



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEDEFLENDİRİLMİŞ İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜL GÖMÜLÜ
FİBERLERİN DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE
KULLANIMI**

ECE GÜLER
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUHAMMET EMİN ÇAM
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

EŞ-DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET SAYIP EROĞLU

İSTANBUL- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEDEFLENDİRİLMİŞ İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜL GÖMÜLÜ
FİBERLERİN DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE
KULLANIMI**

ECE GÜLER
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUHAMMET EMİN ÇAM
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

EŞ-DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET SAYIP EROĞLU

İSTANBUL- 2023

BEYAN

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

Ece Güler

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin ilk gününden bugüne kadar en iyi araştırmacılardan biri olabilmem için tüm desteğini, ilgisini, bilgi ve deneyimini sonuna kadar benimle paylaşan, zorlandığım her an yanına koşabildiğim, her konuda fikrini sorup akıl alabildiğim, çalışmalarımız boyunca her daim saygısını ve hoşgörüsünü hissettiğim, bıkmadan büyük bir sabırla her psikolojik düşüşümde beni motive eden, mesleki duruşu, karakteri, sabrı ve çalışma disiplini kendime örnek aldığım ve her zaman asistanı ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhammet Emin Çam’a,

Bilgi birikimi ve deneyimiyle tez sürecimde vermiş olduğu destekler için eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Eroğlu’na, yurtdışı deneyimlerimde beni hep çok destekleyen ve her konuda yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Deepak M Kalaskar ve Doç. Dr. Fakhre El İkram’a, doktora eğitimim boyunca şevkatini, sevgisini her zaman hissettiğim ve bilimsel olarak her zaman yanımda olan Sayın Doç. Dr. Esra Tatar’a, yurtdışında kendimi geliştirebilmem için gerekli bağlantıları kurmamda bana destek olan ve beni projelere dahil eden Sayın Prof. Dr. Oğuzhan Gündüz’e ve tez sürecinde birçok analizimde kahrımı çeken çok kıymetli çalışma arkadaşım Gül Sinemcan Özcan’a,

Yaptığımız çalışmalarda ve özellikle tez sürecimde her zaman bana tüm gücüyle yardım eden, kendi teziymiş gibi sahiplenen kıymetli çalışma arkadaşım ve dostum Ecz. Hümeysra Betül Yekeler’e, aynı süreçlerden beraber geçtiğimiz, özellikle tezlerimizin hayvan deneylerinde omuz omuza verdiğimiz, beraber stresimizi paylaştığımız canım arkadaşım Ecz. Saliha Aydın’a, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen ve destek olan değerli arkadaşlarım Ecz. Gita Parviz, Ecz. Şevval Gülşah Tekinalp, Ecz. Fatima Abobakr ve Sabiha Kendirci’ye, Pakistan’daki en yakın dostum ve çalışma arkadaşım Asima Asghar’a,

Hayatımın her anında benimle mutlu olup benimle üzülen, tüm stresime, kaygılarıma ortaklık eden, her zaman bir telefon uzağımda bana kız kardeş olan can dostlarım Dr. Öğr. Üyesi Fatma Yüce, Uzm. Ody. Banu Bulut, Dr. Esra Seven, Dt. Zeynep Üstün Kavak ve Ecz. Dilay Kahvecioğlu’na,

Bana her konuda, her zaman maddi manevi destek olan, sevgilerini her daim yanımda hissettiğim canım babam, çok değerli abim ve çok kıymetli eşi Nur'a ve çalışmalara gitmek için her yanından ayrıldığımda dönüşümü kapılarda bekleyen bal yeğenim Alisa'ya ve fiziken yanımda olamasa da sevgisi, kalbi, fikirleri ve ruhuyla hep kalbimde ve ruhumda olan, her ne başarıyorsam beraber başardığım canım anneme,

En içten ve kıymetli teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu tez çalışmasının gerçekleşmesi için destek veren Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi (BAPKO) tarafından “Hedeflendirilmiş İlaç Yüklü Nanopartikül Gömülü Fiberlerin Deneysel Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanımı” başlıklı ve TDK-2022-10514 numaralı proje, Türkiye Sağlık Enstitüleri (TÜSEB) tarafından “Hedeflendirilmiş İlaç Yüklü Nanopartikül Gömülü Fiberlerin Deneysel Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanımı” başlıklı ve 20062 numaralı proje ve TÜBİTAK 1002B Acil Destek Modülü tarafından “Hedeflendirilmiş İlaç Yüklü Nanopartikül Gömülü Fiberlerin Deneysel Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanımı” başlıklı ve 223S157 numaralı proje tarafından desteklenmiştir. Ayrıca doktora eğitimim boyunca beni destekleyen burs programları olan YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı, TÜBİTAK 2211-A Yurtiçi Doktora Burs Programı, TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ve TÜBİTAK 2250 Lisansüstü Bursları Performans Programı'na verdikleri burslardan dolayı çok teşekkür ederim.

Ece Güler

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. ALZHEIMER HASTALIĞI HAKKINDA GENEL BİLGİLER	7
4.2. ALZHEIMER HASTALIĞINDA ÖNE SÜRÜLEN HIPOTEZLER.....	8
4.3. KAN BEYİN BARIYERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	10
4.4. ALZHEIMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR.....	12
4.5. ALZHEIMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BITKİSEL YAKLAŞIMLAR	13
4.6. CURCUMIN'IN ALZHEIMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNDEKİ ETKİ MEKANİZMALARI	15
4.7. ALZHEIMER HASTALIĞINDA KULLANILAN HASTALIK MODELLEME YAKLAŞIMLARI.....	18
4.8. SH-SY5Y HÜCRE HATTI ÖZELLİKLERİ.....	21
4.9. NANOTEKNOLOJİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	22
4.10. NANOPARTİKÜLLER VE ÜRETİM TEKNİKLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	24
4.11. NANOFİBERLER VE ÜRETİM TEKNİKLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	26
4.12. POLİMERLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	27
4.13. ORAL YOLLA İLAÇ UYGULAMASININ AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI.....	36
4.14. SUBLİNGUAL İLAÇ UYGULAMASI.....	40
5. GEREÇ VE YÖNTEM	42
5.1. MATERYALLER.....	42
5.2. PLGA NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ	42
5.3. PVP/PEG NANOFİBERLERİN BASINÇLI DÖNME CİHAZIYLA ÜRETİLMESİ	42
5.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM).....	43
5.5. FOURIER DÖNÜŞÜMÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FT-IR).....	43
5.6. X-IŞINI TOZ KİRİNİMİ (XRD).....	43
5.7. DİFERANSİYEL TARAMALI KALORİMETRİ (DSC).....	43
5.8. ZETA POTANSİYEL (Z) ÖLÇÜMÜ.....	44
5.9. İLAÇ ENKAPSÜLLEME VERİMLİLİĞİ	44
5.10. IN VITRO İLAÇ SALIM PROFİLİ.....	44

5.11. IN VITRO İLAÇ SALIM KINETİĞİ.....	45
5.12. DEĞREDASYON TESTİ.....	45
5.13. NANOFİBERLERİN DISİTEGRASYON TESTİ.....	45
5. 14. IN VITRO HÜCRE KÜLTÜRÜ TESTLERİ.....	45
5.14.1. Hücre Kültürü ve Tedaviler	45
5.14.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi için Picogreen Test Analizi	46
5.14.3. Oligomerik A β ₁₋₄₂ ve Tedavi Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	46
5.14.4. SH-SY5Y Hücrelerinde Anti-Alzheimer Etkinliğin Değerlendirilmesi	46
5.14.5. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı PCR	46
5. 15. İN VIVO ANTI-ALZHEIMER ETKİNLİĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ	47
5.15.1. Vücut ağırlığı ölçümü	47
5.15.2. Sıçanlarda ICV-A β ₁₋₄₂ peptit indüklü Alzheimer modelinin oluşturulması ve sıçanların tedavi edilmesi	48
5.15.3. Davranış çalışmaları	49
5.15.3.1. Açık alan testi	49
5.15.3.2. Morris'in su tankı testi.....	49
5.15.3.3. Pasif sakınma testi	50
5.15.3.4. Yeni obje tanıma testi	50
5.15.5. Alınan Beyin Dokularının Histolojik Analizi	51
5.15.6. Alınan Beyin Dokularının İmmunohistokimyasal Analiz	51
5.15.7. Alınan Beyin Doku Örneklerinde ELİSA ile Ölçülen A β Seviyeleri.....	51
5.16. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	52
6. BULGULAR	53
6.1. SOLÜSYONLARIN FİZİKSEL PARAMETRELERİ.....	53
6.2. ÜRETİLEN FİBER VE NANOPARTİKÜLLERİN SEM İLE MORFOLOJİK ANALİZLERİ.....	54
6.3. ÜRETİLEN FİBER VE NANOPARTİKÜLLERİN FOURIER DÖNÜŞÜMÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FT-IR)	56
6.4. ÜRETİLEN FİBER VE NANOPARTİKÜLLERİN X-ISINI TOZ KIRINIMI (XRD)	58
6.5. ÜRETİLEN FİBER VE NANOPARTİKÜLLERİN DİFERANSİYEL TARAMALI KALORİMETRİ (DSC).....	60
6.6. ZETA POTANSİYEL (Z) ÖLÇÜMÜ	61

6.7. İN VITRO İLAÇ SALIM PROFİLİ VE İLAÇ SALIM KINETİĞİ.....	62
6.8. ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN DEĞREDASYON TESTİ	66
6.9. NANOFİBERLERİN DISİNTEGRASYON TEST SONUCU.....	67
6.10. İN VITRO HÜCRE KÜLTÜRÜ TESTLERİ	68
6.10.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi için Picogreen Test Analizi	68
6.10.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Anti-Alzheimer Etkinliğinin Değerlendirilmesi	69
6.10.3. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı PCR	70
6.11. İN VIVO ANTI-ALZHEIMER ETKİNLİĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ	72
6.11.1. Davranış çalışmaları	72
6.11.1.1. Açık alan testi	72
6.11.1.2. Morris'in Su Tankı Testi	74
6.11.1.3. Pasif Sakınma Testi	76
6.11.1.4. Yeni Obje Tanıma Testi	77
6.12. ALINAN HAYVAN BEYİN DOKULARININ HİSTOLOJİK ANALİZİ.....	79
6.12.1. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları	82
6.12.2. Alınan beyin dokularında Aβ1-42 seviyelerinin ELİSA ile analiz sonucu	86
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	88
8. KAYNAKLAR.....	107

KISALTMALAR LİSTESİ

2B	: 2 boyutlu
3B	: 3 boyutlu
AChİ	: Asetilkolinesteraz inhibitörleri
AH	: Alzheimer hastalığı
Akt	: Protein kinaz B
Al	: Aluminyum
APC	: Adenomatöz poliposis koli
APP	: Amiloid prekürsör protein
APPsβ	: APP dış alan
Aβ	: Amiloid beta
BACE	: β bölgesi APP parçalama enzimi
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
C99	: Zara bağlı karboksil terminal parçası
CK1	: Kazein kinaz 1
CNP	: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül
CNPF	: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül gömülü PVP/PEG nanofiber
CO ₂	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
CUR	: Curcumin
DO	: Donepezil
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetri
DVL	: Disheveled protein
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
Gap junction	: Boşluk kavşaklarını
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz-3
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Housekeeping gen	: Referans değeri

KBB	: Kan beyin bariyeri
LRP5	: Lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein
MAPT	: Mikrotübül ile ilişkili protein tau
NMDA	: N-metil-D-aspartat
O	: Yağ fazı
P-TAU	: Hiperfosforile tau proteini
Pb	: Kurşun
PCL	: Polikaprolakton
PDI	: Çoklu dağılma indeksi
PEG	: Polietilen glikol
PG	: Pressurized gyration (Basıncılı dönme)
PGA	: Poli(glikolik asit)
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PLA	: Polilaktik asit
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PNP	: Saf nanopartikül
PNF	: PVP/PEG nanofiber
PSEN	: Presenilin
PVA	: Polivinil alkol
PVP	: Polivinilpirolidon
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SH-SY5Y	: İnsan nöroblastoma hücreleri
TCF/LEF	: T-hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör
Tg	: Camsı geçiş sıcaklığı
Tight junction	: Sıkı bağlantı noktası
USP	: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
W	: Su fazı
W1/O/W2	: Çift emülsiyon
XRD	: X-ışını toz kırınımı
Zn	: Çinko

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. PCR analizinde kullanılan primerlerin gen dizilerinin listesi.....	47
Tablo 2. Zeta potansiyel, partikül boyutu ve PDI ölçüm sonuçları.....	62



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. A β peptitlerin üretilmesi.....	8
Şekil 2. PI3K/AKT/GSK-3 β yolağının şematik gösterimi.....	16
Şekil 3. AH modellemesinde kullanılan yaklaşımlar.....	18
Şekil 4. Basıncılı dönme sisteminin şematik gösterimi	26
Şekil 5. PLGA'nın vücut içerisindeki metabolizması.....	31
Şekil 6. <i>İn vivo</i> hayvan deneyi sürecinin şematik gösterimi.....	49
Şekil 7. Solüsyonların fiziksel parametre sonuçları.....	53
Şekil 8. Üretilen PLGA/PEG nanopartiküllerinin ve PVP/PEG fiberlerin SEM görüntüleri, fiber çap dağılımlarının histogram grafikleri ve floresan mikroskop görüntüsü.....	55
Şekil 9. Üretilen nanopartikül ve nanofiberlerin FT-IR sonuçları.....	58
Şekil 10. XRD sonuçları.....	59
Şekil 11. DSC analiz sonuçları.....	61
Şekil 12. İlaç yüklü nanopartiküllerin <i>in vitro</i> ilaç salım profili ve kinetik modellemeleri.....	64
Şekil 13. Üretilen nanopartiküllerin degradasyon testi sonucu.....	66
Şekil 14. CNPF'lerin yapay tükürük sıvısında gerçekleştirilen disintegrasyon test sonucu.....	67
Şekil 15. <i>İn vitro</i> SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı test sonucu.....	68
Şekil 16. <i>İn vitro</i> SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi.....	70
Şekil 17. β -katenin, GSK-3 β , MAPT, Psen1 ve Akt1 genlerindeki göreceli kat değişiklikleri.....	71
Şekil 18. Açık alan testi sonucu.....	73
Şekil 19. Morris'in su tankı testinin tüm gruplara ait sonuçları.....	75
Şekil 20. Hayvanların pasif sakınma test sonucunda geçiş sürelerinin değerlendirmesi.....	77
Şekil 21. Yeni obje tanıma test sonuçları.....	78
Şekil 22. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının korteks bölgelerine ait fotomikrograftlar.....	80
Şekil 23. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının hipokampus CA3 bölgelerine ait fotomikrograftlar.....	81

Şekil 24. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının hipokampus CA2 bölgelerine ait fotomikrograflar.....	82
Şekil 25. Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama.....	83
Şekil 26. Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama.....	84
Şekil 27. Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-tau immünohistokimyasal boyama.....	85
Şekil 28. Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-tau immünohistokimyasal boyama.....	86
Şekil 29. A β ₁₋₄₂ seviyelerinin alınan beyin dokularının korteks ve hipokampusünde ölçümü.....	87

1.ÖZET

Tezin başlığı : Hedeflendirilmiş İlaç Yüklü Nanopartikül Gömülü Fiberlerin Deneysel Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanımı

Öğrencinin Adı Soyadı : Ece Güler

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. Muhammet Emin Çam

Programın Adı : Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Doktora Programı

Amaç: Curcumin (CUR) kullanılarak Alzheimer hastalığının (AH) radikal tedavisi için beyne hedeflendirilmiş sublingual uygulamaya yönelik yeni bir tedavi stratejisi bulmaktır.

Gereç ve Yöntem: Yeni geliştirilen CUR nanopartikül (CNP) yüklü nanofiberlerin (CNPF) yapılarını aydınlatmak için FT-IR, XRD, DSC, SEM, *in vitro* ilaç salım ve kinetiği, disintegrasyon, degradasyon ve zeta potansiyel analizi testleri yapılmıştır. Sonrasında geliştirilen bu yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin AH tedavisindeki etkinliği, SH-SY5Y hücrelerinde A β ile indüklenmiş AH modelinde *in vitro* hücre kültüründe hücre canlılığı, anti-Alzheimer etkinlik ve PCR analizi; *in vivo* hayvan testlerinden açık alan, yeni obje tanıma, pasif sakınma ve Morris su tankı davranış testleri ile değerlendirildi. Hayvanlardan alınan beyin dokularının korteks ve hipokampusünde ise histoloji, immunohistokimyasal analiz ve A β ₁₋₄₂ seviyeleri için ELİSA yapılmıştır.

Bulgular: Yeni geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin, karakterizasyon testleriyle içeriklerinin doğruluğu kanıtlanmıştır. CNPF'lerin yapay tükürük sıvısı içerisinde 5 sn'de tamamen parçalanabildiğinden sublingual uygulamaya uygunluğu, degradasyon testinde ise partiküllerin bozunma sürelerinin 18 gün olduğu kanıtlanmıştır. *İn vitro* hücre canlılığı testi sonucunda tedavilerin hücreler üzerine toksik bir etkisinin olmadığı, A β ₁₋₄₂ (20 μ M) indüklenmiş hücrelerde CUR dozu arttıkça tedavi etkinliğinin düştüğü görülmüştür. CUR'un AH'deki etkinliğini yapılan PCR analiziyle PI3K/AKT/GSK-3 β ve Wnt/ β -katenin olmak üzere 2 farklı yolakla gerçekleştirdiği bulunmuştur. Yapılan hayvan deneylerinde tedaviyle öğrenme ve bellek fonksiyonlarının iyileştiği görülmüştür. ELİSA, histoloji ve immunohistokimyasal analizlerle de bu sonuçlar desteklenmiştir.

Sonuç: CNPF'nin AH tedavisinde etkinliği *in vitro* ve *in vivo* testlerle kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, curcumin, nanopartikül, nanofiber, SH-SY5Y hücreleri

2. SUMMARY

Title of Thesis: Usage of Targeted Drug-Loaded Nanoparticle Embedded Fibers in the Treatment of Experimental Alzheimer's Disease

Student Name, Surname: Ece Guler

Supervisor Name : Assoc. Prof. Muhammet Emin cam

Program Name : Faculty of Pharmacy Pharmacology PhD Program

Objective: To find a new treatment strategy for targeted sublingual application to the brain for the radical treatment of Alzheimer's disease (AD) using curcumin (CUR).

Materials and Methods: FT-IR, XRD, DSC, SEM, *in vitro* drug release and kinetics, disintegration, degradation, and zeta potential tests were performed to elucidate the structures of newly developed CUR nanoparticle (CNP) embedded nanofibers (CNPF). The effectiveness of these systems developed for the treatment of AD was analyzed by cell viability, anti-Alzheimer activity, and PCR analysis in the A β -induced SH-SY5Y cells AD model; *in vivo* animal tests were evaluated with open field, novel object recognition, passive avoidance, and Morris water maze behavioral tests. ELISA for A β_{1-42} levels, histology, and immunohistochemical analysis were performed in the cortex and hippocampus of brain tissues taken from animals and their results confirmed the results of the *in vitro* and *in vivo* tests.

Results: The accuracy of the contents of newly developed drug carrier systems was proven via characterization tests. CNPF was found suitable for sublingual administration via 5 sec disintegration time in the artificial saliva and the degradation time of the particles was determined as 18 days. As a result of the *in vitro* cell viability test, the treatments have no toxic effects on the cells, and the treatment effectiveness decreased as the CUR dose increased in A β_{1-42} (20 M) induced cells. By PCR analysis, CUR exerted its effectiveness in AD through 2 different pathways: PI3K/AKT/GSK-3 β and Wnt/ β -catenin. The improvement of learning and memory functions was proven via animal experiments by treatments. These results were supported by ELISA, histology, and immunohistochemical analyses.

Conclusion: The effectiveness of CNPF in AD was proven by *in vitro* and *in vivo* tests.

Keywords: Alzheimer's disease, Curcumin, Nanoparticle, Nanofiber, SH-SY5Y cells

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bellek ve benzeri zihinsel yeteneklerin bozulduğu demansın bir türü olan Alzheimer hastalığı (AH); hafıza kaybı ve bilişsel gerileme gibi hastalığa özgü semptomlarla kendini gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır ve dünya genelinde milyonlarca insanın hayatını olumsuz yönde etkilemektedir (Ayodele ve ark., 2021; Pentkowski ve ark., 2021). Hastalığın preklinik, hafif, orta ve ileri derece olmak üzere 4 farklı evresi bulunmaktadır ve bu evrelerde hafıza kaybıyla birlikte yeni bilgileri hatırlayamama, bir şeyleri ve randevuları unutma, problem çözme, muhakeme ve yürütücü işlevlerde bozulmalar, kişilik değişiklikleri ve ruh hali değişimleri, kafa karışıklığı ve oryantasyon bozukluğu, sosyal ortamlardan geri çekilme, dil ve görsel-mekansal becerilerde bozulmalar ve günlük aktivitelerindeki bireyselliklerini tamamen kaybetme gibi belirtilere rastlanmaktadır (Kosel ve ark., 2020; Calabrò ve ark., 2021; Gaugler ve ark., 2022). Bu hastalığın patolojisi araştırıldığında ise Amiloid β ($A\beta$), tau, kolinerjik nöron hasarı, oksidatif stres, inflamasyon vb. birçok hipotez geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın kabul edilenleri ise $A\beta$, tau hiperfosforilasyonu ve kolinerjik hipotezdir ve bu hipotezlerde, hastalığın gelişmesiyle öğrenme, hafıza ve mekansal navigasyon gibi bilişsel işlevlerden sorumlu yapılar olan hipokampus ve korteksin etkilendiğinin üstünde durulmuştur.

Vücudun en önemli organlarından biri olan beyin, kan beyin bariyeri (KBB) olarak isimlendirilen ve perisit, astrosit, nöron ve mikrogial hücreler tarafından çevrili oldukça seçici bir bariyer tarafından korunmaktadır. Bu bariyer beyne inflamasyon, hastalık etkenleri, ksenobiyotikler, terapötik ve patojenlerin girişini engellerken düşük molekül ağırlığına (<500 Da) sahip lipofilik moleküllerin ve birkaç hidrojen bağı vericisi ve/veya alıcısı maddelerin fizyolojik koşullar altında geçişini sağlayarak beyni olası tehlikelere karşı korumaktadır (Altıntaş ve Benbir, 2004; Zhao ve ark., 2022).

Hastalığın tedavisinde kullanılan bu ilaçlardan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı olanlar asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChI) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olarak 2 gruba ayrılmıştır. Bu tez çalışmasında en yaygın kullanılan ilaç sınıfından olan AChI'lerden donepezil (DO) pozitif kontrol grubu olarak seçilmiştir. DO, beyindeki asetilkolin düzeyini artırarak bilişsel semptomları hafifletir ve günlük yaşam aktivitelerinde belirgin bir fayda sağlayabilir. Günümüzde DO oral bir formülasyon olarak uygulanmaktadır ve uygulamayı takiben ishal, mide bulantısı gibi çeşitli gastrointestinal yan etkilere sebep olmaktadır. Ek olarak KBB, hidrofilik DO'nun beyne iletilmesinde bir sınırlama oluşturmaktadır. Bu sebeple AH'ye sahip hastaların beyindeki DO konsantrasyonunu

arttırmaya yardımcı olmak için etkili bir alternatif tedavi stratejisinin geliştirilmesi gerekmektedir (Al Harthi ve ark., 2019; Kaur ve ark., 2020).

Günümüzde AH tedavisinde varolan tedavi stratejilerine ek olarak yeni doğal bileşiklerin etkileri de AH tedavisinde araştırılmaktadır. Halk arasında zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* tropikal iklimde yetişen, sarı çiçekli ve geniş yapraklı, otsu çok yıllık bir bitkidir. Kurutulmuş toz haline getirilen zerdeçal köklerinin özü curcumin (CUR) bileşenlerinden oluşan kurkuminoidler içerir. CUR'un AH'ye karşı çoklu mekanizmalar yoluyla etki ettiği düşünülmektedir. Bu mekanizmalar; A β , tau hiperfosforilasyonu ve asetilkolinesteraz oluşumunu inhibe etmesi, mikrogliayı modüle etmesi; metali şelatlaması, E vitamininden birkaç kat daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması, insülin sinyal yolağını düzenlemesi ve kolesterolü düşürmesidir (Lim ve ark., 2001; Mengxi Tang ve Changiz Taghibiglou, 2017; M. Tang ve C. Taghibiglou, 2017; Voulgaropoulou ve ark., 2019). Ancak CUR kullanımında karşılaşılan en temel sorunlar, olağanüstü derecede düşük suda çözünürlüğe sahip olmasıdır, bu da vücuttan hızla atılmasına ve düşük oral biyoyararlanıma sahip olmasına sebep olmaktadır (Ege, 2021).

CUR'un anti-Alzheimer etkinliğini en çok fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt)/glikojen sentaz kinaz-3'ün (GSK-3 β) ve Wnt/ β -katenin yolları üzerinden sürdürdüğü düşünülmektedir. PI3K/Akt/GSK3 β yolağının tau hiperfosforilasyonu ve senil plak birikimlerinin sebep olduğu mikrotübül yapısında meydana gelen deformasyonlar sonucu hücre ölümleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tzeng ve ark., 2022). Wnt/ β -katenin yolağı ise, nöronal sağkalımı ve nörojenezi destekler, sinaptik plastisiteyi artırır, KBB bütünlüğü ve işlevini sağlar, A β üretimini/agregasyonunu ve tau fosforilasyonunu baskılar ve nöroinflamasyonu giderir (Jia ve ark., 2019).

AH tedavisinde terapötik ajanların biyoyararlanımını artırarak hastalık üzerinde çok yönlü bir etki oluşturmak oldukça önem kazanmaktadır. Bu amaçla çağımızın en önemli araştırma ve uygulama alanlarından biri olan nanoteknolojiden yararlanılmakta ve çok sayıda yeni ilaç taşıyıcı sistem ve tedavi seçenekleri geliştirilmektedir (Nasrollahzadeh ve ark., 2019). İlaçların belirlenen doku veya organa özgü bir şekilde hedeflendirilebilmesi, bir nanotaşıyıcıya iki veya daha fazla etkin maddenin bağlanabilmesi ve tedavinin etkinliğinin takibinin yapılabilmesi nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarından (Farokhzad ve Langer, 2009). Bu sebeple bu tez çalışmasında PLGA/PEG nanopartikülleri üretilmiş ve terapötik ajan olarak da bu nanopartiküllerin içerisine CUR yüklenmiştir. Sublingual uygulamaya uygun hale getirmek

ve doğru dozda uygulayabilmek için de bu ilaç yüklü nanopartiküller PVP/PEG nanofiberlerin içerisine gömülmüştür. Fiber üretiminde kullanılan teknik ise birçok üstünlüğü sebebiyle basınçlı döndürme (pressurized gyration, PG) sistemidir.

İlaç uygulama yollarından sublingual uygulamada ilaç, dilaltı uygulaması sonrası kan kapilleri ve lenf damarlarınca zengin olan oral mukoza tarafından emilir ve sonrasında süperior vena kava ile kalbe getirilir ve kalp aracılığıyla sistemik dolaşıma pompalanır. Böylece ilaç; gastrointestinal sistemdeki enzimlerin etkilerinden, mide asiditesinden, karaciğerin ilk geçiş etkisinden korunarak biyoyararlanımı düşmeden sistemik dolaşıma ulaşmış olur. Ayrıca hızlı ve etkili tedavide hastaya sunulan diğer üstünlüklerdendir (Verma ve ark., 2010; Nibha ve Pancholi, 2012).

Bu tez çalışmasında yukarıda bahsi geçen bilgilerin ışığında AH'nin tedavisi için kullanılmak üzere radikal bir tedaviyi literatüre kazandırabilmek adına yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu yeni ilaç taşıyıcı sistem ile asıl amaç AH tedavisinde başarısız olunmasında en büyük etken olan KBB'den geçişteki problemleri hedeflendirme ile çözmek, tedavide kullanılan ilacın biyoyararlanımını artırmak, FDA tarafından onaylı ilaçlara bitkisel kaynaklı bir etken maddenin eklenebilmesi için yeni veriler sunmak, ilacın dozunu ve dozlama sayısını düşürerek istenmeyen yan etkileri minimuma indirmek ve ilaç uygulama yollarından sublingual yol tercih edilerek sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarını artırmaktır. Bu sebeple AH tedavisinde farklı etki mekanizmalarına sahip CUR, çift emülsiyon yöntemi kullanılarak üretilen PLGA/PEG nanopartikülleri içerisine enkapsüle edilmiştir. Daha sonrasında sublingual uygulamada ilaç taşıyıcı sistemin doğru dozda ve kolay uygulanabilmesi için üretilen PLGA/PEG nanopartiküller yenilikçi PG tekniğiyle üretilen PVP/PEG nanofiberlerinin içerisine gömülmüştür. Bu ilaç yüklü nanopartikül gömülü nanofiberlerin fizikokimyasal yapıları (kimyasal, kristal, termal, morfolojik yapılar) yapılan Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışını toz kırınımı (XRD), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), taramalı elektron mikroskobu (SEM) testleri ile analiz edilmiştir. *In vitro* ilaç salım testi ile ilaç taşıyıcı sisteme yüklenen CUR'un salınımı test edilirken *in vitro* salım kinetiği analizi ile ilacın hangi kinetik modele uygun olarak salındığı belirlenmiştir. Yapılan disintegrasyon testi ile nanofiberlerin sublingual uygulamaya uygunluğu kanıtlandı. CUR nanopartiküller için degradasyon testi yapılarak vücut içerisinde ne kadar zamanda ne kadar bozunma oranı gösterdikleri bulunmuştur. Ayrıca zeta potansiyel analizi ile de nanopartiküllerin itme ve çekme kuvvetlerini analiz edilmiştir. Sonrasında geliştirilen bu yeni ilaç taşıyıcı sistemin AH

tedavisindeki etkinliği *in vitro* hücre kültürü ve *in vivo* hayvan testleri ile analiz edildi. *In vitro* hücre kültürü SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılarak yapıldı. AH, SH-SY5Y hücrelerine A β ile indüklendi. Sonrasında tedavi edici ajan olarak CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül (CNP) gömülü PVP/PEG nanofiber (CNPF) 3 farklı dozda denenerek CNPF'nin anti-Alzheimer etkinliği picogreen test ile değeriendirildi. Aynı zamanda hücre canlılığı da yine SH-SY5Y hücrelerinde picogreen test ile analiz edildi. Aynı zamanda geliştirilen yeni ilaç taşıyıcı sistemin AH'nin tedavisinde Wnt/ β -katenin ve PI3K/Akt/GSK3 β yolaklarından hangisini kullanarak etki gösterdiği PCR testi ile test edildi. *In vitro* hücre kültürünün ardından yapılan *in vivo* hayvan deneyleri ile CNPF'nin anti-Alzheimer etkinliği, sıçanlarda A β ile indüklenmiş AH modelinde davranış testleri ile değeriendirildi. ELİSA, histoloji ve immunohistokimyasal analizlerle de bu sonuçlar desteklenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler

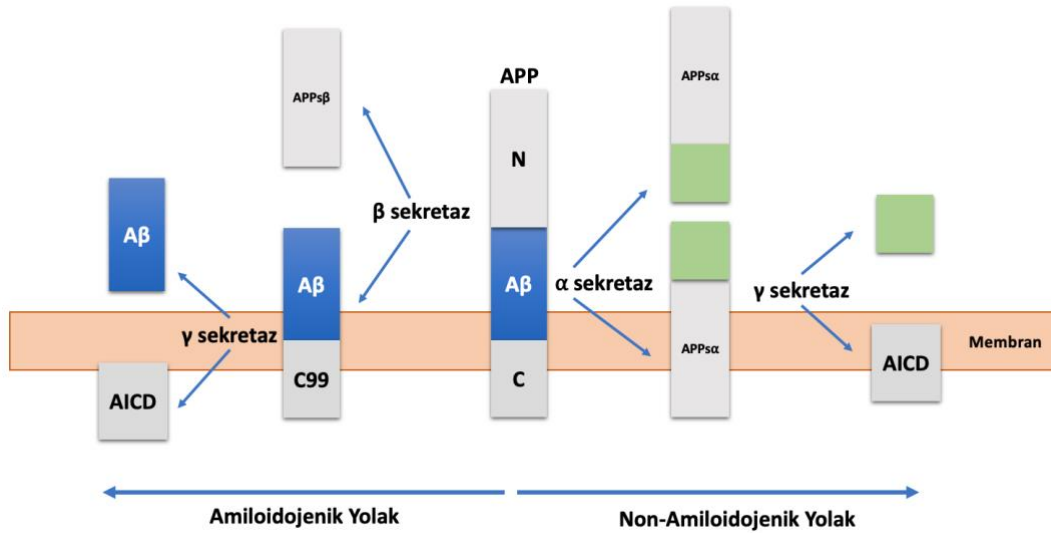
Demans, bellek ve benzeri zihinsel yeteneklerin bozulduğu, günlük bilişsel işlevlerin düşüşüyle karakterize edilen bir hastalık kategorisidir. Dünya çapında yaklaşık 50 milyon insan demans ile yaşamaktadır. Demansın bir türü olan Alzheimer hastalığı (AH); hafıza kaybı ve bilişsel gerileme gibi işlevsel bozukluklara yol açan, demansın günümüzde %50-75'ini oluşturan nörodejeneratif bir hastalıktır (Ayodele ve ark., 2021; Pentkowski ve ark., 2021). Amerikan Alzheimer Derneği'nin 2022 yılı raporunda; Amerika'da 65 yaş ve üstü 6,5 milyon bireyin Alzheimer hastası olduğu, bu sayının 2060 yılına kadar 13,8 milyona ulaşabileceği tahmin edilmektedir. 2050 yılında ise dünya genelinde AH'ye sahip hastaların sayısının 107 milyona ulaşması beklenmektedir. Aynı zamanda 2022 yılında 65 yaş ve üstü AH'li bireyler için sağlık, uzun süreli bakım ve bakımevi hizmetleri için tahmini olarak toplam 321 milyar dolar harcandığı belirtilmektedir (Calabrò ve ark., 2021; Gaugler ve ark., 2022).

Hastalığın 4 farklı evresinden bahsedilebilir. Bunlar ; Preklinik, hafif, orta ve ileri derece AH'dir. Preklinik evresinde şiddetli semptomlar olmadığı için bu aşamalar genellikle göz ardı edilir ve bu evre hafif bilişsel bozukluk olarak da sınıflandırılabilir. Bu aşamada uzun süreli bellek görece korunurken hafif bir bellek kaybı görülür. Günlük aktivitelerinde önemli bir bozulma yoktur. Hafif AH evresinde ise bilişsel belirtiler ortaya çıkmaya başlar. Patolojik değişiklikler bu aşamada serebral kortekse ulaşır. Semptomolojik açıdan, hafıza kaybının yanı sıra, yeni bilgileri hatırlayamama, bir şeyleri ve randevuları unutma, ardından problem çözme, muhakeme ve yürütücü işlevlerde bozulmalar görülür. Ayrıca hastalar kişilik değişiklikleri ve ruh hali değişimleri gösterirler. Ayrıca, kafa karışıklığı ve oryantasyon bozukluğu durumları yaygın olarak görülür. Orta derecede ise semptomların şiddeti daha da artar. Patolojik hasar, dil, muhakeme ve duyuşal işlemlerden sorumlu alanlara (serebral korteks) daha da yayılır. Diğer evrelerdeki semptomların şiddetinin artmasının dışında, davranış sorunları ve sosyal geri çekilme eğilimleri ortaya çıkmaya başlar. Bunu dil bozukluğu ve görsel-mekansal becerilerde bozulma izlemektedir. Dikkat çekici bir şekilde, bu aşamadaki hastalar sevdiklerini tanımakta güçlük çekerler. En son evre olan şiddetli AH evresinde ise hastalar günlük aktivitelerindeki bireyselliklerini tamamen kaybederler. Bu aşamadaki patolojik hasarın tüm korteks alanlarını kapsadığına inanılmaktadır. Hastaların bilişsel yetenekleri en düşük seviyeye ulaşır, öğrenilmiş motor görevleri yerine getirmede zorluk (dispraksi), koku alma bozukluğu, uyku bozuklukları,

distoni, akatizi ve parkinson gibi ekstrapiramidal motor belirtiler dahil olmak üzere başka sistemik belirtiler ortaya çıkmaya başlar (Kosel ve ark., 2020; Calabrò ve ark., 2021; Gaugler ve ark., 2022).

4.2. Alzheimer Hastalığında Öne Sürülen Hipotezler

AH, birçok faktörü içeren karmaşık bir hastalıktır. İnsan beyninin karmaşıklığı, günümüzde kullanılan hayvan modellerinin ve araştırma araçlarının eksikliği nedeniyle, AH'nin ayrıntılı patogenezi şu ana kadar hala belirsizdir. Amiloid β ($A\beta$), tau, kolinerjik nöron hasarı, oksidatif stres, inflamasyon vb. dahil olmak üzere AH hakkında birçok hipotez geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın kabul gören 3 tanesi $A\beta$, tau hiperfosforilasyonu ve kolinerjik hipotezdir. $A\beta$ hipotezi; merkezi sinir sisteminde $A\beta$ plaklarının anormal birikiminin demans ile güçlü bir korelasyonu olduğunu ileri sürer. Amiloid prekürsör protein (Lingappa ve ark.) α -, β - ve γ -sekretaz aracılığıyla bölünebilir. $A\beta$ peptit üretiminden β - ve γ -sekretazlar sorumludur. APP, β -sekretaz tarafından bölündükten sonra dış alan ($APPs\beta$) ve zara bağlı karboksil terminal parçası (C99) olmak üzere iki kısım ortaya çıkar. Daha sonra C99'un, γ -sekretaz tarafından bölünmesinin ardından $A\beta$ proteini oluşur. İlerleyen yaş veya patolojik koşullarla birlikte oluşan bu $A\beta$ peptitler ($A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$) vücuttan uzaklaştırılmaz veya elimine edilemez. Bunun sonucunda $A\beta$ peptitlerin birikmesi veya $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranının artmasıyla $A\beta$ fibril oluşumu indüklenerek nörotoksisite ve tau patolojisi indüksiyonuna ve sonuç olarak nöronal hücre ölümüne ve nörodejenerasyona yol açar (Y.-w. Zhang ve ark., 2011; Menting ve Claassen, 2014; Pentkowski ve ark., 2021).



Şekil 1. $A\beta$ peptitlerin üretilmesi (Menting ve ark., 2014'ten yararlanılarak hazırlanmıştır)

Tau hipotezi, beyin hücrelerinde AH'ye neden olan anormal protein birikimi ile ilgilidir. Tau proteinleri, sinir hücreleri içerisinde hücrenin şeklini korumak, hücre içi taşımacılığı düzenlemek ve sinir iletimini sağlamakla görevli mikrotübül yapılarının stabilitesini ve esnekliğini korurken aynı zamanda aksonal taşımayı düzenler ve aktin filament oluşumunu destekler. Sağlıklı hücrelerde tau, mikrotübül birleştirme alanında birden fazla fosfat grubu taşır. Ancak AH varlığında tau proteinleri anormal bir şekilde değişime uğrar ve beyin hücrelerindeki mikrotübüllere bağlanarak bu yapıların istenmeyen düğümlere ve fibril denilen lif benzeri bir yapıya dönüşmelerine neden olur. Bu anormal birikimler, nöronların doğru şekilde iletişim kurmasını ve işlevlerini yerine getirmesini engeller. Tau proteininin anormal birikimi, beyinde özellikle hipokampus ve korteks gibi hafıza ve bilişsel işlevlerin kontrol edildiği bölgelerde yoğunlaşır. Bu nedenle AH'nin erken dönemlerinde özellikle hafıza sorunları gözlenir (Mohandas ve ark., 2009; Kametani ve Hasegawa, 2018; Zeinab Breijyeh ve Rafik Karaman, 2020).

Bir diğer hipotez ise kolinerjik hipotezdir. AH'nin altında yatan mekanizmalardan biridir ve hastalığın nörotransmitter sistemi üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Bu hipotezde, beyindeki asetilkolin nörotransmitterin azalmasıyla AH arasında bir ilişki olduğu öne sürülür. Sağlıklı bir beyinde asetilkolin; öğrenme, hafıza ve dikkat gibi bilişsel işlevlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Ancak AH'de, beyin içinde asetilkolin salınımı ve etkisi azalır. Bu azalma, nöronlar arasındaki iletişimin bozulmasına ve bilişsel işlevlerin kaybına yol açabilir (Hampel ve ark., 2018; Chen ve ark., 2022).

AH'nin oluşumu hakkında geliştirilen hipotezlerde bahsedilen anormal protein birikimleri, hastalık sürecinde özellikle beyin korteks ve hipokampus bölgelerini etkiler. Hipokampus, beyin iç kıvrımlı yapısında medial temporal lobunda yer alan limbik sistem bölgesindedir. Özellikle öğrenme, hafıza ve mekansal navigasyon gibi bilişsel işlevlerden sorumlu bir yapıdır. Hafızanın hayati bir bölgesidir ve beyin bu kısmı yetişkin nörojenezini gösterir. Yaşlılıkta hipokampus, AH gibi nörodejeneratif bozukluklarda da görülen bilişsel gerilemeden etkilenir. Hastalığın erken dönemlerinde, hipokampüste anormal protein birikimi ve sinir hücrelerinin hasar görmesi gözlenir. Bu nedenle Alzheimer hastalarında özellikle yeni anılar oluşturma ve uzun süreli bellek gibi hafıza işlevlerinde bozulma görülür. Hipokampusun erken dönemde etkilenmesi, AH tanısında önemli bir göstergedir (Rao ve ark., 2022). Korteks, beyin yüzeyinin dış katmanıdır ve bilişsel işlevlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. AH'nin ilerleyen aşamalarında, anormal protein birikimleri korteks içinde daha yaygın hale gelir ve korteks

hücrelerini etkiler. Bu, bilişsel işlevlerde daha geniş kapsamlı bozulmalara ve hafıza kaybına yol açar. Korteks, AH'nin neden olduğu bilişsel bozulmanın önemli bir merkezidir (Olajide ve ark., 2021).

4.3. Kan Beyin Bariyeri Hakkında Genel Bilgiler

Sinir sisteminin merkezi olan ve vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan beyin yaklaşık 1 trilyon glial hücre, 100 milyar nöron ve kan damarlarından meydana gelir ve vücutta tüketilen oksijen ve glikozun yaklaşık %20'si burada harcanır. Yaklaşık 644 km uzunluğa, 20-30 m² yüzey alanına sahip kan damarları beyin hücrelerini beslerken aynı zamanda beyindeki metabolik atıkların ve karbondioksit (CO₂)'nin sistemik dolaşıma taşınmasını sağlar. Beyindeki bu mikro ortamı ve homeostazı koruyabilmek ve beyni dolaşımdaki zararlı maddelerden uzak tutabilmek için beyin dokusu ile serebral dolaşım arasında fiziksel ve metabolik bir engel vardır (Altınsoy ve Dikmen, 2023). Kan beyin bariyeri (KBB) olarak isimlendirilen ve perisit, astrosit, nöron ve mikrogial hücreler tarafından çevrili bu bariyer oldukça seçicidir ve inflamasyonun, hastalık etkenlerinin, ksenobiyotiklerin, terapötiklerin ve patojenlerin beyne girişini engellerken düşük molekül ağırlığına (<500 Da) sahip lipofilik moleküllerin ve birkaç hidrojen bağı vericisi ve/veya alıcısı maddelerin fizyolojik koşullar altında geçişini sağlar. Aktif iki yönlü transport mekanizmasını sağlayan taşıyıcılar, reseptörler, sıkı bağlantı noktaları (tight junctions, adherens junctions ve junctional proteinler) ve ilaçları metabolize eden enzimler ideal KBB'nin seçici geçirgenliği için sahip olması gereken özelliklerdendir (Altıntaş ve Benbir, 2004; Zhao ve ark., 2022). Böylece glikoz, amino asitler, nükleositler ve bazı nörotransmitterler taşıyıcı aracılı taşıma yoluyla beyne girişine izin verirken küçük moleküllü ilaçların %98'inden fazlasını ve tüm makromoleküler terapötiklerin beyne girişini engeller (D. Wu ve ark., 2023). Merkezi sinir sistemindeki bu seçici geçirgen bariyer sebebiyle nörolojik hastalıkların tedavisinde ilaçların beyne ulaşması güçleşmektedir. Bununla birlikte metabolizma, çevrede maruz kalınan toksinler, anestezi maddeler, bağırsak mikrobiyotası, stres, bradikinin, P maddesi, beslenme, histamin, yaşlanma, sirkadiyen ritim gibi faktörler KBB'nin geçirgenliğinde ve hücreler arası etkileşimde rol almaktadır (Zhao ve ark., 2022).

10-15. embriyonik günde meydana gelen KBB'de, paraselüler akışı kesmek için ilk olarak endotel hücre zarı oluşurken transselüler akışı sınırlandırmak için ise pinositoz ve fenestralar ortadan kalkar. Sonrasında toksik maddelerin beyne girmesini engellerken beyin ve periferik doku arasında metabolit ve besin maddelerinin aktarımına izin veren seçici geçirgen taşıyıcı sistemler kurulur. En son basamak olarak perisitler, endotel kapiler duvarı ve bazal membranda

bariyeri güçlendirmek için özelleşirler. KBB nörovasküler ünitelerden oluşur. Bu sistemde dolaşımdaki kan bileşenleri, endotel hücreler, astrosit son ayaklar, bazal lamina, perisit, tight junctionlar, internöronlar ve mikroglialardan oluşur. Bu sistem nöronlar arası iletişimi, KBB'nin geçirgenliğini, hücre-matriks etkileşimlerini, nörojenezi ve anjiyogenezi düzenler (Lochhead ve ark., 2020; Zhunushova, 2020; Altınsoy ve Dikmen, 2023).

KBB'nin kılcal damarları, silindirik bir kan damarı oluşturmak üzere kendi üzerine katlanan mezodermden türetilen basit, tek bir epitel hücre tabakasından oluşur. Epitel hücreler, serebral dolaşımdaki maddelerin paraselüler yarıktan beyne girmesini veya çıkmasını önlemek için sıkı bağlantı noktaları olan tight junctionlar ile birbirine bağlanır. Taşıyıcı proteinler aracılığıyla büyük ve/veya polar moleküllerin damar lümeninin içine veya dışına hareketi ile nörotoksinlerin ortadan kaldırılması veya glikoz gibi temel biyomoleküllerin konsantrasyonlarının en üst düzeye çıkarılmasında önemlidir. Bu benzersiz düzen, farklı apikal ve bazolateral yüzlere sahip polarize endotel hücrelerin oluşmasını sağlar. Bu hücreler, genellikle bileşiklerin gerekirse ATP harcanarak konsantrasyon gradyanına karşı taşınmasını sağlayan seçici bir fiziksel ve kimyasal bariyerdeki aktivitelerine göre periferik endotel hücrelerden daha fazla mitokondri içerir (Sharif ve ark., 2018).

Perisitler, kılcal damarların duvarları boyunca aralıklarla bulunan hücrelerdir. Santral sinir sisteminde kan damarı oluşumu, anjiyogenezi, bağışıklık hücresi girişinin düzenlenmesi, KBB'nin korunması, toksik ürünlerin beyinden uzaklaştırılması ve beyin kan akışının kontrolü için önemlidirler (Attwell ve ark., 2016). Astrositler, bazal zarın dışını kaplayan, hücre zarlarının ayak benzeri uzantıları olan glial hücrelerdir. Genellikle KBB mikro ortamı içindeki bakımla ilgili işlevleriyle tanınırlar. Bunlar, elektrokimyasal aktivitenin izlenmesini, doğuştan gelen bağışıklık düzenlemesini ve parankimal su ve metabolitlerin dengesini içerir (Sharif ve ark., 2018). KBB'de bir diğer hücre tipi de perivasküler makrofajlar ve mikroglialardır. Perivasküler makrofajlar monositlerden türevlenirler ve beyinde Virchow-Robin alanı içinde abluminal tarafta bulunur. İki hücre tipi de kalıntıları, patojenleri ve atık ürünleri fagosite eder. Ayrıca KBB boyunca damar dışına çıkabilirler. Bazal membran, vasküler tüpü ve perisitleri çevreleyen hücre dışı matrisi oluşturan ve astrosit uç ayakları ile doğrudan temas halinde olan karmaşık bir yapıdır. Sadece 30-40 nm kalınlığında olmasına rağmen kolajen IV, fibronektin, heparin sülfat, proteoglikanlar ve lamininler gibi yapısal destek molekülleri açısından zengindir. Bazal membran vasküler ve parankimal olmak üzere iki katmana ayrılabilir. Tight junctionlar KBB'deki sıkı bağlantı noktalarıdır. Beyne geçirgenlikte bariyer görevi görür ve

doku homeostazını kontrol etmede ana fonksiyonel bileşenlerdir. Hidrofilik moleküllerin ve makromoleküllerin çapraz geçişini kısıtlayabilen tıkayıcı bağlantılar olarak da bilinirler (D. Wu ve ark., 2023). Dolaşım sistemindeki maddelerin KBB'yi aşıp beyne geçişlerini etkileyen parametreler arasında maddenin lipit çözünürlüğü, elektrik yükü, molekül büyüklüğü ve taşıyıcılara bağlanma yeteneği vardır. Hidrofobik küçük moleküller (CO₂ ve oksijen gibi) transselüler lipofilik difüzyon ile KBB'den geçerken glikoz, küçük ara metabolitler ve aminoasit taşıyıcı aracılı kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınırken; insülin, diğer plazma proteinleri ve transferrin ise reseptör aracılı transitoz ya da adsorptif transitoz yoluyla taşınır (Altınsoy ve Dikmen, 2023).

4.4. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Dünya genelinde birçok insanın hayatını ciddi anlamda etkileyen AH'nin tedavisi için günümüzde radikal bir tedavi sağlanamamış olup geliştirilen tedavi stratejileri hastalığın semptomlarını hafifletmeye, ilerlemesini yavaşlatmaya ve yaşam kalitesini artırmaya yöneliktir. Bu tedavi yaklaşımları, farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedavileri içerebilir. Hastalığın tedavisinde kullanılan bu ilaçlardan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı olanlar asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChİ) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olarak 2 gruba ayrılmıştır. AChİ'ler (donepezil, rivastigmin, galantamin) AH tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç sınıfıdır. Bu ilaçların, beyindeki asetilkolin düzeyini artırarak bilişsel semptomları hafiflettiği ve günlük yaşam aktivitelerinde belirgin bir fayda sağlayabildiği gösterilmiştir. Donepezil (Aricept®) (DO) AH'nin tüm aşamalarını tedavi etmek için onaylanmıştır. Günümüzde DO oral bir formülasyon (5-10 mg) olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte, DO'nun oral uygulaması, ishal veya mide bulantısı gibi çeşitli gastrointestinal yan etkilere neden olur. Ek olarak KBB, hidrofilik DO'nun beyne iletilmesinde bir sınırlama oluşturur. Bu bariyer, ilaçların yüksek konsantrasyonda beyne geçişini engeller. Bu nedenle, DO'nun hidrofilik doğasını maskeleyen ve Alzheimer hastasının beynindeki DO konsantrasyonunu artırmaya yardımcı olmak için etkili bir alternatif tedavi stratejisinin geliştirilmesi gerekmektedir (Al Harthi ve ark., 2019; Kaur ve ark., 2020). Rivastigmin (Exelon®) hafif ile orta dereceli AH'nin yanı sıra Parkinson hastalığı ile ilişkili hafif ile orta dereceli demans için onaylanmıştır. Galantamin (Razadyne®) ise AH'nin hafif ile orta dereceli evreleri için onaylanmıştır. Genellikle iyi tolere edilse de, yan etkilerin ortaya çıktığı durumlarda bunlar genellikle mide bulantısı, kusma, iştahsızlık ve bağırsak hareketlerinin sıklığının artmasıdır. Memantin ise bir NMDA reseptör antagonistidir. İlaç, NMDA

reseptörlerini bloke ederek, beyindeki glutamat sinyalini düzenlemeye yardımcı olur ve hafif veya orta derecede AH semptomlarını tedavi etmeye çalışır. Araştırmalar, memantinin bilişsel işlevleri ve yaşam kalitesini iyileştirebileceğini ve hasta bakımını kolaylaştırabileceğini göstermektedir. Memantin (Namenda®) orta ile şiddetli AH tedavisi için onaylanmıştır ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023).

AH sadece hafıza ve düşünmeyi değil bilişsel olmayan semptomları (davranışsal ve psikolojik semptomlar) da etkiler. Bir kişinin yaşam kalitesi; bunamaya eşlik eden uyku bozuklukları, ajitasyon, halüsinasyonlar ve sanrılar gibi çeşitli davranışsal ve psikolojik belirtilerden de etkilenebilir. Bazı ilaçlar bir süreliğine bu bilişsel olmayan semptomları tedavi etmeye odaklanır, ancak ilaçları eklemekten önce davranışları yönetmek için ilaç dışı stratejileri denemek önemlidir. Şu anda FDA, bunama ile yaşayan insanlarda uykusuzluğu gidermek için bir ilacı onayladı, ancak diğer bilişsel olmayan semptomları ele alan ilaçlarla ilgili denemeler sürüyor. Bu ilaç Suvorexant (Belsomra®) uykusuzluk tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır ve klinik araştırmalarda hafif hastalıkla yaşayan insanlar için etkili olduğu gösterilmiştir ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023). Aynı zamanda destekleyici tedavi olarak bilişsel egzersizlerin, müzik ve sanat terapisinin, fiziksel aktivitenin ve sosyal etkileşimin de iyi geldiği düşünülmektedir (Fang ve ark., 2017).

FDA devam eden çalışmalarının ardından yakın zamanda iki yeni ilaca daha AH tedavisi için onay vermiştir. Bunlar Aducanumab (Aduhelm™) ve Lecanemab (Leqembi™)'tir. Aducanumab; AH'ye bağlı hafif bilişsel bozukluk veya hafif demans ile yaşayan insanlar da dahil olmak üzere, erken AH için onaylanmış bir anti-amiloid antikor intravenöz infüzyon tedavisidir. Lecanemab da erken AH tanısı konmuş hastalar için onaylanmış bir anti-amiloid antikor intravenöz infüzyon tedavisidir. Ayrıca hastaların beyinlerinde yüksek Aβ plakların varlığının doğrulanması gerekmektedir. En sık bildirilen ciddi yan etkiler infüzyonla ilişkili reaksiyonlar ve genellikle semptomlara neden olmayan ancak ciddi olabilen yaygın bir yan etki olan amiloidle ilişkili görüntüleme anormallikleridir. Tipik olarak beyin bölgelerinde geçici bir şişlik meydana gelebilir, genellikle zamanla düzelir ("2023 Alzheimer's disease facts and figures," 2023).

4.5. Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Bitkisel Yaklaşımlar

Hastalığın tedavisinde kullanılan bitkisel yaklaşımlardan en yaygın olanları ise zerdeçal (Curcuma longa) ve ginkgo biloba ekstresidir. Ginkgo biloba özü şu anda bilişsel bozukluklar için en çok araştırılan bitkisel tedavilerden biri olan yaşayan bir fosil ağaçtır. Ginkgo biloba

potansiyel olarak boşluk kavşaklarını (gap junction) aktive eder ve adenosin reseptörü aktivasyonu yoluyla KBB'nin paraselüler geçirgenliğini geliştirir. Bu, Ginseng'in aktif bileşenlerinin beyin dokusunda dağılımını teşvik edebilir. Ayrıca, önceki çalışmalar, ginkgo bilobadaki flavonun, beyinde birlikte uygulanan ilaçların konsantrasyonunu artırmaya yardımcı olabilecek bir P-glikoprotein inhibitörü olabileceğini göstermiştir (Assi ve ark., 2023).

