapasiteleri (%İYK) ve ilaç yükleme etkinlikleri (%İYE).....	76
Tablo 4.4	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3 polimeri ile oluşturulan M3 ve M3/DZP misellerinin DLS ölçüm sonuçları.....	77
Tablo 4.5	: M3 ve M3/DZP misellerinin DLS ölçümleri ile elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.	80
Tablo 4.6	: RAFT polimerizasyonu ile elde edilen P <i>t</i> BMA’nın sentezlenme koşulları ve sonuçları ^a	86
Tablo 4.7	: RAFT polimerizasyonu ile elde edilen P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) polimerlerinin sentezlenme koşulları ve sonuçları. ^a	90
Tablo 4.8	: P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) ve P <i>t</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) polimerleri ile oluşturulan misellerin DLS ve TEM verileri.....	104
Tablo 4.9	: Misellere yüklenen ilaç miktarına göre teorik ilaç yükleme kapasitesi (TİYK), ilaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme etkinliğinin (İYE)	107
Tablo 4.10	: Boş ve İlaç yüklü polimerik misellerin DLS verileri.....	108

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: AH patogenezi ile ilişkili risk faktörleri.....	7
Şekil 2.2	: AH ve patogenezi: AH'nin temel belirteçleri ve nedenleri.....	8
Şekil 2.3	: AH ile ilişkili nöropatolojik özellikler.....	9
Şekil 2.4	: AH'de amiloid ve tau patolojisi. (A) CRND8 APP transgenik bir fare korteksindeki A β plaklarının tiyoflavin S boyaması ile elde edilen görsel. (B) Yaşlı bir insan hipokampusunun CA1 bölgesindeki nörofibriler tau yumaklarının (NFT) AT8 boyamasıyla elde edilen görsel ve (C) Alzheimer hastalığı sırasında amiloid ve tau patolojisinin beyin boyunca yayılımını gösteren görsel.....	11
Şekil 2.5	: Presinaptik ve postsinaptik sinir uçları arasında ACh sentezi ve taşınması.....	12
Şekil 2.6	: AH tanısında teşhis edici görüntüleme örnekleri. A) manyetik rezonans görüntüsü (MRI) ile kortikal atrofi ve ventriküler genişlemeyi göstermektedir. B) Pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması ile, diğer kortikal alanlarda gözlenen paryetal loblarda azalmış glikoz metabolizmasını (mavi-yeşil) ve daha normal metabolizma (sarı) görüntülenmiştir.	13
Şekil 2.7	: DZP'nin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.8	: KBB'deki nörovasküler ünitenin gösterimi	19
Şekil 2.9	: Moleküllerin KBB'den geçiş şeması.....	20
Şekil 2.10	: <i>İn vitro</i> KBB model tiplerinin şematik diyagramları. (a) Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve astrositlerin temas halinde olduğu ko-kültür modeli. (b) Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve astrositlerin temas halinde ko-kültüre edildiği, ancak perisitlerin onlarla temas etmeden plakanın alt kısmına yerleştirildiği model. (c) Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve perisitlerin temas halinde ko-kültüre edildiği, ancak astrositlerin temas olmadan plakanın alt kısmına yayıldığı model. (d) Beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin transwell membranının bir tarafında tek başına kültüre edildiği, astrositler ve perisitlerin ise transwell membranının diğer tarafında karıştırıldığı model. (e) Beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin transwell membranının bir tarafında tek başına kültüre edildiği, astrositler ve perisitlerin transwell membranının diğer tarafında karıştırıldığı model. Nöronal hücreler ise temas olmadan plakanın alt kısmına yerleştirilmiştir	24
Şekil 2.1	: AH'nin tedavisinde kullanılan terapötiklerde uygulanan ilaç hedeflendirme stratejilerine örnekler şeması	27
Şekil 2.12	: KBB'yi aşmak için geliştirilen stratejiler.....	29
Şekil 2.13	: RAFT ajanı yapısı	41
Şekil 2.14	: Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT) mekanizması	42

Şekil 2.15	: Nano boyutlu ilaç taşıyıcıları olarak blok kopolimerler ile oluşturulan polimerik miseller	46
Şekil 4.1	: Makro-RAFT ajanın sentezi.....	69
Şekil 4.2	: Makro-RAFT ajanın ¹ H NMR spektrumu.....	70
Şekil 4.3	: Makro-RAFT ajanının FT-IR spektrumu.....	71
Şekil 4.4	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) polimerinin sentezi.....	71
Şekil 4.5	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA) polimerlerinin GPC kromatogramları.....	72
Şekil 4.6	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3 polimerinin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	73
Şekil 4.7	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3 polimerinin DSC diyagramı.....	74
Şekil 4.8	: PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3 polimerinin sulu çözelti konsantrasyonunun (mg/mL) logaritmasına karşı floresans yoğunluk oranının I ₃ /I ₁ grafiği.....	75
Şekil 4.9	: DZP'nin DMSO içerisinde oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	76
Şekil 4.10	: M3 ve M3/DZP misellerinin partikül boyutu dağılım grafiği.....	78
Şekil 4.11	: Uranil asetat ile boyanmış A) M3 ve B) M3/DZP misellerinin transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri (ölçek çubuğu = 100 nm).....	78
Şekil 4.12	: DZP'nin Tween® 80 (%2 v/v) içeren PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 4.13	: DZP yüklü misellerin 37°C'de Tween 80 (%2 v/v) içeren PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde <i>in vitro</i> salım grafiği.....	80
Şekil 4.14	: İnsan beyin endotel hücrelerinin (hCMEC/D3) A) DZP ve B) M3 ve M3/DZP miselleri ile 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılıkları (Veriler, n = 6-8 için ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. C: Besi yeri ile muamele edilen kontrol grubu. TX: Maksimum hücresel toksisiteyi göstermek için Triton X-100 ile muamele edilen hücreler. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA, ardından t testi yapılmıştır. P < 0.05, kontrol grubuna kıyasla).....	82
Şekil 4.15	: Kültür edilmiş insan beyin endotel hücrelerinde (hCMEC/D3) DZP ve M3/DZP'nin 2 saatlik inkübasyon sonrası hücresel alımı (Değerler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n = 6). İstatistiksel olarak anlamlı fark p < 0.05, tek yönlü ANOVA).....	83
Şekil 4.16	: hCMEC/D3 hücrelerinin trans-endotelyal elektrik direncinin (TEER) ölçüm grafiği.....	84
Şekil 4.17	: DZP (0.06 mg/mL, misellere yüklenen miktarla aynı) ve M3/DZP'nin (1 mg/mL) 2 saat inkübasyon sonrasında hCMEC/D3 hücreleri ile oluşturulan KBB kültür modelinden geçirgenliği (2 saat). Değerler, ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n = 4-6). DZP ile muamele edilen ve DZP yüklü M3 miselleri ile muamele edilen hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p > 0.05, tek yönlü ANOVA). Ancak, muamele edilen örnekler ile muamele edilmeyen hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p < 0.05, tek yönlü ANOVA).	85
Şekil 4.18	: P <i>t</i> BMA sentezi.....	86
Şekil 4.19	: P <i>t</i> BMA-1 polimerinin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	86
Şekil 4.20	: P <i>t</i> BMA-1 polimerinin GPC kromatogramı.....	87
Şekil 4.21	: P <i>t</i> BMA-1'in DSC diyagramı.....	87

Şekil 4.22	: <i>Pt</i> BMA-2 polimerinin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	88
Şekil 4.23	: <i>Pt</i> BMA-2 polimerinin GPC kromatogramı.	88
Şekil 4.24	: <i>Pt</i> BMA-2'nin DSC diyagramı.	89
Şekil 4.25	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA) sentezi.	90
Şekil 4.26	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-1 polimerinin GPC kromatogramı.	91
Şekil 4.27	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-1 polimerinin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	92
Şekil 4.28	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-1 polimerinin DSC diyagramı.	93
Şekil 4.29	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-2 polimerinin GPC kromatogramı.	93
Şekil 4.30	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-2 polimerinin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	94
Şekil 4.31	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-2 polimerinin DSC diyagramı.	95
Şekil 4.32	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3 polimerinin GPC kromatogramı.	95
Şekil 4.33	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3 polimerinin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	97
Şekil 4.34	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3 polimerinin DSC diyagramı.	97
Şekil 4.35	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA) sentezi.	98
Şekil 4.36	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-1 polimerinin DMSO içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	99
Şekil 4.37	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-2 polimerinin DMSO içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	100
Şekil 4.38	: a) <i>Pt</i> BMA-1, b) <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3, c) <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-1 ve d) folik asidin FT-IR spektrumları. .	101
Şekil 4.39	: a) <i>Pt</i> BMA-1 b) <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-1, c) <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3 polimerlerinin DSC diyagramları.	102
Şekil 4.40	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3 polimerinin KMK'sına ait logaritmik grafik.	103
Şekil 4.41	: <i>Pt</i> BMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-1 polimerinin KMK'sına ait logaritmik grafik.	103
Şekil 4.42	: A) M1 (ölçek çubuğu = 100 nm), B) M1/DZP (ölçek çubuğu = 100 nm) ve C) M1/DZP'nin (ölçek çubuğu = 50 nm) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.	105
Şekil 4.43	: A) M2 (ölçek çubuğu = 100 nm), B) M2/DZP (ölçek çubuğu = 100 nm) ve C) M2/DZP'nin (ölçek çubuğu = 50 nm) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.	106
Şekil 4.44	: A) M1/DZP ve B) M2/DZP misellerinin 37°C'de Tween 80 (%2 v/v) içeren PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde <i>in vitro</i> salım grafikleri.	108
Şekil 4.45	: A) hCMEC/D3 hücreleri ve B) PS70 hücrelerinin farklı konsantrasyonlardaki DZP varlığında hücre canlılığı (C: Kültür ortamı ile muamele edilmiş kontrol grubu; TX: Maksimum hücresel toksisiteyi gösteren Triton X-100 ile muamele edilmiş hücreler)	109
Şekil 4.46	: A) hCMEC/D3 hücreleri ve B) PS70 hücrelerinin boş ve DZP yüklü misellerin farklı konsantrasyonları varlığındaki hücre canlılığı grafikleri (Veriler, n = 6-8 için ortalama ± SEM olarak sunulmaktadır. C: Kültür ortamı ile muamele edilen kontrol grubu. TX: Triton X-100 ile muamele edilmiş hücreler, maksimum hücresel toksisiteyi temsil etmektedir. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA testi, ardından t testi uygulanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir).	110

- Şekil 4.47** : Kültüre edilmiş insan beyin endotel hücrelerinde (hCMEC/D3), 2 saat, 6 saat ve 8 saatlik inkübasyon sonrası M2/DZP'nin hücre alımı. Kontrol olarak, misellere konjüge edilen miktarla aynı miktarda folik asit kullanılmıştır. Sunulan değerler, kontrol yüzdesi olarak ifade edilen ortalama \pm SEM (standart hata) şeklindedir (n = 4-6). İstatistiksel olarak anlamlı fark (p < 0.05, tek yönlü ANOVA). 110
- Şekil 4.48** : Kültürlenmiş insan beyin endotel hücrelerinde (hCMEC/D3) 2 saatlik inkübasyondan sonra DZP, DZPyüklü FA-fonksiyonelleştirilmiş polimer (M2/DZP) ve DZP yüklü fonksiyonsuz polimer misel (M1/DZP) misel hücrelerinin hücre alımı. DZP kontrol olarak kullanıldı. Sunulan değerler ortalama \pm SEM'dir; ortalamanın standart hatasıdır ve kontrolün yüzdesi olarak verilmiştir. n = 4-6. *İstatistiksel olarak anlamlı fark (p < 0.05, tek yönlü ANOVA) 111
- Şekil 4.49** : Endote hücrelerin Transendotelial Elektriksel Direncinin Ölçümü hCMEC/D3 hücreleri, cellZscope® cihazında hücre kültürü insertlerinde yetiştirilmiştir. Hücreler konfluansa ulaştığında, DZP yüklü ve boş misellerden eşit miktarlar (yaklaşık 3.3 mg misel/cm²) lüminal tarafa eklenmiş ve TEER ölçümleri gerçekleştirilmiştir..... 112
- Şekil 4.50** : Polimerik misellerin *in vitro* KBB ortak kültür modeli üzerindeki geçirgenliği (2 saat). A) PS70 hücreleri, ablüminal bölmede, lüminal bölmede bulunan konfluansa ulaşmış hCMEC/D3 hücreleri ile birlikte ortak kültür olarak yetiştirilmiştir. B) İnsan beyin endotelial hücreleri (hCMEC/D3) üzerine, inkübasyonun 2. saatinde uygulanan DZP (misellere yüklenen miktarla aynı), M2 ve M2/DZP (1 mg/mL konsantrasyon) geçirgenliği. C) İnsan beyin endotelial hücrelerine (hCMEC/D3) uygulanan, folik asit (FA, misellere yüklenen miktarla aynı, 0.07 mg/mL konsantrasyon), M2 ve M2/DZP (1 mg/mL konsantrasyon) geçirgenliği (Sunulan değerler, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir n = 4-6). 114
- Şekil 4.51** : PS70 hücrelerinde DZP yüklü misellerin transimiyon çalışması sonucunda hücre alımına dair elde edilen sonuçlar. 115
- Şekil 4.52** : İmmünoblot verileri. K (uygulama yapılamayan hücre), S (standart, APP), YT (yabanil tip, APP-), DZP, M2/DZP, M2. 116

ALZHEİMER HASTALIĞI İÇİN POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH), uzun ve ilerleyici bir seyir gösteren, tedavi edilemeyen bilişsel ve davranışsal bozukluğa neden olan bir hastalıktır. AH patolojisinde bazı proteinlerin birikimi, enflamasyon değişiklikleri, sinaptik temasın kaybı, nöronal hücre ölümü ve sinaps kayıpları ile sonuçlanan oksidatif stres nedenleri yer almaktadır. AH'nin tedavisine yönelik mevcut farmakolojik yaklaşımlar, vasküler koruma ile kolinesteraz inhibitörleri ve *N*-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistleri kullanılarak yapılan semptomatik tedaviye dayanmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri arasında donepezil (DZP), rivastigmin, galantamin ve takrin gibi ilaçlar yer almakta olup NMDA antagonisti olarak memantin kullanılmaktadır. AH, terapötiklerin kan-beyin bariyerini (KBB) geçme zorluğu nedeniyle sınırlı tedavi seçeneklerine sahiptir. Tedavi başarısızlığı sıklıkla ilaçların olumsuz farmakokinetik ve farmakodinamiği nedeniyle ortaya çıkar. Bu nedenle ilaçların nano-platformlarda taşınması önem taşımaktadır. Bu sistemler ilaçların biyoyararlanımını, farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini iyileştirmeyi ve yan etkilerini azaltmayı sağlayabilmektedir. Küçük boyutlara sahip olabilmeleri ve ilaçların hastalık bölgelerinde kontrollü salımını sağlayabilmeleri nedeniyle polimerik nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak geliştirilmesi umut vericidir.

Bu tez kapsamında, AH tedavisinde en çok tercih edilen asetilkolinesteraz inhibitörü ilaç olan DZP'in KBB'den geçişini sağlamak için ilaç taşıyıcı platformlar olarak polimerik miseller geliştirilmiştir. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerden ilk olarak tersinir ekleme-parçalanma zincir transferi (RAFT) polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)-*b*-poli(*tert*-bütil metakrilat) (PEG-*b*-P_tBMA) amfifilik blok kopolimerler sentezlenmiştir. Bir diğer taşıyıcı sistem olarak ise RAFT polimerizasyonu ile folik asit (FA)-konjugasyonlu amfifilik kopolimerler sentezlenmiştir. Elde edilen tüm polimerler, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹H NMR) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) teknikleri ile karakterize edilmiştir. Boş ve DZP yüklü polimerik miseller diyaliz yöntemiyle hazırlanmış ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizleri kullanılarak boyut, zeta potansiyeli ve stabilite açısından kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Polimerik misellerin ilaç yükleme verimliliği ve salım davranışı UV/Vis mikropilaka okuyucu ile izlenmiştir. Misellerin sitotoksitesi, hücresel alımları kolorimetrik testler ve empedans ölçümleriyle incelenmiştir. Ayrıca, nanotaşıyıcıların *in vitro* KBB kültür modeli üzerindeki geçirgenliği gözlemlenmiştir. İlaç yüklü polimer miseller, DZP ile benzer bir geçirgenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu tez çalışması, polimerik misellerin bir ilaç taşıma sistemi olarak AH gibi nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde kullanılabilme potansiyelini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, polimerik miseller, donepezil, kan-beyin bariyeri.

DEVELOPMENT OF POLYMERIC DRUG CARRIER PLATFORMS FOR ALZHEIMER'S DISEASE

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and long-term disorder characterized by cognitive and behavioral impairments for which no definitive cure currently exists. The pathology of AD involves the accumulation of certain proteins, changes in inflammation, oxidative stress leading to neuronal cell death, synaptic contact loss, and overall synaptic degeneration. Current pharmacological approaches to AD treatment are symptomatic and include vascular protection, cholinesterase inhibitors, and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. Among cholinesterase inhibitors are drugs such as donepezil, rivastigmine, galantamine, and tacrine, while memantine is the commonly used NMDA antagonist. Due to the difficulty of therapeutic agents crossing the blood-brain barrier (BBB), treatment options for AD remain limited. Treatment failure is often associated with the unfavorable pharmacokinetics and pharmacodynamics of these drugs. Therefore, the use of nano-platforms for drug delivery has gained importance. These systems can improve drug bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics, while also reducing adverse effects. Owing to their small size and ability to provide controlled release of drugs at disease sites, polymeric nanoparticles are considered promising candidates for drug delivery systems.

In this thesis, polymeric micelles were developed as drug delivery platforms to enhance the BBB permeability of donepezil (DZP), the most commonly used acetylcholinesterase inhibitor in AD treatment. The first type of these drug delivery systems involved the synthesis of amphiphilic block copolymers, poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*tert*-butyl methacrylate) (PEG-*b*-PtBMA), via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. As a second carrier system, folic acid (FA)-conjugated amphiphilic copolymers were synthesized using RAFT polymerization. All synthesized polymers were characterized by gel permeation chromatography (GPC), proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR), and differential scanning calorimetry (DSC). Blank and donepezil loaded polymeric micelles were prepared using the dialysis method and were extensively characterized in terms of size, zeta potential, and stability using dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). Drug loading efficiency and release behavior of the micelles were monitored using a UV/Vis microplate reader. The cytotoxicity and cellular uptake of the micelles were investigated using colorimetric assays and impedance measurements. Furthermore, the permeability of the nanocarriers was evaluated using an *in vitro* BBB culture model. The DZP loaded polymeric micelles were found to exhibit permeability comparable to that of free DZP. This thesis investigates the potential of polymeric micelles as a targeted drug delivery system for the treatment of neurodegenerative disorders, particularly Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, polymer micelles, donepezil, blood-brain barrier

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biri olup, ilerleyici bir seyir gösteren bilişsel ve davranışsal bozukluklarla karakterize bir demans türüdür [1]. AH, yaşlı bireylerde demansa yol açan en yaygın nörodejeneratif hastalıktır [2]. Alzheimer Raporuna göre (2022), dünya genelinde 55 milyonun üzerinde insanın AH veya ilgili durumlar yaşadığını ve bu sayının 2030'da 82 milyona, 2050'de ise 138 milyona kadar ulaşacağı beklenmektedir [3]. 2050 itibarıyla AH'nın küresel prevalansının 106,8 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [4]. AH, hafıza, düşünme ve davranış üzerinde ciddi zorluklar yaratan bir demans türüdür. Çoğunlukla yaşlanan nüfusu hedef alarak beyin hücrelerini bozmakta ve bu karmaşık çok faktörlü sonuçları nedeniyle tedavi edilemez bir durumda kalmaktadır [5]. AH'ye yol açan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır. Artan yaş, genetik faktörler, kafa travmaları, vasküler hastalıklar, enfeksiyonlar, çevresel faktörler (ağır metaller ve benzeri) ile vitamin ve mineral eksiklikleri bu risk faktörleri arasındadır [6]. Düşük folat seviyeleri, AH'de depresyonun birincil nedenlerinden biri olabildiği düşünülmektedir [7]. Folik asit (FA; vitamin B9), nükleotid bazlarının sentezi için gerekli olan öncü bir moleküldür. Folik asit reseptörlerine (FR) yüksek afinite göstermektedir [8]. Alzheimer hastalığında folat düzeyleri ile ilişkiler kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Alzheimer hastalarının, sağlıklı bireylere kıyasla daha düşük folat seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, folat eksikliği (<13.5 nmol/L) AH riskini artırırken günlük yeterli folat alımı (≥ 400 $\mu\text{g/gün}$) ise AH gelişme riskini azaltmaktadır [2]. Alzheimer tedavisinde ise kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri gibi az sayıda ilaç adayının hedefe yönelik iletimi, kan-beyin bariyeri (KBB)'nin yarattığı sınırlamalar nedeniyle zayıf çözünürlük, düşük biyoyararlanım ve yetersiz etkinlik gibi sorunlar sergiler. Ancak, nanoteknolojideki mevcut ilerlemeler, aktif ilaç adaylarının iletiminde bu tür kısıtlamaların üstesinden gelme fırsatları sunmaktadır [9]. AH'nin diğer nedenleri

arasında beyinde asetilkolinesteraz (AChE) seviyesindeki artış ve buna bağlı olarak asetilkolin miktarındaki azalma yer alır. Ayrıca, beyin hücrelerinde inflamasyon ve belli bölgelerdeki sinaps kaybı ile nöronların apoptozise (programlanmış hücre ölümü) bağlı kaybı da hastalığın temel nedenlerindedir [10]. AH'nın mevcut farmakolojik tedavi yaklaşımları; kolinesteraz inhibitörleri ve *N*-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistleri ile semptomatik tedaviye dayanmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri arasında, AChE etkisini bloke ederek postsinaptik uyarım için yeterli miktarda asetilkolin düzeyi sağlayan donepezil (DZP), rivastigmin, galantamin ve takrin gibi ilaçlar bulunur [11]. DZP, Alzheimer hastalarının tedavisinde en çok tercih edilen ilaç olup, hafif ila orta düzeyde bilişsel bozukluğu olan hastalarda en olumlu tedavi yanıtını sağlayan geri dönüşümlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür (AChEI) [12]. DZP, asetilkolinesteraz enzimine bağlanarak aktivitesini azaltır, böylece beyindeki asetilkolin içeriğini artırır, sinir sinyali iletim verimliliğini artırır ve hastaların bilişsel yeteneklerini geliştirir. Ancak, DZP'in konvansiyonel uygulanması, periferik kolinerjik etkilere bağlı yan etkilere neden olur. En sık bildirilen yan etkiler arasında bulantı, kusma ve ishal yer almakta olup, genellikle tedavinin bırakılmasına yol açmaktadır. Bu durumun başlıca nedeni KBB'nin varlığıdır [1]. Merkezi sinir sistemi (MSS) tedavisinde kullanılan tüm ilaçların, beyinde ve MSS'de gerekli terapötik etkisini sağlayabilmesi için KBB'yi geçebilmesi gereklidir. KBB, beyin mikrodamarlarını ve kılcal damarlarını kaplayan beyin endotelial hücrelerinden oluşur ve hücreler arasında boşluk bırakmayan sıkı bağlantılar içerir. Bu nedenle, ilaçların yalnızca sınırlı bir kısmı MSS'ye ulaşabilir ve bu durum karmaşık hastalıkların tedavisinde yetersiz kalınmasına sebebiyet verir [1]. KBB'ni geçme ve biyoyararlanımı artırma çalışmaları, terapötik sonuçları iyileştirmek için umut vaat etmektedir. Ayrıca, nanoteknolojinin tıbbi uygulamaları, KBB'yi aşarak etkin ilaç taşıma için umut verici fırsatlar sunmaktadır [13]. Nanoteknoloji ile geliştirilen nanoyapılardan olan polimerik miseller, amfifilik blok kopolimerlerden oluşan, kendiliğinden bir araya gelen ve hidrofobik çekirdek ile hidrofilik yüzey yapılarıyla stabil küresel nanotaşıyıcılardır [14]. Bu misellerin hidrofobik çekirdeği, hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için uygun bir yapı sağlarken, hidrofilik kabuk, koloidal stabilite ve "görünmezlik" özellikleri kazandırır [15]. Polimerik miseller, nano boyutları (10-100 nm), membran akışkanlığını artırma yetenekleri ve pegilasyon yoluyla sağlanan sterik stabilizasyon özellikleri nedeniyle KBB'yi aşarak beyin parankimine ulaşma kapasiteleri ile beyin hedefli ilaç taşımada yaygın olarak

araştırılmaktadır [16-18]. AH'de en yaygın kullanıma sahip olan DZP ilaç molekülünün taşınması için çeşitli nanotaşıyıcı sistemler geliştirilmiş olup bunlar arasında nanoemülsiyonlar [19], katı lipid nanopartikülleri (SLN'ler) [20], poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) mikroküreler [21], lipozomlar [22], nanoyapılı lipid taşıyıcılar (NLC'ler) [23], kitosan nanopartikülleri [24] ve PLGA-*b*-PEG nanopartiküller [25] yer almaktadır.

Bu doktora tezi kapsamında, DZP'nin polimerik misellerle taşınmasını sağlamak için literatürde yer alan taşıyıcılara kıyasla daha etkili bir ilaç taşıma yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. PEG tabanlı bir makromoleküler zincir transfer ajanı (makroRAFT) hazırlanmış ve bu ajan, RAFT polimerizasyonu yöntemiyle poli(etilen glikol)-*b*-poli(*tert*-bütil metakrilat) amfifilik blok kopolimerlerinin sentezinde kullanılmıştır. mPEG makroRAFT ajanı ve amfifilik kopolimerler, spektroskopik ve kromatografik ölçümlerle karakterize edilmiştir. DZP, polimer misellere enkapsüle edilerek PBS ortamında ilaç salım davranışı incelenmiştir. DZP yüklü misellerin hücresel alımı incelenmiş ve insan endotelial hücre hattı (hCMEC/D3) üzerinde *in vitro* sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, endotelial hücrelerin transendotel elektrik direnci (TEER) ve misellerin *in vitro* KBB kültür modeli üzerindeki geçirgenliği detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca bir diğer polimerik misel ilaç taşıyıcı sistem olarak, folik asit (FA) konjugasyonu ile çok işlevli bir ilaç taşıyıcı sistem olabilme potansiyeli sağlanarak, Donepezil yüklü FA-konjuge edilmiş polimerik miseller geliştirilmiştir. Amfifilik kopolimerler RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve çeşitli tekniklerle karakterize edilmiştir. Model bir ilaç olarak DZP, FA-konjuge edilmiş polimerik misellere enkapsüle edilmiş ve FA-konjugasyonlu misellerden DZP salımı *in vitro* salım çalışmaları ile yapılmıştır. DZP yüklü misellerin hücresel alımı incelenmiş, insan beyin endotelial hücrelerinde (hCMEC/D3) ve Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde (CHO) sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, endotelial hücrelerin transendotel elektrik direnci ve misellerin KBB ko-kültür modeli üzerindeki geçirgenliği detaylı bir şekilde araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1 AH

2.1.1 AH'nin tanımı ve tarihçesi

AH'nin tarihçesi, 1901 yılında psikiyatr ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer'ın Frankfurt Akıl Hastanesi'nde kısa süreli hafıza kaybını da göz önüne alarak olağandışı davranışsal semptomlar sergileyen 51 yaşındaki bir hastayı gözlemlemesiyle başlamıştır [26]. AH olarak bilinen demans durumunu ilk kez Dr. Alois Alzheimer'ın 1906 yılında verdiği bir konferans sunumunda ve 1907'de yayımladığı bir makalede tanımlamıştır [27]. Takip edilen hastada ilerleyici hafıza ve dil bozukluğu, çeşitli davranışsal semptomlar (halüsinasyonlar, sanrılar, paranoya) ve psikososyal işlev bozukluğu izlenmiştir [27]. Erken başlangıç yaşı ve yeni bir patolojik bulguların keşfi bu durumu bilinenlerden farklı kılmıştır ve AH'nin keşfini sağlamıştır. AH, o zaman olduğu gibi bugün de karakteristik patolojisi ile nörolojik bozulma süreci ile ilerleyici bir hastalık olarak kabul görmektedir [28]. Günümüzde AH, demansın en yaygın (%65-75) formu olarak beynin dejeneratif bir hastalığı olmaktadır. AH, beynin işleyişini bilişsel ve işlevsel kayıplara neden olarak bozan bir hastalıktır [26]. Bu işlevsel kayıplara bağlı olarak sosyal ve mesleki işlevleri etkileyen, hafızanın ilerleyici kaybıyla ilişkili olarak diğer bilişsel alan bozukluklarının eşlik ettiği, çok çeşitli risk faktörlerine bağlı nörodejeneratif hastalıktır [29].

2.1.2 AH'nin prevalansı

AH genellikle yaşam sürecinin ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan ancak zaman zaman genç bireylerde de görülebilen progresif ve nörodejeneratif olan nörolojik bir hastalıktır. AH'nin prevalansı, 60 yaşından sonra her 5 yılda bir iki katına çıkmaktadır [30]. 65 yaş ve üzerindeki bireylerin yaklaşık olarak %10'unda demans

görülebilmektedir ve bu bireylerde %70'inde AH izlenmektedir. 85 yaş ve üzerindeki bireylerde ise AH oranlarının %50'ye kadar çıkabileceği bildirilmektedir [31]. Her yıl 4,6 milyon yeni demans vakası saptanmakta ve bu durumdan etkilenen vaka sayıları her 20 yılda bir neredeyse iki katına çıkarak 2040 yılına kadar 81,1 milyona kadar ulaşabilmektedir [32]. Dünya genelinde yaklaşık olarak 50 milyon kişi demansla yaşamaktadır ve bu kişilerin yaklaşık olarak da üçte ikisi gibi büyük bir oranda AH teşhis edilmektedir [33]. AH, dünya genelinde yaşanan nüfusla birlikte giderek artan ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır [31]. AH, demans türleri ile birlikte artan prevalansına ilişkin veriler ve özellikle tüm dünya genelinde yaşanan nüfus artışı göz önüne alındığında, birçok açıdan büyük önem taşımaktadır [34].

2.1.3 AH'nin klinik belirtileri

AH, ilerleyici hafıza kaybı ile karakterize edilen, sürekli kötüleşen nörodejeneratif ve kronik bir hastalıktır. Hastalık süresi tipik olarak 8-10 yıl arasında değişir, ancak bu süre 2 ila 25 yıl arasında da olabilir [35]. AH pek çok farklı belirti gösterebilir [36]. AH klinik olarak demans, hafıza kaybı veya gerilemesi, yürütücü işlevlerin bozukluğu ve diğer bilişsel yeteneklerdeki azalma ile kişilik değişiklikleri gibi davranışsal anormalliklerle karakterize olabilen bir sendrom olarak tanımlanabilir. AH'nin klasik semptomlarını bir başlık altında toplamak gerekirse, 5A olarak tanımlanabilir [26]:

- Anomi (isimlendirme güçlüğü)
- Apraksi (motor hareketlerin bilinçli bir şekilde yapılamaması)
- Agnosi (nesneleri tanıma bozukluğu)
- Afazi (dil bozukluğu)
- Amnezi (hafıza kaybı)

2.1.4 AH'nin evreleri

AH'nin klinik evreleri dört evre ile şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. Pre-klinik veya asemptomatik evre: Bu evre yıllarca sürebilir. Hafif hafıza kaybı ve korteks ile hipokampustaki erken patolojik değişiklikler ile karakterizedir. Günlük yaşam aktivitelerinde bozulmalar veya AH'ye dair klinik belirtiler bu evrede görülmez [6].

2. Hafif veya erken evre: Günlük yaşamda bazı zorluklar, konsantrasyon ve hafıza kaybı, yer ve zaman oryantasyonunda bozuklukların görülmesi, ruh hali değişiklikleri ve depresyon gibi belirtilerin başladığı evredir [6].

3. Orta evre: Hastalık serebral korteksin geniş alanlarına yayıldığı ve artan belirgin hafıza kaybı ile örneğin aile bireylerini tanıyamama, dürtü kontrol kaybı, okuma, yazma ve konuşmada zorlukların görüldüğü evredir [6].

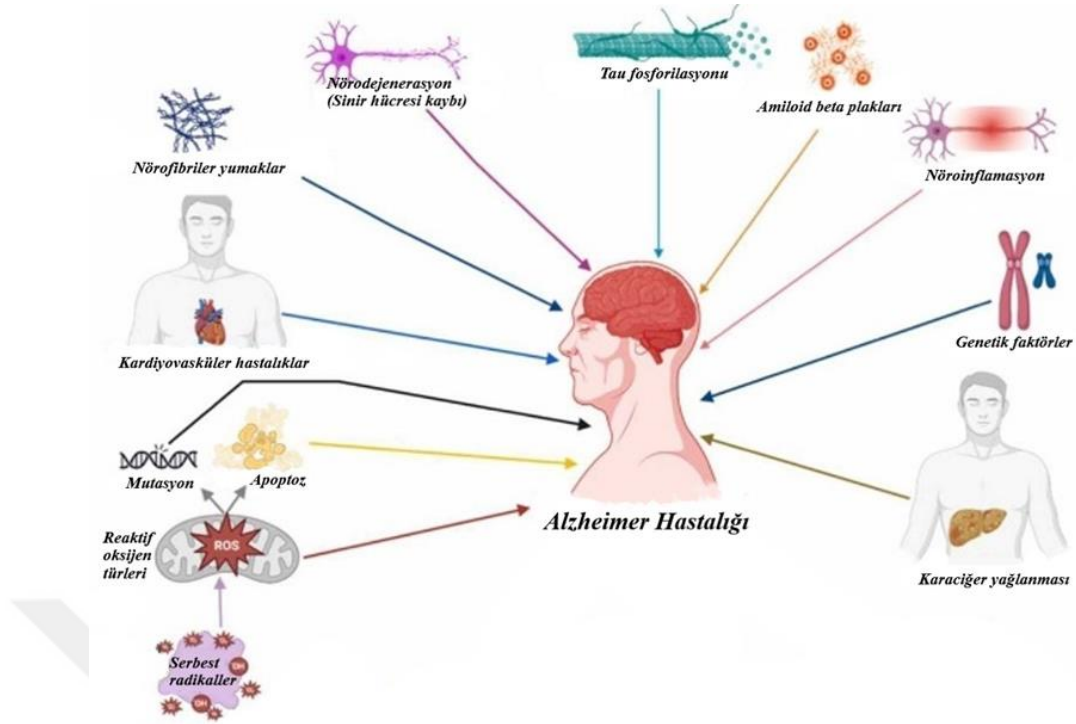
4. Şiddetli veya geç evre: Hastalığın tüm serebral korteks bölgesine yayıldığı; nöral plaklar ve nörofibriler yumakların yoğun birikimi ile fonksiyonel ve bilişsel yetersizliklerin fazlaca ilerlediği, hastaların ailelerini tamamen tanıyamaz hale gelebileceği, yatalak kalabileceği gibi ileri sorun ve zorlukların yaşandığı evredir [6].

2.1.5 AH'nin nedenleri ve risk faktörleri

AH'deki patolojik değişikliklerin (A β , NFT'ler ve sinaptik kayıp) altında yatan sebepler halen kesin olarak bilinmemektedir. AH yaşlanma, genetik faktörler, kafa travmaları, vasküler hastalıklar, enfeksiyonlar, çevresel faktörler (ağır metaller, eser metaller ve diğerleri) ve bazı vitamin, minerallerin eksikliği gibi çok çeşitli risk faktörleriyle ilişkili olabilen çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilmektedir [6] (Şekil 2.1). Örneğin folik asit takviyesinin bazı biyosentezi olan yapılar ile ilişkili olumsuz sonuçları önleyebileceği ve dolayısıyla AH gelişme riskini azaltabileceği öne sürülmektedir [31, 37]. AH'ye neden olabilecek başlıca risk faktörlerini ve bunların hastalık patogenezi olan etkileri aşağıdaki Tablo 2.1'de özetlenmiştir [6].

2.1.6 AH'de epigenetik

AH, nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte muhtemel birden fazla genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerin bir sonucudur. Epigenetik mekanizmalar da AH patogeneziinde etkilidir fakat AH'de gözlemlenen epigenetik değişikliklerin hastalığın bir nedeni mi yoksa hastalığın bir sonucu mu olduğunu konusu netlik kazanmamıştır [38]. Yaşlanma geç başlangıçlı AH için genetik olmayan en önemli risk faktörüdür. [38]. Erken başlangıçlı AH için ise genetik bağlantılı mutasyonlar, genellikle transmembran bölgelerinde yer almakta olup, vakalarının %70'inde ve tüm AH vakalarının %10'unda hastalığın sebebi olarak görülmektedir [39].

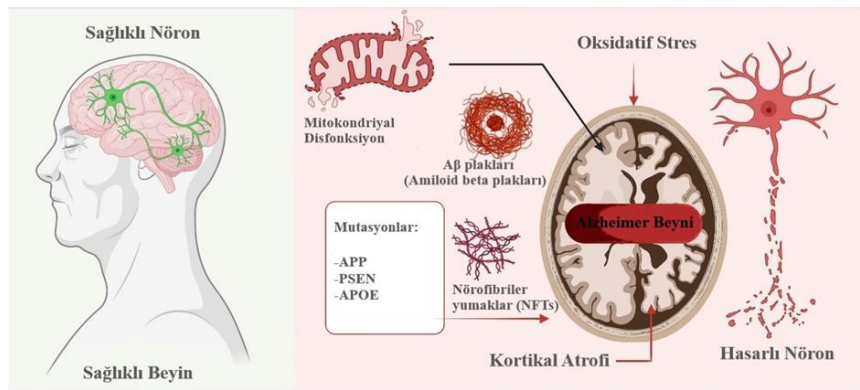


Şekil 2.1 : AH patogenezi ile ilişkili risk faktörleri [40].

Hastalığın tanısındaki genetiğin rolünü belirlemek amacıyla klinik genetik testler, AH semptomlarına sahip bireyler veya erken başlangıçlı bir hastanın bilinen bir mutasyona sahip çocukları ya da kardeşleri için mevcuttur [41]. Otozomal dominant bir AH formunun mevcut olduğu biliniyorsa (amiloid öncü proteini (*APP*), presenilin 1 (*PS1*), presenilin 2 (*PS2*)'de ve ApoE ϵ 4 genetik faktörleri gibi), o zaman hafif bilişsel bozukluk gelişimi büyük olasılıkla AH demansının prodromudur [42] (Tablo 2.1). AH risk faktörleri ve *APP*, *PSEN* ve ApoE gibi bazı genlerdeki mutasyonların A β katabolizması ve anabolizmasını etkilediği ve hızla A β birikimine neden olarak nörodegenerasyonun hızlı bir şekilde ilerlemesine yol açtığı saptanmıştır [6] (Şekil 2.2). Yapılan araştırmalar, geç başlangıçlı AH'nin, birden fazla yatkınlık genini içerebilecek karmaşık bir bozukluk olduğunu destekler niteliktedir [35]. AH'nin patogenezinin tam aydınlatılmamış olması, hem hastalığın altında yatan nedenlerin anlaşılmasını hem de etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır [26].

Tablo 2.1 : AH risk faktörleri [6].

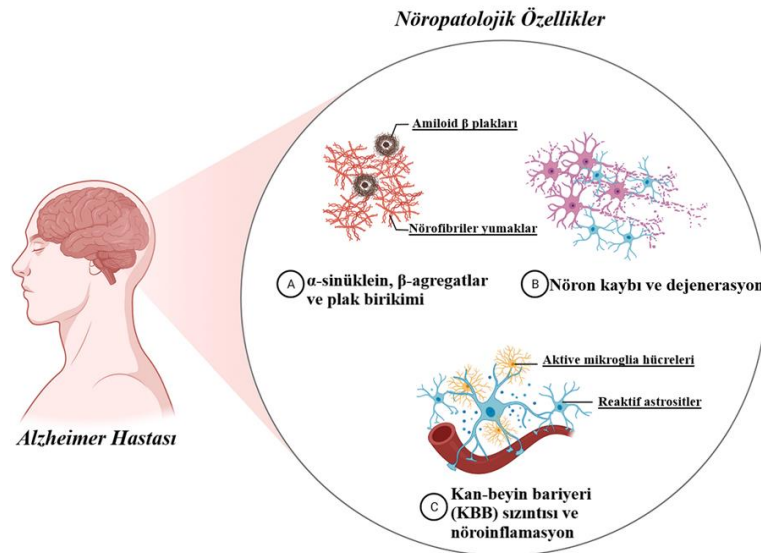
Risk Faktörü	Risk Faktörleri ve Olası Etkileri
Yaşlanma	<ul style="list-style-type: none">- En önemli risk faktörüdür ve 65 yaşından sonra risk artmaktadır.- Beyinde kortikal atrofi, nöral sinaps kaybı, ventrikül genişlemesi gibi değişikliklerle ilişkili olabilmektedir.
Genetik Faktörler	<ul style="list-style-type: none">- AH vakalarının %70'i genetik faktörlerle ilişkilidir.- Erken başlangıçlı AH için APP, PSEN1, PSEN2 mutasyonları ve geç başlangıçlı AH için ApoEε4 güçlü bir risk faktörüdür.
Çevresel Faktörler	<p>Ağır metallere maruziyet sinir sisteminde toksik etkiye neden olabilir (Alüminyum, kurşun birikimi gibi) veya hava kirliliği gibi bazı çevresel koşullar Aβ birikimini artırabilir.</p>
Enfeksiyonlar	<ul style="list-style-type: none">- <i>Treponema pallidum</i>, <i>Chlamydia pneumoniae</i> gibi bazı bakterilere bağlı gelişen enfeksiyonlar veya HSV-1 gibi bazı virüs kaynaklı enfeksiyonlar, Aβ birikimini artırabilir, inflamasyon buna bağlı nöronal hasar oluşturabilir ve AH riskini artırabilir.
Tıbbi Faktörler	<ul style="list-style-type: none">- Kraciğer yağlanması veya bazı kardiyovasküler hastalıklar; felç, hipertansiyon, atriyal fibrilasyon, hipoksi gelişimi gibi AH riskini artırabilir.- Obezite ve diyabet gelişimi veya glikoz intoleransı, kronik hiperglisemi gibi hastalıklar nöroinflamasyon ve oksidatif strese neden olmasıyla AH riskini artırmaktadır.



Şekil 2.2 : AH ve patogenezi: AH'nin temel belirteçleri ve nedenleri [43].

2.1.7 AH'nin patofizyolojisi ve hipotezleri

AH, demans hastalıkları arasında en yaygın olan yıkıcı etkideki bir nörodejeneratif hastalıktır. AH'nin nöropatolojik özellikleri arasında ekstraselüler amiloid beta ($A\beta$) öncülü olan amyloid öncü proteinin (APP) birikintileri, intraselüler nörofibriler yumaklar (NFT), patolojik hiperfosforile Tau (p-Tau) birikiminin neden olduğu distrofik nöritler ve amiloid anjiyopati bulunur [44]. AH'deki patolojik değişikliklerin ($A\beta$, NFT, nöronal ve sinaptik kayıp) altında yatan nedenler kesin olarak aydınlatılamamıştır. AH'nin patofizyolojisine ilişkin temel olarak iki ana başlık üzerinde durulmaktadır [6]: Kolinerjik işlevdeki bozulmalar ve NFT, $A\beta$ işlevindeki değişiklikler. Kolinerjik işlevdeki bozulmaların AH için kritik bir önem taşıyan faktör olduğu düşünülmektedir. Ayrıca NFT, $A\beta$ üretimi ve işlenmesindeki değişikliklerin hastalığın başlangıcındaki ana nedenler olduğu ileri sürülmektedir. AH'nin gelişimini açıklamaya yönelik çeşitli hipotezler mevcuttur. En yaygın kabul gören hipotezler: Amiloid Kaskadı Hipotezi, Tau Hiperfosforilasyon Hipotezi ve Kolinerjik Hipotezdir [26]. Bunlara ek olarak diğer önerilen hipotezler arasında inflamatuvar, oksidatif stres, vasküler, hücre sinyal kaynaklı, insülin sinyal kaynaklı ve metallobiyolojik hipotezleri bulunmaktadır [26].



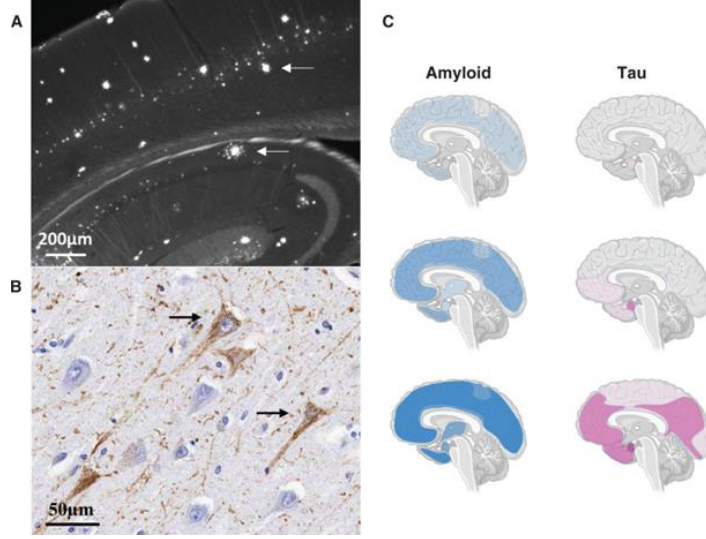
Şekil 2.3 : AH ile ilişkili nöropatolojik özellikler [45, 46].

2.1.7.1 Amiloid kaskadı hipotezi

MSS'deki anormal amiloid beta ($A\beta$) plaklarının birikiminin demans ile güçlü bir bağlantıya sahip olduğu kabul edilmiştir. Bu durum, amiloid hipotezinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu hipotez ile amiloid APP'den türeyen $A\beta$ 'nin yaşlanma veya patolojik durumlar nedeniyle yıkımının azalmasına dolayısıyla $A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$ peptidlerinin birikimine sebebiyet verdiği öne sürülmektedir [6]. Normalde toksik olmayan bu protein yapıları, Alzheimer'da çözülemez plaklara dönüşerek birikimleriyle nöronal hasara neden olur [36] (Şekil 2.4). $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranının artışı, $A\beta$ amiloid fibril oluşumunu uyararak nörotoksositeye ve tau patolojisinde gelişimine neden olarak sinaptik yetmezlik ve bilişsel disfonksiyon oluşturabilir ve sonuçta nöronal hücre ölümü ile nörodejenerasyonu tetiklemektedir [6, 44].

2.1.7.2 Tau hiperfosforilasyon hipotezi

Tau, hücre iskeletinde mikrotübül dinamiğinde önemli roller üstlenen çok işlevli bir proteindir. Tau proteini mikrotübüllerin oluşumu, stabilizasyonu ve diğer sitoskeletal filamentlerle bağlantısının sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Sağlıklı bir beyinde tau fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki denge, sitoskeletonun stabilitesini ve dolayısıyla aksonal morfolojiyi düzenlerken AH'ye sahip beyinlerde en erken değişikliklerden biri olabilmektedir. Bu değişiklik, tau proteininin tübülün ile bağlanma yeteneğini ve mikrotübül oluşumunu desteklemesi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir [47]. Herhangi bir gen mutasyonu olmaksızın tau agregasyonu artmış fosforilasyon kaynaklı oluşan hiperfosforile tau yapısı oluşur (Şekil 2.4). Bu çözünmez yapı, sitoplazmik fonksiyonlara zarar verir ve aksonal taşınmayı engelleyerek hücre ölümüne yol açar [44].

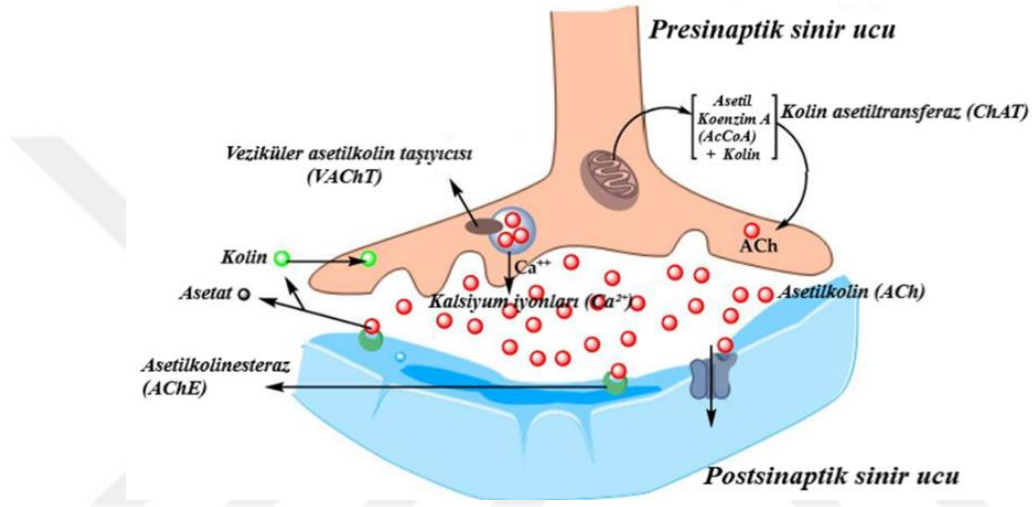


Şekil 2.4 : AH'de amiloid ve tau patolojisi [33, 48]. (A) CRND8 APP transgenik bir fare korteksindeki A β plaklarının tiyoflavin S boyaması ile elde edilen görsel. (B) Yaşlı bir insan hipokampusunun CA1 bölgesindeki nörofibriler tau yumaklarının (NFT) AT8 boyaması ile elde edilen görsel ve (C) Alzheimer hastalığı sırasında amiloid ve tau patolojisinin beyin boyunca yayılımını gösteren görsel [33, 48].

