

**EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
FENİTOİN YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF
PHENYTOIN LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES
FOR USE IN THE TREATMENT OF EPILEPSY**

SETENAY AKMAN

PROF. DR MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE FENİTOİN YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Setenay AKMAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Eylül 2022, 81 sayfa

Epilepsi dünya nüfusunun %1' ini etkileyen ve spontan tekrarlayan nöbetler ile karakterize kronik bir nörolojik hastalıktır. Yaygın nedenleri arasında kritik nöronal genlerdeki patojenik genetik varyantlar, travmatik beyin hasarları, enfeksiyon ve genetik destekli olan veya olmayan gelişimsel malformasyonlar bulunmaktadır.

Epilepsi tedavisinde çeşitli ilaçlar kullanılmakla birlikte bu ilaçlar epilepsiyi tedavi etmemekte sadece nöbet oluşumunu önlemektedir. Bu nedenle epilepsi tedavisinde kullanılan bu tür ilaçlar antikonvülsanlar olarak bilinmektedir. En yaygın kullanılan antikonvülsanlardan biri olan fenitoinidir.

Fenitoin yüksek oranda protein bağlanma kapasitesine sahiptir ve fenitoin nöbet önleyici etki gösterdiği dozlarda protein bağlanma özelliği, fenitoinin yan etkisini arttırmaktadır. Bu durum nöbet önleme etkisi yüksek olmasına rağmen fenitoinin epilepsi hastalarında kullanımı günümüzde oldukça azalmıştır.

Günümüzde konvansiyonel tanımlı terapötiklerin biyoyararlanımlarını artırmak / yan etkilerini azaltmak için nanopartiküller taşıyıcı sistemleri ile kombinasyonu çalışılan konulardandır. Nanopartiküllerin sağladığı temel avantajlar; (1) suda çözünürlüğü artırarak iyileştirilmiş biyoyararlanım, (2) vücuttaki direnç süresini arttırma (klirens için

yarı ömrü arttırma/ aynı kökenli reseptörleri için özgüllüğü arttırma) ve (3) ilacı belirli bir bölgeye (etki yeri) hedeflemedir. Böylece gerekli ilaç miktarında ve doz toksisitesinde eş zamanlı azalmaya neden olarak toksik teröpatik ilaçların güvenli bir şekilde verilmesini ve hedef olmayan hücre ve dokuların ciddi yan etkilerden korunmasını sağlamasıdır.

Serbest fenitoinin canlı içerisinde proteine tutunarak işlevsizleşmesi, suda çözünmüyor olması ve yüksek dozlarda hastaya verilmesi durumunda önemli yan etkilere sebep olması göz önünde bulundurularak son dönemlerde bu gibi durumların önlenmesi için ilaç taşıyıcı olarak ve kontrollü salım gerçekleştirmek üzere sık kullanılmaya başlanan nanopartiküler sistemler ile fenitoinin yeniden epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanabileceği öngörülmüştür. Bu amaçla sunmuş olduğumuz proje önerisinde stearik asit nanopartiküller içerisine enkapsüle edilen fenitoinin *in vitro* karakterizasyonu gerçekleştirilecek ve glial ve nöronal hücrelerdeki etkileri incelenecektir. Bu amaçla T98G glioblastoma hücre hattında *in vitro* epilepsi modeli oluşturulacak ve bu modellerin ilaç yüklü nanopartikül ile etkileşimi sonucu hücrelerde meydana gelen değişimler (TOS ve 8-OHdG) incelenecektir.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, Fenitoin, Katı Lipid Nanopartiküller, TOS, 8-OHdG,

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PHENYTOIN LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR USE IN THE TREATMENT OF EPILEPSY

Setenay AKMAN

Master, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

September 2022, 81 pages

Epilepsy is a chronic neurological disease that affects 1% of the world's population and is characterized by spontaneous recurrent seizures. Common causes include pathogenic genetic variants in critical neuronal genes, traumatic brain injuries, infection, and developmental malformations with or without genetic support.

Although various drugs are used in the treatment of epilepsy, these drugs do not treat epilepsy, they only prevent seizures. For this reason, such drugs used in the treatment of epilepsy are known as anticonvulsants. One of the most widely used anticonvulsants is phenytoin.

Phenytoin has a high protein binding capacity, and at doses where phenytoin has anti-seizure effects, its protein binding property increases the side effect of phenytoin. Although this situation has a high anti-seizure effect, the use of phenytoin in epilepsy patients has decreased considerably today.

Today, the combination of conventionally defined therapeutics with nanoparticles carrier systems in order to increase their bioavailability / decrease their side effects is one of the

subjects studied. The main advantages of nanoparticles are; (1) improved bioavailability by increasing water solubility, (2) increased resistance time in the body (increasing half-life for clearance/increased specificity for cognate receptors), and (3) targeting the drug to a specific site (site of action). Thus, by causing a simultaneous decrease in the required amount of drug and dose toxicity, it ensures the safe delivery of toxic therapeutic drugs and the protection of non-target cells and tissues from serious side effects.

Considering that free phenytoin clings to protein *in vivo*, becomes dysfunctional, does not dissolve in water, and causes significant side effects in case of high doses, phenytoin is used in the treatment of epilepsy again with nanoparticulate systems, which have recently been used as a drug carrier and for controlled release in order to prevent such situations. anticipated to be used. For this purpose, the *in vitro* characterization of phenytoin encapsulated in stearic acid nanoparticles will be performed and its effects on glial and neuronal cells will be examined in our project proposal. For this purpose, an *in vitro* epilepsy model will be created in the T98G glioblastoma cell line and the changes that occur in cells as a result of the interaction of these models with drug-loaded nanoparticles will be examined (TOS and 8-OHdG).

Keywords: Epilepsy, Phenytoin, Solid Lipid Nanoparticles, TOS, 8-OHdG

TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca bilgisini ve desteęini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR' a,

Yine tüm tez deney sürecim boyunca desteklerini gördüğüm sayın hocalarım Prof. Dr. Murat DEMİRBİLEK' e, Doç. Dr. Baran ERMAN' a, Dr. Öğr. Üyesi Esin ÇETİN' e,

Tezimin tüm deney ve yazım süreci dahil her aşamasında daima yanımda olan canım arkadaşım Funda ALKAN ÇANDIR' a

Manevi desteklerini her daim hissettiren canım arkadaşlarım Elif BABAYİĞİT' e ve Şefika ÖZCAN' a

Hayatımın her döneminde maddi manevi her zaman yanımda olan ve beni destekleyen biricik annem Yeter AKMAN ve biricik babam Ridvan AKMAN' a, Tamara YAĞAN' a ve Funda ÇAĞIRMAZ' a

Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epilepsi	3
2.2. Epilepsi Sınıflandırması	3
2.3. Epidemiyoloji	5
2.4. Epilepsi Etiyolojisi ve Patofizyolojisi	5
2.5. Epilepsi Tedavisi.....	6
2.5.1. Epilepside İlaç Tedavisi	7
2.6. Fenitoin.....	9
2.7. Nanopartiküller	10
2.7.1. Katı Lipid Nanopartiküller	10
2.8. Nanopartiküllerin İlaç Taşımada Kullanımı	11
2.9. Nanopartiküllerin Epilepsi Tedavisinde Kullanımı	12
2.10. Kainik Asit.....	14
2.11. <i>In vitro</i> Epilepsi Modeli.....	14
2.13. T98G Gliablastoma Hücre Hattı.....	15
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	16
3.1. Stearik Asit Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	16
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	16
3.1.2. Stearik Asit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	16
3.2. Fenitoin Enkapsülasyonu ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	18
3.2.1. Kimyasal Malzemeler	18

3.2.2. Fenitoin Enkapsülasyonu	18
3.2.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	19
3.2.3. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	20
3.2.4. <i>In vitro</i> İlaç Salım Analizi	20
3.3. MTT Yöntemi Kullanılarak Sitotoksitesinin Belirlenmesi	21
3.3.1. Kimyasal Malzemeler	21
3.3.2. SA-SLNP Sitotoksitesinin Belirlenmesi	21
3.3.3. PHT-SA-SLNP Sitotoksitesinin Belirlenmesi	21
3.3.4. Kanik Asit Sitotoksitesinin Belirlenmesi	22
3.4. <i>In vitro</i> Epilepsi Modeli Oluşturulması ve Nöbet Aktivitesinin Önlenmesi ...	23
3.4.1. Kimyasal Malzemeler	23
3.4.2. Hücrelerin PHT-SA-SLNP ile Muamele Edilmesi/Etkileştirilmesi ve KA ile Etkileştirilmesi	23
3.4.3. Hücre Mutajenitesinin Belirlenmesi	24
3.4.4. Hücre TOS Seviyesinin Belirlenmesi.....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
4.1. SA-SLNP' lerin Karakterizasyonu.....	27
4.1.1. SA-SLNP' lerin Boyut ve Yük Analizi.....	27
4.1.2. SA-SLNP' lerin SEM Görüntülemeleri	31
4.2. PHT SA-SLNP' lerin Karakterizasyonu	31
4.2.1. PHT-SA-SLNP' lerin Boyut ve Yük Analizi	31
4.2.2. PHT-SA-SLNP' lerin İlaç Yükleme Oranı (%DL) ve Enkapsülasyon Etkinliğinin (%EE) Belirlenmesi	32
4.2.3. PHT-SA-SLNP' lerin <i>in vitro</i> İlaç Salım Analizleri	33
4.3. MTT Yöntemi Kullanılarak Sitotoksitelerin Belirlenmesi.....	36
4.3.1. SA-SLNP' lerin Sitotoksitesi	36
4.3.2. PHT-SA-SLNP Sitotoksitesinin Belirlenmesi	37
4.3.3. KA Sitotoksitesinin Belirlenmesi	38
4.4. <i>In vitro</i> Epilepsi Modelinin Oluşturulması.....	39
4.4.1. Hücre Mutajenitesinin Belirlenmesi	39
4.4.2. Hücre TOS Seviyesinin Belirlenmesi.....	40
4.5. İstatistiksel Analiz.....	41

5. KAYNAKLAR	42
EKLER.....	50
EK 1 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	50
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Nöbet/ Epilepsi Sınıflandırmasının Tarihsel Süreci	4
Şekil-2: 2017 ILAE Nöbet Sınıflandırması – Temel Sınıflandırma.....	5
Şekil-3: SA-SLNP bütün ve kesit görüntüsü	17
Şekil-4: PHT-SA- SLNP bütün ve kesit görüntüsü	19
Şekil-5: SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği.....	28
Şekil-6: SA PHT oranı 9:1 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği	28
Şekil-7: SA PHT oranı 8:2 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği	29
Şekil-8: SA PHT oranı 7:3 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği	29
Şekil-9: SA PHT oranı 6:4 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği	30
Şekil-10: SA-SLNP SEM Görüntüleri.....	31
Şekil-11: PHT-Aseton Kalibrasyon Eğrisi Grafiği	34
Şekil-12: SA PHT oranı 9:1 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salm – Zaman Grafiği.....	34
Şekil-13: SA PHT oranı 8:2 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salm – Zaman Grafiği.....	35
Şekil-14: SA PHT oranı 7:3 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salm – Zaman Grafiği.....	35
Şekil-15: SA PHT oranı 6:4 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salm – Zaman Grafiği.....	36
Şekil-16: SA-SLNP' lerin T98G gliablastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi	37
Şekil-17: PHT-SA-SLNP' lerin T98G gliablastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	38
Şekil-18: KA dozlarının muamele sürelerine göre % hücre canlılığına etkisi	39
Şekil-19: NK, SA-SLNP, PHT-SA-SLNP, PHT ve KA' ya ait mutajenite seviyeleri	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo-1: AED'lerin Sınıflandırılması	9
Tablo-2: SLNP'lerin Üretim Yöntemleri	11
Tablo 3: Stearik asit katı lipid nanopartiküller için denenen formülasyonlar ve karakterizasyon sonuçları.....	30
Tablo 4: Fenitoin yüklü stearik asit katı lipid nanopartikül formülasyonları ve karakterizasyon sonuçları.....	32
Tablo 5: PHT-SA-SLNP'lere ait enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme oranları.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Na ⁺	Sodyum İyonu
Ca ²⁺ /Ca ⁺⁺	Kalsiyum İyonu
PDI	Polydispersal Index
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
DL	İlaç Yükleme Oranı
OD	Optik Densite

Kısaltmalar

ILAE	Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği
IBE	Uluslararası Epilepsi Bürosu
EEG	Elektroensefalografi
VEEG	Videoelektroensefalografi
CT	Bilgisayarlı Tomografi
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
GABA	γ -aminobütirik Asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
AED	Anti Epileptik İlaç
RNS	Nörostimülasyon Sistemi
VNS	Vagus Sinir Uyarımı
NMDA	N-Metil D-Aspartik Asit
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik Asit
PHT	Fenitoin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

RNA	Ribo Nükleik Asit
SLNP	Katı Lipid Nanopartikül
RES	Retikülo Endotelyal Sistem
KBB	Kan Beyin Bariyeri
INS-GNP	İnsülin ile Kaplanmış Altın Nanopartiküller
PVP	Polivinilprolidon
AuNP	Altın Nanopartikül
DZ	Diazepam
XRD	X- Işını Kristalografisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DZ-SLNP	Diazepam Yüklü Katı Lipid Nanopartikül
KA	Kainik Asit
P2X7R	P2X Purinoceptor 7 Reseptörü
ATP	Adenozin Trifosfat
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
mGluRs	Metabotropik Glutamat Reseptörleri
SA	Stearik Asit
PVA	Poli Vinil Alkol
dH ₂ O	Distile Su
SA-SLNP	Stearik Asit Katı Lipid Nanopartikül
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PBS	Phosphate Buffer Saline
PHT-SA-SLNP	Fenitoin Yüklü Katı Lipid Nanopartikül
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
FBS	Fetal Bovine Serum

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HCl	Hidroklorik Asit
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosine
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
TOS	Total Oksidant Seviyesi
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
mRNA	Messenger RNA
cDNA	Complementer DNA
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

1. GİRİŞ

Epilepsi dünyada yaklaşık 50 milyon insanı etkileyen, spontan tekrarlayan nöbetlerle karakterize; bilişsel, psikolojik ve sosyolojik sonuçları olan kronik bir nörolojik hastalıktır [1,2] Yaygın nedenleri arasında kritik nöronal genlerdeki patojenik genetik varyantlar, travmatik beyin hasarları, enfeksiyon ve genetik destekli olan veya olmayan gelişimsel malformasyonlar bulunmaktadır [3]. Beyin dinlenme durumundan nöbet durumuna geçerken anormal senkronize bir beyin aktivitesi gerçekleşir [4]. Meydana gelen bu anormal senkronize beyin aktivitesi hastalarda epileptik nöbet sırasında bilinç kaybı, titreme, katılaşma, karından göğüse doğru yükselen bir his, yanmış lastik kokusu veya déjà vu gibi genel veya öznel bazı davranış değişikliklerine neden olabilir [5].

Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) 2017 yılında nöbetleri başlama durumlarına göre fokal, jeneralize ve başlangıcı bilinmeyen nöbetler olmak üzere üç sınıfa, epilepsiyi ise fokal, jeneralize, jeneralize ve fokal kombinasyonu ve başladığı yer bilinmeyen epilepsiler olmak üzere dört sınıfa ayırdı [6,7].

Epilepsi oluşumunda birçok farklı neden ve yolak etkilidir. Oluşumunda birden fazla genin rol oynamasından ötürü epilepsi literatürde poligenik bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır. Epilepside nöbet oluşumu genetik bozukluklardan kaynaklı olabileceği gibi bilinen bir lezyon veya akut bir hastalıktan kaynaklı hücrelerde meydana gelen moleküler veya fizyolojik değişikliklerden de kaynaklanabilmektedir [8].

Epilepsi hastalarının tedavisinde cerrahi operasyon [9,10], derin beyin uyarımı [11] ve ilaçla tedavi [12, 13, 14] gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. İlaç tedavisi yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. İlaçlar epilepsiyi tedavi etmekten ziyade nöbete sebep olan mekanizmalara etki ederek nöbet oluşumunu engellemektedir. Bu nedenle bu tarz ilaçlara antikonvülsan ilaçlar denilmektedir. Bu ilaçlar etki mekanizmalarına göre çeşitli gruplara ayrılır ve bu etki mekanizmaları doğrultusunda kullanılırlar.

Son yıllarda hayvan modellerinde nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak çalışması giderek artmıştır. Bunun nedenleri arasında nanopartiküler sistemlerle ilaç taşınmasının hastalıklar için daha etkili sonuçlar vermesi, toksisiteyi azaltmaları, sudaki çözünürlüğü artırıp biyoayarlanımı iyileştirmesi, ilacın direkt hedef bölgeye etkisinin sağlanabilmesi ve düşük doz ilaçta yüksek verim elde edilmesi gösterilebilir [15, 16, 17].

