

**SELEKTİF MAO-B İNHİBİTÖRÜ SELEJİLİN YÜKLÜ PLGA-b-PEG
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE BETA-AMİLOİD
FİBRİLLERLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**PREPARATION OF SELECTIVE MAO-B INHIBITOR SELEGILINE
LOADED PLGA-b-PEG NANOPARTICLES AND EVALUATION OF
THEIR INTERACTION WITH BETA-AMYLOID FIBRILS**

İPEK BAYSAL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Gülberk UÇAR

Üye :.....
Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Üye :.....
Doç. Dr. Eylem GÜVEN

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 17/01/2012 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Selektif MAO-B İnhibitörü Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Beta-Amiloid Fibrillerle Etkileşiminin İncelenmesi

İpek BAYSAL

ÖZ

Alzheimer hastalığı (AH), beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybı ile ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın moleküler mekanizması açık olmamakla birlikte AH'nda, neokorteksin ekstraselüler sinaptik boşluklarında amiloid beta proteinlerinin birikerek plaklar oluşturduğu ve nöron dejenerasyonuna yol açtığı öne sürülmektedir. AH'nda monoamin oksidaz-B (MAO-B) düzeyinin arttığı; bu aktivite sonucu açığa çıkan oksidanların nörodejenerasyona yol açtığı; MAO-B inhibitörlerinin nörodejeneratif hastalıklarda sinirsel dejenerasyonu engellediği bildirilmiştir. Bir MAO-B inhibitörü olan selejilin, AH'nda beynin dopamin reseptörlerince zengin olan bölgesinde etkiyerek hastalığın gelişimini yavaşlattığı öne sürülmekte; ancak periferik yan etkileri bulunan bileşiğin doğrudan beyne hedeflenmesi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. MAO-B inhibitörlerinin AH'nda β -amiloid fibril ve plak oluşumunu engellediği konusunda da yeni çalışmalar vardır. Bu çalışmanın amacı, selektif MAO-B inhibitörü olan Selejilini kan beyin engelini aşmak üzere hazırlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerine yüklemek; yüklü partiküllerin β -amiloid fibrilleri destabilize edici etkisini *in vitro* koşullarda incelemek; partiküllerin *in vivo* ortamda kan beyin engelini aşabilme yeteneğini ve beyindeki dağılımını saptamaktır.

Bu çalışmada selejilin yüklenmiş PLGA-b-PEG nanopartiküller, çift emülsiyon yönteminin modifiye edilmesiyle hazırlanmış; yükleme etkinliği *in vitro* etkin madde salım deneyleriyle belirlenmiştir. En yüksek verim, 5 mg selejilin kullanılan seri ile elde edilmiştir. Bu seri için partikül boyutları ve polidispersite indeksi sırasıyla 217 ± 15.5 nm ve 0.321 olarak saptanmıştır. Nanopartiküllerin β -amiloid fibrilleri ($A\beta$ 1-40 ve $A\beta$ 1-42) destabilize edici etkisi *in vitro* koşullarda ThT floresans şiddetindeki azalmanın ölçülmesiyle incelenmiştir. Bu sonuç, TEM ve AFM görüntüleriyle de doğrulanmıştır. Her iki fibril tipi için de altıncı saate kadar inkübasyon süresinin artmasıyla destabilize edici etkinin arttığı, altıncı saatten sonra ise etkinin platoya ulaştığı saptanmıştır. *In vivo* deneylerde Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır ve selejilin yüklü nanopartiküllerin selejiline kıyasla daha yüksek verimle korteks ve hipokampüse gittikleri saptanmıştır. Bu tez kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda gelecekte bu nanopartiküllerin yüzeyine doğrudan β amiloid fibrillere hedeflemeyi sağlayacak ligand/antikorların takılması ve Alzheimer modeli oluşturulmuş farelerde *in vivo* çalışmaların tekrarlanması planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: PLGA-b-PEG nanopartikülleri, selejilin, β amiloid fibril, Alzheimer Hastalığı, sıçan, hipokampus, korteks

Danışman: Prof. Dr. Gülberk UÇAR, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

Preparation of Selective MAO-B Inhibitor Selegiline Loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles and Evaluation of Their Interaction with Beta-Amyloid Fibrils

İpek BAYSAL

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible and progressive neurodegenerative disease that is caused by the irreversible loss of neurons in the hippocampus and cortex regions of the brain. Although the molecular mechanism of the disease is still unclear, the deposition of the amyloid beta proteins (senile plaques) in the extracellular synaptic spaces of the neocortex is suggested to play a major role in progress of AD. The increased activity of monoamine oxidase-B (MAO-B) in AD brains was suggested to cause oxidative damage, and MAO-B inhibitors have been reported to inhibit the neuronal degeneration. Selegiline, a selective MAO-B inhibitor, known to have beneficial effects in the brain regions which are rich by dopamine receptors, however, studies based on brain targetting of selegiline are limited. There have been some recent studies showing the possible A β -fibril destabilizing effects of MAO inhibitors. The aim of the present study is to prepare the selective MAO-B inhibitor selegiline loaded PLGA-b-PEG nanoparticles; to investigate the *in vitro* A β -fibril destabilizing effect of the loaded particles; to determine the blood brain barrier (BBB) crossing ability of the loaded particles and their distribution in brain *in vivo*. Selegiline loaded PLGA-b-PEG nanoparticles were prepared by a modified double emulsion method; loading efficiency was determined by *in vitro* drug releasing method. Particule serie prepared with 5 mg selegiline was found to be the one with highest efficiency. Particule dimensions and polydispersity index for this serie were determined as 217 $\pm$ 15.5 nm and 0.321, respectively. Destabilizing effect of these particules on the β -amiloid fibril (A β 1-40 and A β 1-42) formation was determined *in vitro* by evaluating the decrease in ThT fluorescence intensity. This result was also verified by TEM and AFM images. For both fibril types, destabilizing effect were found to be increased by increasing incubation time until sixth hours; and reached a plateau after the sixth hour. Wistar Albino rats were used in *in vivo* experiments and selegiline loaded nanoparticules were determined to get access to cortex and hippocampus with a higher efficiency compared to selegiline alone. According to these results, it has planning in future to design *in vivo* studies concerning to target the nanoparticles with specific ligands/antibodies on their surfaces to directly to β -amiloid fibrils in AD transgenic mice.

Keywords: PLGA-b-PEG nanoparticles, selegiline, β amyloid fibril, Alzheimer's Disease, rat, hippocampus, cortex

Advisor: Prof. Dr. Gülberk UÇAR, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry

TEŞEKKÜRLER

Tezimin her aşamasında bilimsel katkı ve desteğini esirgemeyen, beni cesaretlendiren, yol gösteren tez danışmanım, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülberk UÇAR'a,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorlandığım her noktada destek veren, beni hiç yalnız bırakmayan sevgili Hocam Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye;

Laboratuvarını bana çömertçe açan, nanopartikül sentez çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini sunan, saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez çalışmalarım sırasında benimle deneysel becerilerini paylaşan, yol gösteren sayın Hocam Dr. Yeliz TUNÇ SARISÖZEN'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a ve tüm Nanoteknoloji ve Nanotıp ailesine,

Hayvan deneylerim esnasında bana destek olan, zamanını ve bilgisini paylaşan H.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Hocam Dr. Nihan BURUL BOZKURT'a,

Tez çalışmalarım süresince desteklerini benden esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Yardımcılarına,

Partikül sentez aşamalarında deneysel bilgilerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Ece SARI'ya,

AFM analiz aşamalarımnda bana destek veren Arş. Gör. Tayfun VURAL'a,

Çalışmamın başında beri zaman, mekân gözetmeksizin ihtiyacım olan her anda bana sevgi ve istekle yardım eden ve bu stresli dönemimde desteğini her an hissettiğim canım dostum Arş. Gör. Açelya YALOVAÇ ASLAN'a,

Karşılıksız sevgileri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, zaman ve koşul gözetmeksizin her sıkıntıma çözümler üretmek için ellerinden gelen her şeyi yapan, hayatımdaki en değerli varlıklarım Anneme, Babama,

Ve beni asla yalnız bırakmayıp, desteklerini her zaman hissettiğim biricik Ablam, Emre Abim ve minicik yeğenime,

Teşekkürü bir borç bilirim...

İÇERİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. AH.....	3
2.1.1. AH'nın Moleküler Mekanizması	4
2.1.2. AH'nin Nöropatoloji ve Patofizyolojisi.....	6
2.1.2.1.Tau Proteinleri	7
2.1.2.2.Aβ Peptitler.....	9
2.1.2.3.APP ve Sekretazlar	10
2.1.2.4.Sinaptik Bozulma.....	12
2.1.3.AH'da Tedavi Stratejileri	13
2.1.3.1.Kolinesteraz İnhibitörleri	15
2.1.3.2.MAO İnhibitörleri.....	16
2.1.3.3.Antioksidan Bileşikler.....	16
2.1.3.4.Anti-enflamatuar Bileşikler.....	16
2.1.4.MAO	17
2.1.4.1.MAO-B İnhibitörleri	18
2.1.4.2.Selejin	18
2.2. AH'nın Tedavisinde Beyine İlaç Hedeflendirme	20
2.2.1.KBB Aşan Nanopartiküllerle İlaç Hedeflendirilme.....	21
2.2.1.1.KBB	22
2.2.1.1.1. KBB'nin Biyolojisi	22
2.2.2.KBB'nden İlaç Taşınması ve Hedeflendirme Mekanizması	24
2.3. Polimerik Nanopartiküller.....	27
2.4. AH Tedavisinde Nanopartiküllerin Kullanımı.....	29
2.4.1.Kinolin Türevleri.....	29

2.4.2.ThT	30
2.4.3.D-Penisillamin	31
2.5. PLGA-b-PEG Nanopartikülleri	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1.Kimyasallar	33
3.1.2.Cihazlar	34
3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması	35
3.2.1. Çift Emülsiyon Yöntemi ile Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Hazırlanması	35
3.3. Nanopartiküllere yüklenen Selejilin Miktar Tayini	36
3.3.1. Selejilin için Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması	36
3.3.2. Selejilin Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	37
3.3.3. Etkin Madde Salım Çalışmaları	37
3.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	37
3.4.1. Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli	37
3.4.2. Morfolojik analiz	38
3.4.3. FT-IR Analizi	38
3.5. Aβ Fibrillerin Hazırlanışı	38
3.5.1. Aβ Peptid Örneklerinin Hazırlanması	38
3.5.2. Fibrillerin Hazırlanması	39
3.5.3. Aβ (1-40) Fibrilin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu	39
3.5.4. Aβ (1-42) Fibrilin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu	39
3.5.5. ThT Floresans Ölçümü	39
3.5.6. Aβ (1-40) Fibrilin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnhibisyonuna İlişkin AFM ve TEM Analizleri	40
3.6. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Sıçanlara Uygulanması; Beyin Dokusunda Selejilin Tayini	40
3.7. İstatistiksel Analizler	41
4. SONUÇLAR	42
4.1. Selejilin HPLC Yöntemi ile <i>In Vitro</i> Miktar Tayini	42
4.2. Selejilin Miktar Tayininde Kullanılan HPLC Yönteminin Validasyonu	43
4.2.1. Doğrusallık	43
4.2.2. Özgüllük	44

4.3. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin <i>İn Vitro</i> Yüklenme Verimliliğinin Değerlendirilmesi.....	44
4.4. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin <i>İn Vitro</i> Etkin Madde Salım Çalışmaları	47
4.5. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Boyut Analizi, Zeta Potansiyeli ve Polidispersitesi.....	48
4.6. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Morfolojisi.....	50
4.7. FT-IR Analizi	50
4.8. A β (1-40) Fibrilinin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu	53
4.8.1. A β (1-40) Fibrilinin Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikülleri ile İnkübasyonuna İlişkin Morfolojik Analiz	55
4.9. A β (1-42) Fibrilinin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu	56
4.10. <i>İn vivo</i> Koşullarda Sıçana Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin ve Tek Başına Selejilinin uygulamasını takiben Korteks ve Hipokampüsteki Selejilin Derişiminin Belirlenmesi	58
5. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AH	Alzheimer hastalığı
AIHÖ	Aktivasyonla indüklenen hücre ölümü
AKo	Asetilkolin
AKoE	Asetilkolinesteraz
APP	Amiloid prekürsör protein
A β	Amiloid beta
BAKE 1 ve 2	β -bölgesi APP-kesici enzim 1 ve 2
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BuKoE	Bütirilkolinesteraz
ÇIDP	Çoklu ilaç dirençi proteinleri
EH	Endotel hücreler
EHM	Endotel hücresi multimeri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
GFI	Glikozilfosfatidilinozitol
GSK	Glikojen sentaz kinaz,
HAB	Hücrelerarası boşluk
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KBB	Kan beyin bariyeri
KK	Kliokinol (5-kloro-7-iyodo-hidroksikinolin)
KK-NP	Kliokinol polimerik matrikse enkapsüle edilmiş şekilde hazırlanmış nanopartikül
KoAT	Kolinasetiltransferaz
MAO A ve B	Monoamin oksidaz A ve B
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sisteminde
NFA	Nörofibriler ağ
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OAT	Organik anyon taşıyıcıları
PASA	Polialkilsiyanoakrilatlar
PBS	Fosfat tamponu
PBSA	Polibütilsiyanoakrilat
PEG	Poli (etilen glikol)
Pgp	P-glikoprotein
PH	Parkinson hastalığı
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PLGA-b-PEG	Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri
PS	Presenilin
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
RES	Retiküloendotel sistem
SBK	Siklin bağımlı kinaz
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopisi
ThT	Tiyoflavin T

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. AH'nın moleküler mekanizmasına ilişkin temel hipotezler	4
Şekil 2.2. Hiperfosforile olmuş, mikrotübüllere karşı olan Afinitesini kaybetmiş ve kendi kendilerine çift helikal yapıya dönüşmüş Tau proteinler.....	8
Şekil 2.3. Aβ peptitlerin oluşumunun şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.4. AH için tedavi stratejileri.....	14
Şekil 2.5. Selejilinin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.6. KBB'deki karakteristik serebral kapillerlerin şematik olarak gösterimi.....	23
Şekil 2.7. KBB'nin yapısının şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.8. Derişim bağımlı madde taşınımının şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.9. KBB'nde taşınım mekanizmaları.....	25
Şekil 2.10. İlaç taşınım mekanizmaları	26
Şekil 2.11. PASA emülsiyon ile polimerizasyon mekanizması.....	29
Şekil 2.12. Kliokinolün yapısı.....	30
Şekil 3.1. Sentezlenen selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin şematik gösterimi.....	36
Şekil 3.2. Sıçan beyinde hipokampusün şematik gösterimi	41
Şekil 4.1. 0.5, 1, 2.5 ve 5µg/mL selejilin içeren standarta ait kromatogram	42
Şekil 4.2. 10, 25, 50 ve 100 µg/mL selejilin içeren standarta ait kromatogram..	42
Şekil 4.3. Selejiline ait kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.4. Boş nanopartiküllere ait kromatogram	44
Şekil 4.5. Farklı derişimlerde selejilin kullanılarak hazırlanmış nanopartiküllerin dış faz kromatogramları.....	46
Şekil 4.6. Selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartikülü <i>in vitro</i> % salım grafiği.....	47
Şekil 4.7. Selejilin içeren PLGA-b-PEG Nanopartikülleri boyut analizi.....	49
Şekil 4.8. Selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı.....	50

Şekil 4.9. Boş PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin FT-IR analizi.....	51
Şekil 4.10. Selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin FT-IR analizi	52
Şekil 4.11. Selejilin FT-IR analizi.....	52
Şekil 4.12. A β (1-40) fibrilin belirli derişimlerde selejilin yüklü nanopartiküller ile inhibisyonu.....	54
Şekil 4.13. A β (1-40) fibrillerinin TEM ve AFM görüntüsü.....	55
Şekil 4.14. A β (1-40) fibriller ile inkübe edilmiş selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartikülleri ile oluşturulmuş inhibisyonun TEM ve AFM görüntüsü.....	55
Şekil 4.15. A β (1-42) fibrilin belirli derişimlerde selejilin yüklü nanopartiküller ile inhibisyonu.....	57
Şekil 4.16. 1 saatlik bekleme süresi sonrasında Hipokampus ve Korteksteki selejilin Derişim kromotogramları.....	59
Şekil 4.17. 2 saatlik bekleme süresi sonrasında Hipokampus ve Korteksteki selejilin Derişim kromotogramları	60
Şekil 4.18. 1 saatlik bekleme süresi sonrasında Hipokampus ve Korteksteki selejilin Derişim kromotogramları.....	61
Şekil 4.19. 2 saatlik bekleme süresi sonrasında Hipokampus ve Korteksteki selejilin Derişim kromotogramları	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. Nanopartiküllere selejilin yükleme etkinliği	45
Çizelge 4.2. Nanopartiküllerin ortalama boyutları, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri.....	48
Çizelge 4.3. Uygulamayı takiben 1 ve 2 saatlik bekleme süresi sonucu elde edilen beyin korteks ve hipokampüs dokularında selejilin miktarları.....	59

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), geri dönüşümsüz ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalık, konuşmada, yön bulmada, karar vermede, düşünmede ve yorumlamada zorluklar ve hafıza kaybı ile karakterizedir [1, 2]. Hastalığın nöropatolojik ayırıcı özellikleri arasında amiloidce zengin senil plakların oluşması [3], nörofibriler ağ meydana gelmesi [4] ve nörondejenerasyonun ortaya çıkması yer alır.

Hastalığın moleküler mekanizmasının açıklanmasında iki temel hipotezden söz edilmektedir. Kolinerjik hipotez, AH ile bağlantılı bilişsel, hareketsel ve davranışsal fonksiyon bozukluklarına, kolinerjik sinaps boyunca sinir hücresi uyarımının eksikliğinin neden olduğu temeline dayandırılmıştır. Amiloid şelale hipotezi ise AH'nı, beyindeki amiloid prekürsör proteinin (APP) normal olmayan bir şekilde kesime uğraması sonucu amiloid beta ($A\beta$) türevlerinin oluşumu, agregasyonu, depolanması ve toksisitesiyle tetiklenen nörodejenerasyon ile açıklamaktadır [5]. Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar, amiloid şelale hipotezini büyük ölçüde desteklemektedir [6].

AH'nin moleküler mekanizmasının karmaşıklığı nedeniyle, tedavide $A\beta$ birikiminin engellenmesi, bozuk sinirsel yapının tamiri, sinir hasarına yol açan oksidatif stresin önlenmesi, artmış nörotransmitter düzeylerinin ve nörotransmitter dönüşüm hızının azaltılması, sinir iletiminin düzenlenmesi gibi birçok yaklaşım denenmekle birlikte etkin bir klinik tedavi biçimi henüz bulunabilmiş değildir. AH patogeneğinde $A\beta$ peptidlerin birikiminin temel olması nedeniyle güncel AH tedavisinde bu peptidlerin ve fibrillerin oluşumunun engellenmesine veya fibrilin destabilizasyonuna yönelik yaklaşımlar söz konusudur [7].

AH'nda, aminleri metabolize eden enzim, monoamin oksidaz-B (MAO-B), düzeyinin arttığı; bu aktivite sonucu açığa çıkan oksidanların nörodejenerasyona yol açtığı; MAO-B inhibitörlerinin bu hastalıklarda sinirsel dejenerasyonu engellediği bildirilmiştir. Alzheimer hastalarında artmış MAO aktivitesi bozulan dopaminerjik ve noradrenerjik sistemler ile ilişkilendirilmiştir; MAO-B inhibitörlerinin AH'nda nöron hasarını azalttığı öne sürülmüştür [8]. Bir MAO-B inhibitörü olan selejilinin, AH'nda beyin prefrontal bölgesindeki dopamin reseptörlerince zengin kısımda yararlı etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. MAO-B inhibitörlerinin

Parkinson hastalığı ve AH'da katekolamin düzeylerini artırarak davranış bozukluklarını düzelttiğinin rapor edilmesi, dopamin antagonistlerinin ve MAO-B inhibitörlerinin A β fibril oluşumunu da inhibe edebileceği hipotezini doğurmuştur [9]. Asetil kolinesteraz (AKoE) ve MAO-B inhibisyonu gösteren çift etkili bileşikler Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisi açısından ümit vadetmektedir [10, 11].

Bu tez çalışmasının amacı, kan beyin engelini aştığı bildirilen Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri (PLGA-b-PEG) nanopartiküllerini sentezlemek; daha önce gerçekleştirdiğimiz *in vitro* çalışmalarda A β fibrillerin oluşumunu bozduğunu gösterdiğimiz selektif MAO-B inhibitörü selejilini bu nanopartiküllere yüklemek; karakterize etmek; yüklü nanopartiküllerin *in vitro* koşullarda A β fibrilleri destabilize edici özelliklerini araştırmak; *in vivo* koşullarda, yüklü nanopartiküllerin ve serbest selejilinin kan beyin bariyerini aşıp aşmadığını gözlemlemek; selejilinin ve selejilin yüklü nanopartiküllerin beyindeki dağılımını ve partiküllerden selejilin salınımını belirlemektir. Elde edilecek öncül sonuçların, bilinen ve yeni sentezleyeceğimiz MAO-B ve Kolinesteraz (KoE) inhibitörlerinin A β proteinlere özgül ligand taşıyan uygun nanopartüllere yüklenerek doğrudan beyin dokusuna hedeflenmesi konusundaki çalışmalarımıza ışık tutacağına inanmaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.AH

AH, geri dönüşümsüz ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalık, konuşmada, yön bulmada, karar vermede, düşünmede, ve yorumlamada zorluklar ve hafıza kaybı ile karakterizedir. Kişilik ve davranış bozukluklarının giderek artması ile kendini gösterir. Hastalık ilk kez bir Alman tıp doktoru olan Dr. Alois Alzheimer tarafından 1907 yılında nedeni bilinmeyen mental bir hastalıktan ölen kadının beyin dokusunda yaptığı otopsi ile tanımlanmıştır [1].

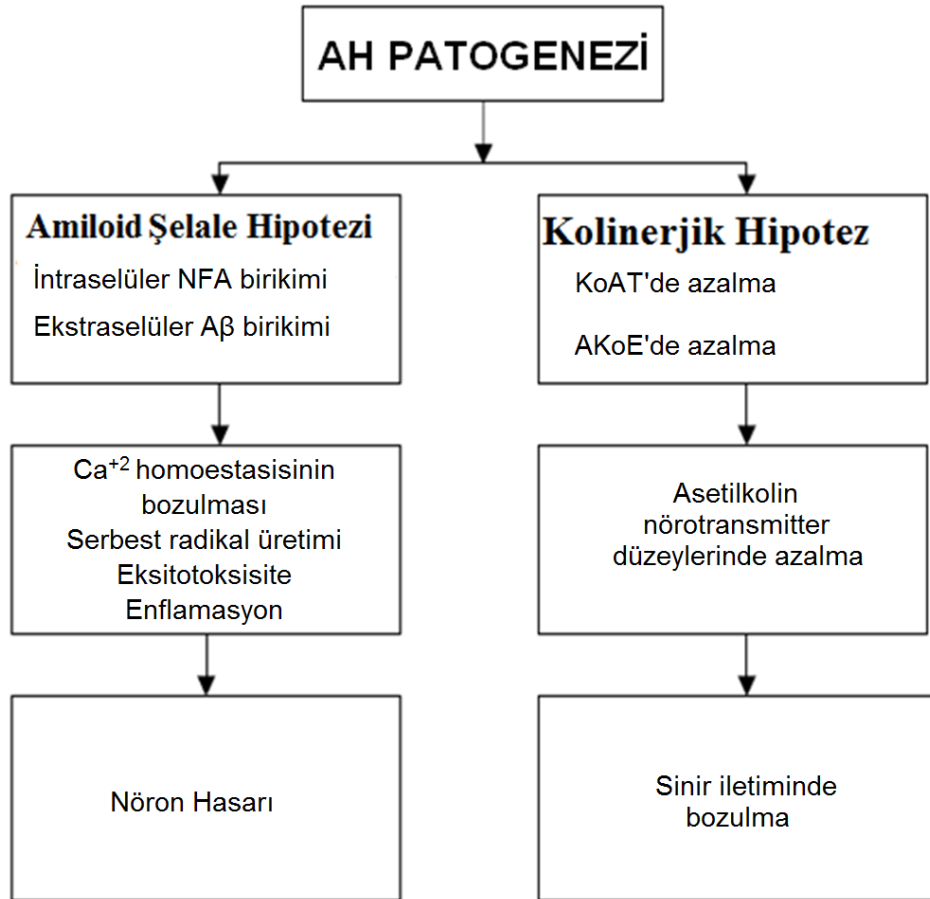
AH'nın patogeneğinde, beyinin özellikle temporal ve parietal loblarında olmak üzere neokorteksindeki ekstraselüler sinaptik boşluklarında A β proteinlerinin (senil plakların) birikmesi ve nörofibriller ağ oluşması büyük önem taşımaktadır. Bu plakların varlığı ile tetiklenen nörodejenerasyon, bilişsel davranışlar (öğrenme, soyutlama, yargı, vs.) ve hafızayı etkiler. Bunun sonucunda da depresyon, halüsinasyon, sanrı, öfke ve ajitasyon gibi davranışlar ortaya çıkar [2-7]. Kısa zamanlı hafıza kaybı ilk klinik belirtidir. Hastalık ilerledikçe diğer bilişsel özelliklerde de kayıplar görülmeye başlanır [12]. Hastalığın klasik klinik özellikleri amnezik bellek bozukluğu [13], konuşmada bozukluklar [14] ve görsel-uzamsal bozukluklardır [15]. Yaş bağımlı AH'nın ilerleyici nörodejeneratif doğası, sinaptik afferent sistemlerin dejenerasyonuna, dendrit ve nöron hasarına ve beyin boyunca dağılmış anormal protein agregasyonuna neden olur [16]. Nörodejeneratif hastalıkların çoğunun yaşa bağımlı olmasının nedeni ise beyindeki özgün nöronların çeşitli stres koşullarına olan duyarlılığıdır [17].

AH ve normal birey beyinleri arasında gen ekspresyonu düzeyinde anlamlı fark saptanmıştır [18]. Modern görüntüleme teknikleri, AH ve demans tanısı açısından umut verici olanaklar sunmaktadır. Beynin fonksiyonel aktivitesinin ölçülmesi için pozitron emisyon tomografisi, tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi ve fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fonksiyonel MRG) teknikleri; beyin anatomisinin belirlenmesi için hidrojen manyetik rezonans spektroskopisi ve MRG teknikleri; kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi için ise manyetik rezonans spektroskopisi kullanılmaktadır. Bu teknikler AH'nı vasküler ve frontotemporal demans gibi demansın diğer türlerinden ayırır, risk sahibi bireylerin tanımlanmasına yardımcı olur [19, 20, 21].

AH, 65 yaşının üzerindeki bireylerin %10'unu, 85 yaş üzerindekiilerin ise %50'sini etkilemektedir [22]. Kadınların AH'na yakalanma olasılığı erkeklere oranla 1.5 kat daha fazladır [23]. AH'nın dünya çapında 15 milyon insanı, ABD'nde 4.5 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir [24]. ABD'nde Alzheimer hastalarının toplam bakım harcamalarının yaklaşık 83.9 milyar doları bulduğu rapor edilmiştir [25]. 50 yıl içinde hastalığın tedavisi veya önlenmesi ile ilgili gelişmeler göz ardı edildiğinde bu sayıların popülasyondaki yaşlı yüzdelерinin artması ile en az üç katına çıkacağı düşünülmektedir [24].

2.1.1. AH'nın Moleküler Mekanizması

Hastalığın moleküler mekanizmasının açıklanmasında iki temel hipotez ortaya konulmuştur: "Kolinерjik hipotez" ve "amiloid şelale hipotezi" (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. AH'nın moleküler mekanizmasına ilişkin temel hipotezler [26]. NFA: Nörofibriler ağ, KoAT: Kolinasetiltransferaz, AKoE: Asetilkolinesteraz

Alzheimer hastalarının beyinde, etkili öğrenmede önemli rolü olan nörotransmitterlerden asetilkolinin (AKo) düzeyinde eksiklik saptanmış [27] ve bu veri, “kolinerjik hipotez”in oluşmasına yol açmıştır. Bu hipotez, AH ile bağlantılı bilişsel, hareketssel ve davranışsal fonksiyon bozukluklarına, kolinerjik sinaps boyunca sinir hücresi uyarımının eksikliğinin neden olduğu temeline dayandırılmıştır. Merkezi kolinerjik iletimin, bazal önbeyin çekirdeğinin yıkımı nedeniyle eksik olması AH’nin patolojisi açısından önemlidir. AH’nin ilerlemesi sırasında nikotinik reseptörlerin sayıca azaldığı gözlenmiştir ki bu reseptörlerin, hafıza ve bilişsel bozukluklarda rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır [27]. Son çalışmalar, AH patogeneğinde gözlenen bilişsel bozukluklar ile bazal önbeyin kolinerjik sistem bozukluğunun ilişkisi olduğunu; A β fibril birikiminin reseptör sinyalizasyonunu keserek veya nörotransmitter salınımını engelleyerek kolinerjik haberleşmeyi olumsuz etkilediğini göstermiştir [28]. AH’nda beyinin temporal lobu, frontal ve paryetal kortislerinde KoAT aktivitesinde azalma görüldüğü; bu azalmanın Meynert bazal nukleusundaki kolinerjik nöron kaybıyla uyumlu olduğu bildirilmiştir [29, 30]. Hastalığın ileri safhalarında bütirilkolinesteraz (BuKoE) aktivitesinin de arttığı gösterilmiş; BuKoE inhibitörlerinin kullanımının AH gelişimini yavaşlatabileceği öne sürülmüştür [31].

