

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

**ALZHEİMER HASTALIĞI TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE DONEPEZİL YÜKLÜ PLGA-b-
PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE
BEYNE HEDEFLENDİRİLMESİ**

Uzm. Bio. İpek BAYSAL

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ**

**ANKARA
2015**

Anabilim Dalı :Biyokimya
 Program :Biyokimya
 Tez Başlığı :Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil
 Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve
 Beyne Hedeflendirilmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı :İpek BAYSAL
 Savunma Sınavı Tarihi :04.03.2015

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof.Dr. Gülberk UÇAR**
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Tez danışmanı: **Doç.Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ**
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Üye: **Prof.Dr. Derya AKAYDIN ALDEMİR**
 (Başkent Üniversitesi)
 Üye: **Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ**
 (Gazi Üniversitesi)
 Üye: **Doç.Dr. İncilay LAY**
 (Hacettepe Üniversitesi)







ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorlandığım her noktada destek veren, beni hiç yalnız bırakmayan, cesaretlendiren, yol gösteren, bilimsel çalışma kültürünü bana öğreten saygıdeğer danışman hocam Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye;

Tez çalışmam boyunca, tüm imkânlarını bana cömertçe sunan, bilimsel katkı ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülberk UÇAR'a,

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

Hayvan deneyleri esnasında destek olan, zamanını ve bilgisini paylaşan Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Hocam Yrd. Doç.Dr. Banu Cahide TEL'e,

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

Polimer ve partikül sentez aşamalarında deneysel her tür desteğin yanında güleryüzü, sohbeti ve dostluğu için sevgili arkadaşım Arş. Gör. Merve GÜLTEKİNOĞLU'na, Dostluğuyla hayatıma anlam katan, her anda bana sevgi ve istekle yardım eden ve bu stresli dönemimde desteğini her an hissettiğim canım dostum Arş. Gör. Açelya ERİKÇİ'ye,

İlgi, özveri ve hepsinden önemlisi sevgisiyle her an yanımda olan canım arkadaşlarım Arş. Gör. Selin ÖNCÜL ve Arş. Gör. Beyza AYAZGÖK'e

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

Ve beni asla yalnız bırakmayan, desteklerini her zaman hissettiğim biricik Ablam, Emre Abim ve minicik yeğenlerime,

Teşekkürü bir borç bilirim...

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojiler Araştırma Kurumu (TÜBİTAK proje no: 112T490) ve HÜBAP Tez Destekleme (TDK-2015-5468) tarafından desteklenmiştir

ÖZET

Baysal, İ. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Beyne Hedeflendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015. Alzheimer hastalığı (AH), beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybı ile ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın moleküler mekanizması açık olmamakla birlikte AH’nda, neokorteksin ekstraselüler sinaptik boşluklarında amiloid beta ($A\beta$) proteinlerinin birikerek plaklar oluşturduğu ve nöron dejenerasyonuna yol açtığı öne sürülmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri, AH’nda bozulan sinir iletimini düzeltmeyi amaçlayan semptomatik tedaviye yönelik bileşiklerdir. Donepezil, AH’nda klinik kullanımı olan, tersinir ve non-kompetitif bir kolinesteraz inhibitörüdür ve bütirilkolinesteraza kıyasla asetilkolinesterazı (AKoE’i) daha özgül olarak inhibe eder. Bu tez kapsamında AH tedavisine yönelik olarak; donepezilin yan etkilerini azaltmak ve tedavi etkinliğini artırmak için donepezil yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli(etilen glikol) [PLGA-b-PEG] nanopartikülleri geliştirilmiş ve bu nanopartiküller doğrudan beyindeki $A\beta$ fibrillerine hedeflenmiştir. Donepezil $A\beta$ fibrillerine yönlendirildiğinden doku dağılımı minimize edilmiş, doğrudan $A\beta$ fibrillerini destabilize edecek konsantrasyonda beyne ulaşması sağlanmıştır. Ayrıca insan beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve astrositleri kullanılarak hücre kültürü ortamında kan beyin bariyeri modeli oluşturulmuş hazırlanan nanopartiküllerin kan beyin bariyerini geçtiği tespit edilmiştir; donepezilin koruyucu etkisini değerlendirebilmek adına da astrositlerden salınan ve nöroenflamatuvar süreçte rol oynayan sitokinlerin ekspresyonları protein ve gen düzeyinde belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre fibrillerle inkübe edilen astrositlerde enflamasyona ait sitokinlerden IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TGF- β , MCP-1 ve TNF- α için hem gen hem protein düzeyinde ekspresyon artışı tespit edilmiştir. Donepezil ve donepezil yüklü nanopartikül ile uyarılma sonucunda ise bu sitokinlerden IL-1 β , IL-6, GM-CSF ve TNF- α düzeylerinde anlamlı azalma hem gen ekspresyon düzeylerinde hem de protein düzeylerinde tespit edilirken TGF- β , MCP-1 sitokinleri için ise anlamlı değişiklik saptanmamıştır. $A\beta$ (25-35) peptidinin intraserebroventriküler enjeksiyonu ile Alzheimer benzeri model oluşturulmuştur. Tedavi sürecinin ardından farmakolojik deneyler tamamlandıktan sonra sıçanların beyin dokusu çıkarılarak homojenize edilmiştir. Hayvan beyin dokularının homojenize edilmesini takiben homojenatlarda asetilkolinesteraz aktivite tayini yapılmıştır. Bu sonuçlara göre $A\beta$ (25-35) fibrilleri kullanılarak AH modeli oluşturulmuş olan sıçan grubunda aktivitenin anlamlı ölçüde arttığı saptanmıştır. Donepezil yüklü nanopartiküllerin donepezilden daha etkin davranarak aktiviteyi anlamlı şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak donepezil yüklü nanopartiküllerin AKoE aktivitesini inhibe etme güçlerinin donepezile oranla daha fazla olduğu söylenebilir. Bu da nanopartiküllerden donepezilin kontrollü olarak salındığının, etki süresinin daha uzun olmasının ve hedeflemenin başarılı olmasının bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer Hastalığı, donepezil, nanopartikül, *in vitro*, *in vivo*

Destekleyen Kuruluşlar: TÜBİTAK (Proje No: 112T490) ve HÜBAP Doktora Tez Destekleme (TDK-2015-5468)

ABSTRACT

Baysal, I. Preparation and Brain Targeting of Donepezil Loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles for Treatment of Alzheimer's Disease. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2015.

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible and progressive neurodegenerative disease, which is caused by irreversible loss of neurons in the hippocampus and cortex regions of the brain. Although the molecular mechanism of the disease is still unclear, the deposition of the amyloid beta ($A\beta$) proteins (senile plaques) in the extracellular synaptic spaces of the neocortex is suggested to play a major role in progress of AD. Cholinesterase inhibitors are compounds that are used for symptomatic treatment of neuron transmission improvement in AD. Donepezil is a reversible and non-competitive cholinesterase inhibitor that preferably inhibits acetylcholinesterase compared to butyrylcholinesterase and is clinically used for treatment of AD. In the frame of this thesis, we developed donepezil loaded poli (laktic-co-glycolic acid)-block-poli (ethylen glycol) [PLGA-b-PEG] nanoparticles to increase efficiency of treatment in AD and to reduced the side effects of donepezil nanoparticles were directly targeted to the $A\beta$ fibriles. By targeting donepezil to the brain in sufficient concentration we destabilized $A\beta$ fibrile formation and minimized its tissue distrubition. Furthermore by setting up a blood brain barrier model *in vitro*, using microvascular endothelial cells and astrocytes we determined that this prepared nanoparticles passed across the blood brain barrier. In this set up we also evaluated the protective effect of donepezil on astrocytes in neuroinflammation by assessing cytokine expressions both in protein and gene levels. According to these results for inflammation cytokines IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TGF- β , MCP-1 and TNF- α , increase in both expression and protein levels was detected on astrocytes which were incubated with amyloid fibrils. After free donepezil and donepezil loaded nanoparticle administration to these stimulated astrocytes a significant decreased in both gene expression and protein levels were detected for IL-1 β , IL-6, GM-CSF and TNF- α , whereas there were no significant changes observed for TGF- β and MCP-1. *In vivo* Alzheimer model was created using intracerebroventricular injection of $A\beta$ (25-35) peptide. After the treatment period brain tissues of rats were removed and homogenized. Following the homogenization of the brain tissues; acetylcholinesterase activities were determined in each sample. According to the results acetylcholinesterase activity of Alzheimer model rats achieved with icv $A\beta$ (25-35) injection were found to be significantly increased. Effect of donepezil loaded nanoparticles in this animal model were found to be more effective than free donepezil and significantly inhibited the acetylcholinesterase activity. Based on these results, ability of donepezil loaded nanoparticles to inhibit acetylcholinesterase activity is stronger than high dose free donepezil. The reason for this can be attributed to the controlled release of donepezil, longer duration of action and successful targetting of nanoparticles.

Keywords: Alzheimer's Disease, donepezil, nanoparticle, *in vitro*, *in vivo*

Supported by TÜBİTAK (Project No: 112T490) and HÜBAP Ph.D. Thesis Grant (TDK-2015-5468)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 AH’da Beyindeki Mikroskopik ve Makroskopik Değişiklikler	3
2.2.1. AH Patolojisi: Plaklar ve Aβ	4
2.2.2. AH Patolojisi: Tau Proteinleri	6
2.2.3. AH Patolojisi: Sinaptik Bozulma	8
2.3. AH’nın Etiyolojisi	9
2.4. AH’nda Enflamasyonun Rolü	11
2.4.1. Mikroglialar	11
2.4.2. Astrositler	12
2.4.3. Nöronlar	14
2.5. AH’nın Moleküler Mekanizması	14
2.5.1. Amiloid Şelale Hipotezi	15
2.5.2. Kolinerjik Hipotez	17
2.6. AH’da Tedavi Stratejileri	17
2.6.1. Sinir İletiminin Modülasyonu	19
2.6.2. Tau Temelli Tedavi Stratejileri	20
2.6.3. Amiloid Hedefli Tedavi Stratejileri	20
2.6.4. İntraselüler Sinyal Yolaklarının Modülasyonu	20
2.6.5. Oksidatif Stresin Azaltılması	21
2.6.6. Mitokondriye Özgül Tedavi Stratejileri	21
2.6.7. Hücrel Ca ²⁺ Homeostazının Modülasyonu	22

2.6.8. Anti-enflamatuar Bileşikler.....	22
2.7. AKoE	22
2.7.1. AKoE’ın AH’daki Dual Rolü.....	23
2.7.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin (AKoEI) Çalışma Mekanizması.....	24
2.7.3. Donepezil	24
2.8. Kolinerjik Hipotez ve Donepezil.....	27
2.9. AH’nın Tedavisi için Beyine İlaç Hedeflendirme.....	29
2.10. KBB	30
2.10.1. KBB’nin Biyolojisi.....	30
2.10.2. KBB’nden İlaç Taşınması ve Hedeflendirme Mekanizması.....	32
2.11. Hücre Temelli KBB <i>in vitro</i> Modelleri.....	34
2.11.1. Endotel Mono-Kültürler.....	35
2.11.2. Astrositler ile Serebral Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Ko-Kültürü.....	35
2.11.3. KBB <i>in vitro</i> Model Etkinlikleri.....	36
2.12. KBB’den Geçiş için Nanopartiküllerin Kullanımı	36
2.12.1. Nanopartiküllerin KBB’ni Geçme Stratejileri.....	38
2.13. AH için Nanoteknoloji Temelli Stratejiler.....	40
2.13.1. AH Teşhisi için Görüntüleme Temelli Nanoteknolojiler.....	40
2.13.2. AH Tedavisi için Nanoteknolojiler.....	42
2.14. Nanotaşıyıcı Sistemler	44
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	48
3.1. Gereçler.....	48
3.2. Çift Emülsiyon Yöntemi ile Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG-COOH Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	48
3.2.1. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Anti-A β Antikoru ile Konjugasyonu	49
3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	50
3.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü.....	50
3.3.2. Morfolojik Analiz	51
3.4. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerine Yüklenen Donepezil Miktar Tayini	51
3.4.1. Donepezil için Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması	51
3.4.2. Donepezil Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	52
3.5. Etkin Madde Salım Çalışmaları	52
3.6. <i>İn vitro</i> Deneyler.....	52
3.6.1. A β Fibrillerin Hazırlanışı.....	52

3.6.2. A β (1-40) Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu	53
3.6.3. A β (1-42) Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu	53
3.6.4. ThT Floresans Ölçümü	53
3.6.5. Hücre Kültürü.....	54
3.6.6. KBB <i>in vitro</i> Modeli.....	54
3.6.7. RNA İzolasyonu ve RT-PCR	56
3.6.8. ELISA analizleri	57
3.7. <i>In vivo</i> Deneyler	58
3.7.1. Deney Hayvanları	58
3.7.2. A β Peptid.....	58
3.7.3. Stereotaksik Enjeksiyon ve İlaç Uygulanması	58
3.7.4. İmmünohistokimyasal Boyama	60
3.7.5. Beyin Homojenatlarının Hazırlanması	60
3.7.6. Beyin Homojenatlarındaki Total Protein Tayini	61
3.7.7. AKoE Aktivite Tayini.....	61
3.8. İstatistiksel Analizler	61
4. BULGULAR	62
4.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Zeta Potansiyeli.....	62
4.2. Nanopartiküllerin Morfolojisi	66
4.3. Donepezilin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini.....	68
4.3.1. Donepezil Miktar Tayininde Kullanılan HPLC Yönteminin Doğrusallığı..	69
4.3.2. Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerde Yükleme Verimliliği	69
4.4. Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin <i>in vitro</i> Etkin Madde Salım Çalışmaları	71
4.5. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Anti-A β Antikoru ile Konjugasyonu	73
4.5.1. Anti-A β Antikoru ile Konjuge Nanopartiküllerin Morfolojisi.....	73
4.6. <i>In vitro</i> Deney Sonuçları.....	74
4.6.1. A β (1-40) ve A β (1-42) Fibrillerinin Hazırlanması, ThT Ölçümü ve Morfolojik Analizi	74
4.6.2. A β (1-40) Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu	75
4.6.3. A β (1-42) Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu	75
4.6.4. Hücre Kültürü.....	76
4.6.5. KBB <i>in vitro</i> Modeli.....	78
4.6.6. AM Ortamındaki Donepezil Miktarının Belirlenmesi.....	80

4.6.7. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin IL-6 Ekspresyonu.....	82
4.6.8. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin TGF- β 1 Ekspresyonu	84
4.6.9. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin GM-CSF Ekspresyonu	86
4.6.10. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin TNF- α Ekspresyonu	88
4.6.11. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin MCP-1 Ekspresyonu	90
4.6.12. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin IL-1 β Ekspresyonu.....	92
4.7. <i>İn vivo</i> Deney Sonuçları.....	94
4.7.1. A β Enjeksiyonu	94
4.7.2. Beyin Homojenatlarında AKoE Tayini	95
5. TARTIŞMA.....	97
KAYNAKLAR.....	105
EKLER.....	
Etik Kurul İzni	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-HT	Serotonin
A β	Amiloid beta
AGF	Astrosit büyüme faktörü
AH	Alzheimer hastalığı
AIHÖ	Aktivasyonla indüklenen hücre ölümü
AKo	Asetilkolin
AKoE	Asetilkolinesteraz
AM	Astrosit besiyeri
APP	Amiloid prekürsör protein
ApoE	Apolipoprotein E
BAKE 1	β -bölgesi APP-kesici enzim 1
b-CTP	APP α -sekretaz ile kesildiğinde açığa çıkan C-Terminal Fragmenti
BSA	Sığır serum albumin
BuKoE	Bütirilkolinesteraz
CTF	APP α -sekretaz ile kesildiğinde açığa çıkan C-Terminal Fragmenti
DCM	Diklorometan
ECGS	Endotel hücre büyüme faktörü
ECM	Endotel hücre besiyeri
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) kabodiimid
EH	Endotel hücreler
EHM	Endotel hücresi multimeri
FBS	Fetal sığır serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDE	Fosfodiesteraz
GIS	Gastrointestinal sistem
GFI	Glikozilfosfatidilinozitol
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GSK	Glikojen sentaz kinaz
İBMEH	İnsan beyin mikrovasküler endotel hücresi

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İcv	İntraserebroventriküler
İp	İntraperitoner
İv	İntraventriküler
IL-1 α	İnterlökin 1 α
IL-1 β	İnterlökin 1 β
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
KBB	Kan beyin bariyeri
KoAT	Kolin asetil transferaz
KP	Potasyum fosfat tamponu
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MHC II	Majör histokompalibite kompleksi
MSS	Merkezi sinir sisteminde
NFA	Nörofibriler ağ
NHS	N-hidrosisüksinimid
NMDA	N-metil-D-aspartat
PBS	Fosfat tamponu
PDI	Poli dispersite indeksi
PEG	Poli (etilen glikol)
Pgp	P-glikoprotein
P n BCA	Poli-n-bütil siyanoakrilat
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PLGA-b-PEG	Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri
PS-b-P n BCA	Polisitrien-blok-poli-n-bütil siyanoakrilat kopolimeri
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
RES	Retiküloendotel sistem

sAPP α	APP α -sekretaz ile kesildiğinde açığa çıkan N-Terminal Fragment
sAPP β	APP β -sekretaz ile kesildiğinde açığa çıkan N-Terminal Fragment
SBK	Siklin bağımlı kinaz
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- β
ThT	Tiyoflavin T

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. A β peptitlerin oluşumunun şematik gösterimi.	6
2.2. Hiperfosforile olmuş, mikrotübüllere karşı olan afinitesini kaybetmiş ve kendi kendilerine çift sarmal yapıya dönüşmüş tau proteinleri.	7
2.3. AH'nın moleküler mekanizmasına ilişkin temel hipotezler.	14
2.4. Amiloid şelale hipotezinin şematik gösterimi	15
2.5. AKoE'm katalizlediği reaksiyon	23
2.6. Donepezilin kimyasal yapısı	25
2.7. KBB'deki karakteristik serebral kapillerlerin şematik olarak gösterimi	31
2.8. KBB'nin yapısının şematik gösterimi	32
2.9. Derişim bağımlı madde taşınımının şematik gösterimi	33
2.10. KBB'nde taşınım mekanizmaları	33
2.11. Nanoteknolojiden nörodejeneratif hastalıklara geçişin şematik gösterimi	40
3.1. Anti-A β antikor taşıyan donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin şematik gösterimi	50
3.2. Hücre kültürü ortamında gerçekleştirilen deneylerin şematik özeti	56
4.1. NP1 boyut grafiği	63
4.2. NP2 boyut grafiği	64
4.3. NP3 boyut grafiği	64
4.4. NP4 boyut grafiği	64
4.5. NP1 zeta potansiyel grafiği	65
4.6. NP2 zeta potansiyel grafiği	65
4.7. NP3 zeta potansiyel grafiği	65
4.8. NP4 zeta potansiyel grafiği	66
4.9. Nanopartiküllerin SEM görüntüsü	67
4.10. 0.5, 1 ve 5 μ g/mL donepezil içeren standartlara ait kromatogram	68

4.11.	10, 25, 50 ve 100 µg/mL donepezil içeren standartlara ait kromatogram	68
4.12.	Donepezil'e ait kalibrasyon eğrisi	69
4.13.	Farklı derişimlerde donepezil kullanılarak hazırlanmış nanopartiküllerin dış faz kromatogramları	71
4.14.	A) 2,5 mg donepezil ile hazırlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım grafiğı, B) 5 mg donepezil ile hazırlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım grafiğı	72
4.15.	BSA validasyon eğrisi	73
4.16.	NP1'in SEM görüntüsü	74
4.17.	A) Aβ(1-40) ve Aβ(1-42) fibrilinin oluşumuna ait grafik	74
4.18.	Aβ(1-40) fibrilinin rifampisin ve donepezil ile inhibisyonuna ait grafik	75
4.19.	Aβ(1-42) fibrilinin rifampisin ve donepezil ile inhibisyonuna ait grafik	76
4.20.	İBMEH'nin zamana bağımlı proliferasyonu	77
4.21.	İnsan Astrosit hücrelerinin zamana bağımlı proliferasyonları	78
4.22.	<i>In vitro</i> KBB deney düzeneğı: A) İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri, B) İnsan Astrosit Hücre Kültürü	79
4.23.	<i>In vitro</i> KBB'ne uygulanan donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküllerin deney düzeneğı	79
4.24.	NP1 salım etkinliğı profili	80
4.25.	KBB düzeneğinde serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin zamana göre donepezil salım profili	81
4.26.	Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP'ler için A) IL-6 düzeyleri B) IL-6 için ekspresyon düzeyleri	83
4.27.	Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP'ler için A) TGF-β1 düzeyleri B) TGF-β1 için ekspresyon düzeyleri	85
4.28.	Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP'ler için A) GM-CSF düzeyleri B) GM-CSF için ekspresyon düzeyleri	87
4.29.	Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP'ler için A) TNF-α düzeyleri B) TNF-α için ekspresyon düzeyleri	89
4.30.	Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP'ler için A) MCP-1 düzeyleri B) MCP-1 için ekspresyon düzeyleri	91

4.31.	Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP'ler için A) IL-1 β düzeyleri B) IL-1 β için ekspresyon düzeyleri	93
4.32.	A β fibrillerinin immünohistokimyasal boyaması	94
4.33.	Kontrol ve deney gruplarında asetilkolinesteraz aktivite düzeyleri	96

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. AH’nda mikroglialar ve astrositler tarafında salgılanan moleküller ve ürünler.	13
2.2. KBB <i>in vitro</i> modellerinin avantaj ve dezavantajları.	36
3.1. RT-PCR deneylerinde kullanılacak olan primer dizileri.	57
4.1. Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel verileri	62
4.2. Nanopartiküllere donepezil yükleme etkinliği	70
4.3. AM ortamı zamana göre donepezil konsantrasyonu	81
4.4. Kontrol ve deney gruplarında AKoE aktivite düzeyleri	95

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybı ile ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın moleküler mekanizması açık olmamakla birlikte AH’nda, neokorteksin ekstraselüler sinaptik boşluklarında amiloid beta (A β) proteinlerinin birikerek plaklar oluşturduğu ve nöron dejenerasyonuna yol açtığı öne sürülmektedir (1). AH’nda beyinin temporal lobu, frontal ve parietal kortekslerinde kolin asetil transferaz (KoAT) aktivitesinde azalma görüldüğü; bu azalmanın Meynert bazal nükleusundaki kolinerjik nöron kaybıyla uyumlu olduğu bildirilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri, AH’nda bozulan sinir iletimini düzeltmeyi amaçlayan semptomatik tedaviye yönelik bileşiklerdir. AH’nda asetilkolinin (AKo’nin) kortikal aktivitesi düşük olduğu için, sinaptik boşlukta AKo’nin yıkımından sorumlu olan asetilkolinesteraz (AKoE), başlıca ilaç hedefini oluşturur (2).

Donepezil, AH’nda klinik kullanımı olan, tersinir ve non-kompetitif bir kolinesteraz inhibitörüdür ve bütirilkolinesteraz (BuKoE)’a kıyasla AKoE’ı daha özgül olarak inhibe eder. Periferik dokulardaki kolinesteraz üzerine belirgin etki etmeden beyin kolinesterazının net ve uzun süreli inhibisyonunu sağlarken; *in vivo* koşullarda beynin AKo içeriğini artırır. Donepezilin aynı zamanda *in vitro* koşullarda A β fibrillerini destabilize ettiği rapor edilmiştir. Bunun yanında donepezilin AH’nda ortaya çıkan nöroenflamasyon sürecine karşı koruyucu etkili olduğu da bildirilmektedir. Donepezil bütün bu özelliklerinden ötürü hem semptomatik tedaviye uygun oluşu hem de hastalığın mekanizmasına müdahalede bulunabilecek özellikleri nedeniyle AH tedavisi açısından umut vaat etmektedir (3).

Donepezilin klinik kullanımındaki en büyük problem ise oral kullanımına bağlı gözlenen gastrointestinal sistem (GIS) yan etkileridir. Ayrıca her gün tekrarlanan 5mg’lık dozlarda alınması gerekliliğinden özellikle demansı olan Alzheimer hastalarında uyum problemi yaşanmaktadır. Bunun yanında son yıllarda donepezilin oral alındığında bütün dokulara yaygın bir şekilde dağıldığı ve hızla metabolize olduğu da gösterilmiştir. Bu nedenle donepezil gibi birçok ilacın terapötik etkileri açısından rasyonel bir yaklaşımla hedef bölgeye taşınması öngörülmektedir (4).

Bu sebeplerden ötürü bu tez kapsamında, intravenöz (iv) yolla uygulamaya olanak verecek şekilde donepezili poli(laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli(etilen glikol)

(PLGA-b-PEG) nanopartiküllerine yüklemek, bu nanopartiküllerin karakterizasyonunu ve optimizasyonunu yapmak, hazırlanan nanopartiküllerin yüzeylerine anti-amiloid beta antikoru takarak doğrudan A β fibrillerine hedeflenmelerini sağlamak, AH'da olduğu bilinen A β fibrillerini *in vitro* koşullarda ticari olarak satılan A β peptitlerinden oluşturmak, bu fibrillerin oluştuğunu göstermek ve söz konusu PLGA-b-PEG nanopartikülleri ile etkileşimini incelemek, insan beyin mikrovasküler endotel hücreleri (İBMEH'leri) ve astrositleri kullanılarak hücre kültürü ortamında kan beyin bariyeri (KBB) modeli oluşturularak hazırlanan nanopartiküllerin KBB'ni geçtiğini saptamak, hazırlanan nanopartiküllerin KBB'ni aşarak astrositlerden salınan ve nöroenflamatuar süreçte yer alan sitokinlerin ekspresyonlarını protein (ELISA ile) ve gen düzeyinde (gerçek zamanlı PCR ile) nasıl etkilediğini belirlemek ve son olarak donepezil yüklü nanopartiküllerin tedavi açısından etkisini hayvan deneyleri ile saptamak amaçlanmıştır.

Bu tezde kapsamında sonuç olarak AH tedavisine yönelik olarak; yukarıda belirtildiği gibi çoklu etkiye sahip donepezilin yan etkilerini azaltmak ve tedavi etkinliğini artırmak için donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri başarıyla geliştirilmiş ve bu nanopartiküller doğrudan beyindeki A β fibrillerine hedeflenmiştir. Bu şekilde donepezil A β fibrillerine yönlendirileceğinden doku dağılımı minimize edilmiş, doğrudan A β fibrillerini destabilize edecek konsantrasyonda beyne ulaştırılması başarıyla sağlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller doğası gereği uzun süre etkili olduğundan ve iv uygulamaya uygun olduklarından hem GIS yan etkilerin hem de uyunc probleminin önüne geçilmesi sağlanmıştır.

Ayrıca İBMEH'leri ve astrositleri kullanılarak hücre kültürü ortamında KBB modeli oluşturularak hazırlanan nanopartiküllerin KBB'ni geçtikleri saptanmış; donepezilin koruyucu etkisini değerlendirebilmek adına da astrositlerden salınan ve nöroenflamatuar süreçte rol oynayan sitokinlerin ekspresyonları protein ve gen düzeyinde belirlenmiştir.

Donepezil yüklü nanopartiküllerin tedavi açısından etkisinin belirlenmesinde Alzheimer oluşturulmuş sıçanlar kullanılmıştır. Tedavi sürecinin ardından sıçanların beyin dokusu çıkarılarak beyin homojenatlarında AKoE aktivite tayini yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

AH, geri dönüşümsüz ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalık, konuşmada, yön bulmada, karar vermede, düşünmede ve yorumlamada zorluklar ve hafıza kaybı ile karakterizedir. Kişilik ve davranış bozukluklarının giderek artması ile kendini gösterir. Hastalık ilk kez bir Alman tıp doktoru olan Dr. Alois Alzheimer tarafından 1907 yılında nedeni bilinmeyen mental bir hastalıktan ölen kadının beyin dokusunda yaptığı otopsi ile tanımlanmıştır (5).

AH'nın patogeneğinde, beyinin özellikle temporal ve parietal loblarında olmak üzere neokorteksindeki ekstraselüler sinaptik boşluklarında A β proteinlerinin (senil plakların) birikmesi ve nörofibriller ağ oluşması büyük önem taşımaktadır. Bu plakların varlığı ile tetiklenen nörodejenerasyon, bilişsel davranışlar (öğrenme, soyutlama, yargı, vs.) ve hafızayı etkiler. Bunun sonucunda da depresyon, halüsinasyon, sanrı, öfke ve ajitasyon gibi davranışlar ortaya çıkar (6-11). Kısa zamanlı hafıza kaybı ilk klinik belirtidir. Hastalık ilerledikçe diğer bilişsel özelliklerde de kayıplar görülmeye başlanır (12). Hastalığın klasik klinik özellikleri amnezik bellek bozukluğu (13), konuşmada bozukluklar (14) ve görsel-uzamsal bozukluklardır (15).

AH, 65 yaşının üzerindeki bireylerin %10'unu, 85 yaş üzerindekiilerin ise %50'sini etkilemektedir (16). Kadınların AH'na yakalanma olasılığı erkeklere oranla 1.5 kat daha fazladır (17). AH'nın dünya çapında 15 milyon insanı, ABD'nde 4.5 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir. 50 yıl içinde hastalığın tedavisi veya önlenmesi ile ilgili gelişmeler göz ardı edildiğinde bu sayıların popülasyondaki yaşlı yüzdelerinin artması ile en az üç katına çıkacağı düşünülmektedir (18).

2.1 AH'da Beyindeki Mikroskobik ve Makroskobik Değişiklikler

AH nöropatolojik olarak, A β protein agregasyonunun neden olduğu ekstraselüler amiloid plak birikimi ve aşırı fosforlanmış tau proteinlerinin agregasyonu ile intraselüler nörofibriller ağlar ile karakterizedir.

AH'da oluşan yapısal değişiklikler “pozitif” lezyonlar olarak sınıflandırılmışlardır. Bunlara plakların birikimi, nörofibriller ağlar, distrofik nöritler, serebral amiloid anjiyopatisi örnek verilebilir. Bunun dışında gelişen nöron kaybı,

nöritlerin ve sinapsların degradasyonu ile bağlantılı olan şiddetli atrofi ise “negatif” lezyon olarak isimlendirilmektedir (19).

Senil plaklar ilk olarak Alzheimer tarafından Bielchowsky silver boyaması ile demanslı bir hastada gösterilmiştir ve 1980’lerin başlarında çoğunlukla A β peptidinden meydana geldiği belirlenmiştir (20,21).

AH’nda A β ile dolu serebral plaklar, neokortikal terminal alandaki distrofik nöritler ve medial temporal lob yapısında göze çarpan nörofibriler ağlar önemli patolojik bulgulardır. Bunlara ek olarak nöron ve ak maddenin kaybı, amiloid anjiyopatisi, enflamasyon ve oksidatif hasar da gözlenebilir.

Nörofibriler ağ ve nöropil iplikleri AH’nın patolojik özelliklerindendir ve sayılarındaki değişiklik yaşa bağlı değildir. Nörofibriler ağların ve nöropil ipliklerinin oluşumu, hastalıkta gözlenen ilk değişikliklerdir. Bu değişiklikler hastalığın oluşması kadar gelişmesi ve ilerlemesiyle de bağlantılıdır. Plaklar (A β birikimi ve/veya nöritik plaklar) ise hastalığın son safhasında ortaya çıkmaktadır. Nörofibriler ağlar ve nöropil iplikler, ilk olarak özgün kortikal bölgelerde oluşurlar ve daha sonra serebrumun diğer bölümlerine yayılırlar. Bir evreleme prosedürünün oluşturulabilmesi için temel olarak lezyonların dağılım paterni ve yıkıcı sürecin kademeli gelişimi dikkate alınmalıdır (22).

2.2.1. AH Patolojisi: Plaklar ve A β

A β proteinin transmembran amiloid prekürsör proteininin (APP), α -, β -, ve γ -sekretazlar ile ardışık olarak kesilmesi ile meydana gelir (23,24). APP, α -sekretaz ile kesildiğinde salgısal bir form olan (N)-terminal ektodomain (sAPP α) ve C-terminal fragmenti (CTF) ortama salınır. APP bu şekilde kesildiğinde, A β proteini oluşmaz (25). Bu yolağa “non-amiloidojenik” yolak adı verilir. A β proteinin oluşmasına yol açan “Amiloidojenik” yolakta ise APP, β -sekretaz ile N-terminalinden kesilir ve çözünür N-terminal fragmenti (sAPP β) ve kalan C-terminal bölgesi (b-CTF) ortama salınır. CTF ve b-CTF γ -sekretaz ile transmembran bölgeden kesilip sırasıyla p2 veya A β ’nın salınmasına neden olur (Şekil 2.1). γ -sekretaz ile kesim 40 veya 42. amino asitte gerçekleşir ve sırasıyla A β (1-40) veya A β (1-42) oluşmasına neden olur. Reziduların yaklaşık %90’ı A β (1-40)’dan meydana gelir. Ancak A β (1-42) formu çok

daha toksiktir ve daha kolay agrege olur. Bu nedenle A β (1-42), amiloid plaklarda en bol bulunan formdur.

Bu peptitlerin üretimi, uzaklaştırılması ve agregasyonu arasındaki dengede oluşan bozukluk, A β 'nın birikmesine sebep olur. Bu durum ise AH'nın oluşmasında bir başlangıç faktörü kabul edilir. Bu hipoteze amiloid hipotez adı verilir (26,27). A β , spontan bir şekilde agrege olarak diğer formlarına dönüşür. Bu formlardan biri oligomerlerden (2 den 6 peptide kadar) oluşur ve bu oligomerler ise ara ürün topluluklarına dönüşürler (28,29). A β 'lar aynı zamanda fibril haline dönüşebilir ve bunu A β plakların çözünmeyen fiberleri olan β -pileli yapıya dönüşerek gerçekleştirirler.

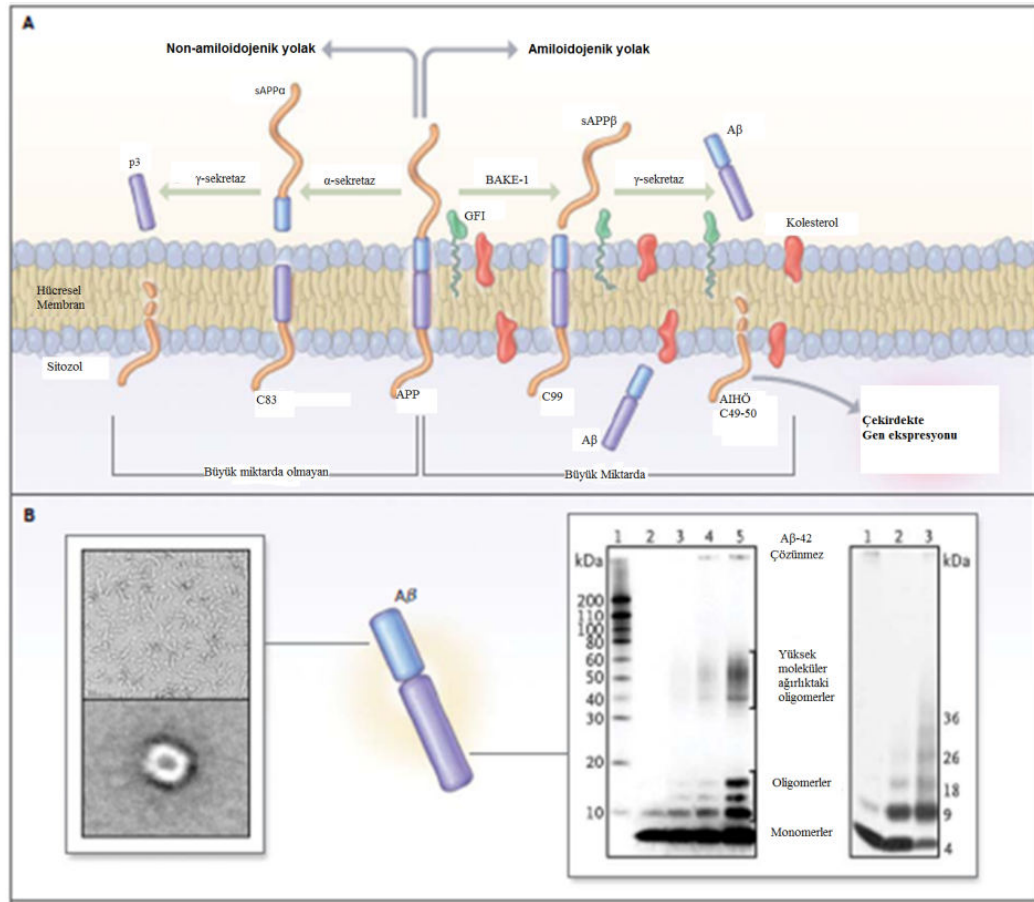
Çözünebilen oligomerler ve amiloidlerin ara ürünleri, A β 'nın en nörotoksik formlarındandır (30). Beyin kesitlerinde yapılan çalışmalarda, A β 'nın dimer ve trimerlerinin sinapslara karşı toksik olduğu saptanmıştır (31,32). AH'ndaki kavramsal bozuklukların ciddiyeti beyindeki total oligomer miktarı ile koreledir, fakat total A β yükü ile korele değildir (33). Nöron aktivasyonu sinapslardaki A β sekresyonunu hızlı bir şekilde artırır, bu işlem nörotransmitter içeren veziküllerin normal salınımı ile bağlantılıdır. Fizyolojik düzeydeki A β , oksidatör iletinin gücünü azaltıp, nöronların hiperaktivitesini engelleyebilir (34).

Postmortem insan beyninde yapılan kesitsel çalışmalarda, senil plakların hastalığın ilk evrelerinde ortaya çıktığı ve neokorteksten başlayarak allokortekse ilerlediği, daha sonra ise diensefalon, striatum ve basal önbeyin kolinerjik çekirdeğine ve sonunda serebelluma ulaştığı görülmüştür (35).

Yoğun plaklar beyin parankima etrafında toksiktir ve sinaps fonksiyon bozukluğu ve kaybı gibi çeşitli olaylara neden olur. Plakların etrafında bulunan birçok nöritte şişmiş, distrofik bir morfoloji ve fosforillenmiş-tau agregatları ve bozulmuş hücresel taşınmadan dolayı çeşitli hücresel yapıların birikimi meydana gelmektedir (19,36).

A β 'nın beyindeki parankimal birikmesi dışında serebral damarlarda da birikir (37). Amiloid birikimi ilk önce serebrum etrafını saran arteriyollerde oluşmaya başlar ve daha sonra beynin diğer bölgelerindeki kortikal arteriyollere, kılcal damarlara ve damarlar yayılır (38). Bu vasküler A β birikimi serebral amiloid anjiyopatisine neden

olur. Bunlara ek olarak A β birikintileri olfaktör bulblarında bulunur ve bunun devamı olarak olfaktör korteks ve hipokampüste birikim oluşmaya başlar (39).

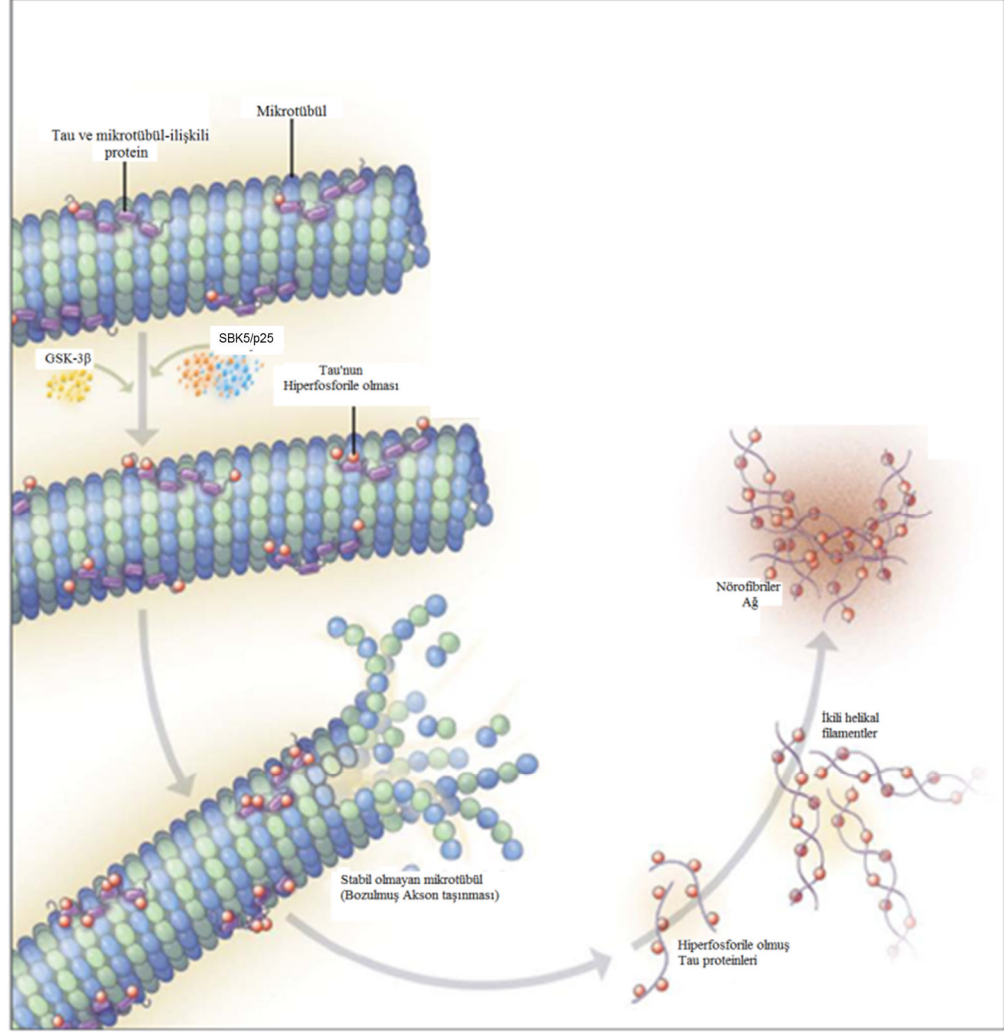


Şekil 2.1. A β peptitlerinin oluşumunun şematik gösterimi (40). BAKE-1: β -bölgesi APP-kesici enzim, GFI: Glikozilfosfatidilinozitol, AIHÖ: Aktivasyonla indüklenen hücre ölümü.

2.2.2. AH Patolojisi: Tau Proteinleri

Plakların, bozulmuş nörit morfolojisi, gliosis ve oksidatif stres ile ilişkili olduğu bilinirken, nörofibriler ağların nöropiller üzerinde ne tür etkileri olduğu hakkında bilgiler kısıtlıdır. Nörofibriler ağlar ve nöropil iplikçileri, agregasyonu uğramış tau proteinlerinden meydana gelmektedir. tau, aksonlarda çok miktarda bulunan ve mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayan mikrotübül bağlayıcı proteindir (41). AH'nın gelişimi sırasında tau hiperfosforile olur, mikrotübüllerden ayrılır ve çift sarmal filamentler ve düz filamentler halinde somatodendritik

kompartmanda birikmeye başlar (1). Ağların birikimi hiyerarşik bir şekilde ilk olarak entorinal kortekste başlayıp daha sonra hipokampal formasyon ve ilgili kortekse doğru ilerler ve sadece hastalığın son aşamalarında primer duyu alanlarını etkilemeye başlar (Şekil 2.2)(42,43).