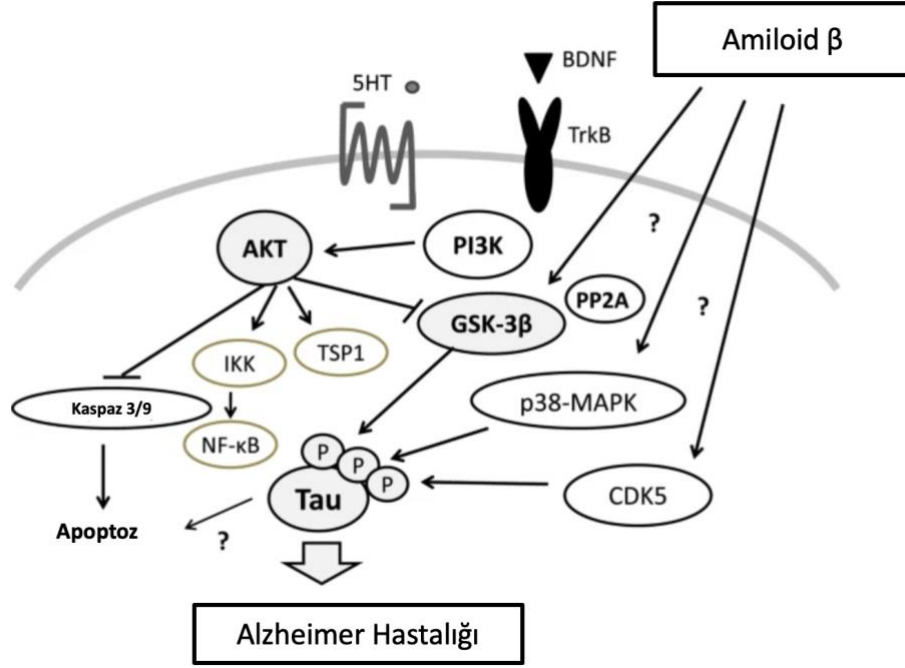
Halk arasında zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* tropikal iklimde yetişen, sarı çiçekli ve geniş yapraklı, otsu çok yıllık bir bitkidir. Bu bitki İran'da oldukça önemli bir baharat olmakla birlikte Malezya, Hindistan, Çin, Polinezya ve Tayland'ta sarı rengini verdiği körilerin, Batı'da ise hardal ve sosların önemli bir bileşenidir. Zerdeçal ayrıca pirinç, makarna, et ve sebze yemekleri ile salatalara lezzet ve renk katmak için kullanılır. Zerdeçalın en az 2500 yıldır çeşitli hastalıkların tıbbi tedavisinde çoğunlukla Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanıldığı ve Ayurveda ve geleneksel Çin tıbbında çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için birçok faydası olduğu belirtilmektedir. Zerdeçalın bileşimi karbonhidrat (%69,4), protein (%6,3), yağ (%5,1), mineral (%3,5) ve nemdir (%13,1). Kurutularak toz haline getirilen zerdeçal köklerinin özü ayrıca curcumin (CUR) bileşenlerinden oluşan kurkuminoidler içerir. Kurkuminoidler, CUR (%77), demetoksicurcumin (%17) ve bidemetoksicurcumin'den (%3) oluşur. Zerdeçalın tıbbi tedavideki önemi, öncelikle en aktif bileşeni olan turuncu-sarı renkli CUR'dan kaynaklandığı kabul edilse de diğer kurkuminoid bileşenlerinin de biyolojik aktiviteleri olduğu belirtilmektedir. CUR'un kimyasal yapısı (5-hidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on)'dur (Kocaadam ve Şanlıer, 2017; Nouredin ve ark., 2019). CUR, zerdeçal tozunun %2-5'ini oluşturan lipofilik bir polifenol maddesidir. CUR ile ilgili yapılan çalışmalar ile bu polifenol maddesinin kimyasal yapısının antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, antianjiyojenik, antimitojenik ve antiplatelet agregasyon özellikleri gösterdiği belirlenmiştir. Bu özellikleri sayesinde CUR'un kanser, otoimmün, nörolojik, metabolik, akciğer, karaciğer, kas-iskelet, cilt ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve önleyici etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Son zamanlarda başta kanser olmak üzere çeşitli dejeneratif hastalıklar üzerindeki etkileri nedeniyle polifenol maddelere büyük önem verilmektedir. CUR'un nörolojik faydaları AH, Parkinson hastalığı, beyin tümörleri, multipl skleroz, travmatik beyin yaralanmaları, iskemi ve depresyon için geçerlidir ve bu da onu AH'ye karşı en umut verici doğal terapötik ajanlardan biri yapar. Hindistan'da, diğer ülkelere kıyasla AH prevalansının daha düşük olması (Amerika Birleşik Devletleri'nden 4,4 kat daha düşük), daha yüksek CUR tüketimine bağlanmıştır. CUR'un AH'ye karşı çoklu mekanizmalar yoluyla

etki ettiği düşünölmektedir. Bu mekanizmalar; A β , tau hiperfosforilasyonu ve asetilkolinesteraz oluşumunu inhibe etmesi, mikrogliayı modöle etmesi; metali şelatlaması, E vitamininden birkaç kat daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması, insölin sinyal yolağını düzenlemesi ve kolesterolö düşürmesidir (Lim ve ark., 2001; Mengxi Tang ve Changiz Taghibiglou, 2017; M. Tang ve C. Taghibiglou, 2017; Voulgaropoulou ve ark., 2019).

Bununla birlikte, CUR'un kullanımında engellerle karşılanmaktadır. İlk olarak, olağanüstü derecede düşük suda çözünörlöğe sahiptir (sulu tampon pH 5'de 11 ng/mL), bu da vücuttan hızla atıldığı ve düşük oral biyoyararlanıma sahip olduğu anlamına gelir. Diklorometan, etil asetat, etanol, aseton, kloroform, dimetil sülfoksit ve metanol içinde çözünür. Suda düşük çözünörlöğü nedeniyle vücuttan hızlı bir şekilde atılır ve bu nedenle oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür (Ege, 2021).

4.6. Curcumin'in Alzheimer Hastalığının Tedavisindeki Etki Mekanizmaları

Anti-Alzheimer etkinlik gösterdiği iddia edilen CUR, birçok farklı etki mekanizmasına sahiptir. Bunlardan en çok tartışılan 2 yolağı ise fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt)/glikojen sentaz kinaz-3'ün (GSK-3 β) ve Wnt/ β -katenin yolaklarıdır. PI3K/Akt/GSK3 β yolağının tau hiperfosforilasyonu ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. AH'nin nörolojik özelliği, amiloid plak oluşumunun aşırı derecede artması ve serebral korteks ve hipokampusta birikerek nöronal hasara yol açması ve senil plaklara ve nörofibriler yumaklara neden olmasıdır. A β , tau proteininin hiperfosforilasyonunu indökeleyerek mikrotüböllerin yapısını etkiler ve hücre ölümüne neden olur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, GSK-3'ün nöronal iletimde yer aldığını da göstermiştir. GSK-3 proteininin iki homolog formu vardır. Bunlar; GSK-3 α ve GSK-3 β 'dir. Yetişkinlikte GSK-3 α ve GSK-3 β beyinde, özellikle hipokampus, serebral korteks ve serebellumda daha iyi performans gösterir. GSK-3 protein fonksiyonunun kaybı şizofreni, inme ve AH gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olabilir. Bu sebeple PI3K/Akt/GSK-3 β yolu da nöroproteksiyonda önemli bir rol oynar ve tau proteininin hiperfosforilasyonu ile ilişkili olduğundan AH'de çok önemlidir (Tzeng ve ark., 2022).



Şekil 2. PI3K/AKT/GSK-3 β yolağının şematik gösterimi (Kitagishi ve ark., 2014'ten yararlanılarak hazırlanmıştır)

Tau proteininin birçok geçiş konformasyonuna maruz kalabileceği ve her bir konformasyonun potansiyel olarak toksik bir etki gösterebileceği kanıtlanmıştır. İnsan beyinde yanlış katlanmış tau ara ürünlerinin birikmesi, AH'nin en yaygın formu olan tauopatilere neden olur. PI3K/AKT/GSK-3 β yolağı, tau'nun protein hiperfosforilasyonunu desteklediğinden AH için çok önemli görülmektedir. Özellikle, GSK-3 β , beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) transkripsiyonunu ve uzun süreli belleğin düzenlenmesinde ve sinaptik plastisitenin korunmasında önemli olan diğer nöropeptidleri düzenleyen cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteinin transkripsiyonel aktivitesini fosforile ederek strese verilen nöronal yanıtta önemli bir rol oynar ve böylece nöronal dejenerasyon patolojisine katkıda bulunur. Ayrıca, GSK-3 β , tau proteininin anormal hiperfosforilasyonunda rol oynayan en çok çalışılmış kinazdır. GSK-3 β 'nin aşırı aktivasyonu, Ser199, Ser202, Ser396 ve Ser422'deki artan tau fosforilasyonunu açıklayabilir, çünkü bu bölgeler esas olarak GSK-3 β tarafından katalize edilen fosforilasyon bölgeleridir (Yu ve ark., 2012). Akt inhibisyonu, Thr212, Ser214 ve Ser396'da tau fosforilasyonunun azalmasına katkıda bulunabilir çünkü bu üç bölge Akt'nin substratlarıdır. Akt fosforilasyonu esas olarak PI3K tarafından fosforile edilerek aktive olur ve aktifleşmiş Akt uyarılmamış hücrede defosforile formda aktif olarak bulunan GSK-3'ü fosforile ederek inaktive

eder ve böylece artmış fosforile GSK-3 β sonucu tau hiperfosforilasyonu engellenmiş olur (Kitagishi ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda GSK-3 β aktivasyonu ile bozulmuş kolinerjik fonksiyon arasında bir bağlantı gözlenmiştir. CUR uygulamasından sonra GSK-3 β 'nin deaktivasyonu (fosforilasyonu) ile kolinerjik aktiviteler artmıştır. Artan asetilkolin seviyeleri ile öğrenme, hafıza ve diğer bilişsel işlevlerde iyileşme gözürken AH tedavisinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Ege, 2021).

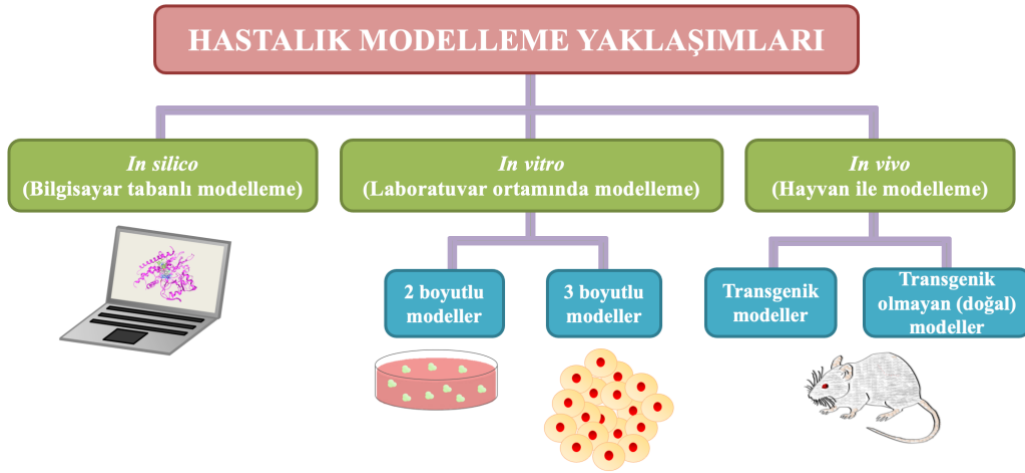
Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hücre proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyen önemli bir yolaktır ve Wnt proteinleri, memelilerde yetişkin kök hücrelerinin temel itici güçleridir. Çalışmalar, düzensiz Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin AH'nin patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Wnt/ β -katenin yolağının beyindeki fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki rollerine bakıldığında Wnt proteinleri, Frizzled reseptör ailesinin hücre dışı sistein açısından zengin alanına ve Wnt/ β -katenin sinyalini aktive etmek için Wnt yardımcı reseptörü olan lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 5 (LRP5) veya LRP6'ya bağlanan glikoproteinlerdir. Wnt ligandlarının yokluğunda, Disheveled protein (DVL), GSK3 β , adenomatöz polipozis koli (APC), kazein kinaz 1 (CK1) ve aksin içeren bir protein kompleksi β -katenin fosforilasyonuna aracılık eder ve β -katenin degrade olur. Wnt'nin Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine bağlanması, GSK3 β inhibisyonu ve sitozolik β -katenin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Stabilize β -katenin daha sonra çekirdeğe transloke olur, T-hücre faktörü/lenfoid artırıcı faktör (TCF/LEF) ile etkileşime girer ve spesifik hedef genlerin ekspresyonunu indükler. Wnt/ β -katenin sinyali, nöronal sağkalımı ve nörojenezi destekler, sinaptik plastisiteyi artırır, KBB bütünlüğü ve işlevi için gereklidir, β bölgesi APP parçalama enzimi (BACE1) ekspresyonunu inhibe eder ve A β üretimini/agregasyonunu baskılar, tau fosforilasyonunu baskılar ve nöroinflamasyonu giderir (Jia ve ark., 2019).

AH'nin bir diğer önemli özelliği, nöronlarda mikrotübül ile ilişkili protein tau'nun (MAPT) hiperfosforile formlarından oluşan hücre içi nörofibriler yumakların varlığıdır. GSK3 β , AH ile ilgili fosforilasyon bölgelerinde hiperfosforile tau proteini ile ilişkili önemli bir kinazdır. Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin aktivasyonu, GSK3 β aktivitesinin inhibisyonu ve ardından tau fosforilasyonunun baskılanması ile sonuçlanır. Aslında, Wnt antagonisti DKK1, Wnt/ β -katenin sinyalini inhibe edebilir ve hem tau hiperfosforilasyonunu hem de nöronal ölümü indükleyebilir. Buna karşılık, Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin aktivasyonu, A β ile indüklenen tau hiperfosforilasyonunu ve nöronal ölümü inhibe edebilir (Jia ve ark., 2019). Protein kinaz C (PKC), GSK-3 β 'yi serin 9 fosforilasyonu yoluyla inhibe eder ve sitoplazmik β -katenin

bozulmasını önler ve böylece siklin-D1 gibi Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Wnt-3a ve lityum PKC aktivasyonunu taklit ederler (Inestrosa ve Toledo, 2008). Presenilin (PSEN) eksikliği, Wnt kontrollü aksin kompleksinden bağımsız olarak β -katenin'in kademeli fosforilasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca, PSEN1 mutasyonları taşıyan AH hastalarında β -katenin ekspresyonu azalır ve AH ile ilişkili PSEN1 mutasyonları, β -katenin'in hücre içi etkilerinde bir bozulmaya neden olur, stabiliteyi azaltır ve/veya bozulmayı artırır (C. Gao ve ark., 2014).

4.7. Alzheimer Hastalığında Kullanılan Hastalık Modelleme Yaklaşımları

Literatürde AH'yi modellemek için araştırmacılar tarafından *in vivo*, *in vitro* ve *in silico* olmak üzere üç temel yaklaşım kullanılmaktadır. *In vivo* yaklaşımda model organizmalar olarak hayvanları içerirken, *in vitro* yaklaşımda genellikle 2 veya 3 boyutlu (2B, 3B) hücre kültürleri temel alınır. Buna karşılık *in silico* yaklaşım ise bilgisayar simülasyon ve modellemeleri kullanılarak etkin maddelerin vücuttaki üç boyutlu yapı aktivite ilişkileri, hedeflenen ve hedeflenmeyen biyomoleküllerle etkileşimleri, fizikokimyasal özellikleri, moleküler etki mekanizmaları gibi önemli birçok parametrenin değerlendirilmesidir.



Şekil 3. AH modellemesinde kullanılan yaklaşımlar (Ranjan ve ark., 2018'ten yararlanılarak hazırlanmıştır)

AH modellemelerinde *in vivo* hayvan modeli olarak çeşitli organizmalar kullanılmıştır. Bunlar; *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), meyve sineği (*Drosophila melanogaster*), zebra balığı, fare, sıçan ve primatlardır. Ancak gerekli ortam ve bakım şartları düşünüldüğünde bu organizmalar arasından en sık kullanılan iki tanesi kemirgen ailesine ait olan fareler ve sıçanlardır ve kendi aralarında iki kategoriye ayrılır. Bunlar transgenik (genelde insan kaynaklı

eksojen bir genin eklenmesiyle genetiği değiştirilmiş hayvanlar) ve transgenik olmayan (doğal) hayvan modelleridir. Bu hayvanların tercih edilme sebepleri küçük boyutlu ve yüksek doğum oranına sahip olmaları, kolay bakım şartlarının, düşük maliyetlerinin ve kısa üreme döngülerinin olması, hem genetik hem anatomik hem de yaşlanma süreçleri olarak insanlara benzemeleridir. Transgenik fareler literatürde en çok tercih edilen *in vivo* modeldir ve günümüzde 200'e yakın transgenik AH fare türü mevcuttur. Hastalığın Aβ plaklara bağlı gelişen sürecini yansıtmaya yardımcı olurlar. Aβ plak oluşumu insanlardaki gibi yaşa bağlı meydana gelirken oluşum süreci insanlarla karşılaştırıldığında daha hızlıdır. Aβ plak oluşumu öncesi hafıza ve bilişsel problemler de görülmektedir. *In vivo* AH modellemesi için en çok tercih edilen bir diğer kemirgen olan sıçanlar ise genetik, fizyolojik ve morfolojik özellikler olarak farelerle karşılaştırıldığında insanlara daha çok benzerler. Ayrıca beyinleri daha büyüktür ve buna bağlı olarak beyin omurilik sıvıları (BOS) da fazladır. Görüntüleme ve elektrofizyolojik deneyler daha kolay yapılırken daha kompleks davranışsal testleri yapmak da sıçanlarla mümkündür. Transgenik sıçan fenotipleri transgenik farelerle oldukça benzerdir. AH araştırmalarında transgenik olmayan (doğal) hayvan modellerinde nörotoksinler hayvan beyinlerine Paxino-Watson sıçan atlasında belirtilen koordinasyonlara uygulanarak AH modeli indüklenir (Ranjan ve ark., 2018; Başak ve ark., 2023). Bu amaçla AH indüklemeye kullanılan nörotoksinler; skopolamin, streptozotosin, sodyum azit, okadaik asit, lipopolisakkarit, ibotenik asit, indirgen şeker (D-galaktoz) ve yüksek doz etanol alkolün yanı sıra alüminyum (Al), bakır (Cu), çinko (Zn) ve kurşun (Pb) gibi ağır metallerdir (Mahdi ve ark., 2019).

Hayvan modellerinin AH modellemesinde kullanılmalarını kısıtlayan faktörler de vardır. Çeşitli hayvan türlerinde 20 yılı aşkın bir süredir yürütülen çok sayıdaki çalışmaya rağmen bu modeller ile AH'li insan beyni arasındaki korelasyonlarda çeşitli tutarsızlıklar gözlemlenmiştir. İlk olarak, çoğu AH vakası doğası gereği sporadiktir, yani çoklu genetik ve çevresel risk faktörleri nedeniyle kökenini tam olarak belirlemek zordur. Bununla birlikte, transgenik AH modelleri ise genellikle çok yaygın olmayan ailesel AH formlarıyla ilişkilidir; yani hastalığın otozomal dominant bir şekilde kalıtımı görülür. Aynı zamanda, ailesel AH formlarının mutasyonlarını kullanan AH transgenik fare modellerinin hiçbirisi aynı anda hem Aβ plakları hem de nörofibriler yumakları gösteremezler. Çoğunlukla Aβ plaklar ve Aβ kaynaklı hafıza bozuklukları oluşurken güçlü nörofibriler yumak patolojisi ve nöronal kayıp taklit edilemez. Bu sebeple nörofibriler yumakları modelleyebilmek için ek olarak nitrik oksit sentaz genine sahip olmayan transgenik fare soyları geliştirilmiştir. Ayrıca Aβ plak oluşumu öncesi

görülen bilişsel problemler insanlar da A β plak oluşumu sonrası görülür. Ek olarak, transgenik farelerde gözlemlenen AH patolojisinin fenotipleri, AH insan beyninde görülenden farklıdır. Muhtemelen bu modellerde mutasyona uğramış genlerin anormal derecede yüksek ekspresyon seviyeleri nedeniyle öngörülemez hücre cevaplarının aktivasyonu meydana gelir. Ayrıca fare ve sıçanlar canlı görüntüleme için uygun değildirler. Farelerde tau patolojisi görülmesi nadirdir ve sıçan ve primatlarla karşılaştırıldığında davranış biçimleri kısıtlıdır. Tüm bunlarla birlikte *in vivo* AH hayvan modellerini oluşturmadaki diğer dezavantajlar ise karmaşık *in vivo* koşulların hedef dokuya erişimi kısıtlaması, biyolojik parametrelerdeki değişimleri aynı anda değerlendirmedeki zorluklar ve etik kısıtlamalardır (Ranjan ve ark., 2018; Başak ve ark., 2023). AH modellemeleri geliştirilirken hayvan modelleri, AH patolojisine ilişkin kritik öngörülerini sağlayan ilk modeller olmalarına rağmen hastalığın ilerlemesine dahil olan patolojik olayları tam olarak özetleyemediler. Bu sebeple çalışmaları daha da geliştirebilmek için etkili bir AH hücre modeli, AH'den etkilenen spesifik beyin bölgesine karşılık gelen uygun hücre tipini kullanılarak kültür süresi boyunca tekrarlanabilir, tüm patolojik özellikleri özetleyen modeldir. İlk olarak bu amaçla 2B *in vitro* hücre kültürü modeli ön plana çıktı. Ancak bu modellerde hücreler çoğunlukla düz, sert, işlevselleştirilmiş sentetik yüzeylere bağlanırlar. Bu ortam da ne yazık ki *in vivo* gerçek dokularda bulunan doğal lifli substratlardan oldukça farklıdır. Bu sebeple son yıllarda araştırmalar, eski yaklaşımların bıraktığı boşlukları doldurmak için 3B hücre kültürüne doğru ilerledi. Doğal dokuda bulunan *in vivo* ortamın taklit edilmesi açısından 3B hücre kültürünün tek katmanlı 2B hücre kültürlerine göre daha üstün olduğuna inanılmaktadır (Ranjan ve ark., 2018).

In vitro AH modelinin oluşturulmasında en sık kullanılan hücre hatları birincil nöronal hücre hatları, kanser hücre hatları (SH-SY5Y, M17 hücreleri), indüklenmiş pluripotent kök hücre hatları, PC12 ve N2a hücreler, glial hücreler (mikroglial, astrositler, oligodendrositler) ve CHO hücreleridir. Hastalığın farklı yönlerini incelemek için farklı hücresel modeller kullanılır (Ranjan ve ark., 2018; Fontana ve ark., 2020).

Birincil hücre hatları transgenik hayvan veya insan hastalardan kültürlenebilir. Ölümsüz sıçan hipokampal hücre hatları, AH'de en çok etkilenen bölge olan hipokampus için yaygın olarak kullanılmaktadır. A β oligomerlerinin nöron fonksiyonu ve apoptoz üzerindeki etkisini incelemek için ise birincil kortikal kültürler kullanılmıştır. İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293), tau ile ilgili etkileri modellemek için kullanılır ve tau ile kolayca transfekte edilebilir. Birincil kültürler ayrıca APP ile transfekte edilebilir ve A β oligomerlerinin rolleri

hakkında yararlı bilgiler verebilirler. Pluripotent kök hücreler ise farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler ve olgun somatik hücrelerin yeniden programlanmasından üretilirler ve AH'nin modellenmesi için kullanılabilirler. Bu hücrelerin teknolojisindeki ilerleme, kişiselleştirilmiş tıp için uygulanabilen hastaya özel nöronların üretilmesine olanak sağlar. Ancak AH yaşa bağlı bir hastalık olduğu için bu modelin kullanımındaki ana sınırlama olgunluk ve yaşlanma özelliklerinin olmamasıdır. İnsan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y), embriyonik aşamada olgunlaşmamış nöronal hücrelerin bir kanserinden izole edilir ve büyüme faktörüne bağlı olarak farklı fenotiplere farklılaştırılabilir. AH araştırmalarında SH-SY5Y hücreleri, olgun nöronlara benzer morfolojiye sahip nöron benzeri hücrelere farklılaştırılır. Bu hücreler daha sonra nörodejenerasyona yol açan toksik A β oligomerlerine maruz bırakılır (Ranjan ve ark., 2018; Fontana ve ark., 2020).

4.8. SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri

SH-SY5Y, sempatik adrenerjik ganglial nöroblastomlu bir hastanın kemik iliğinden elde edilen, SK-N-SH hücrelerinin üç kez klonlanmış bir alt hattıdır. Nörodejeneratif hastalıklardan Parkinson ve AH araştırmalarında kullanılan hücre hatlarından biridir. SH-SY5Y hücreleri, kültürde uzun süre çoğalır ve kolinerjik, dopaminerjik ve adrenerjik nöron benzeri hücrelere farklılaştırılabilir. Bu hücre hatta hem endojen hem de sentetik A β peptitlerle nörotoksite çalışmalarında kullanılmaktadır. Birincil nöronal kültürlerle karşılaştırıldığında, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri hücre canlılığı analizlerine göre A β oligomerlerinin toksisitesine karşı daha az dirençlidir (Fontana ve ark., 2020).

SH-SY5Y hücrelerinde AH modelini indükleyebilmek için A β (M. A. Tan ve ark., 2020; H. S. Park ve ark., 2021), hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) (Lingappa ve ark., 2021), Al $^{+3}$ (Mustafa Rizvi ve ark., 2014), skopolamin (Suthprasertporn ve ark., 2020), glutamat, kolşisin, sodyum ditionit (Das ve Devi, 2021), streptozotosin (J. Park ve ark., 2020), etanol (Okoro, 2020) ve sodyum azit (R.-y. Zhang ve ark., 2021) kullanılan kimyasal maddeler arasındadır. SH-SY5Y kullanan Lilja ve arkadaşları sentetik A β_{1-40} peptitlerinin nöronal nikotinik asetilkolin iyonotropik reseptörlerinin $\alpha 7$ alt birimine bağlanarak sitozolik kalsiyum seviyelerini artırdığını öne sürdü. Buna karşılık, A β_{1-42} oligomerleri, aynı zamanda hücre içi kalsiyum seviyelerine bağlı olan çinko-algılayıcı metabotropik reseptör sinyalini zayıflatarak Zn $^{+2}$ 'yi şelatlıyor gibi görünmektedir. A β peptitlerin bir başka ilginç özelliği de hücreden hücreye transfer olma, birikme ve endojen mekanizmalar aracılığıyla daha düşük bir temizlenme oranına sahiptirler (Fontana ve ark., 2020).

Hücre kültüründe de bazı dezavantaj ve sınırlamalar mevcuttur. Bunlardan bazıları literatürde veri eksikliklerinin olması ve hücreler belirli boyuta ulaştıkları zaman besiyerlerinde nekroz ile sonuçlanan besin ve oksijenin iç bölgelere sızmasının azalması problemidir. Bir başka problem ise *in vitro* ortamın *in vivo* ortamdaki besiyerini, sinyal moleküllerini ve çevre dokuların birbiri üzerindeki etkilerini tamamen yansıtamamasıdır. Organoidlerin kendi kendine bir araya gelme doğası kontrol edilmelerini zorlaştırır ve yüzeyden derinliğe bağlı olarak hücre mikro ortamında önemli farklılıklar gözlenir. Bir diğer dezavantaj ise kontaminasyona oldukça açık olmalarıdır. 3B kültür platformlarının standardizasyonunun ve geçerliliğinin düşük olması ortaya çıkan bir başka problemidir. Hidrojel içeren iskelelerin hücre kültürü süreleri uzun olduğu için çoklu ortam değişiklikleri gerekir ve bu durum matrisin bozulmasına neden olabilir (Ranjan ve ark., 2018).

4.9. Nanoteknoloji Hakkında Genel Bilgiler

Nano, herhangi bir parametrenin 10^{-9} 'unu tanımlamak için kullanılan bir örnektir. Nanoteknolojinin arkasındaki fikir, ünlü malzeme bilimci Richard P. Feynman tarafından Aralık 1959 Amerikan Fizik Derneği Toplantısı'nda "Alta Çok Yer Var " başlıklı konferansında sunuldu. Sonrasında malzeme biliminde, Feynman'ın malzeme özelliklerini atomik ölçekte kontrol etmeye yönelik çok sayıda ilerleme oldu. 1974'te Tokyo Bilim Üniversitesi'nde (Japonya) bir eğitmeni olan Norio Taniguchi, yüksek doğruluk ve ultra ince ölçümleri tasvir etmek için nanoteknoloji terimini icat etti (Mabrouk ve ark., 2021).

Nanoteknoloji, çok çeşitli hastalıkların hem tespit hem de tedavisinde etkili olma potansiyeline sahiptir. Saç telinin milyonda biri kalınlığında olan bu teknoloji dünyanın ana hastalık ve ölüm sebeplerine yön vermede her geçen gün daha da etkili olmaktadır (Kirtane ve ark., 2021). Nanoteknolojideki bu hızlı gelişme ile bu teknolojinin nano ölçekli üretimin dahil olduğu bilim ve teknolojinin hemen hemen her alanına hızla girmesini sağlamaktadır. Günümüzde tarım, gıda, kozmetik, ilaç, sağlık, otomotiv, petrol ve gaz endüstrileri, kimya ve mekanik endüstrileri gibi farklı endüstrilerde nanoteknoloji uygulamalarını mevcuttur. Nanoteknoloji; biyolojik, fiziksel ve kimyasal bilimlerin temel özelliklerini birleştiren bir bilim alanıdır. Bu teknolojinin temelinde ise fiziksel olarak boyutun küçülmesi, kimyasal yeni bağların ve özelliklerin geliştirilmesi ve ilaç enkapsülasyonu ve dağıtımı gibi biyolojik eylemlerin nano ölçekte gerçekleşmesi vardır (Rickerby ve Morrison, 2007; Bhushan, 2017).

Nanoteknolojinin avantajlarından sağlık alanında da farklı alanlarda yararlanılmaktadır. İnsan yaşamının kalitesi, tıpta nanoteknolojinin başarılı uygulamalarıyla sürekli olarak iyileştirilir ve

sonuç olarak, bilim adamları sağlık hizmetleri için teşhis, tedavi, tarama, hastalığı önleme gibi birçok alanda ilaç üretimi, tasarımı, konjugasyonu ve verimli dağıtımında nanoteknoloji kullanılmaktadır. Benzer şekilde, nanoteknoloji kullanılarak üretilen ilaç dağıtım sistemleri ilacın stabilitesini, kontrollü dağılımını, farmakodinamik ve farmakokinetik profillerini iyileştirmektedir (S. Malik ve ark., 2023). Aynı zamanda nanoteknolojideki mevcut gelişmeler, nöral doku mühendisliği için ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımında da önemli faydalar sağlamıştır. AH, bipolar bozukluk, Parkinson hastalığı, şizofreni gibi pek çok nöral hastalık için, hastalıkların patofizyolojisi ve tedavilerinde kullanılan ilaçların fizikokimyasal özellikleri nedeniyle uygun ilaç taşıyıcı sistemin seçilmesi çok önemlidir. Polimerik, silika, manyetik, metalik, lipid, lipopleks ve polipleks nanopartiküller, nanofiberler, kuantum noktaları, dendrimerler, nanoemülsiyonlar, miseller, lipozomlar, hidrojel ve karbon nanotüpler gibi birçok ilaç taşıyıcı sistem nanoteknoloji kullanılarak geliştirilmiştir (GulerPolat ve ark., 2023). AH tedavisinde terapötik ajanların biyoyararlanımını artırarak hastalık üzerinde çok yönlü bir etki oluşturmak oldukça önem kazanmaktadır, bu amaçla çağımızın en önemli araştırma ve uygulama alanlarından biri olan nanoteknolojiden yararlanılmakta ve çok sayıda yeni ilaç taşıyıcı sistem ve tedavi seçenekleri geliştirilmektedir (Nasrollahzadeh ve ark., 2019). İlaçların belirlenen doku veya organa özgü bir şekilde hedeflendirilebilmesi, bir nanotaşıyıcıya iki veya daha fazla etkin maddenin bağlanabilmesi ve tedavinin etkinliğinin takibinin yapılabilmesi nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarından biridir (Farokhzad ve Langer, 2009). Bu sistemlerin geliştirilmesinde nanopartikül ve nanofiberler başta olmak üzere çeşitli nanoboyutlu malzemeler kullanılmaktadır (Lijie Zhang ve Webster, 2009). Nanopartiküller ilaçların matristen kontrollü salınımını sağlamak ve bu sayede ilacın biyoyararlanımını artırarak dozaj sıklığının azalmasına olanak tanımaktadır (Gelperina ve ark., 2005). Aynı zamanda hedef dokulara absorpsiyonu kolaylaştırarak formülasyon etkinliklerini artırmaları, ilaç kinetiği ve dağılımı için stabilizasyon sağlamaları, hidrofilik ve hidrofobik ilaçların birlikte kullanılabilmesine olanak sağlayarak kombine tedavide kullanılabilmeleri, yüksek ilaç taşıma kapasitelerine sahip olmaları, hafif ve kontrol edilebilir yapıda olmaları sayesinde sıklıkla tercih edilmektedirler (Lou ve ark., 2019). Birlikte çöeltme, hidrotermal sentez, inert gaz yoğunlaştırma, iyon püskürtme saçılması, mikroemülsiyon, mikrodalga, puls lazer ablasyonu, sol-jel, sonokimyasal, kıvılcım deşarjı, kalıp sentezi, çift emülsiyon ve biyolojik sentez nanopartikülleri sentezlemek için kullanılan çeşitli yöntemlerdendir (Rane ve ark., 2018).

4.10. Nanopartiküller ve Üretim Teknikleri Hakkında Genel Bilgiler

Nanopartikül üretimde çift emülsiyon yöntemi ile ilgili ilk makale 89 yıl öncesine dayanmaktadır; ancak çift emülsiyonlarla ilgili detaylı araştırmalar 1970'lerin sonunda başlamıştır. Emülsiyonun emülsiyonu olarak da adlandırılan çift emülsiyon, dağılmış faz damlacıklarının kendilerinin bile küçük bir dağılmış faz içerdiği karmaşık bir sistemdir (Garti ve Bisperink, 1998). Çift emülsiyon tekniğinde, damlacıklar çoğunlukla boyut olarak çoklu dağılımlıdır. Bazı durumlarda damlacıklar, çift emülsiyonun her damlasında 50-100 damlacık içeren birçok küçük bölme içerecek kadar büyüktür, öte yandan küçük çift emülsiyon damlacıkları bir veya birkaç damladan oluşabilir. İki yaygın çift emülsiyon türü vardır; su-yağ-su (W/O/W) ve yağ-su-yağ (O/W/O). Çift emülsiyonların hazırlanması için en yaygın olarak iki aşamalı prosesler kullanılır; w/o/w çift emülsiyon hazırlama için, ilk adımda iç sulu faz lipofilik emülgatör içeren yağ fazında dağıtılır, ardından birincil emülsiyonun hidrofilik emülgatör içeren dış sulu faza dağıtılması gerçekleştirilir (Schuch ve ark., 2013; Ding ve ark., 2019)

Çift emülsiyon, iç sulu fazda çözünen veya polimerik matris içinde dağılmış aktif bileşenlerin kontrollü salımına izin veren polimerik parçacıklar hazırlama yeteneğine sahiptir. En önemli işlevi, enkapsüle edilmiş hassas içeriği ışığa, enzimatik bozulmaya ve oksidasyona karşı koruyabilmesi ve enkapsüle edilmek için seçilen aktif bileşenler için dahili bir rezervuar oluşturabilmesidir. Ayrıca, bu ilaç taşıyıcı sistemler aktif bileşenlerin dahili rezervuardan harici dispersiyon ortamına yavaş, sürekli ve kontrollü olarak salınmasını sağlayan ve hem lipofilik hem de hidrofilik ilaç moleküllerini aynı formülasyonda kapsülleme avantajı sunan benzersiz bir süreçtir. Çift emülsiyonun dezavantajları ise bu teknik karmaşık bir süreçtir ve termodinamik olarak kararsızdır. Bu teknikle üretilen parçacıklar nispeten heterojendir ve parçacık boyutu, çift emülsiyon tekniğinin çeşitli işlem parametrelerine duyarlıdır (Benichou ve ark., 2004; Ibraheem ve ark., 2013; Zakeri-Milani ve ark., 2013; Bitar ve ark., 2015).

Mikro ve nanopartiküllerin hazırlanması ve aktif bileşiklerin enkapsülasyonu için en sık kullanılan çift emülsiyon tekniği, çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniğidir. Bu yöntemde homojenleştirme iki aşamada gerçekleştirilir; ilk adımda suda çözünen ilaçlar iç sulu faza (W1) ve polimer/lipofilik ilaçlar yağ fazına (O) eklenir, ardından her iki faz da uygun karıştırma metodu ile homojenleştirilerek birincil emülsiyon (W1/O) oluşturulur. Daha sonra birincil emülsiyon, çift emülsiyon (W1/O/W2) oluşturmak için uygun stabilizatörü içeren dış sulu faz ile emülsifiye edilir. Çift emülsiyon (parçacıklı dağılım) oluşumunu, dağılmış fazdan organik

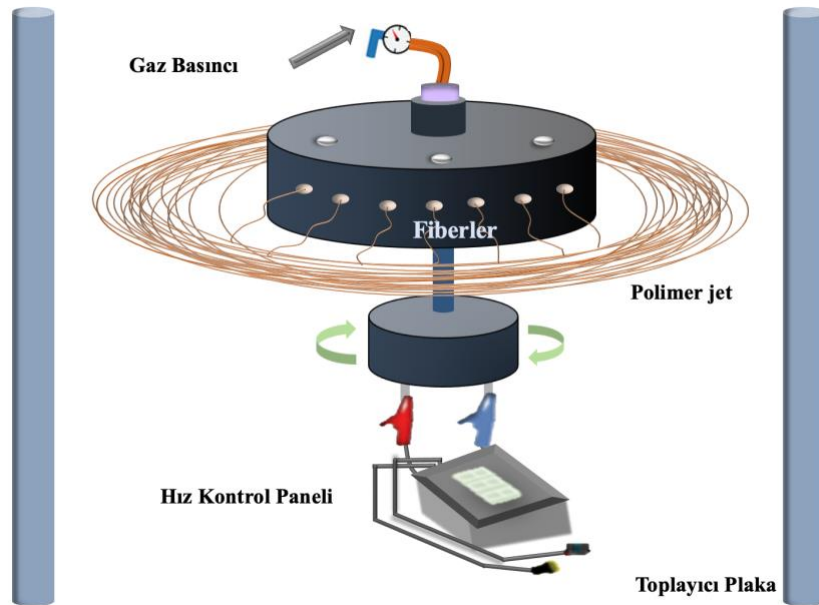
çözücünün (O) buharlaşması takip eder ve bu da bir çözünmezlik noktasına yol açar ve sonuç olarak, aktif malzemeyi içine alan polimerin sertleşmesine neden olur. Çözücü, organik çözücünün kaynama noktasına bağlı olarak, döner buharlaştırıcı yoluyla veya ortam sıcaklığında basit karıştırma yoluyla indirgenmiş basınç altında buharlaştırılabilir. Dispersiyon ortamı ve çalkalama, kapsüllenecek ilacın kimyasal yapısına ve amaçlanan parçacık boyutuna bağlı olarak mekanik karıştırma veya sonikasyon yoluyla sağlanabilir (P. P. Das ve ark., 2019; Szczęch ve Szczepanowicz, 2020).

Biyobozunur polimerler, toksik olmayan bileşenlere parçalanabildikleri için farmasötiklerin enkapsüllemesinde ilaç dağıtım sistemi olarak oldukça etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bu polimerlerden örneğin polilaktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polikaprolakton (PCL) çeşitli aktif ilaçları, genleri ve makromolekülleri çift emülsiyon işlemi kullanarak enkapsüllemek için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Ding ve ark., 2019). PLGA, çift emülsiyon tekniklerinde yaygın olarak kullanılan biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve tolere edilebilir bir polimerdir. İnsanlarda kullanımı FDA tarafından onaylandıktan sonra, ilaç dağıtımı için popüler bir seçim olmuştur. Hidroliz yoluyla yavaş yavaş biyouyumlu laktik ve glikolik asite parçalanır ve böylece uzun bir süre (haftalar-aylar) boyunca yavaş yavaş kapsüllenmiş olan aktif bileşeni serbest bırakır. Böylece ilaç dağıtım sistemleri olarak, PLGA nanopartikülleri küçük moleküllü ilaçların, peptitlerin ve nükleik asitlerin kontrollü salımlı dozaj formlarını hazırlamak için kullanılabilir. Polietilen glikol (PEG) ile uygun kopolimerizasyonu ve bağlayıcılar ile yüzey modifikasyonlarının ardından KBB'den geçişi kolaylaştırıp ilaç dağıtımı için umut verici taşıyıcılar olmuşlardır (Zhi ve ark., 2021).

Stabilizatörler, iki veya daha fazla birbiriyle karışmayan fazın dispersiyonunun fizikokimyasal durumunu korumayı sağlar ve fazların ayrılmasını önler. Böylece emülsiyon sistemini daha kararlı hale getirir. Çift emülsiyon prosesinde yaygın olarak kullanılan stabilizatörler polivinil alkol (PVA), Tween 80 ve Span 80'dir (J. B. Alves ve ark., 2020). PVA, iyi bilinen bir hidrofilik, biyouyumlu polimerdir ve iyi mekanik mukavemete, düşük kirlenme potansiyeline ve sıcaklık ve pH stabilitesine sahiptir. PVA'nın bu özellikleri, onu çeşitli farmasötik ve biyofarmasötiklerin enkapsüllemesinde kullanılmaya uygun yapmaktadır. Ayrıca kontrol edilebilir hidroliz derecesi ve zincir uzunluğuna sahip sentetik bir polimer olması ve kolayca elde edilebilmesi açısından diğer kolloid stabilizatörlerine daha avantajlıdır (Qiao ve ark., 2002; Gaaz ve ark., 2015).

4.11. Nanofiberler ve Üretim Teknikleri Hakkında Genel Bilgiler

Bir başka ilaç taşıyıcı sistem olan nanofiberler çapları 1 ile 1000 nm arasında değişen polimerik yapılardır. Nanofiberleri üretebilmek için kullanılan polimerlerin yüksek moleküler ağırlığa, birkaç küçük yan zincire sahip olması ve bu polimerlerin kendilerine ait spesifik çözücülerde kolayca ve tamamen çözülebilir olmaları gerekmektedir (Ewaldz ve Brettmann, 2019). Nanofiberler ise küçük çaplı ve hafif olmaları; kontrol edilebilir gözenek yapısına, yüksek yüzey/hacim oranına ve üstün mekanik özelliklere sahip olmaları sayesinde büyük ilgi görerek doku mühendisliği, ilaç dağıtımı vb. gibi birçok uygulamada kullanılmaktadırlar (Cai ve ark., 2012). İki bileşenli ekstrüzyon, şablon sentezi, kendinden montaj, faz ayırma, eriyik üfleme, çekme, elektro-eğirme ve basınçlı dönme (pressurized gyration, PG) nanofiber üretiminde kullanılan tekniklerdir. Seçilen polimer çözeltisine yüksek voltajın uygulanmasına dayanan elektro-eğirme, basit ve uygun maliyetli olduğu için elyaf üretmek için en sık seçilen tekniktir (J. Song ve ark., 2020). Elektro-eğirme prosesinin birçok avantajına rağmen, yüksek üretim hızının olmaması, çözeltinin elektriksel iletkenliğinin hassasiyetine bağlı olarak sınırlı malzeme seçimi ve elde edilen liflerin rastgele yönlendirilmesi nedeniyle büyük zorluklar kullanımlarını hala kısıtlamaktadır (Luo ve ark., 2012). Bu sebeple nanofiber üretmek için elektro-eğirme gibi elektriksel alan uygulanan üretim yöntemlerine alternatif olarak Prof. Dr. Mohan Edirisinghe tarafından 2013 yılında çok yönlü yeni bir teknik olan PG yöntemi geliştirilmiştir (Ahmed ve ark., 2018).



Şekil 4. Basınçlı dönme sisteminin şematik gösterimi

PG ile nanofiber üretimi seçili polimer solüsyonunun Rayleigh-Taylor kararsızlığında oynama yaparak gerçekleştirilir. PG ile nanofiber üretimi, üzerinde küçük delikler bulunan silindir alüminyum hazne kullanılarak gerçekleştirilir. Bu hazne, dönme hızı kapasitesi 15000 rpm olan elektrik motoruna bağlıdır. Nanofiber üretimi elektrik motoru tarafından sağlanan dönme hızı ve haznenin üst kısmına plastik bir boruyla bağlanmış gaz girişinden uygulanan gaz basıncının sonucunda gerçekleşmektedir. Önceden hazırlanmış polimer çözeltisi haznenin içine yüklenir. Yöntemin çalışma prensibi, PG sistemindeki motor çalışmaya başladıkça dönme hızı hızla artar, bu da merkezkaç kuvvetinin artmasına neden olur ve artan kuvvet polimer çözeltisinin yer değiştirmesine yol açar. Hareket eden sıvıya karşı bir gaz basıncı uygulanır ve uygulanan bu basınçtan dolayı kapta bir basınç farkı oluşur ve böylece oluşan basınç farkı çözeltiyi dışarıya itmeye zorlar. PG sisteminde polimer solüsyonun bulunduğu kap üzerindeki deliklerden sıvı çıkışının olmasının arkasındaki ana itici güç, sıvı-hava arayüzündeki yüzey gerilimi gradyanı nedeniyle oluşan merkezkaç kuvvetidir. Ayrıca, bu gradyan, sıvı-gaz arayüzüne teğet olarak Marangoni gerilimini harekete geçirir, böylece polimer damlacığının ucunda akışı başlatır. Fiberler, perforasyonlardan ayrılırken polimer solüsyonunun ucunda sürekli olarak var olan merkezkaç kuvvetinin etkisiyle oluşurlar. Yavaş yavaş gerçekleşen buharlaşmanın etkisiyle çözücü kaybı gerçekleşerek fiberlerin ana maddesi olarak polimerler kalır. Tüm bunların sonucunda fiberler sistemin yan yüzeyinde biriktirilerek bu prosedürün hızlı bir şekilde tekrarlanmasıyla nanofiber demetleri oluşturulur. Bu üretim tekniği toplu üretim yapmaya elverişli ve fiberlerin sanayieler içerisinde üretilebildiği bir tekniktir (Alenezi ve ark., 2021).

4.12. Polimerler Hakkında Genel Bilgiler

Polimerler, yapısal birimlerin büyük ölçekte tekrarlanmasıyla oluşan makromoleküllerdir. Yunancada "çok" anlamına gelen poli ve "parçalar" anlamına gelen meros'ten türetilmiştir. Polimer molekülü çok yüksek moleküler ağırlığa (10000-1000000 g/mol arasında) sahiptir ve genellikle kovalent bağlarla birbirine bağlanmış birkaç yapısal birimden oluşur. Polimerler, monomerlerin kimyasal reaksiyona girmesiyle elde edilir. Monomerler, polimer zincirini oluşturmak için uygun durumda aynı türden veya başka bir türden başka bir molekülle reaksiyona girme yeteneğine sahiptir. Monomerlere bağlı olarak, polimerler homomerler ve heteropolimerler olarak sınıflandırılabilir. Doğadaki bu süreçte, insan yapımı olan sentetik polimerler 19. yüzyılın ortalarından beri hayatımızda iken, doğal polimerler ise dünyanın

oluşumuyla birlikte hayatımıza girmiştir (Namazi, 2017). Polimerler sentetik, yarı sentetik ve doğal polimerler olmak üzere üçe ayrılırlar (T. F. Alves ve ark., 2020).

Sentetik polimerler, monomerlerin polimerleştirilmesiyle elde edilirler. Biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden üretilen gözenekli yapı iskeleleri, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta hayati roller oynamaktadır. Poliglikolik asit, poli (N-izopropilakrilamid), PLA, PCL, PLGA, PEG gibi sentetik polimerler ve bunların kopolimerleri doku mühendisliği biliminde kullanılmaktadır. Sentetik polimerler, esnek yapıya sahiptirler ve doğal ekstraselüler matris proteinlerine kıyasla hiçbir immünolojik yanıt oluşturmazlar (Asghari ve ark., 2017).

Yarı sentetik polimerler, doğal kaynaklardan elde edilen polimerlerin sentetik işlemlerle modifiye edilmesiyle üretilir. Doğal polimerler, bitkilerden veya hayvanlardan elde edilen ve genellikle biyolojik kökenli olan polimerlerdir. Bir örnek vermek gerekirse, selüloz asetat yarı sentetik bir polimerdir. Selüloz, bitkilerin hücre duvarlarında bulunan bir polisakkarittir ve doğal bir polimerdir. Bu doğal polimer, asetik asit gibi kimyasal işlemlerle modifiye edilerek selüloz asetat adı verilen yeni bir polimer haline getirilir. Yarı sentetik polimerler, doğal polimerlerin özelliklerini korurken, sentetik polimerlerin istenilen özelliklerini ekleyerek daha çeşitli ve kullanışlı malzemelerin üretilmesini sağlar. Bu, polimer biliminde ve endüstrisinde önemli bir gelişmedir, çünkü farklı uygulama alanları için özelleştirilmiş malzemelerin geliştirilmesine imkan tanır (Germershaus ve ark., 2015; T. F. Alves ve ark., 2020).

Doğal polimerler; mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi biyolojik sistemler tarafından üretilen polimerlerdir. Doğal polimerlerin yapışkan bandaj, kozmetik ürünleri, ilaç salımı ve tıbbi yapı iskeleleri üretimi gibi birçok alanda kullanımları mevcuttur. Bu polimerlerin birtakım avantajları ve dezavantajları vardır. Konak dokuya benzer olması, biyolojik sistemlerle haberleşebilmesi, metabolik uyumluluğu, nontoksik olması ve inflamatuvar reaksiyonların düşük olması, enzimlerle parçalanabilmesi avantajlarından bazılarıdır. Öte yandan, sıcaklık hassasiyeti nedeniyle erime noktasına ulaşmadan parçalanmaları ve karmaşık yapısının işlenmesini zorlaştırması dezavantajlarından biridir. Kaynaklarının bitki ve hayvan olması sebebiyle insanlara hastalık bulaşma olasılığının olması bu polimerlerin bilinen dezavantajlarından biridir. Kitin, kitosan, jelatin, kolajen ve aljinat bilinen doğal polimerlerdendir (Asghari ve ark., 2017).

Aynı zamanda polimerler sudaki çözünürlüklerine göre de ikiye ayrılır: Suda çözünen (hidrofilik) polimerler ve çözünmeyenler (hidrofobik) polimerler. PEG, PVA, polietilen oksit,

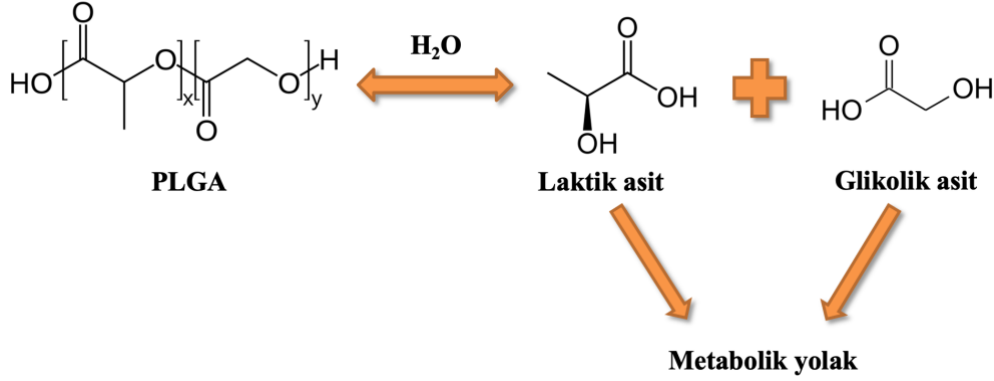
poliakrilamidler, poliakrilik asit kopolimeri ve polivinil prolidin gibi suda çözünür polimerler, suda çözünen, dağılan veya şişen ve sonuç olarak jelleşme veya koyulaşmaya uğrayan sulu sistemlerin fiziksel özelliklerini değiştiren organik polimerlerdir. Suda çözünen polimerler, sulu ortamda çeşitli işlevleri yerine getirir, bunlar arasında dağıtma ve askıya alma maddeleri, dengeleyiciler, koyulaştırıcılar, topaklaştırıcılar ve pıhtılaştırıcılar, film oluşturucular, nemlendiriciler, bağlayıcılar ve yağlayıcılar bulunur. Bunlar çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilir (Moja ve ark., 2021). Hidrofobik polimerler ise suda iyi çözünmeyen veya suya karşı itici olan polimerlerdir. Bu tür polimerler, hidrofobik grupları içeren moleküllerden oluşur ve suyla etkileşime girmek yerine hidrofobik ortamlarda daha iyi çözünürler. PLGA, PLA, PCL gibi polimerler hidrofobik polimerlere örnek olarak verilebilir. Kloroform, metilen klorür ve dioksan gibi organik çözücülerde çözülmeyi severler (Ghosh ve Biswas, 2021; ul Hassan ve ark., 2021)

Biyobozunur polimerlerden PLGA; hidrolizi sonucu endojen ve vücut tarafından Krebs döngüsü yoluyla kolayca metabolize edilen laktik asit ve glikolik asite parçalandığından nanopartikül üretiminde en çok tercih edilen partikül matris malzemelerinden biridir. Ayrıca PLGA, FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından da insanlarda çeşitli ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Nanopartikül boyut aralığının 100–200 nm arasında oluşu beyin hedeflemesi için idealdir. Retiküloendotelial sisteme sahip organların opsonizasyon derecesinin bu boyut aralığında düşük olması ve nanopartiküllerin küçük boyut aralığında yüksek ilaç yükleme kapasitesi göstermesi ve dahil edilen ilacı bozunmaya karşı koruyabilmesi beyin hedefleme ve KBB'den geçişi artıran diğer avantajlardandır (Jose ve ark., 2014). Tüm bu özellikleri sağlayabilen PLGA nanopartikülleri peptit, DNA, protein, RNA ve farklı terapötiklerin enkapsüle edilmesini sağlayarak sürekli ve kontrollü salıma uygun degradasyon özellikleri ile tercih edilirler (Makadia ve Siegel, 2011).