Bozulmuş olan kolinerjik sinyal iletimini düzeltebilmek için farklı birçok strateji geliştirilmiştir. Bunlar arasında AKo sentezinin ve presinaptik AKo salımının artırılması, kolinerjik postsinaptik, muskarinik ve nikotinik reseptörlerin uyarılması ve kolinesteraz inhibitörleri ile AKo’nın sinaptik yıkımının azaltılması yer almaktadır [32].

Amiloid şelale hipotezinde AH’nda gözlenen nörodejeneratif olayların, beyindeki APP normal olmayan bir şekilde kesime uğramasıyla ortaya çıkan A β peptidler tarafından tetiklendiği ve hastalığın ilerlemesinde bu peptidlerin agregasyonu, depolanması ve toksisitesinin önemli rol oynadığı kabul edilmektedir [5]. Bu hipotez, son yıllarda gerçekleştirilen moleküler ve genetik çalışmalarla büyük ölçüde desteklenmektedir [6].

Alzheimer hastalarında hastalıkla ilişki olabileceği düşünülen bazı genler tanımlanmış; AH’nda ortaya çıkan biyokimyasal değişikliklerle bu anormal gen ve gen ürünleri ilişkilendirilmiştir. AH’nın patofizyolojisinde en az dört gendeki

mutasyonların önem taşıyabileceği düşünülmektedir. Bunlar, 21.Kromozom üzerindeki APP geninin mutasyona uğraması [33], 19. Kromozom üzerindeki apolipoprotein E'nin polimorfizime uğraması [34], 14. ve 1. Kromozomlardaki sırasıyla presenilin 1'in (PS1) ve presenilin 2'nin (PS2) mutasyonudur [35, 36]. AH'nin erken evrelerindeki birçok hastada tanımlanan A β üretimindeki artışta, hem 21. Kromozomdaki APP geninin hem de presenilin (PS) geninin mutasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir. Membrana bağlı APP ile türevlenmiş bu protein, iki belirgin yol ile üretilir: (i) A β peptidini oluşturan amiloidojenik yolak ve (ii) A β peptidini oluşmasını engelleyen non-amiloidojenik yolak (APP'nin salgılanan formu olan sAPP α bu yolakta üretilir). Amiloid şelale hipotezini savunan bilim adamları, uzun amiloid peptit olan A β 1-42'nin üretiminin artması ile amiloid plakların oluştuğunu bildirmektedirler [37].

2.1.2. AH'nin Nöropatoloji ve Patofiziyojisi

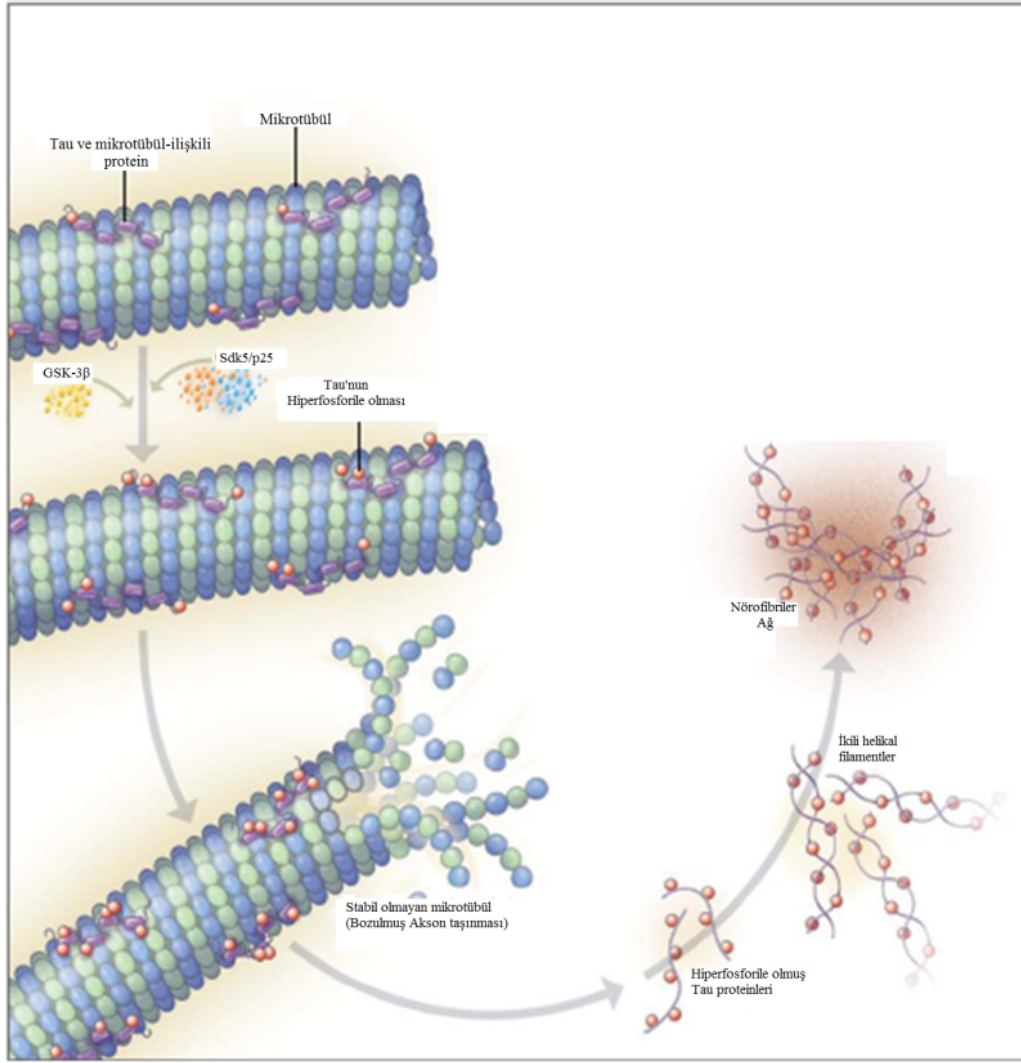
AH'da gözlenen demans, nörodejenerasyondan kaynaklanır ve nöron hasarı, sinaptik bozulma ve nöron ölümü ile karakterizedir. Nörofibriler ağ ve nöropil iplikleri AH'nin patolojik özelliklerindendir ve sayılarındaki değişiklik yaşa bağlı değildir. Nörofibriler ağların ve nöropil ipliklerinin oluşumu, hastalıkta gözlenen ilk değişikliklerdir. Bu değişiklikler hastalığın oluşması kadar gelişmesi ve ilerlemesiyle de bağlantılıdır. Plaklar (A β birikimi ve/veya nöritik plaklar) ise hastalığın son safhasında ortaya çıkmaktadır. Nörofibriler ağlar ve nöropil iplikler, ilk olarak özgün kortikal bölgelerde oluşurlar ve daha sonra telensefalon korteksin diğer bölümlerine yayılırlar. Bir evreleme prosedürünün oluşturulabilmesi için temel olarak lezyonların dağılım paterni ve yıkıcı sürecin kademeli gelişimi dikkate alınmalıdır [38].

Hücre dışında A β protein birikimi ve nöron içindeki nörofibriller değişiklikler hastalığın patolojisindeki temel özellikleridir. AH, genellikle geri dönüşümsüzdür. A β birikintiler ilk olarak, bazal neokorteks alanındaki zayıf miyelinli bölgelerde oluşur. Nöron içindeki lezyonlar ise ilk olarak transentorhinal bölgede gelişir ve daha sonra diğer bölgelere de yayılırlar. AH, nöropatolojik açıdan altı aşamaya sahiptir: I ve II. aşamalarda, nörofibriler değişiklikler, A β birikiminin olmadığı bir aralıkta meydana gelir. Bir grup vakada, hastalığın erken evlerinde de A β birikim ve nöron içi değişiklikler gözlenmiştir. İleri yaş, lezyonların gelişmesi için bir

önkoşul değildir. AH, yaş ile ilgilidir fakat yaşa bağlı bir hastalık değildir. III ve IV. aşamalarda beyinde oluşan yıkım, ilk klinik semptomların oluşmasına neden olur. V ve VI. aşamalar ise gelişmiş AH'nı temsil eder ve yaş ile beraber hastalığın ilerlemesi artar. AH'ndaki ana risk faktörü yaşıdır. Hem A β birikimi, hem de nörofibriler patoloji yaş ile artmaktadır [38].

2.1.2.1. Tau Proteinleri

Primidal nöronlardan oluşan iplik şeklindeki nörofibriler ağlar, AH ve taupatiler olarak isimlendirilen diğer nörodejeneratif hastalıklarda meydana gelir [39]. Nörofibriler ağ miktarı, AH'nın ciddiyetini gösteren patolojik bir göstergedir. Bu ağın temel bileşeni, anormal biçimde hiperfosforile olmuş ve agregasyona uğramış Tau proteinidir. Normalde çözünebilen ve aksonlarda çok miktarda bulunan Tau proteinleri, mikrotübüler ve vezikül transport sisteminin bir araya gelmesini ve stabilitesini sağlar. Hiperfosforile olmuş Tau proteinleri çözünmez, mikrotübüllere karşı olan afinitesini kaybeder ve kendi kendilerine çift helikal yapıya dönüşürler (Şekil 2.2). Fosfat kalıntılarını ekleyen ve çıkaran enzimlerle Tau fosforilenmesinin düzeyi kontrol edilebilir [40].



Şekil 2.2. Hiperfosforile olmuş, mikrotübüllere karşı olan afinitesini kaybetmiş ve kendi kendilerine çift helikal yapıya dönüşmüş Tau proteinleri [41]. GSK: Glikojen sentaz kinaz, SBK: Siklin bağımlı kinaz.

Tıpkı A β oligomerleri gibi anormal Tau moleküllerinin ara ürün agregatları da sitotoksiktir ve hafızayı etkiler [42, 43]. Çözünmeyen helikal filamentler ise etkisizdir [44]. Bu helikal filamentlerin, toksik Tau ara ürün türlerini tuttuğu için koruyucu oldukları düşünülmektedir [45]. Parkinson hastalığında (PH) görülen frontotemporal demansta, 17. Kromozom üzerinde 30'dan fazla Tau mutasyonu gözlenmiştir [46]. Buna karşı AH'nda Tau mutasyonları oluşmamaktadır [47]. Fakat serebrospinal sıvı içerisindeki fosforile olmuş miktar ve total Tau miktarlarının artması ile kavramsal incelemelerde alınan skorların düştüğü gözlenmiştir [48]. Kavramsal bozuklukları az olan Alzheimer hastalarının erken teşhisinde, T181 ve T231 fosfo Tau amino asit düzeylerindeki artış ve serebrospinal sıvıdaki toplam

Tau miktarının biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür [8]. Yapılan çalışmalarda A β birikiminin, Tau agregasyonuna öncü olduğunu gösterilmiştir [49]. Buna ek olarak A β tarafından uyarılmış nöron kültürlerinin dejenerasyonu ve Alzheimer hastası olan farelerdeki kavramsal bozuklukların oluşabilmesi için endojen Tau'ya ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir [50]. Yaşlanma ile doğru orantılı olarak oksidatif stresin artması, endoplazmik retikulumun katlanma fonksiyonlarının zarar görmesi sonucu oluşan bozulmuş proteinler ve bu proteinlerin proteozom tarafından yetersiz temizlenmesi, AH'nda A β ve Tau proteinlerinin birikimini arttırmaktadır [51, 52].

2.1.2.2. A β Peptitler

AH'nda A β ile dolu serebral plaklar, neokortikal terminal alandaki distrofik nöritler ve medial temporal lob yapısında göze çarpan nörofibriler ağlar önemli patolojik bulgulardır. Bunlara ek olarak nöron ve ak maddenin kaybı, amiloid anjiyopati, enflamasyon ve oksidatif hasar da gözlenebilir. A β peptitler, 36'dan 43'e kadar amino asitten oluşabilen metabolizmanın doğal ürünleridir. A β 1-40 monomerleri agregasyona eğilimlidir ve zararlı olan A β 1-42 türünden daha yaygın olarak bulunurlar. A β peptitleri, amiloid prekürsör proteinlerinin (APP) sırası ile APP beta bölgesi kesme enzimi 1 (BAKE-1), (β -sekretaz), γ -sekretaz ve katalitik çekirdeğinde PS 1 olan protein kompleksleri ile gerçekleşen enzimatik reaksiyonlarla proteolize uğraması ile oluşur [53] (Şekil 2.3). Bu peptitlerin üretimi, uzaklaştırılması ve agregasyonu arasındaki dengede oluşan bozukluk, A β 'nın birikmesine sebep olur. Bu durum ise AH'nın oluşmasında bir başlangıç faktörü kabul edilir. Bu hipoteze amiloid hipotez adı verilir [54, 55]. A β , spontan bir şekilde agregate olarak diğer formlarına dönüşür. Bu formlardan biri oligomerlerden (2 den 6 peptide kadar) oluşur ve bu oligomerler ara ürün topluluklarına dönüşürler [56, 57] (Şekil 2.3). A β 'ler aynı zamanda fibril haline dönüşebilir ve bunu A β plakların çözünmeyen fiberleri olan β -pileli yapıya dönüşerek gerçekleştirirler.

Çözünebilen oligomerler ve amiloidlerin ara ürünleri, A β 'nın en nörotoksik formlarındandır [58]. Beyin kesitlerinde yapılan çalışmalarda, A β 'nın dimer ve trimerlerinin sinapslara karşı toksik olduğu saptanmıştır [59, 60]. AH'ndaki kavramsal bozuklukların ciddiyeti beyindeki total oligomer miktarı ile koreledir fakat total A β yükü ile korele değildir [61]. Nöron aktivasyonu sinapslardaki A β

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, APP'nin kinesin-1 kargo reseptörü gibi işlev görüp, birçok sinaptik proteinin nöron terminaline hedeflenmesine aracı olduğu gösterilmiştir [64]. APP'ler, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtında olgunlaşırlar ve fosforilasyon, glikolizasyon, sülfatlanma gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğrarlar. APP'nin anormal modifikasyonu, A β türevlerinin agregasyonunu, depolanmasını ve toksitesini etkiler [65].

APP iki yolak ile metabolize olmaktadır. Non-amiloidojenik yolda membrana bağlı proteaz aktivitesi (α -sekretaz) ile APP, A β kısmından kesilir ve APP'nin hücre dışında birikmesini engellenir. α -sekretazın metabolizması, protein kinaz C ile ilişkili birçok hücre yüzey reseptörü tarafından stimüle edilebilir. Bu şekilde bu metabolizma, fosfotidilinositol hidrolizi ile bağlantılı olur [26].

Amiloidojenik yolak ise ardışık iki kesim işlemini içerir. APP ilk olarak β -sekretaz ile kesilir ve membrana bağlı 99 amino asit kalıntılı C-terminal ucu (C99) oluşur. Bu daha sonra transmembran kısımda γ -sekretaz tarafından kesilir ve A β 'yı ortama verir. Heterojen C terminalinde γ -sekretaz tarafından gerçekleştirilen proteoliz sonucunda iki tane C-terminalli varyant (A β 1-40 ve A β 1-42) oluşur. Oluşan A β 'ların yaklaşık olarak %90'ı A β 1-40'dır, fakat A β 1-42 agregat olmaya daha uygundur ve amiloid birikiminin temel bileşenidir. β ve γ -sekretazın farmakolojik olarak inhibisyonunun, AH'ndaki amiloidopatinin tedavisi için iyi bir hedef olabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.3) [26].

BAKE, aspartil proteazın pepsin ailesi ile homoloji içerisindedir. β -sekretaz geni 11. kromozom üzerindedir. β -sekretaz homologu olan BACE-2 ise damarlandırılmış dokularda (kalp, böbrek ve plasenta) çok fazla eksprese olur ve 21. kromozomda tanımlanmıştır [66]. AH'nın tedavisi için β -sekretazın en ideal hedef olduğu düşünülmüştür. β -sekretaz, A β oluşumunun ilk aşamasını gerçekleştirir. β -sekretaz knock-out farelerde, düşük A β derişimleri dışında hiçbir klinik fenotip görülmemiştir [25].

Çalışmalar sırasında γ -sekretazın görevleri tartışma konusu olmuştur. γ -sekretazın, A β 1-40 ve A β 1-42 oranını belirleme ve susuz çevrede transmembran kısmın ortasında substratları kesme özelliği vardır [67]. γ -sekretazın çoklu protein kompleksi olduğu öne sürülmüştür ve bazı çalışmalar PS'nin, bu kompleksin katalitik bölgesi olduğunu önermiştir [26]. PS'ler notch reseptörlerin kesiminde

görev alırlar. Bu yolağın embriyolarda engellenmesi ölümcüldür, fakat indüklenebilir PS 1 knock-out olan yetişkin farelerde patolojik fenotip görülmemiştir [66]. Son yıllarda üretilen bir γ -sekretaz inhibitörünün, notch sinyalizasyonunu etkilemeden A β üretimini azalttığı gösterilmiştir. Yu ve diğerleri [68], nikastrin isimli membrana bağlı bir protein tanımlamışlardır. Bu proteinin, katalitik aktiviteyi kontrol eden γ -sekretaz kofaktörü olduğu düşünülmüştür [69]. γ -sekretaz inhibitörlerinin, hayvan modellerinde amiloid yükünü ortadan kaldırdığı gözlemlenmiştir ve birçok çalışmada faz I klinik denemelerine başlanmıştır.

2.1.2.4. Sinaptik Bozulma

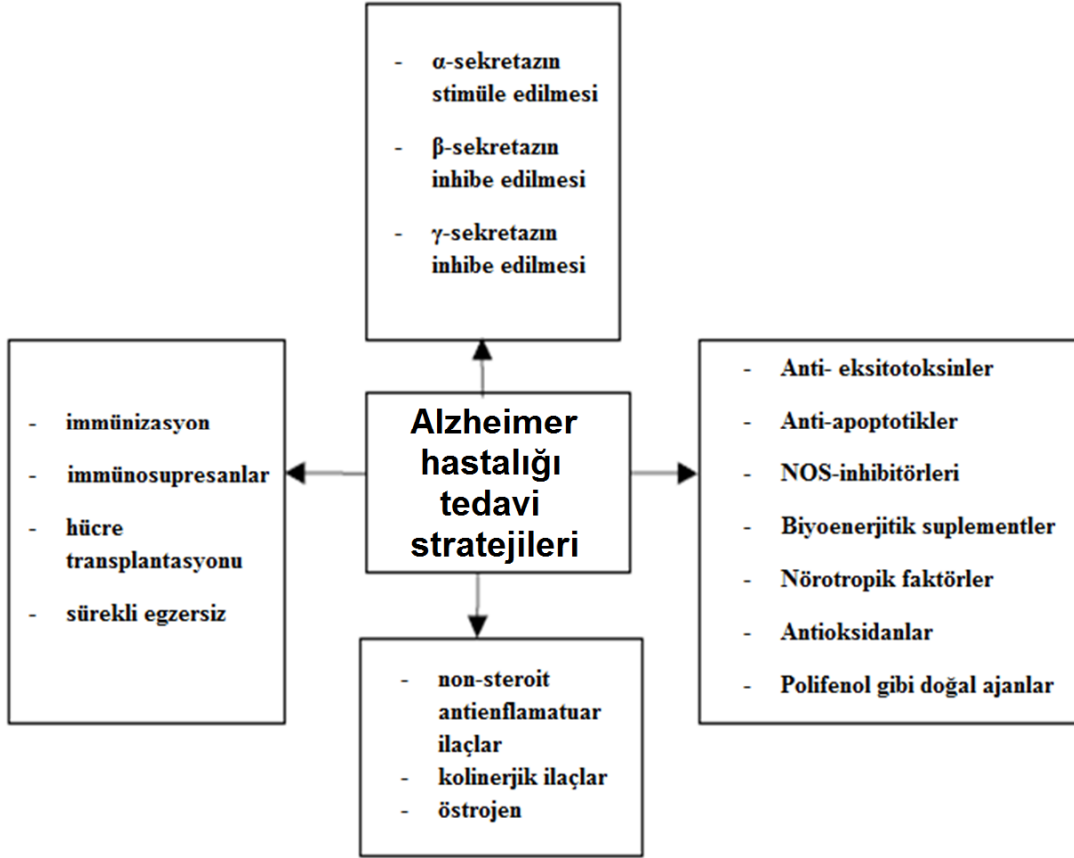
Yapılan çalışmalarda, AH'ndaki sinaptik kaybın bilişsel bozukluklarla en uyumlu patoloji olduğu gösterilmiştir. AH'nın tedavisinde, ilerlemesinin yavaşlatılmasında ve bilişsel-fonksiyonel yeteneklerin korunmasında, hastalığın erken evrelerinde oluşan sinaptik fonksiyon kaybı ve bozukluğu önemli bir hedeftir. Birçok çalışmada Alzheimer hastalarının beyinlerinin çeşitli bölgelerinde sinaps yoğunluğunun azaldığı gösterilmiştir [67]. Bilişsel bozukluğu minimal olan hastalarda ilk olarak hipokampal sinapslar azalmaya başlar ve bu demansın başlangıcı olan kısıtlı kavramsal bozuklukların oluşmasına neden olur [70]. AH'nın başlangıcında, presinaptik vezikül proteini olan sinaptofisinde %25 oranında azalma görülür [71]. Hastalığın ilerlemesi ile beraber sinapslar, nöronlara oranla daha fazla miktarda azalma gösterir. Bu kayıpların, demansın gelişmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir [72]. Yaşlanmanın kendisi de sinaptik kayıplara neden olur [73] ve bundan özellikle hipokampüsün dentate bölgesi etkilenir [74]. Tek uyarıların bazal iletimi ve uzun süreli potansiyelizasyonu, sinapslardaki hafıza oluşumunun deneysel göstergesidir. Plak yapısına sahip AH olan farelerin beyin kesitlerinde bunun bozulduğu gösterilmiştir [75, 76]. Bu bozulmanın devamında hafıza için önemli olan sinyal molekülleri inhibe olmaktadır. Presinaptik nörotransmitter ve postsinaptik glutamat reseptörlerinden iyon akımının [77, 78] bozulması, genel olarak N-metil-D-aspartat (NMDA) yüzey reseptörleri [79] ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokzole propionik asidin yüzey reseptörlerinin endositozu ile oluşmaktadır [80]. Normal yaşlanmada da sinapslar arasındaki dengede bozulma gerçekleşir. Nöronlar arası A β , bu sinaptik bozulmaları daha önceden tetikleyebilir [81].

Son çalışmalarda, sinir büyüme faktörü ve beyin-türevli ntrofik faktör gibi ntrofinlerin, nöronlarda sinaptik esnekliği düzenleyen koruma faktörleri olduğu gösterilmiştir [82].

Sinaptik fonksiyon bozukluğu, AH'nda erken görülen bir olaydır ve nöron kaybından önce görülür. Bu şaşırtıcı değildir çünkü dendritler, nöron yüzey alanının geniş bir kısmını oluştururlar. Gövdeden uzaklığı nedeniyle sinaptik bölge, hücre içi sinyalizasyonu ve aksonal iletişimi bozan işlemlere karşı kısmen savunmasız olabilir. Bu durum dejeneratif bunamalarda görülür. Sinaptik bozuklukta, sinaptik proteinlerin ve membran lipidlerinin kaybı, veziküler fonksiyonun bozulması ve esneklik fonksiyonlarının kaybı gibi çeşitli mekanizmalar rol oynar. AH'nın patofizyolojisinde, oksidatif stresin rolü olduğu bilinmektedir ve serbest radikallerin birikimi beyinde aşırı lipid peroksidasyonuna ve nöron kaybına yol açabilir [67].

2.1.3. AH'da Tedavi Stratejileri

AH, genelde beyin amiloidozu olarak görülmektedir. Aβ depolanmasının engellenmesi/ortadan kaldırılması bu nedenle yıllardır tedavinin en önemli hedefi olmuştur [26, 83]. AH'nda birçok patofizyolojik olay gerçekleşir. Hastalığın ilerleyişi eşzamanlı olmayabilir. Hastalığın tedavisi, hastalık gelişmiş durumda iken veya hastalığın her safhasında canlı nöronlar bulunduğu sürece devam ettirilebilir. AH'nda kolinerjik, noradrenerjik, dopaminerjik ve GABAerjik nöron iletimlerinde belirgin bir azalma gözlenir [84, 85]. Kolinesteraz inhibitörleri ve NMDA reseptör antagonistleri gibi nörotransmitter temelli tedaviler halen yürürlüktedir. AH'nın tedavisi için düşünülen terapötik seçenekler şu zamana kadar kolinerjik sistemdeki nörotransmitter sistemi modifiye ederek kalan nöronlar arasındaki aktiviteyi maksimum hale getirmeye yöneliktir (şekil 2.4.).



Şekil 2.4. AH için tedavi stratejileri.

AH oluşumunun biyolojik mekanizmasının son derece karmaşık oluşu ve hastalığın nöropatolojisinde birçok faktörün yer alması nedeni ile AH oluşumunun engellenmesi, hastalığın seyrinin yavaşlatılması gibi değişik stratejilerin kullanılmasını zorunludur [49].

AH patogenezinde A β -peptid birikiminin temel olması nedeniyle, güncel AH tedavisinde bu peptidin oluşumunun engellenmesi veya fibrilin destabilizasyonuna yönelik yaklaşımlar söz konusudur [86]:

- APP'in baskılanması
- Amiloidojenik proteinin ekspresyonunun engellenmesi ve küçük organik ligandlarla doğal formunun bozulması
- Proteaz inhibitörleri kullanarak amiloidojenik proteinin ana molekülden salınımının engellenmesi
- A β 1-42 ve/veya A β 1-40 proteinlerinin üretiminin inhibe edilmesi

- A β fibril oluşumunun inhibe edilmesi
- A β fibrillerinin nörodejeneratif etkilerinin bloke edilmesi

Bunlar içinde en popüler olanı A β fibril oluşumunun inhibe edilmesidir. Bu amaçla kullanılan moleküller ve etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- Kongo kırmızısının A β fibrile bağlandığı, böylece fibrilin destabilize olup proteazlara açık hale geldiği gösterilmiştir. Ancak bu bileşik Kan beyin bariyeri (KBB)'ni aşamamaktadır [50].
- β -siklodekstrinin, yapısındaki hidrofobik aromatik bölge ile A β peptidine bağlanıp agregasyonunu engellediği öne sürülmektedir [87].
- Rifampisin, A β fibrile bağlandığı ve onu destabilize ettiği; ayrıca moleküldeki naftohidrokinon ve naftokinon yapısının antioksidan etkisi nedeniyle AH'ndaki hasarı azalttığı bildirilmiştir [51].
- Benzofuran türevlerinin, tetrasiklik ve karbazol tipi bileşiklerin A β fibrile bağlandığı gösterilmiştir [52].
- Nikotin, A β fibril yapısındaki α -heliks ve β -pileli konformasyonu bozarak ve amiloid birikimini engelleyen transtherin biyosentezini artırarak, fibrili destabilize ettiği öne sürülmektedir [88].
- HEM ve ilişkili porfirinlerin, melatonin, Tip IV kollajenin A β fibril oluşumunu engellediği öne sürülmektedir [89].
- Ampifilik sürfaktanların A β fibril yapısını β -pileli konformasyonu bozarak engellediği bildirilmiştir [70].
- 4-iyodo-4'-deoksidosorubisinin anti-amiloid etkisi rapor edilmiştir [39].
- A β 'dan türetilen farklı peptidlerin anti-amiloid etkileri bildirilmiştir [39].
- Floresan bir boya olan Tiyoflavin T (ThT), A β peptide bağlanmaktadır [71].
- Sekretaz inhibitörlerinin, PS'leri bloke ederek, A β peptid yapımını engelledikleri öne sürülmektedir [72].

2.1.3.1. Kolinesteraz İnhibitörleri

Bu tip ilaçlar, AH'nda bozulan sinir iletimini düzeltmeyi amaçlayan semptomatik tedaviye yönelik bileşiklerdir [72]. AH'nda AKo'nun kortikal aktivitesi düşük olduğu için, sinaptik boşlukta AKo'nun yıkımından sorumlu olan AkoE, başlıca ilaç hedefini oluşturur. Takrin, donepezil ve rivastigmin gibi AKoE inhibitörlerinin AH'nda sinirsel iletiyi düzelttiği gösterilmiştir [49].