2.1.7.3 Kolinerjik hipotez

Kolinerjik hipotez, azalmış kolinerjik transmisyonun AH'de bilişsel, fonksiyonel ve davranışsal semptomların ifadesinde büyük bir rol oynadığını bilinmektedir. Hipotezde ayrıca kolinerjik eksikliğin sadece bilişsel semptomlarda değil, aynı zamanda hastalıkta gözlemlenen davranışsal değişimlerde de rol oynadığını belirtilmektedir [49]. AH'de kolinerjik nöronların dejenerasyonu, bilişsel işlevlerde bozulmalara neden olur [6]. Neokortikal ve presinaptik kolinerjik eksikliklerin, asetilkolin sentezinden sorumlu olan kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimideki bir bozuklukla ilişkili olduğu göz önüne alındığında asetilkolin (ACh) bilişsel işlevlerde temel rol üstlenmektedir [6]. İlk keşfedilen nörotransmitter olan ACh, tüm otonom gangliyonlarda, birçok otonomik olarak innerve edilen organda, nöromusküler kavşakta ve merkezi sinir sistemindeki birçok sinapta nörotransmitter olarak görev yapar [50]. ACh, kolinerjik nöronların sitoplazmasında kolin ve asetil-koenzim A'dan ChAT enzimi aracılığıyla sentezlenir ve veziküler asetilkolin taşıyıcısı (VACHT) ile sinaptik veziküllere taşınır (Şekil 2.5). ACh, veziküllerde yoğunlaşır ve sinaptik aralığa salınır; burada presinaptik reseptörler üzerinde etki ederek ACh'nin daha fazla salınımını düzenler ve postsinaptik reseptörler üzerinde etki ederek nörotransmisyonu

düzenler. AChE, ACh'yi asetat ve koline hidroliz eder; kolin daha sonra presinaptik nörona geri alınarak ACh'nin yeniden sentezlenmesinde kullanılır (Şekil 2.5). AChE inhibitörleri, ACh'nin yıkımını azaltarak sinaptik konsantrasyonunu artırır ve postsinaptik nörotransmisyon etkilerini güçlendirir [49]. Kolinerjik sistemi aktive etmeyi ve AH'deki bilişsel eksiklikleri hafifletmeyi amaçlayan AChE inhibitörlerinin ilk klinik çalışmaları bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. AChE, salınan ACh'yi sinaptik yarıklarda kolin ve asetata ayrıştırır. AChE inhibitörleri, ACh'nin hidrolizini engelleyerek kolinerjik transmisyonu aktive eder [51].



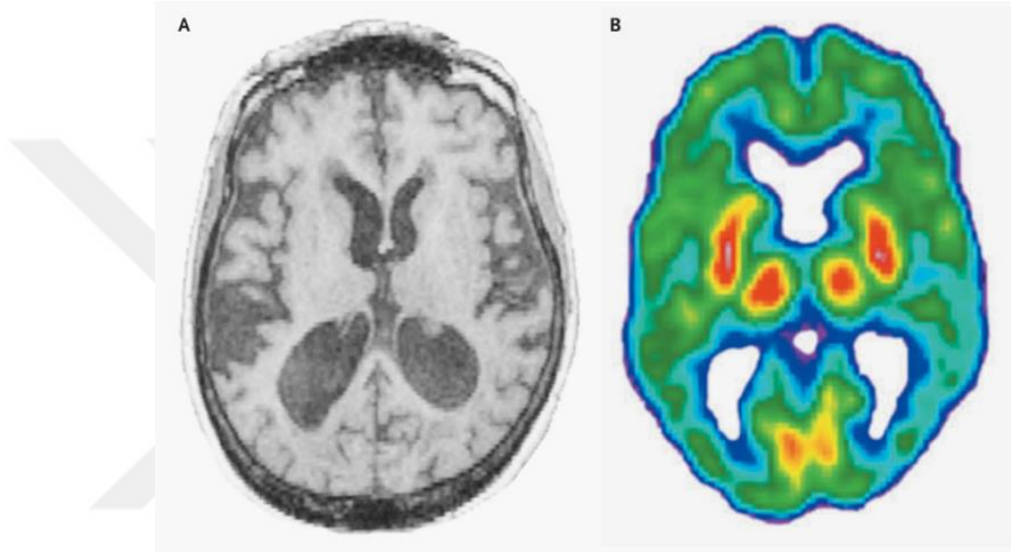
Şekil 2.5 : Presinaptik ve postsinaptik sinir uçları arasında ACh sentezi ve taşınması [6].

Perry ve çalışma arkadaşları [52] AH beyinlerindeki ChAT aktivitesindeki azalmanın bilişsel bozukluğun şiddeti ile ilişkili olduğunu bildirmiştir [51, 52]. AH'de kolinerjik nörotransmisyon eksikliğinin gözlemlenmesi, demans semptomlarının ilk onaylanmış tedavisi olarak AChE inhibitörlerinin geliştirilmesine neden olmuştur [49]. Kolinerjik hipotez ile AH'nin semptomatik tedavisi için kolinomimetik ilaçların prelinik ve klinik gelişimi özellikle kolinesteraz inhibitörlerine odaklanmayı sağlamıştır [53].

2.1.8 AH'nin tanı ve tedavi stratejileri

AH erken dönemde nörovasküler disfonksiyon, ilerleyici nörodejenerasyon, seçici nöron kaybı, A β patolojisinin ve hiperfosforile Tau'nun oluşturduğu nörofibriler yumakların birikimi görülmektedir [54-56]. AH'nin tanısında beyindeki amiloid plakların ve nörofibriler yumakların varlığı ve dağılımı, kesin bir AH tanısı koymak ve hastalığın evresini belirlemek için kullanılır. Klinik olarak AH tanısı büyük ölçüde

tıbbi geemiş, fiziksel ve nörolojik muayeneler, nöropsikolojik değerlendirmeler ve seçici yardımcı testlerle diğer etiyolojilerin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Klinik AH tanısının, patolojik tanıya göre doğruluk oranı %70-90 arasında değişmektedir [27]. AH tanısında teşhis edici belirteçler; A β ve tau biyobelirteçleri gibi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi ölçümler kullanılmaktadır [57]. Bununla birlikte, pozitron emisyon tomografisi (PET) teknolojisi ile görüntüleme, C11-etiketli Pittsburgh B Bileşiği (PiB) ile amiloid- β (A β) birikimini görselleştirme imkanı mevcuttur [28].



şekil 2.6 : AH tanısında teşhis edici görüntüleme rnekleri [58]. A) manyetik rezonans görüntüsü (MRI) ile kortikal atrofi ve ventriküler genişlemeyi göstermektedir [58]. B) Pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması ile, diğer kortikal alanlarda gözlenen pariyetal loblarda azalmış glikoz metabolizmasını (mavi-yeşil) ve daha normal metabolizma (sarı) görüntülenmiştir [58].

Erken AH'nin teşhisi, hastalığa müdahale açısından stratejik bir önem taşımaktadır. Ne yazık ki, AH, mevcut tüm tedavi seçeneklerine rağmen ilerleyici bir hastalıktır [28]. Hastalığın erken teşhisi ile başlangıcının ertelenmesini veya ilerlemesinin yavaşlatılmasını amaçlayan tedavilerin geliştirileceği konusunda çalışmalar sürmektedir. AH risk faktörlerini azaltmak, bilişsel/davranışsal semptomların yönetimi ve hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılmasına yönelik tedavi stratejileri olarak: kolinesteraz inhibitörleri ve memantin gibi, β -amiloid antagonistleri (rn. sekretaz inhibitörleri, anti-agregasyon bileşikleri, amiloid aşıları), anti-nörofibriler ilaçlar, damar riskini azaltmada antihipertansif ilaçlar veya lipid düzenleyici ajanlar (statinler, homosistein azaltımı gibi), beyin fonksiyonlarını koruma anti-inflamatuar ilaçlar,

nöroprotektif ajanlar (sinir büyüme faktörü (NGF) gibi), antioksidanlar (Ginkgo, Vitamin E gibi), davranışsal semptomlar için ise psikiyatrik ilaçlar (antidepresanlar, atipik antipsikotikler, anksiyolitikler, duygu durum düzenleyiciler gibi) uygulanabilmektedir [59]. Hâlihazırda, AH'nin tedavisinde bilişsel ve davranışsal semptomları hafifleten ve günlük yaşam aktivitelerinin sürdürülmesine yardımcı olan ilaçlar mevcuttur (Tablo 2.2) [60].

2.1.9 AH'de kullanılan ilaçlar

AH kesin bir tedavi sağlanamamasına rağmen, bazı tedaviler klinik olarak nörodejenerasyonu yavaşlatabilir ve bilişsel işlevi artırabilir. AH hastalarında klinik gerilemeyi yavaşlatılması ve hastalığın bazı semptomlarını geçici olarak hafifletebilmesi bazı ilaç tedavileri ile sağlanmaktadır [61]. AH'nin semptomatik tedavisinde hâlihazırda kullanılan ana ilaç sınıfı, asetilkolinesteraz/kolinesteraz inhibitörleridir (ChE-I'ler). Tedavi stratejileri temel olarak kolinerjik ve glutamaterjik sistemlerdeki bozulmaları hedef alır. Özellikle ChEI'ler uzun zamandır AH tedavisinin temelini oluşturmuştur [29]. AChE inhibitörleri, asetilkolin yıkımını engelleyerek sinaptaki nörotransmitter düzeylerini artırır ve AH hastalarında hafıza işlevi ile dikkatin iyileştirilmesine yardımcı olur [27]. Kolinerjik sistemi aktive etmeyi ve AH'daki bilişsel eksiklikleri hafifletmeyi amaçlayan ChE inhibitörlerinin ilk klinik çalışmaları bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. ChE, salınan ACh'yi sinaptik yarıklarda kolin ve asetata ayırır. ChE inhibitörleri, ACh'nin hidrolizini engelleyerek kolinerjik transmisyonu aktive eder. AH hasta grubunda ilk test edilen ilaçlardan biri fizostigmin olmuştur [51, 62-66]. İlaç bir dereceye kadar etkili olmasına rağmen, başka bir çalışmada muhtemelen fizostigminin kısa yarı ömrü (15–30 dakika kadar) ve buna bağlı periferik yan etkilerinden kaynaklı olumsuz sonuçlar elde edilmiştir [51, 65]. Semptomatik tedavi için ilk lisanslanan ChE-I, takrin olmuştur [67]. Takrin, etkili bir ChE inhibitörüdür. Summers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [68] oral takrin alan on iki AH hastasının altısında bellek skorunda iyileşme gösterdiğini bildirmiştir [51, 68]. Bu çalışma, AH için kolinerjik ilaçların geliştirilmesini teşvik niteliğindedir [51]. Takrin, daha büyük ölçekli bir plasebo kontrollü çalışma ile yeniden değerlendirilmiş ve etkilerinin iyileştirici olduğu kanıtlanmasına karşın aynı zamanda takrinin, ALT/SGPT gibi karaciğer enzimlerinde yükselmelere neden olduğu da izlenmiştir [51]. Bu nedenle tedavide kullanımda değildir. Tedavide FDA onaylı üç kolinesteraz inhibitörü bulunmaktadır: rivastigmin ve galantamin (hafif-orta evre AH için) ve

donepezil (tüm evrelerde AH için) [27] (Tablo 2.2). Donepezil, özellikle AH için rasyonel olarak tasarlanmış piperidin sınıfı bir AChE inhibitörüdür [51]. DZP, hafif ile orta-şiddetli AH hastalarının bilişsel fonksiyonlarını iyileştirdiği ve hepatotoksisite göstermediği kanıtlanmıştır [51]. DZP, takrin ile yapılan *in vitro* ve *ex vivo* sıçan çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, AChE'yi Butirilkolinesteraza (BChE) kıyasla daha seçici ve geri dönüşümlü olarak inhibe eden bir inhibitör olarak tanımlanmıştır [69]. Memantin ise orta-ileri evre AH için onaylanmış bir ilaçtır ve NMDA (glutamat) reseptör antagonisti sınıfına aittir [27]. NMDA (glutamat) reseptör antagonistleri nöronal hasara neden olan aşırı glutamat aktivitesini azaltır. Memantin, bu kategoride onaylanan tek ilaçtır ve orta ila şiddetli AH tedavisinde kullanılmaktadır. Memantin, glutamat reseptörlerini bloke ederken normal sinaptik iletişimi koruyarak yan etkileri en aza indirmektedir [6]. Bu ilaçlar genellikle iyi tolere edilir ve en sık görülen yan etkiler gastrointestinal rahatsızlık, baş dönmesi ve baş ağrısıdır [27]. Ancak yine de bu ilaç tedavilerinin uygulanması ilerlemesini durdurmamaktadır [6].

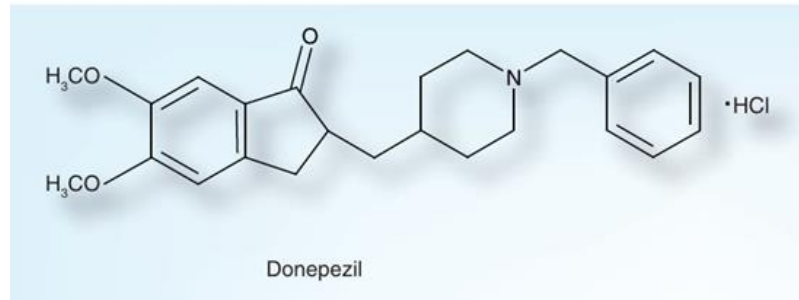
Tablo 2.2 : AH tedavisinde kullanılan ilaçlar [36].

İlaç	Sınıf	Hedef Doz	Yan Etkiler
Donepezil	AChE inhibitörü	10 mg/gün	Bulantı, kusma, ishal, rüyalar
Rivastigmin	AChE inhibitörü	6 mg 2×günlük	Bulantı, kusma, ishal, baş dönmesi
Takrin	AChE inhibitörü	20–40 mg 4×günlük	Hepatik toksisite, karaciğer enzim takibi gerektirir
Galantamin	AChE inhibitörü	12 mg 2×günlük	Bulantı, kusma, ishal, baş dönmesi, olası kardiyak etkiler
Memantin	NMDA reseptör inhibitörü	10 mg 2×günlük	Huzursuzluk, kafa karışıklığı

2.1.10 AH'de DZP etken maddesi ve etkinliği

1996 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), DZP ilacını hafif, orta ve şiddetli AH'nin tedavisi için onaylamıştır. [70]. DZP, AChE'ye karşı geri dönüşümlü seçiciliğe sahip piperidin türevi bir kolinesteraz inhibitörüdür. BChE'ye göre a AChE üzerinde çok daha seçici bir inhibitördür. [71]. DZP, mekanizması öncelikli olarak nonkompetitif bir inhibitör olarak etki gösterse de, aynı zamanda kompetitif özellikler de sergileyerek karma inhibitör niteliği taşımaktadır [72]. DZP beyinde kolinesterazını belirgin ve uzun süreli şekilde inhibe ederken, periferik dokulardaki kolinesteraz üzerinde ise belirgin bir etki göstermez ve *in vivo* olarak beyindeki asetilkolin

miktarını artırmaktadır [73, 74]. Sinaptik aralıklara salınan asetilkolinin yıkımını geciktirerek kolinerjik transmisyonu artırmış olur. [75]. Oral uygulama sonrası oldukça iyi emilim göstermekte ve maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) 3-4 saat içinde ulaşmaktadır [76]. DZP'nin nispeten uzun plazma yarı ömrü (yaklaşık 70 saat), günlük tek dozluk bir doz rejimine izin vermektedir. DZP geleneksel ChE inhibitörlerine kıyasla daha önemli bir avantaja sahiptir [51]. Ayrıca donepezil, öğrenme ve hafıza yetilerindeki performans eksikliklerini önemli ölçüde iyileştirebilmektedir. Bu özellikleri yanı sıra DZP günde bir kez uygulama imkanı sunması nedeniyle piyasada mevcut olan en etkili AChE inhibitörü haline gelmiştir. DZP etki mekanizması gereği kolinomimetik özelliklerine bağlı olarak gastrointestinal sistemle ilişkili olarak bulantı, ishal ve kusma gibi semptomlara ve bazı hastalarda uyku bozukluğuna yol açabilecek yan etkiler gösterebilir [73, 77]. Bu semptomlar genellikle hafif-orta şiddette olup zamanla kaybolabilmektedir. Bradikardi ve atriyoventriküler blok gibi kardiyak etkiler nadiren görülür. Uyku bozuklukları (insomnia veya canlı rüyalar gibi), özellikle ilacın gece alınması durumunda ortaya çıkabilir bu nedenle sabah ilaç alımına geçilerek bu durum önlenebilmektedir. Nihai olarak, DZP nöroprotektif mekanizmaları ile hem semptomatik rahatlama sağlar hem de nörodejeneratif süreçleri potansiyel olarak etkileyen mekanizmaları sunar [73].



Şekil 2.7 : DZP'nin kimyasal yapısı [78].

2.2 AHve KBB

AH, A β peptidlerinin patolojik birikimi ve hiperfosforile nöronal tau proteini içeren nörofibriler yumaklarla karakterize olan ilerleyici kronik bir nörodejeneratif bozukluktur. Ayrıca AH patolojisinde hastalık patogenezini teşvik eden kronik beyin enflamasyonu da yer almaktadır. Beyindeki mikrodamarları çevreleyen, yüksek derecede özelleşmiş bir endotel hücre zarı olan kan-beyin bariyeri (KBB), sinir

hücreleri ve bağışıklık sisteminin dolaşımdaki hücreleri arasındaki arayüzdür [79]. Bu nedenle KBB, AH sırasında enflamasyonun oluşumu ve sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çok sayıda çalışma, nörovasküler işlev bozukluğunun AH'nin başlangıcı ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu ve serebrovasküler değişiklikler ile nörodejenerasyon arasında bir bağlantı olabileceğini göstermektedir [56, 79-84]. AH'de KBB'de yer alan yapılara da geleşebilen bazı disfonksiyonlar Tablo 2.3'te özetlenmiştir [85-90]. KBB özelliklerini ve serebral endotel hücrelerinin farklılaşmasını indüklediği düşünülmektedir [91]. KBB, dolaşım sisteminden beyne önemli maddelerin ve bağışıklık hücrelerinin geçişini önleyen çok hücreli yapılardan oluşan seçici bir sınır olarak görev yaparken aynı zamanda çoğu kimyasalında kandan beyne girmesini engelleyen bir difüzyon bariyeridir [92].

Tablo 2.3 : AH'de KBB bileşenlerinin özellikleri.

Bileşen	AH'deki Özellikler
Kapillerler	Toplam uzunluğu kısalma gösterir.
GLUT1	Aβ temizlenmesinde azalmaya neden olur.
Transferrin reseptörü	Hipokampustaki reseptör sayısı normalden daha azdır.
İnsülin reseptörü	Beyindeki insülin reseptörü yoğunluğu yaşla birlikte azalır.
Laktoferrin	Ekspresyonu artmıştır.
Melanotransferrin	Ekspresyonu artmıştır.

Sağlıklı KBB, mikrovasküler endotel hücreleri, kapiler bazal membran, astrositler, perisitler, mikroglial hücreler ve bazı nöronal hücreler gibi bileşenlerden oluşur. Bir dizi özel protein, endotel hücrelerini sıkıca bağlar ve KBB'yi son derece seçici bir geçirgenlik bariyeri yapar. Ancak AH, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz gibi bazı hastalık durumlarında KBB bozulması genellikle meydana gelmektedir. Serebrovasküler Aβ birikimi, AH beyinde artan KBB geçirgenliğine katkıda bulunan pro-enflamatuar ve sitotoksik olaylara yol açar [79, 93-95]. Hastalık durumunda KBB'nin geçirgenliği artarak AH'de beyinde anormal Aβ birikimi endotel hücrelerine zarar verir ve bu da KBB sızıntısına yol açar [96-98]. KBB, yaşlanma ile birlikte fizyolojik değişikliklere uğrasa bile, daha geçirgen bir zarın

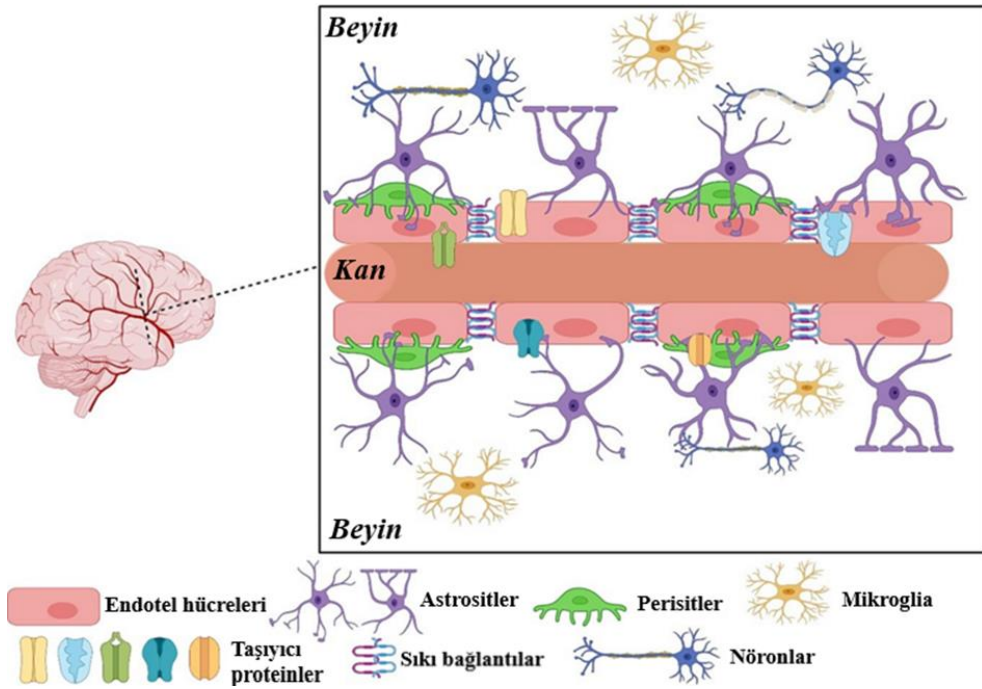
AH'nin bir özelliği olduğu ve bu geçirgenliğin bütünlüğü tehdit eden çeşitli faktörlerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir [99].

2.2.1 KBB fizyolojisi

KBB, beynin normal işlevi için hayati önem taşıyan bir difüzyon bariyeridir. Beynin homeostazını korumak için maddelerin kan yoluyla beyne girişini engelleyen bir bariyer görevindedir. Beyin mikrodamar endotel hücreleri (EH'ler), perisitler, astrositler, sıkı bağlantılar (tight junctions, TJs), nöronlar ve bazal membran, KBB'nin fiziksel olarak sıkı beyin kapillerlerini oluşturmaktadır. Beyin kapiller endotel hücrelerinde fenestrasyonlar bulunmaz, bu da küçük moleküllerin ve proteinlerin difüzyonunu sınırlayan en önemli faktördür. Endotelial hücreler arasındaki bağlantılar, endotel hücreleri sürekli bir bariyer halinde birleştirir ve suya çözünür maddelerin penetrasyonunu büyük ölçüde kısıtlar. Perisitler, astrositler ve bazal membran endotel hücreleri çevreler ve nihayetinde geçiş sağlanmayan bir KBB sistemini oluşturur. Ayrıca, beyin kapiller endotel hücrelerinde yer alan aktif dışa atım (efflux) taşıyıcıları, beyne maddelerin girişine karşı ek bir engel oluşturur [100]. KBB'de yer alan moleküler ve hücrel bariyerler [98] (Şekil 2.8): endotel hücreler arasındaki sıkı bağlantılar, KBB'de paraselüler taşınımı sınırlandırır ve zararlı maddelerin geçişini engeller. Claudin-1, -3, -5 gibi proteinler, bu bağlantıları oluşturur ve düzenler. Adherens bağlantılar: VE-Cadherin gibi proteinler, hücre-hücre bağlanmasını destekler. Astrositler ve Perisitler: Astrositlerin son ayakları ve perisitlerin kapiller üzerindeki etkileri, KBB'nin yapısal bütünlüğünü ve geçirgenliğini güçlendirir [98].

Nörovasküler ünite, MSS içerisinde sinir hücreleri (nöronlar), glial hücreler (astrozitler vb.), endotel hücreleri, perisitler ve KBB arasındaki dinamik etkileşimleri ifade eder (Şekil 2.8). Bu yapı, beyin fonksiyonlarını düzenlemek ve KBB'nin bütünlüğünü sağlamak için kritik öneme sahiptir. Beyin mikrovasküler endotelial hücreleri, kan damarları ile beyin parankiması arasındaki ilk bariyeri oluşturur. Endotelial hücreler, sıkı bağlantılar (tight junctions, TJs) ile birbirine bağlıdır ve perisitler tarafından yakından çevrelenir; ayrıca bazal lamina ile sarılmıştır. Bazal lamina, astrosit uç ayaklarının ve endotelial hücrelerin plazma zarları ile bütünleşmiştir. Astrosit uç ayaklarının uzantıları endotelial işlevleri destekler ve nöronal hücrelerle hücrel bağlantı sağlar. Dallanmış mikrogliya, nöronal yaralanmayı algılayabilir ve KBB'ye

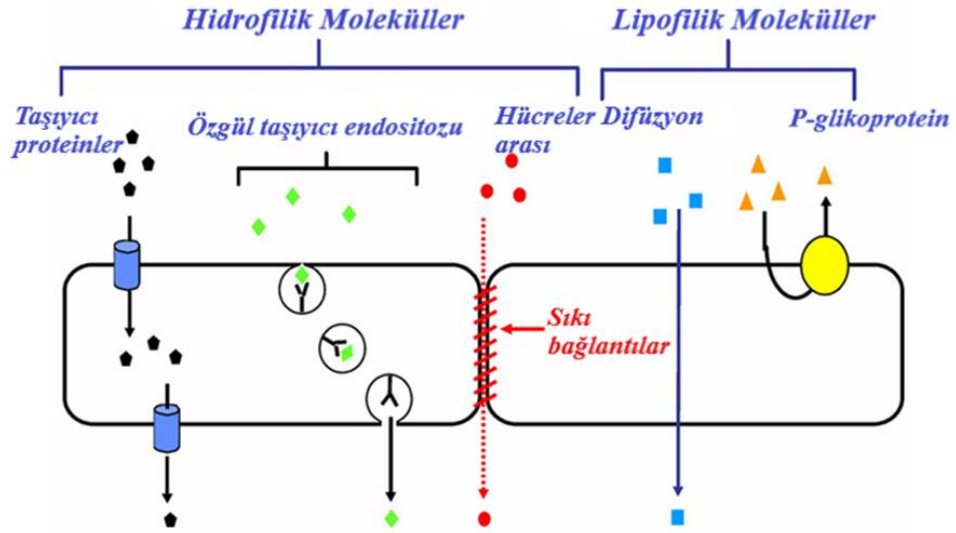
zarar veren sinyaller gönderebilir [79, 101]. KBB, besinlerin, kimyasalların ve ilaçların beyindeki dağılımını kontrol ederek nörovasküler ünitenin işlevlerini düzenler [92]. Moleküllerin dolaşımdan beyne geçme yeteneği, lipit çözünürlüğü, elektrik yükü, moleküler boyutu ve hidrojen bağlanma kapasitesi gibi temel faktörlere bağlıdır. Karbondioksit, nitrik oksit, etanol ve oksijen gibi küçük moleküler ağırlıklı (<400-500 Da) nonpolar lipit-çözünür moleküller, endotelial hücre zarının lipid çift tabakası aracılığıyla pasif difüzyon ile beyin parankimasına kolayca geçiş sağlayabilir. Hidrofilik ve yüklü moleküller ise yalnızca aktif taşıma sistemleri aracılığıyla KBB'yi geçebilir. Bu sistemler arasında reseptör aracılı taşıma, taşıyıcı aracılı taşıma ve adsorpsiyon aracılı taşıma yer alır. Glukoz, transferin, amino asitler ve potasyum, sodyum, kalsiyum ve bikarbonat gibi iyonlar bu sistemleri kullanırken, büyüme faktörleri ve sitokinler KBB'yi geçmede sınırlı bir yeteneğe sahiptir [102]. Besinler, iyonlar ve diğer moleküller KBB'yi ya bağlantı kompleksleri aracılığıyla paraselüler difüzyonla ya da hücreler arası yolla (transselüler yol) geçer [103]. Paraselüler geçiş büyük ölçüde minimize edilmiştir, ancak iyonlar ve çözünen maddeler konsantrasyon gradyanlarına göre bitişik hücreler arasında difüze olabilir [102]. KBB'yi aşma mekanizmalarına ilişkin daha geniş bir anlayış, beyne ilaçların ulaştırılması için yeni stratejilerin geliştirilmesini sağlaması açısından önem taşımaktadır [100].



Şekil 2.8 : KBB'deki nörovasküler ünitenin gösterimi [101].

2.2.2 KBB geçiş mekanizmaları ve ilaç taşınmasındaki rolü

KBB'nin iki temel işlevi beyni korumak ve beyne maddelerin taşınmasını sağlamaktır [104]. KBB, maddelerin aşağıdaki yollarla beyne geçmesine izin verebilir: paraselüler taşınım (endotelial hücreler arasından geçiş) ve transselüler taşınım (endotelial hücrelerin lüminal yüzeyinden ablüminal yüzeyine ve beyin parankimasına doğru hücre içinden veya hücre boyunca geçiş [104]. Paraselüler yol için iyonlar ve çözücüler, pasif difüzyon yoluyla konsantrasyon gradyanlarını kullanarak KBB'yi aşar. Transselüler yol ise pasif difüzyon, reseptör aracılı taşınım ve transitoz gibi farklı mekanizmalarını kapsar (Şekil 2.9). Çoğunlukla, pasif difüzyon, molekülün fizikokimyasal özelliklerine bağlı, doğgunluk göstermeyen bir mekanizmadır. KBB geçirgenliğini etkileyen fizikokimyasal faktörler arasında moleküler ağırlık, yük, lipit çözünlüğü, yüzey aktivitesi ve molekülün relatif boyutu bulunur. [100]. Sıkı bağlantılar, endotelial hücreler arasındaki paraselüler rotayı engellerken, transselüler yol, moleküllerin elektro-kimyasal gradyanlarına (konsantrasyon, elektrik yükü ve lipofiliklik) bağlı olarak geçişine izin verir.



Şekil 2.9 : Moleküllerin KBB'den geçiş şeması [105].

Aktif taşınım, molekülleri KBB boyunca konsantrasyon gradyanına karşı taşımak için enerji kaynağı olarak adenozin trifosfat (ATP) moleküllerini kullanır. Bu süreçler, lipofilik olmayan moleküllerin taşınmasını sağlar [104]. Bu taşınma perisit taşıyıcılarını, endotelial iyon taşınımını, endotelial taşıyıcı-aracılı taşınımı,

endotelial aktif dışı akışı (ATP-bağlayıcı kasetler) ve endotelial reseptör-aracılı taşınımı kapsamaktadır. Bunlardan ilki perisit taşıyıcıları: Perisitler, KBB bütünlüğünü ve homeostazını düzenlemede kritik bir rol oynar. Perisitlerde karbonhidratlar, amino asitler, organik anyonlar ve katyonlar için taşıyıcılar yer almaktadır [98]. Endotelial iyon taşınımında ise: sodyum (Na^+/K^+ -ATPaz), potasyum kanalları (KCa, KV1 ve Kir) ve kalsiyum kanalları yer alır. Hücre membranı boyunca sodyum ve potasyum iyonlarının taşınmasını düzenleyerek elektrokimyasal gradyanları korur. Endotel bariyer fonksiyonu gibi çeşitli fizyolojik süreçler için gerekli olan kalsiyum sinyallemede görev alır. Böylece membran potansiyelini ve iyon dengesini düzenlemeye katkıda bulunur. Endotelial taşıyıcı-aracılı taşınımında karbonhidrat taşıyıcıları (glukozun taşınmasını sağlayan GLUT1 gibi), amino asit taşıyıcıları, hormon taşıyıcıları: (MCT8 (triiodotironin) ve OATP1C1 (tiroksin) gibi taşıyıcılar), yağ asidi taşıyıcıları: (özellikle dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi omega-3 yağ asitlerinin taşınmasında rol oynayan MFSD2A gibi) ve organik anyon/katyon taşıyıcıları yer almaktadır.

Endotelial aktif dışı akışta (ATP-bağlayıcı kasetler): ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları yer alır. ATP kullanarak molekülleri aktif olarak endotel hücrelerinden kana geri taşınması söz konusudur. Örneğin ABCB1 (P-glikoprotein): İlaç ve yabancı maddelerin beyinde birikmesini önler. BCRP (Meme Kanseri Direnç Proteini): İlaçlar ve metabolitlerin temizlenmesini kolaylaştırır. MRP'ler (Çoklu İlaç Direnci İlişkili Proteinler): Toksik maddelerin ve metabolik atıkların atılmasında görev alır.

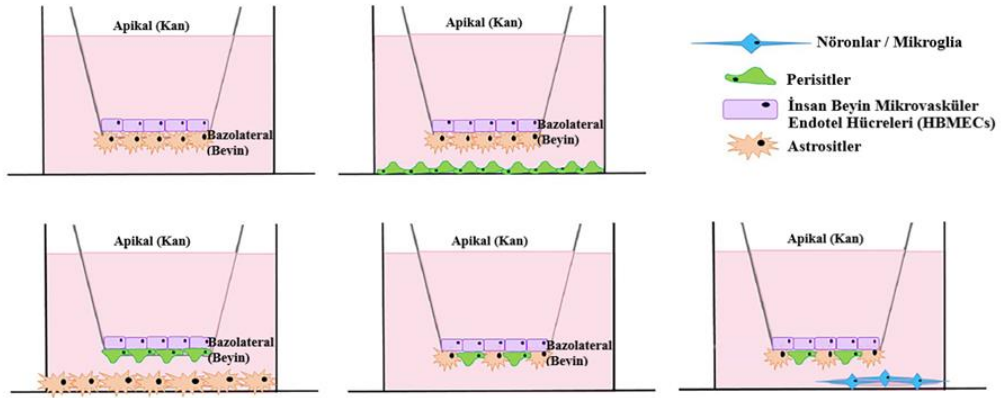
Son olarak endotelial reseptör-aracılı taşınımında ise endotel hücrelerinde bulunan reseptörler, makromoleküllerin seçici şekilde taşınmasını sağlar: Örneğin Transferrin Reseptörü (TfR): Demir taşıyıcısı olan transferrinin beyne taşınmasını kolaylaştırır. İnsülin Reseptörü (IR): beyindeki glukoz metabolizmasında rol oynar ve İnsülinin alınmasını düzenler. Lipoprotein Reseptörleri (LRP1, LRP2): AH'ye neden olan amiloid-beta gibi moleküllerin beyinden kana taşınmasını sağlar [98, 104].

2.2.3 *In vitro* KBB modelleri

KBB, kan dolaşımı ile beyin hücre dışı sıvısı arasındaki sınırdaki yer alan ve bir ara yüz oluşturan dinamik bir fizyolojik yapıdır. Bu yapı, serebral kan akışı ve anjiyogenez, nöronal gelişim ve sinaptik aktivite gibi çeşitli süreçleri düzenler [106], [107]. Beyindeki kılcal damarlar, kan ve beyin arasındaki iyonlar, küçük ve büyük

moleküllerin hücreler ile transferini sıkı bir şekilde kontrol edecek şekilde gelişmiştir [108]. MSS hastalıklarını hedefleyen bir ilacın sistemik olarak uygulanması durumunda KBB'yi geçebilmesi zorunludur. Uygun *in vitro* KBB modellerinin oluşturulması, beyin ile ilişkili hastalıkların tedavisinde bir ilacın potansiyelini ve etkinliğini değerlendirmek açısından büyük önem taşımaktadır. KBB'nin AH gibi hastalık koşullarında daha iyi taklit edilmesi için endotel hücreleri sıklıkla bazı özel proteinlerle ko-kültüre edilmesi gerekebilir [96]. Mikrovasküler endotel hücreleri *in vitro* KBB modellerinin oluşturulmasında kullanıldığında, bu hücreler tek başına (monokültür) veya diğer hücrelerle birlikte (ko-kültür) uygulanabilir. Endotel hücrelerinin monokültürü, beyin endotelyum modelleri için kolaylıkla gerçekleştirilebilir [96, 109]. Yapılan çalışmalarda endotel hücreleri AH'yi daha iyi modellemek için A β ile ko-kültüre edilmiştir [96, 110-112]. Geçmiş yıllarda, *in vitro* KBB modelleri, fare, sıçan, domuz, sığır ve insan gibi çeşitli türlerden elde edilen primer ve ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kullanılarak oluşturulmuştur. Kemirgenler (örneğin, bEnd.3, bEnd.5, TR-BBB vb.), insanlar (örneğin, HCMEC/D3, HBMEC vb.) ve domuzlardan elde edilen beyin endotel hücre hatlarının ortaya çıkışı, daha iyi erişilebilirlik ve ölçeklenebilirlik sağlamış, ancak bu avantajlar endotel hücre türlerine göre belirteçleri, bağlantı proteinleri ve taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunda değişiklikler göstermektedir [113]. Hayvan modelleri, KBB aracılığıyla ilaç taşınması ve beynin etkinliği için prelinik testlerde yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak, bu modellerin yaklaşık %92'sinin klinik deneylerde başarısız olması nedeniyle daha iyi modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumu ele almanın bir yolu, ilaç keşfi veya taraması için insan KBB'sinin biyolojisini, fizyolojisini, immünolojisini ve anatomisini yeniden oluşturan yüksek doğruluklu bir *in vitro* model geliştirmektir [114]. *In vitro* modeller, KBB'nin fizyolojisi, patolojisi ve farmakolojisini anlamak, ilaçların beyne geçişini incelemek ve yeni terapötik ajanlar geliştirmek için kritik araçlardır [115]. Kullanılan hücre modelleri: Primer Hücre Kültürleri: Sığır, insan, domuz ve kemirgenlerden elde edilen beyin kapiller endotel hücreleri, astroglia ve nöronlar gibi komşu hücrelerle birlikte kullanılabilir. Bu *in vitro* modelleri oluşturmak için beyin mikrovasküler endotel hücreleri (BMEC'ler) veya diğer endotel hücreleri (EC'ler), bazal membran tarafından desteklenir. RBE4 (sıçan beyin endotel hücreleri) ve bEND.3 (fare beyin endotel hücreleri) gibi ölümsüzleştirilmiş hücre hatları, kolay ulaşılabilirliği ve bariyer özellikleri nedeniyle KBB ile ilgili *in vitro* çalışmalarda en sık kullanılan modellerdir [115-117]. Bunun yanı sıra özellikle sığır ve insan kökenli

hücre hatları da sıkça kullanılmaktadır. İnsan hücre hatları enfeksiyon çalışmalarında öne çıkar, ancak geçirgenlik açısından daha düşük değerlere sahiptir [115]. Buna örnek olarak hCMEC/D3 hücre hattı, insan beyninden türetilmiş olması nedeniyle KBB'nin insan biyolojisine yakın özelliklerini yansıtır [118]. hCMEC/D3, normal insan beyin endotel hücrelerinden izole edilmiş bir hücre hattıdır. hCMEC/D3, KBB'nin anahtar özelliklerini simüle eder. Bu hücre hattı, *in vitro* koşullarda glial hücrelerin eş-kültürü olmaksızın KBB özelliklerini başarılı bir şekilde gösterebilir. Sıkı bağlantı proteinleri (tight junctions, TJ) ve adherens bağlantılar (adherens junctions, AJ) içerir. Bu proteinler arasında claudin-5, occludin, ve ZO-1 bulunur. KBB özelliklerinin taklidi, ilaç adaylarının değerlendirilmesi ve ilaç taşıma sistemlerinin test edilmesi için büyük bir avantaj sağlar. Bu hücre hattı, MSS ilaçlarının taranması ve KBB üzerinden ilaç taşıma sistemlerinin değerlendirilmesi için yaygın bir model olarak kullanılmaktadır [118, 119]. *In vitro* KBB model tipleri için yapılan çalışmalarda; tek kültür (monokültür), çift kültür (ko-kültür) ve üçlü kültür (triple ko-kültür) olmak üzere farklı *in vitro* KBB modeli geliştirilmiştir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 : *In vitro* KBB model tiplerinin şematik diyagramları [96, 120]. (a) Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve astrositlerin temas halinde olduğu ko-kültür modeli. (b) Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve astrositlerin temas halinde ko-kültüre edildiği, ancak perisitlerin onlarla temas etmeden plakanın alt kısmına yerleştirildiği model. (c) Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve perisitlerin temas halinde ko-kültüre edildiği, ancak astrositlerin temas olmadan plakanın alt kısmına yayıldığı model. (d) Beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin transwell membranının bir tarafında tek başına kültüre edildiği, astrositler ve perisitlerin ise transwell membranının diğer tarafında karıştırıldığı model. (e) Beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin transwell membranının bir tarafında tek başına kültüre edildiği, astrositler ve perisitlerin transwell membranının diğer tarafında karıştırıldığı model. Nöronal hücreler ise temas olmadan plakanın alt kısmına yerleştirilmiştir [96].

Bu modeller, sırasıyla endotel hücreler, astrositler ve perisitlerden oluşmaktadır. Monokültür modellerinde tek başına endotel hücreleri içerir ve bu model tipinde fenotip kaybı görülebilmektedir. Ko-kültür modelleri endotel hücreleri, astroglia, perisitler ve nöronlarla birlikte yetiştirilir. Bu model tipinde modellerinde perisitler ve endotel hücreler, porlu membranın iki farklı tarafında, bağlantıları artırdığı sebebiyle astrositler ise alt kısımda konumlandırılarak *in vivo* KBB yapısına en yakın düzenleme sağlanması amaçlanmaktadır. Elde edilen *in vitro* KBB modellerinin bariyer kalitesi modellerde bariyer sıklığının transendotelial elektrik direnci (TEER) ölçüleriyle değerlendirilmektedir. Bu yöntem bariyer sıklığını değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Buna ek olarak geçirgenlik katsayısı (Pe) parselüler geçişi ölçmek için kullanılır. Modellerin başarısı, *in vivo* KBB geçirgenlik değerlerine ne kadar yaklaştıklarıyla değerlendirilir [115, 121].

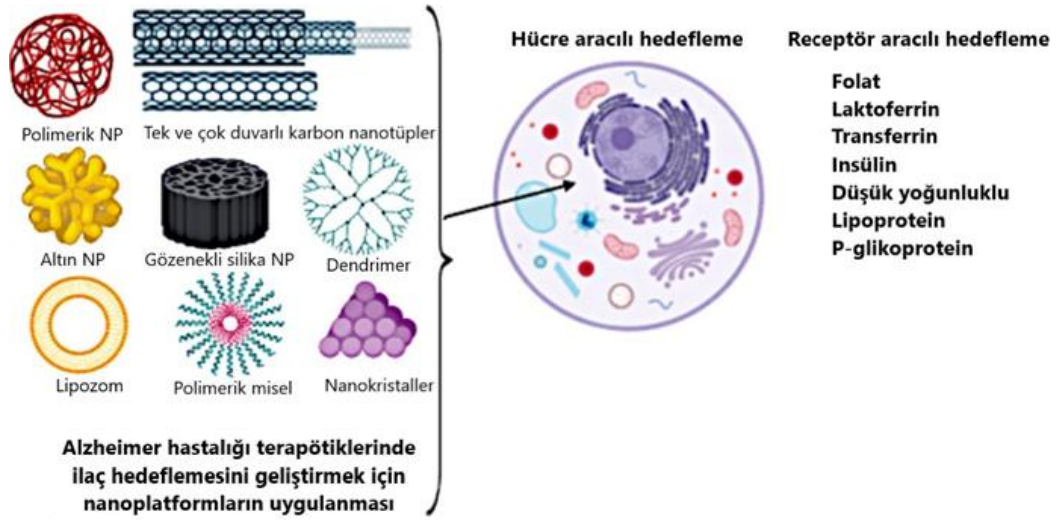
2.2.4 KBB'yi aşmak için geliştirilen stratejiler

KBB, kan dolaşımı ile gelen moleküllerin beyne girişini düzenleyen ve beyin mikroçevresinde iyonik homeostazı koruyan son derece özelleşmiş yapısal ve biyokimyasal bir bariyerdir [122]. KBB'de yer alan beyin kapiller endotel hücreleri tarafından oluşturulan fiziksel bariyer, toksik maddelerin beyne girmesini engellerken yalnızca küçük, lipofilik moleküllerin geçişine izin vermektedir. İlaç geçişinde sınırlayan bu bariyer mekanizmasında sıkı bağlantılar, efluks taşıyıcıları ve metabolik yıkım bulunur [104]. İlaç geliştirme süreçlerinde KBB'yi aşmak, büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle alternatif geçiş yolları olarak nazal yolla ilaç ulaştırımı yapılması hedeflenerek burundan beyne doğrudan ilaç taşınımı, Alzheimer ve diğer nörolojik hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği üzerine çalışmalar yer alırken bir diğer geçiş yolu olarak osmotik maddeler ve kimyasal modifikasyonları ile ozmotik ajanlar ve bradikinin analogları gibi kimyasallar kullanılarak, KBB'nin bütünlüğünü geçici olarak bozarak ilaç geçişini artırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bunlar dışında KBB'den ilaç geçişine dair güncel yaklaşımlar olarak nanopartikül sistemler geliştirilmektedir [104]. Nanopartiküllerin KBB üzerinden geçişi için yapılan çalışmalar, KBB'nin nanopartikülleri endositoz yoluyla alabileceğini ve ilaçların nanopartiküllerden salımının hücre içi pasif difüzyon veya transsitoz yoluyla beyne taşınabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, kullanılan nanopartikülün yüzey özellikleri (zeta potansiyeli gibi) ve taşıyıcı matrisinin özellikleri de bu süreçte etkili olmaktadır [118]. Lipit temelli sistemler (lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, nanoyapılandırılmış lipit taşıyıcılar) KBB'ni aşmak için kullanılmaktadır. Son yıllarda ise polimerik nanopartiküller ve inorganik nanopartiküller (altın, gümüş ve silika bazlı) ile ilaç taşınımı optimize edilmektedir. İlaç-polimer oranını ayarlayarak ve nanopartikül yüzeyini yüzey aktif maddeler, hücre nüfuz edici peptitler veya antikorlarla kaplayarak, polimerik nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli, kan dolaşım süresi, ilaç salım hızı ve hedefleme alanları gibi özellikleri kontrol edilebilmektedir. AH için tanı ve tedavi uygulamalarıyla ilgili biyobozunur polimerik nanopartiküller kullanılarak yapılan nanotaşıyıcı çalışmaları mevcuttur [85, 104]. Nanotaşıyıcılar boyutları nedeniyle benzersizdir ve kullanılan malzeme nedeniyle kolayca uyarlanabilir yapılara sahiptir. Fazla ilaç yükü taşıyabilirler, yüzey özellikleri değiştirilebilir ve kontrollü ilaç salımını sağlayabilirler. Bu özellikler, nanotaşıyıcıların ilacın KBB üzerinden taşınması için ilgi çekici alternatif haline

getirmiştir. Nano-ölçekli ilaç taşıyıcılar 10 ile 1000 nm arasında boyut aralığında parçacıklardan oluşur. KBB genelinde ilaç dağıtımı için nanotaşıyıcıların ideal özellikleri aşağıda listelenmiştir [123].

- Toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olmalıdır.
- Parçacık boyutu 100 nm'den küçük (monositler veya makrofajlar yoluyla taşıma hariç) olmalıdır.
- Kanda stabil (toplanma ve ayrışma olmadan) olmalıdır.
- İmmünojenik olmamalıdır.
- KBB için hedefli kısmına (reseptör veya adsorptif aracılı mekanizma veya monositler veya makrofajlar tarafından alım sağlayan yapılar) sahip olmalıdır.
- İyi korunmuş ve ilaç stabilitesine sahip olmalıdır.
- Ayarlanabilir kontrollü ilaç salım profilleri gösterebilmelidir.
- Küçük molekülleri, proteinleri, peptitleri veya nükleik asitleri taşımak için uygun olmalıdır [123].

Gopalan ve arkadaşlarının hazırladığı derleme çalışmasında [124], AH'nin başlıca patolojik özelliklerini hedef alan nanoteknolojinin mevcut uygulamalarıyla derinlemesine incelenirken KBB gibi biyolojik bir bariyeri aşarak beyinde spesifik hedefleme için antikor, aptamerler, proteinler ve peptitler kullanan nanotaşıyıcıların yüzey modifikasyonlarının kullanıldığı belirtilmiştir. pH, sıcaklık, foto-termal, reaktif oksijen türleri, ultrason ve elektrik gibi uyaranları kullanan uyaranlara duyarlı ilaç dağıtım nanoplatformları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Nanoplatformların mitokondri, çekirdek, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve lizozomlar gibi hücre altı bölümlerine ve folat, laktoferrin, transferrin, insülin ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörleri gibi reseptöre özgü etkileşimlere hedeflenmesi dahil edilmiştir [124] (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 : AH'nin tedavisinde kullanılan terapötiklerde uygulanan ilaç hedeflendirme stratejilerine örnekler şeması [124].

Hücre bazlı olan hedeflendirme yaklaşımlarında hedef bölgede ilaç birikimini sağlamak ve olumsuz etkileri azaltmak için, araştırmacılar hedef hücre içindeki belirli bölgeleri hedeflemektedir. Bugüne kadar tasarlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre içi hedeflemesine örnek olarak mitokondriyal hedefleme sekansı, TAT CPP (hücre nüfuz eden peptid) ve nükleer lokalizasyon sinyali gibi organel hedefleme parçaları, nanoparçacık yüzeyini işlevselleştirmek ve ilaç taşıma için spesifik hücre organelini hedeflemek verilebilir [124].