Şekil 2.2. Hiperfosforile olmuş, mikrotübüllere karşı olan afinitesini kaybetmiş ve kendi kendilerine çift sarmal yapıya dönüşmüş tau proteinleri (44). GSK: Glikojen sentaz kinaz, SBK: Siklin bağımlı kinaz.

Tıpkı A β oligomerleri gibi anormal tau moleküllerinin ara ürün agregatları da sitotoksiktir ve hafızayı etkiler (45,46). Çözünmeyen helikal filamentler ise etkisizdir (47). Bu helikal filamentlerin, toksik tau ara ürün türlerini tuttuğu için koruyucu oldukları düşünülmektedir (48). Parkinson hastalığında görülen frontotemporal demansta, 17. Kromozom üzerinde 30'dan fazla tau mutasyonu gözlenmiştir (49).

Buna karşı AH'nda tau mutasyonları oluşmamaktadır (50). Ancak serebrospinal sıvı içerisindeki fosforile olmuş tau ve total tau miktarlarının artması ile kavramsal incelemelerde alınan skorların düştüğü gözlenmiştir (51). Kavramsal bozuklukları az olan Alzheimer hastalarının erken teşhisinde, T181 ve T231 fosfo tau amino asit düzeylerindeki artışın ve serebrospinal sıvıdaki toplam tau miktarının biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (52). Yapılan çalışmalarda tau agregasyonunun A β birikimine öncü olduğu gösterilmiştir (53). Buna ek olarak A β tarafından uyarılmış nöron kültürlerinin dejenerasyonu ve Alzheimer hastası olan farelerdeki kavramsal bozuklukların oluşabilmesi için endojen tau'ya ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir (54). Yaşlanma ile doğru orantılı olarak oksidatif stresin artması, endoplazmik retikulumun katlanma fonksiyonlarının zarar görmesi sonucu oluşan bozulmuş proteinler ve bu proteinlerin temizlenmesinde proteozomun yetersizliği, AH'nda A β ve tau proteinlerinin birikimini artırmaktadır (55,56).

2.2.3. AH Patolojisi: Sinaptik Bozulma

Yapılan çalışmalarda, AH'ndaki sinaptik kaybın bilişsel bozukluklarla en uyumlu patoloji olduğu gösterilmiştir. AH'nın tedavisinde, ilerlemesinin yavaşlatılmasında ve bilişsel-fonksiyonel yeteneklerin korunmasında, hastalığın erken evrelerinde oluşan sinaptik fonksiyon kaybı ve bozukluğu önemli bir hedeftir. Birçok çalışmada Alzheimer hastalarının beyinlerinin çeşitli bölgelerinde sinaps yoğunluğunun azaldığı gösterilmiştir (57). Bilişsel bozukluğu minimal olan hastalarda ilk olarak hipokampal sinapslar azalmaya başlar ve bu demansın başlangıcı olan kısıtlı kavramsal bozuklukların oluşmasına neden olur (58). AH'nın başlangıcında, presinaptik vezikül proteini olan sinaptofisinde %25 oranında azalma görülür (59). Hastalığın ilerlemesi ile beraber sinapslar, nöronlara oranla daha fazla miktarda azalma gösterir. Bu kayıpların, demansın gelişmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (60). Yaşlanmanın kendisi de sinaptik kayıplara neden olur (61) ve yaşlanmadan özellikle hipokampusun dentat bölgesi etkilenir (62). Tek uyarıların bazal iletimi ve uzun süreli potansiyelizasyonu, sinapslardaki hafıza oluşumunun deneysel göstergesidir. Plak yapısına sahip AH olan farelerin beyin kesitlerinde bunun bozulduğu gösterilmiştir (63,64). Bu bozulmanın devamında hafıza için önemli olan sinyal molekülleri inhibe olmaktadır. Presinaptik nörotransmitter ve

postsinaptik glutamat reseptörlerinden iyon akımının (65,66) bozulması, genel olarak N-metil-D-aspartat (NMDA) yüzey reseptörleri (67) ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokzole propionik asidin yüzey reseptörlerinin endositozu ile oluşmaktadır (68). Normal yaşlanmada da sinapslar arasındaki dengede bozulma gerçekleşir. Nöronlar arası A β , bu sinaptik bozulmaları daha önceden tetikleyebilir (69).

Son çalışmalarda, nöron büyüme faktörü ve beyin-türevli nötrofik faktör gibi nöropillerin, nöronlarda sinaptik esnekliği düzenleyen koruma faktörleri olduğu gösterilmiştir (70).

Sinaptik fonksiyon bozukluğu, AH'nda erken görülen bir olaydır ve nöron kaybından önce görülür. Bu şaşırtıcı değildir çünkü dendritler, nöron yüzey alanının geniş bir kısmını oluştururlar. Gövdeden uzaklığı nedeniyle sinaptik bölge, hücre içi sinyalizasyonu ve aksonal iletişimi bozan işlemlere karşı kısmen savunmasız olabilir. Bu durum dejeneratif bunamalarda görülür. Sinaptik bozuklukta, sinaptik proteinlerin ve membran lipidlerinin kaybı, veziküler fonksiyonun bozulması ve esneklik fonksiyonlarının kaybı gibi çeşitli mekanizmalar rol oynar. AH'nın patofizyolojisinde, oksidatif stresin rolü olduğu bilinmektedir ve serbest radikallerin birikimi beyinde aşırı lipid peroksidasyonuna ve nöron kaybına yol açabilir (57).

2.3. AH'nın Etiyolojisi

AH iki ana tipten meydana gelir. Erken başlangıçlı tip veya presenile AH ve geç başlangıçlı tip veya sporadik AH olarak isimlendirilir. Erken başlangıçlı tip olarak isimlendirilen hastalarda ilk semptomlar 65 yaşında önce gerçekleşmeye başlar. Erken başlangıçlı tip dünya çapındaki Alzheimer hastalarının %5'ini oluşturur ve genellikle genetik mutasyonlar sonucu meydana gelir (71). 21. Kromozomda bulunan APP genindeki çeşitli mutasyonlar, 12. Kromozomda bulunan presenilin 1 (PS1)'de çeşitli mutasyonlar, 1. kromozomda bulunan presenilin 2(PS2)'de çeşitli mutasyonlar otozomal-dominant olarak kalıtılır (72). PS1 ve PS2 mutasyonları γ -sekretaz aktivitesini artırarak agregre olabilme kabiliyeti yüksek A β (1-42) peptidinin üretimini artırır. Bu da 40 yaşından önce görülen AH'nın en agresif formuna neden olur. Ancak APP, PS1 ve PS2'deki mutasyonlar erken başlangıçlı tipin %30'unu oluşturur. Erken başlangıçlı tipi oluşturan diğer mutasyonlar bilinmemektedir (73).

Geç başlangıçlı AH tipi, hastaların %95'ini oluşturur. Geç başlangıçlı tip için kesin nedenler hala tam olarak bilinmemektedir. AH'nın gelişimine neden olan birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Ancak bilinen en önemli faktör yaşlanmaktır (74). Diğer risk faktörleri sigara, beslenme şekli, hipertansiyon, kalp hastalığı, hiperkolesterolemi ve diabetes mellitusu içerir (75,76). Geç başlangıçlı tipte risk faktörü olarak tanımlanan tek gen apolipoprotein E (apoE) olarak isimlendirilen kolesterol taşıma proteininin $\epsilon 4$ allelidir (77,78).

ApoE, 3 izoformu bulunan 34-kDa'luk kolesterol taşıma glikoproteinidir. İzorformları apoE- $\epsilon 2$, - $\epsilon 3$ ve - $\epsilon 4$ 'dür. ApoE en fazla karaciğerde sentezlenir ve karaciğerden sonra en fazla sentezlendiği organ beyindir. Beyinde temel olarak astrositlerden ve az miktarda mikroglialardan sentezlenir (79,80). Ayrıca astrositlerden çok daha az miktarda nöronlar da çeşitli koşullarda apoE sentezlerler (81,82). Genetik epidemiyoloji çalışmalarında en genel form olan $\epsilon 3$ ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, bir apoE- $\epsilon 4$ allelinin kalıtılması AH'nın gelişimine yönelik risk faktörünü 2-5 kat, iki $\epsilon 4$ allelinin kalıtılması ise risk faktörünü 4-10 kat artırır (83). E4 allel ayrıca AH başlangıcında yaşlanma ile ilişkilendirilmektedir (84). Bunun aksine $\epsilon 2$ allelinin kalıtımı AH patogeneze karşı korur (85).

ApoE bir hasar sonucunda nöron koruması sağlamak veya hasarlı nöronu tedavi etmek için üretilir ve membrana kolesterol taşır. Ancak apoE4 bu siyal sürecinde nöronlar arası proteolize duyarlı olduğu için diğerlerine göre daha az etkilidir (86). Kolesterol taşıma kapasitesi dışında apoE, A β 'yı bağlayarak daha kararlı bir form oluşturur ve bu şekilde A β 'yı beyinden periferlere taşımayabilir. Yapılan bir çalışmada A β 'nın aktif bir şekilde beyinden kana olan bu taşıma verimliliğinin apoE4'de diğerlerine göre çok daha az olduğu gösterilmiştir (87). ApoE4-A β kompleksi diğer ApoE'lere oranla, lipoprotein reseptör ilgili protein 1 ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri ile daha az ortadan kaldırılırlar (88,89). Bu da insan apoE4 sentezleyen farelerde insan apoE3 sentezleyen farelere göre daha fazla A β birikimi olduğunu açıklayabilir (90).

2.4. AH'nda Enflamasyonun Rolü

AH'ndaki enflamatuvar süreçte görev alan temel faktörler mikroglialar, astrositler, nöronlar ve beyindeki homeostaz ve fonksiyonlarda kritik rol oynayan diğer hücresel bileşenlerdir (91).

2.4.1. Mikroglialar

Mikroglialar, nöronlar ve nöronların merkezi sinir sistemindeki (MSS'ndeki) fonksiyonlarını koruyan, destekleyen ve MSS'nin endojen immün cevabını kontrol eden hücrelerdir. Mikroglialar genel olarak mezodermal türevli makrofajlardan (92) meydana gelirler ve majör histokompatibilite kompleksi tip II (MHK II), pro-enflamatuvar sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri ve komplementer proteinleri eksprese ederler (93).

Mikroglialar, A β ve nörit plaklar gibi patolojik lezyonlara karşı oluşturulan hücresel cevapta merkezi bir rol oynarlar (94). A β , mikrogliaları etkileyerek aktive olmalarına neden olur ve mikroglialar beyindeki A β birikintilerinin etrafında kümeleşmeye başlarlar. Mikrogliaların A β 'ya maruz kalmaları, mikrogliaların aktivasyonuna neden olur ve bunun sonucunda hücre yüzeyinde MHK II artışı ile beraber pro-enflamatuvar sitokinler interlökin 1 β (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6), tümör nekroz faktörü α (TNF- α) ve kemokinler interlökin 8 (IL-8), makrofaj enflamatuvar protein 1 α , monosit kemoatraktan protein-1'in salımlarında miktar artışı gerçekleşir (95). A β 'nın ortamda bulunması ile makrofajlar, kemokinlerin güçlendirilmesi için periferel dolaşımdan KBB'ne geçer ve bu şekilde enflamatuvar yükün artışına neden olurlar (96). Mikrogliaların aktive olmasına neden olan bir diğer A β potansiyel mekanizması ise gelişmiş glikasyon sonuç proteinleri ve makrofaj koloni-stimüle edici faktör (M-CSF) reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir. Bu reseptörler A β 'yı bağlar ve hücresel aktivasyona neden olacak sinyallerin oluşmasına neden olurlar. M-CSF'ün kendisi mikroglial kemotaksi, proliferasyonu indükler ve hücre hayatta kalımını artıran makrofaj temizleyici reseptör ekspresyonunu artırır (97).

Genomik düzeyde de incelendiğinde, AH ile ilişkili enflamasyonda bulunan transkripsiyon faktörlerinin, Alzheimer hastalarının beyinde bulunduğu gözlenmiştir. C/EBP ailesine ait transkripsiyon faktörleri proteinlerinden biri olan C/EBP- β 'nın mikroglialar tarafında eksprese edildiği görülmüştür ve bu proteinin IL-6, interlökin

1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-8, TNF- α , granülasit koloni stimüle edici faktör, indüklenabilir nitrik oksit sentaz, lizozom, hemopeksin, haptoglobülin , α 1-asit glikoprotein, serum A1, A2, A3, komplementer C3 ve C-reaktif protein gibi çeşitli enflamatuvar aracı proteinlerinin regülasyonunda görev aldığı gösterilmiş (98) ve ayrıca ekspresyonunun AH olan ve olmayan korteks ile karşılaştırıldığında, AH olan kortekste önemli derecede artış gösterdiği saptanmıştır (99).

2.4.2. Astrositler

Astrositler beyinde en fazla bulunan hücrelerdir. Fonksiyonel kapasiteleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak astrositlerin beyindeki bağ dokusu ve iskelet fonksiyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Astrositler, nöronların aktivitelerini etkileyerek veya kontrol ederek, nöronların sinapslardaki fonksiyonel bütünlüğünün korunmasını sağladığı ve beyin fonksiyonlarında aktif rol oynadığı düşünülmektedir. Beyin hasar gördüğünde astrositlerin iyileşme sürecine glial yara dokusu oluşturarak yanıt verdikleri düşünülmektedir.

AH ile ilişkili enflamasyon sürecinde astrositlerin rolünün belirlenmesi güçtür ancak AH'nda senil plakların reaktif astrositlerle bağlantılı olduğu ve A β birikintilerinin etrafında astrosit kümelerinin bulunduğu bilinmektedir (100). Bu astrositlerin interlekinler, prostoglandinler, lökotrienler, tromboksanlar, koagülasyon faktörleri, komplementer faktörler, proteazlar, proteaz inhibitörleri gibi çeşitli pro-enflamatuvar moleküllerin salımına mikrogliyalara benzer şekilde neden olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.1) (101).

Tablo 2.1. AH’nda mikroglialar ve astrositler tarafında salgılanan moleküller ve ürünler.

Mikroglialar	Astrositler
Komplementer Proteinler	Komplementer Proteinler
Komplementer İnhibitörler	Komplementer İnhibitörler
A β	A β
Sitokinler ve Kemokinler	Sitokinler ve Kemokinler
IL-1	IL-1
TNF- α	TNF- α
IL-6	IL-6
IL-8	IL-8
MIP-1	S100
Reaktif Oksijen Türleri	COX-2
MCH II	

AH’na sahip beyin dokusunun elektron mikroskobu ile incelenmesi astrositlerin işlevinde A β varlığını ortaya çıkarmıştır (102). Bu sonuç, astrositlerin A β sentezi veya fagositozu ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Başka bir çalışmada astrositlerle ilişkili A β granüllerden meydana gelmiş yeni bir tip difüze plak belirlenmiş ve bu sonuç doğrultusunda astrositlerin A β üretimi yerine fagositozunda görev aldığı düşünülmüştür (103). Başka bir çalışmada fare astrositleri ile A β degradasyonu *in vivo* ve *in situ* ortamda gösterilmiştir (104). Bu sonuçlar doğrultusunda A β birikintileri etrafında kümeleşen astrositlerin A β ’yı aktif fagositoza uğrattığını göstermiştir. Senil plakların oluşumunun çeşitli aşamalarında üç boyutlu olarak yeniden oluşturması ile plak oluşumunda mikroglial hücrelerin en önemli faktör, astrositlerin ise plak degradasyonunda en önemli faktör olduğu görülmüştür (105).

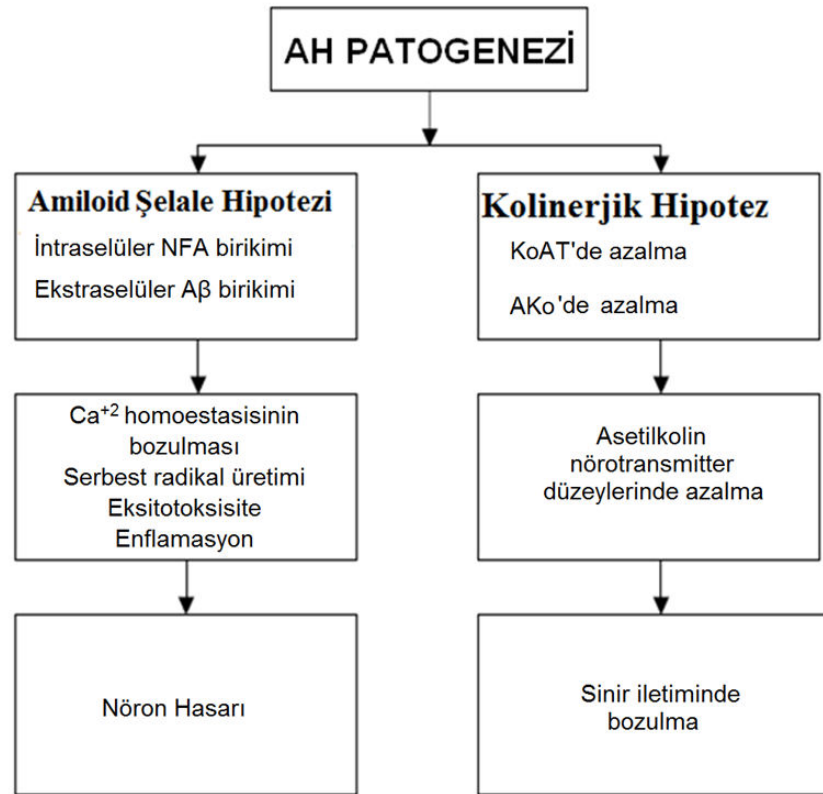
Astrositler, A β ile aktive edilip kemokin, sitokin ve nöronların hasarına yol açacak reaktif oksijen türlerini salgılayabilmektedir (106). Astrositlerden salınan kemokinler, mikrogliaları etkilemekte ve bunun sonucunda nöron hasarına katkısı olan pro-enflamatuar ürünler daha ileri seviyede eksprese olmaktadır.

2.4.3. Nöronlar

Nöronlar, AH'ndaki enflamatuar sürece enflamatuar ürünlerin üretilmesi ile katılmaktadırlar. Nöronların IL-1 (107), IL-6 (108) ve TNF- α (109) gibi çeşitli sitokinleri üretebildikleri bilinmektedir. Nöronlar tarafından üretilen bu pro-enflamatuar ürünlerin, enflamatuar süreci daha ileri bir hale getirdiği ve ortamın bu şekilde kötüleşmesinin sonucun olarak nöron toksisitesi ve ölümünün oluştuğu düşünülmektedir.

2.5. AH'nın Moleküler Mekanizması

Hastalığın moleküler mekanizmasının açıklanmasında iki temel hipotez ortaya konulmuştur: “Kolinerjik hipotez” ve “amiloid şelale hipotezi” (Şekil 2.3).



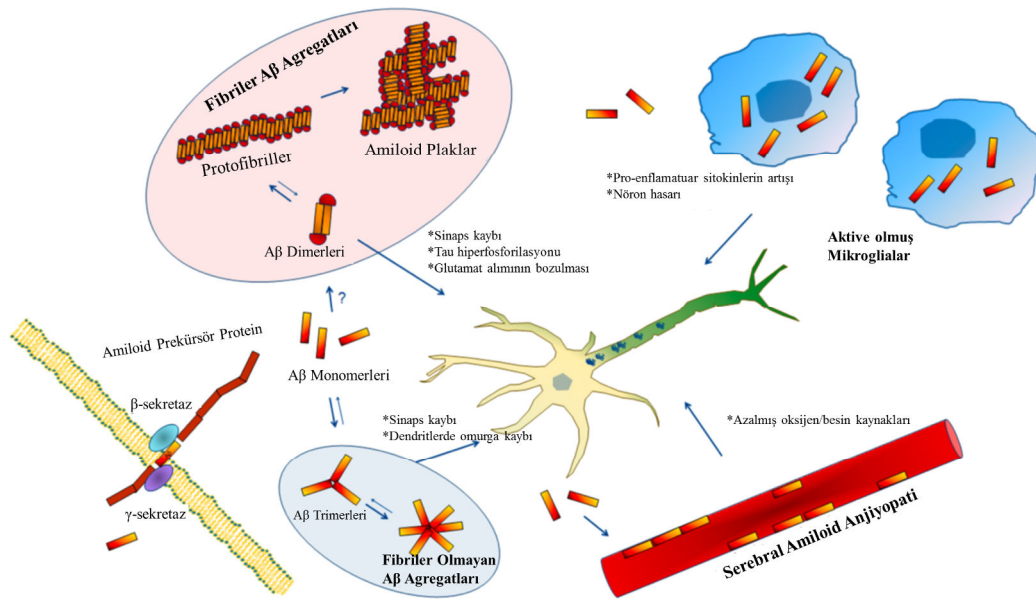
Şekil 2.3. AH'nın moleküler mekanizmasına ilişkin temel hipotezler. NFA: Nörofibriler ağ, KoAT: Kolin asetil transferaz, AKo: Asetilkolin

1. *Kolinerjik hipotez*, AH ile bağlantılı bilişsel, hareketssel ve davranışsal fonksiyon bozukluklarına, kolinerjik sinaps boyunca nöron uyarımının eksikliğinin neden olduğu temeline dayandırılmıştır.

2. *Amiloid şelale hipotezi* ise AH'yi, beyindeki APP'nin normal olmayan bir şekilde kesime uğraması sonucu A β türevlerinin oluşumu, agregasyonu, depolanması ve toksisitesiyle tetiklenen nörodejenerasyon ile açıklamaktadır (8). Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar, amiloid şelale hipotezini büyük ölçüde desteklemektedir (9).

2.5.1. Amiloid Şelale Hipotezi

Amiloid şelale hipotezinde AH'nda gözlenen nörodejeneratif olayların, beyindeki APP'nin normal olmayan bir şekilde kesime uğramasıyla ortaya çıkan A β peptidleri tarafından tetiklendiği ve hastalığın ilerlemesinde bu peptidlerin agregasyonu, depolanması ve toksisitesinin önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (8). Bu hipotez, son yıllarda gerçekleştirilen moleküler ve genetik çalışmalarla büyük ölçüde desteklenmektedir (9) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Amiloid şelale hipotezinin şematik gösterimi (110)

APP, hidrofobik bir amino-terminal hücre dışı kısım, hidrofobik varsayılan tek bir transmembran kısım ve küçük bir karboksi-terminal sitoplazmik kısım içeren, her yerde bulunabilen 770 kalıntılı glikolize bir transmembran proteindir (34). APP, AH'de nöritik plaklarda bulunan A β peptidinin kaynağıdır.

APP iki yolak ile metabolize olmaktadır. Non-amiloidojenik yolakta membrana bağlı proteaz aktivitesi (α -sekretaz) ile APP, $A\beta$ kısmından kesilir ve APP'nin hücre dışında birikmesini engellenir. α -sekretazın metabolizması, protein kinaz C ile ilişkili birçok hücre yüzey reseptörü tarafından stimüle edilebilir. Bu şekilde bu metabolizma, fosfotidilinositol hidrolizi ile bağlantılı olur (111).

Amiloidojenik yolak ise ardışık iki kesim işlemini içerir. APP ilk olarak β -sekretaz ile kesilir ve membrana bağlı 99 amino asit kalıntılı C-terminal ucu (C99) oluşur. Bu daha sonra transmembran kısımda γ -sekretaz tarafından kesilir ve $A\beta$ 'yı ortama verir. Heterojen C terminalinde γ -sekretaz tarafından gerçekleştirilen proteoliz sonucunda iki tane C-terminalli varyant ($A\beta(1-40)$ ve $A\beta(1-42)$) oluşur. Oluşan $A\beta$ 'ların yaklaşık olarak %90'ı $A\beta(1-40)$ 'dır, fakat $A\beta(1-42)$ agrege olmaya daha uygundur ve amiloid birikiminin temel bileşenidir (111,112). Oluşan $A\beta$ 'lerin amiloid fibrillere spontan agregasyonu konsantrasyon bağımlıdır; dolayısıyla beyin interstisiyel sıvısındaki ekstraselüler olarak bulunan $A\beta$ konsantrasyonunu regüle eden mekanizmalar amiloid plak oluşumu açısından önemlidir. $A\beta$ 'nin steady-state (yatışkın) düzeyi, üretimi ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasıyla sağlanır. Genellikle ailesel AH'deki mutasyonların $A\beta$ 'nin fazla üretimi yönünde dengeyi kaydırıldığı bilinmektedir. Buna karşın hastalığın sporadik formlarının $A\beta$ 'nin temizlenme mekanizmalarında meydana gelen bozulma ile ortaya çıktığı öne sürülmektedir.

Beyinden $A\beta$ 'nin temizlenmesi birçok değişik yol ile gerçekleştirilir. Bunlar arasında, reseptör aracılı selüler alım, KBB'den taşınım, mikrogial fagositoz (95) ve $A\beta$ 'nin enzim bağımlı proteolitik yıkımı (113-115) prosesleri yer almaktadır.

Alzheimer hastalarında hastalıkla ilişki olabileceği düşünülen bazı genler tanımlanmış; AH'de ortaya çıkan biyokimyasal değişikliklerle bu anormal gen ve gen ürünleri ilişkilendirilmiştir. AH'nin patofizyolojisinde en az dört gendeki mutasyonların önem taşıyabileceği düşünülmektedir. Bunlar, 21. kromozom üzerindeki APP geninin mutasyona uğraması (116), 19. kromozom üzerindeki apolipoprotein E'nin polimorfizime uğraması (77), 14. ve 1. kromozomlardaki sırasıyla PS1'in ve PS2'nin mutasyonudur (117,118). AH'nin erken evrelerindeki birçok hastada tanımlanan $A\beta$ üretimindeki artışta, hem 21. kromozomdaki APP geninin hem de presenilin geninin mutasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir.

Membrana bağı APP ile türevlenmiş bu protein, iki belirgin yol ile üretilir: (i) A β peptidini oluşturan amiloidojenik yolak ve (ii) A β peptidini oluşmasını engelleyen non-amiloidojenik yolak (APP'nin salgılanan formu olan sAPP α bu yolakta üretilir). Amiloid şelale hipotezini savunan bilim adamları, uzun amiloid peptit olan A β (1-42)'nin üretiminin artması ile amiloid plakların oluştuğunu bildirmektedirler (119).

2.5.2. Kolinerjik Hipotez

Alzheimer hastalarının beyinde, etkili öğrenmede önemli rolü olan nörotransmitterlerden AKo düzeyinde eksiklik saptanmış (2) ve bu veri, "kolinerjik hipotez" in oluşmasına yol açmıştır. Bu hipotez, AH ile bağlantılı bilişsel, hareketsetel ve davranışsal fonksiyon bozukluklarına, kolinerjik sinaps boyunca nöron uyarımının eksikliğinin neden olduğu temeline dayandırılmıştır. Merkezi kolinerjik iletimin, bazal önbevin çekirdeğinin yıkımı nedeniyle eksik olması AH'nin patolojisi açısından önemlidir. AH'nin ilerlemesi sırasında nikotinik reseptörlerin sayıca azaldığı gözlenmiştir ki bu reseptörlerin, hafıza ve bilişsel bozukluklarda rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (2). Son çalışmalar, AH patogenezinde gözlenen bilişsel bozukluklar ile bazal önbevin kolinerjik sistem bozukluğunun ilişkisi olduğunu; A β fibril birikiminin reseptör sinyalizasyonunu keserek veya nörotransmitter salınımını engelleyerek kolinerjik haberleşmeyi olumsuz etkilediğini göstermiştir (120). AH'de beyinin temporal lobu, frontal ve paryetal kortekslerinde KoAT aktivitesinde azalma görüldüğü; bu azalmanın Meynert bazal nukleusundaki kolinerjik nöron kaybıyla uyumlu olduğu bildirilmiştir (121,122). Hastalığın ileri safhalarında bütirilkolinersteraz (BuKoE) aktivitesinin de arttığı gösterilmiş; BuKoE inhibitörlerinin kullanımının AH gelişimini yavaşlatabileceği öne sürülmüştür (123).

2.6. AH'da Tedavi Stratejileri

AH bir yüzyıldır bilinmesine rağmen hastalığın tedavisi için Amerikan ilaç ve gıda dairesi (FDA) tarafından sadece dört kolinersteraz inhibitörü ve memantin onay almıştır. Bu ilaçlar hastalığın ilerleyişini değil sadece semptomlarını tedavi etmektedir. Bu nedenle hastalığın modifiye edilmesi ile ilgili tedavi yöntemleri

popüler hale gelmiştir. Hastalığın patogeneğinde birçok mekanizma bulunduğu için etkili bir tedavi yöntemi geliştirmek zordur.

AH için geliştirilen terapötik stratejiler;

1. Sinir iletimi modülasyonu
 - Kolinesteraz inhibitörleri
 - NMDA reseptör antagonistleri
 - GABAerjik modülasyonu
 - Serotonin reseptör modülasyonu
 - Histaminerjik modülasyon
 - Adenozin reseptör modülasyonu
2. Tau temelli tedavi stratejiler
 - Tau fosforilasyon inhibisyonu
 - Mikrotübül stabilizasyonu
 - Tau oligomerizasyonunun bloklanması
 - Tau degradasyonunun desteklenmesi
 - Tau temelli immünoterapiler
3. Amiloid temelli tedavi stratejiler
 - Sekretaz enzimlerinin modülasyonu
 - Amiloid taşınması
 - Amiloid agregasyonunun engellenmesi
 - Amiloidlerin temizlenmesinin desteklenmesi
 - Amiloid temelli immünoterapiler
4. İntraselüler sinyal yolaklarının modülasyonu
5. Oksidatif stresin azaltılması
 - Ekzojen antioksidan desteği
 - Endojen korunmanın artırılması
6. Mitokondri hedefli tedavi
7. Hücresel kalsiyum (Ca^{2+}) homeostazının modülasyonu
8. Anti-enflamatuar tedavi
9. Diğer tedaviler
 - Gonadotropin desteği

- Lipid modifiye edici ilaçlar – Statinler
- Büyüme faktörü desteği
- Metal şelasyonu
- Epigenetik modülasyon
- Kaspaz inhibitörleri
- Nitrik oksit sentez modülasyonu
- Nükleik asit ilaçları
- Çok-hedefli ligandlar

2.6.1. Sinir İletiminin Modülasyonu

Kolinerjik nöronlar AH'nın patolojisinde temel sinir iletim sistemidir ve aynı zamanda önbeyindeki kolinerjik kayıp da hastalıkta bilinen önemli bir patolojidir. Bu nöronlar, kortikal aktivite, serebral kan akışı, bilişsel modülasyon, öğrenme, görev ve hafıza temelli aktiviteler, serebral korteksin gelişimi, uyuma-uyanma siklusunu kontrol ederler (124,125).

AH'da kolinerjik sistemlerdeki fonksiyon bozuklukları çeşitli seviyelerde gerçekleşir. Örnek olarak, KoAT aktivitesinin azalması, kolin alımının azalması, AKo sentezinin azalması (126) ve AKo reseptör miktarının değişikliğe uğraması (127) verilebilir. Glutamat, beynin hipokampal ve neokortikal bölgelerindeki primer eksitator nörotransmitterdir ve bilişsel, öğrenme ve hafıza işlevinde önemli rol oynar. Post-sinaptik membranda yüksek yoğunlukta glutamat reseptörlerinden biri olan NMDA reseptörü bulunmaktadır. Çalışmalarda AH'nda hücre dışında glutamat birikmesi görülmüştür ve bunu takiben presinaptik glutamat salımında artış ve geri alımında azalma görülmüştür. Bunlar da sonuç olarak NMDA reseptörlerinde tonik aktiviteye neden olmuştur (128). Bunun eksitotoksitesisi, kalp krizi ve epilepsinin akut veya hızlı formuna göre daha yavaştır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile beraber bozulmuş insülin sinyali ve reseptör anormallikleri, fizyolojik konsantrasyonda bulunsa bile glutamat, eksitotoksik sürece hazırlık yapar (129). γ -aminobutirik asit, histamin ve nöronlardaki serotonin sistemi gibi diğer nörotransmitterlerdeki fonksiyon bozuklukları da AH'na neden olmaktadır.

Sinir iletiminin ilaçlar ile modüle edilmesi, hastalardaki semptomatik tedavide hala en iyi yaklaşım olarak kabul edilmektedir.

2.6.2. Tau Temelli Tedavi Stratejileri

Nöronlar genellikle mikrotübülleri stabilize etmek için tau proteinlerini ekprese eder. Tau proteinleri, mikrotübüllerin bir arada kalmasını regüle eder ve bu şekilde nöronların fonksiyonel organizasyonunu kontrol eder, özellikle de aksonların morfolojisini, büyümesini ve polaritesini etkiler (130). Tau proteinlerinin birçok fosforilasyon bölgesi vardır ve tau proteinlerin mikrotübülleri bağlanma özelliği bu fosforile olmuş durumuna bağlıdır. Fosforile olmuş tau proteini mikrotübüllere daha düşük bir afinite ile bağlanır ve bu da mikrotübüllerin stabilitesinin bozulmasına neden olur. AH'da hiperfosforile olmuş tau proteinleri birikir ve çift sarmal filamentlere agregre olur ve bu şekilde mikrotübülleri bağlama ve stabilizasyon özelliğini kaybeder ve dolaylı olarak nöronların degradasyonuna neden olur (131).

2.6.3. Amiloid Hedefli Tedavi Stratejileri

A β fibrilleri AH'nın patolojik özelliklerinden biri olduğu halde bu peptidlerin birçok fizyolojik rolde görev aldığı bilinmektedir (132). A β 'nın patolojik bir moleküle dönüşme nedenleri tam olarak anlaşılmamıştır, fakat konsantrasyon bağımlı olabileceği düşünülmektedir. Üretilmiş A β miktarı temizlenme kapasitesinin üzerine çıktığı zaman birikmeye başlar ve bu miktarı toksik seviyelere kadar çıkabilmektedir. A β -fibril-oligomer-monomerlerinin miktarları arasında dinamik bir denge vardır ve oligomerik türler diğerlerinden çok daha zararlıdır (133). Amiloid temelli tedavi yöntemleri APP metabolizmasının çeşitli özelliklerini hedeflemektedir (134).

2.6.4. İntraselüler Sinyal Yolaklarının Modülasyonu

A β fibriller birçok intraselüler yolağı aktive etmektedir. Bu nedenle bu anormal yolakları bozabilecek ilaçların AH tedavisi için kullanışlı olabileceği düşünülmüştür. cAMP sinyali ve nitrik oksit/cGMP/cGMP-bağımlı protein kinaz/cAMP cevap elementi-bağlama protein kaskatı başlıca A β ile indüklenmiş sinaptik eksiklik ve AH ile ilişkili hafıza kaybı ile belirgin bir şekilde ilişkilidir (135). Bu işlevlerin ışığında fosfodiesteraz (FDE) inhibisyonu deneysel modellerde çeşitli faydalar sağlamaktadır. Kafein, etazolat FDE inhibisyon aktivitesine sahiptir ve farmakolojik etkilerde rol oynayabilmektedir. Rolipram, FDE-4 selektif

inhibitördür ve A β uygulanmış farelerde hafıza ve bilişsel bozuklukları başarılı bir şekilde geri çevirmiştir (136). Buna ek olarak sildenafil benzer sonuçlar vermiş FDE-5 inhibitörüdür (135).

Ayrıca AH'da bozulmuş lipid sinyal yollarının varlığı dikkat çekmektedir. AH hayvan modellerinde A β indüklenmiş patogeneze, araşidonik asit ve fosfolipazlar anahtar rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda AH'na sahip hastalarda ve aynı zamanda AH modeli oluşturulmuş transjenik hayvanların hipokampusünde aktive olmuş fosfolipaz A2 grup IV izoformlarının arttığı gözlenmiştir (137). Bunlara ek olarak fosfolipaz A2'nin sıçanlarda ortadan kaldırılmasının sıçanları bilişsel hasarları ve total tau protein miktarını azalttığı gösterilmiştir (137,138).

2.6.5. Oksidatif Stresin Azaltılması

Nöronlarda meydana gelen oksidatif hasarın, AH'nın oluşma riskini artırdığı; radikal yakalayıcıları, kalsiyum kanal blokörleri ve metal şelatörlerinin A β peptid birikiminin nörodejeneratif etkilerini azalttığı rapor edilmiştir (50). A β fibriller, nörofibriller ağ, mitokondriyal anormallikler, yaşlanma nedeniyle artan oksidatif stresin yol açtığı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu nörodejenerasyona neden olmaktadır (49). E ve C vitaminleri, ubikinon, lipoik asit, beta-karoten, melatonin, kurkumin gibi doğal antioksidanların ve bazı sentetik antioksidanların AH'nda koruyucu ve nörodejenerasyonu durdurucu etkisi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (64).

2.6.6. Mitokondriye Özgül Tedavi Stratejileri

Genellikle kullanılan antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında kullanılır, fakat tedavi için reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan ana kaynağı hedeflemek daha anlamlı olarak görülmektedir. Bu nedenle birçok hastalığın tedavisi için ilaçları mitokondriye hedefleme yöntemleri kullanılmıştır. Koenzim Q10 desteğinin potansiyel olarak nöroprotektif etkisi olduğu ve aynı zamanda ROS üretimini baskıladığı, ROS bağımlı hasarı azalttığı, mitokondriyal fonksiyonları stabilize ettiği gösterilmiştir (139).

AH patolojisinde mitokondriyal dinamiklerde oluşan dengesizlik ile fizyon ve füzyon proteinlerin miktarlarında değişiklikler olduğu gözlenmiştir (140). Bu

nedenle mitokondriyal dinamikları koruyabilecek bir ajanın AH için koruyucu etki göstereceği düşünülmektedir. ,

2.6.7. Hücresel Ca^{2+} Homeostazının Modülasyonu

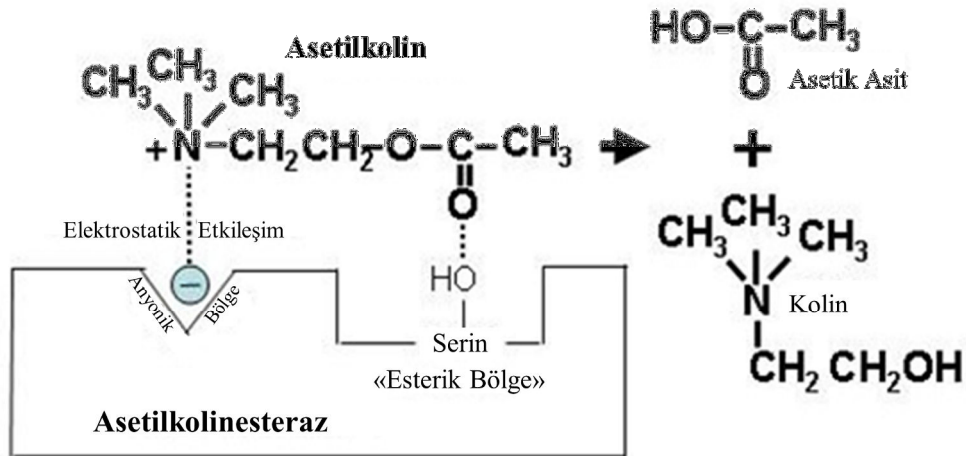
AH'nin temel mekanizmalarından biri bozulmuş Ca^{2+} homeostazıdır. Çeşitli Ca^{2+} sinyal yollarını hedefleyen ilaçların değerlendirilmesi mantıklı görülmektedir. Memantin, Ca^{2+} 'un girişini az miktarda azaltarak eksitotoksisiteyi azaltmaktadır (141). Pre-klinik deneyler ile GluN2B altünitesine sahip NMDA reseptör antagonistleri ve metabotropik mGluR5 reseptörlerinin nöronları A β toksisitesine karşı koruduğu gösterilmiştir (142).

2.6.8. Anti-enflamatuar Bileşikler

AH'nda gözlenen nöroenflamasyonun A β birikimini, AH gelişimini ve nöron kaybını hızlandırdığı öne sürülerek (65) non-steroidal anti-enflamatuar ilaçların AH gelişimini durdurduğu ve AH'nda gözlenen davranışsal bozuklukları düzelttiği rapor edilmiştir (67).

2.7. AKoE

AKoE (EC 3.1.1.7) α/β hidrolaz süper ailesine aittir. Temel fizyolojik görevi, AKo'nin sinaps ve nöromusküler kavşaklarda hızla hidrolize uğrayıp sinir sinyallerinin oluşmasını sağlamaktır (143) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. AKoE’ın katalizlediği reaksiyon

Hedef enzim AKoE’ın iki ayrı ligand bağlama bölgesi olan dar bir geçite sahiptir. İlaç olarak AKoE inhibitörleri temel olarak AH, glokom, nöromusküler blokaj, cerrahi anestezi ve myastenia gravis’in tedavisinde kullanılmaktadır (144). Omurgalılarda iki tip kolinesteraz enzimi bulunmaktadır. AKoE ve BuKoE (EC 3.1.1.8), bu enzimlerin ikisi de AKo hidrolizini etkili bir şekilde gerçekleştirebilir. İki enzim birbirlerinden temel olarak substrat özellikleri, doku dağılımı ve inhibitörlere karşı hassaslıklarına göre ayrılırlar (145,146).

2.7.1. AKoE’ın AH’daki Dual Rolü

Yapılan çalışmalarda AKoE’ın Aβ’nın agregasyonu gibi birçok katalitik olmayan aktivitede görev aldığı gözlenmiştir. AH’na sahip bireylerde, AKoE aktivitesi artmaya başlar ve nörotransmitter AKo’in parçalanmasına yol açar ve bu şekilde beyindeki AKo miktarı azalır. AKoE ve AH arasındaki bir diğer ilişki ise enzimin amiloid plaklar ve nörofibriler ağların formasyonundaki etkisidir. Çalışmalarda AKoE’ın Aβ peptit fragmentlerinin agregasyonunu destekleyerek kompleks ve büyüyen fibrillerin oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu komplekslerin tek başına Aβ fibrillerine göre daha sitotoksik olduğu çalışmalarda belirtilmiştir (147,148). AKoE enziminin Aβ peptit oluşumunu geliştiren yapısal bir bölgesi tanımlanmış ve bu bölgenin enzimin periferik anyonik konumunda bulunduğu belirtilmiştir (149,150). Bunlara ek olarak yapılan çalışmalarda AKoE inhibitörlerinin sadece kolinerjik sinir iletimi değil aynı zamanda toksik Aβ sentezi,

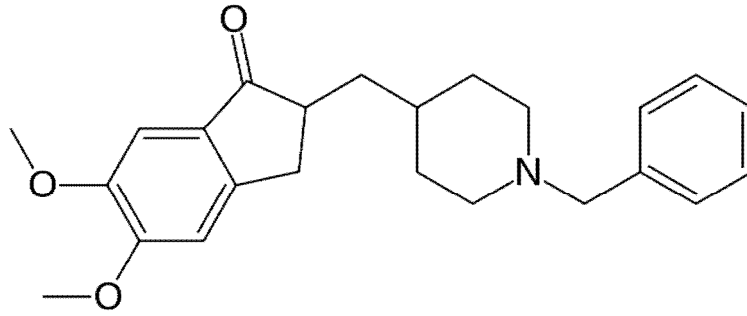
birikimi ve agregasyonunu engellediği de gösterilmiştir. Bu nedenle AKoE inhibitörlerinin AH'nın tedavisinde etkili bir strateji olduğu kabul edilmiştir.