Biyomedikal uygulamalarda, PLGA tipik olarak 5-40 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir (Makadia ve Siegel, 2011). Diklorometan, tetrahidrofur, etil asetat, triklorometan, aseton ve benzil alkol dahil olmak üzere çok sayıda organik çözücüde çözünebilir (C. Martins ve ark., 2018). Laktik asit ve glikolik asit monomerleri biyouyumlu ve biyobozunur polimer olan PLGA'yı oluşturmak için polimerize edilerek PLA ve poli(glikolik asit) (PGA) polimerlerinden PLGA'yı oluşturur (C. Martins ve ark., 2018). İçerdiği laktid yapısı ile optikçe aktif L-laktid ve D-laktid ve optikçe aktif olmayan DL-laktid olmak üzere üç farklı çeşidi vardır. Sahip olduğu metil yan grubu ile hidrofobik bir yapısı olan PLA, metil grubunun sterik etkisiyle birlikte PGA

ile kıyaslandığında daha az su absorplar ve hidrolize daha dayanıklıdır. Ayrıca PLA kırılğan yapısının yanında düşük termal stabiliteye sahiptir. Poli(L-laktid) yarı-kristal iken poli (DL-laktid) ise amorf yapıdadır. PGA, %45-55 oranında kristal yapıya sahiptir ve birçok organik çözücünde çözünmez. PLGA'nın kopolimerizasyonunda glikolid ile L-laktid veya DL-laktid tercih edilir. Farklı bağıl moleküler ağırlık ve monomer bileşim oranları (laktik asit:glikolik asit; 25:75, 50:50, 20:80 gibi) birincil olarak PLGA'nın fizikokimyasal özelliklerini etkiler (Lamprecht ve ark., 2000; Vroman ve Tighzert, 2009; Makadia ve Siegel, 2011; Danhier ve ark., 2012). Bu nedenle, *in vivo* dağıtım sistemlerinin bozunma kinetiklerini kontrol altında tutabilmek için doğru laktik asit:glikolik asit oranının seçilmesi gerekmektedir (Kapoor ve ark., 2015). Ayrıca PLGA'nın kristallığı, camsı geçiş sıcaklığı (Tg), karakteristik viskozitesi ve bağıl moleküler kütlesi de ilaç salım sisteminin özelliklerini belirleyen diğer temel ana unsurlardandır. Amorf yapıdaki PLGA'nın kristallığı; mekanik mukavemetini, şişmesini ve biyolojik bozunma oranını etkiler. Polimerin kristallığı de glikolik asit ve laktik asit arasındaki orana bağıl olarak değişim göstermektedir (McHugh ve ark., 1998). Örneğin; PLGA içeriğinde laktik asit:glikolik asit 25:75 ise polimer amorf bir yapıda iken 80:20 olduğunda yarı-kristal yapıdadır. Aynı zamanda PLGA'daki laktik asit içeriğinin azalmasının normalde 45–55 °C arasında değişen PLGA Tg'sinde bir azalmaya yol açtığı ve Tg'deki bu düşüşün polimer matrisinin plastikleşmesine neden olduğu bildirilmiştir (L. Wu ve ark., 2006; Kapoor ve ark., 2015). Genellikle, glikolik asit seviyesi ne kadar yüksek olursa, PLGA'nın bozulması o kadar hızlı olur. Tüm bu modifikasyonlar da PLGA'nın mekanik özelliklerinin düşmesine neden olur. PLGA'nın hidroliz yoluyla bozunması öncelikle, polimer matrisin amorf bölgelerine nüfuz eden suyun, van der Waals kuvvetlerini ve hidrojen bağlarını kırarak PLGA'nın Tg'sini düşürmesiyle başlar. Böylece polimerin moleküler ağırlığı azalır, bu da polimerin hidrofilikliğini artırır ve polimerin suda çözünür parçalara ayrılmasını hızlandırır. Bu işlem, polimerler arasındaki kovalent bağların sürekli kırılmasından kaynaklanır. Son olarak da bu parçalar laktik asit ve glikolik asite hidroliz edilerek metabolik yollarla enerji, CO₂ ve suya ayrılır (Lü ve ark., 2009; C. Martins ve ark., 2018). Yan zincirdeki metil grubu ve poli (laktik asit), poli (glikolik asit)'den daha hidrofobik olduğundan, laktik asit monomerinin glikolik asit monomerine oranı ayarlanarak, bozunma hızı azaltılabilir. Ek olarak, PLGA otokatalitik bozunmaya uğrayabilir (Yoon ve Park, 2001; Gentile ve ark., 2014). PLGA'nın bozunmasına ortamın hafif asidik olmasına bağıl olarak hızlanabilir (Siepmann ve ark., 2005). Bununla birlikte, PLGA bozunmasının neden olduğu asidik ortam, vücutta lokal inflamatuvar

reaksiyonlara yol açabilir ve kapsüllenmiş farmasötiklerin, özellikle terapötik proteinlerin, ne kadar süre stabil kaldığı üzerine olumsuz bir etkiye sebep olabilir. İlaçların stabilitesini artırmak ve daha iyi terapötik etkiler sağlamak için, asiditeden etkilenen terapötikler için yerel dokulardaki pH, ilaç taşıyıcı sisteme suda daha az çözünür alkali bir malzeme eklenerek kontrol edilebilir (Astete ve Sabliov, 2006; Go ve ark., 2020).



Şekil 5. PLGA'nın vücut içerisindeki metabolizması (Amo ve ark., 2021'den yararlanılarak çizilmiştir)

PEG; etilen oksit, etilen glikol veya dietilen glikolün alkali katalizör varlığında polimerleştirilmesinden üretilir ve polimer istenen moleküler ağırlığa ulaştığında katalizörün nötralize edilmesiyle reaksiyon sonlandırılır. PEG'in kimyasal yapısı $HO-[CH_2-CH_2-O]_n-H$ 'dir ve n; etilen oksit birimlerinin sayısıdır ve molekül ağırlığı $(44 \text{ g/mol}) \cdot n$ ile hesaplanır. PEG hidrofiliktir ve her bir etilen glikol alt birimi 2-3 su molekülü ile çevrilidir. PEG su, metanol, etanol, asetonitril, gliserin, glikol, benzen ve diklorometan da çözünür ve bu özelliği PEG'i birçok formülasyon ve üründe kullanışlı kılar. PEG; doğrusal, tüp, dallı, yıldız ve tarak dahil olmak üzere farklı geometrilere sahip olabilir ve çeşitli modifikasyonlarla özelleştirilebilir (Roser ve ark., 1998; Alexis ve ark., 2008; D'souza ve Shegokar, 2016; Brady ve ark., 2017). PEG aynı zamanda çok esnektir ve çok sayıda polimer zincir konformasyonu ile sonuçlanan yüksek zincir hareketliliği sergiler ve zincir konformasyon serbestliğinde bir azalma termodinamik olarak elverişsizdir. PEG misellerin etrafında bir kabuk oluşturmak için kullanılabilir. PEG kabukları, biyomakromoleküllerin polimer tabakasına nüfuz etmesini sterik olarak önler ve hidrofobik veya elektrostatik etkileşimlerle çekirdeğe bir hidrasyon kılıfıyla bağlanır. Bununla birlikte PEG, ilaç formülasyonlarında ve gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılan bir üründür. İlaç formülasyonlarında ve sarf malzemelerinde kullanılan PEG'in

molekül ağırlığı genellikle 200-60.000 Da moleküler ağırlıklar arasında değişir. Çeşitli formülasyonlar ve daha büyük PEG matrisleri yapmak için PEG üzerindeki uç hidroksil grubunun bileşikler üzerindeki reaktif gruplara konjugasyonu, PEG'in, PEG'lenmiş nanopartiküller veya daha iyi sirkülasyona, sürekli salıma izin veren ilaç formlarındaki yaygın bir kullanımıdır (Needham ve ark., 1992; Cruise ve ark., 1998; Sadhana Sharma ve ark., 2004; Fruijtier-Pölloth, 2005; Akiba ve ark., 2010; Day ve ark., 2018; Baumann ve ark., 2019). PEG'in bir nanoparçacık yüzeyine konjugasyonu plazma proteinlerinin nanoparçacıklara bağlanmasını azaltır ve PEGlenmiş nanoparçacıkların tek çekirdekli fagositik sistem tarafından temizlenmesini durdurur (Hou ve ark., 2011; Suk ve ark., 2016; Ait Bachir ve ark., 2018). Bu nedenle, PEG'lenmiş nanopartiküller, PEG'lenmemiş muadillerinden daha uzun sirkülasyon süresine sahiptir; bu özellik, dolaşım yarılanma ömrünün uzamasına ve sürekli ilaç salımı özelliğiyle PEG'lenmiş nanoformülasyonların geliştirilmiş etkinliğine katkıda bulunur. Örneğin, daha uzun PEG zinciri (moleküler ağırlık 2000 veya 5000 Da) veya daha yüksek PEG yüzey yoğunluğu (%43 ve %75) ile formüle edilen kitosan-nanopartiküller, kontrol formülasyonlarından daha fazla sürdürülebilir ilaç salımı gösterdi (Papadimitriou ve ark., 2012; C. Yang ve ark., 2017).

PEG; gıda ve kozmetik alanlarında, tablet, merhem, parenteral sıvı preparasyonu, ultrason jeli, fitil ve ilaç üretimlerinde formülasyonlarda kullanılmaktadır. Bu alanlarda PEG yüzey aktif maddesi, dağıtıcı, çözücü ve ekspiyan olarak tercih edilmektedir ve böylece oldukça geniş bir kullanım çeşitliliği göstermektedir. FDA tarafından onaylanmış bir polimerdir. Aynı zamanda PEG'in bir füzojen, yani hücreleri hücre zarları ile kaynaştırabilen bir madde olduğu bilinmektedir. Füzojenik aktivite mekanik olarak tam bilinmemekle birlikte PEG'in hidrofilik doğasından kaynaklandığı düşünülmektedir ve hücre zarlarını dehidre ederek protein ve lipid yapıların birbiri içerisinde yeniden çözünmesine izin verdiği düşünülmektedir. PEG bilinen bir membran sürfaktanıdır ve membran yüzey gerilimini azaltarak ve membran akışkanlığını artırarak membranın yeniden kapanmasını sağlayabilir (Shi, 2013). Bununla birlikte PEG koruyucu özelliği sayesinde organ nakli ve iskemi reperfüzyon alanlarında da çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı PEG, organların korunmasını sağlamak için ve apoptozu önleyen bir geri kazandırıcı ajan olarak kullanılır (Valuckaite ve ark., 2013).

PEGilasyon yoluyla nanoparçacıkların immün hücreler tarafından tanınmasındaki azalmaya bağlı olarak dolaşım süresinin uzamasına rağmen PEGilasyon, protein bağlanmasını tamamen

bloke etmez. PEGlenmiş proteinlerin ve lipozomal formülasyonların hızlandırılmış kan klerensi, PEG'e özgü antikorların oluşumuyla açıklanır ve sonunda PEGlenmiş ürünler de parçalanır ve fagositik hücreler tarafından uzaklaştırılır. PEG, idrar ve dışkı yoluyla esas olarak değişmeden atılır. Uygulanan PEG'in bir kısmı oligomer, glikolik asit, hidroksiglikolik asit, diglikolik asit homologları, CO₂ ve çok az oksalik asite metabolize olur (Suzuki ve ark., 2012; Shi, 2013). CO₂'ye bozunma ile elimine edilen PEG yüzdesinin, PEG boyutunda daha büyük bir azalma gösterdiği bulunmuştur. PEG, H₂O₂ varlığında bozunur ve bozunma H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Konsantrasyon ne kadar düşükse, bozunma o kadar yavaş olur (Fruijtier-Pölloth, 2005; Ulbricht ve ark., 2014).

PLGA'nın yarı ömrünün kısa oluşunu tolere edebilmek için PLGA/PEG kopolimer nanopartiküller üretilerek PLGA, PEG ile birleştirilir (K. Zhang ve ark., 2014). PLGA/PEG kopolimeri, farmasötik ürünlerde ve cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, PLGA/PEG nanopartiküllerinin kimyası, onları çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ve gliomanın tedavisinde kullanılmak üzere çeşitli peptidler ve bağlayıcılarla konjugasyona uygun hale getirir. Memantin, hafif ve orta dereceli AH'nin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Yapılan bir çalışmada memantin çift emülsiyon yöntemi kullanılarak PLGA/PEG nanopartiküllerinde enkapsülasyonu sonucunda, serbest memantine kıyasla hedef dokuya daha yüksek oranda iletiltiğini gösterdi (Sánchez-López ve ark., 2018). Bir başka çalışmada ise solvent yer değiştirme tekniği ile üretilen pioglitazon yüklü PLGA/PEG nanopartiküller, KBB boyunca transsitoz oranını artırarak pioglitazonun hedef dokuda yavaşça salınarak AH tedavisinde etkinliğini artırdığını gösterdi (Silva-Abreu ve ark., 2018). Aynı zamanda *in vitro* testlerle de PLGA/PEG nanopartiküllerinin AH tedavisinde ilaçların etkinliğini artırdığı bulunmuştur. Solvent buharlaştırma yöntemiyle üretilen donepezil-yüklü PLGA/PEG nanopartikülleri *in vitro* ortamda Aβ oluşumunu destabilize etti (Baysal ve ark., 2017). PLGA/PEG nanopartiküllerinde enkapsülasyonu çeşitli doğal bileşiklerin ve ilaçların da *in vitro* modellerde AH patolojisini azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Amin ve ark., 2017). Polividon veya povidon olarak da adlandırılan polivinilpirolidon (PVP), N- vinilpirolidon monomerinden türetilir ve biyolojik olarak parçalanabilen, suda çözünür bir polimerdir. Hidrofilik bir polimer olmasının yanı sıra PVP, farklı polaritelere sahip çözücülerde mükemmel çözünürlüğe, iyi bağlanma özelliklerine ve süspansiyonlar ve emülsiyonlar için stabilize edici bir etkiye sahiptir. PVP, biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan, FDA tarafından da onaylanmış bir polimerdir. Bu nedenle PVP, 1940'lerde hacim genişletici olarak tanıtıldıktan

sonra gıda sektörünün yanı sıra ilaç ve kozmetikte, farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. PVP'nin benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri vardır. Bunlar; kimyasal olarak inert, renksiz, sıcaklığa dayanıklı ve pH açısından karardır. Eşsiz özellikleri ve kimyası, çeşitli homopolimerlerin, çapraz bağı-PVP'nin ve farklı moleküler ağırlıklara sahip kopolimerlerin sentezini kolaylaştırır (del Consuelo ve ark., 2007; Foltmann ve Quadir, 2008; Bothiraja ve ark., 2009; Fogaca ve Catalani, 2013; R. M. Martins ve ark., 2013; Rasekh ve ark., 2014). PVP'nin moleköl ağırlığı Avrupa ve ABD Farmakopelerine göre K-değeri ile temsil edilir. Ortalama moleköl ağırlığı 2500–3000000 g/mol'dür. PVP'nin viskozitesi moleköl ağırlığı ile artarken sudaki çözünürlüğü azalır. Moleköl ağırlığının ilaç çözünme profili üzerindeki etkisi araştırıldığında ilaç çözünme hızları, büyük olasılıkla sabit difüzyon tabakasının artan viskozitesinden dolayı, moleköl ağırlığındaki artışla birlikte azalır. Ana zincirinde ve halkasında sırasıyla hidrofilik ve hidrofobik özelliklerini gösteren yüksek polariteli bir amid ve polar olmayan metilen grupları nedeniyle amfoterik bir monomer birim yapısına sahiptir. PVP; su ve organik çözücülerde yani etanol ve propilen glikol arasında değişen her solventte çözünürlüğe sahiptir. PVP, sert bir halka içeren kimyasal yapısı nedeniyle mekanik olarak güçlü bir polimerdir. Mekanik özellikler konsantrasyon ve moleköl ağırlığı ile değişir. Bunların yanı sıra PVP'nin higroskopik yapısı PVP bağlayıcı veya yapıştırıcı olarak kullanıldığında faydalı olurken tabletlerin film kaplanması gerektiğinde zararlıdır. Bu özellik, moleküler ağırlıktan bağımsız olarak, tüm PVP dereceleri için geçerlidir (Bühler, 2005; Foltmann ve Quadir, 2008; Ke ve ark., 2012; Julinova ve ark., 2013; Dillon ve ark., 2017; Suave ve ark., 2018; Franco ve De Marco, 2020). PVP'nin dezavantajı ise; toksik ve kanserojen olmayan, biyolojik olarak uyumlu bir polimer olmasına karşın biyolojik bozunmayla ilgili bir problemi olmasıdır. Karmaşık yapısı, gama laktamaz ve ardından amino oksidaz maruziyeti yardımıyla enzimatik bozunmayı kolaylaştırır. Gama laktamaz enzimi sadece mikroorganizmalar tarafından üretildiği için PVP polimeri vücutta neredeyse hiç parçalanmaz. Bu enzimi üreten mikroorganizmalar insan vücudunda değil, çevrede bulunur. Değişmeyen formunun vücuttan atılmasını zorunlu kılan temel sebep budur. Ancak, renal atılım için parenteral olarak uygulanan polimerlerde kabul edilebilir moleküler boyutun 40 kDa olduğu rapor edilmiştir. Eğer polimerin moleköl ağırlığı 40 kDa'dan az ise vücut içerisinde minimum polimer birikimi gözlemlenir (Dillon ve ark., 2017; Vanharova ve ark., 2017). Bu sebeple düşük moleköl ağırlıklı PVP'ler uygun şekilde kullanılabilirler. PVP'nin bir gıda katkı maddesi ve kozmetik içerik maddesi olarak kullanımı bazen belirli bir konsantrasyondan sonra

önerilmemektedir. Alerjiler, deri altı granülomlar, pulmoner vaskülarizasyon ve retiküloendotelial sistem birikimi, PVP veya türevlerinin oluşturabileceği bazı olumsuz durumlardır. Bu yan etkileri önlemenin yolu ise yüksek molekül ağırlıklı PVP'nin aşırı dozlarda veya tekrar tekrar uygulanmasından kaçınmaktır (Kurakula ve Rao, 2020; Waleka ve ark., 2021).

PVP'nin bu çok yönlülüğü ve benzersiz özellikleri, onu farmasötik formülasyonların üretimi için büyük potansiyele sahip bir polimer haline getirir. Aslında, gelişmekte olan farmasötik ve biyomedikal alanlarda PVP kullanımı, ilaç pazarının hala ihtiyaç duyduğu çözümlerin sunulmasına olumlu katkıda bulunabilir. Şimdiye kadar PVP, farmasötik ve biyomedikal alanlarda oral, topikal, transdermal ve oküler uygulama gibi farklı ilaç uygulama sistemlerini geliştirmek için kullanılmıştır. Ayrıca PVP, genlerin iletilmesinde de kullanılır (Saxena ve ark., 2006; Y. Song ve ark., 2015; Zheng ve ark., 2015). Polimerik taşıyıcı olarak rejeneratif tıp ve hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler için de metal parçacıklarla birleştirilebilir (Hecold ve ark., 2017; de Lima ve ark., 2018; Ramalingam ve ark., 2018). Bununla birlikte PVP, ilaç kontrollü bir salım elde etmeye, suda çözünürlüğü az olan ilaçların biyoyararlanımını artırmaya, aktif bileşiği dış etkenlere (pH, sıcaklık ve oksijen) karşı korumaya ve hoş olmayan kokuları ve tatları maskeleyen olarak tanır (Dowding ve ark., 2005; Gupta ve Bansal, 2005; K. Wu ve ark., 2009; Prosapio ve ark., 2016). Farklı kategorilere ait birçok aktif bileşik, PVP mikropartikül, nanopartikül, nanofiber, hidrojel ve oral tablete enkapsüle edilmiştir. Bu PVP tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler geleneksel veya daha yenilikçi teknikler kullanılarak farklı teknolojilerle üretilebilirler (R. K. Mishra ve ark., 2008; D. Yu ve ark., 2009; Mohabe ve ark., 2011; Wlodarski ve ark., 2016).

PVP nanofiber üretiminde hem geleneksel bir teknik olan elektro-eğirmeyle üretimde hem de yenilikçi bir teknik olan PG tekniğiyle üretimde tercih edilmiştir. Hidrofilik PVP, hidrofobik davranış sergileyen polimerlerle birleştirildi. Örneğin, yara örtüsü oluşturmak için PVP/PCL kompozit lifleri üretilmiştir. Böylece PVP'nin formülasyona dahil edilmesiyle PCL'nin yüksek hidrofobikliği nedeniyle düşük olan şişme derecesi iyileştirilmiş oldu (M. Hu ve ark., 2018). Yapılan bir diğer çalışmada ise oral antidiyabetik ilaçlar arasında en güçlü antiinflamatuvar etkiyi sergileyen pioglitazon, metformin ve glibenklamit kombinasyonu PG tekniğiyle üretilen PVP/PCL kompozit nanofiberleri içine yüklendi. Diyabetik yara iyileştirmesindeki etkileri elektro-eğirme tekniğiyle üretilen kitosan/jelatin/PCL nanofiberleriyle karşılaştırıldı (Cam ve ark., 2021). Literatüre sunulan bir diğer çalışmada ise ibuprofen elektro-eğirme tekniğiyle

Üretilen PVP nanofiberlerinin içine yüklendi. Üretilen fiberler ağız içinde 10 saniyede znd ve böylece, sudaki znrlėđ düşük olan ilaçlar için oral uygulamaya uygun hızlı çözünen yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiş oldu (D. G. Yu ve ark., 2009).

4.13. Oral Yolla İlaç Uygulamasının Avantajları ve Dezavantajları

Bir ilacın etkisini gösterebilmesi ve sona erdirebilmesi için ilacın vücutta dağılması gerekmektedir. Bu da vücutta sırayla meydana gelen emilim, dağılım, metabolizma ve atılımdan meydana gelen bir dizi işlem aracılığıyla gerçekleşir. Oral yol daha güvenli, kullanışlı, non-invaziv, ağrısız ve daha ekonomik olması ile ilaç uygulamasında en çok tercih edilen yoldur. Oral olarak alınan bir ilaç bağırsak lümeni boyunca emilmelidir ve bağırsak enzimleri tarafından metabolizmaya duyarlı olmamalıdır. Bununla birlikte emilim, bir ilacın etki bölgesine ulaşması ve istenen farmakolojik etkiyi göstermesi için ön koşul olan süreçtir. İlaçların emilimi; çözünürlük, geçirgenlik, formülasyon özellikleri, kompleks oluşturmaya yatkınlık, enterohepatik siklus, midenin boşalma süresi, bağırsak geçiş süresi, emilecek bölgeye özgü özellikler, hormonlar, genetik yapı, yaş, sahip olunan hastalıklar, diyet faktörleri gibi birçok fizikokimyasal ve fizyolojik faktörden etkilenen karmaşık bir olgudur. Emilimi tamamlanan ilacın kapilerdeki kan dolaşımından ekstravasküler sıvıya geçmesinin ardından doku içine yayılmasıyla dağılım gerçekleşir. Dağılımı gerçekleşen ilaç organizmadaki enzimlerin etkisiyle metabolize edilerek genellikle daha polar hale getirilir ve eliminasyona hazırlanmış olur. Eliminasyon, ilacın etkisini sonlandırır ve ilacın vücuttan atılmasını sağlar. Karaciğer ve böbrek vücuttaki başlıca eliminasyon organlarıdır. Bazı ksenobiyotikler ve endojen maddeler karaciğer tarafından bağırsaklara atıldıktan sonra yeniden emilmeye yatkındır ve bu da enterohepatik siklus tarafından geri dnştrlmelerine yol açar. Enterohepatik siklus, karaciğer hücreleri tarafından metabolize edilen ilaçların bir kısmının, safra içine itrah edilmesi ve ince bağırsağa gelen ilaçların yeniden emilip karaciğere tekrar gelmesiyle ilaçların yeniden sistemik dolaşıma geçmesidir. Bu döngü, ilaç vücuttan tamamen temizlenene dek devam eder. Enterohepatik siklus, bileşiklerin dolaşımda tekrar tekrar ortaya çıkmasını mümkün kıldığı için, plazma ilaç konsantrasyonu-zaman profilinin belirli zaman aralıklarından sonra tekrar tekrar yükselmesine neden olarak çoklu tepe noktalarına yol açar (M. Y. Malik ve ark., 2016).

Karaciğerin ilacın kandaki doruk konsantrasyonu üzerine bir diğer etkisi de ilk geçiş etkisidir. Vücut içerisinde biyotransformasyonda en önemli organ karaciğerdir. Bununla birlikte deri, böbrek, akciğer gibi birçok organda da biyotransformasyon gerçekleşmektedir. Oral yolla

alınan bir ilaç bağırsakta emildikten sonra sistemik dolaşıma geçmeden önce karaciğere uğrar ve burada büyük bir kısmı metabolize olarak etkisiz hale gelmektedir. Bu olay karaciğerden ilk geçiş etkisi olarak adlandırılır ve ilaçların biyoyararlanımları bu etkiyle birlikte azalmaktadır. Bununla birlikte ilk geçiş etkisinin doruk ilaç konsantrasyonu üzerinde de bir etkisi vardır. Bu da ilaç konsantrasyonunun doruk noktasının parenteral dozda olacağından çok daha erken meydana gelmesine neden olabilir (Özdemir ve Karakurt, 2016).

Karaciğerin ilk geçiş etkisinin oluşturduğu bu negatif etkiden kurtulmak ve farmakolojik tedavinin uygun şekilde sürdürülmesini sağlamak için oral olarak alınan ilacın dozu artırılır. Bu da istenmeyen yan etkilere sebep olabilir. Bir diğer seçenek ise ilacın uygulama yolu değiştirilir. Buna örnek olarak; anjina pektoriste tedavisinde tercih edilen nitrogliserin sublingual yolla verilirken migren tedavisi için ergotamin ise rektal yolla uygulanmaktadır. Bir diğer seçenek olarak da bu etkiyi minimuma indirmek için ilaç molekülünün yapısı değiştirilmektedir. Lipofilik yapıda olan ilaçlar daha büyük oranda ilk geçiş etkisine maruz kalırken, hidrofilik ilaçlar ise daha az maruz kalırlar (Pelley, 2011). Böylece ilk geçiş etkisine sahip bir ilacın uygun serum konsantrasyonunun ve güvenli ve etkili dozunun korunması sağlanmış olur. Araştırmalar, ilk geçiş etkisine sahip ilaçların kan konsantrasyonlarının izlenmesinin, bu ilaçların terapötik konsantrasyonlarını korumanın en uygun yol olduğunu göstermiştir (Herman ve Santos, 2019). Intravenöz dışı yoldan verilen bir ilacın sistemik dolaşıma geçme hız ve oranına biyoyararlanım denir. Absorpsiyon hız ve derecesi biyoyararlanım üzerine oldukça büyük bir etkiye sahiptir. Yani verilen ilacın % kaçının absorbe edilip sistemik dolaşıma ulaşabildiğinin ve vücudun o ilaçtan ne kadar yararlanabildiğinin göstergesidir. Oral uygulanan bir ilaç için biyoyararlanım mide-bağırsak mukozasından portal kan dolaşımına geçen ilaç miktarı değil, karaciğeri aşp vena cava inferior'a erişen ve oradan sistemik kan dolaşımına ulaşan ilaç miktarıdır. Bu sebeple biyoyararlanım, vücuttaki farmakokinetik mekanizmasının ayrılmaz bir parçasıdır. Farmakokinetiği oluşturan absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım süreçleri ilaçların biyoyararlanımı üzerine de etkilidir. Bununla birlikte, bir ilacın uygulama yolu ve dozu, biyoyararlanımın hızı ve derecesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bir ilacın dozu, biyoyararlanımı ile dolaylı olarak orantılıdır. Nispeten düşük biyoyararlanıma sahip bir ilacın minimum etki konsantrasyon eşiğine ulaşmak için daha büyük bir doz gerekir. Böyle durumlarda uygulama yolunu değiştirmek dozu artırmayı önleyebilir. Örneğin, oral olarak uygulanan bir ilacın gastrointestinal sistemden geçmesi gerekir ve bu da onu bağırsak emilimine ve hepatik ilk geçiş metabolizmasına maruz bırakır. Oral uygulama yerine, intravenöz olarak

verilen bir ilacın direkt olarak sistemik dolaşıma geçtiği kabul edilir. Böylece oral kullanımda olduğu gibi ilacın hedef organ veya dokuya istenilen dozda ulaşabilmesini sağlamak için gerekli doz hesaplanırken, absorpsiyon ve karaciğerin ilk geçiş etkisini düşünerek dozda bir artış yapmaya gerek kalmaz (Price ve Patel, 2020). Bununla birlikte kullanılan etkin madde ve yardımcı maddelerin saflık ve kalite farklılıkları da biyoyararlanımı etkileyen bir diğer faktördür. İlacın partikül boyutu küçüldükçe yüzey alanı küçüldüğü için çözünme hızı artar ve hızlı emilir. Kristal yapısı amorf olan bir ilaç kristal forma sahip bir ilaca göre daha hızlı çözünür. Absorpsiyon hızını azaltan bir başka faktör ise ilaç etken maddesinin gastrointestinal sistemde kompleks oluşturmasıdır. Bazı durumlarda da suda yavaş ve az çözünen ilaç molekülleri başka bir ilaç ya da yardımcı maddeyle kompleks haline gelerek biyoyararlanımları artabilir. İlaçların yağıdaki veya sudaki çözünürlükleri iyonizasyon derecelerinden etkilenir. Sindirim sisteminin pH'sindeki değişiklikler ilaçların absorbe edildiği ve uygulandığı ortamın pH'sini değiştirdiği için biyoyararlanımları da etkiler. Örneğin; ortamın pH'sinin asidik yöne kayması sonucunda zayıf asidik etken maddelerin noniyonize kısımlarının oranı artacağından absorpsiyonları artarken zayıf bazik etken maddelerin ise iyonlaşan kısımları artış gösterir ve absorpsiyon hızları düşer. Bir diğer etkileyen faktör ise ilacın yemek yenildikten önce ya da sonra kullanılmasıdır. Yemek yemek midenin boşalma süresini, gastrointestinal kanalın kanlanması ve bağırsak motilitesini etkilediği için ilaçların absorpsiyon oranı ve hızı üzerine de etkili olabilir. Ayrıca karaciğerin kan akımı ve enzim aktivitesini de etkileyerek ilaç metabolizması üzerine etkilidir. Bireysel farklılıklar da yaş, cinsiyet, genetik faktörler gibi biyoyararlanımı etkileyen faktörler arasındadır (Çelik ve Birdane, 2015).

İlaçlar çoğu zaman hastaları tedavi ederek hayat kurtarıcı olurken yanlış kullanımları sonucu ise hastaların çok ciddi zarar görmesine sebep olabilir hatta bu durum ölümle sonuçlanabilir. Bu sebeple tüm ilaçlar, reçete edildiği şekilde ve üreticinin talimatları izlenerek uygulanmalıdır. İlaç kullanımının temel amacı, hasta için arzu edilen terapötik etkiyi elde etmektir. Bunu yapabilmenin temel şartı ise doğru ilacı, doğru dozda, doğru kişiye, doğru formülasyonda, doğru uygulama yoluyla ve uygun zaman aralıklarında vermektir (Brack ve ark.). Bir ilaç uygulama yolu, genellikle ilacın uygulandığı yere göre, örneğin oral veya intravenöz olarak sınıflandırılır. İlacın uygulanma yolu seçilirken, sadece uygunluğa göre değil, aynı zamanda ilacın özellikleri, farmakokinetik profili ve biyoyararlanımı da göz önünde bulundurulmalıdır. İlaç uygulamaları sistemik ve lokal olmak üzere ikiye ayrılır. Lokal uygulama; ilacın mukoza, cilt ya da invaziv uygulama ile belirli bir organ ya da vücut bölgesine uygulanmasıdır. Bu

uygulama yolu ile biyoyararlanımda artış, yan etkilerin, toksisitenin ve hedef dışı etkilerin azalması ve düşük maliyet elde edilen avantajlardandır. Bununla birlikte, birçok durumda, farklı vücut boşluklarına lokal ilaç iletimi söz konusu olduğunda veya lokal uygulamanın ancak belirli vücut engellerini ve dokularını aşarak mümkün olduğu durumlarda genellikle uygulama, gerçekleştirilmesi zor ve uzmanlık gerektiren özel enjeksiyon yöntemleriyle gerçekleştirilir. Gastrointestinal kanaldan absorbe edilemeyen ilaçlar da sadece lokal etkiye sahip olmak için bu yolla uygulanabilir. Bununla birlikte bu uygulama yolunda sistemik absorpsiyonu azaltmak için lokal olarak uygulanan ilacın sadece yavaş emilen formları kullanılabilir. Epidermal (cilt üzerine veya peruktan), cilt içine (intrakütan, intradermal), intranazal, oftalmik, intratekal, intraplevral, intraperitoneal, intravajinal, bukkal, otik, intrakardiyak, intrauterin, intraartiküler, intrarektal ve lezyon içine uygulama olmak üzere çeşitli lokal uygulama yolları bulunmaktadır. Sistemik ilaç uygulamasında ise ilaç uygulandıktan sonra kan dolaşımına geçer, vücutta dağılarak etki bölgesine ulaşınca sistemik etkiler oluşturur. Genel olarak bu yol; enteral, parenteral ve özel ilaç dağıtımı olarak üçe ayrılır. Enteral; oral, sublingual ve rektal olarak alt dallara ayrılırken parenteral; inhalasyon, enjeksiyon ve transdermal olarak ayrılır. Enjeksiyonun alt başlıklarında ise intravenöz, intramüsküler, subkütan, intraarteriyel, intraartiküler, intratekal ve intradermal sayılabilir (Verma ve ark., 2010; Talevi ve Quiroga, 2018).

Oral ilaç uygulaması, yukarıda bahsi geçen farklı ilaç uygulamaları arasında en yaygın tercih edilen yoldur. Oral uygulamayı takiben ilaç, sistemik dolaşıma ulaşır ve tüm dokulara yaygın olarak dağılır. Oral uygulama yolunun güvenli, ağrısız, tekrar ve uzun süreli kullanıma uygun olması gibi avantajları vardır. Ayrıca bu yol ile uygulanan ilaçlar hastalar tarafından herhangi bir profesyonelden yardım almaksızın uygulanabilmektedir ve ilaçlar tablet, kapsül gibi katı; veya şurup, süspansiyon gibi sıvı farmasötik şekillerde kullanılabilir. Ancak bu yolun sahip olduğu dezavantajlardan biri ise bu yol ile alınan ilaçların yavaş etki başlangıcı göstermesidir. Bu nedenle acil durumlarda ilacın etkisini gösterebilmesi için geçmesi gereken süre uzun olacağından bu yol ile ilaç uygulaması çok tercih edilmemektedir. Ayrıca tadı tatsız/irite edici ilaçlar, emilemeyen ilaçlar, sindirim sistemindeki enzimlerin ya da mide asidinin etkisi ile etkisini yitirecek ilaçlar yine bu yoldan tercih edilmez. Bilinci kapalı, iletişim kurulamayan, kusma veya ishali olan hastalarda da yine bu yolla ilaç uygulaması yapılamamaktadır. Karaciğerden ilk geçiş etkisine maruz kalarak ilaçların biyoyararlanımlarının düşmesi ve ilaçların besinlerle etkileşime girerek istenmeyen etkilerin oluşması oral uygulamanın diğer

olumsuz yönlerindendir. Oral yoldan alınan ilaçların absorpsiyon oranları değişebilir. İlacın bağırsak epitelyal zar hücrelerini etkili bir şekilde geçememesi, absorpsiyona uğrayacağı bölgeye ulaşmadan önce bozunması ve gastrointestinal sistemdeki pH değişikliklerinden etkilenerek etkisini yitirmesi oral kullanımın tercih edilmeme sebeplerindendir. Bunların yanında oral alınan ilaçların etkisiyle gastrointestinal sistemin mukozasında meydana gelebilecek tahrişler de oral uygulamanın bir diğer dezavantajıdır (Verma ve ark., 2010; Kim ve De Jesus, 2021).

4.14. Sublingual İlaç Uygulaması

Bir diğer uygulama yöntemi olan sublingual uygulamada ise ilaç, dilaltı uygulaması sonrası kan kapilleri ve lenf damarlarınca zengin olan oral mukoza tarafından emilir ve sonrasında süperior vena kava ile kalbe getirilir ve kalp aracılığıyla sistemik dolaşıma pompalanır. Bu ilaç uygulama yolunun en büyük avantajlarından biri karaciğerden ilk geçiş metabolizması yüksek olan bir ilacın bu yol ile verildiğinde biyoyararlanımları düşmeden sistemik dolaşıma kolaylıkla ulaşmasıdır. Bu uygulama yolunun diğer avantajları arasında ise ilacın hızlı absorpsiyonunu takiben etkinin birkaç dakika içinde başlaması ve hastalar tarafından uzman birine ihtiyaç duymadan kendi kendine uygulanabilmesi ve tabletin tükürülmesiyle ilaç etkisinin kolayca sonlandırılabilmesidir. Etki çabuk başladığı için acil durumlarda klinik uygulamalarda ilk sıralarda tercih edilirler. Oral yolla verilemeyen ilaçların uygulaması bu yolla yapılır. Ayrıca sublingual olarak alınan ilaç mide asiditesinin ve gastrointestinal kanal enzimlerin etkisinden korunmuş olacaktır. Ayrıca bazı ilaçlar tükürük ile mideye geçerken ağız, yutak ve yemek borusunda emilimi gerçekleşir. Sublingual uygulamayla bu etki de olmayacağı için ilacın biyoyararlanımı artar. Bunların yanısıra sublingual uygulama; pediatrik, geriatrik ve psikiyatrik hastalar gibi tablet yutmayı reddeden hastalara uygulama kolaylığı sağlar. Özellikle pediatrik hastalar için ağızda bıraktığı hoş tat ile ilacın “acı hap” olarak düşünülmesini engeller. Sıvı formülasyonlara kıyasla ilaç uygulamasında kolaylık ve doğru dozlama da sunduğu diğer avantajlardandır. Ayrıca seyahat eden ve suyu kolaylıkla bulamayan hastalar için suyun gerekli olmadığı bu uygulama yolu uygundur. Bu uygulama ile ilaçların biyoyararlanımı arttığı için oral kullanımın aksine doz azaltılır ve istenmeyen etkilerin görülme ihtimali düşer. Sublingual uygulamanın dezavantajı ise bazen uygulanan ilaç o bölgede tahriş edici olabilir, yüzey alanı küçüktür ve eğer yağda çözünen bir ilaçsa uygulaması güç olabilir. Sublingual uygulamada dikkat edilmesi gereken noktalar ise ağız kuruluşu olan hastalarda ağız içi önce ıslatılmalıdır, uygulama öncesi vazokonstriksiyon ya da vazodilatasyona sebep olup ilacın emilimini

etkileyeceği için çok soğuk ya da çok sıcak içecekler içilmemelidir. Hasta ilacı yutmaması ve iğnememesi konusunda ve ilaç emilimi tamamlanana kadar konuşmaması konusunda uyarılmalıdır (Verma ve ark., 2010; Nibha ve Pancholi, 2012).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Materyaller

PVA (Molekül ağırlığı ~ 89,000–98,000 g/mol), PVP (Molekül ağırlığı ~ 40,000 g/mol), PLGA (Asit terminalli, laktit:glükolik 50:50, Molekül ağırlığı 24,000-38,000) ve PEG (Molekül ağırlığı~ 4,000 g/mol), A β ₁₋₄₂, tüm solventler ve hücre kültüründe kullanılan RPMI 1640 besiyeri, PBS ve Triton X Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. PCR analizinde kullanılan GSK-3 β (İleri 5'-AGTGGTGTGGATCAGTTGGT-3', Ters 5'-ACGGCTACACAGTGCAATTG-3'), β -katenin (İleri 5'-CTTACACCCACCATCCCACT-3', Ters 5'-CCTCCACAAATTGCTGCTGT-3'), Psen1 (İleri 5'-TGGCTCATCTTGGCTGTGAT-3', Ters 5'-CGGGTCTCCTTCTGCCATAT-3'), Akt (İleri 5'-CTGCCCTTCTACAACCAGGA-3', Ters 5'-ATGATCTCCTTGGCGTCCTC-3'), MAPT (İleri 5'-ACTGAGAACCTGAAGCACCA-3', Ters 5'-TCCTGGCTTGTGATGGATGT-3') ve β -aktin (İleri 5'-CATGGAATCCTGTGGCATCC-3', Ters 5'-CACACAGAGTACTTGCGCTC-3') primerleri Sentebilab'tan alınmıştır.

5.2. PLGA Nanopartikül Üretimi

CUR enkapsüle edilmiş PLGA (Asit terminalli, laktit:glükolik 50:50, Molekül ağırlığı 24000-38000) nanopartikülleri çift emülsiyon çözücü uçurma tekniği (su/yağ/su) ile hazırlandı. 40 mg PLGA, 2 ml diklorometan içinde çözöldü. Bu solüsyona 200 μ l PEG içinde çözölmüş 50 μ g ilaç eklenerek homojenize edildi. Daha sonra karışım, 50 ml PVA (%1, a/h) solüsyonuna ilave edildi ve bir su/yağ/su emülsiyonu oluşturmak üzere homojenize edildi. Karışımındaki fazla diklorometan, manyetik bir karıştırıcı yardımıyla çözeltiden uzaklaştırıldı. Nanopartiküller 12000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplandı. Daha sonra nanopartiküller üç kez deiyonize su ile yıkandı. Kurutma için liyofilize edildi (Doğan ve Gurgah, 2022).

5.3. PVP/PEG Nanofiberlerin Basınçlı Dönme Sisteminde Üretilmesi

PVP (%100, a/h) ve PEG (%80, a/h) sırasıyla 120 °C'de ve oda sıcaklığında distile suda çözöldü. PVP/PEG sırasıyla 8:1, 9:1 ve 10:1 (v/v) oranlarında karıştırıldı. Üretilen tüm saf nanofiblerin morfolojileri SEM kullanılarak analiz edildi ve 10:1 (PVP/PEG) oranında boncuksuz ve düzgün morfoloji gözlemlendi. Bu nedenle PVP/PEG (10:1) kompozit solüsyonuna 0,9-1,4 mg/ml CUR yüklü partikül ilave edilerek kolloidal süspansiyonlar elde edildi. Tüm polimer çözeltilerinin yoğunluk, viskozite ve yüzey gerilimi gibi fiziksel parametreleri yoğunluk şişesi (10 mL yoğunluk şişesi, Boru Cam Inc., Türkiye), DV-E viskozimetre

(Brookfield AMETEK, ABD) ve yüzey gerilimi ölçme cihazıyla değerlendirildi. Tüm ölçümler 25 °C sıcaklıkta üç kez tekrarlandı. Ekipmanlar ölçümlerden önce kalibre edildi.

Tüm fiberler basınçlı dönme sistemiyle üretilmiştir. Özetle, 1 mL'lik çözeltiler alüminyum bir kap içerisine konularak 9000-15000 rpm dönüş hızında, 1,5-3,5 MPa çalışma basıncında, %35-40 nem ve 28-35°C sıcaklıkta döndürülerek üretimler denendi (Cam ve ark., 2021).

5.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Liflerin çapı ve morfolojisi SEM (EVO LS 10, ZEISS cihazı) ile analiz edilmiştir. Tüm örneklerin yüzeyi SEM'den önce 1 dk süreyle altınla kaplandı. Ortalama çap ve lif boyutu dağılımı, ImageJ yazılımı (Broken Symmetry Software) kullanılarak rastgele seçilen mikrograflarda 100 lifin çapı ölçülerek belirlendi (Cam ve ark., 2021).

5.5. Fiber İçerisine Gömülen CNP'lerin Floresans Mikroskop ile Görüntülenmesi

Uranin tozu, CNP'leri boyamak için floresan boya olarak kullanıldı. PVP/PEG (10:1) kompozit çözeltilisine floresan boyalı-CNP'ler (0,5 mg/mL) ilave edildi ve CNPF'ler, PG ile üretildi. Floresan boyalı CNP'lerin fiber içerisine başarılı bir şekilde gömüldüğünü doğrulamak için Leica DMLB2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) floresan mikroskopu kullanıldı.

5.6. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR ölçümleri bir Jasco FT/IR 4700 spektrometre kullanılarak gerçekleştirildi ve PLGA, PVP, PEG ve CUR'un varlığını doğrulamak için liflerin ve partiküllerin moleküler içeriklerini belirlemek üzere OPUS Viewer sürüm 6,5 yazılımı kullanılarak spektrograflar analiz edildi. Ölçümler oda sıcaklığında 4 cm⁻¹ çözünürlükte 500 ile 4000 cm⁻¹ dalga sayıları arasında elde edildi (Cam ve ark., 2021).

5.7. X-ışını Toz Kırınımı (XRD)

Nanoliflerin ve nanopartiküllerin yapısı ve kristal formları, Cu K α radyasyonlu bir D/Max-BR difraktometre (RigaKu, Tokyo, Japonya) kullanılarak analiz edildi. Analizler 40 mV ve 30 mA'da 2 θ 5–50° aralığında 2°/dak hızında yapıldı. Elde edilen verilerin difraktogramlara dönüştürülmesi için OriginPro 7 yazılımı (OriginLab Corporation, MA, ABD) tercih edilmiş ve sonuçlardan yararlanılmıştır (Cam ve ark., 2021).

5.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

DSC analizi yapmak için Pyris yazılımı ve Perkin Elmer Jade DSC (PerkinElmer Inc., Mass., ABD) kullanıldı. Sistem, liflerin ve partiküllerin termal özelliklerini analiz etmek için dinamik bir argon atmosferi (20 mL min⁻¹) altında 0 ile 200 °C arasında 10 °C min⁻¹ ısıtma hızına ayarlandı. Sistem ölçümlerden önce kalibre edilmiştir (Cam ve ark., 2021).

5.9. Zeta Potansiyel (ζ) Ölçümü

Üretilen nanopartiküllerin ζ potansiyelleri, PBS (pH 7,4; 137 mM NaCl) içinde yaklaşık 1 mg/mL konsantrasyonda bir Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Ltd., UK) kullanılarak dinamik ışık saçılımı ile incelendi. Nanopartiküller arasındaki itme ve çekme kuvveti ve nanopartikül boyutu analiz edildi. Ölçümler üç kez tekrarlanıp üç ölçümün ortalama değeri olarak sunuldu (Y. Gao ve ark., 2014).

5.10. İlaç Enkapsülleme Verimliliği

Enkapsülleme verimliliği, nanopartikül ve nanofiberlere yüklenen ilaç miktarının, çözelti içerisine konulan toplam ilaç miktarına ağırlık oranı olarak tanımlanmaktadır. Nanofiber ve nanopartiküllerin içindeki CUR içeriğini belirlemek için kullanılacak standart test prosedürü şu şekildedir. Kısaca, nanofiber ve nanopartiküller çözücüsü içinde tamamen çözündürülerek CUR içeriği UV spektroskopisi ile ölçüldü. CNP ve CNPF 5 mg ağırlığında tartıldı ve 10 mL çözücü içeren volumetrik bir flask içinde çözündürüldü. Nanopartikül ve nanofiberlerin flask içerisinde tamamen çözünmesi sağlanacak şekilde 1 saat boyunca yavaşça karıştırıldı ve 1 mL çözelti alınarak UV ile analiz edildi. CUR dalga boyu 425 nm olarak belirlendi (Van Nong ve ark., 2016). Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı. Enkapsülleme verimliliği, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Cam ve ark., 2021):

Enkapsülleme verimliliği = Nanopartikül veya nanofiber içinde yüklü gerçek ilaç miktarı / Nanopartikül veya nanofiber içinde bulunan teorik ilaç miktarı × %100

5.11. *In Vitro* İlaç Salım Profili

İlaç salım testinin başında CUR'un 2 ile 10 µg/mL arasında değişen standart çözeltilerinden doğrusal bir kalibrasyon eğrisi oluşturulup değerlendirildi. İlaç yüklü nanopartiküllerin ilaç salım profilini araştırmak amacıyla ilaç yüklü nanopartiküllerden 5 mg ağırlığında tartıldı. Sonrasında 1 mL PBS'e (37 °C, pH 7.4 olacak şekilde) daldırıldı ve her numune termal çalkalayıcıda (BIOSAN TS-100) 200 rpm sabit hızda karıştırıldı. Belirlenen zaman noktalarında (1., 2., 3., 4., 6., 24., 48., 72., 120., 192., 240., 288., 360. ve 432. sa) analiz amacıyla PBS çözeltisi çıkarıldı ve yerine 1 mL taze PBS eklenerek salım testine devam edildi. Numuneler CUR salım profilini tespiti için UV spektrometre kullanılarak 425 nm'de ölçüldü (Van Nong ve ark., 2016). Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı (Akhgari ve ark., 2017; Cam ve ark., 2021). Nanofiberler sublingual uygulamaya uygun üretildiği için ve ultra hızlı bir şekilde disintegrasyon profili gösterdiği için *in vitro* salım testi yapılmamıştır. İlacın nanopartikülden salım profili değerlendirilmiştir.

5.12. *In Vitro* İlaç Salım Kinetiği

İlaçların vücuttaki plazma konsantrasyonunun zamanla değişimi *in vitro* olarak simüle edildi ve ilacın nanopartikülden salımı beş farklı matematiksel model kullanılarak hesaplandı. Aşağıda verilen denklemler Korsmeyer-Peppas (1), sıfır derece (2), birinci derece (3), Higuchi (4) ve Hixson-Crowell (5) modellerine ait değişkenleri içermektedir. Bu modellerin kinetik sabitleri sırasıyla K, K₀, K₁, K_h ve K_{hc}'dir. Q, t zamanında ilaç salımının kesirli miktarıdır. n, difüzyon katsayısını gösterir (Cam ve ark., 2021).

$$Q = Kt^n \quad (1)$$

$$Q = K_0t \quad (2)$$

$$\ln(1-Q) = -K_1t \quad (3)$$

$$Q = K_{ht}^{1/2} \quad (4)$$

$$Q^{1/3} = K_{hc}t \quad (5)$$

5.12. Degredasyon Testi

Tüm örnekler 1 ml PBS'ye yerleştirildi, deney boyunca 37°C'lik bir termal çalkalayıcıda (BIOSAN TS-100) tutuldu. Nanopartiküllerin başlangıç ağırlıkları (A₀) ilk gün ölçüldü. Daha sonra bozunma testi için belirlenen zaman aralıklarında (1., 5., 7., 10., 15. ve 18. gün) ağırlıkları (A_z) ölçüldü. Ölçüm için nanopartiküller PBS ortamından alındı ve oda sıcaklığında 6 saat kurutuldu. Degredasyon indeksi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (Guler ve ark., 2021).

$$\text{Degredasyon oranı} = (A_0 - A_z) / A_0 \times \%100$$

5.13. Nanofiberlerin Disintegrasyon Testi

Nanofiberler 15 mL PBS (pH 7,4) içeren bir petri kabına yerleştirildi. Kullanılan yapay tükürük formülasyonu (%0,034) potasyum fosfat, %0,2 metilparaben, %0,5 sodyum karboksimetilselüloz, %0,005 magnezyum klorür, %0,062 potasyum klorür, %4,69 dekstroz ve %0,01 sodyum florür kullanılarak hazırlandı. İlk olarak magnezyum klorür, metilparaben ve dekstroz ılık suda eritildi, ardından çözeltiler karıştırılmadan önce ortam sıcaklığında soğutuldu. Deneyler termal çalkalayıcı (BIOSAN TS-100) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanofiberlerin parçalanması bir video kamera (Canon Sx70 HS, Tokyo, Japonya) ile sn'de 50 kare olarak kaydedildi (Topal ve ark., 2022).

5.14. *In vitro* Hücre Kültürü Testleri

5.14.1. Hücre Kültürü ve Tedaviler

SH-SY5Y hücreleri, %5 CO₂ ile nemlendirilmiş bir inkübatörde 37 °C kültür ortamında %90 RPMI 1640 besiyeri %10 fetal sığır serumu ile kültürlendi. Hücreler her 3 günde bir tripsin ile

pasajlanmıştır. Analiz için, SH-SY5Y hücreleri 24 saat boyunca 96 oyuklu plakalarda $0,5 \times 10^4$ hücre/kuyu yoğunluğunda kültürlendi. A β_{1-42} indüklemek için hücreler A β_{1-42} varlığında 20 μ M konsantrasyonda 24 saat daha inkübe edildi. Tedavi grupları için hücreler, A β_{1-42} indüksiyonundan sonra 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda tedavi grupları ile muamele edildi. Tedavi ve hastalık gruplarını karşılaştırabilmek için kontrol grubu oluşturuldu. Tedavi sonrası her gruptaki hücrelerin morfolojik yapıları faz kontrast mikroskobu ile gözlemlendi (Du ve ark., 2019).

5.14.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi için Picogreen Test Analizi

Toplam DNA içeriği, üreticinin önerdiği protokol izlenerek Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) testi ile belirlendi. Hücre ekilmiş oyuklar, 1 ml PBS ile yıkandı ve daha sonra hücre lizisi için %0,1 (v/v) Triton-X içeren 1 ml 1x PBS ile inkübe edildi. Toplanan hücreler 11000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. 96 oyuklu bir plaka içinde 175 μ L PicoGreenW reaktif çalışma solüsyonuna 25 μ L süpernatant ilave edildi. 30 dk inkübe edildi. Numunelerin floresansı, sırasıyla 485 ve 535 nm eksitasyon ve emisyon dalga boylarına sahip bir mikropilok okuyucu (Tecan, Research Triangle Park, NC) ile ölçüldü. DNA konsantrasyonuna karşı standart bir floresans eğrisi oluşturuldu ve tüm ölçümler üç kez tekrarlandı (Du ve ark., 2019).

5.14.3. Oligomerik A β_{1-42} ve Tedavi Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

A β_{1-42} stok solüsyonu, 1 mg/ml konsantrasyonda PBS (37 °C'de pH 7,4) ile hazırlandı. Stok solüsyon 37 °C'de 72 saat inkübe edildi. Tedavi gruplarının stok çözeltileri, uygulamadan 24 saat önce farklı konsantrasyonlarda PBS ile hazırlandı (Du ve ark., 2019).

5.14.4. SH-SY5Y Hücrelerinde Anti-Alzheimer Etkinliğinin Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücreleri, oyuk başına $0,5 \times 10^4$ oranında 96 oyuklu plakalara ekildi ve 37 °C'de 24 saat kültürlendi. A β_{1-42} (5,10 ve 20 μ M) hücrelere eklendi. Plakalar tekrar 37 °C'de 24 saat daha inkübe edildi. Daha sonra, hücrelere farklı dozlarda tedavi grupları uygulandı. 24 saat sonra, Picogreen test protokolü kullanılarak hücre canlılığı belirlendi ve kontrol hücrelerinin yüzdesi olarak ifade edildi. A β_{1-42} dozu olarak 20 μ M seçildi (Du ve ark., 2019).

5.14.5. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı PCR

Hücreler, 12 oyuklu plakalara $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyu olarak ekildi ve 20 μ M A β_{1-42} veya PBS uygulanmadan önce 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saat boyunca hücreler, 1 μ M'de CUR, CNP ve CNPF'ye maruz bırakıldı. SH-SY5Y hücrelerinin toplam RNA'sını elde edebilmek için MiniRNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. Qiagen First Strand Kit ile cDNA'ya ters transkripsiyonun ve bir Biotech Spektrofotometre ile kantifikasyonun

ardından, 500 ng toplam RNA elde edildi. SYBR Green RT-qPCR Master Mix, Rotor-Gene Q Sisteminde (Qiagen, Hilden, Almanya) kantitatif gerçek zamanlı PCR için kullanıldı. Döngü eşiği (Ct) değeri daha sonra kaydedildi ve bir $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hedef genin göreceli ifadesi belirlendi. PCR Dizisi Veri Analizi Yazılımı (The GeneGlobe Data Analysis Center, Qiagen), kontrole kıyasla tedavi edilen hücrelerdeki kat değişimini belirlemek için kullanıldı. Tablo 1’de PCR analizinde kullanılan primerlerin gen dizilerinin listesi verilmiştir. β -aktin geni, housekeeping gen (referans değeri) olarak seçildi.