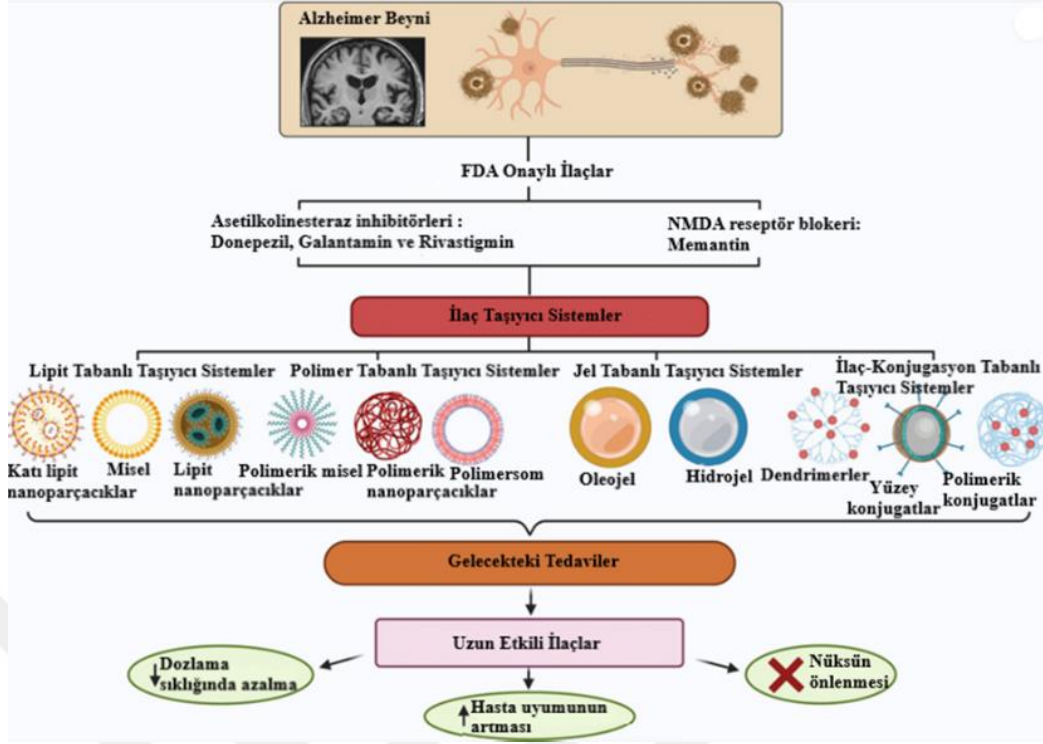
2.2.5 KBB engelinde geçişi artırmak için kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler

KBB, MSS'ye toksik maddelerin girişini engelleyerek doğal bir koruyucu bariyer olarak işlev görür. Sıkı hücrel bağlantılar, kan kılcal damarlarındaki endotel hücrelerinden MSS'ye doğru polar moleküllerin difüzyonunu ciddi biçimde sınırlar. KBB üzerinden pasif taşınma, lipit çözünürlüğü yüksek ve 400 Da'dan küçük moleküller için gerçekleşebilir. Ancak, lipofilik moleküller KBB'yi pasif difüze edebilse dahi, KBB'de bulunan endotel hücreleri tarafından ifade edilen endojen membran taşıyıcı proteinler aracılığıyla hızlıca kan dolaşımına tekrar geri atılabilir. KBB'yi geçen oldukça polar veya makromoleküler bileşiklerin çoğu, reseptör aracılı veya adsorpsiyon aracılı taşınım yoluyla geçiş yapar; ancak bu yollar da belirli moleküllerle sınırlıdır. MSS'ye yönelik ilaç dağıtımındaki stratejiler arasında KBB'nin atlanmasını sağlayan yöntemler (örneğin, konveksiyon destekli dağıtım veya burun içi uygulama), KBB'nin bozulmasını sağlayan yöntemler (örneğin, odaklanmış ultrason),

ve KBB'nin endojen reseptörleri/etkileşimlerinden yararlanan yöntemler (örneğin, reseptör aracılı taşınım ve hücre-penetran peptitler) yer almaktadır (Şekil 2.12). Serbest ilaçlar uygulama sonrası farmakokinetik ve farmakodinamik zorluklarla karşılaşır. Zayıf çözünürlük, sınırlı biyodağılım veya hedef alanlara seçici olmama gibi etkenler, ilaç etkinliğini artırmak için daha iyi tasarlanmış taşıyıcıların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle nanopartiküller MSS bozukluklarının tedavisinde etkinliği artırmaya yardımcı olmuştur. Nanopartiküller yalnızca dolaşım süresini artırıp terapötiklerin dağılım hacmini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda KBB üzerindeki P-glikoprotein gibi taşıma proteinlerinin etkisinden de kaçınabilir [125-130].

Nanotaşıyıcıların büyük çoğunluğu, KBB'yi aşmak için mevcut fizyolojik mekanizmaları kullanır. KBB, kan dolaşımı ile MSS arasında fiziksel ama dinamik bir biyolojik bariyerdir [131]. Ayrıca beyne ulaşabilmek için çoğu molekül, endotelial hücrelerin lümenal (kan tarafı) yüzeyinde eksprese edilen özel taşıyıcılar ve/veya reseptörlerle etkileşime geçmek zorundadır [105]. Genel olarak, literatüre göre, makromoleküllerin hücre içi taşınması veziküler sistem tarafından gerçekleştirilir ve üç tür endositoz vezikülü bu süreçte rol oynar. Bunlardan ilki klatrin kaplı çukurlar: çoğunlukla reseptör aracılı transsitoza katılır. Bir diğeri kaveolar: ekstraselüler moleküllerin adsorptif-aracılı endositozu ve reseptör trafiği ile ilişkilidir. Son olarak makropinositik veziküller: daha büyük moleküllerin endositozunu sağlar [131-135].

Nanoparçacıklar, aynı terapötik ajan içinde birden fazla bileşeni birleştirebilmek için benzersiz bir yöntem sunarak beyin hastalıklarının başarılı bir şekilde tedavi edilmesinde önemli bir potansiyel taşımaktadır. Çekirdek malzemesine bağlı olarak nanoparçacıkların hemen hemen tüm fiziksel özellikleri, boyut, şekil, yük, bağlanma kapasitesi ve hidrofobiklik/hidrofiliklik (içsel ve dışsal) dahil olmak üzere ayarlanabilir. Bu faktörler, nanoparçacıkların farmakokinetik yarı ömrü, biyodağılımı, stabilitesi ve terapötik protein veya enzimle bağlanma kapasitesiyle doğrudan ilişkilidir. Ayrıca nanoparçacıkların birçoğu hedefleme ligandları veya PEG gibi gizlenme ajanlarıyla daha fazla modifikasyona uygun hale getirilebilir [136].



Şekil 2.12 : KBB'yi aşmak için geliştirilen stratejiler [70].

Nanotaşıyıcı stratejileri, ilaç dağılımını iyileştirme, yan etkileri azaltma, hızlı karaciğer metabolizmasını önleme ve daha iyi terapötik etkinlik sağlama amacıyla yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Nanopartiküller (NP'ler), ultra küçük boyutlara (10–1000 nm), yüksek yüzey alanına ve işlevselleştirilebilir bir yapıya sahip ilaç taşıyıcılarıdır. Bu sistemlerin hücre zarlarını geçme yetenekleri ve ilaçların bozulmasını azaltma kapasiteleri, boyut, yüzey yükü, şekil, kimyasal bileşim ve yüzey özelliklerinin optimize edilmesiyle sağlanabilir [137]. AH tedavisinde mevcut tedaviler hastalığın temel nedenini hedeflemek yerine semptomatik bir rahatlama sağlamaktadır, çünkü KBB sınırlayıcı doğası ilaçların geçişini engelleyerek ilaç etkinliği ve biyoyararlanımını olumsuz etkilemektedir. Araştırmacılar, en yüksek biyoyararlanımı ve en düşük yan etkiyi sağlamak için KBB'yi aşarak hedefe yönelik ilaç teslimini mümkün kılan yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmeye odaklanmaktadır. NP'ler, küçük partikül boyutları sayesinde KBB'yi geçebilir, böylece ilaçların farmakokinetik özelliklerini artırarak hedefe yönelik ilaç teslimatını mümkün kılar. Özellikle polimerik NP'ler, basit üretim yöntemleri, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, biyouyumlulukları ve benzersiz mimarileri nedeniyle geniş çapta bir araştırma konusudur [138].

2024 yılında Oliveira Silva ve arkadaşları [137] AH'nin tedavisinde kullanılan DZP'nin etkinliğini artırmak, KBB aşma kapasitesini, beyin hedeflemesini ve etkinliğini iyileştirmek amacıyla iki farklı nanotaşıyıcı sistem geliştirerek polimerik nanopartiküllerin (PLA-PEG NP'ler) ve hücre dışı veziküllerin (EV'ler) karşılaştırmasını sağlamıştır.

Baysal ve çalışma arkadaşlarının [25] yaptığı diğer bir çalışmada, DZP yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküller çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanmış ve bu nanopartiküllerin amiloid-beta fibril ($A\beta$ 1-40 ve $A\beta$ 1-42) oluşumu üzerindeki stabilize edici etkisi *in vitro* olarak kanıtlanmıştır. Elde edilen nanopartiküller, KBB'yi aşabilme ve kontrollü salım profili gösterme kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır [25].

Sharma ve arkadaşları [139] tarafından yapılan çalışmada AH için hem tedavi edici hem de tanısal bir ajan olarak kullanılma potansiyeli araştırılmak üzere triptofan nanopartiküllerinin (TrpNP) sinir hücreleri üzerindeki biyouyumluluğu, SH-SY5Y hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. Alzheimer'a özgü toksik protein agregatları (özellikle $A\beta$ 42) ile etkileşim kabiliyetleri araştırılmış ve *in vitro* etkinlik testleri ile $A\beta$ 42 agregasyonunu inhibe etme ve çözme kabiliyeti test edilmiştir. Antioksidan ve nöroprotektif etkiler incelenerek TrpNP'ler, $A\beta$ 42 agregasyonunu etkin bir şekilde inhibe etmiş ve var olan agregatları çözmüştür. Sonuç olarak TrpNP'lerin oksidatif stresi azalttığı ve sinir hücrelerini nörodejenerasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. TrpNP'lerin Alzheimer tedavisinde kullanılabilecek güvenli ve etkili ajanlar olarak geliştirilmesi için önemli bir temel olduğu belirtilmiştir [139].

Yang ve arkadaşlarının [140] yaptığı çalışmada fukoksantin (FX)'in düşük biyoyararlanım ve biyolojik kararlılık gibi sorunlarına çözüm bulunmasının yanı sıra FX'in antioksidan, anti-enflamatuar ve nöroprotektif özelliklerinin, AH tedavisinde *in vivo* etkilerini artırmak için uygun bir taşıyıcı sistem olan PLGA-PEG nanopartikülleri kullanılarak iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Deniz kaynaklı doğal bir bileşik olan FX'in, PLGA-PEG nanopartikülleri aracılığıyla AH'nin tedavisinde etkili ve güvenli bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu yaklaşım, *in vitro* ve *in vivo* modellerde yapılan deneysel çalışmalarla desteklenerek FX'in biyoyararlanımı artırılmış ve beyin hedefli yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerin potansiyel önemini vurgulanmıştır [140].

Rani ve arkadaşları [141] tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada, AH'de pro-enflamatuar sitokinlerin rolü incelenmiş ve peglenmiş kendiliğinden bir araya gelen

nanoyapılı iskelelerin (PEG-NSc) nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Beyin dokusunda pro-enflamatuar sitokin düzeyleri ve oksidatif stres belirteçleri ölçülüp pro-enflamatuar sitokin düzeylerinin de anlamlı şekilde azalma saptanmıştır. Bu sitokinlerin, oksidatif stres ve A β plak oluşumunu da teşvik ederek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu düşünüldüğünde amiloid-beta plak oluşumunu inhibe ettiği ve mevcut plakları çözme potansiyeli gösterdiği belirlenmiştir. AH'nin nöroenflamatuar temellerini hedefleyen yeni bir nanoteknolojik yaklaşım sunmaktadır [141]. AH, özellikle A β birikimi ve sinir hücrelerinde APP metabolizmasının bozulması ile ilişkili olması nedeniyle Wu ve arkadaşlarının [142] gerçekleştirdiği çalışmada, PLGA (polilaktik-ko-glikolik asit) nanoparçacıklarının (NP) APP metabolizması ve A β toksisitesine karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar PLGA NP'lerinin APP metabolizmasını düzenleyerek ve A β toksisitesini AH'nin patolojik ilerleyişine karşı potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir. PLGA, biyouyumlu ve biyobozunur yapısıyla ilaç taşıyıcı sistemlerde gelecek vaat etmektedir [142].

Nöroprotektif özellikteki memantin, AH tedavisinde kullanılan bir NMDA reseptör antagonistidir. Ancak, memantin biyoyararlanımı ve hedefe yönelik etkinliği sınırlıdır. Saleh ve arkadaşları [143] tarafından yapılan bu çalışmada memantin yüklü kitosan nanokristalleri (CS-NC) fizikokimyasal özellikleri ve toksikolojik profillerini değerlendirilmiştir. *İn vitro* testler ve *ex vivo* testler gerçekleştirilmiştir. Bu tür nanotaşıyıcıların, memantin etkinliğini artırabileceği, yan etkilerini azaltabileceği ve ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilmesi öne sürülmektedir [143].

Aydın ve arkadaşlarının [144] yaptığı çalışma AH tedavi etkinliğini artırmak için yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemi olarak DZP ve kurkumin gibi terapötik ajanlarla yüklenmiş polikaprolakton/polilaktik asit (PCL/PLA) nanoliflerin özellikleri incelenmiştir. Lif çapının bu tür nanoliflerin fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Biyolojik olarak hücre canlılığı ve antioksidan aktivite değerlendirmesi sonucu nanolifler, nöronal hücrelerde biyouyumlu bulunmuş ve hücre proliferasyonunu desteklediği saptanmıştır. Bu çalışma, AH'nin tedavisinde polimerik nanoliflerin potansiyel bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesini göstermektedir. PCL/PLA nanolifler, AH tedavisi için yenilikçi bir platform sağlayabileceği vurgulanmaktadır [144].

DZP, AH tedavisinde kullanılan bir AChE inhibitörüdür ancak konvansiyonel formülasyonlarında sınırlı biyoyararlanım ve yan etkiler gözlemlenmesi nedeniyle yapılan çalışmada [145], DZP yüklü PLGA-*b*-PEG NP'lerin terapötik etkinliği değerlendirilmiştir. Özellikle, bu nanoparçacıkların bellek ve öğrenme fonksiyonlarına etkisi, A β indüklenmiş sıçan modelinde incelenmiştir. Beta-amiloid 1-42 peptidi ile indüklenmiş Alzheimer modelinde, DZP yüklü nanoparçacıkların nörolojik etkileri değerlendirilmiştir. PLGA-*b*-PEG nanoparçacıkları, DZP'nin biyoyararlanımını artırarak nöroprotektif etkisini güçlendirdiği belirlenmiştir. DZP yüklü PLGA-*b*-PEG nanoparçacıklar, ilaç taşıma ve yan etkilerin azaltılmasıyla beraber öğrenme ve bellek fonksiyonlarını iyileştirerek AH tedavisinde etkili bir yaklaşım olduğu vurgulanmaktadır [145].

Amjad ve Alotaibi [24] tarafından yayımlanan çalışmada DZP yüklü biyobozunur ve biyoyumlu özellikteki kitosan nanoparçacıklarının hazırlanması ve fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucu DZP yüklü kitosan nanoparçacıkları, AH tedavisinde biyoyararlanımı artırma ve yan etkileri azaltma potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır [24].

Kim ve arkadaşlarının [146] çalışmasında AH tedavisinde kullanılan donepezilin kontrollü salımını sağlamak amacıyla geniş gözenekli ve aljinat kaplı PLGA (polilaktik-*ko*-glikolik asit) mikroküreler hazırlanmıştır. Mikroküreler biyoyumlu bulunmuş ve hücrel toksisite göstermemiştir. PLGA mikroküreler, AH'nin tedavisinde DZP'nin doz sıklığını azaltmak ve tedavi etkinliğini artırmak için umut verici bir yaklaşım olduğu öne sürülmektedir [146].

Mohamadpour ve arkadaşlarının [147] yaptığı çalışma AH ve demans tedavisinde kullanılan bir AChE inhibitörü olan rivastigminin sınırlı beyin penetrasyonu, kısa yarılanma ömrü ve gastrointestinal yan etkilerini iyileştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada, rivastigminin beyne hedefli taşınması için metoksi poli(etilen glikol)-*ko*-poli(ϵ -kaprolakton) (mPEG-PCL) nanoparçacıklarının hazırlanması ve optimizasyonunun ardından etkinliği değerlendirilmiştir. Yapılan *in vitro* salım testleri ve *in vivo* fare modellerinde rivastigminin beyin penetrasyonu ve farmakokinetik profili ile beyin dağılımı incelenmiştir. KBB'yi geçiş etkinliği, yarılanma ömrünü artışıyla serbest rivastigmine kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışma, rivastigminin beyin hedeflemesini artırarak farmakokinetik, farmakodinamik

profillerini iyileştirmiş ve mPEG-PCL nanoparçacıklarının AH'de rivastigmin taşıyıcısı olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır [147].

Prakash ve arkadaşları [148] tarafından yine rivastigmin ile yapılan çalışmada, rivastigmin yüklü PEG-PLGA nanoparçacıklarının hazırlanmış, *in vitro* ve *in vivo* performanslarının değerlendirilmesiyle, rivastigminin beyin hedeflemesini artırılması ve tedavi etkinliğini geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyonların ardından histolojik analizlerde, rivastigmin yüklü nanoparçacıkların nöronal dejenerasyonu azalttığı ve amiloid beta birikimini sınırladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak PEG-PLGA bazlı rivastigmin nanoparçacıkları, AH'nin tedavisinde etkili bir ilaç taşıyıcı platform olduğu belirtilmiştir [148].

Gangopadhyay ve arkadaşlarının [149] yakın tarihli bir çalışmasında DZP'nin oral uygulamada düşük beyin penetrasyonu, ilk geçiş etkisi ve yan etkileri sınırlayıcılığının iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada intranazal yol, KBB'yi doğrudan aşarak beyne ilaç taşınmasını kolaylaştırabileceği düşünüldüğünden, intranazal uygulama için bir jel formülasyonu geliştirilmiş ve etkinliği değerlendirilmiştir. Yapılan *ex vivo* ve farmakokinetik analizler ile intranazal yolun oral uygulamaya kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir. Klinik potansiyeli açısından DZP'nin beyne doğrudan taşınmasını sağlayarak terapötik etkinliği artırabilir ve yan etkileri azaltabilmesiyle AH'de etkili bir ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir [149].

Espinoza ve arkadaşlarının [150] benzer bir çalışmasında yine DZP, yüklü çeşitli nazal formülasyonların (örn. hidrojeller, nanopartiküler sistemler) etkinliği karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir ve en uygun nazal uygulama sistemini belirlemeyi amaçlamaktadır. DZP, farklı nazal ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmiş *ex vivo* ve *in vitro* değerlendirilmesiyle nanopartiküler sistemler, partikül boyutlarının küçük olması (~100-200 nm) nedeniyle mukozadan daha etkin bir geçiş göstermiştir. Hidrojeller ise daha stabil ve kolay uygulanabilir bir alternatif sunmuş fakat nanopartiküler sistemler, DZP'nin beyne hedefli taşınmasında en etkili formülasyon olarak belirlenmiştir [150].

PLGA dışında farklı polimerler kullanılarak yapılan çalışmalar da rapor edilmiştir. Örneğin, bir çalışmada polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş polimerik nanopartiküller (P(HDCA-*ko*-MePEGCA)) A β 1-42 peptidine karşı afinite göstermiştir. Anti-A β 1-42 nanopartiküllerle yapılan tedavi, Alzheimer farelerinde amiloid yükünü azaltmış ve hafıza işlevlerini iyileştirmiştir. Uygulama, çözünmeyen

A β birikiminde anlamlı bir azalma sağlayamazken, çözümler A β 1–40 ve A β 1–42 seviyelerini %20 oranında azalma sağlanmıştır [85].

Literatürde yer alan MSS'ye yönelik hedefli ilaç dağıtım alanlarında yapılan en son çalışmalar, KBB'yi aşmak için nanoteknoloji ile geliştirilen nanopartiküllerin etkin ve etkili ilaç taşıyıcılar olarak kullanımını potansiyeli olduğu yönündedir [126].

Nanoteknoloji ile geliştirilen nanoparçacıkların, tanı ve tedavi süreçlerindeki önemli potansiyeli vardır [151]. Nanoparçacıklar, boyutları nedeniyle benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikler, yüzey alanının büyük olması, hedef moleküllerle etkileşim kabiliyeti ve optik özelliklerdeki değişikliklerle biyolojik ortamda yüksek kararlılık sergileyebilir ve biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Nanoparçacıklar, hem biyolojik süreçlerin anlaşılmasında hem de terapötik ve teşhis yaklaşımlarında önemli bir role sahiptir [151].

Nanoteknolojinin tıp ve biyoteknoloji alanındaki dönüşümsel etkisi giderek önem kazanmaktadır. Özellikle nanoparçacıkların gelişmiş ilaç taşıma sistemlerinde, terapötik ajanlarda, tanısal araçlarda ve görüntüleme tekniklerinde sunduğu faydalar bilinmektedir. Başlıca nanoparçacık türlerinden polimerik nanoparçacıklar kontrollü salım ve hedefleme kabiliyeti sunar. Nanoparçacık teknolojisi, tıpta kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının temelini oluşturabilecek öneme ve potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, bazı zorlukların aşılması ve güvenliğin artırılması adına geniş bir çalışma alanı mevcuttur [152].

2.3 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji, genel olarak 100 nm veya daha küçük ölçeklerdeki moleküllerle ilgilenen bilim dalıdır. Farklı disiplinleri bir arada tutan nanoteknoloji, sağlık, enerji ve elektronik gibi alanlarda araştırmaları kapsamaktadır. Moleküler ölçekte hastalıkların teşhisi, önlenmesi ve tedavisi için özel tıbbi alandaki uygulama alanı nanotıptır. İlaç taşıyıcı nanosistemler, nanotıbbın önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Nanoteknoloji nanotıpta kullanılması sayesinde, suda zayıf çözümlüğe sahip ilaçların vücutta dolaşımını artırılabilir, ilaçlar belirli bir hücreye veya dokuya hedeflenebilir, ilaçlar vücuttaki sıkı epitel ve endotel bariyerlerden geçirilebilir, büyük makromolekül ilaçlar hücre içi etki bölgelerine taşınabilir, kombine tedavi için iki veya daha fazla terapötik ajan bir arada uygulanabilir ve terapötik ajanlar ile görüntüleme

ajanlarının bir arada uygulanması yoluyla ilacın vücutta ulaştığı özel bölgeler gözlemlenebilir [153]. Organik ve inorganik yapılar, nano ölçekli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılabilir. Organik nanopartiküller, polimer bazlı nanopartiküller ve lipit bazlı nanopartiküller gibi yapılardan oluşurken, inorganik nanopartiküller arasında altın nanopartiküller, karbon nanotüpler ve kuantum noktalar gibi yapılar yer almaktadır. Organik nanopartiküller arasında miseller, lipozomlar, katı lipit nanopartiküller ve dendrimerler bulunur. Polimer bazlı nanopartiküller adına polimer konjugat kompleksleri, polimerik miseller ve dendrimerler dahil olmak üzere birçok türde polimerik nanopartikül geliştirilmektedir [154].

Polimerik ilaçların tarihi 1960'lara kadar uzanır; bu dönemde bir polimerik ilaç ilk kez klinik denemelere girmiştir. 1970'lerin sonlarında, Kopf ve arkadaşları, polimerik nanopartiküler bir taşıyıcının ilk kez hazırlanışını rapor etmiştir [155, 156]. Takip eden yıllarda sağlıklı dokulardaki olası yan etkileri en aza indirmek, ilacın doğru zamanda kontrollü ve uzun süreli salımını sağlamak, ilacın etkinliğini optimize etmek ve toksik etkilerini azaltmak için biyouyumlu ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir [157]. Polimerler ilaç taşıma uygulamalarında terapötik faydalar sağlamak amacıyla kontrollü ilaç salımı, ayarlanabilir farmakokinetik ve biyodağılım profili, geliştirilmiş ilaç güvenliği gibi avantajlar sunmaktadır [158].

2.3.1 Polimerler

Polimerler, monomer adı verilen küçük moleküllerin kimyasal bağlarla birbirine bağlanarak oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı maddeler olarak tanımlanır. Bu yapılanma, makromoleküller olarak da bilinen polimerlerin benzersiz fiziksel özelliklere sahip olmasını sağlar [159, 160].

Tablo 2.4'te yer alan sınıflandırmaya ek olarak polimerlerin monomer çeşitliliğine göre sınıflandırılması ise aşağıdaki gibidir.

Homopolimerler: Tek bir tür monomerin tekrar ederek oluşturduğu polimerlerdir. Örneğin polietilen (PE) sadece etilen monomerlerinden oluşur, polipropilen (PP) tek tip propilen monomerlerinden oluşur, polistiren (PS) sadece stiren birimlerinden oluşur.

Kopolimerler: İki veya daha fazla farklı monomerin bir araya gelmesiyle oluşan polimerlerdir. Kopolimerler, homopolimerlerin sınırlı özelliklerini aşmak için tasarlanır. Örneğin, mekanik dayanım veya kimyasal direnç açısından farklı avantajlar

sunar. Kopolimerler monomerlerin düzen ve dizilimlerine göre Şu tŐrlere ayrılır: monomerler belirli bir sırayla dizildiği alternatif kopolimerler, aynı tŐr monomer bloklar halinde gruplandığı blok kopolimerler, monomerlerin rastgele bir Şekilde polimer zincirine bağlanmasıyla oluşan rastgele (dŐzensiz) kopolimerler, monomerler arasında çapraz bağlarla bir ağ yapısı oluşturduğu ağımsal (apraz bağlı) kopolimerler [161, 162].

Amfifilik kopolimerler ise iki veya daha fazla farklı tŐrde monomer içeren polimer zincirleri kopolimer tŐrŐdŐr. İçerdikleri farklı tŐrde monomerler arasındaki yapısal farklılıklar, polimer zincirine çeşitli özellikler kazandırarak avantajlar sağlar. Örneğin, artmış stabilite, iyileştirilmiş özŐnŐrlŐk, gelişmiş mekanik dayanım gibi fiziksel zellikler Őzerinde önemli etkiler sağlar. İki veya daha fazla tŐrde monomerde oluşan hidrofobik ve hidrofilik polimer zincirleri, içeriğinde olan monomerlerin özelliklerini taŐıyarak belirli bir etkileşim sergiler ve bu etkileŐimler polimerin faz davranıŐını belirler [163, 164]. Kopolimerler genel olarak meydana geldikleri polimer zincirdeki monomerlerin yoğunluğu veya diziliŐ Őekline göre sınıflandırılabilir. Alternatif, rastgele, blok, yıldız biçimli ve aŐı kopolimerleri, temel olarak tanımlanmış polimer mimarilerindedir [165, 166]. Kopolimerlerin oluŐtuđu polimer zincirindeki monomere bağlı birimlerin dŐzenlenme Şekli, çeşitli uygulamalar için etkili olan birbirinden farklı özellikte yapılar oluŐturmayı sağlar.

Tablo 2.4 : Polimerin sınıflandırılması [162].

Kriter	Polimer Türleri	Örnekler
Kaynaklarına Göre	- Doğal Polimerler - Sentetik Polimerler	-Selüloz, nişasta, doğal kauçuk -PVC, polietilen, naylon, polyester
Yapısal Özelliklerine Göre	- Doğrusal Polimerler - Dallanmış Polimerler -Ağ Yapılı (Çapraz Bağlı) Polimerler	-HDPE (yüksek yoğunluklu polietilen) -LDPE (düşük yoğunluklu polietilen) - Vulkanize kauçuk, epoksi reçineleri
Fiziksel Özelliklerine Göre	- Termoplastikler - Termosetler - Elastomerler	-Polistiren, PVC -Fenol-formaldehit reçineleri -Doğal kauçuk, sentetik kauçuk
Polimerizasyon Yöntemlerine Göre	- Adisyon Polimerizasyonu - Kondenzasyon Polimerizasyonu - Ekzotermik Polimerizasyon - Endotermik Polimerizasyon	Polietilen, polipropilen -Poliester, poliamid (naylon) -Isı açığa çıkan polimerizasyon tepkimeleri -Isı alarak gerçekleşen polimerizasyon tepkimeleri
Uygulama Alanlarına Göre	- Plastik Malzemeler - Fiber ve Tekstil Polimerleri -Biyomedikal Polimerler	-Ambalaj, otomotiv, inşaat malzemeleri - Naylon, polyester, akrilik - Protezler, ilaç taşıma sistemleri

Bunun yanı sıra oluşan sistemin farklı kopolimerlerle uyumlu hale getirilerek ve işlevselliği artırılarak çeşitli modifikasyonların yapılmasını mümkün kılar. Bu oluşum mekanizması kopolimerlerin neredeyse sayısız şekilde çeşitlendirilmesine ve geliştirilmesine olanak sağlar [167, 168]. Farklı yapısal özellik ve davranışa sahip monomer içeriği ile elde edilen blok kopolimerlerde uygun koşullarda amfifilik moleküllerin kendiliğinden birleşebilme özelliği, nanometre boyutunda yapılar oluşturmak için elverişlidir [169]. Bu amaçla geliştirilen kontrollü polimerizasyon

yöntemleri ile iyi tanımlanmış polimer yapılarının tasarımı ve sentezi yapılabilmektedir. Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer radikal polimerizasyonu (RAFT), atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ve nitroksit-aracılı radikal polimerizasyonu (NMP) gibi çok bilinen ve uygulanan kontrollü radikal polimerizasyon yöntemleri sayesinde, farklı yapılarda ve farklı özelliklerde geniş bir çeşitlilikte polimerik yapıları oluşturulabilir. Bu yöntemlerle özellikle fonksiyonel birimlerin eklenmesiyle yapılabilecek modifikasyonlarla molekül ağırlığının kontrol edilebilmesi ve düşük polidispersitenin elde edilmesi gibi önemli avantajlar sağlar [168].

2.3.2 Polimerizasyon

Kopolimer oluşturmak için kullanılan polimerizasyon mekanizması ve sentez yöntemi, kopolimer zincirlerindeki monomer moleküllerinin düzenini etkiler. Polimerlerin sentezinde kullanılan yöntemler iki gruba ayrılabilir: katılma (zincir büyümesi), kondenzasyon (basamaklı) polimerizasyon [170, 171].

2.3.2.1 Katılma (zincir büyümesi) polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonu yönteminde, doymamış çift bağlar içeren bileşikler kullanılır. Bu bileşikler, serbest radikal veya iyonik başlatıcılarla polimerizasyonu başlatacak ve sürdürecektir aktif bölgelere sahip olma yeteneğine sahiptir. Katılma polimerizasyonları başlatma, ilerleme ve sonlanma adımlarını takip ederek, aktif bölgelerin nötralize edilmesiyle sona erer. Monomerlerin aktif merkezlere birer birer bağlanması nedeniyle, reaksiyon sırasında ortamda bulunan monomer konsantrasyonu azalır. Yüksek verim elde etmek için polimerizasyon süresi uzatılmalıdır, ancak reaksiyon sırasında molekül ağırlığında bir artış olmaz. Katılma polimerizasyonunun en büyük dezavantajı, özellikle molekül ağırlığının ve molekül ağırlığı dağılımının kontrol edilmesindeki zorluklardır [172].

2.3.2.2 Kondenzasyon (basamaklı) polimerizasyonu

Kondenzasyon polimerizasyonlarında, polimerler, monomerlerin esterleşme veya amidleşme gibi reaksiyonlarıyla oluşur. Bu monomerler, genellikle $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ gibi en az iki fonksiyonel grup taşıyan yapılardır ve bu reaksiyonlar sırasında H_2O , NH_3 , CO_2 gibi küçük moleküller açığa çıkar [161, 170, 171]. Polimerizasyonda, fonksiyonel grupların türüne bağlı olarak, bazen asit veya alkali bir katalizör

kullanılması gerekebilir. Ekleme polimerizasyonundan farklı olarak, kondenzasyon polimerizasyonunda molekül ağırlığı polimerizasyon sırasında sürekli artar, bu da uzun polimerizasyon sürelerini gerekli kılar. Polimerizasyon tamamlandığında, ortamda her boyutta molekül bulunur, ancak artık monomer kalmaz [172].

2.3.2.3 Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon

Polimerlerin sentezlenmesi sırasında, kullanım alanına bağlı olarak, polimerin yapısında, fonksiyonunda ve bileşiminde istenilen değişiklikleri yapabilme imkanı sayesinde son yıllarda bu alandaki araştırmacılar arasında popüler hale gelmiştir. Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon iyi tanımlanmış karmaşık makromoleküler yapıların sentezi için nispeten basit ve etkili bir yöntemdir [173]. Yaşayan kontrollü polimerizasyon, geleneksel radikal polimerizasyonlara kıyasla zincir büyümesini kontrol ederek polimer mimarisini hassas bir şekilde düzenlemeye olanak tanır [174]. Kontrollü mimari, molekül ağırlığı kontrolü, uç grup kontrolü, blok kopolimer oluşturma yeteneği ve yaşayan yapıların elde edilmesi konusunda en yaygın kullanılan kontrollü polimerizasyon teknikleri ise ATRP, NMP ve RAFT polimerizasyonlarıdır [172].

Üç temel yaşayan kontrollü polimerizasyon tekniği olarak:

1. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP): Polimer zincirlerinin büyümesini kontrol etmek için bir geçiş metali (örneğin, bakır) kullanır. Zincir uçlarındaki aktif radikaller, metalle kompleksleşme yoluyla stabilize edilir.
2. Nitroksit-aracılı radikal polimerizasyonu (NMP): Nitroksit radikal türleri, zincir büyümesini kontrol eder. Bu yöntemde polimerizasyon kinetiği nispeten yavaştır ancak mükemmel zincir uzunluğu kontrolü sağlar.
3. Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer radikal polimerizasyonu (RAFT): RAFT, tiyokarbonil bazlı bir ajan aracılığıyla zincir büyümesini kontrol eder. Geniş bir monomer yelpazesi sunar ve polimer mimarilerinin kontrolünde yüksek esneklik sağlar.

Yaşayan kontrollü radikal polimerizasyon, geleneksel radikal polimerizasyonun aksine, polimer zincir uzunluğu ve mimarisinin hassas kontrolüne olanak tanır. Bu tekniklerde, radikal türleri sürekli olarak kontrol edilerek zincir büyümesi sırasında yan reaksiyonlar (örneğin zincir sonlanması veya transferi) en aza indirilir [175].

2.3.3 Tersinir katılma-ayırma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT)

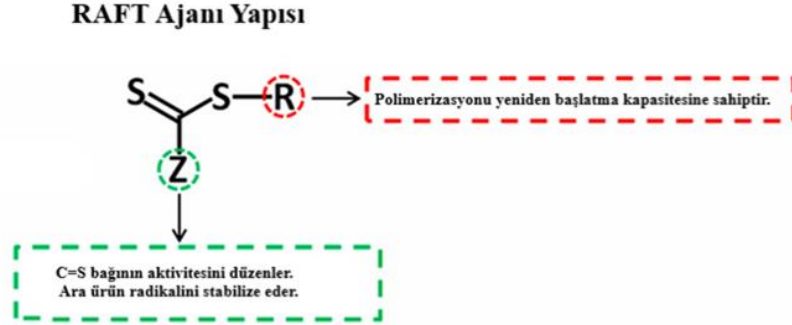
RAFT polimerizasyonu, 1998 yılında geliştirilmiştir [176]. RAFT tekniğinin geliştirilmesi, kontrollü yaşayan serbest radikal polimerizasyon alanında önemli bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir ve bu yöntemin temel ilkeleri, zincir transfer ajanlarının kullanımıyla serbest radikal polimerizasyonuna yeni bir boyut kazandırmıştır [176]. RAFT polimerizasyonu, "yaşayan serbest radikal polimerizasyon" olarak tanımlanan bir yöntemdir. Bu süreç, serbest radikal polimerizasyonunun avantajlarını, kontrollü/yaşayan polimerizasyon teknikleriyle birleştirir. RAFT, monomerlerin polimer zincirlerine kontrollü bir şekilde eklenmesine olanak tanıyabilmektedir. Bu özellik, polimerlerin molekül ağırlığının ve uç gruplarının yüksek hassasiyetle kontrol edilmesini sağlar. Sistemin temelinde, bir zincir transfer ajanı kullanılarak radikal reaksiyonlarının kontrol altına alınması yer alır. Bu ajan, zincir büyümesi sırasında oluşan aktif radikallerin yoğunluğunu düzenler ve zincir transferi mekanizması yoluyla polimerizasyon kinetiklerini stabilize eder. RAFT süreci, geniş monomer seçeneklerine sahiptir ve polimerlerin farklı fonksiyonel gruplar ve karmaşık yapılarla tasarlanmasına imkan tanır [176]. Bu polimerizasyon yönteminde, reaksiyon kinetiğini, polimer yapısını ve polimerizasyonun son ürünlerini kontrol etmek için RAFT ajanı olarak adlandırılan bir zincir transfer ajanı kullanılır. RAFT polimerizasyonunun kontrollü olması, zincir transfer reaksiyonlarına bağlıdır [177].

RAFT polimerizasyonu çok çeşitli avantajlar sunar. Bunlardan bazıları monomer seçiminde sunduğu çeşitliliştir. RAFT yöntemi, geniş bir monomer yelpazesine sahip olmasıyla polimer mimarisinde çeşitlilik sağlamak mümkündür. Ayrıca blok kopolimerler, yıldız polimerler, dallanmış polimerler gibi karmaşık polimer yapıları üretilebilir. RAFT, polimerlerin moleküler ağırlığını ve dağılımını hassas bir şekilde kontrol ederek daha tutarlı ve dar polidispersiteye sahip malzemeler kolay üretme imkanı sağlar [177]. RAFT polimerizasyonunun temel bileşenleri; monomer, başlatıcı ve raft ajanıdır.

Monomer: RAFT polimerizasyonunda serbest radikal polimerizasyonu ile polimerleşebilen birçok monomer için kullanılabilir.

Başlatıcı: Tersinir zincir transferi sırasında yeni radikaller üretilmediğinden, serbest radikal oluşturma yöntemleri kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan termal

başlatıcıların yanı sıra, redoks, foto, plazma ve iyonlaştırıcı radyasyon başlatıcıları da kullanılabilir [178-180].



Şekil 2.13 : RAFT ajanı yapısı [181].

RAFT Ajanı: RAFT ajanları, polimerizasyonun etkinliği ve kontrolü açısından kritik öneme sahiptir. RAFT ajanının kimyasal yapısı (Şekil 2.13), polimerizasyon sürecinin etkinliğini ve kontrollü bir şekilde gerçekleşmesini belirler. Özellikle tiyokarboniltil grubu içeren bileşikler, dengeli bir reaktivite ve kararlılık sağlar. RAFT ajanı (genellikle tiyokarboniltil yapılar), büyüyen polimer zinciri ile etkileşime girer ve bir ara ürün oluşturur. Bu süreçte ekleme-parçalanma dengesi kurulur. Temel olarak tiyokarboniltil gruplarını içeren bileşiklerdir. Yapısında bulunan Z grubu: RAFT ajanının elektron yoğunluğunu ve stabilitesini belirler. R grubu: polimer zinciri transfer kapasitesini etkiler. RAFT ajanının yapısı, kullanılan monomer türüne ve hedeflenen polimer yapısına göre optimize edilebilir [177, 182]. RAFT polimerizasyonunda zincir transfer ajanı, polimerizasyon reaksiyonunda molekül ağırlığının kontrol altında tutulmasını sağlar. RAFT polimerizasyonu için en çok tercih edilen ajan, ditiyoester türevleridir. RAFT ajanı, radikallerin eklenmesine izin veren reaktif bir S=C çift bağı, radikallerin reaktivitesini etkileyen bir Z grubu ve yapıdan ayrılan ve yeni bir zinciri başlatma özelliğine sahip bir R grubundan oluşur (Şekil 2.14) [183].

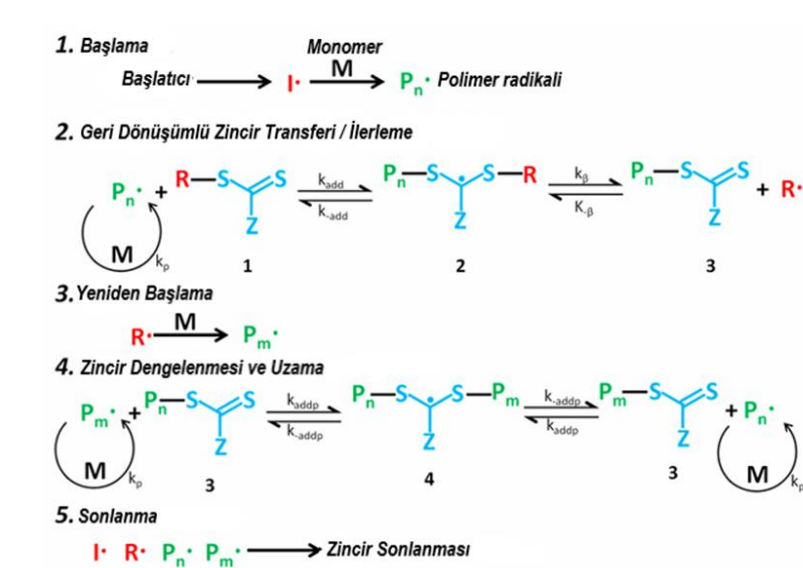
2.3.3.1 RAFT polimerizasyon adımları

RAFT polimerizasyon tekniği ile polimer zincir uzunluğunun hassas şekilde kontrol edilmesini sağlar. RAFT, çeşitli monomerlerle uyumludur ve blok kopolimerler gibi karmaşık yapıların üretiminde etkilidir. Temel reaksiyon mekanizması, bir radikal kaynağı, monomerler ve bir RAFT ajanı (genellikle ditiyobenzoat veya tritiyokarbonat

türevleri) içermektedir [184]. Bu ajanlar, zincir transfer reaksiyonları aracılığıyla polimerizasyonun kontrol edilmesini sağlar. RAFT polimerizasyon aşamaları; ilk olarak başlatma adımı: serbest radikaller, geleneksel bir başlatıcı (örneğin, AIBN) kullanılarak üretilir ardından zincir transferi adımı: RAFT ajanı, aktif zincir radikalini stabilize eder ve kontrollü şekilde monomer eklenmesini sağlar. Devamında gelen zincir uzaması ve dengelenme adımı: monomerler, RAFT aracısına bağlanarak polimer zincirine dahil edilir. Dengelemede aktif ve "uyuyan" zincir uçları arasında bir denge kurulur, bu da kontrolü sağlar. Son adım olarak zincir sonlanması adımı gerçekleşir (Şekil 2.14) [185].

RAFT Polimerizasyon Aşamaları

1. Başlama : Geleneksel bir radikal başlatıcı (örneğin 2,2'-Azobis(2-metilpropionitril) (AIBN)) kullanılarak serbest radikaller oluşturulur ve monomer ile reaksiyon başlatılır [186]. Başlatıcı, bir serbest radikal üretir. Bu radikal, monomer molekülleri ile reaksiyona girerek polimerizasyonu başlatır. Monomerden elde edilen propagasyon radikali ($P_n\cdot$), RAFT ajanına (RSC(Z)S) eklenir ve bir geçiş radikali oluşturur.



Şekil 2.14 : Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT) mekanizması [181].

2. Katılma-Ayrışma Dengesi: RAFT ajanı (genellikle bir tiyokarboniltiyo bileşiği) ile reaksiyon gerçekleşir. Bu süreç, polimerizasyonun kontrolünü sağlayan temel adımdır. RAFT ajanı: Kontrollü zincir büyümesini sağlar ve radikal konsantrasyonunu dengeler [186]. $P_n\cdot$ radikali, RAFT ajanı ile reaksiyona girerek ara bir radikal oluşturur. Bu ara

radikal daha sonra fragmente olur ve yeni bir serbest radikal ($R\bullet$) açığa çıkar. Açığa çıkan $R\bullet$ radikali, başka bir monomer ile reaksiyona girerek yeni bir propagasyon radikali ($P_m\bullet$) oluşturur. Bu aşamada, aktif propagasyon radikalleri ($P_n\bullet$ ve $P_m\bullet$) ile "uyuyan" RAFT zincir transfer bileşikleri arasında hızlı bir denge kurulur. Bu denge, tüm zincirlerin eşit büyüme şansına sahip olmasını sağlar ve dar molekül ağırlığı dağılımı ile polimer oluşumuna olanak tanır [187].

3. Polimer Zincirlerinin Uzaması: Kontrollü zincir büyümesi, istenilen polimer yapısının elde edilmesine olanak tanır. Tipik olarak, düşük sonlanma oranlarıyla polimerizasyon sona erer [186]. RAFT polimerizasyonunda, monomerler kontrollü bir şekilde polimer zincirine eklenir. Bu süreç, zincirlerin homojen bir şekilde büyümesini sağlar. RAFT ajanı, serbest radikal üretimini kontrol ederek zincir transferini optimize eder ve "yaşayan" polimerizasyon karakteristiği kazandırır. RAFT ajanı, büyüyen radikallerle reaksiyona girerek ara ürün oluşturur. Bu ara ürün, aktif radikaller oluşturmak üzere parçalanır [181, 187].

4. Sonlanma: Polimerizasyon sırasında serbest radikal-radikal sonlanması meydana gelebilir. Ancak, RAFT ajanı bu olasılığı en aza indirir. Polimerizasyonun sonunda, polimerlerin büyük bir kısmı tiyokarboniltiyo (RAFT türevli) uç gruplarını korur ve bu sayede blok kopolimerlerin veya fonksiyonel polimerlerin sentezi için uygun hale gelir. Bu mekanizma, RAFT ajanının etkin bir transfer ajanı olarak davranması ve monomer tüketimi sırasında dengeli bir şekilde molekül ağırlık dağılımını kontrol etmesine dayanır [187].

RAFT polimerizasyonu, önemli avantajlara sahiptir ve bunların başında polimerlerin uç gruplarını kontrol etme olanağı sunması gelir. Bu, çeşitli uygulamalara yönelik özelleştirilmiş spesifik polimerler üretmek için önemlidir [188]. RAFT, geniş bir monomer yelpazesıyla uyumludur. Akrilatlar, metakrilatlar, stiren türevleri ve vinil monomerler gibi çeşitli türlerle çalışabilir. Polimer mimarisinin kontrolü sağlanarak blok kopolimerler, yıldız polimerler, yan zincirli polimerler ve diğer kompleks yapıların sentezlenebilmesine olanak tanır. Polimer zincir uzunluğu ve polimerlerin molekül ağırlık dağılımı (polidispersite indeksi) hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Geleneksel radikal polimerizasyon ekipmanlarıyla kolayca entegre edilebilir olması uygulamada büyük kolaylık sağlar [189].

RAFT polimerizasyonu bir çok avantajlarının yanı sıra bazı sınırlamalara da sahiptir. RAFT ajanının seçiminde bazı sınırlamalar mevcuttur. RAFT ajanlarının monomer tipine uygun olarak dikkatlice seçilmesi gerekir. Yanlış seçim, polimerizasyon verimini düşürebilir. RAFT ürünleri genellikle renkli veya kokulu olur, bu da bazı uygulamalarda sınırlamalara neden olabilir. RAFT polimerizasyonunda reaksiyon kinetiği, monomer tipine ve RAFT ajanına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir ve bu durum kinetik zorluğa neden olabilir [189].

RAFT polimerizasyonun çok geniş uygulama alanları mevcuttur örneğin biyomedikal uygulamalarda ilaç taşıma sistemleri, biyoyumlu kaplamalar ve doku mühendisliği materyalleri ve pH, sıcaklık veya iyonik değişikliklere duyarlı malzemelerden elde edilen akıllı polimerlerin geliştirilmesi gibi. Endüstriyel ürünlerde ve de nanoteknolojide fonksiyonel nanoparçacık kaplamaları ve nanokapsüller de elde edilmesi gibi kullanımları mevcuttur [189, 190]. RAFT işlemi, radikal polimerizasyonuna özgü reaktiviteyi korurken, moleküler tasarımı optimize etmek için yüksek kontrol imkanı sunar. RAFT ile sentezlenen polimerler, biyolojik sistemlere uygun yüzey özellikleri ve biyolojik bozunabilirlik gösterebilir. Bu, biyomateryal uygulamalarında önemli bir avantajdır. Polimerlerin molekül ağırlıklarının ve fonksiyonel gruplarının kontrolü sayesinde biyoyum artırılabilir. RAFT polimerizasyonu ile spesifik hedeflere yönlendirilebilecek polimerler sentezlenebilir. Örneğin, ilaç taşıyıcıları olarak kullanılacak polimerler, spesifik hücre reseptörlerini tanıyacak şekilde fonksiyonlandırılabilir. RAFT, çeşitli fonksiyonel grupları kolayca polimere dahil etme imkanı sunar. Bu, ilaç taşıma sistemlerinde aktif madde salım kinetiklerinin kontrolü gibi alanlarda büyük bir avantaj sağlar. RAFT ile hazırlanan polimerler, kontrollü ilaç salımı sağlayabilir [191]. RAFT polimerizasyonu, hem ilaç taşıma hem de tanı (theranostics) uygulamaları için çok işlevli nanotaşıyıcıların hazırlanmasını kolaylaştırır. Örneğin ilaç taşıma sistem olarak hassas yükleme ve salım kontrolü sağlayan polimerik misellerin çekirdek kısmındaki kimyasal özellikler, farklı tür ilaçların yüklenmesine olanak tanır ve ilaç salımını kontrollü bir şekilde yapar. RAFT polimerizasyonu, bloktaki segment uzunluğunu ve kompozisyonunu hassas bir şekilde kontrol edebilir, böylece misellerin boyutu, morfolojisi ve ilaç yükleme kapasitesi optimize edilebilir.