2.1.3.2. MAO İnhibitörleri

Alzheimer hastalarında plateletler, MAO aktivitesinin yüksek bulunması ile bozulan dopaminerjik ve noradrenerjik sistemler ile ilişkilendirilmiştir; özellikle MAO-B inhibitörlerinin AH'nda nöron hasarını azalttığı öne sürülmüştür [8]. Selektif MAO-B inhibitörü selejilinin Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında etkili olduğu; katekolamin düzeylerini artırarak bu iki hastalıkta gözlenen davranış bozukluklarını düzelttiği bildirilmiştir [90]. Buradan yola çıkarak, dopamin antagonistlerinin ve MAO-B inhibitörlerinin A β fibril oluşumunu da inhibe edebileceği hipotezi geliştirilmiştir [91]. AKoE ve MAO-B inhibisyonu gösteren çift etkili bileşikler, PH ve AH'nın tedavisi açısından ümit vadetmektedir [73,74].

MAO inhibitörleri ve AH'ndaki kullanımları Bölüm 2.1.4'de detaylı açıklanmıştır.

2.1.3.3. Antioksidan Bileşikler

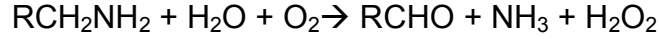
Nöronlarda meydana gelen oksidatif hasarın, AH'nın oluşma riskini arttırdığı; radikal yakalayıcıları, kalsiyum kanal blokörleri ve metal şelatörlerinin A β peptid birikiminin nörodejeneratif etkilerini azalttığı rapor edilmiştir [47]. A β fibriller, nörofibriller ağ, mitokondriyal anormallikler, yaşlanma nedeniyle artan oksidatif stresin yol açtığı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu nörodejenerasyona neden olmaktadır [46]. E ve C vitaminleri, ubikinon, lipoik asit, beta-karoten, melatonin, kurkumin gibi doğal antioksidanların ve bazı sentetik antioksidanların AH'nda koruyucu ve nörodejenerasyonu durdurucu etkisi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [76].

2.1.3.4. Anti-enflamatuar Bileşikler

AH'nda gözlenen nöroenflamasyonun A β birikimini, AH gelişimini ve nöron kaybını hızlandırdığı öne sürülerek [77] non-steroidal anti-enflamatuar ilaçların AH gelişimini durdurduğu ve AH'nda gözlenen davranışsal bozuklukları düzelttiği rapor edilmiştir [78].

2.1.4. MAO

MAO; (EC 1.4.3.4.) dış mitokondri membranında bulunan ve aşağıdaki oksidatif deaminasyon reaksiyonunu katalizleyen bir integral proteindir.



MAO, hem merkezi sinir sisteminde (MSS), hem de periferik nöronlarda ve dokularda bulunan biyogenik ve diyet-türevli aminlerin *in vivo* inaktivasyonunda önemli rol oynar. MSS’de MAO için bulunan en önemli substratlar katekolamin nörotransmitterleri (dopamin, adrenalin ve noradrenalin), serotonin (5-hidroksitriptamin; 5HT) ve β -feniletilamindir.

Klorjilinin inhibisyonuna karşı substrat tercihi ve duyarlılığı doğrultusunda iki MAO izozimi bulunmuştur [92].

- MAO-A, düşük derişimdeki (nM) klorjilin ile seçici ve geri dönüşümsüz olarak inhibe edilir. İnsan MSS’de asıl işi serotonin ve noradrenalinin deaminasyonudur. Bağırsaklarda tiraminin oksidasyonunu metabolize eder.
- MAO-B, l-deprenil ile inhibe edilir; başlıca substratları dopamin ve β -feniletilamindir.

İmmünolojik olarak farklı olan bu izozimler, X kromozomunda birbirinden ayrı, fakat birbirlerine yakından bağlı genler tarafında kodlanırlar [93]. İki formun da aktif bölgesi %93,9 oranında benzerlik gösterir [94]. Büyük ihtimalle iki molekül, ikinci bağlanma bölgeleri ve sahip oldukları lipid çevreleri sayesinde substrat seçiciliği kazanmaktadırlar [95].

İki MAO formunun substrat özgüllüklerine bakıldığında, beynin içerisindeki dağılımları ilgi çekicidir. En yüksek MAO-A derişimi, lokus seruleusdaki katekolaminerjik nöronlardadır. MAO-B ise en fazla raphe ve posterior hipotalamusdaki serotonerjik ve histaminerjik nöronlarda bulunur [96, 97]. İnsan bazal ganglionlarında her iki form da yüksek derişimdedir [98]. İnsanda MSS’deki MAO-B aktivitesinin yaşla orantılı arttığı [99]; bu artışın, glial hücre proliferasyonu ile bağlantılı nöron kaybından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [100]. AH ve PH’nda beyinde ve plateletlerde MAO-B miktarının arttığı gözlenmiş [100, 101];

PH'ndaki artışın doğrudan hastalıkla ilgili olmayıp AH ile birlikte gelişmesinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [101]. Sigara içen bireylerin beyinde MAO-B aktivitesinin %40 oranında azaldığı gösterilmiş; tütün kullanımının psikiyatrik hastalıkların ve PH'nın oluşma riskini azaltabileceği belirtilmiştir [102].

2.1.4.1. MAO-B İnhibitörleri

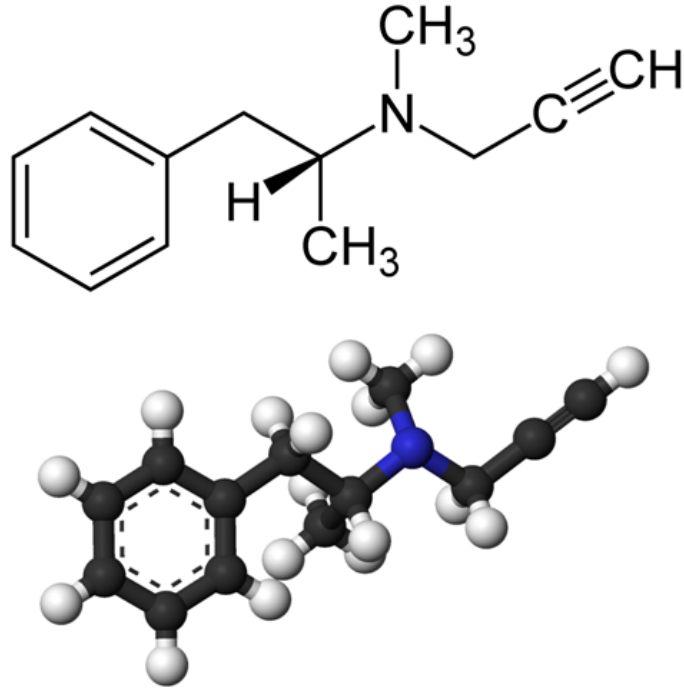
MAO-B inhibitörleri, nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde halen iyi bir seçenek olarak düşünülmektedir. İki sınıf MAO-B inhibitöründen söz edilebilir [103 -105]:

- “Geri dönüşümlü”, “kompetitif” inhibitörler, MAO substratlarına yapısal olarak benzerler ve enzimin aktif bölgesine bağlanırlar, yavaş metabolize edilirler.
- “Geri dönüşümsüz”, “kcat” veya “intihar” inhibitörleri, enzime geri dönüşümlü ve kompetitif durumda bağlanır fakat daha sonra enzim tarafından oksitlenerek aktive edilirler. Enzimin aktif bölgesini FAD kofaktörü ile işgal ettirir ve enzimi kalıcı olarak kullanılamaz hale getirirler. İnhibisyon, geri dönüşümlü inhibitörelere göre daha kalıcıdır (saatler yerine haftalar sürer). İnhibitörün etkisi sadece enzimin *novo* sentezi tarafından ortadan kaldırılabilir [106].

Son zamanlarda sentezlenen MAO-B inhibitörlerinin çoğu geri dönüşümsüzdür. İlk tanımlanan özgün MAO-B inhibitörü selejilin de bunlardan birisidir [107]. Selejilin ilk olarak 1962'de üretilmiştir [108, 109]. L-izomeri, D-izomerine göre 150 kat daha etkilidir [110]. MAO-B'ye olan afinitesi, MAO-A'ya göre daha azdır. MAO-B'ye karşı asıl yüksek özgünlüğünü sağlayan ise geri dönüşümsüz olması ve kovalent bağlanmasıdır [104].

2.1.4.2. Selejilin

Selejilin (L-deprenil) (Şekil 2.5), Jôsef Knoll tarafından yetmişli yıllarda bulunmuş [107]; geri dönüşümsüz selektif MAO-B inhibitörü oluşu, enzime karşı olan yüksek afinitesi ve seçiciliği ile dikkat çekmiştir [107, 108]. Lipofilik yapıdaki selejilinin beyinde 10^{-6} M [111] derişimde MAO-B'yi inhibe ettiği, fakat daha yüksek derişimler denendiğinde (10^{-5} - 10^{-4} M) MAO-A'yı da inhibe ettiği gösterilmiştir [112].



Şekil 2.5. Selejilinin kimyasal yapısı.

İnsan beynindeki toplam MAO aktivitesinin %70'i B tipidir. MAO-B'nin doğal substratları genel olarak feniletilamin, benzilamin metilhistamin, oktilamindir. Dopamin, tiramin ve triptamin hem MAO-A, hem de MAO-B için substrattır [111]. MAO'nun inhibe olması bu doğal substratların beyinde birikmesine sebep olur ve sonuçta katekolaminerjik sistem uyarılır.

Selejilin, beyindeki feniletilamin ve dopamin miktarını MAO-B'yi inhibe ederek artırır. Bu şekilde MSS'deki nöronların amin alımını inhibe eder [113]. Bunlara ek olarak süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesini arttırdığı için nöroprotektif ve antioksidan etkileri de vardır [112, 114]. Ayrıca beyin dokusu ve serebral damarlarda nitrik oksit üretimini artırır ve damar endotelini A β peptidinin toksik etkilerinden korur [115].

Klinik çalışmalarda selejilin:

- a. Kandaki derişimi 10^{-6} M iken, PH'nda levodopa tedavisi için bir adjuvan olarak görev yapar [115].
- b. Kandaki derişimi 10^{-5} M iken antidepresan olarak kullanılır [116].
- c. Selejilin, Alzheimer'lı hayvanlarda ve insanlarda bilişsel fonksiyonlarda ilerleme sağlamıştır [117].

Selejilinin optik izomeri olan D-deprenil, biyolojik olarak daha az aktiftir. Klinik olarak selejilin genelde dopamin derişimini artırmak amacıyla kullanılır. Dopamin, hem MAO-A hem de MAO-B için substrattır. Selejilin, PH'nın tedavisinde, özellikle erken safhadaki PH'nda hareket bozukluğunun başlamasının geciktirilmesinde tek başına veya L-DOPA ile birlikte kullanılmaktadır [118]. Selejilin, aynı zamanda mitokondriyal permeabilite geçiş poru ile indüklenmiş nörotoksisite ve PH benzeri semptomları olan hayvanlarda da başarılı olmuştur. Düşük dozlardaki selejilinin kronik uygulaması, MAO-A'nın da inhibe olmasına neden olur. Selejilinin antidepresan aktivitesi, MAO-B inhibisyonuna ek olarak MAO-A inhibisyonuna da bağlıdır [119].

2.2.AH'nın Tedavisinde Beyine İlaç Hedeflendirme

İlaç hedeflendirme, ilaçların istenilen reseptöre, organa veya vücudun diğer bölgelerine özel olarak gönderilmesi demektir. İlaç hedefleme kavramı 1902 yılında “sihirli mermi” adı altında Paul Ehrlich tarafından önerilmiştir [120]. İlaç hedeflendirmede dikkat edilecek noktalar arasında, belirli bir hastalık için uygun hedeflenecek bölgenin bulunması, hastalığı en etkin tedavi edecek ilacın seçimi ve immünojenik veya özel olmayan etkileşimlerle vücuttaki yabancı maddeleri temizleyen sistemlerden uzak durabilecek ve ilacı stabil olarak taşıyabilecek taşıyıcı sistemlerin seçimi ve sentezi sayılabilir [121]. Beyine hedeflendirme, farmasötik araştırma yapan bilim adamları için en zorlu işlemlerden birisidir zira birçok ilaç ve nöropeptid KBB'ni geçememektedir [122]. Beyin, çok hassas bir organdır ve evrim onu korumak için etkin yollar oluşturmuştur. Ama aynı mekanizma tedavi için yapılacak müdahaleleri de boşa çıkarmaktadır [123]. KBB, karmaşık sıkı kavşaklar ile bağlanmış tek tabakalı polarize endotel hücrelerinden oluşmuştur [124]. KBB'nin fonksiyonlarını astrosit, nöron ve perisit gibi çeşitli hücreler dinamik olarak kontrol ederler [125]. Endotel hücreler, diğer hücrelerden tip IV kollajen, laminin, fibronektin, heparan sülfat bileşenlerinden meydana gelen bazal lamina içermesiyle ayrılır. Bu yapılar, negatif yüklü arabirim sağladıkları için ilaç taşımada kullanılabilirler [126]. Omurgalı beyinde ve omuriliğinin kılcal damarlarında, çözünen maddenin hızlı hareketlerle diğer organlar içerisinde dolaşmasına izin veren küçük gözenekler yoktur. Mikrodamarlar, KBB'nin yüzey alanının %95'ini oluşturur ve kimyasalların beyine girebileceği en önemli yeri temsil eder [127]. Beyin damarlarının diğer vücut damarlarına göre daha dar çaplı

ve ince duvarlı olduğu bilinmektedir. Beyin mikrodamarlarındaki mitokondri yoğunluğunun da vücuttaki diğerkılcal damarlara göre daha yoğun olduğu bulunmuştur [128]. MSS bozukluk/hastalıklarında kullanılmak üzere tasarlanan ve umut vaad eden birçok ilaç, KBB'yi geçmekte zorlandıkları için farmasötik etkilerini kaybetmektedirler. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için birçok strateji uygulanmaktadır. Bunlar arasında kimyasal ilaç taşıma sistemleri [129], manyetik ilaç taşıma sistemleri [130], ozmotik yollarla sıkıştırılmış kavşakların açılması [131], veya belirli taşıyıcı sistemler örneğin; antikorlar [132], lipozomlar [133], nanopartiküller [134] sayılabilir. Nanopartiküller, ilaç taşıma sistemi araştırmalarında önemli bir yere sahiptirler [135]. İlaç, nanopartiküllere veya nanopartikül hazırlama aşamasında polimer matriks içine dağıtılarak veya enkapsüle edilerek, veya oluşmuş partikül yüzeyine adsorbsiyonla yüklenebilir [136]. Nanopartiküller, intravenöz taşıma için daha uygun oldukları için mikropartiküllere göre daha kullanışlıdır ve hidrofobik ve hidrofilik ilaçlar, proteinler, aşilar ve biyolojik makromoleküller gibi birçok yapının taşınmasında başarı sağlamaktadırlar [135].

Son yıllarda insidansı artan AH'na ilginin artması hastalığın moleküler yapısının anlaşılması ve tedavisi ile ilgili birçok gelişmeye yol açmışsa da AH hala kronik ve tedavisi son derece sınırlı bir bozukluk olarak kalmaya devam etmektedir. AH'nin oluşumunun moleküler mekanizmasının karmaşıklığı nedeniyle, tedavide Aβ birikiminin engellenmesi, bozuk sinirsel yapının tamiri, sinir hasarına yol açan oksidatif stresin önlenmesi, artmış nörotransmitter düzeylerinin ve nörotransmitter dönüşüm hızının azaltılması, sinir iletiminin düzenlenmesi gibi birçok yaklaşım denenmektedir. Ancak etkin bir klinik tedavi biçimi henüz bulunabilmiş değildir.

2.2.1. KBB Aşan Nanopartiküllerle İlaç Hedeflendirilme

MSS bozukluklarına yönelik terapötik stratejiler, KBB'deki kısıtlayıcı sıkı bağlantılar nedeni ile sınırlıdır. MSS'ne polimer ve biyouyumlu ilaç taşıyıcılarla antikanserojen ilaç hedeflenmesi konusunda çok çalışma bulunmakta, fakat AH tedavisinde nanopartiküle yüklenmiş ilaç hedeflenme teknolojisi konusunda henüz fazla gelişme sağlanamamıştır [136]. AH'nda ilaç hedeflemede polimerik nanopartiküller sıkı bağlantıları açarak [137], KBB'yi geçerek [138], yüksek ilaç yüklenme

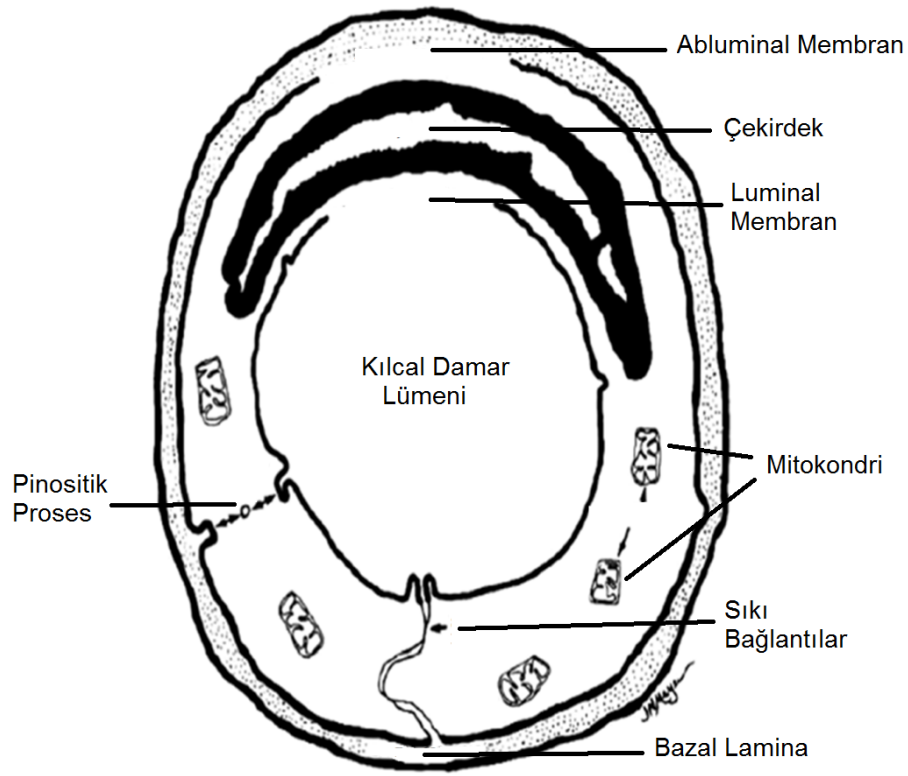
kapasiteleriyle mutajenik proteinlerine ilaç hedefleme açısından umut vaat etmektedirler.

2.2.1.1. KBB

KBB, beyni patojen ve toksinlere karşı koruyan homeostatik bir koruma mekanizmasıdır. Komplekstir ve sıkı denetlenir. KBB, biyokimyasalları, fizikokimyasalları ve periferdeki maddesel yapıları görüntüler ve bu yolla bariyer seçiciliğini yaratıp istenilen moleküllerin beynin parankimasından geçişini sağlar [139].

2.2.1.1.1. KBB'nin Biyolojisi

KBB, serebral kapiller anjiyogenez ile oluşur. Şekil 2.6'da serebral kapiller tarif edilmektedir, Şekil 2.7'de ise KBB'nin özellikleri gösterilmektedir. Anjiyogenez sırasında endotel hücreler (EH), mikrovasküler ağı oluşturmak için hücre dışı matrikse çapraz bir şekilde geçer ve membranın altına degrade olur. [139, 140] Daha sonra proliferasyon gerçekleşir. EH'nin proliferasyonu nötral belirleyicilerden etkilenir. Bunlar KBB'ye karakteristik fizyolojik özelliklerini sunar ve bu şekilde serebral EH periferdeki EH'den farklı olur. Örneğin beyindeki EH'nin periferdeki EH'lere göre daha az endositotik damarı vardır ve bu şekilde KBB'ye olan transsellüler akım kısıtlanmış olur. Yüksek elektriksel dayanıklılığı olan sıkı bağlantılar, hücrelerarası akışa karşı bariyer oluştururlar ve beyindeki EH'lerle birleşirler. Ayrıca serebral EH'lerin, periferdeki EH'lere göre daha fazla mitokondrisi vardır ve bu hücreler KBB'deki iyonik gradienti sabit tutmak için gerekli metabolik iş yükünü sahiplenmiş olurlar [140].

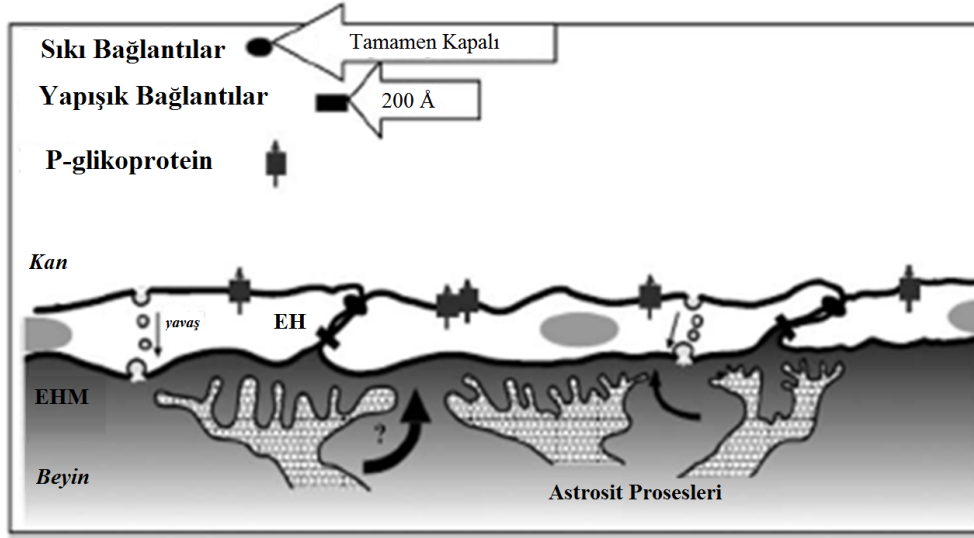


Şekil 2.6. KBB'deki karakteristik serebral kapillerlerin şematik olarak gösterimi [141].

Alt membrandaki elektronca yoğun tabakalar, EH'lerle astrositleri kaynaştırırken, hücre dışı alanı çevreleyen EH'ler ve perisitleri ayırırlar. Perisitler, serebral kapillerin dış eksen boyunca bulunurlar ve kasılmada görev alırlar. Bu yakın ilişki ve fonksiyon, kan akışının izlenmesine yardımcı olur. Bu şekilde perisitlerin adezyonu ile birlikte mikrodolaşım, dolaylı olarak EH aktivitesi ve KBB transportu kontrol edilmiş olur. Perisitler aynı zamanda hücre proliferasyonunu inhibe ederek, endotel büyümesini ve gelişmesini kontrol ederler [142]. Buna bağlı olarak anjiyogenezde de rol oynayarak tezat iki görevde rol almış olurlar [143].

Astrositler, bazal kapiller membranların %99'undan fazlasını sararlar [144]. Buna ek olarak KBB'nin yüksek hücrelerarası elektrik direncinin uyarılmasında rol oynarlar. Sadece 20 nm'lik boşluk, astrositleri EH'lerden ve perisitlerden ayırır. Üç hücre arasındaki etkileşimler madde transportunda önemli rol oynar. Kandan beyne doğru olan moleküler yol, ilk olarak astrositik prosesden ileri hareket etme ile gerçekleşir. Daha sonra perivasküler boşluktan geçer ve oradan da kapillerin sınırındaki perisitlere hareket eder. Sonuç olarak taşıyıcılar, reseptörler, astrosit ve

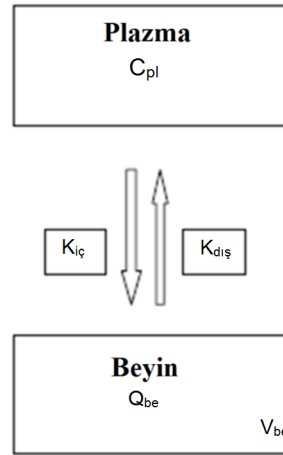
perisitlerin plazma membranındaki enzimler, maddelerin EH'ye ulaşmadan önce akıbetine karar verirler [144, 145].



Şekil 2.7. KBB'nin yapısının şematik gösterimi [141]. EH: Endotel Hücresi, EHM: Endotel hücresi multimeri.

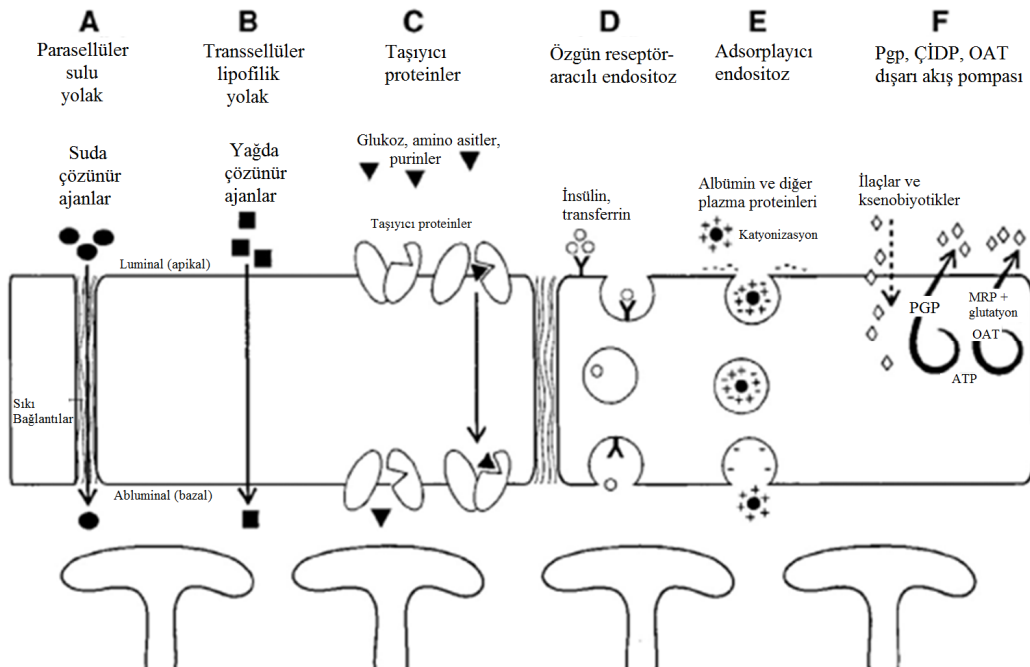
2.2.2. KBB'nden İlaç Taşınması ve Hedeflendirme Mekanizması

KBB, çembersel, seri halinde dizilmiş polarize luminal (apikal) ve abluminal (bazal) endotel membrandan ve diğer dokulardan meydana gelmektedir [138]. Maddelerin beyine girebilmeleri için membran setlerinden geçmeleri gerekmektedir. Bu da KBB'nin denetlenmesini dinamik hale getirir. Bariyer, gerekli besin, hormon ve vitaminleri alır, enzimatik aktivite aracılığı ile de birçok peptidi ve nörotransmitteri parçalar. Bunlara ek olarak, enerji gerektiren toksin dışa akış mekanizması, serebral canlılığın korunmasına zarar verecek maddeleri ortadan kaldırarak yardımcı olur. Kinetik akış analizleri, maddelerin tek yönlü derişim bağımlı hareketlerini ortaya çıkartmıştır [146] (Şekil 2.8). Akışın yönü plazmadan beyne veya beyinden plazmaya doğrudur. Bu iki parametre içe akış ve dışa akış olarak tanımlanır.