Tablo 1. PCR analizinde kullanılan primerlerin gen dizilerinin listesi

Genler	Primer Gen Dizilimleri
GSK-3 β	İleri 5'-AGTGGTGTGGATCAGTTGGT-3'
	Ters 5'-ACGGCTACACAGTGCAATTG-3'
β -katenin	İleri 5'-CTTACACCCACCATCCCCT-3'
	Ters 5'-CCTCCACAAATTGCTGCTGT-3'
Psen1	İleri 5'-TGGCTCATCTTGGCTGTGAT-3'
	Ters 5'-CGGGTCTCCTTCTGCCATAT-3'
Akt1	İleri 5'-CTGCCCTTCTACAACCAGGA-3'
	Ters 5'-ATGATCTCCTTGGCGTCCTC-3'
MAPT	İleri 5'-ACTGAGAACCTGAAGCACCA-3'
	Ters 5'-TCCTGGCTTGTGATGGATGT-3'
β -aktin	İleri 5'-CATGGAATCCTGTGGCATCC-3'
	Ters 5'-CACACAGAGTACTTGCGCTC-3'

5. 15. *İn vivo* Anti-Alzheimer Etkinliğinin Değerlendirilmesi

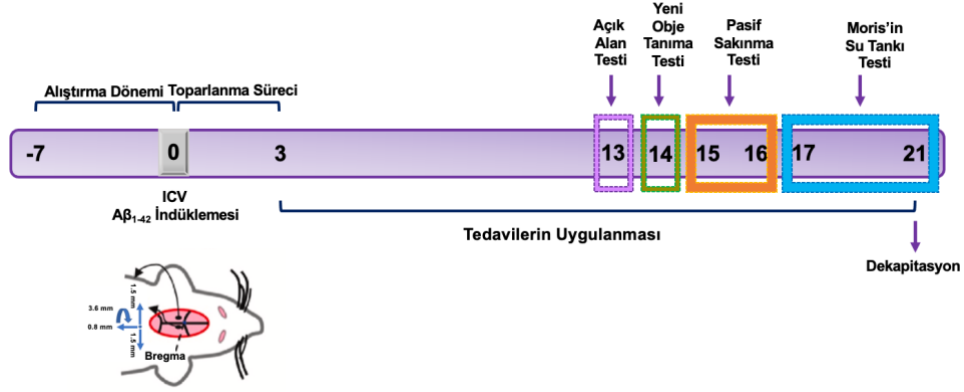
Bu tez çalışmasında yapılacak hayvan deneylerinde kullanılacak hayvanlar için Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAMER) Etik Kurul Başkanlığı’ndan etik kurul onayı (49.2020mar., Onay Tarihi: 25.09.2020) alınmıştır.

5.15.1. Vücut ağırlığı ölçümü

Hayvanlar deneyin başlangıcında ICV-A β_{1-42} peptit enjeksiyonundan önce ve deney süresince her hafta, davranış deneylerinin sonuna kadar düzenli olarak tartıldı. Başlangıç ağırlığının %20’sinden fazla ağırlık kaybı yaşayan hayvanlar deneyden çıkarıldı.

5.15.2. Sıçanlarda ICV-A β ₁₋₄₂ peptit indüklü Alzheimer modelinin oluşturulması ve sıçanların tedavi edilmesi

AH modeli oluşturmak için ICV yoldan A β ₁₋₄₂ enjeksiyonu bilateral olarak yapıldı. 3-4 aylık 250-300 g ağırlığında Sprague Dawley erkek/dişi hayvanlar kullanıldı (DEHAMER, 49.2020mar., Onay Tarihi: 25.09.2020). Hayvanlar ketamin/ksilazin (100/10 mg/kg, sırasıyla) (i.p., 0,1 ml/100 g) ile anesteziye alındıktan sonra, kafa derilerindeki tüyler tıraşlandı ve ICV-A β ₁₋₄₂ uygulaması için stereotaksi cihazına yerleştirildi. Asepsi kurallarına uyularak kafada sagittal insizyon açıp bregma ve sagittal sütür ekspose edildikten sonra Paxino ve Watson sıçan atlasından serebroventrikül girişime uygun olan yerden elmas dental tur uçla karşılıklı iki mini delik açıldı. Kafatasında bregma referans noktası alınarak aşağıdaki koordinatlara karşılık gelen lateral ventriküllere iki taraflı olacak şekilde bregmadan 0,8 mm aşağı, 1,5 mm sağ ve sol yanlar, 3,6 mm kafatasından içeriye doğru delikler açıldı. Bu aşamada delik açılmadan önce iki taraf kalemle işaretlendi ve bu işaretli kısımlardan, özel matkap yardımıyla delikler açıldı. Stereotaksi cihazına monte edilmiş 100 mm hamilton mikroyenjektörü (No:28) ile serebral ventriküllerin her birine 5 μ l hacimde, 1 μ g/ μ l dozda A β ₁₋₄₂ uygulaması yapıldı. Uygulama hacmi yavaşça (1 μ l/dak) verildi ve çözelti hacmindeki kaybı önlemek için şırınga en az 5 dk bu şekilde tutuldu. Hayvanlar 21 gün boyunca tedavi grupları ile tedavi edildikten sonra dekapite edildi (Sheetal Sharma ve ark., 2019) (Şekil 6). Tedavi gruplarında hayvanlar 6 gruba bölünmüştür: Kontrol grubu (Sağlıklı hayvanlardan oluşan grup), ICV-A β ₁₋₄₂ grubu (Hastalık grubu), PNF grubu (ICV-A β ₁₋₄₂ + Tedavide PNF'nin verildiği grup, sublingual uygulama), CNPF grubu (ICV-A β ₁₋₄₂, Tedavide CNPF'nin verildiği grup, sublingual uygulama), Toz CUR grubu (ICV-A β ₁₋₄₂, Tedavide toz CUR'un verildiği grup, oral uygulama) ve DO grubu (ICV-A β ₁₋₄₂, Tedavide pozitif kontrol grubu olarak DO'nun verildiği grup, oral uygulama). CUR dozu hem toz CUR (oral) hem de CNPF (sublingual) grubu için 20 mg/kg'dır (Tiwari ve ark., 2014). Pozitif kontrol grubu olan DO ise 5 mg/kg olarak oral uygulanmıştır (Topal ve ark., 2022). Tedaviler, hayvanlara AH indüklemesinden 3 gün sonra uygulanmaya başlanmıştır. Ayrıca hayvanlara AH indüklemesi sonrası ilk bir hafta boyunca her gün diklofenak sodyum 10 mg/kg i.p. (Hasani ve ark., 2011) ve gentamisin 5 mg/kg i.p. (Raheja ve ark., 2021) uygulaması yapılmıştır.



Şekil 6. *In vivo* hayvan deneyi sürecinin şematik gösterimi

5.15.3. Davranış çalışmaları

5.15.3.1. Açık alan testi

Açık alan testi, deney sırasında sıçanların davranışlarını izlemek için tavana bir kamera yerleştirilerek yapıldı. Bu test, orta derecede aydınlatılmış bir odaya yerleştirilen siyah zemin üzerine beyaz çizgilerle 25 eşit kareye bölünmüş yüzeye sahip (50x50x30 cm³), 60 cm yüksekliğindeki pleksiglas kutuda gerçekleştirilmiştir. Duvara bitişik 16 kare "dış kareler" olarak adlandırılıp güvenli alanı temsil ediyordu. Orta alandaki diğer 9 kare ise açık alanı temsil ediyordu ve "iç kareler" olarak adlandırılıyordu. Test gerçekleştirilirken, başlangıç köşesine bir sıçan yerleştirildi ve hareket etmesine izin verilerek 5 dk boyunca gözlemlendi. Deney sonunda sıçanların merkez bölgede geçirdikleri zaman, merkez alana ilk girdikleri süre, süslenme ve şaşlanma sayıları ve katedilen toplam çizgi sayısı kaydedilmiştir. Hayvanların merkez bölgede 4 patisi görüldükten sonra merkez bölgeye girdi olarak kabul edildiler. Her testin sonunda zemin %70 etanol ile temizlendi ve 5 dk kurumaya bırakıldı (Veysanoğlu ve ark., 2023).

5.15.3.2. Morris'in su tankı testi

Hayvanların öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını değerlendirmek için çalışmaya ait davranış testleri ve Morris'in su tankı testi yapıldı. Tank 4 sabit nokta belirlenerek 4 bölge oluşturacak şekilde bölündü. Bu havuz içerisine herhangi bir yanlış pozitif sonuç elde etmemek için havuzla aynı renkte 10x10x10 cm³ ölçülerinde bir kaçış platformu yerleştirildi. Bu platform havuzun sabit bir bölgesinde çalışma boyunca su yüzeyinin 1,5 cm altında tutuldu. Sıçanlar havuzun önceden belirlenen kaçış alanı bulunmayan bir bölgesindeki başlangıç noktasına yüzleri duvara bakar bir halde yavaşça bırakıldı. Sıçanın 75 saniye boyunca kaçış platformunu bulması beklendi ve başaramazsa kibarca platforma yönlendirildi ve 30 saniye boyunca platformun

üzerinde kalmasına izin verildi. Hayvanlara 4 ardışık gün boyunca yaklaşık 10'ar dk ayrılarak 4 deneme yapıldı ve bu süre içerisinde 2 parametre değerlendirildi: Hedef kadranda geçirilen toplam süre ve platforma ulaşmak için geçen süre. 5. gün, önceki denemeden 24 saat sonra, kaçış platformu çıkarıldı ve hayvanlar çalışmayı sonlandırmadan önce 60 saniye boyunca serbest bir şekilde yüzmeye bırakılarak prob çalışmaları başlatıldı. Bu prob çalışmada hayvanın hedef kadrana ulaşma süresi ve hedef kadranda geçirdiği süre hesaplandı. Bu test uzaysal öğrenme ve hafızanın bir ölçüsü olarak kabul edildi. Datalar video kamera ile kaydedildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.15.3.3. Pasif sakınma testi

Testte pasif sakınma cihazı kullanıldı. Cihaz, aydınlık ve karanlık olmak üzere iki farklı bölmeden (her biri 20x25x30) oluşmakta ve bu iki bölme bir geçiş kapısıyla ayrılmaktadır. Aydınlık bölme biri ışık yardımıyla aydınlık tutulmaktadır. Test öğrenme ve sakınma olmak üzere 2 ardışık günde tamamlandı. Öğrenme gününde, her bir sıçan tek tek ışıklı bölmeye yerleştirilip karanlık bölmeye geçtiğinde ızgara zemini üzerinde ayaklarına elektrik şoku uygulandı. Sonrasında sıçan hızlı bir şekilde platformdan alınarak kafesine konuldu. Sakınma deneyi ise öğrenme deneyinden 24 saat sonra gerçekleştirildi. Başlangıçta sıçanlar yine ışıklı bölmeye konuldu, ışıklı bölmeye konduktan sonra hayvanların karanlık bölmeye geçiş süresi kaydedildi. Eğer hayvanlar 300 saniye içerisinde karanlık bölmeye geçmezse, test sona erdirildi ve geçiş süresi 300 saniye olarak kabul edildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.15.3.4. Yeni obje tanıma testi

Yeni obje tanıma testi 50x50x30 cm siyah pleksiglastan yapılmış bir düzenekte yarı karanlık ortamda gerçekleştirildi. Yeni obje tanıma testine başlamadan bir gün önce alıştırma yapıldı ve ertesi gün teste başlandı. Alıştırma gününde aynı kafesteki hayvanlar pleksiglas düzeneğe obje olmaksızın yerleştirildi ve 60 dk boyunca test düzeneğine alışmaları sağlandı. Alıştırma süreci tüm hayvanlar için uygulandı. Test gününde her bir hayvan 60 dk arayla 3 dk süresince düzeneğe yerleştirildi. İlk yerleştirme tanıma evresi olarak adlandırılıp bu süreçte aynı iki nesne test düzeneğine yerleştirildi ve 3 dk boyunca hayvanın düzenekte serbestçe gezinmesine izin verilerek bu nesneleri tanıması sağlandı. 3 dk süre dolduğunda hayvan düzenekten alınarak kafesine konuldu (T1). 60 dk sonra aynı hayvan tekrar düzeneğe alındı ve T1'de görmüş olduğu objelerden bir tanesi değiştirilerek 3 dk boyunca platform üzerinde serbestçe gezinmesi sağlandı (T2). Her iki periyot da bilgisayar destekli kamera sistemi yardımıyla kayıt altına alındı ve hayvanların T2'de her iki objeye olan ilgileri skorlandı. Hayvanın yeni objeye karşı olan

ilgisinin eski objeye karşı olan ilgisine oranı bu hayvanın öğrenme ve bellek fonksiyonunun bir ölçüsü olarak kabul edildi (Abdel-Aal ve ark., 2011).

5.15.4. Alınan Beyin Dokularının Histolojik Analizi

Deney hayvanları sakrifiye edildikten sonra, elde edilen beyin dokuları hızlıca serum fizyolojik ile yıkanarak ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edildi. Dokular daha sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi, 2x10 dk ksilende tutularak şeffaflaştırıldı, 60°C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklandı. Parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında alınan kesitlere genel morfolojik değerlendirme yapabilmek için Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyası uygulandı. Kesitler daha sonra ışık mikroskobu (LEICA DMA 1000) ile incelenerek fotoğraflandı (Guler ve ark., 2023).

5.15.5. Alınan Beyin Dokularının İmmunohistokimyasal Analiz

Deney gruplarından alınan beyin dokuları anti-beta amyloid ve anti-tau immünohistokimyası için %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edildi. Pozitif şarjlı lamlara alınan 4 µm kalınlığında parafin kesitler 1 gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra, deparafinize etmek amacıyla ksilende 3x5 dk tutulup, %96'luk alkolde 2 kere 10 dk bekletildikten sonra endojen enzim blokajı yapmak için metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 20 dk bekletildi. Önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için ısıtılmış sitrat tamponda (pH 6.0, 60°C'de) 20 dk 200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakılan kesitler PBS ile 2 kere 5 dk yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dk bekletildi. Pankreas kesitleri gece boyunca primer antikorlar ile inkübe edilmiş, ardından biyotinlenmiş sekonder antikorlar ve streptavidin-peroksidaz konjugatları (ABCAM, ab64264) ile inkübasyon yapıldı. Kesitler, PBS (phosphate-buffered saline, fosfat tamponlu salin) içinde yıkandı, sıvı diaminobenzidin (ABCAM, ab64264) ile ortaya çıkarıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapıldı (Topal ve ark., 2022).

5.15.6. Alınan Beyin Doku Örneklerinde ELİSA ile Ölçülen Aβ Seviyeleri

Hayvan deneyi sonunda alınan beyin doku örneklerindeki (korteks ve hipokampal bölgeler) Aβ seviyelerine ELİSA yöntemiyle bakıldı. Dekapitasyon sonrası alınıp -200°C'de saklanan dokular çözdürüldü fakat ısısının 2-8°C'de tutulmasına özen gösterildi. Dokular küçültüldü ve ağırlığı tartıldı. Bir tüpün içerisine doku yerleştirilip üzerine %10'luk homojenat olarak PBS

(pH 7.4) eklendi ve homojenizatör ile örnekler homojenize edildi. Yaklaşık 20 dk 3000 rpm’de santrifüj edilerek dikkatli bir şekilde süpernatantları toplandı. Standartlar her bir kit prosedürüne göre seyreltilerek hazırlandı. Reaktiflerimiz de kit içerisinde hazır durumdaydı. Kuyucuklara standartlar 50 µl konuldu, kör olarak ilk kuyucuğa hiçbir şey konulmadı. Test edilecekler örnekler ise 40 µl örnek çözücü+10 µl örnek olacak şekilde kuyucuklara konuldu ve hafifçe karıştırıldı. 37°C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her küvete 0,35 ml yıkama solüsyonu konuldu ve sonrasında sirkeleyerek yıkama solüsyonu döküldü ve ters çevirerek havlu kağıda solüsyon boşaltıldı. Bu işlem 5 kere tekrar edildi. Her bir kuyucuğa (kör kuyu hariç) 50 µl HRP-konjugat reaktifi eklendi ve 37°C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bir önceki basamaktaki gibi yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama yapıldıktan sonra kör ve standartlar da dahil olmak üzere her kuyuya önce kromojen solüsyon A 50 µl, sonra ışıktan korunması gereken kromojen solüsyon B karanlık ortamda yine 50 µl olacak şekilde eklendi. Karışması için nazikçe çalkalandı ve 10 dk 37°C 'de inkübe edildi. 10 dk'lık inkübasyon sonrasında her bir kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu koyduktan sonra 15 dk içerisinde ölçüm yapılması gerektiği için hemen ELİSA reader'a (Epoch Biotek®) alındı. 450 nm'de ELİSA Reader yardımıyla ölçüm yapıldı. Absorbansların elde edilmesinin ardından absorbans-konsantrasyon grafiği çizildi (Topal ve ark., 2022).

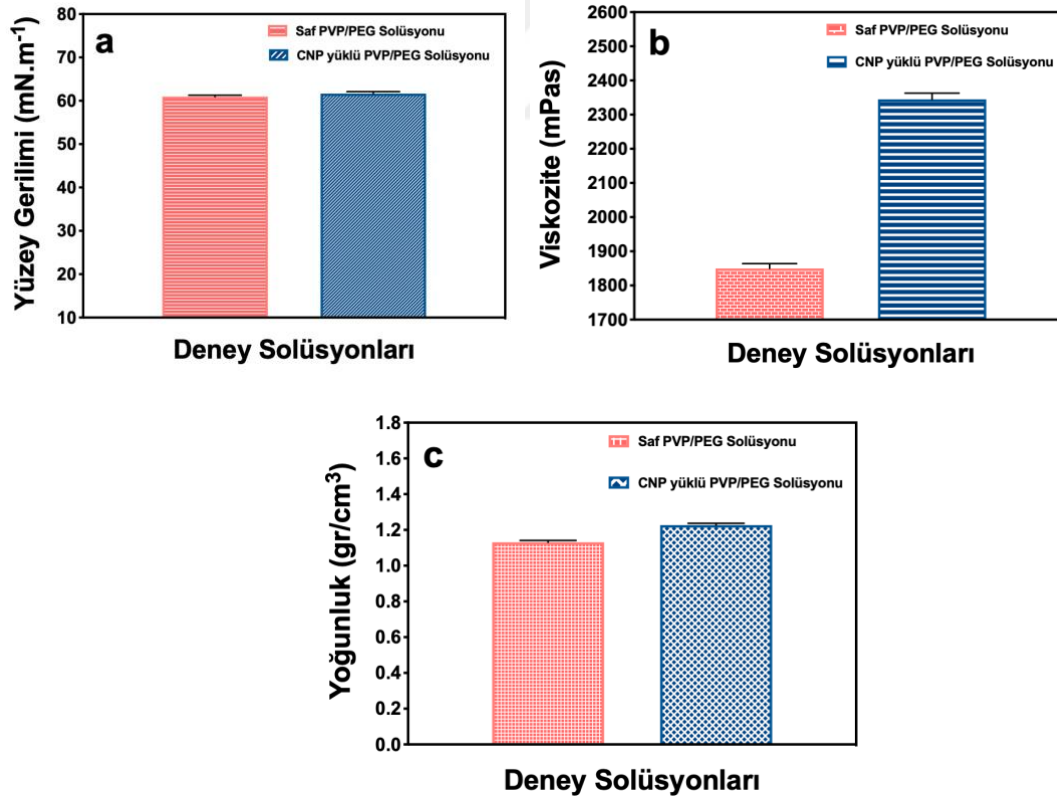
5.16. İstatistiksel Analiz

Verileri istatistiksel olarak analiz etmek için istatistiksel uygulama GraphPad Prism 8.0 kullanıldı. Sonuçlar ortalamanın standart ortalama hatası ya da sapması olarak sunuldu. Aralarındaki grupların performansını değerlendirmek için ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Solüsyonların Fiziksel Parametreleri

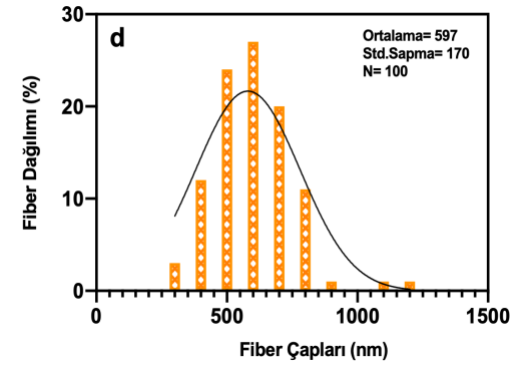
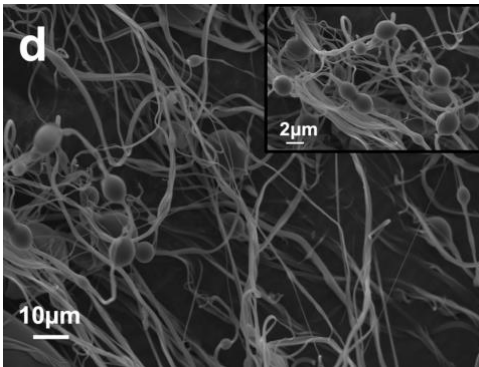
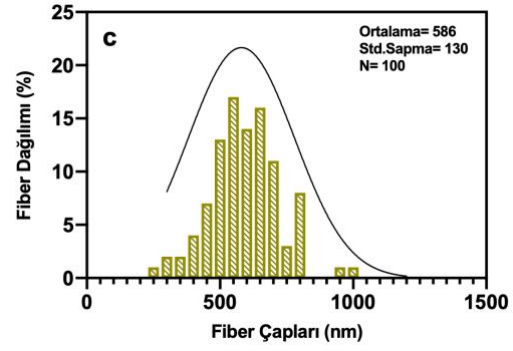
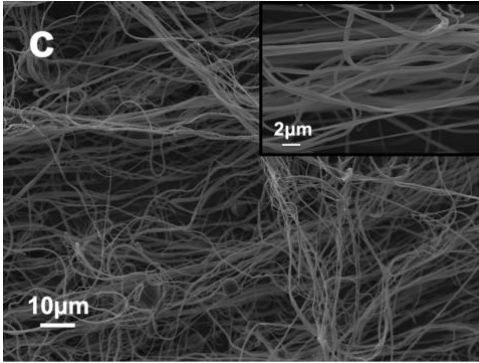
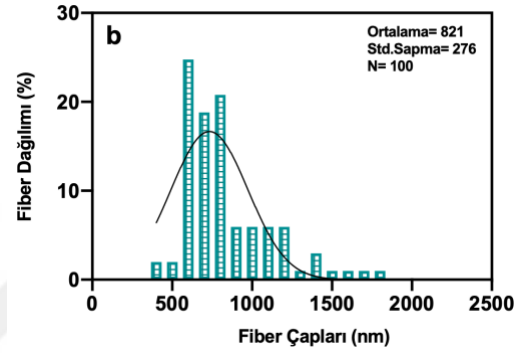
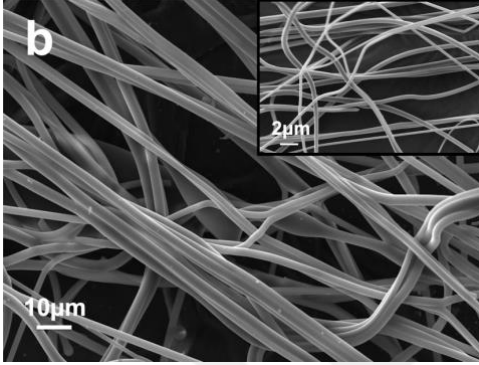
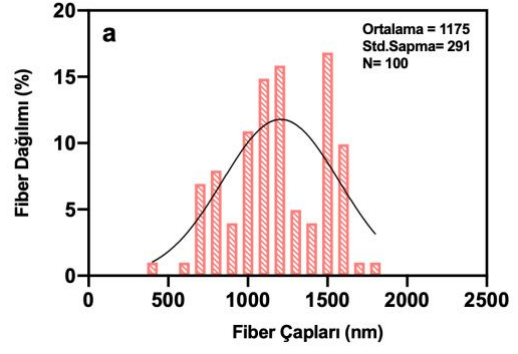
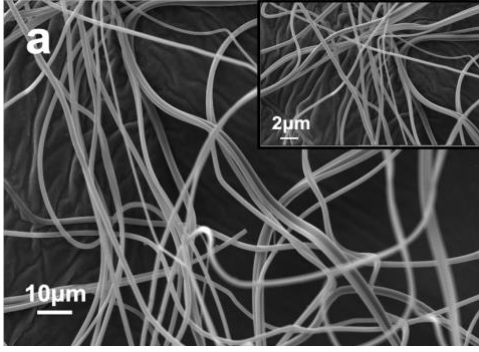
PG sistemi ile fiber üretiminde üretimi etkileyen solüsyon parametreleri solüsyonun yüzey gerilimi, yoğunluğu ve viskozitesidir. Fiber üretiminde kullanılacak PVP ve PEG solüsyonları sırasıyla %100 (a/h) ve %80 (a/h) olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Sonrasında PVP/PEG kompozitini oluşturmak için çözeltiler seçilen optimum oranda (10:1 (v/v)) karıştırılmıştır. İlaç yüklü olmayan bu saf PVP/PEG kompozit solüsyonunun yüzey gerilimi $60,95 \text{ mN.m}^{-1}$, yoğunluğu $1,131 \text{ gr/cm}^3$ ve viskozitesi 1850 mPas olarak ölçülmüştür. Sonrasında bu solüsyonun içerisine $1,2 \text{ mg/ml}$ CNP eklenerek CNPF üretimi için CNP yüklü PVP/PEG solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ilaç yüklü PVP/PEG solüsyonunun fiziksel parametreleri ölçüldüğünde ise yüzey gerilimi $61,65 \text{ mN.m}^{-1}$, yoğunluğu $1,227 \text{ gr/cm}^3$ ve viskozitesi 2345 mPas olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan saf PVP/PEG solüsyonuna ilacın eklenmesiyle birlikte yüzey gerilimi artarken, yoğunluğun azaldığı, viskozitesinin ise arttığı bulunmuştur (Şekil 7).

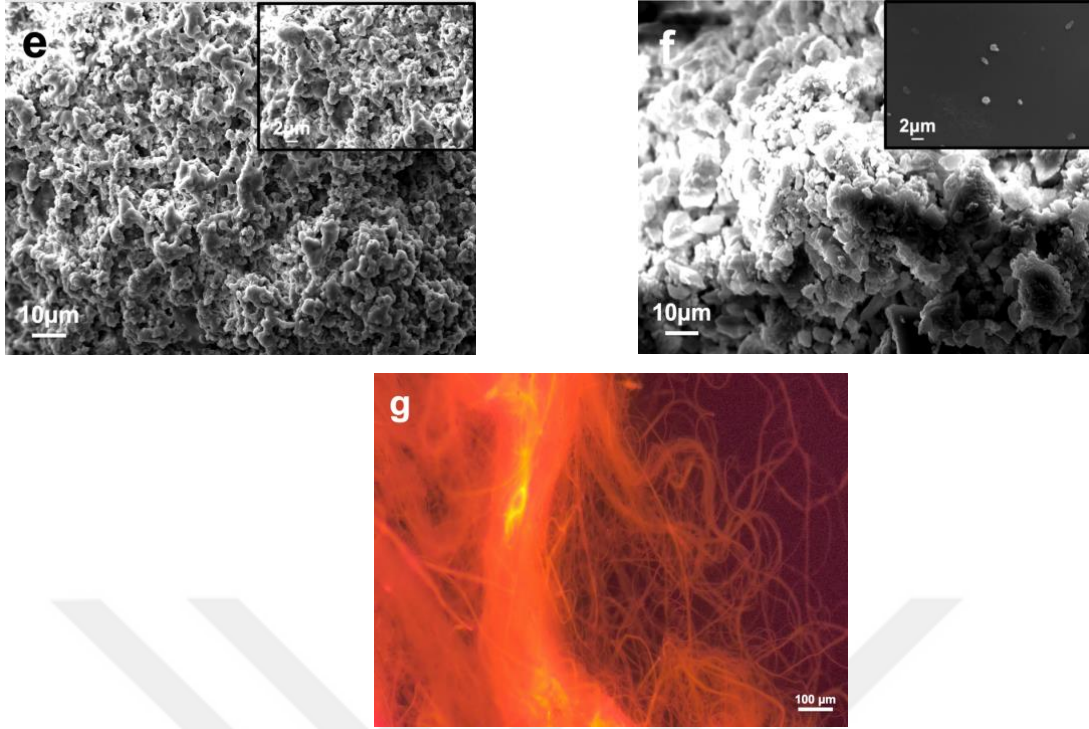


Şekil 7. Solüsyonların fiziksel parametre sonuçları : (a) Yüzey gerilimi, (b) viskozite ve (c) yoğunluk

6.2. Üretilen Fiber ve Nanopartiküllerin SEM ile Morfolojik Analizleri

PG tekniğiyle üretilen fiberlerin ve çift emülsiyon tekniğiyle üretilen nanopartiküllerin morfolojileri SEM altında analiz edilmiş ve Şekil 8’de verilmiştir. Morfolojik olarak kıyaslama fiberlerin homojen dağılımı, yapılarında boncuk olup olmaması ve çapları gözönünde bulundurularak yapılır. PG tekniğiyle fiber üretimde, üretimi ve fiber çapını etkileyen parametreler arasında ise nem, basınç, sıcaklık ve dönme hızı bulunmaktadır. Bu doğrultuda fiberler 9000-15000 rpm dönüş hızında, 1,5-3,5 MPa çalışma basıncında, %35-40 nem ve 28-35°C sıcaklık aralıklarında PVP/PEG kompozit nanofiberler (PNF) 8:1, 9:1 ve 10:1 (v/v) olmak üzere üç oranda üretilmiştir. 8:1, 9:1 ve 10:1 oranlarında üretilen fiberlerin çapları sırasıyla 1175 ± 291 , 821 ± 276 ve 586 ± 130 nm olarak ölçülmüştür. Üç oran arasında fiber çapının en düşük olması, boncuksuz ve homojen bir morfolojik yapısının olmasıyla optimize oran olarak PVP/PEG 10:1 (v/v) seçildi. Üretilen saf nanopartiküllerin (PNP) çapı ise 202 ± 1.28 nm iken CUR enkapsüle edildikten sonra partikül çapı 216 ± 1.84 nm’ye yükselmiştir. CNPF ise, saf PVP/PEG 10:1 (v/v) solüsyonundan alınan 1 ml solüsyonun PG sistemine konulmasının ardından bu solüsyon içerisine 0,9-1,4 mg/ml CNP konulup hızlıca karıştırılmasıyla üretilmiştir. SEM altında analiz edilen CNPF morfolojilerinde CNPF’nin çapının 597 ± 170 nm olduğu saptanmıştır. Tüm bu ölçüm sonuçları fiberlerin SEM görüntülerinde 100 ölçüm alındıktan sonra ortalamalarının belirlenmesiyle bulunurken partiküller için ise partikül çaplarının ölçülmelerinin ardından elde edilmiştir. Böylece PNF’ler arasında PVP/PEG kompozitinde PVP’nin oranı 8’den 10’a yükseldikçe çapın 1175 ± 291 nm’den 586 ± 130 nm’ye azaldığı görülmüştür. Saf PVP/PEG solüsyonuna CNP’nin eklenmesinin ardından ise çap 597 ± 170 nm’ye yükselmiştir. Saf ve ilaçlı olarak üretilen nanopartikül çapları kıyaslandığında ise PNP’nin çapı 202 ± 1.28 nm’den CUR’un enkapsüle edilmesinin ardından 216 ± 1.84 nm’ye yükselmiştir. Bu sonuçların ışığında saf nanopartikül ve nanofiberlerin CUR ve CNP enkapsüllemelerinin ardından çaplarının artışı kanıtlanmıştır.



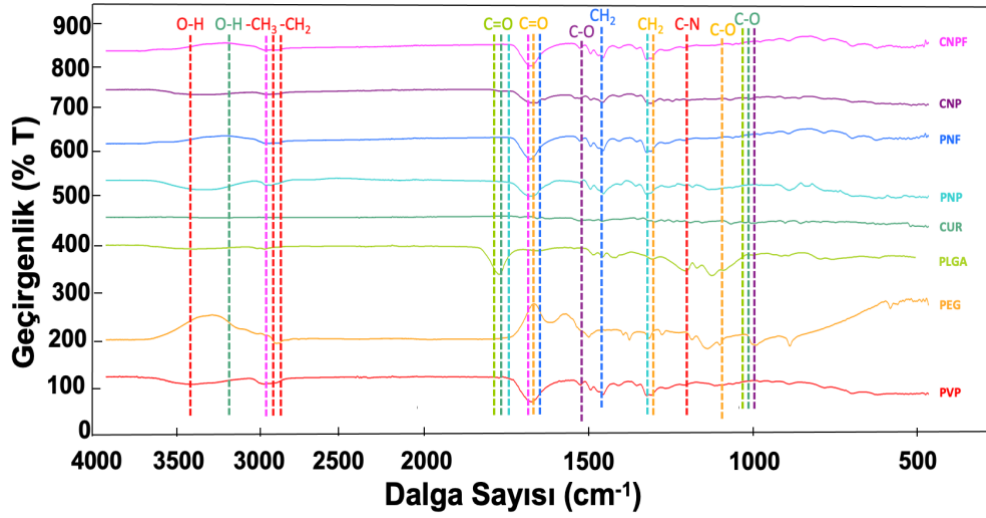


Şekil 8. Üretilen PLGA/PEG nanopartiküllerinin ve PVP/PEG fiberlerin SEM görüntüleri, fiber çap dağılımlarının histogram grafikleri ve floresan mikroskop görüntüsü: (a) 8:1, (b) 9:1 ve (c) 10:1 (v/v) PNF, (d) CNPF, (e) PNP, (f) CNP ve (g) floresan mikroskop görüntüsü. Tüm ölçümler N = 100 olacak şekilde ölçülmüştür. (N: SEM görüntüsünde ölçülen fiber sayısı) (Std. Sapma: Standart Sapma) (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül)

6.3. Üretilen Fiber ve Nanopartiküllerin Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR, üretilen nanofiber ve nanopartiküllerin kimyasal yapılarını analiz etmek için kullanılmıştır. Örnekleri üretmek için kullanılan CUR ve polimerler tek tek karakteristik pikleri gözönünde bulundurularak analiz edilmiştir. PVP'nin FT-IR spektroskopisi analiz edildiğinde 1074 cm^{-1} 'de C-O tek bağ esneme titreşimi, 1644 cm^{-1} 'de C=O çift bağ esneme titreşimi, 2956 cm^{-1} 'de $-\text{CH}_3$ germe titreşimi, 3401 cm^{-1} 'de O-H esneme titreşimi, 1286 cm^{-1} 'de C-N esneme titreşimi, 1421 cm^{-1} 'de C-H bükülme titreşimi, 2955 cm^{-1} ve 2893 cm^{-1} 'de CH_2 gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri, 1373 cm^{-1} ve 1317 cm^{-1} 'de ise C-H eğilme titreşimleri görüldü. Bunlarla birlikte 1492 , 1459 , 1438 ve 1421 cm^{-1} 'deki dört orta pik döngüsel CH_2 grubunun makaslama titreşimiyle ilişkilidir. 1228 ve 11768 cm^{-1} 'deki diğer zayıf bantlar, pirol halkasının CH_2 bükülmesinden kaynaklanmaktadır. 1074 cm^{-1} 'deki küçük bant, C-H bükülmesinden ve halka deformasyonu ile ilişkilidir (Siva ve ark., 2021; Bramanti ve ark.,

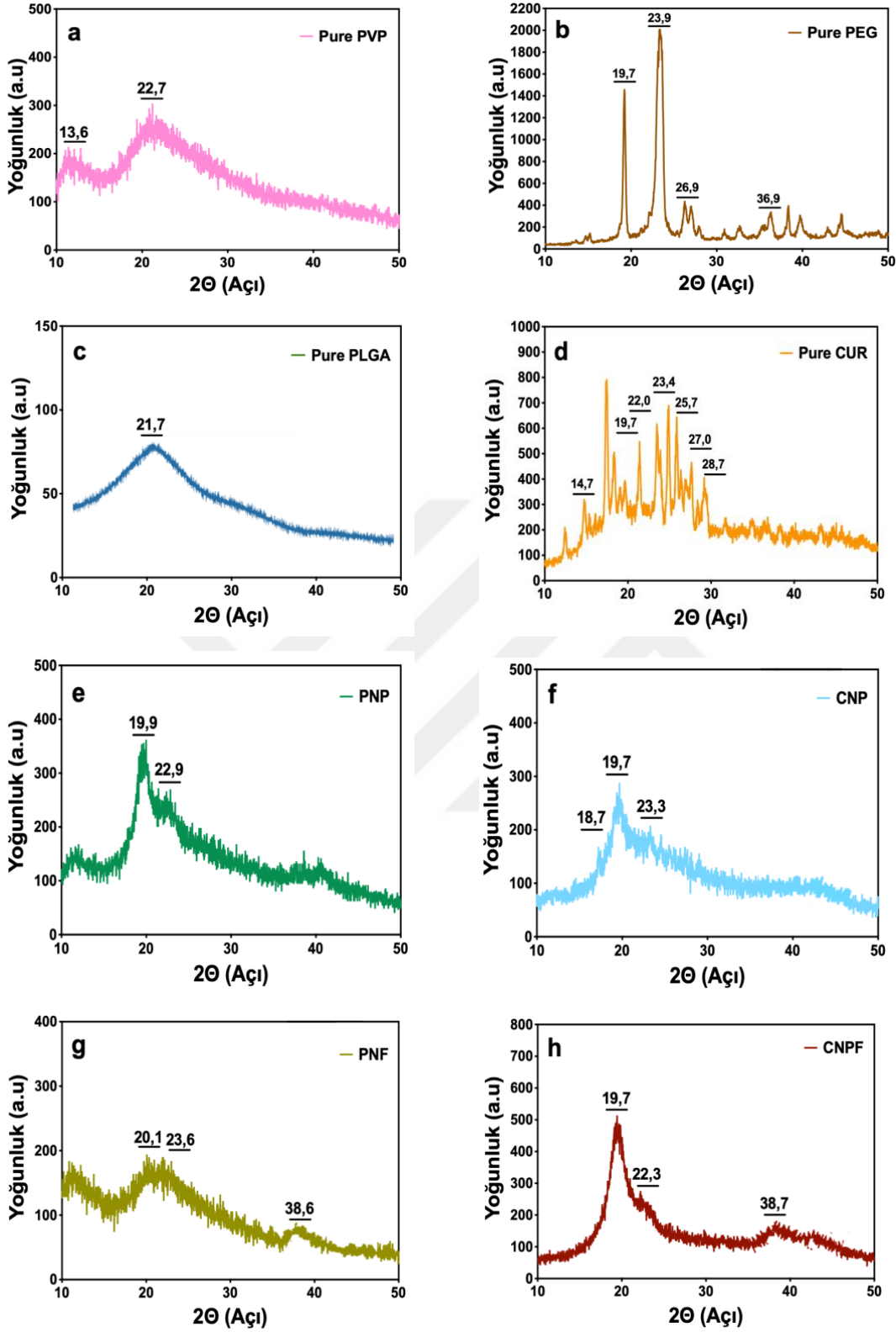
2022; Topal ve ark., 2022). PEG'in karakteristik pikleri analiz edildiğinde 2879 cm^{-1} 'de C-H tek bağ gerilme piki, 1633 cm^{-1} 'de C=O esneme titreşimi, 1453 cm^{-1} 'de CH_2 gerilme piki, 1097 cm^{-1} 'de C-O tek bağ (eter) gerilme piki görüldü (Erzengin ve ark., 2022). Ayrıca 1460 cm^{-1} ve 1340 cm^{-1} bölgesindeki pikler C-H deformasyon titreşimlerini temsil etmektedir. Ek olarak, 1281 cm^{-1} ve 1239 cm^{-1} bölgesindeki pikler ise O-H bükülme titreşimlerine karşılık gelir (Charmi ve ark., 2019). 1127 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki, PEG'in C-O-C karakteristik titreşimiyle ilişkilidir (Wang ve ark., 2019). PLGA ise 3502 cm^{-1} 'deki geniş pik O-H gerilme titreşimi gösterir. 2998 ve 2954 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar ise alifatik C-H gerilme titreşimleriyle (C-H, C-H₃ ve C-H₂) ilgilidir. PLGA'da gerilen -C=O grupları ise 1745 ve 1630 cm^{-1} 'de görülmüştür. C-O grubunun gerilmesi ise 1083 cm^{-1} 'de elde edilmiştir (Bhatt ve ark., 2020; Balakrishnan ve ark., 2021). CUR'a ait karakteristik pikler analiz edildiğinde ise 3232 cm^{-1} 'de fenol grubuna ait olan O-H esneme titreşimi, 2906 cm^{-1} 'de ise -CH₃ esneme titreşimi, 1024 cm^{-1} 'de ise C-O esneme titreşimi, 1625 ve 1589 cm^{-1} 'de C=O ve C-O (eter) gruplarına ait bantlar, $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ 'de OH tekli bağ grubunun -C-O uzaması, 700 , 806 ve 960 cm^{-1} 'de ise C-H alken grubunun ve C-H bükülme titreşiminin spesifik pikleri görülmüştür (Roy ve Rhim, 2020; Aydın ve ark., 2022). Tüm bu karakteristik pikler gözönünde bulundurularak PNP'nin yapısı analiz edildiğinde 2940 , 1643 , 1461 , 1421 , 1286 , 892 cm^{-1} 'deki pikleriyle PLGA ve PEG'in karakteristik pikleriyle uyumlu pikler gösterdiği görülmüştür. Aynı şekilde CNP spektroskopisi analiz edildiğinde 3365 , 2944 , 1629 , 1025 , 964 ve 813 cm^{-1} 'de görülen piklerle CUR'un CNP'ye enkapsüle edildiği kanıtlanmıştır. PNF'nin yapısına bakıldığında 1650 , 1421 ve 1286 cm^{-1} 'deki piklerle nanofiberlerin üretiminde PVP ve PEG'in kullanıldığı ve CNPF'deki 2944 , 1648 ve 1421 cm^{-1} 'deki piklerle ise CNP'nin başarılı bir şekilde CNPF'ye yüklendiği kanıtlanmıştır. Böylece bu testin analizinin ardından fiber ve partikül üretiminde kullanıldığı iddaa edilen PVP, PEG ve PLGA polimerlerinin ve ilaç olarak kullanılan CUR'un örneklerdeki varlığı kanıtlanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Üretilen nanopartikül ve nanofiberlerin FT-IR sonuçları (PVP : Polivinilpirolidon, PEG: Polietilen glikol, PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik asit, CUR: Curcumin, PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, PNF: PVP/PEG nanofiber, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber)

6.4. Üretilen Fiber ve Nanopartiküllerin X-ışını Toz Kırınımı (XRD)

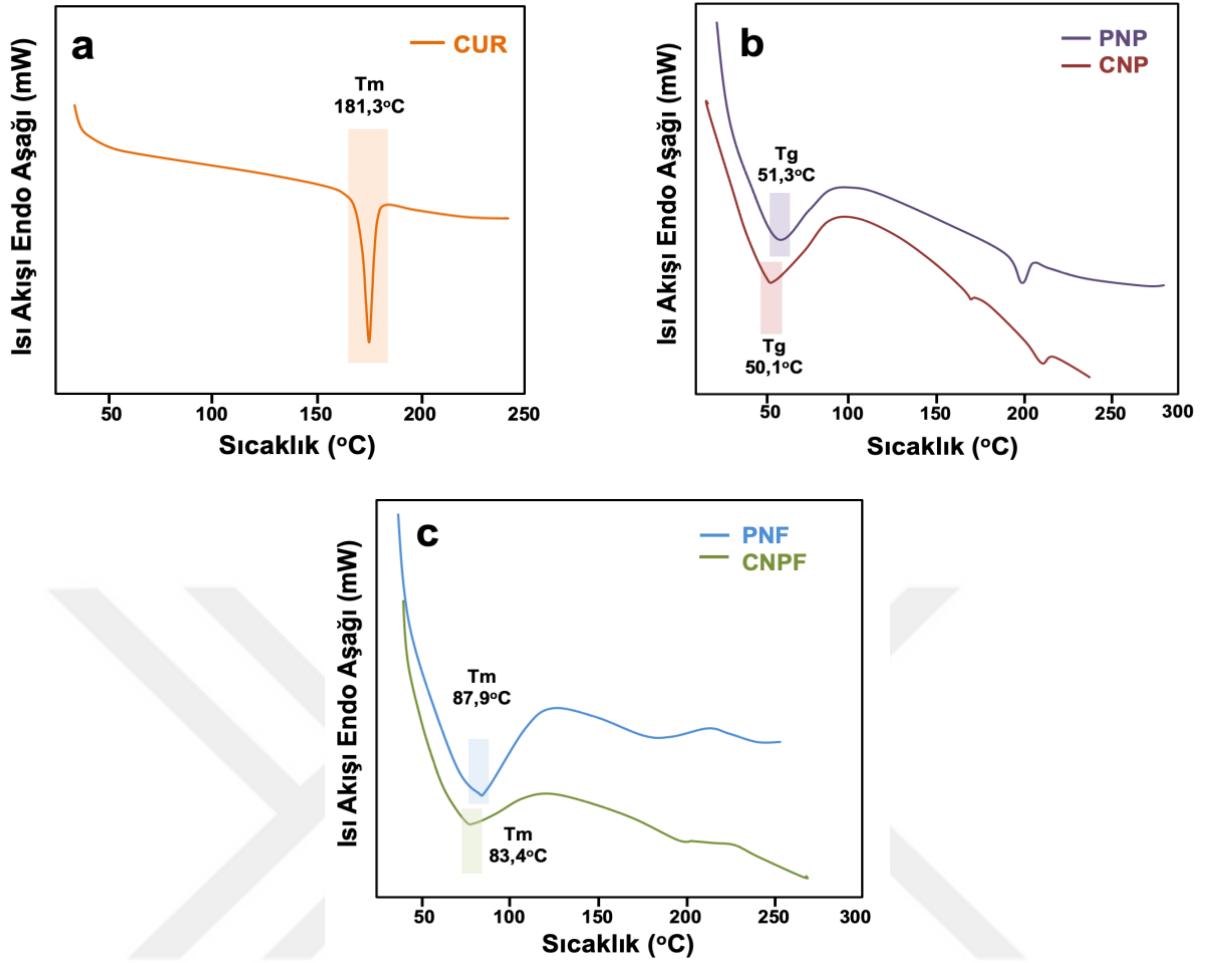
XRD analizi, üretilen nanopartikül ve nanofiberlerin ve bu ürünlerin üretiminde kullanılan polimerlerin ve ilacın kristal yapısını analiz etmek için yapılmıştır. Bu analiz sonucunda PVP polimerinin amorf yapıda olduğu kanıtlanmıştır. Amorf yapısı kaynaklı XRD modelinde keskin olmayan, geniş pikler görülmüştür. Bu pikler de $2\theta = 13,6$ ve $22,7^\circ$ 'te elde edilmiştir (L. Huang ve ark., 2021; Liu ve ark., 2021). PEG yapısı incelendiğinde ise kristal bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur ve bu kristal yapısı sayesinde düzenli ve birbirine yakın bağları yapısında bulundurarak $2\theta = 19,7^\circ, 23,9^\circ, 26,9^\circ$, and $36,9^\circ$ 'te de keskin pikler vermektedir (H.-L. Tan ve ark., 2020; Erzengin ve ark., 2022). Bir diğer polimer olan PLGA'nın kristal yapısı analiz edildiğinde ise $2\theta = 7^\circ$ ile 25° arasında pik noktası $21,7^\circ$ 'de olan geniş, tek bir pik verdiği görülmektedir. Keskin olmayan bu geniş pik PLGA'nın amorf yapıda olduğunu kanıtlamaktadır (Sadozai ve ark., 2020). PLGA nanopartiküllerin içerisine tedavide kullanılmak üzere enkapsüle edilen CUR'un yapısı ise kristal yapıdadır. Kristal yapısını da $2\theta = 14,7; 19,7; 22,0; 23,4; 25,7; 27,0$ ve $28,7^\circ$ 'de verdiği oldukça keskin pikler ile kanıtlamıştır (Homayouni ve ark., 2019; H. Xie ve ark., 2022). Bu bilgiler doğrultusunda PLGA ve PEG polimeri kullanılarak üretildiği iddaa edilen PNP'lerin yapısı $19,9$ ve $22,9^\circ$ 'da gösterdiği pikler ile kanıtlamıştır. Sonuç olarak saf PVP, PEG, PLGA ve CUR'un XRD modelleriyle, üretilen nanopartikül ve nanofiberlerin yapıları karşılaştırıldığında kullanıldığı iddaa edilen polimerlerin ve CUR'un üretilen bu ilaç taşıyıcı sistemlerdeki varlığı kanıtlanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. XRD sonuçları : (a) PVP, (b) PEG, (c) PLGA, (d) CUR, (e) PNP, (f) CNP, (g) PNF ve (h) CNPF (PVP : Polivinilpirolidon, PEG: Polietilen glikol, PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik asit, CUR: Curcumin, PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber)

6.5. Üretilen Fiber ve Nanopartiküllerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetrisi (DSC)

Üretilen CUR yüklü nanopartikül ve nanofiberlerin termal özelliklerinin analizini yapabilmek için DSC analizi yapılmıştır. Bu analizde ilaç yüklü ve yüklü olmayan nanopartikül ve nanofiberler ve CUR'un toz halinin DSC diyagramları çekilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde toz CUR'un T_m değerinden kaynaklanan 181.3°C'de karakteristik endotermik bir pike sahip olduğu görüldü (V. Sharma ve Pathak, 2016; Sadeghi-Ghadi ve ark., 2023). PLGA, PEG ve PVA polimerleri kullanılarak üretilen PNP'lerin diyagramında PLGA'nın T_g değeri olarak 51,3°C'de PLGA'nın amorf yapısı kaynaklı fazla sıvı olmayan ana piki görülmüştür. Normalde toz PLGA polimerinin T_g'si 60°C'ye yakın çıkarken nanopartikülün T_g'si PEG'in plastikleştirici etkisiyle polimer zincirleri arasındaki çekici kuvvetlerin azalması kaynaklı T_g değerinde hafif bir düşüş görülmüştür. Ayrıca diyagramda görülen küçük pikler ise nanopartikül üretimde stabilizatör olarak kullanılan PVA'nın etkisiyle ortaya çıkmıştır (Vega ve ark., 2012; Sun ve ark., 2015). Nanofiberlerin üretiminde kullanılan PVP/PEG kompozisyonunun DSC diyagramında ise emilen suyun buharlaşması sebebiyle 80 - 140°C'de geniş bir pik görülmüştür. Bu durum PVP'nin higroskopik yapısının kanıtıdır. PEG'le meydana gelen kimyasal etkileşim sonucunda da bu pik hafifçe gerilemiştir (Akhgari ve ark., 2016; Tort ve ark., 2019; Almukainzi ve ark., 2022). Bir diğer yandan CNP ve CNPF'nin DSC diyagramları ise CUR'un bu ilaç taşıyıcı sistemlerin termal davranışlarında nasıl bir değişiklik meydana getirdiğini ve bu ilaç taşıyıcı sistemlerde homojen bir dağılım gösterip göstermediğini analiz etmek için incelendi. Toz CUR DSC diyagramındaki sıvı pikin varlığı, CNP ve CNPF'nin diyagramlarında yerini çok hafif bir dalgalanmaya bırakmıştır. Bu da CUR'un partikül veya nanofiberlerin yüzeyine adsorplanmadığının, içine enkapsüle olduğunun ve bu ilaç taşıyıcı sistemlerde homojen bir dağılım gösterdiğinin bir kanıtıdır (L. Hu ve ark., 2015) (Şekil 11).



Şekil 11. DSC analiz sonuçları: (a) Toz CUR, (b) PNP ve CNP ve (c) PNF ve CNPF (CUR: Curcumin, PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber)

6.6. Zeta Potansiyel (ζ) Ölçümü

Zeta potansiyeli, partikül dağılımlarındaki elektrostatik etkileşimleri kontrol eden fiziksel bir özelliktir ve koloidal dağılımların kararlılığının anlaşılmasında önemli bir parametredir. Partikül ile partikülün çevresini çevreleyen iyonik atmosfer arasındaki potansiyel farkı olarak tanımlanır. ± 30 değeri zeta potansiyel değeri olarak kritik bir değerdir ve genellikle partikülün kararlılığını belirlemek için seçilen bir değerdir. 30 mV'den büyük bir mutlak değer kararlı bir koşul olarak belirtilirken, 30 mV'den düşük bir zeta potansiyel değeri ise kümeleşme, kararsızlık, flokülasyon veya topaklaşmaya yönelik bir durumu gösterir. Süspansiyonun pH'ı, sıcaklığı, kararsızlık radyasyonu, konsantrasyonu, solüsyonun iyonik gücü, partikülün boyutu, polimer/çapraz bağlayıcı oranı ve yüzey ligandlarının yapısı zeta potansiyeli etkileyen parametrelerdendir (Colegate ve Molyneux, 2007). Çoklu dağılma indeksi (PDI), bir örneğin

boyuta dayalı heterojenliğinin ölçüsüdür. Aynı zamanda örneklerin agregasyona olan eğilimleri hakkında da fikir verir (Mudalige ve ark., 2019).

Bu çalışmada üretilen PNP ve CNP'nin zeta potansiyelleri, partikül boyutları ve PDI'ları ölçülmüştür. CNP için zeta potansiyeli, partikül boyutu ve PDI sırasıyla $1,78 \pm 0,03$ mV; $216,43 \pm 1,84$ nm ve $0,278 \pm 0,03$ 'tür. PNP için bu değerler sırasıyla $1,82 \pm 0,02$ mV; $201,87 \pm 1,28$ nm ve $0,259 \pm 0,03$ 'tür (Tablo 2).