Fenitoin 1930' lu yıllarda kullanılmaya başlanmış ve voltaj kapılı sodyum kanallarını inhibe ettiği bilinen bir antikonvülsan ajandır [18, 19]. Uzun yıllardan beri antikonvülsan olarak epilepsi tedavilerinde kullanılmakta olan etkili bir ilaçtır. Fakat son yıllarda etkinliği yüksek olmasına karşın ağır yan etkileri dolayısıyla kullanımı azalmıştır. Bu nedenle bu çalışmada fenitoini katı lipid nanopartikül içerisine hapsederek yan etkilerinin azaltılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsi, spontan tekrarlayan nöbetlerle karakterize dünya nüfusunun %1' ini (yaklaşık 50 milyon kişi) etkileyen nörolojik bir hastalıktır [20]. 2010 yılında yapılan Küresel Hastalık Yükü araştırmalarında epilepsi, hayat kalitesini önemli ölçüde düşüren en ağır ikinci hastalık olarak yer almıştır [21].

Hastalığa genellikle otizm spektrum bozukluğu, depresyon ve anksiyete gibi psikiyatrik, entelektüel yetersizlik ve öğrenme güçlüğü gibi bilişsel ve motor bozukluklar gibi komorbiditeler eşlik eder [22, 23, 24, 25].

Nöbet, epileptik nöbet ve epilepsi kavramları Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) ve Uluslararası Epilepsi Bürosu (IBE) tarafından tanımlanmıştır. Bu tanımlara göre;

- **Nöbet:** Beyindeki nöronların aşırı hipersenkron deşarjının sebep olduğu nörolojik fonksiyonların proksimal bir değişimidir [26, 3].
- **Epileptik Nöbet:** Beyindeki anormal aşırı veya senkronize beyin aktivitesine bağlı olarak meydana gelen geçici sinyal ve/ veya semptomlardır [26].
- **Epilepsi:** Epilepsi güçlü genetik yatkınlıklar ile meydana gelen epileptik nöbetlerin nörobiyolojik, bilişsel, fizyolojik ve sosyal sonuçları ile karakterize edilen bir beyin hastalığıdır. Epilepsi tanımı en az bir epileptik nöbetin meydana gelmiş olmasını gerektirir [26]. Ateş, hipoglisemi gibi geçici bir durum tarafından tetiklenen nöbetler kronik değildir ve kısa süreli sekonder bir durum oldukları için epilepsi tanımına girmezler [3].

2.2. Epilepsi Sınıflandırması

Modern olarak ilk nöbet sınıflandırması 1964 yılında yapılmış olup yaygın olarak 1970 yılında kullanılmaya başlanmıştır [27]. Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (ILAE) tarafından ilk nöbet ve epilepsi sınıflandırması 1981 yılında yapılmıştır [28]. ILAE tarafından yapılan bu sınıflandırma 1985 [29] ve 1989 yılında [30] yine ILAE tarafından revize edilmiştir. 1989 yılında yapılan sınıflandırma 2010 yılında yapılan revizyona kadar geçerliliğini korumuştur. Daha sonra 2014 reyyonu yayınlanmış ve son olarak 2017 yılında ILAE tarafından şu an hala kullanılmakta olan sınıflandırma yayınlanmıştır [31].



Şekil-1: Nöbet/ Epilepsi Sınıflandırmasının Tarihsel Süreci

2017 yılında yapılan son revizyonda epilepsi bir bozukluktan ziyade tedavi edilebilir bir hastalık olarak ele alınmış ve klinik özelliklerine göre nöbet, epilepsi ve epilepsi sendromu olmak üzere 3 aşamada sınıflandırılmıştır.

Nöbetler sınıflandırılırken nöbetin başlama bölgesi, nöbet süresince meydana gelen bilinçsizliğin derecesi ve beden hareketlerinin seviyesi olmak üzere 3 kriter göz önünde bulundurulmuştur. Buna göre temel sınıflandırmada nöbetler fokal başlangıçlı (beynin bir hemisferinde başlayan ve yakın nöronlara yayılan nöbetler), jeneralize başlangıçlı (beynin her iki bölgesine de çok hızlı yayılan nöbetler) [32] ve başlangıcı bilinmeyen olarak 3 sınıfa ayrılmış, genişletilmiş sınıflandırmada ise her bir nöbet türü kendi içlerinde tekrar sınıflara ayrılmıştır [33].

Bu sınıflandırmada epilepsi ise fokal, jeneralize, fokal ve jeneralize kombinasyonu ve bilinmeyen olmak üzere 4 ana sınıfa ayrılmıştır. 2017 yılına yapılan son revizyonla fokal ve jeneralize kombine epilepsi türü bu sınıflandırmaya eklenmiştir.

Nöbet şikayetiyle hastaneye başvuran hastalara doğru teşhis konulabilmesi adına epilepsy sınıflandırması önemli bir yer tutmaktadır. Bu bağlamda hastalara elektroensefalografi (EEG), videoelektroensefalografi (VEEG), bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi görüntüleme uygulamaları kullanılarak elde edilen bulgular sınıflandırma parametrelerine göre değerlendirilip en doğru teşhisin konması sağlanmaktadır [5, 33].

FOKAL BAŞLANGIÇLI	<ul style="list-style-type: none"> •Korunmuş farkındalık / Bozulmuş farkındalık •Motor başlangıçlı/ Nonmotor başlangıçlı •Fokal başlayan bilateral tonik-klonik
JENERALİZE BAŞLANGIÇLI	<ul style="list-style-type: none"> •Motor Semptom •Tonik-Klonik •Diğer motor •Nonmotor semptom (Absans)
BAŞLANGICI BİLİNMEYEN	<ul style="list-style-type: none"> •Motor Semptom •Tonik-Klonik •Diğer motor •Nonmotor Semptom (Absans) •Sınıflandırılmayan

Şekil-2: 2017 ILAE Nöbet Sınıflandırması – Temel Sınıflandırma

2.3. Epidemiyoloji

Dünya genelinde bir kişinin hayatı boyunca bir nöbet geçirme olasılığı %10 olup tek bir nöbet geçiren bireylerin çoğunda epilepsi gelişmemektedir. 2020 verilerine göre epilepsi insidansı yılda 100.000 kişide %50,4 ila %80,7' dır. Düşük gelirli ülkelerde bu insidans önemli ölçüde artış gösterebilmektedir. Bunun sebepleri arasında yetersiz bakım, enfeksiyon hastalıklarının daha yaygın görülmesi, anti epileptik ilaçlara erişimin kısıtlı olması, kafa travması geçirme oranlarındaki artış, çeşitli parazitlere maruz kalma ve genetik farklılıklar gösterilebilir. Fakat literatürde buradaki en önemli etkenin anti epileptik ilaçlara ulaşımındaki yetersizlik olduğu belirtilmiştir [34, 35, 36].

Epilepsi görülme sıklığı tüm yaş gruplarında aynı değildir ve ayrıca cinsiyetle arasında kaydadeğer bir farklılık yoktur. 5-9 yaş grubu çocuklar ve 80 yaş ve üzeri yaşlılar epilepsinin en sık görüldüğü yaş gruplarıdır [34].

Beyin tümörlerinin tedavi edilmesi, felç tedavisi, intrakraniyal enfeksiyonlardan ve ciddi kafa travmalarında kurtulma gibi hastalıklara/durumlara karşı geliştirilen tedavilerin artmasıyla yaşam süresinin uzatılması nedeniyle epilepsi prevalansının artış gösterebileceği öngörülmektedir [34].

2.4. Epilepsi Etiyolojisi ve Patofizyolojisi

Epileptik nöbetler altta yattığı varsayılan nedenlere göre idiyopatik ve genetik olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Genetik kaynaklı epilepsi genetik

yatkınlıktan dolayı meydana gelirken idyopatik (edinilmiş) epilepsiler bilinen ya da akut bir lezyonun epileptik bir nöbete yol açacak bir dizi moleküler, hücresel ve fizyolojik mekanizmayı ateşlemesiyle meydana gelmektedir [37].

Edinilmiş epilepsilerin meydana gelmesinde travmatik beyin hasarı [38], beyin tümörleri [39] , nörodejeneratif hastalıklar, intraserebral kanama ve status epileptikus görece olarak yüksek risk oluşturan durumlardır [40, 41].

Epileptik nöbetlerin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Şu ana kadar aydınlatılabilmemiş olan mekanizmalar göz önüne alındığında nöbetler temelde eksitator bir nörotransmitter olan glutamat ve inhibitör bir nörotransmitter olan γ -aminobütirik asit (GABA) arasında meydana gelen dengesizliklerin sonucunda oluşmaktadır [42]. Bu dengesizliğe;

- İyon kanallarında iyon geçişini arttıracak ve azaltacak yönde meydana gelen fonksiyon bozuklukları [42],
- Nöron kaybı ve sinaptik yeniden organizasyon gibi anormal nörojenез ve kan beyin bariyeri disfonksiyonu gibi durumlara yol açan travmatik beyin hasarı gibi postnatal beyin hasarları,
- Yapısal beyin patolojisi,
- Nöroinflamasyon, stres ve hormonlardan kaynaklı hücre sinyal yollarında meydana gelen bozulmalar,
- Son yıllarda yapılan çalışmalarla gut mikrobiyotası [43]

gibi durumlar neden olmaktadır [44].

2.5. Epilepsi Tedavisi

Epilepsi tedavi edilmediği takdirde hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren bir hastalıktır. Hastalar nöbet geçirme korkusu nedeniyle günlük yaşantılarına devam edemez, sosyal yaşamdan kopuk duruma gelebilmektedirler. Bu da beraberinde depresyon ve anksiyete gibi yeni sorunlara yol açabilmektedir.

Epilepsi hastaları yaşamları boyunca bir veya birkaç defa nöbet geçirebildiği gibi yaşamı boyunca hiç nöbet geçirmeyen hastalarda olabilmektedir. Nöbet geçirmeyen hastaların olması tanı konmayan kişilerin varlığını da beraberinde getirmektedir. Bu durum epilepsi hastası sayısının kayıtlı sayıdan daha fazla olduğunu düşündürmektedir [45].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) doğru teşhis ve tedavi uygulandığı sürece hastaların %70' inin hayatları boyunca hiç nöbet geçirmeden yaşayabileceğini öngörmektedir. Bu öngörü göz önüne alındığında teşhis ve tedavinin epilepsi hastalarının yaşam kalitesini arttırmada ne kadar etkili olabileceği görülmektedir.

Epilepsi teşhisinin konmasının ardından hekim tarafından hastaya uygun tedavi yöntemi seçilmektedir. Cerrahi müdahale [46], anti epileptik ilaçlar (AED) [47], gen terapisi [48], immünoterapi [49], nörostimülasyon (RNS Sistemi) [50], çeşitli diyetler (ketojenik diyet [51], Adkins Diyeti ve düşük glisemik indeksli diyet [52]), vagus sinir uyarımı (VNS) [53] ve derin beyin uyarımı [54] epilepsi tedavisinde en sık kullanılan yöntemlerdir. Bunların dışında literatürde bilinçli farkındalık uygulamalarının da özellikle ilaca karşı direnç gösteren epilepsi hastaları üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösteren klinik çalışmalara rastlanmıştır [55, 56].

2.5.1. Epilepside İlaç Tedavisi

Epilepsi nöbetlerinin önlenmesinde en çok ilaç tedavisi tercih edilmektedir. Anti epileptik ilaçlar (AED) epilepsiyi tedavi etmekten ziyade epileptik nöbetlerin önlenmesinden sorumludur. Bu nedenle bu ilaçlar antikonvülsanlar olarak bilinirler. AEDler tarihsel gelişimine göre 3 nesil olarak gruplandırılmaktadır. Birinci nesil ilaçlar 1857 ve 1958 yılları arasında, ikinci nesil ilaçlar 1960 ve 1975 yılları arasında ve üçüncü nesil ilaçlar da 1980lerden günümüze kadar piyasaya sürülmüş olan ilaçlardır [57].

Bir ilacın antiepileptik aktivite gösterebilmesi için iyon kanalları, nörotransmitter taşıyıcıları ve nörotransmitter metabolik enzimler gibi hedeflerden bir ve/veya birkaçına etki etmesi gerekmektedir. Bu bağlamda AED'ler etki mekanizmalarına göre voltaj kapılı iyon kanallarının blokajı (Sodyum, kalsiyum kanalları), GABA aracılı mekanizmaları destekleyerek sinaptik inhibisyonun artırılması ve glutamat aracılı olayların azaltılarak sinaptik uyarıların inhibisyonu olmak üzere 3 ana hedefi vardır [58, 59].

1. NESİL AED'LER [60]	2. NESİL AED'LER [61, 62]	3. NESİL AED'LER [63, 64]
<p>Carbamazepine – Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Ethosuximide – Voltaj kapılı T tipi Ca²⁺ iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Phenobarbital – Postsinaptik GABA_A clorid akımının artması yoluyla GABA' nın inhibe edici etkisini artırır.</p> <p>Phenytoin - Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Primidone – Phenobarbital ile türdeşdir. Aynı etki mekanizmasına sahip.</p> <p>Valproate – Beyindeki GABAerjik etkiyi artırır.</p>	<p>Felbamate – GABA_A reseptörlerinin aktivitesini artırır.</p> <p>Gabapentin – Voltaj kapılı Ca⁺⁺ kanallarının α₂-δ-1 ve α₂-δ-2 alt birimlerine etki ederek kanalı bloke eder.</p> <p>Lamotrigine – Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Levetiracetam – Antepileptik mekanizması tam olarak bilinmemektedir. SV2A sinaptik vezikül proteinine bağlanarak presinaptik Ca⁺⁺ kanallarını inhibe eder.</p> <p>Oxcarbazepine – Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Pregabalin – Voltaj kapılı Ca⁺⁺ kanallarının α₂-δ alt birimine etki ederek kanalı bloke eder.</p> <p>Topiramate – Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder, GABA etkinliğini artırır, AMPA reseptörlerinin antagonisti olarak çalışır ve karbonik asit enzimini inhibe eder.</p> <p>Zonisamide – Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder ve voltaj kapılı T tipi Ca²⁺ iyon kanallarının etkinliğini azaltır.</p>	<p>Brivaracetam – SV2A ligandır ve voltaja bağlı Na⁺ iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Carabersat – İyon kanalları, GABA ve glutamat üzerinde herhangi bir etkisi olmayıp henüz belirlenmemiş olan kendine özgü bağlanma bölgesi ile etkileşime girer.</p> <p>DP-Valproic Acid – Valproik asitin fosfatidilkolin estrik konjugatıdır. Fosfolipaz A2 enzimini inhibe eder.</p> <p>Eslicarbazepine acetate – Voltaj kapılı Na⁺ iyon kanallarını bloke eden (S)ligarbazepini oluşturur.</p> <p>Fluorofelbamate – Felbamate türevidir. GABA aktivitesini arttırmaz. NMDA ve kainat reseptörlerine verilen yanıtı azaltır ve voltaj kapılı sodium iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Fosphenytoin – Bir fenitoin öncülüdür. Etki mekanizması fenitoininkine benzer.</p> <p>Ganaxolone – GABA_A reseptör izoformlarını active ederek GABA etkinliğini artırır.</p> <p>Lacosamide – NMDA reseptörlerini allosteric olarak bloke eder.</p> <p>Losigamone – GABA yokluğunda Cl⁻ alımını artırarak GABA' nın etkinliğini güçlendirir, NMDA' nın neden olduğu depolarizasyonu</p>

		<p>baskılar, glutamate ve aspartate salımını azaltır.</p> <p>Pregabalin – Voltaj kapılı Ca^{2+} iyon kanallarını bloke eder.</p> <p>Retigabine – KCNQ (Kav7) tipi potasyum kanallarındaki M tipi potasyum akışını artırır, Na^+ ve Ca^{++} kanallarına zayıf bir blokaj uygular ve GABA sentezini uyarır.</p> <p>Rufinamide – Voltaja bağlı Na^+ kanallarının inaktivasyonunu uzatır.</p> <p>Seletracetam – SV2A proteinine karşı yüksek afiniteye sahip bir levetiracetam analogudur. Yüksek voltajla aktive olan kalsiyum akımlarını azaltır.</p> <p>Talampanel – AMPA reseptör kanal kompleksindeki allosterik bir bölgeye bağlanarak AMPA reseptörlerini stereospesifik olarak ve rekabetçi olmayan bir şekilde bloke eder.</p>
--	--	---

Tablo-1: AED'lerin Sınıflandırılması

2.6. Fenitoin

Fenitoin (PHT) aromatik halkaya sahip bir bileşiktir ve ilk defa 1908 yılında sentezlenmiş ve 1930 ların sonlarına doğru klinik uygulamalarına başlanmıştır. Fokal ve jeneralize tonik-klonik nöbetlerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. 2020 yılı WHO verilerine göre 50 milyon epilepsi hastasının %18' i fenitoin tedavisi görmektedir. En çok kullanılan fenitoin markası Dilantin' dir.

Fenitoin özellikle alümin olmak üzere %90 oranında proteine bağlı halde bulunmaktadır. Farmakolojik olarak aktif hali ise serbest formudur. Bu nedenle proteine bağlanma durumunu değiştirecek ilaçlar ve etken maddelerle kullanılması durumunda plazma fenitoin seviyesi etkilenecek farmakolojik olarak toksik etki yaratabilir [65]. Genellikle

plazmadaki kabul edilebilir bağı veya serbest fenitoin miktarının toplamı literatürde 10 ila 20 mg/L arasındadır [66]. Yarılanma ömrü ise ortamala 22 saattir [67].