2.7.2. Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin (AKoEI) Çalışma Mekanizması

AKoEI'ler (donepezil, galantamin, rivastigmin), AH'nın hafif evresi ve sonrasının tedavisi için geliştirilmiştir (151,152). Bu ilaçlar, AKoE'ı inhibe ederek, beyindeki AKo miktarının artırıp hastalığı ilerleyici kolinerjik fonksiyonların kaybının neden olduğu hastalık semptomlarını azaltmaya yönelik çalışmaktadır. Yapılan çalışmalarda azalmış AKo sentezinin AH'nın da dahil olduğu demanstaki bilişsel zayıflama ile yüksek derecede ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (153). Buna ek olarak, beyinde artmış AKo konsantrasyonları, kolinerjik nöronlardaki nikotinik AKo reseptörlerinin ekspresyonunu artırdığı (154) ve aynı zamanda glutamat gibi bilişsel fonksiyonları ile ilişkili nörotransmitter sistemlerinin fonksiyonlarını artırdığı görülmüştür (155). Bu nedenle, ilerlemiş Alzheimer hastalarında AKoE miktarları %90'nın altına indiği halde, kolinerjik sinir iletimini desteklediği için AKoE inhibisyonu uygulanabilir bir tedavi stratejisi olarak tanımlanmıştır (156). Bu tedavi yöntemi için yapılan birçok klinik çalışmada AKoEI'lerin hastalardaki bilişsel, fonksiyonel ve genel durumlarında iyileşmeye yol açtığı gözlenmiştir (151). Ancak klinik çalışmalardaki başarıya rağmen AKoE inhibisyonu ve AKo aktivitesinin AH'ndaki semptomatik düzelmenin mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

2.7.3. Donepezil

Donepezil, 1996 yılında AH'nın tedavisi için fizostigmin ve takrinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için geliştirilmiş piperidin temelli kolinesteraz inhibitörüdür (KoEI'dür) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Donepezilin kimyasal yapısı

Donepezil, tersinir ve non-kompetitif bir kolinesteraz inhibitörüdür ve BKoE'a kıyasla AKoE'ı daha özgül olarak inhibe eder (157). KoEI'lerinin BKoE kıyasla AKoE'a özgül olmasının klinik olarak önemi tam olarak anlaşılmassa da, muhtemelen ilgili klinik kolinerjik yan etki insidansının az olması düşünülmektedir. Diğer AKoEI'leri ile karşılaştırıldığında donepezil AKoE enzimin aktif bölge oyuğunu periferik anyonik bölge, orta girinti ve katalitik anyonik bölgesi de dahil olmak üzere tamamen kapatır.

AKoE indüklenmiş A β agregasyonu çalışmalarında, donepezil 100 μ M konsantrasyonda %22 agregasyonu inhibe edici potansiyeli olduğu belirlenmiştir (158).

Farmakokinetik Özellikleri

Donepezilin nöronlarda bulunan AKoE'a karşı ilgili klinik dozlarda yüksek dereceli bir seçiciliği vardır. Plazma ve periferik dokularda bulunan BuKoE'a karşı düşük bir inhibisyon etkisi bulunmaktadır (159). Yapılan hayvan çalışmalarında donepezilin beyindeki AKoE'ı önemli ölçüde inhibe ettiği ancak çizgili, düz veya kalp kasındaki AKoE'ı çok az inhibe ettiği görülmüştür ve donepezilin dokuda da seçicilik gösterdiği belirtilmiştir (160).

Donepezil, iyi emilir ve göreceli olarak oral biyoyararlanımı %100'dür. Emilim oran ve derecesi gıda alımı veya uygulama süresinden etkilenmemektedir (161). Proteine bağlanma oranı çok yüksektir, yaklaşık %96 oranında proteine bağlanarak taşınır. Temel olarak %75 albümine ve %21 α -1-asit glikoproteine bağlanır (162). Yaygın bir biyotransformasyona sahiptir. Donepezil ilk geçiş metabolizmasında dört ana metabolite dönüşür. Bu metabolitlerden ikisi ve küçük

metabolitlerin bir kısmı aktif olarak bilinir. Donepezil, sitokrom P450 izoenzimleri CYP2D6 ve CYP3A4 ile glukuronidasyona uğrar. Metabolizma hızı yavaştır ve doyurulabilir olarak görülmemektedir. Radyoışaretili donepezilin uygulanmasının ardından, plasma radyoaktivitesi temel olarak bozulmamış donepezil (%53) ve 6-O-desmetil donepezil (%11) formunda bulunmuştur. Bu metabolitin *in vitro* ortamda donepezil ile aynı oranda AKoE'ı inhibe ettiği ve plazmada donepezile benzer şekilde %20 oranında bulunduğu rapor edilmiştir (163).

Donepezilin yarı ömrü yaklaşık 70 saattir ve zirve konsantrasyona 3-4 saatte ulaşır (162). Eliminasyonu böbrek ve safrada gerçekleşir. Radyoışaretili donepezilin uygulamasını takiben 10 günlük süre içerisinde geri kazanılan toplam radyoaktivite idrarda %57 (%17 bozulmamış ilaç) ve dışkıda %15 (%1 bozulmamış ilaç); %28'i bulunamamıştır (163).

Preklinik ve Klinik Bilgiler

Yakın zamanda yapılan *in vitro* çalışmalarda donepezil semptomatik düzelme dışında aynı zamanda hastalığı modifiye edici ve nöroprotektif özellikleri olduğu görülmüştür.

AH'nda hücre ölümüne neden olan ve hücre kültürü modellerinde nöroprotektif etki çalışılmalarında kullanılan üç tane sitotoksik ortam vardır: i) oksijen ve glukoz yoksunluğu; ii) ekzojen glutamat; ve iii) A β .

Primer sıçan kortikal nöronlarında yapılan alternatif bir *in vitro* iskemi modelinde, donepezilin hücre küçülmesi ve ölümünü, oksijen ve glukoz yoksunluğundan önce zaman ve konsantrasyon bağımlı uygulaması ile geri çevirdiği görülmüştür (164). Donepezilin oksijen ve glukoz yoksunluğuna karşı olan koruyucu etkisi dışında aynı zamanda glutamat ile indüklenmiş toksisiteye karşı da koruduğu gözlenmiştir (165).

Bir diğer sitotoksik neden A β da aynı zamanda donepezil tarafından pozitif şekilde etkilenir. Inestrosa ve diğerleri (166) tarafından yapılan çalışmalarda AKoE-A β kompleksinin A β -bağımlı nörotoksisiteyi artırdığı ve bunu A β 'nın enzimin periferik anyonik bölgesine bağlanarak artırdığı belirlenmiştir. Donepezil periferik anyonik bölgeye ve katalitik anyonik bölgeye bağlandığı için A β 'nin agregasyonunu inhibe eder ve hücreleri ölüme karşı korur (167). Bu tür bir etki nöroprotektif etkinin

yanında aynı zamanda hastalık modifiye edici olarak da dikkate alınabilir, çünkü bu modifikasyon ile AH'nın ilerlemesi yavaşlatılmış olur (168).

Bunlara ek olarak donepezil aynı zamanda serotonerjik, noradrenerjik, dopaminerjik gibi diğer nörotransmitter sistemlerini de etkiler, bu sistemler de hastalık süresince değişikliğe uğrarlar. Serotonin (5-hidroksitriptamin; 5-HT), kısa süreli ve uzun süreli bellek de dahil olmak üzere çeşitli bilişsel konularda önemli rol oynar. 5-HT'nin etkisi direkt ve indirekt olarak 5-HT'e özgü reseptörlerin aktivasyonu ve kolinerjik, glutaminerjik, dopaminerjik ve GABAminerjik nörotransmitter sistemlerin modülasyonu ile gerçekleşebilir. AH bağımlı 5-HT sinir iletimindeki eksiklikler hızlanmış bilişsel gerileme, psikoz ve ilerlemiş demans ile ilişkilendirilebilir (169). Noradrenalin ise anti-enflamatuar, beyin ilişkili nörotropik faktör artışı, nörogenezin indüklenmesi, amiloid toksisitesinin azaltılması, amiloid ortadan kaldırılması, dopaminerjik ve kolinerjik hücre yardımı ve glutamat stimülasyonu gibi çeşitli özelliklere sahiptir (168).

Donepezil uygulamasının AKoE inhibisyonu dışında ayrıca sıçan beyinde NA'nın (%50/100) ve Dopaminin (%-/80) hücre dışı miktarını artırdığı gözlenmiştir. Buna ek olarak donepezilin, imipramin ile karşılaştırıldığında 5-HT alımını 10 kat daha az etkili biçimde inhibe ettiği görülmüştür. Bu nedenle donepezilin aynı zamanda duyuusal problemleri de ortadan kaldıracı ve Alzheimer hastalarının hayat kalitesini artırabileceği düşünülmüştür (170).

Güncel klinik çalışmalar göz önüne alındığında donepezil hafif ve orta seviyedeki AH'nın semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır. İlaç güvenilir ve iyi tolere edilmektedir. Donepezil ile tedavi edilen hastalarda, ilerlemiş AH'na sahip olan bireylerde bile, bilişsel ilerlemeye ve genel klinik belirtiler ve fonksiyonlarda iyileşmeye neden olacağı düşünülmektedir.

2.8. Kolinerjik Hipotez ve Donepezil

Bozulmuş olan kolinerjik sinyal iletimini düzeltebilmek için farklı birçok strateji geliştirilmiştir. Bunlar arasında AKo sentezinin ve presinaptik AKo salımının artırılması, kolinerjik postsinaptik, muskarinik ve nikotinik reseptörlerin uyarılması ve kolinesteraz inhibitörleri ile AKo'nun sinaptik yıkımının azaltılması yer almaktadır (171).

Kolinesteraz inhibitörleri, AH'nda bozulan sinir iletimini düzeltmeyi amaçlayan semptomatik tedaviye yönelik bileşiklerdir (59). AH'de AKo'nın kortikal aktivitesi düşük olduğu için, sinaptik boşlukta AKo'nın yıkımından sorumlu olan AKoE, başlıca ilaç hedefini oluşturur. Takrin, donepezil ve rivastigmin gibi AKoE inhibitörlerinin AH'de sinirsel iletiyi düzelttiği gösterilmiştir (51).

Donepezil, tersinir ve non-kompetitif bir kolinesteraz inhibitörüdür ve bütirikolinesteraza kıyasla AKoE'ı daha özgül olarak inhibe eder. Periferik dokulardaki kolinesteraz üzerine belirgin etki etmeden beyin kolinesterazının net ve uzun süreli inhibisyonunu sağlarken; *in vivo*'da beyin AKo içeriğini artırır. Donepezil uzun süredir klinik kullanımdadır. Çift kör ve plasebo kontrollü klinik deneyler, donepezilin ılımlıdan ileri seviyelerdeki AH'ye sahip hastalarda bilişsel gelişimi ve global fonksiyonları artırdığını göstermiş ve aynı zaman da mükemmel güvenlik ve tolere edilebilirlik göstermiştir (3). Donepezil günümüzde piyasada günlük bir tablet veya kapsül olarak bulunmaktadır (5 mg veya 10 mg/gün) (172). Günlük tekrarlanan bu oral uygulama hastaların bazıları için elverişlidir fakat ilaç almayı unutabilecek, hafıza kaybından şikayetçi olan AH olan hastalarda kullanımı çok zordur. Ek olarak donepezil diyare, mide bulantısı, anoreksiya ve kas krampları, vb. gastrointestinal yan etkiler de gösterir. Sonuç olarak AH'nın donepezil ile tedavisi için uzun vadeli ve donepezilin GIS tarafından taşınmadığı bir tedavi geliştirmek çok önemlidir. Ayrıca son yıllarda radyoaktif işaretli donepezil kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada donepezilin bütün dokulara yaygın bir şekilde dağıldığı ve hızla metabolize olduğu saptanmıştır (4).

Dolayısıyla donepezilin doğrudan beyne daha da ötesi doğrudan hipokampus ve kortekse hedeflendirileceği bir tedavi stratejisinin geliştirilmesiyle doku dağılımı minimize edilip maksimum miktarda donepezil etki bölgesine ulaştırılabilecektir. Literatürde bu yönde gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Tez kapsamına özellikle donepezilin alınmasının bir diğer nedeni de literatürde donepezilin AH'da ortaya çıkan nöroenflamasyona karşı protektif etkisinin olduğuna dair birçok çalışmanın bulunmasıdır (173-176).

2.9. AH'nın Tedavisi için Beyine İlaç Hedeflendirme

İlaç hedeflendirme, ilaçların istenilen reseptöre, organa veya vücudun diğer bölgelerine özel olarak gönderilmesi demektir. İlaç hedefleme kavramı 1902 yılında “sihirli mermi” adı altında Paul Ehrlich tarafından önerilmiştir. İlaç hedeflendirmede dikkat edilecek noktalar arasında, belirli bir hastalık için uygun hedeflenecek bölgenin bulunması, hastalığı en etkin tedavi edecek ilacın seçimi ve immünojenik veya özel olmayan etkileşimlerle vücuttaki yabancı maddeleri temizleyen sistemlerden uzak durabilecek ve ilacı stabil olarak taşıyabilecek taşıyıcı sistemlerin seçimi ve sentezi sayılabilir (177). Beyine hedeflendirme, farmasötik araştırma yapan bilim adamları için en zorlu işlemlerden birisidir, zira birçok ilaç ve nöropeptid KBB’ni geçememektedir (178). Beyin, çok hassas bir organdır ve evrim onu korumak için etkin yollar oluşturmuştur. Ama aynı mekanizma tedavi için yapılacak müdahaleleri de boşa çıkarmaktadır (179). KBB, karmaşık sıkı kavşaklar ile bağlanmış tek tabakalı polarize endotel hücrelerinden (EH’inden) oluşmuştur (180). KBB’nin fonksiyonlarını astrosit, nöron ve perisit gibi çeşitli hücreler dinamik olarak kontrol ederler (181). EH, diğer hücrelerden tip IV kollajen, laminin, fibronektin, heparan sülfat bileşenlerinden meydana gelen bazal lamina içermesiyle ayrılır. Bu yapılar, negatif yüklü arabirim sağladıkları için ilaç taşımada kullanılabilirler. Omurgalı beyinde ve omuriliğinin kılcal damarlarında, çözünen maddenin hızlı hareketlerle diğer organlar içerisinde dolaşmasına izin veren küçük gözenekler yoktur. Mikrodamarlar, KBB’nin yüzey alanının %95’ini oluşturur ve kimyasalların beyine girebileceği en önemli yeri temsil eder (182). Beyin damarlarının diğer vücut damarlarına göre daha dar çaplı ve ince duvarlı olduğu bilinmektedir. Beyin mikrodamarlarındaki mitokondri yoğunluğunun da vücuttaki diğer kılcal damarlara göre daha yoğun olduğu bulunmuştur (183). MSS bozukluk/hastalıklarında kullanılmak üzere tasarlanan ve umut vaat eden birçok ilaç, KBB’yi geçmekte zorlandıkları için farmasötik etkilerini kaybetmektedirler. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için birçok strateji uygulanmaktadır. Bunlar arasında kimyasal ilaç taşıma sistemleri (184), manyetik ilaç taşıma sistemleri, ozmotik yollarla sıkıştırılmış kavşakların açılması (185), veya belirli taşıyıcı sistemler örneğin; antikorlar, lipozomlar (186), nanopartiküller sayılabilir. Nanopartiküller, ilaç taşıma sistemi araştırmalarında önemli bir yere sahiptirler (187). İlaç, nanopartiküllere veya

nanopartikül hazırlama aşamasında polimer matriks içine dağıtılarak veya enkapsüle edilerek, veya oluşmuş partikül yüzeyine adsorbsiyonla yüklenebilir (188). Nanopartiküller, iv taşıma için daha uygun oldukları için mikropartiküllere göre daha kullanışlıdır ve hidrofobik ve hidrofilik ilaçlar, proteinler, aşılar ve biyolojik makromoleküller gibi birçok yapının taşınmasında başarı sağlamaktadırlar (187).

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

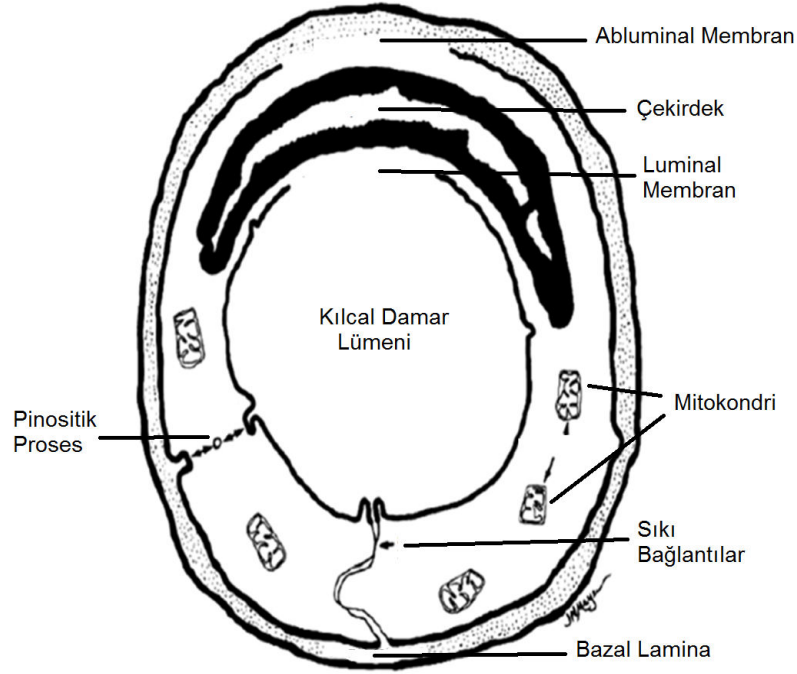
2.10. KBB

KBB, beyni patojen ve toksinlere karşı koruyan homeostatik bir koruma mekanizmasıdır. Komplekstir ve sıkı denetlenir. KBB, biyokimyasalları, fizikokimyasalları ve periferdeki maddesel yapıları görüntüler ve bu yolla bariyer seçiciliğini yaratıp istenilen moleküllerin beynin parankimasından geçişini sağlar (118).

2.10.1. KBB'nin Biyolojisi

KBB, serebral kapiller anjiyogenez ile oluşur. Şekil 2.7'de serebral kapiller tarif edilmektedir, Şekil 2.8'de ise KBB'nin özellikleri gösterilmektedir. Anjiyogenez sırasında EH, mikrovasküler ağı oluşturmak için hücre dışı matrikse çapraz bir şekilde geçer ve membranın altına degrade olur (118,119). Daha sonra proliferasyon gerçekleşir. EH'nin proliferasyonu nötral belirleyicilerden etkilenir. Bunlar KBB'ye karakteristik fizyolojik özelliklerini sunar ve bu şekilde serebral EH periferdeki EH'den farklı olur. Örneğin beyindeki EH'nin periferdeki EH'lere göre daha az endositotik damarı vardır ve bu şekilde KBB'ye olan transsellüler akım kısıtlanmış olur. Yüksek elektriksel dayanıklılığı olan sıkı bağlantılar, hücrelerarası akışa karşı bariyer oluştururlar ve beyindeki EH'lerle birleşirler. Ayrıca serebral

EH'lerin, periferdeki EH'lere göre daha fazla mitokondrisi vardır ve bu hücreler KBB'deki iyonik gradienti sabit tutmak için gerekli metabolik iş yükünü sahiplenmiş olurlar (119).

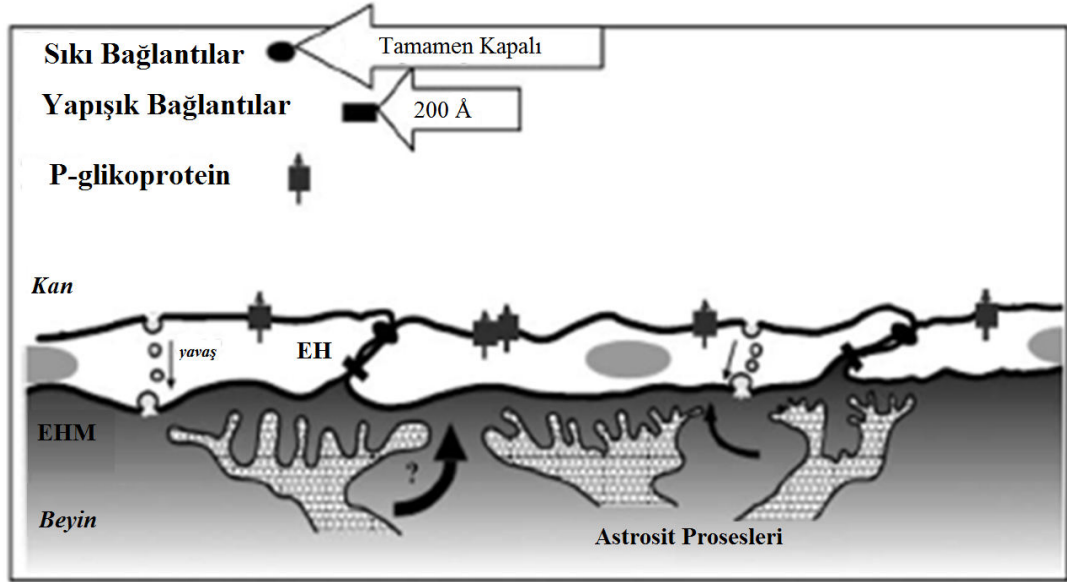


Şekil 2.7. KBB'deki karakteristik serebral kapillerlerin şematik olarak gösterimi (189).

Alt membrandaki elektronca yoğun tabakalar, EH'lerle astrositleri kaynaştırırken, hücre dışı alanı çevreleyen EH'ler ve perisitleri ayırırlar. Perisitler, serebral kapillerin dış eksenini boyunca bulunurlar ve kasılmada görev alırlar. Bu yakın ilişki ve fonksiyon, kan akışının izlenmesine yardımcı olur. Bu şekilde perisitlerin adezyonu ile birlikte mikrodolaşım, dolaylı olarak EH aktivitesi ve KBB taşınması kontrol edilmiş olur. Perisitler aynı zamanda hücre proliferasyonunu inhibe ederek, endotel büyümesini ve gelişmesini kontrol ederler (22). Buna bağlı olarak anjiyogeneze de rol oynayarak tezat iki görevde rol almış olurlar (112).

Astrositler, bazal kapiller membranların %99'undan fazlasını sararlar (40). Buna ek olarak KBB'nin yüksek hücrelerarası elektrik direncinin uyarılmasında rol oynarlar. Sadece 20 nm'lik boşluk, astrositleri EH'lerden ve perisitlerden ayırır. Üç hücre arasındaki etkileşimler madde taşınmasında önemli rol oynar. Kandan beyne doğru olan moleküler yol, ilk olarak astrositik prosesden ileri hareket etme ile

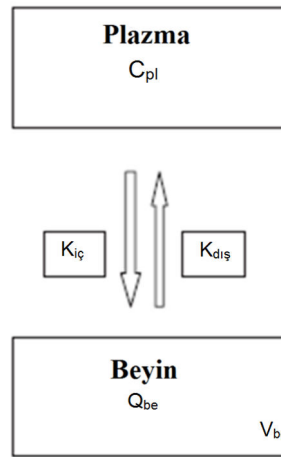
gerçekleşir. Daha sonra perivasküler boşluktan geçer ve oradan da kapillerin sınırındaki perisitlere hareket eder. Sonuç olarak taşıyıcılar, reseptörler, astrosit ve perisitlerin plazma membranındaki enzimler, maddelerin EH'ye ulaşmadan önce akıbetine karar verirler (44,45).



Şekil 2.8. KBB'nin yapısının şematik gösterimi (189). EH: Endotel Hücreleri, EHM: Endotel hücresi multimeri.

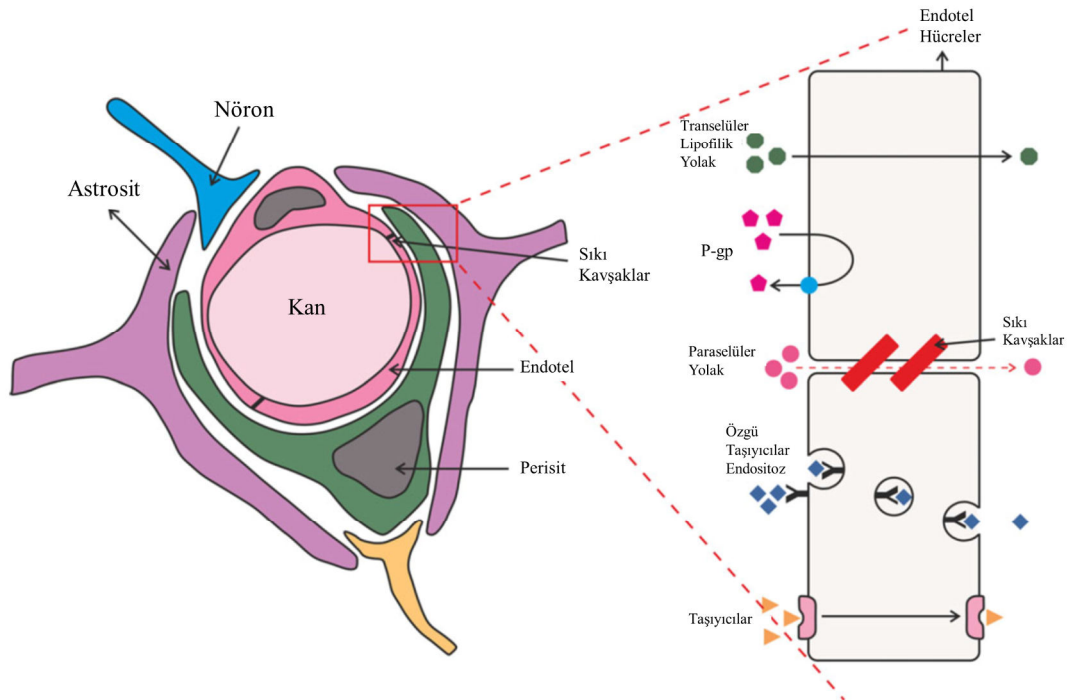
2.10.2. KBB'nden İlaç Taşınması ve Hedeflendirme Mekanizması

KBB, çembersel, seri halinde dizilmiş polarize luminal (apikal) ve abluminal (bazal) endotel membrandan ve diğer dokulardan meydana gelmektedir (190). Maddelerin beyine girebilmeleri için membran setlerinden geçmeleri gerekmektedir. Bu da KBB'nin denetlenmesini dinamik hale getirir. Bariyer, gerekli besin, hormon ve vitaminleri alır, enzimatik aktivite aracılığı ile de birçok peptidi ve nörotransmitteri parçalar. Bunlara ek olarak, enerji gerektiren toksin dışa akış mekanizması, serebral canlılığın korunmasına zarar verecek maddeleri ortadan kaldırarak yardımcı olur. Kinetik akış analizleri, maddelerin tek yönlü derişim bağımlı hareketlerini ortaya çıkartmıştır (191) (Şekil 2.9). Akışın yönü plazmadan beyne veya beyinden plazmaya doğrudur. Bu iki parametre içe akış ve dışa akış olarak tanımlanır.



Şekil 2.9. Derişim bağımlı madde taşınımının şematik gösterimi (192).

Bu iki tek yönlü oran arasında net akış birbirinden farklıdır ve KBB'nin doğasından doğrudan etkilenir. KBB akışı, MSS'de ilaçların terapötik derişimlere ulaşmasında önemli bir belirteçdir. KBB'ni birçok taşıma mekanizması tanımlar (Şekil 2.10). Kapillerden en rahat küçük lipofilik moleküller geçer. Yüklü, büyük veya hidrofilik moleküllerin KBB'den geçebilmesi için kapılı kanallar, ATP, proteinler ve/veya reseptörler gerekmektedir (193).



Şekil 2.10. KBB'nde taşınım mekanizmaları (194). Pgp: P-glikoprotein

KBB'deki taşıma mekanizması, beyne ilaç hedefleme için ayarlanabilir (Şekil 2.10). Doğal olarak en ideal ilaçlar küçük, lipofilik, hidrofobik ve kompakt (polar yüzey alan ile ölçülebilen bir parametre) olanlardır. Fizikokimyasal faktörlere rağmen biyolojik sistemin içerisindeki ilaç adayının doğası, ilaç tasarımı için çok önemlidir. Periferik dolaşımda sistematik enzim saldırıları ve plazma proteini opsonizasyonu, ilacın beyne ulaşmadan önce metabolize olmasına neden olabilir. Dahası hücre salımlama olasılığı ve ilacın kan dolaşımından temizlenme oranı ilaç hedeflemede düşünülmesi gereken ek sorunlardır. Aday ilacın beyindeki atılım oranının anlaşılması çok önemlidir. Buna bağılı olarak ilacın kandaki derişiminden yola çıkılarak beyindeki derişimine odaklanılmalıdır. İlacı tasarlarırken, ilaç derişimini, lipofilikliği ve polar yüzey alanı gibi birçok parametrenin göz önüne alınması gerekmektedir. Dışa akış proteinleri ve KBB'de oluşabilecek diğerk engeller, ilaç beynin iç kısımlarına girmeden önce ortadan kaldırılmalıdır (193).

2.11. Hücre Temelli KBB *in vitro* Modelleri

In vitro KBB modelleri, sıkı kavşakların açılması ve kapanma mekanizmasının anlaşılması için gereklidir. Bu tür *in vitro* modeller aracılığı ile i) terapötik ajanların veya toksik materyallerin KBB'den geçişi incelenebilir ve ii) beyne metastazı gerçekleştirebilen malignan hücrelerin altında yatan mekanizma incelenebilir.

Bunlara ek olarak *in vitro* modeller ilaç endüstrisi tarafından gerek duyulan en önemli kriterleri yerine getiren yararlı teknikleri olma potansiyeline sahiptir. "Mükemmel" bir model *in vivo* durumunun tüm özelliklerini taklit eder; ancak maliyet, kapasite, zaman ve tahmini değerler arasında makul bir uzlaşmanın olması gerekir (195). Yararlı bir KBB modelinin belirli bazı kriterleri sağlaması gerekmektedir (196). Bu kriterler, çözünen geçirgenliğinin tekrarlanabilir olması, sınırlayıcı paraselüler yolun varlığı ve fizyolojik olarak gerçekçi yapı ve taşıyıcı ekspresyonlarının fonksiyonel olması ve kültürünün kolay yapılabilmesi şeklinde özetlenebilir.

Son birkaç yıl içerisinde KBB modelleri alanındaki çalışmalarda geniş bir varyasyon artışı yaşanmaktadır. Bu varyasyonlar tür seçimi, ko-kültür yapılmış hücrelerin tipleri, farklı hücre hatları ve kültür koşullarıdır. Bunları çoğu yeni model

olarak kabul edilemez, ancak varolan modellerdeki yeni eğilimler teknolojinin gelişmesine neden olmuştur.

Serebral tek tabakalı EH'leri ilaç kaynaklı hücre içi sinyal ve toksisite gibi birçok çalışma için faydalı olsalarda tek başlarına KBB modeli oluşturmazlar, çünkü dolaşım bölümünden beyin bölümüne olan akışı yansıtamazlar.

2.11.1.Endotel Mono-Kültürler

En basit *in vitro* KBB modelleri yarı saydam zarlar üzerinde EH'inin serebral monokültürleridir. Gözenek büyüklüğüne bağlı olarak zardaki gözenekler aracılığıyla apikal ve bazolateral bölmeler arasında madde alışverişi sağlanır. Bu şekilde selüler madde alışverişinin izlenmesine olanak sağlar. Bu model, farklı kökenli EH'inin kullanımını sağlar; en yaygın olarak sıçan, fare, domuz, inek, maymun veya insan beyin EH'i kullanılır. Modelin en büyük avantajı basitliği ve düşük maliyet ile yüksek kapasiteli inceleme sağlamasıdır (197). Modelin en büyük dezavantajı ise, nörovasküler biriminin (astrositler, perisitler) diğer hücresel bileşenlerden türeyen uyarıcı faktörlerin yokluğu, yani nispeten düşük bir transendotel elektrik direnci olmasıdır, bu da paraselüler bariyer özellikleri yeterli olmadığı anlamına gelir.

2.11.2. Astrositler ile Serebral Mikrovasküler Endotel Hücrelerinin Ko-Kültürü

Astrositler, karışık bağlantıların (198) ve dışarı akış taşıyıcıları ABCB1 (199) ve ABCG2'nin (200) düzenlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Yakın zamanda gerçekleştirilen proteomik analiz çalışmalarında bovin beyin endotel KBB fonksiyonlarının sıçan glial hücreleri ile ko-kültüründe, temel olarak hücre yapısı, hareketi ve protein metabolizması ve modifikasyonları ile ilişkili 55 proteinde değişiklik olduğunu göstermiştir (201). Astrositlerin serebral endotel üzerindeki etkisini taklit etmek için birçok deneysel ortam dizayn edilmiştir.

Sistemlerden olası olanlarından biri yarı geçirgen membran girintisinin üzerine EH'inin, altına ise astrosit hücrelerinin kültürü yapılır. Bu yöntem ile astrosit ve EH'i arasında doğrudan iletişim sağlar. Başka bir olası yöntem ise astrositlerin girinti sisteminin plak tabanında kültürünün gerçekleştirilmesidir. Bu yöntem ile

çözünebilen faktörlerin etkilerini göstermelerine olanak sağlar. Bu modeller KBB fonksiyonlarının farklı patolojik yönlerinin araştırılmasında yardımcıdır.

2.11.3. KBB *in vitro* Model Etkinlikleri

Çeşitli sayıdaki modeller içerisinde ideal model bulunmamaktadır. Her modelin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Tablo 2.2). İlaç testleri için uygun karakter ve parametreye sahip net tanımlanmış bir model bulunmamaktadır. Örnek olarak geniş bir açıdan tarama yapılacak ise (örneğin bir maddenin dışarı akış taşıyıcısının substratı olup olmadığı) modifiye epitel hücre kullanımı uygun olur. Tercih edilen hücrelerle ilgili olarak insana benzerliği nedeniyle genelde bovin veya domuz EH'i kullanılmaktadır. Son zamanlarda en yaygın olarak kullanılan modeller primer EH kültürünün mono veya ko-kültürlerine dayanmaktadır.

Tablo 2.2. KBB *in vitro* modellerinin avantaj ve dezavantajları

MODEL	AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
Mono-Kültür	-Beyin endotel hücreleri kullanılır. -Pahalı değil.	-Diğer nörovasküler birimlerin hücresel faktörlerinin etkileri ihmal edilir.
Ko-Kültür	-Diğer nörovasküler birimlerin hücresel faktörlerinin etkileri dikkate alınır.	- Diğerlerine nazaran biraz daha pahalı ve zaman alıcı

2.12. KBB'den Geçiş için Nanopartiküllerin Kullanımı

KBB, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için karşılaşılan en büyük engellerden biridir. Hastalıkların tedavisi için kullanılabilecek birçok etkili ilaç KBB nedeniyle beyine geçememekte ve bu nedenle etkisini gösterememektedir. Nanopartiküllerle ilaç taşınımı bu problemin üstesinden gelebilmekte ve ayrıca bunun yanında ilaç hedeflenmesi, ilaç toksistesinin azaltılması ve terapötik etkinliğinin artırılması gibi konularda gelişme sağlar (202-204). Bununla birlikte AH ve diğer MSS ile ilişkili hastalıkların tedavisi için nanopartiküllerin KBB'nden

geçmesini temel alan birçok araştırma bulunmaktadır, ancak önemli bir gelişme şimdilik elde edilememiştir (205,206).

KBB'ndeki sıkı kavşaklar nedeniyle diğer dokular ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir transendotel elektriksel direnç ile karşılaşmaktadır ve bu nedenle su temelli paraselüler taşıma için daha az geçirgen ve dar interselüler alan meydana gelir. KBB bunlara ek olarak spesifik enzim sistemleri, glukoz taşıyıcıları ve protein reseptörlerine sahiptir ve bu da sonuç olarak KBB'nin madde değiş tokuşu konusunda özgü mekanizmaları bulunduğu işaret etmektedir. Ayrıca, KBB P-gp ve çoklu ilaç direnci proteini gibi birçok dışarı akış proteine sahiptir. Bu proteinler ATP-bağımlı olarak birçok terapötik ajan da dahil olmak üzere çeşitli maddelerin dışarıya taşınmasında görev alırlar (207).

KBB'nin fonksiyonları düşünüldüğünde temel görevi beynin korunmasıdır ve aynı zamanda geçirgen olmayan bir duvar ve seçici elek olarak görev yapar. Bunun sonucunda çoğu iyonize maddeler, 180 Da'dan büyük suda çözünür molekül ve dışarı akış sisteminin substratları KBB'den geçememektedir. Sadece küçük, lipofilik moleküller KBB'ni kolayca geçebilmektedir (191,208).

Maddelerin KBB'den geçişi ile ilişkili birçok mekanizmanın olduğu bilinmektedir. Beyine geçiş için sıkı kavşakların varlığı nedeniyle paraselüler yolu kullanabilen suyun da dahil olduğu çok az madde vardır. Lipofilik moleküller KBB'ni lipofillik derecesi ve hidrojen bağı yapabilme kapasitesine göre transelüler yoldan pasif difüzyon ile geçebilmektedir (209). Ancak lipidde çözünen maddelerin geniş bir ailesi aynı zamanda dışarı akışta görevli P-gp için substrat olduğu için KBB'den geçişi çok az gerçekleşmektedir (210). KBB aynı zamanda glukoz gibi polar çözünen maddelerin geçişi için özgü taşıyıcı sistemler içermektedir (211). KBB'ndeki taşıyıcı aracılı taşıma sistemleri, endojen maddelerin ve besinlerin beyine geçmesi için ana sistemi oluşturmaktadır. Bunun haricinde spesifik veya adsorptif olan endositotik mekanizmalar büyük protein ve peptitelerin KBB'ne taşınmasında görev almaktadır.

Bu sebeple, polar çözünmüş maddelerin ve lipidde çözünemeyen maddelerin serebral endotelden geçmeleri fazlasıyla engellenmektedir (212). Bununla birlikte yüklü olmayan, küçük, lipofilik moleküller KBB'nin endotel membranından pasif difüzyonla geçebilmektedir. Bu yolak dışarı akış pompa sistemleri ve çoklu ilaç

direnci ilişkili proteinler ile yakından kontrol edilmemektedir. Sonuç olarak esansiyel maddelerin beyine girişine izin verilmesi ve metabolik atıkların beyinden çıkışı sağlanmalıdır. KBB bu fonksiyonları çeşitli reseptör ve transport sistemleri ile gerçekleştirir (213). Bu mekanizmalarla beyin tarafından emilen veya atılan bu maddelere; amino asitler, heksozlar, insülin, lipoproteinler, pürin komponentleri örnek verilebilir (212).

Nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri, beyine ilaçları taşıyabilmek için düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptör ve transferrin transitozis sistemlerinden yararlanabilmektedirler (214). KBB'ni geçmek için kullanılan diğer yöntemler, beyin EH'inin sıkı kavşaklarının ozmatik olarak açılması (215), antikor içeren taşıyıcı aracılı taşıma sistemleri (216), karbohidrat içeren taşıyıcı aracılı taşıma sistemleri (217), gen taşıyıcı vektörler (218), peptitler (219), lipozomlar (220), miseller (221) ve nanopartiküllerdir (222).

Nanopartiküllerin pasif hedeflenmesinde, ilaç hedefleme sisteminin doğal dağılımını sırasında aktif fagositoz yapabilecek hücreleri olan karaciğer, dalak gibi organlara özellikle pareteral uygulama sonrasında gitmesinin engellenmesi gerekmektedir (223). Bu pasif alım, ilacın beyin dahil vücudun çeşitli organlarına hedeflenmesi konusunda majör problemi temsil etmektedir. Nanopartikül ilaç taşıma sistemlerinin modifiye edilmesi ile partiküllerin spesifik organ ve dokulara hedeflenmesi mümkün hale gelebilmektedir (224). Sistemin yüzey özelliklerinin surfaktan ve makromoleküller ile kaplanarak değiştirilmesi, sistem yüzeyine spesifik antikorun konjuge edilmesi, partikül boyutunun ve yüzey yükünün değiştirilmesi gibi modifikasyon örnekleri verilebilir. Bu teknikler ile nanopartikül ilaç hedeflemeleri için yeni kapılar açar ve hedeflenmiş partikül taşınmasında birçok seçenek sunar.

2.12.1. Nanopartiküllerin KBB'ni Geçme Stratejileri

MSS'ne ilaç gönderilirken en büyük engeli KBB'nin karakteristik özellikleri oluşturmaktadır, fakat KBB geçilmez değildir. Beyne ilaç gönderilmesini destekleyen birçok çeşitli strateji bulunmaktadır (225). Bu stratejiler temel olarak iki gruba ayrılır: KBB manipülasyonu ve ilaç manipülasyonu.

KBB Manipülasyonu

KBB manipülasyon teknikleri sırasıyla: KBB'nin ozmotik parçalanması, KBB'yi açacak biyokimyasal metodlar, KBB'ni üstesinden gelmek için alternatif yollar olarak özetlenebilir.

Rapoport ve diğerlerinin (226) yaptığı çalışmada interkarotid enjeksiyon ile uygulanan arabinoz gibi inert hipertonic solüsyonlar ile yapay olarak ozmatik basınç oluşturulup beyine geçebilen hidrofilik ilaç konsantrasyonu 20 kat artırılmıştır. KBB'nin ozmotik bozulması dışında daha güvenli olan seçici olarak beyin kapillerlerinin açılmasını sağlayan biyokimyasal metodlar da kullanılabilir. Sanovich ve diğerleri (227) tarafından yapılan çalışmada bradkin analogu olan RMP-7 kullanarak KBB'nin lanthanuma karşı geçirgenliği artırılmıştır. Ancak KBB'nin bozulması beklenmedik hasarlara neden olup, beyine çeşitli toksinlerin girmesine izin verip anormal nöron fonksiyonu ve bozulmuş glukoz alımına götürebilmektedir (228). KBB'nin geçilmesi için bir diğer strateji ise intraventriküler, olfaktor yolları ve doğrudan beyin intertisiyel taşınması gibi kardiyovasküler olmayan yolların kullanılmasıdır (225).