Tablo 2. Zeta potansiyel, partikül boyutu ve PDI ölçüm sonuçları

Örnekler	ζ potansiyel (mV) $\pm$ SH	Partikül boyutu (nm) $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH
CNP	$1,78 \pm 0,03$	$216,43 \pm 1,84$	$0,278 \pm 0,03$
PNP	$1,82 \pm 0,02$	$201,87 \pm 1,28$	$0,259 \pm 0,03$

Dipnot: SH: Standart hata, PDI: Çoklu dağılıma indeksi

6.7. *In Vitro* İlaç Salım Profili ve İlaç Salım Kinetiği

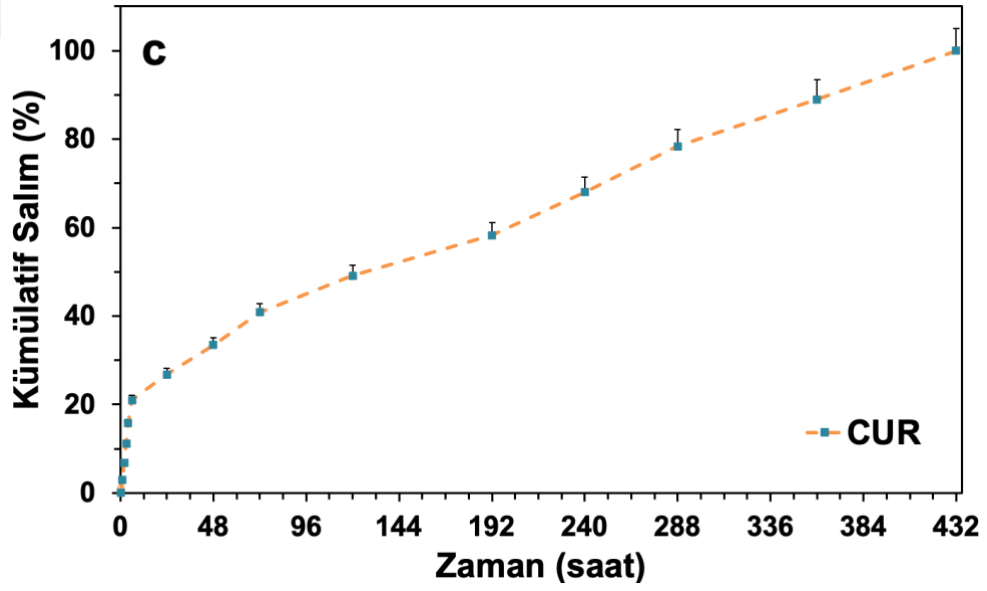
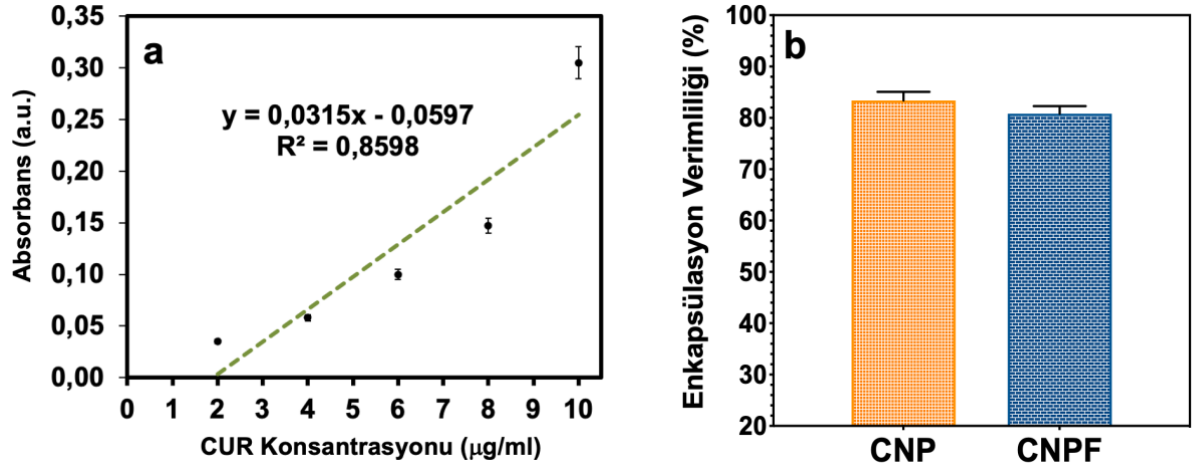
In vitro ilaç salım profili, geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerde enkapsüllenen ilacın vücut içerisindeki zamana bağlı salım profilini taklit etmek için gerçekleştirilen bir testtir. Bu testte ilaç taşıyıcı sistemi PBS içerisine koyarak önceden belirlenen zaman aralıklarında PBS içerisinden örnekler alınıp UV spektrometrede ilacın spesifik dalga boyunda ölçümler yapılarak salınan ilaç miktarı hesaplandı. Vücuttaki sistemik dolaşımı taklit etmek için kan pH'ı ve sıcaklığı esas alınarak pH 7,4'e, sıcaklık ise 37°C'ye ayarlandı. Salınan ilaç miktarını bulabilmek için öncelikle o ilaca ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi gerekmektedir. İlacın bilinen farklı 5 konsantrasyonda örneği hazırlandı ve UV altında ölçümleri yapıldı. Bu çalışmada 2, 4, 6, 8 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında CUR numuneleri hazırlandı ve CUR'un spesifik dalga boyu olan 425 nm'de ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler sonucunda $y = 0,0315x - 0,0597$ ($R^2 = 0,8598$) kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Bu çalışmada, AH tedavisi için ilaçların biyoyararlanımını artıran ve dozaj sıklığını ve yan etkilerini azaltan, beyin hedefli yeni bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle, CUR'un sürekli ilaç salımını sağlamak üzere nanopartikül üretiminde biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, hidrofobik PLGA polimeri seçildi. Üretilen CNP ve CNPF'deki CUR'un EE'si sırasıyla $83,4 \pm 1,7$ ve $80,8 \pm 1,5$ olarak bulundu. *In vitro* ilaç salım testi, CNPF'nin disintegrasyon testinin sonucunda 5 sn'de dağıldığı görüldüğü için CNPF ile yapılmak yerine CNP kullanılarak gerçekleştirildi. Çünkü CNPF için dissolüsyon testi yapılsa dahi CNPF'nin disintegrasyonu sonucunda salınacak CNP içerisindeki CUR, CNP'den

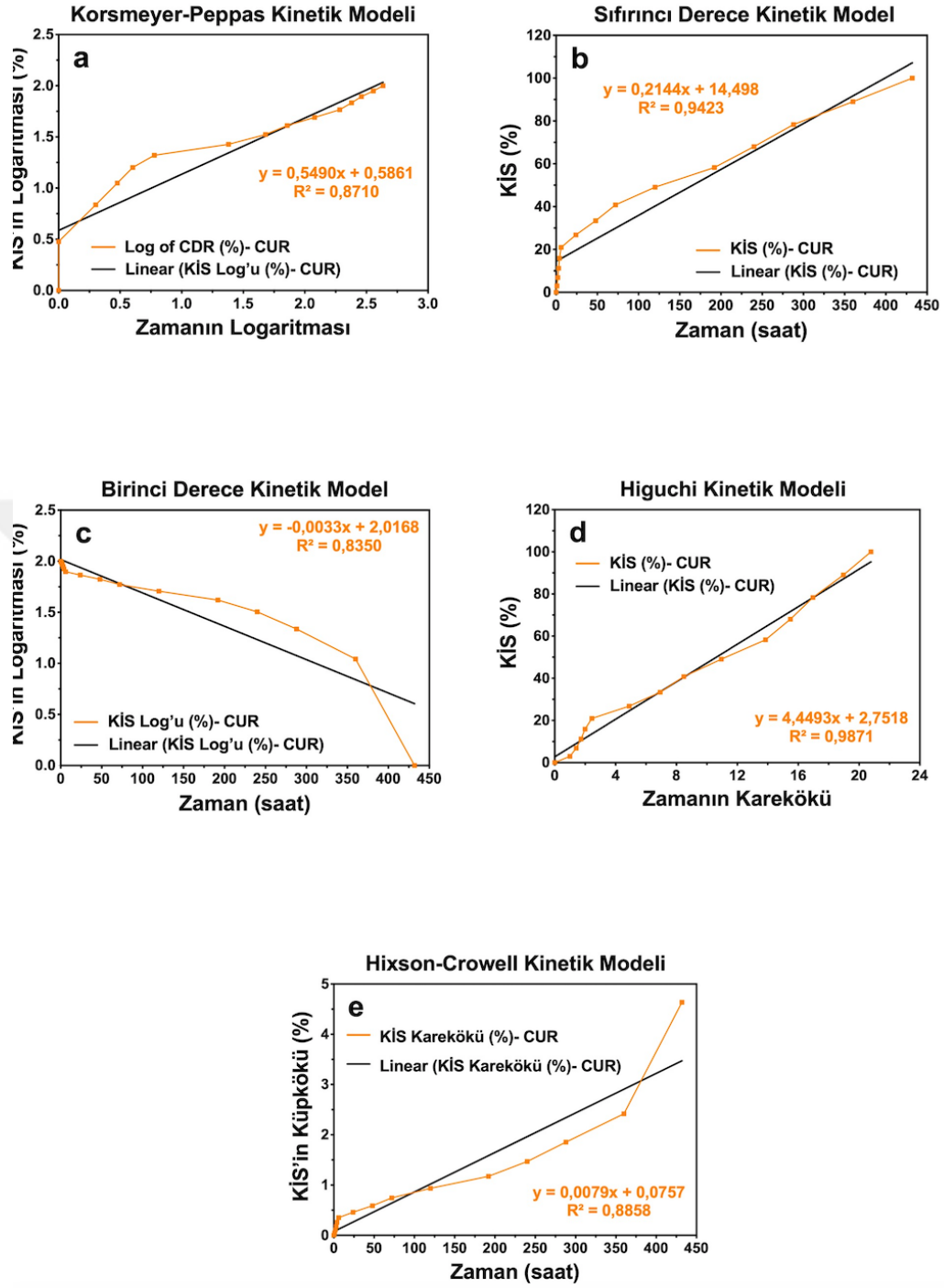
5 sn içerisinde salınmayacağı için ölçüm sonuçları sıfır çıkacaktı. Bu yüzden CNPF'nin sublingual kullanımının ardında ağızda 5 sn sonra tamamen parçalanıp içine gömülü olan CNP'nin sistemik dolaşıma geçtiği kabul edilip CNP'deki CUR'un *in vitro* ilaç salımı test edilmiştir. 18 gün boyunca plazma pH'ını (pH 7.4, 37 °C'de) taklit ederek PBS içerisinde belirli miktardaki CNP'de enkapsüllenmiş CUR salım profili araştırılmıştır. Ölçümler 1, 2, 3, 4, 6 ve 24. saat, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15 ve 18. günde yapılmıştır. CUR; 1. saatin sonunda %3, 2. saatin sonunda %6, 3. saatin sonunda %11, 4. saatin sonunda %15, 6. saatin sonunda %20 salınarak kısa sürede patlama salım profili göstermiştir. Bu patlama salım profiline, PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine adsorbe olan CUR'ların veya daha küçük boyutlu PLGA nanopartiküllerinden hızlı difüze olan CUR'ların sebep olduğu düşünülmektedir. 24. saatin sonunda %26 olan CUR salımı 5. günün sonunda %49'a ulaşmış, 8. günün sonucunda %58, 10. günün sonunda %68, 12. günün sonunda %78, 15. günün sonunda %89 ve 18. günün sonunda ise %100 ulaşarak CUR salımı tamamlanmıştır. Analiz sonucundan da anlaşılabileceği gibi 18 gün gibi uzun bir süre boyunca ilacın, geliştirilen yeni ilaç taşıyıcı sistemden kontrollü salımı devam etmiştir. Böylece hedeflenildiği gibi dozlama sıklığı azaltılıp yan etkileri düşürülmüş bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir (Şekil 12A).

In vitro ilaç salım kinetiği ise ilacın vücut içerisinde hangi kinetik modele uygun olarak salındığının *in vitro* olarak değerlendirildiği testtir. Bu çalışmada, CUR salımı 5 farklı ilaç salım kinetiği modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu kinetik modeller; Korsmeyer-Peppas, sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixon-Crowell kinetik modelleridir ve bu kinetik modellerden elde edilen R^2 değerleri sırasıyla $R^2 = 0,8710$; $0,9423$; $0,8350$; $0,9871$ ve $0,8858$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre CUR salımının R^2 değeri 1'e en yakın olan Higuchi kinetik modeline göre gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 12B).

A



3



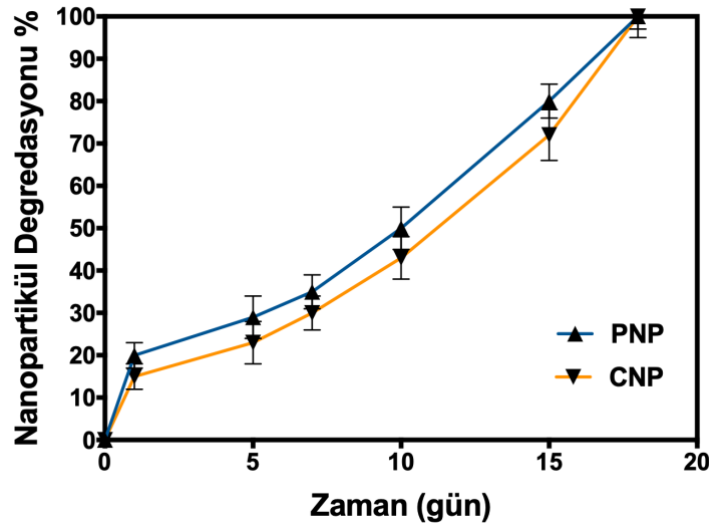
Şekil 12. İlaç yüklü nanopartiküllerin *in vitro* ilaç salım profili (A) ve kinetik modelleri (B): (A) (a) CUR'un kalibrasyon eğrisi, (b) CUR'un nanopartikül ve nanofiberlerdeki enkapsülleme verimliliği, (c) CNP'nin ilaç salım profili; (B) (a) Korsmeyer-Peppas, (b) sıfırıncı derece, (c) birinci derece, (d) Higuchi ve (e) Hixson-Crowell kinetik modelleri. (KİS: Kontrollü İlaç Salımı, CUR: Curcumin, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, CNPF: CNP-yüklü

PVP/PEG nanofiber). Tüm değerler, %5'ten az hatayla üç deneyin ortalaması kullanılarak elde edildi.

6.8. Üretilen Nanopartiküllerin Degredasyon Testi

Degredasyon testi, vücuda giren ilaç taşıyıcı sistemlerin vücuttaki gastrointestinal hareket ve enzimlerin etkisiyle geçen zamana karşı yüzde kaçının bozunduğunun *in vitro* olarak test edilmesidir. Genellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin degradasyon oranı çaplarından etkilenirler. Aynı zamanda degradasyon oranına bağlı olarak da ilaç salımı yorumu hakkında bir fikrimiz olabilir. Parçalanma üzerine ilaç taşıyıcı sistemin bulunduğu ortamın pH'ı da etkili olur.

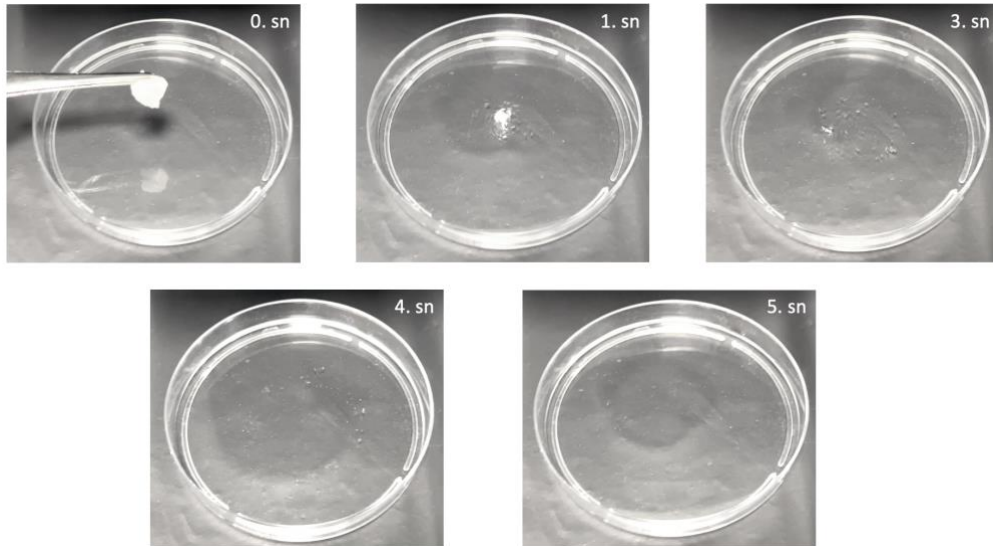
Degredasyon testini gerçekleştirebilmek için nanopartiküller, belirli ağırlıklarda her birinden 3 tekrar yapılacak şekilde tartılıp sonrasında, daha önceden belirlenen zamanlarda ağırlıklarının ölçümelerini almak üzere PBS içerisine konulmuşlardır. Bu ilaç taşıyıcı sistemler sublingual uygulamaya uygun tasarlandıkları için uygulama sonrası direkt kana geçeceği düşünülerek PBS pH'ı, kan pH'ı olan 7.4 olarak seçilmiştir. Degradasyon testi 1, 5, 7, 10, 15 ve 18. günde ölçülmüştür. Yapılan degradasyon testinin sonucunda ise PNP'nin 1, 5, 7, 10, 15 ve 18. gün ölçümleri sırasıyla %20, 29, 35, 50, 80 ve 100 olarak ölçülmüştür. CNP'nin % degradasyon sonucu ise 1, 5, 7, 10, 15 ve 18. günde sırasıyla %15, 23, 30, 43, 72 ve 100'dür (Şekil 13).



Şekil 13. Üretilen nanopartiküllerin degradasyon testi sonucu. Testler her nanofiberden 3'er numune alınarak gerçekleştirildi. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hata ile hesaplandı (n=3). (PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül)

6.9. Nanofiberlerin Disintegrasyon Test Sonucu

Üretilen PVP/PEG nanofiberlerin yapay tükürük sıvısındaki zamana bağlı parçalanma özellikleri bu test aracılığıyla analiz edilmiştir. Bu nanofiberler sublingual kullanıma uygun üretilmek istenmiştir. Bu sebeple üretimde kullanılan kompozit polimer yapısındaki iki polimer de suda çözünen polimerlerden seçildi ve herhangi bir çapraz bağlayıcı bu üretimde kullanılmadı. Çapraz bağlayıcı ajan, yeni polimer zincirleri oluşturarak maddeler arasında ek, güçlü bağlar meydana getirir. Bu çalışmada da nanofiberlerin sublingual kullanılması durumunda nanofiberlerin tükürük içerisinde çok kısa sürede parçalanması beklendiği için herhangi bir çapraz bağlayıcı ajan tercih edilmemiştir. Belirlenen miktarda CNPF pens ile daha önceden hazırlanmış 37°C’de 250 rpm titreşimde yapay tükürük sıvısı içerisine bırakıldı ve fiberler tükürük sıvı içerisinde tamamen parçalanana kadar bir kamera yardımıyla parçalanma süreci kaydedildi. Böylece insan vücudu düşünüldüğünde vücut sıcaklığı ve ağız içerisindeki hareketler taklit edilmiş oldu. CNPF’den alınan örnek, 5 sn içerisinde tamamen parçalandı. 1. sn yapay tükürük sıvısıyla temasının ardından tamamen ıslanan fiberde, 3. sn’de fiber parçaları arasında gözle görülür uzaklaşmalar meydana geldi ve bu fiber parçaları çok ince bağlarla bir arada duruyorlardı. 4. sn’de ise fiber parçaları artık oldukça küçük parçalar haline geldi ve gözle görülmesi çok zorlaştı. 5. sn’de ise başta koyulan fiber, yapay tükürük sıvısı içinde tamamen yok oldu (Şekil 14).

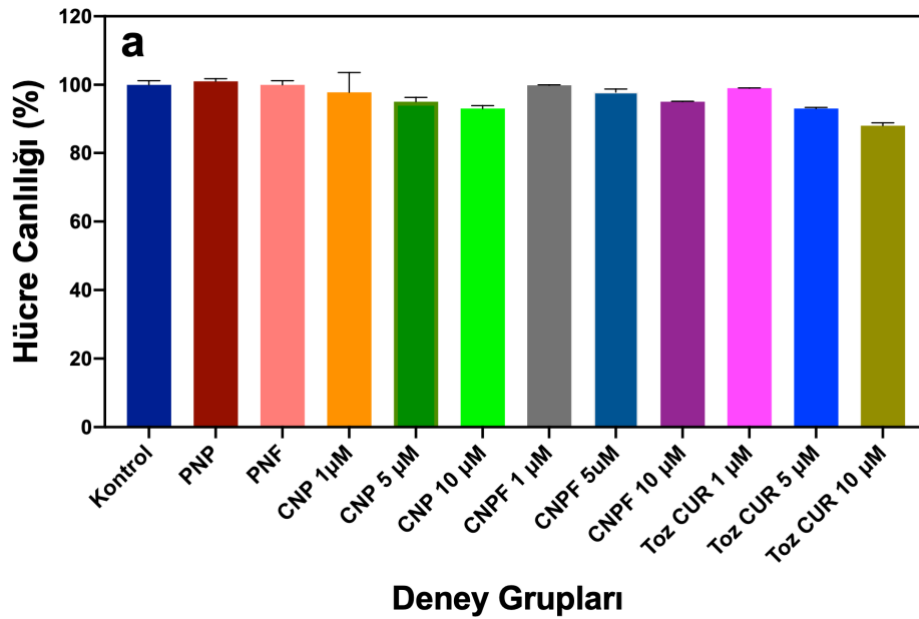


Şekil 14. CNPF’lerin yapay tükürük sıvısında gerçekleştirilen disintegrasyon test sonucu (CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber)

6.10. *In vitro* Hücre Kültürü Testleri

6.10.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesinde Picogreen Test Analizi

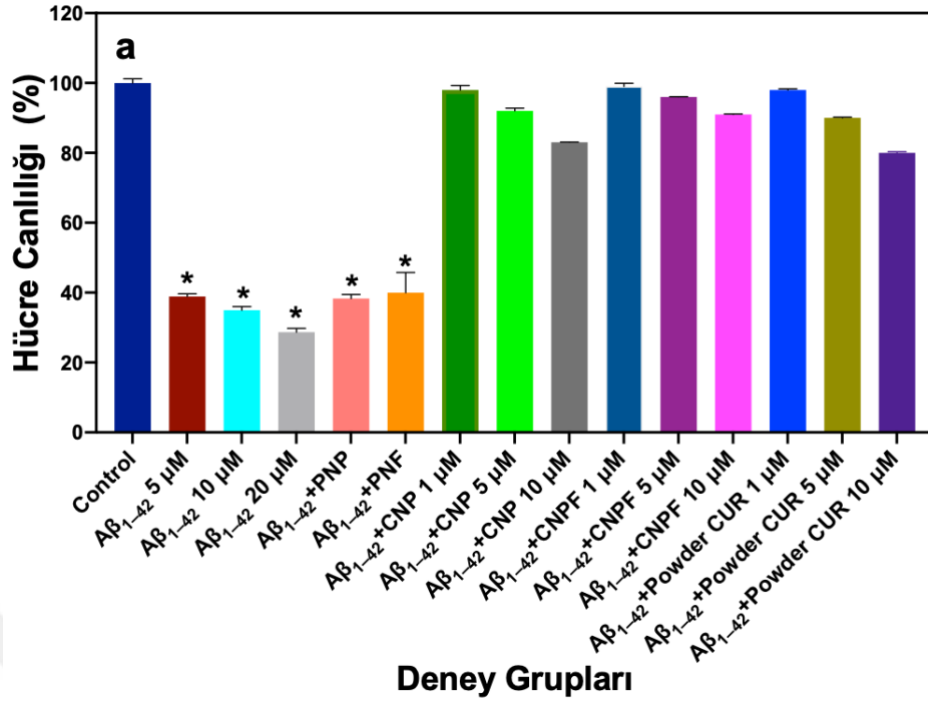
In vitro hücre kültürü testleri hayvan çalışmalarından önce üretilen ürünlerin hücreler üzerine herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığını test etmek ve en uygun optimal dozun hangi doz olduğuna karar vermek için yapılır. Bu tez çalışmasında SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri kullanılarak hücre canlılığı testi 24 saat süre ile Picogreen testi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kıyaslama yapabilmek için herhangi bir tedavi grubu içermeyen, sadece SH-SY5Y hücrelerini içeren kontrol grubu kullanılmıştır. Tedavi grupları olarak ise tez çalışması sırasında üretilen ürünler olan PNP, PNF, CNP ve CNPF verilirken toz CUR ise pozitif kontrol grubu olarak seçilmiştir. Tedavi edici ajan olarak kullanılan CUR ise hücre canlılığı testinde 3 farklı dozda denenmiştir. Bu dozlar 1, 5 ve 10 μM 'dır (H.-C. Huang ve ark., 2012). Bu hücre canlılığı testinin sonucunda ise kontrol grubu %100 olarak kabul edilirken PNP %101 ve PNF %100 olarak bulunmuştur. CNP'nin 1, 5 ve 10 μM dozları sırasıyla %97,8; %95 ve %93 olarak hesaplanmıştır. CNPF'nin 1 μM dozunun hücre canlılığı sonucu %99,8 iken 5 μM %97,8 ve 10 μM ise %95 olarak gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan toz CUR'un 1, 5 ve 10 μM dozlarındaki %hücre canlılığı test sonucu sırasıyla %99, %93 ve %88 olarak bulunmuştur. Aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Elde edilen sonuçlarda genellikle artan CUR dozuyla birlikte hücre canlılığının azaldığını göstermektedir. Tüm bu sonuçların ışığında üretilen hiçbir ürünün uygulanan hiçbir dozunda toksik bir etkisine rastlanmamıştır ve en güvenilir CUR dozunun 1 μM olduğuna karar verilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. *In vitro* SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığı test sonucu. Test sonuçları 3 kez tekrarlandı ve veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hata ile hesaplandı. (PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, PNF: PVP/PEG nanofiber, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin)

6.10.2. SH-SY5Y Hücrelerinde Anti-Alzheimer Etkinliğin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında tedavi edici ajan olarak anti-Alzheimer etkinliğe sahip olan CUR kullanılmıştır. *In vivo* hayvan çalışmalarından önce CUR enkapsüle edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin anti-Alzheimer etkinliğini kanıtlamak için Picogreen test kullanılarak $A\beta_{1-42}$ -indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerinde 24 saatlik analiz yapılmıştır. AH'yi indüklemek için $A\beta_{1-42}$, 3 farklı dozda SH-SY5Y hücrelerine indüklenmiştir. Bu dozlar 5,10 ve 20 μM 'dır (H.-C. Huang ve ark., 2012). Kıyaslama yapabilmek için hiçbir tedavi grubu uygulanmayan ve $A\beta_{1-42}$ indüklenmeyen bir kontrol grubu kullanılmıştır ve bu grubun hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir. Tedavi gruplarındaki CUR dozu 1, 5 ve 10 μM olmak üzere 3 farklı dozda denenmiştir. $A\beta_{1-42}$ 'nin denen 3 dozu arasında doz arttıkça hücreler üzerindeki öldürücü etkinin arttığı analiz edilmiştir. $A\beta_{1-42}$ 'nin 5,10 ve 20 μM dozdaki hücre canlılıkları sırasıyla %38,9, 35 ve 28,7 olarak bulunmuş ve kontrol grubuna kıyasla $p<0.05$ 'lik bir fark bulunmuştur. Bu sebeple analiz sonucunda AH'nin sinir hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini taklit etmedeki en etkili dozunun 20 μM olduğuna karar verilmiştir ve tedavi gruplarının denendiği hücrelerde AH indüklemesi için kullanılan $A\beta_{1-42}$, bu dozda uygulanmıştır. $A\beta_{1-42}$ indüklenen hücrelere anti-Alzheimer etkinliklerini değerlendirmek için uygulanan tedavi grupları PNP, PNF, CNP, CNPF ve toz CUR'dur. Bu tedavi grupları uygulandıktan sonra $A\beta_{1-42}$ 'nin hücreler üzerindeki öldürücü etkisinin azalmasının ve hücre canlılığının artmasını istedik. Sonuçlar değerlendirildiğinde PNP ve PNF'nin hücre canlılıklarının sırasıyla %38,3 ve 40 olduğu görüldü ($p<0.05$). Çünkü bu gruplarda CUR enkapsüle edilmediği için tedavi edici ajan bulunmadığından sonuçlar hastalık grubunu temsil eden sadece $A\beta_{1-42}$ indüklü grupların sonuçlarına yakın çıkmıştır. CNP'nin 1, 5 ve 10 μM dozundaki tedavi gruplarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri sırasıyla %98, 92 ve 83 iken CNPF'nin ise sırasıyla %99, 96 ve 91'dir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan toz CUR grubunun 1, 5 ve 10 μM dozlardaki %hücre canlılığı ise sırasıyla %98, 90 ve 80'dir. İlaçlı tedavi gruplarında sonuçlar birbirine benzer çıkmakla birlikte aralarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu sonuçlar neticesinde CUR dozu arttıkça anti-Alzheimer etkinliğin düştüğü analiz edilmiştir (Şekil 16).



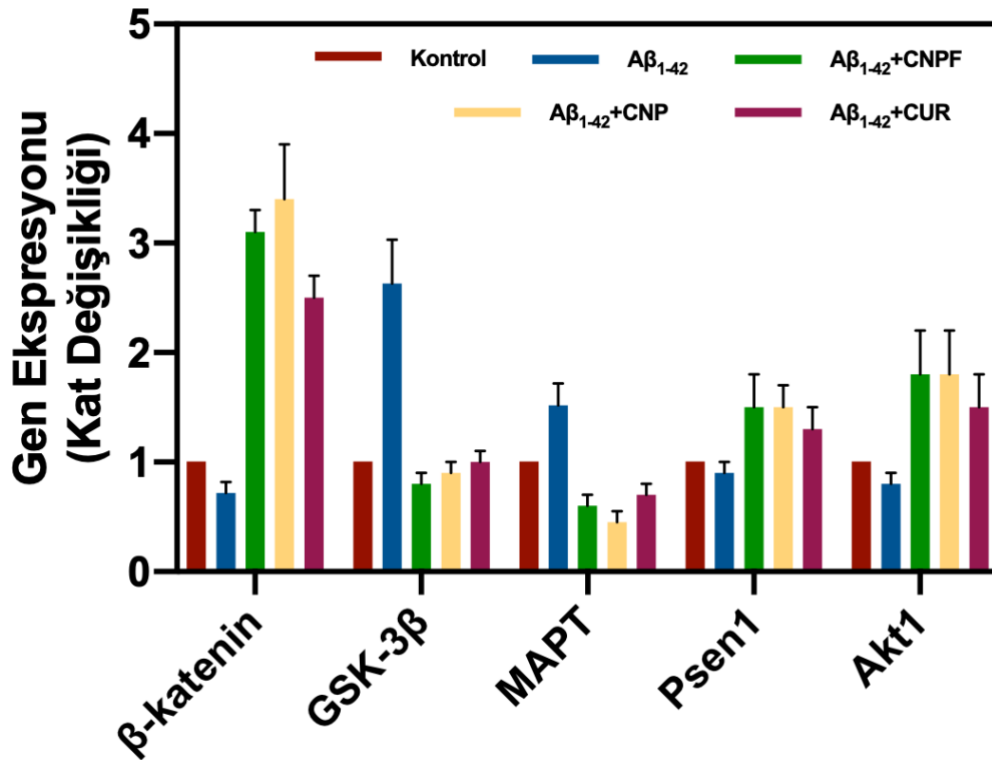
Şekil 16. *In vitro* SH-SY5Y hücrelerinde anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi. Test sonuçları 3 kez tekrarlandı ve veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hata ile hesaplandı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır (* $p < 0.05$) (PNP: Saf PLGA/PEG nanopartikül, PNF: PVP/PEG nanofiber, CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin)

6.10.3. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı PCR

PCR testi, *in vitro* hücre kültüründe gen ekspresyon seviyelerini karşılaştırarak gösterilen etkinin vücutta hangi yolak kullanılarak gerçekleştirildiğinin bulunmasını sağlayan testtir. Bu tez çalışmasında CUR'un AH tedavisinde etkisini göstermede etkili olduğu düşünülen PI3K/AKT/GSK-3 β ve Wnt/ β -katenin yolakları değerlendirilmiştir. Bunun için bu yolaklarla ilişkili olan 5 farklı gen PCR testinde değerlendirilmiştir. Bunlar β -katenin, GSK-3 β , Psen1, Akt1 ve MAPT'dir. B-aktin ise referans değeri olarak kullanılmıştır. Bu genler üzerine etkinliği değerlendirilen tedavi grupları ise CNP, CNPF ve CUR'dur. Kullanılan hücreler SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri iken AH indüklemeye ise A β_{1-42} tercih edilmiştir. Yapılan *in vitro* anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesi testinin sonucu dikkate alınarak indüklemeye tercih edilen A β_{1-42} dozu 20 μ M iken tedavide uygulanan CUR dozu ise 1 μ M tercih edilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde Şekil 17'de gösterildiği gibi referans değeri kat sayısı 1 kabul edilmiştir. Hastalık grubunu temsil eden ve hiçbir tedavi uygulanmayan A β_{1-42} indüklü hücrelerde β -katenin 0,72 kata düşerken GSK-3 β 2,63 kat, MAPT 1,52 kat, Psen1 0.9 kat ve

Akt1 0,8 kat olarak değişimler göstermiştir. CNP'nin uygulandığı tedavi grubunda ise bu değerler β -katenin 3,4 kat artarken GSK-3 β 0,9 kata düşmüş, MAPT 0,45 kat, Psen1 1,5 kat ve Akt1 1,8 kat olarak değişmiştir. Tedavi grubu olarak CNPF'nin uygulandığı grupta ise β -katenin 3,1 kat artarken GSK-3 β 0,8 kata düşmüş, MAPT 0,6 kat, Psen1 1,5 kat ve Akt1 1,8 kat olarak değişiklikler gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak uygulanan toz CUR grubunda meydana gelen değişiklikler ise β -katenin 2,5 kat artarken GSK-3 β 1 katta sabit kalmış, MAPT 0,7 kat, Psen1 1,3 kat ve Akt1 1,5 kat olarak değişmiştir. Tüm bu sonuçlar incelendiğinde tedavinin uygulandığı gruplarda Psen1, Akt1 ve β -katenin gen ekspresyonu artarken MAPT ve GSK-3 β 'nın gen ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. β -katenin gen ekspresyonu diğer gen ekspresyonlarıyla kıyaslandığında 3 tedavi grubu için de en çok artış gösteren gendir. GSK-3 β gen ekspresyonundaki artış en çok tedavi uygulanmayan hastalık grubunda görülmüştür. CNP ve CNPF gruplarının gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Toz olarak uygulanan CUR ile CNP ve CNPF grupları karşılaştırıldığında gen ekspresyonları üzerindeki etkileri CNP ve CNPF'nin daha iyi bulunmuştur (Şekil 17).



Şekil 17. β -katenin, GSK-3 β , MAPT, Psen1 ve Akt1 genlerindeki göreceli kat değişiklikleri. Test sonuçları 3 kez tekrarlandı ve veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart sapma ile hesaplandı. (CNP: CUR-yüklü PLGA/PEG nanopartikül, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin)

6.11. *İn vivo* Anti-Alzheimer Etkinliğin Değerlendirilmesi

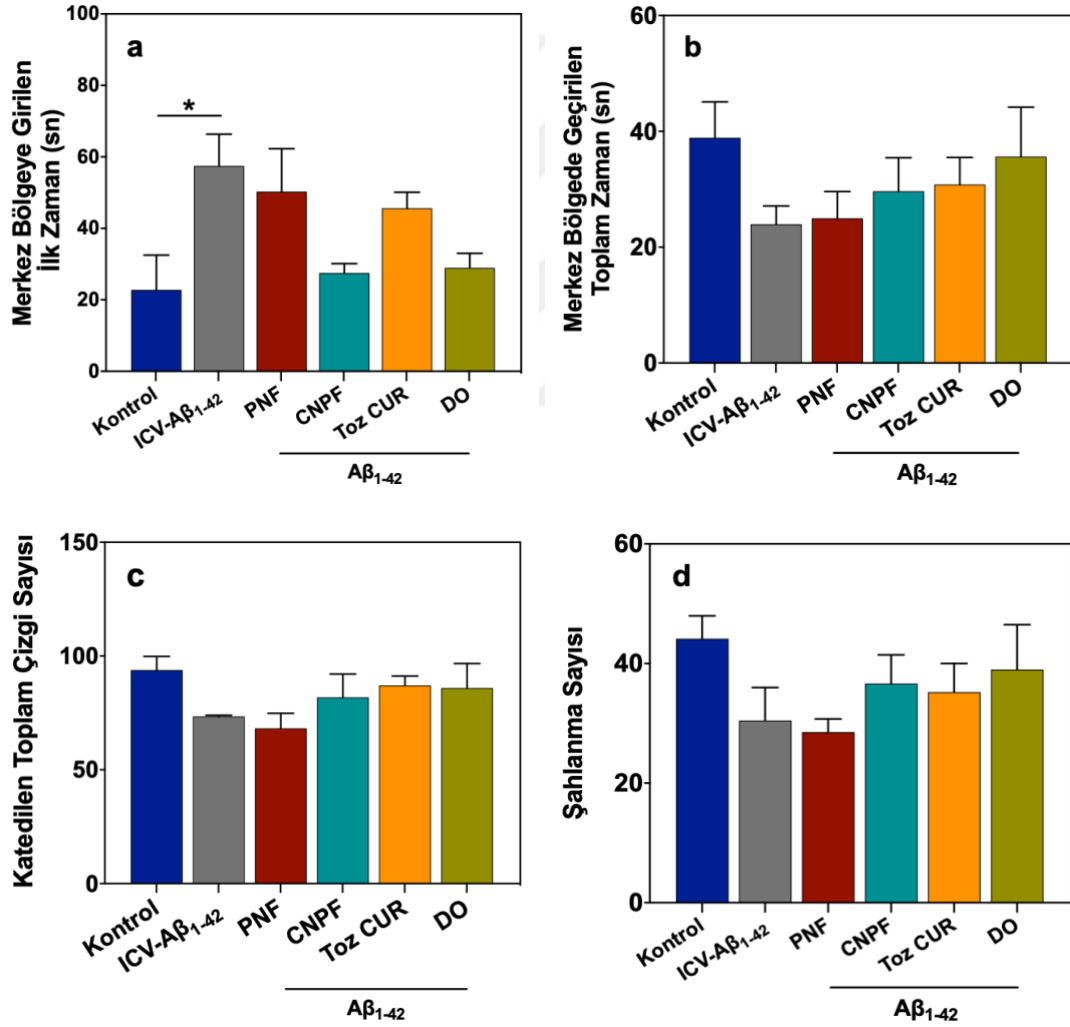
6.11.1. Davranış çalışmaları

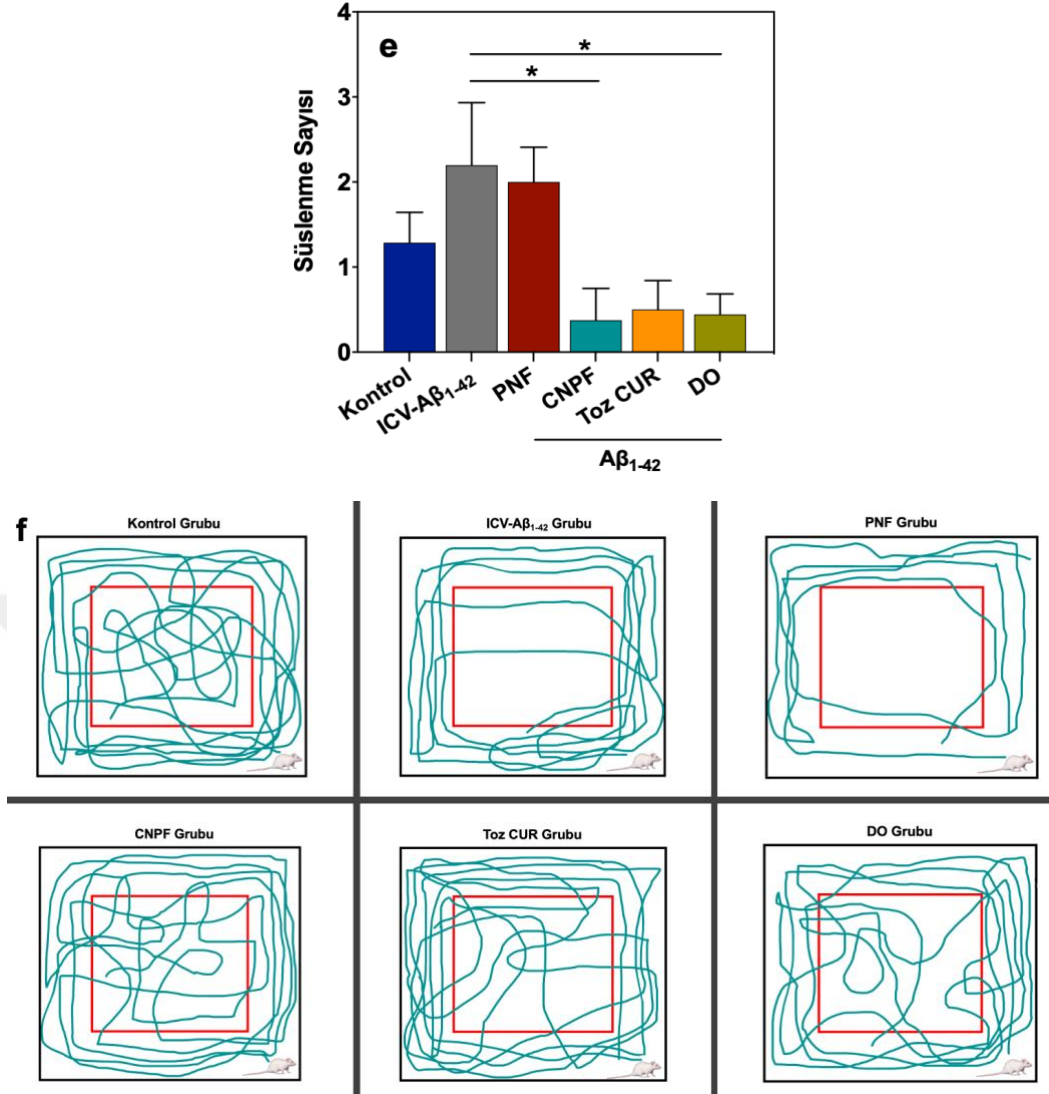
Davranış çalışmaları yapılırken hayvanlara Alzheimer ICV-A β ₁₋₄₂ kullanılarak indüklenmiştir. Tedavi grubu olarak PNF, CNPF ve toz CUR verilmiş, pozitif kontrol grubu olarak DO seçilmiştir ve bu tedavi grupları hiçbir tedavi uygulanmayan kontrol grubu ve AH indüklenen hastalık grubuyla kıyaslanmıştır. *İn vitro* hücre kültüründe PNP ve CNP de tedavi grubu olarak uygulanırken *in vivo* hayvan çalışmalarında bu gruplar değerlendirmeye alınmamıştır. Çünkü son ürün olarak geliştirilen ilaç taşıyıcı sistem aslında fiber grubudur. *İn vitro* hücre kültüründe de partikül ve fiberler arasında çok ciddi farka rastlanılmamıştır. Bu çalışmada partikülün fiber içerisine yüklenmesinin temel amacı, partikülü *in vivo* ortamda doğru dozda ve kolay bir şekilde uygulayabilmektir. Bu sebeple hem *in vitro* ilaç salım ve verimlilik testleri hem hücre kültürü ve diğer karakterizasyon testleriyle ilacın partiküle partiküllerin de fiberlerin içerisine başarıyla yüklendiği kanıtlandığından *in vivo* hayvan çalışmalarında sadece son ürünler değerlendirilerek fazla hayvan kullanımından kaçınılmıştır. Ayrıca *in vivo* hayvan deneyleri boyunca vücut ağırlıkları düzenli olarak ölçülmüştür. Hayvanların ağırlıklarında deney süresi boyunca ciddi bir düşüş gözlemlenmediği için fazla kilo kaybı kaynaklı deneyden hayvan çıkarılması söz konusu olmamıştır.

6.11.1.1. Açık alan testi

Bu tez çalışmasında açık alan testi hayvanların anksiyete ve lokomotor aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Açık alan testi olarak hayvanlar, zemini belirli ölçülerdeki karelere bölünmüş bir kutu içerisinde 5 dk boyunca gözlemlenmiştir. Bu süre boyunca hayvanların merkez bölgeye ilk giriş zamanları, merkez bölgede geçirilen süre, katedilen toplam çizgi sayısı, şahlanma ve süslenme sayıları analiz edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak DO uygulanmış, tedavi grupları ise PNF, CNPF ve toz CUR olarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda merkez bölgeye ilk defa girmek için geçen süre kontrol grubuna kıyasla ICV-A β ₁₋₄₂ grubunda anlamlı düzeyde yükselmiştir ($p<0.05$). PNF grubu da hastalık grubuna yakın çıkarken CUR ve DO içeren diğer tedavi gruplarında ise bu değer düşmüştür. Merkez bölgede geçirilen toplam süre değerlendirildiğinde ise gruplar içerisinde anlamlı bir fark bulunamadı. Merkez bölgede en az zaman geçiren grup ICV-A β ₁₋₄₂ grubu olurken PNF grubunun değeri de bu gruba yakındır. Merkez alanda en çok vakit geçiren grup DO grubu olurken CNPF ve toz CUR gruplarında DO grubunun sonucuna yakın değerler bulunmuştur. Katedilen toplam çizgi sayısı analiz edildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Şahlanma sayıları

kıyaslandığında ICV-A β_{1-42} ve PNF gruplarının şahlanması sayısı kontrol grubuna göre daha düşükken DO ve CNPF'nin sonuçları ise kontrol grubunun sonucuna yakın çıkmıştır. CNPF ve toz CUR grupları arasında da anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bir diğer parametre olan süslenme sayıları kıyaslandığında ise en yüksek süslenme sayısı ICV-A β_{1-42} grubunda görünürken bu değer DO ve CNPF gruplarında anlamlı bir farklılık çıkacak kadar düşmüştür ($p<0.05$). Böylece açık alan testine ait değerlendirilen bu 5 farklı parametre sonucu bize diğer davranış testlerini yapmadan önce indüklenme sırasında hayvanlarda herhangi bir lokomotor bozukluğa sebep olacak bir hasarın gerçekleşmediğini, hayvanların deney sürecinde stabil davranışlar içerisinde olduklarını ve operasyondan kaynaklı bir lokomotor bozukluğun olmadığını kanıtlamıştır (Şekil 18).



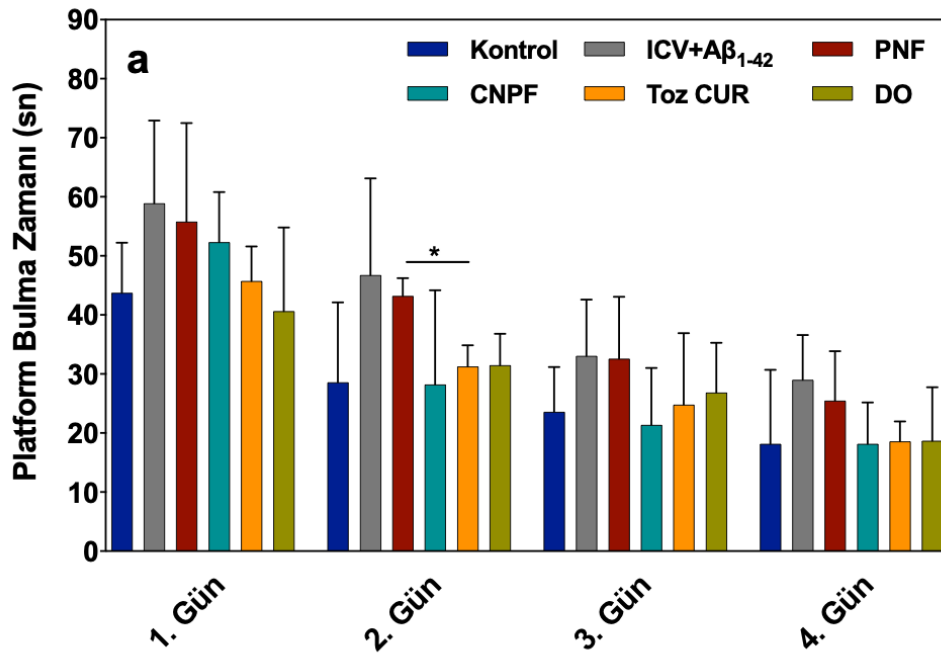


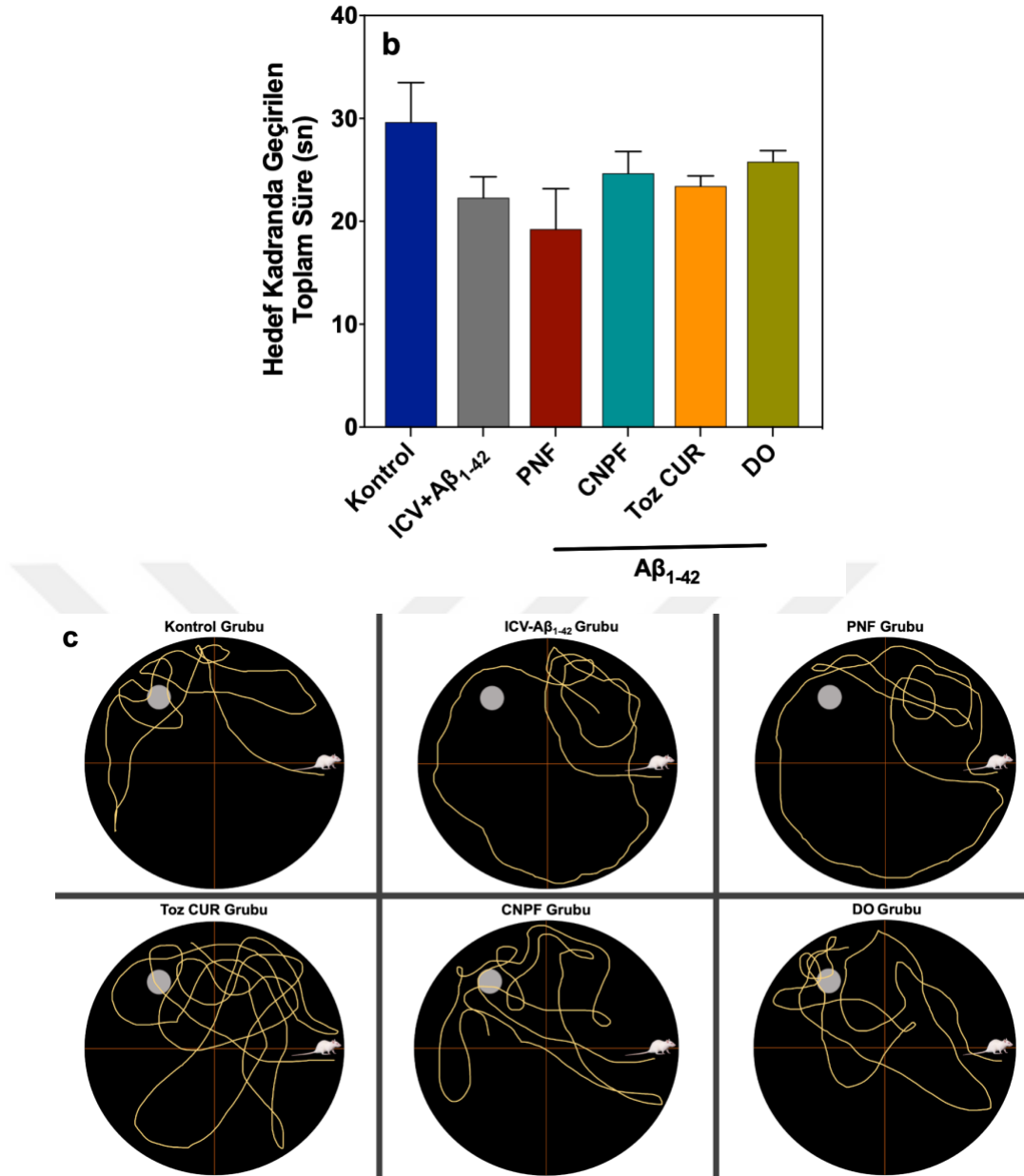
Şekil 18. Açık alan testi sonucu: (a) Merkez bölgeye ilk giriş zamanları, (b) merkez bölgede geçirilen süre, (c) katedilen toplam çizgi sayısı, (d) şaşlanma sayısı, (e) süslenme sayısı ve (f) katedilen yolun şematik gösterimi. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır (* p < 0.05). (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

6.11.1.2. Morris'in Su Tankı Testi

Bu testte hayvanlar bir havuzun içerisinde sabit konumda bulunan platformu belirli bir süre içerisinde bulmayı öğrenmeleri için 4 gün boyunca havuzun 4 farklı köşesinden bırakılırlar ve platformu kaç sn içerisinde buldukları kaydedilir. Bulamayan hayvanlar platformun üzerine belirli bir süre bırakılıp platformun yerini öğrenmeleri sağlanır. 5. gün ise platform havuz içerisinde çıkarılır ve platformun 4 gün boyunca durduğu yer olan hedef kadranda hayvanların ne kadar süre geçirdikleri analiz edilir. Şekil 19a'da 4 gün boyunca 6 farklı grup hayvanın

platformu kaç sn içerisinde bulunduğunu analiz edilmiştir. Kontrol ve diğer tedavi gruplarına kıyasla ICV-A β_{1-42} ve PNF grupları ilaçla tedavi edilmediklerinden yaşadıkları bellek problemleri kaynaklı platformu buluş süreleri daha uzundur. Bununla birlikte 4 gün boyunca tüm gruplarda platformu bulma süresi düşmüştür. Ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sadece 2. gün CNPF ve PNF grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. CNPF grubunda anlamlı bir düşüş elde edilmiştir ($p<0.05$). CNPF tedavi süresi arttıkça kontrol grubuna eş değer sonuçlar vermeye başlamıştır. Toz CUR ve DO gruplarında da özellikle son gün verilerinde elde edilen sonuçlar kontrol grubunun sonuçlarıyla oldukça benzerdir. Şekil 19b’de ise 5. günde hedef kadranda geçirilen süre analiz edilmiştir. Sonuçlar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak hedef kadranda yani 4 gün boyunca platformun durduğu yerde kadranda en az vakit geçiren PNF ve ICV-A β_{1-42} grubu olurken CNPF ve DO grubu kontrol grubuna yakın sonuçlar vermişlerdir. Bu tedavi edilen grupların görsel-uzamsal bellek ve uzun süreli hafızalarında iyileşme olduğunun ve geliştirilen yeni ilaç taşıyıcı sistemin tedavideki etkinliğinin kanıtıdır (Şekil 19).



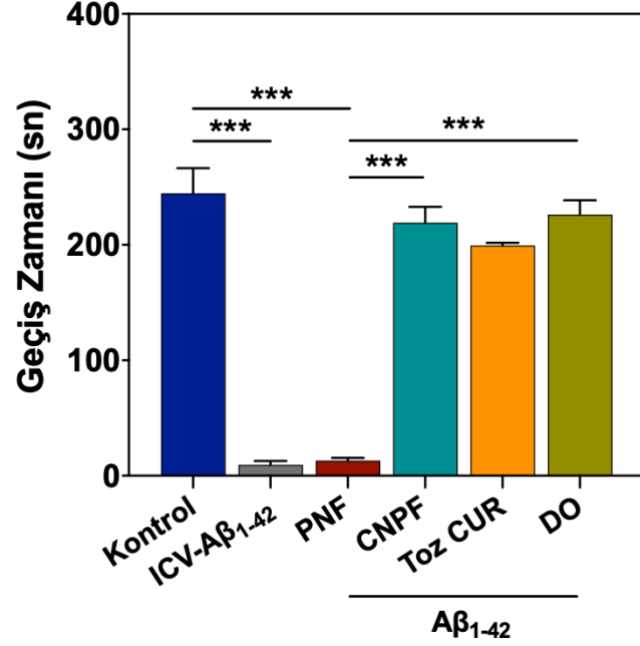


Şekil 19. Morris'in su tankı testinin tüm gruplara ait sonuçları : (a) Platform bulma zamanı, (b) hedef kadranda geçirilen toplam süre ve (c) hayvanların yüzme yolu şematik gösterimi. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır (* p <0.05). (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

6.11.1.3. Pasif Sakınma Testi

Aydınlık ve karanlık olmak üzere ortasındaki otomatik kapı aracılığıyla 2 bölmeye ayrılmış kutuda gerçekleştirilen bu test 2 farklı günde tekrarlanır ve sağlıklı grubun ilk günde (alıştırma günü) karanlık bölmeye geçişleri sonrası uygulanan elektrik sonrası ikinci günde bunu öğrenip karanlık bölmeye geçmemeleri ya da daha geç geçmeleri beklenir. Bu bilgiler doğrultusunda

kontrol grubu CNPF, toz CUR ve DO gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiş, tedavilerin etkisiyle öğrenme günü olan 2. günde hayvanların karanlık bölgeye geçiş süresi uzamıştır. ICV-A β ₁₋₄₂ ve PNF grubunda ise geçiş süresi ilk günkü değerle karşılaştırıldığında neredeyse hiç değişmemiştir ve tedavi gruplarına kıyasla bu gruplardaki karanlık bölgeye geçiş süresi anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p < 0.001$) (Şekil 20).