Fenitoinin ana mekanizması spesifik olmayan voltaj kapılı sodyum kanallarını bloke etmektir [68]. Neredeyse tüm voltaj kapılı sodyum kanalları alt tiplerini hedef almaktadır. Yüksek frekanslı aksiyon potansiyellerinin nöronal yayılması ile sonuçlanan döngüleri hedef alarak inhibe eder ve nöbet oluşumunu önler [69, 70].

2.7. Nanopartiküller

Nanopartiküller 10 ila 1000 nm aralığında boyutlara sahip katı patiküller ya da partikül dispersiyonları olarak tanımlanan ve son yıllarda kullanım alanı çok genişlemiş olan yapılardır. Başlıca kullanım alanları görüntüleme, tedavi, ilaç ve DNA/RNA gibi moleküler yapıları taşımada taşıyıcı sistem olarak sıralanabilir. Geleneksel küçük molekülü görüntüleme ajanları ve ilaçların aksine nanopartiküler sistemler birden fazla türe kolayca entegre olabilmeleri ve hem teşhis hem de tedavi gibi çok fonksiyonlu etkiler gösterebilmeleri açısından daha avantajlıdır [73, 74].

Çok çeşitli nanopartiküler sistemler bulunmaktadır. Bu sistemleri altın nanopartiküller [73], gümüş nanopartiküller [74], polimerik nanopartiküller [75], liposomlar [76], protein nanopartiküller [77], dendrimerler [78], katı lipid nanopartiküller [79], kuantum dotlar [80] ve demir oksit nanopartiküller [81] olmak üzere dokuz ana başlık altında toplayabiliriz. Bu tez çalışmasında ilaç taşıyıcı sistem olarak stearik asit yapılı katyonik katı lipid nanopartiküller kullanılmıştır.

2.7.1. Katı Lipid Nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller (SLNP) 1991 yılında biyoyumluluk sağladığı, yükleme kapasiteleri ve ilacın bozunurluğunu önleme amaçlarıyla ortaya çıkmıştır. SLNP'ler biyoyumlu ve biyobozunur bileşenlerden oluştuğu için hem lipofilik hem de hidrofilik biyoaktifleri içerebilmektedir. Bu sayede de kontrollü salıma ve hedefe yönelik taşınmaya imkan vermektedirler. Tek katmanlı bir fosfolipid çekirdeğe sahiplerdir ve yüklenen ilaç genelde ya çekirdek içerisine dağılmış ya da çekirdek içerisinde çözülmüş olarak bulunur.

SLNP' ler diğer geleneksel kolloidal taşıyıcı sistemlere göre daha düşük toksisiteye ve geniş yüzey alanlarına sahip olmaları, lipid yapıda olan hücre zarı içerisine kolay alınması, uzun süreli ilaç salımına imkan tanınması, ilaçların çözünürlüğü ile

biyoayarılanımının iyileştirilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca nano boyut skalalarından dolayı retikulo endotelial sistem (RES) hücreleri tarafından alınmadıklarından dolayı dalak ve karaciğer filtrasyonunun bypass edilmesini sağlarlar ve lipozomlara göre daha stabil yapılardır. Tüm bu avantajlarının yanında öngörülemeyen bir jelleşme eğilimleri olması, nispeten yüksek su oranlı dispersiyonlar olması (%70-%99,9) ve beklenmedik polimerik geçiş dinamikleri oluşturabilmeleri gibi bir takım dezavantajları da bulunmaktadır [79, 82, 83].

SLN' ler birçok farklı yöntem ile hazırlanabilmektedir. Tablo 2' de bu yöntemler verilmiştir. Bu tez çalışmasında solvent enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır.

1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon
a. Sıcak Homojenizasyon
b. Soğuk Homojenizasyon
2. Ultrasonikasyon
a. Prob Ultrasonikasyonu
b. Banyo Ultrasonikasyonu
3. Solvent Evaporasyon Yöntemi
4. Solvent Emülsifikasyon – Difüzyon Yöntemi
5. Süperkritik Akış Yöntemi
6. Mikroemülsiyon Temelli Yöntem
7. Çift Emülsiyon Yöntemi
8. Presipitasyon Tekniği
9. Film – Ultrasound Dispersiyonu
10. Solvent Enjeksiyon Yöntemi
11. Membran Kontraktör Kullanımı

Tablo-2: SLNP' lerin Üretim Yöntemleri

2.8. Nanopartiküllerin İlaç Taşımada Kullanımı

Geleneksel ilaçlara göre nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin; ilaçların suda çözünürlüğünü arttırarak iyileştirilmiş biyoayarılanım sağlamaları, klirens için yarı ömrü arttırarak ve/veya aynı kökenli reseptörler için özgüllüğü arttırarak ilacın vücuttaki direnç

sürelerini arttırmak ve ilacın etki edeceği bölgeye hedeflenmesini sağlayarak olamak üzere bazı temel avantajları mevcuttur. Bu avantajlar sayesinde ilaçların sistemik toksisitesi azalmakta ve kan beyin bariyeri, hücre zarı gibi çeşitli bariyerleri aşmada bir çözüm aracı olarak kullanımları artmaktadır [84].

Aşağıda nanopartiküllerin kullanımlarıyla ilgili boyut ve şekillerinin etkilerini inceleyen iki literatür çalışması ayrıntılı olarak ele alınarak bir literatür özeti haline getirilmiştir.

Betzer ve ark. yaptığı çalışmada nanopartikül boyutunun nanopartikülün kan beyin bariyerinden (KBB) geçişi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada 20, 50, 70 ve 100 nm boyutlarında insülin ile kaplanmış altın nanopartiküller (INS-GNP) sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen INS-GNP' ler Balb/C farelerine kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Daha sonra KBB' yi geçen ve farklı organlara giden INS-GNP miktarı ölçülmüş ve in vivo mikro CT ile gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, zaman içerisindeki en yaygın biyolojik dağılımı 20 nm boyutundaki partiküllerin sağladığı görülmüş ve ilaç taşıma sistemi olarak 20 nm boyutundaki partiküllerin uygun olacağı ileri sürülmüştür [85].

Moore ve ark. yaptığı çalışma in vitro da hücrelere nanopartikülün verilme şeklinin nanopartiküllerin hücresel etkileşimlerini etkilediğini göstermiştir. Bu çalışmada polivinilprolidon (PVP) ile kaplanmış 116 nm altın nanopartiküller (AuNP) hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller konsantre olarak, ön karıştırma yapılmış olarak ve tamamen DMEM besi yeri ile karıştırılmış olarak hücrelerle etkileştirilmiş. 30dk, 1 sa ve 24 sa sonra nanopartiküllerin hücrelere penetransı gözlemlenmiş ve konsantre şekilde verilen nanopartiküllerin daha yüksek oranda penetra olduklarına dair veriler elde edilmiştir. Fakat in vivo da daha karmaşık biyolojik etkileşimler olduğu için aynı etkinin gösterilip gösterilmeyeceği bilinmemektedir [86].

2.9. Nanopartiküllerin Epilepsi Tedavisinde Kullanımı

Epilepsi tedavisinde AED' ler için taşıyıcı sistem olarak elektroresponsive hidrojel nanopartiküller [87], poli (ϵ -kaprolaktan) [88], protein nanokafes [89], demiroksit nanopartikül [90] ve katı lipit nanopartiküller [91] gibi çeşitli yapılar kullanımına dair literatür çalışmalarına rastlanmıştır.

Aşağıda nanopartiküllerin epilepsi tedavisinde kullanımlarıyla ilgili iki literatür çalışması ayrıntılı olarak ele alınarak bir literatür özeti haline getirilmiştir.

Oliveria ve ark. da püskürtmeli kurutma yöntemini kullanarak poli(ϵ -kaprolaktan) taşıyıcı sistemler üretmiş ve PHT taşımada kullanmışlardır. Bu çalışmada kitosan kaplamanın yeniden dağılıbilirlik, gastrointestinal stabilite ve nanopartiküllerden ilaç salımı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Aseton içerisinde çözölen poli(ϵ -kaprolaktan), üzüm çekirdeği yağı, sorbitan monostearat ve PHT ile lipid bir çekirdeğe sahip nanokapsöller üretilmiştir. Bu sistemlerin bir kısmı pozitif bir yüzey oluşturabilmek için kitosan ile kaplanmış ve bu iki nanopartiköl sistemi karşılaştırılmıştır. Kitosan kaplı nanopartiköllerin suda daha iyi dağılım gösterdeği görölmüştür. Ayrıca *in vivo* ilaç salım profilleri incelendeğinde çıplak PHT' ye kıyasla enkapsüle edilmiş PHT' nin daha uzun süreli bi salıma sahip olduğu görölmüştür (8 saate 48 saat). Ayrıca enkapsüle PHT verilmiş yetişkin C57BL/6 farelerinde pilokarpin kaynaklı nöbetlerde iyileştirici etki göstermiştir. Bu durum çocuk ve yetişkin hastalarda antikonvülsan tedavisi için umut verici olarak değerlendirilmiştir [92].

Abdelbary ve Fahmy diazepamın (DZ) katı lipid nanopartiköllere (SLNP) dahil edilmesinin uygulanabilirliğini araştırmışlardır. SLNP olarak Compritol® ATO 888 veya Imwitor® 900K, aktif madde olarak ise Polox-amer 188 veya Tween 80 kullanılmıştır. SLNP' ler kütlece %5 ilaç olacak şekilde ilaç yüklenmiş ve DZ yüklü SLNP dispersiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen ilaç yüklü nanopartiköller karakterize edilmiştir. Geçirimli elektron mikroskopu ile morfolojisi, mastersizer kullanılarak parçacık boyutu, X-ışını kristalografisi (XRD) ile parçacıkların kırınım modelleri, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile partiköllerin kristalinitesi belirlenmiştir. SLNP' lerin enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Bunun için başlangıç ilaç miktarından enkapsülasyon sonrası serbest olan ilaç miktarının farkı başlangıçtaki toplam ilaç miktarına oranlanmıştır. Ayrıca *in-vitro* ilaç salım profilleri belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca diazepam yüklü katı lipid nanopartiköl (DZ-SLNP) bazlı süspansiyonları hazırlanmıştır. Bunu için *in-vitro* salım profillerine göre optimum düzeyde olan DZ-SLNP formülasyonları iki farklı fitil bazına (Witepsol W35 ve Witepsol S58) dahil edilmek üzere seçilmiş ve DZ yüklü SLNp fitilleri hazırlanmıştır. DZ' nin direkt olarak yüklendeği fitil bazları da yanı şekilde hazırlanmış ve bu iki grubun *in-vitro* salım profilleri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

Tüm bu analizler sonucunda elde edilen verilere göre DZ' nin başarılı bir şekilde SLNP içerisine dahil edilebildiği görölmüştür. *In-vitro* salım testlerinin beklendeği gibi ilaç salım süresinin uzadığını doğrular yönde olduğu yorumlanmıştır. Sürfektan olarak Tween

80' nin kullanıldığı ve daha düşük konsantrasyonda lipit matrisi içeren SLNP formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri ve in-vitro ilaç salım profilleri daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu çalışma ile DZ-SLNP' lerin rektal yoldan uygulanabileceği bir araç sağlamıştır. Bu uygulama şeklinin birçok epileptik vakada en uygun yol olduğu düşünülmekte ve DZ-SLNP bazlı fitillerin sağladığı uzatılmış ilaç salım profili umut verici olarak görülmektedir. Bu bulguların klinik öneminin anlaşılması adına in-vivo çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir [93].

2.10. Kainik Asit

C₁₀H₁₅NO₄ kimyasal formülüne sahip kainik asit (KA) 1950' li yılların başında tropikal ve subtropikal sulardaki kırmızı alglerden (*Digenea simplex*) izole edilmiştir. İlk olarak bir parazitik solucan olan *Ascaris lumbricoides*' den kaynaklanan askariazi hastalığının tedavisinde kullanılmıştır [94, 95]. Daha sonra yapılan bir çalışma sonucunda sıçanlardaki kortikal nöronlarda uzun süreli depolarizasyonları indüklediği bulunmuş ve bir nörotoksin olarak kullanılmaya başlanmıştır [96].

KA nöroeksitotoksik ve epileptojenik etkilerini kainat reseptörlerine bağlanıp bir dizi hücrel reaksiyonu başlatarak oluşturur. İyonotropik glutamat reseptörleri için spesifik bir agonist olarak yaygın olarak kullanılırlar.

2.11. In vitro Epilepsi Modeli

Literatür incelendiğinde *in vitro* epilepsi modelinin hücre [97] veya organ kesitleri [98] olmak üzere iki ana sistem üzerinden gerçekleştirildiği görülmüştür.

Organ kesitleri ile oluşturulan modellerin bir kısmında pilokarpin [99], 4-aminopridin [100] gibi nöbet oluşturan kimyasallarla hayvanların in vivo olarak indüklenmesi ile gerçekleştirilir. İndüksiyon sonrası sakrifiye edilen hayvanların tüm beyinleri çıkarılır. Çıkarılan beyinlerin C1 ve C3 bölgelerinden alınan kesitlerin kültüre edilip kesitler üzerinde bir dizi çalışma yapılarak epileptik aktiviteler incelenir. Diğer bir kısmında ise model direkt sağlıklı hayvanlardan alınan beyin kesitlerinin *in vitro* doku kültüründe GABA_A reseptör antagonistleri, glutamerjik agonistler ve K⁺ kanal blokerları kullanılarak nöbet aktivitesinin indüklenmesi ile oluşturulabilir [101].

Hücre kültürleri ile oluşturulan modellerde ise hücre hatları, primer hücre kültürleri ve nöronal kök hücreler kullanılabilir. Bu çalışmalarda epileptogenezi uyarmak için pentylenetetrazole (PTZ) ve KA gibi nörotoksinlerin kullanıldığı çalışmalar literatürde

mevcuttur [97, 102]. Bunun dışında indüklenmiş pluripotent nöronal kök hücrelerde ve organoidlerde CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemi kullanılarak SCNA1 gibi epilepsi ile bağlantılı gen/ genlerin bu hücrelere/organoidlere aktarılmasıyla *in vitro* epilepsi modelleri oluşturulabilmektedir [103].

2.13. T98G Glioblastoma Hücre Hattı

T98G hücre hattı (ATCC® CRL-1690™) glioblastoma multiform hücre hattıdır. Verdugo ve ark. yaptığı çalışmada epilepsi nöbetlerinin nöral ve glial aktiviteleri zebra balığı modelinde incelenmiş ve nöbetlerin preiktal dönemde glialarda başladığı ve glialar arasında hızlı bir senkronizasyon ile yayıldığı bulunmuştur. Glial ağların aktivasyonunun, glutamat ve boşluk bağlantılarının eylemi yoluyla nöral aktivitede güçlü bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Preiktal durumdan genelleştirilmiş bir nöbete geçişin gliya-nöron etkileşimlerinde güçlü bir değişiklik ve hücre dışı glutamatta büyük bir artışla birlikte nöral aktivitede ve bağlantıda ani bir artışa yol açtığı görülmüştür. Bu çalışmaya göre nöbetlerin nöronal hücrelere geçmeden önceki glial yolakta sönümlendirilmesinin klinikteki nöbet etkilerini önleyebileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle nöbetleri önlemede kullanılan antikonvülsanların glia hücrelerindeki etkisinin incelenmesi adına *in vitro* modelin oluşturulması ve hücre kültürü deneylerinin yapılması için bu tez çalışmasında T98G hücre hattının kullanılmasına karar verilmiştir [2].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Stearik Asit Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Stearik asit (SA), kloroform, polivinil alkol (PVA), Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. SA kullanılana kadar 4°C’ de, diğer kimyasallar ise 25°C’ de karanlık depoda muhafaza edildi.

3.1.2. Stearik Asit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

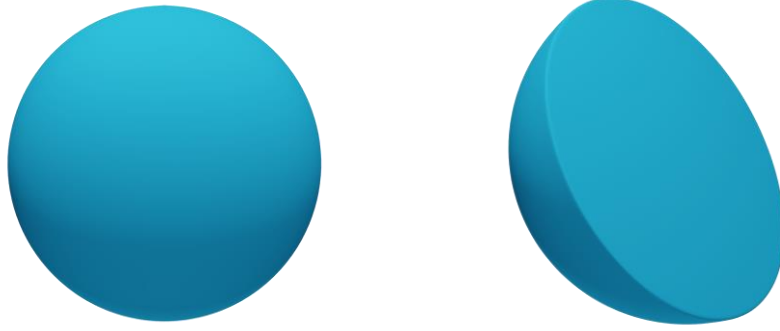
Bu çalışmada ilaç taşıyıcı sistem olarak stearik asit katı lipid nanopartiküller kullanıldı. Nanopartiküller çözücü difüzyon yöntemi ile ve su içerisinde stearik asit temelli lipid fazın tekli emüsyonu şeklinde hazırlandı.

50 mL %0.4 PVA içeren sürfektant faz hazırlandı. Sürfektant faz için çözücü olarak distile su (dH₂O) kullanıldı. PVA’ nın tamamen homojen olarak dağılması için çözelti en az 6 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Hazırlanan sürfektant faz 1 gece (yaklaşık 18 saat) +4°C’ de bekletildi. Sürfektant fazın sıcaklığı nanopartikül boyutunu etkilemektedir.