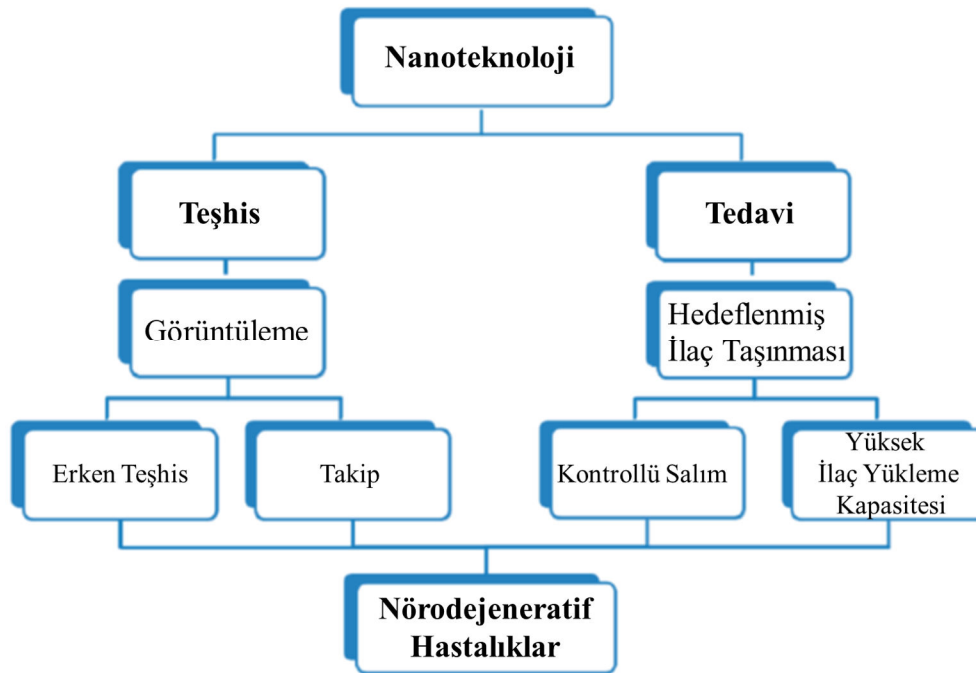
İlaç Manipülasyonu

İlaç manipülasyonuna proilaç sentezi, lipofilik analogların sentezi, kimyasal ilaç taşınması, taşıyıcı temelli ilaç taşınması ve reseptör/vektör aracılı ilaç taşınması gibi stratejileri kapsar. Proilaçlar, ana ilahtan türevlenerek sentezlenmiş ve başlangıçta farmakolojik olarak aktif olmayan bileşiklerdir. Uygulama sonrasında proilaçlar aktivite göstermeleri gereken bölgeye ulaşırlar ve karakteristik özellikleri nedeniyle o bölgede uzun süre bekleyebilirler. Proilaçlar daha sonra tek bir aktivasyon basamağı ile aktif hale gelip etkilerini gösterirler. Lipofilik analoglar ise ilaçların lipidde çözünabilir hale gelmesini sağlayıp, KBB'nden geçme kabiliyetlerini artırmaktadır. Buna en iyi örnek lipozomlar verilebilir. Poli (etilen-glikol) (PEG)'lenmiş immüno-lipozomlar KBB'ni *in vivo* reseptör aracılı taşıma sistem ile geçebilmektedir (229). Taşıyıcı, reseptör ve vektör aracılı beyine ilaç taşınması, kimerik peptit teknolojisini oluşturur ve bu şekilde peptitler gibi taşınması mümkün olmayan ilaçlar KBB taşıma vektörlerine konjuge edilerek kullanılır.

Nanopartiküller, KBB'ne ilaç taşınması için en popüler ve gelecek vaat eden vektörler haline gelmiştir (230).

2.13. AH için Nanoteknoloji Temelli Stratejiler

Nanoteknoloji tabanlı stratejiler, KBB'nin oluşturduğu limitleri ortadan kaldırabilme kabiliyetleri nedeniyle son yıllarda büyük önem kazanmışlardır (Şekil 2.11.). AH'nın erken teşhisi üzerine geliştirilebilecek stratejiler en kritik ve önemli noktayı oluşturur. Bu sayede nöronlardaki geri dönüşümsüz hasar oluşmadan önce hastalığın gelişimi engellenebilir. Hastalığın tedavisine yönelik stratejiler, çeşitli biyolojik olarak aktif moleküllerin enkapsüle edilip beyine hedeflenmesi ve bu şekilde amiloid plaklarla savaşıp hem kanda hem de beyinde A β agregasyonuna yönelik özelliklerde değişiklik yapabilecek, ortadan kaldırabilecek nanoyapıların hazırlanmasıdır (231)



Şekil 2.11. Nanoteknolojiden nörodejeneratif hastalıklara geçişin şematik gösterimi

2.13.1. AH Teşhisi için Görüntüleme Temelli Nanoteknolojiler

AH'da erken teşhis (klinik bulgulardan önce), demansa yol açan geri dönüşümsüz nöron kaybının önlenmesinde önem taşır. Bu konu ilgili yapılan

çalışmalar temel olarak amiloid plakların, kontrast madde yüklü Nanopartiküller veya floresan prob ile işaretli nanopartiküller aracılı şekilde manyetik rezonans görüntüleme (MRI) cihazı ile görüntülenmesini içerir (231).

Demir Oksit Nanopartiküller

Manyetik demir oksit nanopartikülleri büyük yüzey alanı, manyetik özellikleri ve sınırlı toksisiteleri nedeniyle birçok bilim adamının ilgisini çekmektedir. Karaciğerin MRI görüntülenmesinde kontrast ajanı olarak FDA onayı almıştır (232). N-terminalinden amid bağıyla A β (1-40) peptidi ile kovalent olarak bağlı demir oksit nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu partiküller ile senil plaklara hedefleme ve görüntüleme gerçekleştirilmiştir (233). APP ve APP/PS1 transjenik farelere mannitol ile beraber verilmiş ve μ MRI ile beyinlerindeki A β plakları görüntülenmiştir. Bunun dışında A β (1-40) fibrillerine özgü işaretleme metodu olarak floresan rhodamine veya Congo-Red ile enkapsüle edilerek hazırlanmış manyetik γ Fe₂O₃ nanopartikülleri çalışılmıştır. Ayrıca bu partiküllerin dışardan manyetik alan uygulaması sayesinde çözünebilir A β çözeltisinden fibrilleri uzaklaştırdığı gözlenmiştir (234,235).

PE154 (Heterodimerik AKoEI)

PE154 AKoEI olmasının yanı sıra insan ve transjenik fare beyin dokusu örneklerinde A β plakları için floresan prob olarak görev yaptığı da gösterilmiştir (236). Ancak bu molekül KBB'ni geçememektedir. PE154 yüklü polistiren-blok-poli (*n*-bütil siyanoakrilat) (PS-*b*-PnBCA) nanopartikülleri sentezlenmiş ve partiküllerin A β plak depolarına *in vivo* hedeflenmesi gösterilmiştir. Bu nanopartiküller hipokampüse doğrudan enjekte edilerek kullanılmıştır, fakat bu yöntem sayesinde *in vivo* ortamda partiküllere yüklenmiş AKoE inhibitörünün partiküllerden salınıp A β plaklara hedeflendiği gösterilmiştir (237).

Tiyoflavin T

Tiyoflavin T (ThT), A β agregatlarının β -tabaka yapılarını *in vitro* ve *in vivo* ortamda tanıyan bir moleküldür. ThT yüklü PS-*b*-PnBCA nanopartikülleri

sentezlenmiş ve intraserebral olarak enjekte edilip salımı incelenmiş ve A β ile etkileşimi sayesinde amiloid agregatlarının net görüntüleri alınmıştır (238).

Kuantum Noktaları-A β Kompleksi

Floresan yarı iletken nano-kristaller (kuantum noktalar, QD) son on yılda floresan probalar olarak biyolojik etiketleme ve teşhis için geliştirilmiştir (239). A β peptidi ile çapraz bağlı PEG-QD, çözelti veya hücresel sistem içindeki fibriller ve oligomerlerin oluşumunu nicel olarak tanımlamak ve izlemek için geliştirilmiştir. Bu yaklaşım A β peptidinin agregasyon kinetiğinin çalışılmasını sağlamıştır ve ayrıca ileride *in vivo* olarak da peptit agregasyonunun incelenmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür (240).

2.13.2. AH Tedavisi için Nanoteknolojiler

Sağlıklı bir KBB, küçük veya büyük nöroterapötik moleküllerin geliştirilmesinde en büyük engeli oluşturur. KBB, ilaç etkisini, toleransını negatif olarak etkiler, çünkü beyinde minimum etkiyi oluşturacak minimum ilaç konsantrasyonunu sağlamak için yüksek dozda ilaç gerekmektedir. Nanopartikül sistemleri bu problemleri ortadan kaldırıp aktif moleküllerin KBB'yi geçmesini sağlayarak toksisiteyi azaltıp, terapötik etkiyi artırma olanakları sağlayabilirler (241).

AkoE inhibitörleri

Kolinerjik sinir iletimindeki bozukluklar Alzheimer hastalarındaki öğrenme ve hafıza bozukluklarında önemli rol oynar (242). AH tedavisinde kolinerjik sinir iletiminin desteklenmesi en etkili tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Rivastigmin, hem AKoE hem de BuKoE'nin FDA tarafından AH tedavisi için onaylı inhibitörüdür. Deneysel olarak bu ilacın AH hastalarında kognitif fonksiyonları, genel fonksiyonları ve davranışları en azından koruduğu ve geliştirdiği gösterilmiştir. Fakat klinik etkinliği, beyin translokasyonu düşük olduğu için sık sık enjeksiyon gerektirmesi ve periferik organlar üzerindeki olumsuz kolinerjik etkileri nedeniyle sınırlı kalmaktadır (243). Rivastigminin beyne hedeflenmesi ve yan etkilerinin ortadan kaldırılması için polisorbata 80 kaplı rivastigmin yüklü polimerik poli-*n*-bütil siyanoakrilat (PnBCA) nanopartikülleri sentezlenmiştir. Sıçanlara iv olarak verilmiş

ve serbest ilaç ile karşılaştırıldığında sıçan beyindeki rivastigmin alım oranının 3,8 kat arttığı görülmüştür (244). Aynı grup PnBCA nanopartikülleri ile bir diğer AKoE inhibitörü olan takrini de kullanmıştır. Sıçanlara iv olarak verilmiş ve serbest ilaç ile karşılaştırıldığında sıçan beyindeki takrin alım oranının 4 kat arttığı görülmüştür (245).

Östrojenler ve Androjenler

MSS'nin gelişmesinde ve fonksiyonlarında eşeyssel bezlerden salınan steroidlerin önemli rol oynadığı prelinik deneylerde gösterilmiştir (246). Östrojen tedavisi AH riskini azalttığı öne sürülmüştür. Deneysel olarak estradiol, kolinerjik nöronların büyümesini, hayatta kalmasını teşvik eder ve önemli miktarda serebral amiloid birikmesini azaltabilir (247). Estradiol yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu şekilde oral alım ve serbest ilaç karşılaştırıldığında ilacın biyoyararlılığını 10 kat artmıştır (248). Alzheimer hastalarındaki bilişsel gerilemeyi azalttığı bilinen aktif antiprogesteron bileşiği olan mifepriston yüklü Poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu şekilde ilacın oral alımda biyoyararlanımı artırmıştır (249).

Kurkuminler

Kurkuminler *Curcuma longa*'dan elde edilir ve gıda endüstrisinde kullanılır. Son yıllarda ise sahip olduğu biyolojik aktiviteleri nedeniyle araştırmalarda kullanılmaktadır. Bunlar özellikler anti-enflamatuar, antioksidan, nöroprotektif hepatoprotektif, antikanserojen, antiviral aktiviteler olarak özetlenebilir (250). Sayısız araştırmacı kurkuminin A β agregasyonunun nöronlardaki toksisitesini anlamlı düzeyde azalttığını bildirmiştir (251). Ne yazık ki, bu bileşikler, kararlı değildir ve hem asidik hem de alkalın koşulların kolayca hidroliz edilir. Ayrıca ışııkla bozunduğu için zayıf biyoyararlanıma sahiptir ve dolayısıyla beyine alımı olmayabilir. Kurkumin polimerik PnBCA nanopartiküllerine yüklenmiştir. Bu şekilde kurkuminin yarı ömrü uzatılmıştır ve serbest kurkumine göre beyindeki konsantrasyonu artırılmıştır. Ancak AH için terapötik etkilerine bakılmamıştır (252). ApoE3 ligandlarına sahip kurkumin yüklü PnBCA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu şekilde beyindeki LDL-r aracılı şekilde KBB'yi geçebileceği düşünülmüştür.

ApoE3 ile fonksiyonel hale getirilmiş nanopartiküllerin A β bağımlı toksisiteyi inhibisyonu, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde gösterilmiştir. Serbest ilaca göre bu nanopartiküllerin %40 oranında toksisteyi azalttığı ve aynı zamanda reaktif oksijen türlerini de azalttığı tespit edilmiştir (253).

α - β - ve γ - Sekretaz İnhibitörleri

A β peptit, APP'nin β -bölgelerinden β -sekretaz ve daha sonra γ - sekretaz ile kesilmesi ile meydana gelir. Non-amiloidojenik yolda ise α - ve γ - sekretaz ile kesilir ve salgısal form meydana gelir. Bu iki yolda oluşabilecek çeşitli bozuklukların AH'nın nedenlerinden biri olan A β agregasyonunu tetiklediği düşünülmektedir (40). α - β - ve γ - Sekretazlar çeşitli biyolojik fonksiyonları nedeniyle en uygun hedefleri oluşturmaktadırlar. Doğal α -sekretaz düzenleyicisi epigallotechin-3-gallate (gallik asit) lipidik nanopartiküllere enkapsüle edilmiştir ve oral biyoyararlanımı artırılmıştır (254).

Antioksidan Türler

AH tedavisi için bir diğer strateji ise reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırdıkları için antioksidan türlerinin beyine hedeflenmesine yöneliktir. Glutasyon en önemli intraselüler antioksidanlardan biridir. Hücreleri oksidatif strese karşı korur. PEG-GSH konjugatı nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu partiküllerin amacı beyindeki GSH miktarının artırılmasıdır. Bu partiküller SH-SY5Y hücrelerinde hidrojen peroksitin oluşturduğu oksidatif stresi ortadan kaldırmıştır (255). Benzer başka bir çalışmada ise PLGA nanopartikülleri bir metalloprotein olan süperoksit dismutaz (SOD) enkapsüle ederek sentezlenmiştir. Bu şekilde SOD'nin dolaşımdaki yarı ömrü ve beyindeki alımını artırmak amaçlanmıştır. Bu nanomalzemelerin insan nöronlarını *in vitro* hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir (256).

2.14. Nanotaşıyıcı Sistemler

İlaç teknolojisinde karşılaşılan en büyük sorunlar arasında yer alan spesifik organa ya da dokuya ilaç hedeflendirilmesi, ilacın etki süresinin uzatılması, KBB'nin aşılması, ilacın lokalizasyonu, yan ve toksik etkilerinin azaltılmasını sağlayan

nanosistemlerin geliştirilmesi üzerine bütün dünyada yoğun bir çalışma başlamıştır (257,258). Bu nanosistemler arasında lipozomlar, miseller, nanoemülsiyonlar, polimerik ve lipid nanopartiküller, sıvı kristaller, nanokristaller, dendrimerler, biyokonjugatlar, polimer-ilaç kovalent nanoyapı oluşturan ön ilaç yaklaşımları ve “self assembling” ilaç taşıyıcı sistemler bulunmaktadır. Nanosistemler ile hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar, proteinler, aşılar, biyolojik makromoleküller vb. yapılar enkapsüle edilerek etkin bir şekilde taşınabilir. Tümör dokularına, lenfatik sisteme, arteriyel duvarlara, akciğerlere, karaciğere, dalağa ve beyne hedeflendirilmeleri ve sistemik dolaşımda istenilen süre boyunca kalmaları sağlanabilmektedir. Nano ölçekteki üretim ve manipulasyonlarla akılcı ilaç tasarımının önü açılmaktadır. Diğer taraftan santral sinir sisteminin kendini koruması için gerekli olan ve birçok maddenin geçişine izin vermeyen KBB; Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, multipl skleroz ve beyin tümörleri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan yöntemler için kısıtlama getirmektedir. İlaç taşıyıcı nanosistemler ile gerçekleştirilebilen girişimsel olmayan ilaç hedeflendirme teknikleri bu açıdan büyük değer yaratmaktadır. Fonksiyonlandırılabilmesinin yanı sıra küçük boyutları nedeniyle KBB’yi geçebilen nanotaşıyıcılar ile nörodejeneratif hastalıklara karşı tedavi teknikleri geliştirilebileceği düşünülmektedir (259).

Polimerik nanosistemlerin hazırlanmasında kitosan, aljinatlar gibi doğal ve poli(alkilsiyanoakrilat)lar, poli(anhidrit)ler ve poliestерler gibi sentetik polimerler kullanılmaktadır. PLGA, sayılanlar arasında nano ve mikroküre üretiminde en çok kullanılan polimerlerdir.

Literatürde bizim araştırmalarımız neticesinde donepezil taşıyıcı sistemler üzerine fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece, Zhang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen PLGA mikropartiküller ile uzatılmış salım çalışması mevcuttur (260). Bu çalışmada donepezil, PLGA mikrokürelere yağ-su emülsiyon tekniği ile enkapsüle edilerek salım profilleri incelenmiş ve in-vivo deneyler ile beyin dokusunda miktarı tespit edilmiştir. Bu çalışma neticesinde donepezilin 1 ay süre ile mikrokürelerden salındığı ve beyine geçtiği tespit edilmiştir.

Ancak nanoteranostikler, mikro sistemlere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül boyutları, kan damarlarını tıkama riski olmadan doğrudan sistemik dolaşıma verilebilmelerine olanak sağlamaktadır

(261,262). Partiküllerin, organizmadaki davranışlarındaki en büyük etkenin boyutları olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin opsonizasyon ve buna bağlı olarak makrofajlar tarafından tanınma ve fagosit edilmelerinin boyuta bağlı olduğunu göstermektedir (263). 200 nm'den küçük boyuta sahip partiküllerin sistemik dolaşımdan uzaklaştırılma oranlarının büyük partiküllere kıyasla daha düşük olduğu, dolayısıyla kanda dolaşım sürelerinin de daha uzun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca küçük boyutları nedeniyle KBB'ni kolayca aşabildikleri bildirilmiştir (264).

Diğer taraftan, bütün bu popülerliğine rağmen, PLGA kopolimerlerinin diğer biyobozunur polimerler gibi sahip olduğu güçlü hidrofobik özellikleri pratik uygulamalarda bazı sınırlamalara yol açmaktadır. Ayrıca, etkin farmasötik uygulamalar da bu polimerlerle hazırlanmış partiküler yapıların biyolojik ortamla uyumlarını sağlamak için yüzey özelliklerinin uygun hale getirilmesini gerektirmektedir. Polimer yapısına PEG gibi biyouyumlu ve hidrofilik bir polimerin eklenmesi, sonuç malzemeye hidrofilik karakter ve malzemenin spesifik uygulamalarına yönelik farklı fiziko-kimyasal özellikler kazandırılmasını sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, yüksek orandaki polimer zinciri esnekliği sayesinde, PEG polimer birimleri serbest dönme hareketleri ve yüksek hidrofilik karakterleriyle, hidrofobik polimer yapısını perdeleyerek retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından tanınmayı geciktirici bir hidrofilik sterik bariyer yaratırlar.

Ayrıca, malzeme yüzeyinde bulunan PEG zincirleri malzeme yüzeyine antikorlar gibi hedefleme moleküllerinin takılabilmesini sağlamaktadır, bu da malzemenin istenilen dokuya yönlendirilmesine izin vermektedir. Hidrofilik PEG segmentinin eklenmesiyle oluşan PLGA-b-PEG kopolimerleri, yapısını oluşturan PLGA ve PEG polimerlerinden farklı kristallik, çözünürlük ve biyobozunum özellikleri ve ayrıca yukarıda bahsi geçen avantajları sebebiyle farmasötik ve medikal alanda kullanılabilen yeni bir malzeme sınıfı olarak kabul edilmektedir. Bu bilgiler ışığında, PLGA-b-PEG kopolimerleri farmasötik ve biyomedikal alanda yüksek uygulama potansiyeline sahiptirler (265).

Diğer taraftan, literatürde nanopartiküller ile beyne etkin madde hedeflendirme üzerine yoğun olarak çalışıldığı göze çarpmaktadır. Costantino ve diğerlerinin (266) yaptığı çalışmalarda; normalde KBB'yi aşamayan PLGA nanopartiküllerinin, yapılan peptidik yüzey modifikasyonları ile bu engeli

aşabildikleri gösterilmiştir. Burada kullanılan peptidler sentetik opioidlere benzeyen kısa peptidlerdir. Yüzeyleri PEG ile modifiye edilen nanopartiküller daha düşük fagositoz edilebilme özelliği göstermektedirler ki bu durum nanopartiküllerin daha uzun süre kan dolaşımında kalmasını sağlamaktadır. Opsonizasyon adı verilen ve nanopartiküllerin makrofajlar tarafından vücuttan uzaklaştırılmaya çalışıldığı mekanizmanın, nanopartikül yüzeyinde bulunan PEG molekülleri sayesinde geciktirilmesi sonucu, nanopartiküler kontrollü salım sistemleri oluşturulabilmektedir (267). Lu ve diğerlerinin (268) 2005'te yaptığı bir diğer çalışmada da, albumin bağlı nanopartiküllerin KBB'yi geçtiği; özellikle de katyonik albumin bağlı nanopartiküllerin bu bariyerde bulunan sıkı kavşaklara bir miktar toksisite göstermekle birlikte bu bariyeri 7-8 kat daha fazla aştığı gösterilmiştir. Ayrıca Kim ve ekibi aljinat hidrojel içerisine koyulan PLGA nanopartiküllerinden model ilaç olarak alınan deksametazon salımının 3 hafta kadar sürdüğünü yapılan in-vitro salım çalışmaları sonucu ortaya koymuştur. Khuller ve Pandey, antitüberküloz ilaçları PLGA nanopartikülleri içine enkapsüle edip fare modellerinde bu nanopartikülleri beyne hedeflendirme üzerinde çalışmışlardır. Farelere oral olarak verilmiş bu partiküller tek doz uygulama ile 5-8 gün boyunca plazmada, 9 gün boyunca beyinde tespit edilmiştir. Sonuçta serbest ilaca oranla iyileştirilmiş farmakokinetik özellikler ve yüksek bir bağlı biyoyararlanım sağlanmıştır. Ayrıca Mycobacterium tuberculosis ile enfekte edilmiş farelerde 10 günde 1 olmak üzere sadece 5 oral doz uygulaması ile tam bir iyileşme sağlanmıştır (269).

Klinikte AH kesin tedavisi mümkün olmadığından donepezil vb asetikkolinesteraz inhibitörleriyle semptomatik tedavi yapılmaktadır. Ancak şiddetli bulantı, kusma, diyare gibi gastrointestinal yan etkiler bu ilaçların hastalar tarafından iyi tolere edilememesine sebep olmaktadır ayrıca bu ilaçların hergün tekrarlanan dozda alınması gerekliliği demansı olan Alzheimer hastalarında uyunç problemi yaratmaktadır. Klinikte hastalığın mekanizmasına/nedenine yönelik olarak kullanılan her hangi bir ilaç bulunmamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Tez deneylerinde kullanılan bütün kimyasallar Sigma-Aldrich (ABD) ve Merck (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Tez kapsamında kullanılan hücre hatları ve besiyerleri Sciencecell (ABD)'den temin edilmiştir. Kullanılan antikorlar Abcam (İngiltere) firmasından temin edilmiştir. Protein tayini için kullanılan BCA (Katolog numarası: 21071) kiti Intron Biotechnology (Kore)'den temin edilmiştir. Hücre kültürü ortamındaki TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β 1, MCP-1 ile GM-CSF düzeyleri ise Invitrogen (ABD)'den satın alınan insan ELISA kitleri ile tayin edilmiştir. RNA izolasyonu Ambion (ABD)'den satın alınan kitlerle gerçekleştirilmiştir.

Deneylerde kullanılan cihazlar ve temin edildikleri firmalar aşağıdaki gibidir: Ultraturaks (PRO Scientific Inc, ABD), Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı (Malvern Zetasizer Nano-ZS, İngiltere), Santrifüj, (Hettich, Almanya) Manyetik Karıştırıcı (Ika, Almanya), pH metre (Orion, ABD), Hassas Terazı (Mettler Toledo, ABD), Spektrofotometre (RF-5301PC, Shimadzu, Japonya), Buz Makinesi (AF80, Scotsman, İtalya), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), pompası (P680, Dionex, Almanya), HPLC, otomatik örnek enjektörü (ASI-100, Dionex, Almanya), HPLC, Termostatlı kolon kompartmanı (TCC-100, Dionex, Almanya) HPLC, UV dedektörü (UVD340U, Dionex, Almanya), Spektrofotometre (UV-1800, Shimadzu, Japonya), PCR (Veriti, Applied Biosystems, ABD), Gerçek zamanlı-PCR (ViiA7, Applied Biosystems, ABD), Mikropılaka okuyucu (BioTek, ABD), -86°C Buzdolabı (Panasonic, Japonya), Laminar akış kabini (Clean Air, ABD), Homojenizatör (Schuett-Biotek, Almaya), CO₂ inkübatörü (Panasonic, Japonya). ışık mikroskobu (Leica DM4000B, Almanya).

3.2. Çift Emülsiyon Yöntemi ile Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG-COOH Nanopartiküllerin Hazırlanması

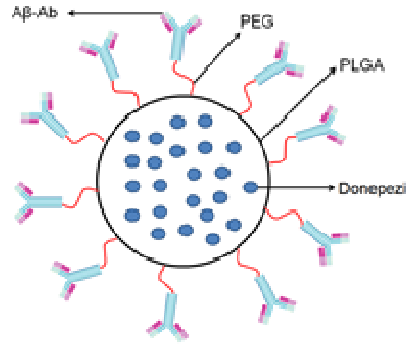
Donepezil yüklü nanopartiküller, Dziubla ve diğerleri tarafından kullanılan çift emülsiyon sentez yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır (270). Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan PLGA-b-PEG-COOH polimeri,

PLGA-COOH ve $\text{NH}_2\text{-PEG}_{3400}\text{-COOH}$ polimerleri kullanılarak Prof. Dr. Kezban Ulubayram (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı) ve grubu tarafından sentezlenmiştir. 1. emülsiyon, dikolorometan (DCM) içerisindeki PLGA-b-PEG-COOH polimer çözeltisinin (20 mg/mL) 1 mL'sine, pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) içerisindeki farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış donepezil çözeltisinden sırayla (2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 7.5 mg/mL, 10 mg/mL) 1 mL damla damla eklenerek, ultraturaksla 15000 rpm'de 1 dakika karıştırılması ile elde edilmiştir. Hazırlanan bu emülsiyon, enjektör yardımı ile kütlece % 2'lik Pluronic F68 çözeltisine (5 mL) damla damla eklenerek, ultraturaks ile 15000 rpm'de 1 dakika karıştırılmış ve 2. emülsiyon elde edilmiştir. Oluşturulan bu 2. emülsiyon bir enjektör yardımı ile manyetik karıştırıcıda karışmakta olan % 0.5'lik Pluronic F68 çözeltisine (50 mL) şırınga pompası yardımı ile eklenmiştir. Elde edilen emülsiyon, organik çözücünün uzaklaştırılması için bir 24 saat $+4^\circ\text{C}$ 'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşan partikül süspansiyonu öncelikle 4 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlenerek makroagregatların uzaklaştırılması sağlanmış, daha sonra elde edilen nanopartikül süspansiyonu 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek hazırlanmış olan nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen nanopartiküller 2 kez yıkanarak yüklenmemiş donepezil ve yüzey aktif maddenin fazlasının uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.1. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Anti-A β Antikoru ile Konjugasyonu

Hazırlanan nanopartiküllerin doğrudan amiloid plaklara hedeflendirilmesi için nanopartiküllere anti-A β antikoru (Abcam) bağlanmıştır. Çalışmada salım profili en iyi olan NP1 (2.5 mg/mL) kullanılmıştır. Antikor bağlanma etkinliği için ise de model antikor olarak IgG kullanılmıştır. Nanopartiküllere anti-A β antikor bağlanması için çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin distile su içinde belirli derişimdeki süspansiyonları hazırlanmış ve bu süspansiyondan belli bir miktar alınarak üzerine 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid HCl (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) çözeltileri eklenerek 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra nanopartiküller 3 kez yıkanarak EDC ve NHS'in fazlası uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküllere bağlanan anti-A β antikoru miktarının tayini

protein tayini Bradford yöntemi ile yapılmıştır. Sığır serum albümini (BSA) standartları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Sentezlenecek olan ve yüzeylerinde anti-A β antikor taşıyan donepezil PLGA-b-PEG nanopartikülleri Şekil 3.1’de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Anti-A β antikor taşıyan donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin şematik gösterimi.

Antikor Tayini

Anti-A β antikor taşıyan nanopartiküllerin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (271). Bu yöntem için gerekli olan kalibrasyon eğrisi standart olarak saf BSA kullanılarak çizilmiştir. Hazırlanmış nanopartiküllerin 10 μ L alınmış, reaksiyon karışımına 90 μ L saf su, 5.9 mL %0,9 NaCl çözeltisi ve 1 mL Bradford Coomassie Brilliant Blue eklenmiştir. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 595 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Örnekteki antikor miktarı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyel analizleri Malvern Zetasizer Nano-ZS partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Partikül büyüklüğü dağılımı tayinindeki temel prensip, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içinde Brownian hareketi yapmasına bağlı gelişen hareketlerinin ölçümüdür. Büyük boyutlu partiküllerin küçük olanlardan daha fazla ışık saçması sonucu boyut açısından hassas bir ölçüm yapılabilmekte ve özellikle agregasyon durumlarında stabil olmayan sistemler kolaylıkla ve hassas bir

şekilde tespit edilebilmektedir. Dinamik ışık saçılımı tekniği, Foton Korelasyon Spektroskopisi ya da Kuazi-Elastik Işık Saçılımı olarak da bilinmektedir.

Zeta potansiyeli, sulu ortamlarda partiküllerin yüzeyindeki iyonizasyon ya da yüzeylerine adsorbe olan iyonik maddelerin meydana getirdiği yüzey yükü olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzey yüküne bağlı olarak partikülü çevreleyen iyonların dağılımı değişiklik göstermektedir. Partikül hareket ederken, bu iyon tabakası da onunla birlikte hareket etmekte, tıpkı bir parçası gibi davranmaktadır. Bu değer negatif ve pozitif her iki yönde de artması sonucu partiküller birbirini itmekte ve sistem kararlılığı korunmaktadır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin ölçümü için kullanılan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı, bu potansiyeli ölçmek için süspansiyon boyunca bir elektriksel alan uygulamakta ve partiküllerin yüklerine bağlı olarak gelişen hareket hızlarını ölçerek hesaplama yapmaktadır.

3.3.2. Morfolojik Analiz

Nanopartiküllerin şekil, geometri, büyüklük ve dağılım gibi morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM analizinde nanopartiküller ince bir platin tabakası ile kaplanmış ve Nova NanoSem cihazı ile örneklerin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerine Yüklenen Donepezil Miktar Tayini

3.4.1. Donepezil için Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

Donepezil miktar tayini Pappa ve diğerleri (272) tarafından geliştirilen HPLC yönteminin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde mobil faz olarak metanol, 0.02 M fosfat tamponu (0.2 M K_2HPO_4 ve 0.02 M NaOH, pH 8) ve trietilamin karışımı (60:40:0.5), fosforik asit ile pH 7.5'e ayarlanarak kullanılmıştır. Analitik ayırım için Thermo hipersil gold fenil kolonu (250 x 4.6 mm; 5 μ m) kullanılmış (25°C) ve donepezil deteksiyonu $\lambda=268$ nm'de gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 50 μ L olarak ayarlanmıştır. Donepezil mobil fazda hazırlanan 1mg/mL derişimdeki stok çözeltisinden hareketle 0.1mg/mL derişimde ikinci çözelti hazırlanmış ve bu stoktan kullanılarak 7 farklı kalibrasyon noktası için gerekli seyreltmeler yapılmıştır (100, 50, 25, 10, 5, 1, 0.5 μ g/mL).

3.4.2. Donepezil Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Donepezilin yükleme etkinliğinin belirlenmesi için nanopartikül hazırlama işlemi sırasında dış sulu fazda serbest halde bulunan donepezil miktarı tayin edilmiştir. Bu amaçla, donepezil yüklü nanopartiküller hazırlandıktan sonra nanopartikül süspansiyonu 20,000xg’de 15 dakika santrifüj edilerek üst fazdan örnekler alınmış ve bu örnekler 0.22 µm por açıklığına sahip filtreden süzülmüştür. Dış fazdaki donepezil derişimi HPLC yöntemi ile tayin edilmiş, etkin madde yükleme etkinliği aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

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

K₁: Nanopartikül formülasyonu hazırlanmasında kullanılan donepezil derişimi

K₂: Su fazında nanopartiküllere yüklenmeden kalan donepezil derişimi

3.5. Etkin Madde Salım Çalışmaları

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

3.6. *In vitro* Deneyler

3.6.1. Aβ Fibrillerin Hazırlanışı

Aβ Peptid Örneklerinin Hazırlanması

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

500 μM $\text{A}\beta(1-42)$ peptid %0.02 (h/h) soğuk amonyum çözeltisinde çözülüp vortekslenmiştir. 20 μL 'lik kısım fibrillerin hazırlanması için inkübasyona bırakılmak üzere alınmış; kalan çözelti taze $\text{A}\beta(1-42)$ peptid olarak -80°C de saklanmıştır (273,274).

Fibrillerin Hazırlanması

$\text{A}\beta(1-40)$ fibril sentezinde 50 μM taze $\text{A}\beta(1-40)$, 100 mM NaCl, 50 mM PBS (pH=7.5) birleştirilmiş ve 2400 μL 'lik reaksiyon karışımı oluşturulmuş ve 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Karışım, 20 μL $\text{A}\beta(1-40)$, 240 μL NaCl ve 1200 μL PBS içermektedir.

$\text{A}\beta(1-42)$ fibril sentezinde 50 μM taze $\text{A}\beta(1-42)$, 100 mM NaCl, 50 mM PBS (pH=7.5) birleştirilmiş ve 2400 μL 'lik reaksiyon karışımı oluşturulmuş ve 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Karışım, 20 μL $\text{A}\beta(1-42)$, 240 μL NaCl ve 1200 μL PBS içermektedir (273,274).

3.6.2. $\text{A}\beta(1-40)$ Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu

Hazırlanan 2.3 mM $\text{A}\beta(1-40)$, 100 μM derişimdeki donepezil yüklü nanopartiküller ve fibrilleri inhibe ettiği bilinen 100 μM Rifampisin ile 100 mM NaCl, 50 mM fosfat tamponu (pH=7.5) içeren 500 μL 'lik reaksiyon ortamında, 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında belirli zaman noktalarında karışımdan örnek alınarak ThT floresans şiddeti ölçülmüştür.

3.6.3. $\text{A}\beta(1-42)$ Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu

Hazırlanan 2.5 mM $\text{A}\beta(1-42)$, 100 μM derişimdeki donepezil yüklü nanopartiküller ve fibrilleri inhibe ettiği bilinen 100 μM Rifampisin ile 100 mM NaCl, 50 mM fosfat tamponu (pH=7.5) içeren 500 μL 'lik reaksiyon ortamında, 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında belirli zaman noktalarında karışımdan örnek alınarak ThT floresans şiddeti ölçülmüştür.

3.6.4. ThT Floresans Ölçümü

Fibril oluşumu ve oluşumun selejilin içeren nanopartiküllerle inhibisyonu ThT floresans ölçümü ile takip edilmiştir. Reaksiyon ortamından 100 μL 'lik örnekler

alınarak 0. dakikada eksitasyon ve emisyon spektrumları taranmıştır. eksitasyon=448 nm ve emisyon=490 nm olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamından sırasıyla 0, 10, 24 ve 48. saatlerde örnekler alınarak belirtilen eksitasyon ve emisyon dalga boylarında ThT floresans şiddeti ölçülmüştür (274). Floresans şiddetindeki azalma, fibril oluşumunun inhibiyonu ile doğru orantılıdır.

3.6.5. Hücre Kültürü

İBMEH Kültürü

İBMEH (ACBRI 376) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler ekilmeden önce flasklar attachment factor (4Z0-210, Cellsystems) ile kaplanmıştır. Hücreler, antibiyotiklerle desteklenen (100 U/ml penisilin, 100 µg/mL streptomisin), %10 oranında fetal sığır serum (FBS) ve %1 endotel hücre büyüme faktörü (ECGS) içeren endotel hücre besiyeri (ECM) (Sciencecell) ile süspande edilerek 37°C’de 5% CO₂ içeren nemli atmosferli ortamda büyümeye bırakılmışlardır.

İnsan Astrosit Hücre Kültürü

İnsan astrosit hücre hattı (Cat no: 1800-5, Sciencecell) kullanılmıştır. Hücreler ekilmeden önce flasklar poly-L-Lizin ile kaplanmıştır. Hücreler, antibiyotiklerle desteklenen (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin), %10 oranında FBS ve %1 oranında astrosit hücresi büyüme faktörü (AGF) içeren astrosit besiyeri (AM) (Sciencecell) ile süspande edilerek 37°C’de 5% CO₂ içeren nemli atmosferli ortamda büyümeye bırakılmışlardır.

3.6.6. KBB *in vitro* Modeli

İBMEH, KBB’ni temsil eden polarize bir tabaka elde etmek amacıyla, 50,000 hücre/cm² olacak şekilde attachment factor (4Z0-210, Cellsystems) kaplı, 6 kuyucuklu, 0.4 µm-porlu, yarı saydam membran girintilerine (0.3 cm²/girinti) ekilmiştir. EH tabakası bu sistemi apikal (kan tarafı) ve bazolateral bölüm (beyin tarafı) olarak ayırır. Bu düzenek, KBB’in her iki tarafına uygulama yapılması veya örnek alınmasına olanak sağlar. ECM %5’lik fotal sığır serumu, %1’lik penisilin/streptomisin çözeltisi ve %1’lik ECGS ile desteklenmiştir. Ko-kültür modeli için astrositler, 6 kuyucuklu taşıyıcı plakların kuyucuklarına (1.9

cm²/kuyucuk) 50,000 hücre/cm² olacak şekilde ekilenmiştir. AM, %5'lik fetal sığır serumu, %1'lik penisilin/streptomisin çözeltisi ve %1'lik AGF ile desteklenmiştir. Tüm hücreler, nemlendirilmiş 37°C'lik inkübatörde %5 CO₂ ile kültüre edilecektir. Medyum değişimi, tek tabakalar birleşene kadar (3-4 gün) gün aşırı değiştirilmiştir. Hücre kültürü ortamında gerçekleştirilecek deneyler Şekil 3.2'de özetlenmiştir.

Şekilde belirtilen astrositlere ait AM toplanarak aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir.

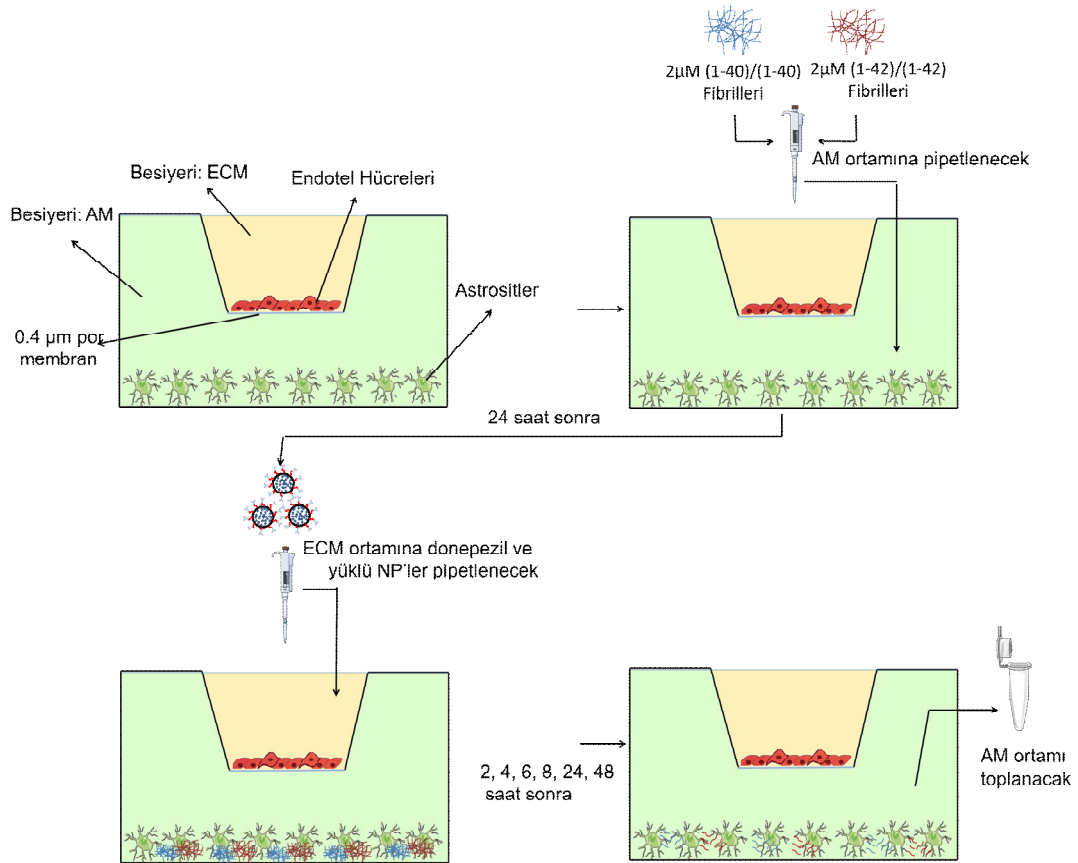
1. Fibril destabilizasyonunu tespit etmek amacıyla ThT floresans ölçümü gerçekleştirilmiştir.
2. Donepezil miktar tayini gerçekleştirilmiştir.
3. MCP-1, TGF- β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β protein düzeyleri ELISA kitleri ile tayin edilecektir. Sitokinlerin veya kemokinlerin ölçümü kullanılacak kitlerin yönergelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Şekilde belirtilen astrositler toplanarak aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir.

1. RNA izolasyonu
2. MCP-1, TGF- β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β gen ekspresyonu için gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) analizi (kullanılmış olan primer dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir).

Bu deney düzenineğinin amacı

1. Donepezil yüklü nanopartiküllerin KBB'ni aştığının tespit edilmesi.
2. Nanopartiküllere hapsedilen donepezilin ortama salındığının tespit edilmesi.
3. Astrositlerdeki MCP-1, TGF- β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-1 β 'nin protein ve gen düzeyindeki ekspresyonlarının donepezil uygulamasıyla nasıl değiştiğini saptamaktır.



Şekil 3.2. Hücre kültürü ortamında gerçekleştirilen deneylerin şematik özeti

3.6.7. RNA İzolasyonu ve RT-PCR

Astrosit hücrelerden total RNA; RNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda izole edilmiştir.

Tek zincirli cDNA 1 µg total RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. Bu işlem 100 U Superscript II, 0.25 µg random primer, 0.5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 32 U Rnase inhibitörü varlığında 50 dakika 42°C'de son hacim 20 µl olacak şekilde RT tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Tek zincirli cDNA'nın 5 µg'ı fibrotik proteinlerin ve enflamatuar proteinlerin PCR ile amplifiye edilmesi için kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı olarak 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 60 nM primer, 2 U Taq polymerase içeren PCR tamponu kullanılmıştır.

Termal döngü koşulları Thermal Cycler'da şu şekilde 94°C'de 5 dk, 35 döngü boyunca 94°C 30 sn, 55°C 30 sn, 72°C 60 sn ve sonra 72°C 10 dk ayarlanmıştır. Örneklerde kontaminasyon olmadığı Superscript II kullanılmadan hazırlanmış örneklerin negatif kontrolleri ile doğrulanmıştır.

RT-PCR analizi 96 kuyucuklu plaklar ve SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak sekans deteksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu (25 µl) 1:5 oranında seyreltilmiş 5 µl örnek varlığında üçlü kontrol sistemi ile gerçekleştirilmiştir. RT-PCR işleminde, kullanılan primerler Tablo 3.1’de verilmiştir. Her deneyde araştırılan genin değeri, kontrol genin (housekeeping gene) değerine oranlanarak normalize edilmiştir.