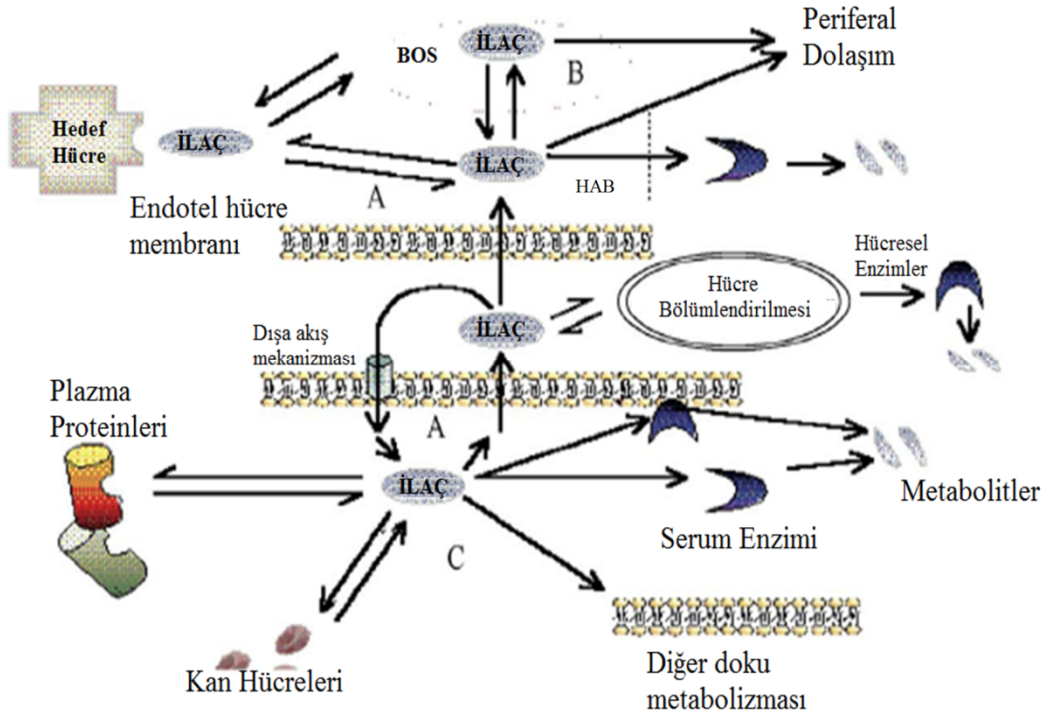
Şekil 2.8. Derişim bağımlı madde taşınımının şematik gösterimi [141].

Bu iki tek yönlü oran arasında net akış birbirinden farklıdır ve KBB'nin doğasından doğrudan etkilenir. KBB akışı, MSS'de ilaçların terapötik derişimlere ulaşmasında önemli bir belirteçtir. KBB'yi birçok transport mekanizması tanımlar (Şekil 2.9). Kapillerden en rahat küçük lipofilik moleküller geçer. Yüklü, büyük veya hidrofilik moleküllerin KBB'den geçebilmesi için kapılı kanallar, ATP, proteinler ve/veya reseptörler gerekmektedir [147].



Şekil 2.9. KBB'nde taşınım mekanizmaları [141]. Pgp: P-glikoprotein, Çırp: Çoklu ilaç direnç proteinleri, OAT: Organik anyon taşıyıcıları.

KBB'deki taşıma mekanizması, beyne ilaç hedefleme için ayarlanabilir (Şekil 2.10). Doğal olarak en ideal ilaçlar küçük, lipofilik, hidrofobik ve kompakt (polar yüzey alan ile ölçülebilen bir parametre) olanlardır. Fizikokimyasal faktörlere rağmen biyolojik sistemin içerisindeki ilaç adayının doğası, ilaç tasarımı için çok önemlidir. Periferik dolaşımda sistematik enzim saldırıları ve plazma proteini opsonizasyonu, ilacın beyne ulaşmadan önce metabolize olmasına neden olabilir. Dahası hücre salımlama olasılığı ve ilacın kan dolaşımından temizlenme oranı ilaç hedeflemede düşünülmesi gereken ek sorunlardır. Aday ilacın beyindeki atılım oranının anlaşılması çok önemlidir. Buna bağlı olarak ilacın kandaki derişiminden yola çıkılarak beyindeki derişimine odaklanılmalıdır. İlacı tasarlarken, ilaç derişimini, lipofilikliği ve polar yüzey alanı gibi birçok parametrenin göz önüne alınması gerekmektedir. Dışa akış proteinleri ve KBB'de oluşabilecek diğer engeller, ilaç beyin iç kısımlarına girmeden önce ortadan kaldırılmalıdır [148].



Şekil 2.10. İlaç taşınım mekanizmaları [141]. BOS: Beyin-omurilik sıvısı, HAB: Hücrelerarası boşluk.

Beyne ilaç hedeflemede, moleküler yaklaşım ve polimerik taşıyıcı yaklaşım olmak üzere iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Moleküler yaklaşımda öncelikle ilaçların beyin hücrelerine hedeflenmesi (lipofiliklik, boyut ve polar yüzey alanı gibi önemli

belirteçler temel alınarak) gerekir. Daha sonra ilacın hedeflendiği hücre içerisindeyken özgün enzimatik mekanizma ile aktive edilmesi şarttır. Bu yöntemin dezavantajı, kullanılabilecek ilaçların ve metabolik yolların potansiyel olarak kullanılmasının limitli olmasıdır. Avantajı ise ilaçların, reseptör aracılı olarak KBB'ye hedeflenebilmesinin mümkün olmasıdır. Ancak birçok reseptör özgül değildir ve ilacın, hedeflenen hücre dışında başka hücrelere karşı da afinite gösterme ihtimali vardır. Beyine ilaç hedeflemede diğer bir yöntem ise taşıyıcı partiküllerin kullanılmasıdır. Lipozomlar, su içerisinde yağ emülsiyonları ve polimerik nanopartiküller, taşıyıcı partiküllere örnek olarak verilebilir [148].

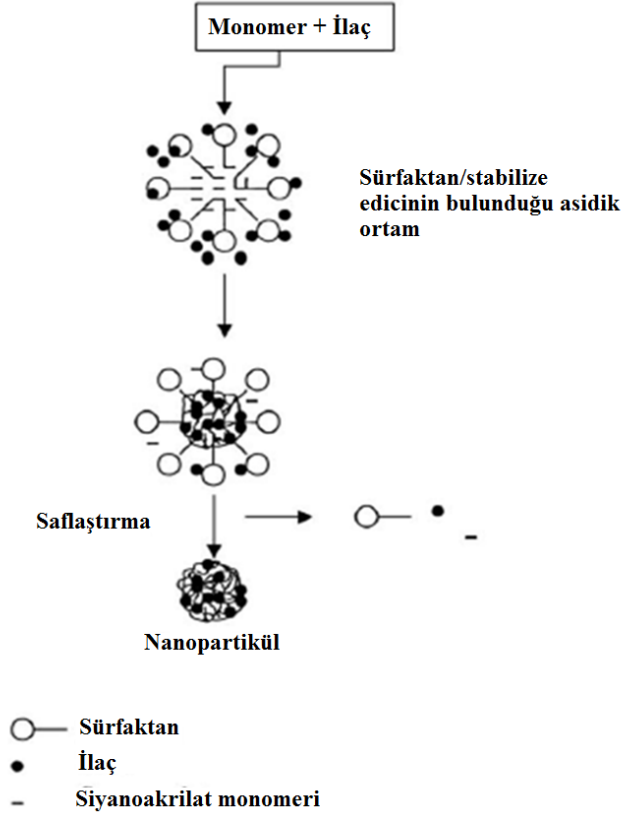
Polimerik nanopartiküller birçok açıdan avantajlıdır. İlaç yükleme kapasiteleri yüksektir ve ilacın hücre içi taşınımı artırılabilir. Katı matrisli taşıyıcı partiküller, ilaçları degradasyona karşı korurlar, böylece ilacın beyine ulaşma olasılığı yükselir. Ayrıca taşıyıcılar ilaçları hedefleyebilirler ve bu hedefleme kontrol edilebilir. Taşıyıcı partiküllerin yüzey özellikleri kontrol edilebildiği için retikuloendotel sistemin (RES) makrofajları tarafından fark edilmezler ve beyine ulaşma olasılıkları artar [148].

2.3. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller birçok açıdan avantajlıdır. İlaç yükleme kapasiteleri yüksektir ve ilacın hücre içi taşınımı artırılabilir. Katı matrisli taşıyıcı partiküller, ilaçları degradasyona karşı korurlar, böylece ilacın beyine ulaşma olasılığı yükselir. Ayrıca taşıyıcılar ilaçları hedefleyebilirler ve bu hedefleme kontrol edilebilir. Taşıyıcı partiküllerin yüzey özellikleri kontrol edilebildiği için RES makrofajları tarafından fark edilmezler ve beyine ulaşma olasılıkları artar [148].

Nanopartiküller, doğal veya yapay polimerlerden yapılmış, 10 ile 1000 nm arası boyutları olan polimerik partiküllerdir [149]. Diğer kolloidal taşıyıcılarla karşılaştırıldığında polimerik nanopartiküller, biyolojik sıvıya karşı daha yüksek kararlılığa sahiptirler. Ayrıca polimerik doğaları, kontrollü ve sürekli ilaç salımı gibi istenilen birçok özelliğin oluşturulmasına izin verirler. Nanopartiküller önceden oluşturulmuş polimerlerden sentezlenebilecekleri gibi monomerlerinden de sentezlenebilirler. Partikülün oluşturulmasında kullanılan teknoloji ve yöntem doğrultusunda nanokürecikler veya nanokapsüller sentezlenebilir. Nanokürecikler, ilacın içine dağıtıldığı yoğun polimerik matrislerdir. Bunun yanında nanokapsüller,

sıvı bir çekirdeğin etrafını saran polimerik kabuk şeklinde ifade edilebilir. Monomerin polimerizasyonu, monomerin dağılmış bir emülsiyon fazına eklenmesi, ters mikroemülsiyon veya çözünmeyen polimerin emülsiyon içinde dağıtılması gibi birçok teknik içerir. Önceden oluşturulmuş polimerden başlanırsa nanopartiküller, sentetik polimerin çöktürülmesi, denatüre edilmesi veya doğal makromoleküllerin jelleşmesi ile oluşturulur [50, 87-91]. Sentetik polimerlerden nanopartikül hazırlanması için iki temel yaklaşım önerilmiştir. İlk yaklaşım, karışmayan su-polimer organik çözeltisinin, sürfaktan içeren sulu faz ile emülsiyon oluşturulması ve daha sonra çözücünün uçurulmasıdır. İkinci yaklaşım ise polimere, polimerin çözücüsü olmayan bir çözücü eklenmesi ile çöktürmedir. Şimdiye kadar *in vivo* koşullarda uygulanmış ve beyine hedeflenmesi başarılı olmuş sadece bir tane nanopartikül vardır. O da biyobozunur olan polibütilsiyanoakrilatlardır (PBSA) [80]. Polialkilsiyanoakrilatların (PASA) emülsiyon ile polimerizasyon mekanizması Şekil 2.11’de gösterilmiştir. Kreuter ve diğerlerinin [81] çalışmasında, PBSA nanopartiküllerinin KBB’den geçişinin EH’den fagositoz veya endositoz yolu ile olmakta olduğu belirtilmiştir. Vauthier ve diğerleri [94] ise PASA’nın alımında EH’nin endositoz mekanizması fikrini çürütüp, nanopartiküllerin hücre membranına Pgp dışı akış proteinleri ile geçiş yaptığını öne sürmüşlerdir.



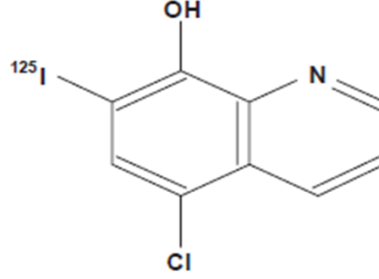
Şekil 2.11. PASA emülsiyon ile polimerizasyon mekanizması [141].

2.4. AH Tedavisinde Nanopartiküllerin Kullanımı

2.4.1. Kinolin Türevleri

Antibiyotik olarak tıpta çok fazla kullanılmakta olan kinolinler, malarya gibi birçok mikrobiyal hastalıkta etkilidir [150]. Kinolin türevi kliokinol (5-kloro-7-iyodo-hidroksikinolin) (KK) (Şekil 2.12), bir Cu/Zn şelatörüdür; *in vitro* ortamda plakları çözdüğü ve AH'na sahip transgenik farelerde A β birikimini inhibe ettiğı gösterilmiştir [151. 152]. *In vitro* çalışmalar, KK'nın, A β (1-40) birikintilerini Zn⁺² veya Cu⁺² ile çözdüğünü, fakat peptidi, pH 5.5'de yeniden çözünebilir hale getiremediğini ve β -tabaka formasyonuna indüklediğini göstermiştir. KK ile A β 'nın bağlanma etkileşimleri nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisinde incelenmiştir. A β (1-28), A β 'nın histidin içeren metal-bağlama parçasıdır. Bu sebeple spektroskopik çalışma için bu parça seçilmiştir. NMR'da KK'nın A β (1-28)'den Cu⁺² bağınyı kaldırdığı gösterilmiştir. NMR, KK'nın peptide değil histidin kalıntılarına bağlandığını kanıtlamıştır. Ayrıca postmortem beyin homojenatı KK ile

inkübe edilmiş ve KK varlığında A β (1-40) ve A β (1-42)'nin çözünmüş fazda serbest halde bulundukları gösterilmiştir [107, 153].



Şekil 2.12. Kliokinolün yapısı [141].

N-bütülsiyanoakrilat nanopartikülünde, KK polimerik matrikse enkapsüle edilmiş şekilde hazırlanmıştır (KK-NP) ve KK-NP'nin beyinde A β senil plakların görüntülenmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. APP ve APP/PS1 transgenik farelerde KBB'yi aşmak üzere hazırlanan mannitol içeren monokristal demir oksit nanopartikülleri A β (1–40) görüntülemesi yapılmıştır [154]. Diğer bir çalışmada ise KK-NP'nin KBB'yi serbest olarak geçtiği gösterilmiştir [152, 153]. KK-NP taşıma sisteminin AH'nın tedavisi için bir prototip olabileceği düşünülmektedir [141].

Roney ve diğerleri [141], değişik polimerizasyon teknikleri kullanarak hazırlanan nanopartiküllerin gelecekte A β plakların *in vivo* görüntülenmesinde kullanılması konusundaki çalışmalarını rapor etmişlerdir. PBSA nanopartikülleri, radyoaktif olarak işaretli ¹²⁵I-KK kinolin türevi ile yüklenmiş ve fareye intravenöz olarak uygulanmıştır. Nanopartiküllerin çok başarılı bir şekilde KBB'yi aştığı gösterilmiştir. ¹²⁵I-KK, beyin ve kandan temizlenerek, *in vivo* görüntülemeye uygun bir aday olduğunu göstermiştir.

2.4.2. ThT

Hidrofilik, yüklü ve fluoresan bir işaretleyici olan ThT, daha önce olgun A β plakların belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmıştır. Hartig ve diğerleri [155], kapsülle çevrilmiş ThT nanopartiküllerini (bütülsiyanoakrilat polimeri), enjeksiyonla doğrudan fare hipokampusu içine göndermişler ve devamında fikse edilmiş dokularda nanopartiküllerden ThT fotokonversiyonunu takip etmişlerdir. Fotokonversiyona uğratılmış nanopartiküller ışık mikroskopisiyle hipokampusün özelleşmiş bölgesi

olan dentate gyrus'da lokalize edilmiş ve sitoplazmada çökmüş lateks nanopartiküllerinin yakınında vakuoller görülmüştür. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile nanopartiküllerin, mikroglia ve nöronlardaki varlığı doğrulanmıştır. ThT lateks partiküllerinin, Aβ'nin hücre içi sentezini ve hücre dışı depozisyonunu işaretlemeye kullanılabileceği önerilmektedir [119]. ThT nanopartikülleri damardan uygulandığında da KBB'ni aşmaktadırlar [81].

2.4.3. D-Penisillamin

Beyindeki metal iyonlarının derişiminin yaşla birlikte arttığı; AH'na sahip beyinde letal etkilerin oluşmasına neden olduğu bilinmektedir. Özellikle bakır miktarındaki artış, ölümcül hidroksil radikallerinin üretimini artırarak DNA yapısını bozmakta, protein ve lipidleri modifiye etmektedir [120]. Amiloid plak oluşumu başlamış beyinde ($\sim 400 \mu\text{M Cu}^{+2}$; $\sim 1 \text{ mM Zn}^{+2}$), sağlıklı beyine ($70 \mu\text{M Cu}^{+2}$; $350 \mu\text{M Zn}^{+2}$) oranla Cu ve Zn seviyelerinin arttığı bilinmektedir. AH'nın olası tedavisi için tasarlanan *in vitro* şelasyon çalışmasında Cu(I) şelatörü D-penisillamin nanopartiküllere yüklenmiş (PDP-NP); ancak bazik koşullarda ve artmış sıcaklıkta muamele sonrasında plakların yaklaşık %40'nın çözöldüğü görölmüştür [109].

2.5. PLGA-b-PEG Nanopartikülleri

PLGA-b-PEG, poli(laktik-ko-glikolikasit)'e (PLGA) hidrofilik polietilenglikol (PEG) segmentinin eklenmesiyle oluşan bir blok kopolimeridir. Özellikle PEG içeren blok kopolimerlerin sulu ortamda spontan olarak oluşturdukları polimerik miseller sayesinde sahip oldukları biyouyumlulukları, dolaşımında uzun süre kalmaları ve toksik olmamaları nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler olarak büyük ilgi görmektedirler. PEG'lenmiş polimerik misellerin PEG kabukları, RES organları tarafından tanınmalarını önler. PEG kabukları sayesinde, kanda bulunan opsonik proteinler partikül yüzeyine adsorbe olamamakta ve bu şekilde RES organları tarafından tanınmayarak kanda kalış süresi uzatılmaktadır. Bu tür sistemler, "görünmez partiküller" olarak da isimlendirilmektedir. PEG, düşük toksisitesi ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından çeşitli şekillerde kullanımına izin verilmiş olması yönünden görünmez partiküller elde edilmesine çok uygundur [156]. Ayrıca blok kopolimerin kendi kendine oluşumu ile artan moleküler kütle, renal klerensi düşürerek, misellerin kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlar. Ayrıca PEG'lenmiş polimerik misellerin yüzeyine spesifik ligand

moleküllerinin takılması, hedef dokudaki spesifik ve gelişmiş hücresel alımı artırarak, gerekli etkin dozun ve yan etkilerin azaltılmasını sağlar. Ligand yüklenmiş ve PEG'lenmiş polimerik misellerin, hedeflenebilir ilaç ve gen taşıyıcıları olarak kullanılması umut vericidir [157].

PLGA-b-PEG kopolimerleri özellikleri nedeniyle ilaç taşınımında ve hedeflendirilmesinde, üzerinde en çok çalışılan polimer grubudur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Sodyum klorür (NaCl)	Merck & Co, Inc. Almanya
Potasyum klorür (KCl)	Merck & Co, Inc. Almanya
Disodyum hidrojenfosfat (Na_2HPO_4)	Merck & Co, Inc. Almanya
Potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	Merck & Co, Inc. Almanya
Di-potasyum hidrojenfosfat (KH_2PO_4)	Merck & Co, Inc. Almanya
Pluronic F68	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya
Asetonitril	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya
Amonyum (NH_4)	BDH Chemicals Ltd. İngiltere
Diklorometan	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya
R-(–)-Deprenil hidroklorür	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck & Co, Inc. Almanya
A β (1-40) peptit	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya
A β (1-42) peptit	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya
Ketalar	Pfizer, İsviçre
Ksilazin	Alfasan, Hollanda
Glisin	Merck & Co, Inc. Almanya
ThT	Sigma & Aldrich, Inc. Almanya

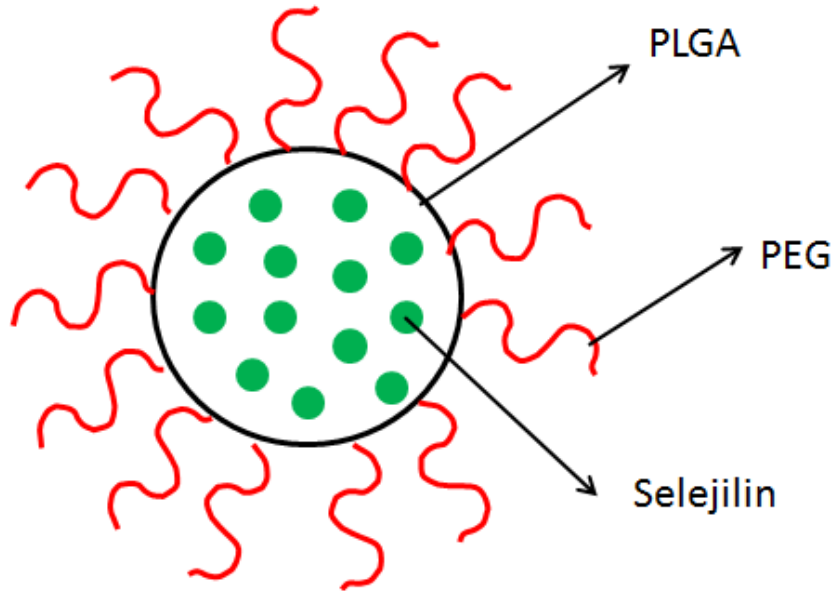
3.1.2. Cihazlar

Ultraturaks	PRO Scientific Inc. ABD
Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS, İngiltere
Santrifüj	Hettich, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Ika, Almanya
pH metre	Orion, ABD
Hassas Terazı	Mettler Toledo, ABD
Çalkalamalı inkübatör	Shel Lab, El Salvador
Spektrofıurımetre	RF-5301PC, Shimadzu, Japonya
Buz Makinesi	AF80, Scotsman, İtalya
Atomik Kuvvet Mikroskobu	Nanomagnetics Instruments, İngiltere
Geçirimli Elektron Mikroskobu	902, Zeiss, Almanya
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), pompası	P680, Dionex, Almanya
HPLC, otomatik örnek enjektörü	ASI-100, Dionex, Almanya
HPLC, Termostatlı kolon kompartmanı	TCC-100, Dionex, Almanya
HPLC, UV dedektörü	UVD340U, Dionex, Almanya
Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskobu	DR8101, Shimadzu, Japonya

3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.2.1. Çift Emülsiyon Yöntemi ile Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Hazırlanması

Selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri, çift emülsiyon yönteminin modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır [158]. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan PLGA-b-PEG-COOH polimeri, PLGA-COOH ve $\text{NH}_2\text{-PEG}_{3400}\text{-COOH}$ polimerleri kullanılarak Prof. Dr. Kezban Ulubayram (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı) ve grubu tarafından sentezlenmiştir [158]. İlk emülsiyon, diklorometan içerisindeki PLGA-b-PEG-COOH polimer çözeltisinin (20 mg/mL) 1 mL'sine, pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) içinde çözülmüş selejilin çözeltisinden (50 mg/mL) 100 µL lik kısmın damla damla eklenmesi ve ultraturaksla 15,000 rpm'de 1 dakika karıştırılması ile hazırlanmıştır. Emülsiyon daha sonra enjektör yardımı ile % 2'lik Pluronic F68 çözeltisine (a/a, 5 mL) damla damla eklenirken, ultraturaks ile 15,000 rpm'de 1 dakika karıştırılmıştır. Oluşturulan bu ikinci emülsiyon manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan % 0.5'lik (h/h) Pluronic F68 çözeltisine (50 mL) şırınga pompası yardımı ile eklenmiştir. Elde edilen emülsiyon, bir gece boyunca +4°C'de manyetik karıştırıcıda organik çözücünün uzaklaştırılması amacıyla karıştırılmıştır. Oluşan süspansiyon önce 2,800xg'de 5 dakika santrifüjlenerek makroagregatlardan kurtarılmış, daha sonra elde edilen nanopartikül süspansiyonu 20,000xg'de 20 dakika santrifüjlenerek oluşturulan nanopartiküller çöktürülmüştür. Daha sonra nanopartiküller 2 kez yıkanmış, yüklenmemiş selejilin ve yüzey aktif maddenin fazlası uzaklaştırılmıştır. Sentezlenen selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri Şekil 3.1'de şematize edilmiştir. Selejilin içermeyen nanopartiküller de kontrol amaçlı olarak aynı yöntem ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Sentezlenen selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin şematik gösterimi.

Etkin madde yükleme etkinliğinin saptanması amacıyla gerçekleştirilen deneylerde 100 mg/mL, 75 mg/mL ve 25 mg/mL selejilin içeren stok çözeltiler kullanılmıştır.

3.3. Nanopartiküllere yüklenen Selejilinin Miktar Tayini

3.3.1. Selejilin için Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

Selejilin miktar tayini Tzanavaras ve diğerleri [159] tarafından geliştirilen HPLC yönteminin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde mobil faz olarak 50:50 (h/h) Asetonitril/PBS (3.7mM KH_2PO_4 ve 4.4mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) kullanılmıştır. Analitik ayırım için Dionex C18 ters faz kolunu (250 x 4.6 mm; 5 μm) kullanılmış (25°C) ve selejilin deteksiyonu $\lambda=220$ nm'de gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 50 μL olarak ayarlanmıştır. Selejilinin su:asetonitril (h/h) şeklinde hazırlanan 1mg/mL derişimdeki stok çözeltisinden hareketle 0.1mg/mL derişimde ikinci çözelti hazırlanmış ve bu stoktan kullanılarak 8 farklı kalibrasyon noktası için gerekli seyreltmeler yapılmıştır (100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 $\mu\text{g/mL}$).

3.3.2. Selejilin Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Selejilin yüklem etkinliğinin belirlenmesi için nanopartikül hazırlama işlemi sırasında dış sulu fazda serbest halde bulunan selejilin miktarı tayin edilmiştir. Bu amaçla, selejilin yüklü nanopartiküller bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra nanopartikül süspansiyonu 20,000xg’de 15 dakika santrifüj edilerek üst fazdan örnekler alınmış ve bu örnekler 0,22 µm por açıklığına sahip filtreden süzölmüştür. Dış fazdaki selejilin derişimi bölüm 3.3.1’de özetlenen HPLC yöntemi ile tayin edilmiş, etkin madde yükleme etkinliği aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Etkin madde yükleme etkinliği (\%)} = \frac{K_1 - K_2}{K_1} \times 100$$

- K_1 : Nanopartikül formülasyonu hazırlanmasında kullanılan selejilin derişimi
- K_2 : Su fazında nanopartiküllere yüklenmeden kalan selejilin derişimi

3.3.3. Etkin Madde Salım Çalışmaları

Selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerden etkin madde salımının incelenmesinde “sink” koşulları sağlayacak şekilde 3 mg nanopartikül 1.5 mL PBS (pH 7.4) içerisinde dağıtılmıştır. Örnekler 37°C’de 110 rpm’e ayarlanmış çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu örneklerin önceden belirlenmiş zaman noktalarında üst fazları toplanarak 20,000xg’de santrifüj edilmiştir ve bölüm 3.3.1’de açıklanan HPLC yöntemi ile salınan etkin madde miktarı belirlenmiştir. Her zaman noktası için üst fazın tamamı alınmış ve aynı miktarda yeni PBS eklenerek bir sonraki zaman noktasına geçilmiştir. HPLC yöntemi ile hesaplanan etkin madde miktarları her zaman noktası için toplanarak salım profilleri elde edilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.4.1. Partikül Boyutu, Zeta Potansiyeli

Hazırlanan selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyel analizleri Malvern Zetasizer Nano-ZS partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel ölçümü için

kullanılan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı, bu potansiyeli ölçmek için süspansiyon boyunca bir elektriksel alan uygulamakta ve partiküllerin yüklerine bağlı olarak oluşan hareket hızlarını ölçerek hesaplama yapmaktadır [160].

3.4.2. Morfolojik analiz

Hazırlanmış nanopartiküllerin yüzeylerinin topografik görüntüleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak elde edilmiştir. Analiz esnasında nanopartiküller su içinde süspand edilerek mika plakalar üzerine damlatılmış ve azot gazı ile kurutulmuştur. AFM görüntülemesi dinamik modda (tapping mode), Buggetsensor Tap300-G model silikon uç kullanılarak (yarıçap < 10 nm) yapılmış; rezonans frekansı 300 kHz ve kuvvetsabiti 40 N/m olarak belirlenmiştir. Uç açısı kantilever boyunca 20°-25°, yanlardan 25°-30° ve tepeden 10° olarak ayarlanmıştır.

3.4.3. FT-IR Analizi

Hazırlanan selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin ve selejilinin yapı analizi FT-IR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Selejilin içeren ve içermeyen PLGA-b-PEG nanopartikülleri hazırlandıktan sonra 1 gün süre ile liyofilize edilerek kurutulmuştur. Daha sonra partiküller ve selejilin hidroklorür, ağırlıkça %1 olacak şekilde KBr ile karıştırılarak 10 tonluk pres yardımı ile incelemeye uygun hale getirilmiştir.

3.5. Aβ Fibrillerin Hazırlanışı

3.5.1. Aβ Peptid Örneklerinin Hazırlanması:

500µM Aβ (1-40) peptid %0.02 (h/h) soğuk amonyum çözeltisinde çözülüp vortekslenmiştir. 20µL lik kısım fibrillerin hazırlanması için inkübasyona bırakılmak üzere alınmış; kalan çözelti taze Aβ (1-40) peptid olarak -80°C de saklanmıştır.

500 µM Aβ (1-42) peptid %0.02 (h/h) soğuk amonyum çözeltisinde çözülüp vortekslenmiştir. 20µL lik kısım fibrillerin hazırlanması için inkübasyona bırakılmak üzere alınmış; kalan çözelti taze Aβ (1-42) peptid olarak -80°C de saklanmıştır [161, 162].