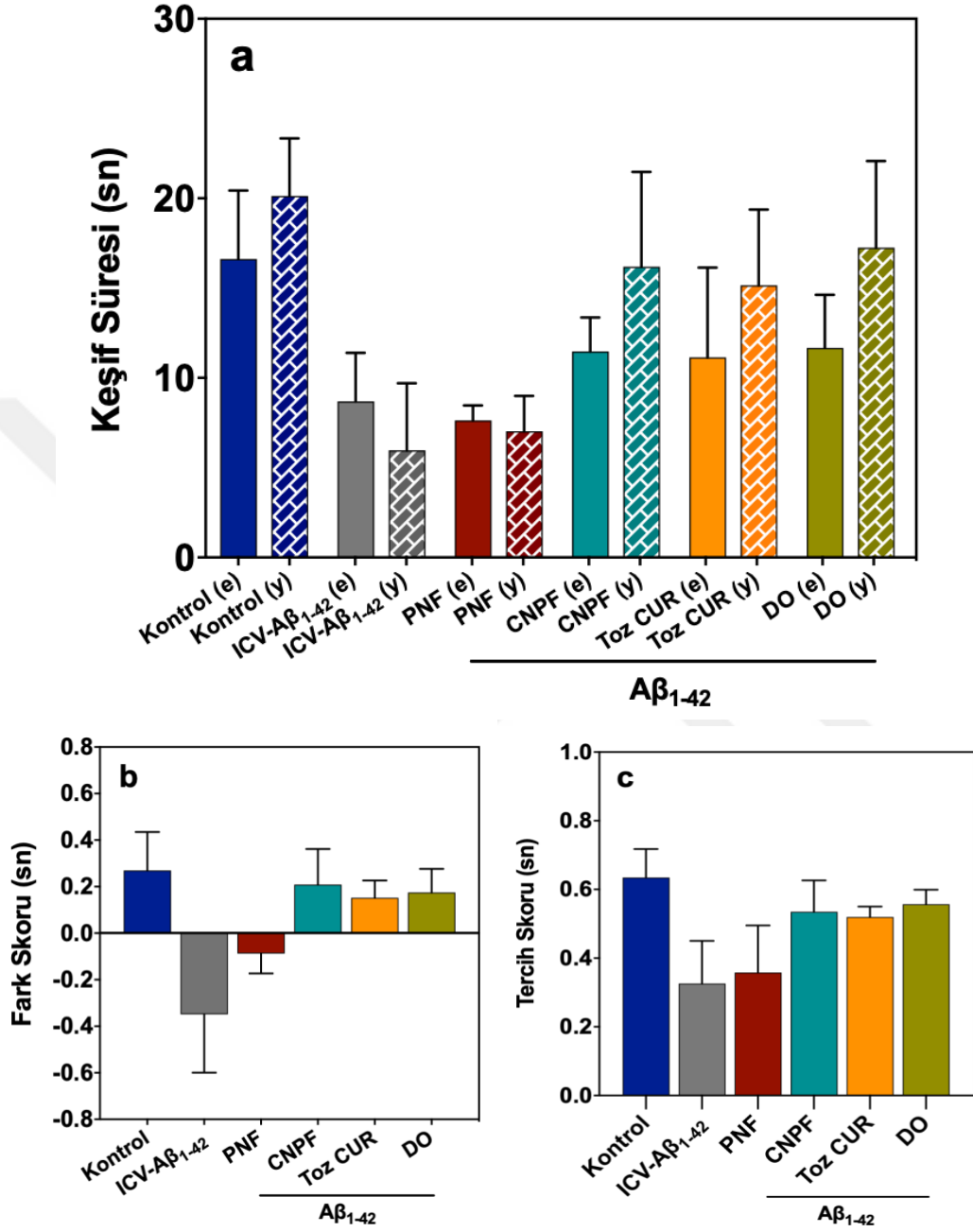


Şekil 20. Hayvanların pasif sakınma test sonucunda geçiş sürelerinin değerlendirilmesi. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır (***) $p < 0.001$. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

6.11.1.4. Yeni Obje Tanıma Testi

Bu test hayvanlardaki kısa süreli hafızayı ve öğrenmeyi değerlendirmek için yapılmıştır. 2 aşamalı gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 3 dk boyunca iki aynı cisme olan ilgileri not alınırken 1 sa aradan sonra ikinci 3 dk'lık periyotta cisimlerden bir tanesi yeni cisimle değiştirilmiştir ve Şekil 21'de yeni cisme olan ilgileri temel alınarak keşif süresi, fark ve tercih skorları analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre kontrol grubunun yeni cisme olan ilgisinin açıkça arttığı görülürken ICV-A β ₁₋₄₂ ve PNF gruplarında ise bu ilginin düştüğü, yeni cismi fark edemedikleri görülmüştür. Aynı şekilde tedavi gruplarında yeni cisme olan ilgi analiz edildiğinde ise DO ve CNPF gruplarındaki yeni cisme olan ilgi süresi neredeyse kontrol grubuna eş değerdir. Toz CUR grubunda da ilginin arttığı görülmüştür. Fark ve tercih skorlarında da hastalık grubunda ve ilaç içermeyen PNF grubunda değerlerin düşüşü hastalık kaynaklı kısa süreli hafızada

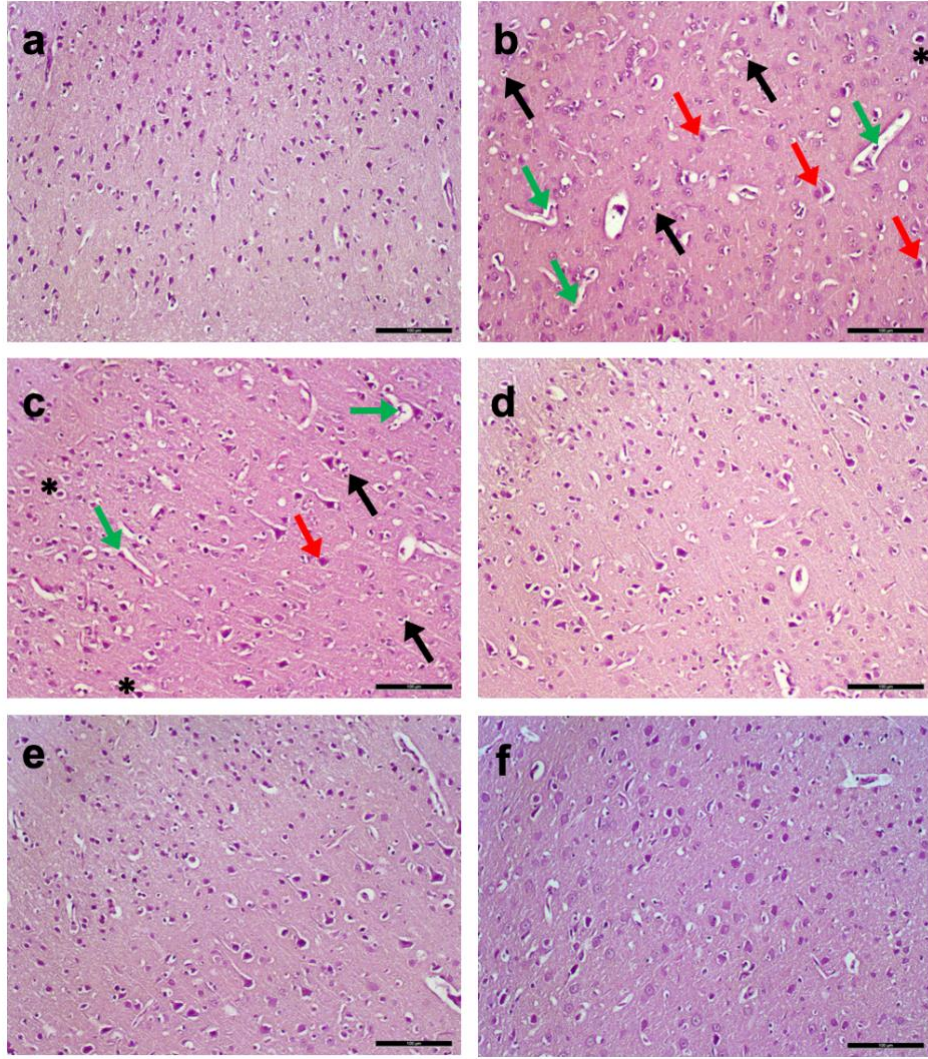
hasarların meydana geldiğini gösterirken tedavi gruplarında CNPF'nin pozitif kontrol grubu DO ile eş değer iyileştirme gücü göstererek kısa süreli hafıza gelişimini iyileştirdikleri görülmüştür. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



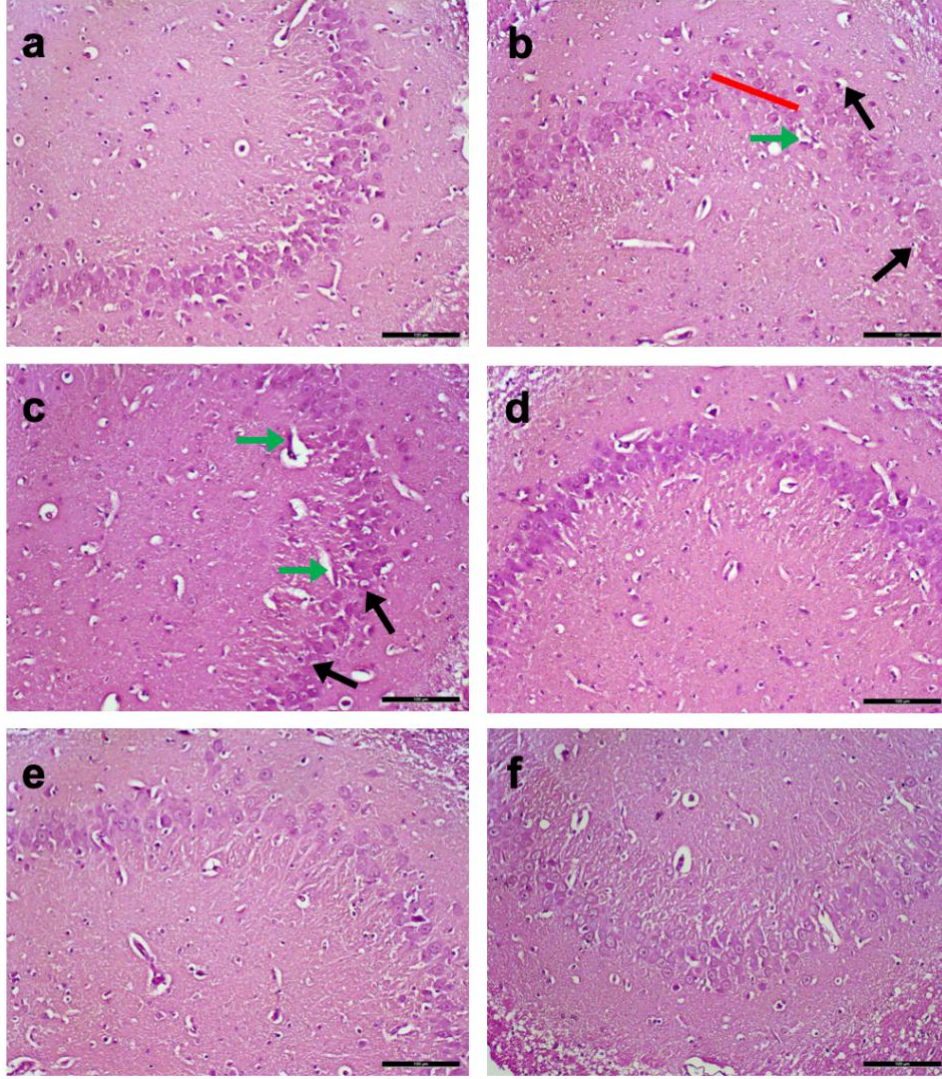
Şekil 21. Yeni obje tanıma test sonuçları: (a) Keşif süresi, (b) fark skoru ve (c) tercih skoru. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

6.12. Alınan Hayvan Beyin Dokularının Histolojik Analizi

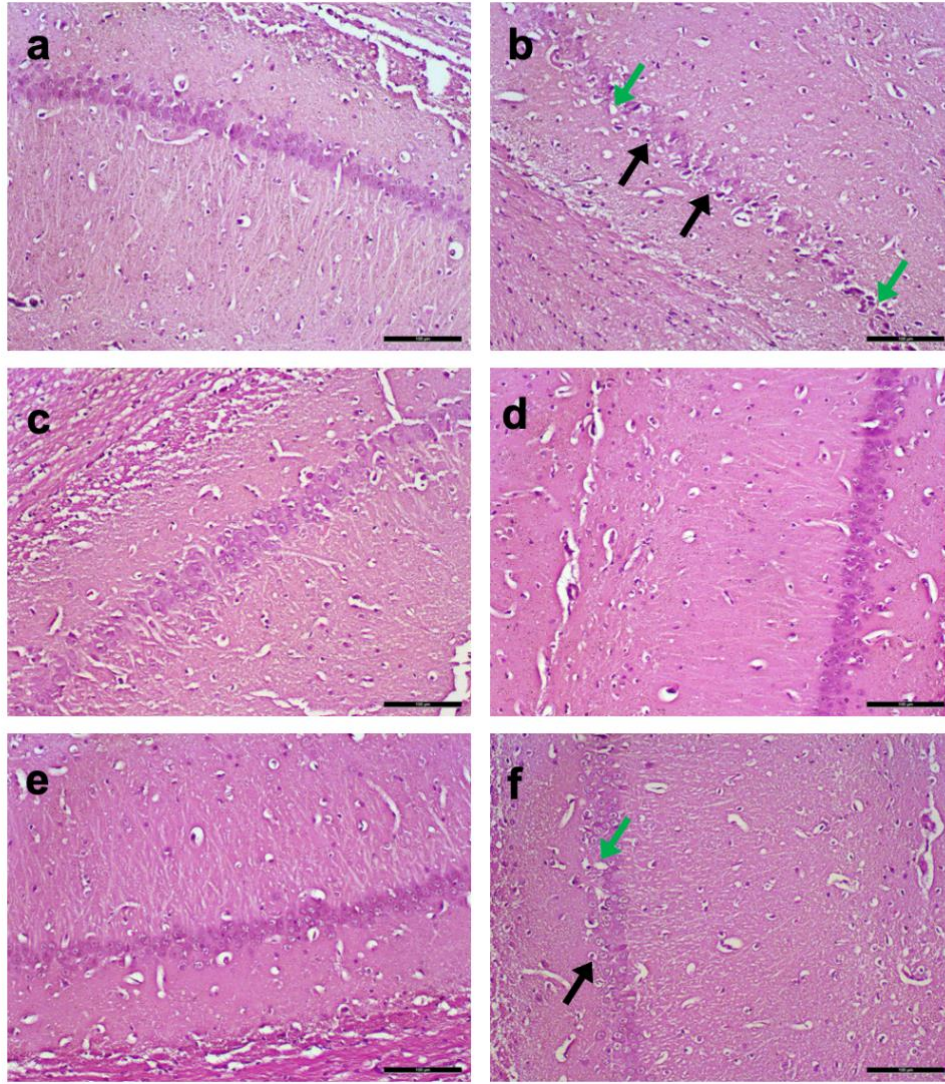
Yapılan histoloji analizinde, her gruptan hayvanların korteks ve hipokampusları incelendi ve bu bölgelerdeki hastalığa ve tedavilere bağlı değişimler kontrol gruplarıyla kıyaslandı. Kontrol grubu, farklı beyin alanlarındaki (serebral korteks, CA2 ve CA3 hipokampal bölgeler) nöronların normal histolojik yapısını gösterdi. ICV-A β ₁₋₄₂ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serebral korteks ve hipokampal bölgelerin bazı nöronlarında önemli nükleer piknoz ve dejenerasyon göstermiştir. Ayrıca fokal eozinofilik plaklar ve intraselüler ve perivasküler ödem kaydedildi. PNF grubu ile ICV-A β ₁₋₄₂ grubu kıyaslandığında ise benzer şekilde hasar kriterleri gözlemlendi. Toz CUR grubu, incelenen serebral korteks ve hipokampal bölgelerde tüm bu histopatolojik değişiklikleri geriye çevirerek iyileşme sağladı. Nanopartikül aracılığı ile gönderilen curcumin içeriğinin (CNPF grubu), incelenen beyin bölgelerindeki hasarın onarımını daha fazla arttırdığı kaydedildi. Pozitif kontrol grubu olan DO'ya benzer bir doku morfolojisi sergiledi (Şekil 22, 23 ve 24).



Şekil 22. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının korteks bölgelerine ait fotomikrograftlar: (a) Kontrol, (b) ICV-A β_{1-42} , (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Siyah ok: Nükleer piknoz ve dejenerasyon; Kırmızı ok: Fokal eozinofilik plaklar; Yeşil ok: Nöronal hücrelerde intraselüler ödem ve perivasküler ödem; Yıldız: Nöronal nekroz. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)



Şekil 23. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının hipokampus CA3 bölgelerine ait fotomikrograflar: (a) Kontrol, (b) ICV-A β_{1-42} , (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Siyah ok: Nükleer piknoz ve dejenerasyon; Yeşil ok: nöronal hücrelerde intraselüler ödem ve perivasküler ödem; Kırmızı çizgi: Nöronal dispersiyon. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

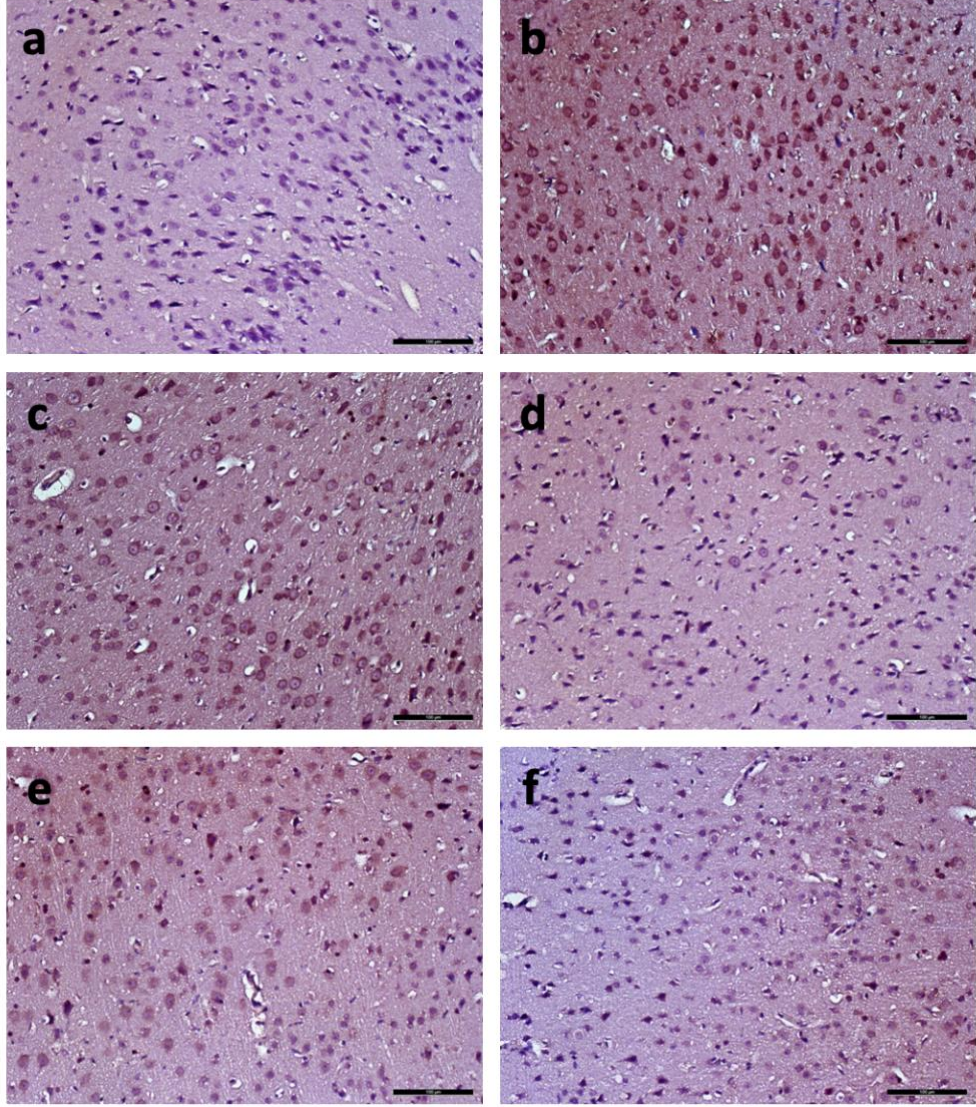


Şekil 24. Deney grupları arasında H&E boyalı beyin dokularının hipokampus CA2 bölgelerine ait fotomikrograftlar: (a) Kontrol, (b) ICV-A β ₁₋₄₂, (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Siyah ok: Nükleer piknoz ve dejenerasyon; Yeşil ok: nöronal hücrelerde intraselüler ödem ve perivasküler ödem. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

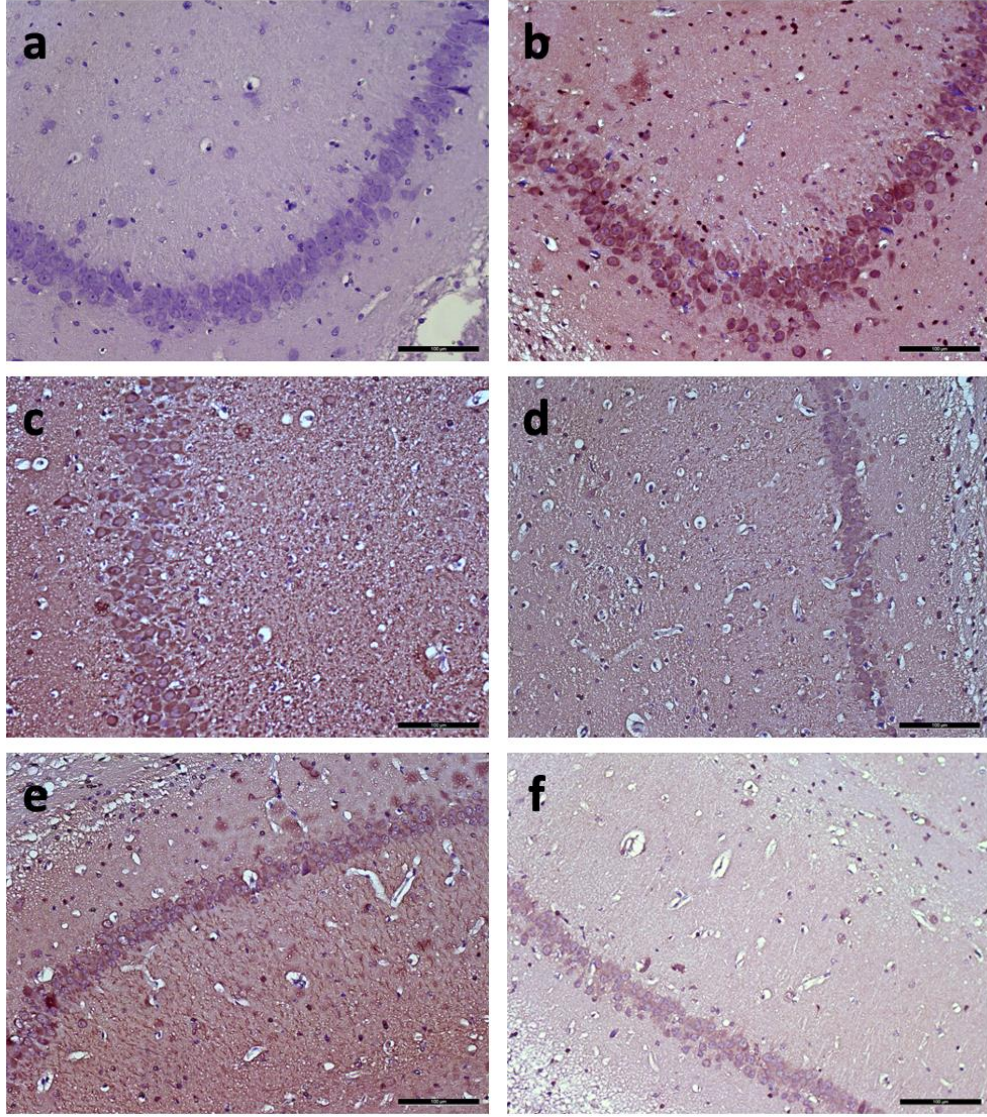
6.12.1. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları

Bu tez çalışmasında yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda ICV-A β ₁₋₄₂ grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında beyin dokusunun korteks ve hipokampus (CA2 ve CA3) bölgesinde yoğun amiloid plakları ve tau protein ekspresyonuyla karşılaşıldı. PNF grubunda da hastalık grubuna benzer şekilde A β ve tau protein ekspresyonları gözlemlendi. Hastalık grubu ile kıyaslandığında, pozitif kontrol (DO) ve toz CUR gruplarında bu protein ekspresyonlarının azaldığı belirlendi. Toz CUR ile CNPF grupları kıyaslandığında ise nanofiber aracılığı ile

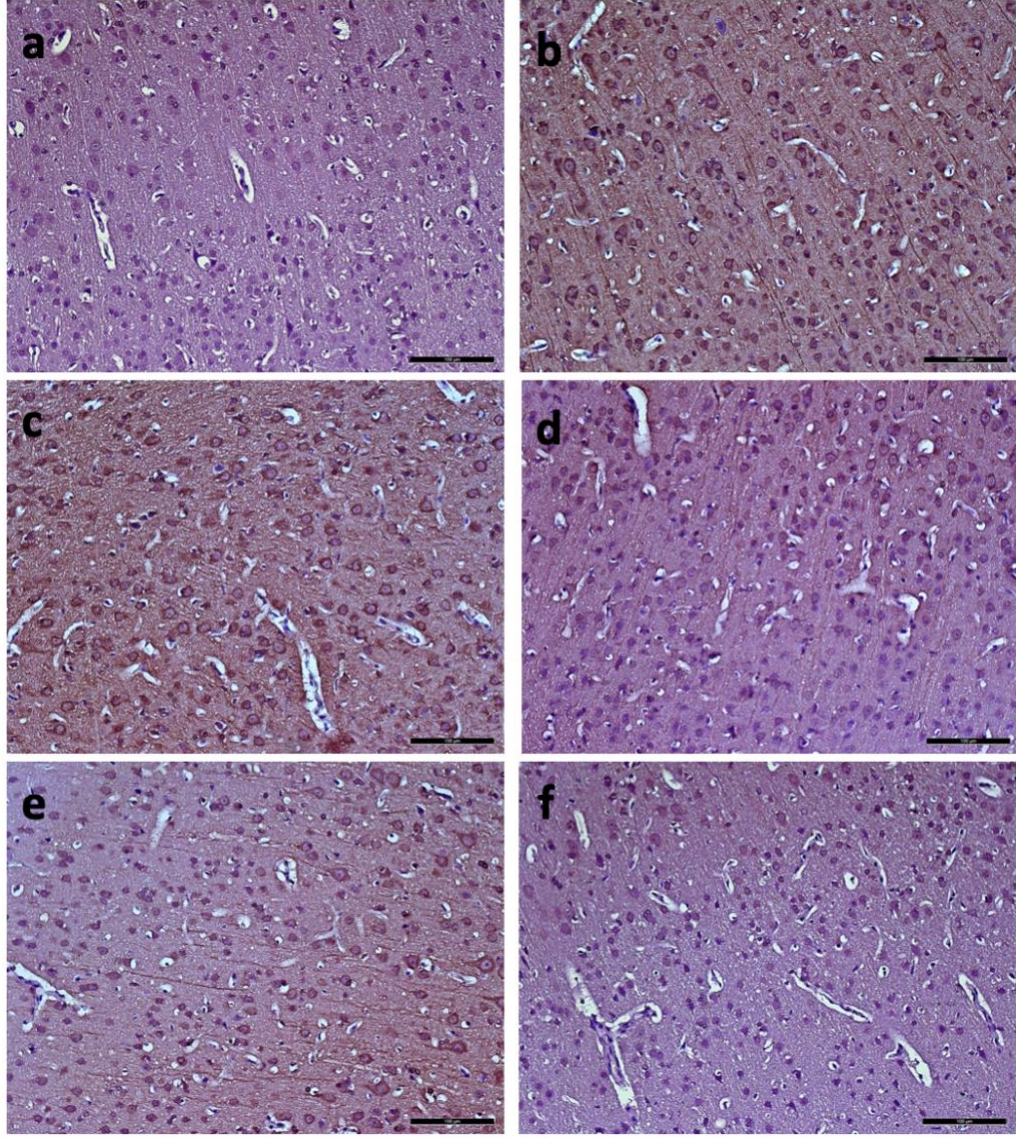
transfer edilen CUR'un bu protein ekspresyonları üzerinde anlamlı bir şekilde etki gösterdiği tespit edildi (Şekil 25, 26, 27, 28).



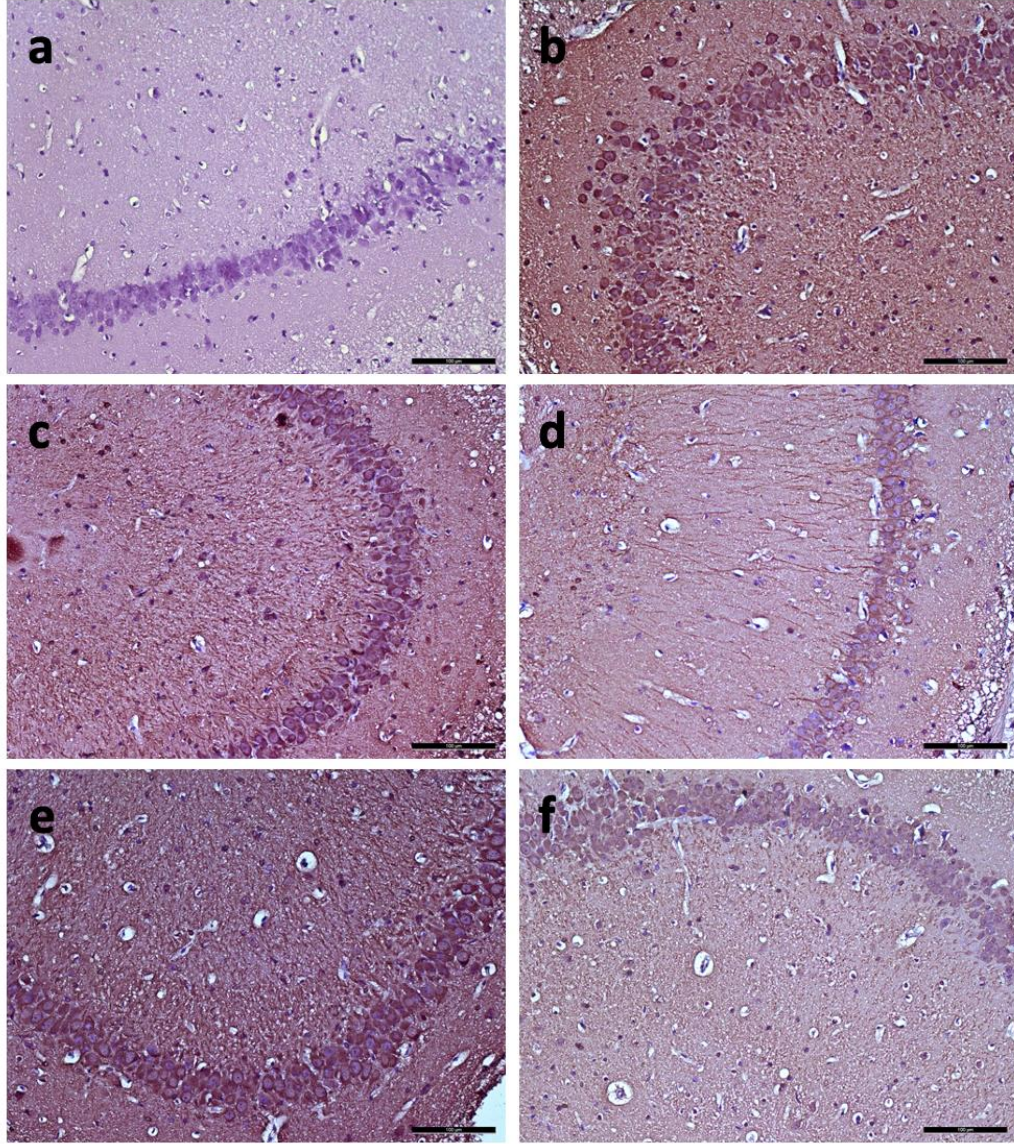
Şekil 25. Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama: (a) Kontrol, (b) ICV-A β_{1-42} , (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)



Şekil 26. Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-A β immünohistokimyasal boyama: (a) Kontrol, (b) ICV-A β_{1-42} , (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)



Şekil 27. Deney grupları arasında beyin dokularının korteks bölgelerine ait anti-tau immünohistokimyasal boyama: (a) Kontrol, (b) ICV-A β_{1-42} , (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

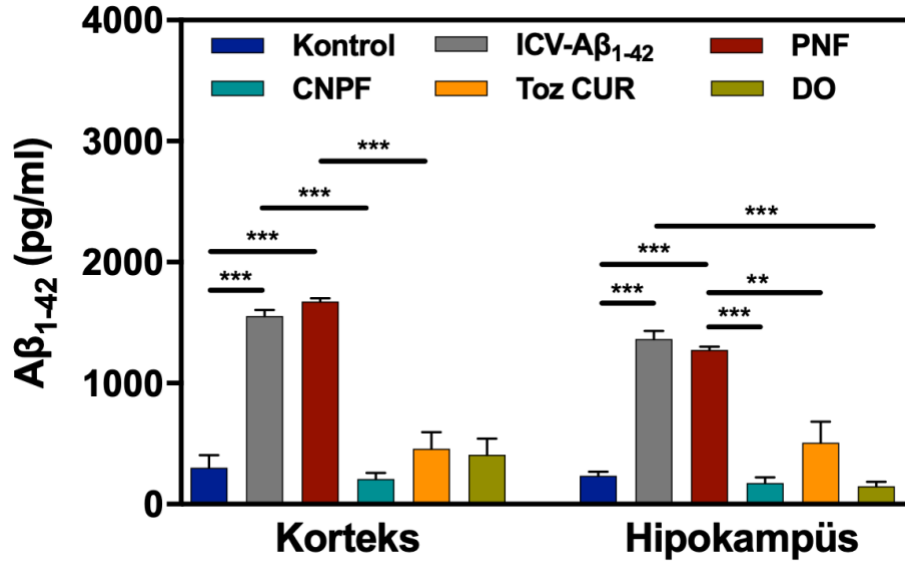


Şekil 28. Deney grupları arasında beyin dokularının hipokampus bölgelerine ait anti-tau immünohistokimyasal boyama: (a) Kontrol, (b) ICV-A β_{1-42} , (c) PNF, (d) CNPF, (e) Toz CUR ve (f) DO. Kahverengi boyanma, immüno-pozitif hücreleri ifade eder. Ölçek: 100 μ m. (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

6.12.2. Alınan beyin dokularında A β_{1-42} seviyelerinin ELİSA ile analiz sonucu

Bu çalışmada, antijen-antikor kompleksi oluşturarak bilinmeyen konsantrasyonu ölçmeye yarayan kantitatif analiz ELİSA ile, yapılan hayvan çalışması sonrası alınan beyin dokularındaki korteks ve hipokampus bölgelerindeki A β_{1-42} seviyeleri ölçülmüştür. Bu analiz sonucunda her iki beyin bölgesinde de hastalığın oluşmasındaki temel sebeplerden olan A β plak oluşumu seviyesi kontrol grubuna kıyasla tedavi edilmeyen ICV-A β_{1-42} ve PNF grubunda

artarken CUR ve DO ile tedavi edilen gruplarda ise azalmıştır. Kontrol grubuna kıyasla her iki bölgede de ICV-A β_{1-42} ve PNF gruplarındaki artış $p<0.001$ olarak anlamlı artarken hastalık grubuyla kıyaslandığında CNPF ve DO grubunda A β_{1-42} seviyelerinde anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.001$). PNF ile toz CUR grubu arasında da $p<0.01$ olarak anlamlı bir düşüşe rastlanmıştır. Kontrol grubuyla diğer tedavi tedavi grupları olan CNPF, DO ve toz CUR arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aynı şekilde ICV-A β_{1-42} ve PNF grupları arasında da anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 29).



Şekil 29. A β_{1-42} seviyelerinin alınan beyin dokularının korteks ve hipokampusünde ölçümü. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır (***) $p < 0.001$ ve ** $p < 0.01$). (PNF: PVP/PEG nanofiber, CNPF: CNP-yüklü PVP/PEG nanofiber, CUR: Curcumin, DO: Donepezil)

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

AH, beyindeki hücrelerin dejenerasyonuna neden olan bir hastalıktır. Hastanın günlük kişisel aktivitelerinde bağımsız hareket edebilme yetilerinde azalma ve hafızada kötüleşme ile karakterize edilen demansın ana nedenidir. AH çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilir ve hastalığın oluşmasında kolinerjik, tau ve amiloid hipotezler olmak üzere üç ana hipotez öne sürülmüştür. Ayrıca ilerleyen yaş, genetik faktörler, kafa travmaları, damar hastalıkları, enfeksiyonlar, çevresel faktörler gibi birçok risk faktörü de hastalığın gelişmesinde rol oynamaktadır. Hastalığın farklı evrelerinde hasta üzerinde görülen belirtileri de değişmektedir. Unutkanlığın artması, yeni bilgileri hatırlamada zorluk, problem çözme ve muhakeme yetilerinde azalma, çevreye ayak uydurmakta zorlanma, ruh hali değişiklikleri, kafa karışıklığı, dil problemleri ve görsel-mekansal becerilerde bozulma, bilişsel yeteneklerin azalması, öğrenilmiş motor görevleri yerine getirmede zorluk, uyku problemleri ve parkinson benzeri motor belirtiler dahil olmak üzere birçok belirti hastalığın evresine bağlı olarak hastada gözlemlenmektedir (Z. Breijyeh ve R. Karaman, 2020).

Şu anda AH'nin tedavisinde FDA tarafından onaylanan yeni ilaçların dışında yaygın olarak kullanılan AChİ'ler ve NMDA reseptör antagonistleri olmak üzere iki ilaç sınıfı vardır. Ancak bu ilaçlar hastalığın semptomatik tedavisinde etkili olurken radikal tedaviyi sağlayamamaktadır. Günümüzde yapılan araştırmalarda, anormal tau protein metabolizması, A β , kolinerjik hasar, inflamatuvar yanıt ve serbest radikal hasarı gibi çeşitli mekanizmaları hedef alarak AH patolojisini anlamak ve tedavide etkin bir çözüm bulmak için çalışmalar devam etmektedir. Doğal bileşiklerin AH tedavisindeki etkinliklerinin araştırılması da günümüzde popüler konulardandır (Z. Breijyeh ve R. Karaman, 2020).

Bir Hint bitkisi olan CUR'un tedavi edici etkileri kistik fibroz, hemoroid, mide ülseri, kolon kanseri, meme kanseri, karaciğer hastalıkları, artrit, ateroskleroz gibi birçok hastalık üzerinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Tüm bu hastalıkların yanında CUR'un AH'nin tedavisinde ve önlenmesinde etkin bir rolünün olup olmadığı da değerlendirilmiştir. CUR'un; A β oluşumunu azaltması, mikroglia'yı modüle etmesi, metali şelatlaması, tau hiperfosforilasyonu, antioksidan olması, asetilkolinesteraz oluşumunu inhibe etmesi, insülin sinyal yolağını düzenlemesi, nöronların parçalanmasını geciktirmesi, antiinflamatuvar özelliğe sahip olması ve kolesterolü düşürmesi gibi sahip olduğu çoklu mekanizmalar ile AH tedavisinde etkili olduğu ve hafızada iyileşme sağladığı düşünülmektedir (S. Mishra ve Palanivelu, 2008). Bu sebeple bu

tez çalışmasında da CUR AH'de tedavi edici ajan olarak seçilmiş, günümüzde kullanılan ilaçlara ek alternatif bir yaklaşım olarak sunulmak istenmiştir. CUR'un suda çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı hızlı metabolize olup atılımı hızlıdır ve bu sebeple biyoyararlanımı düşüktür. Bu çalışmada CUR, üretilen PLGA/PEG nanopartiküllerinin içerisine enkapsüle edilmiştir. Böylece nano boyuta indirgenen CUR'un hem fagositik hücreler tarafından tanınması zorlaşmış, hem KBB'den geçişi kolaylaşarak biyoyararlanımı artırılmış, hem de PLGA nanopartikülleri sayesinde kontrollü uzun süreli salıma sahip olarak dozaj sıklığı azaltılıp yan etkileri düşürülmüştür. Aynı zamanda sublingual yolla uygulamayı kolaylaştırmak ve doğru dozda verilebilmesini sağlamak için üretilen bu ilaç yüklü nanopartiküller PVP/PEG fiberlerin içerisine gömülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada, CUR-yüklü mezoporoze silika nanopartiküllerinin AH tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur. Nanopartikül formuna getirilen CUR'un suda çözünürlüğünün düşük olması probleminin üstesinden gelinerek biyoyararlanımı artırılmıştır. Ardından üretilen bu nanopartiküller ısıya duyarlı bir hidrojel içerisine gömülmüştür ve böylece CUR yüklü nanopartiküllerin burun yoluyla uygulanması kolaylaştırılmış ve aynı zamanda mukosiliyer temizleme mekanizmalarının üstesinden gelinerek AH tedavisinde potansiyel bir formülasyon olarak doğrulanmıştır (Ribeiro ve ark., 2022). Lv ve arkadaşları ise, CUR'un sinirlerin korunması ve tedavisi için oldukça umut verici bir doğal bileşik olduğunu belirtmiştir. Öte yandan CUR'un, sahip olduğu doğal floresans özelliği sayesinde AH tanısında da kullanılabileceği ifade edilmiştir (Lv ve ark., 2023). Yapılan bir başka çalışmada ise CUR nanopartiküllerin etkinliği, sıçanlara ICV-Streptozotosin'in ile AH indüklenmesinin ardından sıçanlarda meydana gelen davranışsal, nörokimyasal ve histopatolojik değişiklikler gözönünde bulundurularak değerlendirilmiştir. CUR nanopartiküller ICV-Streptozotosin enjeksiyonundan 6 gün önce hayvanlara oral olarak protektif amaçlı verilmeye başlanmış, enjeksiyon sonrasında da verilemeye devam edilmiştir. Çalışma sonunda CUR nanopartiküllerin hayvanların hipokampus ve kortekslerinde streptozotosinin neden olduğu davranışsal, immünohistokimyasal ve nörokimyasal değişikliklerin çoğunu iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Noor ve ark., 2022).

PLGA nanopartikülleri, FDA onaylı PLGA'nın yüksek biyoyumumluluğu ve biyoparçanırılığı sayesinde birçok AH çalışmasında tercih edilmektedir. Hidrofilik bir polimer olan PEG ise yüzey hidrofilikliğini arttırmak için PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine eklenebilmektedir. Bununla birlikte PEG ile modifiye edilmiş PLGA nanopartikülleri, partiküle enkapsüle edilen ilaç moleküllerinin daha stabil kalmasını ve yüklenen bileşiklerin salındıktan sonra vücutta

daha uzun dolaşım süresine sahip olmasını ve dolayısıyla biyoyararlanımlarının artmasını sağlar. Bu sebeple Yang ve arkadaşları, daha önceden nöroprotektif etkisi *in vitro* ve *in vivo* testlerle kanıtlanmış fukoksantini PLGA/PEG nanopartikülleri içerisine yükleyerek fukoksantin KBB'den geçişini artırmış A β oligomerlerinin neden olduğu nörotoksisitenin azalmasını sağlamışlardır (M. Yang ve ark., 2021). Yine yapılan başka bir çalışmada A β ₂₅₋₃₅ ile AH indüklenen sıçanların tedavisinde hedeflendirilmiş PLGA/PEG nanopartiküllerine DO enkapsüle edilerek kullanılmıştır ve DO'nun bu sayede ACh aktivitesinin daha önemli ölçüde engellediği, etkisini daha uzun süre gösterdiği ve A β fibriller oluşmasını daha çok azaltarak bilişsel gerilemeyi iyileştirdiği görülmüştür (Çınar ve ark., 2022). Prakash ve arkadaşları ise rivastigmin yüklü PLGA/PEG nanopartiküller üreterek hidrofilik PEG grubunun varlığıyla nanopartikülün daha küçük boyutlu olmasıyla beyindeki rivastigmin konsantrasyonunu arttırmış hayvanların hafıza öğrenme becerilerinin daha iyi geliştiğini kanıtlamışlardır (Prakash ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında üretilen CUR yüklü nanopartiküllerin *in vivo* uygulamalarda sublingual olarak daha kolay ve doğru dozda uygulanabilmeleri için partiküller PVP/PEG nanofiber içerisine gömülmüşlerdir. Nanofiberin üretiminde PG tekniği kullanılmıştır. Aslında fiber üretiminde iki bileşenli ekstrüzyon, şablon sentezi, kendinden montaj, faz ayırma, eriyik üfleme, çekme ve elektro-eğirme gibi birden farklı teknik kullanılmaktadır. Ancak bunlardan en popüler olanlarından biri elektro-eğirmedir. Bir iğne ucunda damlacık şeklinde toplanan polimer çözeltisine uygulanan elektriksel alan sonucu oluşan taylor konisinden meydana gelen nanofiberler bir toplayıcı alanda birikerek nanofiber üretimi tamamlanmış olur. Basit ve kolay uygulanabilir bir tekniktir. Ancak tek bir iğne ucundan üretimin olması, ince uçlu iğneler kullanıldığında çözeltinin iğnede tıkanmaya sebep olması, birim zamanda üretilen fiber miktarının az ve üretim hızının düşük olmasıyla veriminin oldukça az olması, bakım maliyetlerinin fazla olması, uygulanan elektrik alandan fiber içerisine yüklenmeye çalışılan ilaçların olumsuz etkilenmesi ve üretim hızının düşük olması sebebiyle ilaçların solüsyon içerisinde uzun süreler boyunca bekleyerek stabilitelerinin düşmesi bu tekniğin dezavantajlarından (Ahmed ve ark., 2018; Dai ve ark., 2023). Tüm bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için nanofiber üretiminde PG tekniği tercih edilmiştir. PG tekniğinden adından anlaşılacağı gibi yüksek basınçlı ve döner jet eğirme sistemlerini birleştiren, ölçeklenebilir bir nanofiber oluşturma teknolojisidir. PG, elektro-eğirmede gerekli olan yüksek voltajlı elektriksel alana ihtiyaç duymadan, merkezkaç kuvveti ve gaz üfleme kombinasyonu

yoluyla lifleri üretir. Bu da, PG'nin daha geniş bir potansiyel nanofiber oluşturma malzeme yelpazesine sahip olmasını sağlar. Ek olarak PG, potu üzerinde sahip olduğu birden fazla delikle elektro-eğirme metodundaki tek iğneli sisteme göre saniyeler içerisinde çok daha hızlı ve yüksek verimle nanofiber üretimini gerçekleştirmektedir. Üretim sırasında uygulanan yüksek basınç fiber üretimini kolaylaştırır, daha ince ve daha yüksek verimde nanofiber üretimi sağlar. Ayrıca PG ile fiber üretimi saniyeler içerisinde tamamlandığı için fibere yüklenmek istenen ilaçlar da daha stabil kalırken üretimde elektriksel alana ihtiyaç duyulmaması da yine ilaçların bozunmasını önleyen bir avantajdır. Ortam sıcaklığı, nemi ve gaz basıncı gibi son derece kontrol edilebilen ve istenildiği takdirde kolayca değiştirilebilen PG'yi etkileyen işlem parametreleri de yine bu tekniğin bizlere sunduğu avantajlardandır (Cam ve ark., 2020; Dai ve ark., 2023). Tüm bu sebeplerden dolayı bu tez çalışmasında fiber içerisine nanopartikül gömülmesi istendiği için elektro-eğirme tekniğinin tercih edilmesi durumunda hem ilaç elektriksel alandan etkilenenecekti hem de üretim sırasında saatlerce solüsyon içerisinde bekleyerek partikülden solüsyon içerisine salınan ilaç miktarı artacağından ilaç verimi de düşecekti. Tüm bunlar düşünüldüğünde PG tekniğinin fiber üretiminde seçilmesi daha uygun bulunmuştur.

PG tekniği ile nanofiber üretiminde potun dönme hızı, uygulanan basınç, ortamın sıcaklığı ve neminin yanı sıra solüsyonun yüzey gerilimi, viskozitesi ve yoğunluğu da üretimi etkileyen parametrelerdendir. Aynı zamanda bu parametreler üretilen nanofiberlerin çapları ve morfolojileri üzerine de etkilidirler. Bu parametrelerden yüzey gerilimi nanofiber üretiminde oldukça kritik bir role sahiptir. Üretimin gerçekleşebilmesi için solüsyonun yüzey geriliminin aşılması gerekmektedir. Eğer yüzey gerilimi çok yüksek olursa fiberlerin hiç üretilmemesine ya da boncuklu üretilmesine sebep olabilir (Cam ve ark., 2020; Altun ve ark., 2022). Yüzey gerilimi polimer konsantrasyonundan ve buna bağlı polimer moleküllerinin ve ara yüzeyin çekimiyle ilişkili olarak artabilir ya da azalabilir. Bizim çalışmamızda saf PVP/PEG solüsyonuna CNP ilave edildikten sonra yüzey geriliminin çok hafif bir artış gösterdiği görülmüştür. Bu artış CNP ile PVP ve PEG arasındaki kimyasal etkileşim kaynaklı olabilir. Ayrıca yüzey geriliminin hem saf hem de ilaçlı solüsyonda da üretime uygun bir aralıkta olduğu görülmektedir. Bu, SEM görüntüleri incelendiğinde her iki solüsyona ait fiber üretiminin de başarılı bir şekilde yapılabildiği ve morfolojilerinin boncuksuz olmasıyla kanıtlanmaktadır. Literatürde de ilaç ilavesinden sonra saf polimer solüsyonuna kıyasla yüzey geriliminin arttığı makalelere denk gelinmiştir (Topal ve ark., 2022). Fiber üretimini etkileyen diğer bir parametre

olan viskozite de üretimi oldukça etkilemektedir. Çözelti viskozitesi arttıkça polimerlerin fiziksel zincir kenetlenmesi de artar ve bu durum solventin buharlaşmasıyla birlikte PG'nin fiber üretim sürecini kontrol eden polimer jetinin stabilizasyonu için hayati öneme sahiptir. Çözelti viskozitesi düşükse, polimerin hidrodinamik hacmi düşük olur ve bu, yüzey gerilimindeki artışla birlikte fiberlerin boncuklu oluşmasına sebep olur. Çözeltinin viskozitesi çok yüksekse, merkezkaç kuvvetine karşı daha fazla direnç uygulanacak ve dinamik sıvı merkezkaç kuvvetinin etkisiyle üflenmesinin ardından fiber üretimi, daha kalın liflerin, büyük boncukların veya katılaşmayla sonuçlanacaktır. Genel olarak polimer çözeltisinin konsantrasyonunun artırılması çözelti viskozitesini artırır. Bu nedenle, boncuksuz tekdüze polimer nanofiberler oluşturmak için doğru polimer çözeltisi konsantrasyonunu bulmak çok önemlidir (Mahalingam ve ark., 2020). İlaçlı ve ilaçsız solüsyonlarla üretilen fiberlerin SEM görüntüleri incelendiğinde yapılan bu çalışmada tekdüze morfoloji ve boncuksuz yapılarıyla fiber üretiminde uygun viskoziteye sahip solüsyonların hazırlandığı kanıtlanmıştır. Ayrıca CNP'lerin solüsyona eklenmesinin ardından artan viskozitenin fiber çaplarına olan etkisi ise çaplarda meydana gelen artıştır. Viskozite ile fiber morfolojisi arasında doğrudan bir ilişki vardır ve daha yüksek viskoziteye sahip solüsyonlarla üretilen fiberler daha büyük çaplara sahiptirler (Cam ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da bu durum kanıtlanmıştır. Solüsyonların yoğunlukları da fiber üretimini etkileyen oldukça önemli bir parametredir. Solüsyonun yoğunluğu arttıkça üretilen fiber çapları da artar (Altun ve ark., 2019). Aynı zamanda solüsyon yoğunluğu ile konsantrasyonu arasında da bir ilişki olduğu düşünülmektedir ve yoğunluk arttıkça solüsyon konsantrasyonu da artmaktadır. Bu durum da fiberlerin çapı ve morfoloji üzerine etki etmektedir. Bu sebeple doğru polimer konsantrasyonu ve yoğunluğu çok önemlidir (Aydın ve ark., 2022). Bizim çalışmamızda da CNP'nin saf PVP/PEG solüsyonuna eklenmesinin ardından çözeltinin yoğunluğunun arttığı ve buna bağlı olarak da ilaç yüklü fiberlerin de saf fiberlere kıyasla daha yüksek fiber çapına sahip olduğu görülmüştür.

FT-IR testi çalışma içerisinde kullanıldığı iddia edilen polimerlerin ve ilaçların üretilen yapılar içerisindeki varlıklarının ispatlandığı testtir ve kullanılan malzemelerin molekülleri arasındaki kimyasal bağları analiz etmeyi temel alır. Yapılan bu tez çalışmasında üretilen nanopartiküllerin yapısında PLGA ve PEG polimerleri kullanılırken nanofiber üretiminde PVP ve PEG tercih edilmiş, tedavi edici ajan olarak da CUR seçilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda PEG'in CH, CH₂ ve CH₃ gruplarına ait spesifik pikleri 2888 cm⁻¹'de görülmüştür. C-H bandını temsilen 1464 ve 1343 cm⁻¹'de pikler verdiği görülmüştür. 1342⁻¹'de O-H bandı

görülürken 1096 cm^{-1} 'de ise C-O-C bandı görülmüştür (Pereira ve ark., 2016; Abreu-Rejón ve ark., 2022). Singh ve arkadaşları çalışmasında PLGA polimerinin O-H, C-H, C=O, C-O ve C-H karakteristik piklerine ait bantları sırasıyla 3450-3500, 2885-3010, 1762, 1186-1089 ve 1450-850 cm^{-1} 'de gözlemlemiştir (Singh ve ark., 2014). Bu sonuçlar ışığında yapılan bu tez çalışmasında üretilen PNP'nin FT-IR sonuçları incelendiğinde PLGA ve PEG'e ait pikler 2940, 1461, 1421, 1286, 892 cm^{-1} 'deki bantlarda görülerek literatürle uyumlu bulunmuştur. CUR'a ait spesifik pikler ise yapılan literatür taramasında 1630 ve 1505 cm^{-1} 'de C=C ve C=O bantlarına ait pikler görülürken O-H pikine ait bant 3200-3500 cm^{-1} 'de görülmüştür (Ismail ve ark., 2014). 1500-1400 cm^{-1} 'de ise O-H grubunun C-O uzamasına ait bant tespit edilmiştir. Eter grubuna ait C-O bandı ise 1273 cm^{-1} 'de elde edilmiştir. 713, 808 and 963 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar ise C-H bantlarına aittir (Roy ve Rhim, 2020). Yapılan bu tez çalışmasında ise CNP'nin FT-IR sonucu incelendiğinde 3365, 1629, 964 ve 813 cm^{-1} 'de görülen piklerle CUR'un varlığı kanıtlanmıştır. Diğer yandan yapılan literatür taraması sonucu Grant ve arkadaşlarının PVP'nin C-C, C-H, CH₂ ve C=O' ya ait karakteristik piklerini sırasıyla 753-1023, 1372, 1495 ve 1670 cm^{-1} 'de gözlemlemiştir (Grant ve ark., 2021). Aynı zamanda C-N bandına ait pik 1287 cm^{-1} 'de görülmüştür (Deghiedy ve El-Sayed, 2020). Bu sonuçlar doğrultusunda yapılan bu tez çalışmasındaki PNF'nin yapısı incelendiğinde 1650, 1421 ve 1286 cm^{-1} 'deki piklerle nanofiberlerin üretiminde PVP ve PEG'in kullanıldığı ispatlanırken ve CNPF'deki 3365, 1648 ve 1421 cm^{-1} 'deki piklerle ise CNP'nin başarılı bir şekilde CNPF'ye yüklendiği kanıtlanmıştır. Bu tez çalışmasında yapılan XRD testi sonucunda üretimlerde kullanılan polimerlerin ve CUR'un kristal yapıları analiz edilmiştir ve üretilen son ürünlerin de yapıları test edilerek bu polimerlerin ve CUR'un son ürünlerdeki varlıkları ispatlanmıştır. Yapılan literatür taramasının ardından Fu ve arkadaşlarının da çalışmalarının sonucunda XRD modelinde PLGA'nın amorf yapısı kaynaklı pik noktası 21.13° 'de olan geniş bir pik elde edilmiştir (Fu ve ark., 2023). Sarter ve arkadaşlarının çalışmasında ise PEG'in kristal yapısı kaynaklı keskin pikleri 19.36° ve 23.72° 'de görülmüştür (Sarker ve ark., 2018). PVP'nin yapısı literatürde yapılan bir çalışmada analiz edildiğinde ise 11.55° ve 21.36° 'de amorf yapısı kaynaklı iki geniş pike sahip olduğu belirlenmiştir (R. K. Mishra ve ark., 2008). Bu tez çalışmasında da polimerlere ve CUR'a ait elde edilen XRD modellerinde literatür ile benzer kristal yapılar ve spesifik pikler elde edilmiştir. Üretilen nanopartiküllerin yapısındaki PLGA'nın sahip olduğu amorf yapısı kaynaklı geniş pik PEG'in kristal yapısının etkisiyle genişliğini kısmi de olsa kaybetmiştir ve ek bir keskin pike sahip olmuştur. Bu nanopartiküllere CUR'un enkapsüle edilmesinin ardından

ise yine CUR'un kristal yapısı kaynaklı küçük keskin pikler yapıda görülmüştür. PNF'nin kristal yapısı incelendiğinde ise üretiminde kullanılan PVP/PEG polimer kompoziti kaynaklı PVP'nin oran olarak kompozitin içerisinde daha yüksek oranda bulunması kaynaklı yapının genelinde amorf bir yapının hakim olduğu görülmektedir. Buna karşılık PEG'in etkisiyle de küçük kristal pikler yapıda mevcuttur. CNP'nin PVP/PEG nanofiberlerin içerisine yüklenmesiyle üretilen CNPF'nin kristal yapısı incelendiğinde ise yine PVP ve PLGA'nın amorf yapısı kaynaklı geniş bir pik görülse de PEG ve CUR'un kristal yapısının getirdiği keskin pikler de yapının XRD analizinde ortaya çıkmıştır.

Bu tez çalışmasında yapılan bir diğer karakterizasyon testi ise DSC analizidir. Bu test, üretimlerde kullanılan polimerlerin, ilaçların ve son ürünlerin termal özelliklerini analiz etmek için yapılır ve analiz sonucunda son ürünlerde ilaç gerçekten enkapsüle edilebildi mi ve kullanıldığı iddia edilen polimerler gerçekten yapıların içerisinde mevcut mu test edilmiş olur. Ayrıca bu tez çalışmasında ürünlerin *in vivo* kullanıma uygun olup olmadığı da vücut sıcaklığı olan 37 °C'de gösterdikleri termal özellikler ile analiz edilmiştir. 37 °C'de herhangi bir bozunmaya uğrayıp uğramadıkları detaylı olarak incelenmiştir. Yapılan literatür taramasında CUR'un sahip olduğu kristal yapısı kaynaklı 185 °C'de T_m piki verdiği görülmüştür (H. Xie ve ark., 2022). PLGA/PEG nanopartiküllerinin DSC diyagramları incelendiğinde ise PLGA'nın amorf yapısı kaynaklı sahip olduğu T_g değeri PEG'in kristal yapısı ve plastikleştirici etkisiyle aralarında oluşan kimyasal etkileşim sonucu 48.1 °C'den 41.2 °C'ye düşmüştür (Gholizadeh ve ark., 2018). PEG'in, sahip olduğu terminal OH grupları aracılığıyla H bağları oluşturarak PVP ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Düşük PEG konsantrasyonlarında, PVP moleküler zincirleri hidrojen bağlı PEG molekülleri tarafından itilir ve daha uzun PVP makromolekülleri arasında bir boşluk oluşturur. Bu, PVP moleküllerine uyum sağlamak ve kristalleşmek için yeterli hareketlilik sağlar. Bununla birlikte PVP'nin higroskopik özelliğiyle birlikte T_m değerinde bir düşüş gözlemlenmiştir (Dhakal ve ark., 2012). CUR'un ise kristal yapısı kaynaklı sahip olduğu keskin pikleri CNP ve CNPF'de gözlemlenmemiştir. Bu piklerin yerini hafif dalgalanmalar almıştır. Bu da CUR'un nanopartiküllere enkapsüle olduğunun, yüzeyde adsorplanan CUR miktarının düşük olduğunun ve CUR homojen dağılımının ispatıdır (L. Hu ve ark., 2015). 37 °C'de hiçbir ürünün kimyasal yapısında bir bozunmaya rastlanılmadığı için ürünlerin *in vivo* uygulamaya uygun olduğu da kanıtlanmıştır.

Zeta potansiyel ölçümü, partikül dağılımlarında etkili olan elektrostatik etkileşimlerin analiz edildiği bir testtir. Aynı zamanda partiküllerin kolloidal dağılımlarının kararlılığının

anlaşılmasında önemli bir parametredir. Yapılan literatür taramasında genellikle PLGA'nın yüzeyinde bulunan negatif yüklü karboksil gruplarının etkisiyle PLGA nanopartiküllerin negatif yük taşıma eğiliminde oldukları görülmüştür. Ancak partiküllerin PEG ile yüzey modifikasyonu, iyonik tabakanın PEG zinciri tarafından nanopartikülden daha uzak bir mesafeye yer değiştirmesi nedeniyle yüzey yükünü pozitif veya nötr olarak değiştirmesine sebep olmaktadır (Elsewedy ve ark., 2020). Bu sebeple zeta potansiyellerinin düşük pozitif değerlerde çıktığı düşünülmektedir. Düşük zeta potansiyelinin (<20) agregasyon eğilimini artırması söz konusudur. Ancak nanopartiküllerin düşük elektrostatik itme kuvvetleri nedeniyle kümeler oluşturabilme ve kararlılıklarının azalması şüphesi PDI değerlerinin de düşük çıkmasıyla ortadan kalkmıştır. Bu nedenle, nanoparçacıkların stabilitesinde PLGA sterik engellemesinin yüzey yükünden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir (Vakilinezhad ve ark., 2019). Zeta potansiyelindeki bir düşüş sebebi ise PVA'nın negatif yükü asetat gruplarından kaynaklanmaktadır. Ancak PVA'nın düşük zeta potansiyeline sebep olması sebebiyle partikülün kararlılığına negatif etki etmesi beklenirken oluşturduğu sterik bir kalkan ile bu durumu tersine çevirmiştir (Chavez, 2020; Javed ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında ilaç yüklü nanopartiküller, sublingual uygulamada daha kolay ve doğru dozda uygulanabilmeleri için fiber içerisine gömülerek AH tedavisinde yeni bir ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmişlerdir. Bu sebeple sublingual uygulamaya uygun olması ve hızlı bir şekilde disintegre olabilmeleri için fiber üretiminde suda çözünen polimerler kullanılmış, çapraz bağlayıcı ajan tercih edilmemiştir. İlaç taşıyıcı sistemin dil altı uygulamasından sonra ilaç taşıyıcı sisteme enkapsüle edilmiş ilacın, mukozal kan damarlarına absorpsiyonu için en önemli parametrelerden biri hızlı parçalanma ve ağızda kısa süre kalmasıdır. Bu sayede ilaç hepatik ilk geçiş etkisinden ve mide asidik ortamının negatif etkisinden korunurken daha hızlı absorpsiyon sağlar (Rawas-Qalaji ve ark., 2007; Şenel ve Comoglu, 2018). Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP)'ye göre disintegrasyon testinde sublingual yolla kullanım için geçerli süre limiti maksimum 2 dk olarak kabul edilmektedir (Bayrak ve ark., 2011). Elde edilen literatür verileri göz önüne alındığında, bu çalışmadaki CNPF, yapay tükürük sıvısı içerisinde 5 sn içerisinde tamamen parçalanarak ultra hızlı parçalanma özelliği göstermiştir. Bu nedenle, bu nanoliflerdeki CNP'nin yutulma şansı olmadan hızla emilebileceği açıkça görülmüştür. Sublingual fiber uygulamasından sonra fiberin disintegrasyonu ile sistemik dolaşımdan kana geçtiği kabul edilen partiküllerin vücut içerisinde ne kadar zaman içerisinde ne kadar parçalanacağı degradasyon testiyle simüle edilmiştir. Bu tez çalışmasında amaç

dozlama sayısını azaltmak ve uygulanan ilacın biyoyararlanımını arttırarak dozu düşürüp yan etkileri azaltmak olduğu için nanopartikül üretiminde suda çözünmeyen PLGA polimeri seçilmiş ve PEG ile modifikasyonu sağlanarak fagositozu sağlayan hücrelerden korunmuş, indirekt olarak hedeflendirmenin arttırılması amaçlanmıştır. Tüm bu hedefleri gerçekleştirebilmek için nanopartiküllerin sistemik dolaşımdaki ömrü uzun olmalı, vücut içerisindeki enzimatik reaksiyonlara ve midenin asidik ortamına dirençli olmalıdır. %degradasyon oranı ortamın pH'ına ve partikülün çapına göre değişkenlik göstermektedir. Bu tez çalışmasında partiküllerin sublingual yoldan direkt olarak kana geçmesi hedeflendiği için bu test gerçekleştirilirken pH, kan pH'ı olan 7,4'e ayarlanmıştır. Yapılan literatür taramasında çap küçüldükçe artan yüzey alanı sebebiyle degradasyon oranının arttığı görülmüştür (Moghaddam ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında üretilen PNP'nin çapı 202 ± 1.28 nm iken CNP çapı ise 216 ± 1.84 nm olarak bulunmuştur. İlacın enkapsüle edilmesiyle çap artmıştır. PNP ve CNP'nin çapları karşılaştırıldığında PNP'nin çapının daha küçük olduğu bulunmuştur. Degradasyon sonuçları da yine bu sonuçla korelasyon içerisinde. Daha küçük partikül çapına sahip PNP'nin %degradasyon oranlarının ölçümün gerçekleştirildiği 6 gün için de CNP'nin %degradasyon sonuçlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Ama aralarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Degrade olan partikül oranına bağlı olarak içine enkapsüle edilen ilacın salınma oranı da değişeceği için salım sonuçları da değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda CNP salım sonuçları 1, 5, 8, 10, 15 ve 18. gün sırasıyla %26, 49, 58, 68, 89 ve 100 olarak ölçülmüştür. Artan degradasyona bağlı olarak salınan ilaç miktarının yüzdesinin de arttığı görülmüştür. Böylece %degradasyon ölçüm sonuçlarının partikül çapı ve partikül içerisine enkapsüllenen ilacın salım oranıyla tutarlı olduğu bulunmuştur.

İlaç yüklü nanopartiküller vücut içerisine girdikten sonra gastrointestinal sistem hareketleri, midenin asidik ortamı ve enzimlerin etkisiyle parçalanacak; nanopartikül içerisine enkapsüllenen ilaç, biyoyararlanımına bağlı olarak sistemik dolaşıma geçecektir. Tüm bu süreç gözönüne alındığında ortamın pH'ı ve sıcaklığı, nanopartiküllerin degradasyon ve nanofiberlerin disintegrasyon oranı, ilaç taşıyıcı sistemin üretiminde kullanılan polimerlerin ve ilacın kimyasal yapısı salımı etkileyen parametreler arasındadır. Bu tez çalışmasında ilaç taşıyıcı sistem sublingual uygulamaya uygun olarak hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin gömülü olduğu fiberlerin distegrasyon testinin sonucunda 5 sn'de tamamen disintegre olduğu bulunmuştur. Bu ilaç taşıyıcı sistemin dilaltı uygulamasının ardından fiberlerin 5 sn içerisinde tükürük içerisinde dağılıp açığa çıkan enkapsüllemiş ilaç yüklü nanopartiküllerin sistemik

dolaşıma geçeceği anlamına gelmektedir. Fiberlerin üretim amacı nanopartiküllerin kolay ve doğru dozda uygulanması olduğu için ve 5 sn'de parçalanma özelliğine sahip olduklarından degradasyon testi sadece partiküllere yapılmıştır. Bu test sonucunda PLGA/PEG nanopartiküllerin vücuttaki bozunmalarının 18 gün boyunca sürdüğü tespit edilmiştir. Bu sebeple *in vitro* ilaç salımı da 18 gün boyunca ölçülmüştür. Ölçümler 37 °C'de, pH 7,4'te 1, 2, 3, 4, 6, 24. saat, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15 ve 18. günde alınmıştır. CUR, enkapsüle olduğu nanopartiküllerden ilk 6 saatin sonunda %20 oranında salınarak patlama salım profili göstermiştir. Bu patlama salım profili, PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine adsorbe olan CUR'lar kaynaklı olabileceği gibi daha küçük boyutlu PLGA nanopartiküllerinden hızlı difüze olan CUR'lar kaynaklı da olabilir. Sonrasında 18. gün sonuna kadar kontrollü salım profiline uygun olarak salınmıştır. Hidrofobik kimyasal yapısı sayesinde bu uzun süreli salımı sağlamıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda da Budhian ve arkadaşları haloperidol yüklü PLGA nanopartiküllerin 13 gün boyunca *in vitro* kontrollü ilaç salımı profili sergilediği sonucuna varmışlardır ve %20'den az patlama salım profiline sahip olduğunu bulmuşlardır (Budhian ve ark., 2005). Yapılan bir başka çalışmada da farklı oranlarda üretilen sisplatin yüklü PLGA/PEG nanopartiküllerinde *in vitro* sisplatin salım profili değerlendirilmiştir. PLGA/PEG kompozitindeki PEG oranı arttıkça sisplatinin patlama salım yüzdesinin arttığı bulunmuştur (Avgoustakis ve ark., 2002). Yapılan tez çalışmasının sonuçları literatürle karşılaştırıldığında 18 günlük kontrollü ilaç salımı, 6 sa'lik bir patlama salım profili ve %80'nin üzerinde ilaç verimliliği ile hedeflenildiği gibi dozlama sıklığı azaltılıp yan etkileri düşürülmüş bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirildiği kanıtlanmıştır.

Nano ölçekli ilaç taşıyıcı sistemlerde enkapsüle edilmiş ilaçların nanopartiküllerden salınmaları farklı hızda ve kinetiğe bağlı olarak gerçekleşmektedir. Nanopartikülün boyutu, şekli, su emme yeteneği, bozunma derecesi ve hızı, kimyasal bileşimi, nanopartikülü oluşturan polimerlerin moleküler ağırlığı, çözünürlüğü, kristallliği, ilaç-ilaç veya ilaç-polimer etkileşimleri gibi fizikokimyasal özellikler nanopartikülden salınan ilacın salım profilini ve kinetik profilini etkilemektedir. PLGA nanopartiküllerin ilaç salınımında genellikle iki fazlı bir davranış belirgindir. Suyla dolu gözeneklerden ve polimerik partikül matrisinden ilaç difüzyonunun yanı sıra partikül matrisinin bozunmasına bağlı ilaç salımı ve yüzeye adsorbe olan ilacın patlama salımı gözlenebilmektedir. PLGA'nın parçalanması başlangıçta oldukça yavaştır ve yavaş yavaş polimerin molekül ağırlığı azalır ve dolayısıyla çözünürlüğü asidik ürünlerle ortam pH'ını değiştirir ve bu koşullar altında parçalanma otokatalitik bir şekilde daha hızlı olur. Bu tez

çalışmasında CUR'un salım kinetiği 5 farklı salım kinetik modeli kullanılarak analiz edilmiştir ve CUR'un enkapsüle olduğu nanopartiküllerden Higuchi kinetik modeliyle salındığı tespit edilmiştir. Bu modelde, dozaj formundan serbest kalan ilaç miktarının zamanın karekökünün bir fonksiyonu olduğunu ifade edilir ve özellikle yüzeyin zamanla değiştiği bir sistemi tanımlar. Bu çalışmada da üretilen PLGA/PEG nanopartiküllerin yüzeyi zamanla degrade olup değiştiği için bu kinetiğe uygun salınması literatürle de uyumlu bulunmuştur (Jahromi ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında AH tedavisi için geliştirilen yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin *in vivo* denemeleri yapılmadan önce *in vitro* hücre kültürü testleri yapılmıştır. Bu sayede ürünlerin toksisite özellikleri, anti-Alzheimer etkinlikleri ve tedavide hangi yolağı kullanarak gen ekspresyonu sağladıkları *in vivo* test öncesi analiz edilmiştir. *In vitro* hücre kültüründe SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri tercih edilmiştir. Yapılan literatür taramasında da nörotoksisite ve nöroprotektif etkinlik, *in vitro* AH modeli olarak kabul edilen A β ₁₋₄₂ indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerinde değerlendirilmiştir. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı, Parkinson hastalığı ve AH gibi nörodejeneratif hastalık çalışmalarını *in vitro* model olarak taklit etmek için sıklıkla tercih edilmektedir. SH-SY5Y hücreleri sempatik sinir sistemindeki olgunlaşmamış bir nöron soyundan türetilir. Bu hücreler olgunlaşmamış nöronal proteinleri eksprese edebilir, sürekli çoğalabilir ve olgun nöron benzeri özellikler kazanabilir. Ayrıca, nöronal farklılaşma sonrasında, nöritlerin oluşumu ve yayılması, proliferasyon hızının azalması ve olgun nöronal belirteçlerin ekspresyonu gibi çeşitli morfolojik ve biyokimyasal olayların gerçekleştirilmesini sağlarlar. En önemlisi SH-SY5Y hücrelerinin insan proteinlerini eksprese edebilmesidir. Tüm bu özellikleriyle kolinerjik nöronların erken evre patofizyolojisini taklit etmede, tau fosforilasyon mekanizmalarının incelenmesi ve potansiyel GSK3 β inhibitörlerinin taranmasında ve A β 'nın nörotoksik etkisine karşı koruma yeteneklerinin araştırılmasında uygun bir *in vitro* model görevi görmektedir (Jämsä ve ark., 2004; H.-r. Xie ve ark., 2010; Md ve ark., 2018; de Medeiros ve ark., 2019). Oligomerik A β 'nın patolojik birikimi, sinaptik seviyede uyarıcı iletimi bastırır, fakat aynı zamanda ağ seviyesinde anormal nöronal devre aktivitesi ve epileptiform deşarj modellerini tetikler. İnhibitör internöronların A β kaynaklı fonksiyon bozukluğu, uyarıcı ana hücreler arasındaki senkronizasyonu artırır ve nöronal ağların dengesizleşmesine katkıda bulunur. Bu özellikleriyle A β , *in vitro* hücre kültüründe AH indüklemesinde tercih edilen kimyasallar arasındadır (Palop ve Mucke, 2010). Huang ve arkadaşları AH modelini SH-SY5Y hücrelerinde indükleyebilmek için A β 'yı 5, 10 ve 20 μ M konsantrasyonda uygulamıştır (H.-C. Huang ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında da A β bu

konsantrasyonlarda SH-SY5Y hücrelerine indüklenmiş ve hücreler üzerindeki toksik etkileri Picogreen test ile değerlendirilmiştir ve 20 μM dozda $\text{A}\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine en negatif etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu sebeple anti-Alzheimer etkinin değerlendirilmesinde ve PCR analizinde $\text{A}\beta_{1-42}$ dozu olarak 20 μM seçilmiş ve uygulanmıştır. Yine yapılan literatür taramasında nörotoksik maddelere karşı oksidatif stresi hafifletme ve apoptotik hücre ölümünü kurtarma üzerindeki koruyucu etkileriyle tedavi edici ajan olarak seçilen CUR'un denenen dozları araştırıldığında 1, 5, 10, 20 ve 40 μM dozların en çok tercih edilen dozlar olduğu görülmüştür. Bu dozlardaki tedavilerin hücreler üzerindeki etkileri analiz edildiğinde ise yüksek dozların toksik etkilere sebep olabileceği görülmüştür. Bu sebeple bu tez çalışmasında uygulanacak dozlar, en etkili tedavi sonuçları elde edilen dozlar olan 1, 5 ve 10 μM olarak seçilmiştir (H.-C. Huang ve ark., 2012; Jaroonwitchawan ve ark., 2017; Li Zhang ve ark., 2020).

Yapılan hücre canlılığı testinde üretilen ürünlerin ve toz CUR'un hücreler üzerine toksik etkileri değerlendirilmiştir ve geliştirilen hiçbir ürünün hücreler üzerine toksik etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak CUR dozu arttıkça hücrelerin proliferasyonunda toksik dozda olmasa da negatif bir etki görülmüş ve hücre proliferasyonu doz arttıkça azalmıştır. Yapılan literatür taramasında da CUR dozunun artmasıyla hücre çoğalmasında azalmaya denk gelinmiştir. Artan dozun hücreler üzerine öldürücü etkisi olduğu tespit edilmiştir (Jaroonwitchawan ve ark., 2017). Bu sebeple bu çalışmada 1 μM doz terapötik doz olarak belirlenmiştir. Böylece etkin dozun en düşük dozda bulunmasıyla aslında düşük dozda etkinlik sağlanmış olup yan etki profili iyileştirilmiştir. Anti-Alzheimer etkinliğin değerlendirilmesinde ise $\text{A}\beta_{1-42}$, 3 farklı dozda indükleme için kullanılmış ve en çok 20 μM dozda hücre çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür. Tedavi gruplarının anti-Alzheimer etkinliğinin değerlendirilmesinde de SH-SY5Y hücrelerine $\text{A}\beta_{1-42}$ 20 μM dozda indüklendikten sonra tedavi grupları uygulanmış ve etkinlikleri değerlendirilmiştir. $\text{A}\beta_{1-42}$ 'nin etkisiyle hücrelerin çoğalması üzerinde meydana gelen negatif etki 1, 5 ve 10 μM dozda CUR içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin etkisiyle ortadan kalkmıştır ancak en çok 1 μM dozda CUR içeren ilaç taşıyıcı sistemler hücre çoğalması üzerine pozitif etki oluşturmuştur. Yapılan literatür taramasında da Bissacotti ve arkadaşları CUR'un anti-Alzheimer etkinliğini SH-SY5Y hücrelerinde 0.01–20 μM doz aralığında 9 farklı dozda test etmiştir. Çok düşük dozlarda dalgalanmalar olsa da 1, 5 ve 10 μM dozda CUR dozu arttıkça CUR'un hücreler üzerindeki koruyucu etkinliğinin azaldığı bulunmuştur (Bissacotti ve ark., 2023).

Bu tez çalışmasında CUR'un AH tedavisinde hangi yolağı kullanarak etkili olduğu araştırılmıştır ve CUR'un, en çok üzerinde çalışılan yolaklardan olan PI3K/Akt/GSK-3 β ve Wnt/ β -katenin yolaklarındaki gen ekspresyonları üzerine etkileri yapılan PCR analiziyle test edilmiştir. PI3K/Akt/GSK3 β / β -katenin yolağı, nöral hayatta kalma, çoğalma ve farklılaşmada önemli bir rol oynar. Kısaca, aktifleştirilmiş PI3K, reseptör tirozin kinazlardan sinyal iletimi ile bağlantılı olan ve hücrenin hayatta kalmasını desteklediği ve apoptozu önlediği bildirilen Akt'yi fosforile eder. GSK3 β , Akt'nin aşağı yönlü bir hedef genidir. Aktive edilmiş Akt, GSK3 β 'yi fosforile ederek GSK3 β 'nin inaktivasyonuna yol açar ve ardından hücre döngüsü ve sinir oluşumunda rol oynayan β -katenin'i katalize eder (Shu ve ark., 2018). Bilindiği gibi hücre dışı A β agregasyonu ve tau hiperfosforilasyonu AH patofizyolojisinin ana faktörleridir. Anormal tau hiperfosforilasyonunu destekleyen önde gelen adaylardan biri olan GSK-3 β geni, β -katenin dengesini bozarak etki eder (T. K. Das ve ark., 2019; Patil ve ark., 2023). Yapılan çalışmalarda GSK3 β 'nin, β -katenin fosforilasyonundan sorumlu iki ana kinazdan biri olduğu ve GSK3 β 'nin aktivasyonunun, β -kateninin fosforilasyonunu ve bozulmasını indüklediği bulunmuştur. AH hastalarının beyinde GSK3 β 'nin artmış aktivitesi tespit edilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, β -kateninin protein düzeylerindeki önemli bir azalmanın, AH'li insan beyninin prefrontal kortikal lob yapılarında GSK3 β 'nin artan aktivasyonu ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca GSK3 β , tau fosforilasyonu için anahtar bir kinazdır ve GSK3 β 'nin aşırı aktivasyonu, tau hiperfosforilasyonu, A β birikimi, plakla ilişkili mikrogial aracılı inflamatuvar yanıt ve hafıza bozukluğu ile yakından ilişkilidir (Jia ve ark., 2019). Sonuçlarımıza göre CUR, CNP ve CNPF ile tedavi edilen hücrelerde GSK-3 β gen ekspresyonu önemli ölçüde azaldı ve β -katenin seviyeleri arttı. Bu sonuçlar A β agregasyonunda ve tau hiperfosforilasyonunda azalmaya ve dolayısıyla AH'de iyileşmeye yol açabilir. MAPT protein birikintilerinin AH hastalarında önemli ölçüde aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir (H. Yang ve ark., 2022). MAPT gen mutasyonu çeşitli nörodejeneratif bozukluklarla ilişkilidir. AH'de de MAPT'de meydana gelen anormal değişimler, taunun hiperfosforilasyonu ve nörofibriler yumaklarla sonuçlanmaktadır. Bu tez çalışmasında da CUR, CNP ve CNPF tedavi grupları A β ile indüklenen hücrelerde MAPT ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladı. Önceki çalışmalar, AH'nin indüklendiği farelerde Psen1 ve Akt1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını bildirmişti (Abid ve ark., 2019; Wei ve ark., 2023). Çalışmamızda CUR, CNP ve CNPF uygulanan hücrelerde Psen1 ve Akt1 ekspresyonu arttı. Özetle, bu çalışmada β -katenin gen ekspresyon seviyesi diğer gen ekspresyonlarına kıyasla biraz daha yüksek artışa

sahip olduğu için bu çalışmadaki tedavi gruplarının PI3K/Akt/GSK-3 β 'ye göre AH tedavisi için Wnt/ β -katenin yolunu modüle ederek nöroprotektif etkiler gösterdiği savunabilir. Ancak birbiriyle ilişkili bu iki yolak üzerindeki diğer genler üzerine de etkileri olduğu için iki yolağı da kullanarak AH tedavisinde etkili oldukları sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında *in vivo* hayvan deneyi olarak açık alan, yeni obje tanıma, pasif sakınma ve Morris'in su tankı testleri yapılmıştır. Açık alan testi, hayvanların anksiyete, kaygı, yenilikleri keşfetme ve lokomotor aktivitelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Bunun için 5 dk boyunca, hayvanlar zemini belirli aralıklarla bölünmüş bir kutu içerisinde gözlemlenmiş ve merkez bölgeye ilk giriş zamanları, merkez bölgede geçirilen süre, katedilen toplam çizgi, şahlanma ve süslenme sayıları analiz edilerek 5 farklı parametre üzerinden değerlendirilmişlerdir. Hayvan, kutunun içine konulunca kendini bilmediği yeni bir ortamda bulmuş olur ve etrafını saran duvarlar kaçışını engeller, bu durum da onu strese iter. Hayvanlar tipik olarak kutunun ortasında, aydınlatılmış alanda olmayı tercih etmezler ve duvarlara yakın karelerde yürüme eğilimindedirler. Çünkü merkez bölge hayvan için yeni ve muhtemelen stresli bir ortamdır. Bu sebeple sonuçlarımızda kontrol grubuna kıyasla ICV-A β ₁₋₄₂ grubunun merkez bölgeye girme süresinde anlamlı bir artış görülmüştür. Çünkü bu grupta Alzheimer indüklemesinden sonra herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Tedavi gruplarından PNF grubunda da uygulanan PNF'ler herhangi bir ilaç içermediği için PNF grubunun ICV-A β ₁₋₄₂ ile benzer sonuçlara sahip olması normaldir. Merkez bölgede en çok zaman geçiren grup pozitif kontrol grubu olan ve günümüzde de hastalığın tedavisinde en çok tercih edilen ilaçlardan olan DO grubudur. Bu da tedavinin etkili olduğunu göstermektedir. CNPF ve toz CUR grubunun DO grubuyla arasında anlamlı bir fark bulunmamasıyla CUR'un da tedavide etkili olduğunu kanıtlamaktadır. Katedilen toplam çizgi sayısı analiz edildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamış olması hayvanların operasyon sonrasında lokomotor becerilerini engelleyecek bir hata yapılmadığının kanıtıdır. ICV-A β ₁₋₄₂ ve PNF gruplarının katettiği toplam çizgi sayısının diğer tedavi gruplarına kıyasla daha düşük olmasının sebebi kutu içerisinde daha fazla kaygılı olmaları ve yeni yerler keşfetmeye isteklerinin daha az olması kaynaklı olabilir. Aynı şekilde şahlanma sayısı da yeni yerler keşfetmeye yönelik gerçekleştirilen bir harekettir. Bu sebeple CNPF ve DO gruplarının sonuçlarının kontrol grubuyla benzer olması olumlu bir sonuçtur. Süslenme hareketi ise hayvanların stresli olmalarının bir göstergesidir ve kaygı, stres durumlarının AH'yle olan ilişkileri üzerine fikir sahibi olmamızı sağlar (Williams; Nordquist ve ark., 2017). Bu sebeple sonuçlarımızda PNF ve ICV-A β ₁₋₄₂ gruplarındaki süslenme sayısında

CNPF ve DO gruplarına kıyasla anlamlı bir artış bulunmuştur. Böylece bu tez çalışmasında diğer davranış testleri gerçekleştirilmeden hastalığın indüklenmesi sırasında hayvanlarda herhangi bir lokomotor bozukluğa sebep olacak bir hasarın gerçekleşmediği, hayvanların deney sürecinde stabil davranışlar içerisinde oldukları, operasyondan kaynaklı bir lokomotor bozukluğun olmadığı, tedavi edilen grupların edilmeyen gruplara kıyasla daha az kaygılı ve stresli oldukları gözlemlenirken yeni yerleri keşfetme isteğinin CNPF ve DO gruplarında diğer gruplara kıyasla arttığı kanıtlanmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda da çalışmalarda kontrol grubuna kıyasla hastalık grubunda şaşlanma, katedilen toplam çizgi sayısı, merkez bölgeye ilk geçiş ve merkez bölgede geçirilen sürede düşüş görülürken süslenme sayısında ise artış görülmüştür (Klenerova ve ark., 2009; Nordquist ve ark., 2017; Yadang ve ark., 2020; Bargi ve ark., 2021).

Morris'in su tankı testi hipokampus ilişkili öğrenme ve uzaysal hafızayı test etmek ve hafızanın nörobiyolojisi ve nörofarmakolojisini araştırma çalışmalarında tercih edilmektedir. AH gibi nörobilişsel bozukluklar için kemirgen modellerin doğrulanmasında kullanılan bu testte hayvanın öğrenmesini tetikleyen pek çok faktör vardır. İçi su dolu havuzda gerçekleştirilen bu testte hayvanların ıslanması bile stres olmalarını tetikleyebilir. Bununla birlikte suyun sıcaklığı, ortamdaki ışık ve gürültü hayvanların öğrenmesini etkileyen diğer faktörlerdendir. Bu sebeple deney süresi boyunca bu faktörlerin sabit tutulması ve izlenmesi gerekmektedir (Bromley-Brits ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında bu testte iki farklı parametre değerlendirilmiştir. Bunlardan ilki platformu bulma zamanı, diğeri ise hedef kadranda geçirilen süredir. Bu iki test de hayvanların öğrenme ve hafıza becerileriyle ilişkili testlerdir. Sonuçları değerlendirildiğinde de kontrol grubuyla kıyaslandığında tedavi edilmeyen grupların platformu bulma zamanı daha uzun sürerken CUR ve DO ile tedavi edilen gruplar da ise bu süre kısalmıştır. Bununla birlikte son günde hedef kadranda geçirilen süreler analiz edildiğinde de özellikle CNPF grubu pozitif kontrol grubuyla kıyaslandığında çok yakın sonuçlar göstermiş, kontrol grubuna yakın sonuçlar sergilemiştir. Yapılan literatür taramasında da grupların platformu öğrenme süreleri günden güne düşerken hastalık grubunun süresi tedavi gruplarına göre hep daha yüksek seyretmiştir. Bununla birlikte hedef kadranda geçirilen sürelerde de zıt yönde bir değişim olup hastalık grubunun harcadığı zaman azalırken tedavi gruplarınınki artmıştır. Bu da tedavi edilen hayvanlarda hastalık kaynaklı hipokampüse dayalı öğrenme ve hafıza bozukluklarının iyi yönde geliştiği görülürken hastalık grubunda ise kötüye gittiği görülmüştür (Agrawal ve ark., 2010; Topal ve ark., 2022; Veysanoglu ve ark., 2023). Tüm bunların ışığında yeni geliştirilen

ilaç taşıyıcı sistemin sonuçlarının, kontrol ve DO gruplarının sonuçlarıyla benzer çıkması tedavideki etkinliklerinin kanıtıdır.

Pasif sakinme testi, kemirgen hayvan modellerinde hayvanların öğrenme ve bilişsel hafızanın korku güdümlü modelle analiz edilmesidir. Kemirgenler, doğuştan gelen fotofobi nedeniyle bulundukları ortamda karanlık bölmeyi tercih etmektedir. Bu testte, karanlık bölmede elektrik ile ayak şokuna maruz bırakılarak aydınlık bölmede kalmaları gerektiği öğretilmeye çalışılır. Bu doğuştan gelen eğilimleriyle ters bir davranıştır (Rashno ve ark., 2022). Yapılan bu çalışmada da PNF ve ICV-A β ₁₋₄₂ gruplarında karanlık bölgeye geçiş süresi 2. günde de oldukça kısa bulunmuştur. Bu durum bu gruplardaki hafıza bozukluğunu kanıtlamaktadır. Tedavi edilen hayvanlarda ise bu süre kontrol grubunun değerlerine oldukça yakın çıkmıştır. Özellikle CNPF grubunun karanlık bölgeye geçiş süresiyle pozitif kontrol grubunun geçiş süresi arasında anlamlı bir fark bulunmaması tedavinin etkinliğini kanıtlamaktadır. Literatür taramasında Labban ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da 2. gün sonunda hastalık grubunun karanlık bölgeye geçiş sürelerindeki kısalık değişmezken tedavi gören grupların geçiş süreleri neredeyse kontrol grubuyla aynı sürelerde çıkmıştır (Labban ve ark., 2021). Aynı şekilde yapılan bir başka çalışmada da hastalık grubunun karanlık bölgeye geçiş süresindeki kısalık değişmezken ilaç yüklü fiber ile tedavi edilen grubun geçiş süresi kontrol grubuyla eş değer çıkmıştır (Veysanoglu ve ark., 2023).

Yeni obje tanıma testi hayvanlarda öğrenme ve kısa süreli hafızanın değerlendirildiği bir testtir. Hayvan içgüdüsel olarak yenilikleri keşfetme eğilimindedirler. Bu sebeple çok sayıda pekiştirmeye ihtiyaç duymamaktadırlar. Görsel hafızaya dayanan bu test alışma, eğitme ve test etme olmak üzere farklı aşamalardan oluşur. Test ortamına bırakılan hayvan ortama alıştıktan sonra iki özdeş nesneyi görsel olarak keşfeder. Ardından test aşamasında daha önce keşfedilen nesnelerden biri yeni bir nesneyle değiştirilir. Hafıza problemi yaşamayan hayvanlar doğaları gereği tanıdık nesne yerine yeni nesneyi keşfetmek için daha fazla zaman harcayacaklardır. Hayvanların yeni objeye olan ilgilerini daha iyi analiz edebilmek için farklı indeksler kullanılmıştır. Fark ve tercih skoru olarak verilen bu değerlerden fark skoru, yeni nesneyi keşfetmek için harcanan sürenin tanıdık nesneyi keşfetmek için harcanan süreden farkının toplam keşif süresine bölünmesiyle hesaplanır. Tüm değerlerin -1 ile +1 arasında olması beklenir. Bu sürenin +1'e yakın olması yeni nesneyle ilginin fazla olduğu anlamına gelirken -1'e yakın olması ise kısa süreli hafıza ve öğrenmede sorunlar olduğunu yansıtır. Tercih skoru ise yeni nesneyi keşfetmek için harcanan zamanın toplam süreye bölünmesiyle elde edilir ve

tüm değerlerin 0 ile 1 arasında olması beklenir. Yine çıkan sonucun 1'e yakın olması yeni objeyle ilginin artması kaynaklı olacağından öğrenme ve kısa süreli hafızada iyi yönlü gelişmeler olduğunu ifade eder (Lueptow, 2017). Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışması sonuçları değerlendirildiğinde keşif süresinde kontrol grubuna kıyasla hastalık ve PNF gruplarında yeni objeyle ilgilenme süresinin düşük çıkması hastalık kaynaklı bellek sorunlarının yaşandığını gösterirken tedavi gruplarında kontrol ve pozitif kontrol gruplarına eşdeğer sonuçların çıkması yeni geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin tedavide etkili olduğunu kanıtlamıştır. Aynı şekilde fark skorunun analizinde hastalık ve PNF gruplarında -1'e yakın değerlerin çıkması hastalık kaynaklı bellek problemleri sebebiyle yeni objeye olan ilgisizliklerini gösterirken özellikle CNPF grubunda ve diğer tedavi gruplarında bu değerlerin +1'e yakın çıkması tedavideki etkinliklerini sergilemektedir. Yine tercih skorunda da kontrol grubundan sonra en yüksek değerlere CNPF ve DO grupları sahipken PNF ve ICV-A β ₁₋₄₂ gruplarında değerler hastalık kaynaklı düşük bellek kapasitesi sebebiyle düşmüştür. Yapılan literatür taraması sonucunda Zarifkar ve arkadaşları da hipokampusün etkili olduğu tanıma hafızasının analiz edildiği bu testin, diğer davranış testlerine kıyasla daha basit, stressiz ve kolay uygulanabilir olduğunu belirtmiş, çalışmasında bizimle benzer sonuçlara ulaşmışlardır (Zarifkar ve ark., 2019).

Deneysel Alzheimer modeli ile yeni geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin beyin üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilebilmesi için hayvanların beyinlerinden alınan korteks ve hipokampus dokuları H&E ile boyanmıştır ve kontrol grubunun dokuları ile kıyaslanmıştır. Yapılan literatür taramasında, A β ile Alzheimer indüklenen sıçanların beyinlerinde H&E boyamayla yapılan histopatolojik analiz sonuçlarında, hipokampus ve kortekslerinde nöronların düzensizliği, eozinofilik plakların olduğu sitoplazma, çekirdek şişmesi ve nöronal büzülme ile karakterize edilen A β aracılı nöronal dejenerasyon gözlemlenmiştir. A β 'nın ICV indüksiyonunun ardından piknotik çekirdeklerle ciddi piramidal hücre kaybı görülmüştür. Bu bulgular, A β ₁₋₄₂ kaynaklı hafıza bozukluğunun, sıçan beyninin hipokampus ve korteks bölgelerindeki nöronal hasarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Rahman ve arkadaşları da A β ₁₋₄₂ ile Alzheimer indüklenen sıçanların hipokampuslerinde nöronal dejenerasyona rastlarken tedavi gruplarının nöron hasarına ve plak oluşumuna karşı önemli koruma sağladıkları kanıtlanmıştır. Tedavi edilen grubun H&E'sinde, daha az sayıda eozinofilik boyalı nöron, belirgin çekirdeklere sahip artan sayıda sağlıklı nöron ve hafif nöronal toksisite gösterdiği tespit edilmiştir. Böylece tedavi edilen sıçanların hipokampuslerinde A β üretiminin ve birikiminin

azaldığını göstermişlerdir. Vedagiri ve arkadaşları ise tedavi edilen sıçan dokularında ölü hücrelerin azaldığı ve daha fazla sayıda sağlıklı hücre olduğunu gözlemlemiştir. Yapılan bir başka çalışmada da AH'li sıçan modelinde beyin dokularının serebral kortekslerinde, küçülmüş nöron, yoğunlaşmış piknotik çekirdek ve dejenerasyona sahip alanların olduğu tespit edilmiştir (Vedagiri ve Thangarajan, 2016; Rahman ve ark., 2019; Almuhayawi ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında da kontrol grubuna kıyasla hastalık ve PNF gruplarının serebral korteks ve hipokampal bölgelerinde tedavi eksikliği sebebiyle AH kaynaklı önemli nükleer piknoz, dejenerasyon fokal eozinofilik plaklar ve intraselüler ve perivasküler ödem kaydedilirken tedavi gruplarında bu hasarlar ortadan kalkmıştır. Özellikle CNPF grubunda beyin hasarlarındaki onarımın arttığı gözlemlenmiştir.

Son yıllarda AH patolojisinin anlaşılmasında yapılan çalışmalar sonrasında hem güçlü anti-A β hem de anti-tau aktivitesi gösteren bileşiklerin hastalığın tedavisinde daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sebeple doğal biyoaktif bileşik olan CUR da büyük ilgi görmektedir. CUR; antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümör olma gibi özelliklerinin yanı sıra yüksek A β afinitesi, anti- β amiloidoz ve anti-tau özellikleri de gösterir. Ancak yapılan hayvan çalışmalarında beklenen güçlü etki, CUR'un biyoyararlanımının düşük oluşu ve KBB'den geçişinin zor olması sebebiyle görülemedi. Bu sebeple bu çalışmada, CUR'un zayıf biyoyararlanımını, KBB'den geçişini arttırmak ve beyne hedeflemek için CUR PLGA/PEG nanopartiküllerin içerisine enkapsüllenmiştir ve bu partiküller fiberlerin içerisine gömülüp sublingual yoldan uygulanarak biyoyararlanım ve beyne ulaşan CUR miktarı arttırılmaya çalışılmıştır (Fan ve ark., 2018). Yapılan immunohistokimyasal analiz H&E boyaması sonucunda CNPF'nin tedavideki etkinliği kanıtlanmıştır. Bu analiz, doku içerisindeki antijenlere spesifik olarak bağlanan antikorlar kullanılarak antijenlerin seçici olarak tanımlanması ilkesine dayanır. Bu çalışmada da AH ile ilişkili olan A β ve tau protein ekspresyonları analiz edildi. Korteks ve hipokampüsteki A β ve tau protein ekspresyonları hastalık ve PNF gruplarında artarken tedavi gruplarında CUR ve DO'nun etkisiyle bu ekspresyonların azaldığı kanıtlandı. Tedavi grupları kendi içerisinde kıyaslandığında ise CNPF içerisindeki hedeflendirilmiş CUR'un artan biyoyararlanımı ile tedavide daha etkin olduğu bulundu. Yapılan literatür araştırmasında da A β ve tau protein ekspresyon seviyelerinin, hastalık gruplarında AH patolojisinin varlığıyla arttığı tedavi gruplarında ise iyileşen nörodejeneratif hasarlar sonucunda azaldığı tespit edilmiştir (Ali ve ark., 2017; den Haan ve ark., 2018).

AH'de A β 'nın, amiloidojenik yolak üzerinden APP'nin β ve γ sekretaz enzimi tarafından sıralı proteolitik bölünmesi veya A β 'nin A β -degradasyon proteazları tarafından azalmış bozunmasına bağlı olarak aşırı üretimi ve birikimi vardır. Bu birikim, özellikle hipokampüste ilerleyici nöritik hasara neden olur ve böylece AH'de sinaptik fonksiyon ve hafıza bozukluğuna neden olur. Bu sebeple bu tez çalışmasında yapılan hayvan deneyi sonucunda alınan beyin dokularının korteks ve hipokampuslerindeki A β_{1-42} seviyeleri ölçülmüştür ve birbirleriyle kıyaslanarak uygulanan tedavilerin AH'de A β birikimi üzerine etkileri test edilmiştir. Yapılan literatür taraması sonrasında da A β_{1-42} peptidlerinin ICV infüzyonunu takiben 8 haftalık süre boyunca Linagliptin'in oral uygulanmasından sonra hipokampustaki A β miktarı analiz edilmiş ve A β_{1-42} seviyelerinin hastalık grubuyla kıyaslandığında tedavi edilen grupta önemli azalmalar gösterdiği görülmüştür (Siddiqui ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda da bu verileri doğrulayacak sonuçlar elde edilmiştir. Hastalık ve PNF gruplarında A β_{1-42} seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterirken tedavi gruplarından özellikle CNPF grubunda senil plakların seviyelerinin düşmesi AH'nin patofizyolojisinde tedavinin işe yaradığını göstermiştir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında AH tedavisinin radikal tedavisini geliştirebilmek için doğal birleşik olan CUR'un AH üzerindeki etkilerinden yararlanarak sublingual uygulamaya uygun yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Böylece beyne indirekt hedeflendirilmiş, yan etkileri ve dozlama sıklığı azaltılmış yeni bir tedavi stratejisi literatüre katılmıştır.

8. KAYNAKLAR

- 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 18(4), 700-89. <https://doi.org/10.1002/alz.12638>
- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 19(4), 1598-695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Abdel-Aal, R. A., Assi, A.-A. A., & Kostandy, B. B. (2011). Rivastigmine reverses aluminum-induced behavioral changes in rats. *Eur. J. Pharmacol*, 659(2-3), 169-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.011>
- Abid, N. B., Naseer, M. I., & Kim, M. O. (2019). Comparative gene-expression analysis of Alzheimer's disease progression with aging in transgenic mouse model. *Int. J. Mol. Sci*, 20(5), 1219. <https://doi.org/10.3390/ijms20051219>
- Abreu-Rejón, A., Herrera-Kao, W., May-Pat, A., Ávila-Ortega, A., Rodríguez-Fuentes, N., Uribe-Calderón, J., & Cervantes-Uc, J. M. (2022). Effect of PEG grafting density on surface properties of polyurethane substrata and the viability of osteoblast and fibroblast cells. *J. Mater. Sci.:Mater. Med*, 33(6), 45. <https://doi.org/10.1007/s10856-022-06668-1>
- Agrawal, R., Mishra, B., Tyagi, E., Nath, C., & Shukla, R. (2010). Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol. Res*, 61(3), 247-52. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.008>
- Ahmed, J., Matharu, R. K., Shams, T., Illangakoon, U. E., & Edirisinghe, M. (2018). A comparison of electric-field-driven and pressure-driven fiber generation methods for drug delivery. *Macromol Mater Eng*, 303(5), 1700577. <https://doi.org/10.1002/mame.201700577>
- Ait Bachir, Z., Huang, Y., He, M., Huang, L., Hou, X., Chen, R., & Gao, F. (2018). Effects of PEG surface density and chain length on the pharmacokinetics and biodistribution of methotrexate-loaded chitosan nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 5657-71. <https://doi.org/10.2147/IJN.S167443>
- Akhgari, A., Ghalambor, D. A., Rezaei, M., Kiarsi, M., & Abbaspour, M. R. (2016). The design and evaluation of a fast-dissolving drug delivery system for loratadine using the electrospinning method. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 11(2), e33613. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-33613>
- Akhgari, A., Heshmati, Z., Garekani, H. A., Sadeghi, F., Sabbagh, A., Makhmalzadeh, B. S., & Nokhodchi, A. (2017). Indomethacin electrospun nanofibers for colonic drug delivery: In vitro dissolution studies. *Colloids Surf*, 152, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.035>
- Akiba, I., Terada, N., Hashida, S., Sakurai, K., Sato, T., Shiraishi, K., Yokoyama, M., Masunaga, H., Ogawa, H., Ito, K., & Yagi, N. (2010). Encapsulation of a hydrophobic drug into a polymer-micelle core explored with synchrotron SAXS. *Langmuir*, 26(10), 7544-51. <https://doi.org/10.1021/la904355p>

- Al Harthi, S., Alavi, S. E., Radwan, M. A., El Khatib, M. M., & AlSarraf, I. A. (2019). Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer's disease. *Sci. Rep*, 9(1), 9563. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46032-y>
- Alenezi, H., Cam, M. E., & Edirisinghe, M. (2021). Core-sheath polymer nanofiber formation by the simultaneous application of rotation and pressure in a novel purpose-designed vessel. *Appl. Phys. Rev*, 8(4). <https://doi.org/10.1063/5.0071257>
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics*, 5(4), 505-15. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Ali, T., Kim, M. J., Rehman, S. U., Ahmad, A., & Kim, M. O. (2017). Anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles enhanced the neuroprotection of anthocyanins in an A β ₁₋₄₂ mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol*, 54, 6490-506. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0136-4>
- Almuhayawi, M. S., Ramadan, W. S., Harakeh, S., Al Jaouni, S. K., Bharali, D. J., Mousa, S. A., & Almuhayawi, S. M. (2020). The potential role of pomegranate and its nano-formulations on cerebral neurons in aluminum chloride induced Alzheimer rat model. *Saudi J. Biol. Sci*, 27(7), 1710-6. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.045>
- Almukainzi, M., El-Masry, T. A., Negm, W. A., Elekhawy, E., Saleh, A., Sayed, A. E., Ahmed, H. M., Abdelkader, D. H. (2022). Co-delivery of gentiopicoside and thymoquinone using electrospun m-PEG/PVP nanofibers: In-vitro and In vivo studies for antibacterial wound dressing in diabetic rats. *Int. J. Pharm*, 625, 122106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122106>
- Altınsoy, C., & Dikmen, D. (2023). Kan Beyin Bariyeri Modülasyonuna Yeni Bir Bakış Açısı: Beslenme ve Çevresel Faktörlerin Etkisi. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 8(1), 183-92.
- Altıntaş, A., & Benbir, G. (2004). Kan-beyin bariyeri. *Türk Nöroloji Dergisi*, 10(5), 401-6.
- Altun, E., Ahmed, J., Aydogdu, M. O., Harker, A., & Edirisinghe, M. (2022). The effect of solvent and pressure on polycaprolactone solutions for particle and fibre formation. *Eur. J. Pharmacol*, 173, 111300. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111300>
- Altun, E., Aydogdu, M. O., Crabbe-Mann, M., Ahmed, J., Brako, F., Karademir, B., Aksu, B., Sennaroglu, M., Eroglu, M. S., Ren, G., Gunduz, O., & Edirisinghe, M. (2019). Co-Culture of Keratinocyte-Staphylococcus aureus on Cu-Ag-Zn/CuO and Cu-Ag-W Nanoparticle Loaded Bacterial Cellulose: PMMA Bandages. *Macromol Mater Eng*, 304(1), 1800537. <https://doi.org/10.1002/mame.201800537>
- Alves, J. B., Mangia, L. H. R., Sousa-Batista, A. d. J., Ferraz, H. C., & Pinto, J. C. (2020). Effects of different stabilizers on miniemulsion methyl methacrylate polymerizations. *Macromolecular Symposia*, 394(1), 2000143. <https://doi.org/10.1002/masy.202000143>
- Alves, T. F., Morsink, M., Batain, F., Chaud, M. V., Almeida, T., Fernandes, D. A., da Silva, C. F., Suoto, E. B., & Severino, P. (2020). Applications of natural, semi-synthetic, and

- synthetic polymers in cosmetic formulations. *Cosmetics*, 7(4), 75. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040075>
- Amin, F. U., Shah, S. A., Badshah, H., Khan, M., & Kim, M. O. (2017). Anthocyanins encapsulated by PLGA@ PEG nanoparticles potentially improved its free radical scavenging capabilities via p38/JNK pathway against A β 1–42-induced oxidative stress. *J. Nanobiotechnology*, 15, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0227-4>
- Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2017). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif. Cells Nanomed*, 45(2), 185-92. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731>
- Assi, A.-A., Farrag, M. M., Badary, D. M., Allam, E. A., & Nicola, M. A. (2023). Protective effects of curcumin and Ginkgo biloba extract combination on a new model of Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01164-6>
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*, 17(3), 247-89. <https://doi.org/10.1163/156856206775997322>
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte?. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(2), 451-5. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A., & Ithakissios, D. (2002). PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release*, 79(1-3), 123-35. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00530-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00530-2)
- Aydin, S., Kabaoglu, I., Guler, E., Topal, F., Hazar-Yavuz, A. N., Ekentok, C., Tatar, E., Gurbuz, F., Gunduz, O., & Cam, M. E. (2022). A Comparison Study of Fiber Diameter's Effect on Characteristic Features of Donepezil/Curcumin-Loaded Polycaprolactone/Polylactic Acid Nanofibers. *Macromol Mater Eng*, 307(5), 2100855. <https://doi.org/10.1002/mame.202100855>
- Ayodele, T., Rogaeva, E., Kurup, J. T., Beecham, G., & Reitz, C. (2021). Early-onset Alzheimer's disease: what is missing in research?. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*, 21, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11910-020-01090-y>
- Balakrishnan, K., Casimeer, S. C., Ghidan, A. Y., Ghethan, F. Y., Venkatachalam, K., & Singaravelu, A. (2021). Bioformulated hesperidin-loaded PLGA nanoparticles counteract the mitochondrial-mediated intrinsic apoptotic pathway in cancer cells. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater*, 31, 331-43. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01746-9>
- Bargi, R., Hosseini, M., Asgharzadeh, F., Khazaei, M., Shafei, M. N., & Beheshti, F. (2021). Protection against blood-brain barrier permeability as a possible mechanism for protective effects of thymoquinone against sickness behaviors induced by

- lipopolysaccharide in rats. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod*, 16(2). <https://doi.org/10.5812/jjnpp.67765>
- Aru, B., Develioğlu, A., Gürel, G., & Demirel, G. Y. (2023). Alzheimer Hastalığı'nda In Vivo ve In Vitro Modeller. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 6(1), 54-77. <https://doi.org/10.54537/tusebdergisi.1213712>
- Baumann, A., Piel, I., Hucke, F., Sandmann, S., Hetzel, T., & Schwarz, T. (2019). Pharmacokinetics, excretion, distribution, and metabolism of 60-kDa polyethylene glycol used in BAY 94-9027 in rats and its value for human prediction. *Eur. J. Pharm. Sci*, 130, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.01.015>
- Bayrak, Z., Tas, C., Tasdemir, U., Erol, H., Ozkan, C. K., Savaser, A., & Ozkan, Y. (2011). Formulation of zolmitriptan sublingual tablets prepared by direct compression with different polymers: In vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 78(3), 499-505. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.014>
- Baysal, I., Ucar, G., Gultekinoglu, M., Ulubayram, K., & Yabanoglu-Ciftci, S. (2017). Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro. *J. Neural Transm*, 124, 33-45. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1527-4>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Adv. Colloid Interface Sci*, 108-109, 29-41. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.013>
- Bhatt, P., Fnu, G., Bhatia, D., Shahid, A., & Sutariya, V. (2020). Nanodelivery of resveratrol-loaded PLGA nanoparticles for age-related macular degeneration. *AAPS PharmSciTech*, 21, 1-9. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01836-4>
- Bhushan, B. (2017). Springer handbook of nanotechnology. In B. Bhushan (Eds.), Springer handbook of nanotechnology, *Introduction to nanotechnology* (pp. 1-19). Springer Handbooks. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02525-9_1
- Bissacotti, B. F., Copetti, P. M., Bottari, N. B., Gündel, S. d. S., Machado, A. K., Sagrillo, M. R., Ourique, A. F., Morsch, V. M. M., & da Silva, A. S. (2023). Impact of free curcumin and curcumin nanocapsules on viability and oxidative status of neural cell lines. *Drug Chem. Toxicol*, 46(1), 155-65. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2015242>
- Bitar, A., Zafar, N., Valour, J. P., Agusti, G., Fessi, H., Humbert, P., Robin, S., Viennet, C., Lévêque, N., & Elaissari, A. (2015) Elaboration of sponge-like particles for textile functionalization and skin penetration. *Colloid Polym. Sci*, 293, 2967-77. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3704-7>
- Bothiraja, C., Shinde, M. B., Rajalakshmi, S., & Pawar, A. P. (2009). Evaluation of molecular pharmaceutical and in-vivo properties of spray-dried isolated andrographolide—PVP. *J. Pharm. Pharmacol*, 61(11), 1465-72. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.11.0005>
- Brack, G., Franklin, P., & Caldwell, J. (2013). Medicines management for nursing practice: Pharmacology, patient safety, and procedures. *Pharmaceutics and Routes of Drug*