Tablo 3.1. RT-PCR deneylerinde kullanılacak olan primer dizileri. (F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı).

Primerler	Sekanslar
IL -6	F: 5'-TGACCCAACCACAAATGCCA-3' R: 5'-TGAGGTGCCCATGCTACATT-3'
GAPDH	F: 5'-ATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3' R: 5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3'
TNF-α	F: 5'-ATCCTGGGGGACCCAATGTA-3' R: 5'-AAAAGAAGGCACAGAGGCCA-3'
TGF-β1	F: 5'-TGGTGGAAACCCACAACGAA-3' R: 5'-AGAAGTTGGCATGGTAGCCC-3'
GM-CSF	F: 5'-AAGTTCTCTGGAGGATGTGGC-3' R: 5'-CTACTCAGGTTTCAGGAGACGC-3'
IL-1β	F: 5'-TGCTCTGGGATTCTCTTCAGC-3' R: 5'-TTTCAACACGCAGGACAGGT-3'
MCP-1	F: 5'-TCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3' R: 5'-GGGCATTGATTGCATCTGGC-3'

3.6.8. ELISA analizleri

IL-6, TGF- β 1, GM-CSF, IL-6, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 gibi çeşitli enflamatuvar sitokinlerin protein düzeyi tayini, insan IL-1 β Elisa kiti (KHC0011, Invitrogen, ABD), IL-6 Elisa kiti (KHC0061, Invitrogen, ABD) ve TNF- α Elisa kiti (KHC3011, Invitrogen, ABD), TGF- β 1 Elisa kiti (KAC1688, Invitrogen, ABD) ve GM-CSF Elisa kiti (KHC2011, Invitrogen, ABD), MCP-1 Elisa kiti (KHC1011, Invitrogen, ABD) yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.7. *İn vivo* Deneyler

3.7.1. Deney Hayvanları

Deneylerde Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden sağlanan erkek Sprague-Dawley (260-280g ağırlığında 6-7 haftalık) sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar su ve yem kısıtlaması olmaksızın 12 saat aydınlık/12 saat karanlık periyoduna göre barındırılmıştır. Bu araştırma için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2012/13 no'lu izin alınmıştır. Deneyler Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.7.2. A β Peptid

İntraserebral A β enjeksiyonu daha önce çalışmış ve başarılı olduğu gösterilmiş bir yöntemdir (275). Yapı- aktivite çalışmalarında A β proteininin yüksek hidrofobik olan 25-35 bölgesinin stabil agregatlar oluşturarak nöronal ölüme sebep olduğu gösterilmiştir (276,277). A β (25-35) peptidinin sıçanlara enjeksiyonuyla oluşturulan Alzheimer modelinde zamana bağlı patolojik değişiklikler ve bunun hafızaya yansımaları detaylı bir şekilde incelenmiştir (278). Bu model AH'nı iyi taklit eden, iyi karakterize edilmiş, ucuz ve çabuk oluşturulabilen bir modeldir.

Bu model için A β fragmenti 25–35 (A β (25-35), Abcam ve Sigma) steril su içinde çözüldükten (1 μ g/1 μ L) sonra *in vitro* olarak 37 °C'da 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. 4. günün sonunda sıçanlara intraserebroventriküler (icv) olarak enjekte edilmiştir (278).

3.7.3. Stereotaksik Enjeksiyon ve İlaç Uygulanması

Hayvanlar ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) karışımından 0.2 mL ile intraperitoneal (ip) olarak anestezi edildikten sonra stereotaksi aletine yerleştirildikten sonra kafa derisi 1.5 cm kadar açılmıştır ve icv enjeksiyonların yapılacağı koordinatlarda (lateral ventrikül: Bregma'dan AP, -1mm; L, $\pm$ 1.5 mm; ve DV, -3.5mm) kemiğe 1-2mm çapında delik açılmıştır. Beyin membranı bir enjektör iğnesi aracılığıyla kesilmiştir ve 10 μ L A β (25-35) fibrilleri 0.4 μ L/dak hızında bir Hamilton iğne aracılığıyla enjekte edilmiştir. İğne 15 dk bekledikten sonra geri çekilmiştir ve

kafa derisi 4.0 ipek iplikle dikilmiştir. Sham grubu hayvanlara ise 10 µL apirojen distile su enjekte edilmiştir. Hayvanlar uyanmaları için sıcak bir zeminde bekletilmiştir ve uyandıktan sonra kafeslerine alınmıştır.

Deney grupları

Deneyler iki kısımda gerçekleştirildi:

1. Öncelikle Alzheimer modelini oluşturmak amacıyla yapılacak ilk kısım deneylerde; sıçanlar iki gruba ayrılmıştır. İlk grupta (n=6) icv olarak Aβ(25-35) peptid enjekte edilirken ikinci gruba (n=6) sadece çözücü (apirojen distile su) enjekte edilmiştir. Bu hayvanlar 22. gün sonunda terminal ketamin/ksilazin anestezisi ile aortlarından kanüle edildikten sonra paraformaldehit ile perfüze edilmiştir ve beyinleri çıkartılmıştır, kesitler alınmış ve bu kesitler immunohistokimyasal yöntemlerle Aβ için boyamalar yapılmıştır.
2. İkinci kısım deneylerde ise Aβ enjeksiyonu yapılmış hayvanlara donepezil yüklü nanopartiküller (4.5 µg etken madde) ya da donepezil (1 mg/kg) tedavisi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemlemek üzere boş nanopartikül grubu, Alzheimer grubu olarak Aβ enjeksiyonu ardından çözücü PBS enjekte edilmiş grup ve hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubu kullanılmıştır. Deney grupları aşağıdaki gibidir:

- I. Aβ enjeksiyonu yapılmış hayvanlarda 3 gün süreyle 0.2 mL iv PBS enjeksiyonu (n=6)
- II. Aβ enjeksiyonu yapılmış hayvanlarda 3 gün süreyle 0.2 mL iv boş nanopartikül enjeksiyonu (n=6),
- III. Aβ enjeksiyonu yapılmış hayvanlarda 3 gün süreyle 0.2 mL iv PBS içinde çözülmüş Donepezil enjeksiyonu (n=6), (1 mg/kg)
- IV. Aβ enjeksiyonu yapılmış hayvanlarda 3 gün süreyle 0.2 mL iv PBS içinde süspande edilmiş Donepezil nanopartikül enjeksiyonu (n=6), (15 µg/kg)
- V. Aβ enjeksiyonu yapılmamış naiv kontrol hayvanlar (n=6),

3.7.4. İmmünohistokimyasal Boyama

Hayvanlar yüksek doz ketamin/ksilazin anestezisi altında aortlarından kanüle edilerek %4'lük paraformaldehit ile perfüze edilmiştir. Beyinler 1 gün boyunca perfüzyon çözeltisi içinde (%4'lük paraformaldehit) oda sıcaklığında ve daha sonra kriyoproteksiyon için % 30'luk sükröz çözeltisinde +4°C'de en az 24 saat bekletildikten sonra mikrotom ile 35 µm kalınlığında tüm beynin kesitleri alınmıştır. Kesitler 6'lı seriler halinde, %30 gliserol ve %30 etilen glikol içeren fosfat tamponunda -20°C'de boyamalar yapılanaya kadar saklanmıştır ve daha sonra Aβ oluştuğunu göstermek için Aβ primer antikoları ile boyama yapılmıştır. Kesitler Tris ve Tris ile tamponlanmış salin solüsyonları ile iyice yıkandıktan sonra uygun serumla (sığır) 10 dakika bloke edilmiştir, daha sonra uygun seyreltmelerdeki (1:500) primer Aβ antikoru ile 12 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yıkamayı takiben, biyotin-işaretli sekonder antikolar 60 dakika süreyle uygulanmıştır. İmmünreaksiyonlara avidin-peroksidaz-işaretli biyotin kompleksi uygulandıktan sonra, kesitler 3-3-diaminobenzidin-4 HCl/H₂O₂ muamelesi ile görüntülenmiştir. Kesitler, poly-L-lizinli lamellere yerleştirildikten sonra lameller kademeli artan konsantrasyonlarda etanol ile dehidrate edilmiştir, ksilene aktarılıp, üzeri lamel ile kapatılarak fıkse edilmiştir. Kontrol olarak, beyin kesitleri immün olmayan serum ile önceden absorbe edilmiş antikorla muamele edilmiştir. Kesitler ışık mikroskobu (Leica DM4000B) altında "NIS-Elements" mikroskop görüntüleme yazılımı aracılığıyla incelenmiştir. Hoechst floresans boyaması için ise kesitler %0.2 TritonX-100 içeren PBS içinde permeabilize edildikten sonra 8 mg/ml Hoechst 33342 ile inkübe edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra poli-L-lizin kaplı lamlara transfer edilmiştir ve kapatılarak floresans mikroskobunda incelenmiştir.

3.7.5. Beyin Homojenatlarının Hazırlanması

Beyin buz soğukluğunda 0.02 mM potasyum fosfat tamponu (KP) (pH 7.4) (1:2 a/h) çözeltisi içinde cam homojenizatörde 450 rpm'de homojenize edilmiştir. 4°C'de 1,500xg'de 5 dakika santrifüjün ardından süpernatant elde edilmiştir.

3.7.6. Beyin Homojenatlarındaki Total Protein Tayini

Beyin homojenatlarının supernatantlarındaki total protein tayini BCA protein tayin kiti (21071, Intron Biotechnology, Kore) yönergesi takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.7.7. AKoE Aktivite Tayini

AKoE aktivite ölçümleri 25°C’de substrat olarak 5 mM asetiltiyokolin (ATC), 0.125 mM ditiyobisnitrobenzoik asit içeren 500 mM KP (pH 7.4) ortamında gerçekleştirilmiştir. Tepkimeler enzim eklenerek başlatılmıştır ve spektrofotometrede, 412 nm’deki absorbans artışı üzerinden izlenmiştir. Hesaplamalarda $\epsilon=14.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ değeri ve beyin homojenatlarının total protein miktarı kullanılmıştır. AKoE aktivitesi nmol/dakika/mg şeklinde gösterilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak rapor edilmiştir. Deney grupları Student’s t-test veya one-way ANOVA testleri ile karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi ve Zeta Potansiyeli

Nanopartiküllere 2.5-10 mg arasında farklı konsantrasyonlarında ilaç yüklenerek, 4 farklı formülasyon (NP1, NP2, NP3, NP4) hazırlanmıştır (Tablo 4.1). Her formülasyon için 6 örnekle çalışılmış; ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve ilaç yükleme oranı değerleri standart sapmaları hesaplanarak elde edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel verileri

Nanopartikül	Donepezil Miktarı (mg)	Boyut	Zeta Potansiyeli	Polidispersite İndeksi
NP1	2,5	174,40	-20,45	0,20
NP2	5	202,23	-20,49	0,24
NP3	7,5	211,62	-15,36	0,23
NP4	10	240,02	-11,32	0,36

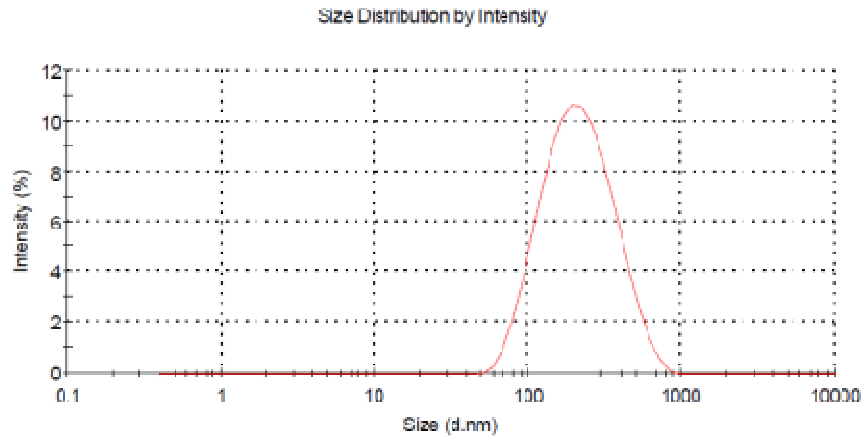
Hazırlanan ilaç yüklü nanopartiküllerin 174 ile 240 nm arasında bulunmuştur. Nanopartiküllere eklenen ilaç miktarı arttıkça partikül boyutunun arttığı izlenmiştir. Ancak bu tezde hedeflenen partikül boyutu 200 nm civarında olduğu için elde edilen nanopartikül boyutlarının buna karşılık geldiği görülmüştür.

Nanopartiküllerin kullanımda süspansiyon halde hazırlanacağı için zeta potansiyelleri diğer bir deyişle yüzey yükü özelliği önemlidir. Zeta potansiyel, partiküllerin elektriksel potansiyellerini yansıtmaktadır ve partiküllerin ve içinde bulundukları ortamın kompozisyonundan etkilenmektedir. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, koloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyel), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Ayrıca nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma eğilimleri elde edilebilir. Zeta potansiyel değeri ± 20 -30 mV arasında ise partiküller kararlıdır. Sentezlenen nanopartiküller bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve topaklaşarak çökelme eğilimindedirler. Hazırlanan formülasyon

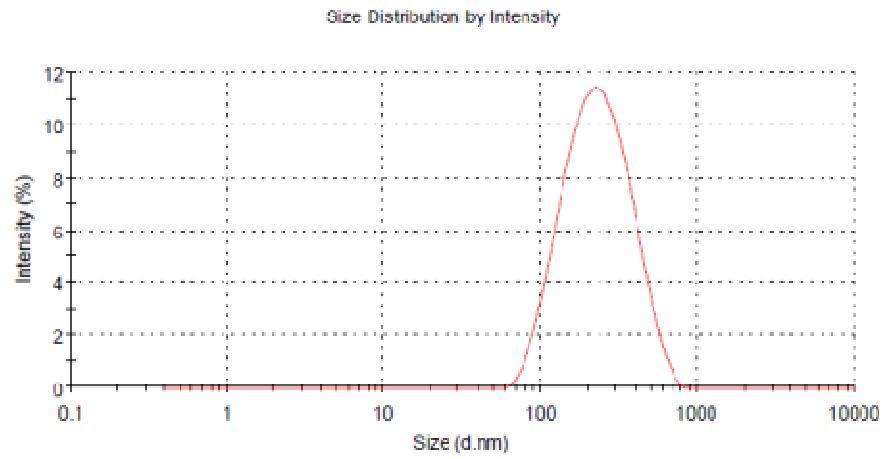
gruplarından NP1 ve NP2'nin zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde kararlı oldukları izlenmiştir.

Nanopartikül boyutlarının homojen dağılım gösterip göstermediklerini izleyebilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımı incelenmiştir. Poli dispersite indeksi (PDI) değeri 0.1-0.25 arasındaki nanopartiküllerin dar bir dağılım gösterdikleri, bunun üzerindeki PDI değerlerinin ise geniş dağılım gösterdikleri kabul edilir. Hazırlanan örnek gruplarında kullanılan ilaç konsantrasyonu arttıkça partikül boyutlarında ve PDI değerlerinde artış gözlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 174 ile 240 nm arasında ve PDI değerleri ise 0.2 ile 0.36 arasında bulunmuştur. Artan ilaç miktarı ile birlikte boyut artarken daha geniş dağılımlı gösterdikleri izlenmiştir.

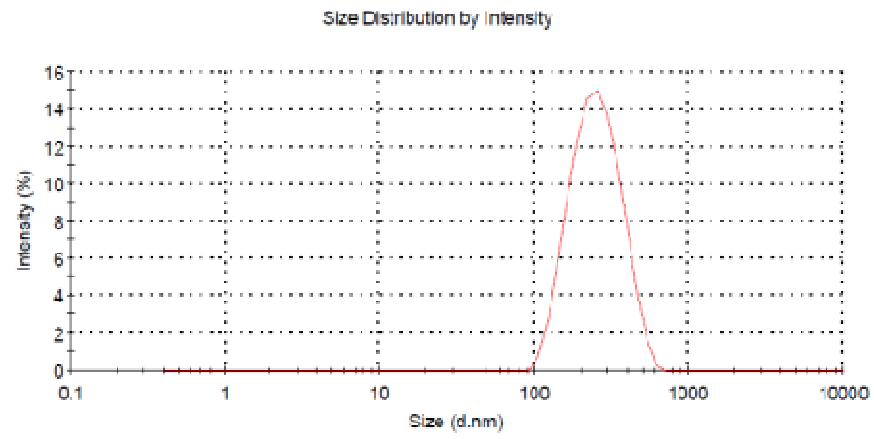
Sonuç olarak, hazırlanan nanopartiküller boyut, zeta potansiyelleri ve partikül dağılımları açısından incelendiğinde, NP1 ve NP2'nin boyut olarak hedeflenen değerlere uygun olduğu ve aynı zamanda dağılım olarak da monodispers bir dağılım göstermeleri nedeniyle çalışmanın amacına uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



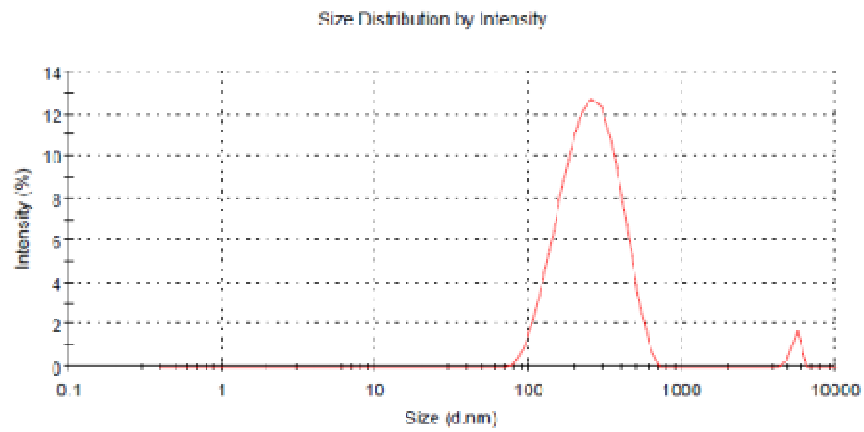
Şekil 4.1. NP1 boyut grafiği



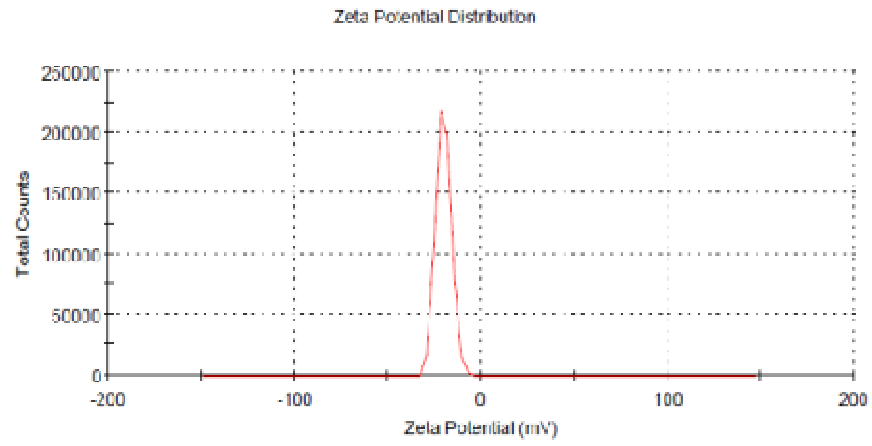
Şekil 4.2. NP2 boyut grafiği



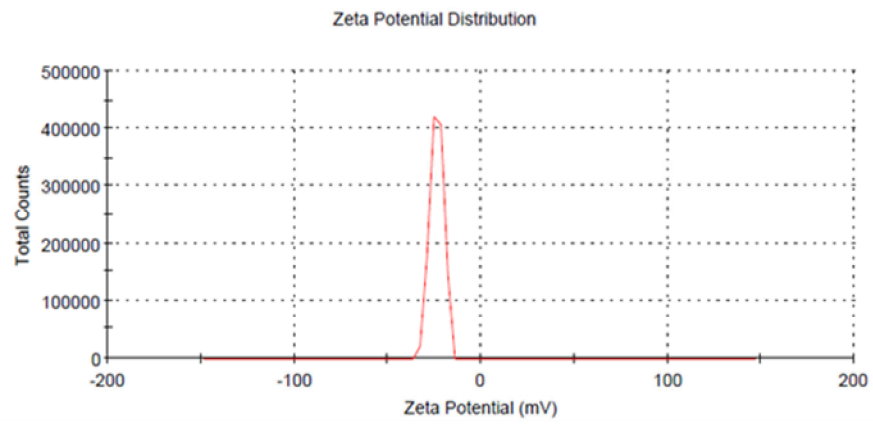
Şekil 4.3. NP3 boyut grafiği



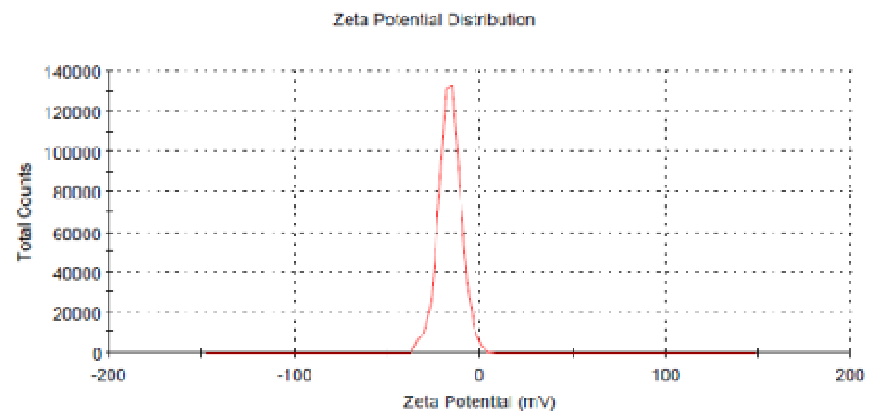
Şekil 4.4. NP4 boyut grafiği



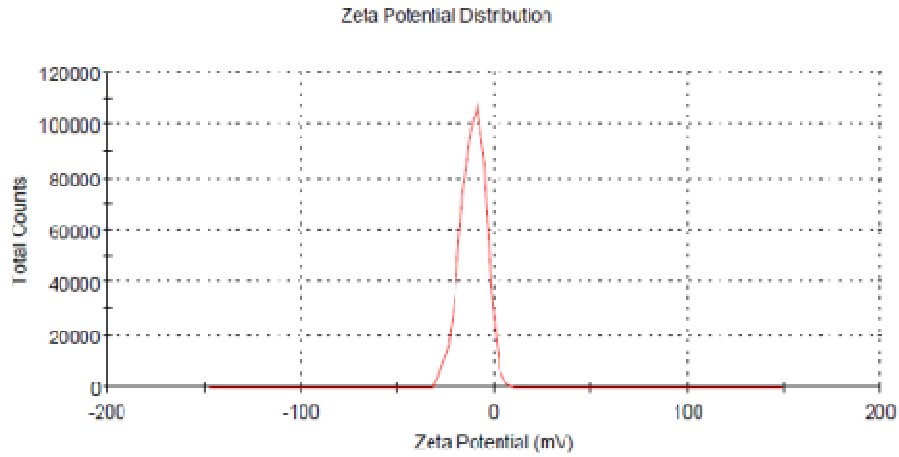
Şekil 4.5. NP1 zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.6. NP2 zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.7. NP3 zeta potansiyel grafiği



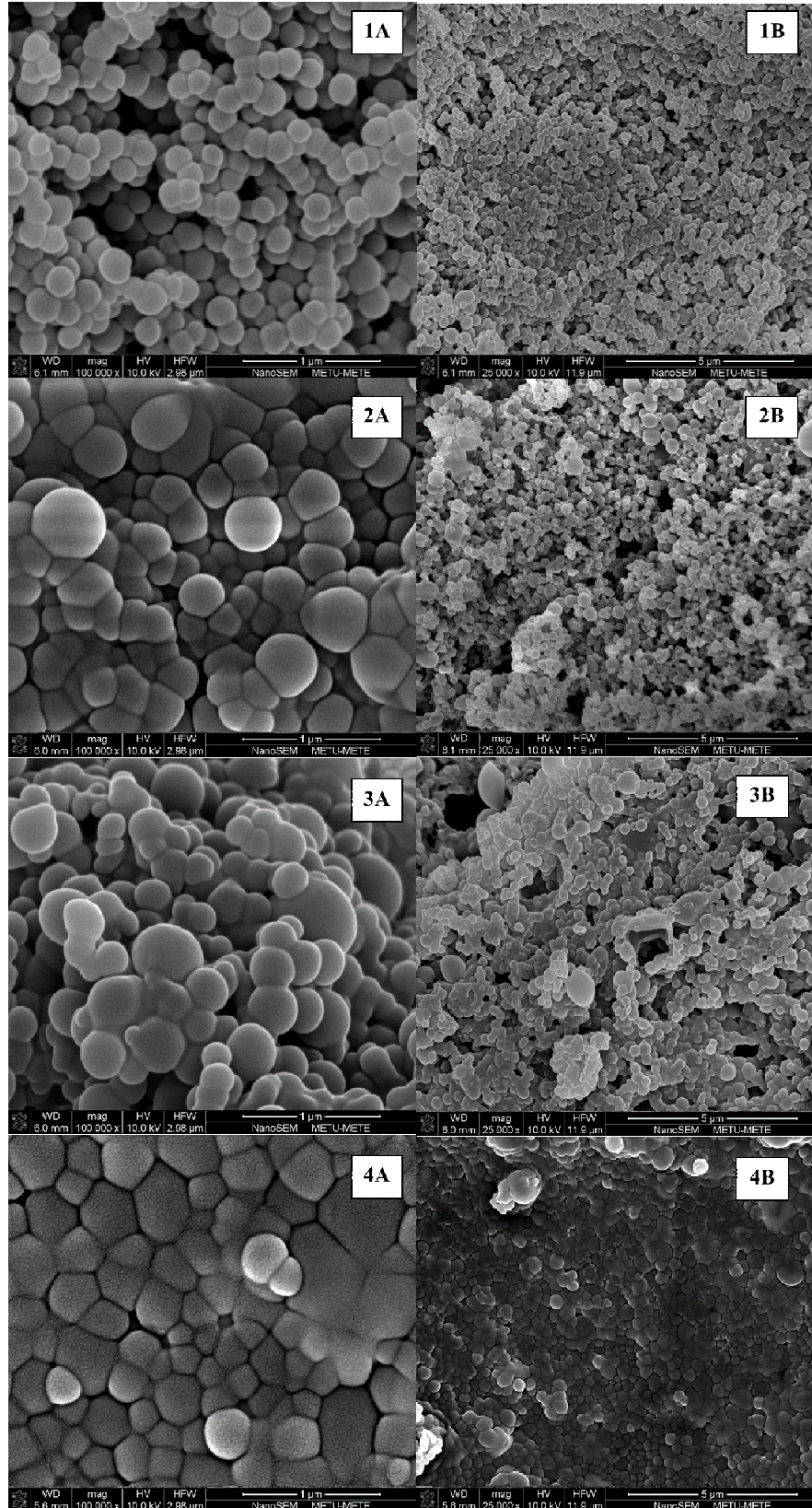
Şekil 4.8. NP4 zeta potansiyel grafiği

4.2. Nanopartiküllerin Morfolojisi

Nanopartiküllerin morfolojisi SEM ile incelenmiş ve partikül boyutlarının Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı verileri ile örtüştüğü görülmüştür. Hazırlanan nanopartikül formulasyonlarından NP1 ve NP2' nin SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.9. 1A ve 2A) bu grupların küresel, düzgün formda, standart boyutlarda, kararlı, agregasyon problemi yaşanmayan örnek grupları olduğu belirlenmiştir. Daha öncede belirtildiği üzere bu grupların zeta potansiyelleri ve PDI verileri de NP1 ve NP2 örnek gruplarının diğerlerine göre daha kararlı yapıda olduğunu göstermiştir. SEM görüntüleri bu verileri destekler niteliktedir.

Ancak nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarının artması ile nanopartiküllerin (NP3 ve NP4) boyutları artarak küresellikten uzaklaşmış ve agregasyon eğilimi göstermiştir (Şekil 4.9. 3A ve 4A).

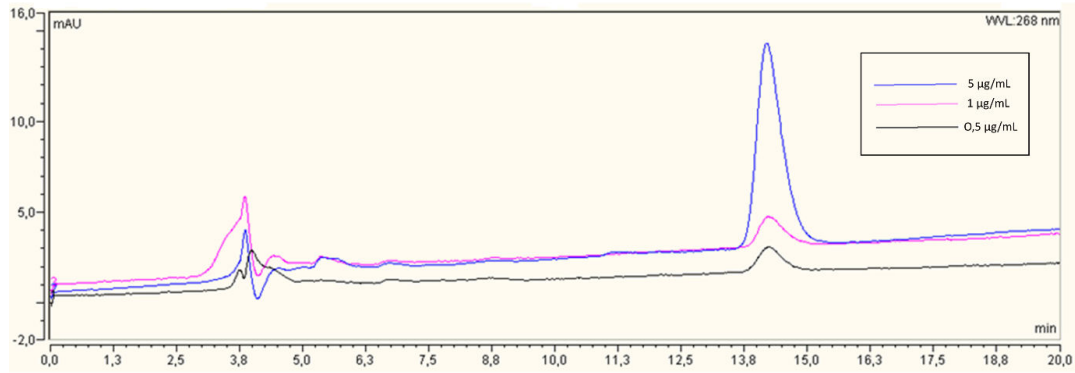
Sonuç olarak, hazırlanan nanopartiküller boyut, zeta potansiyelleri, partikül dağılımları ve morfolojileri açısından incelendiğinde, NP1 ve NP2'nin çalışmanın amacına uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



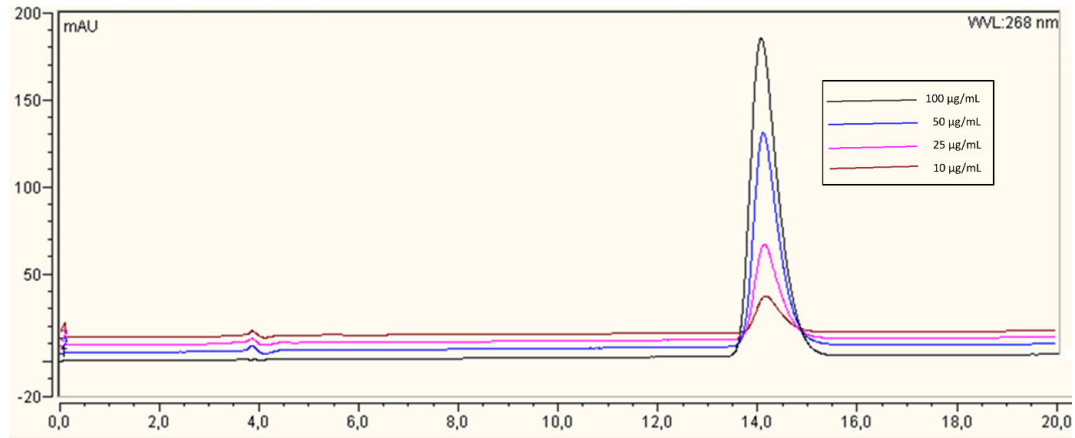
Şekil 4.9. Nanopartiküllerin SEM görüntüsü: NP1) 1A ve 1B; NP2) 2A ve 2B; NP3) 3A ve 3B, NP4) 4A ve 4B, A) 100000 büyütme, B) 25000 büyütme.

4.3. Donepezilin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini

Donepezilin *in vitro* miktar tayini HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL donepezil içeren standartlara ait HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.10 ve 4.11’de gösterilmiştir. Pikler miktar tayinine olanak verecek şekilde simetrik olup pik alanları cihaz tarafından otomatik hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. 0.5, 1 ve 5 µg/mL donepezil içeren standartlara ait kromatogram

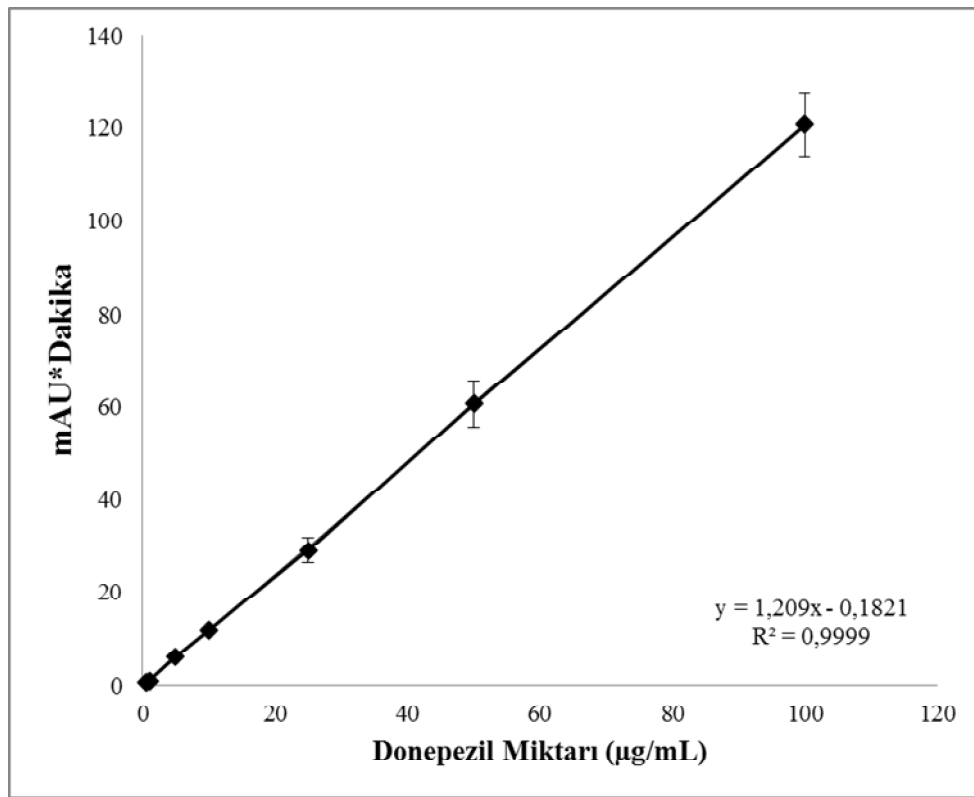


Şekil 4.11. 10, 25, 50 ve 100 µg/mL donepezil içeren standartlara ait kromatogram

Donepezilin *in vitro* miktar tayini için kalibrasyon eğrisi hazırlanırken 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL donepezil içeren standart çözeltiler kullanılmıştır. Donepezile ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

4.3.1. Donepezil Miktar Tayininde Kullanılan HPLC Yönteminin Doğrusallığı

200 µg/mL derişimde hazırlanan donepezilin ana stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL donepezil içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu standart çözeltilere ait kromatogramlardan elde edilen piklerin alanları hesaplanmıştır. Derişimine karşı pik alanları grafiklenip, regresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12). Doğruluk tanımlayıcı regresyon katsayısı ($R^2 = 0.9999$) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. Donepezil'e ait kalibrasyon eğrisi

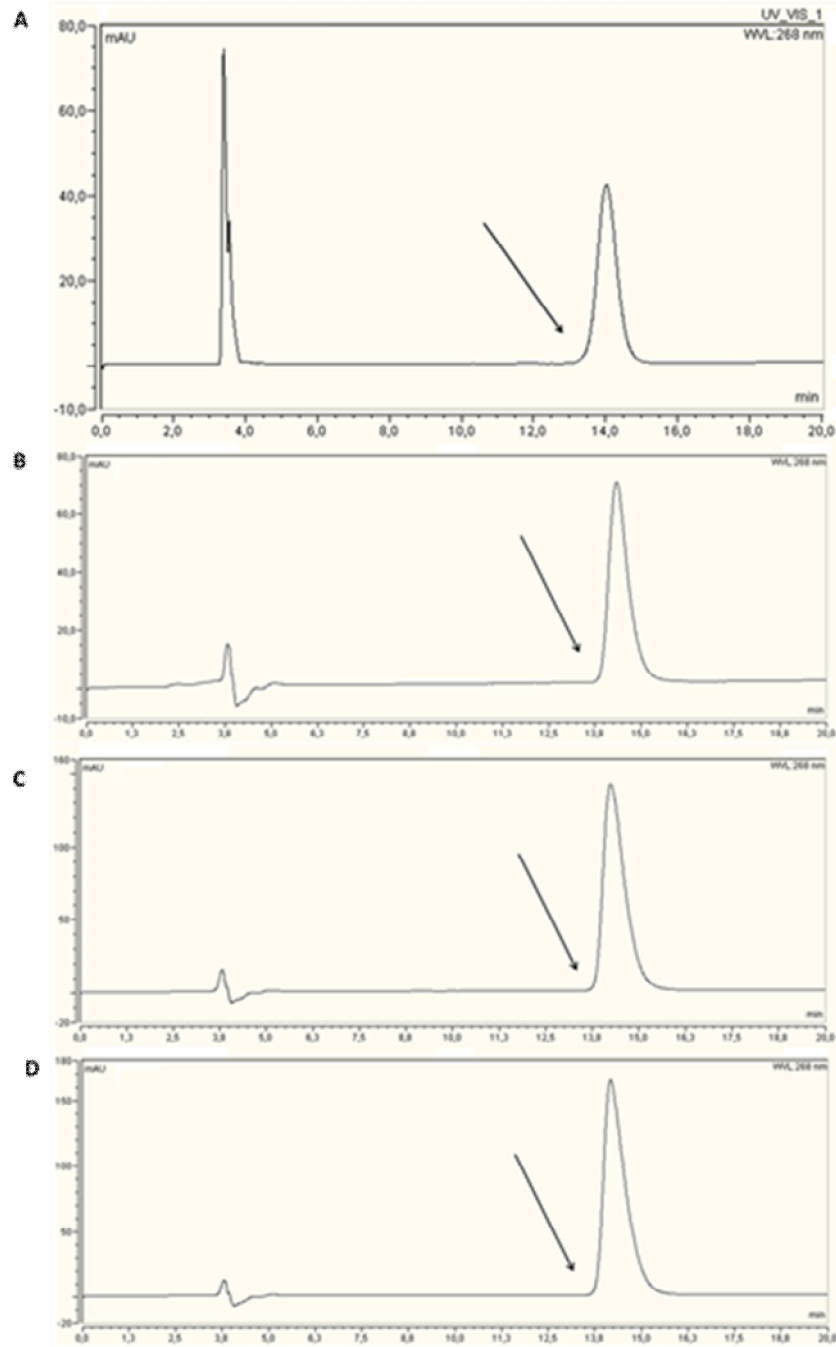
4.3.2. Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerde Yükleme Verimliliği

Çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmış farklı derişimlerde donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin yükleme verimliliğine ilişkin veriler Tablo 4.2'de sunulmuştur. Farklı donepezil derişimleri kullanılarak hazırlanmış PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin dış faz kromatogramları Şekil 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Nanopartiküllere donepezil yükleme etkinliği

Nanopartikül formülasyonu	Nanopartiküllere yüklenmek üzere tartılan donepezil miktarı (mg)	Nanopartiküllerde tayin edilen donepezil miktarı (µg)	Etkin madde yükleme verimliliği (%)
NP1	2.5	23.86±1.34	52.49
NP2	5	55.02±7.82	60.53
NP3	7.5	76.70±12.04	56.40
NP4	10	101.28±10.56	55.71

Hazırlanan nanopartiküllerin ilaç yükleme verimliliğinin % 52 ile % 60 arasında değiştiği izlenmiştir. Artan ilaç yüklemesinin nanopartiküllerde ilaç yükleme verimliliğine fazlaca bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu nedenle nanopartiküllerin boyut, dağılımları ve ilaç yükleme oranları birlikte değerlendirildiğinde NP1 ve NP2 örneklerin ileriki çalışmalar için uygun örnekler olduğu sonucuna varılmıştır.



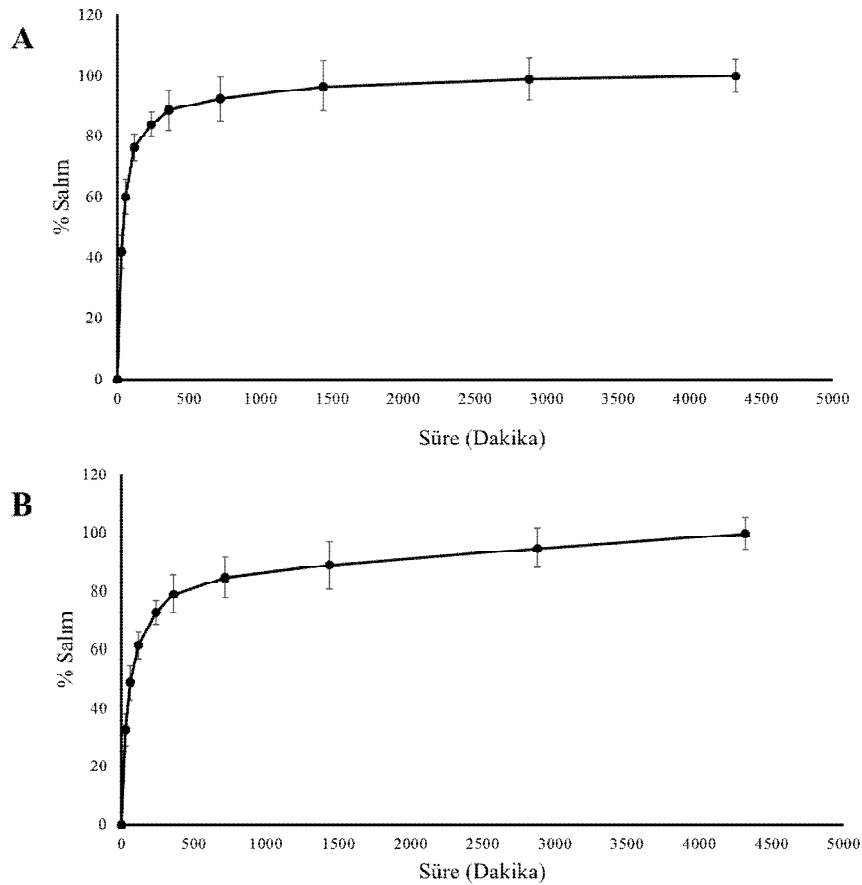
Şekil 4.13. Farklı derişimlerde donepezil kullanılarak hazırlanmış nanopartiküllerin dış faz kromotogramları

4.4. Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin *in vitro* Etkin Madde Salım Çalışmaları

Donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin *in vitro* etkin madde salım çalışmaları, farklı zaman dilimlerinde (30. dakika, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72.

Saat) ve 2,5 mg, 5 mg donepezil ile hazırlanan nanopartiküllerin % salınan etkin madde miktarının ölçülmesiyle (n=3) gerçekleştirilmiştir. Etkin madde salım grafiği Şekil 4.14'de gösterilmiştir. 2,5 mg donepezil ile hazırlanan nanopartiküller (NP1) içerdikleri donepezilin % 60'ını ilk 2 saat içinde salmışlardır. 5 mg donepezil ile hazırlanan nanopartiküller (NP2) ise içerdikleri donepezilin % 50'sini ilk 2 saat içinde salmışlardır. Bu hızlı salımın patlama etkisi olarak bilinen (burst effect) etkiden kaynaklandığı ve nanopartikül yüzeyinde adsorplanmış donepezilin aniden saliverişi sonucu ortaya çıktığı düşünülmüştür. 2,5 mg donepezil ile hazırlanan nanopartikülde 10. saatten sonra salımın platoya ulaşması, ilacın 5 mg donepezil ile hazırlanan nanopartiküle göre daha kontrollü olarak salındığını göstermektedir.