Nanopartikül sentezinin gerçekleştirileceği gün %0.4 SA içeren lipid faz hazırlanır. Lipit faz için çözücü olarak kloroform kullanıldı. Lipit faz stearik asitin tamamen homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla yaklaşık 1 dk vortekslendi. Her iki fazın da hazırlanmasıyla nanopartikül sentezine geçildi ve bu aşamada öncelikle sürfektant faz T 25 dijital Ultra Turrax® (IKA) altına alınmış ve karıştırma hızı kademeli olarak artırılarak 20000 rpm hızda sabitlenecek şekilde karıştırılmaya/homojenize edilmeye başlandı. Hız 20000 rpm’ e gelince sürfektant faz içerisine lipid faz kontrollü şekilde enjekte edildi. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Enjeksiyon tamamlanınca nanopartikül çözeltisi 1 dk daha 20000 rpm hızda karıştırılmış ve nanopartikül sentezi tamamlandı.

Nanopartikül çözeltisi RET basic (IKA) manyetik karıştırıcı üzerine alınarak 1000 rpm hızda kloroformun ortamdan uzaklaşması için 4 saat karıştırıldı. Daha sonra çözelti 50 mL falkona alınarak 5000 rpm hızda 15 dk 320R soğutmalı masa üstü santrifüj (Hettic Universal) kullanılarak santrifüj edildi. Böylece büyük boyutlu partiküllerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernetant pipet yardımıyla dikkatlice yeni bir falkona aktarıldı ve pellet atıldı. Süpernetant bu defa 11000 rpm hızda 1 saat santrifüj edildi ve

böylece küçük boyutlu partiküllerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonunda süpernetant ortamdan uzaklaştırılarak pellet üzerine 3 mL dH₂O eklenmiş ve pellet homojenize edildi. Homojenize olan stearik asit katı lipid nanopartikül (SA-SLNP) çözeltisi 0.45 µm selüloz nitril membrana sahip Minisart® Syringe Filter (Sartorius) steril enjektör filtresinden geçirilerek 15 mL' lik yeni falkonlara aktarıldı. Böylece SA-SLNP' lerin sentez aşaması tamamlandı.



Şekil-3: SA-SLNP bütün ve kesit görüntüsü

3.1.2.1. Stearik Asit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen SA-SLNP' lerin karakterizasyonu için zeta sizer ile boyut ve yük analizleri gerçekleştirilmiştir. Morfolojik karakterizasyonu ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile HÜNİTEK' ten hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.1.1. Stearik Asit Nanopartiküllerin Boyut ve Yük Ölçümleri

Sentezlenen SA-SLNP sulu çözeltisinden 100 µL alınarak 1 mL su içerisinde homojen olarak dağıtılmış ve zetasizer cihazı kullanılarak boyut ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirildi. Yöntemin optimasyonu için toplamda 3 adet farklı formülasyon denenmiş ve boyut/yük karakterizasyonu yapıldı. Bu formülasyonlara ait veriler Tablo-3' te verildi. Optimize edilen yöntem için 6 tekrar gerçekleştirildi. Optimize formüle ait SA-SLNP boyut/ yük analizi verileri Tablo-3' te verilmiştir.

SA-SLNP' lerin verim hesabını gerçekleştirmek üzere bu 6 örneğin her birinden 0,5 µL alınarak 80°C' de 24 saat bekletilmiş ve 24 saat liyofilize edilmiştir. Aşağıdaki formül kullanılarak SA-SLNP' ler için verim hesabı gerçekleştirilmiştir. Bu hesaplama göre SA-SLNP sentezindeki verim %25±5.48 olarak bulunmuştur.

3.2. Fenitoin Enkapsülasyonu ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

3.2.1. Kimyasal Malzemeler

Stearik asit (SA), kloroform, polivinil alkol (PVA), aseton, fenitoin (PHT) ve Phosphate Buffer Saline (PBS) Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edildi. SA kullanılabildiği kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir. Diğer kimyasallar ise 25°C’ de karanlık depoda muhafaza edildi.

3.2.2. Fenitoin Enkapsülasyonu

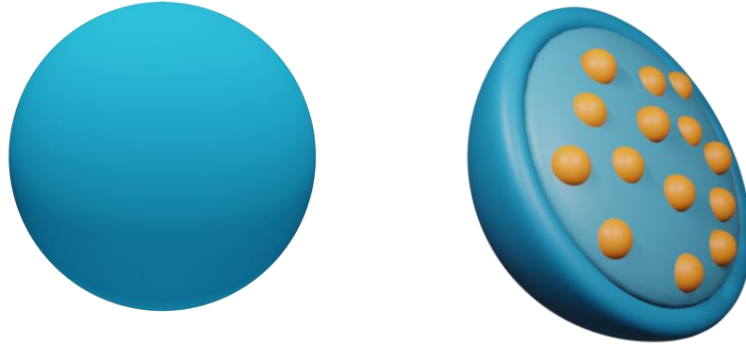
Bu çalışmada antikonvülsan olarak fenitoin kullanıldı. Stearik asit nanopartiküller hazırlanırken lipid faza ilaç/ aseton çözeltisinin belirlenen dozlarda karıştırılarak sürfektan faz içerisine enjeksiyonu ile enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir.

50 mL %0.4 PVA içeren sürfektant faz hazırlandı. Sürfektant faz için çözücü olarak dH₂O kullanıldı. PVA’ nın tamamen homojen olarak dağılması için çözeltiler en az 6 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Hazırlanan sürfektant faz 1 gece (yaklaşık 18 saat) +4°C’ de bekletildi. Tablo.4’ te verilen SA/PHT oranları doğrultusunda SA-kloroform ve PHT-aseton çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler tamamen homojenize olana kadar alüminyum folyo ile sarılmış tüplerde manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Tamamen homojenize olan çözeltiler tek tüp içerisinde birleştirildi ve yaklaşık 1 dk vortekslenerek tamamen homojenize olması sağlandı.

Tüm fazların hazırlanmasıyla enkapsülasyon aşamasına geçildi. Bu aşamada öncelikle sürfektant faz ultratorrax altına alınmış ve karıştırma hızı kademeli olarak artırılarak 20000 rpm hızda sabitlenecek şekilde karıştırılmaya/homojenize edilmeye başlandı. Hız 20000 rpm’ e gelince sürfektant faz içerisine SA/PHT içeren faz kontrollü şekilde enjekte edildi. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Enjeksiyon tamamlanınca nanopartikül çözeltisi 1 dk daha 20000 rpm hızda karıştırıldı ve PHT içeren nanopartikül sentezi tamamlandı.

PHT yüklü katı lipid nanopartikül (PHT-SA-SLNP) çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerine alınarak 1000 rpm hızda kloroform ve asetonun ortamdan uzaklaşması için 4 saat karıştırıldı. 4 saatin tamamlanmasının ardından çözelti 50 mL falkona alınarak 5000 rpm hızda 15 dk santrifüj edildi. Böylece büyük boyutlu partiküllerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernetant pipet yardımıyla dikkatlice yeni bir falkona aktarıldı. Süpernetant bu defa 11000 rpm hızda 1 saat santrifüj edilmiş ve böylece küçük boyutlu

partiküllerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonunda süpernetant ortamdan uzaklaştırılarak pellet üzerine 3 mL dH₂O eklendi ve pellet homojenize edildi. Homojenize olan PHT-SA-SLNP çözeltisi 0.45 µm selüloz nitril memrana sahip steril enjektör filtresinden geçirilerek 15 mL' lik yeni falkonlara aktarıldı. Böylece PHT-SA-SLNP' lerin sentez aşaması tamamlandı.



Şekil-4: PHT-SA- SLNP bütün ve kesit görüntüsü

3.2.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme oranının belirlenmesi için standart PHT yüklü nanopartikül sentezi 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve 4 saat manyetik karıştırıcıda döndürüldü. Daha sonra ilaç yüklü nanopartikül solüsyonları 50 mL' lik falkonlara aktararak 11000 rpm' de santrifüj edildi ve süpernetant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 3 mL dH₂O eklenerek tamamen homojenize olana kadar pipetaj yapıldı. Her bir falkondan 3 tekrarlı olacak şekilde 1' er mL örnek alınarak ependorflara kondu.

Yapılan ölçümler sonucu elde edilen veriler ile aşağıdaki eşitlikler kullanılarak enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve ilaç yükleme oranı (%DL) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar SONUÇLAR VE TARTIŞMA bölümünde değerlendirildi.

$$\%EE = \frac{\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100$$

$$\%DL = \frac{\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç yüklü nanopatikül kütlesi}} \times 100$$

3.2.3. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen PHT-SA-SLNP sulu çözeltisinden 100 µL alınarak 1 mL su içerisinde homojen olarak dağıtılmış ve zetasizer cihazı kullanılarak boyut ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirildi. Yöntemin optimasyonu için toplamda 4 adet farklı formülasyon (SA/PHT = 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4) denenmiş ve boyut/yük karakterizasyonu yapıldı. Optimize edilen yöntem için 3 tekrar gerçekleştirildi. Optimize formüle ait 3 tekrarlı PHT-SA-SLNP boyut/ yük analizi verileri Tablo 4.' te verildi.

3.2.4. *In vitro* İlaç Salım Analizi

Bu çalışmada başlık 3.2. de açıklanan şekilde hazırlanmış olan fenitoin yüklü katı lipid nanopartiküllerin *in vitro* ilaç salım profilleri belirlenecek ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda veriler grafiklere dönüştürülerek ilaç salım modeli oluşturulacaktır. Bu amaçla gerçekleştirilen deneyler aşağıda açıklandı.

12000-14000 Da kesimli diyaliz membranı bir paket olarak kullanıldı. Membranlar yaklaşık 40 cm uzunluğunda kesilerek 100°C ultra saf su içerisinde atıldı ve membranların açılması için 5 dk beklendi. 5 dk sonra diyaliz membranının bir ucu sıkıca bağlandı ve açık ucundan 2mL ilaç yüklü nanopartikül solüsyonu yüklendi. Daha sonra açık ucu da sıkıca bağlanarak içerisinde 20 mL steril PBS bulunan 50 mL' lik falkonlara tamamen sıvı içerisinde kalacak şekilde yerleştirildi. 37°C sabit sıcaklıkta inkübe edildi. Bu deney her bir ilaç yüklü nanopartikül dilüsyonu için (9:1, 8:2, 7:3, 6:4) 3 tekrarlı olarak yapıldı. Her bir falkondan 30 dk, 1., 2., 24., 48. ve 72. saatlerde PBS içerisinde örnek alındı ve koşulları eşit tutmak adına sistemden alınan kadar taze ortam sisteme geri eklendi.

PHT salınım miktarları HPLC cihazı (Agilent®) kullanılarak ölçülmüştür. PHT miktar tayini pik yüksekliklerine göre, kalibrasyon grafiği oluşturularak belirlenmiştir. Kromatografik analizler, C18 kolonu (250mm × 4.6 mm x 5 µm) kullanılarak, Su / asetonitril mobil fazları ile 1 mL/dak. akış hızı ile, izokratik akış (50:50) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DAD dedektör kullanılarak, 210 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır.

3.3. MTT Yöntemi Kullanılarak Sitotoksitenin Belirlenmesi

3.3.1. Kimyasal Malzemeler

DMEM High Glucose Sartorius (Kibbutz Beit-Haemek, Israel) firmasından, MTT tuzu, Penicilin-Streptomycin, izopropanol, HCl ve KA Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından, FBS Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel) temin edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan malzemeler kullanılana kadar 4°C’de muhafaza edildi. Diğer kimyasallar ise 25°C’de karanlık depoda muhafaza edilmiştir.

3.3.2. SA-SLNP Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan SA-SLNP’lerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek üzere 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) yöntemi kullanıldı. Bu deneyler için insan glioblastoma hücreleri olan T98G hücre hattı kullanıldı. Ayrıca besi yeri olarak %10 FBS, %1 penisilin içeren DMEM-High Glucose kullanıldı.

2000 hücre/ kuyucuk konsantrasyonda T98G hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 8 tekrarlı olacak şekilde 100’er µL 250 ng, 200 ng 150 ng 100 ng 50 ng 25 ng 10 ng ve 1 ng SA-SLNP olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilmiş SA-SLNP çözeltisi pipetlendi. Plak tekrardan 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 24 saat inkübe edilerek 24 saatin sonunda MTT testi kullanılarak sitotoksitesite testi gerçekleştirildi.

Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak 1:10 oranında MTT çözeltisi (5mg/ml) içeren 100µl taze besi yeri pipetlendi ve plak 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 4 saat inkübe edildi. 4 saatin sonunda MTT içeren besi yeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100µl 0,08M HCl içeren izopropanol pipetlendi. Pipetaj işlemi sonunda çözünen formazan kristallerinin absorbanları 570 nm’de okutuldu.

Elde edilen veriler sonuçlar kısmında değerlendirildi.

3.3.3. PHT-SA-SLNP Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan PHT-SA-SLNP’lerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek üzere MTT yöntemi kullanıldı. Bu deneyler için insan glioblastoma hücreleri olan T98G hücre hattı kullanıldı. Ayrıca besi yeri olarak %10 FBS, %1 penisilin içeren DMEM High

Glucose kullanıldı. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi sonrası deneylere 6:4 PHT-SA-SLNP' ler ile karar verildi (Bkz Sonuçlar ve Tartışma Bölümü).

2000 hücre/ kuyucuk konsantrasyonda T98G hücreleri 96 kuyucuklu 3 adet plaklağa ekildi ve 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 1. plak 24, 2. plak 48 ve 3. plak 72 saat inkübe edildi. Belirlenen her bir saatin sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 8 tekrarlı olacak şekilde 200' er µL 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg ve 31,25 µg fenitoin yüklü SA-SLNP olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilmiş PHT-SA-SLNP süspansiyonu pipetlendi. Plaklar 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edilerek her bir plağın kendi muamele süresinin sonunda MTT testi kullanılarak sitotoksisite testi gerçekleştirildi.

Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak 1:10 oranında MTT çözeltisi (5mg/ml) içeren 200 µl taze besi yeri pipetlendi ve plaklar 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 4 saat inkübe edildi. 4 saatin sonunda MTT içeren besi yeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200µl 0,08M HCl içeren izopropanol pipetlendi. Pipetaj işlemi sonunda çözünen formazan kristallerinin absorbanları 570nm'de okutuldu.

Elde edilen veriler sonuçlar kısmında değerlendirilmiştir.

3.3.4. Kanik Asit Sitotoksisitesinin Belirlenmesi

Epileptik nöbet oluşumunu tetiklemek üzere kainik asit kullanıldı. Çalışmanın bu aşamasında nöbet tetiklemede kullanılacak optimum kainik asit konsantrasyonunu ve hücrelerle optimum muamele süresini belirlemek amacıyla kainik asit (KA) için MTT yöntemi kullanılarak sitotoksisite testleri gerçekleştirildi.

2000 hücre/ kuyucuk konsantrasyonda T98G hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Besi yeri olarak %10 FBS, %1 penisilin içeren DMEM High Glucose kullanıldı. Bunun için toplamda 4 adet 96 kuyucuklu plak kullanıldı ve her bir plağın 58 kuyucuğuna hücre ekildi.

10 mg KA 1 mL steril ultra saf su içerisinde çözülerek 47mM' lık KA çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan KA çözeltisi 400 µM, 200 µM, 100 µM ve 50 µM olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilerek 4 farklı konsantrasyonda 8 tekrarlı olacak şekilde hücrelere uygulandı. Negatif control olarak hücrelere sadece besiyeri, pozitif control olarak ise 1/20 oranında dilüe edilmiş DMSO 8 tekrarlı olarak uygulandı.

1. plak 30 dk, 2. plak 60 dk, 3. plak 120 dk, 4. plak ise 240 dk KA ile muamele edildi. Her bir plak için belirlenen süreler sona erdiğinde ilgili plaktaki kuyucuklardan KA solüsyonu uzaklaştırıldı. KA solüsyonu uzaklaştırılan plaklara 1:10 oranında MTT çözeltisi (5mg/ml) içeren 100µl taze besi yeri pipetlendi ve plaklar 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Her bir plak için belirlenen 4 saatin sonunda MTT içeren besi yeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100µl 0,08M HCl içeren izopropanol pipetlendi. Pipetaj işlemi sonunda çözünen formazan kristallerinin absorbansları 570 nm’de okutuldu.

Elde edilen veriler sonuçlar kısmında değerlendirilmiştir

3.4. *In vitro* Epilepsi Modeli Oluşturulması ve Nöbet Aktivitesinin Önlenmesi

3.4.1. Kimyasal Malzemeler

DMEM High Glucose Sartorius (Kibbutz Beit-Haemek, Israel) firmasından, FBS Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel) firmasından, Penicilin-Streptomycin, Penicilin-Streptomycin, KA Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından, 8-OHdG ELISA Kit Elabscience (Huston, Teksas, ABD) ve Rel Assay Diagnostics TOS Kiti (Gaziantep, Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

3.4.2. Hücrelerin PHT-SA-SLNP ile Muamele Edilmesi/Etkileştirilmesi ve KA ile Etkileştirilmesi

KA glutamatın yapısal olarak L-analogudur ve glutamat ile antagonist olarak işlev görür. KA glutamat reseptörlerini aktive eder ve glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu nöronal depolarizasyona sebep olur. Bu da Ca²⁺ iyonlarının akışına neden olur. KA’ nın epileptik nöbet oluşumuna sebep olmasını sağlayan bu mekanizmalar göz önünde bulundurularak *in vitro* hücre kültüründe epilepsi nöbet modeli oluşturmak için KA nörotoksininin kullanılmasına karar verildi.