Administration. (pp. 70-81). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/oso/9780199697878.003.0010>

- Brady, J., Dürig, T., Lee, P., & Li, J.-X. (2017). Developing Solid Oral Dosage Forms. In Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Z. Zhang, L. Yu, & R. V. Mantri (Eds.), *Polymer properties and characterization* (pp. 181-223). Pharmaceutical Theory and Practice.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00007-8>
- Bramanti, E., Bonaccorsi, L., Campanella, B., Ferrari, C., Malara, A., & Freni, A. (2022). Structural characterization of electrospun tetraethylortosilicate (TEOS)/Polyvinylpyrrolidone (PVP) microfibres. *Mater. Chem. Phys*, 287, 126248.
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126248>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (53), e2920. <https://doi.org/10.3791/2920>
- Budhian, A., Siegel, S. J., & Winey, K. I. (2005) Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. *J. Microencapsul*, 22(7), 773-85. <https://doi.org/10.1080/02652040500273753>
- Bühler, V. (2005) *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone and copovidone*. Springer Science & Business Media.
- Cai, Y., Wei, Q., & Huang, F. (2012). Functional nanofibers and their applications. In G. Wei (Eds.), *Processing of composite functional nanofibers*. (pp. 38-54). Woodhead Publishing Series in Textiles. <https://doi.org/10.1533/9780857095640.1.38>
- Calabrò, M., Rinaldi, C., Santoro, G., & Crisafulli, C. (2021). The biological pathways of Alzheimer disease: A review. *AIMS neuroscience*, 8(1), 86.
<https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>
- Cam, M. E., Ertas, B., Alenezi, H., Hazar-Yavuz, A. N., Cesur, S., Ozcan, G. S., Ekentok, C., Guler, E., Katsakouli, C., Demirbas, Z., Akakin, D., Eroglu, M. S., Kabasakal, L., Gunduz, O., & Edirisinghe, M. (2021). Accelerated diabetic wound healing by topical application of combination oral antidiabetic agents-loaded nanofibrous scaffolds: An in vitro and in vivo evaluation study. *Mater. Sci. Eng. C*, 119, 111586.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111586>
- Cam, M. E., Hazar-Yavuz, A. N., Cesur, S., Ozkan, O., Alenezi, H., Sasmazel, H. T., Eroglu, M. S., Brako, F., Ahmed, J., Kabasakal, L., Ren, G., Gunduz, O., & Edirisinghe, M. (2020). A novel treatment strategy for preterm birth: Intra-vaginal progesterone-loaded fibrous patches. *Int. J. Pharm*, 588, 119782.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119782>

- Charmi, J., Nosrati, H., Amjad, J. M., Mohammadkhani, R., & Danafar, H. (2019). Polyethylene glycol (PEG) decorated graphene oxide nanosheets for controlled release curcumin delivery. *Heliyon*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01466>
- Chavez, S. E. (2020). *One-step Coassembly of Nanocoatings and Effects of the Deposition Methods*. [Unpublished doctoral dissertation]. University of Connecticut.
- Chen, Z.-R., Huang, J.-B., Yang, S.-L., & Hong, F. F. (2022). Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. *Molecules*, 27(6), 1816. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>
- Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. (2007). *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination* (2nd ed.). CRC press.
- Cruise, G. M., Scharp, D. S., & Hubbell, J. A. (1998). Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 19(14), 1287-94. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00025-8)
- Çelik, G., & Birdane, Y. O. (2015). Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8(1), 85-94. <https://doi.org/10.5578/kvj.8621>
- Çınar, E., Mutluay, S. U., Baysal, İ., Gültekinoglu, M., Ulubayram, K., Çiftçi, S. Y., Tel, B. C., & Uçar, G. (2022). Donepezil-loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles Enhance the Learning and Memory Function of Beta-Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Arch Neuropsychiatry*, 59(4), 281. <https://doi.org/10.29399/npa.28275>
- D'souza, A. A., & Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin. Drug Deliv*, 13(9), 1257-75. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>
- Dai, Y., Ahmed, J., & Edirisinghe, M. (2023). Pressurized Gyration: Fundamentals, Advancements, and Future. *Macromol Mater Eng*, 308(7), 2300033. <https://doi.org/10.1002/mame.202300033>
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161(2), 505-22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- Das, M., & Devi, K. P. (2021). Dihydroactinidiolide regulates Nrf2/HO-1 expression and inhibits caspase-3/Bax pathway to protect SH-SY5Y human neuroblastoma cells from oxidative stress induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology*, 84, 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.02.006>
- Das, P. P., Huda, M. K., Saikia, P. J., & Baruah, S. D. (2019). Study of the formation of biodegradable polycaprolactone particles using solvent evaporation method. *J. Macromol*, 56(1), 69-75. <https://doi.org/10.1080/10601325.2018.1547112>
- Das, T. K., Jana, P., Chakrabarti, S. K., & Abdul Hamid, M. R. (2019). Curcumin downregulates GSK3 and Cdk5 in scopolamine-induced Alzheimer's disease rats

- abrogating A β 40/42 and tau hyperphosphorylation. *J. Alzheimer's Dis. Rep*, 3(1), 257-67. <https://doi.org/10.3233/ADR-190135>
- Day, J. R., David, A., Kim, J., Farkash, E. A., Cascalho, M., & Milašinović, N., Shikanov, A. (2018). The impact of functional groups of poly (ethylene glycol) macromers on the physical properties of photo-polymerized hydrogels and the local inflammatory response in the host. *Acta biomaterialia*, 67, 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.007>
- De Lima, G. G., de Lima, D. W., de Oliveira, M. J., Lugão, A. B., Alcântara, M. T., Devine, D. M., & de Sá, M. J. C. Synthesis and in vivo behavior of PVP/CMC/agar hydrogel membranes impregnated with silver nanoparticles for wound healing applications. *ACS Appl. Bio Mater*, 1(6), 1842-52. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00369>
- De Medeiros, L. M., De Bastiani, M. A., Rico, E. P., Schonhofen, P., Pfaffenseller, B., Wollenhaupt-Aguiar, B., Grun, L., Barbé-Tuana, F., Zimmer, E. R., Castro, M. A. A., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2019). Cholinergic differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and its potential use as an in vitro model for Alzheimer's disease studies. *Mol. Neurobiol*, 56, 7355-67. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1605-3>
- Deghiedy, N., & El-Sayed, S. (2020). Evaluation of the structural and optical characters of PVA/PVP blended films. *Mol. Neurobiol*, 100, 109667. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2020.109667>
- del Consuelo, I. D., Falson, F., Guy, R. H., & Jacques, Y. (2007). Ex vivo evaluation of bioadhesive films for buccal delivery of fentanyl. *J Control Release*, 122(2), 135-40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.017>
- den Haan, J., Morrema, T. H., Rozemuller, A. J., Bouwman, F. H., & Hoozemans, J. J. (2018). Different curcumin forms selectively bind fibrillar amyloid beta in post mortem Alzheimer's disease brains: Implications for in-vivo diagnostics. *Acta Neuropathol. Commun*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0577-2>
- Dhakal, T. R., Mishra, S. R., Glenn, Z., & Rai, B. K. (2012). Synergistic effect of PVP and PEG on the behavior of silver nanoparticle-polymer composites. *J Nanosci Nanotechnol*, 12(8), 6389-96. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6561>
- Dillon, C., Hughes, H., O'Reilly, N. J., & McLoughlin, P. (2017). Formulation and characterisation of dissolving microneedles for the transdermal delivery of therapeutic peptides. *Int. J. Pharm*, 526(1-2), 125-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.066>
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W., & Anton, N. (2019). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *J Control Release*, 295, 31-49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.037>
- Doğan, M., & Gurgah, F. (2022). Preparation of resveratrol containing poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and investigation of its cytotoxic effect in C6 glioma cells. *J. Pharm. Res*, 26(4), 911-919. <https://doi.org/10.29228/jrp.189>

- Dowding, P. J., Atkin, R., Vincent, B., & Bouillot, P. (2005). Oil core/polymer shell microcapsules by internal phase separation from emulsion droplets. II: Controlling the release profile of active molecules. *Langmuir*, 21(12), 5278-84. <https://doi.org/10.1021/la0470838>
- Du, H., Liu, X., Xie, J., & Ma, F. (2019). Novel deoxyvasicinone–donepezil hybrids as potential multitarget drug candidates for Alzheimer’s disease. *ACS Chem. Neurosci*, 10(5), 2397-407. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00699>
- Ege, D. (2021). Action mechanisms of curcumin in Alzheimer’s disease and its brain targeted delivery. *Materials*, 14(12), 3332. <https://doi.org/10.3390/ma14123332>
- Elsewedy, H. S., Dhubiab, B. E. A., Mahdy, M. A., & Elnahas, H. M. (2020). Development, optimization, and evaluation of PEGylated brucine-loaded PLGA nanoparticles. *Drug delivery*, 27(1), 1134-46. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1797237>
- Erzengin, S., Guler, E., Eser, E., Polat, E. B., Gunduz, O., & Cam, M. E. (2022). In vitro and in vivo evaluation of 3D printed sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds for sublingual delivery of insulin: Preparation, characterization, and pharmacokinetics. *Int. J. Mol. Sci*, 204, 429-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.030>
- Ewaldz, E., & Brettmann, B. (2019). Molecular interactions in electrospinning: from polymer mixtures to supramolecular assemblies. *ACS Appl. Polym. Mater*, 1(3), 298-308. <https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00073>
- Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, X., Liao, W., Jing, X., Lei, M., Tao, E., Ma, Q., Zhang, X., Guo, R., & Liu, J. (2018). Curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles conjugated with B6 peptide for potential use in Alzheimer’s disease. *Drug delivery*, 25(1), 1091-102. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1461955>
- Fang, R., Ye, S., Huangfu, J., & Calimag, D. P. (2017). Music therapy is a potential intervention for cognition of Alzheimer’s Disease: a mini-review. *Transl. Neurodegener*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0073-9>
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano*, 3(1), 16-20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Fogaca, R., & Catalani, L. H. (2013). PVP hydrogel membranes produced by electrospinning for protein release devices. *Soft Materials*, 11(1), 61-8. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2011.580411>
- Foltmann, H., & Quadir, A. (2008). Polyvinylpyrrolidone (PVP)—one of the most widely used excipients in pharmaceuticals: an overview. *Drug Deliv Technol*, 8(6), 22-7.
- Fontana, I. C., Zimmer, A. R., Rocha, A. S., Gosmann, G., Souza, D. O., Lourenco, M. V., Ferreira, S., & Zimmer, E. R. (2020). Amyloid- β oligomers in cellular models of Alzheimer’s disease. *J. Neurochem*, 155(4), 348-69. <https://doi.org/10.1111/jnc.15030>
- Franco, P., & De Marco, I. (2020). The Use of Poly (N-vinyl pyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review. *Polymers*, 12(5), 1114. <https://doi.org/10.3390/polym12051114>

- Fruijtier-Pöllöth, C. (2005). Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, 214(1-2), 1-38. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.001>
- Fu, Y., Chen, C., Li, C., An, Q., Zhang, W., Zhang, Y., & Li, D. Photothermal properties of PLGA/graphene composite nanofiber membrane for potential anti-tumor application. *J. Mol. Struct*, 1275, 134628. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134628>
- Gaaz, T. S., Sulong, A. B., Akhtar, M. N., Kadhum, A. A., Mohamad, A. B., & Al-Amiery, A. A. (2015). Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules*, 20(12), 22833-47. <https://doi.org/10.3390/molecules201219884>
- Gao, C., Xiao, G., & Hu, J. (2014). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell & bioscience*, 4(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-13>
- Gao, Y., Wang, Z.-Y., Zhang, J., Zhang, Y., Huo, H., Wang, T., Jiang, T., & Wang, S. (2014). RVG-peptide-linked trimethylated chitosan for delivery of siRNA to the brain. *Biomacromolecules*, 15(3), 1010-8. <https://doi.org/10.1021/bm401906p>
- Garti, N., & Bisperink, C. (1998). Double emulsions: progress and applications. *Curr Opin Colloid Interface*, 3(6), 657-67. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(98\)80096-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(98)80096-4)
- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D., & Heifets, L. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 172(12), 1487-90. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-613PP>
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci*, 15(3), 3640-59. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Germershaus, O., Lühmann, T., Rybak, J.-C., Ritzer, J., & Meinel, L. (2015). Application of natural and semi-synthetic polymers for the delivery of sensitive drugs. *Int. Mater. Rev*, 60(2), 101-31. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000045>
- Gholizadeh, S., Kamps, J. A., Hennink, W. E., & Kok, R. J. (2018). PLGA-PEG nanoparticles for targeted delivery of the mTOR/PI3kinase inhibitor dactolisib to inflamed endothelium. *Int. J. Pharm*, 548(2), 747-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.032>
- Ghosh, B., & Biswas, S. (2021). Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art. *J Control Release*, 332, 127-47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.016>
- Go, E. J., Kang, E. Y., Lee, S. K., Park, S., Kim, J. H., Park, W., Kim, I. H., Choi, B., & Han, D. K. (2020). An osteoconductive PLGA scaffold with bioactive β -TCP and anti-inflammatory Mg (OH) 2 to improve in vivo bone regeneration. *Biomaterials science*, 8(3), 937-48. <https://doi.org/10.1039/C9BM01864F>

- Grant, J. J., Pillai, S. C., Perova, T. S., Hehir, S., Hinder, S. J., McAfee, M., & Breen, A. (2021). Electrospun fibres of chitosan/PVP for the effective chemotherapeutic drug delivery of 5-fluorouracil. *Chemosensors*, 9(4), 70. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9040070>
- Guler, E., Baripoglu, Y. E., Alenezi, H., Arikan, A., Babazade, R., Unal, S., Duruksu, G., Alfares, F. S., Yazir, Y., Oktar, F. N., Gunduz, O., Edirisinghe, M., & Cam, M. E. (2021). Vitamin D3/vitamin K2/magnesium-loaded polylactic acid/tricalcium phosphate/polycaprolactone composite nanofibers demonstrated osteoinductive effect by increasing Runx2 via Wnt/ β -catenin pathway. *Int. J. Mol. Sci*, 190, 244-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.196>
- Guler, E., Hazar-Yavuz, A. N., Tatar, E., Haidari, M. M., Ozcan, G. S., Duruksu, G., Graça, M. P. F., Kalaskar, D. M., Gunduz, O., & Cam, M. E. (2023). Oral empagliflozin-loaded tri-layer core-sheath fibers fabricated using tri-axial electrospinning: Enhanced in vitro and in vivo antidiabetic performance. *Int. J. Pharm*, 635, 122716. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122716>
- Guler, E., Polat, E. B., & Cam, M. E. (2023). Biomaterials for Neural Tissue Engineering. *Drug delivery systems for neural tissue engineering* (pp. 221-68). Woodhead Publishing Series in Biomaterials. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90554-1.00012-4>
- Gupta, P., & Bansal, A. K. (2005). Spray drying for generation of a ternary amorphous system of celecoxib, PVP, and meglumine. *Pharm Dev Technol*, 10(2), 273-81. <https://doi.org/10.1081/PDT-54460>
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917-33. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hasani, A., Soljakova, M., Jakupi, M., & Ustalar-Ozgen, S. (2011). Preemptive analgesic effects of midazolam and diclofenac in rat model. *J Basic Med Sci*, 11(2), 113. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2011.2593>
- Hecold, M., Buczkowska, R., Mucha, A., Grzesiak, J., Rac-Rumijowska, O., Teterycz, H., & Marycz, K. (2017). The effect of PEI and PVP-stabilized gold nanoparticles on equine platelets activation: Potential application in equine regenerative medicine. *J. Nanomater*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8706921>
- Herman, T. F., & Santos, C. (2019). *First pass effect*. StatPearls Publishing.
- Homayouni, A., Amini, M., Sohrabi, M., Varshosaz, J., & Nokhodchi, A. (2019). Curcumin nanoparticles containing poloxamer or soluplus tailored by high pressure homogenization using antisolvent crystallization. *Int. J. Pharm*, 562, 124-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.038>
- Hou, Z., Zhan, C., Jiang, Q., Hu, Q., Li, L., Chang, D., Yang, X., Wang, Y., Li, Y., Ye, S., Xie, L. & Zhang, Q. (2011). Both FA-and mPEG-conjugated chitosan nanoparticles for

- targeted cellular uptake and enhanced tumor tissue distribution. *Nanoscale Res. Lett.*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-563>
- Hu, L., Shi, Y., Li, J. H., Gao, N., Ji, J., Niu, F., Chen, Q., Yang, X. & Wang, S. (2015). Enhancement of oral bioavailability of curcumin by a novel solid dispersion system. *Aaps Pharmscitech*, 16(6), 1327-1334. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0254-0>
- Hu, M., Li, C., Li, X., Zhou, M., Sun, J., Sheng, F., Shi, S. & Lu, L. (2018). Zinc oxide/silver bimetallic nanoencapsulated in PVP/PCL nanofibres for improved antibacterial activity. *Artif. Cells Nanomed.*, 46(6), 1248-57. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1366339>
- Huang, H.-C., Xu, K., & Jiang, Z.-F. (2012). Curcumin-mediated neuroprotection against amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction involves the inhibition of GSK-3 β . *J Alzheimers Dis.*, 32(4), 981-96. <https://doi.org/10.3390/ma14123332>
- Huang, L., Liu, Y., Sang, X., Song, J., Hu, P., & Liu, Y. (2021). Preparation of Alum-borneol-PVP drug-loaded fibers by electrospinning. *Chem. Res. Chin. Univ.*, 37, 411-8. <https://doi.org/10.1007/s40242-020-0225-9>
- Huang, M., Hu, M., Song, Q., Song, H., Huang, J., Gu, X., Wang, X., Chen, J., Kang, T., Feng, X., Jiang, D., Zheng, G., Chen, H. & Gao, X.. (2015). GM1-Modified Lipoprotein-like Nanoparticle: Multifunctional Nanoplatfrom for the Combination Therapy of Alzheimer's Disease. *ACS Nano*, 9(11), 10801-10816. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03124>
- Ibraheem, D., Fessi, H., & Elaissari, A. (2013). DNA encapsulation via double emulsion like process. *J. Colloid Sci.*, 2(4), 328-333. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2013.1060>
- Inestrosa, N. C., & Toledo, E. M. (2008). The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.*, 3(9), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-9>
- Ismail, E., Sabry, D., Mahdy, H., & Khalil, M. (2014). Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1, 10-phenanthroline and their Anticancer Applications. *J. Sci. Res.*, 6(3). <https://doi.org/10.3329/jsr.v6i3.18750>
- Jahromi, L. P., Ghazali, M., Ashrafi, H., & Azadi, A. (2020). A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles. *Heliyon*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03451>
- Jämsä, A., Hasslund, K., Cowburn, R. F., Bäckström, A., & Vasänge, M. (2004). The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319(3), 993-1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.075>
- Jaroonwitchawan, T., Chaicharoenaudomrung, N., Namkaew, J., & Noisa, P. (2017). Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. *Neuroscience letters*, 636, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.050>

- Javed, R., Zia, M., Naz, S., Aisida, S. O., Ain, N. u., & Ao, Q. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. *J. Nanobiotechnology.*, 18, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00704-4>
- Jia, L., Piña-Crespo, J., & Li, Y. (2019). Restoring Wnt/ β -catenin signaling is a promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 12(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0525-5>
- Jose, S., Sowmya, S., Cinu, T., Aleykutty, N., Thomas, S., & Souto, E. (2014). Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 63, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.06.024>
- Julinova, M., Kupec, J., Slavik, R., & Vaskova, M. (2013). Initiating biodegradation of polyvinylpyrrolidone in an aqueous aerobic environment: technical note/Zainicjowanie Biodegradacji Poliwinylpirolidonu W Środowisku Wodno-Tlenowym: Notatki Techniczne. *Ecol. Chem. Eng. S.*, 20(1), 199-208. <https://doi.org/10.2478/eces-2013-0015>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.*, 12(25). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kapoor, D. N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., & Dhawan, S. (2015). PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic delivery*, 6(1), 41-58. <https://doi.org/10.4155/tde.14.91>
- Kaur, A., Nigam, K., Bhatnagar, I., Sukhpal, H., Awasthy, S., Shankar, S., Tyaki, A. & Dang, S. (2020). Treatment of Alzheimer's diseases using donepezil nanoemulsion: An intranasal approach. *Drug Deliv. Transl. Res.* 10, 1862-1875. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00754-z>
- Ke, C.-J., Lin, Y.-J., Hu, Y.-C., Chiang, W.-L., Chen, K.-J., Yang, W.-C., Hao-Li, L., & Fu, C. (2012). Multidrug release based on microneedle arrays filled with pH-responsive PLGA hollow microspheres. *Biomaterials*, 33(20), 5156-5165. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.056>
- Kim, J., & De Jesus, O. (2021). *Medication routes of administration*. StatPearls Publishing.
- Kirtane, A. R., Verma, M., Karandikar, P., Furin, J., Langer, R., & Traverso, G. (2021). Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nature Nanotechnology*, 16(4), 369-384. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00866-8>
- Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Ogura, Y., & Matsuda, S. (2014). Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 6(35), 1-7. <https://doi.org/10.1186/alzrt265>

- Klenerova, V., Krejci, I., Sida, P., Hlinak, Z., & Hynie, S. (2009). Oxytocin and carbetocin effects on spontaneous behavior of male rats: modulation by oxytocin receptor antagonists. *Neuro Endocrinol Lett*, 30(3), 335-342.
- Kocaadam, B., & Şanlier, N. (2017). Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57(13), 2889-2895. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>
- Kosel, F., Pelley, J. M., & Franklin, T. B. (2020). Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 112, 634-647. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.02.012>
- Kurakula, M., & Rao, G. K. (2020). Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 60, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102046>
- Labban, S., Alghamdi, B. S., Alshehri, F. S., & Kurdi, M. (2021). Effects of melatonin and resveratrol on recognition memory and passive avoidance performance in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.*, 402, 113100. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113100>
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Pérez, M. H., Lehr, C.-M., Hoffman, M., & Maincent, P. (2000) Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *Int. J. Pharm.*, 196(2), 177-82. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00422-6](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00422-6)
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2001). The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurochem.*, 21(21), 8370-7. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08370.2001>
- Lingappa, S., Shivakumar, M. S., Manivasagam, T., Somasundaram, S. T., & Seedeve, P. (2021). Neuroprotective effect of epalrestat on hydrogen peroxide-induced neurodegeneration in SH-SY5Y cellular model. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(6), 867. <https://doi.org/10.4014/jmb.2101.01002>
- Liu, Y., Chen, X., Yu, D.-G., Liu, H., Liu, Y., & Liu, P. (2021). Electrospun PVP-core/PHBV-shell fibers to eliminate tailing off for an improved sustained release of curcumin. *Mol. Pharmaceutics.*, 18(11), 4170-4178. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00559>
- Lochhead, J. J., Yang, J., Ronaldson, P. T., & Davis, T. P. (2020). Structure, function, and regulation of the blood-brain barrier tight junction in central nervous system disorders. *Front Physiol.*, 11, 914. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00914>
- Lou, J., Zhang, L., & Zheng, G. (2019). Advancing cancer immunotherapies with nanotechnology. *Adv. Ther.*, 2(4), 1800128. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800128>

- Lueptow, L. M. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J Vis Exp*, 126. <https://doi.org/10.3791/55718>
- Luo, C., Stoyanov, S. D., Stride, E., Pelan, E., & Edirisinghe, M. (2012). Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. *Chem Soc Rev.*, 41(13), 4708-4735. <https://doi.org/10.1039/c2cs35083a>
- Lü, J.-M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P. H., Yao, Q. & Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 9(4), 325-41. <https://doi.org/10.1586/erm.09.15>
- Lv, H., Wang, Y., Yang, X., Ling, G., & Zhang, P. (2023). Application of curcumin nanoformulations in Alzheimer's disease: prevention, diagnosis and treatment. *Nutr Neurosci.*, 26(8), 727-42. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2022.2084550>
- Mabrouk, M., Das, D. B., Salem, Z. A., & Beherei, H. H. (2021). Nanomaterials for biomedical applications: production, characterisations, recent trends and difficulties. *Molecules*, 26(4), 1077. <https://doi.org/10.3390/molecules26041077>
- Mahalingam, S., Huo, S., Homer-Vanniasinkam, S., & Edirisinghe, M. (2020). Generation of core-sheath polymer nanofibers by pressurised gyration. *Polymers*, 12(8), 1709. <https://doi.org/10.3390/polym12081709>
- Mahdi, O., Baharuldin, M. T. H., Nor, N. H. M., Chiroma, S. M., Jagadeesan, S., & Moklas, M. A. M. (2019). Chemicals used for the induction of Alzheimer's disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomed. Res. Ther.*, 6(11), 3460-3484. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i11.575>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Malik, M. Y., Jaiswal, S., Sharma, A., Shukla, M., & Lal, J. (2016). Role of enterohepatic recirculation in drug disposition: cooperation and complications. *Drug Metab. Rev.*, 48(2), 281-327. <https://doi.org/10.3109/03602532.2016.1157600>
- Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2), 661. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>
- Martins, C., Sousa, F., Araujo, F., & Sarmiento, B. (2018). Functionalizing PLGA and PLGA derivatives for drug delivery and tissue regeneration applications. *Adv. Healthc. Mater.*, 7(1), 1701035. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701035>
- Martins, R. M., Pereira, S. V., Siqueira, S., Salomão, W. F., & Freitas, L. A. P. (2013). Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. *Food Res. Int.*, 50(2), 657-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.030>

- McHugh, A., Graham, P., & Brodbeck, K. (1998). Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. *Mater Res Soc Symp Proc.*, 58(2), 233-245. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(98\)00158-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(98)00158-8)
- Md, S., Gan, S. Y., Haw, Y. H., Ho, C. L., Wong, S., & Choudhury, H. (2018). In vitro neuroprotective effects of naringenin nanoemulsion against β -amyloid toxicity through the regulation of amyloidogenesis and tau phosphorylation. *Int. J. Mol. Sci.*, 118, 1211-1219. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.190>
- Menting, K. W., & Claassen, J. A. (2014). β -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Front. aging neurosci.*, 6, 165. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00165>
- Mishra, R. K., Datt, M., & Banthia, A. K. (2008). Synthesis and characterization of pectin/PVP hydrogel membranes for drug delivery system. *Aaps Pharmscitech*, 9(2), 395-403. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9048-6>
- Mishra, S., & Palanivelu, K. (2008). The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*, 11(1), 13-9. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.40220>
- Moghaddam, S. P. H., Mohammadpour, R., & Ghandehari, H. (2019). In vitro and in vivo evaluation of degradation, toxicity, biodistribution, and clearance of silica nanoparticles as a function of size, porosity, density, and composition. *J Control Release.*, 311-312, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.028>
- Mohabe, V., Akhand, R., & Pathak, A. K. (2011). Preparation and evaluation of captopril transdermal patches. *Bull. Pharm. Res.*, 1(2), 47-52.
- Mohandas, E., Rajmohan, V., & Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry.*, 51(1), 55. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.44908>
- Moja, T., Mishra, S., & Mishra, A. (2021). Conductive polymer-based nanocomposites for the removal of hexavalent chromium and trivalent arsenic from wastewater solution. In Kalia, S. (Eds). *Natural Polymers-Based Green Adsorbents for Water Treatment*. (pp. 243-66). Elsevier. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04477-0_8
- Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., & Ingle, T. (2019). Characterization of nanomaterials: Tools and challenges. *Nanomaterials for food applications*, 313-353. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>
- Mustafa Rizvi, S. H., Parveen, A., Verma, A. K., Ahmad, I., Arshad, M., & Mahdi, A. A. (2014). Aluminium induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53. *PLoS One*, 9(5), e98409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098409>
- Namazi, H. (2017). Polymers in our daily life. *Bioimpacts*, 7(2), 73-4. <https://doi.org/10.15171/bi.2017.09>

- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). *An introduction to nanotechnology*. Interface Sci. Technol. (pp. 1-27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>
- Needham, D., McIntosh, T., & Lasic, D. (1992). Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1108(1), 40-8. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00197-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00197-4)
- Nibha, K. P., & Pancholi, S. (2012). An overview on: Sublingual route for systemic drug delivery. *Intra-oral Spray Technology*, 3(2).
- Noor, N. A., Hosny, E. N., Khadrawy, Y. A., Mourad, I. M., Othman, A. I., Aboul Ezz, H. S. & Mohammed, H. S. (2022). Effect of curcumin nanoparticles on streptozotocin-induced male Wistar rat model of Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.*, 37(2), 343-57. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00897-z>
- Nordquist, R. E., Meijer, E., van der Staay, F. J., & Arndt, S. S. (2017). *Pigs as model species to investigate effects of early life events on later behavioral and neurological functions*. In, P. Michael Conn (Ed), *Animal models for the study of human disease*. (pp. 1003-1030). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00039-5>
- Noureddin, S. A., El-Shishtawy, R. M., & Al-Footy, K. O. (2019). Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs. *Eur. J. Med. Chem.*, 182, 111631. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111631>
- Okoro, G. U. (2020). *Alcohol and micronutrient-induced regulation of A β load and Tau hyperphosphorylation through modulation of mitochondrial fusion/fission pathways*. University of the West of England,.
- Olajide, O. J., Suvanto, M. E., & Chapman, C. A. (2021). Molecular mechanisms of neurodegeneration in the entorhinal cortex that underlie its selective vulnerability during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biology Open*, 10(1), bio056796. <https://doi.org/10.1242/bio.056796>
- Özdemir, Z., & Karakurt, A. (2016). İlaç metabolizması ve farmasötik kimyada önemi. *Ann. med. health sci. res.*, 5(2), 35-46.
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.*, 13(7), 812-8. <https://doi.org/10.1038/nn.2583>
- Papadimitriou, S. A., Achilias, D. S., & Bikiaris, D. N. (2012). Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly (glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 430(1-2), 318-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.004>
- Park, H. S., Pang, Q. Q., Kim, Y. S., Kim, J. H., & Cho, E. J. (2021). Neuroprotective effect of membrane-free stem cell extract against amyloid beta 25–35-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Appl. Sci.*, 11(5), 2219. <https://doi.org/10.3390/app11052219>

- Park, J., Won, J., Seo, J., Yeo, H.-G., Kim, K., Kim, Y. G., Huh, J.W., Lee, S. R., Lee, D. S. & Lee, Y. (2020). Streptozotocin induces Alzheimer's disease-like pathology in hippocampal neuronal cells via CDK5/Drp1-mediated mitochondrial fragmentation. *Front. cell.*, 14, 235. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00235>
- Patil, M., Gamit, N., Dharmarajan, A., Sethi, G., & Warriar, S. (2023). Identification of a Novel Wnt Antagonist Based Therapeutic and Diagnostic Target for Alzheimer's Disease Using a Stem Cell-Derived Model. *Bioengineering*, 10(2), 192. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020192>
- Pelley, J. W. (2011). *Elsevier's Integrated Review Biochemistry E-Book: with Student Consult Online Access*. Elsevier.
- Pentkowski, N. S., Rogge-Obando, K. K., Donaldson, T. N., Bouquin, S. J., & Clark, B. J. (2021). Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 127, 647-58. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.05.005>
- Pereira, E. D., Cerruti, R., Fernandes, E., Peña, L., Saez, V., Pinto, J. C., Ramon, J., Oliveira, G., Souza, F.G. (2016). Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros*, 26, 137-43. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2323>
- Prakash, J., Prasad, V. V., & Claret, A. (2022). Rivastigmine Loaded PEG-PLGA Nanoparticles for Enhanced Delivery to the Brain: In-Vitro and In-Vivo Studies for Alzheimer's disease. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1433109/v1>
- Price, G., & Patel, D. A. (2020). *Drug bioavailability*. StatPearls Publishing.
- Prosapio, V., De Marco, I., & Reverchon, E. (2016). PVP/corticosteroid microspheres produced by supercritical antisolvent coprecipitation. *J. Chem. Eng.*, 292, 264-75. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.02.041>
- Qiao, L., Coveny, P. K., & Easteal, A. J. (2002). Modifications of poly (vinyl alcohol) for use in poly (vinyl acetate) emulsion wood adhesives. *Pigment Resin Technol.*, 31(2), 88-95. <https://doi.org/10.1108/03699420210420378>
- Raheja, S., Girdhar, A., Kamboj, A., Lather, V., & Pandita, D. J. (2021). Protective effect of Dalbergia sissoo extract against amyloid- β (1-42)-induced memory impairment, oxidative stress, and neuroinflammation in rats. *Turk J Pharm Sci.*, 18(1), 104. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.04379>
- Rahman, S. O., Panda, B. P., Parvez, S., Kaundal, M., Hussain, S., Akhtar, M. & Najmi, A.K. (2019). Neuroprotective role of astaxanthin in hippocampal insulin resistance induced by A β peptides in animal model of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother.*, 110, 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.043>
- Ramalingam, V., Varunkumar, K., Ravikumar, V., & Rajaram, R. (2018). Target delivery of doxorubicin tethered with PVP stabilized gold nanoparticles for effective treatment of lung cancer. *Sci. Rep.*, 8(1), 3815. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22172-5>

- Rane, A. V., Kanny, K., Abitha, V., & Thomas, S. (2018). Methods for synthesis of nanoparticles and fabrication of nanocomposites. *Inorg. Nano-Met.*, 121-39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101975-7.00005-1>
- Ranjan, V. D., Qiu, L., Tan, E. K., Zeng, L., & Zhang, Y. (2018). Modelling Alzheimer's disease: Insights from in vivo to in vitro three-dimensional culture platforms. *J Tissue Eng Regen Med.*, 12(9), 1944-58. <https://doi.org/10.1002/term.2728>
- Rao, Y. L., Ganaraja, B., Murlimanju, B., Joy, T., Krishnamurthy, A., & Agrawal, A. (2022). Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *Biotech*, 12(2), 55. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>
- Rasekh, M., Karavasili, C., Soong, Y. L., Bouropoulos, N., Morris, M., Armitage, D., Li, X., Fatouros, D.G. & Ahmad, Z. (2014). Electrospun PVP-indomethacin constituents for transdermal dressings and drug delivery devices. *Int. J. Pharm.*, 473(1-2), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.059>
- Rashno, M., Gholipour, P., Salehi, I., Komaki, A., Rashidi, K., Khoshnam, S. E. & Ghaderi, S. (2022). p-Coumaric acid mitigates passive avoidance memory and hippocampal synaptic plasticity impairments in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rat model. *J. Funct. Foods.*, 2022; 94, 105117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105117>
- Rawas-Qalaji, M. M., Simons, F. E. R., & Simons, K. J. (2007). Fast-disintegrating sublingual epinephrine tablets: effect of tablet dimensions on tablet characteristics. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 33(5), 523-30. <https://doi.org/10.1080/03639040600897150>
- Ribeiro, T. d. C., Sábio, R. M., Luiz, M. T., de Souza, L. C., Fonseca-Santos, B., Cides da Silva, L. C., Fantini, M.C.A., Planeta, C.S. & Chorilli, M. (2022). Curcumin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles Dispersed in Thermo-Responsive Hydrogel as Potential Alzheimer Disease Therapy. *Pharmaceutics*, 14(9), 1976. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091976>
- Rickerby, D., & Morrison, M. (2007). Nanotechnology and the environment: A European perspective. *Sci Technol Adv Mate.*, 8(1-2), 19. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2006.10.002>
- Roser, M., Fischer, D., & Kissel, T. (1998). Surface-modified biodegradable albumin nano-and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46(3), 255-63. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00038-1)
- Roy, S., & Rhim, J.-W. (2020). Preparation of antimicrobial and antioxidant gelatin/curcumin composite films for active food packaging application. *Colloids Surf.*, 188, 110761. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110761>
- Sadeghi-Ghadi, Z., Behjou, N., Ebrahimnejad, P., Mahkam, M., Goli, H. R., Lam, M., Nokhodchi, A. (2023). Improving antibacterial efficiency of curcumin in magnetic polymeric nanocomposites. *J. Pharm. Innov.*, 18(1), 13-28. <https://doi.org/10.1007/s12247-022-09619-z>

- Sadozai, S. K., Khan, S. A., Karim, N., Becker, D., Steinbrück, N., Gier, S., Baseer, A., Breinig, F., Kickelbick, G. & Schneider, M. (2020). Ketoconazole-loaded PLGA nanoparticles and their synergism against *Candida albicans* when combined with silver nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 56(5), 101574. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101574>
- Sánchez-López, E., Ettcheto, M., Egea, M. A., Espina, M., Cano, A., Calpena, A. C., Camins, A., Carmona, N., Silva, A.M., Souto, E.B. & García, M.L. (2018). Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer's disease: In vitro and in vivo characterization. *J. Nanobiotechnology.*, 16, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0356-z>
- Sarker, M. S., Barman, R. K., Ali, M. A., Noguchi, S., Iwao, Y., Itai, S. & Wahed, M.I.I. (2018). Formulation development and in-vivo evaluation of atorvastatin calcium solid dispersion in streptozotocin induced diabetic mice. *Pharm. Pharmacol.*, 9(09), 395-414. <https://doi.org/10.4236/pp.2018.99030>
- Saxena, A., Mozumdar, S., & Johri, A. K. (2006). Ultra-low sized cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles as non-viral vectors for in vivo gene delivery. *Biomaterials*, 27(32), 5596-602. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.029>
- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K., & Schuchmann, H. P. (2013). Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. *J Colloid Interface Sci.*, 402, 157-64. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.03.066>
- Sharif, Y., Jumah, F., Coplan, L., Krosser, A., Sharif, K., & Tubbs, R. S. (2018). Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clin. Anat.*, 31(6), 812-23. <https://doi.org/10.1002/ca.23083>
- Sharma, S., Johnson, R. W., & Desai, T. A. (2004). XPS and AFM analysis of antifouling PEG interfaces for microfabricated silicon biosensors. *Biosens Bioelectron.*, 20(2), 227-39. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.01.034>
- Sharma, S., Sharma, N., Saini, A., & Nehru, B. (2019). Carbenoxolone reverses the amyloid beta 1–42 oligomer-induced oxidative damage and anxiety-related behavior in rats. *Neurotox. Res.*, 35, 654-67. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9975-2>
- Sharma, V., & Pathak, K. (2016). Effect of hydrogen bond formation/replacement on solubility characteristics, gastric permeation and pharmacokinetics of curcumin by application of powder solution technology. *Acta Pharm. Sin. B.*, 6(6), 600-13. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.015>
- Shi, R. Polyethylene glycol repairs membrane damage and enhances functional recovery: a tissue engineering approach to spinal cord injury. (2013). *Neurosci. Bull.*, 29, 460-6. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1364-5>
- Shu, T., Liu, C., Pang, M., He, L., Yang, B., Fan, L., Zhang, S., Wang, X., Liu, B. & Rong, L. (2018). Salvianolic acid B promotes neural differentiation of induced pluripotent stem

- cells via PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin pathway. *Neurosci. Lett.*, 671, 154-60. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.007>
- Siddiqui, N., Ali, J., Parvez, S., Zameer, S., Najmi, A. K., & Akhtar, M. (2021). Linagliptin, a DPP-4 inhibitor, ameliorates A β (1–42) peptides induced neurodegeneration and brain insulin resistance (BIR) via insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 195, 108662. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108662>
- Siepmann, J., Elkharraraz, K., Siepmann, F., & Klose, D. (2005). How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. *Biomacromolecules*, 6(4), 2312-2319. <https://doi.org/10.1021/bm050228k>
- Silva-Abreu, M., Calpena, A. C., Andrés-Benito, P., Aso, E., Romero, I. A., Roig-Carles, D., Gromnicova, R., Espina, M., Ferrer, I., García, M.L. & Male, D. (2018). PPAR γ agonist-loaded PLGA-PEG nanocarriers as a potential treatment for Alzheimer's disease: In vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine.*, 13, 5577-90. <https://doi.org/10.2147/IJN.S171490>
- Singh, G., Kaur, T., Kaur, R., & Kaur, A. (2014). Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 1(2), 30-42.
- Siva, V., Vanitha, D., Murugan, A., Shameem, A., & Bahadur, S. A. (2021). Studies on structural and dielectric behaviour of PVA/PVP/SnO nanocomposites. *CompComm.*, 23, 100597. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100597>
- Song, J., Kim, M., & Lee, H. (2020). Recent Advances on nanofiber fabrications: Unconventional state-of-the-art spinning techniques. *Polymers*, 12(6), 1386. <https://doi.org/10.3390/polym12061386>
- Song, Y., Zhang, T., Song, X., Zhang, L., Zhang, C., Xing, J. & Liang, X. (2015). Polycations with excellent gene transfection ability based on PVP-g-PDMAEMA with random coil and micelle structures as non-viral gene vectors. *J Mater Chem B.*, 3(5), 911-8. <https://doi.org/10.1039/C4TB01754D>
- Sridhar, V., Gaud, R., Bajaj, A., & Wairkar, S. (2018). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasally administered selegiline nanoparticles with improved brain delivery in Parkinson's disease. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.*, 14(8), 2609-18. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.004>
- Suave, J., José, H. J., & Moreira, R. d. F. P. M. (2018). Photocatalytic degradation of polyvinylpyrrolidone in aqueous solution using TiO₂/H₂O₂/UV system. *Environ. Technol.*, 39(11), 1404-12. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1330365>
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 99, 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>

- Sun, S.-B., Liu, P., Shao, F.-M., & Miao, Q.-L. (2015). Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *Int J Clin Exp Med.*, 8(10), 19670-19681.
- Suthprasertporn, N., Mingchinda, N., Fukunaga, K., & Thangnipon, W. (2020). Neuroprotection of SAK3 on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Cytotechnology*, 72, 155-64. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00366-7>
- Suzuki, T., Ichihara, M., Hyodo, K., Yamamoto, E., Ishida, T., Kiwada, H., Ishihara, H. & Kikuchi, H. (2012). Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes containing doxorubicin upon repeated administration to dogs. *Int. J. Pharm.*, 436(1-2), 636-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.049>
- Szczęch, M., & Szczepanowicz, K. (2020). Polymeric core-shell nanoparticles prepared by spontaneous emulsification solvent evaporation and functionalized by the layer-by-layer method. *Nanomaterials*, 10(3), 496. <https://doi.org/10.3390/nano10030496>
- Şenel, S., & Comoglu, T. (2018). Orally disintegrating tablets, fast-dissolving, buccal and sublingual formulations. *Pharm Dev Technol.*, 23, 431. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1462471>
- Talevi, A., & Quiroga, A. (2018). *ADME processes in pharmaceutical sciences*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99593-9>
- Tan, H.-L., Kai, D., Pasbakhsh, P., Teow, S.-Y., Lim, Y.-Y., & Pushpamalar, J.(2020). Electrospun cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol (CAB/PEG) composite nanofibers: A potential scaffold for tissue engineering. *Colloids Surf.* 188, 110713. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110713>
- Tan, M. A., Gonzalez, S. J. B., Alejandro, G. J. D., & An, S. S. A. (2020). Neuroprotective effects of vomifoliol, isolated from *Tarenna obtusifolia* Merr.(Rubiaceae), against amyloid-beta 1-42-treated neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biotech*, 10, 1-6. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02421-z>
- Tang, M., & Taghibiglou, C. (2017). The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 58(4), 1003-16. <https://doi.org/10.3233/JAD-170188>
- Tiwari, S. K., Agarwal, S., Seth, B., Yadav, A., Nair, S., Bhatnagar, P., Karmakar, M., Kumari, M., Chauhan, L.K.S., Patel, D.K., Srivastava, V., Singh, D., Gupta, S.K., Tripathi, A., Chaturvedi, R.K. & Gupta, K.C. (2014). Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/ β -catenin pathway. *ACS nano*, 8(1). <https://doi.org/10.1021/nn405077y>
- Topal, F., Ertas, B., Guler, E., Gurbuz, F., Ozcan, G. S., Aydemir, O., Bocekci, V.G., Duruksu, G., Sahin Cam, C., Yazir, Y., Gunduz, O. & Cam, M.E. (2022). A novel multi-target strategy for Alzheimer's disease treatment via sublingual route:

- donepezil/memantine/curcumin-loaded nanofibers. *Biomaterials Advances*, 138, 212870. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212870>
- Tort, S., Yıldız, A., Tuğcu-Demiröz, F., Akca, G., Kuzukıran, Ö., & Acartürk, F. (2019). Development and characterization of rapid dissolving ornidazole loaded PVP electrospun fibers. *Pharm. Dev. Technol.*, 24(7), 864-73. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1615088>.
- Tzeng, C.-Y., Lee, W.-S., Liu, K.-F., Tsou, H.-K., Chen, C.-J., Peng, W.-H. & Jen-Chieh, T. (2022). Allantoin ameliorates amyloid β -peptide-induced memory impairment by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 153, 113389. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113389>
- Ul Hassan, N., Chaudhery, I., & Ahmed, N. (2021). Polymeric nanoparticles used in tissue engineering. *Adv Polym Sci.*, 191-224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814657-6.00005-7>
- Ulbricht, J., Jordan, R., & Luxenhofer, R. (2014). On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly (2-oxazoline) s. *Biomaterials*, 35(17), 4848-61. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.029>
- Vakilinezhad, M. A., Amini, A., Dara, T., & Alipour, S. (2019). Methotrexate and Curcumin co-encapsulated PLGA nanoparticles as a potential breast cancer therapeutic system: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surf.*, 184, 110515. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110515>
- Valuckaite, V., Seal, J., Zaborina, O., Tretiakova, M., Testa, G., & Alverdy, J. C. (2013). High molecular weight polyethylene glycol (PEG 15-20) maintains mucosal microbial barrier function during intestinal graft preservation. *J Surg Res.*, 183(2), 869-75. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.035>
- Van Nong, H., Hung, L. X., Thang, P. N., Chinh, V. D., Dung, P. T., Van Trung, T. & Pham, T. (2016). Fabrication and vibration characterization of curcumin extracted from turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes of the northern Vietnam. *Springerplus*, 5(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2812-2>
- Vanharova, L., Julinova, M., & Slavik, R. (2017). PVP based materials: biodegradation in different environments. *Ecol. Chem. Eng. S.*, 24(2), 299-309. <https://doi.org/10.1515/eces-2017-0021>
- Vedagiri, A., & Thangarajan, S. (2016). Mitigating effect of chrysin loaded solid lipid nanoparticles against Amyloid β 25–35 induced oxidative stress in rat hippocampal region: An efficient formulation approach for Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 58, 111-25. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.03.002>
- Vega, E., Egea, M. A., Calpena, A. C., Espina, M., & García, M. L. (2012). Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA–PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *Int J Nanomedicine.*, 1357-71. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28481>

- Verma, P., Thakur, A., Deshmukh, K., Jha, A., & Verma, S. (2010). Routes of drug administration. *Int. J. Pharm. Res.*, 1(1), 54-9.
- Veysanoglu, S., Ertas, B., Guler, E., Topal, F., Ozcan, G. S., Duruksu, G., Ece, B., Sahin Cam, C., Aydemir, O. & Cam, M.E. (2023). In vitro and in vivo evaluation of multi-target-directed Rivastigmine/Memantine/Ginkgo biloba-loaded nanofibers against Alzheimer's disease. *J Drug Deliv Sci Technol.*, 104691. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4376487>
- Voulgaropoulou, S., Van Amelsvoort, T., Prickaerts, J., & Vingerhoets, C. (2019). The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: A systematic review of pre-clinical and clinical studies. *Brain research*, 1725, 146476. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146476>
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307-44. <https://doi.org/10.3390/ma2020307>
- Waleka, E., Stojek, Z., & Karbarz, M. (2021). Activity of povidone in recent biomedical applications with emphasis on micro-and nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 13(5), 654. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050654>
- Wang, F., Sun, Z., Yin, J., & Xu, L. (2019). Preparation, characterization and properties of porous PLA/PEG/Curcumin composite nanofibers for antibacterial application. *Nanomaterials*, 9(4), 508. <https://doi.org/10.3390/nano9040508>
- Wei, W., Yao, J.-x., Zhang, T.-t., Wen, J.-y., Zhang, Z., Luo, Y.-m., Yu, C. & Hao, L. (2023). Network pharmacology reveals that Berberine may function against Alzheimer's disease via the AKT signaling pathway. *Front Cell Neurosci*, 17, 1059496. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1059496>
- Williams, M., McCarthy, D., Foster, A., Yednock, S. F., Rydel, R., Messersmith, E., & Tuttle, R. (2007). Central nervous system, pain, metabolic syndrome, urology, gastrointestinal and cardiovascular.
- Wlodarski, K., Tajber, L., & Sawicki, W. (2016). Physicochemical properties of direct compression tablets with spray dried and ball milled solid dispersions of tadalafil in PVP-VA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 109, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.09.011>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct. Target.*, 8(1), 217. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Wu, K., Li, J., Wang, W., & Winstead, D. A. (2009). Formation and characterization of solid dispersions of piroxicam and polyvinylpyrrolidone using spray drying and precipitation with compressed antisolvent. *J. Pharm. Sci.* 98(7), 2422-31. <https://doi.org/10.1002/jps.21598>

- Wu, L., Zhang, J., Jing, D., & Ding, J. (2006). "Wet-state" mechanical properties of three-dimensional polyester porous scaffolds. *J Biomed Mater.* 76(2), 264-71. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30544>
- Xie, H.-r., Hu, L.-s., & Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.* 123(08), 1086-92. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021>
- Xie, H., Ma, L., Li, Y., Fu, J., Li, Z., Yu, X. & Gao, Q. (2022). Preparation and Characterizations of Curcumin Protection and Delivery System Using Linear Dextrin. *Compounds*, 2(4), 353-66. <https://doi.org/10.3390/compounds2040029>
- Yadang, F. S. A., Nguézeye, Y., Kom, C. W., Betote, P. H. D., Mamat, A., Tchokouaha, L. R. Y., Taiwé, G.S., Agbor, G. & Bum, E.N. (2020) Scopolamine-induced memory impairment in mice: neuroprotective effects of *Carissa edulis* (Forssk.) Valh (Apocynaceae) aqueous extract. *J. Alzheimer's Dis.* <https://doi.org/10.1155/2020/6372059>
- Yang, C., Gao, S., Dagnæs-Hansen, F., Jakobsen, M., & Kjems, J. (2017). Impact of PEG chain length on the physical properties and bioactivity of PEGylated chitosan/siRNA nanoparticles in vitro and in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9(14), 12203-16. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16556>
- Yang, H., Zeng, F., Luo, Y., Zheng, C., Ran, C., & Yang, J. (2022). Curcumin scaffold as a multifunctional tool for Alzheimer's disease research. *Molecules*, 27(12), 3879. <https://doi.org/10.3390/molecules27123879>
- Yang, M., Jin, L., Wu, Z., Xie, Y., Zhang, P., Wang, Q., Yan, S., Chen, B., Liang, H., Naman, B., Zhang, J., He, S., Yan, X., Zhao, L. & Cui, W. (2021). PLGA-PEG nanoparticles facilitate in vivo anti-Alzheimer's effects of fucoxanthin, a marine carotenoid derived from edible brown algae. *J. Agric. Food Chem.*, 69(34), 9764-77. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00569>
- Dogan, M., M Kocyigit, U., Cetin, F., Yilmaz, B. & Taşkin, T. (2023). Composition characterization and biological activity study of achillea vermicularis extract and extract-loaded nanoparticles. *Biotechnol Appl Biochem.*, 70(3):1270-1278. <https://doi.org/10.1002/bab.2437>
- Yoon, J. J., & Park, T. G. (2001). Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55(3), 401-8. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010605\)55:3<401::aid-jbm1029>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010605)55:3<401::aid-jbm1029>3.0.co;2-h)
- Yu, D., Shen, X., Zhang, X., Branford-White, C., & Zhu, L. (2009). Preparation and characterization of fast-dissolving electrospun drug-loaded nanofiber membrane. *Acta Polymerica Sinica*, 11, 88-92. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1105.2009.01170>

- Yu, D. G., Zhang, X. F., Shen, X. X., Brandford-White, C., & Zhu, L. M. (2009). Ultrafine ibuprofen-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats using electrospinning. *Polym. Int.*, 58(9). <https://doi.org/10.1002/pi.2629>
- Yu, Y., Zhang, L., Li, X., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, Y., H. Lee, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Vocadlo, D., Liu, F. & Gong, C. (2012). Differential effects of an O-GlcNAcase inhibitor on tau phosphorylation. *PloS one*, 7(4), e35277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035277>
- Zakeri-Milani, P., Loveymi, B. D., Jelvehgari, M., & Valizadeh, H. (2013). The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids Surf.*, 103, 174-81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.021>
- Zarifkar, A. H., Zarifkar, A., Nami, M., Rafati, A., Aligholi, H., & Vafae, F. (2019). Ameliorative effects of different transcranial electrical stimulation paradigms on the novel object recognition task in a rat model of Alzheimer disease. *Galen Med. J.*, 8, e1440. <https://doi.org/10.31661/gmj.v8i0.1440>
- Zhang, K., Tang, X., Zhang, J., Lu, W., Lin, X., Zhang, Y., Tian, B., Yang, H. & He, H. (2014). PEG–PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications. *J Control Release*, 183, 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.026>
- Zhang, L., & Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano today*, 4(1), 66-80. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.014>
- Zhang, L., Yang, S., Wong, L. R., Xie, H., & Ho, P. C.-L. (2020). In vitro and in vivo comparison of curcumin-encapsulated chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and curcumin/hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complexes administered intranasally as therapeutic strategies for Alzheimer's Disease. *Mol Pharm.*, 17(11). <https://doi.org/4256-69.10.1021/acs.molpharmaceut.0c00675>
- Zhang, R.-y., Zhang, X., Zhang, L., Wu, Y.-c., Sun, X.-j., & Li, L. (2021). Tetrahydroxystilbene glucoside protects against sodium azide-induced mitochondrial dysfunction in human neuroblastoma cells. *Chin. Herb. Med.*, 13(2), 255-60. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.11.007>
- Zhang, Y.-w., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.*, 4, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhao, Y., Gan, L., Ren, L., Lin, Y., Ma, C., & Lin, X. (2022). Factors influencing the blood-brain barrier permeability. *Brain Res.*, 1788, 147937. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147937>
- Zheng, X., Zhang, T., Song, X., Zhang, L., Zhang, C., Jin, S., Xing, J. & Liang, X. (2015). Structural impact of graft and block copolymers based on poly (N-vinylpyrrolidone) and

poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate) in gene delivery. *J Mater Chem B*, 3(19), 4027-35. <https://doi.org/10.1039/C4TB01956C>

Zhi, K., Raji, B., Nookala, A. R., Khan, M. M., Nguyen, X. H., Sakshi, S., Pourmotabbed, T., M Yallapu, M., Kochat, H., Tadrous, E., Pernell, S. & Kumar, S. (2021). PLGA nanoparticle-based formulations to cross the blood–brain barrier for drug delivery: From R&D to cGMP. *Pharmaceutics*, 13(4), 500. 5278-84. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040500>

Zhunushova, A.(2020). Kan Beyin Bariyeri ve İlaç Geçiş Modülasyonu. *Manas J. Agric. Vet.*, 10(2), 115-21.