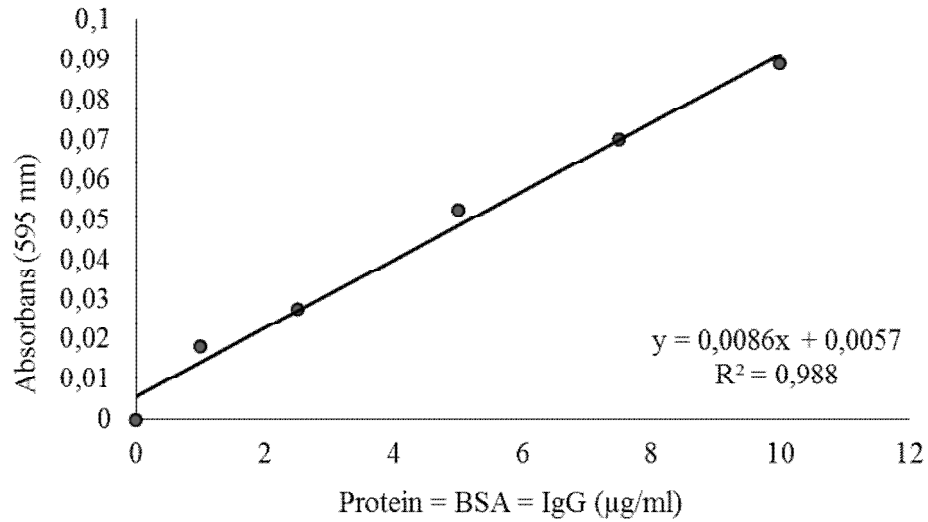
Bütün bu sonuçlar ele alındığında *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere NP1 formülasyonu seçilmiştir.



Şekil 4.14. A) 2,5 mg donepezil ile hazırlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerin *in vitro* salım grafiği, B) 5 mg donepezil ile hazırlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerin *in vitro* salım grafiği

4.5. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Anti-A β Antikoru ile Konjugasyonu

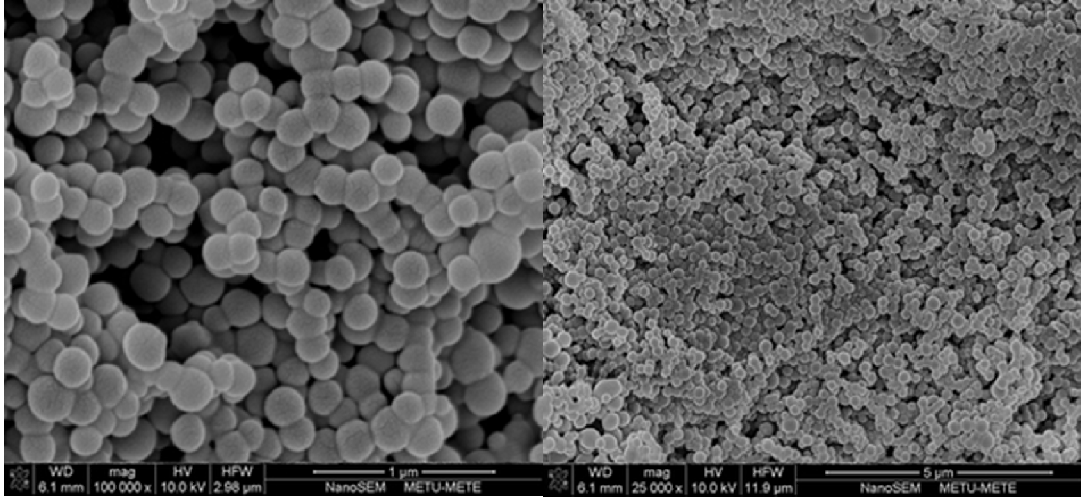
Nanopartiküllere anti-A β antikoru bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi, NP1’e kovalent olarak bağlanmıştır. Antikor bağlanma etkinliği model antikor olan IgG ile belirlenmiş ve $5,87 \pm 1,24$ μg IgG/mg nanopartikül olarak bulunmuştur. Antikor bağlanma etkinliği hesaplaması yapılırken Bradford yöntemi ile şekil 4.15’deki BSA validasyon eğrisi kullanılmıştır.



Şekil 4.15. BSA validasyon eğrisi

4.5.1. Anti-A β Antikoru ile Konjuge Nanopartiküllerin Morfolojisi

Anti-A β antikor ile konjuge nanopartiküllerin morfolojisinin incelenmesinde antikorsuz nanopartiküller ile arasında bir değişiklik olmayacağı belirtilmiştir. Bu nedenle tekrar SEM görüntüsü alınmamıştır. Şekil 4.16’da NP1 için SEM görüntüsü verilmiştir.

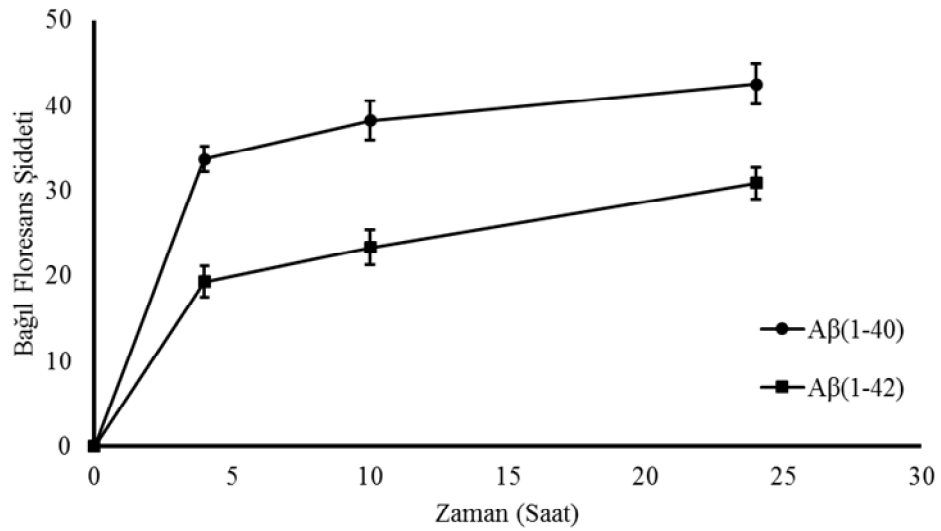


Şekil 4.16. NP1'in SEM görüntüsü (100000 büyütme, 25000 büyütme)

4.6. *İn vitro* Deney Sonuçları

4.6.1. A β (1-40) ve A β (1-42) Fibrillerinin Hazırlanması, ThT Ölçümü ve Morfolojik Analizi

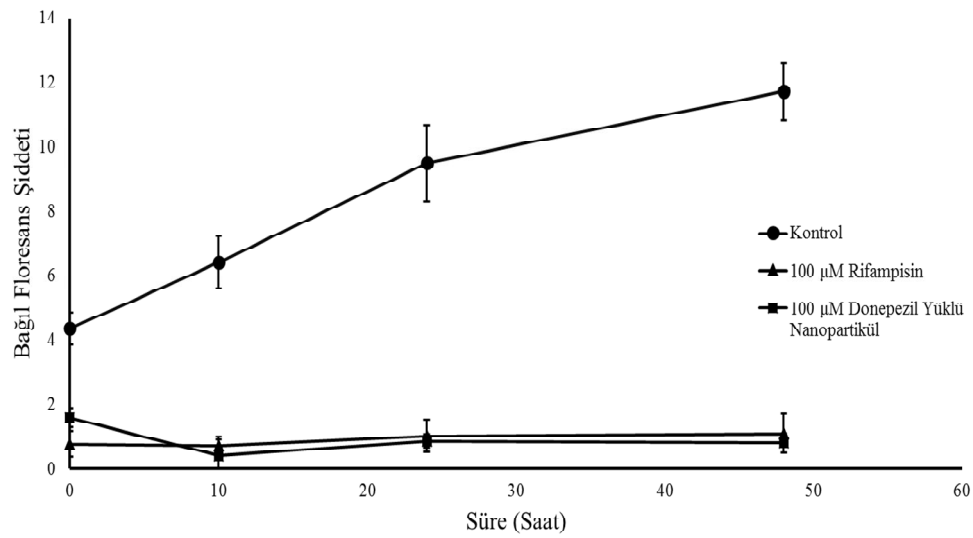
A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri *in vitro* koşullarda bölüm 3.6.1.2'de belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Fibril oluşumuna ait ThT floresans şiddetindeki artışı gösteren grafik Şekil 4.17'de sunulmuştur.



Şekil 4.17. A) A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilinin oluşumuna ait grafik

4.6.2. A β (1-40) Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu

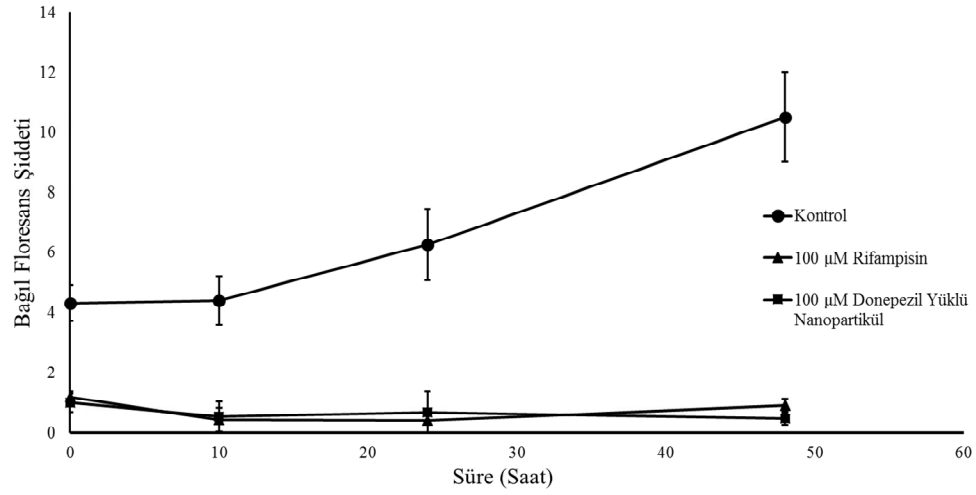
A β (1-40) fibriller ile 100 μ M derişimdeki donepezil içeren nanopartiküller ve fibrilleri inhibe ettiğı bilinen referans bileşik 100 μ M Rifampisin ve fibrilli kontrol ortamı ile 3.6.1.3’de belirtilen yöntem doğrultusunda inkübe edilmiş; inkübasyon sırasında 0, 10, 24, 48. saatlerde örnekler alınmış ve inhibisyon bölüm 3.6.1.5’de belirtilen ThT fuloresans ölçümü ile izlenmiştir. Donepezil ve rifampisinin fibrilleri destabilize ettiğine ilişkin grafik Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. A β (1-40) fibrilinin rifampisin ve donepezil ile inhibisyonuna ait grafik

4.6.3. A β (1-42) Fibrilin Donepezil ve Rifampisin ile İnkübasyonu

A β (1-42) fibriller ile 100 μ M derişimdeki donepezil içeren nanopartiküller ve fibrilleri inhibe ettiğı bilinen referans bileşik 100 μ M Rifampisin ve fibrilsiz kontrol ortamı ile 3.6.1.4’de belirtilen yöntem doğrultusunda inkübe edilmiş; inkübasyon sırasında 0, 10, 24, 48. saatlerde örnekler alınmış ve inhibisyon bölüm 3.6.1.5’de belirtilen ThT fuloresans ölçümü ile izlenmiştir. Donepezil ve rifampisinin fibrilleri destabilize ettiğine ilişkin grafik Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

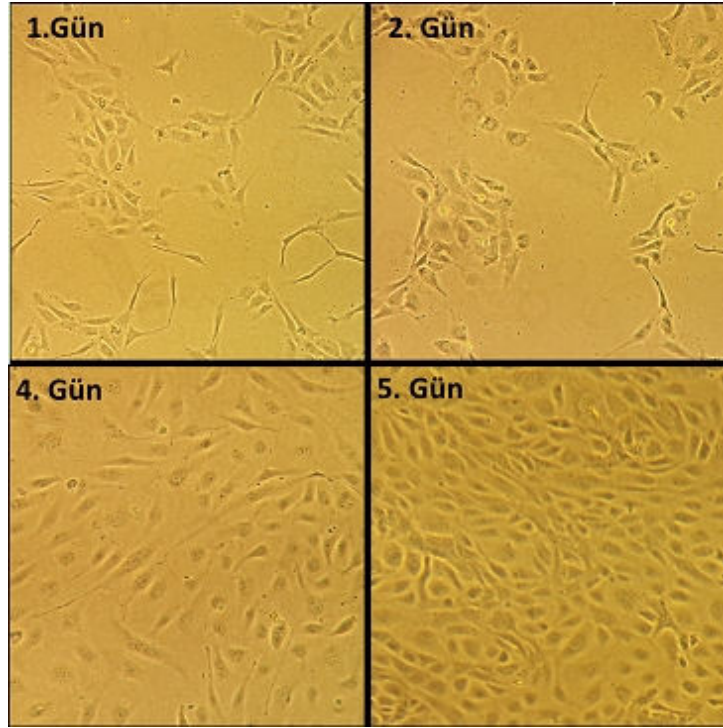


Şekil 4.19. Aβ(1-42) fibrilinin rifampisin ve donepezil ile inhibisyonuna ait grafik

4.6.4. Hücre Kültürü

İBMEH Kültürü

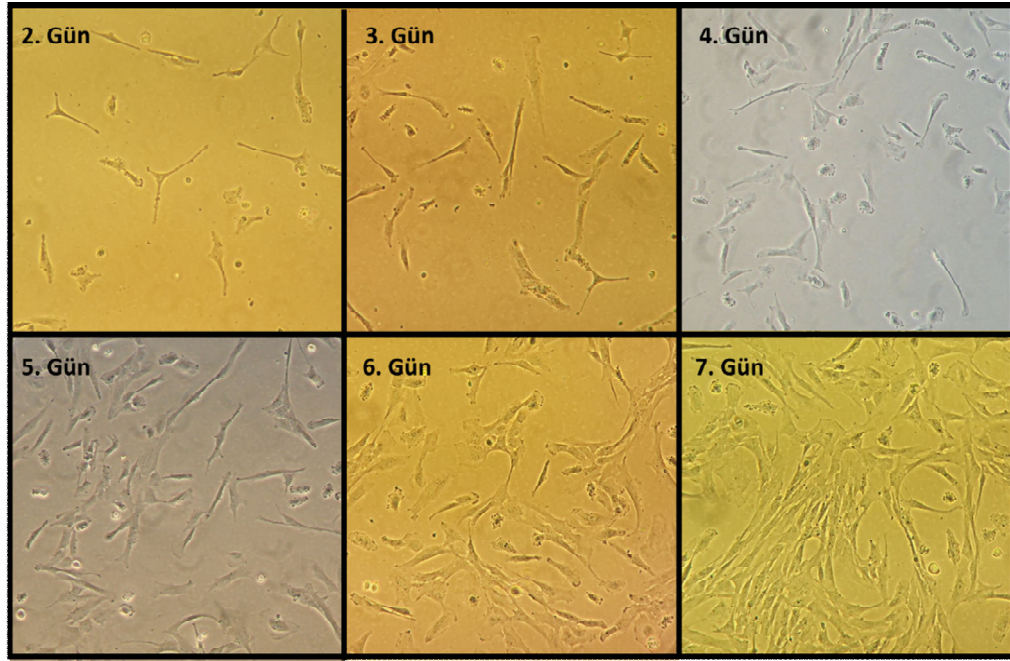
Deneylerde İBMEH hücre hattı (ACBRI 376) kullanılmıştır. Hücreler ekilmeden önce flasklar attachment factor (4Z0-210, Cellsystems) ile kaplanmıştır. Hücreler, antibiyotiklerle desteklenen (100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin), %10 oranında FBS ve %1 endotel hücre büyüme faktörü (ECGS) içeren insan beyin mikrovasküler EH'ine özel besi yeri olan ECM (Sciencecell) ile süspande edilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda büyümeye bırakılmışlardır. Bu koşullarda hücreler ortalama 5 gün içinde tam doluluğa ulaşmıştır ve hücreler pasajlanmıştır. Hücre proliferasyonunun zamana bağımlı artışı Şekil 4.20'de sunulmuştur.



Şekil 4.20. IBMEH'lerinin zamana bağımlı proliferasyonu

İnsan Astrosit Hücre Kültürü

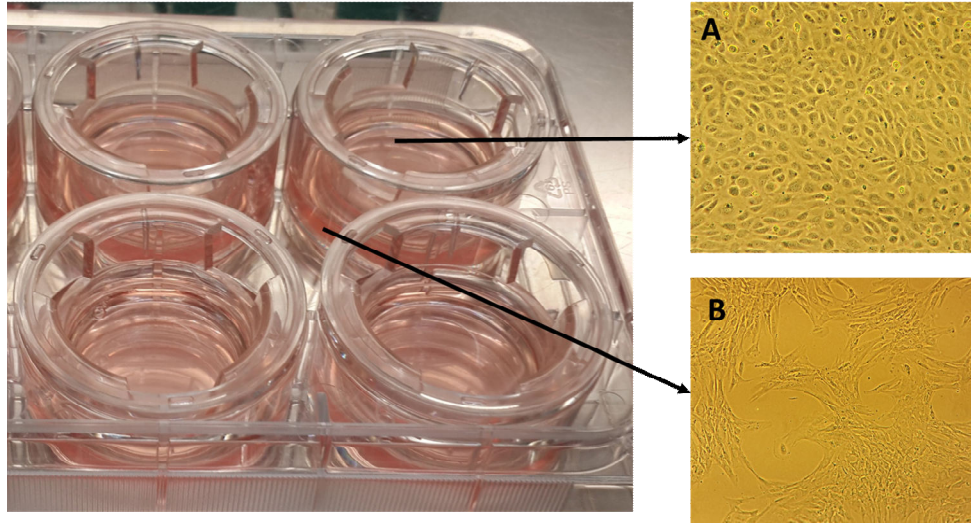
Deneylerde insan astrosit hücre hattı (Cat no: 1800-5, Sciencecell) kullanılmıştır. Hücreler ekilmeden önce flasklar poly-L-Lizin ile kaplanmıştır. Hücreler, antibiyotiklerle desteklenen (100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin), %10 oranında FBS ve %1 oranında astrosit hücresi büyüme faktörü (AGF) içeren insan astrosit hücrelerine özel besi yeri olan AM (Sciencecell) ile süspande edilerek 37°C'de 5% CO₂ içeren nemli ortamda büyümeye bırakılmışlardır. Bu koşullarda hücreler ortalama 7 gün içinde tam doluluğa ulaşmıştır ve hücreler pasajlanmıştır. Hücrelerin zamana bağımlı proliferasyonları Şekil 4.21'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. İnsan Astrosit hücrelerinin zamana bağımlı proliferasyonları

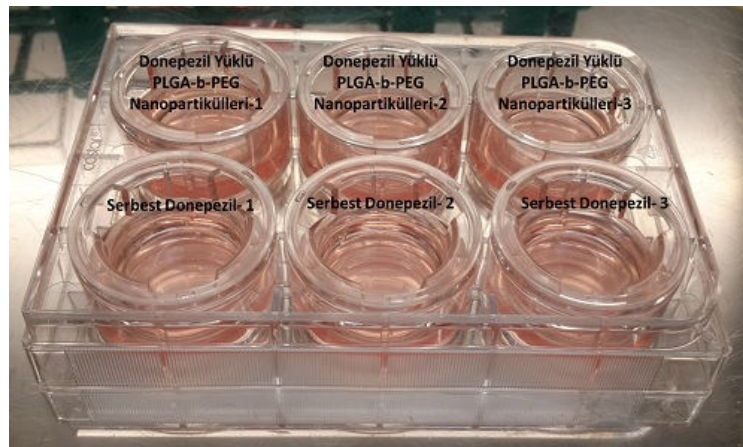
4.6.5. KBB *in vitro* Modeli

İBMEH, KBB’ni temsil eden polarize bir tabaka elde etmek amacıyla, 6 kuyucuklu, 0.4 μ m-porlu, yarı saydam membran girintilerine astrositler ise kuyucuklara ekilmiştir. EH tabakası bu sistemi apikal (kan tarafı) ve bazolateral bölüm (beyin tarafı) olarak ayrılmaktadır. Bu düzenek, KBB’in her iki tarafına uygulama yapılması ve örnek alınmasına olanak sağlamaktadır. Çalışma için hazırlanmış deney düzeneği Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



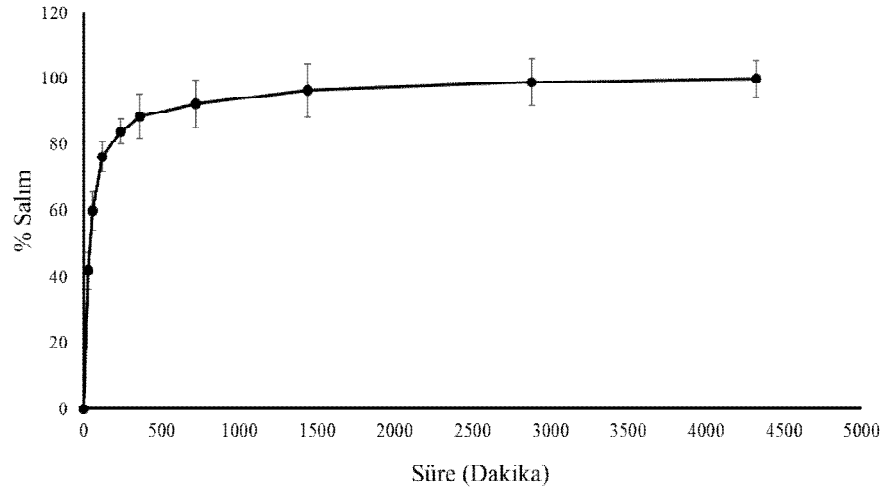
Şekil 4.22. *In vitro* KBB deney düzeneği: A) İBMEH'leri B) İnsan Astrosit Hücre Kültürü

Hem 1 $\mu\text{g/mL}$ serbest ilacın (donepezil) hem de 1 $\mu\text{g/mL}$ donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin KBB'ni geçme kabiliyetleri *in vitro* KBB modeli kullanılarak araştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 1 $\mu\text{g/mL}$ serbest donepezil ve 1 $\mu\text{g/mL}$ donepezil içeren yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri uygulanmıştır. ELISA ve RT-PCR çalışmaları için serbest ilaç ve donepezil yüklü nanopartikülleri azalan farklı dozlarda hazırlanmış ve uygulanmıştır (0,0312 $\mu\text{g/mL}$, 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, 0,125 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Bu çalışma yapılırken örneklerin plak üzerindeki düzeni Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23. *In vitro* KBB'ne uygulanan donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküllerin deney düzeneği.

Deney düzeneğinde ECM'den ve AM'den belirli zaman (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48. Saat) aralıklarında örnekler alınarak donepezil konsantrasyonu ölçülmüştür. Seçilen zaman aralıkları Şekil 4.24'de verilen NP1 formülasyonu için elde edilen salım etkinliği profiline göre belirlenmiştir.



Şekil 4.24. NP1 salım etkinliği profili

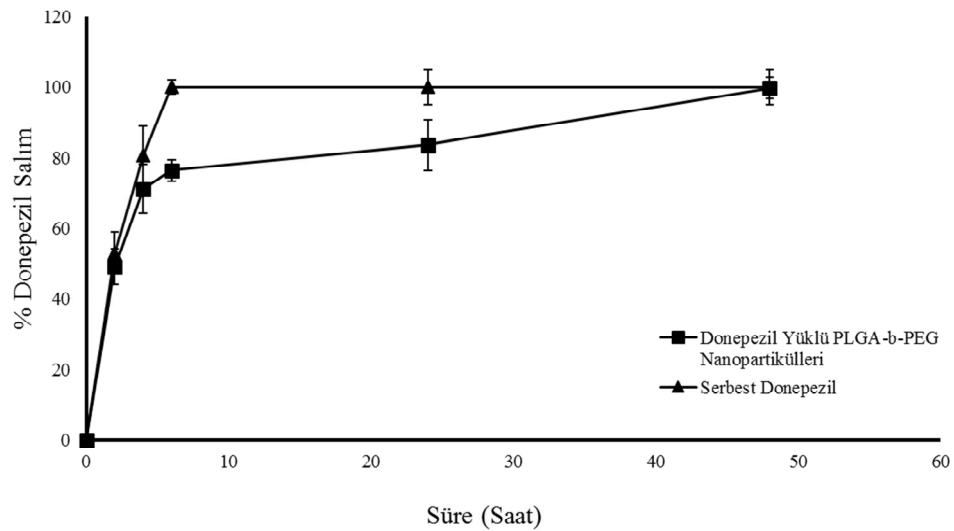
4.6.6. AM Ortamındaki Donepezil Miktarının Belirlenmesi

KBB düzeneği kullanılarak donepezilin KBB'den geçip geçmediği, serbest donepezil kullanılarak araştırılmıştır. Salım profili ile belirlenen zaman aralıklarında (2, 4, 6, 24, 48. Saat) plaklardan toplanan AM ortamı toplanmıştır. Donepezil derişimi HPLC yöntemi ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak tayin edilmiştir. Tablo 4.3 ve Şekil 4.25'de elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Tablo 4.3. AM ortamı zamana göre donepezil konsantrasyonu* (n=4)

	Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikülleri AM Ortamı ($\mu\text{g/ml}$)	Serbest Donepezil AM Ortamı ($\mu\text{g/ml}$)
2 Saat	0.29 ± 0.01	0.34 ± 0.02
4 Saat	0.41 ± 0.03	0.52 ± 0.05
6 Saat	0.45 ± 0.05	0.66 ± 0.13
24 Saat	0.49 ± 0.08	0.69 ± 0.12
48 Saat	0.58 ± 0.12	0.69 ± 0.15

* AM ortamının hacmi 2.5 mL, ECM ortamının hacmi ise 1.5 mL bu nedenle kümülatif donepezil miktarı ECM ortamına yüklenen 1 $\mu\text{g/mL}$ yerine hacimle orantılı olacak şekilde AM ortamında 0.69 $\mu\text{g/mL}$ olarak gözlenmiştir.

**Şekil 4.25.** KBB düzeneğinde serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin zamana göre donepezil salım profili (n=4)

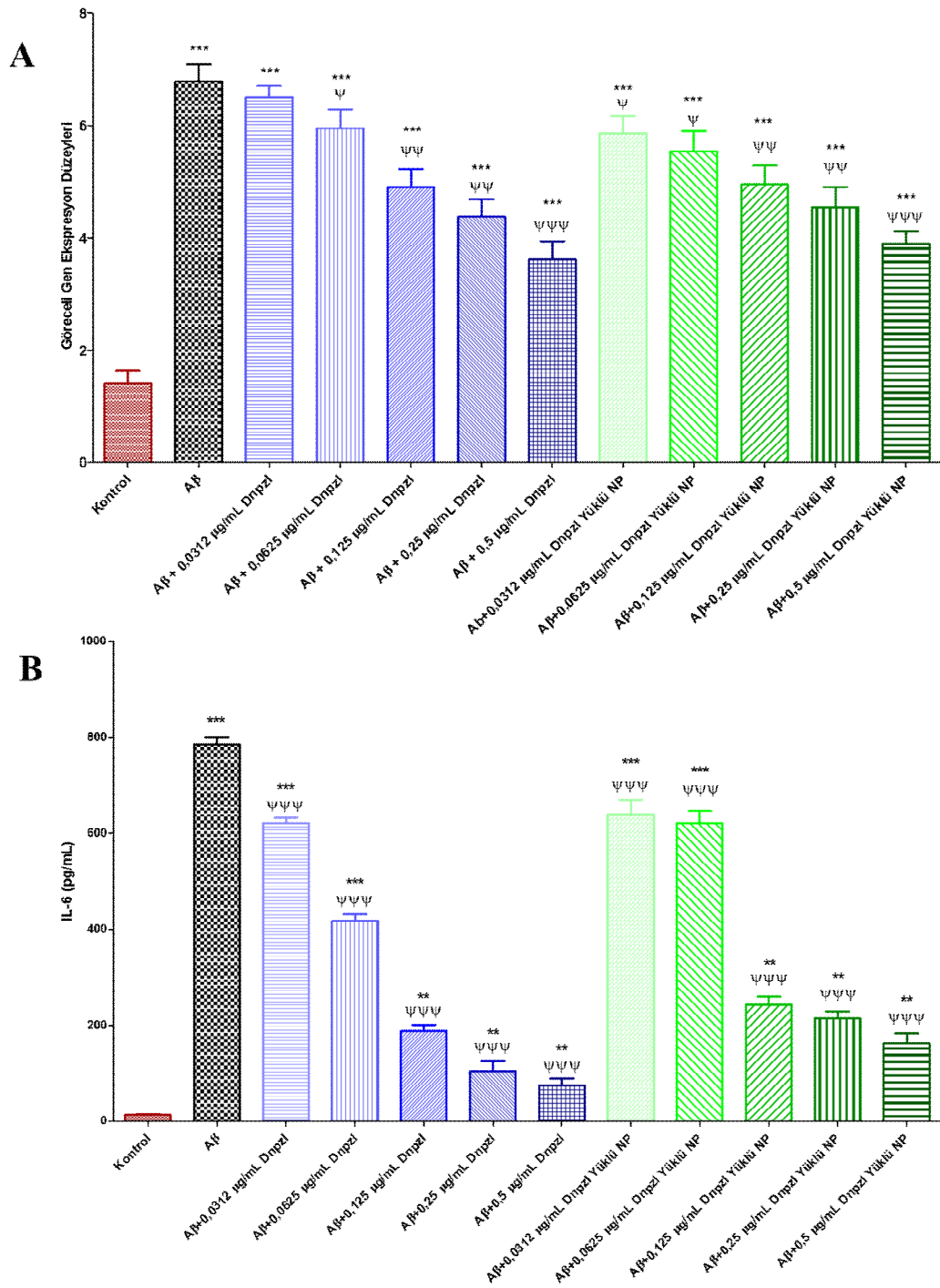
Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan KBB düzeneğinde, kuyucuklara eklenen donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerin ve serbest donepezilin ilk 2 saat içerisinde içerdikleri donepezilin %50'sini AM ortamına geçirdiği tesbit edilmiştir. Serbest donepezil için bu hızlı ilaç geçişi devam edip 6 saat sonunda kuyucuklardaki donepezilin tamamı AM ortamına geçmiştir. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinde ilaç geçişi kontrollü olarak devam edip 48 saat sonunda ilaç salım profili tamamlanmıştır. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG

nanopartiküllerinin sağladığı bu kontrollü ilaç salımının, fibril destabilizasyonu için daha etkili olacağı ve donepezilin hızla hücrelere ulaşmasının neden olabileceği negatif etkileri azaltacağı düşünülmektedir.

4.6.7. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin IL-6 Ekspresyonu

Serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri varlığında astrosit hücreleri üzerindeki potansiyel enflamatuar etkilerini belirlemek amacıyla bu çalışmada amiloid fibril ile aktive edilmiş astrosit hücrelerin mediumlarında ve hücre lizatlarında hem pro- hem de anti-enflamatuar özellikler gösteren çok fonksiyonlu bir sitokin olan IL-6'nın protein seviyeleri ve mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Amiloid fibrillerle aktive edilen astrosit hücrelerinde RT-PCR ile gözlenen IL-6 ekspresyon düzeylerinin arttığı ($P < 0.001$) ve artan dozda donepezil ve donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartikül uygulamasının protein ekspresyonlarını doz ile doğru orantılı olarak azalttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak RT-PCR ile gözlenen sonuçları ELISA ile elde edilen protein düzeyleri de desteklemektedir (Şekil 4.26).

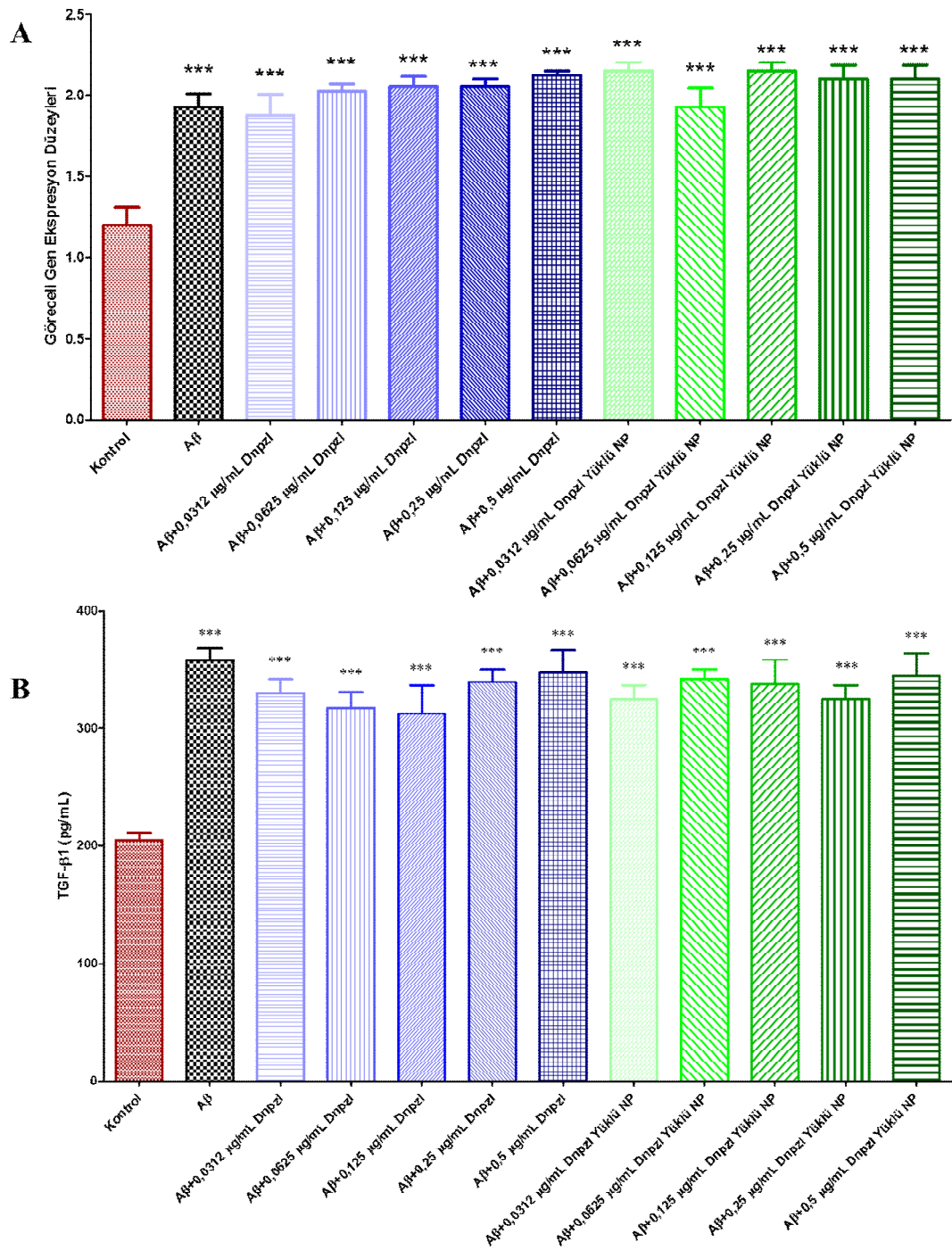


Şekil 4.26. Serbest donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküller için A) Gen düzeyinde IL-6 ekspresyonu B) protein düzeyinde IL-6 miktarı (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ kontrole karşı, ΨΨΨ $P < 0.001$, ΨΨ $P < 0.01$, Ψ $P < 0.05$ Aβ grubuna karşı)

4.6.8. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin TGF- β 1 Ekspresyonu

Serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri varlığında aktive edilmiş astrosit hücrelerin mediumlarında ve hücre lizatlarında enflamasyon ve immün yanıtları düzenleyen hücrelerarası sinyal molekülleri olarak fonksiyon gören proteinlerinden biri olan TGF- β 1 protein seviyeleri ve mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Amiloid fibrillerle aktive edilen astrosit hücrelerinde RT-PCR ile gözlenen TGF- β 1 ekspresyon düzeylerinin arttığı ($P < 0.001$) ve donepezil ve donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartikül uygulaması ile protein ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik saptanmamıştır. Buna ek olarak RT-PCR ile gözlenen sonuçları ELISA ile elde edilen protein düzeyleri desteklemektedir (Şekil 4.27).

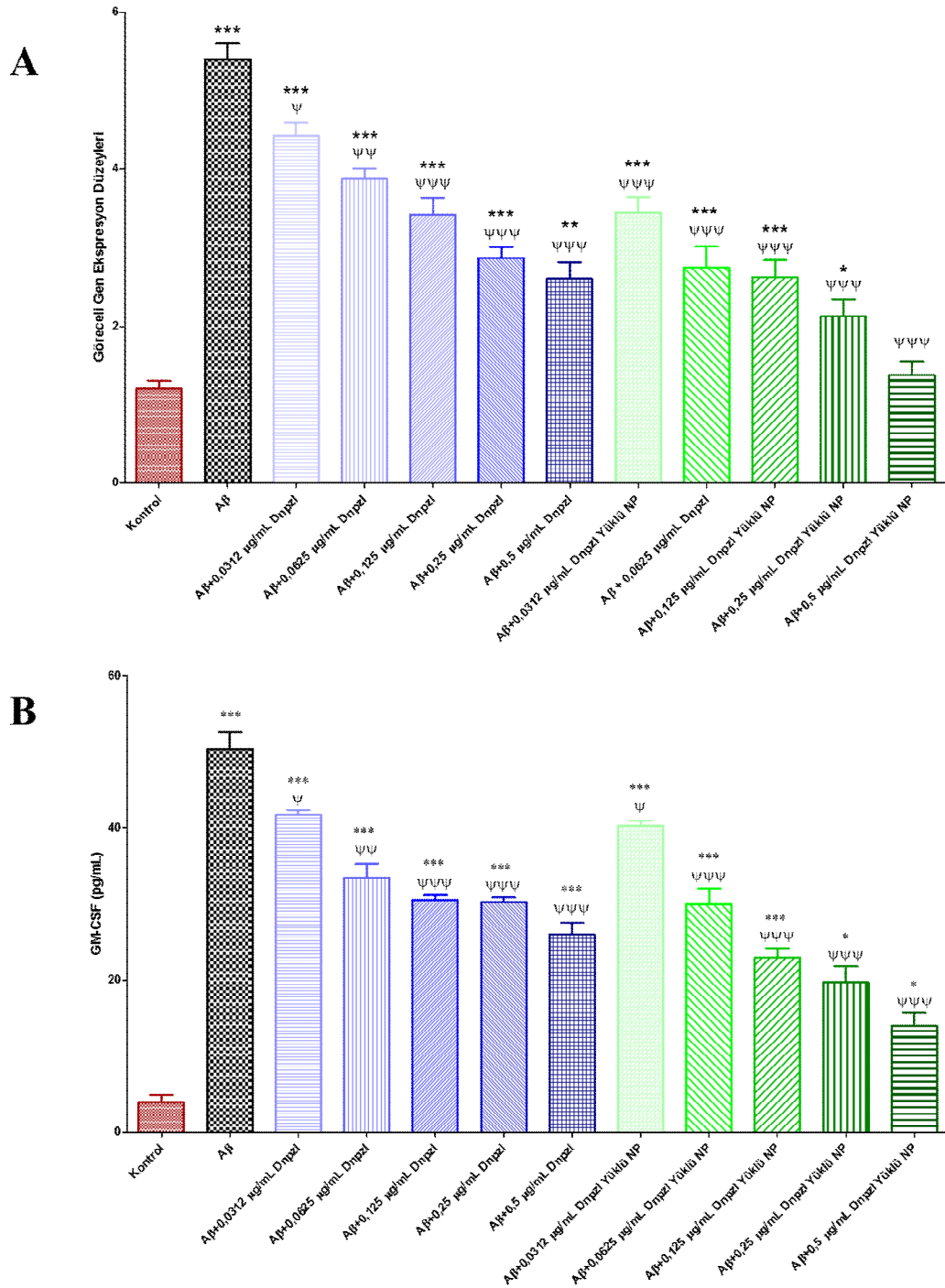


Şekil 4.27. Serbest donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküller için A) Gen düzeyinde TGF-β1 ekspresyonu B) protein düzeyinde TGF-β1 miktarı (***) $P < 0.001$ kontrole karşı)

4.6.9. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin GM-CSF Ekspresyonu

Serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri varlığında astrosit hücreleri üzerindeki potansiyel enflamatuar etkilerini belirlemek amacıyla bu çalışmada amiloid fibril ile aktive edilmiş astrosit hücrelerin mediumlarında ve hücre lizatlarında enflamasyon ve immün yanıtları düzenleyen hücrelerarası sinyal molekülleri olarak fonksiyon gören büyüme faktörlerinden biri olan GM-CSF protein seviyeleri ve mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Amiloid fibrillerle aktive edilen astrosit hücrelerinde RT-PCR ile gözlenen GM-CSF ekspresyon düzeylerinin arttığı ($P<0.001$) ve artan dozda donepezil ve donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartikül uygulamasının protein ekspresyonlarını doz ile doğru orantılı olarak azalttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak RT-PCR ile gözlenen sonuçları ELISA ile elde edilen protein düzeyleri de desteklemektedir (Şekil 4.28).