3.5.2. Fibrillerin Hazırlanması

A β (1-40) fibril sentezinde 50 μ M taze A β (1-40), 100 mM NaCl, 50 mM PBS (pH=7.5) birleştirilmiş ve 2400 μ L'lik reaksiyon karışımı oluşturulmuş ve 37 °C de inkubasyona bırakılmıştır. Karışım, 20 μ L A β (1-40), 240 μ L NaCl ve 1200 μ L PBS içermektedir.

A β (1-42) fibril sentezinde 50 μ M taze A β (1-42), 100 mM NaCl, 50 mM PBS (pH=7.5) birleştirilmiş ve 2400 μ L'lik reaksiyon karışımı oluşturulmuş ve 37 °C de inkubasyona bırakılmıştır. Karışım, 20 μ L A β (1-42), 240 μ L NaCl ve 1200 μ L PBS içermektedir [161, 162].

3.5.3. A β (1-40) Fibrilin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu

Hazırlanan 50 μ M A β fibril (1-40), farklı derişimlerde (20 nM, 40 nM, 60 nM ve 100 nM) selejilin içeren nanopartikül süspansiyonları ile 100 mM NaCl, 50 mM PBS (pH=7.5) içeren 500 μ L'lik reaksiyon ortamında, 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında belirli zaman noktalarında karışımdan örnek alınarak ThT floresans şiddeti ölçülmüştür.

3.5.4. A β (1-42) Fibrilin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu

Hazırlanan 50 μ M A β fibril (1-40), farklı derişimlerde (20 nM, 40 nM, 60 nM ve 100 nM) selejilin içeren nanopartikül süspansiyonları ile 100 mM NaCl, 50 mM PBS (pH=7.5) içeren 500 μ L'lik reaksiyon ortamında, 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında belirli zaman noktalarında karışımdan örnek alınarak ThT floresans şiddeti ölçülmüştür.

3.5.5. ThT Floresans Ölçümü

Fibril oluşumu ve oluşumun selejilin içeren nanopartiküllerle inhibisyonu ThT floresans ölçümü ile takip edilmiştir. Reaksiyon ortamından 100 μ L'lik örnekler alınarak 0. dakikada eksitasyon ve emisyon spektrumları taranmıştır. eksitasyon=448 nm ve emisyon=490 nm olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamından sırasıyla 0, 2, 4 ve 6. saatlerde örnekler alınarak belirtilen eksitasyon

ve emisyon dalga boylarında ThT floresans şiddeti ölçülmüştür [163]. Floresans şiddetindeki azalma, fibril oluşumunun inhibiyonu ile doğru orantılıdır.

3.5.6. Aβ (1-40) Fibrilin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnhibisyonuna İlişkin AFM ve TEM Analizleri

Analiz esnasında nanopartiküller su içinde süspanse edilerek mika plakalar üzerine damlatılmış ve azot gazı ile kurutulmuştur. AFM görüntülemesi dinamik modda (tapping mode), Buggetsensor Tap300-G model silikon uç kullanılarak (yarıçap < 10 nm) yapılmış; rezonans frekansı 300 kHz ve kuvvetsabiti 40 N/m olarak belirlenmiştir. Uç açısı kantilever boyunca 20°-25°, yanlardan 25°-30° ve tepeden 10° olarak ayarlanmıştır.

TEM görüntülemesinde Amiloid fibriller, 10 defa içinde hazırlandıkları tampon ile seyreltilmiş; bakır bölmede karbon kaplı Formvar'ın üzerine 15 µL olacak şekilde eklenmiş ve 4 dakika beklenmiştir. Bölme daha sonra iki defa distile su ile yıkanmıştır ve örnekler 1 dakika boyunca %1 uranil asetat ile işaretlenmiştir. Kurutulmuş örnekler 80 kV ve 50 000x büyütmede analiz edilmiştir.

3.6. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Sıçanlara Uygulanması; Beyin Dokusunda Selejilin Tayini

Hayvan deneyleri, Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izine (2009/52-1) dayanılarak ve Helsinki kriterleri göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 250-300 g ağırlığında Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır.

Deney grupları:

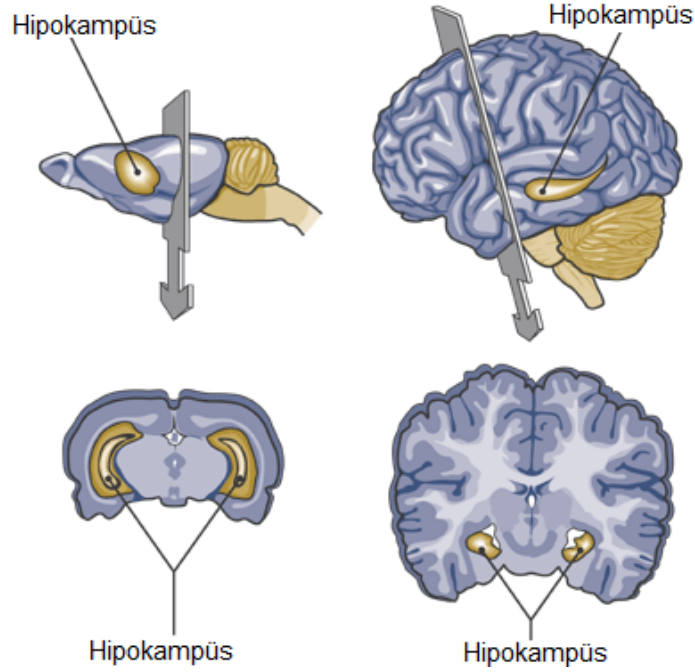
Kontrol grubu: 1 mL taşıyıcı (PBS, pH 7.4) enjekte edilmiştir

Çalışma Grubu 1: 1 mL 10 µg selejilin yüklenmiş nanopartikül çözeltisi (8 mg nanopartikül/mL) enjekte edilmiştir

Çalışma Grubu 2: Selejilin (10 µg/mL) enjekte edilmiştir

Karışımlar, sıçan kaudal venine intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu takiben sıçanlar 1 ve 2. saatlerde ketamin (300 mg/kg) ve ksilazin (30 mg/kg) uygulanarak giyotin ile öldürülmüş ve beyinleri çıkartılıp, hipokampus ve korteks olarak ayrılmış (Şekil 3.2), PBS (pH 7.4) içerisinde homojenize edilmiştir.

Homojenat 4°C'de 15 dakika 2,800xg'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant (500 µl) 500 µl metanol ile karıştırılıp buzdolabında 1 saat bekletilmiştir [161]. Bu karışım tekrar 2,800xg'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve 50 µl süpernatantta bölüm 3.3.1'de detaylandırılan HPLC yöntemi ile selejilin miktar tayini yapılmıştır.



Şekil 3.2. Sıçan beyinde hipokampüsün şematik gösterimi [164].

3.7.İstatistiksel Analizler

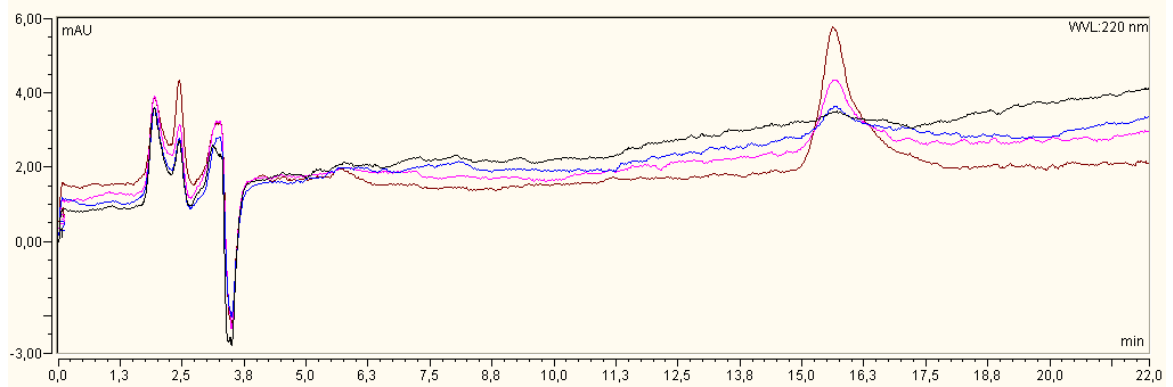
İstatistiksel analizler Windows için üretilmiş GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farkın analizi, t-testi ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmış, değerler ortalama±SH olarak ifade edilmiş, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

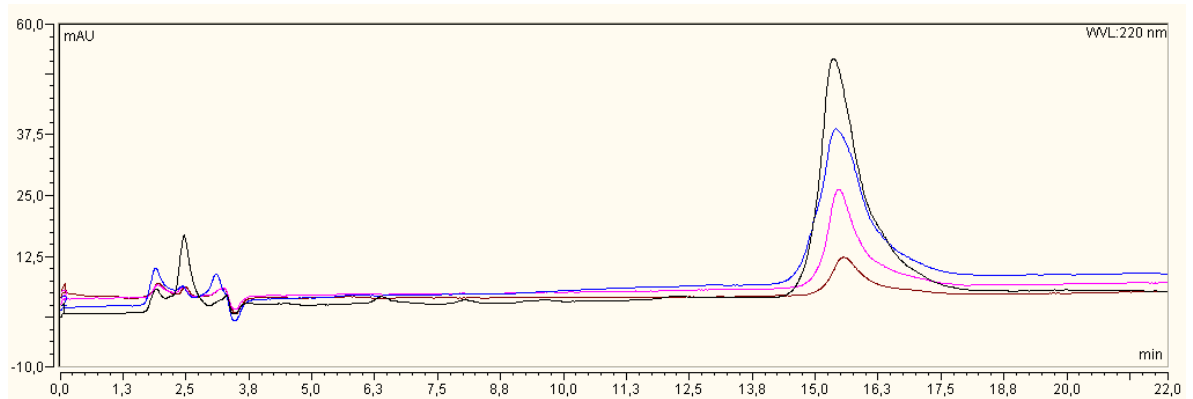
Bu çalışma kapsamında ampifilik blok bir kopolimer olan PLGA-b-PEG nanopartikülleri hazırlanmış, partiküllere selejilin yüklenmiştir. Hazırlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin, hazırlanan amiloid fibrilleri (A β (1-40) ve A β (1-42)) destabilize edici etkisi *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Ayrıca bu nanopartiküllerin KBB'yi aştığı; beyinin korteks ve hipokampus bölgelerine dağıldığı *in vivo* deneylerle ispatlanmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.1. Selejilin HPLC Yöntemi ile *İn Vitro* Miktar Tayini

Selejilin *in vitro* miktar tayini bölüm 3.2.1'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ selejilin içeren standartlara ait HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir. Pikler miktar tayinine olanak verecek şekilde simetrik olup pik alanları cihaz tarafından otomatik hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. 0.5, 1, 2.5 ve 5 $\mu\text{g/mL}$ selejilin içeren standarta ait kromatogram



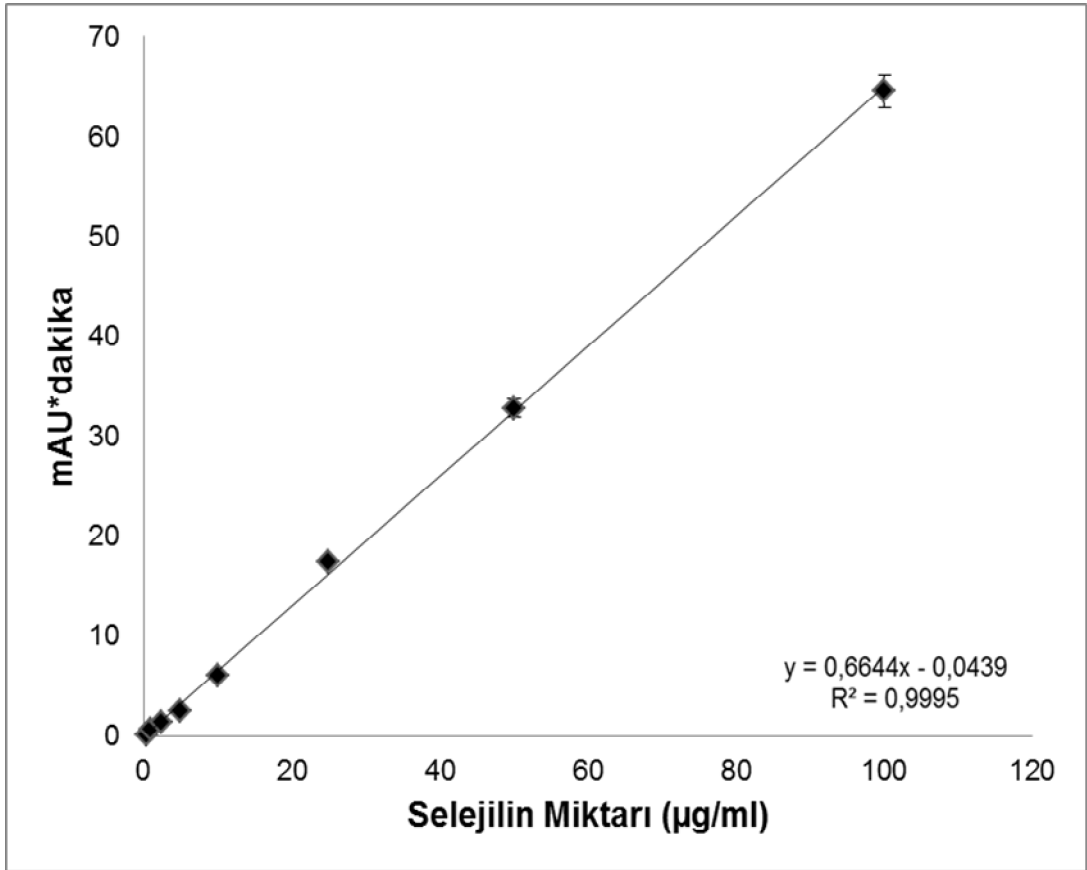
Şekil 4.2. 10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ selejilin içeren standarta ait kromatogram

Selejilinin *in vitro* miktar tayini için kalibrasyon eğrisi hazırlanırken 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL selejilin içeren standart çözeltiler kullanılmıştır. Selejiline ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

4.2. Selejilin Miktar Tayininde Kullanılan HPLC Yönteminin Validasyonu

4.2.1. Doğrusallık

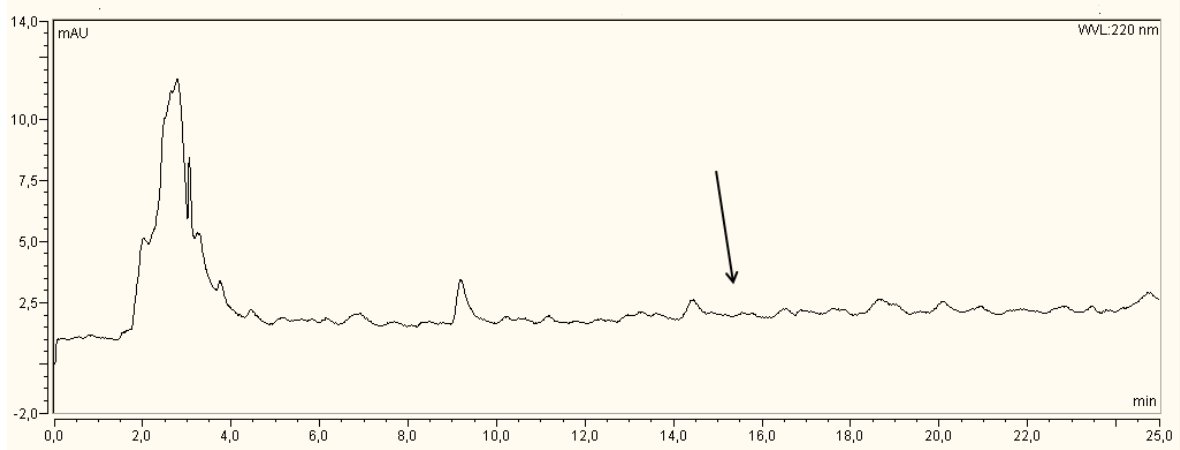
200 µg/mL derişimde hazırlanan selejilin ana stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL selejilin içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu standart çözeltilere ait kromatogramlardan elde edilen piklerin alanları hesaplanmıştır. Derişimine karşı pik alanları grafiklenip, regresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Doğruluk tanımlayıcı regresyon katsayısı ($R^2=0.9995$) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Selejiline ait kalibrasyon eğrisi

4.2.2. Özgüllük

Boş nanopartiküllerin HPLC kromotogramları alınmıştır (Şekil 4.4). Selejilin'in tayin bölgesinde özgüllüğü bozacak başka bir sinyalin olmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla Selejilin miktar tayinini bozacak, engelleyecek veya yöntemle girişim yapacak herhangi bir sinyal söz konusu değildir.



Şekil 4.4. Boş nanopartiküllere ait kromotogram

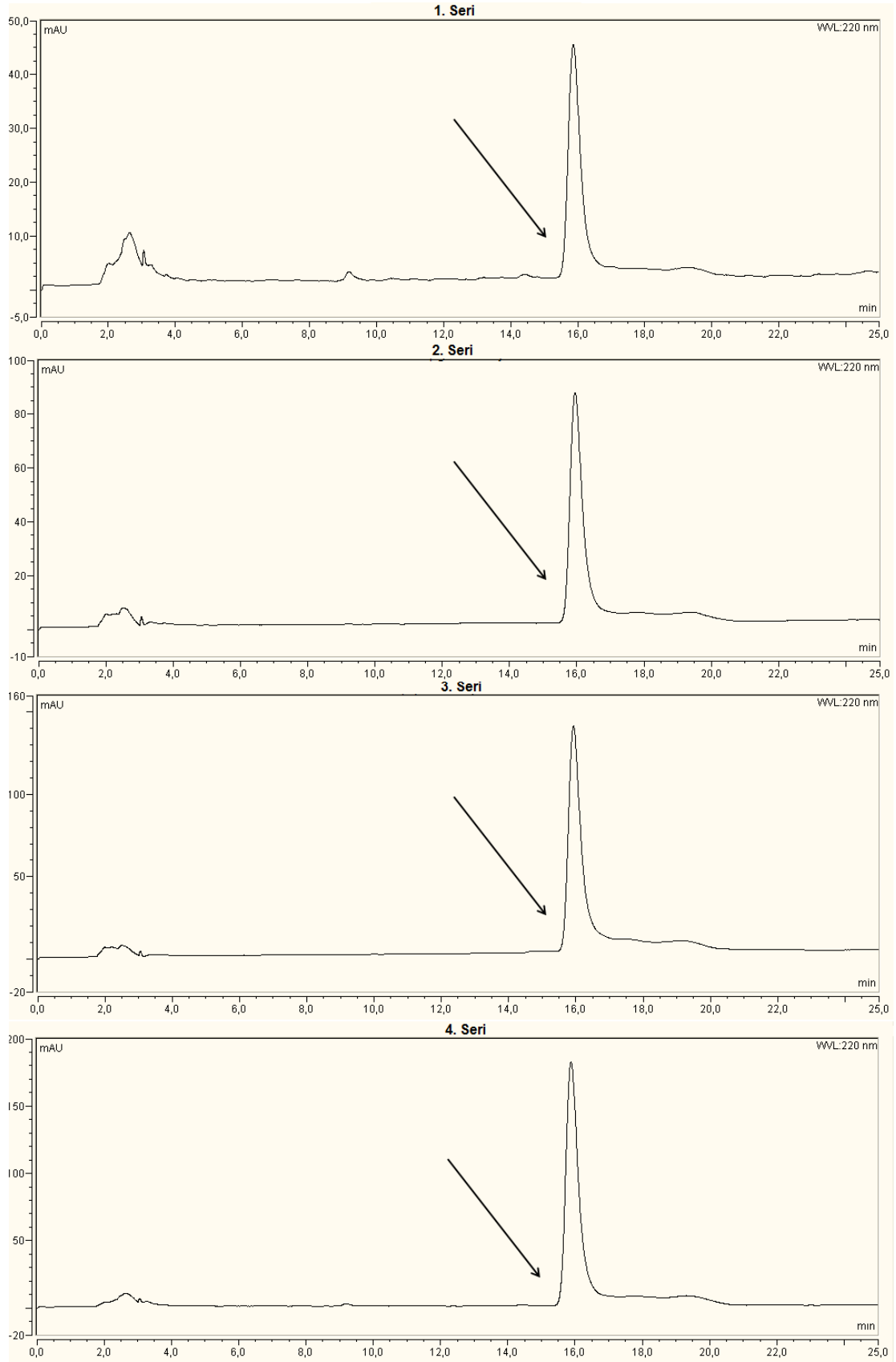
4.3. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin *In Vitro* Yüklenme Verimliliğinin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.1'de açıklanan yöntemle göre hazırlanmış, farklı derişimlerde selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin yüklenme verimliliğine ilişkin veriler çizelge 4.1'de sunulmuştur (n=6). Buna göre yükleme verimliliği en yüksek olan seri, 5 mg selejilin ile hazırlanan 2 numaralı seri olduğundan, tez kapsamındaki *in vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan nanopartiküllerde bu derişim benimsenmiştir. Farklı selejilin derişimleri kullanılarak hazırlanmış PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin dış faz kromotogramları Şekil 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Nanopartiküllere selejilin yükleme etkinliği*

Nanopartikül formülasyonu	Nanopartiküllere yüklenmek üzere tartılan selejilin miktarı (mg)	Nanopartiküllerde tayin edilen selejilin miktarı (µg)	Etkin madde yükleme verimliliği (%)
1	2.50	4.92±3.44	11.70
2	5.00	12.57±3.01	13.00
3	7.50	4.92±0.58	3.30
4	10.00	7.37±2.88	5.20

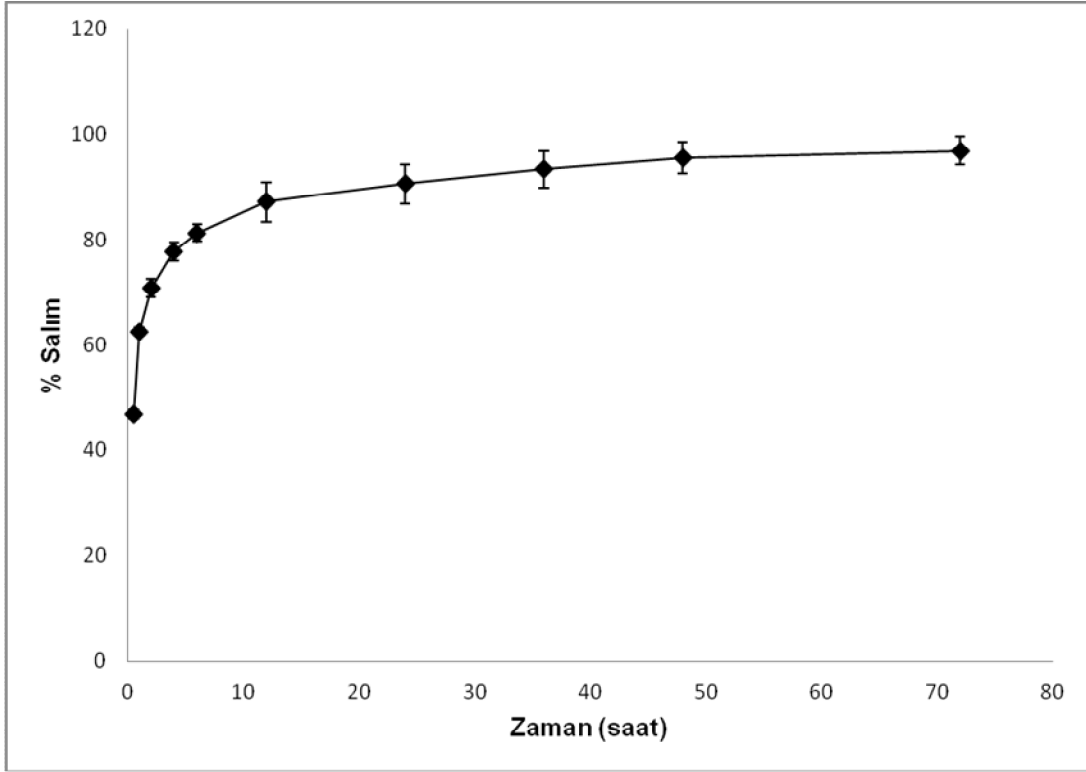
*Değerler, 6 bağımsız ölçümün ortalama±SH'sı olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı derişimlerde selejilin kullanılarak hazırlanmış nanopartiküllerin dış faz kromotogramları

4.4. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin *In Vitro* Etkin Madde Salım Çalışmaları

Selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin *in vitro* etkin madde salım çalışmaları, farklı zaman dilimlerinde (30. dakika, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72. Saat) % salınan etkin madde miktarının ölçülmesiyle (n=3) gerçekleştirilmiştir. Etkin madde salım grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan nanopartiküller içerdikleri selejilinin % 70'ini ilk 2 saat içinde salmışlardır. Bu hızlı salımın patlama etkisi olarak bilinen (burst effect) etkiden kaynaklandığı ve nanopartikül yüzeyinde adsorplanmış selejilinin aniden salıveriş sonucu ortaya çıktığı düşünülmüştür. 10. Saatten sonra salımın platoya ulaşması, ilacın nanopartiküllerden kontrollü olarak salındığını göstermektedir.



Şekil 4.6. Selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerin *in vitro* salım grafiği

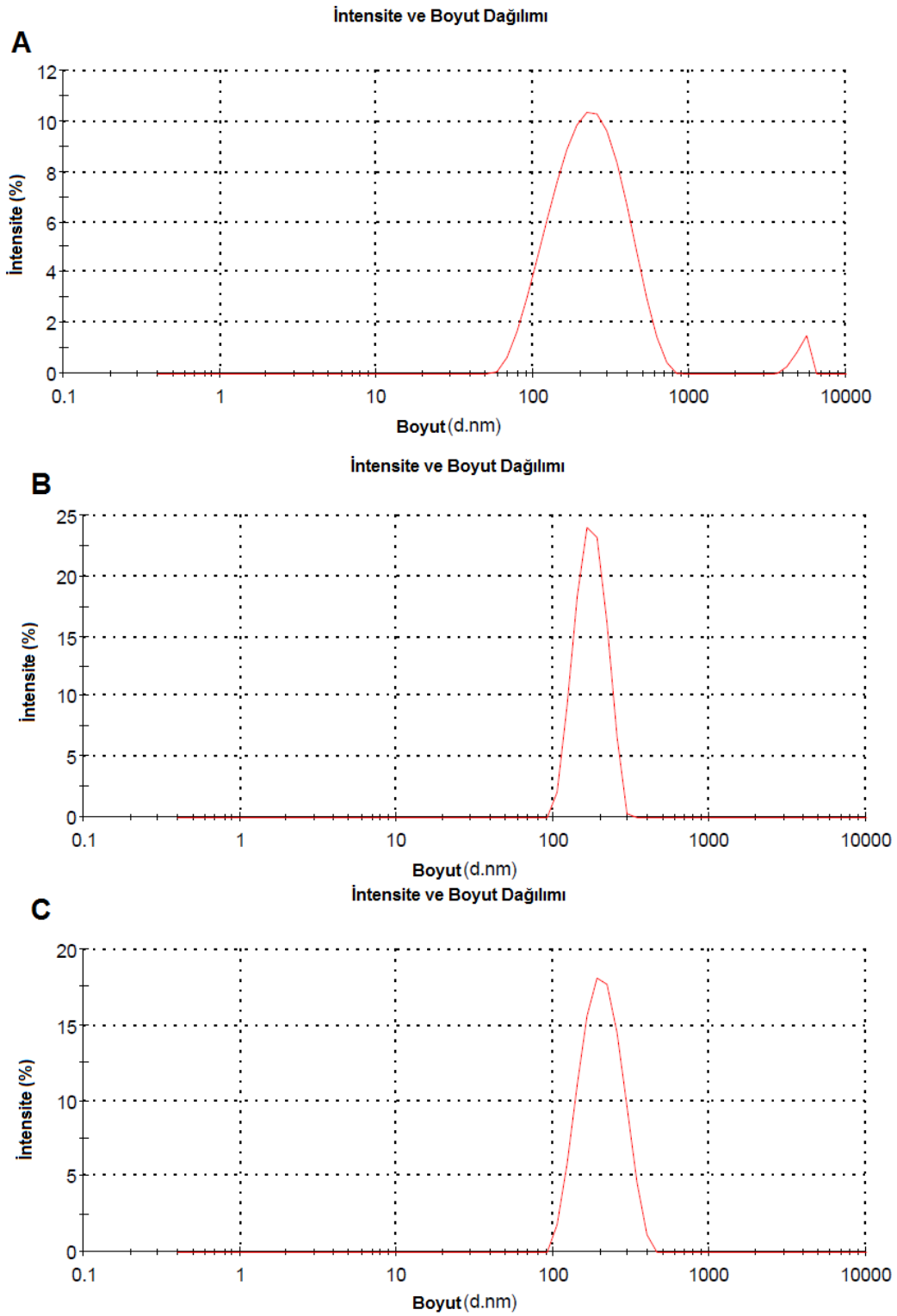
4.5. Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Boyut Analizi, Zeta Potansiyeli ve Polidispersitesi

Bu çalışmada amfifilik blok bir kopolimer olan PLGA-b-PEG'in farklı selejilin derişimleri ile nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve hazırlanan nanopartiküllerin boyut analizleri, zeta potansiyelleri ve polidispersite indeksleri standart sapmaları ile beraber hesaplanarak çizelge 4.2'de verilmiştir (n=6). Değişik derişimlerde selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonlarının ortalama boyutlarının 210-250 nm aralığında olduğu Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı ile saptanmıştır. Polidispersite indekslerinin düşük olması (~0.3), selejilin içeren nanopartiküllerde agregasyon bulunmadığı ve dar bir boyut dağılım aralığına sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 4.7). Nanopartiküllerin, mikropartiküler yapılarla kıyasla intravenöz kullanıma daha uygun olduğu bilinmektedir. Vücuttaki en küçük kapillerler 5-6 µm çapındadır. Kan dolaşımına girecek olan partiküllerin emboliye neden olmamaları için 5 µm'den küçük olmaları ve agregat oluşturmamaları gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen nanopartikül büyüklükleri, intravenöz kullanım için uygundur. Zeta potansiyeli yüzey yükünü karakterize etmek için kullanılır ve bu değer partiküllerin agregasyona karşı olan eğilimlerinin bir göstergesidir. Genellikle nanopartiküllerden kararlı süspansiyonlar hazırlamak için zeta potansiyellerinin ± 30 mV'un üzerinde olması istenir. Hazırlanan selejilin yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin yaklaşık -35 mV olması bu nanopartikül süspansiyonlarının kararlı olduklarını ve agregasyona eğilimli olmadıklarını göstermektedir.