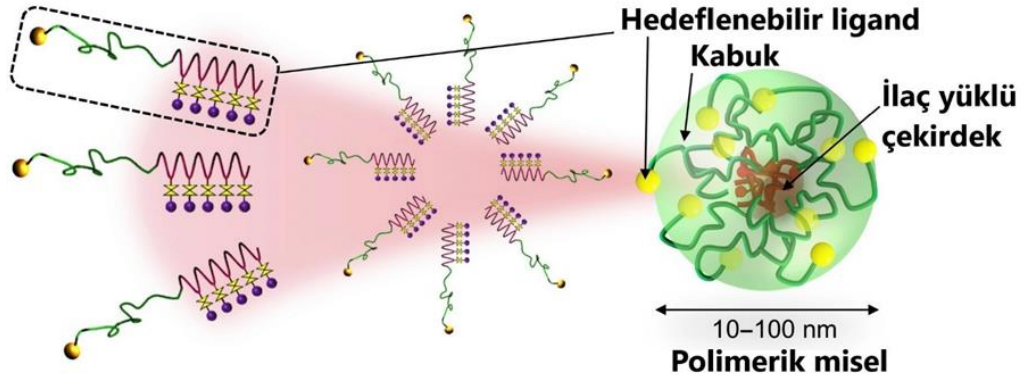
2.4 Polimerik Miseller ve Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

20. yüzyılın ikinci yarısında biyopolimerlerin kullanımı, ilaç salımını daha kontrollü hale getirmiştir. Polimerik sistemler, ilaçların kontrollü ve yavaş salımını sağlayarak bu alanda önemli bir yenilik sunmaktadır. Günümüzde ilaç taşıma sistemleri, salımın kontrollü, hedefe yönelik ve zamanlanmış olmasını sağlamak için gelişmiştir. Bu sistemler, daha iyi biyoyararlanım, uzun süreli dolaşım ve etkin hedefleme sağlamaktadır [192]. Polimerik miseller, ilaç taşıyıcı sistemler olarak, biyoyumlu oldukları amfifilik özellikleri, kendiliğinden oluşmaları ve kolay kontrol edilebilir farmakolojik özellikleri ile dikkat çekmeye başlamıştır [193, 194]. Çünkü bu yapılar ilaçların zamana bağlı veya çevresel koşullara duyarlı şekilde salımını kontrol etme avantajı sunarlar. Salım, hem ilacın etkinliğini artırır hem de yan etkileri en aza indirir [195].

Polimerik miseller, modern ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde güçlü bir araç olarak kabul edilmektedir. Miseller, belirli konsantrasyonun (kritik misel konsantrasyonu) üzerinde, amfifilik moleküllerin (hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlar içeren) sulu bir ortamda kendiliğinden düzenlenmesiyle oluşan nano ölçekli yapılar olarak tanımlanır. Hidrofobik çekirdek ve hidrofilik kabuktan oluşan misel yapısı, suda çözünmeyen veya düşük çözünürlüklü ilaçların taşınması için benzersiz bir fırsat sunar [196].

Amfifilik blok polimerin yapısında bulunan hidrofilik ve hidrofobik kısımların etkileşimleriyle kendiliğinden oluşan misel yapılarını oluşturması için ortamdaki polimer konsantrasyonu belirli bir orana ulaşması gerekmektedir. Misel yapılarını oluşturacak yeterli miktarda polimer belli bir oranda bir araya gelir. Bu oran, kritik misel konsantrasyonudur (KMK) [219].

RAFT polimerizasyonu, özellikle blok kopolimerlerin sentezi için idealdir. Amfifilik blok kopolimerler, hem hidrofobik hem de hidrofilik segmentlere sahiptir. Bu, misel oluşumu için gereklidir. Misel oluşumunda amfifilik kopolimerler, sulu ortamda kendiliğinden toplanarak çekirdek-kabuk yapısında miseller oluşturur. Hidrofobik çekirdek: Genellikle hidrofobik ilaçların yüklenmesi ve korunması için bir depo görevi görür. Hidrofilik kabuk: Miselin kararlılığını artırır ve dolaşım sırasında biyolojik ortamlarla etkileşimini kontrol eder (Şekil 2.15) [197].



Şekil 2.15 : Nano boyutlu ilaç taşıyıcıları olarak blok kopolimerler ile oluşturulan polimerik miseller [198].

2.4.1 Polimerik misellerin ilaç taşıma ve salım özellikleri

Misel yapısında yer alan hidrofobik çekirdek: zayıf suda çözünür veya çözünmeyen ilaçların yüklenmesi için uygundur. Hidrofilik kabuk ise su bazlı ortamda miselin stabilitesini artırır ve uzun dolaşım sürelerini destekler. Misel boyutu genellikle 10–100 nm arasındadır, bu da damar dışına sızıntıyı ve lenfatik sistemde taşınmayı kolaylaştırır [199] Miseller ilaç taşıyıcı sistemler olarak ilaç yükleme, kontrollü salım, kararlılık ve dolaşım süresi özellikleri açısından değerlendirilebilir.

İlaç Yükleme: Hidrofobik ilaçlar, miselin çekirdeğinde çözünerek enkapsüle edilir. RAFT polimerizasyonu ile çekirdeğin kimyasal özelliklerini kontrol ederek farklı ilaç türlerinin yüklenebilmesi sağlanabilir.

Kontrollü Salım: Miseller, çevresel koşullara (pH, sıcaklık, enzimatik ortam gibi) duyarlı olacak şekilde tasarlanabilir. Bu, ilacın hedef bölgede kontrollü bir şekilde salınmasını sağlar. Örneğin, RAFT polimerizasyonu ile pH-duyarlı segmentler eklenebilir. Bu, miselin asidik bir tümör mikroçevresinde çözülmesini ve ilacın salınmasını tetikleyebilir.

Kararlılık ve Dolaşım Süresi: Polimerik miseller, serum proteinleriyle etkileşimlerini sınırlayarak kan dolaşımında daha uzun süre kalabilir. Örneğin polietilen glikol (PEG) segmentleri gibi hidrofilik bileşenler, miselin immün yanıtı uyarmadan dolaşımında stabil kalmasını sağlayabilir [200].

2.4.2 Polimerik misellerin avantajları

Polimerik misellerler, amfifilik blok kopolimerlerin sulu çözeltilerde kendi kendine bir araya gelmesiyle oluşan çekirdek-kabuk yapısına sahip nanoyapılardır. Bu yapılar, hidrofobik ilaçların sulu ortamlarda çözünürlüğünü artırarak biyoyararlanımını iyileştirebilir. Polimerik misellerin çekirdek kısmı hidrofobik segmentlerden oluşurken, kabuk kısmı hidrofilik segmentlerden oluşur. Bu yapı, ilaçların kararlı bir şekilde taşınmasını ve kontrollü salımını sağlar [201]. Miseller birçok açıdan avantajlara sahiptir. Nanometrik küçük boyutlara sahip olmalarıyla biyolojik engelleri aşmalarını kolaylaştırır ve belirli dokulara erişimlerini artırır. Çok yönlü sistemlerdir; çeşitli ilaç türlerini (küçük moleküller, proteinler, genetik materyal gibi) taşıyabilirler. Hedefe yönelik modifikasyon imkanı sağlayan bir yapıya sahiptir. Miselin yüzeyi, spesifik hedefleme ajanları (antikorlar, aptamerler) ile modifiye edilebilir. Çok fonksiyonlu yapılar elde edilebilmesi mümkündür. Hem teşhiste hem de tedavide eş zamanlı kullanılmak üzere tasarlanabilirler [200].

2.4.3 Polimerik misellerin özellikleri

İlaç taşıyıcı olarak miseller; hidrofobik çekirdeği ile çözünürlüğü düşük olan ilaçları taşıyabilir. Bu, ilacın biyoyararlanımını artırabilir. Kontrollü salım bakımından hidrofobik ilaçların polimerik miseller içinde hapsedilmesi, kontrollü ve hedefe yönelik ilaç salımını sağlar. Biyolojik avantajlarada sahip olan bu sistem düşük toksisite, biyoyumluluk ve uzun dolaşım süreleri gibi nitelikler sağlar. Polimerik miseller, genellikle hidrofobik bir çekirdek (ilaç taşıma işlevini gören) ve hidrofilik bir kabuktan (su ile uyumlu ve biyoyumlu) oluşan blok kopolimerlerle hazırlanır. Blok kopolimerlerin türü, miselin boyutu, stabilitesi ve ilaç salım profili gibi özellikleri belirler [196]. Polimerik miseller amfifilik yapıda olup, hidrofilik ve hidrofobik segmentlerden oluşan amfifilik blok kopolimerlerden türetilir. Bu özellik, misellerin kendiliğinden su ortamında toplanmasını sağlar. Yapısal olarak hidrofobik çekirdek, hidrofobik ilaç moleküllerinin enkapsülasyonunu sağlarken, hidrofilik kabuk, miselin sulu ortamda stabil kalmasını ve dolaşım süresinin uzamasını destekler. Nanometrik boyuta sahip bu sistemler genellikle 10-100 nm arasında değişen boyutları sayesinde pasif hedefleme ile tümör dokusu gibi belirli bölgelere ulaşabilirler [196].

2.4.4 Polimerik misellerim oluşumu

Polimerik miseller, amfifilik blok kopolimerlerin biyouyumlu hidrofobik ve hidrofilik bloklarını içeren, sulu ortamlarda kendiliğinden bir çekirdek-kabuk düzeninde düzenlenmesiyle oluşan, küresel, koloidal yapılardır [202, 203]. Amfifilik blok kopolimerler, belirli bir sıcaklık ve konsantrasyon altında sulu çözeltilerde polimerik zincirler olarak bulunur. Bu kopolimerlerin kendiliğinden düzenlenerek misel oluşturması, entropik olarak belirli bir sıcaklık ve konsantrasyonun üzerinde gerçekleşir [16]. Bu sıcaklık kritik misel sıcaklığı (KMS), konsantrasyon ise kritik misel konsantrasyonu (KMK) olarak adlandırılır [204]. KMK'da, amfifilik blok kopolimerin hidrofobik kısmı sudan uzaklaştırılır ve bir çekirdek-kabuk misel yapısı oluşturur. Teorik olarak, misel oluşumu serbest enerjide bir azalma ile gerçekleşir. Sulu ortamda misel oluştuğunda, amfifilik blok kopolimerin hidrofobik kısmı, sudan kaçma eğilimiyle bir araya gelerek yarı katı bir misel çekirdeği oluştururken, hidrofilik kısım su ile etkileşime girerek hidrojen bağı oluşturur. Bunun sonucunda, sistemin serbest enerjisinde bir azalma meydana gelir ve amfifilik blok kopolimerin hidrofilik kısmı kendiliğinden düzenlenerek kabuk katmanını oluşturur. Bu fazla enerji, hidrofobik kısımların bir araya gelerek Van der Waals etkileşimleri kurmasını teşvik ederek miseli oluşturur [16, 204]. Misellerin oluşumu, bu mekanizma ile belirli konsantrasyonun KMK üzerinde termodinamik stabilite sağlanarak, amfifilik moleküllerin sulu bir ortamda kendiliğinden düzenlenmesiyle oluşan nano ölçekli meydana gelmektedir.

Polimerik misellerin oluşturulması için gerekli amfifilik blok kopolimerlerin sentezi ardından misel oluşum süreci gelir. Polimerik miseller, genellikle hidrofobik bir çekirdek (ilaç taşıma işlevini gören) ve hidrofilik bir kabuktan (su ile uyumlu ve biyouyumlu) oluşan blok kopolimerlerle hazırlanır.

Misel Oluşum Süreci:

Doğrudan Çözme Yöntemi: Amfifilik polimerler uygun bir çözücüye eklenir ve su gibi misel oluşumuna neden olan bir ortam sağlanır.

Solvent Değişirme Yöntemi: Amfifilik kopolimerler, organik bir çözücüde çözülür ve ardından misel oluşumunu teşvik eden bir çözücü (örneğin su) yavaşça eklenir.

Film-Hidrasyon Yöntemi: Polimer bir film oluşturacak şekilde kurutulur ve ardından su gibi bir çözücü ile hidrasyon uygulanır.

Fizikokimyasal Kontrol: pH, sıcaklık ve çözücü karışımı gibi faktörler, misel oluşumunu ve stabilitesini kontrol etmek için kullanılır [196].

2.4.5 Polimerik misellerin karakterizasyonu

Polimerik misellerin stabilitesi, termodinamik ve kinetik stabilite ile ifade edilir ve KMK ve kritik misel sıcaklığına (KMS) bağlıdır. Amfifilik moleküller, sulu çözeltide KMK ve KMS'nin altındaki konsantrasyonlarda polimer zinciri formunda kalırken, bu değerlerin üzerinde misel oluştururlar. Kısacası, polimerik miseller, polimer konsantrasyonu KMK'nin üzerinde olduğunda termodinamik olarak stabil kabul edilir. KMK değeri, blok kopolimerin kimyasal yapısına ve hidrofobik/hidrofilik blok uzunluk oranına bağlıdır; bu oran aynı zamanda misellerin morfolojisinde de etkilidir. Özellikle, hidrofobik bloğun uzunluğunun KMK üzerinde önemli bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Daha uzun hidrofobik zincirler, daha düşük bir KMK'ya yol açar [16, 204]. Genel olarak, düşük KMK değerine sahip amfifilik blok kopolimer miselleri, ortamda düşük amfifilik konsantrasyonlarında bile yüksek stabilite gösterir. Kopolimerin hidrofobikliğin artması KMK'ya düşürür ve misel stabilitesini artırır [204, 205]. İntravenöz uygulama sırasında polimerik miseller, kan dolaşımında yüksek derecede seyreltildiği için (en az 25 kat), uzun süre dolaşımında kalabilmek ve taşıdıkları terapötik ajanları hedef bölgeye ulaştırabilmek için düşük bir KMK'ya sahip olmalıdır. Misel oluşturan polimerlerin konsantrasyonu KMK'nın altında olduğunda, miseller polimerlerine ayrılmaya başlar. Bu durumda, *in vivo* ortamda uzun süre dolaşımında kalamazlar ve taşıdıkları terapötik moleküller hedef bölgeye ulaşamaz. Öte yandan, düşük KMK'ya sahip polimerik miseller, düşük polimer konsantrasyonlarında bile stabil kaldıkları için dolaşımında uzun süre kalabilir ve seyreltmeye karşı nispeten hassas değildir [206, 207]. KMK genellikle yüzey tensiyometresi ve floresan prob teknikleri ile ölçülür. Ayrıca, kritik misel konsantrasyonu; iletkenlik, çözünme deneyleri, ozmometre, diferansiyel taramalı kalorimetre, kromatografi, küçük açılı nötron saçılımı, küçük açılı X-ışını saçılımı ve (NMR) gibi yöntemlerle de ölçülebilmektedir [208]. Sulu çözeltide misel boyutu, hidrodinamik çap olarak ifade edilir ve polidispersite indeksi (PDI), polimerik misellerin homojen dağılım derecesini gösterir. Misel boyutu DLS ile karakterize edilir [209]. PDI, DLS veya GPC ile karakterize edilir. Misellerin boyut ve şekli genellikle transmisyon elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) veya atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi yöntemleri ile belirlenir [210].

Polimerik miselleri oluşturan hidrofobik kısımlar arasındaki bağlar, misellerin stabilitesini sağlar. Hidrofobik özelliklere sahip çekirdek, hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırarak oral biyoyararlanımı artırır. Hidrofobik çekirdekte hapsedilen ilaçların stabilitesinin sulu ortamın yıkıcı etkilerine karşı korunması ve yan etkilerin azaltılması sağlanır. Polimerlerden oluşan hidrofilik kabuk yapısı ise biyoyumluluğu artırır, misellerin kan bileşenleri, spesifik proteinler ve hücreler ile dokularla olan etkileşimlerini azaltır [211].

İdeal bir misel sistemin taşınması gereken özellikler genel olarak şu şekilde sıralanabilir [212]:

Yükleme Kapasitesi: Misel çekirdeği, lipofilik ilaçlar için taşıyıcı alan olarak görev yapar ve uyumluluk faktörüne bağlı olarak yüksek yükleme kapasitesi sağlanmalıdır. Çekirdek ve yük arasındaki uyum Flory-Huggins etkileşim parametresiyle değerlendirilebilir. Daha düşük parametre değeri, daha yüksek uyumluluk ve yükleme kapasitesi anlamına gelir.

Salım Kinetiği: İlacın salım hızı; ilaç ve misel çekirdeği arasındaki etkileşimlerin gücü, çekirdeğin fiziksel durumu, ilacın moleküler hacmi ve misel çekirdeğinin uzunluğu gibi faktörlere bağlıdır. Çekirdek, yüksek yükleme kapasitesine sahip olmalı buna karşın kontrollü ve optimize edilmiş bir salım sağlamalıdır.

Stabilite: Misel sistemleri, termodinamik ve kinetik olarak stabil olmalıdır. KMK düşük olmalı, böylece miseller yüksek dilüsyonlarda bile kararlı kalabilir ve de misel yapısı yavaşça bozulmalıdır. Çekirdeğin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) yüksek olmalıdır bu durumda misel daha kararlı olacaktır.

Boyut ve Boyut Dağılımı: Misellerin boyutu, dolaşım süresi ve biyodağılım üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Boyut 200 nm'nin altında olmalı, böylece retiküloendotelial sistem tarafından yakalanmadan hücrelere ve dokulara girebilmelidir. Böbrek yoluyla vücuttan atılabilmesi için zincir parçalarına ayrılarak moleküler ağırlığının 50.000 Dalton'un altında olması gereklidir.

Kabuk Özellikleri: Misel dış yüzeyi (kabuk), miselin kan dolaşımında stabil kalmasını sağlayan kritik bir yapıdır. Dış yüzey yoğunluğu ve kalınlığı, protein adsorpsiyonunu önleyebilir. Miselin kabuğu, çekirdeği yeterince örterken etkili bir sterik bariyer görevi görmelidir.

Morfoloji: Misel sistemlerinin morfolojik özellikleri (küre, çubuk, vezikül gibi) kullanım alanına göre optimize edilmelidir. Örneğin, aerosol formülasyonları için çubuk şeklindeki miseller daha uygun olabilmektedir [212].



3. MATERYAL ve METOD Malzemeler

4-Siyano-4-[(dodesilsülfaniltiyokarbonil)sülfanil]pentanoik asit (CDTP, min. %97, Strem Chemicals), 4-siyano-4-(fenilkarbontiyoliltiyopentanoik asit (CPCTP, min. %97, Strem Chemicals), folik asit (FA, %97, Sigma), donepezil hidroklorür (Thermo Scientific), poli(etilen glikol) metil eter (mPEG $M_n=5000$, Aldrich), trietilamin (TEA, Sigma-Aldrich). Poli(etilen glikol) metakrilat (PEGMA, ortalama $M_n = 300$, 500-800 ppm MEHQ içerir, Sigma Aldrich), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, %98, 200 ppm monometil eter hidrokinon içerir, Sigma Aldrich), ve *ter*-bütil metakrilat (*t*BMA, Sigma-Aldrich) bazik alümina kolonundan geçirilerek kullanılmıştır. 4-(Dimetilamino)piridin (DMAP, Merck), *N,N'*-disikloheksil karbodiimit (DCC, Alfa Aesar), n-hekzan (Emplura), metanol (CH_3OH , Merck), dietil eter (Chem-Lab), toluen (Merck) ve tetrahidrofur (THF, Merck) ise herhangi bir saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Diklorometan (DCM, Merck) ve *N,N*-dimetilformamit (DMF, +%99.8, Alfa Aesar) 4Å boyutundaki moleküler eleklerle kurutulmuştur. 2,2'-Azobis(2-metilpropionitril) (AIBN, Aldrich) metanol ile kristallendirildikten sonra kullanılmıştır. AlamarBlue® reaktifi (Invitrogen, Karlsruhe, Almanya), (EBMTM-2) (Bulletkit, Lonza, ABD), Tip IV kollajen (RABBIT, Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya, REF 234154), DMEM (Gibco, Darmstadt, Almanya), Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich), penisilin/streptomisin (Calbiochem, Nottingham, İngiltere) ve genetikin (Calbiochem, Nottingham, İngiltere) doğrudan kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrumları, ALPHA Bruker spektrometresinde platin-ATR aksesuarı (elmas kristal) ile kaydedilmiştir. 1H NMR ölçümleri, $CDCl_3$ çözücüsü kullanılarak 500 MHz Bruker NMR cihazında yapılmıştır. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri, Viscotek GPCmax ve 2001

Autosampler sistemi ile yapılmıştır. Bu sistem bir pompa ve Viscotek 3580 kırılma indisi (RI) dedektöründen oluşmaktadır. Üç adet Viscotek GPC kolon (T3000, LT4000L ve LT5000L; iç çap 7.8 mm, uzunluk 300 mm) seri olarak bağlanmış ve bir Tosoh koruma kolonu (TSKgel® HXL-H, kolon boyutu 6 mm iç çap x 4 cm, partikül boyutu 13 µm) kullanılmıştır. Ölçümler, 35 °C'de 1.0 mL/dk akış hızında yapılmış ve çözücü olarak THF kullanılmıştır. Dedektör, dar molekül ağırlık dağılımına sahip polistiren (PS) standartları ile kalibre edilmiş ve veriler Viscotek OmniSEC 4.7.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. DSC ölçümleri, TA marka Discovery DSC 250 cihazında, -80°C ile 180°C arasında, 10°C/dk ısıtma hızında ve azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Misel oluşumu sırasında Sujipuli Technology NE-1600 6-kanallı programlanabilir enjektör pompası kullanılmış ve enjeksiyonlar 19.23 mm çapındaki şırıngalarla 0.5 mL/dk hızla gerçekleştirilmiştir. Misellerin ortalama partikül boyutları ve boyut dağılımları, Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılımı (DLS) cihazı kullanılarak 25 °C'de distile suda ve 173° (geri saçılım) ölçüm açısında belirlenmiştir. Her durumda, beş ölçümün ortalamaları alınmıştır. Polimerik miseller, CHRIST Alpha 3-4 LSC basic liyofilizasyon sistemi kullanılarak dondurularak kurutulmuştur. İlaç enkapsülasyon verimliliği ve ilaç salım çalışmaları için BioTek mikrolaka okuyucu (Synergy™ H1) kullanılmıştır. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) görüntüleri, JEOL JEM-2100PLUS geçirimli elektron mikroskobu ile elde edilmiştir. Örnekler, misel çözeltisinin bir bakır ızgara üzerine dökülmesiyle hazırlanmış, hava ile kurutulmuş ve ardından uranil asetat ile negatif boyama yapılmıştır. TEM boyut dağılımı, her örnek için 100 partikül üzerinde ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir. Hücre canlılık ölçümleri için Anthos plaka okuyucu (ADAP yazılım Versiyon 1.6, Anthos Labtech Instruments) kullanılmıştır. Hücresel alım ve geçirgenlik analizleri, Varioskan LUX çok modlu mikrolaka okuyucu (SkanIt Software 6.0.2.3) ile gerçekleştirilmiştir. Trans-epitelyal elektrik direnci (TEER) ölçümleri, cellZscope® cihazı (nanoAnalytics GmbH, Versiyon 2.2.4) kullanılarak yapılmıştır. Western blot analizi belirtilen antikorlarla gerçekleştirilmiş ve floresan ile işaretlenmiş ikincil antikorlar kullanılarak, ChemiDoc MP (Image Lab Touch Software) cihazında doğrudan görüntülenmiştir.

3.3 Deneysel Kısım

3.3.1 DZP yüklü poli(etilen glikol)-*b*-poli(*ter*-bütil metakrilat) (PEG-*b*-P(*t*BMA)) taşıyıcılarının geliştirilmesi

3.3.1.1 mPEG Makro-RAFT ajanının sentezi

mPEG ($M_n = 5000$ g/mol) (1.5 g, 0.3 mmol), CDTP (0.1816 g, 0.45 mmol) ve DMAP (0.036 g, 0.3 mmol), 30 mL kuru DCM içinde karıştırıldı. Bu karışım bir buz banyosuna yerleştirildi ve ardından 15 mL kuru DCM içinde DCC (0.1395 g, 0.675 mmol) çözünerek reaksiyon karışımına damlatma hunisi yardımıyla damla damla eklendi. Reaksiyon, azot (N_2) atmosferi altında oda sıcaklığında gerçekleştirilerek 24 saat sonunda polimer süzüldü ve dietil eter içinde çöktürüldü. Ardından polimer, nuçe erlenmeyer kullanılarak tekrar süzülerek saflaştırıldı ve vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu (Verim= % 68).

1H NMR ($CDCl_3$, δ , ppm): 4.26 (2H), 3.77 (2H), 3.64 (527H), 3.37 (4H), 3.33 (2H), 2.65 (2H), 2.34-2.56 (2H), 1.87 (3H), 1.69 (2H), 1.39 (2H), 1.17-1.35 (16H), 0.88 (3H).

3.3.1.2 RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)-*b*-poli(*ter*-bütil metakrilat) (PEG-*b*-P(*t*BMA)) sentezi

Polimerizasyon için *t*BMA (1.837 g, 12.92 mmol), makro-RAFT ajanı (0.347 g, 0.0046 mmol) ve AIBN (0.0035 g, 0.021 mmol) Schlenk tüpü içerisinde 2 mL kuru toluen içerisinde çözüldü. Polimerizasyon çözeltisine üç kez dondur-çek-çöz (freeze-pump-thaw) işlemi yapıldı. Polimerizasyon çözeltisinin oda sıcaklığına getirilmesinin ardından polimerizasyon 70 °C'lik yağ banyosu içerisinde karışıma halinde reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda hızla soğutulan tüp havaya açılarak THF ile seyreltme yapıldı. Polimerler, soğuk *n*-hekzanda çöktürülen polimer nuçe erleni vasıtasıyla gooch krozedden (por. 4) süzüldü. Vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen polimerler 1H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.

Teorik molekül ağırlıkları ($M_{n,th}$), aşağıda verilen denklem 3.1 ve 3.2 kullanılarak ve gravimetrik dönüşüm değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Dönüşüm} = \frac{\text{Elde edilen polimerin ağırlığı}}{\text{Kullanılan toplam monomer ve makro RAFT ajanının ağırlığı}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$M_{n,th} = \frac{[\text{Monomer}] \times M_{\text{monomer}}}{[\text{RAFT ajanı}]} \times \% \text{ Dönüşüm} + M_{\text{RAFT ajanı}} \quad (3.2)$$

3.3.1.3 PEG-*b*-P(*t*BMA) ile polimerik misel oluşturulması

PEG-*b*-P(*t*BMA) (10 mg) ve DMF (2 mL) oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra distile su (8 mL), enjeksiyon pompası kullanılarak 0.5 mL/dk hızında çözeltiliye eklendi ve oda sıcaklığında bir gece karışmaya bırakıldı. Ertesi gün karışım bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarıldı ve distile suya (2 L) karşı bir gün boyunca diyaliz yapıldı. DLS cihazı ile ölçümlerinin yapılmasının ardından polimerik miseller liyofilize edilerek kurutuldu.

3.3.1.4 Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) belirlenmesi

Oluşan misellerin kritik misel konsantrasyonu (KMK), floresan boya çözündürme yöntemi kullanılarak belirlendi ve floresan prob olarak hidrofobik özellikteki piren kullanıldı. Piren (5 mg), 5 mL aseton içerisinde çözüldü ve 10 µL piren çözeltisi Eppendorf tüplerine aktarıldı. Aseton, oda sıcaklığında bir gece vakum altında buharlaştırıldı. Piren içeren Eppendorf tüplerine, polimerler kullanılarak elde edilen misellerden 10 mg alınarak 10 mL distile su içerisinde çözüldü ve polimer sulu çözeltisi 1×10^{-4} ile 1 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlara sahip olacak şekilde piren içeren eppendorflara 1'er mL eklendi ve ardından her biri 2 dakika sonike edildi. Çözeltiler bir gece karanlıkta bekletildikten sonra floresan ölçümleri için 200'er µL halinde 96 kuyucuklu bir plakaya aktarıldı. Çözeltiler 334 nm'de uyarılarak 371 nm ve 391 nm'deki intensite değerleri oranlandı (I_3/I_1). Piren emisyon profilinin I_3/I_1 oranı ile polimer konsantrasyonunun logaritması grafiğe geçirilerek en uygun iki doğrunun kesişim noktasından sulu ortamda kararlı misellerin oluşumu için gereken minimum polimer konsantrasyonuna karşılık gelen KMK belirlendi.

3.3.1.5 PEG-*b*-P(*t*BMA) ile DZP yüklü polimerik misel oluşturulması

Donepezil•HCl (2 mg), HCl'yi uzaklaştırmak ve serbest ilaç (DZP) elde etmek amacıyla DMF (2 mL) içerisinde, 2 mol oranında trietilamin (TEA) ilavesiyle bir gece karışmaya bırakılmıştır. PEG-*b*-P(*t*BMA) (10 mg) oda sıcaklığında eklenerek 2 saat karıştırmaya devam edilmiştir. İki saatin sonunda çözeltiliye enjeksiyon pompası ile

0.5 mL/dk hızında distile su (8 mL) eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında bir gece karışıma bırakılmıştır. Süre sonunda misel çözeltisi , bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarılarak ve distile suya (2 L) karşı 24 saat boyunca diyaliz edildi. Oluşan DZP yüklü polimerik miseller, DLS cihazı ile ölçümlerinin yapılmasının ardından polimerik miseller liyofilize edilerek kurutuldu.

3.3.1.6 İlaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme etkinliğinin (İYE) belirlenmesi

DZP ayrı ayrı DMSO içerisinde çözündürülerek ve 7 farklı konsantrasyon olacak şekilde DMSO ile seyreltme yapılarak 312 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. İYK ve İYE'nin hesaplanması için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. DZP yüklü polimerik misellere yüklenen ilaç miktarı 312 nm'de ölçülen absorbans değeri kullanılarak aşağıda verilen denklemler yoluyla hesaplandı. [213]. İlaç yüklü polimerik miseller DMSO içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bir gece bekletilmesinin ardından 312 nm'deki absorbans değeri, UV/Vis mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. İYK ve İYE aşağıda verilen denklem 3.3, 3.4 ve 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Teorik İlaç Yükleme Kapasitesi} = \frac{\text{Misele yüklenecek ilaç miktarı}}{\text{Toplam misel miktarı}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\% \text{ İlaç Yükleme Kapasitesi (İYK)} = \frac{\text{Misele yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Toplam misel miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\% \text{ İlaç Yükleme Etkinliği (İYE)} = \frac{\text{Misele yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Başlangıçtaki ilaç miktarı}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.3.1.7 *In vitro* ilaç salım testi

DZP % 2 (v/v) Tween® 80 içeren PBS içerisinde çözündürülerek ve 8 farklı konsantrasyon (0.5, 0.1, 0.0875, 0.075, 0.0625, 0.05, 0.0375, 0.025 mg/mL) olacak şekilde seyreltme yapılarak 312 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü [213]. Ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri ile *in vitro* ilaç salımının hesaplanması için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. İlaç yüklü polimerik misellerden *in vitro* DZP salımı, diyaliz yöntemi kullanılarak ölçüldü. DZP yüklü miseller (1 mg/mL) diyaliz torbasına aktarıldı ve %2 (v/v) Tween® 80 içeren 20 mL PBS (pH 7.4) çözeltisinde, 37°C'de ve 100 rpm karıştırma hızında inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında (0, 1,

2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96 ve 120) salım ortamından 2 mL örnek alınarak aynı hacimde taze ortam çözeltisi eklendi ve total salım çözelti hacmi sabit tutuldu. UV/Vis mikropilaka okuyucu kullanılarak her örnek (üçer tekrarlı) için UV absorbansı ile 312 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen denklemlere uygulanmasıyla DZP konsantrasyonu belirlendi. Ortalama intensite değerleri ile % ilaç salım miktarları aşağıda verilen denklem 3.6 kullanılarak hesaplandı (V: medyum hacmi, df: seyreltme faktörü, eğim: %2 (v/v) Tween® 80 içeren PBS içerisinde çeşitli konsantrasyonlardaki donepezil-%2 (v/v) Tween® 80 içeren PBS çözeltisi ile ölçülen intensite değerleriyle oluşturulan kalibrasyon eğrisinden elde edilmiştir). İlaç salım grafiği zaman ve kümülatif olarak %ilaç salım değerleriyle oluşturuldu.

$$\% \text{ İlaç Salımı} = \frac{\text{İntensite} \times V \times df}{\text{Eğim} \times \text{Misele Yüklenen İlaç Miktarı}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.3.1.8 Stabilite çalışması

Stabilite çalışmaları için, polimerik miseller 4°C'de karanlık bir ortamda on ay boyunca saklanmıştır. Stabilite, polimerik misel nanopartüküllerinin başlangıç ve on ayın sonunda yapılan partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleriyle değerlendirilmiştir.

3.3.1.9 Hücre kültürü ve hücre canlılık testi

Hücre kültürü çalışmaları TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) 2214-A Doktora Sırası Araştırma Bursu ile desteklenmiştir ve Johannes Gutenberg Üniversitesi-Tıp Merkezi, Mainz, Almanya'da bulunan Patobiyokimya Enstitüsü laboratuvarında Pietrzik Grup ile gerçekleştirilmiştir.

hCMEC/D3 hücre hattı, KBB'nin benzersiz özelliklerini yeniden üreten, geniş bir şekilde karakterize edilmiş insan beyin endotel hücre hattıdır. Bu hücre hattı, nöroenflamatuvar veya enfeksiyöz hastalıklar bakımından insan beyin endotelium biyolojisini incelemek ve merkezi sinir sistemi ilaç adaylarının büyük ölçekli taraması için kullanışlı bir modeldir [214]. hCMEC/D3 hücre hattı [215], Endotelial Hücre Bazal Medium 2 (EBMTM-2) (Buletkit, Lonza, ABD) kullanılarak kültüre edilmiş ve üretici tarafından önerilen VEGF, IGF-1, EGF, bazik FGF, hidrokortizon, askorbat, gentamisin ve %2.5 fetal bovin serum (FBS) ile zenginleştirilmiştir. Tip IV kollajen,

RABBIT (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya, REF 234154) tarafından temin edilmiştir. hCMEC/D3 hücreleri (pasaj sayısı ≤ 35), alım çalışmaları ve canlılık testleri için kollajen tip IV ve fibronectin (4:1) ile kaplanmıştır (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile kaplanmış 96 kuyucuklu plaklarda kültüre edilmiştir.

DZP, boş ve DZP yüklü polimerik misellerin sitotoksitesisi, alamarBlue® reaktifi (Invitrogen, Karlsruhe, Almanya) kullanılarak değerlendirilmiştir. hCMEC/D3 hücreleri (4×10^4 hücre/ cm^2), 96 kuyucuklu plakalara (Greiner, Frickenhausen, Almanya) ekilmiş ve hücreler uygun yoğunluk seviyesine ulaştıktan sonra 62.5 μg 'dan 1000 μg 'a kadar artan konsantrasyonlarda donepezil ve polimerik misellerle muamele edilmiştir. Triton X deterjanı (1 mg/mL) %100 hücre toksisitesini belirlemek için referans madde olarak kullanılmıştır. 72 saat sonra hücreler, 1 \times alamarBlue® içeren ortamda dört saat daha inkübe edilmiştir. Absorbans, UV/Vis mikropilaka okuyucu (Varioskan LUX çok modlu mikropilaka okuyucu, SkanIt Software 6.0.2.3) kullanılarak 570 nm ölçüm filtresi ve 600 nm referans filtresiyle ölçülmüştür (Anthos plaka okuyucu, ADAP yazılım Versiyon 1.6, Anthos Labtech Instruments). Hücre canlılığı, kontrol grubundaki hücrelere kıyasla boyanın absorbans azalmasının yüzdesi olarak belirlenerek hesaplanmıştır [216].

3.3.1.10 Hücresel alım çalışması

hCMEC/D3 hücreleri (6×10^4 hücre/ cm^2), 96 kuyucuklu plaklara (Corning Costar, New York, NY, ABD) ekilmiş ve uygun yoğunluk seviyesine ulaştıktan sonra hücreler, kültür ortamında 1000 μg konsantrasyonda DZP ve DZP yüklü polimerik misellerle muamele edilmiştir. Örnekler, 37°C'de CO₂ inkübatöründe 2 saat inkübe edilmiş, ardından hücreler ilaç ve polimerik miselleri hücre yüzeyinden uzaklaştırmak için üç kez buz soğukluğunda PBS (pH 2) ile yıkanmıştır. Son olarak, hücreler %1 Triton X-100 içeren PBS'de 60°C'de bir 1 saat süreyle çalkalayıcıda (80 rpm) inkübe edilerek parçalanmıştır. UV absorbansı, UV/Vis mikropilaka okuyucu (Varioskan LUX çok modlu mikropilaka okuyucu, SkanIt Software 6.0.2.3) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.1.11 Endotel hücrelerin transendotel elektrik direncinin ölçülmesi

hCMEC/D3 hücrelerin polimerik misellerin uygulamasındaki etkiyi incelemek için biyoelektrik empedans ölçümü yapılarak hücreler izlenmiştir. Analiz etmek için transendotel elektrik direnci (TEER) kullanılmıştır. hCMEC/D3 (4×10^4 hücre/ cm^2)

hücreleri, elektrotlarla entegre edilmiş 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiş ve cellZscope® cihazına (nanoAnalytics GmbH, Versiyon 2.2.4) yerleştirilmiştir. Hücreler uygun yopunluk seviyesine ulaştığında, ilaç, boş ve ilaç yüklü polimerik miseller uygulanmış ve TEER ölçümleri yapılmıştır. Hücrelerin TEER'i, fizyolojik koşullarda empedans spektroskopisi kullanılarak 24 ila 72 saat arasında otomatik olarak ölçülmüştür [217].

3.3.1.12 *In vitro* KBB kültür modeli ve geçirgenlik testi

In vitro KBB kültür modelinin oluşturulması ve geçirgenlik test çalışmaları için, hCMEC/D3 (8×10^4 hücre/cm²) hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmek üzere hücre kültürü insertlere (transwell, polikarbonat membran, 0.4 µm gözenek boyutu) ekildiği bir *in vitro* KBB tekli kültür modeli kullanılmıştır. Membran, kollajen tip IV ve fibronektin (4:1) ile kaplanmıştır. *In vitro* KBB kültür modelinin sıklığı, cellZscope® cihazı kullanılarak transendotel elektrik direnci (TEER) ölçümleriyle doğrulanmıştır. Uygun TEER değerleri (30-40 Ω.cm²) elde edildiğinde, geçirgenlik test deneyleri için kullanılmıştır. İnsertler içerisindeki hCMEC/D3 hücreleri üst/donör bölmede kalacak şekilde kültüre edilmiştir. Hücreler DZP yüklü polimerik miseller (1 mg/mL) ve misellerdeki ilaç miktarına eşdeğer DZP ile muamele edilmiştir. İki saat inkübasyon süresi sonunda, alt/alıcı bölmelerden (0.8 mL) örnekler toplanmış (en az üç tekrarlı) ve UV/Vis mikroparka okuyucu ile 312 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. KBB modelinin işlevini test etmek için, geçirgenlik göstergesi olarak kullanılan ilaç molekülü ile endotel tek tabakalar boyunca geçişi görünür geçirgenlik katsayıları (P_{app}) hesaplanarak belirlenmiştir.

Görünür geçirgenlik katsayıları (P_{app}) aşağıda verilen denklem 3.7 ile hesaplanmıştır:

$$P_{app} = \frac{\Delta[C]_A \times V_A}{A \times [C]_D \times \Delta t} \quad (3.7)$$

Bu denklemde; P_{app} görünür geçirgenlik katsayısını (cm/s), $\Delta[C]_A$ 2 saat sonunda alt/alıcı bölmedeki konsantrasyon değişimini, $[C]_D$ başlangıçtaki üst/donör kompartman konsantrasyonunu, V_A alıcı bölmenin hacmini (1.5 mL) ve A geçirgenlik için mevcut yüzey alanını (1.12 cm²) ifade etmektedir.

P_{app} (cm/s), 2 saat (Δt) sonra alıcı bölmedeki kargonun konsantrasyon farkından ($\Delta[C]_A$), donör bölmedeki başlangıç konsantrasyonundan ($[C]_D$, 0. saat), alıcı

bölmenin hacminden (V_A , 0.8 mL) ve geçirgenlik için kullanılabilir yüzey alanından (A , 0.3 cm²) hesaplanmıştır [218].

3.3.1.13 İstatistiksel analiz

Grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism 10 yazılımı (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Veriler, çoklu karşılaştırmalar için Bartlett testi ile birleştirilmiş iki yönlü/tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Farklar, $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm deneyler en az iki kez tekrarlanmış ve her deneyde paralel örnek sayısı 3-6 olmuştur.

3.3.2 DZP yüklü poli(*ter*-bütil metakrilat)-*b*-poli(poli(etilen glikol metakrilat)-*r*-folik asit) (PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)) taşıyıcılarının geliştirilmesi

3.3.2.1 Poli(*tert*-bütil metakrilat) (PtBMA) makro-RAFT ajanının sentezi

tBMA (1.837 g, 12.92 mmol), CPCTP (0.02 g, 0.0647 mmol) ve AIBN (0.0035 g, 0.021 mmol), 4 mL kuru toluen içerisinde bir Schlenk tüp içerisinde karıştırıldı. Polimerizasyon çözeltisine üç kez dondur-çek-çöz (freeze-pump-thaw) işlemi yapıldı. Polimerizasyon çözeltisinin oda sıcaklığına getirilmesinin ardından polimerizasyon 70 °C'lik yağ banyosu içerisinde karışıma halinde bırakıldı. Reaksiyon sonunda hızla soğutulan tüp havaya açılarak THF ile seyreltme yapıldı. Polimer, soğuk metanol-su (2:1 v/v) karışımında çöktürülen polimer nuçe erleni vasıtasıyla gooch krozedden (por.4) süzüldü. Vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen polimerler ¹H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.2.2 RAFT polimerizasyonu ile PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) sentezi

PEGMA (0.0059 mol), HEMA (0.0015 mol), PtBMA (0.036741 mmol) ve AIBN (0.0035 g, 0.021 mmol), Schlenk tüpü içerisinde 2 mL kuru THF içerisinde karıştırıldı. Polimerizasyon çözeltisinin üç kez dondur-çek-çöz (freeze-pump-thaw) işlemi yapıldı. Polimerizasyon çözeltisine oda sıcaklığına getirilmesinin ardından polimerizasyon 70 °C'lik yağ banyosu içerisinde karışıma halinde bırakıldı. Reaksiyon sonunda hızla soğutulan tüp havaya açılarak THF ile seyreltme yapıldı. Polimer, soğuk n-heksan içinde çöktürülerek -20°C'de 1 saat bekletilmesinin ardından dekante edildi ve vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu. PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) amfifilik kopolimerleri ¹H NMR, GPC, FT-IR ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.2.3 Folik asit konjuge polimer (PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)) sentezi

PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 (0.2 g, 0.0599 mmol), folik asit (0.132 g, 0.299 mmol) ve DMAP (0.036 g, 0.299 mmol) içeren 15 mL DMF reaksiyon karışımına buz banyosunda (0°C) DCC çözeltisi (0.061 g, 0.299 mmol, 5 mL DMF) karıştırılarak damlatma hunisi yardımıyla damla damla eklendi. Reaksiyon, karanlık bir ortamda dört gün boyunca devam etti. Reaksiyon sonunda, DCC ve DMAP uzaklaştırılması amacıyla dört gün boyunca distile suya (2 L) karşı diyalize bırakıldı. Diyaliz sonrası liyofilize edilen folik asit konjuge fonksiyonel polimer, bağlanamayan folik asidin uzaklaştırılması amacıyla kloroformda çözülerek nüçe erlenmeyer kullanılarak süzülerek saflaştırıldı ve vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu. Folik asit konjuge fonksiyonel polimerler ¹H NMR, FT-IR ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.2.4 PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) amfifilik polimerleri ile polimerik misellerin oluşturulması

PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) polimeri (10 mg) ve DMF (2 mL) oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Daha sonra distile su (8 mL), enjeksiyon pompası kullanılarak 0.5 mL/dk hızında çözeltiliye eklendi ve oda sıcaklığında bir gece karışmaya bırakıldı. Ertesi gün karışım bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarıldı ve distile suya (2 L) karşı bir gün boyunca diyaliz yapıldı. DLS cihazı ile ölçümlerinin yapılmasının ardından polimerik miseller liyofilize edilerek kurutuldu.

3.3.2.5 KMK'nın belirlenmesi

Oluşan misellerin KMK', floresan boya çözündürme yöntemi kullanılarak belirlendi ve floresan prob olarak hidrofobik özellikteki piren kullanıldı. Piren (5 mg), 5 mL aseton içerisinde çözüldü ve 10 µL piren çözeltisi Eppendorf tüplerine aktarıldı. Aseton, oda sıcaklığında bir gece vakum altında buharlaştırıldı. Piren içeren Eppendorf tüplerine, polimerler kullanılarak elde edilen misellerden 10 mg alınarak 10 mL distile su içerisinde çözüldü ve polimer sulu çözeltisi 1 x 10⁻⁴ ila 1 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlara sahip olacak şekilde piren içeren ependorflara 1'er mL eklendi ve ardından her biri 2 dakika sonike edildi. Çözeltiler bir gece karanlıkta bekletildikten sonra floresan ölçümleri için 200'er µL halinde 96 kuyucuklu bir plakaya aktarıldı. Çözeltiler 334 nm'de uyarılarak 371 nm ve 391 nm'deki intensite değerleri oranlandı (I₃/I₁). Piren emisyon profilinin I₃/I₁ oranı ile polimer

konsantrasyonunun logaritması grafiğe geçirilerek en uygun iki doğrunun kesişim noktasından sulu ortamda kararlı misellerin oluşumu için gereken minimum polimer konsantrasyonuna karşılık gelen KMK belirlendi.

3.3.2.6 PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) amfilik polimerleri ile DZP yüklü polimerik misellerin oluşturulması

Donepezil•HCl (2 mg), HCl'yi uzaklaştırmak ve serbest ilaç (DZP) elde etmek amacıyla DMF (2 mL) içerisinde, 2 mol oranında trietilamin (TEA) ilavesiyle bir gece karışıma bırakılmıştır. Bu çözeltiye PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) veya PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) polimerlerinden 10 mg oda sıcaklığında eklenerek 2 saat karıştırmaya devam edilmiştir. İki saatin sonunda çözeltiye enjeksiyon pompası ile 0.5 mL/dk hızında distile su (8 mL) eklenmiş ve oda sıcaklığında bir gece karışmaya bırakılmıştır. Süre sonunda misel çözeltisi, bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarılarak ve distile suya (2 L) karşı 24 saat boyunca diyaliz edildi. Oluşan DZP yüklü polimer miseller, DLS cihazı ile ölçümlerinin yapılmasının ardından liyofilize edilerek kurutuldu.

3.3.2.7 İlaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme etkinliğinin (İYE) belirlenmesi

DZP ayrı ayrı DMSO içerisinde çözüldürülerek ve 7 farklı konsantrasyon olacak şekilde DMSO ile seyreltme yapılarak 312 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. İlaç yükleme miktarı ve enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. DZP yüklü polimerik misellere yüklenen ilaç miktarı 312 nm'de ölçülen absorbans değeri kullanılarak aşağıda verilen denklemler yoluyla hesaplandı. [213]. İlaç yüklü polimerik miseller DMSO içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bir gece bekletilmesinin ardından 312 nm'deki absorbans değeri, UV/Vis mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. İlaç yükleme miktarı ve enkapsülasyon verimliliği aşağıdaki uygun denklemlerde uygulanarak hesaplanmıştır.

3.3.2.8 *In vitro* ilaç salım testi

DZP % 2 (v/v) Tween® 80 içeren PBS içerisinde çözüldürülerek ve 8 farklı konsantrasyon (0.5, 0.1, 0.0875, 0.075, 0.0625, 0.05, 0.0375, 0.025 mg/mL) olacak şekilde seyreltme yapılarak 312 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri ile *in vitro* ilaç salımının hesaplanması için

kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. İlaç yüklü polimerik misellerden *in vitro* DZP salımı, diyaliz yöntemi kullanılarak ölçüldü. DZP yüklü miseller (1 mg/mL) diyaliz torbasına aktarıldı ve %2 (v/v) Tween® 80 içeren 20 mL PBS (pH 7.4) çözeltisinde, 37°C'de ve 100 rpm karıştırma hızında inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat) salım ortamından 2 mL örnek alınarak aynı hacimde taze ortam çözeltisi eklendi ve total salım çözelti hacmi sabit tutuldu. UV/Vis mikropilaka okuyucu kullanılarak her örnek (üçer tekrarlı) için UV absorbansı ile 312 nm'de yapılan ölçümlerden elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilen denklemlere uygulanmasıyla DZP konsantrasyonu belirlendi. Kümülatif olarak %ilaç salım değerleri uygun denklemlerde uygulanarak hesaplanmıştır.

3.3.2.9 Stabilite çalışması

Stabilite çalışmaları için, polimerik miseller 4°C'de karanlık bir ortamda on ay boyunca saklanmıştır. Stabilite, polimerik misel nanopartüküllerinin başlangıç ve altıncı ayın sonunda yapılan partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleriyle değerlendirilmiştir.

3.3.2.10 Hücre kültürü ve hücre canlılık testi

Hücre kültürü çalışmaları TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) 2214-A Doktora Sırası Araştırma Bursu ile desteklenmiştir ve Johannes Gutenberg Üniversitesi-Tıp Merkezi, Mainz, Almanya'da bulunan Patobiyokimya Enstitüsü laboratuvarında Pietrzik Grup ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü

İnsan serebral mikrovasküler endotel hücre hattı hCMEC/D3 hücre hattı, KBB'nin benzersiz özelliklerini yeniden üreten, geniş bir şekilde karakterize edilmiş insan beyin endotel hücre hattıdır. Bu hücre hattı, nöroenflamatuar veya enfeksiyöz hastalıklar bakımından insan beyin endotelyum biyolojisini incelemek ve merkezi sinir sistemi ilaç adaylarının büyük ölçekli taraması için kullanışlı bir modeldir [214]. hCMEC/D3 hücre hattı [215], Endotelyal Hücre Bazal Medium 2 (EBMTM-2) (Buletkit, Lonza, ABD) kullanılarak kültüre edilmiş ve üretici tarafından önerilen VEGF, IGF-1, EGF, bazik FGF, hidrokortizon, askorbat, gentamisin ve %2.5 fetal bovin serum (FBS) ile zenginleştirilmiştir. Tip IV kollajen, RABBIT (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya,

REF 234154) tarafından temin edilmiştir. hCMEC/D3 hücreleri (pasaj sayısı ≤ 35), hücresel alım çalışmaları ve hücre canlılık testleri için kollajen tip IV ve fibronectin (4:1) ile kaplanmış (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile kaplanmış 96 kuyucuklu plakalarda kültüre edilmiştir.

Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri (PS70) [220] %10 fetal bovin serumu ve 100 U/ml penisilin/streptomisin (Gibco, Darmstadt, Almanya) içeren yüksek glukozlu DMEM (Gibco, Darmstadt, Almanya) ortamında kültürlendi. PS70 hücreleri (pasaj sayısı ≤ 35), hücre canlılık testleri hücresel alım çalışmaları ve için kan-beyin bariyeri ikili kültür modelinde polimerik misellerin geçirgenliği testi çalışmalarında kullanıldı.

Hücre canlılığı

DZP, folik asit konjuge polimerik miseller ve DZP yüklü folik asit konjuge polimerik miseller hücre canlılığı, alamarBlue® reaktifi (Invitrogen, Karlsruhe, Almanya) kullanılarak değerlendirilmiştir. PS70 hücre hattı ve hCMEC/D3 hücre hatları ayrı ayrı olmak üzere (4×10^4 hücre/ cm^2), 96 kuyucuklu plakalara (Greiner, Frickenhausen, Almanya) ekilmiş ve hücreler uygun yoğunluk seviyesine ulaştıktan sonra 62.5 μg 'dan 1000 μg 'a kadar artan konsantrasyonlarda ilaç yüklü miseller ile eşdeğer miktarda DZP, folik asit konjuge polimerik miseller ve DZP yüklü folik asit konjuge polimerik miseller ile muamele edilmiştir. Triton X deterjanı (1 mg/mL) %100 hücre toksisitesini belirlemek için referans madde olarak kullanılmıştır. 72 saat sonra hücreler, $1 \times$ alamarBlue® içeren ortamda dört saat daha inkübe edilmiştir. Absorbans, UV/Vis mikropilaka okuyucu (Varioskan LUX çok modlu mikropilaka okuyucu, SkanIt Software 6.0.2.3) kullanılarak 570 nm ölçüm filtresi ve 600 nm referans filtresiyle ölçülmüştür (Anthos plaka okuyucu, ADAP yazılım Versiyon 1.6, Anthos Labtech Instruments). Hücre canlılığı, kontrol grubundaki hücrelere kıyasla boyanın absorbans azalmasının yüzdesi olarak belirlenerek hesaplanmıştır [216].

3.3.2.11 Hücresel alım çalışması

PS70 hücre hattı ve hCMEC/D3 hücre hatları ayrı ayrı olmak üzere (6×10^4 hücre/ cm^2), 96 kuyucuklu plakalara (Corning Costar, New York, NY, ABD) ekilmiş ve uygun yoğunluk seviyesine ulaştıktan sonra hücreler, kültür ortamında 1000 μg konsantrasyonda ilaç yüklü miseller ile eşdeğer miktarda DZP, folik asit konjuge polimerik miseller ve DZP yüklü folik asit konjuge polimerik miseller ile muamele edilmiştir. Örnekler, 37°C'de CO₂ inkübatöründe 2 saat inkübe edilmiş, ardından

hücreler ilaç ve polimerik miselleri hücre yüzeyinden uzaklaştırmak için üç kez buz soğukluğunda PBS (pH 2) ile yıkanmıştır. Son olarak, hücreler %1 Triton X-100 içeren PBS'de 60°C'de bir 1 saat süreyle çalkalayıcıda (80 rpm) inkübe edilerek parçalanmıştır. UV absorbansı, UV/Vis mikropilaka okuyucu (Varioskan LUX çok modlu mikropilaka okuyucu, SkanIt Software 6.0.2.3) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.2.12 Endotelial hücrelerin transendotelial elektrik direncinin ölçülmesi

hCMEC/D3 hücrelerin polimerik misellerin uygulamasındaki etkiyi incelemek için biyoelektrik empedans ölçümü yapılarak hücreler izlenmiştir. Analiz etmek için transendotelial elektrik direnci (TEER) kullanılmıştır. hCMEC/D3 (4×10^4 hücre/cm²) hücreleri, elektrotlarla entegre edilmiş 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiş ve cellZscope® cihazına (nanoAnalytics GmbH, Versiyon 2.2.4) yerleştirilmiştir. Hücreler uygun yoğunluk seviyesine ulaştığında, ilaç, boş ve ilaç yüklü polimerik miseller uygulanmış ve TEER ölçümleri yapılmıştır. Hücrelerin TEER'i, fizyolojik koşullarda empedans spektroskopisi kullanılarak 24 ila 72 saat arasında otomatik olarak ölçülmüştür [217].

3.3.2.13 *In vitro* KBB kültür modeli ve geçirgenlik testi

In vitro KBB kültür modelinin oluşturulması ve geçirgenlik test çalışmaları için, hCMEC/D3 (8×10^4 hücre/cm²) hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmek üzere hücre kültürü insertlere (transwell, polikarbonat membran, 0.4 µm gözenek boyutu) ekildiği bir *in vitro* KBB tekli kültür modeli kullanılmıştır. Membran, kollajen tip IV ve fibronektin (4:1) ile kaplanmıştır. *In vitro* KBB kültür modelinin sıklığı, cellZscope® cihazı kullanılarak transendotelial elektrik direnci (TEER) ölçümleriyle doğrulanmıştır. Uygun TEER değerleri (20-30 Ω.cm²) elde edildiğinde, geçirgenlik test deneyleri için kullanılmıştır. İntertler içerisindeki hCMEC/D3 hücreleri üst/donör bölmede kalacak şekilde kültüre edilmiştir. Tüm hücre kültürleri uygun yoğunluk seviyesine ulaştıktan sonra üst/donör bölmede hCMEC/D3 hücreleri ve alt/alıcı bölmede PS70 hücreleri (stabil şekilde insan APP eksprese eden CHO hücre hattı) ile ko-kültüre edildi. Ardından hCMEC/D3 hücrelerine ilaç yüklü miseller ile eşdeğer miktarda DZP, folik asit konjuge polimerik miseller ve DZP yüklü folik asit konjuge polimerik miseller uygulandı [214]. İki saat inkübasyon süresi sonunda, alt/alıcı bölmelerden (0.8 mL) örnekler toplanmış (en az üç tekrarlı) ve UV/Vis mikropilaka okuyucu ile 360 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür [221]. KBB

modelinin işlevini test etmek için, geçirgenlik göstergesi olarak misel geçişlerini incelemek amacıyla kullanılan polimerik misele konjuge halde bulunan folik asit ile 360 nm dalga boyundaki absorbans değerleri elde edilerek endotel tek tabakalar boyunca geçişi görünür geçirgenlik katsayıları (P_{app}) hesaplanarak belirlenmiştir.

In vitro KBB ikili kültür modeli boyunca geçen ilaç miktarını belirlemek amacıyla kullanılan ilaç molekülü (DZP) ile endotel tabakalar boyunca geçişi görünür geçirgenlik katsayıları (P_{app}) hesaplanarak belirlenmiştir. İki saat inkübasyon süresi sonunda, alt/alıcı bölmelerden toplanan örnekler (0.8 mL) (en az üç tekrarlı) ve UV/Vis mikropilaka okuyucu ile 312 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür [213]. Ayrıca, 2 saat inkübasyon süresi sonunda alt/alıcı bölmede yer alan PS70 hücreleri, hücre ilaç alımları incelenmek üzere Örnekler, 37°C'de CO₂ inkübatöründe 2 saat inkübe edilmiş, ardından hücreler ilaç ve polimerik miselleri hücre yüzeyinden uzaklaştırmak için üç kez buz soğukluğunda PBS (pH 2) ile yıkanmıştır. Son olarak, hücreler %1 Triton X-100 içeren PBS'de 60°C'de bir 1 saat süreyle çalkalayıcıda (80 rpm) inkübe edilerek parçalanmıştır. UV absorbansı, UV/Vis mikropilaka okuyucu (Varioskan LUX çok modlu mikropilaka okuyucu, SkanIt Software 6.0.2.3) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.2.14 Western blot analizi

Western blot analizinden önce, alt bölmede bulunan ve stabil şekilde insan amiloid prekürsör proteini (APP) ekspres eden CHO hücre hattı (APP) ekspres eden PS70 hücrelerinin (Çin hamsteri yumurtalık hücreleri (CHO)) 2 saatlik inkübasyon sonrası hücre alım metoduna göre hücre alım miktarları belirlenmiştir. Sonrasında Western Blot metodu ile APP'nin C-terminal bölgesine bağlanan monoklonal antikor CT15 antikorunu, daha önceki çalışmalarda tanımlandığı şekilde [222] kullanılmıştır. Hücreler, eşit yoğunlukta olacak şekilde hücre kültür kaplarına ekilmiştir. APP'nin tüm formlarını tespit etmek için ekimden 24 saat sonra uygun hücre yoğunluğuna gelmesinin ardından örneklerin uygulaması yapılmıştır. Uygulama süresi olarak 24 saat sonunda hücreler, soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkanmış ve ardından PBS'ye alınmıştır. Hücreler, 20 dakika boyunca 4°C'de Nonidet P-40 tamponunda (%1 Nonidet P-40 (Sigma, Taufkirchen, Almanya), 150 mM NaCl, %0.02 NaN₃, 50 mM Tris, pH 7.4) ve 1x proteaz inhibitör karışımı (Roche, Indianapolis, IN, ABD) içeren bir çözeltide parçalanmıştır. Elde edilen lizat çözeltisi, 4°C'de mikro santrifüjde 21000

g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Ekstraktların çözümlü fraksiyonu yeni tüplere alınmıştır. Tüm ortam örnekleri, partikül maddeleri uzaklaştırmak için 4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek -80°C'de saklanmıştır. Toplam protein miktarı, BCA Protein Assay kiti (Pierce Chemicals, Rockford, IL, ABD) kullanılarak belirlenmiş ve lizat analizinde eşit protein miktarları kullanılmıştır. Ortam örnekleri ise ilgili hücre ekstraktındaki toplam protein içeriğine göre normalize edilmiştir. Örneklerdeki APP C-terminal fragmanları ve ortamda bulunan A β ise %8-M üre SDS jelinde fraksiyonlanmıştır. Lizatlardaki APP ve ortamda bulunan APP proteinleri %10 Tris–Glysin SDS-PAGE jeli boyunca 120 V ile yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme işlemi sonunda bantlat iyice açıldıktan sonra jelin yığınlama bölümü kesilmiş ve ayırma jeli transfer tamponu (3.03 g Tris, 14.41 g glisin, 10 mL %10'luk SDS ve 150 ml metanol ile hazırlanmış ve su ile hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır) içinde yaklaşık 30 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ayırma jeli büyüklüğünde PVDF membran (Millipore, Bedford, MA, ABD) 0) kesilerek, transfer öncesinde 15 saniye boyunca metanolde ve ardından 15 dakika boyunca transfer tamponu içinde çalkalayıcıda bekletilmiştir. transfer edilmiştir. Ayırma jeli ile aynı büyüklükte filtre kağıtları kesilerek transfer tamponu ile ıslatılmıştır. Transfer kasetinin içine önce filtre kağıtları, sonra membran, daha sonra da jel olacak şekilde yerleştirilmiş ve üstü tekrar önceden ıslatılmış filtre kağıtları ile kapatılmıştır. Transfer kaseti ile transfer sistemine (BioRad) yerleştirilmiş ve 0.05 A 250 V'ta 30 dakika boyunca jeldeki proteinlerin membrana transferi yapılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için membran %5 süt tozu içeren TBST (2.42 g Tris, 9 g NaCl ve 1 ml Tween-20 ile hazırlanmış ve hacmi su ile 1 litreye tamamlanmıştır) çözeltisi ile 30 dakika boyunca inkübe edilerek bloklanmıştır. TBST çözeltisi içinde 1:1000 oranında seyreltilen primer antikoları ile membran gece boyunca +4°C'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. TBST ile 3 defa 20'ar dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından floresan ile işaretlenmiş sekonder antikor ile 2 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. TBST ile 3 defa 20'ar dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Membran, ECL (BioRad) ile 5 dakika boyunca inkübe edilmiş ve görüntüleme için hazır hale gelmiştir. Western blot analizleri, daha önceki çalışmalardaki protokollerde [223] belirtilen antikolarla gerçekleştirilmiş ve floresan ile işaretlenmiş ikincil antikolar kullanılarak, ChemiDoc MP cihazında doğrudan görüntülenmiştir. Veriler arka plan etkilerine karşı düzeltilmiş ve her hücre hattı için APP ekspresyonuna normalize edilmiştir.

3.3.2.15 İstatistiksel analiz

Grafik ve istatistiksel analizler GraphPad Prism 10 yazılımı (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Veriler, çoklu karşılaştırmalar için Bartlett testiyle birleştirilmiş iki yönlü/tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi. $p < 0.05$ olan farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler en az iki kez tekrarlandı ve her deneyde paralel örnek sayısı 4-6 olarak alındı.

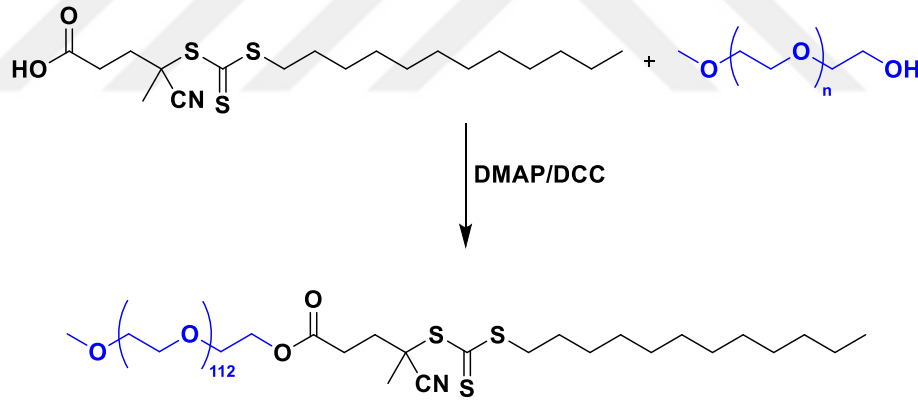


4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Poli(etilen glikol)-*b*-poli(*ter*-bütil metakrilat) (PEG-*b*-P(*t*BMA)) ile DZP Yüklü Taşıyıcılarının Geliştirilmesine Dair Bulgular

4.1.1 mPEG makro-RAFT ajanının sentezi ve karakterizasyonu

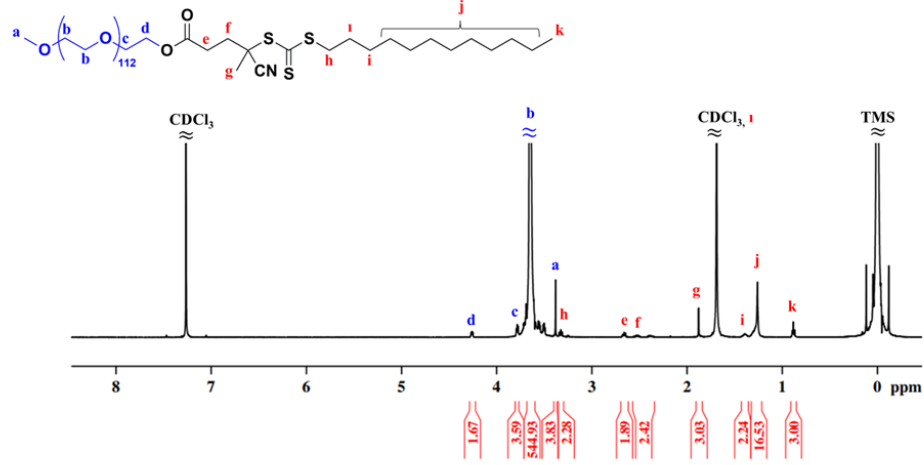
Aynı zamanda hidrofilik bloğu oluşturan mPEG makro-RAFT ajanı (5000 g/mol) Steglich esterifikasyonu ile RAFT ajanının asit ucuna bağlanarak sentezlendi (Şekil 4.1). Elde edilen mPEG makro-RAFT ajanı ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.



Şekil 4.1 : Makro-RAFT ajanın sentezi.

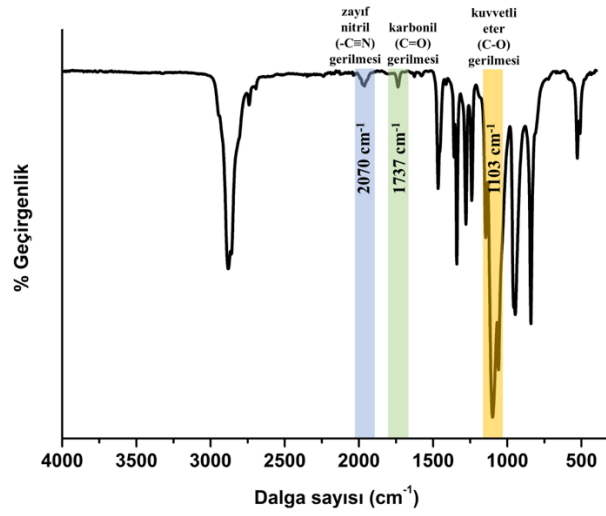
Makro-RAFT ajanının ¹H NMR spektrumu incelendiğinde RAFT ajanından ve mPEG'den gelen tüm karakteristik protonların gözlemlendiği görülmektedir (Şekil 4.2). mPEG'ten gelen ve 3.76-3.42 ppm'de yer alan **b** protonlarının integral değerleri ile RAFT ajanından gelen ve 0.88 ppm'de yer alan **k** protonlarının integral değerlerinin oranlanmasıyla PEG ünite sayısı hesaplanarak esterifikasyon reaksiyonunun gerçekleşme oranı belirlendi. Ayrıca, 3.38 ppm'de bulunan **a** protonlarının integral değerleri ile RAFT ajanından gelen **e** ve **f** protonlarının (sırasıyla 2.66 ve 2.53 ppm'de

bulunan) integral değerlerinin oranlanmasıyla da teyit edildi. Elde edilen makro-RAFT ajanı 0.7616 g olarak %68 verim ile elde edildi.



Şekil 4.2 : Makro-RAFT ajanın ¹H NMR spektrumu.

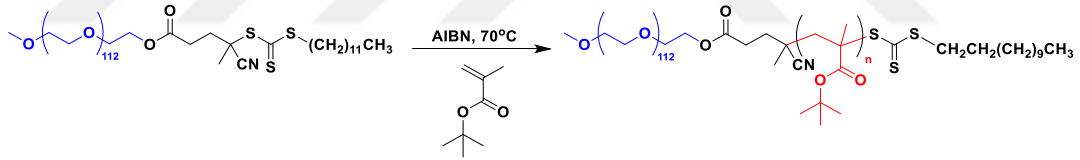
Makro-RAFT ajanına ait FT-IR spektrumunda, yaklaşık 3000 cm⁻¹ civarında hidroksil (-OH) gerilme bandına rastlanmamış, 2070 cm⁻¹'de zayıf bir nitril (-C≡N) gerilme bandı, 1737 cm⁻¹'de karbonil (-C=O) gerilme bandı ve 1087 cm⁻¹'de mPEG kısmından kaynaklanan güçlü bir eter gerilme bandı gözlenmiştir (Şekil 4.3). FT-IR spektrumu makro-RAFT ajanının başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir.



Şekil 4.3 : Makro-RAFT ajanının FT-IR spektrumu.

4.1.2 PEG-*b*-P(*t*BMA) amfifilik kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu

mPEG makro-RAFT ajanı ve başlatıcı olarak AIBN kullanılarak *t*BMA monomerinin RAFT polimerizasyonu toluen içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 : PEG-*b*-P(*t*BMA) polimerinin sentezi.

Polimerin *t*BMA ünitelerinden kaynaklanan hidrofobik kısmını ayarlamak amacıyla farklı polimerizasyon süreleri uygulandı ve beş farklı molekül ağırlığına sahip PEG-*b*-P(*t*BMA) amfifilik kopolimeri elde edildi (Tablo 4.1). GPC kromatogramlarında reaksiyona girmeyen bir miktar PEG gözlemlenmesine rağmen, tüm polimerler dar molekül ağırlık dağılımları ($D < 1.2$) ile monomodal ve simetrik pikler sergiledi (Şekil 4.5). Bazik alümina ile kolon kromatografisi yapılarak veya diyaliz yöntemi ile kopolimerlerden PEG'in uzaklaştırılması mümkün olsa da literatürde bu yöntemlerin 5000 g/mol molekül ağırlıklı PEG için etkili olmadığı belirtilmektedir [224].

Tablo 4.1 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen PEG-*b*-P(*t*BMA) amfifilik kopolimerlerin sentezlenme koşulları ve sonuçları.

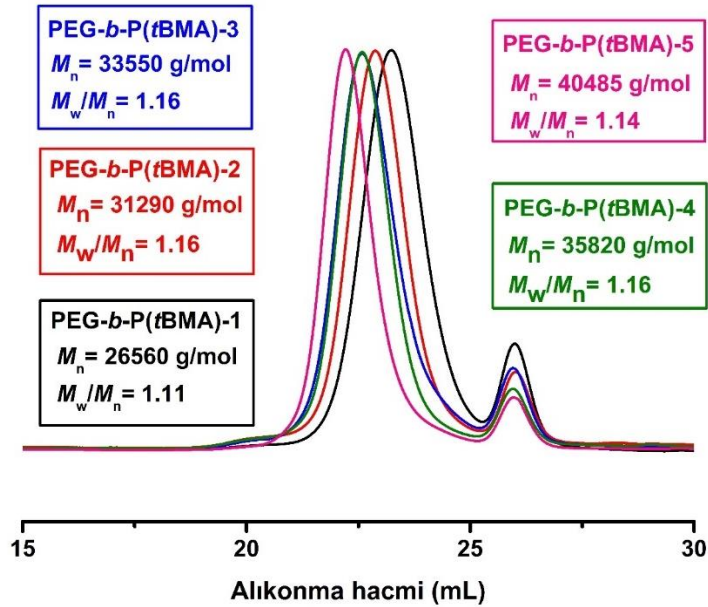
Polimer	Süre (saat)	Dönüşüm ^b (%)	$M_{n,th}$ ^b (g/mol)	$M_{n,GPC}$ ^c (g/mol)	\bar{D} ^c	$M_{n,NMR}$ ^d (g/mol)	Ünite ^d sayısı (<i>t</i> BMA)
PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-1	6	50	19600	26560	1.11	17745	87
PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-2	8	57	21590	31290	1.16	18880	95
PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3	10	61	22720	33550	1.16	23580	128
PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-4	12	63	23290	35820	1.16	27560	156
PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-5	14	78	27590	40485	1.14	38510	233

^a Polimerizasyon toluen içerisinde gerçekleştirilmiştir. [M]:[RAFT]:[AIBN]=200:1:0.33

^b Gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

^c GPC ile THF içerisinde ölçülmüştür.

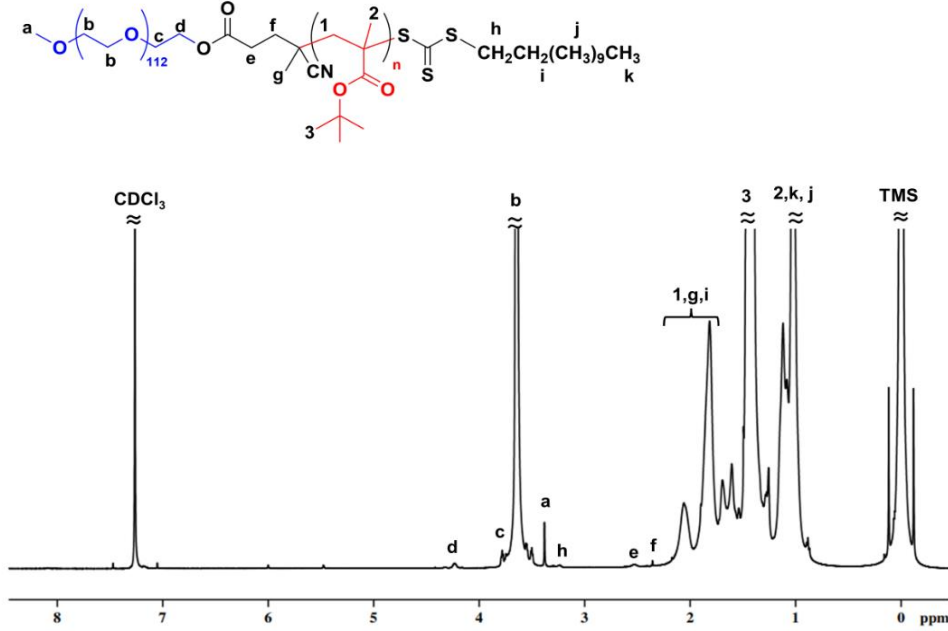
^d ¹H NMR ile belirlenmiştir.



Şekil 4.5 : PEG-*b*-P(*t*BMA) polimerlerinin GPC kromatogramları.

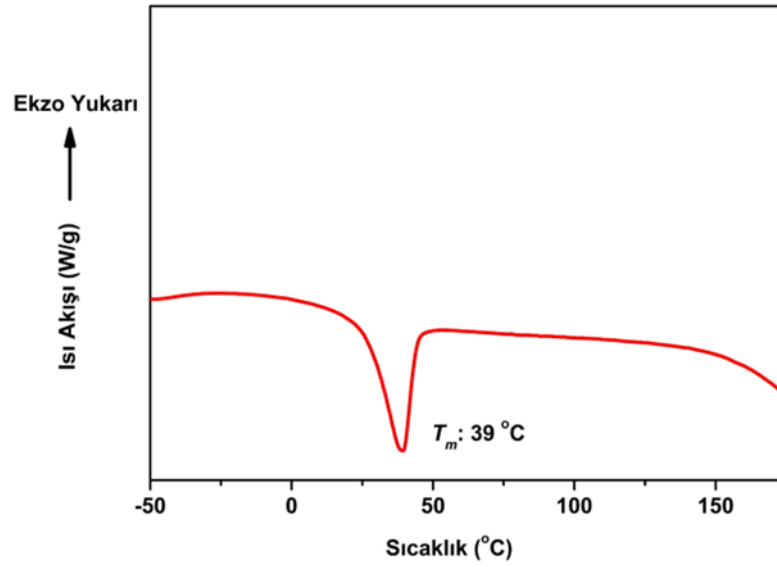
Elde edilen polimerlerin kimyasal yapıları ¹H NMR spektroskopisi ile karakterize edildi. Şekil 4.6'da PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimerinin ¹H NMR spektrumu verilmiştir. PEG ve *t*BMA ünitelerine ait bütün karakteristik protonlar görülmektedir. *t*BMA ünite sayısı, makro-RAFT ajanına ait 4.437 ppm'deki **d** protonlarının integral değerlerinin *t*BMA ünitelerine ait 1.567-1.177 ppm'deki **3** protonlarının integral değerlerinin oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Ayrıca toplam *t*BMA birim sayısı, sırasıyla RAFT

ajanının PEG kısmından gelen **d** protonlarının toplam integral değerleri ile RAFT ajanından gelen **e** ve **f** protonlarının (sırasıyla 2.529 ve 2.355 ppm’de bulunan) toplam integral değerlerinin oranlanmasıyla hesaplanarak doğrulanmıştır. İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları, Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.6 : PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimerinin CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

Elde edilen polimerlerin termal davranışı DSC ile incelenmiştir. Şekil 4.7, PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimerinin DSC diyagramını göstermektedir. Polimerin 39°C’de erime sıcaklığı (T_m) gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.7 : PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimerinin DSC diyagramı.

4.1.3 PEG-*b*-P(*t*BMA) amfilik kopolimerleri ile oluşturulan misellerin karakterizasyonu

Elde edilen amfilik kopolimerler su içinde kendiliğinden bir araya getirilerek polimerik miseller oluşturuldu ve DLS ile karakterize edildi. Farklı molekül ağırlıklarına sahip PEG-*b*-P(*t*BMA) amfilik kopolimerleri ile oluşturulan misellerin DLS ile ölçülen partikül boyutları ve PDI değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Ayrıca, Şekil 4.8’de partikül boyutu dağılım grafikleri de görülmektedir.

Tablo 4.2 : PEG-*b*-P(*t*BMA) polimerleri ile oluşturulan misellerin DLS ile elde edilen partikül boyutları ve PDI değerleri.

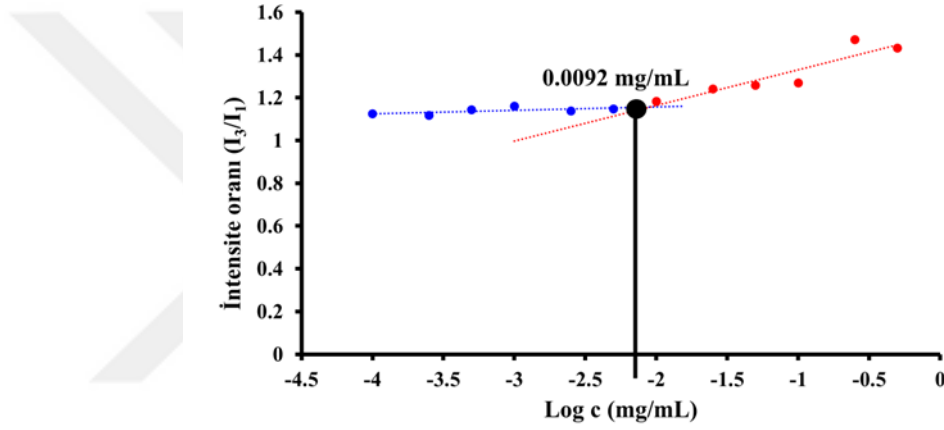
Misel	Polimer	Partikül boyutu ^a (d.nm)	PDI ^a
M1	PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-1	962.9 ± 361.4	0.372
M2	PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-2	32.4 ± 5.8	0.314
M3	PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-3	37.2 ± 1.2	0.162
M4	PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-4	51.9 ± 5.8	0.314
M5	PEG- <i>b</i> -P(<i>t</i> BMA)-5	213.1 ± 18.2	0.960

^aDLS ile ölçülmüştür.

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, polimerlerin molekül ağırlığındaki artış ile polimerik misellerin partikül boyutları ve PDI değerleri arasında bir ilişki bulunmamaktadır.

PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimeri ile oluşturulan M3 miseli en küçük boyuta ve en iyi polidispersiteye sahip olduğu için ilaç yüklü misellerin oluşturulmasında bu polimer kullanılmıştır.

PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 amfifilik blok kopolimerinin KMK'sı, floresan prob olarak piren kullanılan floresan boya çözündürme yöntemi ile belirlendi. Şekil 4.8, 391 ve 371 nm'deki piren floresan yoğunluklarının oranının (I_3/I_1) PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 konsantrasyonuyla ilişkisini göstermektedir. KMK değerinin 9 mg/mL olduğu belirlendi.

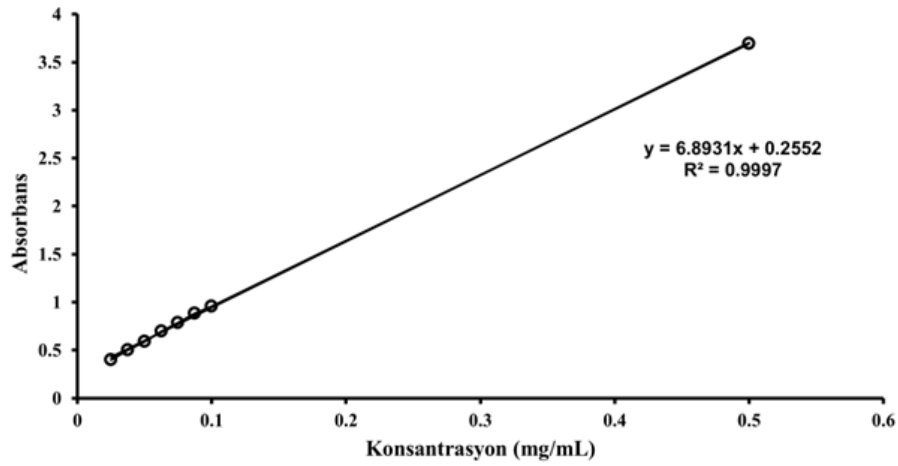


Şekil 4.8 : PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimerinin sulu çözelti konsantrasyonunun (mg/mL) logaritmasına karşı floresans yoğunluk oranının I_3/I_1 grafiği.

4.1.4 PEG-*b*-P(*t*BMA) amfifilik kopolimerleri ile oluşturulan misellere ilaç yüklenmesi ve karakterizasyonu

PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimeri ile DZP yüklü misellerin oluşturulması için diyaliz yöntemi kullanıldı. Öncelikle, Donepezil•HCl formunda bulunan ilacın serbest halini elde etmek amacıyla DMF içerisinde trietilamin (TEA) ilave edildi ve bir gece karıştırıldı. Daha sonra bu çözeltiye PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 eklenerek enjeksiyon pompası ile distile su ilave edildi ve bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarılarak distile suya karşı 24 saat boyunca diyaliz edildi. Miseller içerisinde maksimum ilaç yükleme kapasitesini belirlemek amacıyla 4 mg ve 2 mg olmak üzere iki farklı miktarda DZP yüklemesi yapıldı. Elde edilen ilaç yüklü misellerin teorik ilaç yükleme kapasiteleri, %İYL ve %İYE değerleri 312 nm'deki absorbansları ölçülerek

hesaplandı. Bunun için öncelikle DZP DMSO içerisinde çözülerek 8 farklı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltme yapıldı ve 312 nm'deki absorban değerleri ölçülerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.9). Daha sonra DZP yüklü ve liyofilize edilmiş miseller DMSO'da çözülerek 312 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. DMSO, hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşenleri çözebilen ideal bir çözücü olduğu için misellerin ve hidrofobik ilaç moleküllerinin tamamen çözünmesini sağlamaktadır ve %İYE ölçümlerinde ilk seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır [225]. Tablo 4.3'te görüldüğü üzere 4 mg ilaç yüklemesi yapılan misellerin %İYK'nin %7 ve 2 mg ilaç yüklemesi yapılan misellerin %İYK'nin %5 olduğu belirlenmiştir. Ancak, 4 mg DZP yüklemesi yapılan polimerik misellerin %İYE'de düşüş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 4 mg ilaç yüklemesi yapıldığında misel dengesinin bozulduğu ve misellerin çöktüğü belirlenmiştir. Bu nedenle 2 mg DZP yüklemesinin ilerleyen çalışmalar için daha uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.9 : DZP'nin DMSO içerisinde oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.3 : PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimeri ile farklı miktarda DZP yüklemesi yapılarak oluşturulan polimerik misellerin teorik ilaç yükleme kapasiteleri (%), ilaç yükleme kapasiteleri (%İYK) ve ilaç yükleme etkinlikleri (%İYE).

Yüklenen ilaç miktarı (mg)	Teorik ilaç yükleme kapasitesi (%)	İlaç yükleme kapasitesi (%İYK)	İlaç yükleme etkinliği (%İYE)
4	29	7	16
2	17	5	25

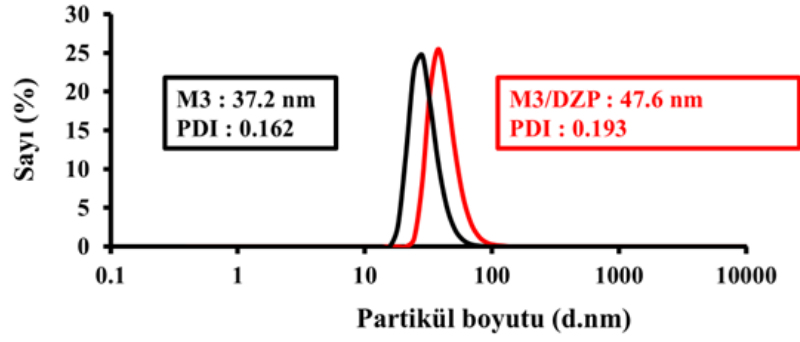
PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimeri ile oluşturulan M3/DZP misellerinin DLS cihazı ile partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak boş M3 miselleri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.4). Tablo 4.4'te ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi M3 misellerinin partikül boyutu DZP yüklemesinden sonra (M3/DZP) 37.2 nm'den 47.6 nm'ye yükselmiştir. Ayrıca, polimerik misellerin KBB penetrasyon potansiyelini incelemek için zeta potansiyelleri de ölçülmüş M3 ve M3/DZP'nin zeta potansiyelleri sırasıyla -13.9 ± 1.61 mV ve -13.6 ± 0.49 mV olarak belirlenmiştir. Genel olarak polimerik nanopartiküllerin zeta potansiyelinin +30 mV ile -30 mV arasında olması beklenmekte olup uygun olmayan yüzey yüküne sahip nanopartiküllerin raf ömrünün kısa olduğu ve kararsız oldukları bildirilmiştir [226]. M3 ve M3/DZP için elde edilen zeta potansiyeli değerleri geçiş için literatürle tutarlı sonuçlar göstermiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 : PEG-*b*-P(*t*BMA)-3 polimeri ile oluşturulan M3 ve M3/DZP misellerinin DLS ölçüm sonuçları.

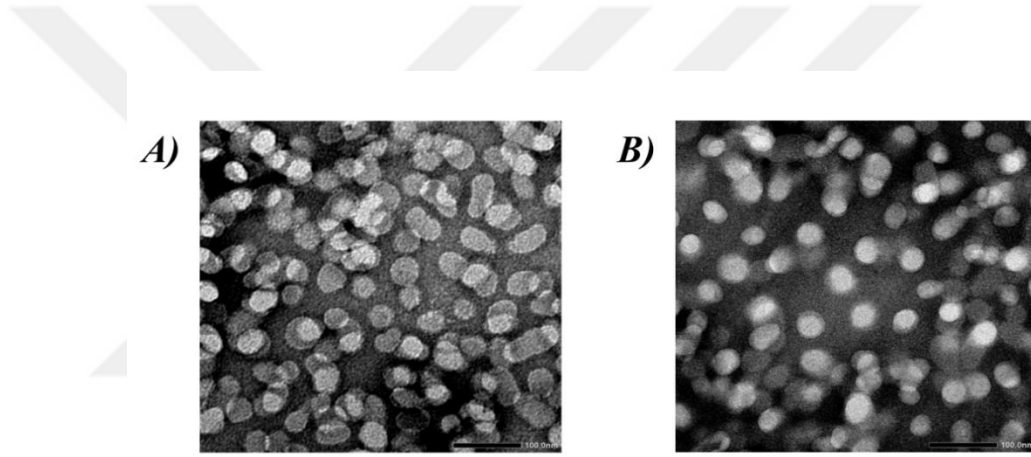
Misel	Partikül boyutu ^a (nm)	PDI ^a	Zeta potansiyeli ^a (mV)
M3	37.2	0.162	-13.9 ± 1.61
M3/DZP	47.6	0.193	-13.6 ± 0.49

^aDLS ile ölçülmüştür.

TEM sonuçları, DLS ile uyumlu olup, M3 ve M3/DZP misellerinin boyutları sırasıyla 38.7 nm ve 46.7 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). Ayrıca, hem M3 miselleri hem de DZP yüklü M3/DZP miselleri küresel morfolojiler sergilemiştir. Bu sonuçlar, hem DLS hem de TEM ile elde edilen misel boyutlarının, KBB aşmak için gerekli olan 10-100 nm aralığında olduğunu göstermektedir[227].



Şekil 4.10 : M3 ve M3/DZP misellerinin partikül boyutu dağılım grafiği.



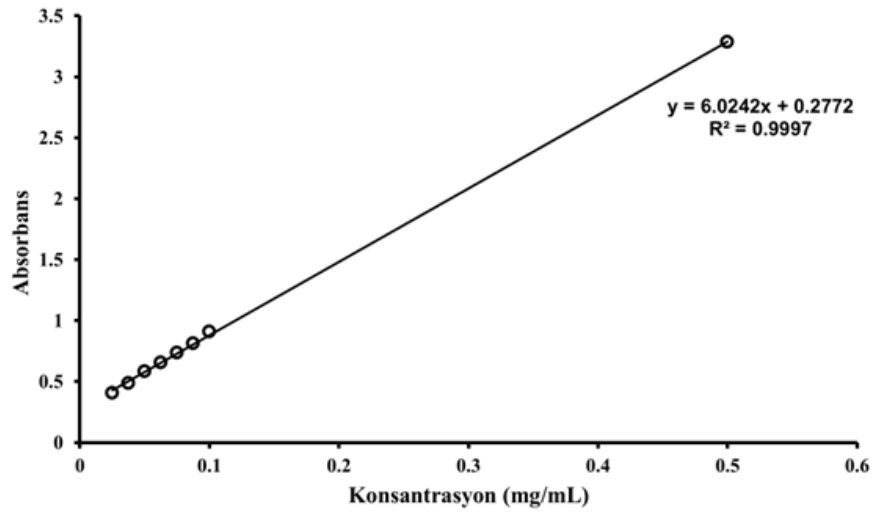
Şekil 4.11 : Uranil asetat ile boyanmış A) M3 ve B) M3/DZP misellerinin transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri (ölçek çubuğu = 100 nm).

4.1.5 *İn vitro* ilaç salımının belirlenmesi

İn vitro ilaç salım çalışması için DZP PBS (%2 Tween 80 v/v) içerisinde çözülerek 8 farklı konsantrasyonda olacak şekilde seyreltme yapıldı ve 312 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.12). Hazırlanan M3/DZP misel çözeltisinden 1 mL alınarak bir diyaliz torbasına aktarıldı ve %2 v/v Tween® 80 içeren 20 mL PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisine yerleştirilerek 37 °C'de çalkalamalı bir inkübatörde salım çalışması gerçekleştirildi. İyonik olmayan bir yüzey aktif ajan olan Tween® 80 sulu ortam ve yağ fazı arasındaki yüzey gerilimini düşürür ve hidrofobik ilaçların sulu ortamda çözünürlüğünü artırarak salım profilinin incelenmesini sağlar. Daha fazla çözünürlük sağlandığında, ilaç molekülleri ortam içinde daha düzenli

dağılır [228]. Diyaliz yöntemi ile gerçekleştirilen *in vitro* ilaç salım çalışmalarında salım ortamının 2% Tween® 80 içerecek şekilde hazırlanması ile ilacın çözünürlüğünü sınırlayan etkiler en aza indirilir, sink koşulları sağlanır ve gerçek biyofarmasötik koşullara daha yakın bir model oluşturulur.

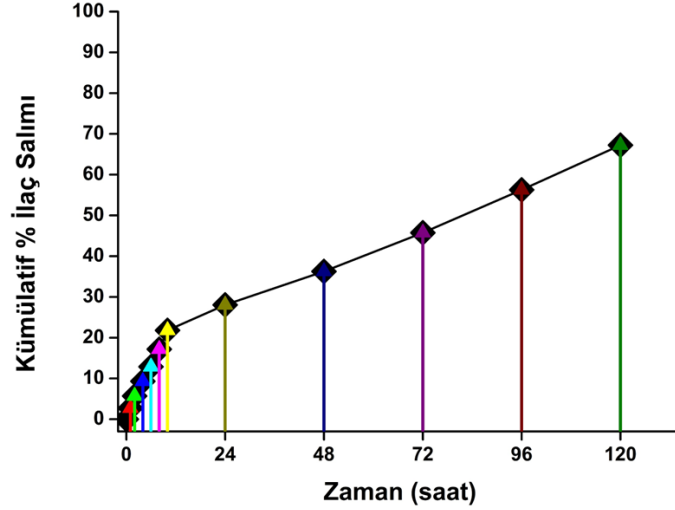
Belirli zaman aralıklarında (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat) salım ortamından 2 mL örnek alındı ve aynı hacimde taze ortam çözeltisi eklenerek salım çözelti hacmi sabit tutuldu. Salım ortamından alınan örnek çözeltilerdeki DZP konsantrasyonu UV/Vis mikropilaka okuyucu kullanılarak ve her örnek için üç ölçüm yapılarak 312 nm'deki absorbans değerlerinin okunması ile kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlendi. Kümülatif olarak %ilaç salım değerleri denklem 3.6 kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4.12 : DZP'nin Tween® 80 (%2 v/v) içeren PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi.

Polimerik miseller, pH 7.4'te sürekli ve kontrollü bir salım profili sergilemiştir. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi polimerik misellerde DZP salımı uzun bir süre boyunca gerçekleşmiş ve ilk 10 saat içinde yalnızca %21.8 ilaç salımı gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan *in vitro* ilaç salım çalışmaları, serbest DZP'nin yaklaşık 24 saat içinde tamamen salındığını göstermektedir [20]. Buna karşılık, bu çalışma kapsamında ilk 24 saate %28 ve 5 gün sonunda %67.2 DZP salımı gerçekleşmiştir. Bu durumun hidrofobik tBMA çekirdeğini çevreleyen hidrofilik PEG koronasının varlığı ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Geleneksel formülasyonlar, dalgalanan ilaç

konsantrasyonlarına ve sık dozlamaya neden olurken, M3 miselleri DZP salımını kontrol ederek hızlı eliminasyon olasılığını azaltmış ve özellikle KBB aşma sürecinde daha tutarlı bir terapötik etki sağlama potansiyeli taşıdıklarını göstermiştir.



Şekil 4.13 : DZP yüklü misellerin 37°C'de Tween 80 (%2 v/v) içeren PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde *in vitro* salım grafiği.

4.1.6 Polimerik misellerin stabilitelerinin belirlenmesi

Stabilite çalışmaları için, polimerik miseller 4°C'de karanlık bir ortamda on ay boyunca saklanmıştır. Stabilite, nanopartiküllerin başlangıç ve on ayın sonunda yapılan partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleriyle değerlendirilmiştir (Tablo 4.5). Misellerin bu değerleri koruduğu maksimum stabilite süresi 10 ay olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.5 : M3 ve M3/DZP misellerinin DLS ölçümleri ile elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.

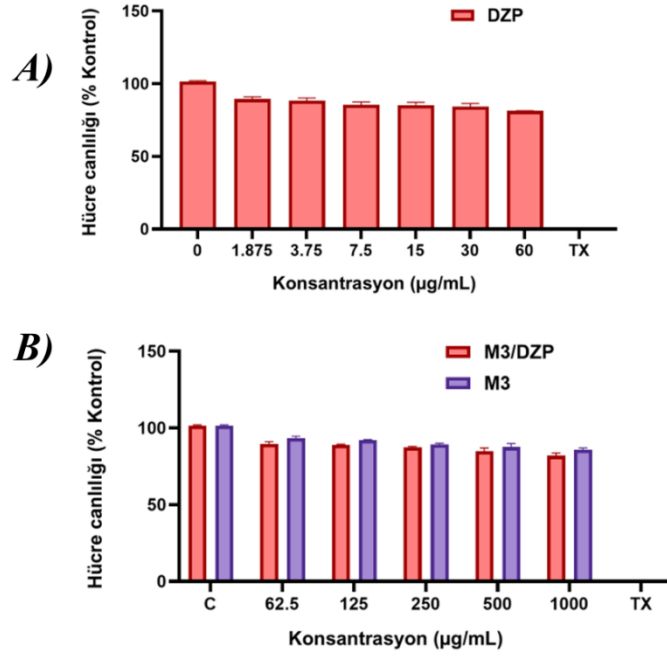
Gün	Misel	Partikül boyutu ^a (d.nm)	PDI ^a	Zeta potansiyeli ^a (mV)
0	M3	37.18	0.162	-13.9 ± 1.61
0	M3/DZP	47.63	0.193	-13.6 ± 0.49
300	M3	57.90	0.149	-10.4 ± 1.08
300	M3/DZP	78.90	0.138	-7.1 ± 0.47

^aDLS ile ölçülmüştür.

4.1.7 Hücre canlılığı ve hücresel alım

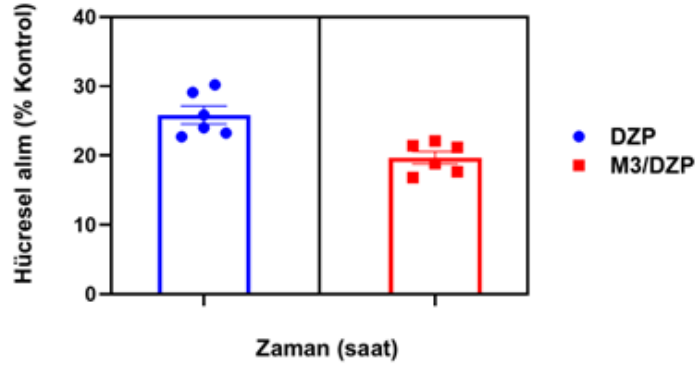
M3 misellerinin hücre üzerindeki sitotoksitesisi yani hücre canlılığı, alamarBlue® hücre canlılığı reaktifi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, hCMEC/D3 hücreleri, artan konsantrasyonlarda serbest DZP, M3 ve M3/DZP miselleri ile inkübe edilmiştir. Şekil 4.14, DZP ile 72 saatlik inkübasyon sonrası hCMEC/D3 hücrelerinin hücre canlılığını göstermektedir. DZP yüklü misellerin en yüksek konsantrasyonu olan 1 mg/mL'de bile belirgin bir sitotoksikite gözlenmemiştir (Şekil 4.14). Bu nedenle, bu en yüksek konsantrasyon güvenli doz olarak belirlenip uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, misellerin hücreler tarafından iyi tolere edildiğini ve test edilen konsantrasyonlarda anlamlı bir sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Özellikle, hücre canlılığı tüm misel konsantrasyonlarında %90'ın üzerinde kalmış ve bu durum hem boş hem de ilaç yüklü misellerin hCMEC/D3 hücrelerinin canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını ve sistemin biyoyumlu olduğunu doğrulamıştır. Hücre canlılığının daha yüksek misel konsantrasyonlarında bile korunması, klinik uygulamalar açısından umut vericidir. Bu durum, nanotaşıyıcı sistemin terapötik dozlarda kullanım için güvenli olduğunu göstermektedir. Hücre canlılığı verilerine ek olarak, misellerin sitotoksitesisini nicelleştirmek için IC50 değerleri hesaplanmıştır [229]. Daha önce yapılmış olan bir çalışmada, DZP için plazma IC50 değeri 53.6 ± 4.0 ng/mL olarak rapor edilmiştir [229].

Bu çalışma kapsamında incelenen M3/DZP için güvenli konsantrasyonun 1 mg/mL olduğu belirlenmiş olup bu değer yaklaşık 60 µg ilaca karşılık gelmektedir. Bu ilaç konsantrasyonu, bildirilen IC50 değerinden anlamlı derecede yüksek olup, misel sisteminin DZP'nin etkili bir terapötik dozunu ilettiğini göstermektedir. Bu nedenle, çalışmalarımızda kullanılan konsantrasyonun, istenen farmakolojik etkileri sağlarken hücre canlılığını ve biyoyumluluğu koruyacak düzeyde olduğu belirlenmiş olmaktadır.



Şekil 4.14 : İnsan beyin endotel hücrelerinin (hCMEC/D3) A) DZP ve B) M3 ve M3/DZP miselleri ile 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılıkları (Veriler, n = 6-8 için ortalama ± SEM olarak sunulmuştur. C: Besi yeri ile muamele edilen kontrol grubu. TX: Maksimum hücresel toksisiteyi göstermek için Triton X-100 ile muamele edilen hücreler. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA, ardından t testi yapılmıştır. P < 0.05, kontrol grubuna kıyasla).

Hücre sağkalım çalışmalarının ardından DZP ve M3/DZP misellerinin hücresel alımı, insan beyin endotel hücre hattı (hCMEC/D3) üzerinde test edilmiştir (Şekil 4.15). hCMEC/D3 hücreleri ile 2 saatlik inkübasyon sonrası, hem sebest DZP (%26) hem de M3/DZP miselleri (%20) için benzer hücresel alım gözlemlenmiştir. Hürelere uygulanan ilaç yüklü misellerde 2 saat süreyle hücresel alımın gerçekleşmesinin ardından tek katmanlı *in vitro* KBB modeli oluşturularak misellerin geçişleri izlenmiştir.

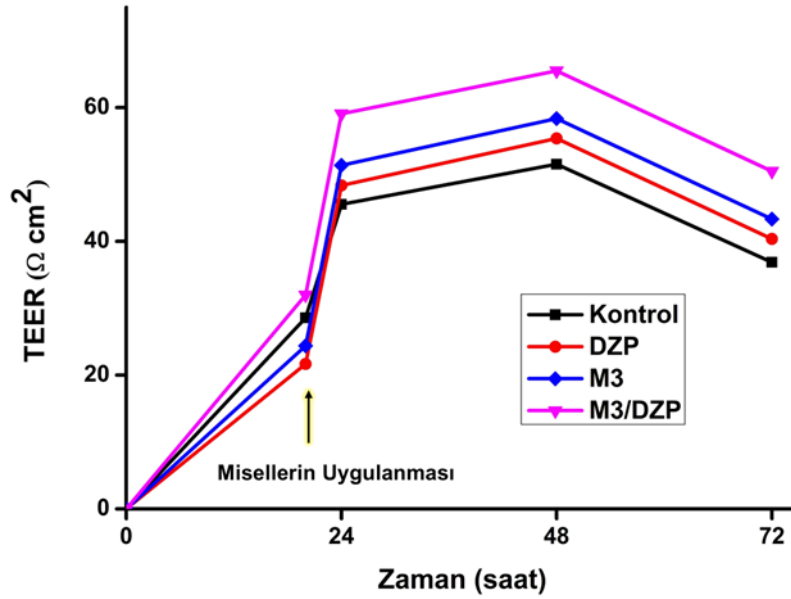


Şekil 4.15 : Kültür edilmiş insan beyin endotel hücrelerinde (hCMEC/D3) DZP ve M3/DZP'nin 2 saatlik inkübasyon sonrası hücresel alımı (Değerler ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur (n = 6). İstatistiksel olarak anlamlı fark $p < 0.05$, tek yönlü ANOVA).

4.1.8 Polimerik misellerin KBB kültür modeli üzerinden geçirgenliğinin belirlenmesi

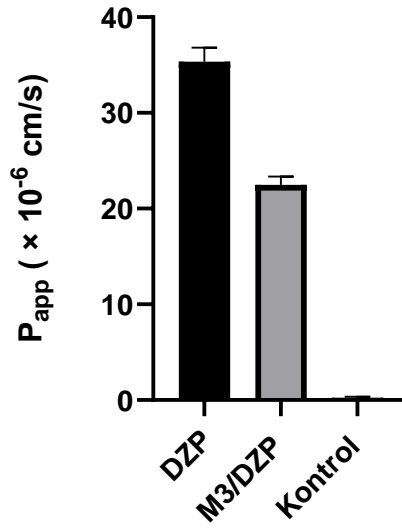
Elde edilen polimerik misellerin biyoyumluluğu hücresel alım sonrasında TEER ölçümleriyle desteklenmiştir (Şekil 4.16). Bu ölçümler, misellerin KBB bütünlüğünü bozmadığını doğrulamıştır. Bu durum, klinik uygulamalar açısından kritik öneme sahip olup KBB'nin yapısında belirgin bir değişime neden olamadan geçebilme yeteneği, Alzheimer hastaları için terapötik açıdan etkili ve güvenli bir ilaç taşıma sistemi geliştirmek için temel bir gerekliliktir. M3 ve M3/DZP misellerinin hCMEC/D3 üzerindeki canlılık etkisi, empedans ölçümleriyle izlenmiştir (Şekil 4.16). *In vitro* KBB tek katmanlı kültür modelinin sıklığı bir cellZscope® cihazı kullanılarak TEER ölçümleriyle doğrulanmıştır [217]. Uygun TEER değerleri ($>30 \Omega \cdot \text{cm}^2$) elde edildiğinde model deneyler için kullanılmıştır. Hücreler, misellere yüklenen DZP'nin eşdeğer konsantrasyonu olan 0.06 mg/mL DZP, M3 ve M3/DZP ile muamele edilmiştir [214]. hCMEC/D3 hücreleri, cellZscope® cihazında hücre kültürü insertlerinde yetiştirilmiştir. Hücreler tam tabaka haline geldiğinde, eşit miktarda M3 ve M3/DZP (yaklaşık olarak 3.3 mg/cm²) lümene eklenmiş ve TEER ölçümleri yapılmıştır. Miseller en yüksek konsantrasyonlarda bile TEER gelişimini etkilememiştir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde DZP, M3 ve M3/DZP'nin hem hücre canlılığını hem de endotel hücre tek tabaka bütünlüğünü bozmadığı ortaya

konmuştur. Bu nedenle miseller herhangi bir sitotoksik etki göstermeyip ilgili konsantrasyonda DZP kadar biyouyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.16 : hCMEC/D3 hücrelerinin trans-endotelial elektrik direncinin (TEER) ölçüm grafiği.

DZP ve M3/DZP'nin penetrasyonu *in vitro* KBB modeli kullanılarak test edilmiştir. hCMEC/D3 hücreleri, 24-transwell hücre kültürü insertlerinde tam tabaka oluşturana kadar büyütülmüştür. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra, belirtilen moleküllere TEER ölçümleri ve ölçüm uygunluğu sonrası geçirgenlik testi yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının yanısıra yeterli bariyer sıklığına işaret eden uygun TEER değeri ($>30 \Omega \cdot \text{cm}^2$) elde edildiğinde geçiş deneyleri başlatılmıştır [214]. M3/DZP misellerinin geçirgenliği serbest DZP ile karşılaştırılmıştır. DZP için P_{app} değeri $103.471 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ve M3/DZP miselleri için ise $81.617 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.17). Sıkı hücre tabakası üzerinden DZP'nin taşınması daha yüksek olmasına rağmen, M3/DZP miselleri de *in vitro* KBB modeli olarak kullanılan hCMEC/D3 tek katmanlı hücre modelini geçmeyi başarmıştır. Miseller, serbest DZP ile karşılaştırılabilir geçirgenlik değerleriyle bariyeri etkili bir şekilde geçmiştir. Ancak, misellerin ilacı enzimatik parçalanmadan ve ilk geçiş metabolizmasından koruma avantajı sunarak *in vivo* biyoyararlanımını daha da artırması olasıdır.

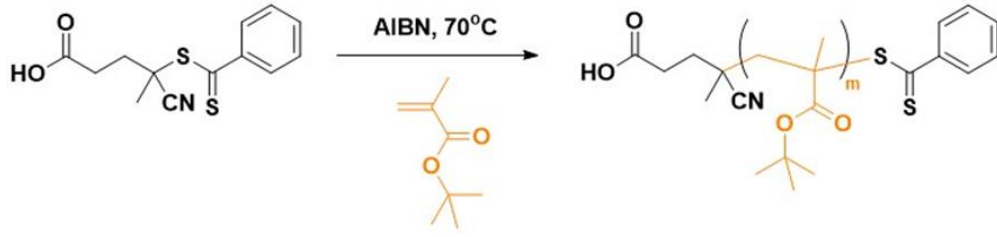


Şekil 4.17 : DZP (0.06 mg/mL, misellere yüklenen miktarla aynı) ve M3/DZP'nin (1 mg/mL) 2 saat inkübasyon sonrasında hCMEC/D3 hücreleri ile oluşturulan KBB kültür modelinden geçirgenliği (2 saat). Değerler, ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur (n = 4-6). DZP ile muamele edilen ve DZP yüklü M3 miselleri ile muamele edilen hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$, tek yönlü ANOVA). Ancak, muamele edilen örnekler ile muamele edilmeyen hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0.05$, tek yönlü ANOVA).

4.2 Folik Asit Konjuge Edilmiş Amfifilik Kopolimerler ile DZP Yüklü Taşıyıcılarının Geliştirilmesine Dair Bulgular

4.2.1 Poli(*tert*-bütil metakrilat) (PtBMA) makro-RAFT ajanının sentezi ve karakterizasyonu

Poli(*tert*-bütil metakrilat) (PtBMA) homopolimeri, *t*BMA birimleri içeren bir makro-RAFT ajanı olarak RAFT polimerizasyonu ile sentezlendi. PtBMA homopolimerinin sentez reaksiyonu Şekil 4.18'da verilmiştir.



Şekil 4.18 : PtBMA sentezi.

Tablo 4.6 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen PtBMA'nın sentezlenme koşulları ve sonuçları.^a

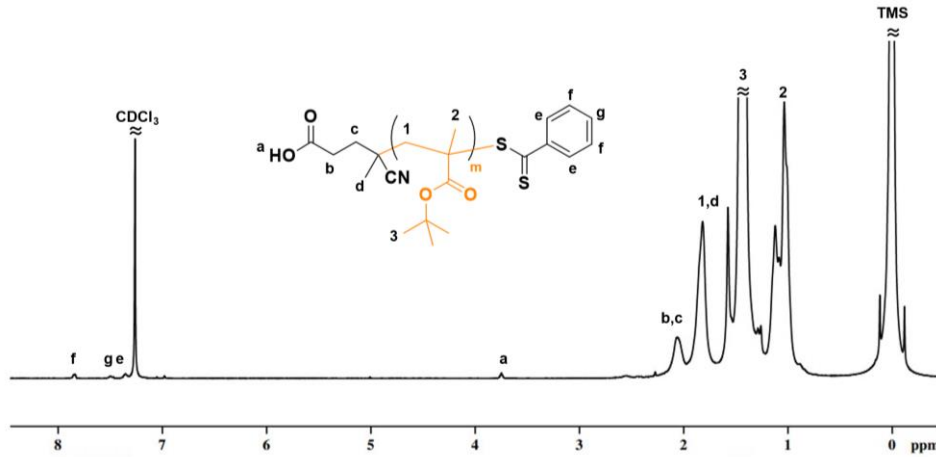
Polimer	Süre (saat)	Dönüşüm ^b (%)	$M_{n,th}$ ^b (g/mol)	$M_{n,GPC}$ ^c (g/mol)	\bar{D} ^c	$M_{n,NMR}$ ^d (g/mol)
PtBMA-1	18	71	20470	14100	1.06	17200
PtBMA-2	10	47	13650	12190	1.06	15210

^aPolimerizasyon çözücüsü olarak toluen kullanılmıştır. [M]:[RAFT]:[AIBN]=200:1:0.33

^bGravimetrik olarak hesaplanmıştır.

^cGPC ile THF içerisinde ölçülmüştür.

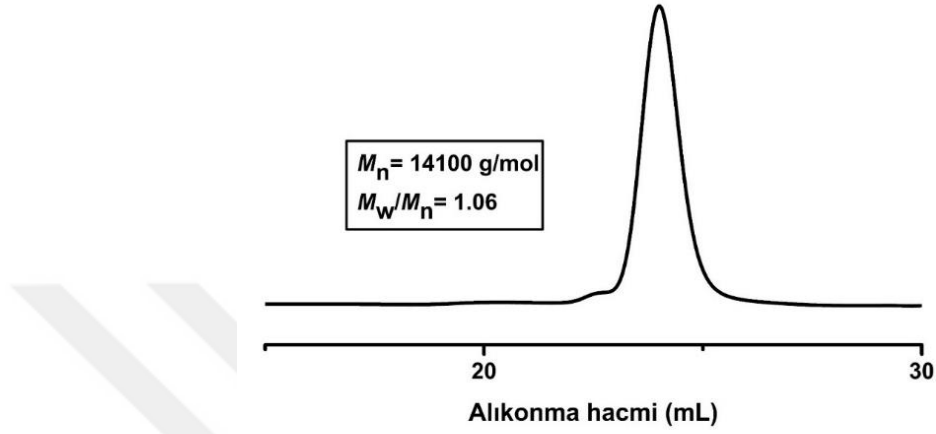
^d¹H NMR ile belirlenmiştir



Şekil 4.19 : PtBMA-1 polimerinin $CDCl_3$ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

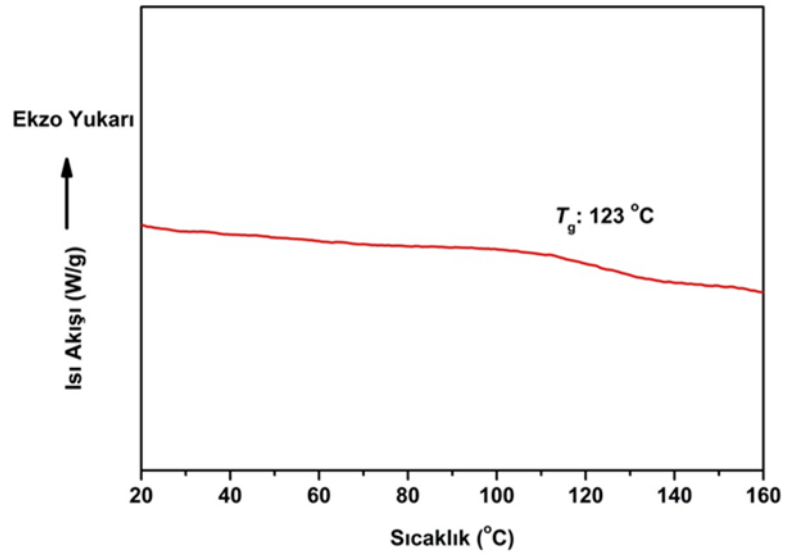
PtBMA-1'in ¹H NMR spektrumu Şekil 4.20'de verilmiştir. ¹H NMR spektrumunda polimerin **a** protonları 3.74 ppm'de, **b** ve **c** protonları 2.06 ppm'de, **d** protonları 1.57 ppm'de, **e** protonları 7.35 ppm'de, **f** protonları 7.84 ppm'de, **g** protonları 7.49 ppm'de, **1** protonları 1.81 ppm'de, **2** protonları 1.47-1.15 ppm'de ve **3** protonları 1.80-1.61 ppm'de polimerin gözlemlendiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.19 incelendiğinde, PtBMA-1

polimerinin karakteristik protonları görülmektedir. *t*BMA ünite sayısı, RAFT ajanından gelen e,f,g protonlarının ve 1.80-1.61 ppm'de bulunan *t*BMA monomerlerinin birimlerinden gelen 3 protonunun toplam integrallerinin oranlanmasıyla hesaplanmıştır. İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.6'da verilmiştir.



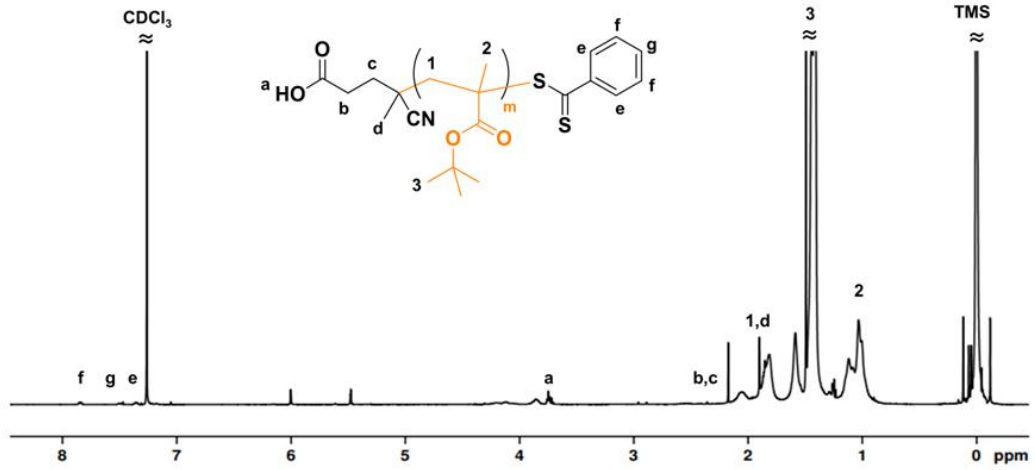
Şekil 4.20 : PtBMA-1 polimerinin GPC kromatogramı.

Elde edilen polimerlerin termal davranışı DSC ile izlenmiştir. Şekil 4.21'te P(*t*BMA)-1 polimerinin termal davranışı görülmektedir. Polimerin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) 123°C olduğu belirlenmiştir.

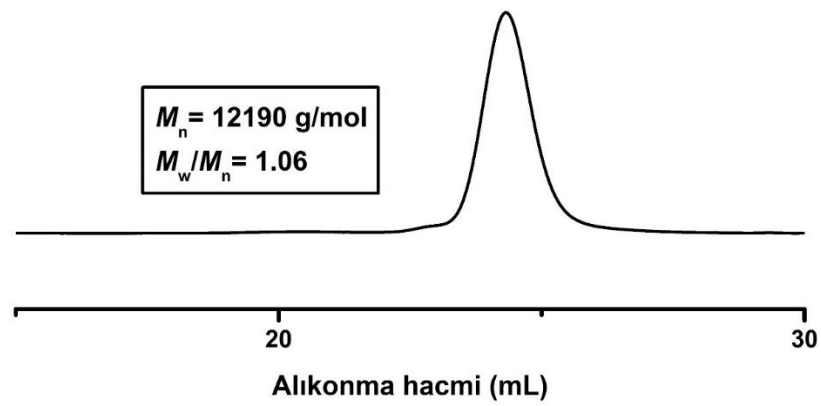


Şekil 4.21 : PtBMA-1'in DSC diyagramı.

*Pt*BMA-2 homopolimerine ait olan **e**, **f** ve **g** protonları ile *Pt*BMA'dan gelen **3** nolu protonlarının integrallerinin oranlanmasıyla *t*BMA ünite sayısı hesaplanmıştır (Şekil 4.22). İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.6'da verilmiştir

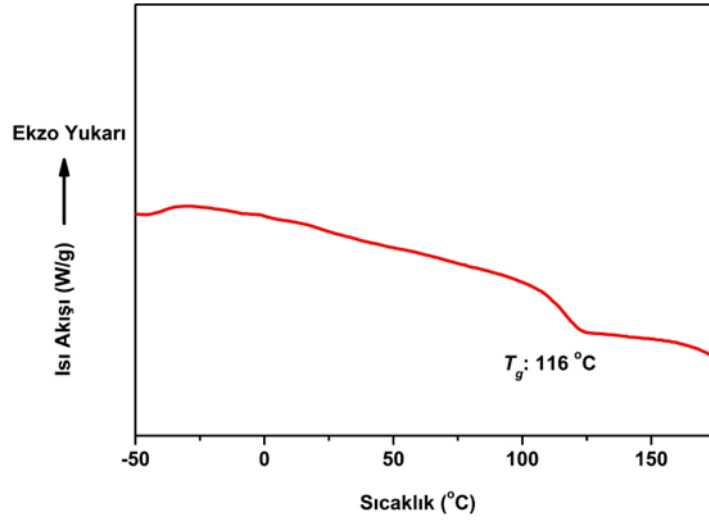


Şekil 4.22 : *Pt*BMA-2 polimerinin CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.



Şekil 4.23 : *Pt*BMA-2 polimerinin GPC kromatogramı.

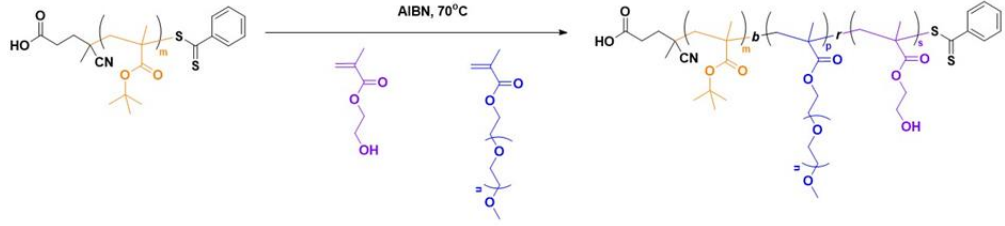
Polimerlerin termal davranışı DSC ile izlenmiştir. Şekil 4.24'te P(*t*BMA)-2 polimerinin termal davranışı görülmektedir. Polimerin camsı geçiş sıcaklığının (T_g) 116°C olduğu belirlenmiştir. P(*t*BMA)-1 polimeri ile karşılaştırıldığında, molekül ağırlığındaki artışa bağlı olarak T_g değerinde de artış gözlenmiştir.



Şekil 4.24 : PtBMA-2'nin DSC diyagramı.

4.2.2 PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) amfifilik kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu

PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) polimeri, PEGMA (0.0059 mol), HEMA (0.0015 mol) 'nın, AIBN varlığında ve PtBMA (0.036741 mmol) makroRAFT ajanı olarak kullanılmasıyla THF içerisinde polimerleştirilmesiyle hazırlandı. Ayrıca makroRAFT başlatıcı olarak kullanılan polimer bu aşamada elde edilen amfifilik kopolimerlerin hidrofobik çekirdek kısmını oluşturmaktadır. Blok kopolimerin kendi kendine düzenlenmesi üzerinde hem hidrofobik hem de hidrofilik blokların uzunluklarının etkisini incelemek amacıyla üç farklı kopolimer sentezlendi. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi kontrollü bir şekilde gerçekleşen polimerizasyon sonucunda molekül ağırlıkları ve polidispersiteler ile doğrulanmış üç farklı amfifilik kopolimerler elde edilmiştir. Elde edilen PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) amfifilik kopolimerleri ^1H NMR, GPC, FT-IR ve DSC yöntemleriyle karakterize edildi.



Şekil 4.25 : *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)* sentezi.

Kopolimer kompozisyonları ¹H NMR spektroskopisi ile belirlenirken, polimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksi (\bar{D}) GPC ile belirlendi (Tablo 4.7). Kopolimer oluşumu ilk olarak GPC analizleriyle doğrulandı. Şekil 4.26'de gösterildiği gibi, *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)*-1 kopolimerinin en yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.7 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)* polimerlerinin sentezlenme koşulları ve sonuçları.^a

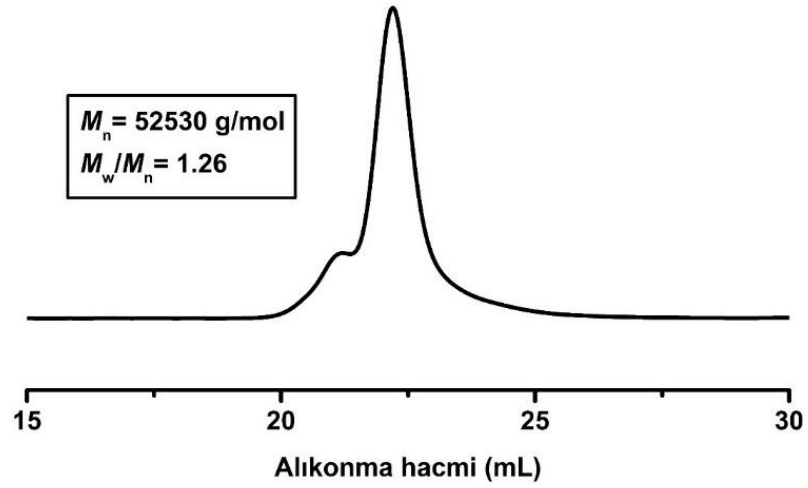
Kopolimer	Makro RAFT ajanı	Süre (saat)	Dönüşü m ^b (%)	$M_{n,th}$ ^b (g/mol)	$M_{n,GPC}$ ^c (g/mol)	\bar{D} ^c	$M_{n,NMR}$ ^d (g/mol)	Ünite oranı ^d [PEGMA]/[HEMA] (%mol)
<i>PtBMA-b-P(PEGMA-<i>r</i>-HEMA)</i> -1	<i>PtBMA</i> -1	18	78	60550	52530	1.26	77780	77/23
<i>PtBMA-b-P(PEGMA-<i>r</i>-HEMA)</i> -2	<i>PtBMA</i> -2	18	89	47370	31780	1.17	55870	79/21
<i>PtBMA-b-P(PEGMA-<i>r</i>-HEMA)</i> -3	<i>PtBMA</i> -1	10	76	57640	22050	1.13	61360	80/20

^aPolimerizasyon çözücüsü olarak toluene kullanılmıştır. [M]:[RAFT]:[AIBN]=200:1:0.33. Besleme oranı: [PEGMA]/[HEMA]= 80/20.

^bGravimetrik olarak hesaplanmıştır.

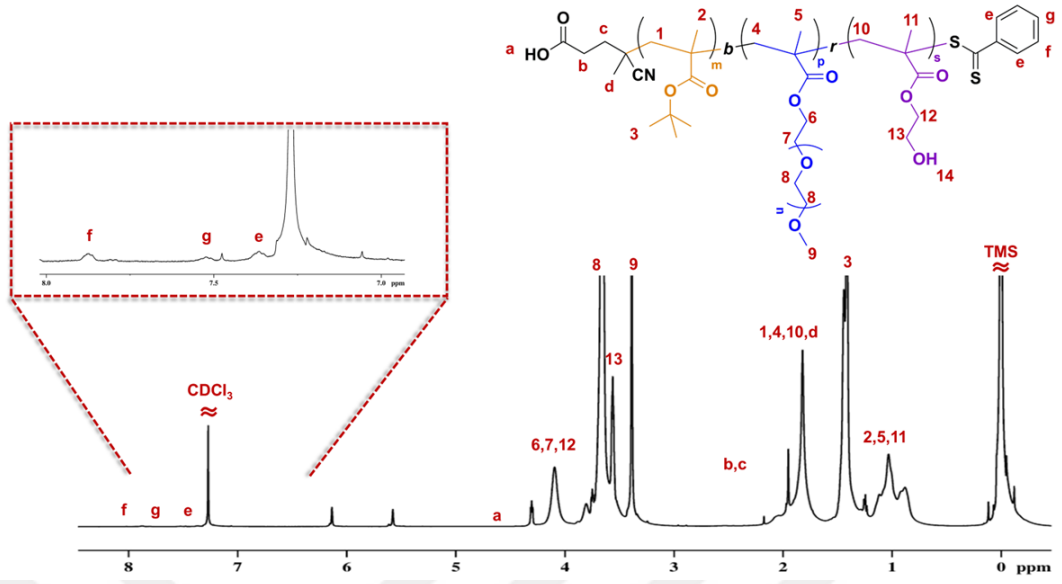
^cGPC ile THF içerisinde ölçülmüştür.

^d¹H NMR ile belirlenmiştir



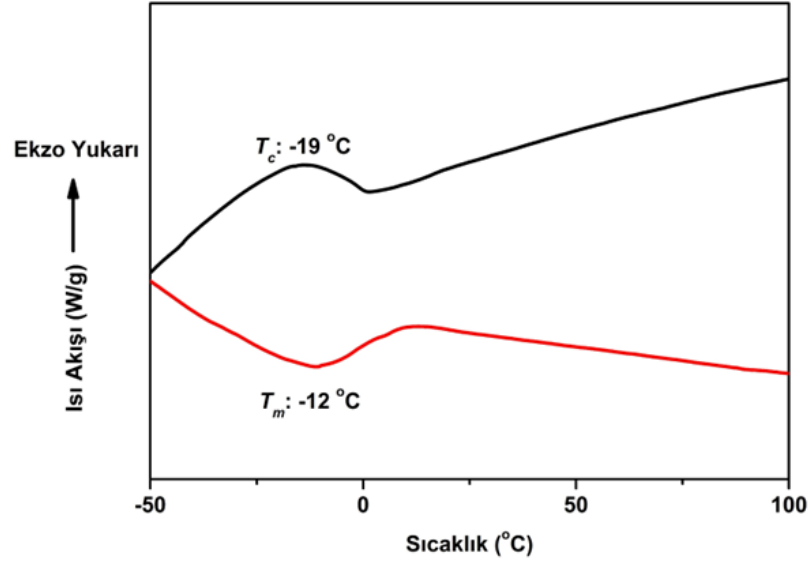
Şekil 4.26 : *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)-1* polimerinin GPC kromatogramı.

Elde edilen polimerlerin kimyasal yapıları ^1H NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.27 incelendiğinde *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)-1* polimerinin yapısına ait karakteristik protonlar görülmektedir. RAFT ajanına ait olan **e,f,g** protonları ile PEGMA ünitelerinden gelen 3.38 ppm deki **9** protonlarının integrallerinin oranlanmasıyla PEGMA ünite sayısı hesaplanmıştır. Ardından *PtBMA*'dan gelen protonlarının toplam *PtBMA*, HEMA ve PEGMA'dan gelen 0.7-1.19 ppm arasında **2,5,11** protonlarının integralleri ile oranlanmasıyla HEMA ünite sayısı hesaplanmıştır. İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.7'de verilmiştir. Bu hesaplamalar aynı makroRAFT ajanı kullanılarak sentezlenen *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)-2* (Şekil 4.30) polimeri için de yapılmıştır. ^1H NMR spektrumlarından yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen kopolimerlerdeki monomer oranlarının besleme oranlarına yakın olduğu tespit edilmiştir.

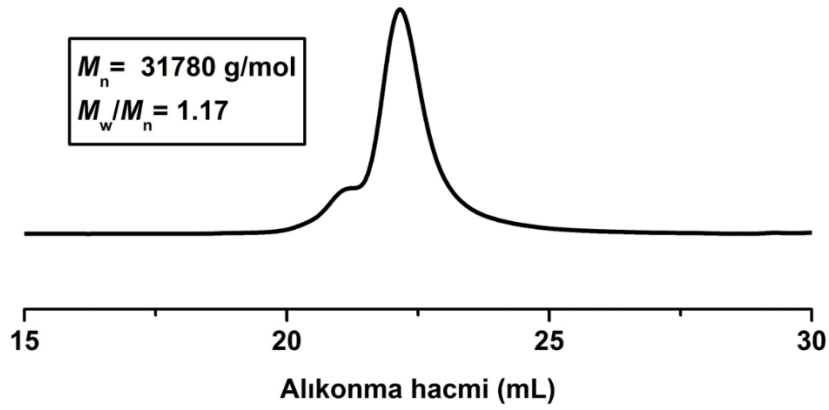


Şekil 4.27 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-1 polimerinin CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

Elde edilen polimerlerin termal davranışı DSC ile izlenmiştir. Şekil 4.28’de PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-1 polimerinin termal davranışı görülmektedir. Polimerin -19°C’de bir kristallenme (T_c) gösterdiği ve erime sıcaklığının (T_m) -12.°C olduğu belirlenmiştir.



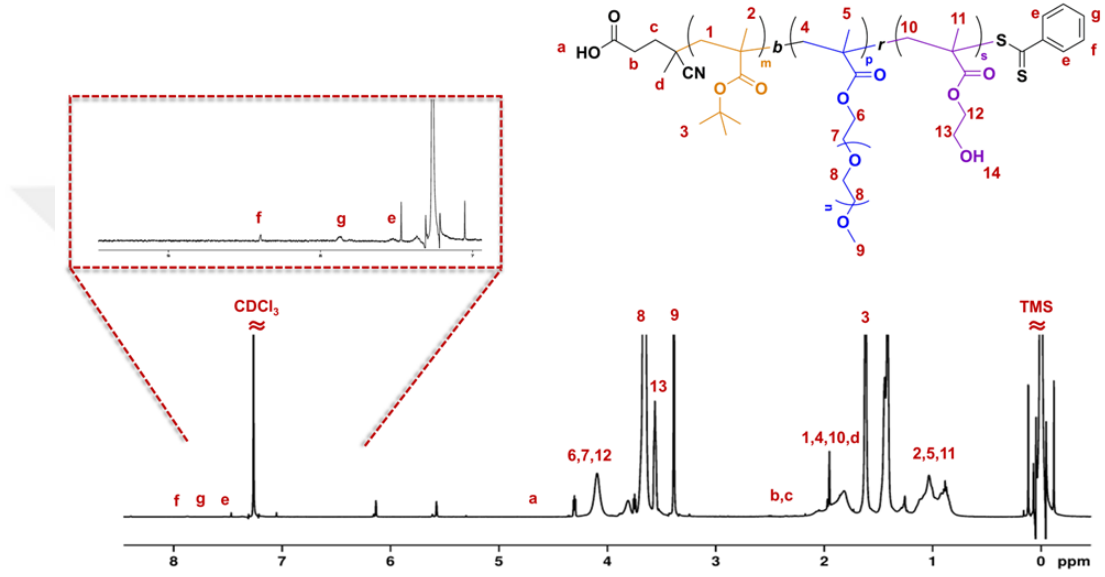
Şekil 4.28 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-1 polimerinin DSC diyagramı.



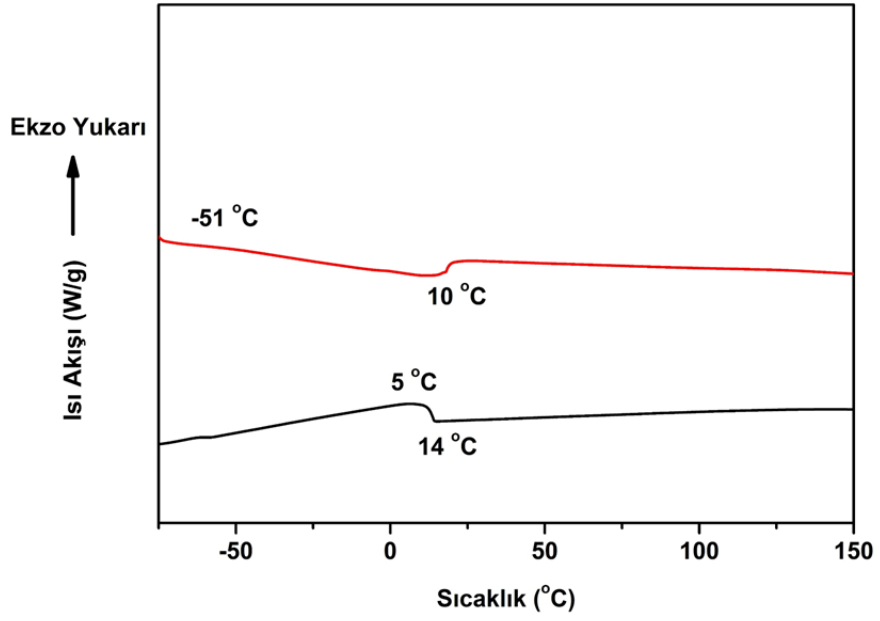
Şekil 4.29 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-2 polimerinin GPC kromatogramı.

Şekil 4.30 incelendiğinde PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-2 polimerlerin kimyasal yapıları ^1H NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Önceki iki polimerden farklı polimerzasyon süresine sahip olarak makroRAFT ajanı olan PtBMA-1 polimeri ile elde edilen bu polimere ait ^1H NMR spektrumunda; RAFT ajanı olarak kullanılan polimere ait e,f,g protonları ve makroRAFT ajanından gelen tBMA sayısı ile PEGMA ünitelerinden gelen 9 protonlarının integrallerinin oranlanmasıyla PEGMA ünite sayısı hesaplanmıştır. Ardından PtBMA'dan gelen protonlarının toplam PtBMA,HEMA ve

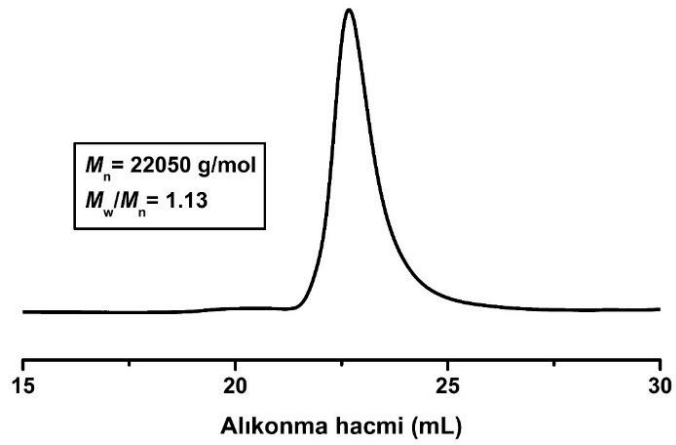
PEGMA'dan gelen 0.7-1.2 ppm arasında **2,5,11** protonlarının integralleri ile oranlanmasıyla HEMA ünite sayısı hesaplanmıştır. İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.7'de verilmiştir. ^1H NMR spektrumlarından yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen kopolimerlerdeki monomer oranlarının besleme oranlarına yakın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.30 : $PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)-2$ polimerinin CDCl_3 içerisinde çekilmiş ^1H NMR spektrumu.



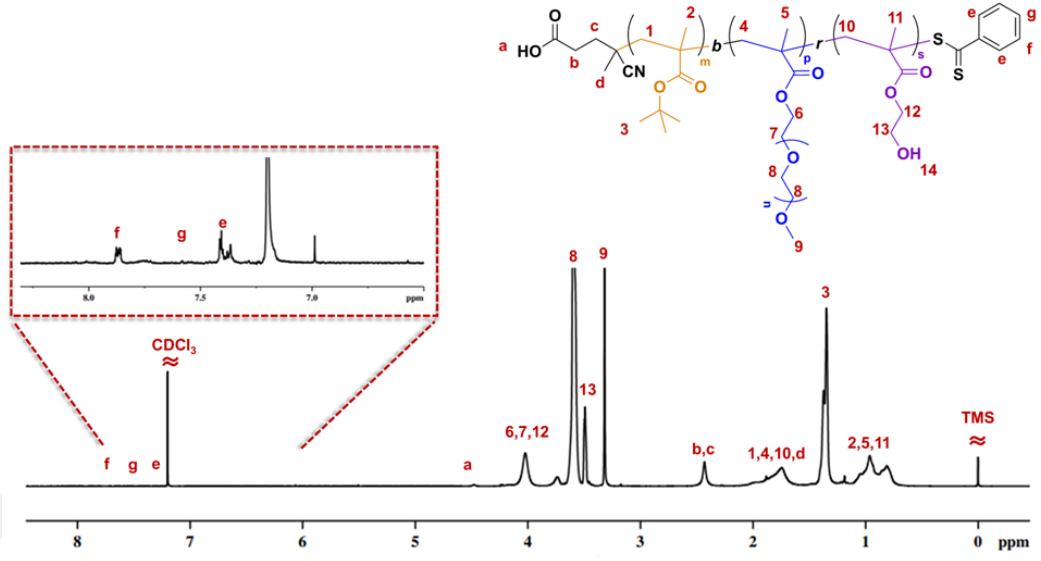
Şekil 4.31 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-2 polimerinin DSC diyagramı.



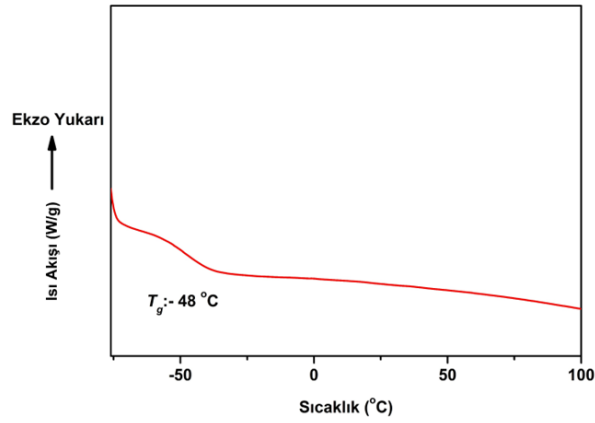
Şekil 4.32 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 polimerinin GPC kromatogramı.

Elde edilen polimerlerin kimyasal yapıları ^1H NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.33 incelendiğinde *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3* polimerine ait karakteristik protonlar gözlemlenmiştir. RAFT ajanına ait **e**, **f**, **g** protonlarının integralleri ile PEGMA birimlerine ait 3.31 ppm'de yer alan **9** protonun integralleri oranlanarak PEGMA ünite sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra, *PtBMA* birimlerinden gelen protonlar ile *PtBMA*, HEMA ve PEGMA'ya ait 1.11-0.71 ppm arasında yer alan **2**, **5**, **11** protonlarının integralleri oranlanarak HEMA birim sayısı hesaplanmıştır. ^1H NMR spektrumu üzerinden yapılan hesaplamalar sonucunda, elde edilen kopolimerlerde PEGMA, HEMA ve *tBMA* birim sayılarının sırasıyla 135, 33 ve 119 olduğu ve bu oranların besleme oranları ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Farklı molekül ağırlığında ve farklı farklı hidrofilik ve hidrofobik özelliklere sahip özellikte olan bu üç polimerin çözünme davranışlarının da farklı olduğu gözlemlendi. İlerleyen aşamalarda kullanılacak olan reaksiyon çözücülerini olacak olan DMF içerisindeki davranışlarının incelenmesi neticesinde öncelikle *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-1* ve *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-2* polimerleri kıyaslandığında her ikisinde DMF içerisinde çözülmüş fakat *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-1* DMF içerisinde nispeten hızlı ve kolay bir çözünme gösterdi. Bu davranışının nedeni *PtBMA-1* polimerinin makroRAFT ajanı olarak kullanılması nedeniyle olduğu düşünülerek optimize edilen polimer içinde *PtBMA-1* homopolimeri makroRAFT ajanı olarak kullanıldı. İlerleyen çalışmalarda misel oluşumunun sağlanması içinde düşük molekül ağırlığı elde etmeyi amaçlayarak süre azaltılarak *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3* elde edildi. Buna entezlenen *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3* polimeri GPC sonucuna göre daha düşük molekül ağırlığında ve daha iyi polidispersiyeye sahip olup DMF içerisinde kolaylıkla çözünme göstermesi nedeniyle *PtBMA-b-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3* seçilmiştir.



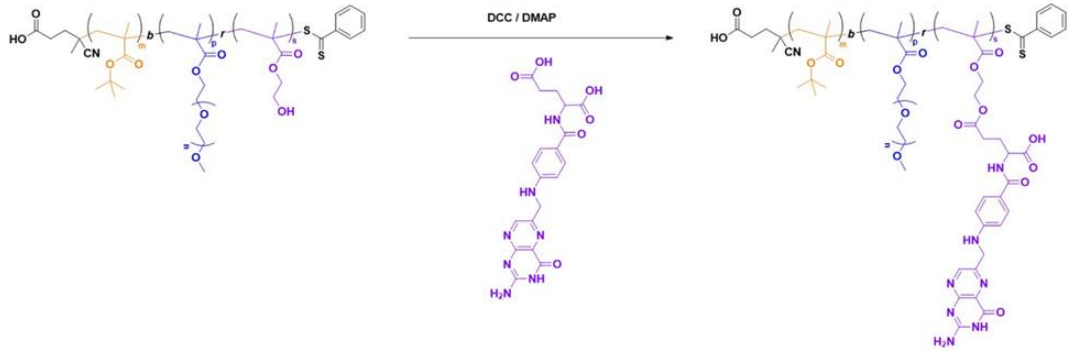
Şekil 4.33 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 polimerinin CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.



Şekil 4.34 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 polimerinin DSC diyagramı.

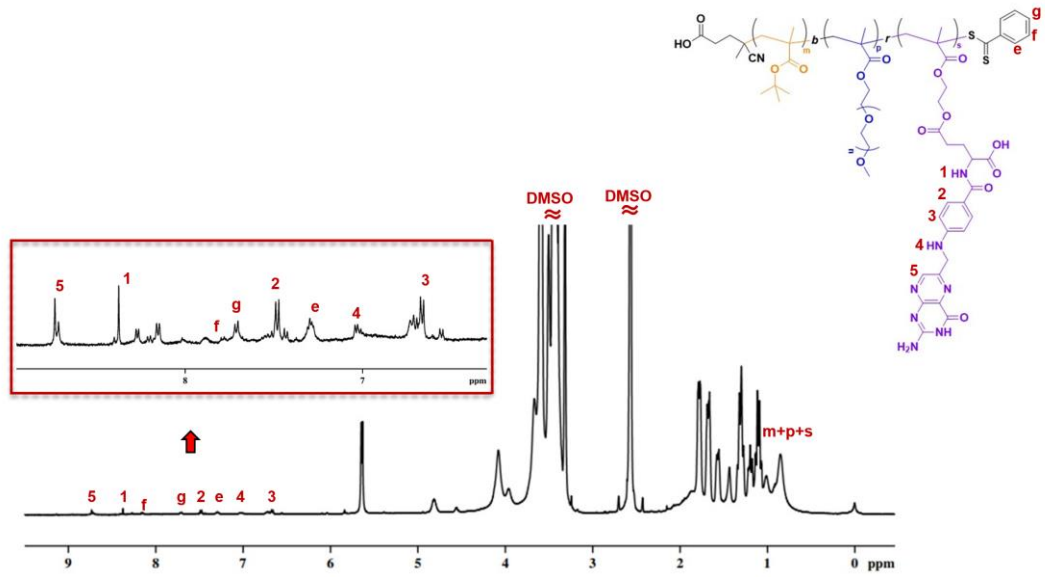
4.2.3 Folik asit konjuge polimer (PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)) sentezi ve karakterizasyonu

PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 (0.2 g, 0.0599 mmol), folik asit (0.132 g, 0.299 mmol) ve DMAP (0.036 g, 0.299 mmol) içeren 15 mL DMF reaksiyon karışımına buz banyosunda (0°C) DCC çözeltisi (0.061 g, 0.299 mmol, 5 mL DMF) karıştırılarak damlatma hunisi yardımıyla damla damla eklendi. Reaksiyon, karanlık bir ortamda dört gün boyunca devam etti. Reaksiyon sonunda, DCC ve DMAP uzaklaştırılması amacıyla dört gün boyunca distile suya karşı diyalize bırakıldı. Diyaliz sonrası liyofilize edilen folik asit konjuge fonksiyonel polimer, bağlanamayan folik asidin uzaklaştırılması amacıyla kloroformda çözülerek nüsche erlenmeyer kullanılarak süzülerek saflaştırıldı ve vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu. PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 polimeri esterifikasyon reaksiyonu ile folik asit (FA) ile işlevselleştirildi. Folik asit konjuge fonksiyonel polimerler, ¹H NMR, FT-IR ve DSC yöntemleriyle karakterize edildi [230].



Şekil 4.35 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) sentezi.

Folik asit (FA) konjugasyonu sonucu elde edilen PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-1 polimerinin ¹H NMR (Şekil 4.36) analizi ile karakterize edildi. PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-1 polimerinin ¹H NMR spektrumu, 6.5 ila 8.7 ppm aralığında FA kısmının karakteristik sinyallerini göstermektedir. tBMA, HEMA ve PEGMA segmentlerinin FA protonlarının (**1**, **2**, **3** ve **4**) ve metil protonlarının (**2**, **5** ve **11**) 0.51-1.04 ppm'de entegrasyonunu karşılaştırarak FA konjuge ünitelerin sayısının 10 olduğu bulundu.

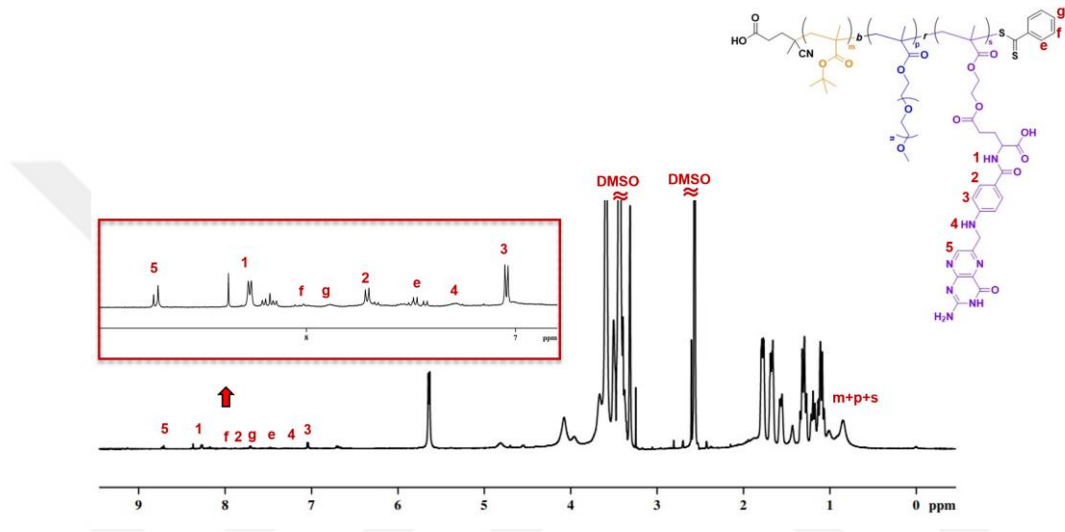


Şekil 4.36 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-1 polimerinin DMSO içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

Konjuge folik asit miktarını artırmak için aynı yöntemle iki katı miktarda folik asit ile tekrar reaksiyona bırakıldı elde edilen PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-2 polimerine ait ¹H NMR ile karakterize edildi (Şekil 4.37).

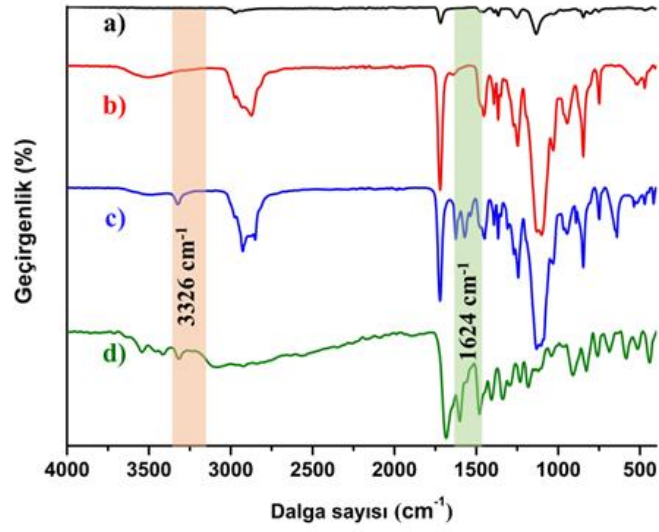
Elde edilen polimerlerin kimyasal yapıları ¹H NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.37 incelendiğinde, PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-2 polimerine ait karakteristik protonlar gözlemlenmiştir. Folik aside ait sırasıyla 8.37, 7.71, 7.05 ve 7.28 ppm'de bulunan **1**, **2**, **3** ve **4** protonlarının integralleri ile PtBMA, HEMA ve PEGMA'ya ait 1.04-0.58 ppm arasında yer alan **2**, **5** ve **11** protonlarının integralleri oranlanarak folik asit sayısı hesaplanmıştır. ¹H NMR spektrumu üzerinden yapılan hesaplamalar sonucunda, kopolimerlerdeki FA konjuge ünitelerin sayısının 15 olduğu belirlenmiştir.

Folik asit ile konjuge edilerek fonksiyonelleştirilmiş polimerler kullanılarak miseller oluşturulmuştur. Ancak, 15 folik asit birimi içeren polimerle yapılan misel oluşumunda çökme gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin miselin hidrofilik kabuk bölgesine konjuge edilen folik asit molekülünün artan miktarı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, eklenebilecek en uygun konjuge ünitelerin sayısı 10 ünite olarak belirlenmiştir. Misel oluşumu için PtBMA-*b*-(PEGMA-*r*-FAHEMA)-1 polimer kullanılmıştır.



Şekil 4.37 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-2 polimerinin DMSO içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

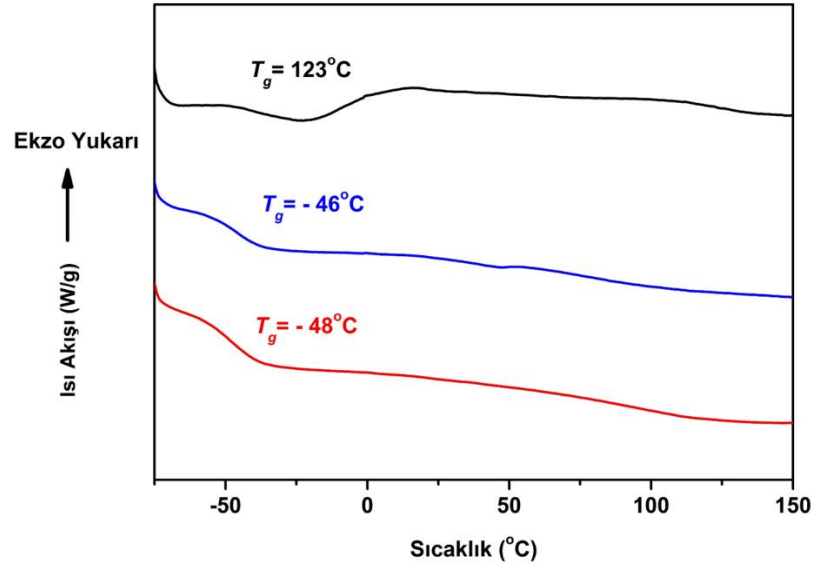
Şekil 4.38’de verilen FT-IR spektrumunda, FA fonksiyonelleştirilmesiyle yapılarına eklenen gruplara ait bantlar gözlemlenmiştir. FA’ya ait aromatik bileşiklerin (C-H) bükülmesi 1624 cm⁻¹’de görülmüştür. Elde edilen ¹H NMR (Şekil 4.36) ve FT-IR (Şekil 4.38) sonuçları, fonksiyonelleştirilmiş polimer sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini gösterilmiştir.



Şekil 4.38 : a) *PtBMA*-1, b) *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)*-3, c) *PtBMA-b-P(PEGMA-r-FAHEMA)*-1 ve d) folik asidin FT-IR spektrumları.

Elde edilen amfifilik kopolimerlerin ısı özelliklerinin belirlenmesi için DSC ölçümleri karşılaştırılmıştır. Ölçüm sonucunda, cam geçiş sıcaklığı (T_g), *PtBMA-b-P(PEGMA-r-FAHEMA)*-1 için -46°C ve *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)*-3 için -48°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.39).

Yan gruptaki aromatik yapılar, polimerlerin cam geçiş sıcaklığını artırmaktadır. Aromatik gruplar, "sert gruplar" olarak adlandırılır ve polimerlerin hareketliliğini sınırlar. Yan gruptaki ikinci bir süstitüent, T_g değerini daha da artırır. Bu ikinci süstitüentler, polimer zincirinin hareketliliğini azaltarak T_g değerini yükseltir. Bu bilgiler göz önüne alındığında, folik asidin aromatik yan gruplarının yapıya eklenmesiyle hedeflenen polimerin T_g değerinin arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, folik asitle fonksiyonelleştirilmiş polimerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği belirlenmiştir.



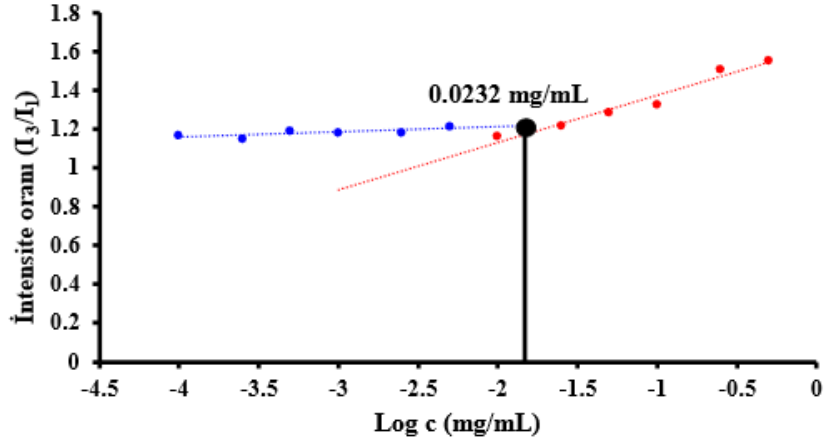
Şekil 4.39 : a) *PtBMA-1* b) *PtBMA-b-P(PEGMA-r-FAHEMA)-1*, c) *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)-3* polimerlerinin DSC diyagramları.

4.2.4 *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)* ve *PtBMA-b-P(PEGMA-r-FAHEMA)* ile polimerik misellerin oluşturulması ve karakterizasyonu

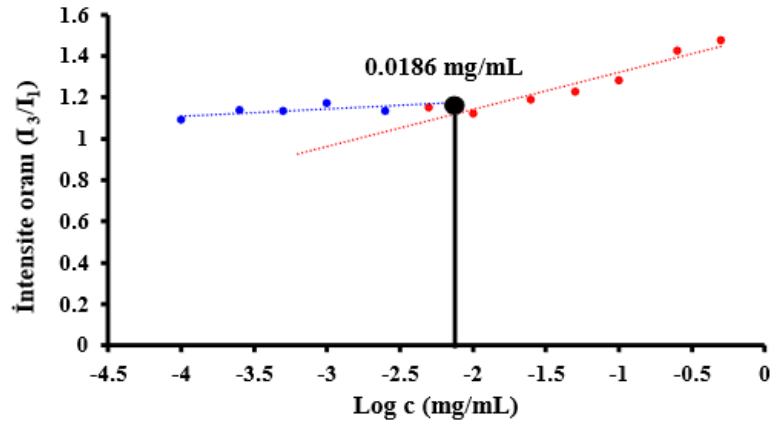
PtBMA-b-P(PEGMA-r-FAHEMA) ve *PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)* polimeri ile FA konjugasyonunun misel oluşumuna ve misel stabilitesine etkisi ayrı ayrı misel oluşturularak incelenmiştir. Polimerlerden (10 mg) ve DMF (2 mL) oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra distile su (8 mL), enjeksiyon pompası kullanılarak 0.5 mL/dk hızında çözeltiye eklendi ve oda sıcaklığında bir gece karışmaya bırakıldı. Ertesi gün karışım bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarıldı ve distile suya (2 L) karşı bir gün boyunca diyaliz yapıldı. DLS cihazı ile ölçümlerinin yapılmasının ardından polimerik misellerin KMK belirlenmiştir.

PtBMA-b-P(PEGMA-r-HEMA)-3 ve *PtBMA-b-P(PEGMA-r-FAHEMA)-1* kopolimerlerinin KMK değerleri sırasıyla 0.0232 mg/mL (Şekil 4.40) ve 0.0186 mg/mL (Şekil 4.41) olarak hesaplanmıştır. Düşük KMK değerleri sayesinde, her iki kopolimerden oluşan miseller, çok düşük kopolimer konsantrasyonlarında bile kararlı kalabilmekte ve bu da miselim stabilitesini koruyarak ilacın dolaşım süresini artırabilme potansiyelini göstermektedir. KMK'ları karşılaştırıldığında FA ile fonksiyonlandırılmış polimerin oluşturduğu misellerin KMK'sı daha düşüktür bu da

misel oluşumu için daha az miktarda polimer gerektiği anlamına gelmektedir. Sonuç olarak FA ile fonksiyonlandırılmış polimer fonksiyonlandırılmadan önceki polimere göre misel oluşumu açısından daha kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.40 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA)-3 polimerinin KMK'sına ait logaritmik grafik.



Şekil 4.41 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)-1 polimerinin KMK'sına ait logaritmik grafik.

4.2.5 PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) ile DZP yüklü misellerin oluşturulması ve karakterizasyonu

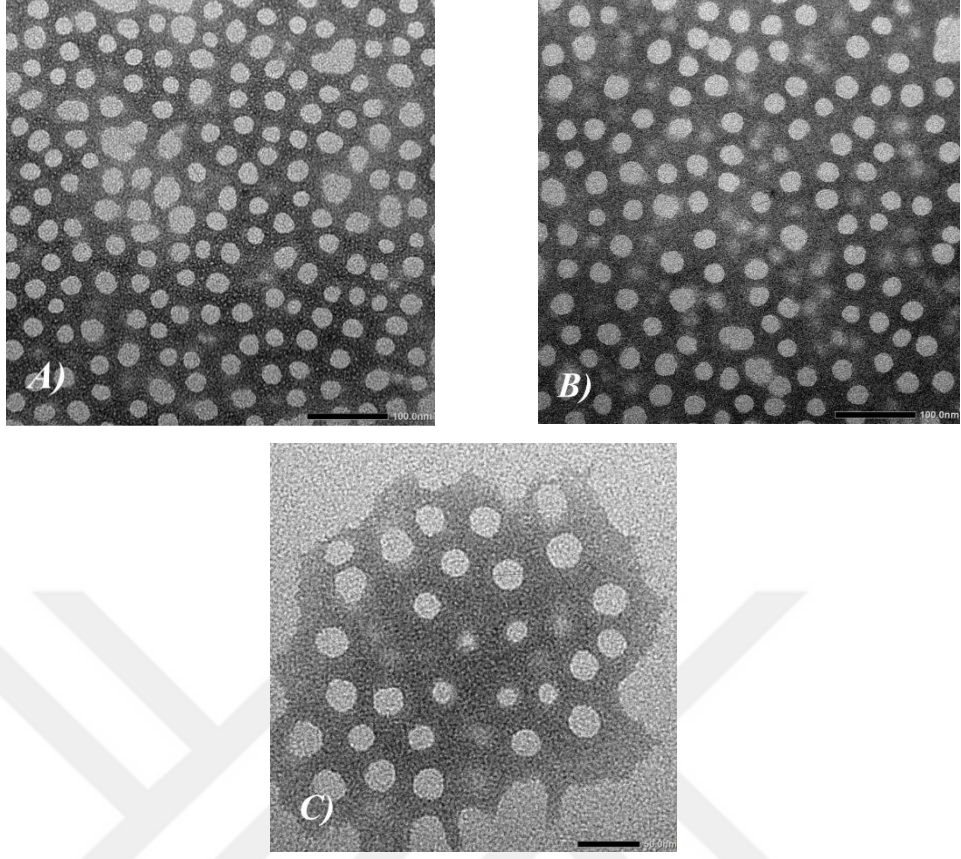
İlaç yüklü polimerik misellerin oluşumu için diyaliz yöntemi ile miseller hazırlanmıştır. Bunun için hidrofobik serbest ilacın elde edilmesi amacıyla Donepezil•HCl (2 mg) DMF (2 mL) içerisinde, 2 mol oranında trietilamin (TEA) ilavesiyle bir gece karışıma bırakılmıştır. PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) (10 mg) oda sıcaklığında eklenerek 2 saat karıştırmaya devam edilmiştir. İki saatin sonunda çözeltiye enjeksiyon pompası ile 0.5 mL/dk hızında distile su (8 mL) eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında bir gece karıştırmaya bırakılmıştır. Süre sonunda misel çözeltisi, bir diyaliz membranına (MWCO= 6000-8000 Da) aktarılarak ve distile suya karşı 24 saat boyunca diyaliz edildi. Oluşan donepezil yüklü polimer miseller, DLS cihazı ile ölçümlerinin yapılmasının ardından polimerik miseller liyofilize edilerek kurutuldu.

Tablo 4.8 : PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) polimerleri ile oluşturulan misellerin DLS ve TEM verileri.

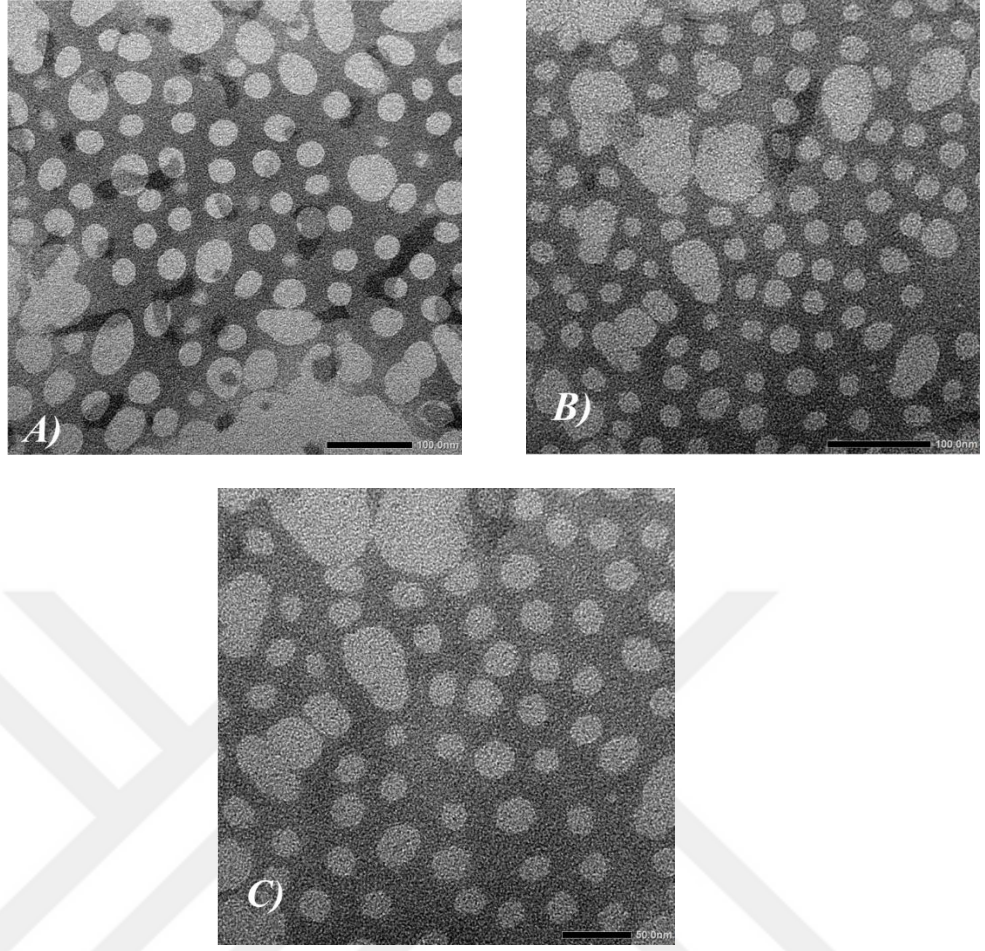
Misel	Polimer	Partikül boyutu ^a (nm)	Partikül boyutu ^b (nm)	PDI ^a	Zeta potansiyeli ^a (mV)
M1	PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3	27	23	0.226	-20.6±1.2
M1/DZP	PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -HEMA)-3	30	26	0.212	-11.7±0.8
M2	PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-1	31	33	0.407	-27.0±2.8
M2/DZP	PtBMA- <i>b</i> -P(PEGMA- <i>r</i> -FAHEMA)-1	34	36	0.715	-13.8±0.9

^aDinamik ışık saçılması (DLS) ölçümleriyle belirlendi.

^bTransmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntülerinden belirlendi.



Şekil 4.42 : A) M1 (ölçek çubuğu = 100 nm), B) M1/DZP (ölçek çubuğu = 100 nm) ve C) M1/DZP'nin (ölçek çubuğu = 50 nm) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.



Şekil 4.43 : A) M2 (ölçek çubuğu = 100 nm), B) M2/DZP (ölçek çubuğu = 100 nm) ve C) M2/DZP'nin (ölçek çubuğu = 50 nm) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.

Numunelerin hiçbirinde zeta potansiyeli +30 mV'dan yüksek veya -30 mV'dan düşük olmamıştır; bu durum, misellere koloidal stabilite sağlamak için yeterli elektrostatik itme kuvveti olduğunu göstermektedir. FA ile fonksiyonlandırılmış misellerin zeta potansiyelinin nispeten daha negatif olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, misel yüzeyine eklenen FA gruplarının daha düşük pH değerlerinde negatif yüklerini koruduğu için, FA'nın misel yüzeyindeki ayırt edilebilir yüzey elektriksel özelliklerini tanımlamak mümkündür [231].

4.2.6 (PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA)) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) ile amfifilik kopolimerleri ile oluşturulan misellerin *in vitro* ilaç salımının belirlenmesi

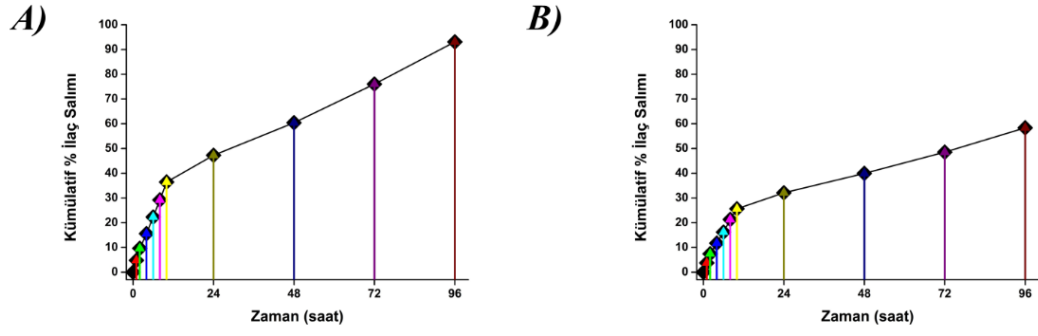
İlacın kalibrasyon eğrileri ; *in vitro* ilaç salım çalışması için PBS (%2 Tween 80 v/v) çözeltisinde (Şekil 4.12) %İYK ve %İYE'nin hesaplanması için DMSO çözeltilerinde (Şekil 4.9) oluşturuldu. Misel formülasyonu, 2 mg DZP ve 10 mg polimer kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan DZP yüklü misel çözeltisinden (1 mL) bir diyaliz torbasına aktarılmış ve sabit sıcaklıkta (37 °C) çalkalamalı bir inkübatörde, Tween® 80 (%2 v/v) içeren 20 mL PBS (pH 7,4) çözeltisi içinde diyaliz yöntemi kullanılarak UV/Vis mikropilaka okuyucu ile UV absorbans değeri 312 nm'de yapılan absorbans ölçümleri ile belirlendi. DZP yüklü polimerik miseller (M1/DZP ve M2/DZP), distile suya karşı diyaliz yöntemi kullanılarak kendiliğinden oluşması sağlanmasının ardından %İYK ve %İYE belirlendi. Ayrıca, enkapsüle edilen DZP miktarı belirlenmesiyle kümülatif olarak % ilaç salım yüzdesi hesaplanmıştır.

Tablo 4.9 : Misellere yüklenen ilaç miktarına göre teorik ilaç yükleme kapasitesi (TİYK), ilaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme etkinliğinin (İYE)

Misel	TİYK (%)	İYK (%)	İYE (%)
M1/DZP	17	5	23
M2/DZP	17	5	49

İYK her iki kopolimer için de %5 olarak bulunurken, İYE değerleri M1/DZP için %23, M2/DZP için ise %49 olarak elde edildi. İlaç yükleme etkinliği DZP ile hidrofobik PtBMA çekirdeği arasındaki uyuma bağlı olarak, aynı zamanda salım hızını da etkileyen parametrelerdendir.

DZP salımı başlangıçta hızlı olmuş, ancak yaklaşık 10 saat sonra salım hızı azalma göstermiştir. Şekil 4.44'de görüldüğü üzere, 96 saat sonunda DZP salımı M1/DZP misellerinden (%93), M2/DZP misellerine kıyasla (%58) önemli ölçüde daha yüksek olmuştur.



Şekil 4.44 : A) M1/DZP ve B) M2/DZP misellerinin 37°C’de Tween 80 (%2 v/v) içeren PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde *in vitro* salım grafikleri.

4.2.7 Polimerik misellerin stabiliteilerinin belirlenmesi

Stabilite çalışmaları için, polimerik miseller 4°C’de ve karanlık bir ortamda altı ay boyunca saklanmıştır. Stabilite, nanopartiküllerin başlangıç ve onuncu ayın sonunda ölçülen parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleriyle değerlendirilmiştir. Bu parametrelerin korunduğu maksimum stabilite süresi altı ay olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.10 : Boş ve İlaç yüklü polimerik misellerin DLS verileri.

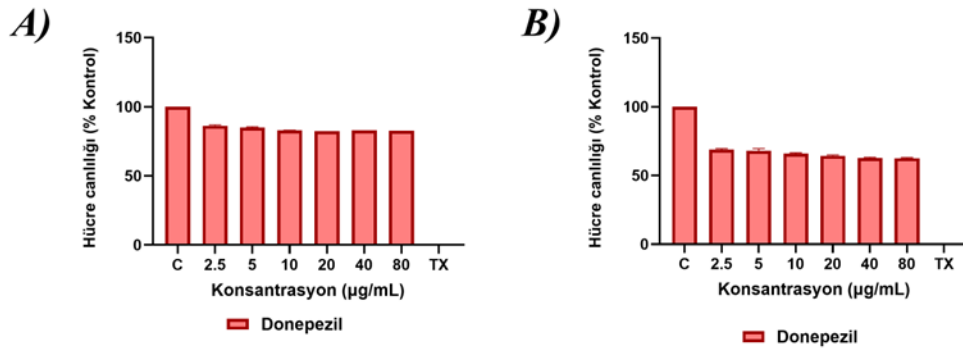
Gün	Misel	Partikül boyutu ^a (nm)	PDI ^a	Zeta potansiyeli ^a (mV)
0	M1	27	0.345	-17.5
180	M1	26.97	0.226	-20.6±1.17
0	M2	29	0,417	-18.2
180	M2	31.4	0.407	-25.9±5.94
0	M2/DZP	30	0.291	-10.2
180	M2/DZP	33.64	0.715	-13.8±0.948

^aDLS ile ölçülmüştür.

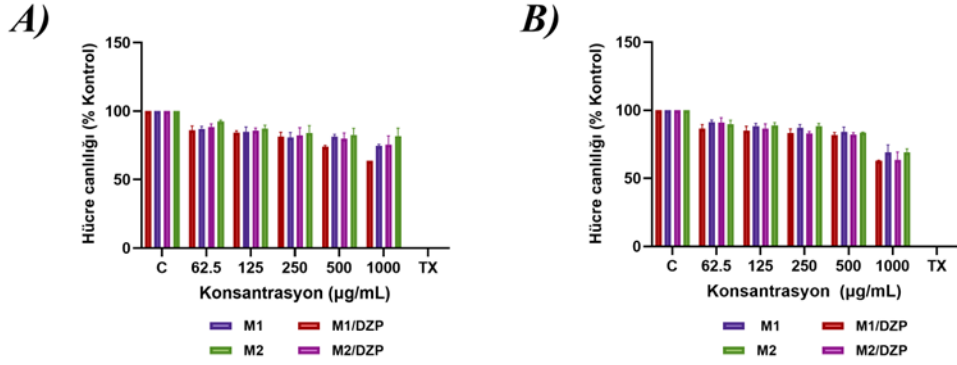
4.2.8 Hücre canlılığı ve hücresel alımı

Boş ve DZP yüklü misellerin hücreler üzerindeki sitotoksitesine bağlı olarak hücresel canlılık, alamarBlue® reaktifi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, konfluansa ulaşmış hCMEC/D3 ve PS70 hücrelerine ayrı ayrı olarak, artan konsantrasyonlarda DZP, M1, M1/DZP, M2 ve M2/DZP örnekleri uygulanmıştır. (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46). DZP’nin artan konsantrasyonuna bağlı 72 saat inkübasyon

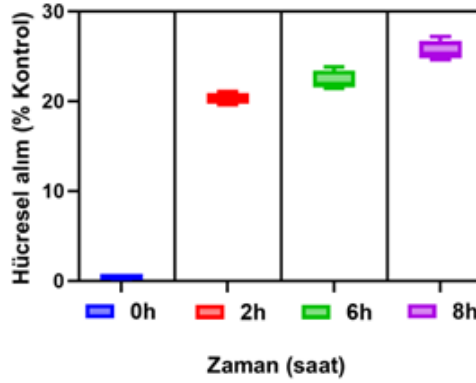
sonrası hCMEC/D3 ve PS70 hücrelerinin hücre canlılığını göstermektedir. Hücreler, misellere yüklenen DZP konsantrasyonları dahil olmak üzere yüksek canlılık göstermiştir. Buna ek olarak, DZP konsantrasyonuna bağlı olarak hem hCMEC/D3 hem de PS70 hücrelerinde canlılıkta belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Tüm miseller, en yüksek konsantrasyonda (1 mg/mL) bile hücre canlılığı açısından güvenli bulunmuştur (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46). Bu nedenle, en yüksek konsantrasyon güvenli doz olarak seçilerek hücre alım için uygulanmıştır. M2/DZP'nin hücre alımı, insan beyin endotel hücre hattı (hCMEC/D3) üzerinde test edilmiştir (Şekil 4.47). Misellere konjuge bulunan folik asit aynı zamanda işaretleyici olarak kullanılarak hücre alımının belirlenmesinde kullanılmıştır. İki saatlik inkübasyon sonrası UV absorbanı ölçülen örnekler, UV/Vis mikropilaka okuyucu cihazı ile 360 nm dalga boyunda (folik asit analizi için) analiz edilmiştir [221]. İnsan beyin endotel hücrelerinde, 2 saatlik inkübasyon sonrası %20, 6 saatlik inkübasyonda ise %22 gibi benzer hücre alım gözlemlenmiştir. Daha sonra, 8. saatte bir artış görülerek hücre alım %26'ya ulaşmıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.45 : A) hCMEC/D3 hücreleri ve B) PS70 hücrelerinin farklı konsantrasyonlardaki DZP varlığında hücre canlılığı (C: Kültür ortamı ile muamele edilmiş kontrol grubu; TX: Maksimum hücre toksisiteyi gösteren Triton X-100 ile muamele edilmiş hücreler).



Şekil 4.46 : A) hCMEC/D3 hücreleri ve B) PS70 hücrelerinin boş ve DZP yüklü misellerin farklı konsantrasyonları varlığındaki hücre canlılığı grafikleri (Veriler, n = 6-8 için ortalama \pm SEM olarak sunulmaktadır. C: Kültür ortamı ile muamele edilen kontrol grubu. TX: Triton X-100 ile muamele edilmiş hücreler, maksimum hücre toksisiteyi temsil etmektedir. İstatistiksel analiz: Tek yönlü ANOVA testi, ardından t testi uygulanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir).

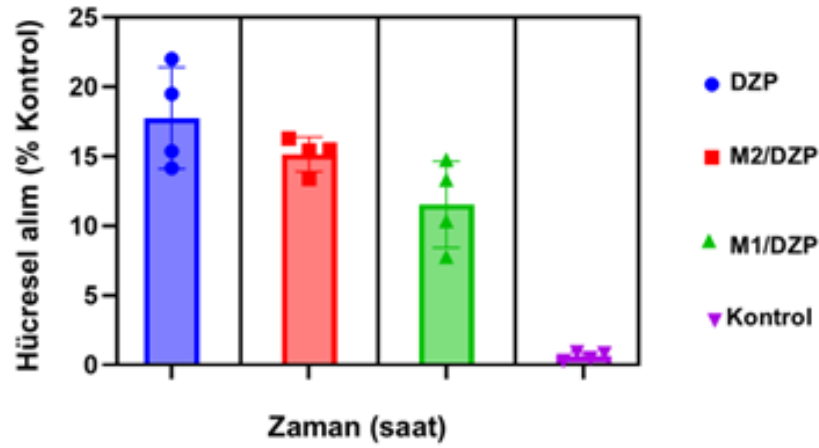


Şekil 4.47 : Kültüre edilmiş insan beyin endotel hücrelerinde (hCMEC/D3), 2 saat, 6 saat ve 8 saatlik inkübasyon sonrası M2/DZP'nin hücre alımı. Kontrol olarak, misellere konjüge edilen miktarla aynı miktarda folik asit kullanılmıştır. Sunulan değerler, kontrol yüzdesi olarak ifade edilen ortalama \pm SEM (standart hata) şeklindedir (n = 4-6).

İstatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.05$, tek yönlü ANOVA).

İnsan beyin endotel hücrelerinde, hücre alımının ardından taşıdığı ilaç miktarı da belirlenmiştir. Ek olarak, ilacın *in vitro* hücre alım çalışması, *in vitro* kan-beyin

bariyeri (KBB) modelinde kullanılan inkübasyon süresine karşılık gelen 2 saatlik bir inkübasyon süresiyle yürütülmüştür. Bu 2 saatlik inkübasyonun sonunda, kümülatif ilaç alımı veya hücrelere salımı belirlendi. Misellerin hücresel alımı, DZP (%18), M2/DZP (%15) ve M1/DZP (%12) için 312 nm'de kaydedilen absorbans değerlerinin bir UV/Vis mikro plaka okuyucusu kullanılarak elde edilmesiyle ölçülmüştür (Şekil 4.48).

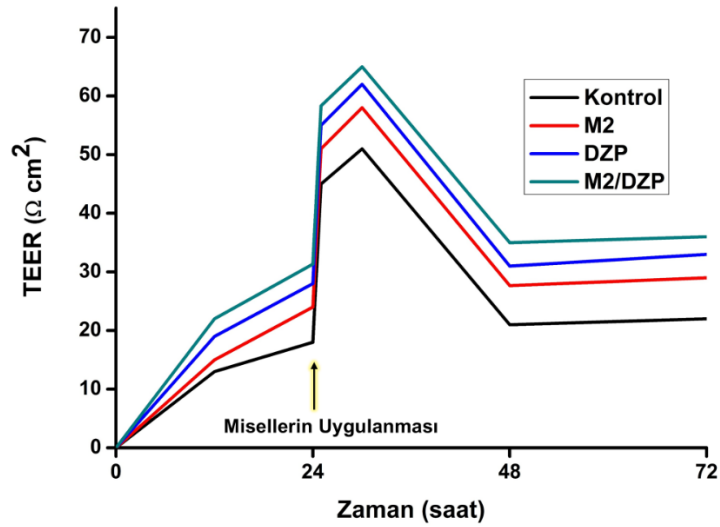


Şekil 4.48 : Kültürleşmiş insan beyin endotel hücrelerinde (hCMEC/D3) 2 saatlik inkübasyondan sonra DZP, DZPyüklü FA-fonksiyonelleştirilmiş polimer (M2/DZP) ve DZP yüklü fonksiyonsuz polimer misel (M1/DZP) misel hücrelerinin hücresel alımı. DZP kontrol olarak kullanıldı. Sunulan değerler ortalama \pm SEM'dir; ortalamanın standart hatasıdır ve kontrolün yüzdesi olarak verilmiştir. n = 4-6. *İstatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.05$, tek yönlü ANOVA)

4.2.9 PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-HEMA) ve PtBMA-*b*-P(PEGMA-*r*-FAHEMA) ile oluşturulan misellerin KBB kültür modeli üzerinden geçirgenliğinin belirlenmesi ve karakterizasyonu

M2 ve M2/DZP'nin hCMEC/D3 üzerindeki etkisi, empedans ölçümü ile desteklenmiştir (Şekil 4.49). KBB kültür modelinin bütünlüğü ilk katmanında yer alacak olan hCMEC/D3 hücrelerine örneklerin uygulaması yapılarak, cellZscope® cihazı kullanılarak empedans spektroskopisi ile transendotelial elektriksel direnç (TEER) ölçülerek doğrulanmıştır. TEER değerleri uygun seviyelere ulaşması ($20-30 \Omega \cdot \text{cm}^2$) *in vitro* KBB modelinin geçiş çalışması için uygun sıklıkta olduğunu işaret etmektedir. Hücreler DZP (misellerde kullanılan konsantrasyon, 0.05 mg/mL), M2 ve

M2/DZP miselleri ile muamele edilmiştir. Polimerik miseller, test edilen en yüksek konsantrasyonlarda bile TEER gelişimini etkilemeyerek *in vitro* kan beyin bariyeri oluşturacak hücre hattının bütünlüğünü bozmamaktadır (Şekil 4.49). Genel olarak, DZP, M2 veya M2/DZP, hücre canlılığını ve endotelial tabakanın bütünlüğünü bozmadığı için potansiyel sitotoksik etkiler göz ardı edilmiştir. Bu durum, misellerin test edilen DZP konsantrasyonunda biyouyumlu olduğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin *in vitro* KBB ortak kültür modelinde geçirgenliğinin incelenmesi nanoboyutlara sahip moleküllerin görünür geçirgenlik değeri (P_{app}) ile belirlenmiştir. Misellerin KBB üzerinden taşınımını değerlendirmek için Papp değerlerini *in vitro* ortak kültür KBB modeli kullanılarak incelendi. Endotel hücreler arasında oluşan sıkı bağlantılar, kan ve beyin arasında hidrofilik ilaçların pasif difüzyonunu engellemede kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu bağlantıların bütünlüğü, hücreler arasındaki en düşük elektriksel dirence sahip bölgelerde ölçülen TEER ile değerlendirilebilir. Bu nedenle, sıkı bağlantı geçirgenliğindeki değişiklikler, *in vitro* KBB modelindeki P_{app} değerlerindeki değişimlerden çıkarılabilir.

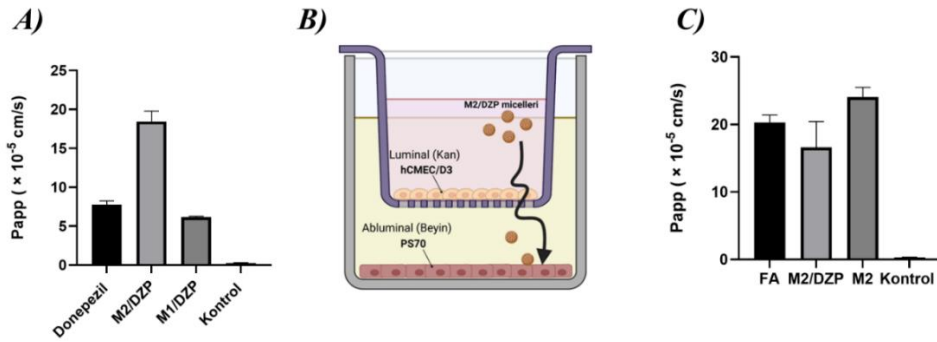


Şekil 4.49 : Endote hücrelerin Transendotelial Elektriksel Direncinin Ölçümü hCMEC/D3 hücreleri, cellZscope® cihazında hücre kültürü insertlerinde yetiştirilmiştir. Hücreler konfluansa ulaştığında, DZP yüklü ve boş misellerden eşit miktarlar (yaklaşık 3.3 mg misel/cm²) lüminal tarafa eklenmiş ve TEER ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Geçiş deneyleri, TEER değeri uygun bir eşiğe ulaştığında ($20-30 \Omega \cdot \text{cm}^2$) başlatılmış ve bariyer sıklığı sağlanmıştır. Geçirgenlik çalışmaları için iki farklı hücreden oluşan ortak kültür KBB modeli kullanılmıştır [232]. hCMEC/D3 hücreleri, tip IV kollajen ve fibronektin karışımı (%4:1) ile kaplanmış $0.4 \mu\text{m}$ gözenek boyutuna sahip Transwell İnsertler içerisindeki hCMEC/D3 hücreleri üst/donör bölmede kalacak şekilde kültüre edilmiştir. Tüm hücre kültürleri uygun yoğunluk seviyesine ulaştıktan sonra üst/donör bölmede hCMEC/D3 hücreleri ve alt/alıcı bölmede PS70 hücreleri (stabil şekilde insan APP eksprese eden CHO hücre hattı) ile ko-kültüre edildi. Ardından hCMEC/D3 hücrelerine ilaç yüklü miseller ile eşdeğer miktarda DZP, FA konjuge polimerik miseller ve DZP yüklü FA konjuge polimerik miseller uygulandı. [214]. İki saat inkübasyon süresi sonunda, alt/alıcı bölmelerden (0.8 mL) örnekler toplanmış (en az üç tekrarlı) ve UV/Vis mikroparka okuyucu ile 360 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür [221]. KBB modelinin işlevini test etmek için, geçirgenlik göstergesi olarak misel geçişlerini incelemek amacıyla kullanılan polimerik misele konjuge halde bulunan folik asit ile 360 nm dalga boyundaki absorbans değerleri elde edilerek endotel tek tabakalar boyunca geçişi görünür geçirgenlik katsayıları (P_{app}) hesaplanarak belirlenmiştir. Alt alıcı bölmelerdeki hücreler tarafından folik asit fonksiyonlandırılmış misellerin hücreSEL alımı ve taşıdıkları ilacın KBB boyunca geçişi, P_{app} değerleri karşılaştırılarak gösterilmiştir (Şekil 4.50). Geçirgenlik çalışmaları, hem taşınan DZP hem de misel yüklü donepezil (M2/DZP) için ortak kültür KBB modeli üzerinden ilaç miktarı kıyasına göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar, FA taşıyan misel yapıların KBB penetrasyonu için daha yüksek bir eğilim sergilediğini düşünülerek M1/DZP ($P_{\text{app}} = 7.7679 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$), M2/DZP'ye ($P_{\text{app}} = 18.4462 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$) kıyasla daha düşük bir penetrasyon göstermiştir. Bu da M2/DZP'nin geçirgenliği 2.99 kat artırdığını göstermektedir. M2/DZP'deki donepezilin (%11) hücreSEL alımı ortak kültür modelinin alt /alıcı tarafındaki PS70 hücrelerine taşınan ilaç miktarı belirlenmiş ve ilaç taşınımı doğrulanmıştır.

Ayrıca, geçirgenlik çalışmalarını doğrulamak amacıyla ve millerin hareketini takip etmek için *in vitro* KBB modeli üzerinden FA konjüge edilmiş misellerin geçişi de ölçülmüştür. P_{app} değerleri, işaretleyici molekül olarak FA kullanılarak elde edilmiştir. Serbest folik asit ($P_{\text{app}} = 20.3215 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$), M2/DZP ($P_{\text{app}} = 16.6074 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$) ve M2 ($P_{\text{app}} = 24.0937 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$) ile karşılaştırıldığında daha düşük penetrasyon

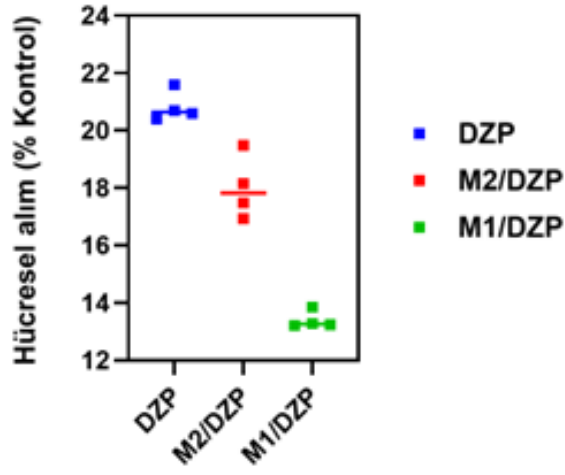
göstermiştir. M2, serbest FA'ya kıyasla geçirgenliği 1.22 kat artırmıştır. Geçirgenlik çalışmalarını takiben, alt/ alıcı bölmelerdeki PS70 hücreleri, hücresel alım için analiz edilmiştir. İki saatlik inkübasyon sonrası hücreler toplanmış ve hücre yüzeyine bağlı polimer miselleri çıkarmak için üç kez buz soğukluğundaki PBS (pH 2) ile yıkanmıştır. Son olarak, %1 Triton X-100 içeren PBS'de 60°C'de bir çalkalayıcıda (80 rpm) 1 saat boyunca hücreler lizise uğratılmıştır. Hücresel misel alım misele konjuge FA'nın ölçümünden faydalanarak, UV/Vis mikropłaka okuyucu ile 360 nm'de ölçülmüş ve serbest folik asit (%8), M2 (%10) ve M2/DZP (%6) için belirlenmiştir. FA fonksiyonlandırılmış miseller, hCMEC/D3 monokültürden geçerek *in vitro* ortak kültür KBB modelinin alt/alıcı tabakasındaki PS70 hücrelerine başarıyla ulaştığı sağlanmıştır. Bu sonuçlar, FA fonksiyonlandırmasının, kontrollü salımla ilaç taşınmasını, çözünürlük problemleri ve sınırlı KBB geçirgenliği olan FA' nın taşınımını artırdığını göstermektedir.



Şekil 4.50 : Polimerik misellerin *in vitro* KBB ortak kültür modeli üzerindeki geçirgenliği (2 saat). A) PS70 hücreleri, ablüminal bölmede, lüminal bölmede bulunan konfluansa ulaşmış hCMEC/D3 hücreleri ile birlikte ortak kültür olarak yetiştirilmiştir. B) İnsan beyin endotelial hücreleri (hCMEC/D3) üzerine, inkübasyonun 2. saatinde uygulanan DZP (misellere yüklenen miktarla aynı), M2 ve M2/DZP (1 mg/mL konsantrasyon) geçirgenliği. C) İnsan beyin endotelial hücrelerine (hCMEC/D3) uygulanan, folik asit (FA, misellere yüklenen miktarla aynı, 0.07 mg/mL konsantrasyon), M2 ve M2/DZP (1 mg/mL konsantrasyon) geçirgenliği (Sunulan değerler, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir n = 4-6).

In vitro KBB ikili kültür modeli'nin modelinin alt/alıcı tabakasındaki PS70 hücrelerine başarıyla ulaştığının belirlenmesinin ardından FA konjuge ve donepezil taşıyan bu multifonksiyonel sistemlerin hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, donepezil HCl tedavisinin, asetilkolinesteraz (AChE), β -sekretaz enzimi 1 (BACE1) ve amiloid prekürsör proteini (APP) mRNA ekspresyon

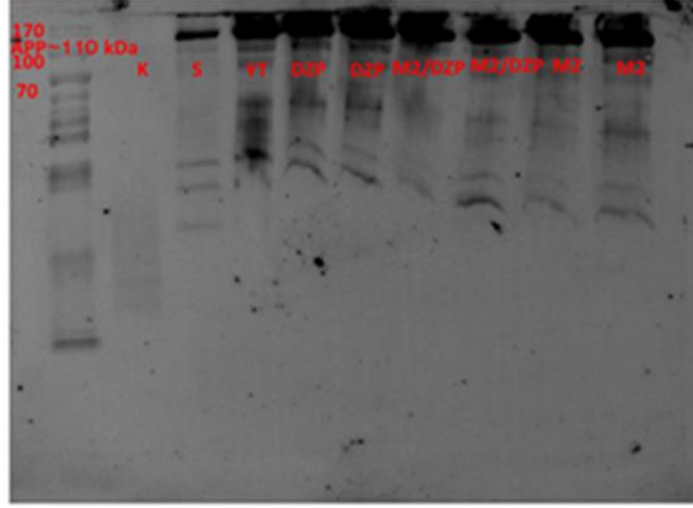
seviyelerini anlamlı derecede azalttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu ilacın KBB ko-kültür modelinin alt bölmesindeki hücreler üzerindeki etkisi Western blot analizi kullanılarak incelenmiştir. Western blot analizinden önce, alt bölmede bulunan ve APP eksprese eden PS70 hücrelerinin 2 saatlik inkübasyonun ardından hücresel ilaç alım miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51 : PS70 hücrelerinde DZP yüklü misellerin transmisyon çalışması sonucunda hücresel alımına dair elde edilen sonuçlar.

Sonuçlara göre, *in vitro* KBB ko-kültür modelinde polimerik misellerle yapılan geçirgenlik testi sonrası yapılan hücresel alım çalışmasında, kontrol grubuna DZP (%21) kıyasla M2/DZP (%18) ilaç yüklü miselleri M1/DZP ilaç yüklü misellerinden daha fazla ilaç geçişi sağlamıştır (Şekil 4. 51).

APP'nin Western blot analizleri, daha önceki çalışmalardaki protokollere [223] göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.52). Geçiş çalışması sonucunda alt/alıcı bölmeye taşınan ilaç miktarı hücre proteinlerinin izolasyonu sonucu gerçekleştirilen Western blot çalışmasında, anlamlı bir etkinliğini gösteremediği tespit edilmiştir. Western blot sonuçlarında protein bantları incelendiğinde ilaç taşıyan ve boş misel uygulamaları arasında belirgin bir gözlem yapılamamıştır. Bu sonucun, PS70 hücrelerinin 2 saatlik inkübasyon sonunda taşıdığı ilaç miktarının yaklaşık %20 'sinin bile altında bir miktarının hücresel alımı sağlamasının yeterli doz seviyesine ulaşamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.52 : İmmünoblot verileri. K (uygulama yapılamayan hücre), S (standart, APP), YT (yabanil tip, APP-), DZP, M2/DZP, M2.

5. SONUÇ

Nörodejeneratif hastalıklar insan popülasyonunu etkileyen önemli bozukluklardır. Nörodejeneratif hastalıklar, kişinin bilişsel davranışlarını ve hafızasını etkileyerek kısa ve uzun vadeli bozukluklara neden olur. AH, MSS'nin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıplarına neden olmasıyla hafıza, düşünce ve davranış problemlerinin görüldüğü bir nörodejeneratif hastalıktır. Günümüzde dünya çapında yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası olduğu bilinmekte ve bu sayının her 5 yılda bir iki katına çıkması öngörülmektedir. AH, çeşitli risk faktörleriyle ilişkili çok faktörlü bir hastalıktır. AH'nin patolojisinde özellikle bazı proteinlerin birikimi, enflamasyon değişiklikleri, sinaptik temas kaybı ve nöronal hücre ölümü yer almaktadır. AH, çok sayıda insanı etkilemesi ve hastalığı iyileştirebilecek veya ilerlemesini yavaşlatabilecek spesifik bir tedavinin olmaması nedeniyle sosyal ve ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Tedavi yetersizliği KBB varlığına bağlı olarak ilaçların olumsuz farmakokinetik ve farmakodinamiği nedeniyle ortaya çıkar. Bu nedenle uygun ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıyla terapötik molekülün etkinliğinin, biyoyararlanımının ve KBB boyunca taşınmasının incelenmesi ve iyileştirmesi ile kontrollü ilaç salımı sergileyerek toksik etkilerinin azaltılmasını sağlamak için stratejiler geliştirmeye ihtiyaç vardır. AH tedavisi için ilaç taşıyıcı platformlar geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında AH tedavisinde en çok tercih edilen ve en olumlu tedavi yanıtını sağlayan DZP ilaç molekülünün yüklenmesi için özgün polimerik misel yapıları geliştirilerek elde edilen ilaç yüklü taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonun sağlanmasının ardından elde edilen sistemlerin stabilite çalışmaları, ilaç enkapsülasyonu ve *in vitro* ilaç salım çalışmalarını ve geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre kültürü ile hücre canlılığı, sitotoksikite ve hücre alım testlerinin gerçekleştirilmesi ardından biyoyüklülüğü kanıtlanmış nanotaşıyıcıların *in vitro* KBB ko-kültür modeli oluşturularak *in vitro* KBB geçişi değerlendirilmiştir.

İki farklı ilaç taşıyıcı sistemden ilkinin elde edilmesi için sentezlenen amfifilik blok kopolimerler, hidrofobik blok olarak PtBMA ve hidrofilik blok olarak PEG'den oluşacak şekilde RAFT polimerizasyonu ile başarıyla sentezlenmiştir. Polimerler, sulu ortamda kendi kendine bir araya gelerek polimerik miselleri oluşturmuştur. Hem boş hem de DZP yüklü misellerin morfolojilerinin küresel olduğu ve ortalama boyutlarının sırasıyla 37.2 nm ve 47.6 nm olduğu tespit edilmiştir. Polimerik miseller, pH 7.4'te DZP için yavaş ve kontrollü bir salım profili sergilemiştir. Ayrıca, *in vitro* sitotoksosite testleri ile DZP yüklü misellerin DZP ile benzer bir aktivite gösterebileceği belirlenmiştir. Hücre içi alım deneylerinde DZP yüklü misellerle inkübe edilen hücrelere ilacın etkili bir şekilde iletildiği gözlemlenmiştir. DZP yüklü misellerin hCMEC/D3 hücrelerinin yaşama oranı üzerindeki etkisi, empedans ölçümleriyle izlenmiş ve misellerin, en yüksek konsantrasyonda bile DZP kadar biyouyumlu olduğu bulunmuştur. DZP yüklü misellerin geçirgenliği, DZP ile benzer bulunmuştur. Sonuçlar, bu polimerik misellerin nanoboyutlara sahip olmaları nedeniyle pasif hedefleme yoluyla KBB'yi aşması için etkili potansiyel platformlar olduğunu göstermiştir.

Diğer ilaç taşıyıcı sistem öncekine göre daha gelişmiş multifonksiyonel özellikler taşımaktadır. Bu ilaç taşıyıcı sistem ile DZP'nin ve FA'nın KBB geçişini artırmak için FA konjuge edilmiş amfifilik kopolimerlerin başarılı bir şekilde sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kendi kendine bir araya gelen miseller, FA ile fonksiyonlandırılmış misellerle kıyaslanmış ve artan partikül boyutu, negatif zeta potansiyeli, geliştirilmiş ilaç yükleme verimliliği ve iyileştirilmiş ilaç salım profili gibi avantajlı özellikler sergilemiştir. Geçirgenlik ve hücre alım çalışmaları sonucunda folik asit konjugasyonunun, DZP'nin KBB'den geçişini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu etki, DZP ve fonksiyonlandırılmamış misellere kıyasla belirgin bir geçirgenlik artışı ile desteklenmiştir. Bu bulgular, FA ile fonksiyonlandırılmış misellerin, AH gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili bir ilaç taşıma sistemi olarak potansiyelini vurgulamaktadır. FA, KBB'yi geçmekte zorluk çeken bir molekül olarak düşük folik asit seviyelerinin de AH riskini belirgin biçimde artırdığı bilinmektedir. Polimer zincirinin yüzeyine konumlandırılan FA'nın hem misellerin sterik stabilitesini artırması hem de AH için gerekli folik asit takviyesini sağlaması hedeflenmiştir. Kapsülleme etkinliği ve ilaç salım profilleri incelendiğinde, FA ile

fonksiyonlandırılmış polimerle elde edilen ilaç taşıyan çok işlevli bu misellerin daha stabil, güvenli ve kontrollü bir sistem olduğu ortaya konmuştur.

Bu tez kapsamında geliştirilen polimerik misel tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin AH tedavisi için umut verici nanotaşıyıcı sistemler olarak potansiyelinin desteklenmesi için bu bulguların *in vivo* doğrulanması ve klinik kullanım için üretimin ölçeklenmesi konusundaki zorlukların ele alınması gereklidir. hCMEC/D3 modeli, insan KBB'sinin sıkı bağlantılar ve anahtar taşıyıcı proteinlerin ifadesi gibi önemli özelliklerini taklit eden ve yaygın olarak kullanılan bir model olmakla birlikte bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Bu model yalnızca beyin endotel hücrelerinden oluşmaktadır ve *in vivo* KBB'de bulunan astrositler ve perisitler gibi bariyer fonksiyonunun ve ilaç taşınımının düzenlenmesinde önemli rol oynayan ek hücreler bileşenleri içermemektedir. Ayrıca, *in vitro* modelin statik yapısı, kan akışı ve akışkan kuvvetler gibi dinamik koşulları hesaba katmamaktadır. Bu sınırlamalar, geçirgenlik verilerinin doğruluğunu ve sonuçların *in vivo* koşullara ne kadar iyi uyarlanabileceğini etkileyebilmektedir. Bu sınırlamalara rağmen, *in vitro* KBB modeli, nanotaşıyıcı geçirgenliğinin ön değerlendirilmesi için yararlı bir araç olmaya devam etmektedir. Daha karmaşık kökültür modelleri veya *in vivo* testler kullanılarak yapılacak gelecekteki çalışmalar, bu geçirgenlik bulgularını doğrulamak ve bu sistemin MSS ilaç taşınımı için potansiyelini daha ayrıntılı olarak değerlendirmek açısından önemli olacaktır. AH'nın hayvan modellerinde yapılacak *in vivo* testler, bu taşıma sisteminin daha karmaşık biyolojik ortamda terapötik etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için kritik önem taşımaktadır. Bu çalışmalar, misellerin biyodağılımı, farmakokinetiği ve bilişsel fonksiyonları iyileştirme kabiliyeti ile sistemik yan etkileri en aza indirme potansiyeli hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca, toksikolojik çalışmalar, bu sistemin uzun vadeli potansiyel etkilerini değerlendirmeye yardımcı olacak ve biyouyumluluğunu daha da destekleyecektir. Geliştirmeye devam edildiği takdirde, bu sistem, terapötiklerin KBB'yi aşmasını sağlamada ve Alzheimer hastalığı ile diğer nörolojik bozuklukların tedavisini iyileştirmede önemli bir ilerleme sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Rai, M. and Yadav, A.** (2019). *Nanobiotechnology in neurodegenerative diseases*. Springer.
- [2] **Zhang, X., Bao, G., Liu, D., Yang, Y., Li, X., Cai, G., Liu, Y. and Wu, Y.** (2021). The association between folate and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in neuroscience*, 15, 661198.
- [3] **Huang, L.-K., Kuan, Y.-C., Lin, H.-W. and Hu, C.-J.** (2023). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease: a 2020–2023 update. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 83.
- [4] **Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K. and Arrighi, H. M.** (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 3(3), 186-191.
- [5] **Chopra, H., Bibi, S., Singh, I., Kamal, M. A., Islam, F., Alhumaydhi, F. A., Emran, T. B. and Cavalu, S.** (2022). Nanomedicines in the management of Alzheimer's disease: current view and future prospects. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 879114.
- [6] **Breijyeh, Z. and Karaman, R.** (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules*, 25(24), 5789.
- [7] **Ravouru, N., Kondreddy, P. and Korakanchi, D.** (2013). Formulation and evaluation of niosomal nasal drug delivery system of folic acid for brain targeting. *Current drug discovery technologies*, 10(4), 270-282.
- [8] **Dcona, M. M., Sheldon, J. E., Mitra, D. and Hartman, M. C.** (2017). Light induced drug release from a folic acid-drug conjugate. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(3), 466-469.
- [9] **Karthivashan, G., Ganesan, P., Park, S.-Y., Kim, J.-S. and Choi, D.-K.** (2018). Therapeutic strategies and nano-drug delivery applications in management of ageing Alzheimer's disease. *Drug delivery*, 25(1), 307-320.
- [10] **Koçancı, F. G. and Aslım, B.** (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 6(1), 19-35.
- [11] **Fonseca-Santos, B., Gremião, M. P. D. and Chorilli, M.** (2015). Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of nanomedicine*, 4981-5003.
- [12] **Zhao, Z. Q., Chen, B. Z., Zhang, X. P., Zheng, H. and Guo, X. D.** (2021). An Update on the Routes for the Delivery of Donepezil. *Molecular Pharmaceutics*, 18(7), 2482-2494.
- [13] **Kassem, L. M., Ibrahim, N. A. and Farhana, S. A.** (2020). Nanoparticle therapy is a promising approach in the management and prevention of many diseases: does it help in curing Alzheimer disease? *Journal of Nanotechnology*, 2020(1), 8147080.
- [14] **Li, X., Tsibouklis, J., Weng, T., Zhang, B., Yin, G., Feng, G., Cui, Y., Savina, I. N., Mikhalovska, L. I. and Sandeman, S. R.** (2017). Nano carriers

- for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of drug targeting*, 25(1), 17-28.
- [15] **Shi, Y., Lammers, T., Storm, G. and Hennink, W. E.** (2017). Physico-chemical strategies to enhance stability and drug retention of polymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Macromolecular bioscience*, 17(1), 1600160.
- [16] **Batrakova, E. V., Bronich, T. K., Vetro, J. A. and Kabanov, A. V.** (2006). Polymer micelles as drug carriers. *Nanoparticulates as drug carriers* pp. 57-93): World Scientific.
- [17] **Curcio, M., Cirillo, G., Rouaen, J. R., Saletta, F., Nicoletta, F. P., Vittorio, O. and Iemma, F.** (2020). Natural polysaccharide carriers in brain delivery: challenge and perspective. *Pharmaceutics*, 12(12), 1183.
- [18] **Kaur, J., Gulati, M., Kapoor, B., Jha, N. K., Gupta, P. K., Gupta, G., Chellappan, D. K., Devkota, H. P., Prasher, P. and Ansari, M. S.** (2022). Advances in designing of polymeric micelles for biomedical application in brain related diseases. *Chemico-Biological Interactions*, 361, 109960.
- [19] **Kaur, A., Nigam, K., Bhatnagar, I., Sukhpal, H., Awasthy, S., Shankar, S., Tyagi, A. and Dang, S.** (2020). Treatment of Alzheimer's diseases using donepezil nanoemulsion: An intranasal approach. *Drug Delivery and Translational Research*, 10, 1862-1875.
- [20] **Topal, G. R., Küçüktürkmen, B., Öz, U. C., Özkan, E., Bakar-Ates, F. and Bozkır, A.** (2023). Investigation on formulation parameters of donepezil HCl loaded solid lipid nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59, e22330.
- [21] **Quan, P., Guo, W., Cun, D. and Yang, M.** (2023). Donepezil accelerates the release of PLGA microparticles via catalyzing the polymer degradation regardless of the end groups and molecular weights. *International Journal of Pharmaceutics*, 632, 122566.
- [22] **Rajput, A. and Butani, S.** (2022). Donepezil HCl liposomes: development, characterization, cytotoxicity, and pharmacokinetic study. *AAPS PharmSciTech*, 23(2), 74.
- [23] **Butani, S.** (2018). Fabrication of an ion-sensitive in situ gel loaded with nanostructured lipid carrier for nose to brain delivery of donepezil. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 12(04).
- [24] **Amjad, M. W. and Alotaibi, N. M.** (2020). Formulation and in vitro characterization of donepezil-loaded chitosan nanoparticles. *J Pharm Res Int*, 32, 57598.
- [25] **Baysal, I., Ucar, G., Gultekinoglu, M., Ulubayram, K. and Yabanoglu-Ciftci, S.** (2017). Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro. *Journal of neural transmission*, 124, 33-45.
- [26] **Satpute, S., Shingare, V. and Mehta, M.** (2015). PHARMACOTHERAPY OF ALZHEIMER'S DISEASE: A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(12), 5000.
- [27] **Korolev, I. O.** (2014). Alzheimer's disease: a clinical and basic science review. *Medical Student Research Journal*, 4(1), 24-33.
- [28] **Castellani, R. J., Rolston, R. K. and Smith, M. A.** (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-month: DM*, 56(9), 484.

- [29] **Piau, A., Nourhashémi, F., Hein, C., Caillaud, C. and Vellas, B.** (2011). Progress in the development of new drugs in Alzheimer's disease. *The Journal of nutrition, health and aging*, 15(1), 45-57.
- [30] **Dooley, M. and Lamb, H. M.** (2000). Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs & aging*, 16, 199-226.
- [31] **Szekely, C., Breitner, J. and Zandi, P.** (2007). Prevention of Alzheimer's disease. *International Review of Psychiatry*, 19(6), 693-706.
- [32] **Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W. and Ferri, C. P.** (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia*, 9(1), 63-75. e62.
- [33] **Sheppard, O. and Coleman, M.** (2020). Alzheimer's disease: etiology, neuropathology and pathogenesis. *Exon Publications*, 1-21.
- [34] **Gurvit, H., Emre, M., Tinaz, S., Bilgic, B., Hanagasi, H., Sahin, H., Gurol, E., Kvaloy, J. and Harmanci, H.** (2008). The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®*, 23(1), 67-76.
- [35] **Bird, T. D.** (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genetics in Medicine*, 10(4), 231-239.
- [36] **Najim, S. M., Moustafa, M. M. and Hammodi, L. E.** (2021). Alzheimer's As a Metabolic Disease: A Review. *Journal of Drug Delivery Technology*, 11(2), 617-624.
- [37] **Corrada, M. M., Kawas, C. H., Hallfrisch, J., Muller, D. and Brookmeyer, R.** (2005). Reduced risk of Alzheimer's disease with high folate intake: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Alzheimer's & Dementia*, 1(1), 11-18.
- [38] **Huang, Y. and Mucke, L.** (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), 1204-1222.
- [39] **Edelberg, H. K. and Wei, J. Y.** (1996). The biology of Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 91(2), 95-114.
- [40] **Prabha, S., Sajad, M., Hasan, G. M., Islam, A., Hassan, M. I. and Thakur, S. C.** (2024). Recent advancement in understanding of Alzheimer's disease: Risk factors, subtypes, and drug targets and potential therapeutics. *Ageing Research Reviews*, 102476.
- [41] **Williamson, J., Goldman, J. and Marder, K. S.** (2009). Genetic aspects of Alzheimer disease. *The neurologist*, 15(2), 80-86.
- [42] **Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J. and Petersen, R. C.** (2013). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Focus*, 11(1), 96-106.
- [43] **Faiyaz, M., Ganayee, M. A., Akhtar, S., Krishnan, S., Flora, B., Dogra, D., Jha, N. K., Chellappan, D. K., Negi, P. and Dua, K.** (2021). Nanomaterials in Alzheimer's disease treatment: a comprehensive review. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 26(10), 851-865.
- [44] **Mohandas, E., Rajmohan, V. and Raghunath, B.** (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian journal of psychiatry*, 51(1), 55-61.
- [45] **Sharma, M., Pal, P. and Gupta, S. K.** (2024). ADVANCES IN ALZHEIMER'S DISEASE: A MULTIFACETED REVIEW OF POTENTIAL THERAPIES AND DIAGNOSTIC TECHNIQUES FOR EARLY DETECTION. *Neurochemistry International*, 105761.

- [46] **Soliman, A.-H. and Mohamed, W.** (2023). Nutrigenomics and Trace Elements: Hopes and Hypes for Parkinson's Treatment. *Trace Elements in Brain Health and Diseases* pp. 47-69): Springer.
- [47] **Maccioni, R. B., Muñoz, J. P. and Barbeito, L.** (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of medical research*, 32(5), 367-381.
- [48] **Braak, H. and Braak, E.** (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- [49] **Lleo, A., Greenberg, S. and Growdon, J.** (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*, 57(1), 513-533.
- [50] **Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. and Vasic, V. M.** (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
- [51] **Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Iimura, Y. and Yamanishi, Y.** (2002). Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *The Japanese journal of pharmacology*, 89(1), 7-20.
- [52] **Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H. and Perry, R. H.** (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J*, 2(6150), 1457-1459.
- [53] **Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. and Wilcock, G. K.** (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137-147.
- [54] **Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C. and Zlokovic, B. V.** (2015). Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*, 163(5), 1064-1078.
- [55] **Querfurth, H. W. and LaFerla, F. M.** (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
- [56] **Zlokovic, B. V.** (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), 723-738.
- [57] **Cummings, J. L., Doody, R. and Clark, C.** (2007). Disease-modifying therapies for Alzheimer disease: challenges to early intervention. *Neurology*, 69(16), 1622-1634.
- [58] **Cummings, J. L.** (2004). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 351(1), 56-67.
- [59] **Bianchetti, A., Ranieri, P., Margiotta, A. and Trabucchi, M.** (2006). Pharmacological treatment of Alzheimer's Disease. *Aging clinical and experimental research*, 18, 158-162.
- [60] **Grutzendler, J. and Morris, J. C.** (2001). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Drugs*, 61, 41-52.
- [61] **Alhazmi, H. A. and Albratty, M.** (2022). An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(12), 1755-1764.
- [62] **Muramoto, O., Sugishita, M., Sugita, H. and Toyokura, Y.** (1979). Effect of physostigmine on constructional and memory tasks in Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 36(8), 501-503.

- [63] **Christie, J. E., Shering, A., Ferguson, J. and Glen, A.** (1981). Physostigmine and arecoline: effects of intravenous infusions in Alzheimer presenile dementia. *The British Journal of Psychiatry*, 138(1), 46-50.
- [64] **Davis, K.** (1983). Memory enhancement with oral physostigmine in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 308, 721.
- [65] **Wettstein, A.** (1983). No effect from double-blind trial of physostigmine and lecithin in Alzheimer disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 13(2), 210-212.
- [66] **Mohs, R. C., Davis, B. M., Johns, C. A., Mathé, A. A., Greenwald, B. S., Horvath, T. B. and Davis, K. L.** (1985). Oral physostigmine treatment of patients with Alzheimer's disease. *The American Journal of Psychiatry*, 142(1), 28-33.
- [67] **Marucci, G., Buccioni, M., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Volpini, R. and Amenta, F.** (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352.
- [68] **Summers, W. K., Majovski, L. V., Marsh, G. M., Tachiki, K. and Kling, A.** (1986). Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *New England Journal of Medicine*, 315(20), 1241-1245.
- [69] **Jann, M. W., Shirley, K. L. and Small, G. W.** (2002). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clinical pharmacokinetics*, 41, 719-739.
- [70] **Singh, B., Day, C. M., Abdella, S. and Garg, S.** (2024). Alzheimer's disease current therapies, novel drug delivery systems and future directions for better disease management. *Journal of Controlled Release*, 367, 402-424.
- [71] **Bassil, N. and Grossberg, G. T.** (2009). Novel regimens and delivery systems in the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 23, 293-307.
- [72] **Nordberg, A. and Svensson, A.-L.** (1998). Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug safety*, 19, 465-480.
- [73] **Seltzer, B.** (2005). Donepezil: a review. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 1(3), 527-536.
- [74] **Talesa, V. N.** (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 122(16), 1961-1969.
- [75] **YY Szeto, J. and JG Lewis, S.** (2016). Current treatment options for Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia. *Current neuropharmacology*, 14(4), 326-338.
- [76] **Massoud, F. and Gauthier, S.** (2010). Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, 8(1), 69-80.
- [77] **Di Stefano, A., Iannitelli, A., Laserra, S. and Sozio, P.** (2011). Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert opinion on drug delivery*, 8(5), 581-603.
- [78] **Tsuno, N.** (2009). Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 9(5), 591-598.
- [79] **Zenaro, E., Piacentino, G. and Constantin, G.** (2017). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 107, 41-56.
- [80] **Kalaria, R. N.** (2000). The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21(2), 321-330.

- [81] **Farkas, E. and Luiten, P. G.** (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 64(6), 575-611.
- [82] **De La Torre, J. C.** (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *The Lancet Neurology*, 3(3), 184-190.
- [83] **Viswanathan, A. and Greenberg, S. M.** (2011). Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Annals of neurology*, 70(6), 871-880.
- [84] **Sagare, A. P., Bell, R. D. and Zlokovic, B. V.** (2012). Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β -peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(10), a011452.
- [85] **Wong, K. H., Riaz, M. K., Xie, Y., Zhang, X., Liu, Q., Chen, H., Bian, Z., Chen, X., Lu, A. and Yang, Z.** (2019). Review of current strategies for delivering Alzheimer's disease drugs across the blood-brain barrier. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 381.
- [86] **Zlokovic, B. V.** (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.
- [87] **Winkler, E. A., Nishida, Y., Sagare, A. P., Rege, S. V., Bell, R. D., Perlmutter, D., Sengillo, J. D., Hillman, S., Kong, P. and Nelson, A. R.** (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature neuroscience*, 18(4), 521-530.
- [88] **Kalaria, R., Sromek, S., Grahovac, I. and Harik, S.** (1992). Transferrin receptors of rat and human brain and cerebral microvessels and their status in Alzheimer's disease. *Brain research*, 585(1-2), 87-93.
- [89] **Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.-G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A. and Hoyer, S.** (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, 105, 423-438.
- [90] **Kennard, M. L., Feldman, H., Yamada, T. and Jefferies, W. A.** (1996). Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2(11), 1230-1235.
- [91] **Begley, D. J.** (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & therapeutics*, 104(1), 29-45.
- [92] **Iqbal, I., Saqib, F., Mubarak, Z., Latif, M. F., Wahid, M., Nasir, B., Shahzad, H., Sharifi-Rad, J. and Mubarak, M. S.** (2024). Alzheimer's disease and drug delivery across the blood-brain barrier: approaches and challenges. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 313.
- [93] **Roher, A. E., Kuo, Y.-M., Esh, C., Knebel, C., Weiss, N., Kalback, W., Luehrs, D. C., Childress, J. L., Beach, T. G. and Weller, R. O.** (2003). Cortical and leptomeningeal cerebrovascular amyloid and white matter pathology in Alzheimer's disease. *Molecular medicine*, 9, 112-122.
- [94] **Carrano, A., Hoozemans, J. J., van der Vies, S. M., Rozemuller, A. J., van Horssen, J. and de Vries, H. E.** (2011). Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxidants & redox signaling*, 15(5), 1167-1178.
- [95] **Erickson, M. A. and Banks, W. A.** (2013). Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(10), 1500-1513.

- [96] **Yin, P. and Wang, X.** (2024). Progresses in the establishment, evaluation, and application of in vitro blood–brain barrier models. *Journal of Neuroscience Research*, 102(6), e25359.
- [97] **Wan, W., Cao, L., Liu, L., Zhang, C., Kalionis, B., Tai, X., Li, Y. and Xia, S.** (2015). A β 1–42 oligomer-induced leakage in an in vitro blood–brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins. *Journal of neurochemistry*, 134(2), 382-393.
- [98] **Sweeney, M. D., Sagare, A. P. and Zlokovic, B. V.** (2018). Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 133-150.
- [99] **Bruno, M., Bonomi, C. G., Ricci, F., Di Donna, M. G., Mercuri, N. B., Koch, G., Martorana, A. and Motta, C.** (2024). Blood–brain barrier permeability is associated with different neuroinflammatory profiles in Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 31(1), e16095.
- [100] **Dong, X.** (2018). Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics*, 8(6), 1481.
- [101] **Chaves, J. C., Dando, S. J., White, A. R. and Oikari, L. E.** (2024). Blood-brain barrier transporters: An overview of function, dysfunction in Alzheimer's disease and strategies for treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1870(2), 166967.
- [102] **Kaya, M. and Ahishali, B.** (2021). Basic physiology of the blood-brain barrier in health and disease: a brief overview. *Tissue Barriers*, 9(1), 1840913.
- [103] **Tajes, M., Ramos-Fernández, E., Weng-Jiang, X., Bosch-Morató, M., Guivernau, B., Eraso-Pichot, A., Salvador, B., Fernandez-Busquets, X., Roquer, J. and Munoz, F. J.** (2014). The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular membrane biology*, 31(5), 152-167.
- [104] **Ndemazie, N. B., Inkoom, A., Morfaw, E. F., Smith, T., Aghimien, M., Ebesoh, D. and Agyare, E.** (2022). Multi-disciplinary approach for drug and gene delivery systems to the brain. *AAPS PharmSciTech*, 23, 1-21.
- [105] **Gabathuler, R.** (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of disease*, 37(1), 48-57.
- [106] **Bernardo-Castro, S., Sousa, J. A., Brás, A., Cecília, C., Rodrigues, B., Almendra, L., Machado, C., Santo, G., Silva, F. and Ferreira, L.** (2020). Pathophysiology of blood–brain barrier permeability throughout the different stages of ischemic stroke and its implication on hemorrhagic transformation and recovery. *Frontiers in neurology*, 11, 594672.
- [107] **Smith, Q. R.** (2003). A review of blood-brain barrier transport techniques. *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols*, 193-208.
- [108] **Reichel, A.** (2006). The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Current drug metabolism*, 7(2), 183-203.
- [109] **Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., Moses, A. V., Hamburger, M. and Oufir, M.** (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood–brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10, 1-17.
- [110] **Huang, Q., Jiang, C., Xia, X., Wang, Y., Yan, C., Wang, X., Lei, T., Yang, X., Yang, W. and Cheng, G.** (2023). Pathological BBB crossing melanin-like

nanoparticles as metal-ion chelators and neuroinflammation regulators against Alzheimer's disease. *Research*, 6, 0180.

- [111] **Lei, T., Yang, Z., Xia, X., Chen, Y., Yang, X., Xie, R., Tong, F., Wang, X. and Gao, H.** (2021). A nanocleaner specifically penetrates the blood–brain barrier at lesions to clean toxic proteins and regulate inflammation in Alzheimer's disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(12), 4032-4044.
- [112] **Liu, C., Chen, K., Lu, Y., Fang, Z. and Yu, G.** (2018). Catalpol provides a protective effect on fibrillary A β 1–42-induced barrier disruption in an in vitro model of the blood–brain barrier. *Phytotherapy Research*, 32(6), 1047-1055.
- [113] **Jackson, S., Meeks, C., Vézina, A., Robey, R. W., Tanner, K. and Gottesman, M. M.** (2019). Model systems for studying the blood-brain barrier: Applications and challenges. *Biomaterials*, 214, 119217.
- [114] **Shamul, J. G., Wang, Z., Gong, H., Ou, W., White, A. M., Moniz-Garcia, D. P., Gu, S., Clyne, A. M., Quiñones-Hinojosa, A. and He, X.** (2024). Meta-analysis of the make-up and properties of in vitro models of the healthy and diseased blood–brain barrier. *Nature Biomedical Engineering*, 1-33.
- [115] **Deli, M. A., Abraham, C. S., Kataoka, Y. and Niwa, M.** (2005). Permeability studies on in vitro blood–brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cellular and molecular neurobiology*, 25, 59-127.
- [116] **Korszun-Karbowiczak, J., Krysiak, Z. J., Saluk, J., Niemcewicz, M. and Zdanowski, R.** (2024). The Progress in Molecular Transport and Therapeutic Development in Human Blood–Brain Barrier Models in Neurological Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 44(1), 34.
- [117] **Lippmann, E. S., Al-Ahmad, A., Palecek, S. P. and Shusta, E. V.** (2013). Modeling the blood–brain barrier using stem cell sources. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10, 1-14.
- [118] **Chattopadhyay, N., Zastre, J., Wong, H.-L., Wu, X. Y. and Bendayan, R.** (2008). Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line. *Pharmaceutical research*, 25, 2262-2271.
- [119] **Weksler, B., Romero, I. A. and Couraud, P.-O.** (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10, 1-10.
- [120] **Stone, N. L., England, T. J. and O'Sullivan, S. E.** (2019). A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 230.
- [121] **Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y. and Niwa, M.** (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 27, 687-694.
- [122] **Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Keep, R. F. and Andjelkovic, A. V.** (2016). Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue barriers*, 4(1), e1154641.
- [123] **Chen, Y. and Liu, L.** (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced drug delivery reviews*, 64(7), 640-665.
- [124] **Gopalan, D., Pandey, A., Udupa, N. and Mutalik, S.** (2020). Receptor specific, stimuli responsive and subcellular targeted approaches for effective therapy of Alzheimer: Role of surface engineered nanocarriers. *Journal of controlled release*, 319, 183-200.

- [125] **Crawford, L., Rosch, J. and Putnam, D.** (2016). Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood–brain barrier to the central nervous system. *Journal of Controlled Release*, 240, 251-266.
- [126] **Lu, C.-T., Zhao, Y.-Z., Wong, H. L., Cai, J., Peng, L. and Tian, X.-Q.** (2014). Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *International journal of nanomedicine*, 2241-2257.
- [127] **Bicker, J., Alves, G., Fortuna, A. and Falcão, A.** (2014). Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 409-432.
- [128] **Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R. and Begley, D. J.** (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13-25.
- [129] **Allen, T. M. and Cullis, P. R.** (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822.
- [130] **Vail, D. M., Amantea, M. A., Colbern, G. T., Martin, F. J., Hilger, R. A. and Working, P. K.**, (Year) editor^editors. Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. *Seminars in oncology*; 2004: Elsevier; Published.
- [131] **Mulvihill, J. J., Cunnane, E. M., Ross, A. M., Duskey, J. T., Tosi, G. and Grabrucker, A. M.** (2020). Drug delivery across the blood–brain barrier: recent advances in the use of nanocarriers. *Nanomedicine*, 15(2), 205-214.
- [132] **Mäger, I., Meyer, A. H., Li, J., Lenter, M., Hildebrandt, T., Leparc, G. and Wood, M. J.** (2017). Targeting blood-brain-barrier transcytosis–perspectives for drug delivery. *Neuropharmacology*, 120, 4-7.
- [133] **Haqqani, A. S., Delaney, C. E., Brunette, E., Baumann, E., Farrington, G. K., Sisk, W., Eldredge, J., Ding, W., Tremblay, T.-L. and Stanimirovic, D. B.** (2018). Endosomal trafficking regulates receptor-mediated transcytosis of antibodies across the blood brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(4), 727-740.
- [134] **Villaseñor, R., Lampe, J., Schwaninger, M. and Collin, L.** (2019). Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood–brain barrier. *Cellular and molecular life sciences*, 76, 1081-1092.
- [135] **Pulgar, V. M.** (2019). Transcytosis to cross the blood brain barrier, new advancements and challenges. *Frontiers in neuroscience*, 12, 1019.
- [136] **Duskey, J. T., Belletti, D., Pederzoli, F., Vandelli, M. A., Forni, F., Ruozi, B. and Tosi, G.** (2017). Current strategies for the delivery of therapeutic proteins and enzymes to treat brain disorders. *International review of neurobiology*, 137, 1-28.
- [137] **Oliveira Silva, R., Counil, H., Rabanel, J.-M., Haddad, M., Zaouter, C., Ben Khedher, M. R., Patten, S. A. and Ramassamy, C.** (2024). Donepezil-loaded nanocarriers for the treatment of Alzheimer’s disease: Superior efficacy of extracellular vesicles over polymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 1077-1096.
- [138] **Elmahboub, Y. S. and Elkordy, A. A.** (2024). Polymeric nanoparticles: A promising strategy for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 19(3), 549-565.
- [139] **Sharma, M., Tiwari, V., Chaturvedi, S., Wahajuddin, M., Shukla, S. and Panda, J. J.** (2022). Self-fluorescent lone tryptophan nanoparticles as

theranostic agents against Alzheimer's disease. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(11), 13079-13093.

- [140] **Yang, M., Jin, L., Wu, Z., Xie, Y., Zhang, P., Wang, Q., Yan, S., Chen, B., Liang, H. and Naman, C. B.** (2021). PLGA-PEG nanoparticles facilitate in vivo anti-Alzheimer's effects of fucoxanthin, a marine carotenoid derived from edible brown algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(34), 9764-9777.
- [141] **Rani, V., Verma, R., Kumar, K. and Chawla, R.** (2023). Role of pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease and neuroprotective effects of pegylated self-assembled nanoscaffolds. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 4, 100149.
- [142] **Wu, Q., Karthivashan, G., Nakhaei-Nejad, M., Anand, B. G., Giuliani, F. and Kar, S.** (2022). Native PLGA nanoparticles regulate APP metabolism and protect neurons against β -amyloid toxicity: Potential significance in Alzheimer's disease pathology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 219, 1180-1196.
- [143] **Saleh, M. A., Mohamed, J. M., Ruby, J. J., Kanthiah, S., Alanazi, Y. F., Majrashi, K. A., Alshahrani, S. M., Eladl, M. A., Alaryani, F. S. and El-Sherbiny, M.** (2022). Preparation of memantine-loaded chitosan nanocrystals: in vitro and ex vivo toxicity analysis. *Crystals*, 13(1), 21.
- [144] **Aydin, S., Kabaoglu, I., Guler, E., Topal, F., Hazar-Yavuz, A. N., Ekentok, C., Tatar, E., Gurbuz, F., Gunduz, O. and Cam, M. E.** (2022). A Comparison Study of Fiber Diameter's Effect on Characteristic Features of Donepezil/Curcumin-Loaded Polycaprolactone/Poly(lactic Acid) Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 307(5), 2100855.
- [145] **Çınar, E., Mutluay, S. U., Baysal, İ., Gültekinoglu, M., Ulubayram, K., Çiftçi, S. Y., Tel, B. C. and Uçar, G.** (2022). Donepezil-loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles Enhance the Learning and Memory Function of Beta-Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Archives of Neuropsychiatry*, 59(4), 281.
- [146] **Kim, D., Han, T. H., Hong, S.-C., Park, S. J., Lee, Y. H., Kim, H., Park, M. and Lee, J.** (2020). PLGA microspheres with alginate-coated large pores for the formulation of an injectable depot of donepezil hydrochloride. *Pharmaceutics*, 12(4), 311.
- [147] **Mohamadpour, H., Azadi, A., Rostamizadeh, K., Andalib, S., Saghatchi Zanjani, M. R. and Hamidi, M.** (2020). Preparation, Optimization, and Evaluation of Methoxy Poly (ethylene glycol)-co-poly (ϵ -caprolactone) Nanoparticles Loaded by Rivastigmine for Brain Delivery. *ACS chemical neuroscience*, 11(5), 783-795.
- [148] **Prakash, J., Prasad, V. V. and Claret, A.** (2022). Rivastigmine Loaded PEG-PLGA Nanoparticles for Enhanced Delivery to the Brain: In-Vitro and In-Vivo Studies for Alzheimer's disease.
- [149] **Gangopadhyay, A., Dandagi, P. M. and Sutar, K. P.** (2023). Development and evaluation of thermoreversible ethosomal gel of donepezil hydrochloride for intranasal delivery. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 18(1), 238-246.
- [150] **Espinoza, L. C., Guaya, D., Calpena, A. C., Perotti, R. M., Halbaut, L., Sosa, L., Brito-Llera, A. and Mallandrich, M.** (2022). Comparative Study of Donepezil-Loaded Formulations for the Treatment of Alzheimer's Disease by Nasal Administration. *Gels*, 8(11), 715.
- [151] **Soloviev, M.** (2007). *Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles*. Springer; p. 1-3.

- [152] **Parveen, S., Misra, R. and Sahoo, S. K.** (2017). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine in cancer*, 47-98.
- [153] **Farokhzad, O. C. and Langer, R.** (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano*, 3(1), 16-20.
- [154] **Akhter, M. H., Rizwanullah, M., Ahmad, J., Ahsan, M. J., Mujtaba, M. A. and Amin, S.** (2018). Nanocarriers in advanced drug targeting: setting novel paradigm in cancer therapeutics. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(5), 873-884.
- [155] **Ekladios, I., Colson, Y. L. and Grinstaff, M. W.** (2019). Polymer–drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects. *Nature reviews Drug discovery*, 18(4), 273-294.
- [156] **Kopf, H., Joshi, R., Soliva, M. and Speiser, P.** (1976). Study on micelle polymerization in the presence of lowmolecular-weight drugs. 1. Production and isolation of nanoparticles, residual monomer determination, physical–chemical data. *Pharm Ind*, 38, 281-284.
- [157] **Kwon, S., Singh, R. K., Perez, R. A., Abou Neel, E. A., Kim, H.-W. and Chrzanowski, W.** (2013). Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *Journal of tissue engineering*, 4, 2041731413503357.
- [158] **Li, J., Yu, F., Chen, Y. and Oupický, D.** (2015). Polymeric drugs: Advances in the development of pharmacologically active polymers. *Journal of Controlled Release*, 219, 369-382.
- [159] **Young, R. J. and Lovell, P. A.** (2011). *Introduction to polymers*. CRC press.
- [160] **Fried, J. R.** (2014). *Polymer science and technology*. Pearson Education.
- [161] **Pişkin, E.** (1987). *Polimer teknolojisine giriş*. İnkılap Kitabevi.
- [162] **Baysal, B.** (1981). *Polimer kimyası*. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- [163] **Castiglione, D. C. and Davis, F. J.** (2016). Block Copolymers and Photonic Band Gap Materials. *Controlling the Morphology of Polymers: Multiple Scales of Structure and Processing*, 263-285.
- [164] **Hebbeker, P., Steinschulte, A. A., Schneider, S. and Plamper, F. A.** (2017). Balancing segregation and complexation in amphiphilic copolymers by architecture and confinement. *Langmuir*, 33(17), 4091-4106.
- [165] **Carraher Jr, C. E.** (2017). *Introduction to polymer chemistry*. CRC press.
- [166] **Alexandridis, P., Olsson, U., Linse, P. and Lindman, B.** (2000). Structural polymorphism of amphiphilic block copolymers in mixtures with water and oil: comparison with solvent-free block copolymers and surfactant systems. *Amphiphilic Block Copolymers* pp. 169-190): Elsevier.
- [167] **Shrivastava, A.** (2018). *Introduction to plastics engineering*. William Andrew.
- [168] **Matyjaszewski, K. and Davis, K. A.** Statistical, Gradient, Block and Graft Copolymers by Controlled/Living Radical Polymerizations [electronic resource].
- [169] **Lindman, B. and Alexandridis, P.** (2000). Amphiphilic molecules: small and large. *Amphiphilic block copolymers*, 1-12.
- [170] **Saçak, M., Kimyası, P. and Kitabevi, G.** (2004). 2. baskı. *Gazi Kitabevi*.
- [171] **Billmeyer, F.** (1984). *Textbook of polymer science*. John Wiley & Sons.
- [172] **Mardare, D. and Matyjaszewski, K.** (1994). "Living" radical polymerization of vinyl acetate. *Macromolecules*, 27(3), 645-649.

- [173] **Matyjaszewski, K., Coca, S., Gaynor, S. G., Wei, M. and Woodworth, B. E.** (1998). Controlled radical polymerization in the presence of oxygen. *Macromolecules*, 31(17), 5967-5969.
- [174] **Ejaz, M., Yamamoto, S., Ohno, K., Tsujii, Y. and Fukuda, T.** (1998). Controlled graft polymerization of methyl methacrylate on silicon substrate by the combined use of the Langmuir-Blodgett and atom transfer radical polymerization techniques. *Macromolecules*, 31(17), 5934-5936.
- [175] **Tsujii, Y., Ohno, K., Yamamoto, S., Goto, A. and Fukuda, T.** (2006). Structure and properties of high-density polymer brushes prepared by surface-initiated living radical polymerization. *Surface-initiated polymerization I*, 1-45.
- [176] **Chiefari, J., Chong, Y., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P., Mayadunne, R. T., Meijs, G. F., Moad, C. L. and Moad, G.** (1998). Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process. *Macromolecules*, 31(16), 5559.
- [177] **Moad, G., Rizzardo, E. and Thang, S. H.** (2005). Living radical polymerization by the RAFT process. *Australian journal of chemistry*, 58(6), 379-410.
- [178] **Haiting, Z., Wei, B., Keliang, H., Ruke, B. and Caiyuan, P.** (2008). Facile room temperature RAFT polymerization via redox initiation. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 46, 2575-2580.
- [179] **You, Y. Z., Hong, C. Y., Bai, R. K., Pan, C. Y. and Wang, J.** (2002). Photo-initiated living free radical polymerization in the presence of dibenzyl trithiocarbonate. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203(3), 477-483.
- [180] **Hua, D., Bai, R., Lu, W. and Pan, C.** (2004). Dithiocarbamate mediated controlled/living free radical polymerization of methyl acrylate under ^{60}Co γ -ray irradiation: Conjugation effect of N-group. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(22), 5670-5677.
- [181] **Tian, X., Ding, J., Zhang, B., Qiu, F., Zhuang, X. and Chen, Y.** (2018). Recent advances in RAFT polymerization: Novel initiation mechanisms and optoelectronic applications. *Polymers*, 10(3), 318.
- [182] **Barner-Kowollik, C., Coote, M. L., Davis, T. P., Radom, L. and Vana, P.** (2003). The reversible addition-fragmentation chain transfer process and the strength and limitations of modeling: Comment on "the magnitude of the fragmentation rate coefficient". *Journal of polymer science part A: polymer chemistry*, 41(18), 2828-2832.
- [183] **Barner-Kowollik, C., Blinco, J. P., Destarac, M., Thurecht, K. J. and Perrier, S.** (2012). Reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization: mechanism, process and applications. *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*.
- [184] **Semsarilar, M. and Perrier, S.** (2010). 'Green'reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization. *Nature chemistry*, 2(10), 811-820.
- [185] **Vasilieva, Y. A., Scales, C. W., Thomas, D. B., Ezell, R. G., Lowe, A. B., Ayres, N. and McCormick, C. L.** (2005). Controlled/living polymerization of methacrylamide in aqueous media via the RAFT process. *Journal of polymer science Part A: polymer Chemistry*, 43(14), 3141-3152.
- [186] **Perrier, S.** (2017). 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization □ A User Guide. *Macromolecules*, 50(19), 7433-7447.

- [187] **Moad, G., Rizzardo, E. and Thang, S. H.** (2008). Radical addition–fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer*, 49(5), 1079-1131.
- [188] **Moad, G., Rizzardo, E. and Thang, S. H.** (2011). End-functional polymers, thiocarbonylthio group removal/transformation and reversible addition–fragmentation–chain transfer (RAFT) polymerization. *Polymer International*, 60(1), 9-25.
- [189] **Mori, H.** (2015). Living Radical Polymerization: Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, 1-9.
- [190] **Lowe, A. B. and McCormick, C. L.** (2007). Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co) polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media. *Progress in Polymer Science*, 32(3), 283-351.
- [191] **Boyer, C., Bulmus, V., Davis, T. P., Ladmiral, V., Liu, J. and Perrier, S.** (2009). Bioapplications of RAFT polymerization. *Chemical reviews*, 109(11), 5402-5436.
- [192] **Mainardes, R. M. and Silva, L. P.** (2004). Drug delivery systems: past, present, and future. *Current drug targets*, 5(5), 449-455.
- [193] **Wang, W., Li, W., Ma, N. and Steinhoff, G.** (2013). Non-viral gene delivery methods. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14(1), 46-60.
- [194] **Torchilin, V. P.** (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1532-1555.
- [195] **Zhang, L., Gu, F., Chan, J., Wang, A., Langer, R. and Farokhzad, O.** (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 83(5), 761-769.
- [196] **Kwon, G. S. and Okano, T.** (1996). Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced drug delivery reviews*, 21(2), 107-116.
- [197] **Zhou, Q., Zhang, L., Yang, T. and Wu, H.** (2018). Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 2921-2942.
- [198] **Nishiyama, N., Matsumura, Y. and Kataoka, K.** (2016). Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers. *Cancer science*, 107(7), 867-874.
- [199] **Aliabadi, H. M. and Lavasanifar, A.** (2006). Polymeric micelles for drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 3(1), 139-162.
- [200] **Stenzel, M. H.** (2008). RAFT polymerization: an avenue to functional polymeric micelles for drug delivery. *Chemical Communications*, (30), 3486-3503.
- [201] **Xu, W., Ling, P. and Zhang, T.** (2013). Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of drug delivery*, 2013(1), 340315.
- [202] **Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W. and Seo, M. H.** (2001). In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of controlled release*, 72(1-3), 191-202.
- [203] **Zhao, X., Poon, Z., Engler, A. C., Bonner, D. K. and Hammond, P. T.** (2012). Enhanced stability of polymeric micelles based on postfunctionalized poly (ethylene glycol)-b-poly (γ -propargyl L-glutamate): the substituent effect. *Biomacromolecules*, 13(5), 1315-1322.

- [204] Owen, S. C., Chan, D. P. and Shoichet, M. S. (2012). Polymeric micelle stability. *Nano today*, 7(1), 53-65.
- [205] Torchilin, V. P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), 137-172.
- [206] Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. and Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of controlled release*, 82(2-3), 189-212.
- [207] Rapoport, N. (2007). Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 962-990.
- [208] Kulthe, S. S., Choudhari, Y. M., Inamdar, N. N. and Mourya, V. (2012). Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Designed Monomers and Polymers*, 15(5), 465-521.
- [209] Nagasaki, Y., Okada, T., Scholz, C., Iijima, M., Kato, M. and Kataoka, K. (1998). The reactive polymeric micelle based on an aldehyde-ended poly (ethylene glycol)/poly (lactide) block copolymer. *Macromolecules*, 31(5), 1473-1479.
- [210] Mourya, V., Inamdar, N., Nawale, R. and Kulthe, S. (2011). Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Indian J Pharm Educ Res*, 45(2), 128-138.
- [211] Yousefpour Marzbali, M. and Yari Khosroushahi, A. (2017). Polymeric micelles as mighty nanocarriers for cancer gene therapy: a review. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 79, 637-649.
- [212] Allen, C., Maysinger, D. and Eisenberg, A. (1999). Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1-4), 3-27.
- [213] Singh, A. K., Gothwal, A., Rani, S., Rana, M., Sharma, A. K., Yadav, A. K. and Gupta, U. (2019). Dendrimer donepezil conjugates for improved brain delivery and better in vivo pharmacokinetics. *ACS Omega*, 4(3), 4519-4529.
- [214] Weksler, B., Subileau, E., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S. and Turowski, P. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB journal*, 19(13), 1872-1874.
- [215] Poller, B., Gutmann, H., Krähenbühl, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P. O., Tuffin, G., Drewe, J. and Huwyler, J. (2008). The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *Journal of neurochemistry*, 107(5), 1358-1368.
- [216] Meister, S., Zlatev, I., Stab, J., Docter, D., Baches, S., Stauber, R. H., Deutsch, M., Schmidt, R., Ropele, S. and Windisch, M. (2013). Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid- β 42 generation in an in vitro blood-brain barrier model. *Alzheimer's research & therapy*, 5, 1-12.
- [217] Wegener, J., Abrams, D., Willenbrink, W., Galla, H.-J. and Janshoff, A. (2004). Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions. *Biotechniques*, 37(4), 590-597.
- [218] Topal, G. R., Mészáros, M., Porkoláb, G., Szecskó, A., Polgár, T. F., Siklós, L., Deli, M. A., Veszélka, S. and Bozkir, A. (2020). ApoE-targeting increases the transfer of solid lipid nanoparticles with donepezil cargo across a culture model of the blood-brain barrier. *Pharmaceutics*, 13(1), 38.
- [219] Tadros, T. (2013). Critical micelle concentration. *Encyclopedia of colloid and interface science*, 209-210.

- [220] Xia, W., Zhang, J., Kholodenko, D., Citron, M., Podlisny, M. B., Teplow, D. B., Haass, C., Seubert, P., Koo, E. H. and Selkoe, D. J. (1997). Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid β -protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7977-7982.
- [221] Kallu, J., Banerjee, T., Sulthana, S., Darji, S., Higginbotham, R., Fletcher, C., Gerasimchuk, N. N. and Santra, S. (2019). Nanomedicine-assisted combination therapy of NSCLC: new platinum-based anticancer drug synergizes the therapeutic efficacy of ganetespib. *Nanotheranostics*, 3(1), 120.
- [222] Jäger, S., Leuchtenberger, S., Martin, A., Czirr, E., Wesselowski, J., Dieckmann, M., Waldron, E., Korth, C., Koo, E. H. and Heneka, M. (2009). α -secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits A β generation. *Journal of neurochemistry*, 111(6), 1369-1382.
- [223] Van Gool, B., Storck, S. E., Reekmans, S. M., Lechat, B., Gordts, P. L., Pradier, L., Pietrzik, C. U. and Roebroek, A. J. (2019). LRP1 has a predominant role in production over clearance of A β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 56, 7234-7245.
- [224] Zhang, X., Burton, T. F., In, M., Begu, S., Aubert-Pouëssel, A., Robin, J.-J., Monge, S. and Giani, O. (2020). Synthesis and behaviour of PEG-b-PDEAm block copolymers in aqueous solution. *Materials Today Communications*, 24, 100987.
- [225] Yoo, H. S. and Park, T. G. (2001). Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *Journal of controlled Release*, 70(1-2), 63-70.
- [226] Lombardo, S. M., Schneider, M., Türel, A. E. and Türel, N. G. (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: The rational design. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11(1), 866-883.
- [227] Hersh, A. M., Alomari, S. and Tyler, B. M. (2022). Crossing the blood-brain barrier: advances in nanoparticle technology for drug delivery in neuro-oncology. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4153.
- [228] Altaani, B. M., Al-Nimry, S. S., Haddad, R. H. and Abu-Dahab, R. (2019). Preparation and characterization of an oral norethindrone sustained release/controlled release nanoparticles formulation based on chitosan. *AAPS PharmSciTech*, 20, 1-14.
- [229] Ota, T., Shinotoh, H., Fukushi, K., Kikuchi, T., Sato, K., Tanaka, N., Shimada, H., Hirano, S., Miyoshi, M. and Arai, H. (2010). Estimation of plasma IC50 of donepezil for cerebral acetylcholinesterase inhibition in patients with Alzheimer disease using positron emission tomography. *Clinical neuropharmacology*, 33(2), 74-78.
- [230] Chen, F., Li, Y., Fu, Y., Hou, Y., Chen, Y. and Luo, X. (2019). The synthesis and co-micellization of PCL-P (HEMA/HEMA-LA) and PCL-P (HEMA/HEMA-FA) as shell cross-linked drug carriers with target/redox properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(4), 276-294.
- [231] Brandt, J. V., Piazza, R. D., Dos Santos, C. C., Vega-Chacón, J., Amantéa, B. E., Pinto, G. C., Magnani, M., Piva, H. L., Tedesco, A. C. and Primo, F. L. (2019). Synthesis and colloidal characterization of folic acid-modified PEG-b-PCL Micelles for methotrexate delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 228-234.

- [232] **Fritzen, L., Wienken, K., Wagner, L., Kurtyka, M., Vogel, K., Körbelin, J., Weggen, S., Fricker, G. and Pietrzik, C. U.** (2024). Truncated mini LRP1 transports cargo from luminal to basolateral side across the blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 21(1), 74.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gizem İĞDELİ
Doğum Tarihi ve Yeri :
E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2019, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2019-2021 Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **İğdeli, G., Fritzen, L., Pietrzik, C. U. & Temel, B. A.** (2024). Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-b-poly(tert-butyl methacrylate) micelles as potential nanocarriers for donepezil. *Pharmaceutical development and technology*, 29(10), 1111–1120.
- **İğdeli, G., Fritzen, L., Pietrzik, C. U. & Temel, B. A.** (2025). Folic acid-conjugated amphiphilic copolymers for the enhanced delivery of donepezil: synthesis, characterization and blood-brain barrier permeability in a co-culture model. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/09205063.2025.2486863>
- **İğdeli G. & Temel B.** " Preparation and Characterization of Donepezil Loaded Poly(ethylene oxide)-b-poly(tert-butyl methacrylate) Micelles for Alzheimer's Disease" *Bayreuth Polymer Symposium BPS'23*, 17-19 Eylül 2023, Beyrut, Almanya.
- **İğdeli G. & Temel B.** " Development of Folic Acid Conjugated Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Donepezil" *8th International FAPS Polymeer Congress*, 2023, 12-14 Eylül, İstanbul, Türkiye

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **İğdeli, G., Dincel, D., Darı, Y., Hancer, K. C., Kartal, M. & Topçu, G.** (2025). Green Chemistry-Based Investigation of Passiflora Extracts: Antioxidant and Anticholinesterase Activities Targeting Alzheimer's Disease Mechanisms. *Methods and Objects of Chemical Analysis*, 2025, Vol. 20, No. 1, 25–32.
- **Erkent A., İğdeli G. & Temel B.** " Synthesis, Characterization and Micelle Formation Behavior of Amphiphilic Copolymers Containing Uracil Side Groups" *International Biotechnology Congress*, 28-30 Eylül 2023, İstanbul, Türkiye
- **Şahinoğlu İ., Kuşcu B., İğdeli G., Samuk E. & Temel B., IX. Uluslararası Katılımlı Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi**, 16-18 Eylül 2024, Ankara, Türkiye