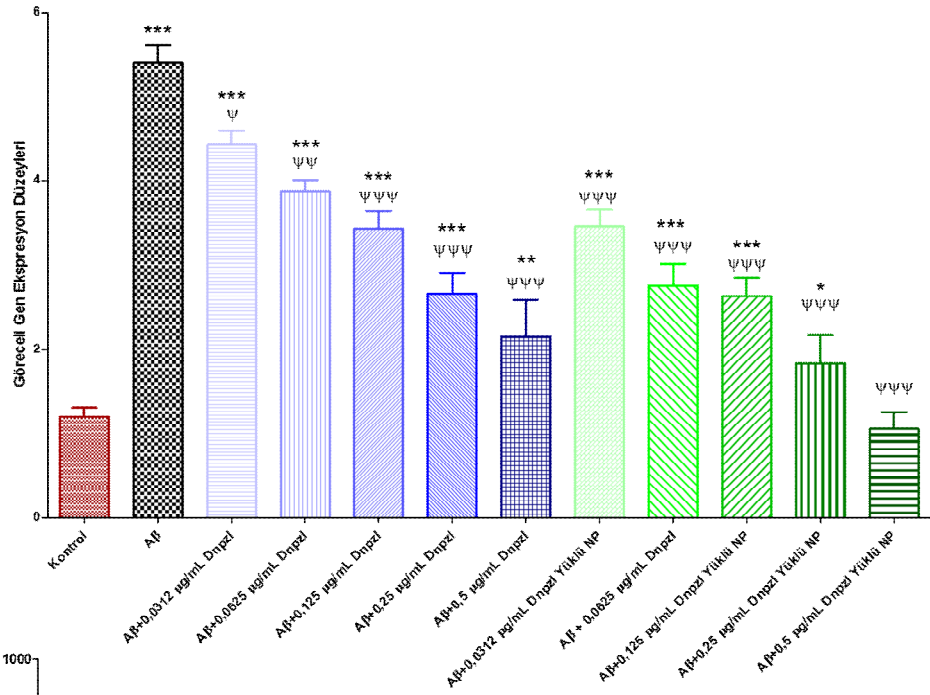
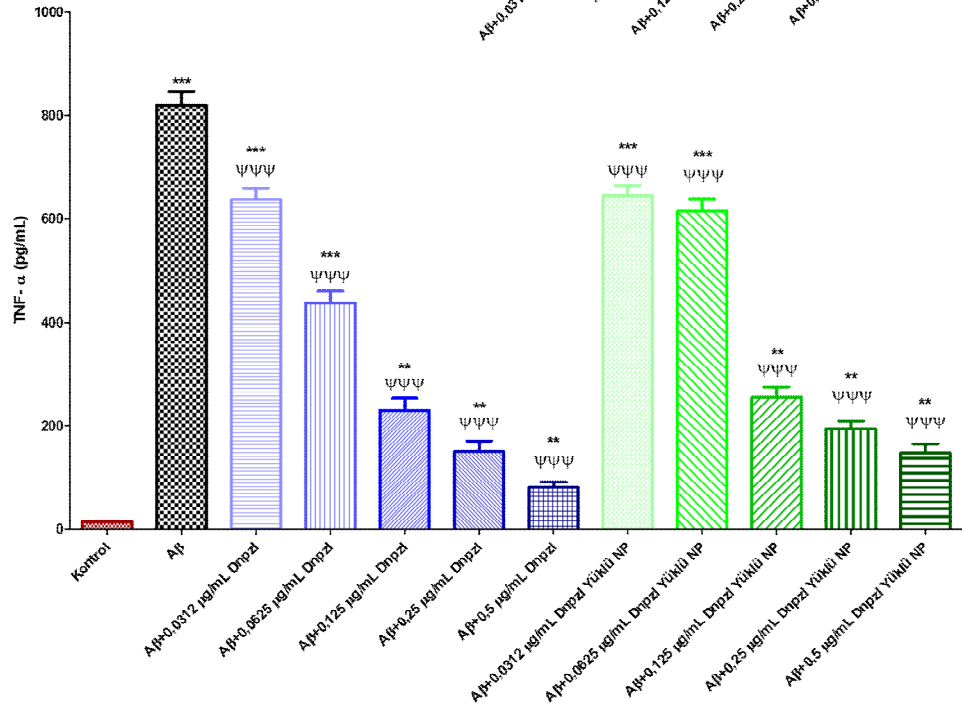


Şekil 4.28. Serbest donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküller için A) Gen düzeyinde GM-CSF ekspresyonu B) protein düzeyinde GM-CSF miktarı (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ kontrole karşı, ΨΨΨ $P < 0.001$, ΨΨ $P < 0.01$, Ψ $P < 0.05$ Aβ grubuna karşı)

4.6.10. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin TNF- α Ekspresyonu

Serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri varlığında aktive edilmiş astrosit hücrelerin mediumlarında ve hücre lizatlarında enflamasyon ve immün yanıtları düzenleyen hücrelerarası sinyal molekülleri olarak fonksiyon gören sitokinlerden TNF- α protein seviyeleri ve mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Amiloid fibrillerle aktive edilen astrosit hücrelerinde RT-PCR ile gözlenen TNF- α ekspresyon düzeylerinin arttığı ($P < 0.001$) ve artan dozda donepezil ve donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartikül uygulamasının protein ekspresyonlarını doz ile doğru orantılı olarak azalttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak RT-PCR ile gözlenen sonuçları ELISA ile elde edilen protein düzeyleri de desteklemektedir (Şekil 4.29).

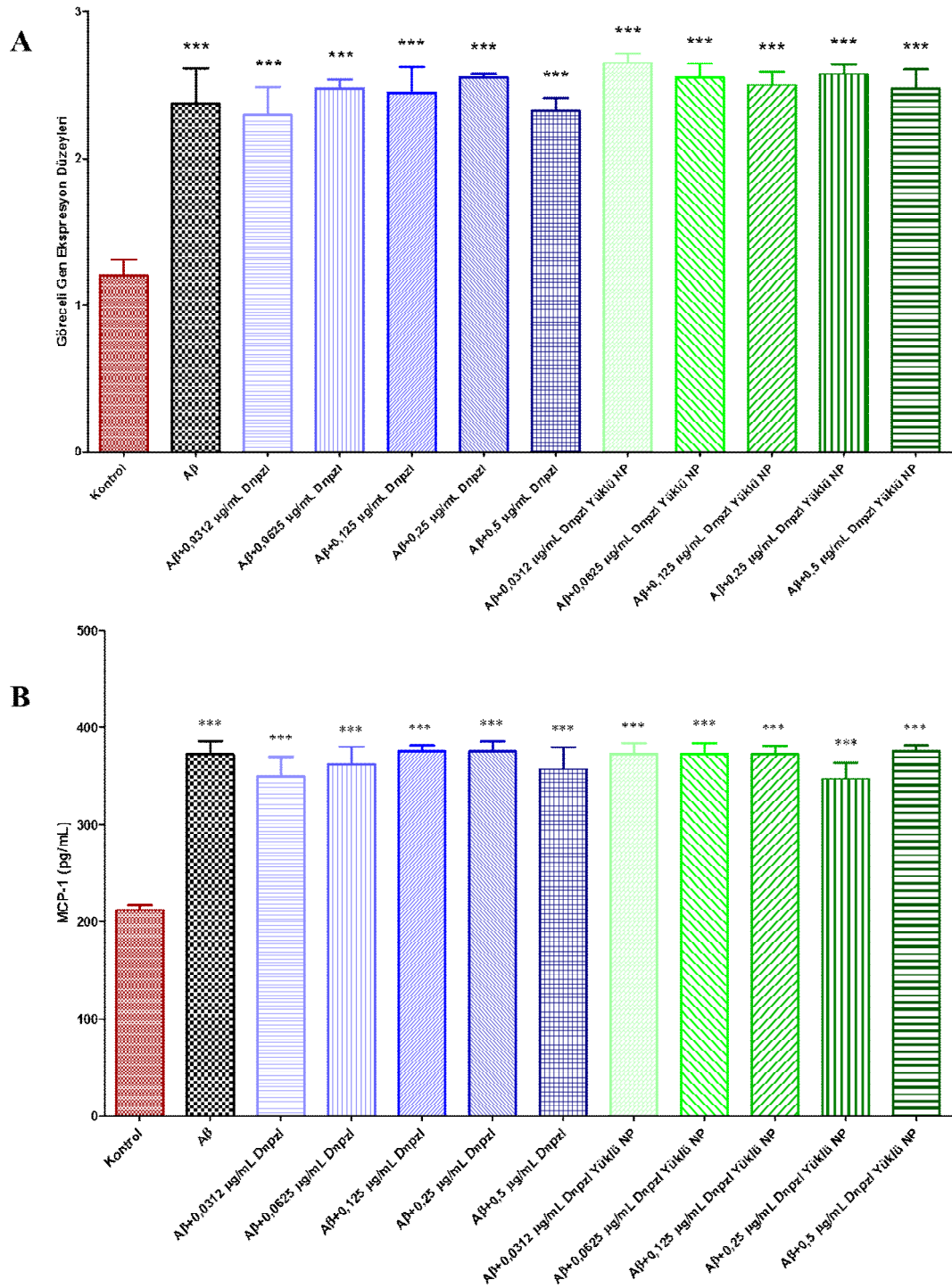
A**B**

Şekil 4.29. Serbest donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküller için A) Gen düzeyinde TNF- α ekspresyonu B) protein düzeyinde TNF- α (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$ kontrole karşı, $\Psi\Psi\Psi$ $P < 0.001$ A β grubuna karşı)

4.6.11. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin MCP-1 Ekspresyonu

Serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri varlığında aktive edilmiş astrosit hücrelerin mediumlarında ve hücre lizatlarında enflamasyon ve immün yanıtları düzenleyen hücrelerarası sinyal molekülleri olarak fonksiyon gören sitokinlerden biri olan MCP-1 protein seviyeleri ve mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Amiloid fibrillerle aktive edilen astrosit hücrelerinde RT-PCR ile gözlenen MCP-1 ekspresyon düzeylerinin arttığı ($P < 0.001$) ve donepezil ve donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartikül uygulaması ile protein ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik saptanmamıştır. Buna ek olarak RT-PCR ile gözlenen sonuçları ELISA ile elde edilen protein düzeyleri desteklemektedir (Şekil 4.30).

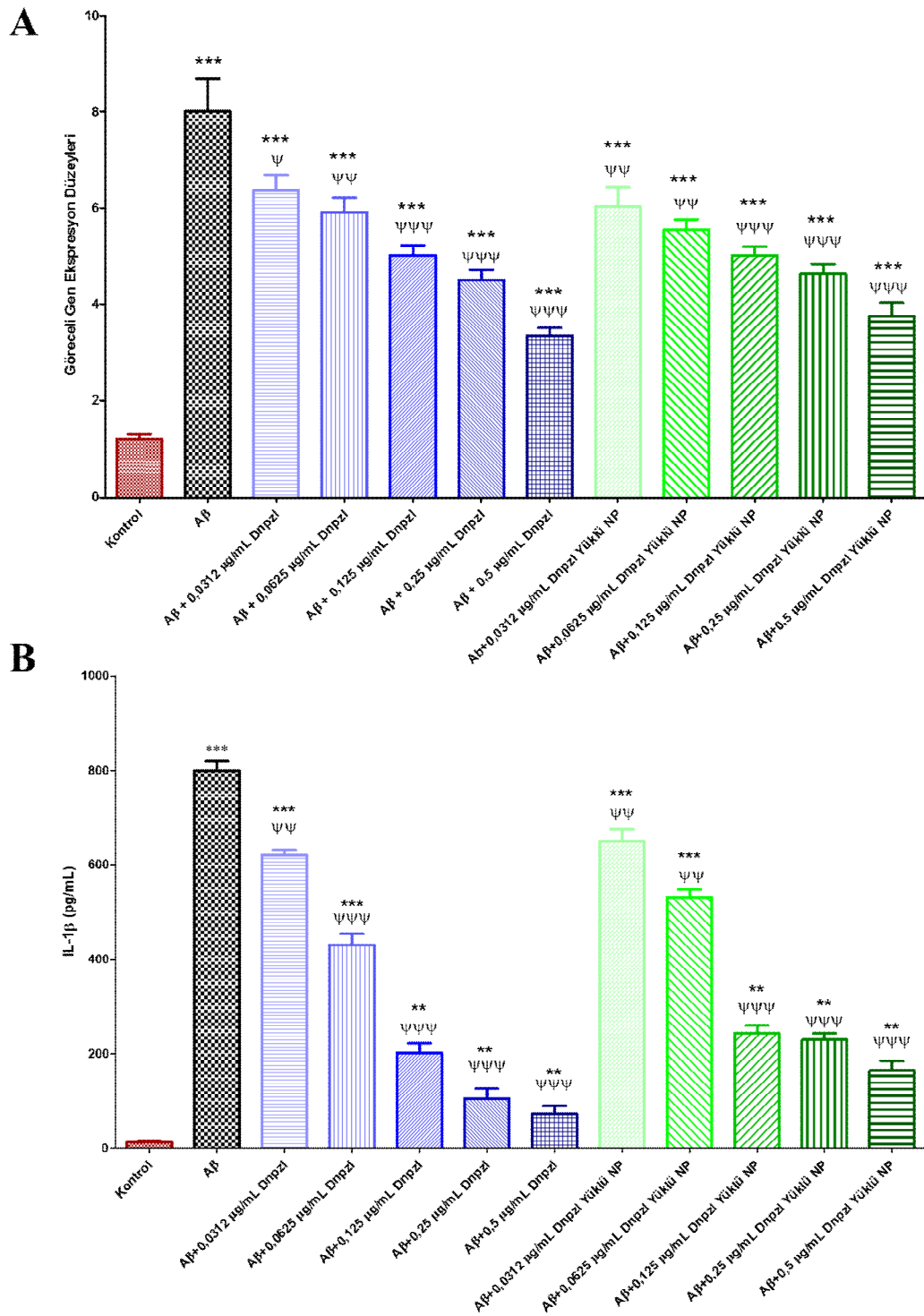


Şekil 4.30. Serbest donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküller için A) Gen düzeyinde MCP-1 ekspresyonu B) protein düzeyinde MCP-1 miktarı (***) $P < 0.001$ kontrole karşı)

4.6.12. A β ile Aktive edilmiş Astrosit Hücrelerinin IL-1 β Ekspresyonu

Serbest donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin A β (1-40) ve A β (1-42) fibrilleri varlığında astrosit hücreleri üzerindeki potansiyel enflamatuar etkilerini belirlemek amacıyla bu çalışmada amiloid fibril ile aktive edilmiş astrosit hücrelerin mediumlarında ve hücre lizatlarında enflamasyon ve immün yanıtları düzenleyen hücrelerarası sinyal molekülleri olarak fonksiyon gören sitokinlerden biri olan IL-1 β protein seviyeleri ve mRNA ekspresyonları belirlenmiştir.

Amiloid fibrillerle aktive edilen astrosit hücrelerinde RT-PCR ile gözlenen IL-1 β ekspresyon düzeylerinin arttığı ($P < 0.001$) ve artan dozda donepezil ve donepezil içeren PLGA-b-PEG nanopartikül uygulamasının protein ekspresyonlarını doz ile doğru orantılı olarak azalttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak RT-PCR ile gözlenen sonuçları ELISA ile elde edilen protein düzeyleri de desteklemektedir (Şekil 4.31).

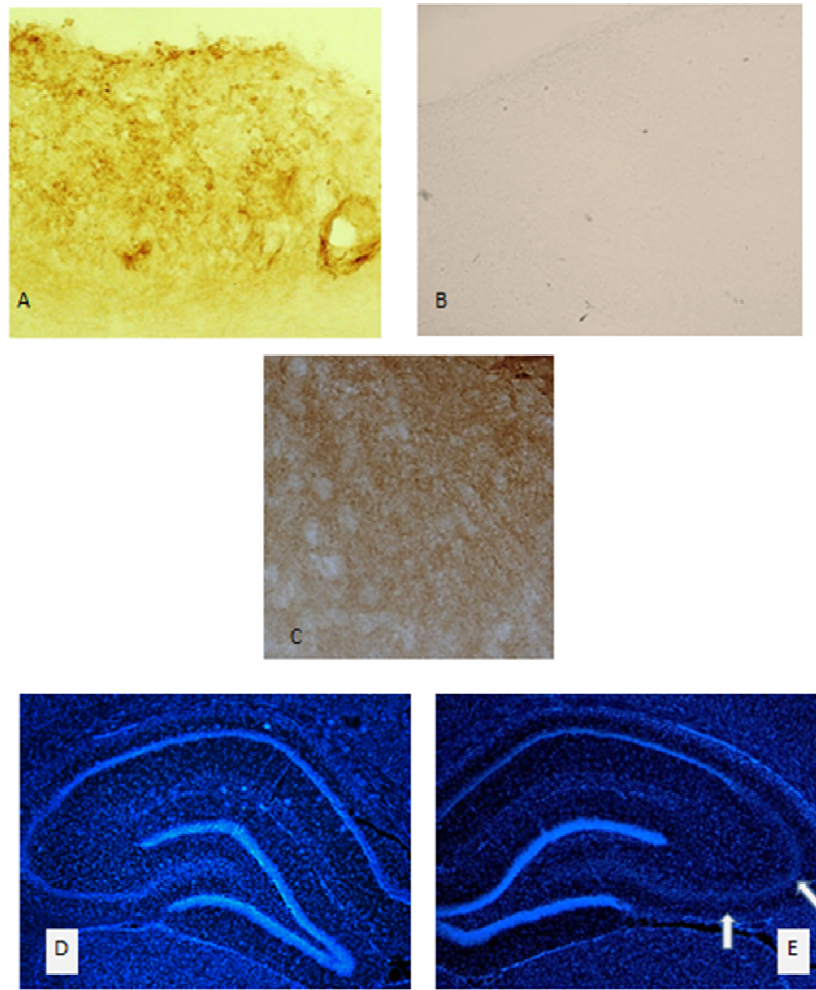


Şekil 4.31. Serbest donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküller için A) Gen düzeyinde IL-1β ekspresyonu B) protein düzeyinde IL-1β miktarı (*** P<0.001, ** P<0.01 kontrole karşı, ΨΨΨ P<0.001, ΨΨ P<0.01, Ψ P<0.05 Aβ grubuna karşı)

4.7. *İn vivo* Deney Sonuçları

4.7.1. A β Enjeksiyonu

Alzheimer modeli oluşturmak için icv olarak preagregre A β (25-35) peptidi enjekte (n=6) edilen hayvanların beyin kesitlerinde yapılan A β immünohistokimyasal boyamalarda, özellikle damar çevrelerinde ve koroid pleksus ve ventrikül ependimal hücrelerde çok yoğun olmakla beraber hipokampus, korteks ve talamusta A β fibrilleri gözlemlendi. İntraserebroventriküler çözücü enjekte Sham grubunda (n=6) ise hiç boyamaya rastlanmadı (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. A β fibrillerinin immünohistokimyasal boyaması. A. Hipokampusta preagregre A β (25-35) peptidi enjeksiyonundan (icv) 3 hafta sonra sıçanlarda hipokampus parenkimi içersindeki A β agregatları görülmektedir. B. Çözücü enjeksiyonundan (icv) 3 hafta sonra sıçanlarda hipokampus parenkiminde boyama

gözlenmemiştir (20x). C. A β fibrilleri (x40). D. Kontrol sıçan hipokampusunda Hoechst floresans boyaması E. Preagregre A β (25-35) peptidi enjeksiyonundan (icv) 3 hafta sonra sıçanlarda hipokampusta Hoechst boyaması. Ok ile işaretli CA3-2 bölgeleri dışında nöron yoğunluğunda azalma gözlenmemiştir.

Selektif DNA boyaması olan Hoechst ile yapılan histolojik analizde korteks ve hipokampus CA-1 ve dentat girusta piramidal nöron tabakasına densitometrik yöntemle bakıldığında, bu tabakaların yoğunluğunda ve piramidal nöron sayısında bir değişiklik meydana getirmezken, hipokampus CA 2 ve 3'te piramidal hücre yoğunluğunda hafif bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.32 D ve E). Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

4.7.2. Beyin Homojenatlarında AKoE Tayini

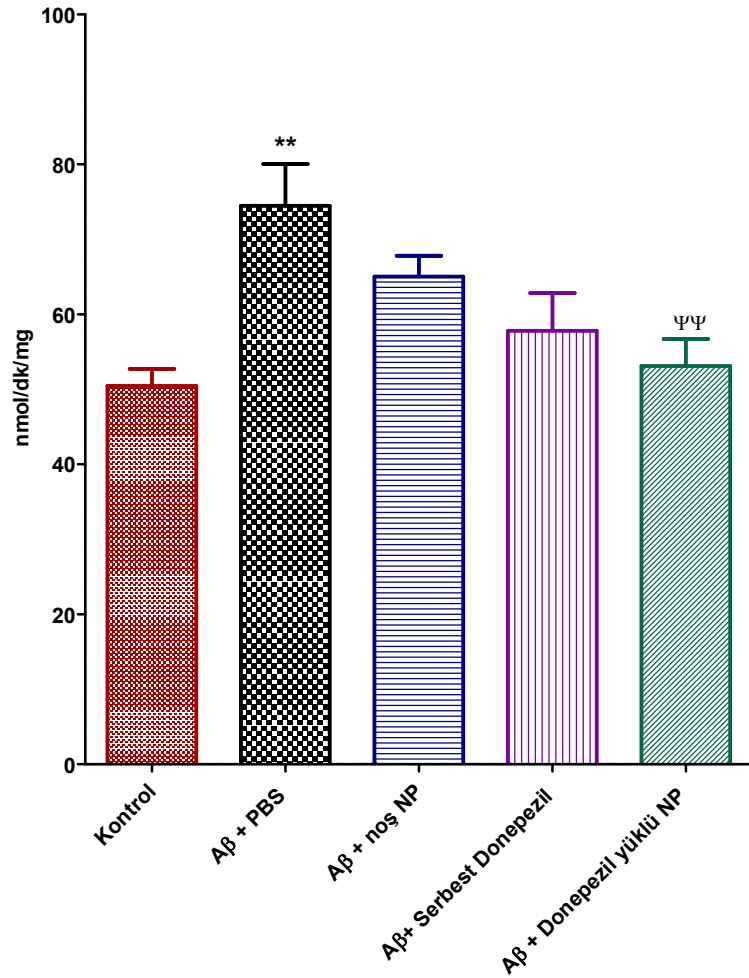
Farmakolojik deneylerin sonunda sıçan beyinleri çıkartılmış ve bölüm 3.7.5'deki yöntemle göre homojenize edilmiştir. Homojenatlarda BCA kiti ile protein miktarları tayin edilmiş ve daha sonra AKoE tayini bölüm 3.7.7'de verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. AKoE aktivite düzeyleri spesifik aktivite olarak (nmol/dk/mg) Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol ve deney gruplarında AKoE aktivite düzeyleri (**P<0.01 kontrole karşı, $\Psi\Psi$ P<0.01, A β +PBS grubuna karşı)

Çalışma Grubu	Spesifik Aktivite (nmol/dk/mg)
Kontrol	50.452 $\pm$ 5.538
A β + PBS **	74.460 $\pm$ 13.653
A β + noş Nanopartikül	65.012 $\pm$ 6.816
A β + donepezil	57.798 $\pm$ 11.224
A β + Donepezil Yüklü Nanopartikül $\Psi\Psi$	53.114 $\pm$ 8.778

Çalışma grupları değerlendirildiğinde sıçanlarda AH'nın nedenlerinden biri olan A β varlığından AKoE enzim aktivitesinde artış gözlenmiş ve bu artışla oluşan farkın kontrol ve A β +PBS grupları arasında anlamlı olduğu tespit edilmiştir (P<0.01). Bu

artışın donepezil ve donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri uygulaması ile normal düzeylere yaklaştığı gözlenmiştir. Aynı zamanda donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerin, serbest donepezile göre daha etkili olduğu görülmüştür ($P<0.01$). Sonuç olarak serbest donepezil uygulaması ile ilacın vücutta dağılıma uğradığı için etkisinin azaldığı ve nanopartiküllerin ise bu dağılıma uğramadan beyne ulaşp ilacı kontrollü bir şekilde salarak etki gösterdiği düşünülmüştür (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Kontrol ve deney gruplarında AKoE aktivite düzeyleri (** $P<0.01$ kontrole karşı, ΨΨ $P<0.01$, Aβ +PBS grubuna karşı)

5.TARTIŞMA

Organizmaya verilen ilacın, uygulandığı bölgeden hedef bölgeye yeterli derişimde ulaşabilmesi, belirli bir süre terapötik özelliğini koruyabilmesi ve en önemlisi doğrudan etki bölgesine hedeflenebilmesi için uygun bir taşıma sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni ilaç taşıma sistemleri, ilaçların istenilen organ doku, hücreye hedeflenebilmesine olanak sağladıklarından yeni tedavi yaklaşımlarının odak noktası olmuşlardır. Speiser ve diğerleri (279) ilk defa 1970'lerin ortalarında nanopartiküllerin farmasötik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermişlerdir. İlaç taşıma sistemlerinin boyutlarının mikro boyutlardan ($>1\ \mu\text{m}$) nano boyutlara ($<1\ \mu\text{m}$) düşürülmesi ile birçok terapötik ile taşıyıcı sistemlerin bütünleşik bir sistem oluşturulması sağlanmıştır (280). Nanopartiküllerin diğer ilaç taşıma sistemler üzerindeki en büyük avantajı mikron altı boyutlarda olmasıdır. Nanopartiküllerin bu özelliği ekstrasvasyonu mümkün kılıp, terminal kan damarlarından emilimi engeller (281). Bu ilaç taşıyıcı sistemler, başarısız tedaviler ve zayıf terapötik cevaplar gibi serbest ilaçların başarısız olduğu yönlerin aşılması için tasarlanmışlardır (282).

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

Polimerik ilaç taşıma sistemleri oldukça geliştirilmiştir (283) ve terapötik ajanların uzun dönemli veya kademeli (284), olarak verilmesinde çekici birer alternatif oluşturmaktadırlar. Polimerik dozaj formlarının içerisinde terapötik ajanlar korunur, dokulara ilacın aralıksız bir biçimde verilmesini sağlar ve tekrarlı ilaç uygulaması engellenir. Bu özellikler ayrıca bölgelere özgü taşınımın oluşturulmasını sağlar. Peptitler ve proteinler gibi makromoleküller stabilize konusunda çok hassas oldukları için enkapsüle olmaları bu makromoleküllerin korunmasına, özellikle de peroral olarak uygulandığında gastrointestinal enzimler ve pH etkisine karşı korur. Başarılı bir ilaç taşıma sisteminin oluşturulmasında polimer matriksinin uygun bir biçimde seçilmesi gerekmektedir. Polimer bozunabilir veya bozunmaz yapıda olabilir. Bozunmaz polimerlerin en temel dezavantajı polimerlerin ilaç taşınımı sonrası vücuttan cerrahi yol ile uzaklaştırılmasını gerektirmesidir. Bozunan polimerin ise cerrahi uzaklaştırmaya ihtiyacı yoktur. Bu nedenle birçok çalışmada bozunmayan polimerler yerine tercih edilmektedirler. Buna ek olarak

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

Bu tez kapsamında PLGA bloğu (hidrofobik) ve PEG bloğu (hidrofilik) olan PLGA-b-PEG kopolimerleri kullanılarak donepezil yüklenmiş nanopartiküller çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır (270). Hazırlanan nanopartiküllerdeki donepezil miktarının tayin edilebilmesi için HPLC ile donepezil miktar tayini yapılması hedeflenmiş ve bu doğrultuda da donepezilin kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. HPLC ile elde edilen kromatogramlarda retansiyon zamanı 14 dakika olan donepezil pikinin miktar tayinine olanak verecek ölçüde simetrik olduğu belirlenmiştir. Partiküllere yüklenen donepezil miktarı *in vitro* etkin madde salım deneyleriyle saptanmıştır.

Hazırlanan formülasyon gruplarından NP1 ve NP2'nin zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde kararlı oldukları izlenmiştir. Nanopartikül boyutlarının homojen dağılım gösterip göstermediklerini izleyebilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımı incelenmiştir. PDI değeri 0.1-0.25 arasındaki nanopartiküllerin dar bir dağılım gösterdikleri, bunun üzerindeki PDI değerlerinin ise geniş dağılım gösterdikleri kabul edilir. Hazırlanan örnek gruplarında kullanılan ilaç konsantrasyonu arttıkça partikül boyutlarında ve PDI değerlerinde artış gözlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 174 ile 240 nm arasında ve PDI değerleri ise 0.2 ile 0.36 arasında bulunmuştur. Artan ilaç miktarı ile birlikte boyut artarken daha geniş dağılımlı gösterdikleri izlenmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan nanopartiküller boyut, zeta potansiyelleri ve partikül dağılımları açısından incelendiğinde, NP1 ve NP2'nin boyut olarak hedeflenen değerlere uygun olduğu ve aynı zamanda dağılım

olarak da monodispers bir dağılım göstermeleri nedeniyle çalışmanın amacına uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

NP1’de hazırlanan nanopartiküller içerdikleri donepezilin % 60’ını ilk 2 saat içinde salmışlardır. NP2’de ise içerdikleri donepezilin % 50’sini ilk 2 saat içinde salmışlardır. Bu hızlı salımın patlama etkisi olarak bilinen (burst effect) etkiden kaynaklandığı ve nanopartikül yüzeyinde adsorplanmış donepezilin aniden salıverışı sonucu ortaya çıktığı düşünülmüştür. NP1’de 10. saatten sonra salımın platoya ulaşması, ilacın NP’ye göre daha kontrollü olarak salındığını göstermektedir. Etkin madde salım çalışmaları sonuçları da beraber değerlendirildiğinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılacak en uygun serinin partikül formülasyonu 2.5 mg donepezil ile hazırlanan ve partikül boyutları 174 olarak saptanan NP1 serisi olduğu tespit edilmiştir. Bu seri için boyut dağılımının homojenliğinin göstergesi olarak kullanılan polidispersite indeksi 0.20 olarak saptanmıştır. Hem verimliliğinin yüksek olması hem ortalama nanopartikül boyutunun küçük olması hem de polidispersite indeksinin 0.20 değerinde olması, ayrıca salım çalışmalarındaki kontrollü salım profili nedeniyle *in vitro* ve *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere sentezlenen nanopartiküllerde bu derişim benimsenmiştir.

Donepezil, AH’nda klinik kullanımı olan, tersinir ve non-kompetitif bir kolinesteraz inhibitörüdür ve bütirilkolinesteraza kıyasla AKoE’ı daha özgül olarak inhibe eder. Birimimizde daha önce gerçekleştirilen ön çalışmada donepezilin aynı zamanda *in vitro* koşullarda A β fibrillerini destabilize ettiği tespit edilmiştir. Ayrıntılı destabilizasyon çalışmaları bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. AH’nda olduğu bilinen A β fibrilleri *in vitro* koşullarda oluşturulmuş ve sentezlenen donepezil yüklü nanopartiküllerle inkübe edilmiştir. Fibrillerin olduğu ThT floresans şiddetindeki artma izlenerek belirlenmiştir. Donepezil yüklü nanopartiküllerin bu fibrilleri destabilize edici etkilerinin zamana bağımlı davranışı da ThT floresans şiddetindeki azalma izlenerek belirlenmiştir. AH’nda olduğu bilenen iki farklı fibril türü için (1-40 ve 1-42) de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

AH’nda oluşan A β plakların öncelikli olarak beynin hipokampus bölgesinde agrege olarak hafızayı etkiledikleri, dolayısıyla kişide zaman kavramının kaybolmasına yol açtıkları ve ikincil olarak da beynin korteks bölgesini etkiledikleri bildirilmektedir (285), Dolayısıyla hazırlanan nanopartiküllerin beyin içi dağılımının

belirlenmesi özellikle KBB'ni geçtiklerinin saptanması ve lokal beyin konsantrasyonunun belirlenmesi önemlidir. Tez kapsamında öncelikli olarak *in vitro* KBB oluşturulmuş ve hazırlanan nanopartiküllerin KBB'ni geçtikleri bu koşullarda tespit edilmiştir. İBMEH'leri ve insan astrosit hücrelerinin kokültürü kullanılarak hazırlanan bu modelde donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerin ve serbest donepezilin ilk 2 saat içerisinde donepezil konsantrasyonunun %50'sini AM ortamına geçirdiği tespit edilmiştir. Serbest donepezil için bu hızlı ilaç geçişi devam edip 6 saat sonunda donepezilin tamamı AM ortamına geçmiştir. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinde ilaç geçişi kontrollü olarak devam edip 48 saat sonunda ilaç salım profili tamamlanmıştır. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin sağladığı bu kontrollü ilaç salımının, fibril destabilizasyonu için daha etkili olacağı, lokal ilaç konsantrasyonunun daha uzun süre stabil kalacağı ve donepezilin hızla hücrelere ulaşmasının neden olabileceği negatif etkileri azaltacağı sonucuna varılmıştır.

MSS'nde aktive olmuş mikroglialar ve aynı zamanda astrositler hücresel hasarın desteklenmesinde kritik rol oynarlar. Astrositler, aynı mikroglialar gibi beyinin immünolojik savunması ve hasara karşı cevabında büyük önem taşırlar. MSS'nin astrositlerle ilgili en iyi bilinen ilişkisi vasküler EH'i ile beyne zararlı maddelerin girişini sınırlayan KBB'ni oluşturmastır (286). Bununla birlikte, astrositler sınıf I ve II majör histokompatibilite kompleks sunan hücreler olarak davranırlar (286,287), aynı zamanda çevresini sardığı nöronlar için yapısal ve besleyici destek sağlarlar. AH ile ilgili olarak, sinaptik aralığın korunmasında aktif olarak görev alırlar ve fonksiyonel sinapsların sayısını artırabilirler (288). Hasar varlığında, karakteristik biyokimyasal ve hücresel değişiklikler ile glial aktivasyon ve proliferasyon meydana gelir. Aktive olmuş astrositler, nöronlar ve mikroglialar, sitokinler ve enflamatuvar moleküller gibi çözünür faktörleri salgılayarak karışık etkileşimlere başlarlar ve bu da nihai olarak mikrogliaların proenflamatuvar maddeleri, eksitotoksinleri, astrositleri daha fazla aktive edecek maddeleri salmalarına neden olur ve nöron hasarı uyarılır (289).

Transgenik fare modelleri ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile AH'daki amiloid ile indüklenmiş enflamasyonun altında yatan mekanizma ve interlökinlerin rolü hakkında çeşitli veriler rapor edilmiştir. Sıçan beyin mikrogli ve astrositlerinde

IL-1 ekspresyon artışı, A β (1-42) ile kortikal enjeksiyonu sonrasında izlenmiştir (290). Bunun aksine, IL-1 sinyalinin aynı zamanda daha fazla hücresel APP üretimini uyardığı ve A β 'nin patolojik birikiminde artışa neden olduğu görülmüştür. Hücre kültüründeki nöronlar ve EH'inde (291) ve aynı zamanda primer insan astrosit ve nöroblastoma hücrelerinde (292), IL-1'in APP'nin mRNA transkripsiyon ve ekspresyonunu önemli derecede artırdığı ve ayrıca *in vitro* deney düzeneğinde IL-1'in APP promotor ekspresyonunu uyardığı gözlenmiştir (293,294). Bunula birlikte, bu bulgular A β ve interlökinlerin kendini devam ettiren bir döngü ile birbirlerine bağlı oldukları ve birinin artışının diğerini de artırdığı ve bunun da nöron hasarı ve toksisitesini artırdığını göstermiştir.

Ayrıca, hücre kültüründe astrositlerin A β 'ya maruz bırakılmasının, IL-1 β , TNF- α , iNOS ve NO üretimini anlamlı bir şekilde artırdığını ve A β 'nin fibriler veya oligomerik, fibriler olmayan formda olmasına göre etkilerinin değişiklik gösterdiği görülmüştür (295). Literatürde AH tedavisinde kullanılan bir AKoEI olan donepezilin yukarıda bahsedilen nöroenflamatuvar süreçte koruyucu olduğu rapor edilmiştir (173).

Tez kapsamında KBB modeli başarıyla oluşturulmuş, donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküllerin KBB'ni geçip geçmedikleri öncelikli olarak bu model üzerinde *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Literatür ve klinik veriler ışığında KBB'ni geçtiği bilinen donepezil ve donepezil yüklü nanopartikül, oluşturulan *in vitro* KBB'nde bariyeri geçmiş ve astrositlerin bulunduğu ortama ulaşmışlardır.

Serbest donepezil için geçişin daha hızlı olduğu 6 saat sonunda donepezilin tamamının AM ortamına geçtiği tespit edilmiştir. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinde ilaç geçişi kontrollü olarak devam edip 48 saat sonunda ilaç salım profili tamamlanmıştır. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin sağladığı bu kontrollü ilaç salımının, fibril destabilizasyonu için daha etkili olacağı ve donepezilin hızla hücrelere ulaşmasının neden olabileceği negatif etkileri azaltacağı düşünülmektedir.

Tez kapsamında kullanılan KBB modelinde İBMEH'leri ve insan astrosit hücreleri kullanılmıştır. Astrosit hücrelerinin A β ile inkübasyonu sonrasında yukarıda anlatılan ve literatürde arttığı tespit edilen çeşitli sitokinler hem gen ekspresyonu hem de protein ekspresyonu düzeylerindeki değişim açısından

değerlendirilmiştir. Bu deney sonuçlarına göre A β ile inkübasyon sonucunda astrositlerde IL-1 β , IL-6, GM-CSF ve TNF- α için hem gen hem protein düzeyinde ekspresyon artışı tespit edilmiştir. Bu durum literatür bilgileri ışığında beklenen bir sonuç olup (296) donepezilin literatürde bildirilen nöroenflamasyonda protektif etkili olduğu bilgisi de göz önünde bulundurularak bu tez kapsamında irdelenmesi amaçlanan asıl konunun sitokin düzeylerinde tespit edilen artışların donepezil ile engellenip engellenemeyeceği ve donepezil yüklü nanopartiküller ile doğrudan donepezil uygulamasını takiben elde edilen sonuçların farklı olup olmayacağıdır. Bu açıdan değerlendirildiğinde; hem donepezil uygulamasını hem de donepezil yüklü nanopartikül uygulamasını takiben her 4 sitokin düzeyinde de hem protein hem gen ekspresyonu düzeyinde A β ile uyarımını takiben elde edilen artışta anlamlı azalma tespit edilmiştir. Elde edilen bu azalmanın her iki deney grubu için de doz bağımlı olduğu belirlenmiştir. GM-CSF dışındaki bütün sitokin düzeylerinde donepezil uygulamasını takiben elde edilen azalma aynı doz donepezil yüklü nanopartikül uygulamasını takiben elde edilen azalmadan daha güçlüdür. GM-CSF için ise nanopartikül uygulaması sitokin düzeyinde donepezil uygulamasına kıyasla daha fazla azalmaya neden olmuştur. Bunun nedeni olarak nanopartiküllerden kontrollü olarak salınan donepezilin özellikle bu sitokin düzeyini azaltmada daha etkili olabileceği gösterilebilir.

Ekspresyonlarına hem gen hem protein düzeyine bakılan diğer sitokinlerden MCP-1, TGF- β ise astrositlerin A β ile uyarılmasını takiben hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde ekspresyonları artmış, ancak bunların düzeyleri donepezil veya donepezil yüklü nanopartiküller ile değişmemiştir.

In vivo deney bulguları, preagreg A β (25-35) peptidinin icv enjeksiyonu ile Alzheimer benzeri modelin oluşturulmuştur. Oluşturulan model ile beyinlerde korteks ve hipokampal CA 1 ve dentat girus piramidal tabakalarında nöron kaybı meydana gelmemiş, ancak CA 3-2'de az sayıda nöron kaybı olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla A β fibrillerinin 3 hafta sonunda nöron kaybına yol açmadan sinaptik disfonksiyon ile hafıza ve öğrenme yetilerini bozduğunu düşündürmektedir (297).

In vivo deneyleri takiben donepezil ve donepezil yüklü nanopartiküllerin etkinliğini kıyaslayabilmek için AKoE aktivite tayini yapabilmek amacıyla sıçan beyinleri çıkarılarak homojenize edilmiştir. Kontrol grubunda spesifik aktivite

50.452 $\pm$ 5.538 nmol/dk/mg protein olarak belirlenmiştir ve bu değer literatürde belirtilen değerlerle uyum göstermektedir (298). AKoE aktivitesinin transjenik Alzheimer farelerinde (Tg2576) olduğu gibi diğer Alzheimer modeli oluşturulmuş hayvanlarda arttığı literatürde rapor edilmiştir (299). Bu bilgiler ışığında bu tez kapsamında oluşturulan Alzheimer sıçan modelinde de AKoE aktivite tayini yapılmıştır. A β (25-35) fibrilleri kullanılarak AH modeli oluşturulmuş olan sıçan grubunda aktivitenin anlamlı ölçüde arttığı ve 74.460 $\pm$ 13.653 nmol/dk/mg protein değerine ulaştığı saptanmıştır. Donepezilin iv yolla bolus uygulanması aktiviteyi 57.798 $\pm$ 11.224 nmol/dk/mg protein değerine çekerken; donepezil yüklü nanopartiküllerin ip uygulanması aktiviteyi donepezilden daha fazla düşürmüş bu grup için aktivite 53.114 $\pm$ 8.778 nmol/dk/mg protein olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak donepezil yüklü nanopartiküllerin AKoE aktivitesini inhibe etme güçlerinin donepezile oranla daha kuvvetli olduğu söylenebilir. Bu da nanopartiküllerden donepezilin kontrollü olarak salındığının ve daha uzun süre etki ettiğinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında iv veya ip yolla uygulamaya olanak verecek şekilde donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri sentezlenmiş, bu nanopartiküller doku dağılımını minimize etmek ve hedef dokudaki lokal konsantrasyonlarını maksimize etmek amacıyla amiloid fibrillere hedeflendirilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. PLGA-b-PEG nanopartikülleri biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmamaları nedeni ile biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar, hedef dokuya etken maddenin uzun süreli bir biçimde verilmesine olanak sağlarlar ve tekrarlı ilaç uygulaması engellenir, ayrıca bölgeye özgü taşınımına olanak sağlarlar. Bu sayede donepezilin GIS yan etkilerinin ve uyunç probleminin önüne geçilmiş olduğu düşünülmektedir. Donepezil yüklü nanopartikül hazırlanmasını konu alan başka bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Hazırlanan nanopartiküllerin A β fibrillerini destabilize ettiği saptanmıştır. *In vitro* koşullarda oluşturulan KBB modeli ile nanopartiküllerin KBB'ni geçtiği tespit edilmiştir.

In vitro koşullarda hazırlanan nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini aşarak astrositlerden salınan ve nöroenflamatuar süreçte yer alan sitokinlerin ekspresyonlarını protein (ELISA ile) ve gen düzeyinde (RT-PCR ile) nasıl etkilediği

belirlenmiştir. Donepezilin nöroenflamatuar süreçte koruyucu etkisi olduğu ve astrositlerin de nöroenflamatuar sürece sitokin ve kemokin salgılayarak katkıda bulunduğu literatürde bildirilmektedir ancak şimdiye kadar donepezilin bu anlamdaki koruyucu etkileri doğrudan astrositler üzerinde çalışılmamıştır. Donepezil yüklü nanopartiküllerin tedavi açısından etkisi *in vivo* hayvan deneyleri ile saptanmıştır. Benzer şekilde hedeflendirilmiş nanopartiküllerin AKoE aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi yüksek doz donepezil uygulamasına oranla çok daha kuvvetli olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Spillantini, M.G., Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet. Neurology*, 12 (6), 609-622.
2. Pettenati, C., Annicchiarico, R., Caltagirone, C. (2003). Clinical pharmacology of anti-Alzheimer drugs. *Fundamental & clinical pharmacology*, 17 (6), 659-672.
3. Rogers, S.L., Friedhoff, L.T. (1998). Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: an interim analysis of the results of a US multicentre open label extension study. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 8 (1), 67-75.
4. Matsui, K., Mishima, M., Nagai, Y., Yuzuriha, T., Yoshimura, T. (1999). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of donepezil (Aricept) after a single oral administration to Rat. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 27 (12), 1406-1414.
5. Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 8 (6), 429-431.
6. Selkoe, D.J. (2000). The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. *Jama*, 283 (12), 1615-1617.
7. Spillantini, M.G., Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, 21 (10), 428-433.
8. Checler, F., Vincent, B. (2002). Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends in neurosciences*, 25 (12), 616-620.
9. Robinson, S.R., Bishop, G.M. (2002). Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 23 (6), 1051-1072.
10. Lansbury, P.T., Jr. (1997). Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Current opinion in chemical biology*, 1 (2), 260-267.
11. Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M. ve diğerleri. (2009). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Jama*, 302 (4), 385-393.