Çizelge 4.2. Nanopartiküllerin ortalama boyutları, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri*

Nanopartikül formülasyonu	Ortalama boyutları (nm)	Polidispersite indeksleri (PDI)	Zeta potansiyel (mV)
1	236.00 $\pm$ 12.01	0.331 $\pm$ 0.230	-38.00 $\pm$ 1.40
2	217.00 $\pm$ 15.50	0.321 $\pm$ 0.036	-34.80 $\pm$ 0.28
3	246.30 $\pm$ 47.60	0.295 $\pm$ 0.075	-34.70 $\pm$ 4.24

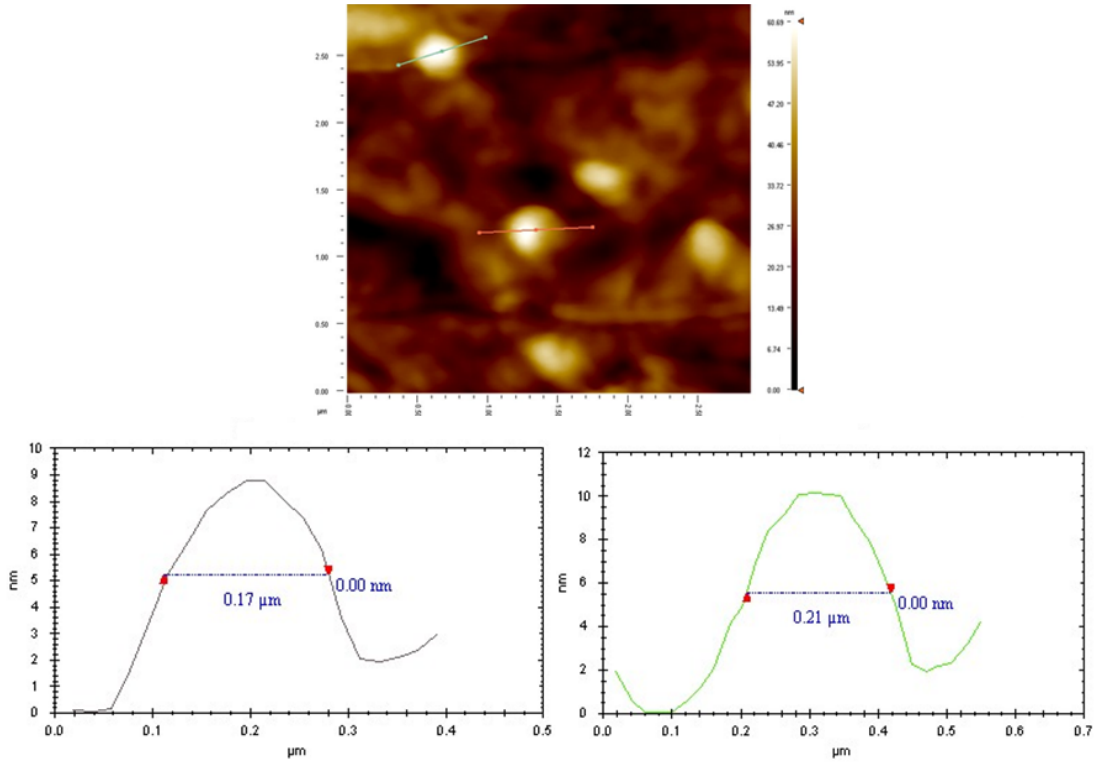
*Değerler, 6 bağımsız ölçümün ortalama $\pm$ SH'sı olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.7. Selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizi A) 7.5 mg selejilin ile hazırlanan 3 numaralı nanopartikül formülasyonu B) 2.5 mg selejilin ile hazırlanan 1 numaralı nanopartikül formülasyonu, C) 5.0 mg selejilin ile hazırlanan 2 numaralı nanopartikül formülasyonu.

4.6. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Morfolojisi

Selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri ve AFM ile elde edilen partikül boyut dağılımları Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Nanopartiküllerin küresel simetriye sahip oldukları ve düzgün formda olduğu görülmüştür (Şekil 4.8.). AFM analizi sonucunda elde edilen partikül boyut dağılımı (170-210 nm) ile önceden gerçekleştirilen boyut analizi sonuçlarının (210-250 nm) birbiri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.



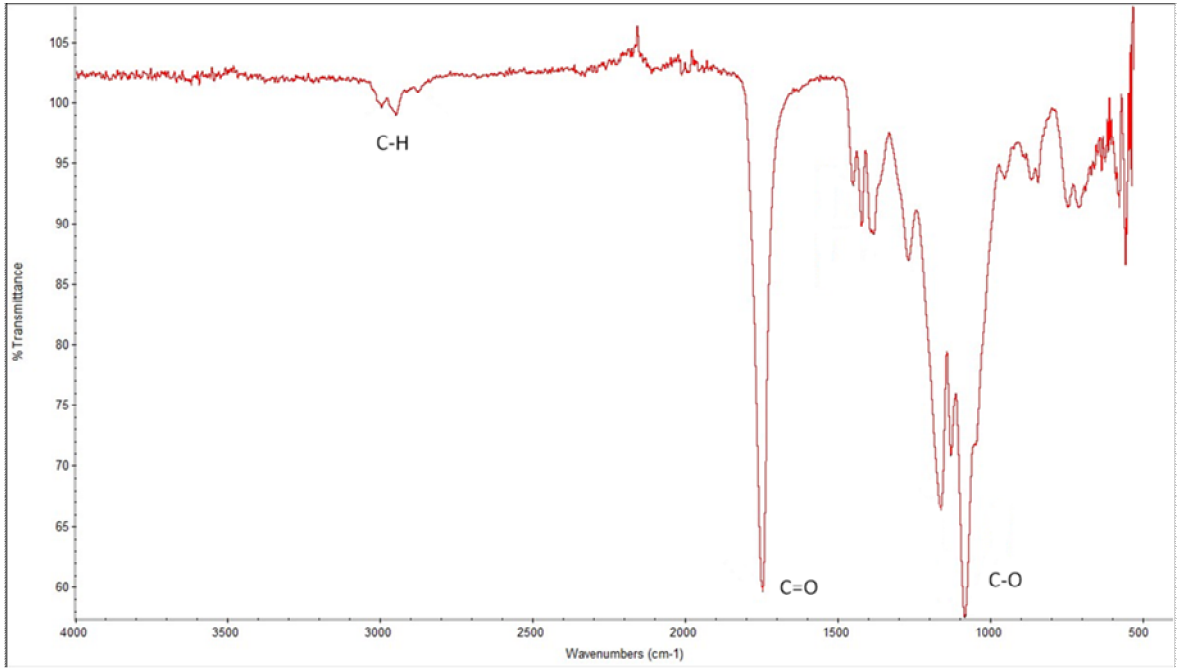
Şekil 4.8. Selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüsü ve AFM ile elde edilen partikül boyut dağılımı

4.7. FT-IR Analizi

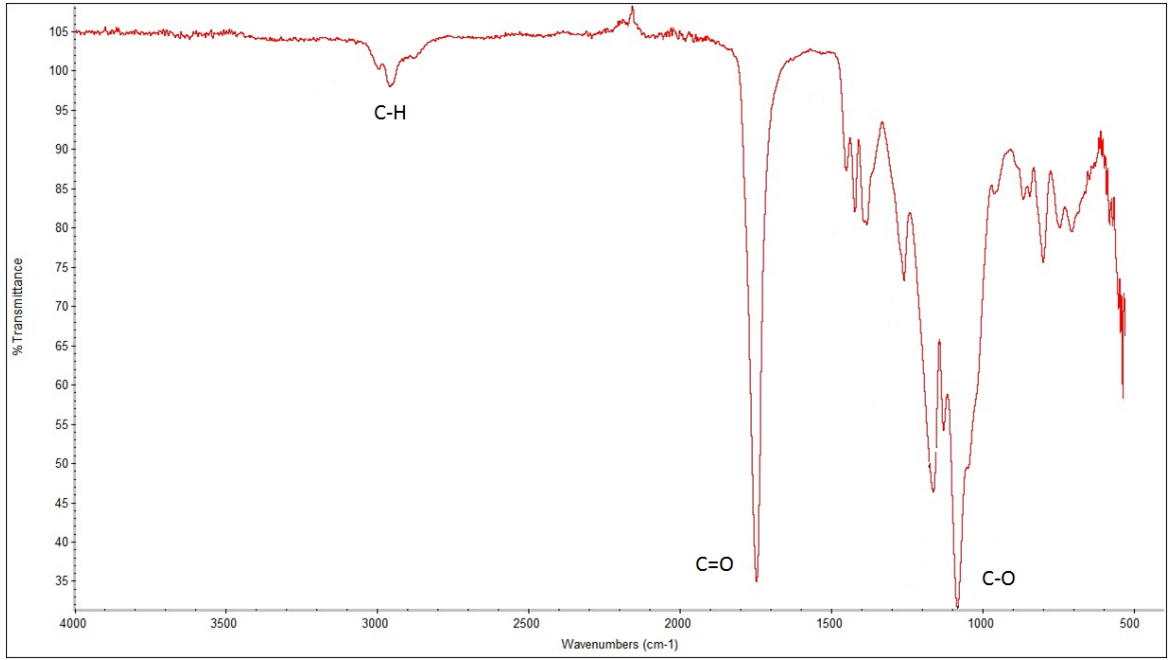
Hazırlanan boş ve selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin FT-IR analizi sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu analizler sonucunda PLGA-b-PEG nanopartikülleri için 3500 cm^{-1} 'deki geniş pik –OH grubu gerilmesine, $2900\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pik CH_2 ve CH_3 'e ait C-H gerilmesine ve 1750 cm^{-1} 'deki pik, C=O gerilmesine aittir. 1300 cm^{-1} ve $1090\text{--}1170\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler ise sırasıyla karboksilik asite ait C-O gerilmesine ve ester grubuna ait C-O gerilmesine aittir.

Selejiline ait FT-IR analiz sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir. Selejiline ait FT-IR spektrumu incelendiğinde 3200 cm^{-1} 'de görülen pik N-H gerilmesine, 2800-3000 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler CH_3 'e ait C-H gerilmesine, 2100 cm^{-1} 'deki pik $\text{C}\equiv\text{C}$ gerilmesine, 1600 cm^{-1} 'deki pik NH_2 eğilmesine, 750-690 cm^{-1} 'deki pikler fenil C-H eğilmesine aittir.

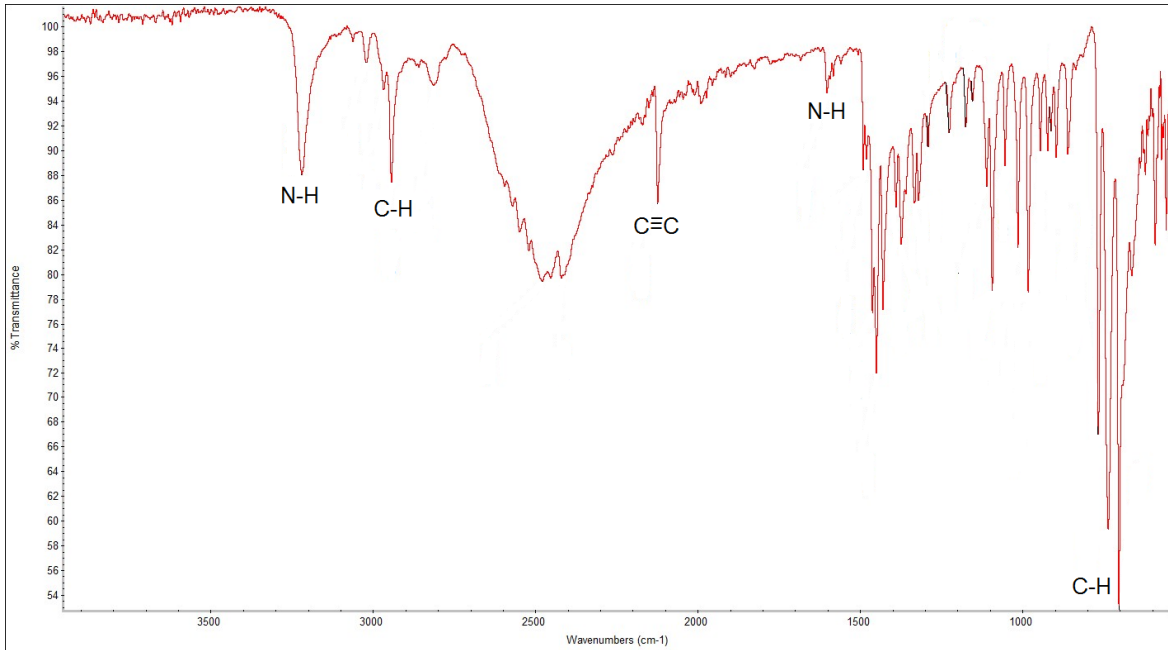
FT-IR analizi sonuçlarında boş nanopartikül, selejilin yüklü nanopartikül ve selejiline ait kromatogramlar karşılaştırıldığında nanopartiküller selejilinle yüklenmemiş gibi görünüyorsa da nanopartiküllerin içlerine hapsedilen selejilin derişimi çok düşük olduğundan FT-IR sonuçlarında gözlemlenememiş olabilir.



Şekil 4.9. Boş PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin FT-IR analizi



Şekil 4.10. Selejilin yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin FT-IR analizi

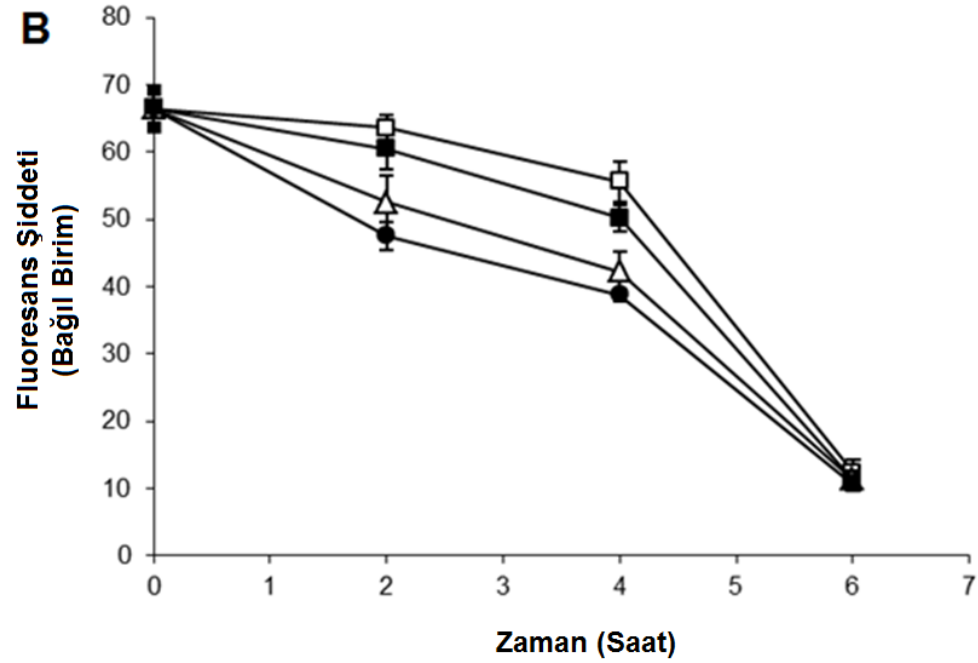
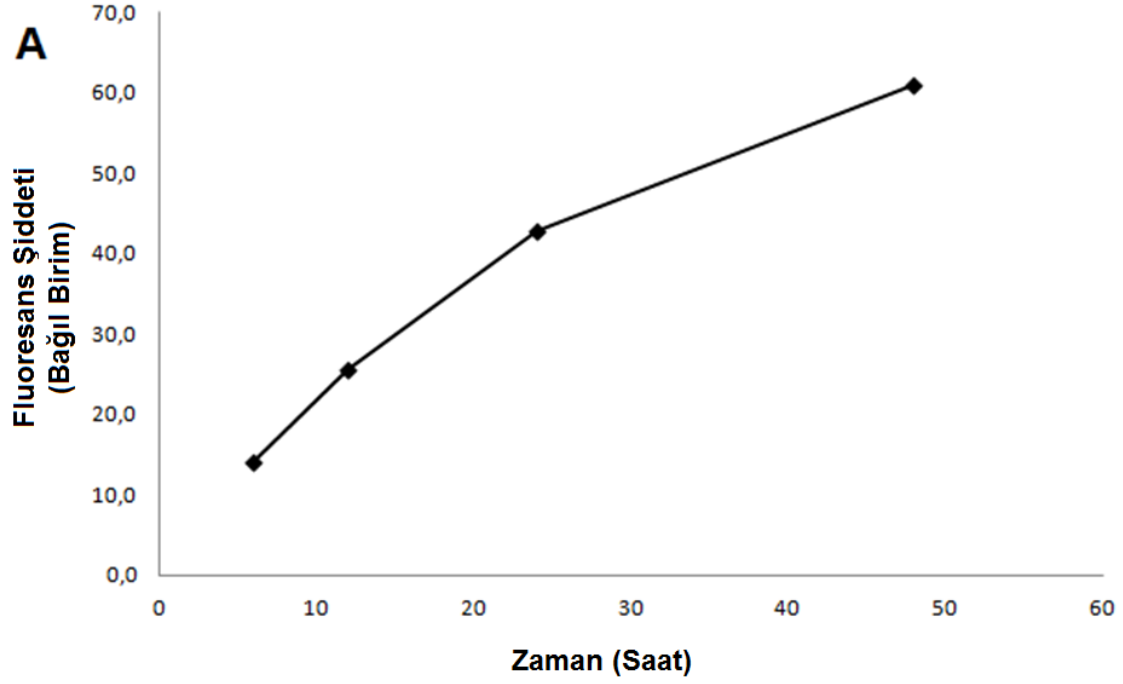


Şekil 4.11. Selejilin FT-IR analizi

4.8. A β (1-40) Fibrilinin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu

A β (1-40) fibrilleri *in vitro* koşullarda bölüm 3.4.2'de belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Fibril oluşumuna ait ThT floresans şiddetindeki artışı gösteren grafik Şekil 4.12'de sunulmuştur.

Bu fibriller ile farklı derişimlerde selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartikülleri (20 nM, 40 nM, 60 nM ve 100 nM) bölüm 3.4.3'de belirtilen yöntem doğrultusunda inkübe edilmiş; inkübasyon sırasında 0, 2, 4, 6. saatlerde örnekler alınmış ve inhibisyon bölüm 3.4.5'de belirtilen ThT fuloresans ölçümü ile izlenmiştir. Fibriller, selejilin ile de aynı koşullarda inkübe edilmiş; alınan örneklerde olası inhibisyon ThT floresans ölçümü ile izlenmiştir (grafik burada verilmemiştir). Selejilinin A β (1-40) fibrillerini *in vitro* koşullarda destabilize edici etkisi ile selejilin yüklü nanopartiküllerin aynı fibrilleri *in vitro* koşullarda destabilize edici etkileri karşılaştırılmış, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

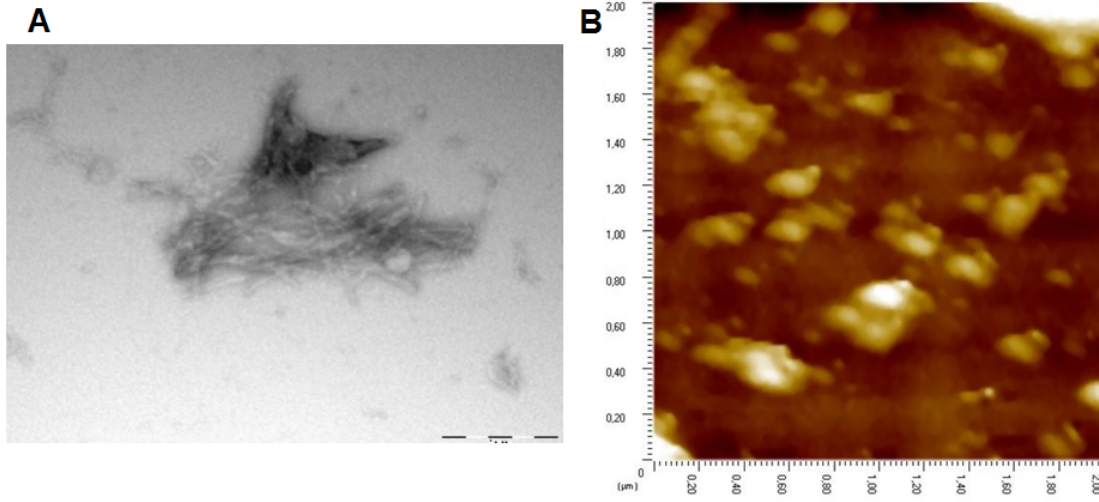


Şekil 4.12. A) A β (1-40) fibrilinin oluşumunu gösteren grafik

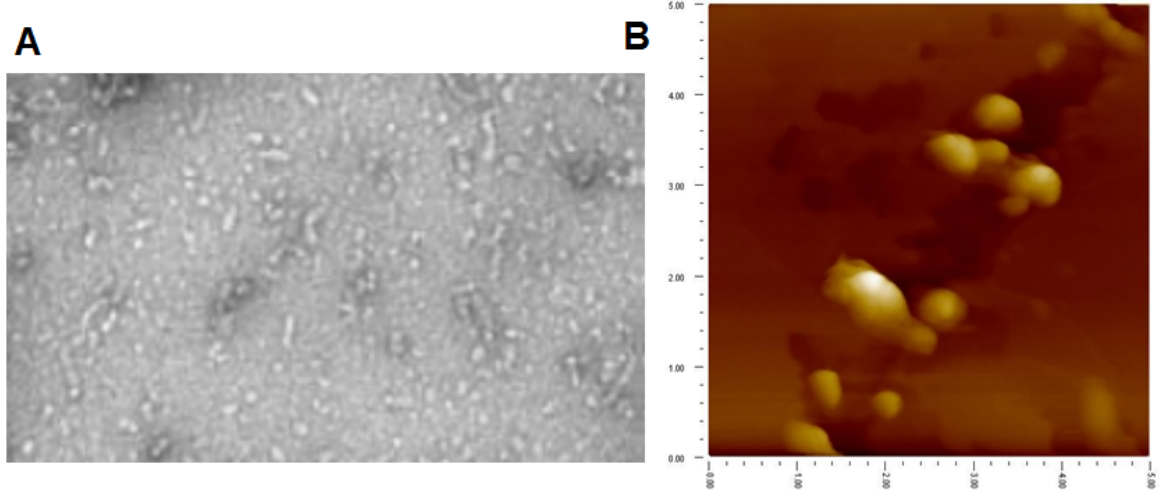
B) A β (1-40) fibrilinin belirli derişimlerde selejilin yüklü nanopartiküller ile inhibisyonu sonucu elde edilen grafik (□) 20nM selejilin içeren nanopartikül, (■) 40nM selejilin içeren nanopartikül, (△) 60nM selejilin içeren nanopartikül, (●) 100nM selejilin içeren nanopartikül

4.8.1. A β (1-40) Fibrilinin Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikülleri ile İnkübasyonuna İlişkin Morfolojik Analiz

İn vitro koşullarda oluşturulmuş A β (1-40) fibrillerinin AFM ve TEM görüntüleri Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Fibriller ile selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerin inkübasyonu sonucunda fibrillerde meydana gelen destabilizasyona ve/veya parçalanmaya ait AFM ve TEM görüntüleri Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.13. A β (1-40) fibrillerinin (A) TEM ve (B) AFM görüntüleri

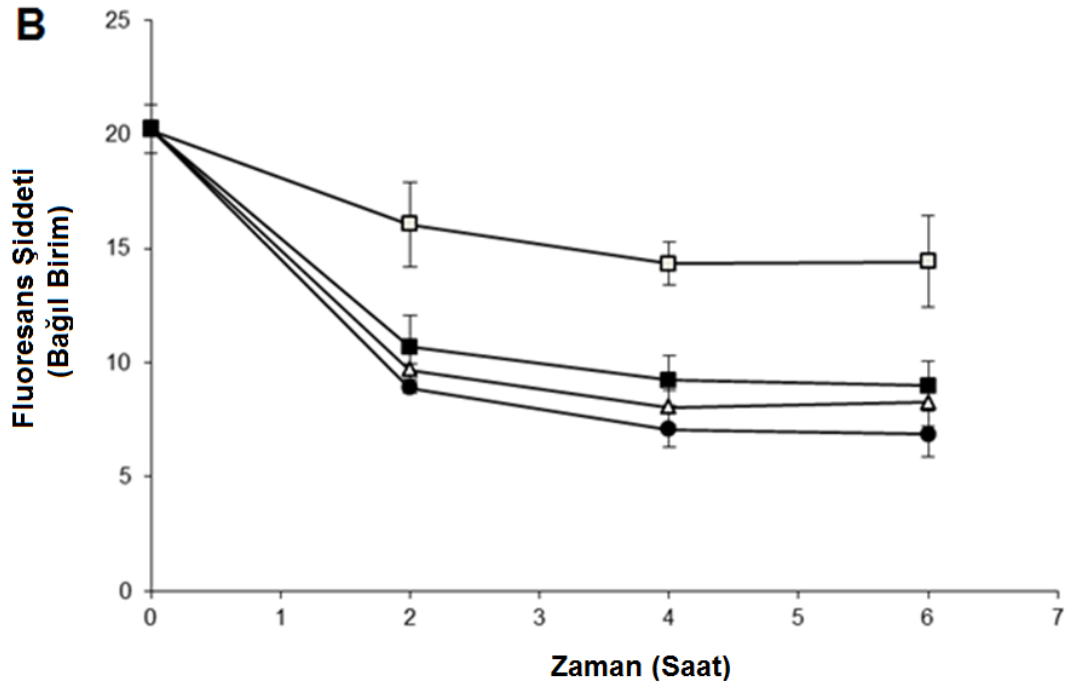
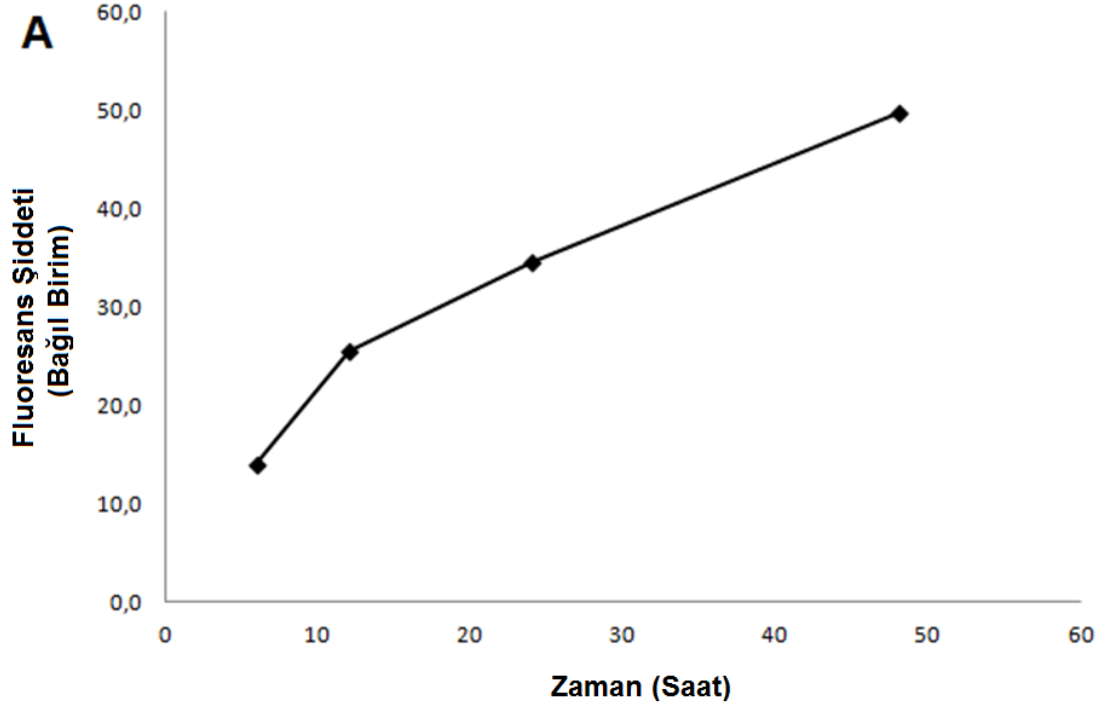


Şekil 4.14. A β (1-40) fibriller ile inkübe edilmiş selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartikülleri ile fibrillerde meydana gelen destabilizasyona ait (A) TEM ve (B) AFM görüntüleri

4.9. A β (1-42) Fibrilinin Selejilin Yüklü Nanopartiküller ile İnkübasyonu

A β (1-42) fibrilleri, *in vitro* koşullarda bölüm 3.4.2’de belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Fibril oluşumuna ait ThT floresans şiddetindeki artışı gösteren grafik Şekil 4.15’de sunulmuştur. Bu fibriller ile farklı derişimlerde selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartikülleri (20 nM, 40 nM, 60 nM ve 100 nM) bölüm 3.4.4’de belirtilen yöntem kullanılarak inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sırasında 0, 2, 4, 6. saatlerde örnekler alınmış ve nanopartiküllerin fibrilleri destabilize etme yetenekleri floresans şiddetindeki azalma ile izlenmiştir. İnhibisyona ilişkin grafik, Şekil 4.15’de gösterilmiştir.

İnkübasyon selejilin ile de gerçekleştirilmiş olup (grafik verilmemiştir) selejilin yüklü nanopartiküller ile selejilinin A β (1-42) fibrillerini *in vitro* koşullarda destabilize edici etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Şekil 4.15. A) A β (1-42) fibrilinin oluşumuna ait grafik.

B) A β (1-42) fibrilinin belirli derişimlerde selejilin yüklü nanopartiküller ile inhibisyonuna ait grafik (□) 20nM selejilin içeren nanopartikül, (■) 40nM selejilin içeren nanopartikül, (△) 60nM selejilin içeren nanopartikül, (●) 100nM selejilin içeren nanopartikül

4.10. *İn vivo* Koşullarda Sıçana Selejilin Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin ve Tek Başına Selejilin uygulamasını takiben Korteks ve Hipokampüsteki Selejilin Derişiminin Belirlenmesi

Çalışma grupları: kontrol grubu, çalışma grubu 1 (sadece selejilin enjekte edilmiştir) , çalışma grubu 2 (10 µg selejilin içeren PLGA-b-PEG nanopartiküller enjekte edilmiştir) olarak belirlenmiş ve kaudal venden yapılan enjeksiyonunu takiben beyinlerin korteks ve hipokampus bölgeleri izole edilmiş; doku homojenatlarında selejilin miktar tayini yapılmıştır. (Bölüm 3.6). Kontrol grubuna ait beyin dokularında selejilin saptanmadığından, bu gruba ait sonuçlar burada gösterilmemiştir.

Çalışma Grubu 1'den enjeksiyonu takiben 1. ve 2. saatlerde çıkarılan beyinlerin korteks ve hipokampus bölgelerindeki selejilin derişimlerine ilişkin kromotogramlar Şekil 4.16 ve 4.17'de; Çalışma grubu 2'den enjeksiyonu takiben 1. ve 2. saatlerde çıkarılan beyinlerden korteks ve hipokampus bölgelerindeki selejilin derişimine ilişkin kromotogramlar ise Şekil 4.18 ve 4.19'da sunulmuştur. Toplu sonuçlar çizelge 4.3'de özetlenmiştir.

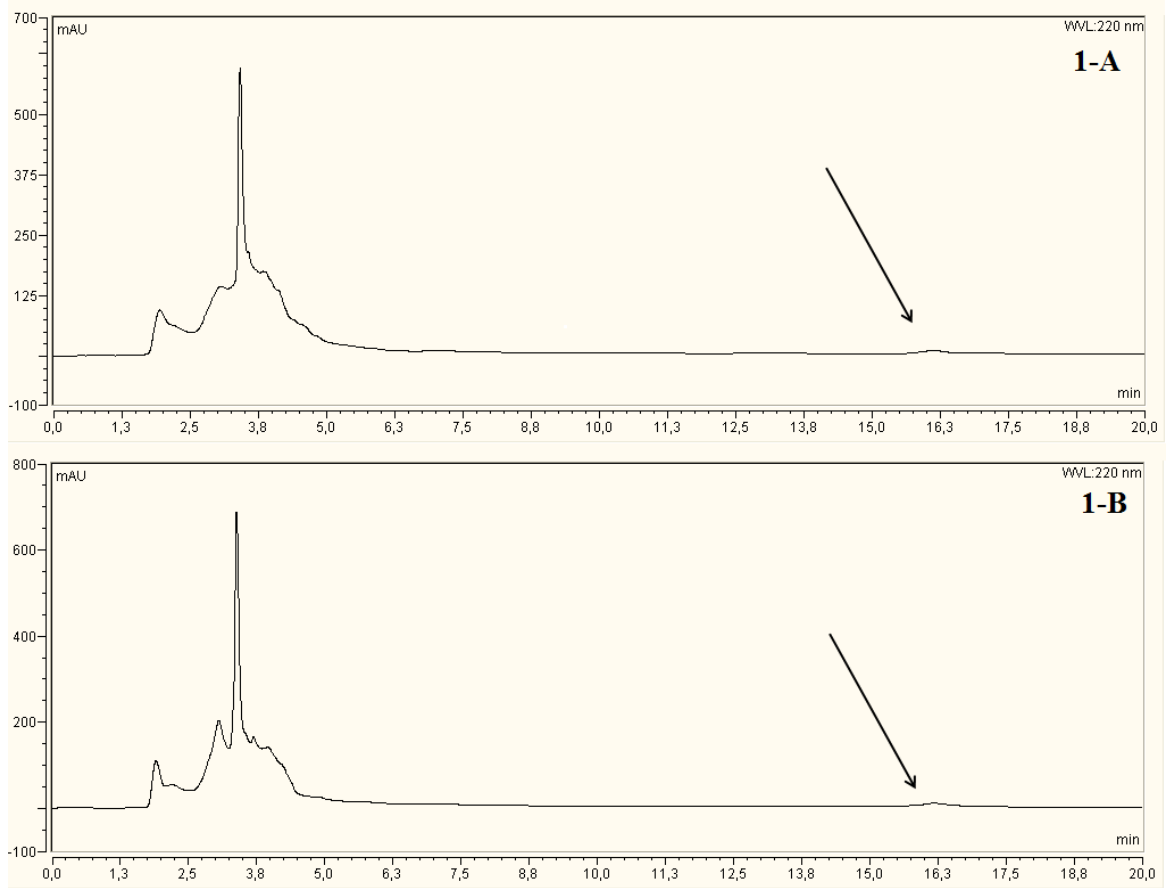
Bu sonuçlara göre her iki çalışma grubunda da enjeksiyonu takiben 2 saat bekleme süresi sonucu elde edilen hipokampus ve korteks doku selejilin derişimlerinin 1 saatlik bekleme süresi sonucu elde edilenlere oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Çalışma gruplarında 2 saatlik bekleme sonrası elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış; Çalışma grubu 2'nin (selejilin yüklü nanopartikül uygulanan grup) doku selejilin derişiminin çalışma grubu 1'in (tek başına selejilin uygulanan grup) doku selejilin derişimine oranla yüksek olduğu (selejilin derişimi açısından hipokampus ve kortekste verim sırasıyla ortalama 2.5 ve 1.5 kat daha yüksektir) görülmüştür. Aradaki fark istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p < 0.01$).

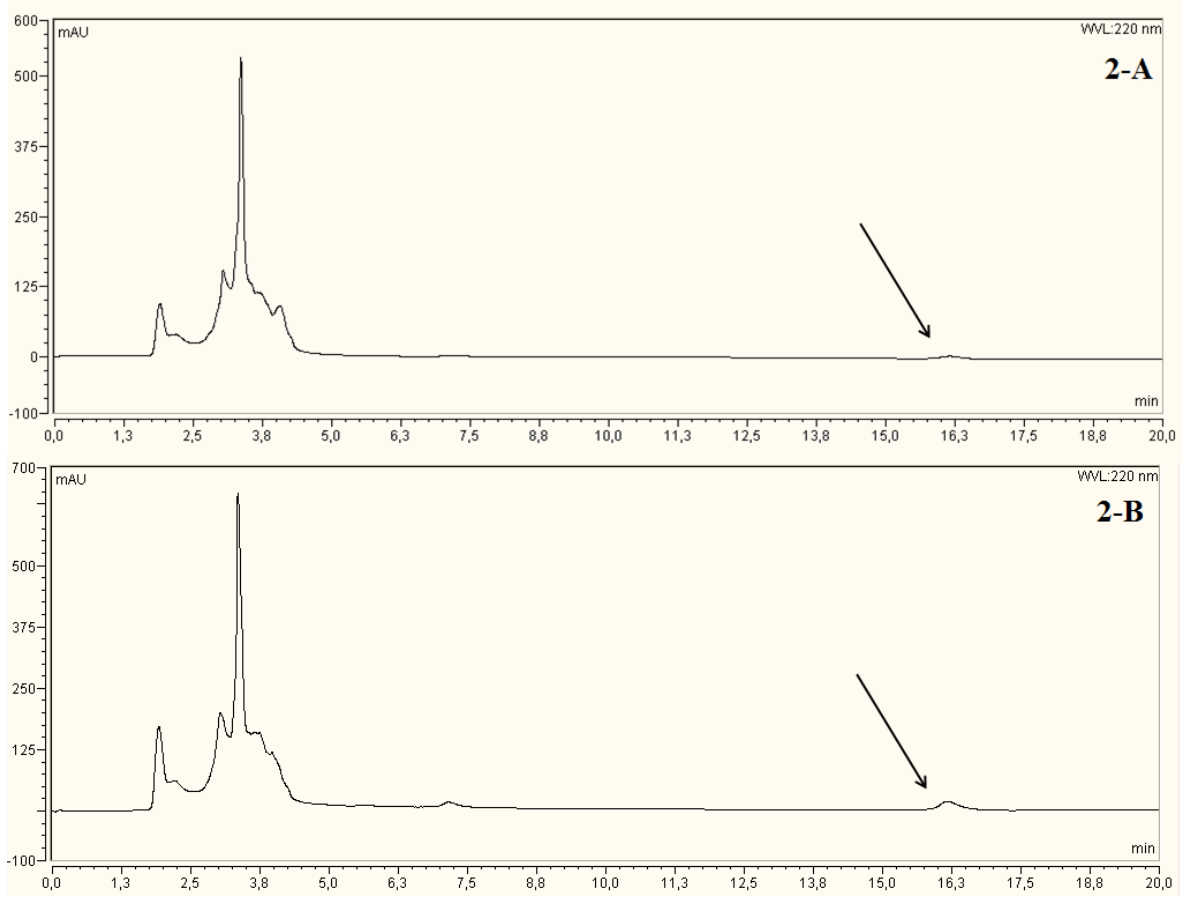
Çizelge 4.3. Uygulamayı takiben 1 ve 2 saatlik bekleme süresi sonucu elde edilen beyin korteks ve hipokampus dokularında selejilin miktarları*

	1 Saatlik bekleme sonrası saptanan doku selejilin derişimi (µg)		2 Saatlik bekleme sonrası saptanan doku selejilin derişimi (µg)	
	Hipokampus	Korteks	Hipokampus	Korteks
Çalışma grubu 1	1.29 ± 0.32	1.71 ± 0.83	1.32 ± 0.92	3.90 ± 0.81
Çalışma grubu 2	1.60 ± 0.27	2.27 ± 0.46	4.06 ± 1.57	4.61 ± 1.33

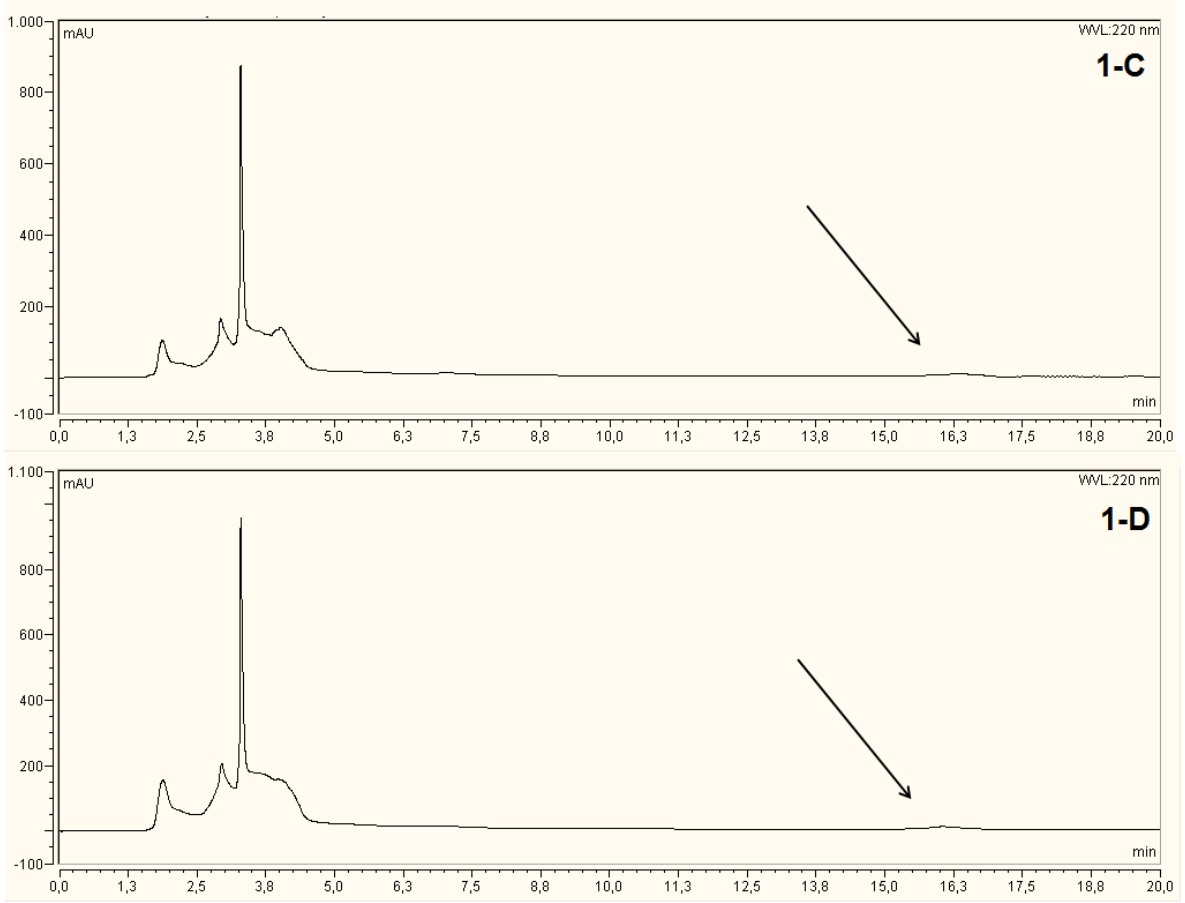
*Değerler, 3 denekteki bağımsız ölçümün ortalama±SH'sı olarak ifade edilmiştir



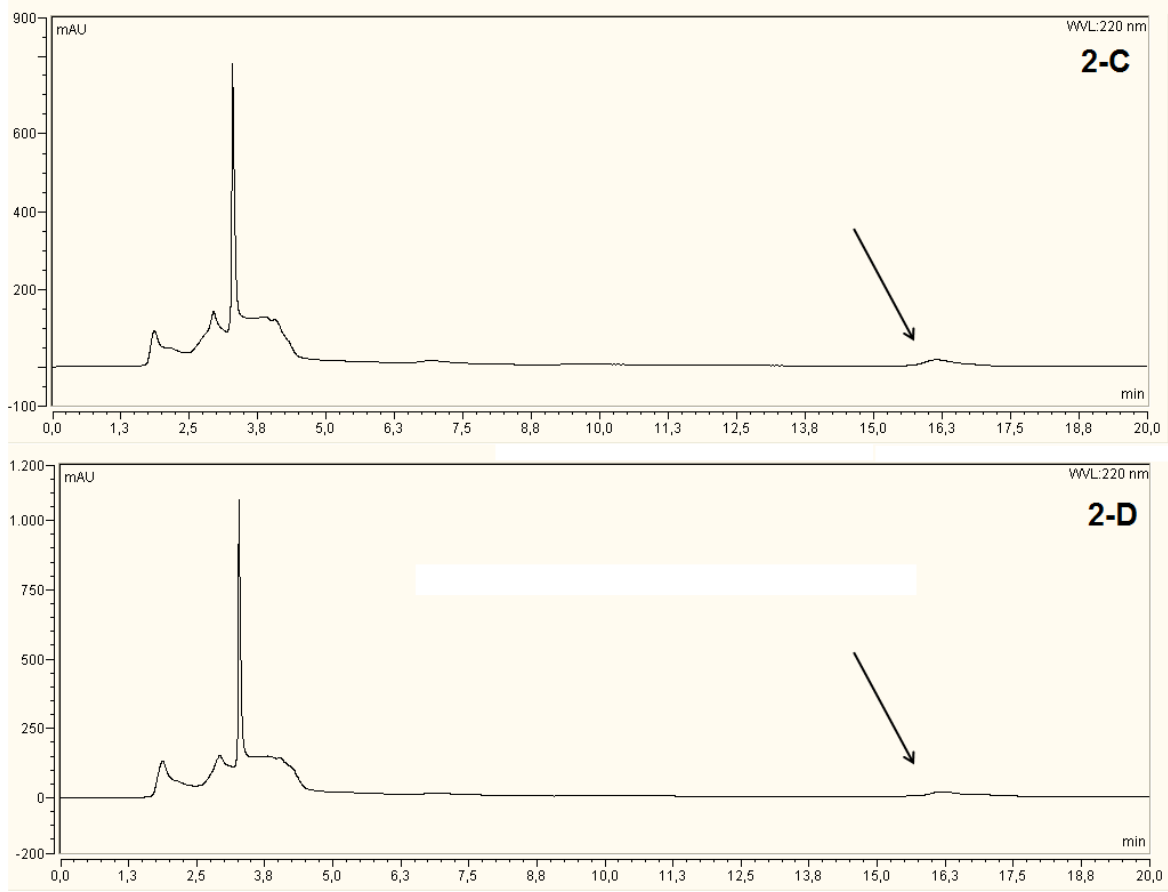
Şekil 4.16. 1 saatlik bekleme süresi sonrasında 1-A)Hipokampus ve 1-B)Korteksteki selejilin derişimi gösteren kromotogram



Şekil 4.17. 2 saatlik bekleme süresi sonrasında 2-A)Hipokampüs ve 2-B)Korteksteki selejilin derişimini gösteren kromotogram



Şekil 4.18. 1 saatlik bekleme süresi sonrasında 1-C)Hipokampüs ve 1-D)Kortekesteki selejilin derişimini gösteren kromatogram



Şekil 4.19. 2 saatlik bekleme süresi sonrasında 2-C)Hipokampüs ve 2-D)Korteksteki selejilin derişimini gösteren kromatogram

5. TARTIŞMA

Organizmaya verilen ilacın, uygulandığı bölgeden hedef bölgeye yeterli derişimde ulaşabilmesi, belirli bir süre terapötik özelliğini koruyabilmesi ve en önemlisi doğrudan etki bölgesine hedeflenebilmesi için uygun bir taşıma sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni ilaç taşıma sistemleri, ilaçların istenilen organ doku, hücreye hedeflenebilmesine olanak sağladıklarından yeni tedavi yaklaşımlarının odak noktası olmuşlardır. Speiser ve diğerleri [166] ilk defa 1970'lerin ortalarında nanopartiküllerin farmasotik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermişlerdir. İlaç taşıma sistemlerinin boyutlarının mikro boyutlardan ($>1\ \mu\text{m}$) nano boyutlara ($<1\ \mu\text{m}$) düşürülmesi ile birçok terapötik ile taşıyıcı sistemlerin bütünleşik bir sistem oluşturulması sağlanmıştır [167]. Nanopartiküllerin diğer ilaç taşıma sistemler üzerindeki en büyük avantajı mikron altı boyutlarda olmasıdır. Nanopartiküllerin bu özelliği ekstravazasyonu mümkün kılıp, terminal kan damarlarından emilimi engeller [168]. Bu ilaç taşıyıcı sistemler, başarısız tedaviler ve zayıf terapötik cevaplar gibi serbest ilaçların başarısız olduğu yönlerin aşılması için tasarlanmışlardır [169].

Bu tez kapsamında amfifilik PLGA-b-PEG nanopartikülleri içine selejilin yüklenerek, AH'nda oluşan amiloid plakları destabilize edici etkisi *in vitro* koşullarda incelenmiştir.

Polimerik ilaç taşıma sistemleri oldukça geliştirilmiştir [170] ve terapötik ajanların uzun dönemli veya kademeli [171] olarak verilmesinde çekici birer alternatif oluşturmaktadırlar. Polimerik dozaj formlarının içerisinde terapötik ajanlar korunur, dokulara ilacın aralıksız bir biçimde verilmesini sağlar ve tekrarlı ilaç uygulaması engellenir. Bu özellikler ayrıca bölgelere özgü taşınımın oluşturulmasını sağlar. Peptitler ve proteinler gibi makromoleküller stabilize konusunda çok hassas oldukları için enkapsüle olmaları bu makromoleküllerin korunmasına, özellikle de peroral olarak uygulandığında gastrointestinal enzimler ve pH etkisine karşı korur. Başarılı bir ilaç taşıma sisteminin oluşturulmasında polimer matriksinin uygun bir biçimde seçilmesi gerekmektedir. Polimer bozunabilir veya bozunmaz yapıda olabilir. Bozunmaz polimerlerin en temel dezavantajı polimerlerin ilaç taşınımı sonrası vücuttan cerrahi yol ile uzaklaştırılması gerekmektedir. Bozunan polimerin ise cerrahi uzaklaştırmaya ihtiyacı yoktur. Bu

nedenle birçok çalışmada bozunmayan polimerler yerine tercih edilmektedirler. Buna ek olarak bozunmayan polimerler küçük emilebilir moleküllere degrade oldukları için monomerlerinin toksik olmamasına dikkat etmek gerekmektedir. En yaygın olarak kullanılan bozunur polimerler PLA, PGA veya onların kopolimeri olan PLGA'dır. Bu polimerler biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmamaları nedeni ile biyomedikal uygulamalarda yirmi yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadırlar [172]. Son yıllarda blok kopolimerler (AB diblok, ABA veya BAB triblok, çoklu blok, dallı blok etc.) mikro ve nanosistemlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle PEG içeren blok kopolimerlerin sulu ortamda kendi kendine oluşturdukları polimerik miseller; mükemmel biyouyumlulukları, kan dolaşımında uzun süre kalmaları ve toksik olmamalarından ötürü ilaç ve gen taşıyıcı sistemler olarak büyük ilgi görmektedir.

Bu tez kapsamında PLGA bloğu (hidrofobik) ve PEG bloğu (hidrofilik) olan PLGA-b-PEG kopolimerleri kullanılarak selejilin yüklenmiş nanopartiküller çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır [158]. Hazırlanan nanopartiküllerdeki selejilin miktarının tayin edilebilmesi için HPLC ile selejilin miktar tayini yapılması hedeflenmiş ve bu doğrultuda da selejilin kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. HPLC ile elde edilen kromatogramlarda retansiyon zamanı 16 dakika olan selejilin pikinin miktar tayinine olanak verecek ölçüde simetrik olduğu belirlenmiştir. Partiküllere yüklenen selejilin miktarı *in vitro* etkin madde salım deneyleriyle saptanmıştır. Verimi en yüksek olan serinin partikül formülasyonu 5 mg selejilin ile hazırlanmıştır ve partikül boyutları 217 ± 15.5 olarak saptanmıştır. Bu seri için boyut dağılımının homojenliğinin göstergesi olarak kullanılan polidispersite indeksi 0.321 olarak saptanmıştır. Hem verimliliğinin yüksek olması hem ortalama nanopartikül boyutunun küçük olması hem de polidispersite indeksinin 0.2 değerine yakın olması nedeniyle *in vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere sentezlenen nanopartiküllerde bu derişim benimsenmiştir. FT-IR analizi sonuçlarında boş nanopartikül, selejilin yüklü nanopartikül ve selejiline ait kromatogramlar karşılaştırıldığında nanopartiküller selejilinle yüklenmemiş gibi görünüyorsa da nanopartiküllerin içlerine hapsedilen selejilin derişimi çok düşük olduğundan FT-IR sonuçlarında gözlemlenememiş olabilir.

Klinik ve farmakolojik kaynaklarda l-deprenil olarak da bilinen selejilin hidroklorür, feniletilaminin asetilenik türevidir. Selejilin, mitokondrinin dış membranında hücre

içi enzim olarak görev yapan MAO enziminin geri dönüşümsüz inhibitörüdür. Alzheimer hastalarında platelet MAO aktivitesinin yüksek bulunması ile bozulan dopaminerjik ve noradrenerjik sistemler ilişkilendirilmiş; özellikle MAO-B inhibitörlerinin AH'nda nöron hasarını azalttığı öne sürülmüştür [173] ve bu şekilde AH'nın ilerlemesini yavaşlattığı düşünülmektedir [174]. Selektif MAO-B inhibitörü selejilin PH ve AH'nda etkili olduğu; katekolamin düzeylerini artırarak AH'ndaki davranış bozukluklarını düzelttiği bildirilmiştir [175]. Buradan yola çıkılarak MAO-B inhibitörlerinin Aβ fibril oluşumunu da inhibe edebileceği hipotezi geliştirilmiştir [176]. Bu tez kapsamında AH'nda olduğu bilinen Aβ fibrilleri *in vitro* koşullarda oluşturulmuş ve sentezlenen selejilin yüklü nanopartiküllerle inkübe edilmiştir. Fibrillerin olduğu hem TEM hem de AFM görüntüleriyle doğrulanmıştır. Selejilin yüklü nanopartiküllerin bu fibrilleri destabilize ettiği de yine TEM ve AFM görüntüleriyle saptanmış ayrıca ThT floresans şiddetindeki azalma izlenerek nanopartiküllerin destabilize edici etkilerinin zamana bağımlı davranışı da belirlenmiştir. AH'nda olduğu bilenen iki farklı fibril türü için (1-40 ve 1-42) de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her iki fibril tipi için de altıncı saate kadar inkübasyon süresinin artmasıyla destabilize edici etkinin arttığı, altıncı saatten sonra ise etkinin platoya ulaştığı saptanmıştır.

AH'nda oluşan Aβ plakların öncelikli olarak beyin hipokampus bölgesinde agregre olarak hafızayı etkiledikleri, dolayısıyla kişide zaman kavramının kaybolmasına yol açtıkları ve ikincil olarak da beyin korteks bölgesini etkiledikleri bildirilmektedir [177]. Dolayısıyla hazırlanan nanopartiküllerin beyin içi dağılımının belirlenmesi özellikle bu iki bölgedeki selejilin derişiminin saptanması önemlidir. Bu doğrultuda *in vivo* ödeneyler zamana bağımlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sıçanların kuyruğundan selejilin veya aynı miktarda selejilin içeren nanopartikül süspansiyonunun enjeksiyonunu takiben 2 saat sonra çıkarılan hipokampus ve korteks bölgelerindeki selejilin derişimi 1 saat sonra çıkarılan hipokampus ve korteks bölgelerindeki selejilin derişiminden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla beraber her iki durumda da hipokampüse oranla kortekste selejilin miktarı daha yüksek bulunmuştur ve ayrıca her iki saat dilimi için de nanopartikül süspansiyonu uygulanan hayvalarda beyindeki selejilin miktarı sadece selejilin uygulanan hayvanlara oranla ortalama 2 kat daha yüksek saptanmıştır. Bu durumun olası nedenleri arasında nanopartiküllerin KBB'yi geçme

yeteneklerinin selejiline oranla daha yüksek olduğu ve muhtemelen nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan serbest grupların KBB'yi hızla aşabilecek şekilde etkileşime girdiği yorumu yapılabilir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında selejilin yüklü PLGA-b-PEG polimerik nanopartikülleri başarıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin *in vitro* koşullarda A β fibrillerle etkileşip bu fibrilleri destabilize ettiği saptanmıştır ve *in vivo* deneylerle de bu nanopartiküllerin KBB'yi aşarak A β fibrillerin yoğun olduğu hipokampus ve korteks bölgelerine ulaştığı ve bu bölgelerde parçalanarak içeriklerindeki selejilini bölgeye saldıkları tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda gelecekte bu nanopartiküllerin yüzeyine A β fibrillere doğrudan yönelimi sağlayacak antikör takılarak A β fibrillere hedefleme yapıldığında söz konusu fibriller üzerindeki destabilize edici etkinin, bölgedeki selejilin derişiminin artması beklenmektedir. Bu şekilde yapılacak hedeflemeyle selejilin için bildirilen santral sinir sistemi yan etkilerinin [178] ve diğer vücut kompartmanlarına dağılımın minimize edileceği öngörüldüğünden A β fibrilleri destabilize etmek amacıyla organizmaya verilecek selejilin derişiminin de azaltılacağı düşünülmektedir. Gelecek için planlanan bir diğer çalışmada Alzheimer oluşturulmuş sıçanların deneylerde kullanılması suretiyle rasyonel bir *in vivo* deney prosedürünün benimsenmesidir. Bu şekilde kullanılacak transjenik bir hayvan modelinde doğrudan A β fibril veya plak oluşumu söz konusu olduğundan *in vivo* koşullarda bu fibril veya plaklarla nanopartiküllerin etkileşimlerinin sonuçları daha ayrıntılı olarak değerlendirilebilecektir. Bu bilgiler ışında daha önce yapılan çalışmalarla [179] selejilinden daha kuvvetli MAO-B enzim inhibitörü olduğu tespit edilen yeni sentezlenen bileşikler için nanopartikül hazırlanmasının önü de açılmış olacaktır. Dolayısıyla klinikte Alzheimer tedavisi için kullanılabilecek yan etkileri minimal seviyede tutulmuş, doğrudan A β fibril veya plaklara hedeflendirilmiş, hasta uyuncunu arttıracak şekilde dozajı ayarlanmış optimum bir nanopartikülün hazırlanmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alzheimer, A., 1907, Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, Allg Z Psychiatr, 64, 146–148.
2. Olson, M., Shaw, C., 1969, Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism, Brain, 92, 147.
3. Selkoe, D. J., 2000, The origins of Alzheimer's disease: A is for amyloid, the Journal of the American Medical Association, 283, 1615–1617.
4. Spillantini, M.G., 1998, Goedert M., The protein pathology in neurodegenerative diseases, Trends in Neurosciences, 21, 428–433.
5. Checler, F., Vincent, B., 2002, Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators, Trends in Neurosciences, 25(12), 616–620.
6. Robinson, S.R., Bishop, GM., 2002, A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 23(6), 1051–1072.
7. Lansbury, P.T., 1997, Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease, Current Opinion in Chemical Biology, 1(2), 260-7.
8. Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., 2009, CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment, The Journal of the American Medical Association, 302, 385-93.
9. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, H., 2006, Anti-parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*, Neurochemistry International, 48, 275-285.
10. Youdim, M.B.H., Weinstock, M., 2002, Novel neuroprotective anti-Alzheimer drugs with anti-depressant activity derived from the anti-Parkinson drug rasagiline, Mechanisms of Ageing and Development, 123,1081-1086.
11. Uçar, G., Gökhan, N., Yeşilada, A., Yabanoğlu, S., Bilgin, A.A., 2005, Interaction of Some 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines with Rat Liver Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO), Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy, 25(1), 23-34.

12. Standaert, D.G., Young A.B., 2001, Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: , Hardman JG, L.E. Limbird, AG Gilman, (eds), Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 3rd edition, McGraw-Hill publishers, New York, 549-568.
13. Green, J.D., Baddelay, A.D., Hodges, J.R., 1996, Analysis of the episodic memory deficit in early Alzheimer's disease: evidence from the doors and people test, *Neuropsychologia*, 34, 537–551.
14. Price, B.H., Gurvit, H., Weintraub, S., Geula, C., Leimkuhler, E., Mesulam, M., 1993, Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease, *Archives of Neurology*, 50, 931–937.
15. Kirk, A., Kertesz, A., 1991, On drawing impairment in Alzheimer's disease, *Archives of Neurology*, 48, 73–77.
16. Isacson, O., Seo, H., Lin, L., Albeck, D., Granholm, A., 2002, Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors, *Trends in Neurosciences*, 25, 79–84.
17. Brewer, G.J., 1998, Age related neurotoxicity to lactate, glutamate and b-amyloid in cultured adult neurons, *Neurobiology of Aging*, 19(6), 561–568.
18. Doyu, M., Sawada, K., Mutsuma, N., Niwa, J., Yoshimoto, M., Fujii Y., Sobue, G., Kato, K., 2000, Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing, *Molecular Brain Research*, 87(1), 1–11.
19. Leslie, R.A., 2002, Imaging Alzheimer's disease in vivo: not so implaqueable anymore, *Trends in Neurosciences*, 25(5), 232–233.
20. Rapoport, S.I., 2002, Hydrogen magnetic resonance spectroscopy in Alzheimer's disease, *Lancet Neurology*, 1, 82.
21. Schuff, N., Capizzano, A.A., Du, A.T., 2002, Selective reduction of N-acetylaspartate in medial temporal and parietal lobes in AD, *Neurology*, 58, 928–935.
22. Evans, D.A., 1990, Estimated prevalence of Alzheimer's disease in the United States, *Milbank Q*, 68, 267–289.
23. Gao, S., Hendrie, H.C., Hall, K.S., Hui, S., 1998, The relationship between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis, *Archives of General Psychiatry*, 55, 809–815.

24. Hebert, L.E., Scherr, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A., Evans, D.A., 2003, Alzheimer's disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census, *Archives of Neurology*, 60, 1119–1122.
25. Wimo, A., Winblad, B., 2001, Health economical aspects of Alzheimer's disease and its treatment, *Psychogeriatrics*, 1, 189–193.
26. Parihar, M.S., Hemnani, T., 2004, Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions, *Journal of Clinical Neuroscience*, 11(5), 456–467.
27. Pettenati, C., Annicchiarico, R., Caltagirone, C., 2003, Clinical pharmacology of anti-Alzheimer drugs, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17, 659–672.
28. Ault, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R., 2002, Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies, *Progress in Neurobiology*, 68, 209–245.
29. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., 2001, BACE1 is the major β secretase for generation of Ab peptides by neurons, *Nature Neuroscience*, 4, 233–234.
30. Etienne, P., Robitaille, Y., Wood, P., Gauthier, S., Nair, N.P., Quirion, R., 1986, Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimer's disease, *Neuroscience* 19, 1279–1291.
31. Cummings, J.L., 2004, Alzheimer's disease, *The New England journal of Medicine*, 351, 56–67.
32. Pakaski, M., Kalman, J., 2008, Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*, 53, 103–111.
33. Citron, M., Oltersorf, T., Haas, C., McColongue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigepelfrey, C., Selkoe, D.J., 1992, Mutations of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increase β -protein production, *Nature*, 360, 672–674.
34. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset familial, *Science*, 261, 921–923.

35. Levy-Lahad, E., Waso, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingel, W.J., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., Crowley, A.C., Fu, Y.H., Guenette, S.Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E.M., Bird, T.D., Scellenberg, G.D., Tanzi, R.E., 1995, Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus, *Science*, 269, 973–977.
36. Sherrington, R., Rogaev, E., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque-Foncin, G., Bruni, M.P., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brooks, A., San Seau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., DaSilva, H.A.R., Haines, J.L., Perick-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., George- Hyslop, P.H., 1995, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature*, 375, 754–760.
37. Mudher, A., Lovestone, S., 2002, Alzheimer's disease do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences*, 25(1), 22–26.
38. Braak, H., Braak, E., 1997, Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging*, 18 (Suppl. 4), S85–S88.
39. Lee, V.M., Goedert, M., Trojanowski, J.Q., 2001, Neurodegenerative tauopathies, *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1121-59.
40. Iqbal, K., Alonso, Adel C., Chen, S., 2005, Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739, 198-210.
41. Querfurt, H.W., LaFerla, F.M., 2010, Alzheimer's disease, *The New England Journal of Medicine*, 362, 329-44.
42. Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., 2005, Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function, *Science*, 309, 476-81.
43. Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M., 2006, Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 39413- 23.
44. Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., 2003, Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms, *Journal of Neurochemistry*, 86, 582-90.

45. Lee, H.G., Perry, G., Moreira, P.I., 2005, Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in Molecular Medicine*, 11,164-9.
46. Goedert, M., Jakes, R., 2005, Mutations causing neurodegenerative tauopathies, *Biochimica et biophysica acta*, 1739, 240-50.
47. Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., 1997, Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Annals of Neurology* 41, 17.
48. Wallin, A.K., Blennow, K., Andreasen, N., Minthon, L., 2006, CSF biomarkers for Alzheimer's disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 21,131-8.
49. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., 2003, Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction, *Neuron* 39, 409-21.
50. Roberson, E.D., Searce-Levie, K., Palop, J.J., 2007, Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model, *Science*, 316, 750-4.
51. López Salom, M., Morelli, L., Castao, E.M., Soto, E.F., Pasquini, J.M., 2000, Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease, *Journal of Neuroscience Research*, 62, 302-10.
52. Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Van Haastert, E.S., 2005, The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathologica*, 110, 165-72.
53. Haass, C., Selkoe, D.J., 2007, Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide, *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 8, 101-12.
54. Selkoe, D.J., 2001, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiological Reviews*, 81, 741-66.
55. Tanzi, R.E., Bertram, L., 2005, Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective, *Cell*, 120, 545-55.
56. Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., 2005, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, *Science*, 300, 486-9.

57. Klein W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E., 2001, Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends in Neurosciences*, 24, 219-24.
58. Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2007, A beta oligomers — a decade of discover, *Journal of Neurochemistry*, 101, 1172-84.
59. Walsh, D.M., Townsend, M., Podlisny, M.B., 2005, Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation, *Journal of Neurochemistry*, 25, 2455-62.
60. Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A.T., 2008, Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization, *Journal of Neurochemistry*, 28, 4231-7.
61. Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., 1999, Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease, *The American Journal of Pathology*, 155, 853-62.
62. Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., 2003, APP processing and synaptic function, *Neuron* 37, 925-37.
63. Turner, P.R., O'Conner, K., Tate, W.P., Abraham, W.L., 2003, Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory, *Progress in Neurobiology*, 70, 1–32.
64. Muller, U., Kins, S., 2002, APP on the move, *Trends in Molecular Medicine*, 10, 1016–1019.
65. Citron, M., 2000, Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease, *Molecular Medicine Today*, 6, 392–397.
66. Golde, T.E., Younkin, S.G., 2001, Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease, *Trends in Molecular Medicine*, 6, 264–269.
67. Coleman, P., Federoff, H., Kurlan, R., 2004, A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias, *Neurology*, 63, 1155–1162.
68. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., 2000, Nicastrin modulates presenilinmediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing, *Nature*, 407, 48–54.

69. Scarpini, E., Scheltens, P., Feldman, H., 2003, Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives, *Lancet Neurology*, 2, 539–547.
70. Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., Mufson, E.J., 2007, Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment, *Neurology*, 68, 1501-8.
71. Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., 2001, Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease, *Neurology*, 56,127-9.
72. Dekosky, S.T., Scheff, S.W., 1990, Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity, *Annals of Neurology*, 27, 457-64.
73. Masliah, E., Crews, L., Hansen, L., 2006, Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 9 Suppl, 91-9.
74. Lister, J.P., Barnes, C.A., 2009, Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging, *Archives of Neurology*, 66, 829-33.
75. Walsh, D., Selkoe, D., 2004, Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease, *Neuron*, 44, 181–193.
76. Larson, J., Lynch, G., Games, D., Seubert, P., 1999, Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice, *Brain Research Journal*, 840, 23-35.
77. Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., 1999, Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice, *Nature Neuroscience*, 2, 271-6.
78. Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L., 2007, Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway, *Journal of Neuroscience*, 27, 2866-75.
79. Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., 2005, Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta, *Nature Neuroscience*, 8, 1051-8.
80. Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., 2006, AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss, *Neuron*, 52, 831-43.

81. Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., 2000, High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *Journal of Neuroscience*, 20, 4050-8.
82. Castren, M., Lampinen, K.E., Miettinen, R., 2002, BDNF regulates the expression of fragile X mental retardation protein mRNA in the hippocampus, *Neurobiology of Disease*, 11, 221-229.
83. Hardy, J., Selkoe, D., 2002, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, 297, 353-356.
84. Breitner, J.C., 2003, NSAIDs and Alzheimer's disease: how far to generalise from trials? *Lancet Neurology*, 2, 527.
85. Lanctot, K.L., Herrmann, N., Mazzotta, P., Khan, L.R., Ingber, N., 2004, GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia, *Journal of Psychiatry*, 49, 439-453.
86. Gotz, J., Chen, F., Van Dorpe, J., Nitsch, R.M., 2001, Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils, *Science*, 293, 1491- 5.
87. Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., Ferreira, A., 2002, Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 6364-9.
88. Selkoe, D.J., 2002, Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science*, 298, 789-91.
89. Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., 2001, Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP, *Science*, 293, 1487-91.
90. Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., 1991, Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Annals of Neurology*, 30, 572-80.
91. Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., Yates, P.O., 1987, A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease, *Journal of the Neurological Sciences*, 78,151-64.

92. Johnston, J.P., 1968, Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue, *Biochemical Pharmacology*, 17, 1285–97.
93. Kochersperger, L.M., Parker, E.L., Siciliano, M., Darlington G.J., Denny, R.M., 1986, Assignment of genes for human monoamine oxidase A and B to the X chromosome, *Journal of Neuroscience Research*. 16,601–16.
94. Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.J., Lan, N.C., Shih, J.C., 1991, Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon–intron organization, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88,3637–41.
95. Fowler, C.J., Callingham, B.A., Mantle, T.J., Tipton, K.F., 1980, The effect of lipophilic compounds upon the activity of rat liver mitochondrial monoamine oxidase-A and –B, *Biochemical Pharmacology*, 29, 1177–83.
96. Saura, J., Bleuel, Z., Ulrich, J., Mendelowitsch, A., Chen, K., Shih, J.C., Malherbe, P., Da Prada, M., Richards, J.G., 1996, Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry, *Neuroscience*, 70,755–74.
97. Westlund, K.N., Denney, R.M., Kochersperger, L.M., Rose, R.M., Abell, C.W., 1985, Distinct monoamine oxidase A and B cell populations in primate brain, *Science*, 230,181–3.
98. Oreland, L., Arai, Y., Strenstrom, A., Fowler, C.J., 1983, Monoamine oxidase activity and localization in the brain and the activity in relation to psychiatric disorders. In: Beckmann H, Riederer P, editors. *Modern problems in pharmacopsychiatry. Monoamine oxidase and its selective inhibitors*, Basel, Karger, p. 246–54.
99. Strolin-Benedetti, M., Dostert, P., 1989, Monoamine oxidase, brain ageing and degenerative diseases, *Biochemical Pharmacology*, 38,555–61.
100. Saura, J., Andres, N., Andrade, C., Ojuel, J., Eriksson, K., Mahy, N., 1997, Biphasic and region-specific MAO-B response to aging in normal human brain, *Neurobiology of Aging*, 18,497–507.

101. Saura, J., Luque, J.M., Cesura, A.M, Da Prada, M., Chan-Palay, V., Huber, G., Löffler, L.J., Richards, J.G., 1994, Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography, *Neuroscience*, 62,15– 30.
102. Danielczyk, W., Streifler, M., Konradi, C., Riederer, P., Moll, G., 1988, Platelet MAO-B activity and the psychopathology of Parkinson's disease, senile dementia and multiinfarction dementia, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 78,730–6.
103. Tipton, K.F., Fowler, C.J., 1984, The kinetics of monoamine oxidase inhibitors in relation to their clinical behaviour. In: Tipton KF, Dostert P, Benedetti MS, editors. *Monoamine oxidase and disease. Prospects for therapy with reversible inhibitors*, London: Academic Press, p. 27–40.
104. Gaa'L, J., Hermecz, I., 1993, Medicinal chemistry of present and future MAOB inhibitors. In: Szelenyi I, editor. *Inhibitors of monoamine oxidase B. Pharmacology and clinical use in neurodegenerative disorders*, Basel: Birkhauser, p. 75–108.
105. Ramsay, R.R., 1998, Substrate regulation of monoamine oxidases, *Journal of Neural Transmission*, 52,139–47.
106. Abeles, R.H., Maycock, A.L., 1976, Suicide enzyme inactivators, *Accounts of Chemical Research*, 9,313–9.
107. Knoll, J., Magyar, K., 1972, Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors, *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 5,393–408.
108. Knoll, J., Ecseri, Z., Kelemen, K., Nievel, J., Knoll, B., 1965, Phenylisopropylmethyl- propinylamine (E-250), a new spectrum psychic energizer, *Archives of International Pharmacodynamics*, 155,154–64.
109. Parnham, M.J., 1993, The history of l-deprenyl. In: Szelenyi I, editor. *Inhibitors of monoamine oxidase B. Pharmacology and clinical use in neurodegenerative disorders*, Basel: Birkhauser, p. 237–51.
110. Magyar, K., Vizi, E.S., Ecseri, Z., Knoll, J., 1967, Comparative pharmacological analysis of the optical isomers of phenylisopropylmethylpropinylamine (E-250), *Acta Physiologica Academy of Sciences (Hungary)*, 32,377–87.

111. Heinonen, E.H., Lammintausta, R., 1991, A review of the pharmacology of selegiline, *Acta Neurologica Scandinavica* 84(Suppl 136), 44–59.
112. Gerlach, M., Riederer, P., Youdim, M.B.H., 1992, The molecular pharmacology of l-deprenyl, *European Journal of Pharmacology*, 226, 97–108.
113. Knoll, J., 1998, (–)Deprenyl (selegiline), a catecholaminergic activity enhancer substance acting in the brain, *Pharmacology & Toxicology*, 82, 57–66.
114. Kitani, K., Kanai, S., Ivy, G., Carrillo, M.C., 1998, Assessing the effects of deprenyl on longevity and antioxidant defenses in different animal models, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 291–306.
115. Thomas, T., McLendon, C., Thomas, G., 1998, l-Deprenyl: nitric oxide production and dilation of cerebral blood vessels. *Neuroreport*, 9, 2595–600.
116. Mann, J.J., Aarons, S.F., Wilner, P.J., 1989, A controlled study of the antidepressant efficacy and side effects of (–)deprenyl, *Archives of General Psychiatry*, 46, 45–50.
117. Mangoni, A., Grassi, M.P., Frattola, L., Piolti, R., Bassi, S., Motta, A., Marcone, A., Smirne, S., 1991, Effects of MAO-B inhibitor in the treatment of Alzheimer's disease, *Experimental Neurology*, 31, 100–7.
118. Parkinson study group, 1993, Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease, *The New England Journal of Medicine*, 328, 176–83.
119. Heikkila, R.E., Hess, A., Duvoisin, R.C., 1984, Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice, *Science*, 224, 1451–3.
120. Ehrlich, P., 1902, *Collected Papers of Paul Ehrlich: Immunology and Cancer Research*. Pergamon Press, London, p. 442.
121. Fahmy, T.M., Fong, P.M., Goyal, A., Saltzman, W.M., 2005, Targeted for drug delivery. *Nanotoday*, 18–26.
122. Tamai, I., Tsuji, A., 1996, Drug delivery through the blood brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19, 401–424.
123. Bodor, N., Buchwald, P., 1999, Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 229–254.

124. Brightman, M.W., 1977, Morphology of blood–brain barrier, *Experimental Eye Research*, 25, 1–25.
125. Janzer, R.C., Raff, M.C., 1987, Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells, *Nature*, 325, 253–257.
126. Vorbrodt, A.W., 1989, Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries, *Journal of Neurocytology*, 18, 359–368.
127. Smith, Q.R., 1989, Quantitation of blood–brain barrier permeability. In: Neuwelt, E.A., *Implications of the Blood–Brain Barrier and its Manipulation*, Plenum, New York, pp. 85–113.
128. Stewart, P.A., Tuor, U.I., 1994, Blood–eye barriers in the rat: correlation of ultrastructure with function, *The Journal of Comparative Neurology*, 340, 566–576.
129. Bodor, N., Prokai, L., Wu, W.M., Farag, H.H., Jonnalagadda, S., Kawamura, M., Simpkins, J., 1992, A strategy for delivering peptides into the central nervous system by sequential metabolism, *Science*, 257, 1698–1700.
130. Devineni, D., Klein-Szanto, A., Gallo, J.M., 1995, Tissue distribution of methotrexate following administration as a solution and as a magnetic microsphere conjugate in rats bearing brain tumors, *J. Neuro-oncology*, 24, 143–152.
131. Neuwelt, E.A., Dahlborg, S.A., 1989, Blood–brain barrier disruption in the treatment of brain tumors: Clinical implications. In: Neuwelt, E.A. (Ed.), *Implications of the Blood Brain Barrier and its Manipulation: Clinical Aspects*, vol. 2. Plenum Press, New York, pp. 195–262.
132. Pardridge, W.M., Buciak, J.L., Friden, P.M., 1991, Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood–brain barrier *in vivo*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259, 66–70.
133. Huwyler, J., Wu, D., Pardridge, W.M., 1996, Brain delivery of small molecules using immunoliposomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14164–14169.
134. Hans, M.L., Lowman, A.M., 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Solid-state Materials for Advanced Technology*, 6, 319–327.

135. Begley, D.J., 2004, Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities, *Pharmacology & Therapeutics*, 104, 29–45.
136. Gutman, R., Peacock, G., Lu, D., 2000, Targeted drug delivery for brain cancer treatment, *Journal of Controlled Release*, 65, 31–41.
137. Zhuang, Z., Kung, M., Hou, C., Skrovonsky, D., Gur, T., Plossl, K., Trojanoski, J., Kung, H., 2001, Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates, *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 1905– 1914.
138. Smith, Q.R., 2003, A Review of Blood Brain Barrier Transport Techniques, *Methods in Molecular Medicine*, 89, 193-208.
139. Reese, T., Karnovsky, M., 1967, Fine structural localization of a blood–brain barrier to exogenous peroxidase, *The Journal of Cell Biology*, 34, 207–217.
140. Nag, S., 2003, Morphology and Molecular Properties of Cellular Components of Normal Cerebral Vessels, *Methods in Molecular Medicine*, 89:3-36.
141. Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., Mallikarjuana, N.N., Manohar, S., Liang, H., Kulkarni, A.R., Sung, H., Sairam, M., Aminabhavi, T.M., 2005, Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer’s disease, *Journal of Controlled Release*, 108, 193–214.
142. Yan, Q., Sage, E., 1998, Transforming growth factor-beta 1 induces apoptotic death in cultured retinal endothelial cells but not in pericytes: association with decreased expression of p21 waf1/cip1, *Journal of Cellular Biochemistry*, 70, 70–83.
143. Hirshi, K., D’Armore, P., 1997, Control of angiogenesis by the pericytes: molecular mechanisms and significance, *EXS*, 79, 419–428.
144. Johanson, C., 1980, Permeability and vascularity of the developing brain: cerebellum vs. cerebral cortex, *Brain Research*, 190, 3– 16.
145. Pardridge, W., 2003, Molecular Biology of the Blood–Brain Barrier, *Molecular Biotechnology*, 30(1), 57-70.
146. Smith, Q., 1989, Implications of the Blood Brain Barrier and its Manipulation, Plenum Press, New York, pp. 85– 118.

147. Lee, G., Dallas, S., Hong, M., Bendayan, R., 2001, Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchymal considerations, *Pharmacological Reviews*, 53, 569– 596.
148. Kabanov, A., Batrakova, E., New technologies for drug delivery across the blood–brain barrier, *Current Pharmaceutical Design*, 10, 1355– 1363.
149. Kreuter, J., 1994, *Encyclopedia of Pharma. Tech.*, Marcel Dekker, New York, pp. 165– 190.
150. Marx, J., 1996, Searching for drugs that combat Alzheimer's, *Science*, 273, 50 –3.
151. McGeer, P.I., Schultzer, M., McGeer, E.G., 1996, Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies, *Neurology*, 47, 425–32.
152. Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., 1996, Effect of estrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease, *Lancet*, 348, 429 –32.
153. Fagan, A., Watson, M., Parasadani, M., Bales, K., Paul, S., Holtzman, D., 2002, Human and murine ApoE markedly alters Abeta metabolism before and after plaque formation in a Mouse model of Alzheimer's disease, *Neurobiology of Disease*, 9, 305–318.
154. Thomas, T., Rhodin, J.A.G., Sutton, E.T., 2000, Estrogen protects peripheral and cerebral blood vessels from toxicity of Alzheimer peptide amyloid b and inflammatory reaction, *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 1, 32– 41.
155. Shih, J.C., 1991, Molecular basis of human MAO-A and MAO-B, *Neuropsychopharmacology*, 4, 1–7.
156. Torchilin, V., 2008, Multifunctional pharmaceutical nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14), 1532-1555.
157. De Villiers, M.M., Aramwit, P., Kwon, G.S., 2008, *Nanotechnology in Drug Delivery*, Springer Verlag.
158. Sarı E., 2011, Vasküler oksidatif strese karşı ıcam-1'e yönlendirilmiş katalaz yüklü polimerik nanopartiküllerin geliştirilmesi, 107s.

159. Tzanavaras, P.D., Themelis, D.G., Zotuo, A., Stratis, J., Karlberg, B., 2008, Optimization and validation of a dissolution test for selegiline hydrochloride tablets by a novel rapid HPLC assay using a monolithic stationary phase, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 670–675.
160. Malvern Instruments Ltd. Technology, Malvern.; Available from: <http://www.malvern.com/>.
161. Naiki, H., Nakakuki, K., 1996, First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension *in vitro*, *Laboratory Investigation*, 74, 374-383.
162. Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Omata, S., Gejyo, F., Naiki, H., Interaction between A β (1-42) and A β (1-40) in Alzheimer's β -Amyloid Fibril Formation *in vitro*, *Biochemistry*, 38, 15514-15521.
163. Hiller-Sturmhöfel, S., Swartzwelder, S., 2004, Alcohol's Effects on the Adolescent Brain—What Can Be Learned From Animal Models, *Alcohol Research & Health*, 28, 213-221.
164. Wetzel, R., Kheterpal, I., 2006, Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates, Part C, Volume 413 (Methods in Enzymology), ISBN 978-0121828189, Elsevier, 416s.
165. Seju, U., Kumar, A., Sawant, K.K., 2011, Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: *In vitro* and *in vivo* studies, *Acta Biomaterialia*, 7, 4169–4176.
166. Speiser, P., Kreuter, J., 1976, *In vitro* studies of poly(methylmethacrylate) adjuvants, *Journal of Pharmacological Sciences*, 65, 1624-1627.
167. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Bauduin, P., Speiser, P., 1979, Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31, 331-332.
168. Barratt, G., 2003, Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 21-37.
169. Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R., 2002, Nanosizing: a formulation approach for poorly water-soluble compounds, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 113-120.
170. Hans, M.L., Lowman, A.M., 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targetting, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 6, 319-327.

171. Sanchez, A., Tobio, M., Gonzalez, L., Fabra, A., Alonso, M.J., 2003, Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 221-229.
172. www.drugdel.com, accessed on 13.08.2004.
173. Foley, P., Gerlach, M., Youdim, M.B.H., Riederer, P., 2000, MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders, *Parkinsonism & Related Disorders*, 6, 25-47.
174. Knoll, J., 1998, (-)Deprenyl (selegiline), a catecholaminergic activity enhancer (CAE) substance acting in the brain, *Pharmacological Toxicology*, 82, 57–66.
175. Alafuzoff, I., Helisalmi, S., Heinonen, E.H., Reinikainen, K., Hallikainen, M., Soininen, H., Koivisto, K., 2000, Selegiline treatment and the extent of degenerative changes in brain tissue of patients with Alzheimer's disease, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 815-819.
176. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, H., 2006, Anti-parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*, *Neurochemistry International*, 48, 275-285.
177. Gasparini, L., Ongini, E., Wenk, G., 2004, Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action, *Journal of Neurochemistry*, 91, 521–536.
178. Antoniadesa, C., Carageorgioub, H., Tsakirisa, S., 2002, Effects of (-)deprenyl (selegiline) on acetylcholinesterase and Na^+, K^+ -ATPase activities in adult rat whole brain, *Pharmacological Research*, 46 (2), 165-169.
179. Gökhan-Kelekçi, N., Koyunoğlu, S., Yabanoğlu, S., Yelekçi K., Özgene, Ö., Uçar, G., Erol, K., Kendi, E., Yeşilada, A., 2009, New pyrazoline bearing 4(3H)-quinazolinone inhibitors of monoamine oxidase: Synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 675-689.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İpek BAYSAL

Doğum Yeri: Kadıköy

Doğum Yılı: 1987

Medeni Hali: Bekar

Elektronik Posta: ipekbaysal@hacettepe.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise: Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi (1998-2004)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004 – 2008)

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2010 - : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,

Biyokimya Anabilim Dalı