Bu amaçla gliyal hücrelerde (T98G) *in vitro* nöbet modeli oluşturulacaktır. Bunun için T98G hücre hattı %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM High Glucose besiyerinde kültüre edildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler 24 kuyucuklu 3 adet plağa her kuyucukta 8x10⁵ adet hücre olacak şekilde 1’ er mL ekilmiştir. Her bir plakta 20 kuyucuk kullanıldı. Deney grupları dört teknik üç de biyolojik tekrar olacak şekilde beş grup olarak planladı. Bu gruplar aşağıda verildi.

1. Grup – Hiçbir işlem yapılmayan grup
2. Grup – Sadece KA uygulanan grup
3. Grup – Çıplak PHT ve KA uygulanan grup
4. Grup – SA-SLNP ve KA uygulanan grup
5. Grup – PHT-SA-SLNP ve KA uygulanan grup

Hücrelerin ekiminden 24 saat sonra hücreler tamamen tutundu. Her bir plakta her bir grup 4 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Her bir plakta birinci ve ikinci sütunda bulunan hücrelerin üzerine 1' er mL hazır besiyeri eklendi. Üçüncü sütundaki hücrelerin üzerine 500 µg/mL fenitoin içeren besiyeri, dördüncü sütundaki hücrelerin üzerine 100 ng/µL SA-SLNP (SA-SLNP sitotoksitesisi sonucunda belirlenen doz) içeren besiyeri ve hücre ekili olan son sütuna ise 500 µg/mL PHT-SA-SLNP içeren besiyeri (PHT-SA-SLNP Sitotoksitesisi sonucunda belirlenen doz) pipetlendi. Tüm bu uygulamalar sonrası plaklar 24 saat (Sitotoksitesite çalışmaları sonucunda belirlenen süre) boyunca 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde inkübe edildi. 24 saatin sonunda plaklar inkübatörden alındı ve içlerinde bulunan besiyerleri uzaklaştırıldı. Birinci sütunda bulunan kuyucuklara negatif kontrol olarak değerlendirilmek üzere tekrardan 1 mL taze hazır besiyeri eklendi. Diğer hücre ekili olan tüm kuyucuklara 1 mL 400 µM kosantrasyonda KA içeren besiyeri (KA sitotoksitesisi sonucunda belirlenen doz) pipetlendi ve plaklar 37°C %5 karbondioksitli inkübatörde 30 dk (KA sitotoksitesisi sonucunda belirlenen süre) inkübe edildi. 30 dk sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 500 µL ultra saf su eklenerek -20°C' de 1 gün bekletildi. Daha sonra hücreler -20°C' den alınarak oda sıcaklığında 30 dk bekletildi ve mikroskop altında hücrelerin patlayıp patlamadığı kontrol edildi. Hücrelerin patlaması için hücreler -20°C' de 30 dk bekletildikten sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlem hücrelerin tamamı patlayana dek tekrarlandı. Tüm hücrelerin patladığı gözlenince mutajenite, TOS ve moleküler deneylerde kullanılmak üzere örnekler hazırlandı.

3.4.3. Hücre Mutajenitesinin Belirlenmesi

Mutajenite testi 8-OHdG(8-Hydroxydeoxyguanosine) ELISA Kit (Elabscience Biotechnology Inc., US) kullanılarak, kit içerisinde bulunan kullanım kılavuzundaki yönergeler takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

Patlatılan hücreler ependorflara aktarıldı. 1000 g' de 2-8°C' de 20 dk santrifüj edilerek süpernetantlar toplandı ve mutajenite, total oksidant seviyesi (TOS) ve moleküler deneylerde kullanıldı.

Deneylere başlamadan 20 dk önce tüm reaktifler oda sıcaklığında bekletildi. Kit içerisinden çıkan yıkama solüsyonu içerisindeki kristaller tamamen yokolana kadar 40°C su banyosunda bekletildi ve çalkalandı. Kristaller tamamen çözüldükten sonra konsantre haldeki yıkama solüsyonu 1/25 oranında olacak şekilde distile su ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Hazırlanan her bir örnek 10000 g' de 1 dk santrifüj edildi ve 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ve 0 ng/mL dilüsyonlara sahip olacak şekilde kit içerisinden çıkan Reference Standard & Sample Diluent kullanılarak örnekler dilüe edildi.

Kit içerisinden çıkan 100x konsantrasyondaki Concentrated Biotinylated Detection Ab reaktifi 1x olacak şekilde yine kit içerisinden çıkan Biotinylated Detection Ab Diluent ile dilüe edildi. Bu işlem örneklerin kit içerisinden çıkan plağın kuyucuklarına pipetlenmesinden 15 dk önce gerçekleştirildi.

Kit içerisinden çıkan plağın her bir kuyucuğu blank (4 adet), standart ve ekilecek örneklerin isimleri ile etiketlendi. Daha sonra her bir kuyucuğa bu etiketleme doğrultusunda 50 µL blank, standart ve örnekler pipetlendi. Hemen ardından her bir kuyucuğa 50 µL dilüe edilmiş olan Biotinylated Detection Ab eklendi. Plak kit içerisinden çıkan sealer ile kapatılarak 45 dk 37°C' de inkübe edildi. 45 dk bitmeden 15 dk önce kit içerisinden çıkan 100x Concentrated HRP Conjugate reaktifi yine kit içerisinden çıkan HRP Conjugate Diluent ile 1x olacak şekilde dilüe edildi.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra sealer açılarak kuyucuklardaki reaktifler uzaklaştırılır ve her bir kuyucuğa 350 µL yıkama solüsyonu eklenerek 1-2 dk beklendi ve yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL dilüe edilmiş HRP Conjugate reaktifi eklendi ve plak sealer ile kapatılarak 37°C' de 30 dk inkübe edildi. 30 dk sonunda HRP Conjugate reaktifi kuyucuklardan uzaklaştırılarak bir önceki adımda olduğu gibi yıkama işlemi yapıldı ve bu işlem 5 defa tekrarlandı.

Yıkama işlemi sonrasında her bir kuyucuğa 90 µL kit içerisinden çıkan Substrate Reagent eklendi ve plak yeni bir sealer ile kapatılarak 37°C' de 15 dk inkübe edildi. Mikroplaka okuyucusuna bu aşamada 15 dk OD ölçümü öncesi ön ısıtma yapıldı.

İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 µL Stop Solution eklendi ve her bir kuyucuktaki optik densite (OD) 450 nm’ de mikropłaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler sonuçlar kısmında tartışıldı.

3.4.4. Hücre TOS Seviyesinin Belirlenmesi

Hücrelerin genel oksidasyon durumunun değerlendirilmesi için TOS testi yapılacaktır. Bu test için ticari TOS kiti (Rel Assay, Antep, Turkey) kullanıldı. Deneye başlamadan önce 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğu konacak örneğe göre etiketlendi. Toplamda 68 kuyucuk kullanıldı. Her bir kuyucuğa 23 µL örnek (60 adet), standart (4 tekrarlı) ve distile su (4 tekrarlı) pipetlendi. Daha sonra üzerlerine 150 µL Reagent 1 eklendi ve shaker kullanılarak plak 30 sn çalkalandı ve 490 nm dala boyunda A1 ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrası kuyucuklara 8 µL Reagent 2 pipetlendi ve 5 dk 37°C etüvde inkübe edildi ve aynı dalga boyunda A2 okuması yapıldı. Daha sonra aşağıdaki eşitlik kullanılarak elde edilen sonuçlar veriler sonuçlar kısmında tartışıldı.

$$A2 - A1 = \Delta Abs \text{ (Standart veya Örnek)}$$

$$\text{Sonuçlar} = \frac{\Delta Abs \text{ Örnek}}{\Delta Abs \text{ Standart}} \times 10$$

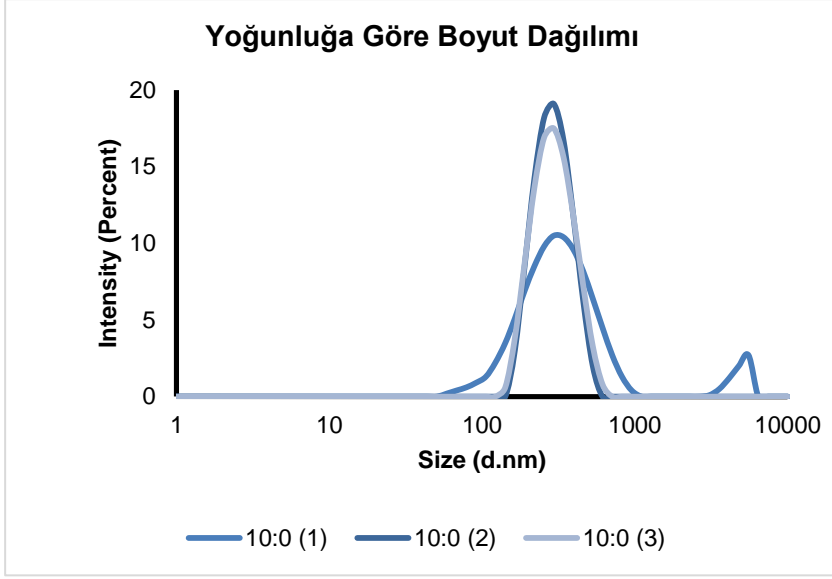
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tezde yapılan çalışmalar i) SA-SLNP' lerin sentezi ve kimyasal karakterizasyonu, ii) PHT-SA-SLNP' lerin sentezi ve kimyasal karakterizasyonu, iii) Sentezlenen nanopartiküllerin (SA-SLNP, PHT-SA-SLNP) ve *in vitro* epilepsi modeli oluşturmak üzere kullanılan kainik asitin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, iv) Sentezlenen PHT-SA-SLNP' lerin *in vitro* ilaç salım kinetiklerinin belirlenmesi, v) *in vitro* epilepsi modelinin oluşturulması ve SA-SLNP, PHT-SA-SLNP ve vi) SA-SLNP, PHT-SA-SLNP ve çıplak ilacın KA ile T98G hücre hattı üzerinde oluşturulan epilepsi modeli üzerindeki mutajenite ve TOS seviyelerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi olmak üzere altı ana başlık altında toplanabilir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler sonuçlar kısmında bu ana başlıklara ait sonuçlar incelendi.

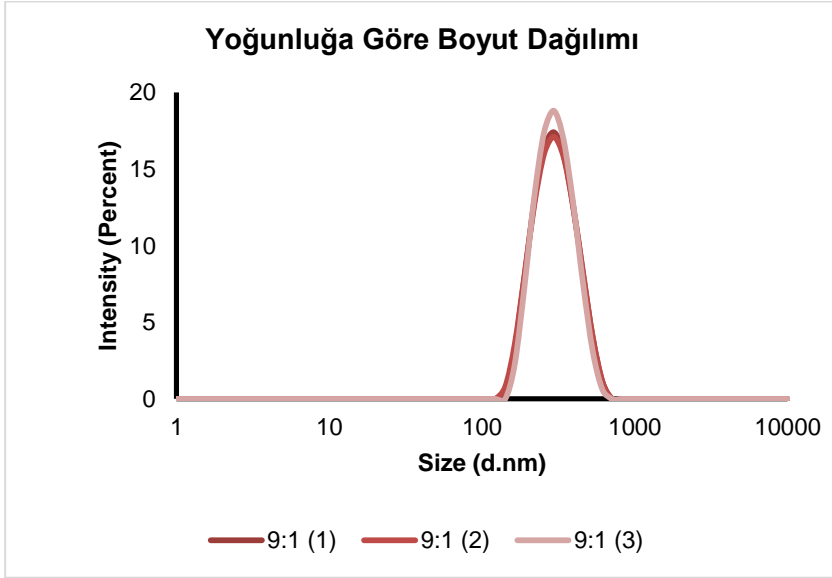
4.1. SA-SLNP' lerin Karakterizasyonu

4.1.1. SA-SLNP' lerin Boyut ve Yük Analizi

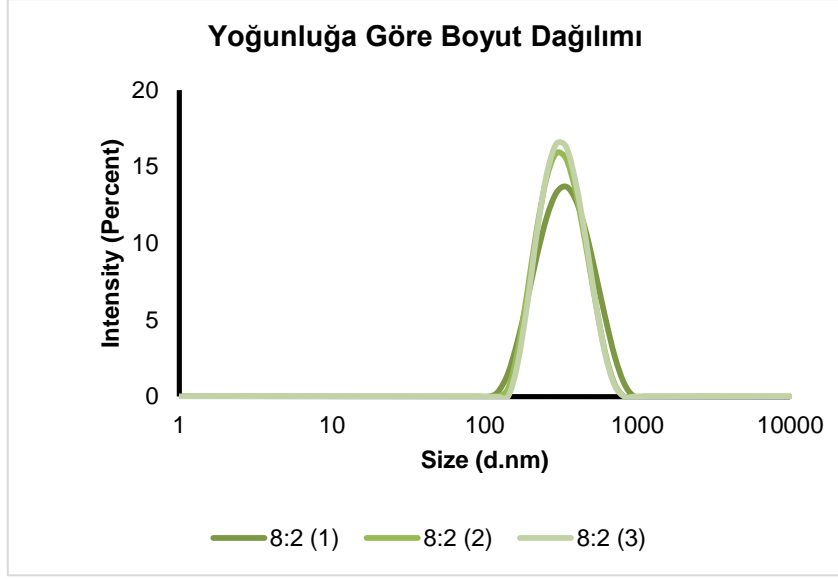
Yapılan çalışmalar sonucu sentezlenen stearik asit nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüş olup elde edilen veriler Tablo 4' te görülmektedir. Graverini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada formülasyonu gizli tutulan katı lipid nanopartiküllerin KBB' yi geçişleri *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Bunun için boyutları 266 nm ve 408 nm, PDI' ları ise 0.184 ve 0.492 arasında değişen 6 farklı formülasyonda SLN sentezlenmiş ve KBB geçirgenlikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre <300 nm boyuta sahip nanopartiküllerin parentemal uygulama için uygun olduğu ve SLN' lerin KBB tarafından yabancı bir ajan olarak algılanmayıp beyin dokularına ulaşabildiği gösterilmiştir [104]. Bu çalışmada elde edilen bulgular göz önünde bulundurularak her bir formülasyon incelendiğinde sürfektan faz olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılan F1 formülasyonunun polydispersal index (PDI) değeri ve partikül boyutu yüksek bulunmuş ve bu nedenle tercih edilmemiştir. Partikül boyutu ve PDI değeri göz önünde bulundurularak en küçük partikül boyutuna ve en düşük PDI' ya sahip olan F4 optimizasyon çalışmalarına başlamak için seçilmiştir.



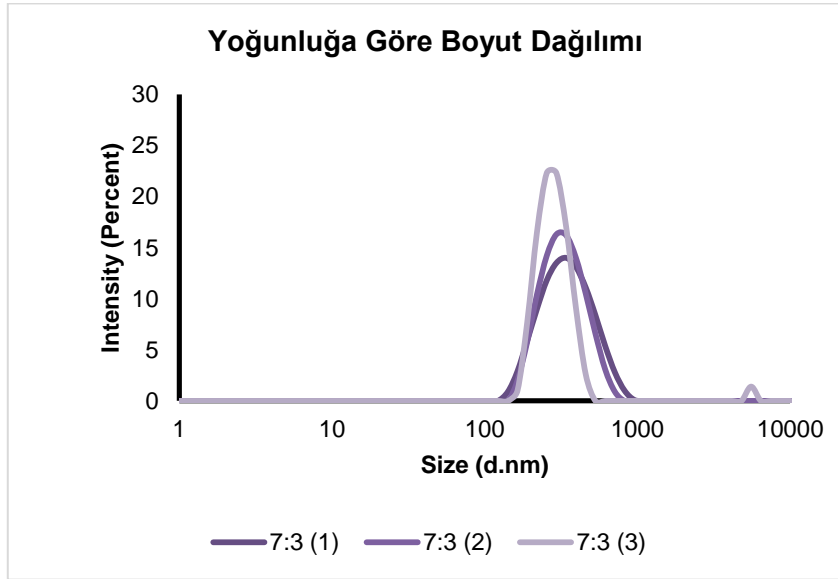
Şekil-5: SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği



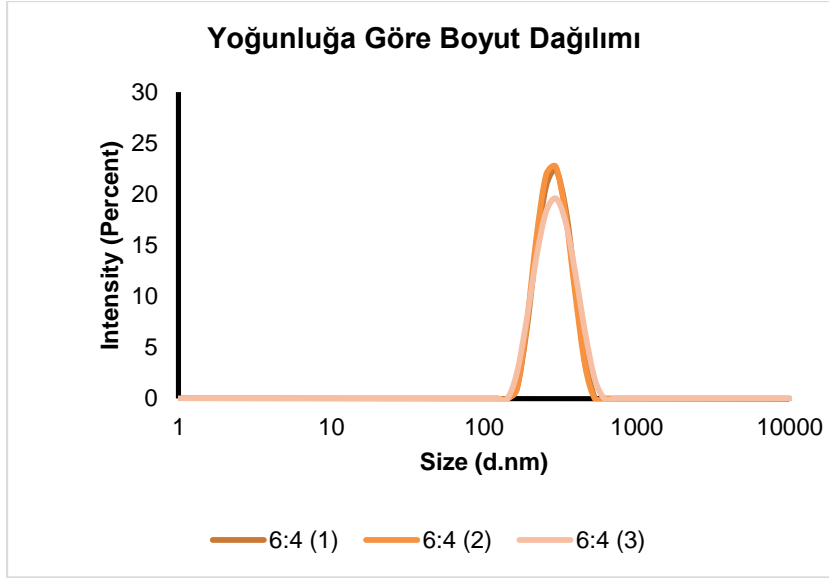
Şekil-6: SA PHT oranı 9:1 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği



Şekil-7: SA PHT oranı 8:2 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği



Şekil-8: SA PHT oranı 7:3 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği



Şekil-9: SA PHT oranı 6:4 olan PHT-SA-SLNP' ye ait yoğunluğa göre boyut dağılımı grafiği

Aynı formülasyona sahip (F4) 3 farklı nanopartikül sentezlendi ve karakterizasyonu yapılarak yöntemin optimizasyonu doğrulandı. Bu 3 nanopartikülün boyut ölçüm sonuçlarına ait grafikler Şekil -5, 6, 7, 8, ve 9'da görülmektedir.

Formülasyon	İçerik	Miktar	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
F1	SDS SA	%0,5 %0,4	480,76 ±105,65	0,755±0,18	-17,6±0,03
F2	PVA SA	%1 %0,4	517,4±81,77	0,641±0.1	-27,63±0,95
F3	PVA SA	%2 %0,4	440,9±8,5	0,281±0,032	-12,6±0,17
F4	PVA SA	%0,4 %0,4	276,6±1,57	0,09±0,022	-12,7±0,46

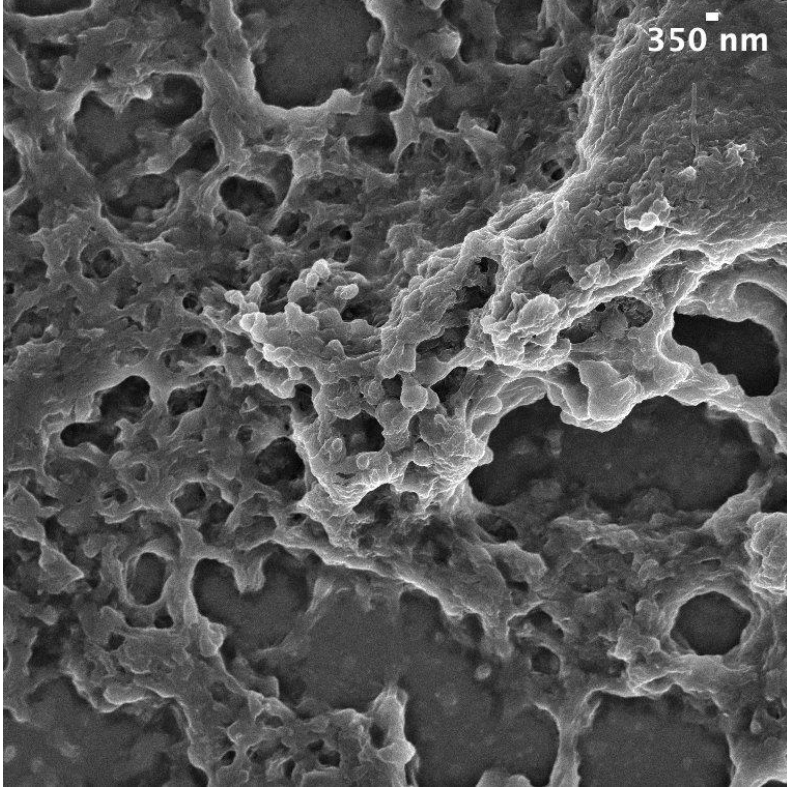
Tablo 3: Stearik asit katı lipid nanopartiküller için denenen formülasyonlar ve karakterizasyon sonuçları

Optimize edilen yönteme göre 6 nanopartikül sentezlendi ve SA-SLNP' lerin verim hesabını gerçekleştirmek üzere bu 6 örneğin her birinden 0,5 µL alınarak 80°C' de 24 saat bekletildi. Daha sonra örnekler 24 saat liyofilize edildi. Aşağıdaki formül kullanılarak SA-SLNP' ler için verim hesabı gerçekleştirildi. Bu hesaplama göre SA-SLNP sentezindeki verim %25±5.48 olarak bulundu.

$$\%Verim = \frac{\text{Kullanılan lipid miktarı (g)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (g)}} \times 100$$

4.1.2. SA-SLNP' lerin SEM Görüntülemeleri

Üretilen SA-SLNP' lerin SEM görüntüleri HÜNİTEK' ten hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiş ve elde edilen görüntüler Şekil-10' da verildi. Elde edilen görüntülere göre SA-SLNP' lerin küresel bir morfolojik yapıya sahip oldukları gözlemlendi.



Şekil-10: SA-SLNP SEM Görüntüleri

4.2. PHT SA-SLNP' lerin Karakterizasyonu

4.2.1. PHT-SA-SLNP' lerin Boyut ve Yük Analizi

Yapılan çalışmalar sonucu sentezlenen fenitoin yüklü stearik asit nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüş olup elde edilen veriler Tablo 4' te verildi.

Formülasyon	İçerik	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
10:0	PVA SA PHT	278,5±0,95	0,115±0,018	-12,7±0,46
9:1	PVA SA PHT	283,86±0,306	0,090±0,008	-13,8±2,12
8:2	PVA SA PHT	305,6± 3,46	0,151±0,025	-12,43±1,16
7:3	PVA SA PHT	321,97±12,003	0,207±0,112	-13,9±0,0,26
6:4	PVA SA PHT	279,83±3,23	0,030±0,008	-13,77±0,06

Tablo 4: Fenitoin yüklü stearik asit katı lipid nanopartikül formülasyonları ve karakterizasyon sonuçları

Yine Graverini ve arkadaşlarının yaptığı çalışma göz nünde bulundurulduğunda PDI ve boyut bakımından en uygun olan PHT-SA-SLNP' ler 9:1 ve 6:4 olarak değerlendirilmiştir.

4.2.2. PHT-SA-SLNP' lerin İlaç Yükleme Oranı (%DL) ve Enkapsülasyon Etkinliğinin (%EE) Belirlenmesi

Her bir ilaç konsantrasyonu için (9:1, 8:2, 7:3 ve 6:4) 3 tekrarlı olacak şekilde PHT-SA-SLNP üretimi gerçekleştirildi. Sentezlenen PHT-SA-SLNP' ler 11000 rpm' de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve altta kalan pellet üzerine 3 mL distile su eklenerek homojenize edildi ve her bir örnekten 1' er mL olacak şekilde 3 örnek alındı. Alınan örnekler içerisindeki ilaç miktarları Şehir Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı' nda Siemens ADVIA[®] Chemistry XPT cihazı kullanılarak hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 5' te verilmiştir.

ÖRNEK ADI	YÜKLENMEYEN İLAÇ MİKTARI (µg)	%EE	%DL
9:1	40.2	-	-
8:2	43.43	%46	%0.8
7:3	38.4	%68	%1.6
6:4	32.5	%80	%2.6

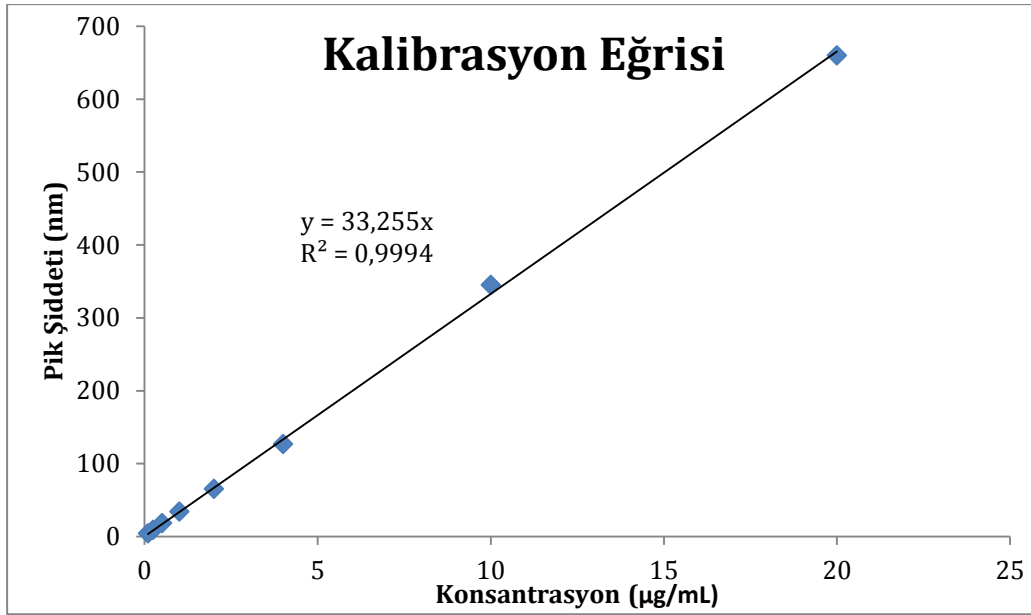
Tablo 5: PHT-SA-SLNP' lere ait enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme oranları

Bu veriler göz önüne alındığında boyut ve PDI değerleri de uygun bulunan ve en yüksek %EE ve %DL' ye sahip olan 6:4 ilaç oranına sahip nanopartiküler sistemle hücre deneylerine devam edilmesine karar verilmiştir.

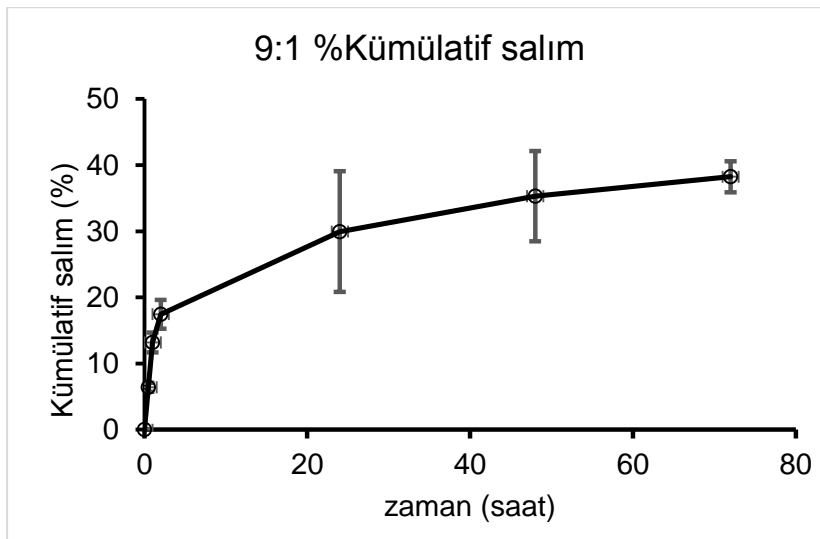
4.2.3. PHT-SA-SLNP' lerin in vitro İlaç Salım Analizleri

Her bir konsantrasyon için 30 dk, 1 saat, 2 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat aralıklarla 1mL örnek alındı. Toplamda ise 3 biyolojik replika (72 adet örnek) çalışıldı. Alınan her bir örnek içerisindeki ilaç miktarı HPLC cihazı (Agilent®) cihazı kullanılarak tespit edildi.

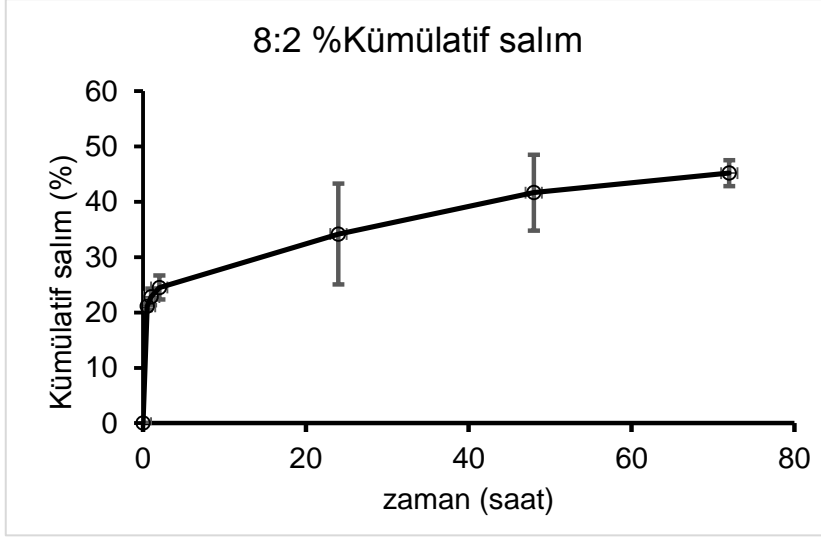
Elde edilen sonuçlara göre 72 saatin sonunda 9:1 PHT-SA-SLNP ilacın %38.2±2.3' ünü, 8:2 PHT-SA-SLNP ilacın %45.2±6.7' sini, 7:3 PHT-SA-SLNP ilacın %45±9.7' sini ve 6:4 PHT-SA-SLNP ilacın %59±9.5' ini salmıştır. Elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil-11, Şekil-12, Şekil-13, Şeki-14, ve Şekil-15' te verilmiştir.



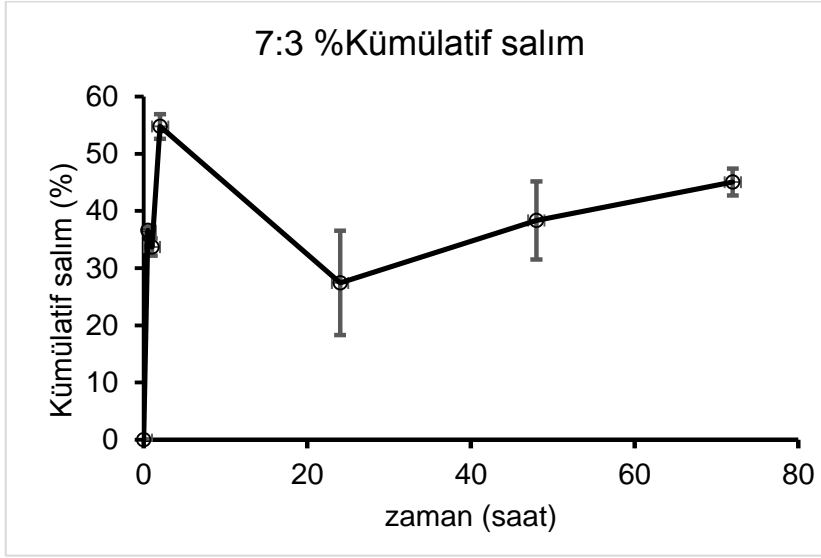
Şekil-11: PHT-Aseton Kalibrasyon Eğrisi Grafiği



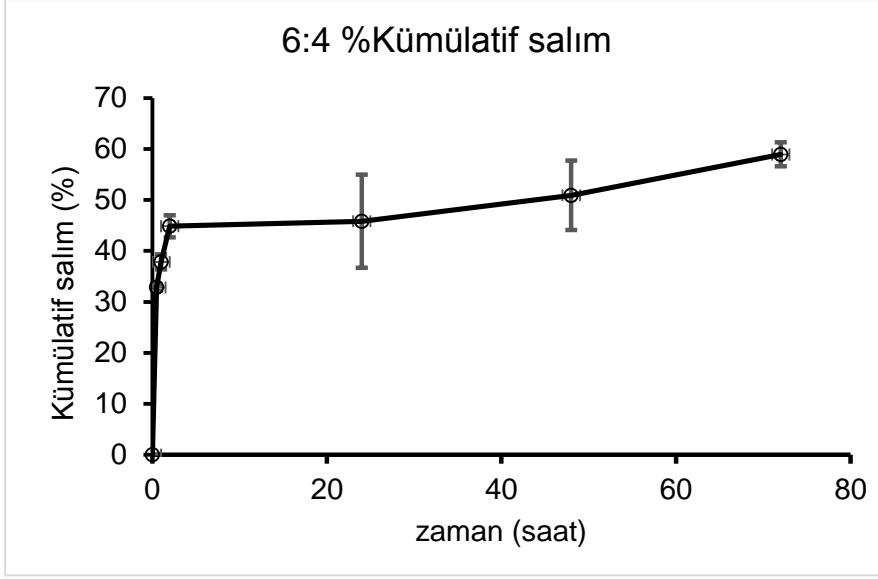
Şekil-12: SA PHT oranı 9:1 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salım – Zaman Grafiği



Şekil-13: SA PHT oranı 8:2 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salım – Zaman Grafiği



Şekil-14: SA PHT oranı 7:3 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salım – Zaman Grafiği



Şekil-15: SA PHT oranı 6:4 olan PHT-SA-SLNP' ye ait % Kümülatif Salım – Zaman Grafiği

Yousfan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada değişen oranlarda kitosan ve lesitin içeren nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu nanopartiküller içerisine 0.3 mg, 0.6 mg ve 1.2 mg PHT enkpsüle edilmiştir. Daha sonra yapılan *in vitro* ilaç salım analizine göre elde edilen sonuçlarda 24 saat sonunda en yüksek kümülatif PHT salım oranı %44 olarak bulunmuştur [105].

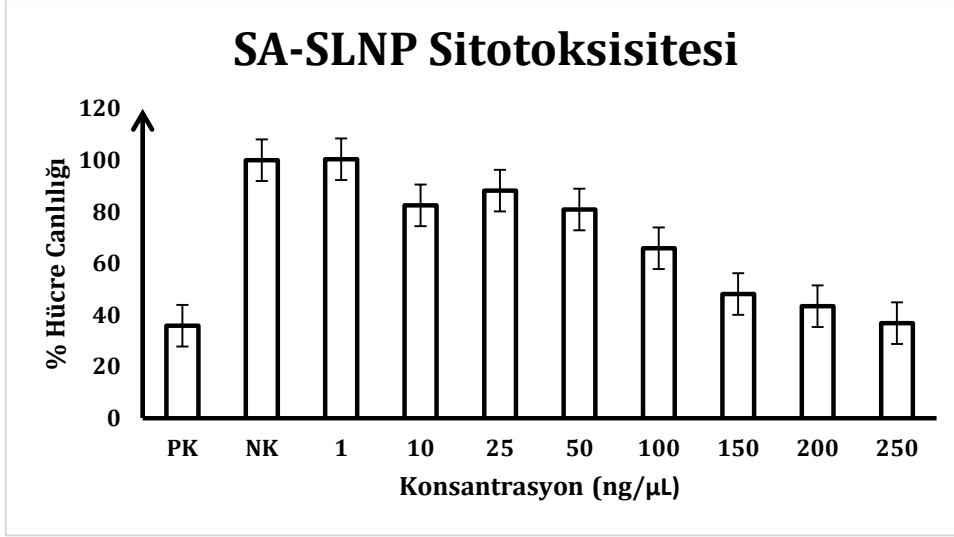
Motawea ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Precirol ATO5 ve Compritol 888 ATO ile sentezlenen nano lipid taşıyıcı sistemler içerisine yara iyileşmesinde kullanılmak üzere dermatolojik uygulama yapmak için fenitoin enkapsüle etmişlerdir. Bu sistemlerle yaptıkları *in vitro* ilaç salım deneyleri sonucunda 48 saat tamamlandığında salınan PHT oranı %73.47±2.45 olarak bulunmuştur [106].

SPSS programı kullanılarak yapılan ANOVA analizleri sonucu elde edilen verilere göre ilaç salımında SA PHT oranı 6:4 olan PHT-SA-SLNP' de 72. saatte 24. ve 48. Saatlere göre anlamlı bir ilaç salım oranı görüldü ($p < 0.05$)

4.3. MTT Yöntemi Kullanılarak Sitotoksitelerin Belirlenmesi

4.3.1. SA-SLNP' lerin Sitotoksitesi

Üretilen SA-SLNP' lerin T98G gliablastoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek üzere MTT yöntemi kullanıldı. Buna göre 250 ng, 200 ng 150 ng 100 ng 50 ng 25 ng 10 ng ve 1 ng SA-SLNP' lerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri Şekil-16' da verildi.



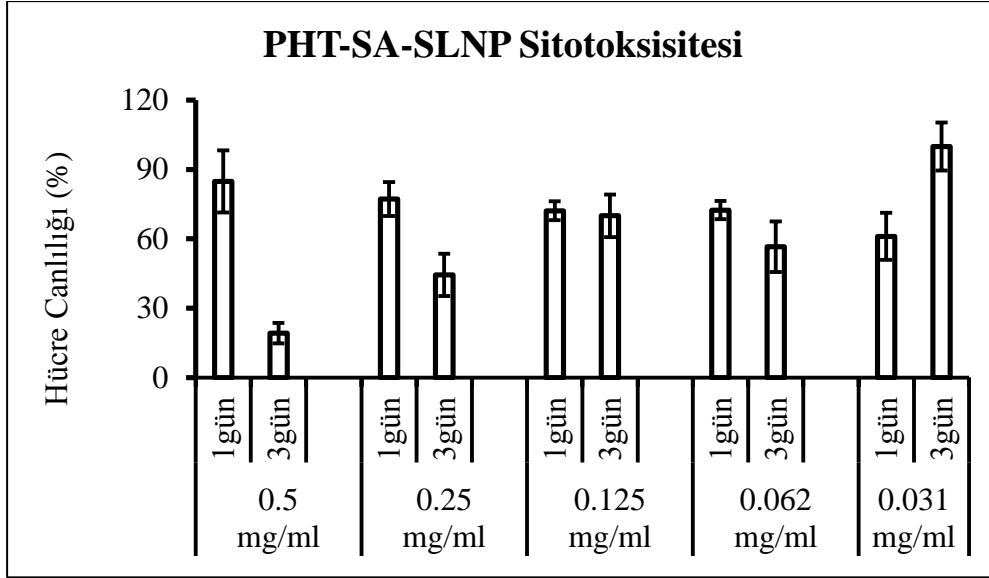
Şekil-16: SA-SLNP' lerin T98G glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde μL 'deki nanopartikül miktarı arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır. TS EN ISO10993-5 Vücut Dışı Sitotoksisite Testleri Standard' ı kapsamında $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ üzeri SA-SLNP içeren örneklerin kabul edilebilir seviye olan %70 hücre canlılığı altında kaldığı görülmektedir. Bu nedenle tolere edilebilir maksimum doz olan $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ konsantrasyonuna sahip SA-SLNP' lerin *in vitro* model deneylerinde NK olarak kullanılmasına karar verilmiştir ($p < 0.05$).

4.3.2. PHT-SA-SLNP Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Üretilen PHT-SA-SLNP' lerin T98G glioblastoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek üzere MTT yöntemi kullanıldı. Teo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada serbest fenitoinin $0.2 \text{ mg}/\text{mL}$ konsantrasyonda hücre canlılığının . TS EN ISO10993-5 Vücut Dışı Sitotoksisite Testleri Standard' ına göre tolere edilebilir olmadığı (yaklaşık %55) sonucu elde edilmiştir [107]. Bu bağlamda nanopartiküler katı lipid taşıyıcı ile enkapsüle edilmiş PHT' nin serbest PHT' ye göre daha düşük bir toksisite göstermesi beklenmektedir. Bu nedenle sitotoksisite çalışmasına $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$ konsantrasyonda PHT-SA-SLNP (6:4) başlanmasına karar verilmiştir. Diğer 4 dilüsyon $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$ konsantrasyon $\frac{1}{2}$ oranında dilüe edilerek elde edilmiştir. Belirlenen dilüsyonlarda 1. ve 3. günlerdeki PHT-SA-SLNP' lere ait % hücre canlılığı grafiği Şekil-17' de verilmiştir.

Teo ve ark. yaptığı çalışmada serbest fenitoinin sitotoksitesi incelenmiş olduğu için bu çalışmada ayrıca incelenmemiştir.

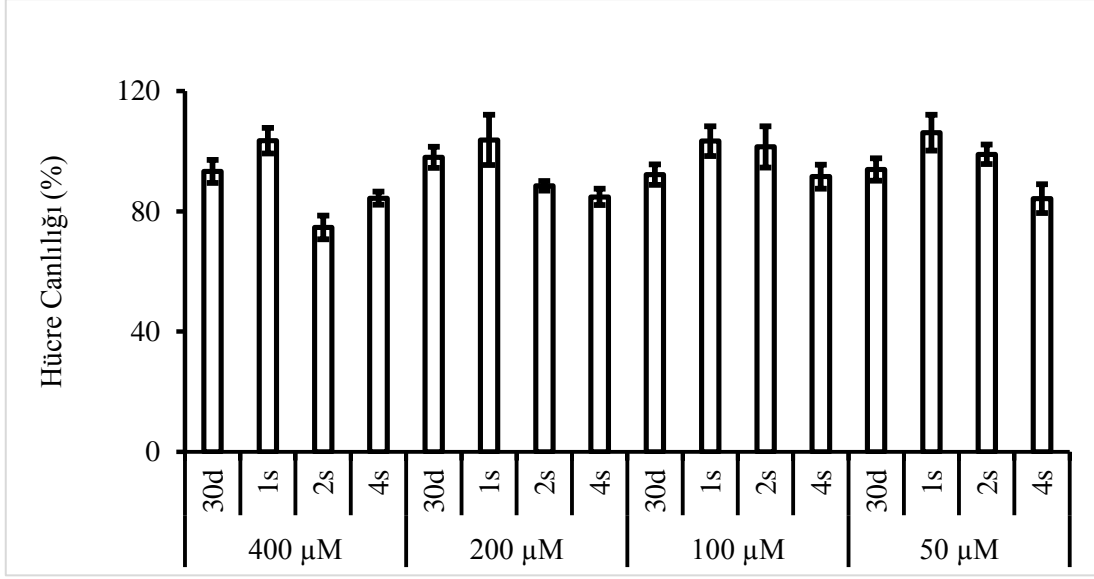


Şekil-17: PHT-SA-SLNP' lerin T98G glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek konsantrasyonda olan 0.5 mg/mL ile en düşük konsantrasyon olan 0.031 mg/mL arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Ayrıca 0.5 mg/mL konsantrasyonda 1 gün ve 3 günlük MTT sonuçları arasında da anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). Bu nedenle en yüksek doz olan 0.5 mg/mL PHT içeren SA-SLNP' lerin 1 gün bekletilen hücrelerin *in vitro* modelde nöbet önleyici olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.3. KA Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan KA çözeltisi 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M ve 50 μ M olacak şekilde 4 farklı konsantrasyonda ve 30 dk, 60 dk, 120 dk ve 240 dk KA ile muamele edilen T98G hücre hattına MTT testi yapıldı. MTT sonucunda elde edilen hücre canlılığına ait veriler Şekil-18' de verilmiştir.



Şekil-18: KA dozlarının muamele sürelerine göre % hücre canlılığına etkisi

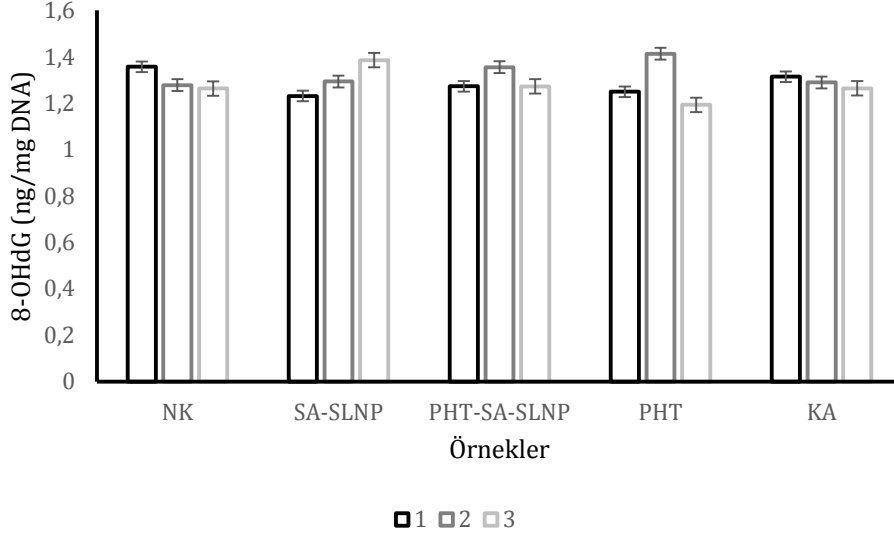
Du ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada BV-2 hücre hatları 100 µM konsantrasyonda KA ile 2 saat muamele edilerek *in vitro* model oluşturulmuştur [102].

400 µM konsantrasyonda 30 saat süre ile muamele edilmiş hücrelerin hücre canlılığı anlamlı oranda diğer gruplardan yüksekti ($p < 0.05$). Tüm bu veriler ve yapılan sitotoksisite deneylerinin sonuçlarına göre 400 µM KA konsantrasyonunun 30 dk T98G hücreleri ile muamale edilerek epilepsi modelinin oluşturulmasına karar verilmiştir. Du ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre konsantrasyon 4 kat arttırılmış süre ise ¼' üne indirilmiştir.

4.4. *In vitro* Epilepsi Modelinin Oluşturulması

4.4.1. Hücre Mutajenitesinin Belirlenmesi

8-OHdG(8-Hydroxydeoxyguanosine) ELISA Kit (Elabscience Biotechnology Inc., US) kullanılarak gerçekleştirilen mutajenite testi sonucunda negatif kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Bu sonuçlara göre kullanılan kimyasalların hücrelerde herhangi bir DNA hasarına yol açmadığı görüldü. Her bir grubun mutajenitelerinin karşılaştırıldığı grafik Şekil-19' da verilmiştir.

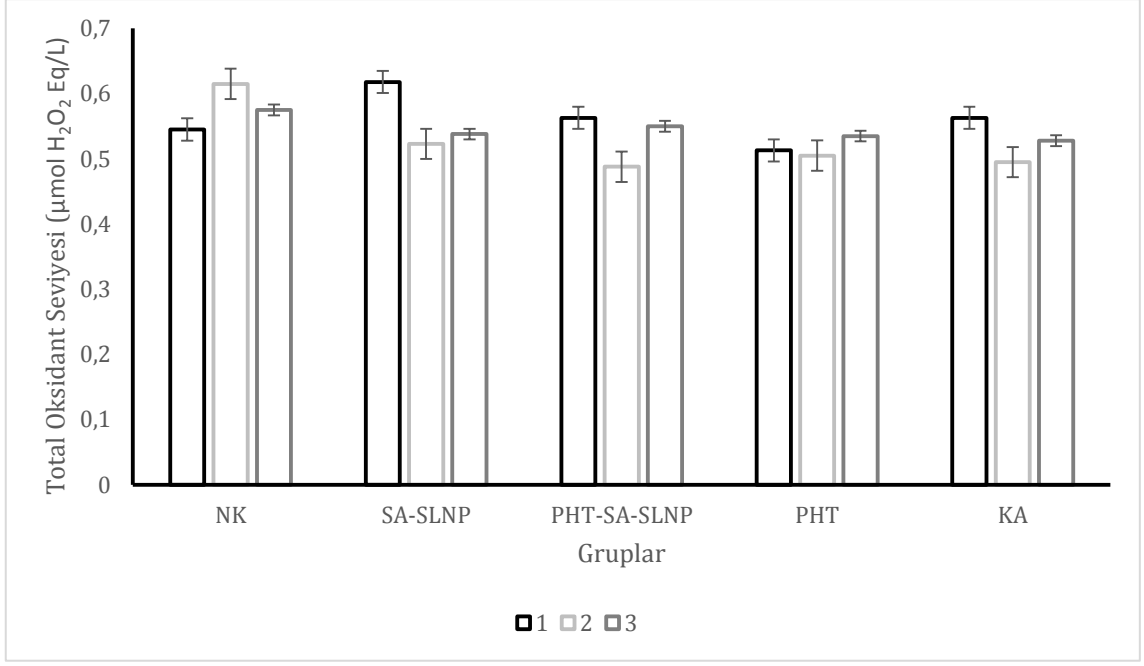


Şekil-19: NK, SA-SLNP, PHT-SA-SLNP, PHT ve KA' ya ait mutajenite seviyeleri

4.4.2. Hücre TOS Seviyesinin Belirlenmesi

Hücelere uygulanan reaktiflerin (SA-SLNP, PHT-SA-SLNP, PHT, KA) hücrelerdeki oksidant seviyelerinde nasıl bir değişim meydana getirdiğini incelemek amacıyla TOS testi yapıldı. Bu testte kit içerisinde bulunan oksidantlar Fe^{2+} iyonlarını Fe^{3+} iyonlarına oksitler. Oluşan Fe^{3+} iyonları da asidik ortamda xilenol orange ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Standart olarak H_2O_2 kullanıldı ve elde edilen sonuçlar mg^{-1} daki hücre proteini başına mikromol H_2O_2 eşdeğeri ile ifade edildi [108].

Sonuçlar değerlendirildiğinde hücelere uygulanan reaktiflerin oksidant oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uyarmadığı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Elde edilen sonuçlara ait grafik Şekil-20' de verilmiştir.



Şekil-20: NK, SA-SLNP, PHT-SA-SLNP, PHT ve KA' ya ait TOS seviyelerinin karşılaştırılması

4.5. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS Windows 20.0 paket programı (SPSS Inc.) ve gruplar arasındaki ortalama değerler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirildi. $p < 0.05$ veriler arasındaki farklılığın anlamlı olduğunu, $p > 0.05$ ise veriler arasındaki farklılığın anlamlı olmadığını belirtmek için kullanıldı.

5. KAYNAKLAR

1. Stafstrom, C. E., & Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(6), a022426.
2. Masoud, K. (2015). Investigation of some possible mechanisms involved in the anticonvulsant activity of *Tulbaghia violacea* harv.
3. Brennan, G. P., & Henshall, D. C. (2020). MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 16(9), 506-519.
4. Diaz Verdugo, C., Myren-Svelstad, S., Aydin, E., Van Hoeymissen, E., Deneubourg, C., Vanderhaeghe, S., ... & Yaksi, E. (2019). Glia-neuron interactions underlie state transitions to generalized seizures. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
5. Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., & Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 18024.
6. Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., ... & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521.
7. Pack, A. M. (2019). Epilepsy overview and revised classification of seizures and epilepsies. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25(2), 306-321.
8. Patel, D. C., Tewari, B. P., Chaunsali, L., & Sontheimer, H. (2019). Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(5), 282-297.
9. Li, H., Ji, S., Dong, B., & Chen, L. (2021). Seizure control after epilepsy surgery in early childhood: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy & Behavior*, 125, 108369.
10. Shlobin, N. A., Campbell, J. M., Rosenow, J. M., & Rolston, J. D. (2022). Ethical considerations in the surgical and neuromodulatory treatment of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 127, 108524.
11. Foutz, T., & Wong, M. (2021). Brain stimulation treatments in epilepsy: Basic mechanisms and clinical advances. *biomedical journal*.
12. Schmidt, D., & Schachter, S. C. (2014). Drug treatment of epilepsy in adults. *Bmj*, 348.
13. Snoeren, A., Majoie, M. H., Fasen, K. C., & Ijff, D. M. (2022). Brivaracetam for the treatment of refractory epilepsy in patients with prior exposure to levetiracetam: A retrospective outcome analysis. *Seizure*, 96, 102-107.
14. Dang, L. T., & Silverstein, F. S. (2017). Drug treatment of seizures and epilepsy in newborns and children. *Pediatric Clinics*, 64(6), 1291-1308.

15. Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., & Saltzman, W. M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, *64*(7), 701-705.
16. Kakkar, A., Traverso, G., Farokhzad, O. C., Weissleder, R., & Langer, R. (2017). Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems. *Nature Reviews Chemistry*, *1*(8), 1-17.
17. Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S., & Bhalgat, C. M. (2011). Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Saudi pharmaceutical journal*, *19*(3), 129-141.
18. Yaari, Y., Selzer, M. E., & Pincus, J. H. (1986). Phenytoin: mechanisms of its anticonvulsant action. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *20*(2), 171-184.
19. Keppel Hesselink, J. M., & Kopsky, D. J. (2017). Phenytoin: neuroprotection or neurotoxicity?. *Neurological Sciences*, *38*(6), 1137-1141.
20. Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., ... & Fukai, S. (2018). Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22. *Nature communications*, *9*(1), 1-13.
21. Murray, C. J., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A. D., Michaud, C., ... & Haring, D. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The lancet*, *380*(9859), 2197-2223.
22. Nabbout, R., & Kuchenbuch, M. (2020). Impact of predictive, preventive and precision medicine strategies in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, *16*(12), 674-688.
23. Boleti, A. P. D. A., Frihling, B. E. F., e Silva, P. S., Cardoso, P. H. D. O., de Moraes, L. F. R., Rodrigues, T. A. A., ... & Migliolo, L. (2020). Biochemical aspects and therapeutic mechanisms of cannabidiol in epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.
24. Vezzani, A., Balosso, S., & Ravizza, T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, *15*(8), 459-472.
25. Hermann, B. P., Seidenberg, M., & Bell, B. (2000). Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression. *Epilepsia*, *41*, S31-S41.
26. Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel Jr, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, *46*(4), 470-472.

27. Gastaut, H. (1970). Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 11(1), 102-112.
28. Angeles, D. K. (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22(4), 489-501.
29. Dreifuss, F. E., Martinez-Lage, M., & Johns, R. A. (1985). Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 26(3), 268-278.
30. Epilepsy, A. (2006). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *The treatment of epilepsy: principles & practice*, 354.
31. Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E., & Fisher, R. S. (2018). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy research*, 139, 73-79.
32. Milligan, T. A. (2021). Epilepsy: a clinical overview. *The American Journal of Medicine*, 134(7), 840-847.
33. Sarmast, S. T., Abdullahi, A. M., & Jahan, N. (2020). Current classification of seizures and epilepsies: scope, limitations and recommendations for future action. *Cureus*, 12(9).
34. Falco-Walter, J. (2020, December). Epilepsy—definition, classification, pathophysiology, and epidemiology. In *Seminars in Neurology* (Vol. 40, No. 06, pp. 617-623). Thieme Medical Publishers, Inc..
35. Duncan, J. S., Sander, J. W., Sisodiya, S. M., & Walker, M. C. (2006). Adult epilepsy. *The Lancet*, 367(9516), 1087-1100.
36. Johnson, E. L. (2019). Seizures and epilepsy. *Medical Clinics*, 103(2), 309-324.
37. Patel, D. C., Tewari, B. P., Chaunsali, L., & Sontheimer, H. (2019). Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(5), 282-297.
38. Agrawal, A., Timothy, J., Pandit, L., & Manju, M. (2006). Post-traumatic epilepsy: an overview. *Clinical neurology and neurosurgery*, 108(5), 433-439.
39. Chen, D. Y., Chen, C. C., Crawford, J. R., & Wang, S. G. (2018). Tumor-related epilepsy: epidemiology, pathogenesis and management. *Journal of neuro-oncology*, 139(1), 13-21.
40. Zilberter, Y., Popova, I., & Zilberter, M. (2021). Unifying mechanism behind the onset of acquired epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*.
41. Meisler, M. H., Hill, S. F., & Yu, W. (2021). Sodium channelopathies in neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(3), 152-166.
42. Rho, J. M., & Boison, D. (2022). The metabolic basis of epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 18(6), 333-347.

43. Arulsamy, A., Tan, Q. Y., Balasubramaniam, V., O'Brien, T. J., & Shaikh, M. F. (2020). Gut Microbiota and Epilepsy: A Systematic Review on Their Relationship and Possible Therapeutics. *ACS chemical neuroscience*, 11(21), 3488–3498.
44. Sears, S. M., & Hewett, S. J. (2021). Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 246(9),
45. Epilepsy. (2022). Retrieved 10 September 2022, from https://www.who.int/health-topics/epilepsy#tab=tab_1
46. Miller, J. W., & Hakimian, S. (2013). Surgical treatment of epilepsy. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 19(3 Epilepsy), 730–742.
47. Lalitha, S., Minz, R. W., & Medhi, B. (2018). Understanding the controversial drug targets in epilepsy and pharmacoresistant epilepsy. *Reviews in the neurosciences*, 29(3), 333–345.
48. Riban, V., Fitzsimons, H. L., & Doring, M. J. (2009). Gene therapy in epilepsy. *Epilepsia*, 50(1), 24–32.
49. Culler, G. W., & VanHaerents, S. (2020). Immunologic Treatments of Seizures and Status Epilepticus. *Seminars in neurology*, 40(6), 708–718.
50. Skarpaas, T. L., Jarosiewicz, B., & Morrell, M. J. (2019). Brain-responsive neurostimulation for epilepsy (RNS® System). *Epilepsy research*, 153, 68–70.
51. D'Andrea Meira, I., Romão, T. T., Pires do Prado, H. J., Krüger, L. T., Pires, M., & da Conceição, P. O. (2019). Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. *Frontiers in neuroscience*, 13, 5.
52. Kaeberle J. (2018). Epilepsy Disorders and Treatment Modalities. *NASN school nurse (Print)*, 33(6), 342–344.
53. Lundstrom, B., Wharen, R., & Tatum, W. (2021). Neuromodulation for Epilepsy. *Epilepsy*, 431-440.
54. Wang, Y., Shen, Y., Cai, X., Yu, J., Chen, C., Tan, B., Tan, N., Cheng, H., Fan, X., Wu, X., Liu, J., Wang, S., Wang, Y., & Chen, Z. (2021). Deep brain stimulation in the medial septum attenuates temporal lobe epilepsy via entrainment of hippocampal theta rhythm. *CNS neuroscience & therapeutics*, 27(5), 577–586.
55. Mindfulness-based Psychotherapy for Drug-resistant Epilepsy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (2022). Retrieved 10 September 2022, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02060422>
56. Impact of Mindfulness Intervention on Quality of Life in Patients With Drug-resistant Epilepsy. - Full Text View - ClinicalTrials.gov. (2022). Retrieved 10 September 2022, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04126369>

57. Löscher, W., & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, 52(4), 657–678.
58. Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(7), 553–564.
59. Miziak, B., Konarzewska, A., Ułamek-Kozioł, M., Dudra-Jastrzębska, M., Pluta, R., & Czuczwar, S. J. (2020). Anti-Epileptogenic Effects of Antiepileptic Drugs. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2340.
60. Cotterman-Hart, S. (2015). Antiepileptic Drugs. *Epilepsy And Brain Tumors*, 159-169.
61. Cotterman-Hart, S. (2015). Antiepileptic Drugs. *Epilepsy And Brain Tumors*, 171-193.
62. Sirven, J., Fife, T., Wingerchuk, D., & Drazkowski, J. (2007). Second-Generation Antiepileptic Drugs' Impact on Balance: A Meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(1), 40-47.
63. Luszczki J. J. (2009). Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacological reports : PR*, 61(2), 197–216.
64. Aneja, S., & Sharma, S. (2013). Newer anti-epileptic drugs. *Indian Pediatrics*, 50(11), 1033-1040.
65. Chang, W. C., Hung, S. I., Carleton, B. C., & Chung, W. H. (2020). An update on CYP2C9 polymorphisms and phenytoin metabolism: implications for adverse effects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 16(8), 723–734.
66. Nation, R. L., Evans, A. M., & Milne, R. W. (1990). Pharmacokinetic drug interactions with phenytoin (Part I). *Clinical pharmacokinetics*, 18(1), 37–60.
67. Kanner A. M. (2009). Does a history of postictal psychosis predict a poor postsurgical seizure outcome?. *Epilepsy currents*, 9(4), 96–97.
68. Yaari, Y., Selzer, M. E., & Pincus, J. H. (1986). Phenytoin: mechanisms of its anticonvulsant action. *Annals of neurology*, 20(2), 171–184.
69. Abdelsayed, M., & Sokolov, S. (2013). Voltage-gated sodium channels: pharmaceutical targets via anticonvulsants to treat epileptic syndromes. *Channels (Austin, Tex.)*, 7(3), 146–152.
70. Tunnicliff G. (1996). Basis of the antiseizure action of phenytoin. *General pharmacology*, 27(7), 1091–1097.
71. Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
72. Lee, D. E., Koo, H., Sun, I. C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2656-2672.

73. Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., & Murray, R. W. (2009). Gold nanoparticles: past, present, and future. *Langmuir*, 25(24), 13840-13851.
74. Khaydarov, R. R., Khaydarov, R. A., Estrin, Y., Evgrafova, S., Scheper, T., Endres, C., & Cho, S. Y. (2009). Silver nanoparticles. In *Nanomaterials: risks and benefits* (pp. 287-297). Springer, Dordrecht.
75. Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., & Saltzman, W. M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, 64(7), 701-705.
76. Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 36-48.
77. Hawkins, M. J., Soon-Shiong, P., & Desai, N. (2008). Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 60(8), 876-885.
78. Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M., & Szoka, F. C. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology*, 23(12), 1517-1526.
79. Yadav, N., Khatak, S., & Sara, U. S. (2013). Solid lipid nanoparticles-a review. *Int. J. Appl. Pharm*, 5(2), 8-18.
80. Wang, E. C., & Wang, A. Z. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative biology*, 6(1), 9-26.
81. Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., & Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*, 9, 49.
82. Mishra, V., Bansal, K. K., Verma, A., Yadav, N., Thakur, S., Sudhakar, K., & Rosenholm, J. M. (2018). Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 10(4), 191.
83. Garud, A., Singh, D., & Garud, N. (2012). Solid lipid nanoparticles (SLN): method, characterization and applications. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(11), 384-393.
84. Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S., & Bhalgat, C. M. (2011). Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Saudi pharmaceutical journal*, 19(3), 129-141.
85. Betzer, O., Shilo, M., OPOCHINSKY, R., Barnoy, E., Motiei, M., Okun, E., Yadid, G., & Popovtzer, R. (2017). The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: an in vivo study. *Nanomedicine (London, England)*, 12(13), 1533-1546.
86. Moore, T. L., Urban, D. A., Rodriguez-Lorenzo, L., Milosevic, A., Crippa, F., Spuch-Calvar, M., Balog, S., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., & Petri-Fink, A. (2019). Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction. *Scientific reports*, 9(1), 900.

87. Wang, Y., Ying, X., Chen, L., Liu, Y., Wang, Y., Liang, J., Xu, C., Guo, Y., Wang, S., Hu, W., Du, Y., & Chen, Z. (2016). Electroresponsive Nanoparticles Improve Antiseizure Effect of Phenytoin in Generalized Tonic-Clonic Seizures. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(3), 603–613.
88. Li, Z., Li, Q., Simon, S., Guven, N., Borges, K., & Youan, B. B. (2007). Formulation of spray-dried phenytoin loaded poly(epsilon-caprolactone) microcarrier intended for brain delivery to treat epilepsy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(5), 1018–1030.
89. Zhao, J., Ye, Z., Yang, J., Zhang, Q., Shan, W., Wang, X., Wang, Z., Ye, S., Zhou, X., Shao, Z., & Ren, L. (2020). Nanocage encapsulation improves antiepileptic efficiency of phenytoin. *Biomaterials*, 240, 119849.
90. Rosillo-de la Torre, A., Zurita-Olvera, L., Orozco-Suárez, S., Garcia Casillas, P. E., Salgado-Ceballos, H., Luna-Bárceñas, G., & Rocha, L. (2015). Phenytoin carried by silica core iron oxide nanoparticles reduces the expression of pharmacoresistant seizures in rats. *Nanomedicine (London, England)*, 10(24), 3563–3577.
91. Mishra, V., Bansal, K. K., Verma, A., Yadav, N., Thakur, S., Sudhakar, K., & Rosenholm, J. M. (2018). Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 10(4), 191.
92. de Oliveira, E. G., Cardoso, A. M., Paese, K., Coradini, K., de Oliveira, C. V., Pohlmann, A. R., Oliveira, M. S., Guterres, S. S., & Beck, R. (2018). Reconstituted spray-dried phenytoin-loaded nanocapsules improve the in vivo phenytoin anticonvulsant effect and the survival time in mice. *International journal of pharmaceutics*, 551(1-2), 121–132.
93. Abdelbary, G., & Fahmy, R. H. (2009). Diazepam-loaded solid lipid nanoparticles: design and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 10(1), 211–219.
94. Zheng, X. Y., Zhang, H. L., Luo, Q., & Zhu, J. (2011). Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 457079.
95. Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 37(10 Pt 2), 2887–2899.
96. Shinozaki, H., & Konishi, S. (1970). Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain research*, 24(2), 368–371.
97. Taskiran, A. S., & Ergul, M. (2021). The modulator action of thiamine against pentylenetetrazole-induced seizures, apoptosis, nitric oxide, and oxidative stress in rats and SH-SY5Y neuronal cell line. *Chemico-biological interactions*, 340, 109447.
98. Campos, G., Fortuna, A., Falcão, A., & Alves, G. (2018). In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy research*, 146, 63–86.

99. Freitas, M. L., Oliveira, C. V., Mello, F. K., Funck, V. R., Figuera, M. R., Royes, L., Furian, A. F., Larrick, J. W., & Oliveira, M. S. (2018). Na⁺, K⁺-ATPase Activating Antibody Displays in vitro and in vivo Beneficial Effects in the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Neuroscience*, 377, 98–104.
100. Gonzalez-Sulser, A., Wang, J., Motamedi, G. K., Avoli, M., Vicini, S., & Dzakpasu, R. (2011). The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array. *Neuropharmacology*, 60(7-8), 1142–1153.
101. Avoli, M., & Jefferys, J. G. (2016). Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *Journal of neuroscience methods*, 260, 26–32.
102. Du, M., Sun, Z., Lu, Y., Li, Y. Z., Xu, H. R., & Zeng, C. Q. (2019). Osthole inhibits proliferation and induces apoptosis in BV-2 microglia cells in kainic acid-induced epilepsy via modulating PI3K/Akt/mTOR signalling way. *Pharmaceutical biology*, 57(1), 238–244.
103. Thodeson, D. M., Brulet, R., & Hsieh, J. (2018). Neural stem cells and epilepsy: functional roles and disease-in-a-dish models. *Cell and tissue research*, 371(1), 47–54.
104. Graverini, G., Piazzini, V., Landucci, E., Pantano, D., Nardiello, P., Casamenti, F., Pellegrini-Giampietro, D. E., Bilia, A. R., & Bergonzi, M. C. (2018). Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo evaluation. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 161, 302–313.
105. Yousfan, A., Rubio, N., Natouf, A., Daher, A., Al-Kafry, N., Venner, K., & Kafa, H. (2020). Preparation and characterisation of PHT-loaded chitosan lecithin nanoparticles for intranasal drug delivery to the brain. *RSC Advances*, 10(48), 28992-29009.
106. Motawea, A., Borg, T., & Abd El-Gawad, A. (2018). Topical phenytoin nanostructured lipid carriers: design and development. *Drug development and industrial pharmacy*, 44(1), 144–157.
107. Teo, S. Y., Yew, M. Y., Lee, S. Y., Rathbone, M. J., Gan, S. N., & Coombes, A. (2017). In Vitro Evaluation of Novel Phenytoin-Loaded Alkyd Nanoemulsions Designed for Application in Topical Wound Healing. *Journal of pharmaceutical sciences*, 106(1), 377–384.
108. Taskiran, A. S., Ergul, M., Gunes, H., Ozturk, A., Sahin, B., & Ozdemir, E. (2021). The Effects of Proton Pump Inhibitors (Pantoprazole) on Pentylentetrazole-Induced Epileptic Seizures in Rats and Neurotoxicity in the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Cellular and molecular neurobiology*, 41(1), 173–183.