12. Greene, J.D., Baddeley, A.D., Hodges, J.R. (1996). Analysis of the episodic memory deficit in early Alzheimer's disease: evidence from the doors and people test. *Neuropsychologia*, 34 (6), 537-551.
13. Price, B.H., Gurvit, H., Weintraub, S., Geula, C., Leimkuhler, E., Mesulam, M. (1993). Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Archives of neurology*, 50 (9), 931-937.
14. Kirk, A., Kertesz, A. (1991). On drawing impairment in Alzheimer's disease. *Archives of neurology*, 48 (1), 73-77.
15. Isacson, O., Seo, H., Lin, L., Albeck, D., Granholm, A.C. (2002). Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh. *Trends in neurosciences*, 25 (2), 79-84.
16. Gao, S., Hendrie, H.C., Hall, K.S., Hui, S. (1998). The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Archives of general psychiatry*, 55 (9), 809-815.
17. Hebert, L.E., Scherr, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A., Evans, D.A. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of neurology*, 60 (8), 1119-1122.
18. Wimo, A., Winblad, B. (2001). Health Economical Aspects of Alzheimer Disease and its Treatment. *Psychogeriatrics*, 1 (3), 189-193.
19. Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1 (1), a006189.
20. Glenner, G.G., Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120 (3), 885-890.
21. Masters, C.L., Selkoe, D.J. (2012). Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2 (6), a006262.
22. Lee, V.M., Goedert, M., Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annual review of neuroscience*, 24, 1121-1159.
23. Van Dam, D., De Deyn, P.P. (2006). Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nature reviews. Drug discovery*, 5 (11), 956-970.
24. Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of neuroscience research*, 74 (3), 342-352.

25. Wisniewski, T., Sigurdsson, E.M. (2010). Murine models of Alzheimer's disease and their use in developing immunotherapies. *Biochimica et biophysica acta*, 1802 (10), 847-859.
26. Tanzi, R.E., Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 120 (4), 545-555.
27. Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W. ve diğerleri. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 300 (5618), 486-489.
28. Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends in neurosciences*, 24 (4), 219-224.
29. Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of neurochemistry*, 101 (5), 1172-1184.
30. Walsh, D.M., Townsend, M., Podlisny, M.B., Shankar, G.M., Fadeeva, J.V., El Agnaf, O. ve diğerleri. (2005). Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25 (10), 2455-2462.
31. Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A.T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A. ve diğerleri. (2008). Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28 (16), 4231-4237.
32. Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L. ve diğerleri. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 155 (3), 853-862.
33. Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T. ve diğerleri. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37 (6), 925-937.
34. Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in neurobiology*, 70 (1), 1-32.
35. Thal, D.R., Rub, U., Orantes, M., Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58 (12), 1791-1800.

36. Woodhouse, A., West, A.K., Chuckowree, J.A., Vickers, J.C., Dickson, T.C. (2005). Does beta-amyloid plaque formation cause structural injury to neuronal processes? *Neurotoxicity research*, 7 (1-2), 5-15.
37. Weller, R.O., Nicoll, J.A. (2003). Cerebral amyloid angiopathy: pathogenesis and effects on the ageing and Alzheimer brain. *Neurological research*, 25 (6), 611-616.
38. Maat-Schieman, M., Roos, R., van Duinen, S. (2005). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 25 (4), 288-297.
39. Wesson, D.W., Levy, E., Nixon, R.A., Wilson, D.A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30 (2), 505-514.
40. Querfurth, H.W., LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 362 (4), 329-344.
41. Goedert, M., Spillantini, M.G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 314 (5800), 777-781.
42. Arnold, S.E., Hyman, B.T., Flory, J., Damasio, A.R., Van Hoesen, G.W. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 1 (1), 103-116.
43. Braak, H., Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82 (4), 239-259.
44. Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M. ve diğerleri. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science (New York, N.Y.)*, 309 (5733), 476-481.
45. Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M. (2006). Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *The Journal of biological chemistry*, 281 (51), 39413-39423.
46. Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K.L., Barde, Y.A. ve diğerleri. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of neurochemistry*, 86 (3), 582-590.
47. Lee, H.G., Perry, G., Moreira, P.I., Garrett, M.R., Liu, Q., Zhu, X. ve diğerleri. (2005). Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in molecular medicine*, 11 (4), 164-169.

48. Goedert, M., Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et biophysica acta*, 1739 (2-3), 240-250.
49. Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C. ve diğerleri. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 41 (1), 17-24.
50. Wallin, A.K., Blennow, K., Andreasen, N., Minthon, L. (2006). CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 21 (3), 131-138.
51. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R. ve diğerleri. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39 (3), 409-421.
52. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. (2006). Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neurochemistry international*, 48 (4), 275-285.
53. Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T. ve diğerleri. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science (New York, N.Y.)*, 316 (5825), 750-754.
54. Lopez Salon, M., Morelli, L., Castano, E.M., Soto, E.F., Pasquini, J.M. (2000). Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 62 (2), 302-310.
55. Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Van Haastert, E.S., Rozemuller, J.M., Baas, F., Eikelenboom, P. ve diğerleri. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 110 (2), 165-172.
56. Haass, C., Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8 (2), 101-112.
57. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A. ve diğerleri. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature*, 407 (6800), 48-54.
58. Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., Jr. ve diğerleri. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56 (1), 127-129.
59. DeKosky, S.T., Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of neurology*, 27 (5), 457-464.

60. Masliah, E., Crews, L., Hansen, L. (2006). Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 9 (3 Suppl), 91-99.
61. Lister, J.P., Barnes, C.A. (2009). Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Archives of neurology*, 66 (7), 829-833.
62. Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, 44 (1), 181-193.
63. Larson, J., Lynch, G., Games, D., Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain research*, 840 (1-2), 23-35.
64. Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M. ve diğerleri. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature neuroscience*, 2 (3), 271-276.
65. Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27 (11), 2866-2875.
66. Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y. ve diğerleri. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature neuroscience*, 8 (8), 1051-1058.
67. Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. ve diğerleri. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, 52 (5), 831-843.
68. Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G. ve diğerleri. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20 (11), 4050-4058.
69. Castren, M., Lampinen, K.E., Miettinen, R., Koponen, E., Sipola, I., Bakker, C.E. ve diğerleri. (2002). BDNF regulates the expression of fragile X mental retardation protein mRNA in the hippocampus. *Neurobiology of disease*, 11 (1), 221-229.
70. Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297 (5580), 353-356.

71. Selkoe, D.J., Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43, 545-584.
72. Rademakers, R., Cruts, M., Van Broeckhoven, C. (2003). Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *TheScientificWorldJournal*, 3, 497-519.
73. Tanzi, R.E., Bertram, L. (2001). New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron*, 32 (2), 181-184.
74. Mayeux, R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual review of neuroscience*, 26, 81-104.
75. Van Duijn, C.M., Clayton, D.G., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A.B., Heyman, A. ve diğerleri. (1994). Interaction between genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease: a reanalysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Genetic epidemiology*, 11 (6), 539-551.
76. Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K. ve diğerleri. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 322 (7300), 1447-1451.
77. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W. ve diğerleri. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261 (5123), 921-923.
78. Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. ve diğerleri. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (5), 1977-1981.
79. Grehan, S., Tse, E., Taylor, J.M. (2001). Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21 (3), 812-822.
80. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D., Weisgraber, K.H. (1987). Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *The Journal of biological chemistry*, 262 (29), 14352-14360.
81. Xu, P.T., Schmechel, D., Qiu, H.L., Herbstreith, M., Rothrock-Christian, T., Eyster, M. ve diğerleri. (1999). Sialylated human apolipoprotein E (apoEs) is

preferentially associated with neuron-enriched cultures from APOE transgenic mice. *Neurobiology of disease*, 6 (1), 63-75.

82. Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26 (19), 4985-4994.
83. Mahley, R.W., Rall, S.C., Jr. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annual review of genomics and human genetics*, 1, 507-537.
84. Blacker, D., Haines, J.L., Rodes, L., Terwedow, H., Go, R.C., Harrell, L.E. ve diğeri. (1997). ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology*, 48 (1), 139-147.
85. Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr. ve diğeri. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*, 7 (2), 180-184.
86. Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (15), 5644-5651.
87. LaDu, M.J., Pederson, T.M., Frail, D.E., Reardon, C.A., Getz, G.S., Falduto, M.T. (1995). Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *The Journal of biological chemistry*, 270 (16), 9039-9042.
88. Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B. ve diğeri. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*, 118 (12), 4002-4013.
89. Ito, S., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Nezu, Y., Terasaki, T. (2007). Cerebral clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. *Journal of neurochemistry*, 103 (6), 2482-2490.
90. Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J. ve diğeri. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (6), 2892-2897.

91. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M. ve diğerleri. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21 (3), 383-421.
92. Streit, W.J., Kincaid-Colton, C.A. (1995). The brain's immune system. *Scientific American*, 273 (5), 54-55, 58-61.
93. Moore, A.H., O'Banion, M.K. (2002). Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Advanced drug delivery reviews*, 54 (12), 1627-1656.
94. Kalaria, R.N. (1999). Microglia and Alzheimer's disease. *Current opinion in hematology*, 6 (1), 15-24.
95. Rogers, J., Lue, L.F. (2001). Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 39 (5-6), 333-340.
96. Fiala, M., Zhang, L., Gan, X., Sherry, B., Taub, D., Graves, M.C. ve diğerleri. (1998). Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood--brain barrier model. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 4 (7), 480-489.
97. Lue, L.F., Walker, D.G., Brachova, L., Beach, T.G., Rogers, J., Schmidt, A.M. ve diğerleri. (2001). Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Experimental neurology*, 171 (1), 29-45.
98. Poli, V. (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *The Journal of biological chemistry*, 273 (45), 29279-29282.
99. Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C.J., Li, R. (2002). Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*, 40 (2), 260-269.
100. Dickson, D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 56 (4), 321-339.
101. McGeer, P.L., McGeer, E.G. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*, 22 (6), 799-809.
102. Kurt, M.A., Davies, D.C., Kidd, M. (1999). Beta-Amyloid immunoreactivity in astrocytes in Alzheimer's disease brain biopsies: an electron microscope study. *Experimental neurology*, 158 (1), 221-228.
103. Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T.C., Ihara, Y. (1998). Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta neuropathologica*, 95 (3), 217-222.

104. Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F. ve diğeri. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nature medicine*, 9 (4), 453-457.
105. Wegiel, J., Wang, K.C., Tarnawski, M., Lach, B. (2000). Microglia cells are the driving force in fibrillar plaque formation, whereas astrocytes are a leading factor in plaque degradation. *Acta neuropathologica*, 100 (4), 356-364.
106. Smits, H.A., Rijmsmus, A., van Loon, J.H., Wat, J.W., Verhoef, J., Boven, L.A. ve diğeri. (2002). Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 127 (1-2), 160-168.
107. Friedman, W.J. (2001). Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Experimental neurology*, 168 (1), 23-31.
108. Li, R., Shen, Y., Yang, L.B., Lue, L.F., Finch, C., Rogers, J. (2000). Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex. *Journal of neurochemistry*, 75 (4), 1447-1454.
109. Renauld, A.E., Spengler, R.N. (2002). Tumor necrosis factor expressed by primary hippocampal neurons and SH-SY5Y cells is regulated by alpha(2)-adrenergic receptor activation. *Journal of neuroscience research*, 67 (2), 264-274.
110. Amiri, H., Saeidi, K., Borhani, P., Manafirad, A., Ghavami, M., Zerbi, V. (2013). Alzheimer's disease: pathophysiology and applications of magnetic nanoparticles as MRI theranostic agents. *ACS chemical neuroscience*, 4 (11), 1417-1429.
111. Parihar, M.S., Hemnani, T. (2004). Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 11 (5), 456-467.
112. Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C.X. ve diğeri. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta*, 1739 (2-3), 198-210.
113. Saido, T.C., Iwata, N. (2006). Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neuroscience research*, 54 (4), 235-253.
114. Leissring, M.A. (2008). The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases. *The Journal of biological chemistry*, 283 (44), 29645-29649.
115. Miners, J.S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L.E., Kehoe, P.G., Love, S. (2008). Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 18 (2), 240-252.

116. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P. ve diğerleri. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360 (6405), 672-674.
117. Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H. ve diğerleri. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, N.Y.)*, 269 (5226), 973-977.
118. Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M. ve diğerleri. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375 (6534), 754-760.
119. Mudher, A., Lovestone, S. (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in neurosciences*, 25 (1), 22-26.
120. Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in neurobiology*, 68 (3), 209-245.
121. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L. ve diğerleri. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nature neuroscience*, 4 (3), 233-234.
122. Etienne, P., Robitaille, Y., Wood, P., Gauthier, S., Nair, N.P., Quirion, R. (1986). Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 19 (4), 1279-1291.
123. Cummings, J.L. (2004). Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 351 (1), 56-67.
124. Berger-Sweeney, J. (2003). The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27 (4), 401-411.
125. Schliebs, R., Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 113 (11), 1625-1644.
126. Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Crain, B.J., Bell, J.M., Bissette, G., Nemeroff, C.B. (1990). Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (7), 2452-2455.

127. Xu, Y., Sakurai, K. (2012). Cooperatively securing network coding against pollution attacks with incentive mechanism [Poster]. Proceedings of the 6th International Conference on Ubiquitous Information Management and Communication. Kuala Lumpur, Malaysia.
128. Revett, T.J., Baker, G.B., Jhamandas, J., Kar, S. (2013). Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 38 (1), 6-23.
129. Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G., Henneberry, R.C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-d-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain research*, 451 (1-2), 205-212.
130. Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 33 (1), 95-130.
131. Garcia, M.L., Cleveland, D.W. (2001). Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 13 (1), 41-48.
132. Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A. ve diğerleri. (2003). Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Research Reviews*, 43 (1), 1-16.
133. Jan, A., Adolfsson, O., Allaman, I., Buccarello, A.L., Magistretti, P.J., Pfeifer, A. ve diğerleri. (2011). A β 42 Neurotoxicity Is Mediated by Ongoing Nucleated Polymerization Process Rather than by Discrete A β 42 Species. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (10), 8585-8596.
134. Schenk, D., Basi, G.S., Pangalos, M.N. (2012). Treatment Strategies Targeting Amyloid β -Protein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2 (9).
135. Puzzo, D., Staniszewski, A., Deng, S.X., Privitera, L., Leznik, E., Liu, S. ve diğerleri. (2009). Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29 (25), 8075-8086.
136. Cheng, Y.-F., Wang, C., Lin, H.B., Li, Y.-F., Huang, Y., Xu, J.-P. ve diğerleri. (2010). Inhibition of phosphodiesterase-4 reverses memory deficits produced by A β 25-35 or A β 1-40 peptide in rats. *Psychopharmacology*, 212 (2), 181-191.
137. Sanchez-Mejia, R.O., Newman, J.W., Toh, S., Yu, G.-Q., Zhou, Y., Halabisky, B. ve diğerleri. (2008). Phospholipase A2 reduction ameliorates

- cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 11 (11), 1311-1318.
138. Schaeffer, E., Forlenza, O., Gattaz, W. (2009). Phospholipase A2 activation as a therapeutic approach for cognitive enhancement in early-stage Alzheimer disease. *Psychopharmacology*, 202 (1-3), 37-51.
 139. Lee, J., Boo, J.H., Ryu, H. (2009). The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start? *Advanced drug delivery reviews*, 61 (14), 1316-1323.
 140. Wang, X., Su, B., Lee, H.G., Li, X., Perry, G., Smith, M.A. ve diğerleri. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29 (28), 9090-9103.
 141. Lipton, S.A., Chen, H.S. (2003). Paradigm shift in neuroprotective drug development: clinically tolerated NMDA receptor inhibition by memantine. *Cell Death Differ*, 11 (1), 18-20.
 142. Rammes, G., Rupprecht, R., Ferrari, U., Zieglgänsberger, W., Parsons, C.G. (2001). The N-methyl-d-aspartate receptor channel blockers memantine, MRZ 2/579 and other amino-alkyl-cyclohexanes antagonise 5-HT₃ receptor currents in cultured HEK-293 and N1E-115 cell systems in a non-competitive manner. *Neuroscience Letters*, 306 (1-2), 81-84.
 143. Johnson, G., Moore, S.W. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current pharmaceutical design*, 12 (2), 217-225.
 144. Blichfeldt-Lauridsen, L., Hansen, B.D. (2012). Anesthesia and myasthenia gravis. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 56 (1), 17-22.
 145. Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9 (1), 101-124.
 146. Zimmerman, G., Soreq, H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res*, 326 (2), 655-669.
 147. Alvarez, A., Opazo, C., Alarcón, R., Garrido, J., Inestrosa, N.C. (1997). Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils¹. *Journal of Molecular Biology*, 272 (3), 348-361.
 148. Alvarez, A., Alarcón, R., Opazo, C., Campos, E.O., Muñoz, F.J., Calderón, F.H. ve diğerleri. (1998). Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid- β peptide change the biochemical properties of the enzyme and

increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *Journal of Neuroscience*, 18 (9), 3213-3223.

149. Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Pérez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C. ve diğerleri. (1996). Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, 16 (4), 881-891.
150. De Ferrari, G.V., Canales, M.A., Shin, I., Weiner, L.M., Silman, I., Inestrosa, N.C. (2001). A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*, 40 (35), 10447-10457.
151. Birks, J., Grimley Evans, J., Iakovidou, V., Tsolaki, M., Holt, F.E. (2009). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *The Cochrane database of systematic reviews* (2), Cd001191.
152. Wilkinson, D.G., Francis, P.T., Schwam, E., Payne-Parrish, J. (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs & aging*, 21 (7), 453-478.
153. Francis, P.T., Palmer, A.M., Sims, N.R., Bowen, D.M., Davison, A.N., Esiri, M.M. ve diğerleri. (1985). Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *The New England journal of medicine*, 313 (1), 7-11.
154. Barnes, C.A., Meltzer, J., Houston, F., Orr, G., McGann, K., Wenk, G.L. (2000). Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*, 99 (1), 17-23.
155. Dijk, S.N., Francis, P.T., Stratmann, G.C., Bowen, D.M. (1995). Cholinomimetics increase glutamate outflow via an action on the corticostriatal pathway: implications for Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 65 (5), 2165-2169.
156. Giacobini, E. (2003). Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International journal of geriatric psychiatry*, 18 (Suppl 1), S1-5.
157. Seltzer, B. (2005). Donepezil: a review. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 1 (3), 527-536.
158. Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V. (2003). beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical pharmacology*, 65 (3), 407-416.
159. Rogers, S.L., Friedhoff, L.T. (1996). The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 7 (6), 293-303.

160. Rogers, S.L., Farlow, M.R., Doody, R.S., Mohs, R., Friedhoff, L.T. (1998). A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology*, 50 (1), 136-145.
161. Mihara, M., Ohnishi, A., Tomono, Y., Hasegawa, J., Shimamura, Y., Yamazaki, K. ve diğerleri. (1993). Pharmacokinetics of E2020, a new compound for Alzheimer's disease, in healthy male volunteers. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*, 31 (5), 223-229.
162. Tiseo, P.J., Rogers, S.L., Friedhoff, L.T. (1998). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following evening administration. *British journal of clinical pharmacology*, 46 Suppl 1, 13-18.
163. Tiseo, P.J., Perdomo, C.A., Friedhoff, L.T. (1998). Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *British journal of clinical pharmacology*, 46 Suppl 1, 19-24.
164. Akasofu, S., Kosasa, T., Kimura, M., Kubota, A. (2003). Protective effect of donepezil in a primary culture of rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *European journal of pharmacology*, 472 (1-2), 57-63.
165. Shen, H., Kihara, T., Hongo, H., Wu, X., Kem, W.R., Shimohama, S. ve diğerleri. (2010). Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. *British journal of pharmacology*, 161 (1), 127-139.
166. Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C. ve diğerleri. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16 (4), 881-891.
167. Svensson, A.L., Nordberg, A. (1998). Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of A beta(25-35) in rat PC12 cells. *Neuroreport*, 9 (7), 1519-1522.
168. Sabbagh, M.N., Richardson, S., Relkin, N. (2008). Disease-modifying approaches to Alzheimer's disease: challenges and opportunities-Lessons from donepezil therapy. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 4 (1 Suppl 1), S109-118.
169. Rodriguez, J.J., Noristani, H.N., Verkhatsky, A. (2012). The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 99 (1), 15-41.
170. Ibach, B., Haen, E. (2004). Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Current pharmaceutical design*, 10 (3), 231-251.

171. Pakaski, M., Kalman, J. (2008). Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 53 (5), 103-111.
172. Christodoulou, C., Melville, P., Scherl, W.F., Macallister, W.S., Elkins, L.E., Krupp, L.B. (2006). Effects of donepezil on memory and cognition in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 245 (1-2), 127-136.
173. Yoshiyama, Y., Kojima, A., Ishikawa, C., Arai, K. (2010). Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 22 (1), 295-306.
174. Tyagi, E., Agrawal, R., Nath, C., Shukla, R. (2007). Effect of anti-dementia drugs on LPS induced neuroinflammation in mice. *Life sciences*, 80 (21), 1977-1983.
175. Herrmann, N., Chau, S.A., Kircanski, I., Lanctot, K.L. (2011). Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review. *Drugs*, 71 (15), 2031-2065.
176. Akasofu, S., Kimura, M., Kosasa, T., Sawada, K., Ogura, H. (2008). Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease. *Chemico-biological interactions*, 175 (1-3), 222-226.
177. Roco, M.C. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current opinion in biotechnology*, 14 (3), 337-346.
178. Bodor, N., Buchwald, P. (1999). Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 36 (2-3), 229-254.
179. Brightman, M.W. (1977). Morphology of blood-brain interfaces. *Experimental eye research*, 25 Suppl, 1-25.
180. Janzer, R.C., Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325 (6101), 253-257.
181. Vorbrodt, A.W. (1989). Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries. *Journal of neurocytology*, 18 (3), 359-368.
182. Stewart, P.A., Tuor, U.I. (1994). Blood-eye barriers in the rat: correlation of ultrastructure with function. *The Journal of comparative neurology*, 340 (4), 566-576.
183. Bodor, N., Prokai, L., Wu, W.M., Farag, H., Jonalagadda, S., Kawamura, M. ve diğ erleri. (1992). A strategy for delivering peptides into the central nervous system by sequential metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 257 (5077), 1698-1700.

184. Devineni, D., Klein-Szanto, A., Gallo, J.M. (1995). Tissue distribution of methotrexate following administration as a solution and as a magnetic microsphere conjugate in rats bearing brain tumors. *Journal of neuro-oncology*, 24 (2), 143-152.
185. Pardridge, W.M., Buciak, J.L., Friden, P.M. (1991). Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 259 (1), 66-70.
186. Huwyler, J., Wu, D., Pardridge, W.M. (1996). Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (24), 14164-14169.
187. Gutman, R.L., Peacock, G., Lu, D.R. (2000). Targeted drug delivery for brain cancer treatment. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 65 (1-2), 31-41.
188. Smith, Q.R. (2003). A review of blood-brain barrier transport techniques. *Methods in molecular medicine*, 89, 193-208.
189. Braak, H., Braak, E. (1997). Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 18 (4 Suppl), S85-88.
190. Reese, T.S., Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of cell biology*, 34 (1), 207-217.
191. Lee, G., Dallas, S., Hong, M., Bendayan, R. (2001). Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacological reviews*, 53 (4), 569-596.
192. Yan, Q., Sage, E.H. (1998). Transforming growth factor-beta1 induces apoptotic cell death in cultured retinal endothelial cells but not pericytes: association with decreased expression of p21waf1/cip1. *Journal of cellular biochemistry*, 70 (1), 70-83.
193. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V. (2004). New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Current pharmaceutical design*, 10 (12), 1355-1363.
194. Pehlivan, S.B. (2013). Nanotechnology-based drug delivery systems for targeting, imaging and diagnosis of neurodegenerative diseases. *Pharmaceutical research*, 30 (10), 2499-2511.
195. Lemere, C.A. (2007). A beneficial role for IL-1 beta in Alzheimer disease? *The Journal of clinical investigation*, 117 (6), 1483-1485.
196. Reichel, A. (2006). The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Current drug metabolism*, 7 (2), 183-203.

197. Butt, A.M., Jones, H.C., Abbott, N.J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology*, 429, 47-62.
198. Berezowski, V., Landry, C., Lundquist, S., Dehouck, L., Cecchelli, R., Dehouck, M.P. ve diğerleri. (2004). Transport screening of drug cocktails through an in vitro blood-brain barrier: is it a good strategy for increasing the throughput of the discovery pipeline? *Pharmaceutical research*, 21 (5), 756-760.
199. Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M. ve diğerleri. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of cell science*, 107 (Pt 5), 1347-1357.
200. Gaillard, P.J., van der Sandt, I.C., Voorwinden, L.H., Vu, D., Nielsen, J.L., De Boer, A.G. ve diğerleri. (2000). Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharmaceutical research*, 17 (10), 1198-1205.
201. Hori, S., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Kimura, N., Kondo, T., Watanabe, M. ve diğerleri. (2004). Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *Journal of neurochemistry*, 90 (3), 526-536.
202. Mahmoudi, M., Sahraian, M.A., Shokrgozar, M.A., Laurent, S. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *ACS chemical neuroscience*, 2 (3), 118-140.
203. Gilmore, J.L., Yi, X., Quan, L., Kabanov, A.V. (2008). Novel nanomaterials for clinical neuroscience. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 3 (2), 83-94.
204. Muldoon, L.L., Tratnyek, P.G., Jacobs, P.M., Doolittle, N.D., Christoforidis, G.A., Frank, J.A. ve diğerleri. (2006). Imaging and nanomedicine for diagnosis and therapy in the central nervous system: report of the eleventh annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium meeting. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 27 (3), 715-721.
205. Liu, G., Garrett, M.R., Men, P., Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A. (2005). Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1741 (3), 246-252.
206. Liu, G., Men, P., Perry, G., Smith, M.A. (2009). Metal chelators coupled with nanoparticles as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Journal of nanoneuroscience*, 1 (1), 42-55.
207. Mooradian, A.D. (1988). Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiology of aging*, 9 (0), 31-39.

208. Kroll, R.A., Neuwelt, E.A. (1998). Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*, 42 (5), 1083-1099; discussion 1099-1100.
209. Eggleton, R.D., Davis, T.P. (1997). Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides*, 18 (9), 1431-1439.
210. Tamai, I., Tsuji, A. (2000). Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89 (11), 1371-1388.
211. Pardridge, W.M. (1998). CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *Journal of neurochemistry*, 70 (5), 1781-1792.
212. Begley, D.J. (1996). The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 48 (2), 136-146.
213. Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchelli, R. (1997). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology*, 138 (4), 877-889.
214. Rapoport, S.I. (1996). Modulation of blood-brain barrier permeability. *Journal of drug targeting*, 3 (6), 417-425.
215. Ristori, C., Filippi, L., Dal Monte, M., Martini, D., Cammalleri, M., Fortunato, P. ve diğ erleri. (2011). Role of the adrenergic system in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: antiangiogenic effects of beta-adrenoreceptor blockade. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52 (1), 155-170.
216. Stieber, D., Abdul Rahim, S.A., Niclou, S.P. (2011). Novel ways to target brain tumour metabolism. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15 (10), 1227-1239.
217. Liu, G., Bruenger, F.W., Miller, S.C., Arif, A.M. (1998). Molecular structure and biological and pharmacological properties of 3-hydroxy-2-methyl-1-(beta-D-ribofuranosyl or pyranosyl)-4-pyridinone: potential iron overload drugs for oral administration. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8 (21), 3077-3080.
218. Cristiano, R.J., Xu, B., Nguyen, D., Schumacher, G., Kataoka, M., Spitz, F.R. ve diğ erleri. (1998). Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy. *Cancer detection and prevention*, 22 (5), 445-454.
219. Temsamani, J., Bonnafous, C., Rousselle, C., Fraisse, Y., Clair, P., Granier, L.A. ve diğ erleri. (2005). Improved brain uptake and pharmacological activity profile of morphine-6-glucuronide using a peptide vector-mediated strategy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 313 (2), 712-719.

220. Cerletti, A., Drewe, J., Fricker, G., Eberle, A.N., Huwyler, J. (2000). Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *Journal of drug targeting*, 8 (6), 435-446.
221. Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced drug delivery reviews*, 47 (1), 113-131.
222. Aktas, Y., Yemisci, M., Andrieux, K., Gursoy, R.N., Alonso, M.J., Fernandez-Megia, E. ve diğeri. (2005). Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjugate chemistry*, 16 (6), 1503-1511.
223. Akagi, T., Shima, F., Akashi, M. (2011). Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 32 (21), 4959-4967.
224. Laurent, S., Mahmoudi, M. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2 (4), 367-390.
225. Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., Shah, S.P. (2003). Drug delivery to the central nervous system: a review. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 6 (2), 252-273.
226. Rapoport, S.I., Ohno, K., Fredericks, W.R., Pettigrew, K.D. (1978). Regional cerebrovascular permeability to [14C]sucrose after osmotic opening of the blood-brain barrier. *Brain research*, 150 (3), 653-657.
227. Sanovich, E., Bartus, R.T., Friden, P.M., Dean, R.L., Le, H.Q., Brightman, M.W. (1995). Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7. *Brain research*, 705 (1-2), 125-135.
228. Feinmann, J. (2002). Breaking down the barriers to a good death. *Lancet*, 360 (9348), 1846.
229. Delon, A., Huguet, F., Courtois, P., Vierfond, J.M., Bouquet, S., Couet, W. (1997). Pharmacokinetic-pharmacodynamic contributions to the convulsant activity of pefloxacin and norfloxacin in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 280 (2), 983-987.
230. Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 56 (11), 1649-1659.
231. Brambilla, D., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Hashemi, S.H., Wu, L.P., Moghimi, S.M. ve diğeri. (2011). Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7 (5), 521-540.

232. De Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., Barentsz, J.O., Verdijk, P., Van Krieken, J.H., Boerman, O.C. ve diğerleri. (2005). Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nature biotechnology*, 23 (11), 1407-1413.
233. Wadghiri, Y.Z., Sigurdsson, E.M., Sadowski, M., Elliott, J.I., Li, Y., Scholtzova, H. ve diğerleri. (2003). Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 50 (2), 293-302.
234. Skaat, H., Margel, S. (2009). Synthesis of fluorescent-maghemite nanoparticles as multimodal imaging agents for amyloid-beta fibrils detection and removal by a magnetic field. *Biochemical and biophysical research communications*, 386 (4), 645-649.
235. Skaat, H., Sorci, M., Belfort, G., Margel, S. (2009). Effect of maghemite nanoparticles on insulin amyloid fibril formation: selective labeling, kinetics, and fibril removal by a magnetic field. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 91 (2), 342-351.
236. Elsinghorst, P.W., Hartig, W., Goldhammer, S., Grosche, J., Gutschow, M. (2009). A gorge-spanning, high-affinity cholinesterase inhibitor to explore beta-amyloid plaques. *Organic & biomolecular chemistry*, 7 (19), 3940-3946.
237. Hartig, W., Kacza, J., Paulke, B.R., Grosche, J., Bauer, U., Hoffmann, A. ve diğerleri. (2010). In vivo labelling of hippocampal beta-amyloid in triple-transgenic mice with a fluorescent acetylcholinesterase inhibitor released from nanoparticles. *The European journal of neuroscience*, 31 (1), 99-109.
238. Siegemund, T., Paulke, B.R., Schmiedel, H., Bordag, N., Hoffmann, A., Harkany, T. ve diğerleri. (2006). Thioflavins released from nanoparticles target fibrillar amyloid beta in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 24 (2-3), 195-201.
239. Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D.J., Noireaux, V., Brivanlou, A.H., Libchaber, A. (2002). In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science (New York, N.Y.)*, 298 (5599), 1759-1762.
240. Tokuraku, K., Marquardt, M., Ikezu, T. (2009). Real-time imaging and quantification of amyloid-beta peptide aggregates by novel quantum-dot nanoprobe. *PloS one*, 4 (12), e8492.
241. Nazem, A., Mansoori, G.A. (2008). Nanotechnology solutions for Alzheimer's disease: advances in research tools, diagnostic methods and therapeutic agents. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 13 (2), 199-223.

242. Ryan, J., Scali, J., Carriere, I., Ritchie, K., Ancelin, M.L. (2008). Hormonal treatment, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *International psychogeriatrics / IPA*, 20 (1), 47-56.
243. Gauthier, S., Juby, A., Dalziel, W., Rehel, B., Schechter, R. (2010). Effects of rivastigmine on common symptomatology of Alzheimer's disease (EXPLORE). *Current medical research and opinion*, 26 (5), 1149-1160.
244. Wilson, B., Samanta, M.K., Santhi, K., Kumar, K.P., Paramakrishnan, N., Suresh, B. (2008). Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain research*, 1200, 159-168.
245. Wilson, B., Samanta, M.K., Santhi, K., Kumar, K.P., Paramakrishnan, N., Suresh, B. (2008). Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 70 (1), 75-84.
246. Pike, C.J., Carroll, J.C., Rosario, E.R., Barron, A.M. (2009). Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30 (2), 239-258.
247. Amtul, Z., Wang, L., Westaway, D., Rozmahel, R.F. (2010). Neuroprotective mechanism conferred by 17beta-estradiol on the biochemical basis of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169 (2), 781-786.
248. Mittal, G., Sahana, D.K., Bhardwaj, V., Ravi Kumar, M.N. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 119 (1), 77-85.
249. DeBattista, C., Belanoff, J. (2005). C-1073 (mifepristone) in the adjunctive treatment of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*, 2 (2), 125-129.
250. Sharma, R.A., Steward, W.P., Gescher, A.J. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology*, 595, 453-470.
251. Ishrat, T., Hoda, M.N., Khan, M.B., Yousuf, S., Ahmad, M., Khan, M.M. ve diğ erleri. (2009). Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 19 (9), 636-647.

252. Sun, M., Gao, Y., Guo, C., Cao, F., Song, Z., Xi, Y. ve diğerleri. (2010). Enhancement of transport of curcumin to brain in mice by poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle. *J Nanopart Res*, 12 (8), 3111-3122.
253. Mulik, R.S., Monkkonen, J., Juvonen, R.O., Mahadik, K.R., Paradkar, A.R. (2010). ApoE3 mediated poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using in vitro cell culture model. *Molecular pharmaceutics*, 7 (3), 815-825.
254. Smith, A., Giunta, B., Bickford, P.C., Fountain, M., Tan, J., Shytle, R.D. (2010). Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *International journal of pharmaceutics*, 389 (1-2), 207-212.
255. Williams, S.R., Lepene, B.S., Thatcher, C.D., Long, T.E. (2009). Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)-glutathione conjugate self-assembled nanoparticles for antioxidant delivery. *Biomacromolecules*, 10 (1), 155-161.
256. Reddy, M.K., Wu, L., Kou, W., Ghorpade, A., Labhasetwar, V. (2008). Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. *Applied biochemistry and biotechnology*, 151 (2-3), 565-577.
257. Pottiez, G., Duban-Deweer, S., Deracinois, B., Gosselet, F., Camoin, L., Hachani, J. ve diğerleri. (2011). A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells. *Journal of proteomics*, 75 (2), 628-641.
258. Sumer, B., Gao, J. (2008). Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine (London, England)*, 3 (2), 137-140.
259. Liu, Y., Miyoshi, H., Nakamura, M. (2007). Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 120 (12), 2527-2537.
260. Jain, K.K. (2007). Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system. *Neuro-degenerative diseases*, 4 (4), 287-291.
261. Zhang, P., Chen, L., Gu, W., Xu, Z., Gao, Y., Li, Y. (2007). In vitro and in vivo evaluation of donepezil-sustained release microparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 28 (10), 1882-1888.
262. Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Muller, R.H., Verbavatz, J.M. ve diğerleri. (1995). The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-

- coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced drug delivery reviews*, 16 (2-3), 215-233.
263. Douglas, S.J., Davis, S.S., Illum, L. (1987). Nanoparticles in drug delivery. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 3 (3), 233-261.
 264. Devine, D.V., Wong, K., Serrano, K., Chonn, A., Cullis, P.R. (1994). Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochimica et biophysica acta*, 1191 (1), 43-51.
 265. Moghimi, S.M., Hedeman, H., Muir, I.S., Illum, L., Davis, S.S. (1993). An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1157 (2), 233-240.
 266. Costantino, L., Gandolfi, F., Tosi, G., Rivasi, F., Vandelli, M.A., Forni, F. (2005). Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 108 (1), 84-96.
 267. Olivier, J.C. (2005). Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2 (1), 108-119.
 268. Lu, W., Tan, Y.Z., Hu, K.L., Jiang, X.G. (2005). Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier. *International journal of pharmaceutics*, 295 (1-2), 247-260.
 269. Kim, D.H., Martin, D.C. (2006). Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. *Biomaterials*, 27 (15), 3031-3037.
 270. Dziubla, T.D., Karim, A., Muzykantov, V.R. (2005). Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 102 (2), 427-439.
 271. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
 272. Pappa, H., Farru, R., Vilanova, P.O., Palacios, M., Pizzorno, M.T. (2002). A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride in tablets. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 27 (1-2), 177-182.
 273. Naiki, H., Nakakuki, K. (1996). First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 74 (2), 374-383.

274. Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Omata, S., Gejyo, F., Naiki, H. (1999). Interaction between A beta(1-42) and A beta(1-40) in Alzheimer's beta-amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry*, 38 (47), 15514-15521.
275. Ghasemi, R., Zarifkar, A., Rastegar, K., Maghsoudi, N., Moosavi, M. (2014). Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25-35 induces a reproducible impairment of learning and memory: considering caspase-3 and MAPKs activity. *European journal of pharmacology*, 726, 33-40.
276. Behl, C., Davis, J.B., Klier, F.G., Schubert, D. (1994). Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain research*, 645 (1-2), 253-264.
277. Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W. (1995). Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 64 (1), 253-265.
278. Zussy, C., Brureau, A., Delair, B., Marchal, S., Keller, E., Ixart, G. ve diğ erleri. (2011). Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats. *The American journal of pathology*, 179 (1), 315-334.
279. Kreuter, J., Speiser, P.P. (1976). In vitro studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants. *Journal of pharmaceutical sciences*, 65 (11), 1624-1627.
280. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P. (1979). Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 31 (5), 331-332.
281. Barratt, G. (2003). Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60 (1), 21-37.
282. Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R. (2003). Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 18 (2), 113-120.
283. Hans, M.L., Lowman, A.M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 6 (4), 319-327.
284. Sanchez, A., Tobio, M., Gonzalez, L., Fabra, A., Alonso, M.J. (2003). Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 18 (3-4), 221-229.

285. Gasparini, L., Ongini, E., Wenk, G. (2004). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *Journal of neurochemistry*, 91 (3), 521-536.
286. Dong, Y., Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36 (2), 180-190.
287. Girvin, A.M., Gordon, K.B., Welsh, C.J., Clipstone, N.A., Miller, S.D. (2002). Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells. *Blood*, 99 (10), 3692-3701.
288. Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science (New York, N.Y.)*, 291 (5504), 657-661.
289. Giulian, D., Baker, T.J. (1985). Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *The Journal of cell biology*, 101 (6), 2411-2415.
290. Heneka, M.T., Galea, E., Gavrilyuk, V., Dumitrescu-Ozimek, L., Daeschner, J., O'Banion, M.K. ve diğerleri. (2002). Noradrenergic depletion potentiates beta -amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22 (7), 2434-2442.
291. Forloni, G., Demicheli, F., Giorgi, S., Bendotti, C., Angeretti, N. (1992). Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain research. Molecular brain research*, 16 (1-2), 128-134.
292. Rogers, J.T., Leiter, L.M., McPhee, J., Cahill, C.M., Zhan, S.S., Potter, H. ve diğerleri. (1999). Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *The Journal of biological chemistry*, 274 (10), 6421-6431.
293. Donnelly, R.J., Friedhoff, A.J., Beer, B., Blume, A.J., Vitek, M.P. (1990). Interleukin-1 stimulates the beta-amyloid precursor protein promoter. *Cellular and molecular neurobiology*, 10 (4), 485-495.
294. Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J. ve diğerleri. (1998). Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 152 (2), 379-389.
295. White, J.A., Manelli, A.M., Holmberg, K.H., Van Eldik, L.J., Ladu, M.J. (2005). Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiology of disease*, 18 (3), 459-465.

296. Heneka, M.T., O'Banion, M.K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*, 184 (1-2), 69-91.
297. Mandler, M., Rockenstein, E., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Michael, S. ve diğerleri. (2012). Detection of peri-synaptic amyloid-beta pyroglutamate aggregates in early stages of Alzheimer's disease and in AbetaPP transgenic mice using a novel monoclonal antibody. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 28 (4), 783-794.
298. Tang, J., Carr, R.L., Chambers, J.E. (1999). Changes in rat brain cholinesterase activity and muscarinic receptor density during and after repeated oral exposure to chlorpyrifos in early postnatal development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 51 (2), 265-272.
299. Subash, S., Essa, M.M., Al-Asmi, A., Al-Adawi, S., Vaishnav, R., Braid, N. ve diğerleri. (2014). Pomegranate from Oman Alleviates the Brain Oxidative Damage in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's disease. *Journal of traditional and complementary medicine*, 4 (4), 232-238.



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 13

24 Şubat 2012

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 20.02.2012 (PAZARTESİ)
TOPLANTI SAYISI	: 2012/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2012/13
KARAR NUMARASI	: 2012/13-10
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Gülberk Uçar
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Yrd. Doç. Dr. Samiye Y. Çiftçi, Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel, Araş. Gör. Açelya Y. Aslan, Araş. Gör. İpek Baysal
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Kezban Ulubayram, Öğr. Gör. Yeliz T. Sarısözen
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 60 Adet C57BL/6 Fare, 48 Adet Tg2576 Transgenik Fare
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 24 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Gülberk Uçar'ın hayvan deneylerinden sorumlu araştırmacısı olduğu 2012/13 dosya numaralı ve *"Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Beyine Hedeflendirilmesi"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Yrd. Doç. Dr. B. C. Tel çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Ömer Uğur
Etik Kurul Başkanı



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/

Sayı :52338575 -58

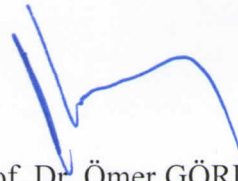
09 Mayıs 2014

Prof.Dr. Gülberk UÇAR
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof.Dr. UÇAR,

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz, Kurulumuzun 20.02.2012 tarihli toplantısında onaylanan, 2012/13 dosya kayıt numaralı ve **“Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Beyine Hedeflendirilmesi”** başlıklı çalışmanın süresinin uzatılmasını talep ettiğiniz 24.04.2014 tarihli dilekçeniz Kurulumuzun 07.05.2014 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, çalışmanın 20.02.2016 tarihine kadar uzatılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof. Dr. Ömer GÖRDÜYSUS
Başkan Yardımcısı



Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 24

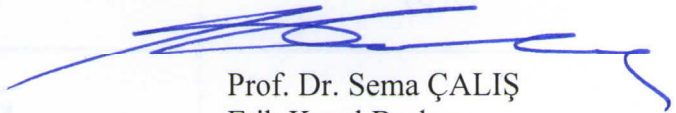
24 Şubat 2015

Prof.Dr.Gülberk UÇAR
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof.Dr. UÇAR

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz Kurulumuzun 20.02.2012 tarihli toplantısında onaylanan, 2012/13-10 dosya kayıt numaralı ve **“Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılmak Üzere Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Beyine Hedeflendirilmesi”** başlıklı çalışmanız hakkında 26.01.2015 tarihli dilekçenizde belirttiğiniz yöntemde yaptığınız değişiklik (Transgenik fareler yerine 56 adet sprague-dawley sıçan) talebiniz Kurulumuzun 03.02.2015 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı