

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİNTEDANİB İÇEREN HEDEFLENDİRİLMİŞ HİBRİT
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI
VE MULTİPL SKLEROZ TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Nihat KURT

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİNTEDANİB İÇEREN HEDEFLENDİRİLMİŞ HİBRİT
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI
VE MULTİPL SKLEROZ TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Nihat KURT

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Levent ÖNER

ANKARA

2024

ONAY SAYFASI**NİNTEDANİB İÇEREN HEDEFLENDİRİLMİŞ HİBRİT NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI VE MULTİPL SKLEROZ TEDAVİSİNDEKİ
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ****Nihat KURT****Danışman: Prof. Dr. Levent ÖNER**

Bu tez çalışması 11.01.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. İmran VURAL*
Hacettepe Üniversitesi
- Üye:** *Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN*
Hacettepe Üniversitesi
- Üye:** *Prof. Dr. Yasemin GÜRİSOY ÖZDEMİR*
Koç Üniversitesi
- Üye:** *Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER*
Gazi Üniversitesi
- Üye:** *Doç. Dr. Tuğba GÜLSÜN İNAL*
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

18 Ocak 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Acık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ... ay ertelenmiştir. (2)
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)

11/01/2024

Nihat KURT

1“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

1. (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
2. (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
3. (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir

*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Levent ÖNER danışmanlığında tarafımda üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Nihat KURT

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim boyunca her zaman desteğini ve güvenini hissettiren, bilimsel ve akademik olarak bana yol gösterip tecrübesini paylaşan saygıdeğer danışman hocam **Prof. Dr. Levent ÖNER**'e,

Doktora eğitimim boyunca Anabilim Dalı Başkanlığı görevi yürüten ve her türlü imkanı sağlayan **Prof. Dr. Sema ÇALIŞ** ve **Prof. Dr. Erem BİLENSOY** hocalarım başta olmak üzere bütün öğretim üyesi hocalarıma ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Tezim boyunca bilimsel yönlendirmeleri ve destekleri ile hep yanımda olan Tez İzleme Komite üyesi hocam **Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN**'a,

Tez çalışmamın yürütülmesinde bilgisiyle ve tecrübesiyle destek olan, enerjik ekibiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum Tez İzleme Komite üyesi hocam **Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY**'a,

Doktora tez çalışmamda bilgisiyle ve ekibiyle her zaman yanımda olan **Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER**'e,

Doktora çalışmam süresince hem bilgileriyle hem de sevgileriyle hep yanımda olan, **Dr. Ecz. Eren AYTEKİN**'e, **Dr. Ecz. Kerem POLAT**'a, **Dr. Ecz. Tuğba ÇOPUR**'a, **Uzm. Ecz. Ahmet AVCI**'ya, **Uzm. Ecz. Yasin ŞENOL**'a, **Dr. Furkan Ömer HALİS**'e ve **Dr. Esra ÖZKAN**'a,

Bu süreçte her zaman yanımda olan ve maddi manevi varlıklarını esirgemeyen, başta biricik eşim **Uzm. Dr. Ayşe SAVAŞ KURT** olmak üzere bütün aile fertlerime,

En çok da ulusumun, annemin ve benim bu günlere gelmem için varlığını esirgemeyen **Mustafa Kemal ATATÜRK**'e derin hürmetlerimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kurt, N. Nintedanib İçeren Hedeflendirilmiş Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Tasarlanması ve Multipl Skleroz Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Bu tez çalışması kapsamında, klinikte antifibrotik ve antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılmakta olan Nintedanib (ND) ilacının in vivo deneysel otoimmün ensefalomiyelit (DOE) modeli oluşturulan farelerdeki antifibrotik etkisi, multipl skleroz (MS) tedavisinde yaygın olarak kullanılan metil prednizolon ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, kan-beyin engeli (KBE)'yi çok düşük miktarda geçtiği bilinen ND'nin bu engeli aşmak için sıklıkla tercih edilen taşıyıcı sistemlerden biri olan polimerik iç çekirdek lipit dış kabuk yapısına sahip hibrit nanopartikül (HNP) ilaç taşıyıcı sistemine yüklenmiştir. Ayrıca, tasarlanan HNP'lerin MS'ye bağlı olarak omurilikte biriktiği belirlenen tip I kolajene seçici olarak hedeflenmesi için tip I kolajene özgül bir peptit (TKKTLRT peptiti) konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Peptit konjugasyonunun teyit edilmesinin ardından hazırlanan HNP formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları (partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, morfoloji, ilaç yükleme, ilaç salım özellikleri) yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonların L929 hücreleri üzerindeki sitotoksitesi değerlendirilmiştir. DOE modeli geliştirilmiş farelerde yapılan klinik skorlama ile peptit konjuge edilmiş, ND yüklü HNP'nin etkin olduğu bulunmuştur. Ayrıca, miyelin bazik protein ve tip I kolajende gerçekleşen değişimler gözlemlenmiştir. Hayvanlardan elde edilen beyin ve omurilik dokularında yürütülen metabolomik çalışmalarla MS ile ilişkili maddelerin miktarlarında değişimler saptanmıştır. HNP'ye peptit konjuge edilmesinin hastalık bölgesine daha fazla ilaç taşınması sağlandığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hibrit nanopartikül; ilaç taşıyıcı sistem; nintedanib; multipl skleroz; PLGA; peptit; aktif hedeflendirme

ABSTRACT

Kurt, N. Design of Targeted Hybrid Nanoparticle Formulations Containing Nintedanib and Evaluation of Their Efficacy in Multiple Sclerosis Treatment, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Programme, PhD Thesis, Ankara, 2024. Within the scope of this thesis study, the effect of Nintedanib, which is used in the clinic for its antifibrotic and anti-inflammatory effects, in mice with in vivo experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model was evaluated by comparing it with methyl prednisolone, which is widely used in multiple sclerosis (MS) treatment. For this purpose, ND, which is known to cross the blood-brain barrier (BBB) in very low amounts, was loaded into a hybrid nanoparticle (HNP) drug carrier system with a polymeric inner core lipid outer shell structure, which is one of the frequently preferred carrier systems to overcome the BBB. In addition, the designed HNPs were conjugated with a type I collagen-specific peptide to selectively target type I collagen, which was found to accumulate in the spinal cord due to MS. HNPs with suitable properties (particle size <200 nm, etc.) were designed to overcome KBE and the HNP formulation was conjugated with an appropriate proportion of peptides. Drug loading efficiency and release kinetics of the formulations were calculated. The cytotoxicity of ND and HNP formulations were evaluated on L929 cells. Clinical scoring in mice showed that peptide-conjugated, ND-loaded HNP was effective in the treatment of MS, and changes in myelin basic protein and type I collagen were observed. In addition, brain and spinal cord tissues obtained from animals. Metabolomic studies carried out in brain and spinal cord tissues obtained from animals revealed changes in the amounts of substances associated with MS. It has been shown that peptide conjugation to HNP provides more drug transport to the disease site. With these studies for HNP formulations designed for the treatment of MS, it has been found that the formulations are safe and as effective as the market preparation.

Keywords: Hybrid nanoparticle; drug delivery system; nintedanib; multiple sclerosis; PLGA; peptide; active targeting

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Multipl Skleroz	4
2.2. Multipl Skleroz Araştırmalarında Kullanılan Deneysel Modeller	6
2.2.1. İn Vitro Modeller	9
2.2.2. İn Vivo Modeller	10
2.3. Multipl Skleroz Tedavisi ve Sınırlamalar	11
2.4. İlaçların Merkezi Sinir Sistemine Erişmesindeki Engeller	14
2.5. İlaçların Merkezi Sinir Sistemine Taşınması için Geliştirilen Stratejiler	15
2.6. Etkin Madde - Nintedanib	28
2.7. Peptit - TKKTLRT	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler	32
3.2 Nintedanib'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	34
3.2.1. UV Spektrofotometresi	34
3.2.2. Fourier Transform Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometresi	34
3.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	35
3.2.4. Erime Noktası Tayini	35

3.3. Nintedanib'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	35
3.4. Analitik Yöntem Validasyonu	36
3.4.1. Doğrusallık	36
3.4.2. Doğruluk	37
3.4.3. Kesinlik	37
3.4.4. Duyarlılık	38
3.4.5. Özgüllük (Seçicilik)	38
3.4.6. Stabilité	38
3.5. Nintedanib Çözünürlük Çalışmaları	39
3.6. Formülasyon Çalışmaları	39
3.6.1. Konjugasyon İşlemi Yapılmamış Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması	40
3.6.2. Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonu	42
3.6.3. Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonunun Kontrolü	42
3.6.4. Konjugasyon İşlemi Yapılmış/Yapılmamış Hibrit Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	44
3.6.5. Hibrit Nanopartiküllere Nintedanib Yükleme Etkinliğinin Değerlendirmesi	44
3.6.6. İn Vitro Salım Çalışması ve Salım Kinetik Modeli	44
3.6.7. Hibrit Nanopartiküllerin Sterilizasyonu	46
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	47
3.8. İn Vivo Çalışmalar	47
3.8.1. Farelerde MS Oluşturulması ve MS Skorlaması Yapılması	47
3.8.2. İmmünofloresan ve İmmünohistokimya	49
3.8.3. Görüntü Analizi	51
3.8.4. Beyin ve Omuriliğe Taşınan Nintedanib Miktarının Tayini ve Metabolomik Analizler	52
3.9. İstatistiksel Analizler	53
4. BULGULAR	55
4.1. Nintedanib'in Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	55

4.1.1. UV Spektrumu	55
4.1.2. FT-IR Spektrumu	56
4.1.3. DSC Termogramı	57
4.1.4. Erime Derecesi Tayini	57
4.2. Nintedanib'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	58
4.3. Analitik Yöntem Validasyonu	58
4.3.1. Doğrusallık	58
4.3.2. Doğruluk	59
4.3.3. Kesinlik	60
4.3.4. Duyarlılık	61
4.3.5. Özgüllük (Seçicilik)	61
4.3.6. Stabilité	62
4.4. Çözünürlük Çalışmaları	62
4.5. Formülasyon Çalışmaları	62
4.5.1. Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması	62
4.5.2. Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonu	63
4.5.3. Konjugasyon İşlemi Yapılmamış ve Yapılmış Hibrit Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	66
4.5.4. Nintedanib Yükleme Etkinliğinin Değerlendirmesi	68
4.5.5. İn Vitro Salım Çalışması ve Salım Kinetik Modeli	69
4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	73
4.7. İn Vivo Çalışmalar	75
4.7.1. Farelerde MS Skorlaması	75
4.7.2. İmmünofloresan Görüntüleme ve Analizler	78
4.7.3. Beyin ve Omuriliğe Taşınan Nintedanib Miktarının Tayini ve Metabolomik Analizler	80
5. TARTIŞMA	88
5.1. Nintedanib'in Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	89
5.2. Nintedanib'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	90

5.3. Nintedanib'in Çözünürlük Çalışmaları	92
5.4. Formülasyon Çalışmaları	92
5.4.1. Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	92
5.4.2. Nintedanib Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	97
5.4.3. İn Vitro Salım Çalışması ve Salım Kinetiği Değerlendirilme	97
5.4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	98
5.5. İn Vivo Çalışmalar	99
5.5.1. Farelerde MS Skorlaması	99
5.5.2. İmmünofloresan Görüntüleme ve Analizler	101
5.5.3. Beyin ve Omuriliğe Taşınan Nintedanib Miktarının Tayini ve Metabolomik Analizler	101
6. SONUÇ	104
7. KAYNAKLAR	106
8. EKLER	136
Ek 1. Etik Kurul Kararı	
Ek 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
Ek 3. Yayın Bilgisi	
Ek 4. Orijinallik ekran görüntüsü	
Ek 5. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	146

SİMGELER VE KISALTMALAR

BCA	Bikinkoninik asit
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSS	Bağlı Standart Sapma
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMF	Dimetil formamit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMT	Hastalığın seyrini değiştirici tedavi
DOE	Deneyisel otoimmün ensefalomyelit
DPBS	Dulbecco fosfat tamponu
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSPE-	1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[amino-
PEG-	(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG)-maleimit
Maleimit	
ECM	Hücreler arası ortam
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPR	Artmış geçirgenlik tutma etkisi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
IFN-β 1b	İnterferon beta-1b
HNP	Hibrit nanopartikül
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KBE	Kan-beyin engeli
KBOSE	Kan-beyin omurilik sıvısı engeli
KLN	Katı lipit nanopartiküller
KOE	Kan-omurilik engeli
KRE	Kan-retina engeli
KSE	Kan-sinir engeli
MAG	Miyelinle ilişkili glikoprotein
MBP	Miyelin bazik protein

MOG	Miyelin oligodendrosit glikoproteini
MP	Metil prednizolon
MS	Multipl skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
ND	Nintedanib
NK	Nil kırmızısı
NLT	Nanoyapılı lipit taşıyıcılar
NO	Nitrik oksit
OCT	Optimum kesme sıcaklığı
PACA	Poli(alkilsiyanoakrilat)
P-gp	P-glikoprotein
PBS	Fosfat tamponu
PCL	Poli(kaprolakton)
PDI	Polidispersite indeksi
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDC	Peptit-ilaç konjugatı
PEG	Polietilen glikol
PFA	Paraformaldehit
PGA	Poli(glikolik asit)
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PPMS	Birincil ilerleyici multipl skleroz
PRMS	İlerleyici Nükseden MS
RES	Retikuloendotelyal sistem
RRMD	Tekrarlayan ve düzelen multipl skleroz
SPMS	İkincil İlerleyici multipl skleroz
SS	Standart sapma
TCEP	Tris(2-karboksietil)fosfin
TEM	Taramalı elektron mikroskobu
TMEV	Theiler fare ensefalomiyelit virüsü
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 Dünya MS prevalans haritası (100.000 kişi başına).	5
2.2 Kan-sinir engelleri.	14
3.1 Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi	41
3.2 Hibrit nanopartiküllerin peptit ile konjugasyonunun şematik gösterimi	43
3.3 Fare omuriliği ve omurilik kesiti alma süreci a) Kardiyak perfüzyon sonrası çıkartılan omuriliğin saklanması, b) <i>Crytome</i> cihazıyla OCT kaplı dokulardan kesit alınması, c) Elde edilen omurilik kesitleri, d) Boyanan kesitlerin kapatılması.	50
4.1 Nintedanib'in UV spektrumu (10 µg/mL).	55
4.2 Nintedanib'in FT-IR spektrumu.	56
4.3 Nintedanib'in DSC spektrumu.	57
4.4 Nintedanib'in HPLC kromatogramı (20 µg/mL).	58
4.5 Doğrusallık çalışmasıyla elde edilen nintedanib kalibrasyon eğrisi (n=6).	59
4.6 Özgüllük çalışmasıyla elde edilen HPLC kromatogramı.	61
4.7 BCA analizine göre HNP, maleimit, (HNP/Peptit:TCEP (1:2)) (2/1) ve Peptit:TCEP (1:2)'ye ait konsantrasyona karşı absorbans grafikleri (n=3, $x \pm SS$).	65
4.8 Formülasyonların TEM görüntüleri. a) F7, b) F14, c) P7, d) P14 kodlu formülasyon.	68
4.9 F14 ve P14 kodlu formülasyonların kümülatif ND salım profilleri (n=6, $x \pm SS$).	69
4.10 F14 formülasyonunun salım kinetiği modelleme grafikleri.	71
4.11 P14 formülasyonunun salım kinetiği modelleme grafikleri.	72
4.12 ND çözeltisi ve HNP formülasyonlarının sitotoksisite bulguları (24 saat) (n=3, $x \pm SS$).	73
4.13 ND çözeltisi ve HNP formülasyonlarının sitotoksisite bulguları (48 saat) (n=3, $x \pm SS$).	74

- 4.14** Şekil 4.14. ND çözeltisi ve HNP formülasyonları uygulanan farelerin DOE skorlama grafikleri (n=6, $\bar{x} \pm SS$). a) Nintedanib çözeltisi uygulanan farelere ait bulgular, b) F7 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular, c) P7 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular, d) F14 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular, e) P14 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular ve f) Bütün formülasyonlardan elde edilen bulgular (a, b, c, d ve e’de yer alan veriler *p<0,5 Tukey çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir, f’de yer alan veriler ise *p<0.5 olarak tekrarlı ANOVA ile karşılaştırılmıştır.). 77
- 4.15** Şekil 4.15. İn vivo deneylerde elde edilen fare omurilik kesitlerine ait görüntüler (yeşil renk (FITC) ile boyanan alanlar kolajen I’i; kırmızı renk (Alexa-647) ile boyanan alanlar MBP’yi; mavi (DAPI) boyanan alanlar hücre çekirdeklerini göstermektedir). a) Sham grubu, b) Negatif kontrol grubu, c) Pozitif kontrol grubu, d) ND çözeltisi grubu, e) F14 uygulanan grup, f) P14 uygulanan grup. 78
- 4.16** Omurilik kesitlerinin boyanması ile elde edilen kolajen I’ e ait % Alan değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$) . (Veriler, tekrarlanan ANOVA ile analiz edildikten sonra gruplar arasındaki istatistiksel fark üzerlerindeki çizgi ile gösterilmiştir (****=p < 0,0001; ***=p < 0,001; **=p < 0,01; *=p < 0,05 ve ns= anlamsız)). 79
- 4.17** F7 ve P7 formülasyonu uygulanan farelere ait omurilik kesitlerinin farklı büyütme değerleri ile görüntüleri (NK yüklü HPN’ler (F7, P7) kırmızı renkte, hücre çekirdekleri (DAPI ile boyanan) mavi renkte görülmektedir). a) Formülasyon F7 (mercek 775x775 μm), b) Formülasyon F7 (mercek 225x225 μm), c) Formülasyon F7 (mercek 112,5x112,5 μm), d) Formülasyon P7 (mercek 775x775 μm), e) Formülasyon P7 (mercek 225x225 μm), f) Formülasyon P7 (mercek 112,5x112,5 μm yakınlaştırılmış). 80
- 4.18** Formülasyonların intraperitoneal uygulamalarından sonra beyin ve omurilik dokularında tespit edilen Nintedanib konsantrasyonları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). Veriler, eşleştirilmemiş t Testi ile analiz edildikten 81

sonra gruplar arasındaki istatistiksel fark üzerlerindeki çizgi ile gösterilmiştir (***)= $p < 0,001$).

4.19	G1 ve G2 gruplarına ait PCA pikleri.	85
4.20	G2 ve G8 gruplarına ait PCA pikleri.	85
4.21	G2 ve G10 gruplarına ait PCA pikleri.	86
4.22	G2 ve G7 gruplarına ait PCA pikleri.	86
4.23	G2 ve G13 gruplarına ait PCA pikleri.	87

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1	MS araştırmaları için geliştirilen in vitro ve in vivo modeller.	7
2.2	Multipl Skleroz tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanan ilaçlar	12
3.1	Hooke Labs Kılavuzuna Göre DOE Skorlaması	49
3.2	İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve seyreltme faktörleri	51
4.1	Nintedanib'in yöntem validasyonuna ait doğruluk, geri kazanım ve BSS değerleri (n=6).	59
4.2	Nintedanib'in yöntem validasyonuna ait tekrarlanabilirlik bulguları (n=6).	60
4.3	Nintedanib'in analitik validasyonuna ait tekrar elde edilebilirlik bulguları (n=6).	60
4.4	Nintedanib'in analitik validasyonuna ait tekrar elde edilebilirlik bulguları (n=6).	62
4.5	Nintedanib'in farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri ($x \pm SS$, n=6).	62
4.6	Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan bazı cihaz parametreleri ve bileşen miktarları.	63
4.7	Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan bazı cihaz parametreleri ve bileşen miktarları (n=3).	63
4.8	HNP, maleimit, (HNP/Peptit:TCEP (1:2)) (2/1) ve Peptit:TCEP (1:2)'ye ait konsantrasyon absorbans verileri ($x \pm SS$, n=3)	64
4.9	Kullanılan maleimit ve peptit mol oranları ve konjugasyon yüzdeleri (n=3).	65
4.10	Konjugasyon işlemi yapılmamış, boş formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI değerleri (n=3, $x \pm SS$).	66
4.11	F7, P7, F14 ve P14 kodlu formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI değerleri (n=3, $x \pm SS$).	67

4.12	F14 ve P14 kodlu formülasyonlara yüklenen ND miktar bulguları (n=3, $x \pm SS$).	69
4.13	F14 ve P14 kodlu formülasyonların salım kinetiği modelleme bulguları.	70
4.14	ND çözeltisi ve HNP formülasyonlarının sitotoksite bulguları (24 saat) (n=3, $x \pm SS$).	73
4.15	ND çözeltisi (ND) ve HNP formülasyonlarının sitotoksite bulguları (48 saat) (n=3, $x \pm SS$).	74
4.16	Omurilik kesitlerinin boyanması ile elde edilen kolajen I'e ait % Alan değerleri (n=3, $x \pm SS$)	79
4.17	Beyin ve omurilik dokularına geçen ND miktarları (n=3, $x \pm SS$).	81
4.18	HMDB'de tanımlanan piklerle eşleşen metabolitler.	82

1. GİRİŞ

Nörolojik hastalıklar beyni ve sinir sistemini etkileyerek yaşam kalitesini düşüren ve hayatı tehdit eden bozukluklardır. Alzheimer, Parkinson, Multipl skleroz (MS) ve Huntington gibi nörolojik hastalıklar, oluşum mekanizması ile diğerlerinden ayrılıp nörodejeneratif hastalıklar olarak adlandırılır. Bu hastalıklarda zamanla sürekli bir nöron kaybı görülmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanan nüfusun artması dikkate alındığında kronik olmaları ve hasarın çabuk gelişmesi nedeniyle son yıllarda daha çok dikkat çekmektedir (1).

İlk defa 1868 yılında Dr. Jean Martin Charcot tarafından merkezi sinir sisteminde (MSS) görülen bir bozukluk olarak tanımlanan MS (2), demiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyonla karakterize kronik bir inflamatuvar bir hastalıktır (3). MS'in genellikle 20-40 yaş aralığındaki yetişkinleri etkilediği (4) ve travma dışı yeti kaybına neden olan en yaygın hastalık olduğu bildirilmiştir (3). MS'de hastada görülen yoğun sıkıntıların yanı sıra, genç yaşta başlaması ve yaygın tutulumu neden olmasından dolayı sosyal ve ekonomik boyutlarıyla toplum için de önemli kayıplara yol açmaktadır (5). Hastalığın sosyoekonomik etkisiyle birlikte MS insidansı dünya çapında artmaktadır (5). Bu artışta karmaşık gen-çevre etkileşimlerinin önemli bir rol oynadığı bilinmesine rağmen MS'nin altında yatan neden hala tam netliğe kavuşmamıştır. MS epidemiyolojisi; düşük D vitamini serum seviyeleri, sigara kullanımı, çocukluk çağında obezite ve *Epstein-Barr* virüsü enfeksiyonunun hastalık gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir (6). Ayrıca, MS'de motor işlev bozukluğu ve bilişsel gerilemenin eşlik ettiği ilerleyici nöron kaybı, bağışıklık tepkileri ve inflamatuvar reaksiyonlar görülmektedir. MS'deki nöroinflamasyon, periferik immün hücrelerin infiltrasyonunu, kan-beyin engeli (KBE)'nin parçalanmasını ve MSS'de yerleşik glial hücrelerin aktivasyonunu içermektedir (7).

Hastalık, MSS'de pek çok yeri etkileyebildiğinden farklı seyir tipleri tanımlayabilmek mümkündür. Genel olarak MS, tekrarlayan-düzelen ("*relapsing-remitting form*") erken inflamasyon ve tekrarlamayan ilerleyici ("*non-relapsing progressive*") gecikmiş nörodejenerasyon olarak iki aşamalı biçimde tanımlanabilir (8, 9). Tanı yöntemlerinde meydana gelen gelişmeler, bireylerdeki hastalık durumunun daha erken teşhis edilebilmesine olanak sağlamaktadır.

MS tedavisi genellikle hastalığın seyrini değiştirici tedaviler (DMT) ve nörolojik işlev bozukluğundan kaynaklanan belirtileri ortadan kaldırmak için uygulanan tedaviler olarak ikiye ayrılır (10). Hastalığın seyrini değiştirici tedavilerin sayısı ve etkinliği arttıka, uzun vadede yeti kaybını önlemek için MS'nin erken tedavisine olan ilgi artmıştır (10). MS tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından şu ana kadar onaylanmış 22 ilaç olsa da hiçbiri hastalığı bütünüyle iyileştirip ortadan kaldırmamaktadır (2).

MS'nin tam olarak tedavi edilmesi için, lezyonlara ilaçların istenen düzeyde taşınarak tedavinin etkinliğinin artırılması, araştırmaların odak noktasıdır. Bu araştırmalarda nanoteknoloji yaklaşımı ile hazırlanan nanofarmasötikler, mevcut sorunların ortadan kaldırılması için ilaç dozunu en aza indirmek, sistemik yan etkilerden kaçınmak ve kontrollü ilaç salımı sağlamak gibi çeşitli çözümler sunmaktadır (11).

MS'de görülen lezyonların patofizyolojisine bağlı olarak, hastalığın ilerlemesi sırasında hem hücre hem de hücreler arası ortam (ECM) bileşenlerinde değişimler meydana gelmektedir. ECM'nin ana bileşeni olan kolajen, doku yapısında, yenilenmesinde ve yeniden şekillenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (12). Yaklaşık 29 tip kolajen tanımlanmış (13) ve bunlardan bazılarının in vitro nöron büyümesi için yapı iskelesi olarak kullanılmak üzere büyük bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (14). Buna ilaveten, kolajen dahil ECM bileşenlerinin aşırı birikmesi olarak tanımlanan fibrozis, çeşitli bozuklukların patolojik bir özelliğidir (12).

Perisitler ve reaktif astrositler tarafından salınan tip I (15), III ve V fibriler kolajenlerin (16, 17), hem aktif hem de aktif olmayan MS lezyonlarında artış gösterdiği ve bağışıklık hücrelerinin MSS'ye sızmasına karşı damarların etrafında kimyasal ve fiziksel bir bariyer olduğu varsayılan bir ağ yapısının oluşumuna katıldığı tespit edilmiştir (17).

Yapılan bir çalışmada, MS modeli olarak deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) oluşturulan farelerde MSS'de artmış fibrozis görülmüş ve MS tanılı hasta serumu ile inkübe edilen insan beyni perivasküler perisit hücre kültüründe artmış kolajen düzeyi in vitro deneylerle desteklenmiştir (18).

Nintedanib (ND); vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptörlerini

güçlü bir şekilde bloke eden eden indolinon türevi bir ilaçtır (19). ND klinikte idiyopatik pulmoner fibrozisin (IPF) tedavisinde kullanılmaktadır (20).

Bu tez çalışması kapsamında, halihazırda klinikte IPF tedavisinde kullanılan bir ilaç olan ND'nin (saf halde veya nanopartiküle yüklü olarak) DOE modeli oluşturulan farelerdeki antifibrotik etkisi, MS tedavisinde yaygın olarak kullanılan metil prednizolon ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, MS tedavisi için kolajen I'e aktif olarak hedeflendirilmiş, ND içeren hibrit nanopartikül formülasyonları tasarlanmış, in vitro karakterizasyon, hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiş ve formülasyonların intraperitoneal olarak DOE modeli oluşturulan farelere uygulanmasıyla in vivo etkinlikleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Multipl Skleroz

MS, genç erişkinlerin MSS'inde görülen (21), kronik, inflamatuvar ve demiyelinizan özellikte nörodejeneratif bir hastalıktır (22). MS aynı zamanda bağışıklık aracılı miyelin yıkımının gerçekleştiği organa özgü bir hastalık (beyin ve omurilik) olarak tanımlanmaktadır (23). Dünya çapında toplam 2,8 milyon insanda MS hastalığı olduğu tahmin edilmektedir (100.000 nüfus başına 35,9). MS görülme sıklığı 2013'ten beri dünyanın her bölgesinde artmıştır. Yetmiş beş ülkenin verilerine göre havuzlanmış insidans oranı yıllık 100.000 kişi başına 2,1'dir ve ortalama tanı yaşı 32'dir. Türkiye'de ise bildirilen 58.401 MS hastası vardır. Dünya ve Türkiye'deki MS prevalans haritası Şekil 2.1'de gösterilmiştir (24). Kadınlarda MS görülme sıklığı erkeklerin iki katıdır (24). MS, farklı klinik bulgulara sahiptir ve belirtilerde, lezyonların nöroradyolojik, histolojik görünümünde ve tedaviye yanıtta heterojenlik söz konusudur (25).

MS lezyonlarında demiyelinizasyon mekanizmaları dört modele ayrılabilir (25, 26).

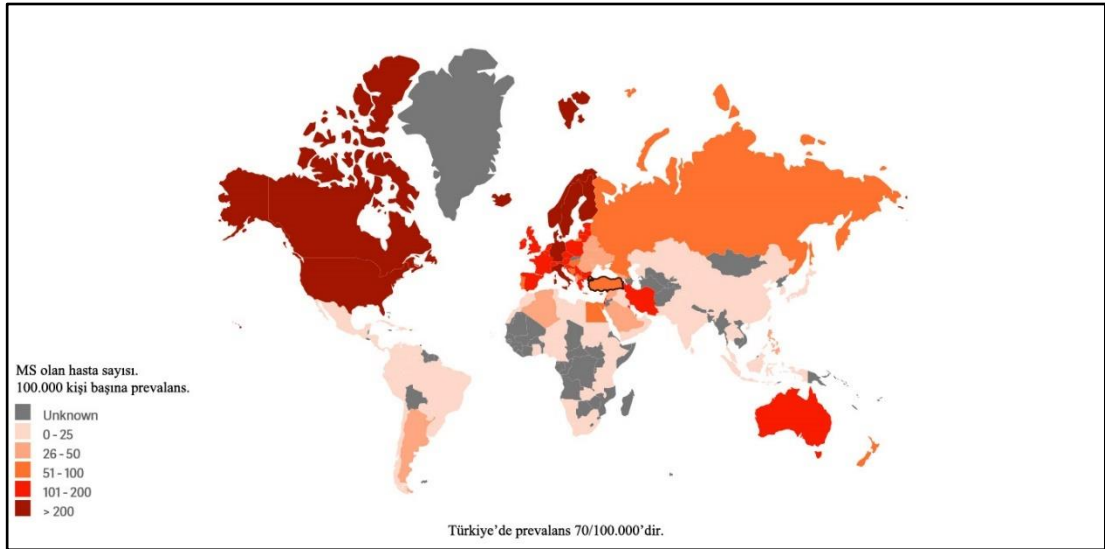
Model 1: Miyelinin aktive edilmiş makrofajlardan salınan toksik ürünlerin (tümör nekroz faktörü alfa; TNF- α ve nitrik oksit; NO) etkisiyle yok edildiği DOE modeline benzeyen makrofajla ilişkili demiyelinizasyon şeklidir (27, 28).

Model 2: Lezyonlar, miyelin oligodendrosit glikoproteinine (MOG) karşı duyarlılaşarak oluşturulan DOE modeline benzemektedir; miyelin hasarı olan alanlar, immünoglobulin ve aktive olmuş kompleman birikimi ile ilişkilidir (29).

Model 3: Lezyonlar; makrofajlar, aktifleşmiş mikroglia ve T hücrelerinden oluşan sızmış bir inflamatuvar hücre yığını içerir ve miyelinle ilişkili glikoproteinde (MAG) önemli bir kayıp yaşanır. Bu modelde oligodendrosit kaybına remiyelinizasyon eşlik eder. MAG kaybının, aksonun gerekli metabolik ihtiyaçlarının karşılanamadığı distalden proksimale doğru oligodendrogliopati gelişmesine yol açtığı düşünülmektedir (30).

Model 4: Birincil ilerleyici MS (PPMS) olan hastalarda nadiren karşılaşılan bu modelde; lezyonlara makrofajlar, aktifleşmiş mikroglia ve T hücreleri de dahil olmak

üzere çok sayıda inflamatuvar hücre sızar. Ancak MAG kaybı yoktur ve immünooglobulin veya kompleman birikimine rastlanmaz. Lezyona komşu beyaz cevher bölgesinde ise apoptotik olmayan oligodendrosit ölümü gözlenir. Bu duruma özellikle inflamasyonun neden olduğu toksik hasara karşı oligodendrositlerdeki metabolik bir bozukluğun bu hücreleri duyarlı hale getirerek yol açtığı düşünülmektedir (30).



Şekil 2.1. Dünya MS prevalans haritası (100.000 kişi başına) (24).

MS'nin etiolojisinin tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesinin genetik, enfeksiyöz, immünolojik ve çevresel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (31). MS'nin en sık gözlenen belirtileri arasında uyuşma, kaşıntı, yanma gibi duyu sorunları, görme sorunları, yürüme güçlüğü, kabızlık, mesane işlev bozukluğu, bilişsel bozukluk, vertigo ve baş dönmesi yer alır (32). Daha az görülen belirtiler arasında ise yutma, nefes alma ve konuşma problemleri vardır (33).

Hastalığın seyri, belirtilerin tipine ve şiddetine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Buna göre MS, başlıca dört sınıfta değerlendirilebilir (34):

1) Tekrarlayan ve düzelen MS (RRMS): RRMS, en yaygın MS tipidir ve hastaların yaklaşık %85'inde görülmektedir. Nörolojik işlevlerde düşüş veya ataklar

meydana gelmektedir, atakları takiben kısmi veya tam düzelme görülebilmektedir (35).

2) İkincil İlerleyici MS (SPMS): Başlangıçta RRMS tanısı alan bazı hastalarda ataklar belirgin olmayabilir fakat zamanla ilerleyici bozulma gerçekleşmektedir (35).

3) Birincil İlerleyici MS (PPMS): Hastaların yaklaşık %10'unda rastlanılan bu tipte, tahribata uğrayan nörolojik işlevlerin düzelme ihtimali yoktur, nüks görülmemektedir (36).

4) İlerleyici Nükseden MS (PRMS): Hastaların sadece %5'inde görülmektedir. Nörolojik işlevlerde tahribat olup lezyonlarda da artış gözlemlenir ve düzelme olasılığı yoktur (36).

2.2. Multipl Skleroz Araştırmalarında Kullanılan Deneysel Modeller

Yapılan araştırmalarda MS hastalarının birey içi ve bireyler arası heterojen lezyonlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, heterojen bir hastalığın etiolojisinden ziyade tek bir patofizyolojik mekanizmanın evrimi olarak yorumlanmıştır (37).

Uzun yıllardır süregelen kapsamlı araştırmalara rağmen MS'nin etiolojisi hala bilinmemektedir ve hastalığın etkili bir tedavisi henüz bulunamamıştır. İnsan MSS üzerinde çalışmanın zorluğu nedeniyle, MS ve KBE'yi incelemek amacıyla in vitro ve in vivo modeller geliştirilmiştir (38–40). Bu modeller hastalık patofizyolojisi hakkında bilgi edinmek, yeni ilaçları test etmek ve MSS doku örnekleri elde etmek için kullanılmıştır (41, 42). MS'te yaygın olarak kullanılan in vitro ve in vivo modellerin bir özeti Tablo 2.1'de sunulmuştur (43). MS için geliştirilen hayvan modellerini kısaca şu şekilde sıralamak mümkündür: 1. Otoimmün modeller; 2. Transgenik modeller, 3. Viral modeller ve 4. Kimyasal bazlı modeller (39, 44, 45). MS'nin klinik seyrini, nöropatolojik ve immünolojik özelliklerini yansıtan tek bir hayvan modeli henüz bulunamamıştır. MS patolojisi ve tedavisine ilişkin bilgiler büyük ölçüde nöroinflamasyon ve demiyelinizasyonla ilgili mekanizmalar hakkında bulgu sağlayan

hayvan çalışmalarından elde edilmiştir (46). Hayvan modelleri MS'nin nedeni ve tedavisinin bulunması için translasyonel araştırmalarda önemli araçlardır (47).

Tablo 2.1. MS araştırmaları için geliştirilen in vitro ve in vivo modeller (43).

Modeller		Üstünlükleri	Zayıflıkları
İn vitro	Primer kemirgen hücreleri	- Oturmuş protokol, - Yüksek tekrarlanabilirlik .	- Kemirgen ve insan MSS hücrelerinin benzer kültür koşullarına farklı tepki vermesi, - Embriyonik aşamalardan izole edilen hücrelerle sınırlı olma, - Klinik araştırmalara geçişte düşük başarı oranı, - Patogenezi kısmen taklit etme.
İn vitro	Primer insan hücreleri	- İnsana özgü yanıtların anlaşılabilmesi.	- Etik sorunlar, - Düşük canlılık, - Elde edilme, çoğaltılma ve bakım zorluğu, - Patogenezi kısmen taklit etme.
İn vitro	Ölümsüzleştirilmiş insan hücre hatları	- Üretim ve kullanımda maliyet ve zaman tasarrufu, - İlaç görüntülemeye elverişli olma.	- MSS hücrelerinin işlevselliğini ve farklılaşma fenotipini sıklıkla göstermeme, - Patogenezi kısmen taklit etme.
İn vitro	İnsan kaynaklı pluripotent kök hücreleri	- Sınırsız MSS hücresi kaynağı,	- Epigenetik değişiklikler MS fenotipinin

türetilmiş MSS hücre hatları	<ul style="list-style-type: none"> - Hastalığa özgü etkileri inceleme potansiyeli, - Hastanın kendi dokusundan kolayca elde edilme, - İmmün ret olmaması, - Hayvan modeline geçişte büyük potansiyel. 	<ul style="list-style-type: none"> tanımlanmasını önleyebilme, - Tümör oluşma potansiyeli, - Farklılaşma potansiyelinde değişkenlik, - Pahalı olma, - Patogenezi kısmen taklit etme.
Organotipik beyin dilim kültürleri/ beyin organoidleri	<ul style="list-style-type: none"> - MSS'nin yapısının korunması, - Karmaşık elektriksel ve biyokimyasal yolların uyarılmasının sağlama. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tek hücre tipinin incelenmesinin zor olması, - Çoğunlukla neonatal veya genç hayvandan izole edilme, - Tek hücreli veya karışık hücreli kültürler kadar çoğaltılamama, - Düşük verimli analiz modeli olma.
İn vivo Kemirgen modelleri	<ul style="list-style-type: none"> - Çok sayıda uygun transgenik hayvan, - Nörodejenerasyonu ve inflamasyonu incelemek için uygun, - Klinik öncesi güvenlik çalışmalarına uygun olma. 	<ul style="list-style-type: none"> - Patogenezi kısmen taklit etme, - Klinik araştırmalara geçişte düşük başarı oranı.

İnsan harici primatlar	- Bazı tedavilerin kliniğe geçişine olanak tanıma, - Klinik öncesi güvenlik çalışmalarına uygun olma.	- Maliyeti yüksek, - Patogenezi kısmen taklit etme.
------------------------	--	--

2.2.1. İn Vitro Modeller

İmmün sistem ile MSS arasındaki etkileşimleri anlamak üzere yapılan araştırmalarda mikrogliya, oligodendrosit, astrosit ve nöronların in vitro kültürleri geliştirilmiştir. Bu araştırmalarda insan MSS primer kültürlerinin elde edilmesi ve sürdürülmesindeki zorluklar nedeniyle, kemirgen MSS hücrelerinin veya dönüştürülmüş insan hücrelerinin kültürleri kullanılmıştır. Kemirgen MSS hücrelerinin primer kültürleri uygun olmakla birlikte, bu kültürler embriyonik aşamalarda izole edilen hücrelerle sınırlıdır. Özellikle nöron ve oligodendrositlerin yetişkin hayvanlardan ve insan dokularından elde edilmesi ise çok zordur (48, 49). Bu nedenle araştırmalarda genellikle insan dönüştürülmüş hücre hatları kullanılır. Bununla birlikte, ölümsüzleştirilmiş oligodendrosit hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar, bu hücre hatlarının bazı durumlarda kullanılabilmesine rağmen işlevselliklerini ve farklılaşma fenotiplerini tamamen yeniden üretemediklerini göstermiştir (50). Sağlıklı durumda ve hastalıkta işlev ve özelliklerin saptanmasında anahtar role sahip olan glial hücre hatlarında da benzer bir durum gözlenmektedir (51).

MS araştırmalarında, hastalığın ilerlemesine aksonal hasar ve nörodejenerasyonun katkıda bulunduğu keşfedilmesiyle, nöron hücrelerinin kullanımı artmıştır (48). MS araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücre hatlarından biri, retinoik asitle farklılaştırılabilen nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y'dir (52, 53). HCN (54) ve NT2 (55) hücre hatları ise beyinden türetilmiş büyüme faktörü ile farklılaşmaktadır. Bununla birlikte, bu hücreler olgun hücrelerin

birçok belirtecini ifade etmemektedir. Bu hücre hatlarının çoğalmasında yavaş ve pahalı büyüme faktörleri gerektirmektedir (48).

Yukarıda bahsi geçen in vitro modellerin önemli sakıncalarından biri, tek hücre hattından elde edilen sonuçların bu hücrelerin sağlam dokudaki davranışını tam olarak yansıtamayabilmesidir (48).

Hücre kültürleri, tedavide kullanımı olası ilaç moleküllerinin ortaya çıkarılmasına yardımcı olabilir ancak bu moleküllerin etkililiğini ve güvenliğini doğrulamak için in vivo modeller gereklidir (48).

2.2.2. İn Vivo Modeller

MS patogenezinin mekanizmaları hakkındaki bilgilerin çoğu, farelerin miyelin peptitleri ile immünizasyonunun T hücresi aracılığıyla miyelin yıkımını indüklediği DOE modeli gibi hayvan modeli çalışmalarından elde edilmiştir. DOE, MS'nin MSS enfeksiyonu, immün takibi ve immün aracılığıyla doku hasarı gibi çeşitli yönlerinin anlaşılmasında büyük fayda sağlamıştır (38). Ayrıca bu model, miyelin peptitleriyle immünizasyon aksomal hasarın yanı sıra inflamatuvar demiyelinizasyonun altında yatan moleküler mekanizmaların incelenmesine olanak sağlamıştır (39). Bu model, MS tedavisi için glatiramer asetat, mitoksantron ve natalizumab gibi çeşitli ilaçların onaylanmasına katkı sağlamıştır. DOE'ye dayanan klinik öncesi deneyler sonucunda elde edilen olumlu bulgular, MS için klinik çalışmaların yapılmasını sağlamıştır (46).

Shiverer fareleri DOE fareleri dışında, MS patolojisinin incelenmesinde en çok kullanılan ikinci hayvan modelidir. Bu hayvanlar, miyelin bazik protein (MBP) geninde MSS'de miyelinin oligodendrosit üretimini bozan ve demiyelinizasyon süreçlerini incelemek için in vivo modeller haline getiren bir mutasyona sahiptir (56).

DOE'ye benzer şekilde, viral modeller de MS'nin inflamatuvar yönlerini yansıtır. MS'ye özgü bir virüs enfeksiyonuna dair kesin bir kanıt bulunmamasına rağmen, Theiler fare ensefalomyelit virüsü (TMEV), MS'de gözlenenlere benzer histolojik özelliklere sahip kronik ilerleyici inflamatuvar demiyelinizasyonu indükleyebilir (39, 45). TMEV en yaygın kullanılan viral model olmasına rağmen, *Murine* hepatit virüsü, *Semliki Forest* virüsü ve *Sindbis* virüsü dahil olmak üzere başka virüsler de kullanılmaktadır (45).

Diğer in vivo MS modelleri arasında kuprizon, etidyum bromür ve lisolesitin maddelerinin kullanıldığı modeller bulunmaktadır (39). Her kimyasal madde farklı bir şekilde demiyelinizasyona neden olmaktadır. Bu farklar astrositlerin yok olmalarının kapsamı ve miyelin parçalanmasının dinamiğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu modellerin bileşiğın uygulanmasından sonra kronik hale gelebilecek veya gelmeyebilecek küçük bir alanla sınırlı demiyelinizasyon oluşturduğu bildirilmiştir (57). Bu modeller demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon hakkında bilgi sağladıkları için bu konudaki araştırmalara ışık tutmuştur (39, 58).

Hayvan modelleri hastalığın ilerlemesinin çeşitli yönlerini taklit eden değerli sistemler olsa da insanlardaki MS ile tam olarak eşleşmemektedir (48). Ayrıca, hayvan modellerinin kullanıldığı yeni ilaç geliştirme çalışmalarında tedaviler genellikle hastalığın erken evresinde başlarken, bu ilaçlar insanlarda hastalığın geç evresinde uygulanmaktadır. Buna ilaveten, geliştirme çalışmalarının çoğunda genetik açıdan homojenliğe sahip, kendi içinde melezlenmiş fare türleri kullanılmaktadır ve genellikle bu farelerde insan popölasyonunda bulunması çok zor olan genetik bozukluklar bulunmaktadır (59). Bu durumların MS’de klinik öncesi bulguların klinik safhaya geçmesinin önündeki engeller olduğu bildirilmiştir (48, 58).

2.3. Multipl Skleroz Tedavisi ve Sınırlamalar

Klinikte şu anda MS’nin kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Mevcut tedaviler ancak MS ataklarının etkisini azaltan ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatan çeşitli ilaçları içermektedir (60). MS’de kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış ilaçlar Tablo 2.2’de listelenmiştir. Bunlar arasında İnterferon beta-1b (IFN- β 1b), DMT, 1993 yılında FDA tarafından MS için onaylanan ilk ilaçtır ve etki mekanizması hala bilinmemektedir (61). Bu ilaçlar genellikle nörodejenerasyonun ilerlemesini dolaylı olarak yavaşlatan nöroinflamasyonu azaltarak etki gösterir. Nüks görölen MS hastalarının tedavisinde intravenöz (i.v.) kortikosteroidler veya adrenokortikotropik hormon enjeksiyonları inflamasyonu azalttıkları için kullanılmaktadır. MS tedavisinde oral kullanım için 2010 yılından bu yana 10’dan fazla ilaç FDA’dan onay almıştır (62).

Tablo 2.2. Multipl Skleroz tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanan ilaçlar

İlaç	Dozaj ve uygulama yolu	Etki Mekanizması	En yaygın yan etkiler	Aktivite bölgesi	Referans
İnterferon β-1b	250 µg, s.c.	T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder	Enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar, lenfopeni, miyalji	Periferik	(63–65)
İnterferon β-1a	30 µg, i.m.	T ve B hücre aktivasyonunu azaltır	Enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar (nekroz dahil), miyalji	Periferik	(66–68)
Glatiramer asetat	20-40 mg, s.c.	Antiinflamatuvar, T hücrelerini bloke eder	Enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar, vazodilatasyon, döküntü, nefes darlığı	Periferik	(69,70)
Mitoksantron	12 mg/m ² , i.v.	Topoizomeraz-II inhibitörü, immünsupresan	Kardiyak toksisite, üst solunum yolu enfeksiyonu, menstrüasyon bozuklukları	Periferik	(71, 72)
İnterferon β-1a	4 µg, s.c.	T ve B hücre aktivasyonunu azaltır	Enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar (nekroz dahil), depresyon, karaciğer enzimlerinde yükselme	Periferik	(73, 65)
Natalizumab	300 mg, i.v.	Lenfositlerin MSS'ye erişimini engeller	Yorgunluk, idrar yolu enfeksiyonu, alt solunum yolu enfeksiyonu	Periferik	(62, 74)
Fingolimod	0,5-7-14 mg, oral	S1P reseptör inhibitörü	GİS bozuklukları, karaciğer transaminaz yüksekliği, öksürük	Periferik ve merkezi	(75–77)
Teriflunomid	7-14 mg, oral	Pirimidin sentez inhibitörü, T ve B hücre aktivasyonunu azaltır	Hepatotoksisite, nefrotoksisite, GİS bozuklukları	Periferik	(78, 79)
Dimetil fumarat	120-240 mg, oral	Antiinflamatuvar ve nöroproteksiyon	İsilik, GİS bozuklukları	Periferik ve merkezi	(80, 81)
Alemtuzumab	96 mg, i.v. infüzyon	Treg bağımlı immün regülasyon indüksiyonu	Döküntü, nazofarenjit, bulantı, idrar yolu enfeksiyonu	Periferik	(82–84)
Peg interferon β-1a	125 µg, s.c.	T ve B hücre aktivasyonunu azaltır	Enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar, ateş, baş ağrısı	Periferik	(65, 85)
Daklizumab	150 mg, s.c.	T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder	Şiddetli enfeksiyonlar, cilt reaksiyonları, anormal karaciğer fonksiyonu	Periferik ve merkezi	(86–88)
Ocrelizumab	300-600 mg, i.v.	Dolaşımdaki B hücrelerini azaltır	İnfüzyona bağlı reaksiyonlar, üst solunum yolu enfeksiyonu	Periferik	(89–91)
Kladribin	10 mg, oral	Sürekli immünsupresyon olmadan T ve B hücrelerini hedef alan adenozin benzeri ön ilaç	Üst solunum yolu enfeksiyonu, lenfopeni, bulantı	Periferik ve merkezi	(92–94)
Siponimod	0,25-2 mg, oral	Antiinflamatuvar ve S1P reseptör inhibitörü	Hipertansiyon, transaminaz artışı, anormal karaciğer fonksiyonu	Periferik ve merkezi	(77, 95, 96)

Ofatumumab	20 mg, s.c	Lenf d�g�mlerindeki B hücrelerini seçici olarak azaltır	üst solunum yolu enfeksiyonu, enjeksiyona bağlı reaksiyonlar	Periferik	(91)
Ozanimod	920 �g, oral	S1P reseptör inhibitörü	üst solunum yolu enfeksiyonu, hepatik transaminaz yüksekliği	Periferik ve merkezi	(77, 97, 98)
Ponesimod	20 mg, oral	Antiinflamatuvar ve S1P reseptör inhibitörü	üst solunum yolu enfeksiyonu, hepatik transaminaz yüksekliği, hipertansiyon	Periferik ve merkezi	(77, 99)
Diroksimel fumarat	231 mg, oral	Antiinflamatuvar ve antioksidan	İsilik, GİS bozuklukları	Periferik ve merkezi	(81)
Monometil fumarat	95 mg, oral	Antiinflamatuvar ve antioksidan	İsilik, GİS bozuklukları	Periferik ve merkezi	(80, 81, 100)
Ublituximab	150 mg, i.v. infüzyon	B hücrelerini inhibe eder	Enjeksiyon bölgesinde reaksiyonlar, lenfopeni, miyalji	Periferik ve merkezi	(101)

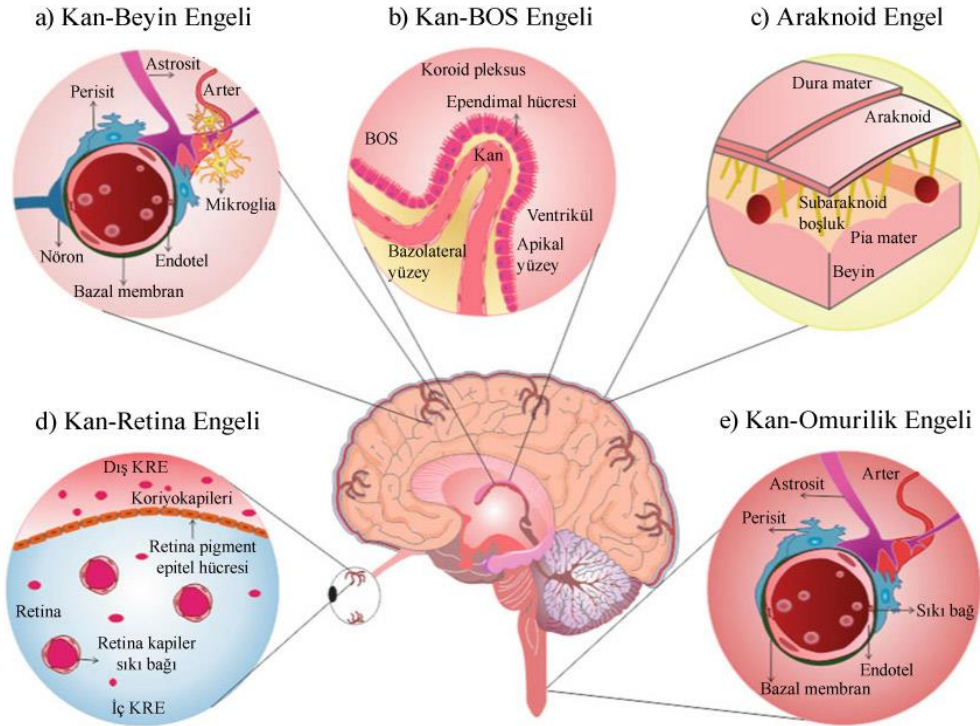
GİS: Gastrointestinal sistem; i.m.: intramüsküler; i.v.: intravenöz; s.c.: subkutan; S1P: Sfingozin-1-fosfat; Treg: Regülatör T hücreleri

MS tedavisinde kullanılmakta olan bazı ilaçların düşük  z n rl ğe ve hızlı klerense sahip olmaları, etkinliklerini sınırlamakta ve uygulama yoluna bağlı olarak farklı yan etkiler de gözlenebilmektedir (102). Klinik çalışmalarda denenen ilaçlarla etkili ve güvenli sonuçlar elde edilse de hedef dışı dağılım nedeniyle bazı istenmeyen etkiler de gözlenmiştir (103). Akut gelişen MS nükslerinde, 3-5 gün boyunca yüksek dozda metil prednizolon (MP) ile sistemik steroid tedavisi, altın standart tedavi olarak bildirilmiştir. Ancak, istenen terapötik etkiyi elde etmek için yüksek dozda ilaç uygulaması nedeniyle, farklı organlarda çeşitli yan etkiler ortaya çıkabilmektedir (103, 104).

MS hastalığında hem periferik hem de merkezi bağışıklık hücreleri rol oynadığından, tedavinin hem periferik hem de MSS'de etkili olması gerekmektedir (60). Mevcut tedavide kullanılan ilaçlar genellikle periferik adaptif bağışıklık sistemi üzerinde etki gösterdiklerinden ilerleyici faz evresinde kalıcı yeti kaybının önüne geçmekte yetersiz kalmaktadır (105, 106). Ayrıca, MS tedavisi için yeti kaybını iyileştirmek ve önlemek için n roproteksiyonla birlikte remiyelinizasyonu da sağlayacak ilaçların keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (107). Ancak, DMT'lerin çoğunluğunun KBE'yi geçemediği ve MSS'ye ulaşamadıkları bildirilmiştir (108, 109).

2.4. İlaçların Merkezi Sinir Sistemine Erişmesindeki Engeller

Kan ve sinir dokusu arasındaki bağlantılar özelleşmiş sinir engellerini meydana getirmektedir. Kan-sinir engeli (KSE), kanı sinir dokularından ayıran endotel hücreleri, astrositler ve nöronları içeren organize bir ağ halinde düzenlenmiş endotelial yapılardır. Bu yapılar dolaşımda bulunan birçok istenmeyen maddenin beyne geçişini engeller. Bu nedenle KSE'ler, normal nöron aktivitesi için yeterli, hassas bir şekilde düzenlenmiş bir mikro ortamın korunmasına katkıda bulunur. KSE'ler arasında; KBE, kan-beyin omurilik sıvısı engeli (KBOSE), kan-retina engeli (KRE), kan-omurilik engeli (KOE) bulunur (110, 111). KSE'lerin şematik gösterimi Şekil 2.2'de yer almaktadır (112).



Şekil 2.2. Kan-sinir engelleri (112 no'lu referansdan değiştirilerek kullanılmıştır) (112).

MSS'ye ilaç erişimini kısıtlayan başlıca engeller KBE, KBOSE ve araknoid tabaka olarak bildirilmiştir (113).

Beyin ve omurilik zarının dış kısmında yer alan araknoid tabaka, MSS'yi çevrelemektedir. Bu tabakanın KBOSE ve KBE'ye kıyasla yüzey alanı daha küçüktür

ve damarla bağlantısı yoktur. Bu nedenle besin ve ilaç alışverişi üzerinde diğer engeller kadar etkisi bulunmamaktadır (114).

Kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS) arasında yer alan KBOSE (115)'nin yüzey alanı KBE'ye kıyasla üç kat daha azdır (116) ve sınırlayıcılığı KBE kadar yüksek olmadığı için bazı ilaçların BOS'a erişimlerini molekül ağırlıklarıyla ters orantılı olacak şekilde engelleyememektedir (117). Ancak yine de, molekülün geçirgenlik katsayısına göre değişen sabit bir BOS akış hızıyla çok miktarda ilacın uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (117).

Beyne ilaç taşınmasındaki en büyük engel KBE'dir. KBE, beyni kanda bulunan istenmeyen maddelere karşı korur ve ilacın beyin dokusuna difüzyonunu etkiler (118–120). İnsan beyinde yaklaşık 100 milyar nöron bulunmaktadır. Beyindeki kılcal damarların çapı 7-10 μm civarındadır (121). KBE'de hücre içi ve kapakçık boşlukları yoktur ve çevreden beyne giriş yolu çok sınırlıdır (118, 122–124). Maddelerin KBE'den taşınması, sıkı kavşakların (fiziksel engel) ve metabolik engellerin (enzimler ve taşıma sistemleri) bulunması nedeniyle seçici ve sınırlıdır (125).

2.5. İlaçların Merkezi Sinir Sistemine Taşınması için Geliştirilen Stratejiler

Tedavide ve görüntülemelerde kullanılan ilaçların beyne taşınması klasik olarak molekülün sistemik dolaşımdan beyne nüfuz ettiği transselüler yol aracılığıyla olmaktadır. Ancak bu yol, Lipinski ve ark. tarafından belirlenen “beş kural” a uyan fizikokimyasal özelliklere sahip küçük moleküller için geçerlidir (126–128). Bu kurallara göre bir ilaç molekülünün molekül ağırlığı 500 Da'dan az olmalı ve partiyon katsayısı beşten küçük olmalıdır. Ayrıca molekülün beşten az hidrojen bağı donörü ve ondan fazla hidrojen bağı alıcısı da olmamalıdır. Bu nedenle, KBE'yi geçebilecek ilaç adaylarını tasarlarken araştırmacılar bu kuralları dikkate almaktadır (129, 130). Bununla birlikte, ilaç adayı bu kuralları karşılarsa da KBE'yi geçişi, dışarı atım pompaları (*efflux pump*) ve enzimler tarafından metabolize edilmesi nedeniyle engellenebilir (131). Dolayısıyla bu tür moleküllerin beyne taşınması oldukça zordur ve alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (112).

MSS hastalıklarına yönelik ilaç geliştirme çalışmalarının başarı oranı diğer tedavi alanlarına kıyasla daha düşüktür (132) ve MSS'ye yönelik ilaçların geliştirilme süresi diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında daha uzundur (133). MSS ilaçlarının klinik deneyleri, beynin karmaşık yapısı, yan etkiler ve KBE gibi ilaç geçişini kısıtlayan yapılar nedeniyle oldukça zordur (133). 2018 yılında, mevcut ilaçların %98'inin, hedef bölgelere erişememeleri nedeniyle beyindeki patolojik durumların tedavisinde etkisiz olduğu bildirilmiştir (134, 135).

MSS hastalıklarına yönelik ilaç geliştirme çalışmalarının başarı oranının düşük olması nedeniyle KBE'yi aşmakta alternatif ilaç taşıyıcı yaklaşımları değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu yaklaşımlar arasında en umut verici olanlardan birinin nanotaşıyıcılar olduğu belirtilmiştir (132, 136–139). Ayrıca, molekülün lipofilik özelliğinde artış sağlanması, nazal yoldan ilaç uygulanması, implantlar aracılığıyla lokal uygulama yapılması ve KBE'nin bütünlüğünün geçici olarak bozulması gibi yöntemler de kullanılmaktadır (115, 140).

Literatürde, *in vitro* MS modellerinde ve genellikle *in vivo* DOE modelinde denenilen pek çok yöntem olmakla birlikte, nanopartikül temelli ilaç taşıyıcı sistemler ile başarılı sonuçların elde edildiği çok sayıda çalışma yer almaktadır (48, 141–144). Buna ilaveten, nanoteknoloji ile mevcut MS tedavisinde kullanılan ilaçların birlikte değerlendirilmesinin, aksonal hasarın önlenmesinde ve remiyelinizasyon yoluyla sinir iletiminin onarılmasında daha etkin sonuçlar sağlayabileceği bildirilmiştir (32).

2.5.1. İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Nanotaşıyıcılar

Genel olarak nanotaşıyıcılar hem küçük moleküllü ilaçların hem de makromoleküllerin enkapsüle edilmesine olanak sağlayan nano boyuttaki sistemlerdir. Bu kolloidal formülasyonlar fizikokimyasal özellikleri ve yüzey işlevselliklerinin istenen şekilde değiştirilmesine olanak sağlamaları nedeniyle, ilaçların KBE gibi biyolojik engelleri geçmelerini sağlayarak terapötik etkinliğin ve biyoyararlanımın artırılmasına yardımcı olmaktadır (145). Nanotaşıyıcıların kullanım amaçları şu şekilde sıralanabilir: 1) ilaç stabilizasyonu, 2) istenmeyen etkiyi azaltma, 3) biyolojik engelleri geçme kapasitesi ve 4) hastalık bölgesine daha iyi hedefleme (146). Etkin tedavinin elde edilmesi için araştırmacılar farklı birçok ilaç taşıyıcı sistem

geliştirmiştir (135). Bu sistemler arasında; lipit kaynaklı nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, metalik nanopartiküller ve ilaç konjugatları (örneğin peptid-ilaç konjugatı) üzerinde en çok çalışılan sistemlerdir (147–149).

Beyne ilaç taşınması ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için geliştirilen nanoformülasyonlardan beklenen özellikler şu şekilde sıralanabilir; toksisite göstermemesi, beyin bölgelerine etkili biçimde difüze olması, <200 nm altında büyüklüğe sahip olması, nöroinflamatuvar etki göstermemesi, ilacın stabilitesinde artış meydana getirmesi, hedefleme yeteneğine sahip olması, etkin ve uygun maliyetli olması (135, 150). Nanotaşıyıcıların özelliklerini boyutları, yüzey yükü, şekli, morfolojisi ve yüzey işlevselliği oluşturmaktadır. İlaçların MSS'ye ulaşmasını engelleyen bariyerlerin nanopartikül temelli sistemler ile etkili bir şekilde aşıldığı bildirilmiştir (151). Nanoteknolojinin ilaç taşınmasında kullanılması ile ilacın hedeflenerek biyodağılımının kontrol edilmesi (152), MS hayvan modelinde immün toleransın uyarılması (153), kontrollü ve sürekli salım sağlanarak daha verimli ilaç taşınması sağlanmaktadır (154).

Nanotaşıyıcılar karmaşık biyolojik ortamlarda çeşitli fizikokimyasal özelliklerini ve in vivo davranışlarını değiştiren biyolojik makromoleküllere ve proteinlere vb. maruz kalmaktadır. Bu nedenle, nanotaşıyıcıların biyolojik sıvılardaki davranışlarını ve etkileşimlerini tespit etmek büyük önem taşımaktadır (135).

MS'nin çeşitli klinik öncesi modellerinde lipit nanopartiküller (katı lipit nanopartiküller (KLN) (155) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT) (156) gibi), polimerik nanopartiküller (157) ve inorganik nanopartiküller (158) gibi çeşitli nanoformülasyonlar yoğun şekilde araştırılmıştır. Bu nedenle, devam eden alt başlıklarda bu nanotaşıyıcı sistemlerin genel özelliklerine kısaca değinilecektir.

İnorganik Nanopartiküller

Altın, silika, karbon ve demir gibi metaller ile hazırlanan inorganik nanopartiküller, uygun özellikleri nedeniyle beyni hedefleyen ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (135). Bu sistemler, ligandların veya polimerlerin konjugasyonu için kolayca değiştirilebilir ve belirli uygulamalar için boyut ve şekillerinin ayarlanması mümkündür. İnorganik nanopartiküller, küçük

boyutları nedeniyle beynin mikro damar sistemine geçebilme yeteneğine sahiptir ve geniş yüzey alanları, aktif hedeflendirme için çeşitli ligandlarla kaplanabilmelerine olanak tanır (159–163). Manyetik nanopartiküller genellikle biyouyumlu bir madde ile kaplanmış demir oksit çekirdeğe sahip çekirdek-kabuk yapısından oluşur. Kan dolaşımına doğrudan uygulanabilir ve tedavi, görüntüleme veya tanı için harici bir manyetik alan uygulanarak hedeflenebilir (164–167). Ayrıca, dış veya iç uyaranlarla inorganik nanotaşıyıcılardan ilaç salımı kontrol edilebilir ve taşınma işlemi kolaylaştırılabilir (168, 169). İnorganik nanopartiküllerin pek çok üstünlüğe sahip olmalarına rağmen, biyobozunur olmamaları, toksisiteleri ve in vivo olarak uzaklaştırılma problemleri nedeniyle nörodejeneratif ve diğer hastalıkların tedavisindeki uygulama alanları sınırlanmaktadır (135).

Lipit Nanopartiküller

Lipit nanopartiküller; lipofilik karakterleri hem hidrofilik hem de lipofilik özellikteki ilaçları taşıma yetenekleri, kontrollü salım sergilemeleri, yüksek ilaç hapsetme kapasiteleri ve hedefleme özellikleri nedeniyle diğer nanotaşıyıcılara kıyasla üstünlük sağlamaktadır [55]. Bu sistemler genel olarak katı lipit nanopartiküller (KLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT) olarak ikiye ayrılabilirler.

KLN'ler emülsiyon, lipozom ve polimerik nanopartiküllere alternatif taşıyıcılar olarak geliştirilmiştir. KLN'ler genel olarak küresel yapıda olan, ortalama çapları 10-1000 nm arasında değişen ve yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilen katı bir lipit çekirdek matrikse sahip sistemlerdir. Bu taşıyıcılar doksorubisin (170), dosetaksel (171), kuersetin (172), atazanavir (173) ve kinin (174) gibi birçok etkin maddenin beyne taşınması için değerlendirilmiştir (175). KLN'ler düşük saklama stabilitesine sahip olsalar da (176) yüksek ilaç yükleme verimliliği, sürekli ilaç salımı sağlama ve kolay değiştirilebilen yüzey özelliklerine sahip olma gibi üstünlüklere sahiptir (177). Bu nanotaşıyıcılarda görülen instabilite problemleri; sert yapıları, jelleşme eğilimleri, partikül büyümesi ve hazırlama ve saklama esnasındaki kristal dönüşümleri olarak sıralanabilir (178–180).

KLN'lerin zayıf yönlerinin güçlendirilmesi için NLT'ler geliştirilmiştir. Bu nanotaşıyıcılar, 70:30'dan 99,9:0,1'e aralığındaki oranlarda değişen sıvı:katı lipitlerin

karışımı ile oluşturulmuştur (181). Yüksek orandaki sıvı lipitlerin varlığına rağmen NLT'ler oda sıcaklığında katı haldedir. Katı ve sıvı lipitlerin bir araya getirilmesi, bu nanotaşıyıcılara KLN'den daha yüksek ilaç yükleme verimliliğine sahip bir matriks sağlar. NLT'nin, KLN'ye göre diğer üstünlükleri arasında daha düşük toksisite ve daha yüksek saklama dayanaklılığı yer alır (182). Daha az su içeriği nedeniyle NLT, KLN'lerde önemli bir sorun olan jelleşmeye daha az eğilimlidir (183). Beyne ilaç taşınmasında NLT'ler, küçük boyuta sahip olmaları (184), lipit çözünürlükleri (185), bozunmaya karşı koruma sağlayıp biyoyararlanımı arttırmaları (186) ve aktif hedeflendirmeye uygun olmaları (187) nedenleriyle tercih edilmektedir (188).

Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller; genellikle 60-200 nm arasında değişen boyutlarda, bileşimlerinde birçok farklı madde kullanılabilen koloidal yapılardır (189). Formülasyonlarında çeşitli doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır (190, 191). İlaç taşıyıcı sistemlerde en çok kullanılan doğal polimerler arasında; kitosan, albümin, dekstran (192) yer alırken, sentetik polimerler; poli(kaprolakton) (PCL), poli(alkilsiyanoakrilat) (PACA), poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktit-ko-glikolik asit) (PLGA) olarak sıralanabilir (193). Polimerik nanopartiküller, lipofilik ilaçları içeren yoğun bir polimerden meydana gelen matriks çekirdeğinden ve sterik stabilite sağlayan hidrofilik bir koronadan oluşur (194). Etkin maddeler, nanopartiküllerin içine hapsedilebilir, yüzeyine adsorbe edilebilir veya nanopartiküllere kimyasal olarak konjuge edilebilir. Etkin maddelerin nanopartiküllere yüklenmesiyle, metabolizasyondan korunmaları sağlanır ve çözünmeyen moleküllerin hedef hücrelere etkili bir şekilde taşınması kolaylaşır (124). İlaç yüklü nanopartiküllerin dolaşım sisteminde kalma süresi polimerin türüne göre değişkenlik gösterir. Genel olarak dolaşımdaki kalış süresi, yüzeylerine hidrofilik polimerlerin (örneğin PEG'ler ve polisakkaritler) fiziksel adsorpsiyonu veya kovalent bağlanması gibi yöntemlerle artırılabilir. Bununla birlikte, nanopartikül yapısına dokuya özgü ligandların alınması beyne hedefli taşımayı kolaylaştırır (194).

Hibrit Nanopartiküller

Nanotaşıyıcı sistemler arasında, farklı bileşime sahip polimerik nanopartiküller ve lipit nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadır (195). Lipit sistemlerin başlıca sakıncaları; ilaç kaybı veya hızlı salım, tekrarlanabilirlik, saklamada zayıf fiziksel ve kimyasal stabilite, yüksek maliyet ve ölçek büyütme olarak sıralanabilir (196, 197). Benzer şekilde, polimerik nanopartiküller polimer toksisitesi, toksik organik çözücülerin varlığı, hidrofilik ilaçların düşük tutulma kapasitesi, polimer bozunması ve etki alanına ulaşmadan önce ilacın salınması gibi bazı sınırlamalara sahiptir (198). Lipit ve polimerik nanopartiküllerde karşılaşılan problemlerin aşılması için, iki farklı sistemin olumlu özelliklerinden yararlanan “hibrit nanopartikül” (HNP) formülasyonları geliştirilmiştir (195). HNP’ler, her iki sistemin (lipit ve polimer/organik ve inorganik maddeler) de istenen özelliklerini içermektedir ve ilacın salım profili, çekirdekdeki maddenin erozyonuna ve bozunmasına dayanır. Bu sistemlerde ilaç salımı dış kabuk tabakasının içine su geçişinin değiştirilmesi ve polimerin bileşimi ile ayarlanabilir (199). HNP’lerin teşhis ve tedavi amacıyla başarılı şekilde kullanılabilceği bildirilmiştir (200).

HNP’ler başlıca üç farklı bölümden oluşmaktadır. İlk kısım olan iç çekirdek; farklı polimerlerden, lipitlerden, inorganik ve organik maddelerden meydana gelebilir ve etkin maddeyi hapseder. İkinci bölüm, polimerik/inorganik çekirdeği saran ve bu sistemin biyouyumluluğunu arttıran ara lipit katmandan meydana gelir. Son olarak en dışta lipit veya polimer konjugatı bulunur ve bu katman polietilen glikol (PEG) ile kaplanarak dolaşımdaki kalış süresi uzatılabilir veya bu katmana farklı ligandların eklenmesiyle hedefe özgüllük sağlanabilir. Bu katman; antikorları, aptameri ve benzeri molekülleri elektrostatik kuvvetle bağlamak için uygun bir yüklü bileşenle işlevsel hale getirilebilir (201).

Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

HNP’lerin bileşimlerine ve uygulamalarına bağlı olarak hazırlanmalarında farklı yöntemler kullanılmaktaysa (202) da genellikle iki yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. İlk olarak, iç çekirdeğin ve dış kabuğun ayrı ayrı hazırlandığı ve daha

sonra HNP oluşumu için birlikte inkübe edildikleri iki aşamalı klasik yaklaşım süreci sayılabilir. İkinci olarak, kendiliğinden birleşmenin meydana gelmesini sağlayan tek aşamalı yaklaşımdan söz edilebilir (195, 203). Bu yöntemlerde, hastalığa özgü tedavi ihtiyacını karşılayan işlevsel HNP'ler elde etmek için farklı kimyasal basamaklarla değişiklikler yapılabilir (203).

İki Aşamalı Klasik Hazırlama Yöntemi

HNP'lerin hazırlanması için geliştirilen ilk tekniktir. İç çekirdek ve dış kabuk bileşenleri, uygun polimerler ve maddeler kullanılarak iki ayrı aşamada hazırlanır, sonrasında HNP oluşturmak üzere bir araya getirilir (201). Formülasyon genellikle uygun oranlarda polimerik nanopartiküllerden oluşan bir çekirdek ve lipit yapıda bir dış kabuk içerir (204). Tek veya çok katmanlı dış kabuk; sonikasyon (205), ekstrüzyon veya yüksek basınçlı homojenizasyon (206) gibi tekniklerle hazırlanır. Polimerik iç çekirdek; hapsedilen ilaçların hidrofobik özelliğine, kullanımına (207) ve çekirdeğin boyutuna bağlı olarak emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma veya çözücü difüzyonu (208), desolvasyon (209), nanoçöktürme (210, 211), sonikasyon (212) ve yüksek basınçlı homojenizasyon (213) ile hazırlanabilir.

Oluşturulan polimerik çekirdek ve lipit kesecikleri, HNP'leri hazırlamak amacıyla vorteksleme, ekstrüzyon, film hidrasyon ve ultrasonikasyon teknikleriyle karıştırılır. Karıştırma işlemleri, kabuğun iç çekirdek üzerine birleşmesi veya adsorpsiyonu için gerekli enerjiyi sağlar (212). Ayrıca, bu bileşenler arasındaki elektrostatik kuvvetler de HNP üretiminde rol oynar. Karıştırma işleminin lipit bileşenin faz geçiş sıcaklığının üzerinde yapılması gereklidir. Oluşan HNP'ler ultrasantrifüj ile ayrılır (214, 215).

Değiştirilmiş İki Aşamalı Hazırlama Yöntemi

İki aşamalı klasik hazırlama yönteminde, püskürterek kurutma ve litografik kalıplama gibi işlemlerle değişiklikler yapılarak HNP formülasyonu elde edilmektedir (207). İç çekirdek; lipit, polimer veya inorganik madde içeren uygun bir çözücü içerisinde dağıtıldıktan sonra püskürterek kurutmaya hazırlanabilir (201).

Tek Aşamalı Hazırlama Yöntemi

İki aşamalı HNP hazırlama yönteminde gözlenen ikinci aşama sırasında iç çekirdekteki etkin maddenin kaybı nedeniyle düşük enkapsülasyon verimliliği, seriler arası değişkenlik ve işlemin uzun zaman alması nedenleriyle tek aşamalı yöntem geliştirilmiştir (216). Tek aşamalı hazırlama yönteminde içerik tekdüzeliği, tekrarlanabilirlik ve diğer özellikleri üzerinde daha iyi kontrol sağlanmaktadır. Bu yöntemde, polimer ve lipit içeren iki farklı çözelti karıştırılır ve kendiliğinden birleşerek çekirdek kabuk HNP'ler oluşur (217). Polimer uygun bir organik çözücü içerisinde çözülürken, lipit çözeltisi organik çözücünün küçük bir kısmını çözücü olarak kullanabilen su içerisinde hazırlanır. Polimer içeren çözelti, polimerin nanopartikülleri oluşturmak üzere çöktüğü ve lipitin, HNP'leri oluşturmak üzere yüzeyde kendiliğinden birleştiği lipit fazına eklenir (201). Tek aşamalı hazırlama genellikle nanoçöktürme, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma ve çözücü difüzyon yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir (195, 201).

Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

HNP hazırlamak için en sık kullanılan tek aşamalı yöntemdir. Bu yöntemde etkin maddenin özellikleri ve çözünürlüğüne göre tekli emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma (218) veya çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminden birisi tercih edilir (195). Tekli emülsiyon oluşturma yönteminde yağ fazı, polimer ve ilacın suyla karışmayan organik çözücü içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Kendiliğinden birleşme sırasında lipit kısmını içeren su fazı stabilizatör görevi üstlenir (219, 220). Organik faz daha sonra sonikasyon altında veya sabit hızda karıştırılarak sulu faza damla damla ilave edilir ve su içinde yağ (Y/S) emülsiyonunun oluşur. Emülsiyon oluşturma işlemi esnasında, lipitin hidrofobik kısmı iç çekirdek üzerine adsorbe olurken, hidrofilik kısmı lipit kaplı HNP'leri oluşturan sulu ortama doğru kendini düzenlemektedir (216, 221).

Tek emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi suda çözünürlüğü düşük olan hidrofobik etkin maddelerin enkapsüle edilmesi için tercih edilir (222). Çift

emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, diğer uygun polimerler veya çekirdek/kabuk malzemeleri ile farklı organik çözücüler içinde çözünmeyen hidrofilik etkin maddeler ve siRNA gibi nükleik asitler için HNP tasarlanırken tercih edilir (223).

Nanoçöktürme Yöntemi

Bu yöntem aynı zamanda tuzla çöktürme yöntemi olarak da bilinmektedir (195). Boyutu 100 nm'den küçük HNP'lerin üretiminde tercih edilen bir yöntemdir (201). Bu yöntemde polimer için farklı çözme kapasitesine sahip iki karışabilir çözücü kullanılır. İlk olarak, polimer çekirdeği, iyi çözücü olarak tanımlanan yüksek çözünürlüğe sahip çözücü içinde çözündürülerek oluşturulur ve bu çözücü, daha sonra zayıf çözücü olarak tanımlanan çözücüye eklenir (224). İki çözelti damla damla ilave edilerek veya sonikasyon yoluyla karıştırılır. İyi çözücünün zayıf çözücüyle karışabilmesi, polimerin çökmesi nedeniyle geride çekirdek nanopartiküllerini bırakarak difüze olmasını sağlamaktadır (225).

Sonikasyon Yöntemi

Sonikasyon, çözücü buharlaştırma veya ısıtma yerine ultrasonik dalgaları kullanarak hızlı üretim sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemde organik faz ve sulu faz olarak adlandırılan iki çözelti sırasıyla iç çekirdek (polimer) ve dış kabuk veya kaplama maddesinin (lipitler) oluşumunu sağlar (195).

Yeşil Teknoloji Yöntemi

HNP hazırlanmasında istenmeyen maddelerin zararlarını azaltan çevre dostu yöntemler ve inorganik çözücüler yerine organik çözücülerin kullanılması büyük değişim yaratmıştır. Bu çevre dostu yaklaşımlar aynı zamanda düşük maliyeti, daha iyi stabilite, yüksek uyumluluk ve daha güvenli kullanım da sağlamıştır (226). HNP'lerin bu yöntemle üretildiği bir çalışmada, organik çözücü olarak hintyağı kullanılmıştır (227).

Nanotaşıyıcıların Hedeflendirilmesi

Nanotaşıyıcıların hedeflendirilmesinde başlıca pasif hedeflendirme ve aktif hedeflendirme olmak üzere iki yaklaşım tercih edilmektedir. Nanotaşıyıcıların terapötik veya tanı amacıyla kullanılabilmesi için, pasif veya aktif hedeflendirme yoluyla belirli bir bölgeye iletilmesi ve birikmesi gerekir (228).

Pek çok araştırmada, pasif hedeflendirmede nanotaşıyıcıların boyut, şekil ve yüzey yükü gibi yapısal özelliklerinin rol oynadığı, bunlara bağlı olarak dolaşım süresinin, penetrasyon hızının ve hücre içine alınmalarının etkilendiği gösterilmiştir (229, 230). Ayrıca, MSS hastalıklarında nanotaşıyıcıların pasif hedeflendirmesi ile KBE'yi geçiş sağlanabilir, beyindeki enflamasyon olan bölgelerdeki damarlarda gerçekleşen patofizyolojik değişimler geçirgenliğin artmasına nanotaşıyıcıların istenen alanda birikmesine olanak sağlar ve bu da artmış geçirgenlik tutma etkisi (EPR) olarak bilinir (231). Bu strateji, nanotaşıyıcıların PEG gibi maddeler ile kaplanması (PEGilasyon) ve onlara “gizlilik” özellikleri kazandırılmasıyla gerçekleştirilir. PEGilasyon, opsonizasyonu önemli ölçüde azaltarak nanotaşıyıcının retikuloendotelial sistem (RES) monositleri ve makrofajları tarafından tanınmasını, fagositozu önler, kandan uzaklaştırılmayı azaltır ve beyin mikrodamarlarında kalma süresini artırır (231, 232). Bununla birlikte, pasif hedeflendirme tek başına aktif hedeflendirme kadar etkili değildir.

Aktif hedeflendirme, nanotaşıyıcıların yüzeyine KBE'de aşırı ifade edilen özgün molekülleri tanıyabilen, bunlara bağlanabilen, beyne geçişi sağlayan ve ilaç alımını artıran ligandların eklenmesiyle gerçekleştirilir (233). Antikorlar, aptamerler, karbonhidratlar, enzimler, folat, peptitler ve vitaminler dahil olmak üzere aktif hedeflendirme tekniklerinde nanotaşıyıcıları işlevsel hale getirmek için, çeşitli ligandlar kullanılmaktadır (234, 235). Nanotaşıyıcıların ligandlarla yüzey değişikliğinin, KBE geçirgenliğini arttırmada en kritik rolü üstlendiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (236, 237). Bunun yanı sıra, nanotaşıyıcıları farklı endositik yollara yönlendirerek dışarı atım pompaları (“*efflux pump*”) tarafından tanınmalarının nispeten önlenmesine olanak tanır. Ayrıca, ideal bir beyne ilaç taşıyıcı sistemin hem KBE'yi aşabilmesi hem de beyin parankimine girdikten sonra hastalıklı hücreleri seçici olarak hedefleyebilmesi istenir. Aktif hedeflendirme, nanotaşıyıcının hem

KBE'ye hem de hedef hücrelere seçiciliğini artırarak hücre içine alımını destekler, işlevsel hale getirilememiş formülasyonlarda yaygın olarak görülen, periferik organlarda birikmeyle ilişkili yan etkileri, en aza indirir (238, 239). Formülasyonun hedefleyeceği reseptörlerin normal hücrelerde zayıf şekilde ifade edilmesi, hatta hiç olmaması ancak tüm hedef hücrelerde homojen şekilde bulunması istene bir durumdur (240–242). Bu şekilde nanotaşıyıcıların tedavideki ve teşhisteki verimliliği artmaktadır (243).

Tez kapsamında geliştirilen HNP'nin aktif hedeflendirme aracılığı ile hastalık bölgesine ulaşması planlandığından devam eden bölümde konjugasyon yoluyla aktif hedeflendirmeye değinilecektir.

Konjugasyonla Aktif Hedeflendirme

Nanotaşıyıcıların işlevsel hale getirilmesi, hedeflendirme verimliliğini artırmak için fonksiyonel grupların veya biyomoleküllerin konjugasyonu yoluyla nanotaşıyıcıların yüzeyindeki değişimi ifade etmektedir (244). Nanotaşıyıcılar; ligandlar ile adsorpsiyon, kovalent bağlanma veya aracı molekül kullanılarak işlevsel hale getirilebilir (245). Nanotaşıyıcı ile bağlanma yöntemi stabil bir bağ oluşturmalı ve ligandın biyolojik aktivitesinin korunmasını sağlamalıdır (246). Kullanılan konjugasyon yöntemine bağlı olarak, nanotaşıyıcıların yüzeyindeki ligandların yerleşmesi bölgeye özgü olabilir veya olmayabilir. Ayrıca bağlanma bölgeleri ligandların yönünü belirler (247).

Adsorpsiyon ile Konjugasyon

Adsorpsiyon, kovalent olmayan, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlanma şeklinde gerçekleşen basit konjugasyon yöntemlerinden biridir (248). Fiziksel adsorpsiyonda ligand, elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri gibi zayıf etkileşimler yoluyla nanotaşıyıcı yüzeyine bağlanır (249). İyonik bağlanma, zıt yüklü ligand ile nanotaşıyıcı yüzeyi arasındaki iyonik bağlantılara dayanır (250). Bu yöntemle ligandlar, az kayıp vererek yüzeylere bağlanabilir (249). Bu yöntem, ucuz olması ve kısa sürmesi sebebiyle tercih edilse de

(251) kovalent bağlanmayla karşılaştırıldığında fiziksel stabilitenin azalmasına neden olur (252) ve konjugasyon verimliliği ve tutunma azalabilir (253). Ayrıca, fiziksel ve iyonik etkileşimlerle ilişkili seçicilik eksikliğinden dolayı rastgele ligand yönelimleri gözlemlenebilir (254).

Kovalent Bağlanma ile Konjugasyon

Kovalent bağlanma ile konjugasyonda nanopartikülün önceden aktivasyonuna ihtiyaç duyulduğundan, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlanmadaki gibi basit bir işlem değildir (247). Ancak daha yüksek stabilite ve tekrarlanabilirlik özellikleri ile kovalent bağlanma tercih edilir. Çünkü kovalent bağlar kopmaya daha az duyarlıdır, bu da adsorpsiyonla karşılaştırıldığında düzenli ligand yerleşmesi ile daha güçlü konjugasyon sağlar (255). Karbodiimit kimyası, maleimit kimyası ve “*Click*” kimyası, nanotaşıyıcı ligand konjugasyonu için en yaygın kullanılan kovalent bağlanma yöntemleridir (254).

Karbodiimit Kimyası

Karbodiimit kimyası yönteminde, karboksilik asitleri primer aminlere çapraz bağlamak için 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDC) ve N,N'-disikloheksilkarbodiimit (DCC) gibi karbodiimid bileşikleri kullanılmaktadır (256, 257). Tek adımlı reaksiyon olarak gerçekleştirilen karbodiimit çapraz bağlanması için N-hidroksisüksinimit (NHS) veya N-hidroksisülfosüksinimit (sülfo-NHS) maddeleri gerekli olmasa da EDC aracılı bağlanma verimliliğini artırmak için bu maddeler genellikle reaksiyon ortamına eklenir (258, 259). Kolay bir işlem olmasına karşın işlevsel gruplar ve çapraz bağlayıcılar arasındaki bağlantının seçici olmaması ve nanotaşıyıcı yüzeyine ligand yerleşmesi üzerinde kontrolün olmaması bu yöntemin başlıca sakıncalarıdır (251, 260).

Maleimit Kimyası

Maleimit kimyası, ligandin, tiyol grubu olarak da adlandırılan sülfhidril grupları (-SH) üzerinden bağlanmanın gerçekleştiği seçici bir konjugasyon yöntemidir. Sülfhidriller, sistein amino asitlerinin yan zincirinde bulunur (261). Tiyol, fizyolojik pH'da proton kaybetmiş hali olan serbest sülfhidril haline gelir ve daha iyi nükleofilik özellik gösterir (262). Maleimit gruplarının serbest sülfhidrillere karşı nötral pH'daki reaksiyonu, primer aminlere kıyasla bin kat daha hızlı yürür ve bunun neticesinde seçicilik artar. Serbest sülfhidril grupları, primer aminlerle reaksiyon yoluyla veya ligandların kendi disülfid bağlarının indirgenmesi yoluyla elde edilir (263, 264). En sık kullanılan maleimit çapraz bağlama reaktifleri, NHS-maleimit ve PEGile edilmiş çeşitleridir (267, 268). Serumdaki tiyol içeren proteinlerle (ör. albümin) etkileşimden kaynaklı olarak maleimit sisteinlere karşı seçicilik göstermeyebilir. Bu durum yöntemin tercih edilmesini sınırlandırabilir (269, 270).

“Click” Kimyası

“Click” kimyası, bölgeye özel ve uygun reaksiyon hızına sahip bir grup kimyasal reaksiyonu ifade eder. Reaksiyon sonucunda kalıcı kimyasal bağlar meydana gelirken toksik ürünler oluşmaz. Reaksiyonlar oda sıcaklığında, sulu çözelti koşullarında, hiç saflaştırma gerektirmeden veya çok az saflaştırma gerektirerek yüksek verimlilikle ve kolaylıkla gerçekleşir (265–267). Bu reaksiyonlarda azit ve alkin gruplarının kullanılması, canlılarda çok az düzeyde bulunmaları ve biyomoleküller ile işlevsel grupların çoğunluğuna karşı inert olmalarından dolayı üstünlük sağlar (268). Cu(I) katalizörleri reaksiyonları hızlandırır (269) ancak toksisiteye yol açabildikleri için oluşan ürünlerin canlılarda kullanımı kısıtlanmaktadır (270).

Aracı Molekül ile Bağlanma

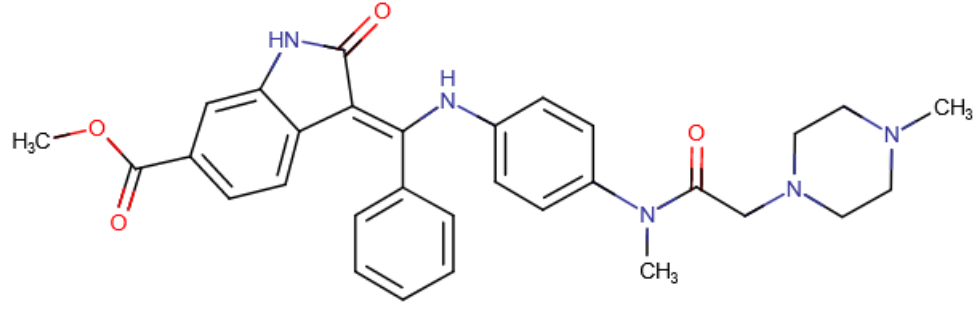
Kovalent bağlanmaya kıyasla aracı moleküller kullanıldığında ligandlar nanopartiküller üzerinde daha seçici şekilde yer alır (271). Bu yöntemde en sık kullanılan biyotin-avidin bağlanmasıdır (272). Bu bağ hızla oluşur ve farklı pH, sıcaklık, organik çözücüler ve denatüre eden maddeler varlığında stabil kalır (273). Bununla birlikte avidin yüksek izoelektrik noktasına sahip bazik bir protein olduğundan (274) hem fizyolojik pH'da hem de glikolizasyonda oluşan pozitif metabolitlerle etkileşime girerek düşük seçicilik gösterebilir (275).

2.6. Etkin Madde - Nintedanib

Nintedanib (ND), bir dizi büyüme faktörüne bağlanarak fibroblastların büyümesini engelleyen tirozin kinaz inhibitörü, küçük bir moleküldür. İlk olarak 2014 yılında idiyopatik pulmoner fibrozisin (IPF) tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından ruhsat almıştır (276). ND; trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR), vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve Fms benzeri tirozin kinaz-3 (FLT3) (277) dahil olmak üzere çoklu reseptör tirozin kinazları ve reseptör olmayan tirozin kinazları inhibe eder (276,278). ND, ayrıca küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (NSCLC) tedavisi için Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından dosetaksel ile kombinasyon halinde kullanım için onaylanmıştır (279).

ND'nin fizikokimyasal özellikleri aşağıda sırayla belirtilmiştir:

- CAS numarası: 656247-17-5
- Kimyasal adlandırma: metil (3Z)-3-[[4-[metil-[2-(4-metilpiperazin-1-il)asetil]amino]anilino]-fenilmetiliden]-2-okso-1H-indol-6-karboksilat
- Kimyasal formülü: C₃₁H₃₃N₅O₄



- Fiziksel özellikleri: Açık sarı renkte toz; -20 °C'de saklanır; erime sıcaklığı: 237 °C
- Molekül ağırlığı: 539,62 g/mol
- Çözünürlük: Suda neredeyse hiç çözünmez; biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre Sınıf II (280)

ND, IPF tedavisinde oral olarak uygulanır, kan dolaşımı yoluyla dokulara büyük ölçüde dağılır ve sistemik yan etkilere sıklıkla yol açar (281), bu etkilere anoreksiya, halsizlik, ishal örnektir, dolayısıyla ND uygulaması erken kesilebilir (282). Ayrıca, ND'nin oral uygulama sonrası beyne geçişi çok düşük miktardadır (283, 284) ve oral biyoyararlanımı yaklaşık %5'tir, bu kadar düşük olmasının ciddi ölçüde ilk geçiş etkisine uğraması ve atım pompası (P-glikoprotein (P-gp) substratı olduğu bilinmektedir (285)) nedeniyle olduğuna inanılmaktadır (286). Başka ilaçlarla etkileşimi düşüktür, plazma proteinlerine yaklaşık %98 oranında bağlanır, dağılma hacmi 1050 L'dir, bu da periferik dokulara yayıldığını gösterir, eliminasyon yarı ömrü 9,5 saattir ve büyük oranda (%93,4) feçes ve safra ile uzaklaştırılır (280).

ECM, sağlıklı bir beyinin yaklaşık beşte birini oluştururken (287), görece düşük miktarlarda kolajen gibi fibroz proteinleri içermektedir (288). Ancak yapılan çalışmalarla, kronik MS'de kolajen birikiminin oldukça arttığı ve fibrotik yapıların oluştuğu gösterilmiştir (289). Özellikle tip I kolajen miktarının artması, fibrozis oluşumu teorisini güçlendirmektedir (15). Bu bilgiler ışığında, ND'nin antifibrotik ve antiinflamatuvar etkilerinin, MS'deki fibrotik yapıların azaltılmasında etkili olacağı ve hastalığın iyileştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu tez kapsamında da ND'nin MS hastalığındaki etkinliği değerlendirilmiştir.

2.7. Peptit - TKKTLRT

MS hastalığında, MSS'deki lezyonlara ilaç taşınması etkin tedavinin sağlanmasının önündeki en büyük engellerdendir. KBE'yi, ilaçların ve ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef bölgeye ulaşmasını engellemektedir. Aynı zamanda, uygulanan ilaçların belirli bir bölgeye hedeflenmemesi nedeniyle ilaç moleküller bütün vücuda dağılmakta, bu durum da tedavi etkinliğinin azalmasına ve yan etkilerin artmasına sebep olmaktadır. Bu tez kapsamında ND etkin maddesinin MSS'ye taşınması için HNP'ler geliştirilmiş ve aktif hedeflendirme için de peptitlerden yararlanılmıştır.

Peptitler yüksek biyouyumlulukları, biyobozunurlukları, kendiliğinden bir araya gelmeleri ve farklı kimyasal özellikleri nedeniyle akıllı nanotaşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında büyük ilgi çekmektedir (290). İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan peptitler genellikle 2-30 amino asit uzunluğundadır (290). Küçük boyutları, kolay sentezlenebilmeleri ve diğer aktif hedeflendirme ajanlarına kıyasla daha düşük immünojenite göstermeleri en önemli üstünlükleri olarak sayılabilir.

Kolajenler ekstrasellüler matriksin temel bileşenlerindedir. Sağlıklı sinir sistemi parankimasında ve beyin kan damarlarını çevreleyen bazal membranda tip IV kolajen bulunmaktadır (291). Hem aktif hem de inaktif MS lezyonlarında ise tip I, III ve IV kolajen salgılanması artmaktadır. Aynı zamanda aktif lezyonlardaki perivasküler boşluklarda tip I kolajenin arttığı tespit edilmiştir (17). Bu sebeplerden ötürü, beyindeki MS lezyonlarının aktif olarak hedeflenebilmesi için tip I kolajene özgül bir peptit kullanılması uygun görülmüştür.

TKKTLRT; yedi amino asitli, kolajen parçalayan enzim kolajenazdaki kolajen bağlama alanlarından türetilmiş bir peptittir. TKKTLRT, yalnızca tip I kolajene yüksek özgüllükle rekabetçi bir şekilde bağlanmakla kalmaz, aynı zamanda düzensizlik olan alanlarda doku rejenerasyonunu uyuracak faktörleri sağlamak üzere işlevselleştirilebilir (292). Literatürde TKKTLRT'nin, diyabetik yara iyileşmesini, nörojenez, vaskülarizasyonu ve hücre oluşumunu kolaylaştırmak için çeşitli büyüme faktörleri ve ilaçlara konjuge edildiği çalışmalar yer almaktadır (292). TKKTLRT, çok yüksek bir izoelektrik noktaya sahiptir ($pI = 11,2$). Yapılan araştırmalar, TKKTLRT-kolajen etkileşiminin yalnızca elektrostatik olmadığını, diziye de bağlı olduğunu göstermiştir (293).

Bir antikorun veya bir peptidin bir bağlayıcı yoluyla bir ilaca kovalent konjugasyonu, bir antikor-ilaç konjugatı veya bir peptit-ilaç konjugatı (PDC) meydana getirir. Bağlayıcı, PDC'nin dolaşım süresini uzatmada ve ilacın salımını kontrol etmede rol oynar. Genel olarak peptidin N veya C terminali veya sistein terminal grubu, konjugasyon bölgeleri olarak seçilir (290). Terminal uçtan konjugasyonunun peptidin işlevi üzerinde çok az etkisi olmasından dolayı, maleimit-sistein "*Michael*" ekleme reaksiyonu, hızlı reaksiyon kinetiği, yüksek seçiciliği ve ılımlı reaksiyon koşulları nedeniyle yaygın olarak bu uçlardan PDC oluşturmakta kullanılır. Bağlayıcı kısmında yalnız bir sistein bulunması bağlanma verimliliğini artırabilir (290). Bu şekilde PDC hazırlanırken değerlendirilen bağlayıcılardan birisi de CGGG dizisidir (294).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

Madde	Marka
1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[amino-(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG)-maleimit	Avanti, ABD
2-Propanol	Merck, Almanya
Asetonitril	Sigma, ABD
96 kuyucuklu ELISA plakları	Nunc, ABD
Alexa Fluor 647 işaretli anti-fare antikoru	Jackson ImmunoResearch, ABD
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, ABD
CGGGTKKTLRT	GenScript, ABD
Etanol	Sigma, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, ABD
Diyaliz membranı	Sigma, ABD
Dulbecco PBS	Sigma, ABD
Fare anti-MBP antikoru	Jackson ImmunoResearch, ABD
Fetal dana serumu	Biological industries, ABD
FITC işaretli anti-tavşan antikoru	Jackson ImmunoResearch, ABD
Fosfat tamponu (pH 7,4) (tablet)	Sigma, ABD
İzopropil alkol	Sigma, ABD
Ketamin	Ata Fen, Türkiye
Ksilazin	Bioveta, Çek Cumhuriyeti
Lesitin (egg yolk, Type XVI-E, $\geq 99\%$)	Avanti, ABD
L-glutamin	Gibco, Invitrogen, ABD
L-929 fare fibroblast hücre hattı	Merck-Millipore, ABD
MetaboAnalyst	Wishart, Kanada
Metanol	Merck, ABD
Metil prednizolon (MP)	Gensanta, Türkiye

MTT	Sigma, ABD
Nil Kırmızısı	Sigma, ABD
Nintedanib	Cayman, ABD
o-Fosforik Asit	Sigma, ABD
Paraformaldehid	Sigma, ABD
Penisilin-streptomisin	Biological industries, ABD
PLGA (50:50) (Resomer RG 503)	Boehringer Ingelheim, Almanya
Sığır serum albümin	Sigma, ABD
Süper Blok	Thermo Scientific, ABD
Tavşan anti-kolajen I antikoru	Jackson Immunoresearch, ABD
Trifloro asetik asit	Sigma, ABD
Tripsin-EDTA çözeltisi	Sigma, ABD
Tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP) çözeltisi	Thermo Scientific, ABD
Tween80	Merck, Almanya

Cihaz/Yazılım	Marka/Program adı
Cryotome	Leica, Almanya
Çok noktalı manyetik karıştırıcı	Variomag, Almanya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	DSC Q 100TA Instruments, ABD
ELISA plak okuyucu	VersaMax, Molecular Devices, ABD
Erime derecesi tayin cihazı	Thomas Hoover, ABD
FT-IR Spektrofotometresi	FT-IR 420 Spec, ABD
HPLC Sistemi	Agilent 1100 Series, Almanya
Isıticılı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
ImageJ	NIH, Amerika
İnkübatör	Sanyo, Japonya
İstatistiksel yazılım	Graphpad Prism8, ABD
Konfokal mikroskop	Leica, Almanya
Laminar hava akışlı kültür kabini	Faster, İtalya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
MS-DIAL	RIKEN, Japonya

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Zetasizer Nano ZS, Malvern, İngiltere
pH metre	Sartorius, Almanya
Q-TOF LC/MS	Agilent, Almanya
Santrifüj cihazı	Hermle Z383K, Almanya
Santrifüj cihazı	Labconco, ABD
Taramalı elektron mikroskobu (JEOL JEM-1200 EX)	Leica, Almanya
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra saf su cihazı	Millipore, ABD
Ultrasonik Banyo	Bandelin, Almanya
UV Spektrofotometresi	Shimadzu, Japonya

3.2. Nintedanib'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

ND'nin fizikokimyasal özelliklerini değerlendirmek amacıyla Ultraviyole (UV) Spektrofotometre analizi, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi ve Fourier Transform Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometre analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. UV Spektrofotometresi

Etanol içinde 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan ND çözeltisi, 1x1 cm boyutundaki kuartz küvetlere yerleştirilerek 200-800 nm aralığında UV spektrumu elde edilmiş ve çözeltinin maksimum absorbanans gösterdiği dalga boyu (λ_{maks}) saptanmıştır.

3.2.2. Fourier Transform Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometresi

ND'nin FT-IR Spektrofotometre ile analizi için, 400 mg potasyum bromür ile yaklaşık 2 mg ND homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra karışım, 10000

kg/cm³'lük hidrolik basınç kullanılarak 5 dakika boyunca sıkıştırılmış ve elde edilen disklerin FT-IR spektrumları, 600-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ölçülmüştür.

3.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

ND'nin DSC analizi için, alüminyum DSC plakalar arasına hassas şekilde tartılmış olan 10 mg ND yerleştirilmiş, azot atmosferi altında ve 25-400 °C aralığında, 10 °C/dakika sıcaklık artış hızına sahip bir DSC termogramı alınmıştır.

3.2.4. Erime Noktası Tayini

Toz halindeki ND, kılcal bir tüp içine yerleştirilmiş ve erime noktası, erime derecesi tayin cihazı kullanılarak saptanmıştır. Cihaz, beklenen erime derecesinin 10 °C altına kadar ısıtıldıktan sonra ND içeren kılcal tüpler içine yerleştirilmiştir. Cihazın standart ısıtma hızına göre sıcaklık artırılarak, ND'nin erimeye başladığı sıcaklık ile tamamen eridiği sıcaklık aralığı kaydedilmiştir.

3.3. Nintedanib'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

ND'nin miktar tayini için HPLC yöntemi olarak Zhao ve ark. (297) tarafından geliştirilen yöntem değiştirilerek kullanılmış olup kromatografik koşullar aşağıda belirtilmiştir:

Kolon:	C18 (125 mm x 4,6 mm, 3,5 µm)
Hareketli faz:	Asetonitril:%0,01 Trifloroasetik asit:Su - (35:20:45)
Enjeksiyon hacmi:	20 µL
Akış hızı:	1 mL/dk
Dedektör:	UV Dedektör
Dalga boyu:	392 nm
Sıcaklık:	35 °C

10 mg ND hassas terazi ile tartılarak 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır, daha sonra üzerine etanol eklenerek ve 2 dakika sonikasyon uygulanarak etkin maddenin çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti etanol ile 10 mL'ye tamamlanarak ve stok elde edilmiştir. Daha sonra analitik yöntem validasyonu için hareketli fazla uygun seyreltmeler yapılarak sırasıyla 20, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 ve 0,2 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir.

3.4. Analitik Yöntem Validasyonu

Analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan yöntemin, uygun görülen koşullarda doğru, özgül ve tekrarlanabilir olduğunu göstermek amaçlı analitik yöntem validasyonu yapılır (295). ND'nin tayininde kullanılacak olan HPLC yönteminin uygunluğunun değerlendirilmesinde aşağıda belirtilen parametreler incelenmiş ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Tekrarlanabilirlik
- Duyarlılık
- Stabilitate (296)

3.4.1. Doğrusallık

Yöntemin belirli bir konsantrasyon aralığında, analizi yapılan madde konsantrasyonu ile deney bulgularının doğrudan orantılı olmasını sağlama özelliğidir (296). Stok çözeltinin hareketli fazla uygun seyreltmeleri yapılarak sırasıyla 20, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 ve 0,2 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiş ve HPLC sisteminde analizleri yapılmıştır. Doğrusallık analizinde, maddenin konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları kullanılarak doğru denklemi hesaplanmış ve bu denklem ile elde edilen determinasyon katsayısının önem kontrolü yapılmıştır. Determinasyon katsayısının 0,995'ten büyük olması istenmektedir (296).

3.4.2. Doğruluk

Yöntem ile bulunan deney bulgularının gerçek değerlere olan yakınlığı doğruluk analizi ile belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi için kalibrasyon doğrusunda yer alan ND ile hazırlanan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,2, 2,5 ve 20 µg/mL) altı farklı örnek hazırlanmış ve tayin edilen konsantrasyonla eklenen konsantrasyondan hareketle % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (296).

3.4.3. Kesinlik

Yöntemin art arda yürütülen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade eden standart sapma (SS) veya bağlı standart sapma (BSS), kesinlik parametresi olarak değerlendirilir. Kesinlik, bir yöntemin normal çalışma şartlarında tekrar edilebilirlik veya tekrar elde edilebilirlik seviyesinin ifadesidir (296).

Tekrarlanabilirlik

Tez çalışmalarında kullanılan HPLC yönteminin tekrarlanabilir olduğunu tespit etmek amacıyla kalibrasyon doğrusunda yer alan ND ile hazırlanan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,2, 2,5 ve 20 µg/mL) örnekler 6 kere peş peşe uygulanmış ve bu uygulama ile elde edilen pik alanlarının \bar{X} , SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır. BSS'nin %2'den küçük olması gerekmektedir (296).

Tekrar Elde Edilebilirlik

Tez çalışmalarında kullanılan HPLC yönteminin tekrar edilebilir olduğunu tespit etmek amacıyla kalibrasyon doğrusunda yer alan ND ile hazırlanan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,2, 2,5 ve 20 µg/mL) altı farklı örnek analiz edilmiş ve bu uygulama ile elde edilen pik alanlarının \bar{X} , SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır. BSS'nin %2'den küçük olması gerekmektedir (296).

3.4.4. Duyarluluk

Saptama Sınırı (“*Limit of Detection*”)

Analizi yapılan maddenin miktar olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Analizdeki sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon, bu değeri göstermektedir (296).

Miktar Tayini Sınırı (“*Limit of Quantitation*”)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak miktar tayini sınırı olarak tanımlanmaktadır. Analizdeki sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon, bu değeri ifade etmektedir (298).

3.4.5. Özgüllük (Seçicilik)

Bir yöntemin analizi yapılacak maddeyi özgül olarak tayin edilebilme yeteneğidir (296). Bu amaçla formülasyonun içeriğinde yer alan yardımcı maddelerin (peptit, PLGA 503, DSPE-PEG-Maleimit, Lesitin ve PBS) HPLC ile analizleri yapılarak kromatogramları elde edilmiş ve ND ile benzer alıkonma süresinde absorbans piki verip vermedikleri incelenmiştir.

3.4.6. Stabilite

ND'nin deney boyunca stabil olarak kaldığını göstermek için 2,5 µg/mL konsantrasyonda 3 seri halinde çözeltileri hazırlanmış ve hemen, 24. ve 48. saatlerde analiz edilmiştir.

3.5. Nintedanib Çözünürlük Çalışmaları

ND'nin etanol ve dimetil formamit (DMF) gibi organik çözücülerde sırasıyla 2 ve 5 mg/mL konsantrasyonda çözüldüğü, suda ise az çözünür olduğu bildirilmiştir (297). Bu sebeple, in vitro salım çalışmalarında *sink* koşulun sağlanması için in vitro salım ortamı olarak kullanılabilir ortamlardaki ND çözünürlüğü tayin edilmiştir. ND çözünürlük çalışmaları pH 7,4 PBS ve %0,5 Tween 80 içeren pH 7,4 PBS ile yürütülmüştür. Bunun için, aşırı miktarda (25 mg) ND tartılıp 1 mL'lik ortamda, 100 rpm ile 72 saat boyunca 25°C'de karıştırılmış (297) ve süre sonunda 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi ile çözünmeyen ilaç ayrılarak süpernatant elde edilmiştir. Daha sonra süpernatant 0,22 µm'lik filtrelerden süzülerek Bölüm 3.3'te belirtilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.6. Formülasyon Çalışmaları

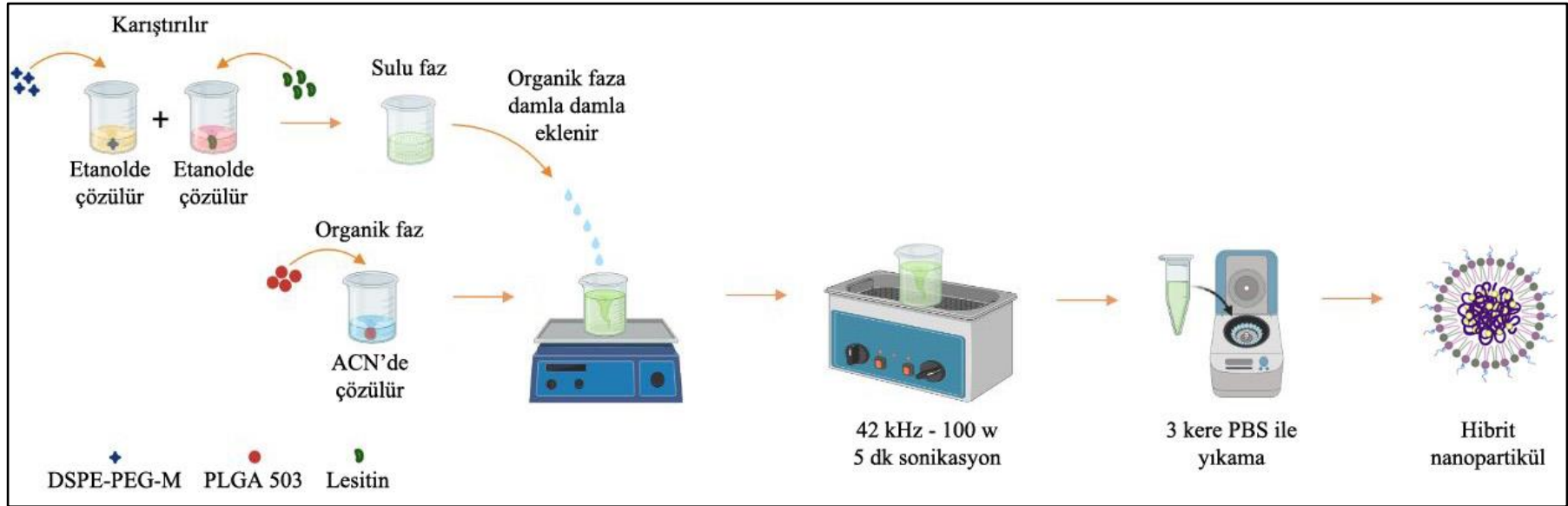
Tez çalışması kapsamında, ilaçların KBE'yi geçmesi için sıklıkla tercih edilen taşıyıcı sistemlerden biri olan polimerik iç çekirdek lipit dış kabuk yapısına sahip HNP formülasyonları tasarlanmıştır (298). Formülasyon tasarımı için polimerik iç çekirdek için PLGA 503, lipit dış kabuk yapısını oluşturmak için 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[amino-(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG)-maleimit ve lesitin değerlendirilmiştir. Ayrıca, tasarlanan HNP'lerin MS'ye bağlı olarak omurilikte biriktiği belirlenen tip I kolajene hedeflenmesi ve bu bölgede ND salımı yaparak fibrozis oluşumunu engellemesi planlanmıştır. Bunun için, tasarlanan nihai HNP formülasyonlarının dış kabuğunda yer alan DSPE-PEG-maleimit, tip I kolajene özgül olarak bağlanan TKKTLRT peptidi ile CGGG bağlayıcı dizisi aracılığıyla maleimit tiyol konjugasyonu gerçekleştirilerek konjuge edilmiş (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) ve aktif hedeflendirme sağlanmıştır.

3.6.1. Konjugasyon İşlemi Yapılmamış Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

ND içeren ve boş HNP'lerin hazırlanmasında emülsiyon sonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Literatürde bu yöntemin suda çözünmeyen ilaç içeren HNP'lerin hazırlanmasında en uygun yöntem olduğu bildirilmiştir (299). HNP'lerin hazırlanması şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bu çalışmaların öncesinde önformülasyon çalışmaları yapılarak aşağıdaki işlem basamakları oluşturulmuştur.

HNP'lerin hazırlanması basamaklar halinde şu şekilde özetlenebilir (300):

- a) PLGA içeren organik faz hazırlanmıştır,
- b) Etkin madde olarak tercih edilen ND organik faza eklenmiştir (dolu HNP'lerde),
- c) Lesitin, DSPE-PEG Maleimit ayrı ayrı %4'lük etanol-su karışımında çözülmüş, uygun miktarlarda karıştırılmış, karışıma deiyonize su ile ilave edilerek sulu faz elde edilmiştir,
- d) Sulu faz organik faza 10:1 oranında ilave edilmiştir,
- e) Karışım ultrasonik banyoda 5 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur,
- f) Oluşan HNP'ler 10 kDa'luk molekül büyüklüğü geçirgenliğine sahip membran içeren filtrelili santrifüj tüpleri (Millipore, 10 kDa) kullanılarak santrifüj edilmiştir,
- g) HNP'ler tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (pH 7,4) ile yıkanmıştır.



Şekil 3.1 Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasının şematik gösterimi

3.6.2. Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonu

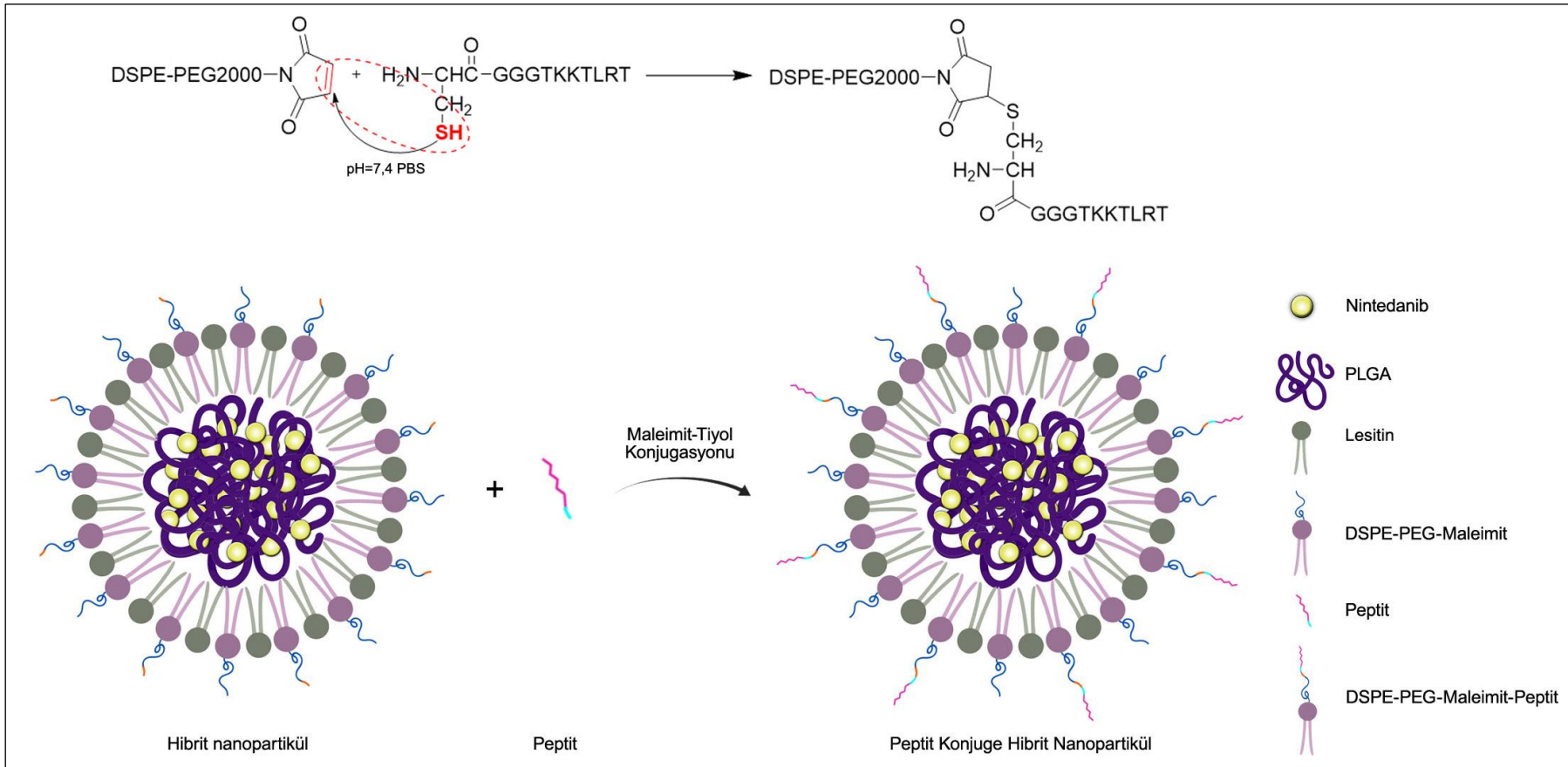
HNP formülasyonlarının dış kabuk kısmında yer alan lipitlerin maleimit kısmı, mevcut yöntemdeki aktif hedeflendirme için kullanılan peptit ile bağlantı sağlayan CGGG bağlayıcısındaki sistein amino asiti ile konjugasyona elverişli kimyasal bir grup sağlamaktadır. Bu kısımlar üzerinden maleimit tiyol konjugasyonu gerçekleştirilmiştir (301) (Şekil 3.2).

Peptide konjuge edilmiş HNP'lerin eldesi için 3.6.1. başlığında verilen hazırlama aşamasındaki "g) basamağı" şu şekilde uygulanmıştır: "g) Oluşan nanopartiküller 1:1 oranında tamponlanmış tuz çözeltisi (pH 7,4 PBS ve 2 mM EDTA) ile yıkanmış, uygun miktardaki CGGGTKKTLRT amino asit dizisine sahip peptit çözeltisi ile 60 dakika inkübe edilmiştir (inkübasyon öncesi PBS-EDTA içinde çözündürülen peptit, disülfid bağlarının kırılması için disülfid bağı:TCEP oranı 1:1 olacak şekilde TCEP ile 5 dakika muamele edilmiştir).

3.6.3. Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonunun Kontrolü

BCA (bisinkoninik asit) testi, biyolojik örneklerdeki toplam proteinin miktarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu nedenle, HNP formülasyonlarına konjuge edilen peptit miktarını belirlemek için BCA testi kullanılmıştır. Reaktif A ve Reaktif B, çalışma reaktifini elde etmek için 50:1 oranında karıştırılmıştır. Analiz için bir mikropilaka okuyucu kullanıldığından, numuneler ve standartlar çalışma reaktifleri ile 1:8 oranında karıştırılmıştır. Daha sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına soğumaya bırakılmıştır. Peptit içeriğinin tayini için her ölçümde 0-2 mg/mL konsantrasyon aralığında bir albümin standardı kullanılmıştır. Son olarak, 562 nm'de plaka okuyucuda analiz edilmiştir (302).

Konjuge peptit miktarının analizi için farklı oranlarda peptit-polimer karışımları hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışımlar 10.000 Da MWCO Amicon santrifüj filtrelerinden süzülmüştür. Süzme işleminden sonra konjuge olmayan peptitler filtreden geçeceği için filtrenin altında kalan örnekler BCA analizinde incelenmiş ve konjuge peptit miktarı hesaplanmıştır (303)..



Şekil 3.2. Hibrit nanopartiküllerin peptit ile konjugasyonunun şematik gösterimi

3.6.4. Konjugasyon İşlemi Yapılmış/Yapılmamış Hibrit Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Analizi

Hazırlanan HNP formülasyonlarının partikül büyüklüklerinin ve zeta potansiyellerinin tespitinde Malvern Zetasizer Nano Series ZS cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan HNP formülasyonları saf olarak ve PBS ile seyreltilerek ölçüm kuvvetlerine ayrı ayrı konmuş ve önce partikül büyüklükleri, sonrasında da zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Ölçümler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

Hibrit Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Tayini

HNP formülasyonlarının şekilleri ve yüzey özellikleri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelenmiştir. Görüntüleme işlemi için 400 mesh'lik karbon kaplı bakır gridler kullanılmış olup negatif boyama üranil asetat ile yapılmıştır. Görüntüleme işlemi JEOL JEM-1200 EX cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.5. Hibrit Nanopartiküllere Nintedanib Yükleme Etkinliğinin Değerlendirmesi

HNP formülasyonlarında yüklenen ND miktarının belirlenmesi için, hazırlanan HNP formülasyonundan sabit hacimde numune alınmış ve üzerine asetonitril eklenerek HNP yapısını parçalaması, bu sayede de ND'yi açığa çıkarması sağlanmıştır. Açığa çıkan ND'yi içinde bulunduran çözelti 0,45 µm'lik filtrelerden süzülerek önceden geliştirilen HPLC yöntemiyle miktar tayini yapılmıştır (304).

3.6.6. İn Vitro Salım Çalışması ve Salım Kinetik Modeli

ND içeren HNP formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları “diyализ membran yöntemi” ile gerçekleştirilmiştir (305). İn vitro salım çalışmaları kapsamında, hazırlanan HNP formülasyonlarından belirli miktarlarda alınarak

(süspende halde) 1 mL'ye pH 7,4 PBS ile seyreltilmiş ve diyaliz membran (10.000 Da Cut off) içine yerleştirilmiştir. Formülasyonu içeren diyaliz membran 15 mL'lik polipropilen tüplerin içerisine aktarılmış ve *sink* koşulu sağlamak amacıyla tüplere 10 mL %0,5 Tween 80 içeren pH 7,4 PBS çözeltisi eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanmış olan 6 ayrı salım hücresi, çalkalama hızı 100 rpm ve sıcaklığı $37 \pm 0,5$ °C'de sabit tutulan yatay çalkalayıcılı su banyosunun içerisine yerleştirilmiştir. Yukarıda belirtilen işlemlerin aynısı ND içeren peptit ile konjuge edilmiş HNP formülasyonlarına da uygulanmıştır. Belirlenmiş olan zaman noktalarında (0,5, 1, 2, 5, 8, 12, 24. saat) polipropilen tüplerin içindeki tüm ortam alınmış ve yerine 10 mL %0,5 Tween 80 içeren taze ortam eklenmiştir. Salım hücrelerinden alınan ortam 0,45 µm'lik membran filtreden süzülerek HPLC sisteminde miktar tayini yapılmıştır. Daha önceden çizilmiş olan kalibrasyon doğrusundan yola çıkılarak zamana bağlı olarak % salınan kümülatif ND miktarı tespit edilmiştir.

Hazırlanan HNP formülasyonlarından elde edilen salım değerleri ile çeşitli kinetik modeller kullanılarak salım süreçleri üzerinde matematiksel araştırmalar yapılmıştır. Bunun için *in vitro* salım profilleri DDSolver 1.0 programı aracılığıyla analiz edilmiştir (306). *In vitro* salım profilini analiz etmek için en yüksek determinasyon katsayısı (R^2), model seçim kriteri (MSC) ve en düşük Akaike bilgi kriteri (AIC) olmak üzere üç kriterin (306) yanı sıra sıfıncı derece, birinci derece, Hopfenberg, Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson-Cromwell, Peppas-Sahlin ve Weibull modellerini içeren sekiz model ile değerlendirme yapılmıştır (306).

Salım bulgularının kinetik değerlendirmelerine ek olarak, hazırlanan formülasyonlardan elde edilen ND'nin salım profilleri arasında hem benzerlik hem de farklılık açısından karşılaştırma yapılmıştır (307). Farklılık faktörünün (f1) ve benzerlik faktörünün (f2) hesaplanması, FDA'ya bağlı İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (CDER) tarafından hazırlanan Endüstri Rehberi'nde verilen metodoloji kullanılarak yapılmıştır (307) (ilgili denklemler aşağıda paylaşılmıştır).

$$f1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right] / \left[\sum_{t=1}^n (R_t) \right] \right\} \times 100$$

$$f2 = 50. \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

İlgili denklemlerdeki ifadeler şu şekildedir:

f_1 : farklılık faktörü,

f_2 : benzerlik faktörü,

n : zaman noktası sayısı,

R_t : Çalışmanın başlangıcından sonraki t zaman noktasında çözülmüş olan referans ürünün ortalama yüzdesi,

T_t : Çalışmanın başlangıcından sonraki t zaman noktasında çözülmüş olan test ürünün ortalama yüzdesidir.

Hesaplamalar her formülasyon için altı numuneye ait ortalama değerler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Test ve referans formülasyonları benzer olduğunda f_1 değeri 0 (sıfır) olur ve bu değer yükseldikçe iki profil arasındaki farklılık artar. f_2 değeri 0 ile 100 arasında değişir. Test ve referans profilleri arasındaki benzerliğin sayısal temsili aynı olduğunda 100'dür ve formülasyonlar arasındaki farklılık arttıkça bu değer küçülerek sıfıra yaklaşır (307).

3.6.7. Hibrit Nanopartiküllerin Sterilizasyonu

Tez kapsamında hazırlanan HNP formülasyonları, “aseptik ortamda filtrasyon” yöntemi kullanılarak sterilize edilmiştir (308). Aseptik ortamda sterilizasyonu sağlamak için süspansiyon halindeki formülasyonlar aseptik ortamda, steril laminar hava kabini içerisinde, daha önceden sterilize edilmiş kaplara 0,22 µm por açıklığına sahip steril filtrelerden süzülmüştür. Formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü 200 nm'nin altında olduğu için 0,22 µm (220 nm) por açıklığına sahip filtrelerin kullanılması formülasyonlar açısından problem oluşturmamaktadır.

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında hazırlanan HNP formülasyonlarının in vitro sitotoksikite özelliklerini değerlendirmek üzere L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından in vitro sitotoksitenin değerlendirilmesi amacıyla L929 hücre hattı önerilmektedir (309). Hücre kültürü

çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

L929 hücreleri için kullanılan DMEM'in içeriği, %10 (h/h) FBS, 50 U/mL Penisilin ve 50 µg/mL Streptomisinden meydana gelmektedir. L929 hücrelerinin çoğaltılıp büyütülmesi için 25 cm² flasklar ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör kullanılmıştır. Hücreler flask yüzeyinin %80'ini kaplayacak düzeye gelince Tripsin-EDTA (%0,25 Tripsin ve %0,02 EDTA) çözeltisi kullanılarak flask yüzeyinden alınıp daha önce kullanılmamış kültür ortamında süspande edilmiştir. Hücreler tripan mavisi ile boyanmış ve mikroskop kullanılarak sayılmıştır. Daha sonra hücreler doksan altı kuyucuklu plakalara her kuyucukta 100 µL/5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakalar bir gece inkübatörde bekletildikten sonra HNP dispersiyonu kültür ortamıyla seyreltilerek kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde uygulanmıştır. Kontrol grubu, yalnızca kültür ortamı eklenen hücreler kullanılarak oluşturulmuştur. Uygulama tamamlandıktan sonra plakalar 24 ve 48 saat olacak şekilde inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde PBS'de çözerek hazırlanan MTT çözeltisinden (5 mg/mL) her kuyucuğa 25 µL eklenmiştir. Dört saatlik inkübasyon tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 80 µL %23 SDS pH 4,7 (%45 DMF: %55 su (h/h) içinde) çözeltisi eklenmiştir. Plakalar bir gecelik inkübasyondan sonra absorbans ölçümü 570 nm'de mikropilaka okuyucuda yapılmıştır. Sonuçların hesaplanması kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek yapılmıştır.

3.8. İn Vivo Çalışmalar

Tez kapsamında gerçekleştirilen bütün in vivo çalışmalar Koç Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi ve Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM)'da yürütülmüştür.

3.8.1. Farelerde MS Oluşturulması ve MS Skorlaması Yapılması

İlerleyici MS hastalığının alt tipini simüle eden DOE modelini oluşturmak için C57BL/6 fareleri MOG antijeni ile immünize edilmiştir (310). Bunun için, Koç Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden Etik Kurul izni alınmış (Etik

protokol numarası, 2022.HADYEK.013) ve burada üretilen 9-13 haftalık dişi C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm fareler aynı bakım, beslenme ve barındırma koşullarında 12 saat gece ve 12 saat gündüz döngüsünde, oda sıcaklığında ve standart kafeslerde tutulmuştur. İmmünizasyon için, 0,1 mL MOG₃₅₋₅₅-CFA emülsiyonu farelerin üst sırt ve alt sırt bölgelerine cilt altından (s.c.) enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar izofluran anestezisi altında (1,5 L/dk oksijen akışı ve %3 izofluran buharı ile) uygulanmıştır. Enjeksiyonlardan sonra hayvanlar kafeslerinde dinlenmeye bırakılmıştır. İşlemden 2 saat sonra, her fareye 0,1 mL 200 ng boğmaca toksini (PTX) i.p. olarak enjekte edilmiştir. 1. gün PTX enjeksiyonları tekrarlanmıştır ve hayvanlar bir hafta boyunca kafeslerinde rahatsız edilmeden bırakılmıştır. Aşılamanın 10-12. gününden itibaren MS'i modelleyen ilk klinik bulgular ortaya çıkmaya başlamıştır.

DOE modelinin oluştuğu 12. günden itibaren 22. güne dek 6'şar hayvandan oluşan gruplara her gün, günde bir kez intraperitoneal tedavi uygulaması aşağıdaki şemaya göre yapılmıştır:

1. Kontrol (sham),
2. Negatif kontrol (sadece MOG uygulama),
3. Pozitif kontrol (2 mg/fare olacak şekilde; Metil prednizolon (MP) çözeltisi (Prednol® 250 mg Ampul)
 - 120 µg ND/fare olacak şekilde;
4. ND çözeltisi
5. F14 formülasyonu
6. P14 formülasyonu
- İlaç içermeyen HNP formülasyonları (taşıyıcı etkisi)
7. F7 formülasyonu
8. P7 formülasyonu

Uygulama sonrası Hooke Labs DOE Skorlama Kılavuzuna göre (Tablo 3.1) bir nöroloji uzmanı tarafından kör olarak iki günde bir klinik skorlama yapılmıştır.

22. günde, fareler, anestezisi olarak 100 mg/mL ketamin ve 20 mg/mL ksilazin anestezisininin 0,1ml/10mg vücut ağırlığı kokteyli ve de Dulbecco PBS (DPBS) ve %4

paraformaldehitin (PFA) kardiyak perfüzyonu uygulanarak sakrifiye edilmiştir. Daha sonra her bir farenin beyin ve omuriliği çıkarılmıştır.

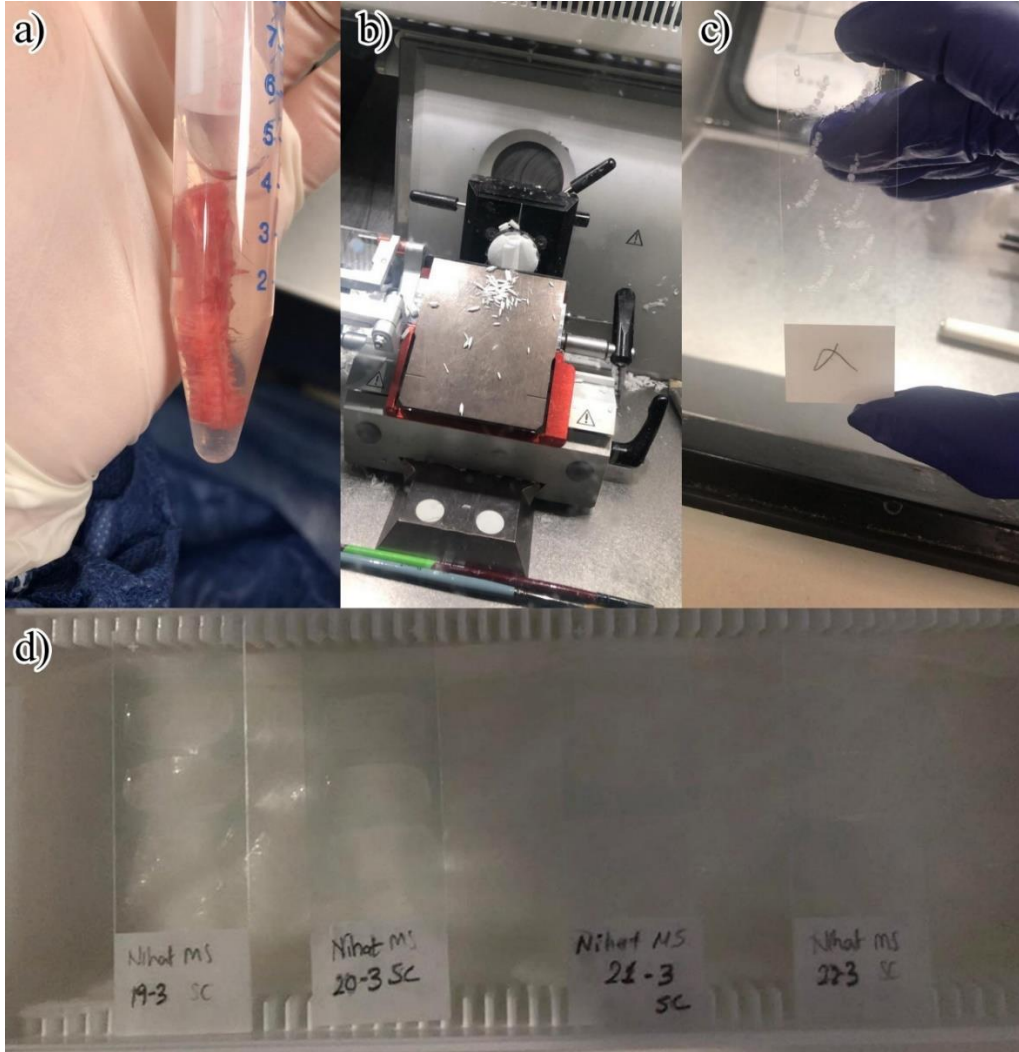
Tablo 3.1. Hooke Labs Kılavuzuna Göre DOE Skorlaması (311).

0,0	- Motor fonksiyonunda belirgin değişiklik yok
0,5	- Kuyruğun ucu gevşek
1,0	- Kuyruk kontrolü yok
1,5	- Kuyruk kontrolü yok ve arka ayaklardan birinde güçsüzlük
2,0	- Kuyruk kontrolü yok ve arka ayaklarda güçsüzlük
2,5	- Kuyruk kontrolü yok ve arka ayaklar sürünür - Bir bacakta hareket yok/bir bacak tamamen sürükleniyor ancak diğer bacakta hareket var - DOE şiddeti hafif görünür (skor 0,0-1,5 olarak) ancak farenin zaman zaman düşmesine neden olan güçlü bir baş eğimi var
3,0	- Kuyruk kontrolü yok ve arka ayaklar felç veya kalçadan ileri hareket edemez - Kuyruk kontrolü yok ve bir ön ve bir arka bacakta felç
3,5	- Kuyruk kontrolü yok ve arka ayaklar felç - Fare yan yatırıldığında kendisini düzeltemez
4,0	- Kuyruk kontrolü yok, tam arka bacak ve kısmi ön bacak felci - Fare çok az hareket ediyor ama uyanık ve besleniyor
4,5	- Tam arka ve kısmi ön bacak felci, hareket yok, fare uyanık değil. - Farenin ön bacaklarında minimum hareket var, temasa neredeyse hiç tepki vermiyor
5,0	- Fare kendiliğinden yuvarlanıyor - Fare felç nedeniyle ölü bulunur

3.8.2. İmmüno Floresan ve İmmünohistokimya

İn vivo çalışmalarda kardiyak perfüzyondan sonra elde edilen omurilik dokuları üzerinde (Şekil 3.3.a) immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. Kardiyak perfüzyondan sonra omurilik dokuları %4 PFA içinde 4 °C'de en az 24 saat

bekletilmiş ve daha sonra kriyoprezervasyon için sırasıyla %10, %20 ve %30 sükröz solüsyonlarında (0,1 M fosfat tamponunda) dokular her sükröz konsantrasyonu için falkon tüpünün dibine inene kadar inkübe edilmiştir. Dokuların dondurulması -20 °C’de optimum kesme sıcaklığı (OCT) bileşiminde gerçekleştirilmiştir. *Cryotome* cihazı kullanılarak (Şekil 3.3.b), poli-lizin kaplı cam lamlar üzerine 10 µm kalınlığında dondurulmuş omurilik kesitleri alınmıştır. Şekil 3.3.c’de gösterilen alanlardaki gibi 10 µm kalınlığında dondurulmuş omurilik kesitleri elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Fare omuriliği ve omurilik kesiti alma süreci a) Kardiyak perfüzyon sonrası çıkartılan omuriliğin saklanması, b) *Cryotome* cihazıyla OCT kaplı dokulardan kesit alınması, c) Elde edilen omurilik kesitleri, d) Boyanan kesitlerin kapatılması.

Antikor çözeltisi uzaklaştırılmış ve lamlar birer dakika DPBS’e üç kez daldırılarak yıkanmıştır. Daha sonra, çalışılacak ikincil antikor (süper blok çözeltisiyle

seyreltilmiş olarak) numunenin üzerine eklenmiş ve 37 °C’de karanlıkta 1,5 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, ikincil antikor uzaklaştırılmış ve DPBS içinde üç kez birer dakika süreyle tekrar yıkanmıştır. Daha sonra hücreler ya 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abcam) ile kaplanmış ya da ikili veya üçlü seriler için başka bir birincil antikor ile başlangıçtaki safhalardan geçirilerek tekrar boyanmıştır ve en sonunda da DAPI ile kaplanmıştır. Son olarak, örnekler DAPI ile kaplandıktan sonra lamlar bir kapak camı ile kapatılmış ve kapak camını lam üzerinde oje kullanılarak sabitlenmiştir (Şekil 3.3.d). Floresan görüntüler Leica DMi8 LCI mikroskop ile alınmış ve Leica LasX yazılımı ile incelenmiştir. Kullanılan antikorlar ve seyreltme faktörleri Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2. İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve seyreltme faktörleri

Hedef	Birincil antikor	Oran	İkincil Antikor	Oran
Miyelin	Fare anti-MBP	1:200	Keçi anti-fare Alexa-647	1:200
Kolajen I	Tavşan anti-kolajen I	1:200	Keçi anti-tavşan FITC	1:200

3.8.3. Görüntü Analizi

İmmünofloresan ve immünohistokimyasal değerlendirme çalışmalarında elde edilen, LAS X programından Tiff dosyaları olarak dışa aktarılan floresan mikroskopi görüntüleri (Leica, Almanya) içe aktarılmış ve ImageJ 1.52e (NIH, ABD) programı ile analiz edilmiştir. Hücre sayımı için DAPI pozitif hücreler “*Find Maxima*” ile işaretlenmiş ve gürültü her hücreyi tek nokta olarak işaretleyecek şekilde ayarlanmıştır. Görüntülerin floresan boyanması % alan olarak gösterilmiştir. Kesitlerde boyanan alan tüm doku alanına oranlanarak elde edilir. Kısaca; görüntü bölünmüş kanallar > ölçülecek gri tonlamalı kanal alınır > kanal çoğaltılır > çoğaltılmış kanalın eşiği alınır (koyu arka planda kırmızı) > gri tonlamalı kanalda ölçüm yapılır, % alan, eşikle sınırla, eşik görüntüsüne yeniden yönlendir > ve ölç basamakları ile veriler elde edilir.

HNP’lerin hedef dokulara ulaşım ulaşmadığını görmek için hayvanlara (n=3) uygulama yapılacak son gün floresan madde yüklü HNP uygulaması yapılmıştır. Bunun için, Bölüm 3.6.1’de verilen, peptit konjuge edilmiş ve edilmemiş HNP formülasyonları üretim yönteminin b basamağındaki ND yerine, Nil Kırmızısı (NK)

NK:polimer oranı 1:100 (a/a) olacak şekilde kullanılmıştır (312). Floresan madde yüklü HNP uygulanan hayvanlar sakrifiye edildikten sonra elde edilen dokulara ait floresan görüntüleri Leica DMI8 LCI mikroskop ile incelenmiş ve HNP'lerin varlığı nitel olarak tayin edilmiştir.

3.8.4. Beyin ve Omuriliğe Taşınan Nintedanib Miktarının Tayini ve Metabolomik Analizler

İn vivo çalışmalarda kardiyak perfüzyondan sonra elde edilen beyin ve omurilik dokularında bulunan ND'nin ekstraksiyonu çalışmaları Saoi ve ark. (313) tarafından geliştirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için, hayvanlara ait dokuların toplam ağırlığı belirlenmiştir. Tartılan dokular porselen havan içerisinde üzerine sıvı azot eklenerek dondurulmuş ve havan eli ile parçalanmıştır. Parçalanmış dokudan bir spatül yardımıyla 200 mg tartılarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Parçalanmış doku üzerine 1 mL soğuk kloroform:metanol (1:1, h/h) eklenmiş ve 3 dakika vortekse tabi tutulmuştur. Daha sonra 0,5 mL distile su eklenmiş ve 7 dakika daha vorteks uygulanmıştır. Vorteks uygulanan numuneler 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra 4 °C sıcaklıkta, 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 0,8 mL süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Alt fazın üzerine 0,3 mL soğuk metanol:su (1:1, h/h) eklenmiştir. 5 dakika vortekslendikten sonra 4 °C sıcaklıkta, 10.000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 0,3 mL süpernatant alınarak önceden alınan üst fazın olduğu tüpe ilave edilmiştir. Hazırlanan numunelerdeki solvan karışımı vakumlu santrifüjde uçurulmuştur.

Kurutulan numuneler ikiye ayrılmıştır. Numunelerin birinci kısmı Bölüm 3.3'te belirtilen yöntemdeki hareketli faz içinde çözülerek, aynı HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen veriler kullanılarak beyin ve omurilik dokularına geçen ND miktarı tespit edilmiştir.

Kurutulan numunelerin ikinci kısmı metabolomik analiz için asetonitril:su (1:1, h/h) içerisinde yeniden çözülmüştür. Çözülen numunelere 1 dakika vorteks uygulandıktan sonra 4 °C'de, 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 0,2 mL viallere alınarak Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, 6530, US) sistemiyle

metabolomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bütün numuneler için aynı işlemler tekrarlanmıştır. Bütün analiz aşamalarında (dokuların tartımında, ekstraksiyonunda, ultrasonik banyoda) numuneler buz aküsü üzerinde tutulmuştur. Kalite kontrol numuneleri (QC), kör numunesi ve havuzlanmış numuneler de çalışma günü hazırlanarak aynı koşullarda analiz edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen metabolomik çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Analiz edilecek numuneler ters faz kromatografi kolonu (2,1x 50 mm, 2,5 µM, Xbridge Waters) kullanılarak gradient elüsyon ile QTOF LC/MS'e sistemine enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak her ikisi de %0,1 formik asit içeren su (A) ve asetronitril (B) (A: %90 (1 dk) → %65 (4 dk) → %10 (11 dk) → %90 (14 dk) → %90 (20 dk)) kullanılmıştır. Akış hızı 0,200 mL/dk, enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. MS cihazı pozitif tarama modunda 100-1700 m/z aralığında çalışılmıştır. Enjeksiyonlar karışık sırada ve her 10 enjeksiyonda bir hareketli faz ve QC numunesi enjeksiyonu eklenerek yürütülmüştür. Cihazdan alınan ham veriler mzml uzantılı dosya formatına dönüştürülmüştür. Pik belirleme, pik eşleştirme, pik şiddetlerinin belirlenmesi gibi işlemler MS-DIAL yazılımı aracılığı ile yapılmıştır. Her bir numune grubu için elde edilen veriler normalizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu filtrelemeler sonucunda elde kalan piklerle Temel Bileşenler Analizi (PCA) (*unsupervised*) ve t testi ve *fold change* (*supervised*) yöntemler kullanılarak gruplar arasında farklılaşan pikler tespit edilmiştir. MetaboAnalyst yazılımı kullanılarak her bir örnek grubu için PCA grafikleri ve metabolit listeleri çıkarılmıştır. Bu piklerde test numunelerin kontrol numunelerine göre kaç kat değiştiği ve değişimin hangi yönde (artış, azalış) olduğu belirlenmiştir (t-testi < 0,05 ve MdFC ≥ 1,5). Uygulanan her bir filtre sonucu elde edilen pik sayıları kaydedilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analizler

Analizler sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel analizi Microsoft Excel 2016 programı ve GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, ABD) programlarında Tukey çoklu karşılaştırma testi, eşleştirilmemiş t Testi, Mann-Whitney U Testi ve tekrarlayan ANOVA uygulanarak gerçekleştirilmiştir (**=p < 0,001; **=p < 0,01; *=p < 0,05 ve

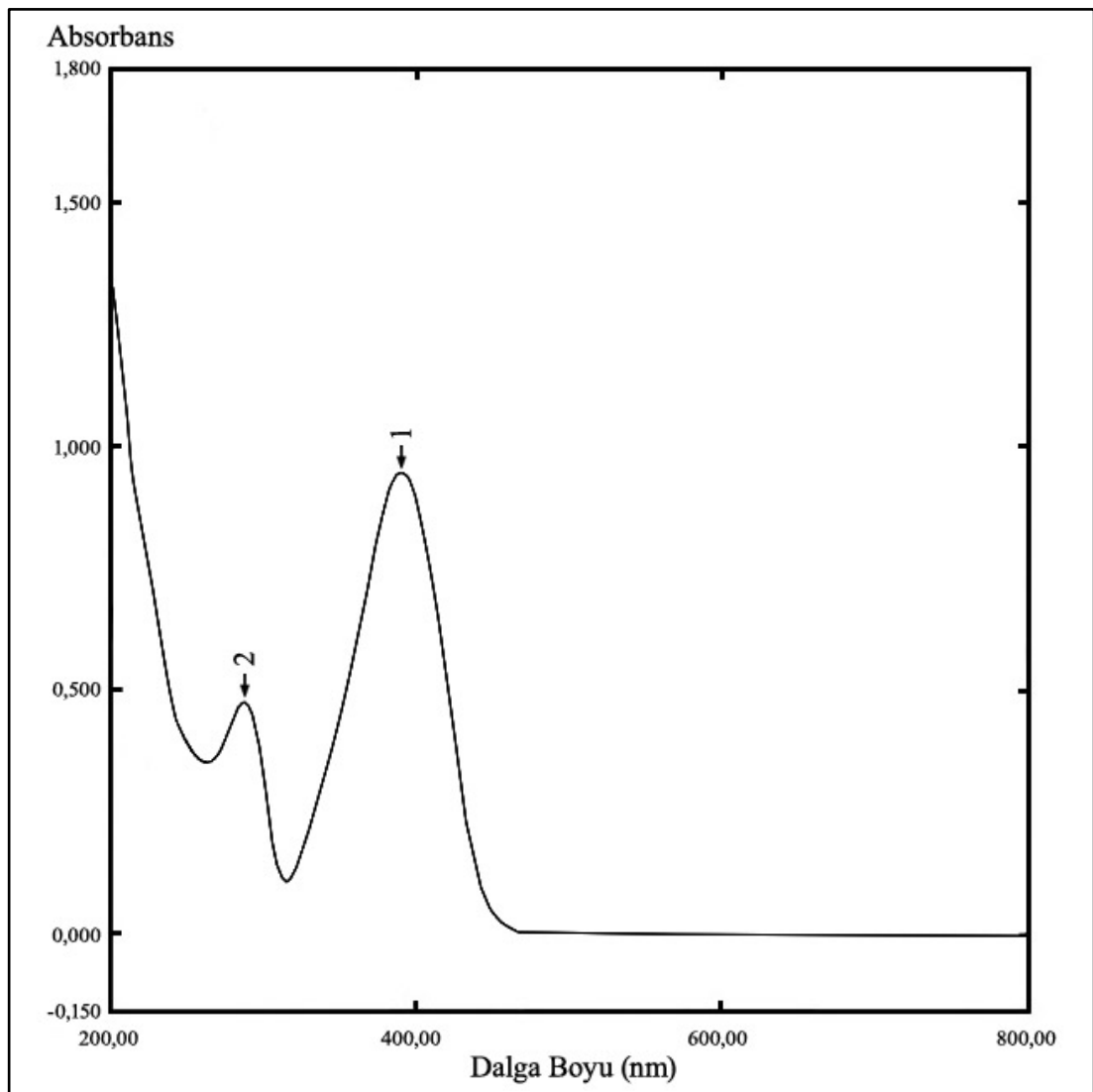
ns= anlamsız). İn vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Nintedanib'in Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

4.1.1. UV Spektrumu

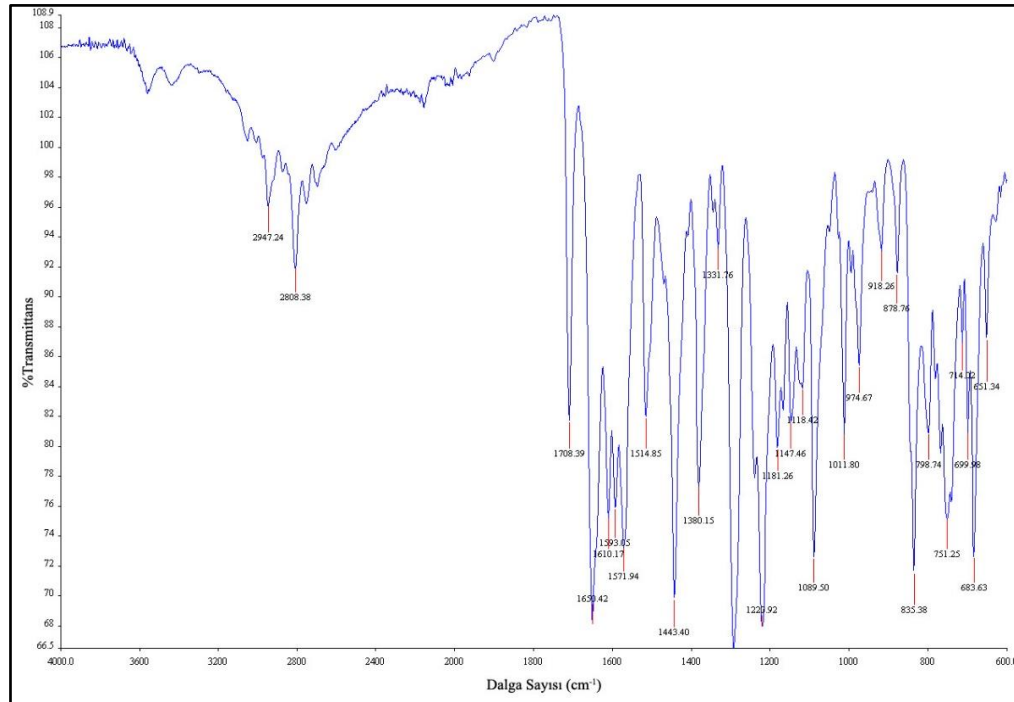
ND'nin UV spektrumu Bölüm 3.2.1'de açıklanan yöntemle çekilmiş ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. λ_{maks} değeri 392 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Nintedanib'in UV spektrumu (10 µg/mL).

4.1.2. FT-IR Spektrumu

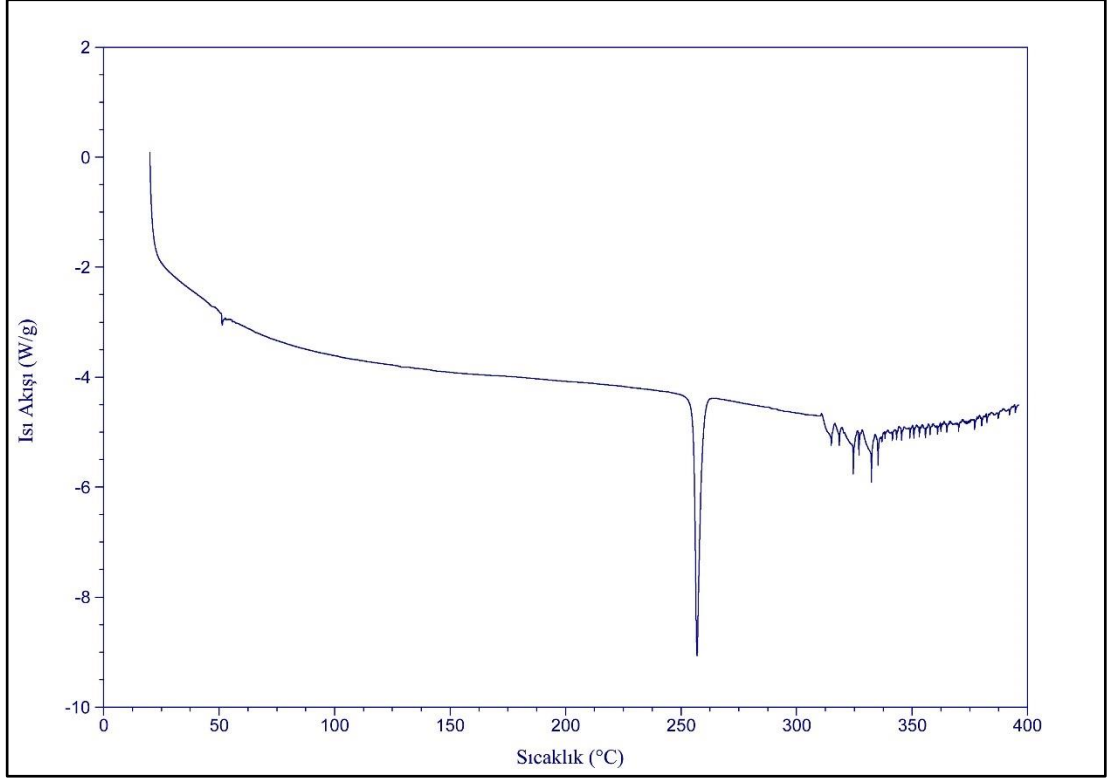
ND'nin FT-IR spektrumu Bölüm 3.2.2'de açıklanan yönteme göre çekilmiş ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. ND'nin FT-IR spektrumunda yapıya özgü C-H gerilim ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1600-1800\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1600-1800\text{ cm}^{-1}$), aromatik gerilim ($1500-1650\text{ cm}^{-1}$), C-C gerilim ($600-1400\text{ cm}^{-1}$) bantları saptanmıştır.



Şekil 4.2. Nintedanib'in FT-IR spektrumu.

4.1.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

ND'nin DSC spektrumu Bölüm 3.2.3'te açıklanan yönteme göre çekilmiş ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



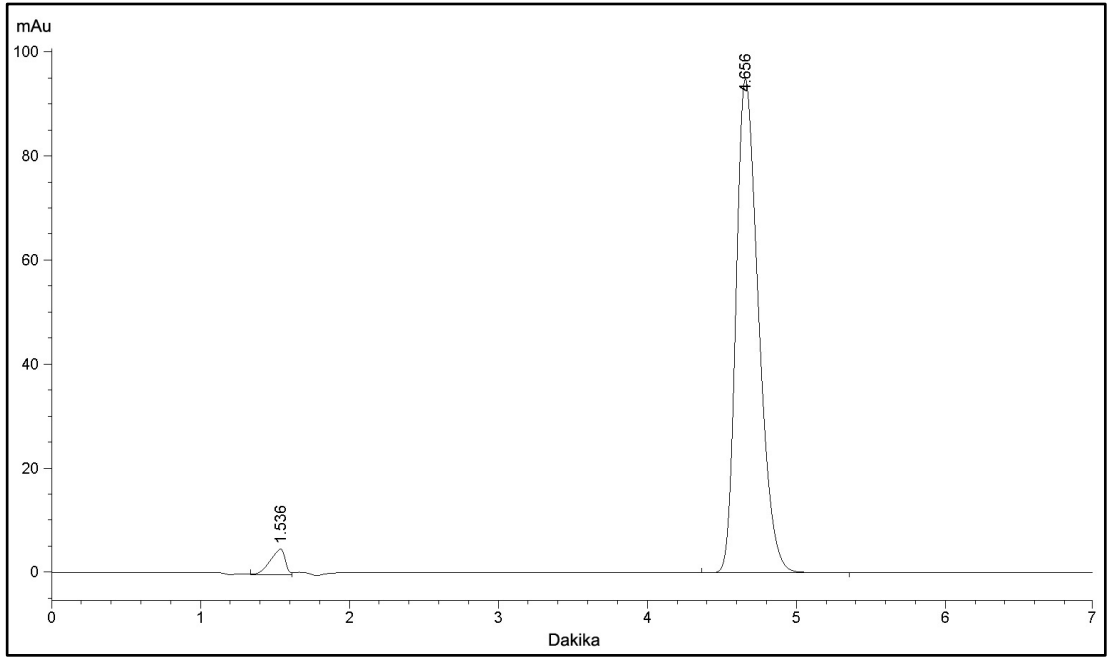
Şekil 4.3. Nintedanib'in DSC spektrumu.

4.1.4. Erime Noktası Tayini

ND'nin erime derecesi tayini Bölüm 3.2.4'te açıklandığı şekilde tespit edilmiştir. ND'nin erimeye başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık 250-260°C aralığı olarak kaydedilmiştir.

4.2. Nintedanib'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

ND'nin HPLC ile miktar tayini çalışması Bölüm 3.3'te belirtilen koşullarda yürütülmüştür. ND'ye ait HPLC piki 392 nm'de 4,65 dakikada Şekil 4.4'te görüldüğü gibi elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Nintedanib'in HPLC kromatogramı (20 µg/mL).

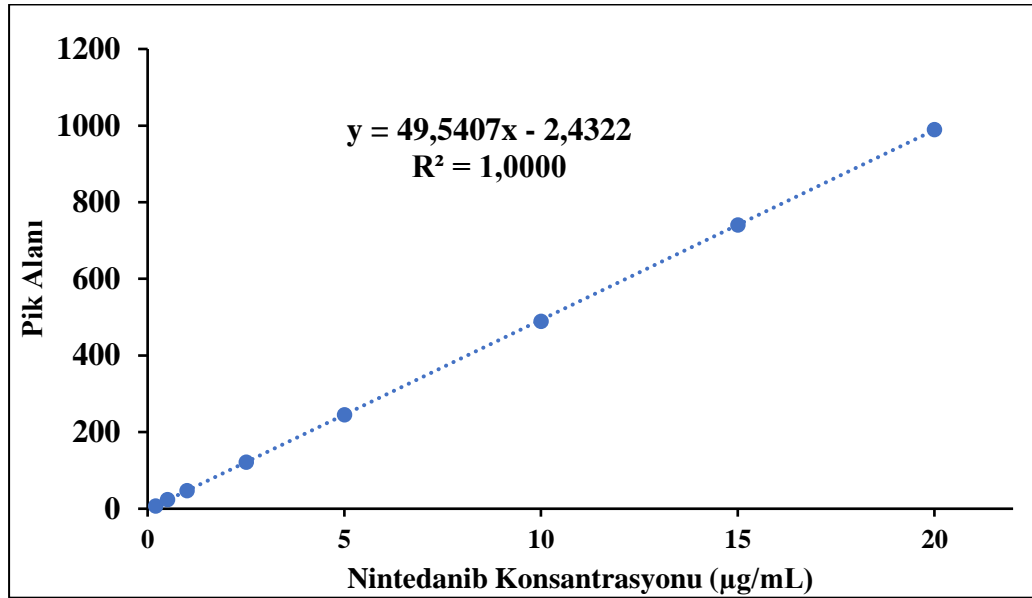
4.3. Analitik Yöntem Validasyonu

HPLC yönteminin analitik validasyonun değerlendirilmesinde Bölüm 3.4'te detayları verildiği üzere aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir.

4.3.1. Doğrusallık

ND'nin doğrusallık çalışması sırasında etkin maddenin 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL konsantrasyonlarındaki piklerine ait eğri altında kalan alanların belirlenmesi ile hazırlanmıştır. ICH rehberlerine göre istenen konsantrasyon olan 10 µg/mL'nin %200 ve %25 değerlerini içerecek şekilde ve en az 6 nokta alınarak

konsantrasyonlar saptanmıştır. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.5'te yer almaktadır.



Şekil 4.5. Doğrusallık çalışmasıyla elde edilen nintedanib kalibrasyon eğrisi (n=6).

4.3.2. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi için kalibrasyon eğrisi aralığında bulunan yüksek, orta ve düşük konsantrasyonda olmak üzere üç değişik konsantrasyonda (0,2 µg/mL, 2,5 µg/mL ve 20 µg/mL) üç seri çözelti ile analiz yapılmış ve % geri kazanımları tespit edilmiştir. Bulgular Tablo 4.1'de gösterilmiş ve BSS'leri %2'nin altında bulunarak yöntemin doğruluğu teyit edilmiştir (296).

Tablo 4.1. Nintedanib'in yöntem validasyonuna ait doğruluk, geri kazanım ve BSS değerleri (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
0,20	0,1990	99,50	1,97
2,50	2,4983	99,93	0,17
20,00	20,0313	100,15	0,02

4.3.3. Kesinlik

Tekrarlanabilirlik

ND'nin 0,2 µg/mL, 2,5 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin üç ayrı sefer ölçülmesi ile tespit edilen pik alanları ortalamasının kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanarak konsantrasyon ve BSS değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4.2'de gösterilmiş ve BSS değerleri %2'nin altında olduğu belirlenmiş ve yöntemin kesinliği saptanmıştır (296).

Tablo 4.2. Nintedanib'in yöntem validasyonuna ait tekrarlanabilirlik bulguları (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	BSS (%)
0,20	0,2010	1,32
2,50	2,4957	0,07
20,00	20,0287	0,01

Tekrar Elde Edilebilirlik

ND'nin 0,2 µg/mL, 2,5 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerinin ölçümleri ile belirlenen pik alanlarının eğri altında kalan alan değerlerinin ortalamasının kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanmasıyla konsantrasyonlar ve BSS değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Tablo 4.3'te gösterilmiş ve BSS değerleri %2'nin altında olduğu belirlenmiş ve yöntemin kesinliği saptanmıştır (296).

Tablo 4.3. Nintedanib'in analitik validasyonuna ait tekrar elde edilebilirlik bulguları (n=6).

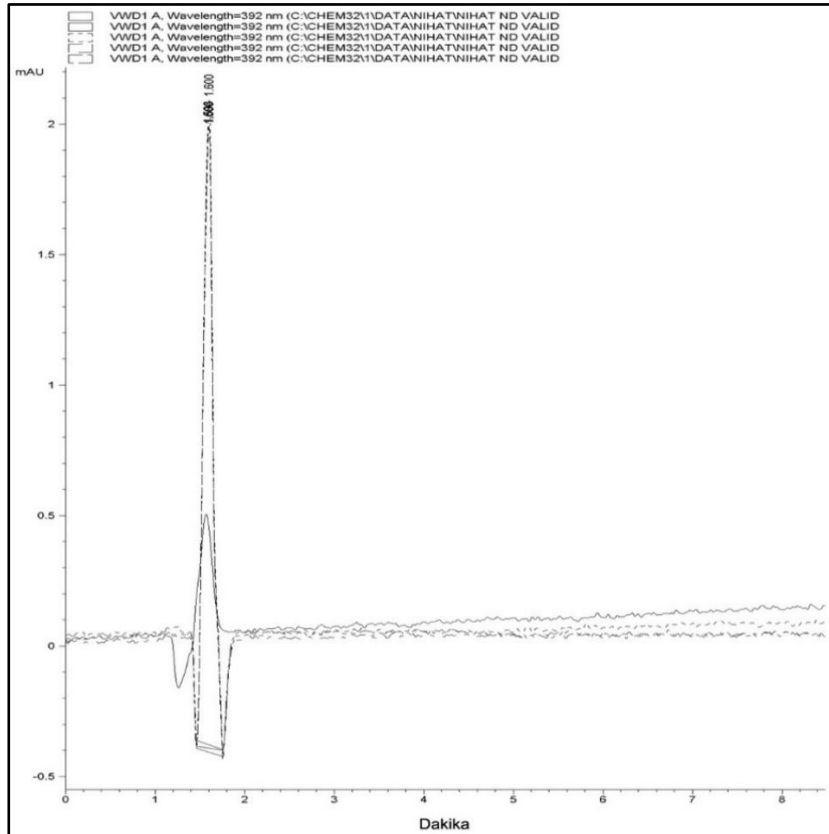
Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	BSS (%)
0,20	0,1995	0,60
2,50	2,5058	0,15
20,00	20,0315	0,01

4.3.4. Duyarlılık

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği şekilde analitik yöntemin saptama sınırı ve miktar tayini sınırı hesaplanıp sırasıyla 0,1645 µg/mL ve 0,4984 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.3.5. Özgüllük

HNP formülasyonları hazırlanırken kullanılan yardımcı maddeler DSPE-PEG-Maleimit, Lesitin, PLGA 503, PBS ve peptitin mevcut analitik yöntemde 1-2 dakika aralığında çok düşük şiddette pikleri olduğu ve ND'nin oluşturduğu pik alanında girişim yapmadığı (bkz. Şekil 4.6) tespit edilmiş olup yöntemin özgüllüğü gösterilmiştir (296).



Şekil 4.6. Özgüllük çalışmasıyla elde edilen HPLC kromotogramı.

4.3.6. Stabilite

ND'nin deneyler süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla 2,5 µg/mL konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve örnekler hemen, 24. saatte ve 48. saatte analiz edilmiştir.

Tablo 4.4. Nintedanibin stabilitesine ait bulgular (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (saat)	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
2,50	0	2,4983	99,93
2,50	24	2,4741	98,96
2,50	48	2,4675	98,70

4.4. Çözünürlük Çalışmaları

Bölüm 3.5'te belirtilen yöntemle yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4.5'te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre salım çalışmasında ND'nin yüksek oranda çözünebilmesi için %0,5 Tween 80 içeren pH 7,4 PBS çözeltisinin salım ortamı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.5. Nintedanib'in farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri ($x \pm SS$, n=6).

Ortam	pH 7,4 PBS	pH 7,4 PBS (%0,5 Tween 80)
Çözünürlük (µg/mL)	5,81 ± 1,27	141,60 ± 4,57

4.5. Formülasyon Çalışmaları

4.5.1. Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bölüm 3.6.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan HNP'ler için farklı polimer miktarları, lipit miktarları ve sonikasyon güçleri kullanılmıştır. Çalışma boyunca aynı sonikasyon süresi kullanılmıştır. Formülasyonların içerikleri Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan bazı cihaz parametreleri ve bileşen miktarları.

Formülasyon	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Sonikasyon gücü (w)	70	100	100	100	100	100
Lesitin (mg)	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
DSPE-PEG-Maleimit (mg)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
PLGA (mg)	1,0	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0

Farklı lipit miktarları ve sonikasyon güçleri kullanılan formülasyonlar Tablo 4.7’de belirtilmiştir.

Tablo 4.7. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan bazı cihaz parametreleri ve bileşen miktarları (n=3).

Formülasyon	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Sonikasyon gücü (w)	100	100	100	100	100	40
Lesitin (mg)	0,125	0,100	0,150	0,125	0,125	0,125
DSPE-PEG-Maleimit (mg)	3,0	3,0	3,0	2,5	3,5	3,0
PLGA (mg)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

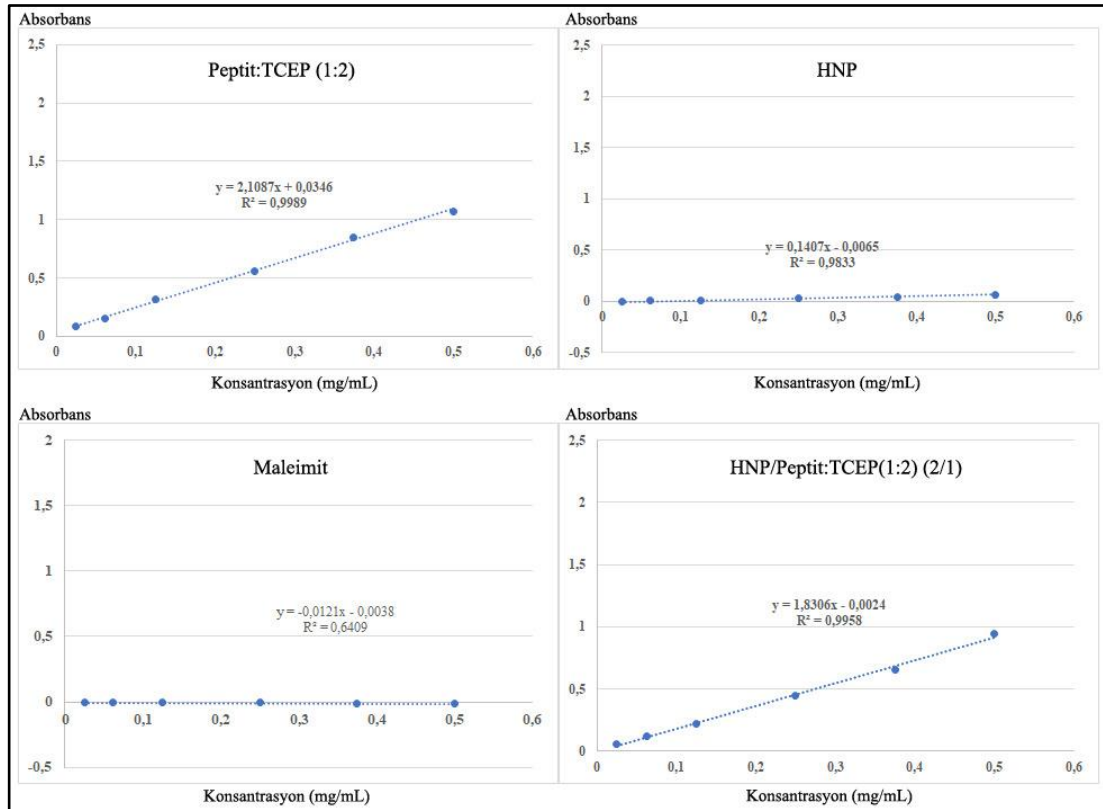
4.5.2. Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonu

Bölüm 3.6.3’te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen BCA yöntemi ile HNP, maleimit ve Peptit:TCEP (1:2) için ayrı ayrı veya birlikte ölçüm yapılarak konjugasyon ortamında Peptit:TCEP dışında (1:2) bulunan bileşenlerin ölçüm sırasında absorbans verip vermediği veya girişime neden olup olmadıkları analiz edilmiştir (Tablo 4.8 ve Şekil 4.7). Yapılan analiz sonucunda maleimit herhangi bir absorbans değeri vermezken, HNP’lerin ihmal edilebilir düzeyde absorbans verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, peptit konsantrasyonu ile absorbans değerlerinin doğrusal şekilde arttığı saptanmıştır, bu nedenle konjugasyon yüzdesinin hesaplanmasında yöntemin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 4.8. HNP, maleimit, (HNP/Peptit:TCEP (1:2)) (2/1) ve Peptit:TCEP (1:2)'ye ait konsantrasyon absorban verileri ($\bar{x} \pm SS$, n=3)

Peptit:TCEP (1:2) Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama Absorbans \pm SS	HNP Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama Absorbans \pm SS
0,5	1,0736 \pm 0,020	0,5	0,0676 \pm 0,017
0,375	0,8431 \pm 0,014	0,375	0,0407 \pm 0,010
0,25	0,5621 \pm 0,012	0,25	0,0303 \pm 0,002
0,125	0,3119 \pm 0,010	0,125	0,0086 \pm 0,001
0,062	0,1559 \pm 0,017	0,062	0,0044 \pm 0,001
0,025	0,0804 \pm 0,003	0,025	ÖY
Maleimit Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama Absorbans \pm SS	(HNP/Peptit:TCEP (1:2)) (2/1) Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama Absorbans \pm SS
0,5	ÖY	0,5	0,9434 \pm 0,032
0,375	ÖY	0,375	0,6507 \pm 0,023
0,25	ÖY	0,25	0,4456 \pm 0,018
0,125	ÖY	0,125	0,2165 \pm 0,022
0,062	ÖY	0,062	0,1194 \pm 0,011
0,025	ÖY	0,025	0,0573 \pm 0,013

ÖY: Ölçüm yok: 0 veya negatif absorban değerleri elde edildiğinde ölçüm yok olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.7. BCA analizine göre HNP, maleimit, (HNP/Peptit:TCEP (1:2)) (2/1) ve Peptit:TCEP (1:2)'ye ait konsantrasyona karşı absorbans grafikleri (n=3, $x \pm SS$).

HNP'ler ile peptit arasındaki konjugasyon reaksiyonu HNP'nin dış kabuğundaki DSPE-PEG-Maleimit ile gerçekleştiğinden, optimum maleimit:peptit oranını saptamak için farklı mol oranlarında konjugasyon deneme çalışmaları yürütülmüştür ve Bölüm 3.6.3'te tarif edildiği şekilde konjugasyon yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Kullanılan maleimit ve peptit mol oranları ve konjugasyon yüzdeleri (n=3).

	Fiziksel Karışım			Konjugasyon		
	Maleimit: Peptit (2:1)	Maleimit: Peptit (1:1)	Maleimit: Peptit (1:2)	Maleimit: Peptit (2:1)	Maleimit: Peptit (1:1)	Maleimit: Peptit (1:2)
Filtreden geçen % peptit	94,34	97,60	93,62	16,87	46,94	50,89
Konjuge olan % peptit	5,66	2,40	6,38	83,13	53,06	49,11

4.5.3. Konjugasyon İşlemi Yapılmamış ve Yapılmış Hibrit Nanopartikül Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Analizi

Hazırlanan HNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayininde Malvern Zetasizer Nano Series ZS cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan HNP formülasyonları ölçüm kuvvetlerine konmuş ve önce partikül büyüklükleri sonrasında da zeta potansiyelleri tespit edilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon işlemi yapılmamış ve ND içermeyen (boş, “blank”) formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10. Konjugasyon işlemi yapılmamış, boş formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI değerleri (n=3, $x \pm SS$).

Formülasyon	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
F1	84,70 ± 1,733	0,088 ± 0,016	-2,76 ± 0,16
F2	44,82 ± 0,457	0,088 ± 0,016	-3,40 ± 0,31
F3	60,48 ± 2,807	0,144 ± 0,032	-7,76 ± 0,13
F4	63,58 ± 1,454	0,123 ± 0,002	-7,32 ± 0,33
F5	70,16 ± 0,751	0,074 ± 0,019	-8,74 ± 0,12
F6	73,77 ± 1,507	0,082 ± 0,007	-8,23 ± 0,11
F7	91,01 ± 2,207	0,133 ± 0,009	-9,12 ± 0,28
F8	72,92 ± 0,157	0,157 ± 0,018	-8,13 ± 0,08
F9	121,4 ± 1,133	0,117 ± 0,011	-9,49 ± 0,58
F10	107,10 ± 0,472	0,056 ± 0,005	-7,18 ± 0,86
F11	113,60 ± 2,721	0,066 ± 0,015	-8,05 ± 0,13
F12	98,06 ± 0,652	0,059 ± 0,037	-10,10 ± 0,07

Literatürde, KBE’yi aşmak için geliştirilen nanotaşıyıcılarda optimum partikül büyüklüğünün 100 nm civarında (<200 nm) olması gerektiği ve nanotaşıyıcılara etkin madde yüklenmesiyle genellikle partikül büyüklüğünde artış meydana geldiği bildirilmiştir (314). Bu nedenle formülasyon geliştirme çalışmalarının ileriki

aşamalarına F7 formülasyonu temel alınarak devam edilmesine, bu formülasyona ND yüklenerek peptit konjugasyonu yapılmasına karar verilmiştir. Formülasyon kodları ve partikül büyüklüğü, zeta potansiyel değerleri (Tablo 4.11) aşağıda sunulmuştur:

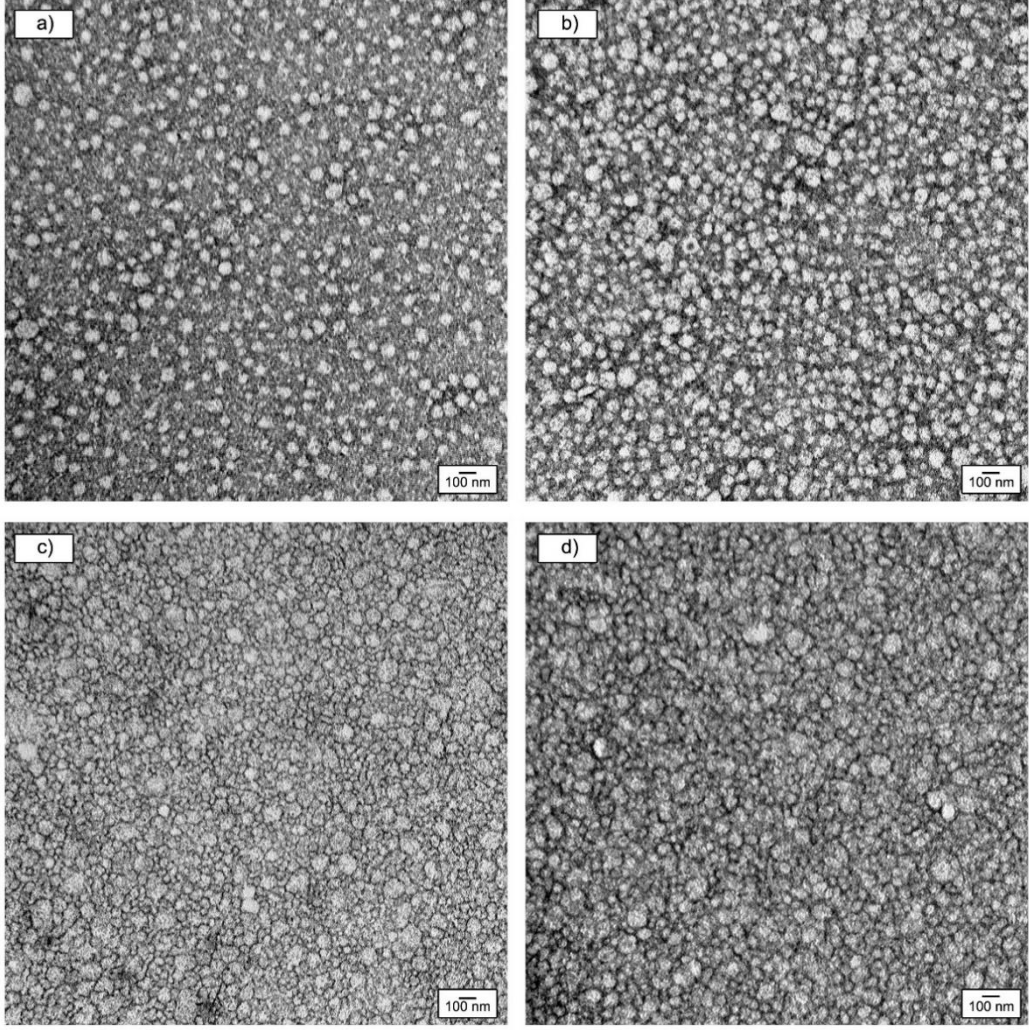
- **F7:** ND içermeyen peptit konjugasyonu yapılmış formülasyon
- **P7:** ND içermeyen peptit konjugasyonu yapılmış formülasyon
- **F14:** ND içeren peptit konjugasyonu yapılmamış formülasyon
- **P14:** ND içeren peptit konjugasyonu yapılmış formülasyon

Tablo 4.11. F7, P7, F14 ve P14 kodlu formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Formülasyon	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
F7	91,01 \pm 2,207	0,133 \pm 0,009	-9,12 \pm 0,28
P7	92,05 \pm 1,858	0,118 \pm 0,025	3,55 \pm 0,28
F14	109,80 \pm 0,152	0,223 \pm 0,218	-9,30 \pm 0,26
P14	110,60 \pm 0,158	0,296 \pm 0,029	3,70 \pm 0,32

Morfolojik Özelliklerinin Tayini

F7, P7, F14 ve P 14 kodlu formülasyonlarının şekilleri ve yüzey özellikleri Bölüm 3.6.3'te belirtildiği şekilde TEM kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.8'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Formülasyonların TEM görüntüleri. a) F7, b) F14, c) P7, d) P14 kodlu formülasyon.

4.5.4. Nintedanib Yükleme Etkinliğinin Değerlendirmesi

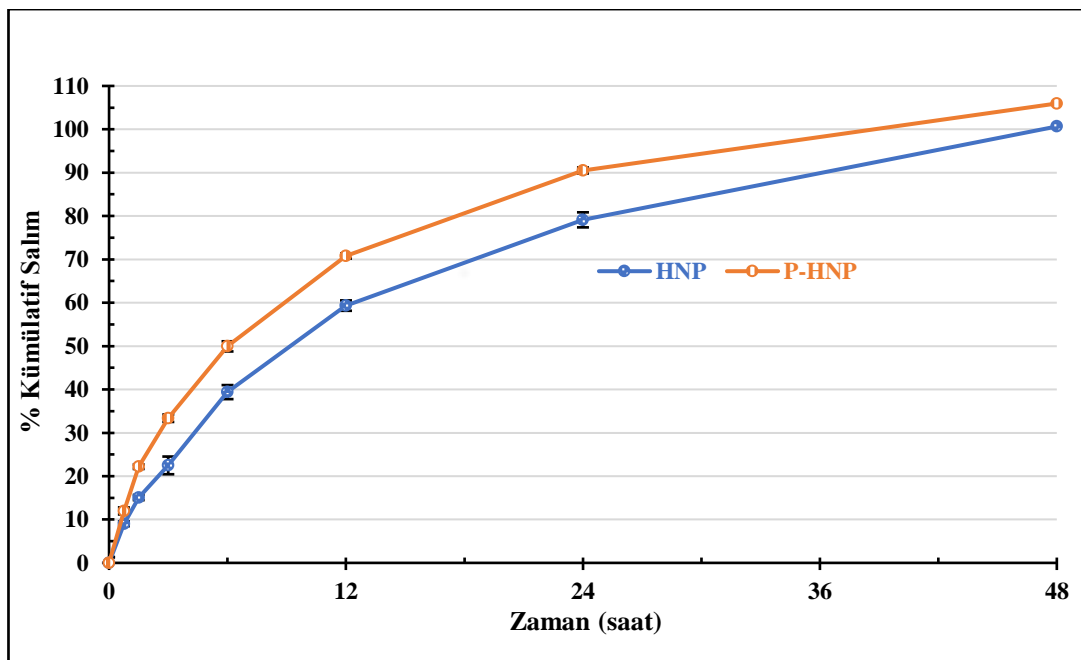
F14 ve P14 kodlu formülasyonlara yüklenen ND miktarı ve yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi Bölüm 3.6.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve bulgular Tablo 4.12'de sunulmuştur.

Tablo 4.12. F14 ve P14 kodlu formülasyonlara yüklenen ND miktarı bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Formülasyon	ND miktarı (mg)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
F14	6,68 \pm 0,02	66,84 \pm 0,27
P14	6,87 \pm 0,02	68,72 \pm 0,29

4.5.5. İn Vitro Salım Çalışması ve Salım Kinetik Modeli

F14 ve P14 kodlu formülasyonların in vitro ND salım çalışması Bölüm 3.5.6'da belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda zamana karşı % kümülatif ND miktarları hesaplanmış ve salım profilleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

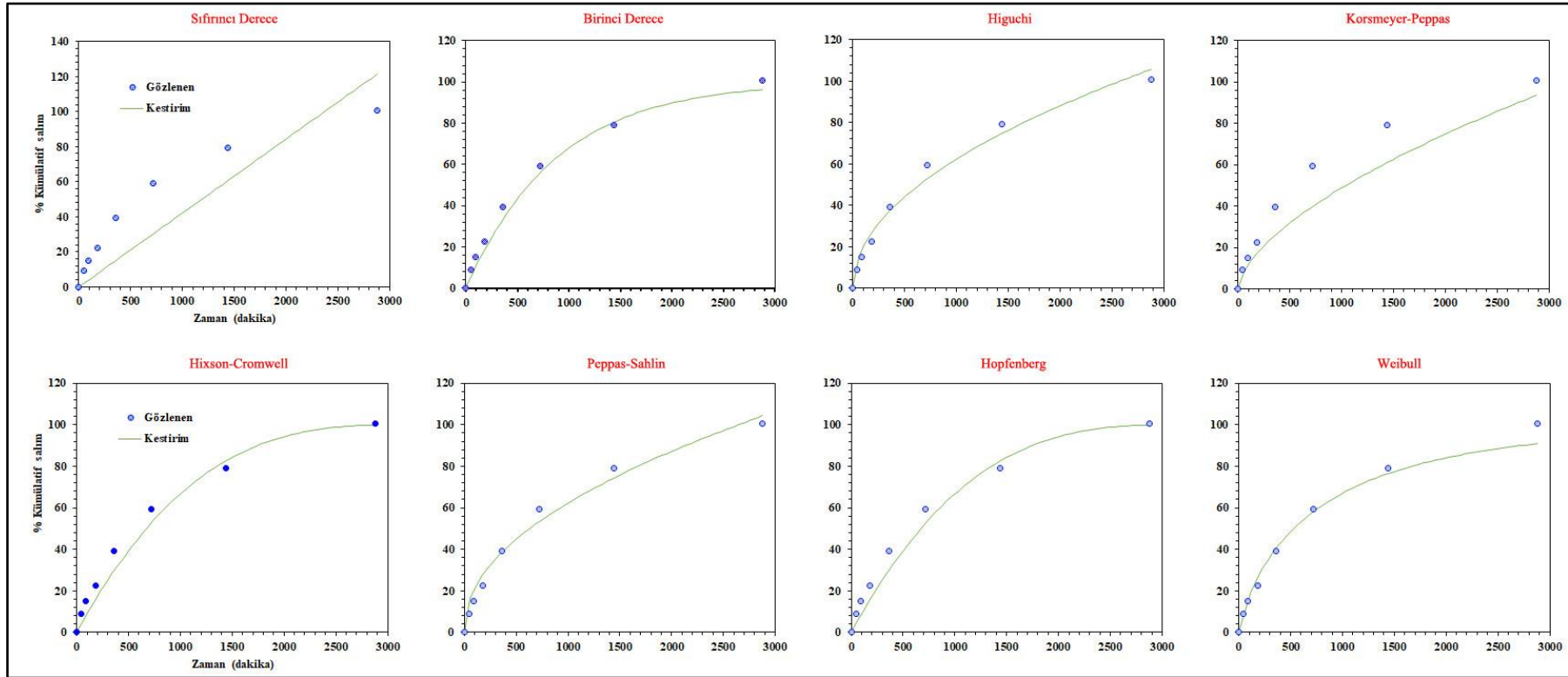


Şekil 4.9. F14 ve P14 kodlu formülasyonların kümülatif ND salım profilleri (n=6, $\bar{x} \pm SS$).

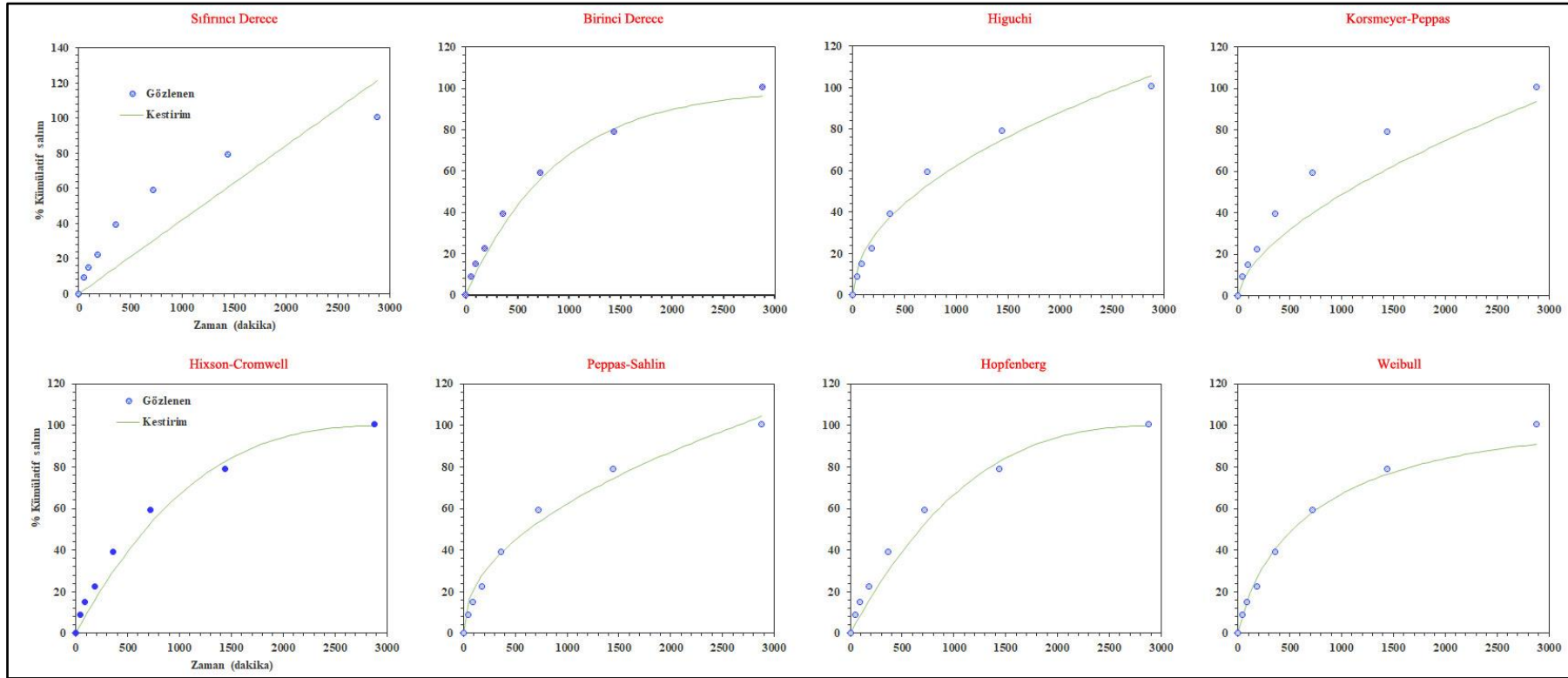
Salım çalışmalarından elde edilen bulgularla yapılan kinetik modelleme analizlerinin verileri Tablo 4.13'te ve Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de sunulmuştur. F14 ve P14 formülasyonlarının in vitro salım profilleri için yapılan benzerlik testinde ise f2 değeri 53 bulunurken, farklılık testinde f1 değeri 18 bulunmuştur.

Tablo 4.13. F14 ve P14 kodlu formülasyonların salım kinetiği modelleme bulguları.

Model ve denklem	Formülasyon					
	F14			P14		
	R ²	AIC	MSC	R ²	AIC	MSC
Sıfırıncı derece F=k ₀ .t	0,7137	64,8958	0,7995	0,5204	69,9400	0,2269
Birinci derece F = 100.(1-e ^{-k₁.t})	0,9861	40,7190	3,8216	0,9792	44,8513	3,3629
Higuchi F = k _H .t ^{0,5}	0,9849	41,3543	3,7422	0,9584	50,3729	2,6727
Korsmeyer-Peppas F = k _{KP} .t ⁿ	0,8732	59,1442	1,5185	0,7320	66,0508	0,7130
Hixson-Crowell F=100.[1-(1-k _{HC} .t) ³]	0,9700	46,8486	3,0554	0,9715	47,3643	3,0488
Peppas-Sahlin F = k ₁ .t ^m + k ₂ .t ^{2m}	0,9752	46,6329	3,0824	0,9754	47,4887	3,0333
Hopfenberg F = 100.[1-(1-k _{HB} .t) ⁿ]	0,9650	48,8486	2,8054	0,9719	47,9968	2,9697
Weibull F = 100.[1-e ^{-((t-T_i)^β)^α}]	0,9814	44,3420	3,3688	0,9858	43,0690	3,5857



Şekil 4.10. F14 formülasyonunun salım kinetiği modelleme grafikleri.



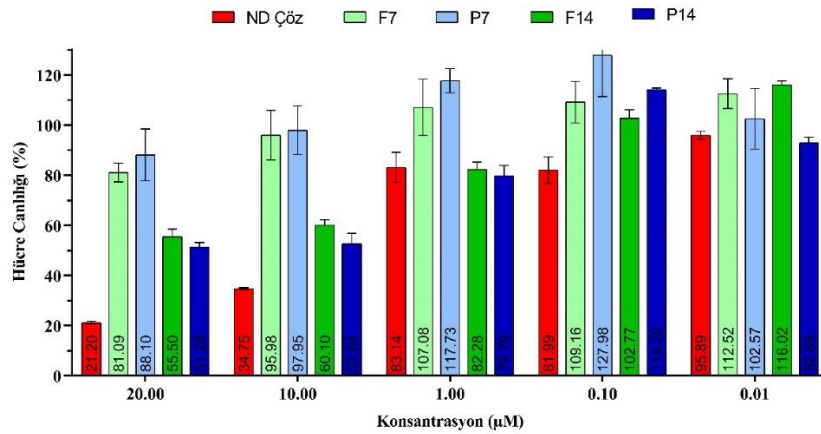
Şekil 4.11. P14 formülasyonunun salım kinetiği modelleme grafikleri

4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

ND çözeltisi (ND), F7, P7, F14 ve P14 formülasyonlarının L929 hücreleri üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisini gösteren hücre canlılığı değerleri Tablo 4.14 ve Şekil 4.12’de gösterilmiştir ve 48 saatlik değerleri ise Tablo 4.15 ve Şekil 4.13’te verilmiştir.

Tablo 4.14. ND çözeltisi ve HNP formülasyonlarının sitotoksik bulguları (24 saat) (n=3, x ± SS).

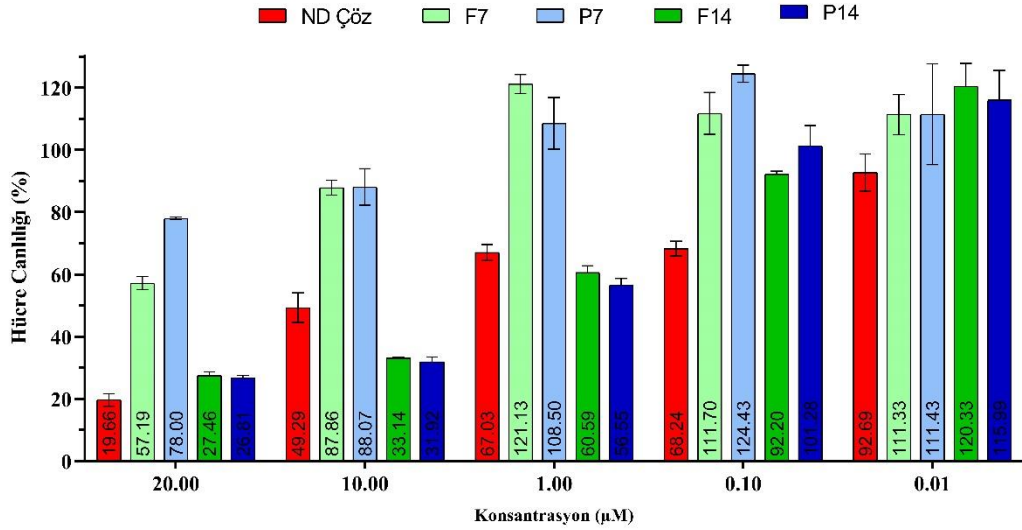
Konsantrasyon (µM)	F7 (%)	P7 (%)	F14 (%)	P14 (%)	ND (%)
20	81,08 ± 3,70	88,10 ± 10,34	55,50 ± 2,95	51,27 ± 1,80	21,19 ± 0,55
10	95,98 ± 9,86	97,94 ± 9,68	60,10 ± 2,14	52,64 ± 4,10	34,75 ± 0,41
1	107,07 ± 11,19	117,73 ± 4,79	82,27 ± 2,94	79,78 ± 4,13	83,14 ± 5,97
0,1	109,15 ± 8,30	127,97 ± 16,55	102,77 ± 3,31	114,20 ± 0,61	81,98 ± 5,29
0,01	112,51 ± 5,96	102,57 ± 12,11	116,02 ± 1,63	92,88 ± 2,29	95,89 ± 1,59



Şekil 4.12. ND çözeltisi ve HNP formülasyonlarının sitotoksik bulguları (24 saat) (n=3, x ± SS).

Tablo 4.15. ND çözeltisi (ND) ve HNP formülasyonlarının sitotoksosite bulguları (48 saat) (n=3, $x \pm SS$).

Konsantrasyon (μM)	F7 (%)	P7 (%)	F14 (%)	P14 (%)	ND (%)
20	57,18 $\pm 2,13$	77,96 $\pm 0,38$	27,46 $\pm 1,14$	26,80 $\pm 0,74$	19,65 $\pm 2,01$
10	87,86 $\pm 2,39$	88,06 $\pm 5,88$	33,13 $\pm 0,18$	31,91 $\pm 1,45$	49,29 $\pm 4,75$
1	121,13 $\pm 3,08$	108,50 $\pm 8,29$	60,59 $\pm 2,17$	56,55 $\pm 2,14$	67,02 $\pm 2,54$
0,1	111,70 $\pm 6,74$	124,43 $\pm 2,76$	92,20 $\pm 0,93$	101,28 $\pm 6,54$	68,23 $\pm 2,38$
0,01	111,33 $\pm 6,41$	111,43 $\pm 16,18$	120,32 $\pm 7,49$	115,98 $\pm 9,49$	92,68 $\pm 5,96$



Şekil 4.13. ND çözeltisi ve HNP formülasyonlarının sitotoksosite bulguları (48 saat) (n=3, $x \pm SS$).

4.7. İn Vivo Çalışmalar

4.7.1. Farelerde MS Skorlaması

DOE modelinin oluşturduğu 12. günden itibaren 22. güne dek 6'şar hayvandan oluşan gruplara her gün, günde bir kez intraperitoneal tedavi uygulaması aşağıdaki şemaya göre yapılmıştır:

1. Kontrol (*sham*),
2. Negatif kontrol (sadece MOG uygulama),
3. Pozitif kontrol (2 mg/fare olacak şekilde; MP çözeltisi (Prednol® 250 mg Ampul)
 - 120 µg ND/fare olacak şekilde;
4. ND çözeltisi
5. F14 formülasyonu
6. P14 formülasyonu
 - İlaç içermeyen HNP formülasyonları (taşıyıcı etkisi)
7. F7 formülasyonu
8. P7 formülasyonu

Uygulama sonrası Hooke Labs DOE Skorlama Kılavuzu'na göre (Tablo 3.1) bir nöroloji uzmanı tarafından kör olarak iki günde bir klinik skorlama yapılmıştır. Farelere ait klinik DOE skorlama verileri grafik halinde Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

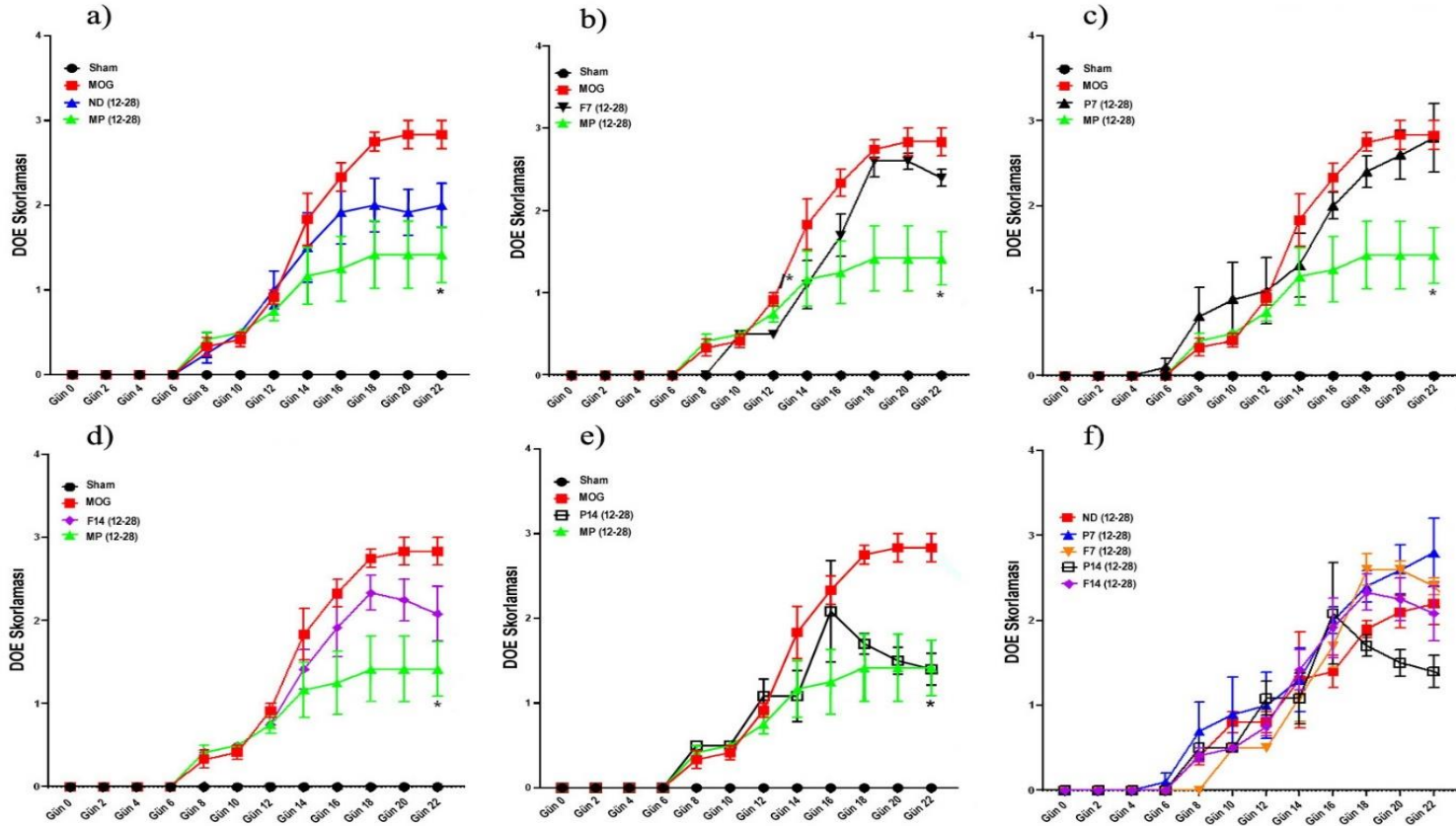
Sham grubu herhangi bir nörolojik bozukluk göstermemiştir. DOE skorlarının genel seyri gruplar arasında önemli ölçüde farklı bulunmuştur ($p < 0,001$, tekrarlanan ANOVA ölçümleri). MOG, MP çözeltisi ve ND çözelti grubu için semptomlar 10. gün sonrasında başlamıştır (Şekil 4.14.a). 10. günden sonra, MOG uygulanan grubun bütün DOE puanları *Sham* grubundan önemli ölçüde daha yüksek çıkmıştır.

Boş nanopartiküllerden gelebilecek taşıyıcı etkisini değerlendirmek için farelere F7 ve P7 formülasyonları uygulanmıştır. F7 formülasyonu, MP tedavisi, MOG ve *Sham* grupları farklı hastalık seyri göstermiştir (tekrarlanan ANOVA ölçümleri, $p < 0,001$), Şekil 4.14.b. P7 uygulanan farelerdeki semptomların seyri gruplar arasında farklılık göstermiştir (tekrarlanan ANOVA ölçümleri, $p < 0,001$), Şekil 4.14.c.

F14 formülasyonu, *Sham*, MOG, MP tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, DOE puanları açısından istatistiksel olarak farklılık göstermiştir (ANOVA'nın tekrarlanan ölçümleri, $p < 0,001$), Şekil 4.14.d. F14 ile tedavi, 12. günden sonra daha düşük puanlarla olsa da MOG grubu ile benzer bir seyir göstermiştir.

P14 formülasyonu, *Sham*, MOG, MP tedavisi uygulanan grupların DOE puanları arasındaki genel karşılaştırma anlamlıdır (tekrarlanan ANOVA ölçümleri, $p < 0,001$), Şekil 4.14.e. P14 grubu DOE puanları açısından MP tedavi grubuna benzerdir. P14 formülasyonu 16. günden sonra DOE skorlarında önemli düşüşe yol açsa da bu eğilim çalışma bitene dek MP tedavi grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar; kullanılan MS modelinde, ND içeren peptit konjugasyonu yapılmış sonuç formülasyonunun (P14), MS tedavisinde kullanılan piyasa preparatı Prednol® 250 mg ampul kadar etkili olduğunu göstermektedir.

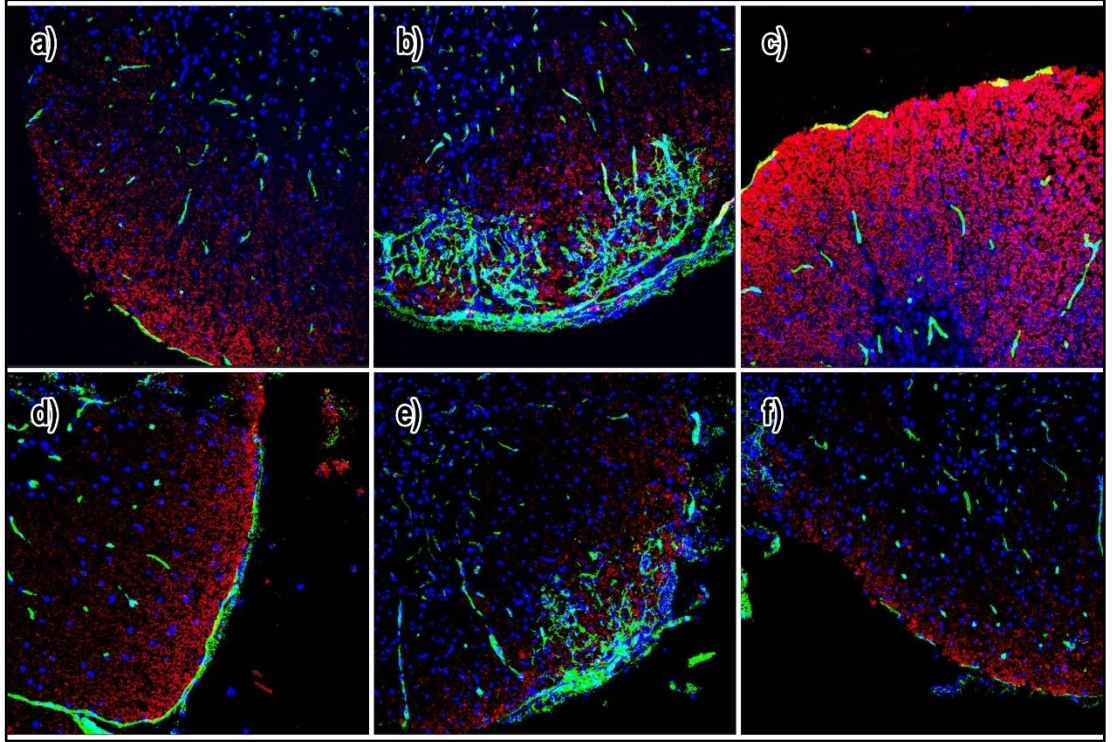
İn vivo çalışma sonucunda elde edilen sonuçların toplu sunumu Şekil 4.14.f'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. ND çözeltisi ve HNP formülasyonları uygulanan farelerin DOE skortlama grafikleri (n=6, x+SS). **a)** Nintedanib çözeltisi uygulanan farelere ait bulgular, **b)** F7 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular, **c)** P7 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular, **d)** F14 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular, **e)** P14 formülasyonu uygulanan farelere ait bulgular ve **f)** Bütün formülasyonlardan elde edilen bulgular (a, b, c, d ve e’de yer alan veriler *p<0,5 Tukey çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir, f’de yer alan veriler ise *p<0.5 olarak tekrarlı ANOVA ile karşılaştırılmıştır.).

4.7.2. İmmünofloresan Görüntüleme ve Analizler

Sham, negatif kontrol (sadece MOG uygulama), pozitif kontrol (MP çözeltisi), ND çözeltisi, F14 ve P14 formülasyonları uygulanan farelerin omurilik kesitlerinde yapılan MBP ve kolajen I boyamaları Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

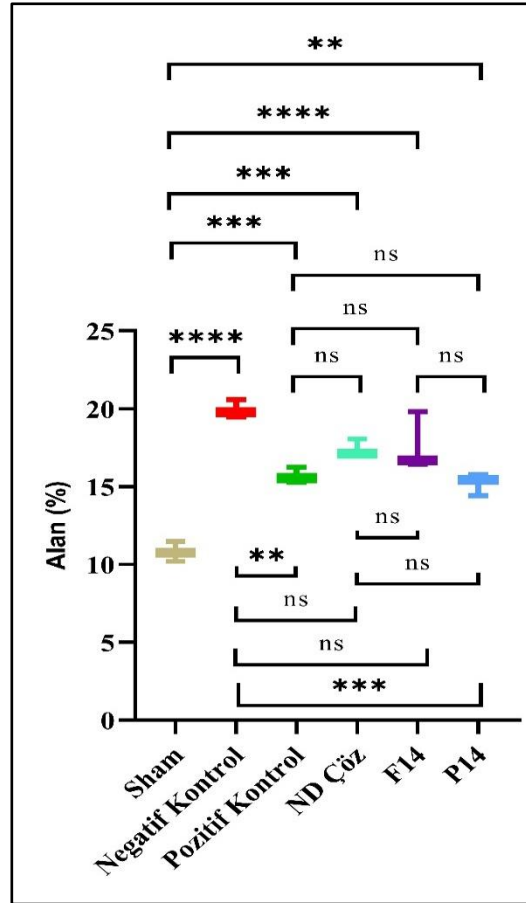


Şekil 4.15. İn vivo deneylerde elde edilen fare omurilik kesitlerine ait görüntüler (yeşil renk (FITC) ile boyanan alanlar kolajen I'i; kırmızı renk (Alexa-647) ile boyanan alanlar MBP'yi; mavi (DAPI) boyanan alanlar hücre çekirdeklerini göstermektedir). a) *Sham* grubu, b) Negatif kontrol grubu, c) Pozitif kontrol grubu, d) ND çözeltisi grubu, e) F14 uygulanan grup, f) P14 uygulanan grup.

Kesitlerde boyanan alanların tüm doku alanına oranlanması ile (Image J yazılımı yardımıyla) elde edilen kolajen I için % alan değerleri, Tablo 4.16'da ve Şekil 4.16'da sunulmuştur.

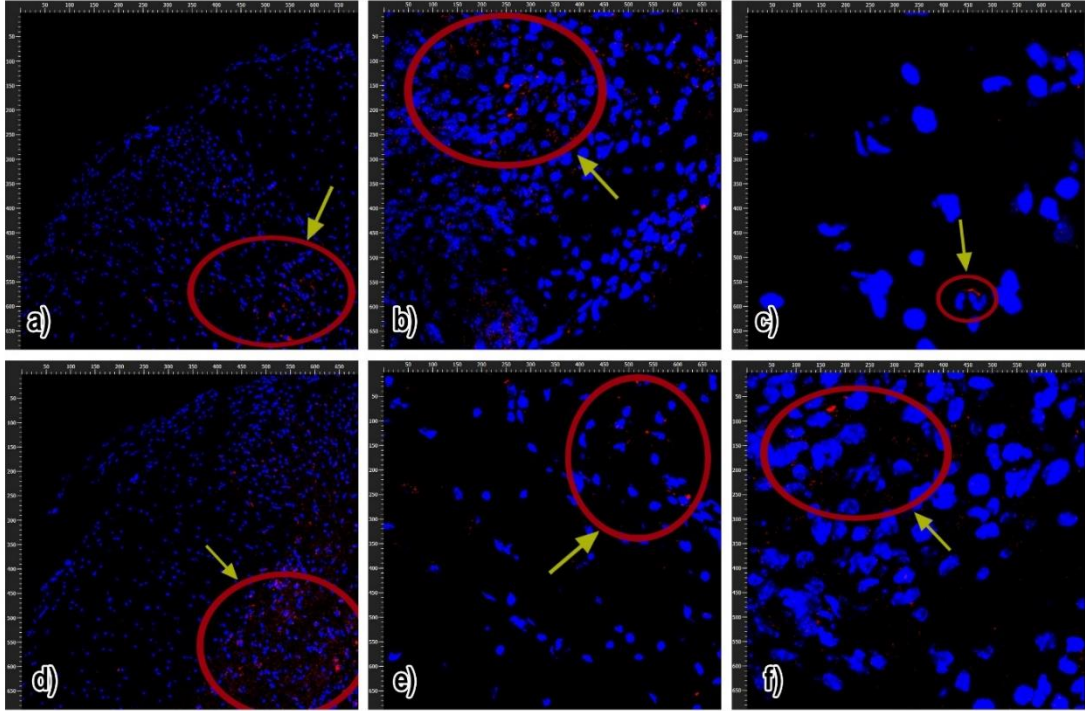
Tablo 4.16. Omurilik kesitlerinin boyanması ile elde edilen kolajen I' e ait % Alan değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Uygulama	Kolajen I; % Alan
Sham	10,80 \pm 0,51
Negatif Kontrol	19,93 \pm 0,40
Pozitif Kontrol	15,68 \pm 0,40
ND çözültisi	17,39 \pm 0,46
F14 formülasyonu	17,64 \pm 1,52
P14 formülasyonu	15,19 \pm 0,57



Şekil 4.16. Omurilik kesitlerinin boyanması ile elde edilen kolajen I' e ait % alan değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (Veriler, tekrarlanan ANOVA ile analiz edildikten sonra gruplar arasındaki istatistiksel fark üzerlerindeki çizgi ile gösterilmiştir (****=p < 0,0001; ***=p < 0,001; **=p < 0,01; *=p < 0,05 ve ns= anlamsız)).

HNP'lerin hedef dokuya ulaşmalarını değerlendirmek için görüntüleme çalışmaları ile doku takipleri yapılmıştır. Bunun için, F7 ve P7 kodlu formülasyonlara Nil Kırmızısı (NK) yüklenerek hazırlanmış ve bu formülasyonların uygulandığı farelerin omurilik kesitleri Bölüm 3.8.2'de belirtildiği şekilde sadece DAPI ile boyanmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.17'de sunulmuştur.



Şekil 4.17. F7 ve P7 formülasyonu uygulanan farelere ait omurilik kesitlerinin farklı büyütme değerleri ile görüntüleri (NK yüklü HPN'ler (F7, P7) kırmızı renkte, hücre çekirdekleri (DAPI ile boyanan) mavi renkte görülmektedir). a) Formülasyon F7 (mercek 775x775 μm), b) Formülasyon F7 (mercek 225x225 μm), c) Formülasyon F7 (mercek 112,5x112,5 μm), d) Formülasyon P7 (mercek 775x775 μm), e) Formülasyon P7 (mercek 225x225 μm), f) Formülasyon P7 (mercek 112,5x112,5 μm yakınlaştırılmış).

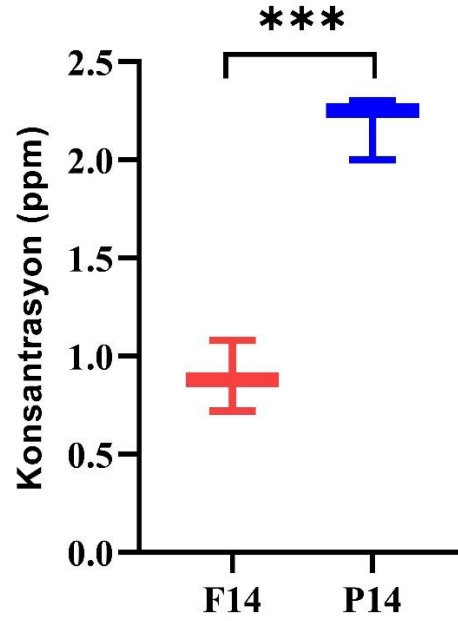
4.7.3. Beyin ve Omuriliğe Taşınan Nintedanib Miktarının Tayini ve Metabolomik Analizler

İntraperitoneal olarak ND çözeltisi, F14 ve P14 formülasyonları uygulanan C57BL/6 farelerinden elde edilen beyin ve omurilik dokularındaki ND miktar tayini, Bölüm 3.3'te belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Tablo 4.17'de ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.17. Beyin ve omurilik dokularına geçen ND miktarları (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Formülasyon	ND Miktarı (ppm)
ND çözeltisi	ÖY
F14	0,8933 \pm 0,14
P14	2,1833 \pm 0,13

ÖY: Ölçüm yok, herhangi bir pik tespit edilememiştir.



Şekil 4.18. Formülasyonların intraperitoneal uygulamalarından sonra beyin ve omurilik dokularında tespit edilen Nintedanib konsantrasyonları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). Veriler, eşleştirilmemiş t Testi ile analiz edildikten sonra gruplar arasındaki istatistiksel fark üzerlerindeki çizgi ile gösterilmiştir (***=p < 0,001).

Sham, negatif kontrol grubu (sadece MOG uygulanan), pozitif kontrol grubu (MP çözeltisi), ND çözeltisi, F14 ve P14 formülasyonları uygulanan farelerden elde edilen dokularda gerçekleştirilen metabolomik analizlerde yapılan kodlama şu şekildedir:

- G1: Sham
- G2: Negatif kontrol (MOG uygulanan)
- G13: Pozitif kontrol (MP çözeltisi)

- G8: ND çözeltisi
- G10: F14 formülasyonu
- G7: P14 formülasyonu

Analiz sonucu Grup G2/G1, G8/G2, G12/G2, G10/G2, G13/G2, için toplamda çok sayıda pik bulunmuş olup regresyon analizi sonucu her bir pik için uygulanan ardışık seyreltme yöntemiyle elde edilen veriler incelendiğinde $R > 0,5$ olan toplam 1501 pike rastlanmıştır. Bu 1501 pik için Düzeltme Katsayısı (DK) $> 1,5$ ve $p < 0,05$ olan 802 pik tespit edilmiştir. Aşağıdaki tabloda (Tablo 4.18.) HMDB’de tanımlanan piklerle eşleşen 50 madde listelenmiştir.

Tablo 4.18. HMDB’de tanımlanan piklerle eşleşen metabolitler.

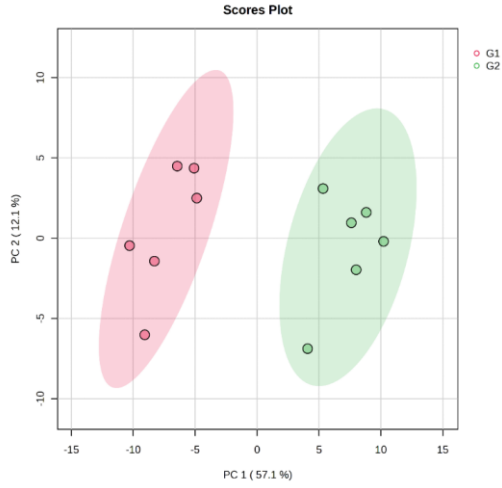
	Kütle/yük	Eşleşen form	Metabolit	HMDB	KEGG	PubChem
MET2	658,2552	M-HCOOH+H[1+]	Tetrahidrofolil-[Glu](n)	HMDB0006826	C03541	45479706
MET3	323,2335	M-C3H4O2+H[1+]	LysoPA(P-16:0e/0:0)	HMDB0011154	C15646	52929772
	359,196	M+H2O+H[1+]	3-Hydroxyquinine	HMDB0001091	C07344	441264
	986,6245	M+H2O+H[1+]	Trihexosylceramide (d18:1/12:0)	HMDB0004877	C04737	53477785
MET4	377,1505	M+Br81[-]	13S-hydroxyoctadecadienoic acid	HMDB0004667	C14762	6443013
	377,1505	M+Br81[-]	12,13-EpOME	HMDB0004702	C14826	5356421
	377,1505	M+Br81[-]	9,10-Epoxyoctadecenoic acid	HMDB0004701	C14825	6246154
	508,379	M-H[-]	LysoPC(O-18:0)	HMDB0011149	C04317	2733532
MET5	149,0266	M+H[1+]	2-Oxo-4-methylthiobutanoic acid	HMDB0001553	C01180	473
	189,1121	M+H[1+]	Azelaic acid	HMDB0000784	C08261	2266
	369,353	M-H4O2+H[1+]	3a,7a-Dihydroxy-5b-cholestane	HMB0006893	C05452	3080603
	369,353	M-H2O+H[1+]		-	-	-
	369,353	M-CO+H[1+]	5-Dehydroepisterol	HMDB0006848	C15780	10894570

	369,353	M-CO+H[1+]	3-Keto-4-methylzymosterol	HMDB0006838	C15816	53477900
	369,353	M-H2O+H[1+]	Lathosterol	HMDB0001170	C01189	65728
	369,353	M-H2O+H[1+]	5a-Cholest-8-en-3b-ol	HMDB0006841	C03845	101770
	369,353	M-H2O+H[1+]	Cholesterol	HMDB0000067	C00187	5997
	986,6245	M+H2O+H[1+]	Trihexosylceramide (d18:1/12:0)	HMDB0004877	C04737	53477785
MET6	189,1121	M+H[1+]	Azelaic acid	HMDB0000784	C08261	2266
	359,196	M+H2O+H[1+]	3-Hydroxyquinine	HMDB0001091	C07344	441264
	519,2749	M-CO2+H[1+]	Protoporphyrin IX	HMDB0000241	C02191	-
	534,3106	M+H2O+H[1+]	Taurocholic acid	HMDB0000036	C05122	6675
	534,3106	M+H2O+H[1+]	Taurohyocholate	HMDB0011637	C15516	0
	986,6245	M+H2O+H[1+]	Trihexosylceramide (d18:1/12:0)	HMDB0004877	C04737	53477785
MET7	189,1121	M+H[1+]	Azelaic acid	HMDB0000784	C08261	2266
	986,6245	M+H2O+H[1+]	Trihexosylceramide (d18:1/12:0)	HMDB0004877	C04737	53477785
MET8	149,0266	M+H[1+]	2-Oxo-4-methylthiobutanoic acid	HMDB0001553	C01180	473
	189,1121	M+H[1+]	Azelaic acid	HMDB0000784	C08261	2266
	227,0859	M-H2O+H[1+]	Biotin	HMDB0000030	C00120	171548
	359,196	M+H2O+H[1+]	3-Hydroxyquinine	HMDB0001091	C07344	441264
	397,2718	M+HCOOK[1+]	Arachidic acid	HMDB0002212	C06425	10467
	397,2718	M+HCOOK[1+]	Phytanic acid	HMDB0000801	C01607	26840
	537,168	M+H[1+]	1,4-beta-D-Glucan	HMDB0006944	C00760	53477911
	658,2552	M-HCOOH+H[1+]	Tetrahydrofolil-[Glu](n)	HMDB0006826	C03541	45479706
	658,5153	M-H2O+H[1+]	PE(P-16:0e/16:0)	HMDB0011158	C04756	52925046

	986,6245	M+H ₂ O+H[1+]	Trihexosylceramide (d18:1/12:0)	HMDB0004877	C04737	53477785
MET10	312,173	M-CO ₂ +H[1+]	S-Adenosylmethioninamine	HMDB0000988	C01137	439415
	325,2376	M-CO+H[1+]	Prostaglandin D2	HMDB0001403	C00696	448457
	325,2376	M-CO+H[1+]	20-Hydroxy-leukotriene B4	HMDB0001509	C04853	5280745
	325,2376	M-CO+H[1+]	Lipoxin B4	HMDB0005082	C06315	5280915
	325,2376	M-CO+H[1+]	Lipoxin A4	HMDB0004385	C06314	9841438
	325,2376	M-CO+H[1+]	Prostaglandin E2	HMDB0001220	C00584	5283116
	325,2376	M-CO ₂ +H[1+]	6-Ketoprostaglandin E1	HMDB0004241	C05962	5280889
	325,2376	M-CO+H[1+]	(13E)-11a-Hydroxy-9,15-dioxoprost-13-enoic acid	HMDB0001320	C04654	5280710
	325,2376	M-CO+H[1+]	13,14-Dihydro-15-keto-PGE2	HMDB0002776	C04671	5280711
	325,2376	M-CO+H[1+]	Prostaglandin I2	HMDB0001335	C01312	5282411
	325,2376	M-CO ₂ +H[1+]	Prostaglandin G2	HMDB0003235	C05956	5280883
	325,2376	M-HCOOH+H[1+]	Thromboxane B2	HMDB0003252	C05963	5283137
	325,2376	M-CO+H[1+]	Thromboxane A2	HMDB0001452	C02198	5280497
	325,2376	M-CO+H[1+]	Prostaglandin H2	HMDB0001381	C00427	445049

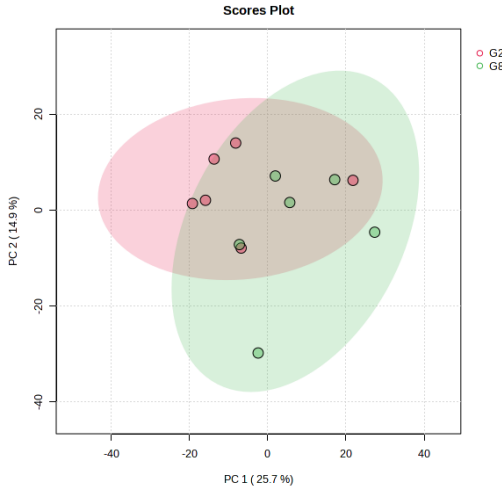
Her gruba ait numune PCA grafiğinde tek nokta ile gösterilerek kümeleri oluşturulmuştur ve grupların, G2 (negatif kontrol) grubuyla kesişimi ve ayrışmasına göre metabolit değişimleri belirlenmiştir.

G1 ile G2 grupları karşılaştırılmış olup $DK > 1,5$ normalize şartına uyan 111 adet pik bulunmuştur ve bu pikler HMDB’de herhangi bir maddeyle eşleşmemiştir. Piklerin eşleşmemesi veri bankalarının güncellenmesinin ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Şekil 4.19’deki PCA grafiğinde görüldüğü üzere gruplar birbirinden anlamlı derece ayrılmaktadır.



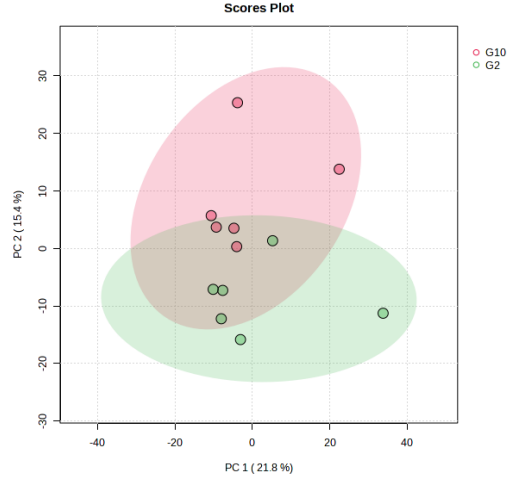
Şekil 4.19. G1 ve G2 gruplarına ait PCA pikleri.

G2 ile G8 karşılaştırılmasına göre grupların tam ayrılmadığı görülmektedir (Şekil 4.20). Bu durum hastalığın ilerleyişine göre ND çözeltisinin yeterli miktarda etki bölgesine ulaşamadığını ve etki gücünün azalığını düşündürmektedir. G2 ve G8 karşılaştırıldığında HMDB’de eşleşen metabolitlerden birisi kolesteroldür.



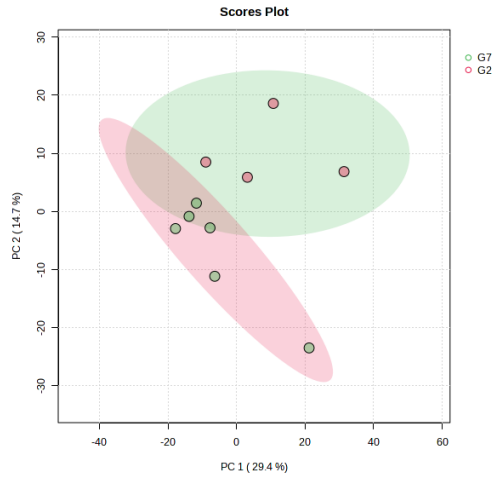
Şekil 4.20. G2 ve G8 gruplarına ait PCA pikleri.

G2 ile G10 karşılaştırılmasına göre grupların tam ayrılmadığı görülmektedir (Şekil 4.21). Bu durum hastalığın ilerleyişine göre F14 (ND yüklü ve hedeflendirilmemiş) formülasyonunun yeterli miktarda etki bölgesine ulaşamadığını ve etki gücünün azalığını düşündürmektedir. G2 ile G10 karşılaştırıldığında HMDB’de eşleşen LysoPC(O-18:0/0:0), eter lipid metabolizma yolağındaki bir ara maddedir.



Şekil 4.21. G2 ve G10 gruplarına ait PCA pikleri.

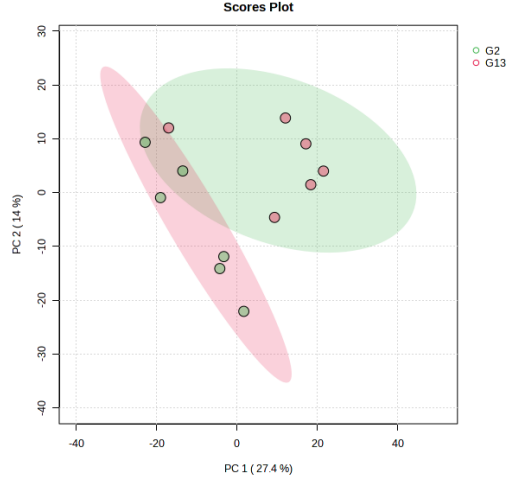
G2 ile G7 karşılaştırılmasına göre grupların ayrıştığı görülmektedir (Şekil 4.22). Bu durum P14 (ND yüklü ve hedeflendirilmiş) formülasyonunun hastalık modelini tedavi ettiğine işaret etmektedir. G2 ve G7 karşılaştırıldığında HMDB’de eşleşen LysoPA(P-16:0/0:0), eter lipit metabolizmasının bir ara ürünüdür.



Şekil 4.22. G2 ve G7 gruplarına ait PCA pikleri.

G2 ile G13 karşılaştırılmasına göre grupların ayrıştığı görülmektedir (Şekil 4.23). Bu durum MP çözeltisinin hastalık modelini tedavi ettiğine işaret etmektedir.

G2 ve G13 grupları karşılaştırıldığında HMDB’de eşleşen metabolitlerden birisi biotindir.



Şekil 4.23. G2 ve G13 gruplarına ait PCA pikleri.

5. TARTIŞMA

Nörolojik hastalıklar, beyni ve sinir sistemini etkileyerek yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren ve hayati tehlike arz eden bozukluklardır. Alzheimer, Parkinson, MS ve Huntington gibi hastalıklar, meydana geliş mekanizmaları bakımından diğerlerinden ayrılarak nörodejeneratif hastalıklar olarak adlandırılır. Bu hastalıklarda, zaman içinde sürekli olarak nöron kaybı meydana gelir. Nörodejeneratif hastalıkların kronik olarak seyretmesi ve yaşlanan nüfusun artışı ile hızla artış göstermesi göz önüne alındığında, son yıllarda araştırmacıların daha fazla ilgisini çekmektedir.

1868 yılında Dr. Jean Martin Charcot tarafından bir MSS bozukluğu olarak tanımlanan MS, demiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyon ile karakterize edilen kronik bir inflamatuvar hastalıktır. Genellikle 20-40 yaşları arasındaki yetişkinleri etkilediği bildirilen MS, travma dışı engelliliğe neden olan en yaygın hastalıktır. Hastada görülen yoğun sıkıntıların yanı sıra genç yaşlarda başlaması ve kronik olarak seyretmesi nedeniyle MS, toplum için de sosyal ve ekonomik açıdan ciddi kayıplara yol açmaktadır.

MS tedavisi genellikle iki kategoriye ayrılır: DMT'ler ve semptomları ortadan kaldırmaya yönelik tedaviler. DMT'lerin sayısı ve etkinliği arttıkça, MS'de görülen uzun vadeli yeti kaybını önlemek için erken tedaviye yoğunlaşmıştır. Şu ana kadar FDA tarafından MS tedavisi için onaylanmış 22 ilaç bulunmasına rağmen, bunlardan hiçbiri hastalığı tamamen tedavi etmez. MS'yi tam anlamıyla tedavi etmek için, ilaçları istenen düzeyde lezyonlara ileterek tedavinin etkinliğini artırmak araştırmaların odak noktasıdır. Bu çalışmalarda, mevcut sorunları ortadan kaldırmak için nanoteknoloji yaklaşımıyla hazırlanan nanofarmasötiklerin ilaç dozunu minimum düzeye indirme, sistemik yan etkileri azaltma ve kontrollü ilaç salımı sağlama gibi çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır.

MS lezyonlarının patofizyolojisine bağlı olarak, hastalık ilerledikçe hem hücresel hem de ECM bileşenlerinde değişiklikler meydana gelir. ECM'nin ana bileşeni olan kolajen, doku yapısı, şekillenme ve yenilenme ve süreçlerinde önemli rol oynar. Ayrıca, kolajen de dahil olmak üzere ECM bileşenlerinin aşırı birikimi şeklinde tanımlanan fibrozis, çeşitli bozuklukların patolojik bir bulgusudur. Perisitler ve reaktif

astrositler tarafından salgılanan tip I, III ve V fibriler kolajenlerin, aktif ve aktif halde olmayan MS lezyonlarında arttığı bulunmuş ve bu kolajenlerin, damarlar etrafında bir ağ yapısının oluşumuna katılarak bağışıklık hücrelerinin MSS'ye sızmasına karşı kimyasal ve fiziksel bir bariyer oluşturduğu saptanmıştır. Özellikle tip I kolajen miktarındaki artış, fibrozis oluşumunu güçlendirmektedir (15).

Bu bilgiler ışığında (15, 17), literatürde daha önce üzerinde bir çalışmaya rastlanmamış bir konu olarak; FDA tarafından IPF tedavisi için onay alan ND'nin (276) antifibrotik ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle MS'deki fibrotik yapıları azaltarak hastalığın tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağı araştırılması, MS tedavilerine yeni bir yaklaşım getirme potansiyeli nedeniyle değerli bulunmuştur.

MS hastalığında MSS'de oluşan lezyonlara etkin dozda ilaç taşınması KBB nedeniyle oldukça zordur. Buna ilaveten, uygulanan ilacın MSS dışında tüm dokulara dağılması, tedavi etkinliğinde azalmaya ve yan etkilerde artışa neden olmaktadır. Bu problemlerin ortadan kaldırılması için bu tez kapsamında ND'nin MS de kullanılma potansiyelinin incelenmesinin yanı sıra, ND'nin MSS'ye taşınması için HNP'ler geliştirilmiş ve bu formülasyonlar aktif hedeflendirme için tip I kolajene özgül TKKTLRT peptidi ile konjuge edilmiştir. Daha sonra HNP'lerin in vitro karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları yapılarak, in vivo DOE modeli oluşturulan farelerde etkinliği değerlendirilmiş, beyin omurilik dokularına ulaşan ND miktarı tespit edilmiş ve metabolik analizler yapılmıştır.

Tartışma bölümünde, bulgular bölümüyle de uyumlu şekilde bir başlık sıralaması takip edilecek ve öncelikle ND'nin fizikokimyasal özellikleri üzerinde yürütülen çalışmalar, analitik yöntem geliştirilmesi ve validasyonu, sonrasında HNP'lerin karakterizasyon çalışmaları yer alacaktır, son kısımda da hücre kültürü çalışmaları ve in vivo hayvan deneylerine ait bulgular üzerinde değerlendirme yapılacaktır.

5.1. Nintedanib'in Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

ND'nin çekilen UV spektrum grafiğine göre λ_{maks} değeri 392 nm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Literatürde Liu ve ark. (297) tarafından yürütülen bir çalışmada ND'nin maksimum absorbansının 391 nm dalga boyunda olduğu belirtilmiştir. HPLC

ile miktar tayini yönteminde dalga boyu olarak 392 nm olarak seçilmiştir. Elde edilen bulgular literatür ile uyumludur (297).

ND'nin FT-IR spektrumunda yapıya özgü C-H gerilim ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1600-1800\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1600-1800\text{ cm}^{-1}$), aromatik gerilim ($1500-1650\text{ cm}^{-1}$), C-C gerilim ($600-1400\text{ cm}^{-1}$) bantları saptanmıştır (Şekil 4.2.).

ND'nin erime derecesi literatürde $255\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak verilmiş olup (315) bu çalışmada da $250-260\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında eridiği tespit edilmiştir. Erime derecesiyle ilgili bulgu DSC termogramıyla da desteklenmiştir (Şekil 4.3).

ND'nin fizikokimyasal özellikleri analiz edildikten sonra literatür ile karşılaştırılıp teyit edilmiştir, ardından da miktar tayini çalışmalarına geçilmiştir (297,315).

5.2. Nintedanib'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

ND'nin miktar tayini için HPLC sistemi kullanılmış ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ND'nin analizi ile elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.4'te sunulmuştur. HPLC kromatogramında görüleceği üzere ND'ye ait pik formülasyona giren yardımcı maddelerin piklerinden (Şekil 4.6) tamamen ayrılmış ve alıkonma zamanı 4,65 dakika olarak saptanmıştır (Şekil 4.4).

Doğrusallık çalışmaları $0,2-20\text{ }\mu\text{g/mL}$ arasındaki konsantrasyonlar seçilerek yürütülmüştür. Bulgular incelendiğinde, belirtilen konsantrasyon aralığında konsantrasyon ile elde edilen pik alanları arasında doğrusal ilişki saptanmıştır. Kalibrasyon doğrusu ve regresyon analizi bulguları Şekil 4.5'te verilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait denklem $y = 49,5407x - 2,4322$ bulunmuştur ve determinasyon katsayısı 1,0000 olarak tespit edilmiştir.

Doğruluk çalışmaları, kalibrasyon eğrisi aralığında bulunan düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda ($0,2, 2,5$ ve $20\text{ }\mu\text{g/mL}$) olacak şekilde 3 farklı konsantrasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir. Doğruluğun değerlendirilmesinde her konsantrasyondan 6 ayrı çözelti hazırlanmış ve ölçümleri yapılmıştır. % geri kazanım değerleri hesaplanarak; ortalama, SS ve BSS değerleri sırasıyla Tablo 4.1'de

verilmiştir. FDA ve USP analitik validasyon rehberlerinde %BSS'nin %2'den daha küçük olması gerektiği açıklanmıştır. %BSS'nin 2'den küçük olması ve % geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olması analitik yöntemin doğruluğunu ortaya koymaktadır (296).

Kesinlik çalışmaları Bölüm 3.4.3'te belirtildiği şekilde kalibrasyon eğrisi aralığında bulunan düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda (0,2, 2,5 ve 20 µg/mL) olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda 6 örnek hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Bir örnekten 6 analiz yapıp tekrarlanabilirlik, 6 ayrı örnekten birer analiz yapılarak tekrar elde edilebilirlik değerleri hesaplanmıştır, ortalama ve BSS değerleri sırasıyla Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te verilmiştir. %BSS'nin 2'den küçük bulunması ile analitik yöntemin kesinliğini göstermektedir (296).

Analitik yöntemin duyarlılığı, saptama sınırı ve miktar tayini sınırı olarak belirtilmiştir, saptama sınırı 0,1645 µg/mL, miktar tayini sınırı ise 0,4984 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular yöntemin tespit edebileceği minimum konsantrasyonu ve yöntemin duyarlılığını göstermektedir.

Yöntemin özgüllüğünü değerlendirmek için Bölüm 3.4.5'te tarif edildiği şekilde çalışmalar yürütülmüştür. Şekil 4.6'dan da anlaşılacağı üzere HNP'lerin yapısına giren yardımcı maddeler ve aktif hedeflendirme ajanı peptit ND ile aynı alıkonma süresinde pik vermemektedir, yardımcı maddelere ait pikler 1-2 dakika aralığında gelmektedir.

Stabilite çalışmaları Bölüm 3.4.6'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. 2,5 µg/mL konsantrasyondaki ND çözeltisi 0, 24 ve 48. saatlerde analiz edilmiş ve elde edilen bulgular Tablo 4.4'te paylaşılmıştır. Elde edilen bulgular karşılaştırılmıştır, % geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olduğu ve BSS değerlerinin %2'nin altında olduğu saptanmıştır. Çalışma süresi boyunca (0-48 saat) herhangi bir bozunma piki gözlenmemiştir. Böylece ND'nin 48 saatlik analiz boyunca stabil kaldığı gösterilmiştir.

ND miktar tayinin kullanılan HPLC yöntemine ait doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük ve stabilite bulguları incelendiğinde, yöntemin ND miktar tayininde kullanılabilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

5.3. Nintedanib'in Çözünürlük Çalışmaları

ND'nin çözünürlük çalışmaları Bölüm 3.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgular Tablo 4.5'te verilmiştir. Literatürde Liu ve ark. (297) tarafından yürütülen bir çalışmada elde edilen bulgulara göre ND'nin pH 7,4 PBS ve %0,5 Tween 80 içeren pH 7,4 PBS ortamlarındaki çözünürlüğü sırasıyla $5,13 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ ve $132,42 \pm 8,87 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular pH 7,4 PBS ve %0,5 Tween 80 içeren pH 7,4 PBS için sırasıyla $5,81 \pm 1,27 \mu\text{g/mL}$ ve $141,60 \pm 4,57 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiş olup literatür ile benzer ve uyumlu bulunmuştur (297).

5.4. Formülasyon Çalışmaları

5.4.1. Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında KBE'yi aşmak üzere sıklıkla literatürde tercih edilen bir ilaç taşıyıcı sistem olan polimerik iç çekirdek ve lipit dış kabuk yapısına sahip HNP formülasyonları tasarlanmıştır. HNP'lerin üretilmesinde emülsiyon sonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin literatürde suda çözünmeyen etkin madde içeren HNP'lerin hazırlanmasındaki en uygun yöntemin olduğu belirtilmiştir (299). Bu tekniğin başlıca üstünlüğü, kısa hazırlama süresi ile stabil HNP'lerin oluşması ve hazırlama hızının diğer işlemlere göre 20 kat hızlı olmasıdır (195).

Emülsiyon sonikasyon yönteminde partiküllerin bir araya gelerek birleşmesiyle nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde artışa yol açabilen aşırı işlem sorunu gözlenebilir. Bu durum genellikle yoğun ses dalgası kullanılarak partikül boyutu küçültüldüğünde emülgatörün partiküllerin çökmesini önleyecek kadar hızlı hareket edememesi nedeniyle meydana gelir. Bu nedenle arzu edilen sonuçları elde etmek için emülgatör konsantrasyonu ile birlikte sonikasyon parametrelerinin de optimize edilmesi gerekir (304).

HNP'lerin hazırlanmasında polimerik iç çekirdeği oluşturmak üzere PLGA 503 tercih edilmiştir. PLGA, biyouyumluluğu, biyobozunur olması, uygun biyobozunma kinetiği ve mekanik özellikleri ve kullanım kolaylığı nedeniyle FDA

tarafından ilaç taşıyıcı sistemler için onaylanmış bir polimerdir (316). PLGA, mikropartiküller, nanopartiküller, implantlar ve çeşitli tıbbi cihazlar gibi farklı biyolojik olarak parçalanabilir yapıların tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır (317). PLGA nanopartikülleri genellikle çapı 10-1000 nm arasında değişen kolloidal sistemlerdir, etkin madde ya polimer matriks içine hapsedilir ya üzerine adsorbe edilir ya da kimyasal olarak polimer matriks üzerine bağlanır (318). PLGA nanopartiküllerinin vücutta biyobozunur olmasının nedeni, fizyolojik koşullar altında vücuttaki çeşitli metabolik yolların yan ürünleri olan yapısındaki monomerlerin, laktik asit ve glikolik asit, oluşumu için su varlığında ester bağlarının hidrolize uğramasıdır (319). PLGA polimerlerinin bozunma hızı yapısındaki monomer oranıyla ilişkilidir; 50:50 oranında laktik asit ve glikolik asit içeren polimer, iki monomerden birini daha yüksek oranda içerenlere göre çok daha hızlı hidrolize uğrar (320). Biyodağılım çalışmaları, PLGA nanopartiküllerinin, artırılmış geçirgenlik ve tutulma etkisi ("Enhanced Permeability and Retention effect", EPR) terapötik maddelerin dokularda birikimini artırdığını göstermektedir (316).

Tez kapsamında HNP formülasyonları, PLGA nanopartiküllerinin üstünlüklerinin lipitlerin hücre membranlarından yüksek geçiş, düşük immünojenite ve minimum ilaç sızıntısı gibi üstünlükleri ile birleştirilmesi için geliştirilmiştir (200,321).

HNP formülasyonlarının hidrofobik yapıdaki lipit kabuk kısmı oluşturulurken; DSPE-PEG ve türevleri, 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC), 1,2-diöleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE), 1,2-dilauroilfosfatidilkolin (DLPC), hintyağı, stearik asit ve lesitin yaygın olarak kullanılan lipitlerden bazılarıdır (200). Tez çalışmasında, HNP'lerin hazırlanmasında lipit dış kabuk yapısını oluşturmak üzere DSPE-PEG-Maleimit ve lesitin tercih edilmiştir. DSPE-PEG türevi olan DSPE-PEG-Maleimit, yapısındaki maleimit grubu sayesinde tiyol ile konjugasyona elverişli kimyasal bir grup sağlar, bu şekilde HNP'nin bir ucunda tiyol olan peptit ile konjugasyona girmesine ve aktif hedeflendirme yapılmış HNP'lerin elde edilmesine olanak tanır.

HNP'lerin bileşimindeki lipit/polimer (L/P) (a/a) oranı, formülasyonun stabilitesi, tekdüzeliği ve enkapsülasyon etkinliğinde önemli rol oynamaktadır. Düşük L/P oranında, partiküllerin yüzeyleri lipitlerle tamamen kaplanamaz, bu da

partiküllerin diğer partiküllerin lipit kısmı ile köprüler oluşturarak çökmesine ve daha büyük partiküllerin oluşmasına neden olabilir. Yüksek L/P oranında ise partiküllerin yüzeyini kaplayan lipitlerin dışında serbest halde kalan lipitler lipozom oluşturmak için bir araya gelebilir ve formülasyonun homojenliğini bozarak üretim verimini düşürebilir. Bu nedenle L/P oranı partikül büyüklüğü ve üretim verimliliğini sağlayacak şekilde optimize edilmelidir (195). Cheow ve ark. (216) tarafından yürütülen bir çalışmada değişik L/P oranları içeren HNP formülasyonları geliştirilmiştir. L/P oranı %15'in altında olan grupta partikül büyüklüğü (800-1000 nm) mikron olarak tespit edilirken, L/P oranı %30 olduğunda partikül büyüklüğünde keskin bir düşüş yaşanmış (260-400 nm) ve %80 üretim verimi elde edilmiştir. Araştırmacılar, L/P oranı %30'un üzerine çıktığında partikül büyüklüğünde değişiklik gözlenmesi de üretim veriminde düşüş olduğunu bildirmiştir (216).

Bu çalışma kapsamında genel basamakları Bölüm 3.6.1'de bahsedildiği şekilde üretilen HNP formülasyonları için farklı polimer, lipit miktarları ve sonikasyon güçleri tercih edilmiştir. Çalışma boyunca sonikasyon süresinde ve su fazı:organik faz oranında (10:1, h/h) değişiklik yapılmamıştır.

Farklı polimer miktarı ve sonikasyon gücü ile üretilen formülasyonların içerikleri Tablo 4.6'da verilmiştir, farklı lipit miktarları ve sonikasyon gücü ile üretilen formülasyonların içerikleri ise Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Bu formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular Tablo 4.10'da paylaşılmıştır.

İdeal bir nanotaşıyıcı sistemde partikül büyüklüğü dağılımının homojen olması istenmektedir. Literatürde PDI değerinin 0,2'den küçük olmasının partikül büyüklüğü dağılımının tekdüze olduğuna işaret ettiği bildirilmiştir (322). Tez çalışmasında formülasyon parametrelerinde yapılan değişikliklerle, partikül büyüklüğünün 44 nm ile 122 nm arasında farklılık gösterdiği, elde edilen PDI değerlerinin ise 0,056-0,157 aralığında (<0,2) olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, hazırlanan bütün formülasyonlar için partikül büyüklüğü dağılımının tekdüze olduğunu göstermektedir. Formülasyonların zeta potansiyel değerleri -2,76 mV ile -10,10 mV aralığında değişmektedir. F2'den başlayarak F6 'ya kadar olan formülasyonlarda polimer miktarının giderek artmasıyla birlikte partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelin değerlerinde (mutlak olarak) artış olduğu belirlenmiştir. Bu durum literatür bulguları

ile uyumludur (323). F1 ve F2 formülasyonu ve F7 ve F12 formülasyonları kıyaslandığında, sonikasyon gücünün azalmasıyla partikül büyüklüğünde artış gözlenmiş, zeta potansiyel değerlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Benzer bulgular Yang G ve ark. tarafından nanopartiküller üzerinde yapılan araştırmada da gözlenmiştir (324). F7, F8 ve F9 formülasyonları karşılaştırıldığında, lesitin içeriğindeki değişimin zeta potansiyeli anlamlı oranda değiştirmedeği ancak partikül büyüklüğünde anlamlı farklılığa neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). F7, F10 ve F11 formülasyonları kıyaslandığında, DSPE-PEG miktarındaki değişimin zeta potansiyeli anlamlı oranda değiştirmedeği ancak partikül büyüklüğünde anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). F2 ve F7 formülasyonlarının bileşimi aynı olsa da kullanılan miktarlar 10 kat artırıldığı için partikül büyüklüğünde, PDI ve zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürde, ölçek büyütme gerçekleştirildiğinde partikül büyüklüğü ve PDI gibi değerleri belirli bir aralıkta tutmak için formülasyon bileşenlerinin oranlarında, konsantrasyonlarında ve de sonikasyon parametrelerinde değişiklikler yapılması gerektiği bildirilmiştir (325).

Literatürde, KBE'yi aşmak için geliştirilen nanotaşıyıcılarda optimum partikül büyüklüğünün 100 nm civarında (<200 nm) olması gerektiği ve nanotaşıyıcılara etkin madde yüklenmesiyle genellikle partikül büyüklüğünde artış meydana geldiği bildirilmiştir (314). Bu nedenle formülasyon geliştirme çalışmalarında ileriki aşamalara F7 formülasyonu esas alınarak devam edilmesine, bu formülasyona ND yüklenmesine ve peptit konjugasyonu yapılmasına karar verilmiştir.

Hibrit Nanopartiküllere Peptit Konjugasyonu

HNP'lere peptitler konjuge edilirken Bölüm 3.6.2'de açıklandığı gibi maleimit-tiyol konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Peptitler arasındaki disülfid bağlarını kırmak üzere peptit çözeltisi üzerine eklenen TCEP, literatür (301) ile uyumlu olacak şekilde Peptit:TCEP 1:2 oranında kullanılmıştır. HNP'ler ile peptit arasındaki konjugasyon reaksiyonu HNP'nin dış kabuğundaki DSPE-PEG-Maleimit'in maleimit kısmı ile gerçekleştiğinden, optimum maleimit:peptit oranını saptamak amacıyla farklı mol oranlarında (2:1, 1:1 ve 1:2) konjugasyon denemeleri yürütülmüştür ve literatürde de yer aldığı gibi (303), Bölüm 3.6.4'te belirtilen BCA yöntemi ile konjugasyon verimi

hesaplanmıştır. Verimi en yüksek oran olarak maleimit:peptit 2:1 bulunmuştur. Literatürde de 2:1 oranında maleimit ile peptit konjugasyonu yapılan çalışmalar da yer almaktadır (301,326). Bu çalışmada, peptit konjuge edilen formülasyonların hazırlanmasında bu oran tercih edilmiştir. Konjugasyon yapılan formülasyonların harf kodu P ile gösterilirken, etkin madde (ND) yüklü formülasyonların numarası 14 olarak tercih edilmiştir (P14).

F7, P7, F14 ve P14 formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular Tablo 4.11’de sunulmuştur. F7 ile F14 ve P7 ile P14 formülasyonları karşılaştırıldığında HNP’lere ND yüklenmesiyle partikül büyüklüğünde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu bulgulara benzer şekilde, yapılan bir araştırmada HNP’lere paklitaksel yüklenmesi sonrası partikül büyüklüğünde artış olduğu bildirilmiştir (327). F7 ile P7 (F7: $91,01 \pm 2,207$ nm, $-9,12 \pm 0,28$ mV) ile (P7: $92,05 \pm 1,858$ nm, $3,55 \pm 0,28$ mV) karşılaştırıldığında partikül büyüklüklerinde az bir artış görülürken, zeta potansiyel değerlerinin negatiften pozitive kaydığı bulunmuştur. Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri açısından F14 ve P14 formülasyonları karşılaştırıldığında da benzer eğilim tespit edilmiştir (F14: $109,80 \pm 0,152$ nm, $-9,30 \pm 0,26$ mV) ve (P14: $110,60 \pm 0,158$ nm, $3,70 \pm 0,32$ mV). Literatürde benzer bulguların elde edildiği çalışmalar yer almaktadır (301,328).

Hibrit Nanopartiküllerin Yüzey Özellikleri

TEM görüntülerinde konjugasyon yapılmamış HNP’lerin (F7 ve F14) yüzey özelliklerinin küresel yapıda olduğu ve homojen bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğu görülmektedir (bkz. Şekil 4.8.a ve Şekil 4.8.b). Konjugasyon yapılan HNP’lerin ise (P7 ve P14), konjugasyon işlemi sonrasında küresel yapılarını koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8.c ve Şekil 4.8.d).

5.4.2. Nintedanib Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

F14 ve P14 formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri sırayla $66,84 \pm 0,27$ ve $68,72 \pm 0,29$ olarak bulunmuştur. HNP'lerin iç çekirdek kısmını oluşturan PLGA polimeri, suda az çözünen ilaçların enkapsülasyonu için idealdir. Elde edilen bu bulgularla uyumlu olarak, hidrofobik özellikteki vinkristin sülfatın, PLGA polimeri kullanılan bir HNP'deki enkapsülasyon etkinliğinin $64,7 \pm 5,9$ olarak bulunduğu bildirilmiştir (329). Mann-Whitney U Testi ile F14 ve P14 formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği değerleri karşılaştırılınca gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,005$). Literatürde de benzer şekilde peptit konjuge edildikten sonra enkapsülasyon etkinliği değişen formülasyonlar bulunmaktadır (330).

5.4.3. İn Vitro Salım Çalışması ve Salım Kinetiği Değerlendirilmesi

İn vitro salım sonuçları incelendiğinde ND yüklü formülasyonların 48 saat boyunca salım yaptığı tespit edilmiştir. Salım profilleri incelendiğinde ND'nin 12. saat sonunda F14 formülasyonundan $59,34$, P14 formülasyonunda ise $70,80$ oranında bir salım gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bunu takip eden süreçte her iki formülasyon da 48 saat boyunca kontrollü bir salım yapmıştır. Elde edilen salım profilleri literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (330,331).

Formülasyonların (F14 ve P14) in vitro zamana bağlı % kümülatif salım değerleri ile yapılan matematiksel hesaplamalarla sıfırıncı derece, birinci derece, Hopfenberg, Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson-Cromwell, Peppas-Sahlin ve Weibull modellerini içeren sekiz model ile uyumlulukları değerlendirilmiştir (306). Yapılan hesaplamalara ait bulgular Tablo 4.13'te verilmiştir. Analizde başlıca, en yüksek determinasyon katsayısı (R^2), en yüksek model seçim kriteri (MSC) ve en düşük Akaike bilgi kriteri (AIC) olmak üzere üç kriter dikkate alınmıştır (306). R^2 değeri ne kadar yüksekse, MSC değeri en az 2'den, tercihen 3'ten büyükse ve AIC değeri ne kadar düşükse profilin modele o kadar uyduğu söylenebilir.

Bu kriterlere göre F14 formülasyonu en yüksek R^2 değerine birinci derece, Higuchi ve Weibull modellerinde sahiptir, en düşük AIC değerlerine de benzer aynı modellerde uymaktadır, en yüksek MSC değeri ise birinci derece modelinde (3,8216)

sahiptir. Bu verilerden hareketle F14 formülasyonunun salım profilinin birinci derece kinetiğine uyum sağladığı söylenebilir (332).

Aynı şekilde P14 formülasyonu incelendiğinde, en yüksek R^2 değerine Weibull modelinde sahiptir, en düşük AIC değerleri ise birinci derece ve Weibull modellerindedir, en yüksek MSC değeri ise Weibull modelinde (3,5857) sahiptir. Bu verilerden hareketle P14 formülasyonunun salım profilinin en çok Weibull modeli kinetiğine uyum sağladığı söylenebilir. Weibull modeli, heterojen matrislerden gerçekleşen salım kinetikleri için geliştirilmiş bir modeldir (332). Weibull modelindeki " β " şekil parametresi, polimerik bir matristen salım profilini aydınlatmak kullanılan bir kriterdir. $\beta \leq 0,75$ değeri Fick'in difüzyon kanununa uyduğunu gösterirken, β değerinin 0,75'ten fazla ancak 1'den az olması Fick'in difüzyon kanununun ve kontrollü salımın bir karışımını ifade eder; β değerleri 1'i aşarsa, ilaç salımı karmaşık bir salım profili sergiler. P14 formülasyonu için Weibull modelinde hesaplanan β değeri, 0,7230'dur. Salım profili, matris erozyonu ile meydana gelen Fick difüzyonuna göre gerçekleşmektedir (333).

F14 ile P14 formülasyonlarının salım profilleri karşılaştırıldığında benzerlik faktörü (f_2) $53 > 50$ bulunmuş ve farklılık faktörü (f_1) $18 > 15$ bulunmuştur. Değerler limit değerlere yakın olduğundan literatürden hareketle (334) Rescigno indisi hesaplanarak 0,06 bulunmuştur. Rescigno indisi 0-1 aralığında değer alır, sıfıra ne kadar yakınsa benzerlik o kadar yüksektir, bu nedenle formülasyonların salım profillerinin benzer olduğu söylenebilir.

5.4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

ND çözeltisi, F7, P7, F14 ve P14 formülasyonlarının in vitro sitotoksitesini değerlendirmek için L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. Kontrol, ND çözeltisi ve formülasyon gruplarına ait farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin (20, 10, 1, 0,1, 0,01 μ M), L929 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiş, bulgular Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'te verilmiş ve Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.

Hem ND çözeltisi hem de formülasyonların konsantrasyonu arttıkça canlı hücre sayısı düşmüştür. Bu sonuçlar Bugatti ve ark. tarafından ND ile L929 yürütülen çalışmanın bulgularıyla uyumludur (335). Buna ilaveten, F7 (etkin madde içermeyen, peptit konjugasyonu yapılmamış) ve P7 (etkin madde içermeyen, peptit konjugasyonu yapılmış) formülasyonlarında yüksek hücre canlılığı değerlerinin elde edilmesi taşıyıcı sistemin güvenli olduğuna işaret etmektedir. HNP'lere peptit konjugasyonunu hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişliğe sebep olmamıştır ($p > 0,5$)

ND yüklenmiş HNP'lerin (F14 ve P14) hücre canlılık değerleri, boş HNP'lere (F7, P7) kıyasla daha düşük çıkmıştır. Bu duruma ND varlığının yol açtığı söylenebilir. Ayrıca bütün formülasyonların 24 ve 48 saatlik verileri kıyaslandığında maruziyet süresindeki artışla hücre canlılığında azalma olduğu görülmektedir.

5.5. İn Vivo Çalışmalar

5.5.1. Farelerde MS Skorlaması

İN vivo çalışmalarda DOE modelinin olduğu 12. günden itibaren 22. güne kadar, her biri 6 hayvandan oluşan gruplara aşağıdaki şemaya göre intraperitoneal tedavi uygulaması gerçekleştirilmiştir:

1. Kontrol (*Sham*),
2. Negatif kontrol (sadece MOG uygulama),
3. Pozitif kontrol (2 mg/fare MP çözeltisi (Prednol® 250 mg Ampul)
120 µg ND/fare olacak şekilde;
4. ND çözeltisi,
5. F14 formülasyonu
6. P14 formülasyonu
İlaç içermeyen HNP formülasyonları (taşıyıcı etkisi);
7. F7 formülasyonu
8. P7 formülasyonu

Uygulama sonrasında, Hooke Labs DOE Skorlama Kılavuzu'na göre (Tablo 3.1) bir nöroloji uzmanı tarafından kör bir şekilde her iki günde bir klinik skorlama

yapılmıştır. Farelerle ilgili klinik DOE skorlama verileri Şekil 4.14'te grafik olarak sunulmuştur.

Şekil 4.14.a'dan görüleceği üzere, *Sham* grubu çalışması süresince herhangi bir nörolojik bozukluk sergilemediği görülmektedir. DOE skorlarının genel seyri gruplar arasında önemli ölçüde farklı bulunmuştur ($p < 0,001$, tekrarlanan ANOVA ölçümleri). MOG, MP çözeltilisi ve ND çözeltili grubu için semptomlar 10. gün sonrasında başlamıştır (Şekil 4.14.a). 10. günden sonra, MOG uygulanan grubun bütün DOE puanları *Sham* grubundan önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur.

Farelerde ilaç taşıyıcı sistemin etkisini (taşıyıcı etkisi) değerlendirmek için F7 ve P7 formülasyonları uygulanmıştır. F7 formülasyonu, MP tedavisi, MOG ve *Sham* grupları arasında farklı hastalık seyri gözlenmiştir (tekrarlanan ANOVA ölçümleri, $p < 0,001$; Şekil 4.14.b). P7 uygulanan farelerde semptomların seyri gruplar arasında farklılık göstermiştir (tekrarlanan ANOVA ölçümleri, $p < 0,001$; Şekil 4.14.c).

F14 formülasyonu, *Sham*, MOG ve MP tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, DOE puanları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (ANOVA'nın tekrarlanan ölçümleri, $p < 0,001$; Şekil 4.14.d). F14 ile yapılan tedavi, özellikle 12. günden itibaren daha düşük puanlarla olsa da MOG grubu ile benzer bir eğilim göstermiştir.

P14 formülasyonu, *Sham*, MOG ve MP tedavisi uygulanan gruplar arasındaki DOE puanlarının genel karşılaştırması istatistiksel olarak anlamlıdır (tekrarlanan ANOVA ölçümleri, $p < 0,001$; Şekil 4.14.e). P14 grubunun DOE puanları, özellikle 16. günden itibaren önemli bir düşüş gösterse de bu eğilim çalışma sonuna kadar MP tedavi grubu ile istatistiksel olarak anlamlı hale erişmemiştir. Bu sonuçlar, kullanılan MS modelinde, ND içeren peptit konjugasyonu yapılmış P14 formülasyonunun, MS tedavisinde kullanılan piyasa preparatı Prednol® 250 mg ampul kadar etkili olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten, MP'nin bir kortikosteroid olduğu ve kortikosteroidlerin osteoporoz, glokom, katarakt, psikiyatrik bozukluklar, kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi yaygın yan etkilere (336) neden olduğu bilinmektedir.

5.5.2. İmmünofloresan Görüntüleme ve Analizler

Şekil 4.15'te; *Sham*, negatif kontrol (sadece MOG uygulama), pozitif kontrol (MP çözeltisi), ND çözeltisi, F14 ve P14 formülasyonları uygulanan farelerin MBP ve kolajen I boyamaları gerçekleştirilen omurilik kesitlerine ait görüntüler sunulmuştur. Negatif kontrol, ND çözeltisi ve F14 formülasyon gruplarına ait görüntüler *Sham* grubu ile kıyaslandığında nitel olarak kolajen I miktarında artış olduğu gözlenmiştir. P14 formülasyonu ve MP çözeltisi uygulanan gruplarda artış gözlenmemiştir. Tablo 4.16'da sunulan boyanan kolajen I alanının bütün doku alanına oranı bulgularına göre en düşük % alan değerinin P14 formülasyonuna ait olduğu ($15,19 \pm 0,57$), diğer formülasyonların ise *Sham* grubu ($10,80 \pm 0,51$) ve negatif kontrol grubu ($19,93 \pm 0,40$) arasında değerlere sahip olduğu görülmektedir. Bu durum ilaç içeren hedeflendirilmiş formülasyonun (sonuç formülasyon) düşük kolajen I alanı değeriyle hastalık modelinde gerilemeye yol açtığını göstermektedir.

Şekil 4.15'te kırmızı renkle boyanan alanlar MBP'yi göstermektedir, *Sham* grubu haricindeki grupların kırmızıyla boyanan alanlarında kararmalar ve kör noktalara denk gelmektedir, bu da miyelin hasarı olduğuna işaret etmektedir.

F7 ve P7 formülasyonlarına NK yüklenerek farelere uygulandığı çalışmalarda formülasyonların hedef bölgelere ulaşip ulaşmadıkları dokuların mikroskopta incelenmesi ile araştırılmıştır. Şekil 4.17'de, floresan mikroskopun farklı mercek büyüklüklerinde elde edilen görüntüler sunulmuştur. Görüntülerden de görüleceği üzere F7 ve P7 formülasyonlarının hedef bölgelere taşındığı tespit edilmiştir.

5.5.3. Beyin ve Omuriliğe Taşınan Nintedanib Miktarının Tayini ve Metabolomik Analizler

C57BL/6 farelerine intraperitoneal olarak ND çözeltisi, F14 ve P14 formülasyonları uygulandıktan sonra elde edilen beyin ve omurilik dokularındaki ND miktarı, Bölüm 3.3'te belirtilen yöntemle göre belirlenmiş ve elde edilen bulgular Tablo 4.17 ve Şekil 4.18'de sunulmuştur. ND çözelti halinde uygulandığında beyin ve omuriliğe mevcut analitik yöntemle saptanabilecek düzeyde ulaşmamıştır, F14 ve P14 formülasyonları uygulandığında ise miktarlar sırasıyla $0,8933 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ ve $2,1833$

$\pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüş ve formülasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Bulgular incelendiğinde, peptit konjugasyonu ile hedeflendirme gerçekleştirilen HNP formülasyonu ile hedef bölgelere daha yüksek miktarda ilaç taşındığı görülmektedir. Benzer şekilde, Prades R ve ark. (337) tarafından yapılan bir çalışmada, altın nanopartiküllerine KBE'de mikrovasküler endotelial hücrelerde sunulan transferin reseptörüne yönelik peptit konjugasyonu yapılmasının formülasyonların beyne taşınan miktarını artırdığını bildirilmiştir.

Metabolomik analizler sonucu Grup G2/G1, G8/G2, G12/G2, G10/G2, G13/G2, için toplamda çok sayıda pik bulunmuş olup regresyon analizi sonucu her bir pik için uygulanan ardışık seyreltme yöntemiyle elde edilen veriler incelendiğinde $R > 0,5$ olan toplam 1501 pike rastlanmıştır. Bu 1501 pik için Düzeltme Katsayısı (DK) $> 1,5$ ve $p < 0,05$ olan 802 pik tespit edilmiştir. Bu piklerden HMDB veri tabanında tanımlanan piklerle eşleşen 50 adet metabolit Tablo 4.18'de verilmiştir. Her gruba ait numuneler, PCA grafiğinde birer nokta ile temsil edilecek şekilde grupların kümeleri oluşturulmuştur. Bu şekilde, grupların G2 grubuyla kesişimi ve ayrışması değerlendirilerek metabolit değişimleri saptanmıştır.

G1 ve G2 grupları karşılaştırıldığında HMDB'de eşleşen herhangi bir pik bulunamamıştır, bununla birlikte Şekil 4.19'daki PCA grafiği incelendiğinde gruplar arası ayrışmanın net olduğu tespit edilmiştir, bu durum HMDB veri tabanının güncellemesi gerektiğini göstermektedir.

Şekil 4.20'deki PCA grafiği incelendiğinde G2 ve G8 gruplarının tam ayrışmadığı görülmektedir. Bu durum, ND çözeltilisinin hastalık üzerinde yeterince etki gösteremediğine işaret etmektedir. G2 ve G8 grupları karşılaştırıldığında HMDB'de eşleşen metabolitlerden birisi kolesteroldür, yapılan bir çalışmada kolesterol seviyesinde yaşanan düşüklüğün MS hastalığı ile korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (338).

G2 ile G10 grupları arasındaki karşılaştırmaya göre grupların tam olarak ayrılmadığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.21). Bu durum, hastalığın ilerlemesine bağlı olarak F14 formülasyonunun yeterince etki bölgesine ulaşamamış olabileceğini ve bu nedenle etki gücünde düşüş yaşanmış olabileceğini düşündürmektedir. G2 ile G10 grupları karşılaştırıldığında, HMDB'de eşleşen LysoPC(O-18:0/0:0) (lizofosfolipit), eter lipid metabolizma yolağında rol alan bir ara üründür. Literatürde benzer bir

çalışmada lizofosfolipit seviyesinde gerçekleşen azalmanın MS hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (339).

G2 ile G7 gruplarının karşılaştırması ile grupların ayrıştığı gözlenmektedir (Şekil 4.22). Bu durum, P14 formülasyonunun DOE modelinde iyileşme sağlamış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. G2 ve G7'nin karşılaştırılması sırasında, HMDB'de eşleşen LysoPA(P-16:0/0:0) (lizofosfatidik asit), eter lipit metabolizmasının bir ara ürünüdür. Fransson ve ark. (340) tarafından yürütülen bir çalışmada lizofosfatidik asit aktivitesinin DOE modelinde hastalığın tekrarı ve şiddetiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada lisofosfatidik asit aktivitesinin DOE'yi şiddetlendirdiği tespit edilmiştir (341). Elde edilen bulgular, bu açıdan literatürle uyumludur.

G2 ile G13 arasındaki karşılaştırmaya göre, grupların ayrıştığı gözlenmektedir, Şekil 4.23. Bu durum, MP çözeltilisinin hastalık modelinde iyileşme sağlamış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. G2 ve G13 grupları karşılaştırıldığında, HMDB'de eşleşen metabolitlerden birisi biotindir. Yapılan bir çalışmada biotin artışının MS hastalığına bağlı yeti kaybını önlediğini göstermiştir (342).

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında MS tedavisine yönelik olarak, halihazırda IPF tedavisinde kullanılan bir ilaç olan ND'nin yenilikçi bir yaklaşımla MS tedavisinde kullanılma potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, ND yüklü TKKTLRT peptiti ile hedeflendirilmiş HNP formülasyonları geliştirilmiş ve in vitro/ in vivo değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Literatürde daha önceki çalışmalarda MS lezyonlarında kolajen I miktarında artış gözlemlendiği ve fibrozis oluştuğu tespit edilmiştir. Bu nedenle etkin madde olarak MS tedavisinde daha önce denenmemiş olan, antifibrotik ve antiinflamatuvar özellikte ND seçilmiştir. Bu kapsamda, KBE'yi çok düşük miktarda geçtiği bilinen ND'nin KBE'yi aşmak için sıklıkla tercih edilen taşıyıcı sistemlerden biri olan polimerik iç çekirdek lipit dış kabuk yapısına sahip HNP formülasyonlarına yüklenmesi planlanmıştır. Formülasyon tasarımı için polimerik iç çekirdek olarak PLGA, lipit dış kabuk yapısını oluşturmak için (DSPE-PEG)-maleimit ve lesitin değerlendirilmiştir. Ayrıca, tasarlanan HNP'lerin MS'ye bağlı olarak omurilikte biriktiği belirlenen tip I kolajene seçici olarak hedeflenmesi için, dış kabuklarında yer alan DSPE-PEG-maleimit, tip I kolajene özgül olarak bağlanan TKKTLRT peptiti ile CGGG bağlayıcı dizisi aracılığıyla maleimit tiyol konjugasyonu gerçekleştirilerek konjuge edilmiş ve aktif hedeflendirme sağlanmıştır.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa:

- KBE'yi aşmak üzere uygun özelliklerde (partikül büyüklüğü < 200 nm, PDI < 0,200, uzun süreli salım gösteren) HNP'ler tasarlanmıştır.
- Formülasyon parametrelerinde yapılan değişikliklerin HNP'lerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel özellikleri üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.
- HNP formülasyonunun uygun oranda peptit ile konjugasyonu sağlanmış ve teyit edilmiştir.
- ND'nin tasarlanan HNP formülasyonlarından salım kinetiği tespit edilmiştir.

- L929 hücreleri ile sitotoksosite çalışması yapılarak geliştirilen HNP'lerin in vitro olarak etkinliği değerlendirilmiştir.
- HNP uygulamasıyla beraber MBP ve kolajen I gibi MS belirteçlerindeki değişimler gözlemlenmiştir.
- Farelerde geliştirilen MS modelinde, ND içeren peptit konjugasyonu yapılmış P14 formülasyonunun MS tedavisinde kullanılan piyasa preparatı Prednol® 250 mg ampul kadar etkili olduğu gösterilmiştir.
- Peptit konjugasyonu ile HNP formülasyonunun hedef dokulara daha yüksek miktarda ilaç taşınması sağladığı tespit edilmiştir.
- Metabolomik çalışmalar ile formülasyon uygulamaları sonucunda beyin ve omurilikteki metabolit değişimleri saptanmış ve MS ile ilişkili maddelerin miktarlarında değişimler belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda, halihazırda IPF tedavisinde kullanılan bir ilaç olan ND'nin hedeflendirilmiş HNP formülasyonu halinde farelerde geliştirilen MS modelinde tedavide kullanılma potansiyelinin olduğu yönünde bir değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen bulguların insan MS modeline genetik, fizyolojik, anatomik yönden daha çok benzeyen daha gelişmiş hayvanlar kullanılarak teyit edilmesi önemlidir. Ancak yine de elde edilen bulguların MS araştırmaları için literatüre farklı bir bakış açısı getireceği, yenilikçi araştırmaları tetikleyeceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Pires PC, Santos AO. Nanosystems in nose-to-brain drug delivery: A review of non-clinical brain targeting studies. *J Control Release*. 2018 Jan;270:89–100.
2. Rayatpour A, Javan M. Targeting the brain lesions using peptides: A review focused on the possibility of targeted drug delivery to multiple sclerosis lesions. *Pharmacological Research*. 2021 May;167:105441.
3. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J, the MSCOI Study Group, et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler*. 2017 Jul;23(8):1123–36.
4. Salles D, Samartini RS, Alves MT de S, Malinverni AC de M, Stávale JN. Functions of astrocytes in multiple sclerosis: A review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2022 Apr;60:103749.
5. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014 Sep 9;83(11):1022–4.
6. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2013 Dec;13(sup2):3–9.
7. Voet S, Prinz M, van Loo G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in Molecular Medicine*. 2019 Feb;25(2):112–23.
8. Coles AJ, Cox A, Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: Evidence from monoclonal antibody therapy. *J Neurol*. 2006 Jan;253(1):98–108.
9. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010 Jul 1;133(7):1900–13.
10. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Euro J of Neurology*. 2019 Jan;26(1):27–40.
11. Ruoslahti E. Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles. *Advanced Materials*. 2012 Jul 24;24(28):3747–56.
12. Muzard J, Sarda-Mantel L, Loyau S, Meulemans A, Louedec L, Bantsimba-Malanda C, et al. Non-Invasive Molecular Imaging of Fibrosis Using a Collagen-Targeted Peptidomimetic of the Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI. Leri A, editor. *PLoS ONE*. 2009 May 18;4(5):e5585.

13. Ucar B, Humpel C. Collagen for brain repair: therapeutic perspectives. *Neural Regen Res.* 2018;13(4):595.
14. Hsiao TW, Tresco PA, Hlady V. Astrocytes alignment and reactivity on collagen hydrogels patterned with ECM proteins. *Biomaterials.* 2015 Jan;39:124–30.
15. Absinta M, Nair G, Monaco MCG, Maric D, Lee NJ, Ha S, et al. The “central vein sign” in inflammatory demyelination: The role of fibrillar collagen type I. *Annals of Neurology.* 2019 Jun;85(6):934–42.
16. Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, et al. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin–N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med.* 2017 Jul;23(7):818–28.
17. Tatomir A, Tegla CA, Martin A, Boodhoo D, Nguyen V, Sugarman AJ, et al. RGC-32 regulates reactive astrogliosis and extracellular matrix deposition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Res.* 2018 Aug;66(4):445–61.
18. Erdem Tuzun, Emine Şekerdağ, Dila Atak, Aysu Yılmaz, Canan Ulusoy, Müjdat Zeybel, et al. The Role of Pericytes in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis (P2.2-075). *Neurology.* 2019 Apr 9;92(15 Supplement):P2.2-075.
19. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, Sommergruber W, Tontsch-Grunt U, et al. BIBF 1120: Triple Angiokinase Inhibitor with Sustained Receptor Blockade and Good Antitumor Efficacy. *Cancer Research.* 2008 Jun 15;68(12):4774–82.
20. Mazzei ME, Richeldi L, Collard HR. Nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis.* 2015 Jun;9(3):121–9.
21. 't Hart BA, Luchicchi A, Schenk GJ, Killestein J, Geurts JGG. Multiple sclerosis and drug discovery: A work of translation. *EBioMedicine.* 2021 Jun;68:103392.
22. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Laboratory Investigation.* 2001 Mar;81(3):263–81.
23. Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple Sclerosis. *Neurologic Clinics.* 2018 Feb;36(1):1–11.
24. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020 Dec;26(14):1816–21.
25. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology.* 2000 Jun 1;47(6):707–17.

26. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2001 Mar;7(3):115–21.
27. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Nov 21;92(24):11294–8.
28. Griot C, Vandeveld M, Richard A, Peterhans E. Selective Degeneration of Oligodendrocytes Mediated by Reactive Oxygen Species. *Free Radical Research Communications*. 1990 Jan;11(4–5):181–93.
29. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *American Journal of Pathology*. 1988;130(3):443–54.
30. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W. The pathology of multiple sclerosis. *Neurologic Clinics*. 2005 Feb;23(1):77–105.
31. Mirshafiey A, Asghari B, Ghalamfarsa G, Niaragh FJ, Azizi G. The Significance of Matrix Metalloproteinases in the Immunopathogenesis and Treatment of Multiple Sclerosis = أهمية الأنزيمات المعدنية المحللة للبروتين في تطور مرض التصلب العصبي المتعدد و علاجه. *SQUMJ*. 2014 Feb;14(1):13–25.
32. Sharma A, Sharma N, Singh S, Dua K. Review on theranostic and neuroprotective applications of nanotechnology in multiple sclerosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023 Mar;81:104220.
33. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American Journal of Medicine*. 2020 Dec;133(12):1380-1390.e2.
34. Bechtel MA, Wong HK. Neurologic adverse effects from dermatologic drugs. In: *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2023 Nov 12]. p. 711-717.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437720037000637>
35. Dolati S, Babaloo Z, Jadidi-Niaragh F, Ayromlou H, Sadreddini S, Yousefi M. Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Feb;86:343–53.
36. Gadhave DG, Sugandhi VV, Kokare CR. Potential biomaterials and experimental animal models for inventing new drug delivery approaches in the neurodegenerative disorder: Multiple sclerosis. *Brain Research*. 2023 Nov;148674.

37. Barnett MH, Parratt JDE, Pollard JD, Prineas JW. MS: Is it one disease? *International MS Journal*. 2009;16(2):57–65.
38. Kipp M, van der Star B, Vogel DYS, Puentes F, van der Valk P, Baker D, et al. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2012 Jan;1(1):15–28.
39. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017 Feb;133(2):223–44.
40. Sanabria-Castro A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A. Biological models in multiple sclerosis. *J of Neuroscience Research*. 2020 Mar;98(3):491–508.
41. Najm FJ, Madhavan M, Zarembo A, Shick E, Karl RT, Factor DC, et al. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. *Nature*. 2015 Jun;522(7555):216–20.
42. García-León JA, Kumar M, Boon R, Chau D, One J, Wolfs E, et al. SOX10 Single Transcription Factor-Based Fast and Efficient Generation of Oligodendrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2018 Feb;10(2):655–72.
43. Martínez-Larrosa J, Matute-Blanch C, Montalban X, Comabella M. Modelling multiple sclerosis using induced pluripotent stem cells. *Journal of Neuroimmunology*. 2020 Dec;349:577425.
44. McMurrin CE, Zhao C, Franklin RJM. Toxin-Based Models to Investigate Demyelination and Remyelination. In: Lyons DA, Kegel L, editors. *Oligodendrocytes* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2023 Dec 1]. p. 377–96. (Methods in Molecular Biology; vol. 1936). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9072-6_21
45. Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Mestre L, Feliú A, Guaza C. Viral models of multiple sclerosis: Neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Progress in Neurobiology*. 2013 Feb;101–102:46–64.
46. Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2006 Jul;60(1):12–21.
47. Ransohoff RM. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci*. 2012 Aug;15(8):1074–7.
48. J. van der Star B, Y.S. Vogel D, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In Vitro and In Vivo Models of Multiple Sclerosis. *CNSNDDT*. 2012 Jun 1;11(5):570–88.
49. Madill M, Fitzgerald D, O'Connell KE, Dev KK, Shen S, FitzGerald U. In vitro and ex vivo models of multiple sclerosis. *Drug Discovery Today*. 2016 Sep;21(9):1504–11.

50. De Kleijn KMA, Zuure WA, Peijnenborg J, Heuvelmans JM, Martens GJM. Reappraisal of Human HOG and MO3.13 Cell Lines as a Model to Study Oligodendrocyte Functioning. *Cells*. 2019 Sep 17;8(9):1096.
51. Melief J, Sneeboer MAM, Litjens M, Ormel PR, Palmen SJMC, Huitinga I, et al. Characterizing primary human microglia: A comparative study with myeloid subsets and culture models. *Glia*. 2016 Nov;64(11):1857–68.
52. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *JAD*. 2010 Jun 13;20(4):1069–82.
53. Forsby A, Bal-Price AK, Camins A, Coecke S, Fabre N, Gustafsson H, et al. Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity. *Toxicology in Vitro*. 2009 Dec;23(8):1564–9.
54. Zhang Z, Drzewiecki GJ, Hom JT, May PC, Hyslop PA. Human cortical neuronal (HCN) cell lines: a model for amyloid β neurotoxicity. *Neuroscience Letters*. 1994 Aug;177(1–2):162–4.
55. Pleasure S, Page C, Lee V. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci*. 1992 May 1;12(5):1802–15.
56. Readhead C, Hood L. The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shi mld). *Behav Genet*. 1990 Mar;20(2):213–34.
57. Blakemore WF, Franklin RJM. Remyelination in Experimental Models of Toxin-Induced Demyelination. In: Rodriguez M, editor. *Advances in multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Diseases* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cited 2023 Dec 2]. p. 193–212. (Compans RW, Cooper MD, Honjo T, Koprowski H, Melchers F, Oldstone MBA, et al., editors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; vol. 318). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-73677-6_8
58. Torre-Fuentes L, Moreno-Jiménez L, Pytel V, Matías-Guiu JA, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Modelos experimentales de desmielinización-remielinización. *Neurología*. 2020 Jan;35(1):32–9.
59. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *European Journal of Pharmacology*. 2015 Jul;759:182–91.
60. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Nov 8;4(1):43.

61. Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis — success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol*. 2019 Jan;15(1):53–8.
62. Diebold M, Derfuss T. Immunological treatment of multiple sclerosis. *Seminars in Hematology*. 2016 Apr;53:S54–7.
63. Rice GP, Oger J, Duquette P, Francis GS, Bélanger M, Laplante S, et al. Treatment with Interferon Beta-1b Improves Quality of Life in Multiple Sclerosis. *Can j neurol sci*. 1999 Nov;26(4):276–82.
64. Sibley WA. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. 1993;43(4):655–61.
65. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon- mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010 Jan 5;74(Issue 1, Supplement 1):S17–24.
66. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon- -1a in relapsing MS. *Neurology*. 2001 Jun 26;56(12):1628–36.
67. Yu L, Croze E, Yamaguchi KD, Tran T, Reder AT, Litvak V, et al. Induction of a Unique Isoform of the *NCOA7* Oxidation Resistance Gene by Interferon β -1b. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2015 Mar;35(3):186–99.
68. Shahi SK, Jensen SN, Murra AC, Tang N, Guo H, Gibson-Corley KN, et al. Human Commensal *Prevotella histicola* Ameliorates Disease as Effectively as Interferon-Beta in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2020 Dec 11;11:578648.
69. Ford C, Goodman A, Johnson K, Kachuck N, Lindsey J, Lisak R, et al. Continuous long-term immunomodulatory therapy in relapsing multiple sclerosis: results from the 15-year analysis of the US prospective open-label study of glatiramer acetate. *Mult Scler*. 2010 Mar;16(3):342–50.
70. Kasindi A, Fuchs DT, Koronyo Y, Rentsendorj A, Black K, Koronyo-Hamaoui M. Glatiramer Acetate Immunomodulation: Evidence of Neuroprotection and Cognitive Preservation. *Cells*. 2022 May 7;11(9):1578.
71. Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *The Lancet*. 2002 Dec;360(9350):2018–25.
72. Marzena J, Fabis-Pedrini, William M. Carroll, Allan G. Kermode. Efficacy and Safety of Mitoxantrone Use in Aggressive Multiple Sclerosis (P3.414). *Neurology*. 2018 Apr 10;90(15 Supplement):P3.414.

73. Fischer JS, Priore RL, Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, et al. Neuropsychological effects of interferon β -1a in relapsing multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2000;48(6):885–92.
74. Babaesfahani A, Khanna NR, Kuns B. Natalizumab [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/30480940>
75. Coelho RP, Payne SG, Bittman R, Spiegel S, Sato-Bigbee C. The Immunomodulator FTY720 Has a Direct Cytoprotective Effect in Oligodendrocyte Progenitors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Nov;323(2):626–35.
76. Kappos L, Cohen J, Collins W, de Vera A, Zhang-Auberson L, Ritter S, et al. Fingolimod in relapsing multiple sclerosis: An integrated analysis of safety findings. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2014 Jul;3(4):494–504.
77. Cohan SL, Benedict RHB, Cree BAC, DeLuca J, Hua LH, Chun J. The Two Sides of Siponimod: Evidence for Brain and Immune Mechanisms in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2022 Jul;36(7):703–19.
78. Papadopoulou A, Kappos L, Sprenger T. Teriflunomide for oral therapy in multiple sclerosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2012 Nov;5(6):617–28.
79. Tilly G, Cadoux M, Garcia A, Morille J, Wiertlewski S, Pecqueur C, et al. Teriflunomide Treatment of Multiple Sclerosis Selectively Modulates CD8 Memory T Cells. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12:730342.
80. Mills EA, Ogrodnik MA, Plave A, Mao-Draayer Y. Emerging Understanding of the Mechanism of Action for Dimethyl Fumarate in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2018 Jan 23;9:5.
81. Jonasson E, Sejbaek T. Diroximel fumarate in the treatment of multiple sclerosis. *Neurodegenerative Disease Management*. 2020 Oct;10(5):267–76.
82. Havrdova E, Cohen J, Horáková D, Kovarova I, Meluzinova E. Understanding the positive benefit:risk profile of alemtuzumab in relapsing multiple sclerosis: perspectives from the Alemtuzumab Clinical Development Program. *TCRM*. 2017 Oct;Volume 13:1423–37.
83. Hilger C, Riedhammer C, Orsó E, Weissert R. Effects of Alemtuzumab on (Auto)antigen-Specific Immune Responses. *Front Immunol*. 2020 Oct 8;11:563645.
84. Kiapour N, Wu B, Wang Y, Seyedsadr M, Kapoor S, Zhang X, et al. Therapeutic Effect of Anti-CD52 Monoclonal Antibody in Multiple Sclerosis and Its Animal

- Models Is Mediated via T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*. 2022 Jul 1;209(1):49–56.
85. Hoy SM. Peginterferon Beta-1a: A Review of Its Use in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2015 Feb;29(2):171–9.
 86. Cohan S. Therapeutic efficacy of monthly subcutaneous injection of daclizumab in relapsing multiple sclerosis. *BTT*. 2016 Sep;Volume 10:119–38.
 87. Gold R, Stefoski D, Selmaj K, Havrdova E, Hurst C, Holman J, et al. Pregnancy Experience: Nonclinical Studies and Pregnancy Outcomes in the Daclizumab Clinical Study Program. *Neurol Ther*. 2016 Dec;5(2):169–82.
 88. Baldassari LE, Rose JW. Daclizumab: Development, Clinical Trials, and Practical Aspects of Use in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017 Oct;14(4):842–58.
 89. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*. 2011 Nov;378(9805):1779–87.
 90. Florou D, Katsara M, Feehan J, Dardiotis E, Apostolopoulos V. Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. *Brain Sciences*. 2020 Oct 20;10(10):758.
 91. Ovchinnikov A, Findling O. An overview of pivotal trials and real-world evidence for CD20-depleting therapy in multiple sclerosis: Immunotherapy with rituximab, ocrelizumab, and ofatumumab. *Wien Med Wochenschr*. 2022 Nov;172(15–16):359–64.
 92. Fissolo N, Calvo-Barreiro L, Eixarch H, Boschert U, Espejo C, Montalban X, et al. Immunomodulatory Effects Associated with Cladribine Treatment. *Cells*. 2021 Dec 10;10(12):3488.
 93. Liliemark J. The Clinical Pharmacokinetics of Cladribine: Clinical Pharmacokinetics. 1997 Feb;32(2):120–31.
 94. Cook S, Leist T, Comi G, Montalban X, Giovannoni G, Nolting A, et al. Safety of cladribine tablets in the treatment of patients with multiple sclerosis: An integrated analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2019 Apr;29:157–67.
 95. Dumitrescu L, Constantinescu CS, Tanasescu R. Siponimod for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2019 Jan 22;20(2):143–50.
 96. Behrangi N, Fischbach F, Kipp M. Mechanism of Siponimod: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Mode of Action. *Cells*. 2019 Jan 7;8(1):24.

97. Kuczynski AM, Oh J. Ozanimod for the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis. *Neurodegenerative Disease Management*. 2021 Jun;11(3):207–20.
98. Scott FL, Clemons B, Brooks J, Brahmachary E, Powell R, Dedman H, et al. Ozanimod (RPC1063) is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P₁) and receptor-5 (S1P₅) agonist with autoimmune disease-modifying activity. *British J Pharmacology*. 2016 Jun;173(11):1778–92.
99. Ruggieri S, Quartuccio ME, Prosperini L. Ponesimod in the Treatment of Relapsing Forms of Multiple Sclerosis: An Update on the Emerging Clinical Data. *DNND*. 2022 Mar;Volume 12:61–73.
100. Berger AA, Sottosanti ER, Winnick A, Izygon J, Berardino K, Cornett EM, et al. Monomethyl Fumarate (MMF, Bafiertam) for the Treatment of Relapsing Forms of Multiple Sclerosis (MS). *Neurology International*. 2021 May 19;13(2):207–23.
101. Lee A. Ublituximab: First Approval. *Drugs*. 2023 Apr;83(5):455–9.
102. Barbieri MA, Sorbara EE, Battaglia A, Cicala G, Rizzo V, Spina E, et al. Adverse Drug Reactions with Drugs Used in Multiple Sclerosis: An Analysis from the Italian Pharmacovigilance Database. *Front Pharmacol*. 2022 Feb 23;13:808370.
103. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018 Feb;97(4):742–68.
104. Lorefice L, Fenu G, Fois M, Frau J, Coghe G, Marrosu MG, et al. Pulse steroid therapy in multiple sclerosis and mood changes: An exploratory prospective study. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2018 Feb;20:104–8.
105. Zadeh AR, Askari M, Azadani NN, Ataei A, Ghadimi K, Falahatian M. Mechanism and adverse effects of multiple sclerosis drugs: a review article. Part.
106. Zadeh AR, Askari M, Azadani NN, Ataei A, Ghadimi K, Falahatian M. Mechanism and adverse effects of multiple sclerosis drugs: a review article. Part.
107. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015 Feb;14(2):183–93.
108. Avasarala J. It's Time For Combination Therapies: in Multiple Sclerosis. *Innov Clin Neurosci*. 2017 Jun 1;14(5–6):28–30.
109. Correale J, Halfon MJ, Jack D, Rubstein A, Villa A. Acting centrally or peripherally: A renewed interest in the central nervous system penetration of disease-modifying drugs in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2021 Nov;56:103264.

110. Yoon KC, Kim KW. Blood-neural barrier: Its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2008;41(5):345–52.
111. Edelhauser HF, Rowe-Rendleman CL, Robinson MR, Dawson DG, Chader GJ, Grossniklaus HE, et al. Ophthalmic Drug Delivery Systems for the Treatment of Retinal Diseases: Basic Research to Clinical Applications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Nov 1;51(11):5403.
112. Barichello T, Collodel A, Hasbun R, Morales R. An Overview of the Blood-Brain Barrier. In: Barichello T, editor. *Blood-Brain Barrier* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2023 Dec 4]. p. 1–8. (Neuromethods; vol. 142). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8946-1_1
113. Mwema A, Muccioli GG, des Rieux A. Innovative drug delivery strategies to the CNS for the treatment of multiple sclerosis. *J Control Release*. 2023 Dec;364:435–57.
114. Misra A, Ganesh S, Shahiwala A. Drug Delivery To The Central Nervous System: A Review. *J Pharm Pharm Sci*. 2003;6(2):252–73.
115. Furtado D, Björnmalm M, Ayton S, Bush AI, Kempe K, Caruso F. Overcoming the Blood–Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Advanced Materials*. 2018;30(46):1801362.
116. Delange E. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood?CSF barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 Oct 14;56(12):1793–809.
117. Pardridge WM. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016 Jul 2;13(7):963–75.
118. Kabanov A, Batrakova E. New Technologies for Drug Delivery Across the Blood Brain Barrier. *CPD*. 2004 May 1;10(12):1355–63.
119. Tajés M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, Bosch-Morató M, Guivernau B, Eraso-Pichot A, et al. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*. 2014 Aug;31(5):152–67.
120. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*. 2020 Dec;17(1):69.
121. Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* [Internet]. 2013

[cited 2023 Dec 4];6. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneng.2013.00007/abstract>

122. Pardridge WM. Targeting Neurotherapeutic Agents Through the Blood-Brain Barrier. *Arch Neurol*. 2002 Jan 1;59(1):35.
123. Kaş HS. Drug delivery to Brain by Microparticulate Systems. In: Hasirci N, Hasirci V, editors. *Biomaterials* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2004 [cited 2023 Dec 4]. p. 221–30. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 553). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-0-306-48584-8_17
124. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K, Dizaj SM. Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019 Mar;111:666–75.
125. Meng J, Agrahari V, Youm I. Advances in Targeted Drug Delivery Approaches for the Central Nervous System Tumors: The Inspiration of Nanobiotechnology. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017 Mar;12(1):84–98.
126. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001 Mar;46(1–3):3–26.
127. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004 Dec;1(4):337–41.
128. Lipinski CA. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016 Jun;101:34–41.
129. Lecomte JM, Costentin J, Vlaiculescu A, Chaillet P, Marcais-Collado H, Llorens-Cortes C, et al. Pharmacological properties of acetorphan, a parenterally active “enkephalinase” inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986;237(3):937–44.
130. Oldendorf WH, Hyman S, Braun L, Oldendorf SZ. Blood-Brain Barrier: Penetration of Morphine, Codeine, Heroin, and Methadone after Carotid Injection. *Science*. 1972 Dec;178(4064):984–6.
131. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*. 2009 Jun 12;9(1):S3.
132. Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*. 2018 Feb 5;8(6):1481–93.

133. Lingineni K, Belekar V, Tangadpalliwar SR, Garg P. The role of multidrug resistance protein (MRP-1) as an active efflux transporter on blood–brain barrier (BBB) permeability. *Mol Divers*. 2017 May;21(2):355–65.
134. Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, De Bonis P, et al. Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2018 Apr 3;15(4):369–78.
135. Agrahari V, Burnouf PA, Burnouf T, Agrahari V. Nanoformulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: Challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019 Aug;148:146–80.
136. Kou L, Bhutia YD, Yao Q, He Z, Sun J, Ganapathy V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 26;9:27.
137. Posadas I, Monteagudo S, Ceña V. Nanoparticles for brain-specific drug and genetic material delivery, imaging and diagnosis. *Nanomedicine*. 2016 Apr;11(7):833–49.
138. Patel MM, Patel BM. Crossing the Blood–Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs*. 2017 Feb;31(2):109–33.
139. Ceña V, Játiva P. Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine*. 2018 Jul;13(13):1513–6.
140. Askarizadeh A, Barreto GE, Henney NC, Majeed M, Sahebkar A. Neuroprotection by curcumin: A review on brain delivery strategies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020 Jul;585:119476.
141. Tabansky I, Messina MD, Bangeranye C, Goldstein J, Blitz-Shabbir KM, Machado S, et al. Advancing drug delivery systems for the treatment of multiple sclerosis. *Immunol Res*. 2015 Dec;63(1–3):58–69.
142. Rahiman N, Mohammadi M, Alavizadeh SH, Arabi L, Badiee A, Jaafari MR. Recent advancements in nanoparticle-mediated approaches for restoration of multiple sclerosis. *J Control Release*. 2022 Mar;343:620–44.
143. Serra P, Santamaria P. Nanoparticle-based autoimmune disease therapy. *Clinical Immunology*. 2015 Sep;160(1):3–13.
144. Yeste A, Nadeau M, Burns EJ, Weiner HL, Quintana FJ. Nanoparticle-mediated codelivery of myelin antigen and a tolerogenic small molecule suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jul 10;109(28):11270–5.

145. Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2018 Jan;270:290–303.
146. Iwamoto T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2013;36(5):715–8.
147. Yousefpour P, Chilkoti A. Co-opting biology to deliver drugs. *Biotech & Bioengineering*. 2014 Sep;111(9):1699–716.
148. Jain V, Jain S, Mahajan SC. Nanomedicines Based Drug Delivery Systems for Anti-Cancer Targeting and Treatment. *CDD*. 2015 Apr 23;12(2):177–91.
149. Batrakova EV, Gendelman HE, Kabanov AV. Cell-mediated drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011 Apr;8(4):415–33.
150. Teleanu D, Chircov C, Grumezescu A, Volceanov A, Teleanu R. Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology. *Pharmaceutics*. 2018 Dec 11;10(4):269.
151. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol*. 2007 Dec;2(1):16.
152. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm Res*. 2006 Jul;23(7):1417–50.
153. McCarthy DP, Yap JWT, Harp CT, Song WK, Chen J, Pearson RM, et al. An antigen-encapsulating nanoparticle platform for TH1/17 immune tolerance therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017 Jan;13(1):191–200.
154. Saito E, Kuo R, Kramer KR, Gohel N, Giles DA, Moore BB, et al. Design of biodegradable nanoparticles to modulate phenotypes of antigen-presenting cells for antigen-specific treatment of autoimmune disease. *Biomaterials*. 2019 Nov;222:119432.
155. Kumar P, Sharma G, Gupta V, Kaur R, Thakur K, Malik R, et al. Oral Delivery of Methylthioadenosine to the Brain Employing Solid Lipid Nanoparticles: Pharmacokinetic, Behavioral, and Histopathological Evidences. *AAPS PharmSciTech*. 2019 Feb;20(2):74.
156. Kumar P, Sharma G, Kumar R, Malik R, Singh B, Katare OP, et al. Enhanced Brain Delivery of Dimethyl Fumarate Employing Tocopherol-Acetate-Based Nanolipidic Carriers: Evidence from Pharmacokinetic, Biodistribution, and Cellular Uptake Studies. *ACS Chem Neurosci*. 2017 Apr 19;8(4):860–5.
157. Cappellano G, Woldetsadik AD, Orilieri E, Shivakumar Y, Rizzi M, Carniato F, et al. Subcutaneous inverse vaccination with PLGA particles loaded with a MOG

- peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vaccine*. 2014 Sep;32(43):5681–9.
158. Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Wagner S, Wuerfel JT, Infante-Duarte C. Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Highlight Early Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation. *ASN Neuro*. 2013 Apr 25;5(2):AN20120081.
 159. Clark AJ, Davis ME. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Oct 6;112(40):12486–91.
 160. Gonzalez-Carter DA, Ong ZY, McGilvery CM, Dunlop IE, Dexter DT, Porter AE. L-DOPA functionalized, multi-branched gold nanoparticles as brain-targeted nano-vehicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019 Jan;15(1):1–11.
 161. Lledos M, Mirabello V, Sarpaki S, Ge H, Smugowski HJ, Carroll L, et al. Synthesis, Radiolabelling and In Vitro Imaging of Multifunctional Nanoceramics. *ChemNanoMat*. 2018 Apr;4(4):361–72.
 162. Shen Y, Cao B, Snyder NR, Woeppel KM, Eles JR, Cui XT. ROS responsive resveratrol delivery from LDLR peptide conjugated PLA-coated mesoporous silica nanoparticles across the blood–brain barrier. *J Nanobiotechnol*. 2018 Dec;16(1):13.
 163. Vio V, Marchant MJ, Araya E, Kogan MK. Metal Nanoparticles for the Treatment and Diagnosis of Neurodegenerative Brain Diseases. *CPD*. 2017 May 23;23(13):1916–26.
 164. Amin FU, Hoshidar AK, Do TD, Noh Y, Shah SA, Khan MS, et al. Osmotin-loaded magnetic nanoparticles with electromagnetic guidance for the treatment of Alzheimer’s disease. *Nanoscale*. 2017;9(30):10619–32.
 165. Cui N, Lu H, Li M. Magnetic Nanoparticles Associated PEG/PLGA Block Copolymer Targeted with Anti-Transferrin Receptor Antibodies for Alzheimer’s Disease. *j biomed nanotechnol*. 2018 May 1;14(5):1017–24.
 166. Tafoya MA, Madi S, Sillerud LO. Superparamagnetic nanoparticle-enhanced MRI of Alzheimer’s disease plaques and activated microglia in 3X transgenic mouse brains: Contrast optimization. *Magnetic Resonance Imaging*. 2017 Aug;46(2):574–88.
 167. Zeng J, Wu J, Li M, Wang P. A Novel Magnetic Nanoparticle for Early Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer’s Disease. *Archives of Medical Research*. 2018 May;49(4):282–5.

168. Lee C, Hwang HS, Lee S, Kim B, Kim JO, Oh KT, et al. Rabies Virus-Inspired Silica-Coated Gold Nanorods as a Photothermal Therapeutic Platform for Treating Brain Tumors. *Advanced Materials*. 2017 Apr;29(13):1605563.
169. Zhang R, Li Y, Hu B, Lu Z, Zhang J, Zhang X. Traceable Nanoparticle Delivery of Small Interfering RNA and Retinoic Acid with Temporally Release Ability to Control Neural Stem Cell Differentiation for Alzheimer's Disease Therapy. *Advanced Materials*. 2016 Aug;28(30):6345–52.
170. Agarwal A, Agrawal H, Tiwari S, Jain S, Agrawal GP. Cationic ligand appended nanoconstructs: A prospective strategy for brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011 Dec;421(1):189–201.
171. Venishetty VK, Samala R, Komuravelli R, Kuncha M, Sistla R, Diwan PV. β -Hydroxybutyric acid grafted solid lipid nanoparticles: A novel strategy to improve drug delivery to brain. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013 Apr;9(3):388–97.
172. Dhawan S, Kapil R, Singh B. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011 Feb 24;63(3):342–51.
173. Chattopadhyay N, Zastre J, Wong HL, Wu XY, Bendayan R. Solid Lipid Nanoparticles Enhance the Delivery of the HIV Protease Inhibitor, Atazanavir, by a Human Brain Endothelial Cell Line. *Pharm Res*. 2008 Oct;25(10):2262–71.
174. Gupta Y, Jain A, Jain SK. Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010 Feb 18;59(7):935–40.
175. Lu CT, Zhao YZ, Wong HL, Cai J, Peng L, Tian XQ. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *IJN*. 2014 May;2241.
176. Luo Y, Teng Z, Li Y, Wang Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydrate Polymers*. 2015 May;122:221–9.
177. Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010 Feb;6(1):9–24.
178. Paliwal R, Paliwal SR, Kenwat R, Kurmi BD, Sahu MK. Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2020 Mar 3;30(3):179–94.

179. Duan Y, Dhar A, Patel C, Khimani M, Neogi S, Sharma P, et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Adv.* 2020;10(45):26777–91.
180. Muchow M, Maincent P, Müller RH. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for Oral Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 2008 Jan;34(12):1394–405.
181. Sarhadi S, Gholizadeh M, Moghadasian T, Golmohamadzadeh S. Moisturizing effects of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) using deionized and magnetized water by in vivo and in vitro methods. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences [Internet].* 2020 Mar [cited 2023 Dec 7];23(3). Available from: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.39587.9397>
182. Jaiswal P, Gidwani B, Vyas A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* 2016 Jan 2;44(1):27–40.
183. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2002 Nov;54:S131–55.
184. Vilella A, Tosi G, Grabrucker AM, Ruozi B, Belletti D, Vandelli MA, et al. Insight on the fate of CNS-targeted nanoparticles. Part I: Rab5-dependent cell-specific uptake and distribution. *Journal of Controlled Release.* 2014 Jan;174:195–201.
185. Pardridge WM. Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Nov;32(11):1959–72.
186. Fang M, Jin, Bao, Gao, Xu, Wang, et al. In vitro characterization and in vivo evaluation of nanostructured lipid curcumin carriers for intragastric administration. *IJN.* 2012 Oct;5395.
187. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release.* 2010 Dec;148(2):135–46.
188. Garg J, Pathania K, Sah SP, Pawar SV. Nanostructured lipid carriers: a promising drug carrier for targeting brain tumours. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2022 Apr 8;8(1):25.
189. Masserini M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. Seno M, Itoh H, Pant H, editors. *ISRN Biochemistry.* 2013 May 21;2013:238428.
190. Dragan ES, Bucatariu F. Design and characterization of anionic hydrogels confined in Daisogel silica composites microspheres and their application in

- sustained release of proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2016 Jan;489:46–56.
191. Farokhi M, Mottaghitlab F, Shokrgozar MA, Ou KL, Mao C, Hosseinkhani H. Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2016 Mar;225:152–69.
192. Ahmed B, Sharma A, Usmani Z, Sharma G, Singh J, Yadav R, et al. Magic shotgun over magic bullet for treatment of ovarian cancer via polymeric nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023 Oct;88:104945.
193. Tahara K, Miyazaki Y, Kawashima Y, Kreuter J, Yamamoto H. Brain targeting with surface-modified poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles delivered via carotid artery administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011 Jan;77(1):84–8.
194. Naqvi S, Panghal A, Flora SJS. Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. *Front Neurosci*. 2020 Jun 9;14:494.
195. Asadullah Madni, Nayab Tahir, Mubashar Rehman, Ahmed Raza, Muhammad Ahmad Mahmood, Muhammad Imran Khan and Prince Muhammad Kashif. Hybrid Nano-carriers for Potential Drug Delivery. In: Sabyasachi Maiti, Kalyan Kumar Sen, editors. *Advanced Technology for Delivering Therapeutics* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2017 [cited 2023 Dec 7]. p. Ch. 4. Available from: <https://doi.org/10.5772/66466>
196. Lee SM, Ahn RW, Chen F, Fought AJ, O'Halloran TV, Cryns VL, et al. Biological Evaluation of pH-Responsive Polymer-Caged Nanobins for Breast Cancer Therapy. *ACS Nano*. 2010 Sep 28;4(9):4971–8.
197. Montasser I, Shahgaldian P, Perret F, Coleman A. Solid Lipid Nanoparticle-Based Calix[n]arenes and Calix-Resorcinarenes as Building Blocks: Synthesis, Formulation and Characterization. *IJMS*. 2013 Nov 5;14(11):21899–942.
198. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro, AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006 Mar;2(1):8–21.
199. Zheng M, Yue C, Ma Y, Gong P, Zhao P, Zheng C, et al. Single-Step Assembly of DOX/ICG Loaded Lipid–Polymer Nanoparticles for Highly Effective Chemophotothermal Combination Therapy. *ACS Nano*. 2013 Mar 26;7(3):2056–67.
200. Tonbul H, Çapan Y. Hybrid PLGA nanoparticles as advanced drug delivery and theranostic applications. In: *Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticles for Drug Delivery* [Internet]. Elsevier; 2023 [cited 2023 Dec 8]. p. 417–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323912150000170>

201. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013 Nov;85(3):427–43.
202. Qi D, Cao Z, Ziener U. Recent advances in the preparation of hybrid nanoparticles in miniemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014 Sep;211:47–62.
203. ZHANG L, ZHANG L. LIPID–POLYMER HYBRID NANOPARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS. *Nano LIFE*. 2010 Mar 1;01(01n02):163–73.
204. Hu CMJ, Zhang L, Aryal S, Cheung C, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(27):10980–5.
205. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013 Jan;65(1):36–48.
206. Zhang L, Granick S. How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles). *Nano Lett*. 2006 Apr 1;6(4):694–8.
207. Enlow EM, Luft JC, Napier ME, DeSimone JM. Potent Engineered PLGA Nanoparticles by Virtue of Exceptionally High Chemotherapeutic Loadings. *Nano Lett*. 2011 Feb 9;11(2):808–13.
208. Mieszawska AJ, Gianella A, Cormode DP, Zhao Y, Meijerink A, Langer R, et al. Engineering of lipid-coated PLGA nanoparticles with a tunable payload of diagnostically active nanocrystals for medical imaging. *Chem Commun*. 2012;48(47):5835.
209. Jain S, Valvi PU, Swarnakar NK, Thanki K. Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B. *Mol Pharmaceutics*. 2012 Sep 4;9(9):2542–53.
210. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2971.
211. Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev*. 2013;42(3):1147–235.

212. Thevenot J, Troutier AL, David L, Delair T, Ladavière C. Steric Stabilization of Lipid/Polymer Particle Assemblies by Poly(ethylene glycol)-Lipids. *Biomacromolecules*. 2007 Nov 1;8(11):3651–60.
213. Miguel D. Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV(TM)) used as drug carriers (2000) *Pharmaceutical Research*, 17 (7), pp. 817-824. Cited 70 times.
214. Wang H, Zhao P, Su W, Wang S, Liao Z, Niu R, et al. PLGA/polymeric liposome for targeted drug and gene co-delivery. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(33):8741–8.
215. Liao Z, Wang H, Wang X, Zhao P, Wang S, Su W, et al. Multifunctional Nanoparticles Composed of A Poly(DL -lactide-coglycolide) Core and A Paramagnetic Liposome Shell for Simultaneous Magnetic Resonance Imaging and Targeted Therapeutics. *Adv Funct Materials*. 2011 Mar 22;21(6):1179–86.
216. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid–polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011 Jul;85(2):214–20.
217. D’Addio SM, Prud’homme RK. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011 May;63(6):417–26.
218. Freese C, Gibson MI, Klok HA, Unger RE, Kirkpatrick CJ. Size- and Coating-Dependent Uptake of Polymer-Coated Gold Nanoparticles in Primary Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *Biomacromolecules*. 2012 May 14;13(5):1533–43.
219. Chu CH, Wang YC, Huang HY, Wu LC, Yang CS. Ultrafine PEG-coated poly(lactic- co -glycolic acid) nanoparticles formulated by hydrophobic surfactant-assisted one-pot synthesis for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2011 May 6;22(18):185601.
220. Liu Y, Pan J, Feng SS. Nanoparticles of lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for controlled release of paclitaxel: Effects of surfactants on particles size, characteristics and in vitro performance. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 Aug;395(1–2):243–50.
221. Bershteyn A, Chaparro J, Yau R, Kim M, Reinherz E, Ferreira-Moita L, et al. Polymer-supported lipid shells, onions, and flowers. *Soft Matter*. 2008;4(9):1787.
222. Yang Z, Luo X, Zhang X, Liu J, Jiang Q. Targeted delivery of 10-hydroxycamptothecin to human breast cancers by cyclic RGD-modified lipid–polymer hybrid nanoparticles. *Biomed Mater*. 2013 Mar 18;8(2):025012.

223. Shi J, Xiao Z, Votruba AR, Vilos C, Farokhzad OC. Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid–Polymer–Lipid Hybrid Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Angew Chem Int Ed*. 2011 Jul 25;50(31):7027–31.
224. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammourey N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989 Oct;55(1):R1–4.
225. Salatin S, Barar J, Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Kiafar F, Jelvehgari M. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Res Pharma Sci*. 2017;12(1):1.
226. Kumar S, Lather V, Pandita D. Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon. *Nanomedicine*. 2015 Aug;10(15):2451–71.
227. Kumar S, Lather V, Pandita D. A facile green approach to prepare core-shell hybrid PLGA nanoparticles for resveratrol delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016 Mar;84:380–4.
228. Saha S, Ray S, Acharya R, Chatterjee TK, Chakraborty J. Magnesium, zinc and calcium aluminium layered double hydroxide-drug nanohybrids: A comprehensive study. *Applied Clay Science*. 2017 Jan;135:493–509.
229. Vasti C, Bedoya DA, Rojas R, Giacomelli CE. Effect of the protein corona on the colloidal stability and reactivity of LDH-based nanocarriers. *J Mater Chem B*. 2016;4(11):2008–16.
230. Kura AU, Hussein MZ, Fakurazi S, Arulselvan P. Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. *Chemistry Central Journal*. 2014 Dec;8(1):47.
231. Teixeira MI, Lopes CM, Amaral MH, Costa PC. Surface-modified lipid nanocarriers for crossing the blood-brain barrier (BBB): A current overview of active targeting in brain diseases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023 Jan;221:112999.
232. Teixeira MI, Lopes CM, Amaral MH, Costa PC. Current insights on lipid nanocarrier-assisted drug delivery in the treatment of neurodegenerative diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020 Apr;149:192–217.
233. Jiang Z, Guan J, Qian J, Zhan C. Peptide ligand-mediated targeted drug delivery of nanomedicines. *Biomater Sci*. 2019;7(2):461–71.
234. Sikorski AF, Toporkiewicz M, Meissner J, Matuszewicz L, Czogalla A. Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges. *IJN*. 2015 Feb;1399.

235. Yoo J, Park C, Yi G, Lee D, Koo H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers*. 2019 May 8;11(5):640.
236. Pinheiro RGR, Coutinho AJ, Pinheiro M, Neves AR. Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery: What Do We Know? *IJMS*. 2021 Oct 28;22(21):11654.
237. Lombardo SM, Schneider M, Türelı AE, Günday Türelı N. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein J Nanotechnol*. 2020 Jun 4;11:866–83.
238. Ruan S, Zhou Y, Jiang X, Gao H. Rethinking CRITID Procedure of Brain Targeting Drug Delivery: Circulation, Blood Brain Barrier Recognition, Intracellular Transport, Diseased Cell Targeting, Internalization, and Drug Release. *Advanced Science*. 2021 May;8(9):2004025.
239. Mojarad-Jabali S, Farshbaf M, Walker PR, Hemmati S, Fatahi Y, Zakeri-Milani P, et al. An update on actively targeted liposomes in advanced drug delivery to glioma. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021 Jun;602:120645.
240. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002 Oct;2(10):750–63.
241. Stefanick JF, Omstead DT, Kiziltepe T, Bilgicer B. Dual-receptor targeted strategy in nanoparticle design achieves tumor cell selectivity through cooperativity. *Nanoscale*. 2019;11(10):4414–27.
242. Din F ud, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *IJN*. 2017 Oct;Volume 12:7291–309.
243. Morachis JM, Mahmoud EA, Almutairi A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. Insel PA, editor. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):505–19.
244. Thiruppathi R, Mishra S, Ganapathy M, Padmanabhan P, Gulyás B. Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. *Advanced Science*. 2017 Mar;4(3):1600279.
245. Quarta A, Manna L, Pellegrino T. Antibody-Functionalized Inorganic NPs: Mimicking Nature for Targeted Diagnosis and Therapy. In: Cingolani R, editor. *Bioinspired Approaches for Human-Centric Technologies* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [cited 2023 Dec 8]. p. 1–28. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-04924-3_1
246. M. Cardoso M, N. Peca I, C. A. Roque A. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Therapeutic Applications. *CMC*. 2012 May 1;19(19):3103–27.

247. Parracino MA, Martín B, Grazú V. State-of-the-art strategies for the biofunctionalization of photoactive inorganic nanoparticles for nanomedicine. In: *Photoactive Inorganic Nanoparticles* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2023 Dec 8]. p. 211–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128145319000099>
248. Liébana S, Drago GA. Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. Estrela P, editor. *Essays in Biochemistry*. 2016 Jun 30;60(1):59–68.
249. Tallawi M, Rosellini E, Barbani N, Cascone MG, Rai R, Saint-Pierre G, et al. Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Journal of The Royal Society Interface*. 2015 Jul 6;12(108):20150254.
250. Goossens J, Sein H, Lu S, Radwanska M, Muyldermans S, Sterckx YGJ, et al. Functionalization of gold nanoparticles with nanobodies through physical adsorption. *Anal Methods*. 2017;9(23):3430–40.
251. Shen M, Rusling JF, Dixit CK. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development. *Methods*. 2017 Mar;116:95–111.
252. Choi JS, Jang WS, Park JS. Comparison of adsorption and conjugation of Herceptin on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles – Effect on cell internalization in breast cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2018 Nov;92:496–507.
253. Marques AC, Costa PJ, Velho S, Amaral MH. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. *Journal of Controlled Release*. 2020 Apr;320:180–200.
254. Lin X, O'Reilly Beringhs A, Lu X. Applications of Nanoparticle-Antibody Conjugates in Immunoassays and Tumor Imaging. *AAPS J*. 2021 Mar 14;23(2):43.
255. Ou X, Jiang L, Chen P, Zhu M, Hu W, Liu M, et al. Highly Stable Graphene-Based Multilayer Films Immobilized via Covalent Bonds and Their Applications in Organic Field-Effect Transistors. *Adv Funct Materials*. 2013 May 20;23(19):2422–35.
256. Cammarata CR, Hughes ME, Ofner CM. Carbodiimide Induced Cross-Linking, Ligand Addition, and Degradation in Gelatin. *Mol Pharmaceutics*. 2015 Mar 2;12(3):783–93.
257. Iwasawa T, Wash P, Gibson C, Rebek J. Reaction of an introverted carboxylic acid with carbodiimide. *Tetrahedron*. 2007 Jul;63(28):6506–11.

258. Conde J, Dias JT, Graça V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front Chem* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2023 Dec 8];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2014.00048/abstract>
259. Yao VJ, D'Angelo S, Butler KS, Theron C, Smith TL, Marchiò S, et al. Ligand-targeted theranostic nanomedicines against cancer. *Journal of Controlled Release*. 2016 Oct;240:267–86.
260. Yang J, Lee CH, Park J, Seo S, Lim EK, Song YJ, et al. Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *J Mater Chem*. 2007;17(26):2695.
261. Dovgan I, Kolodych S, Koniev O, Wagner A. 2-(Maleimidomethyl)-1,3-Dioxanes (MD): a Serum-Stable Self-hydrolysable Hydrophilic Alternative to Classical Maleimide Conjugation. *Sci Rep*. 2016 Aug 9;6(1):30835.
262. Markwalter CF, Kantor AG, Moore CP, Richardson KA, Wright DW. Inorganic Complexes and Metal-Based Nanomaterials for Infectious Disease Diagnostics. *Chem Rev*. 2019 Jan 23;119(2):1456–518.
263. Greene MK, Richards DA, Nogueira JCF, Campbell K, Smyth P, Fernández M, et al. Forming next-generation antibody–nanoparticle conjugates through the oriented installation of non-engineered antibody fragments. *Chem Sci*. 2018;9(1):79–87.
264. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 May;16(5):315–37.
265. Yi G, Son J, Yoo J, Park C, Koo H. Application of click chemistry in nanoparticle modification and its targeted delivery. *Biomater Res*. 2018 Dec;22(1):13.
266. Hein CD, Liu XM, Wang D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm Res*. 2008 Oct;25(10):2216–30.
267. Chen Y, Xianyu Y, Wu J, Yin B, Jiang X. Click Chemistry-Mediated Nanosensors for Biochemical Assays. *Theranostics*. 2016;6(7):969–85.
268. Spicer CD, Davis BG. Selective chemical protein modification. *Nat Commun*. 2014 Sep 5;5(1):4740.
269. Haldón E, Nicasio MC, Pérez PJ. Copper-catalysed azide–alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Org Biomol Chem*. 2015;13(37):9528–50.

270. Sun L, Gai Y, Anderson CJ, Zeng D. Highly-efficient and versatile fluororous-tagged Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition ligand for preparing bioconjugates. *Chem Commun.* 2015;51(96):17072–5.
271. Gordon MR, Canakci M, Li L, Zhuang J, Osborne B, Thayumanavan S. Field Guide to Challenges and Opportunities in Antibody–Drug Conjugates for Chemists. *Bioconjugate Chem.* 2015 Nov 18;26(11):2198–215.
272. Gascón V, Márquez-Alvarez C, Díaz I, Blanco RM. Hybrid Ordered Mesoporous Materials as Supports for Permanent Enzyme Immobilization Through Non-covalent Interactions. In: Maharramov AM, Mahmudov KT, Kopylovich MN, Pombeiro AJL, editors. *Non-covalent Interactions in the Synthesis and Design of New Compounds* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2016 [cited 2023 Dec 8]. p. 345–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119113874.ch19>
273. Kumari M, Acharya A, Krishnamurthy PT. Antibody-conjugated nanoparticles for target-specific drug delivery of chemotherapeutics. *Beilstein J Nanotechnol.* 2023 Sep 4;14:912–26.
274. Fahie MA, Chen M. Electrostatic Interactions between OmpG Nanopore and Analyte Protein Surface Can Distinguish between Glycosylated Isoforms. *J Phys Chem B.* 2015 Aug 13;119(32):10198–206.
275. Jain A, Cheng K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *Journal of Controlled Release.* 2017 Jan;245:27–40.
276. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med.* 2014 May 29;370(22):2071–82.
277. Roth GJ, Binder R, Colbatzky F, Dallinger C, Schlenker-Herceg R, Hilberg F, et al. Nintedanib: From Discovery to the Clinic. *J Med Chem.* 2015 Feb 12;58(3):1053–63.
278. Vaidya B, Patel R, Muth A, Gupta V. Exploitation of Novel Molecular Targets to Treat Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Drug Discovery Perspective. *CMC* [Internet]. 2017 Aug 23 [cited 2023 Dec 8];24(22). Available from: <http://www.eurekaselect.com/152717/article>
279. Bosch ME, Díez RA, Agudo SG, Estela AC. Nintedanib in combination with docetaxel for second-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer; GENESIS-SEFH drug evaluation reporta.

280. Wind S, Schmid U, Freiwald M, Marzin K, Lotz R, Ebner T, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin Pharmacokinet*. 2019 Sep;58(9):1131–47.
281. Hajari Case A, Johnson P. Clinical use of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMJ Open Resp Res*. 2017 Jun;4(1):e000192.
282. Yoon HY, Park S, Kim DS, Song JW. Efficacy and safety of nintedanib in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2018 Dec;19(1):203.
283. Xu X wei, Su X juan, Zhang Y niao, Zheng X kang, Lv P fei, Hu J. Simultaneous determination of nintedanib and its metabolite BIBF 1202 in different tissues of mice by UPLC–MS/MS and its application in drug tissue distribution study. *Journal of Chromatography B*. 2015 Oct;1002:239–44.
284. Tsui H, Zeng Q, Chen K, Zhang X. Inhibiting Kinases in the CNS. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry III* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2023 Dec 8]. p. 408–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472138156>
285. Luedtke D, Marzin K, Jungnik A, von Wangenheim U, Dallinger C. Effects of Ketoconazole and Rifampicin on the Pharmacokinetics of Nintedanib in Healthy Subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2018 Oct;43(5):533–41.
286. Dallinger C, Trommeshauer D, Marzin K, Liesener A, Kaiser R, Stopfer P. Pharmacokinetic Properties of Nintedanib in Healthy Volunteers and Patients With Advanced Cancer. *The Journal of Clinical Pharma*. 2016 Nov;56(11):1387–94.
287. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *Journal of Neurosurgery*. 1988 Aug;69(2):155–70.
288. Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *CMLS, Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2004 Aug [cited 2023 Dec 29];61(16). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4043-x>
289. Daphne Palacios Macapagal, Jennifer Cann, Georgia Cresswell, Kamelia Zerrouki, Karma Dacosta, Jingya Wang, et al. Chronic CNS Pathology is Associated with Abnormal Collagen Deposition and Fibrotic-like Changes. *bioRxiv*. 2021 Jan 1;2021.07.06.451298.
290. Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biology*. 2018 Aug;68–69:106–21.

291. Xu L, Xu S, Xiang T, Liu H, Chen L, Jiang B, et al. Multifunctional building elements for the construction of peptide drug conjugates. *Engineered Regeneration*. 2022 Mar;3(1):92–109.
292. Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Yong VW. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Oct;14(10):722–9.
293. Goldbloom-Helzner L, Hao D, Wang A. Developing Regenerative Treatments for Developmental Defects, Injuries, and Diseases Using Extracellular Matrix Collagen-Targeting Peptides. *IJMS*. 2019 Aug 21;20(17):4072.
294. Addi C, Murschel F, De Crescenzo G. Design and Use of Chimeric Proteins Containing a Collagen-Binding Domain for Wound Healing and Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2017 Apr;23(2):163–82.
295. Affonso de Oliveira JF, Zhao Z, Xiang Y, Shin MD, Villaseñor KE, Deng X, et al. COVID-19 vaccines based on viral nanoparticles displaying a conserved B-cell epitope show potent immunogenicity and a long-lasting antibody response. *Front Microbiol*. 2023 Apr 20;14:1117494.
296. Zhao JL, Zhang JC, Qiu CZ, Zhang Y, Qiu XJ. A simple HPLC method for the determination of nintedanib in rabbit plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2018;37(10):1945–50.
297. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*. 2003 Feb;987(1–2):57–66.
298. Liu H, Mei J, Xu Y, Tang L, Chen D, Zhu Y, et al. Improving The Oral Absorption Of Nintedanib By A Self-Microemulsion Drug Delivery System: Preparation And In Vitro/In Vivo Evaluation. *IJN*. 2019 Nov;Volume 14:8739–51.
299. Ahmed T, Liu FCF, He C, Abbasi AZ, Cai P, Rauth AM, et al. Optimizing the Design of Blood–Brain Barrier-Penetrating Polymer-Lipid-Hybrid Nanoparticles for Delivering Anticancer Drugs to Glioblastoma. *Pharm Res*. 2021 Nov;38(11):1897–914.
300. Kaffashi A, Lüle S, Bozdağ Pehlivan S, Sarısözen C, Vural İ, Koşucu H, et al. Farnesylthiosalicylic acid-loaded lipid–polyethylene glycol–polymer hybrid nanoparticles for treatment of glioblastoma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017 Jul 6;69(8):1010–21.
301. Sekerdag E, Lüle S, Bozdağ Pehlivan S, Öztürk N, Kara A, Kaffashi A, et al. A potential non-invasive glioblastoma treatment: Nose-to-brain delivery of

- farnesylthiosalicylic acid incorporated hybrid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2017 Sep;261:187–98.
302. Chan JM, Zhang L, Tong R, Ghosh D, Gao W, Liao G, et al. Spatiotemporal controlled delivery of nanoparticles to injured vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Feb 2;107(5):2213–8.
303. Song X, Jin Y, Yan M, Zhang Y, Chen B. MicroRNA-342-3p functions as a tumor suppressor by targeting LIM and SH3 protein 1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2019 Jan 1;17(1):688–96.
304. Huang N, Lu S, Liu XG, Zhu J, Wang YJ, Liu RT. PLGA nanoparticles modified with a BBB-penetrating peptide co-delivering A β generation inhibitor and curcumin attenuate memory deficits and neuropathology in Alzheimer's disease mice. *Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(46):81001–13.
305. Mehta N, S Jeyapriya, Kumar P, Verma AK, Umaraw P, Khatkar SK, et al. Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications. *Foods*. 2022 Sep 23;11(19):2973.
306. D'Souza S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. Keck CM, editor. *Advances in Pharmaceutics*. 2014 Nov 20;2014:304757.
307. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J*. 2010 Sep;12(3):263–71.
308. Kassaye L, Genete G. Evaluation and comparison of in-vitro dissolution profiles for different brands of amoxicillin capsules. *Afr H Sci*. 2013 Sep 5;13(2):369–75.
309. Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editors. Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization [Internet]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2004 [cited 2023 Nov 4]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470755884>
310. Zange R, Kissel T. Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(d,l-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1997 Sep;44(2):149–57.
311. Şekerdağ-Kılıç E, Ulusoy C, Atak D, Özkan E, Gökyüzü AB, Seyaj S, et al. Perivascular PDGFRB+ cells accompany lesion formation and clinical evolution differentially in two different EAE models. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2023 Jan;69:104428.

312. Pyka-Fosciak G, Stasiolek M, Litwin JA. Immunohistochemical analysis of spinal cord components in mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2018 Sep 24;56(3):151–8.
313. Xu P, Gullotti E, Tong L, Highley CB, Errabelli DR, Hasan T, et al. Intracellular Drug Delivery by Poly(lactic- co -glycolic acid) Nanoparticles, Revisited. *Mol Pharmaceutics.* 2009 Feb 2;6(1):190–201.
314. Saoi M, Percival M, Nemr C, Li A, Gibala M, Britz-McKibbin P. Characterization of the Human Skeletal Muscle Metabolome for Elucidating the Mechanisms of Bicarbonate Ingestion on Strenuous Interval Exercise. *Anal Chem.* 2019 Apr 2;91(7):4709–18.
315. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology.* 2009 Jun;86(3):215–23.
316. Ma J, Li H, Cao Z, Sha J, Sun R, He H, et al. Solid-liquid phase equilibrium of Nintedanib in ten pure solvents: Determination, thermodynamic analysis, model correlation and molecular simulation. *The Journal of Chemical Thermodynamics.* 2021 Dec;163:106595.
317. Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2009 May;9(4):325–41.
318. Prabha S, Labhasetwar V. Critical Determinants in PLGA/PLA Nanoparticle-Mediated Gene Expression. *Pharmaceutical Research.* 2004;21(2):354–64.
319. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2003 Feb;55(3):329–47.
320. Athanasiou K. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials.* 1996 Jan;17(2):93–102.
321. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(23):2475–90.
322. Ghitman J, Biru EI, Stan R, Iovu H. Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. *Materials & Design.* 2020 Aug;193:108805.
323. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical

- Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018 May 18;10(2):57.
324. Yu K, Zhao J, Yu C, Sun F, Liu Y, Zhang Y, et al. Role of Four Different Kinds of Polyethylenimines (PEIs) in Preparation of Polymeric Lipid Nanoparticles and Their Anticancer Activity Study. *J Cancer*. 2016;7(7):872–82.
325. Yang G, Lin W, Lai H, Tong J, Lei J, Yuan M, et al. Understanding the relationship between particle size and ultrasonic treatment during the synthesis of metal nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021 May;73:105497.
326. Ranjan AP, Mukerjee A, Helson L, Vishwanatha JK. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. *J Nanobiotechnol*. 2012 Dec;10(1):38.
327. Song Z, Lin Y, Zhang X, Feng C, Lu Y, Gao Y, et al. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system for targeted oral apatinib administration: enhanced cellular uptake and improved therapeutic effects. *IJN*. 2017 Mar;Volume 12:1941–58.
328. Pramual S, Lirdprapamongkol K, Atjanasuppat K, Chaisuriya P, Niamsiri N, Svasti J. PLGA-Lipid Hybrid Nanoparticles for Overcoming Paclitaxel Tolerance in Anoikis-Resistant Lung Cancer Cells. *Molecules*. 2022 Nov 28;27(23):8295.
329. Waggoner LE, Madias MI, Hurtado AA, Kwon EJ. Pharmacokinetic Analysis of Peptide-Modified Nanoparticles with Engineered Physicochemical Properties in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *AAPS J*. 2021 Aug 16;23(5):100.
330. Ling G, Zhang P, Zhang W, Sun J, Meng X, Qin Y, et al. Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition. *Journal of Controlled Release*. 2010 Dec;148(2):241–8.
331. Zhang J, Wang L, Fai Chan H, Xie W, Chen S, He C, et al. Co-delivery of paclitaxel and tetrandrine via iRGD peptide conjugated lipid-polymer hybrid nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer cells. *Sci Rep*. 2017 May 4;7(1):46057.
332. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee JW, Langer R, et al. PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(8):1627–34.
333. Heredia NS, Vizuete K, Flores-Calero M, Pazmiño V. K, Pilaquinga F, Kumar B, et al. Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid). Annamalai PK, editor. *PLoS ONE*. 2022 Mar 10;17(3):e0264825.

334. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006 Feb;309(1–2):44–50.
335. Costa P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001 Jun;220(1–2):77–83.
336. Bugatti K, Andreucci E, Monaco N, Battistini L, Peppicelli S, Ruzzolini J, et al. Nintedanib-Containing Dual Conjugates Targeting $\alpha_v\beta_6$ Integrin and Tyrosine Kinase Receptors as Potential Antifibrotic Agents. *ACS Omega*. 2022 May 31;7(21):17658–69.
337. Berthelot JM, Le Goff B, Maugars Y. Side effects of corticosteroid injections: What's new? *Joint Bone Spine*. 2013 Jul;80(4):363–7.
338. Lorincz B, Jury EC, Vrablik M, Ramanathan M, Uher T. The role of cholesterol metabolism in multiple sclerosis: From molecular pathophysiology to radiological and clinical disease activity. *Autoimmunity Reviews*. 2022 Jun;21(6):103088.
339. Valdivia AO, Agarwal PK, Bhattacharya SK. Myelin Basic Protein Phospholipid Complexation Likely Competes with Deimination in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. *ACS Omega*. 2020 Jun 30;5(25):15454–67.
340. Fransson J, Gómez-Conde AI, Romero-Imbroda J, Fernández O, Leyva L, de Fonseca FR, et al. Activation of Macrophages by Lysophosphatidic Acid through the Lysophosphatidic Acid Receptor 1 as a Novel Mechanism in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 2021 Feb;58(2):470–82.
341. Schmitz K, Brunkhorst R, de Bruin N, Mayer CA, Häussler A, Ferreiros N, et al. Dysregulation of lysophosphatidic acids in multiple sclerosis and autoimmune encephalomyelitis. *acta neuropathol commun*. 2017 Dec;5(1):42.
342. Tourbah A, Lebrun-Frenay C, Edan G, Clanet M, Papeix C, Vukusic S, et al. MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Mult Scler*. 2016 Nov;22(13):1719–31.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Kararı

Rumelifeneri Yolu Sanyer 34450 İstanbul T: 0212 338 10 00 F: 0212 338 12 05 www.ku.edu.tr



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi:	29.04.2022
Protokol No:	2022.HADYEK.013
Sorumlu Araştırmacı:	Yasemin Gürsoy Özdemir
Araştırma Başlığı:	Nintedanib İçeren Hedeflendirilmiş Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Tasarlanması ve Multiple Skleroz Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi
Başlangıç tarihi:	29.04.2022
Hayvan türü ve sayıları:	Fare (Balb/c): 150 adet

Koç Üniversitesi Etik Kurulu'na değerlendirilmek üzere başvuruda bulunduğunuz yukarıda künyesi yazılı projenizin başvuru dosyası ve ilgili belgeleri, Üniversitemiz "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu" tarafından araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir.

Üniversite Senatosunun 5 Şubat 2016 tarih ve 2016/2 sayılı oturumunda kabul edilen "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) yönergesi" uyarınca yapılan inceleme sonucunda çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir. Araştırmaya yukarıda verilen başlangıç tarihi itibarıyla başlayabilirsiniz.

Notlar:

- Araştırma başlangıç tarihinin gecikmesi durumunda Etik Kurul'a başvurularak tarihlerin değiştirilmesi gereklidir.
- Etik Kurul incelemesi ve onayı olmadan bu çalışmada kullanılan prosedürler, formlar ya da protokollerde herhangi bir değişiklik yapılamaz.

Saygılarımla,



Prof. Dr. Hakan S. Orer
Başkan

Ek 2. Deneş Hayvanları Kullanım Sertifikası

564



T.C. Millî Eğitim Bakanlığı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Hayvan Deneyleri
Merkezi Etik
Kurulu

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın NİHAT KURT

04.06.2018 - 12.06.2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen “Deneş Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.



Prof. Dr. SEMA ÇALIŞ
HADYEK BAŞKANI





Prof. Dr. Haluk ÖZEN
Rektör



Ek 3. Yayın Bilgisi

epats  TÜRK PATENT VE MARKA KURUMU
Elektronik Başvuru Sistemi

PATENT BAŞVURUSU

TARİFNAME

Hibrit Nanopartikül Formülasyonları

Buluşun İlgili Olduğu Alan

Mevcut buluş, hibrit nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ve bu nanopartiküllerin tip I kolajene spesifik peptit ile konjuge edilerek aktif hedeflendirilmiş hibrit formülasyonlarının geliştirilmesi ile ilgilidir.

Buluşla ilgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

Multiple skleroz (MS), genellikle ilk kez 20-40 yaşları arasında genç erişkinlerde görülen kronik nörolojik bir hastalıktır. Merkezi sinir sistemindeki (MSS) inflamasyon, MSS'de demiyelinizasyon ve nörodejenerasyon ataklarına yol açmaktadır. İlk basamak tedavisinde kullanılan beta interferon (IFN β) ve glatiramer asetat (GA) yalnızca kısmi etkinlik göstermektedir. Avrupa Birliği'nde tedavisi için onaylanan mevcut ilaçlar arasında; hastalık modifiye edici tedaviler (HMET), IFN β , GA, teriflunomide, dimetil fumarate (DMF), fingolimod, natalizumab ve alemtuzumab yer almaktadır.

Tek bir model MS'nin tüm yönlerini tam olarak özetleyemese de hayvan modelleri, hastalığın indüksiyonunu ve patogenezi anlamada ve hastalığın ilerlemesini sınırlayan ve nihayetinde insan hastalığı için etkili tedavilere yol gösteren terapötik stratejiler geliştirmede esastır. Birkaç farklı MS modeli mevcuttur ancak şimdiye kadar en iyi anlaşılabilir ve en yaygın olarak kullanılan, deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) kemirgen modelidir. MS için tüm terapötik stratejiler DOE'de geliştirilmemiş olsa da mevcut ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı immünomodülatör ilaçların tümü, DOE tedavisinde bir dereceye kadar etkilidir; bu MS için potansiyel tedavi geliştirmeye çalışırken son derece yararlı bir model olduğunun güçlü bir göstergesidir (Robinson vd., 2014).

US2014023700A1 patent dokümanı keratinositler üzerindeki bir kolajen bağlayıcı integrin reseptörüne bağlanarak ilaçları keratinositlere hedeflemek için bir siklik peptit ve bunun ilaç taşıyıcı partiküllerle konjugatları ile ilgilidir.

CN108273070A patent dokümanı hücre terapisi ve immünoterapi ve hastalıklar alanına aittir ve özellikle bir hücre ve ilacı hedefleyen transfer yapısı ve ayrıca bunların bir hazırlama yöntemi ve uygulaması ile ilgilidir.

Multipl Skleroz Tedavisinde Nanotaşıyıcı Sistemlerin Uygulanması

Nihat Kurt^{1,2}, Sibel Bozdağ Pehlivan^{1*}, Levent Öner¹

1 Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

2 Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, Türkiye

Özet

Nörodegeneratif hastalıklar arasında kompleks bir immünopatolojiye sahip olan Multipl Skleroz (MS)'un tedavisinde birçok faktörün dikkate alınması gerekmektedir. Bu çok faktörlü hastalıktaki klinik bulgular miyelin kaybının ilerlemesine, enflamasyonun evresine, aksonların durumuna ve oligodendrosit öncü hücrelerinin aktivitesine bağlıdır. Uzun yıllardır süregelen yoğun çalışmalara rağmen hastalığın çok faktörlü oluşu ve kan-beyin engeli (KBE) gibi ilaçların beyne ulaşmasını engelleyen yapılar nedeniyle henüz kesin bir tedavi bulunamamıştır. Bu durum, bilim insanlarını yeni yaklaşımlar aramaya yönlendirmiştir. Yapılan araştırmalarda genellikle nanotaşıyıcı olarak adlandırılan nano boyuttaki farmasötik taşıyıcıların MS'nin yalnızca teşhisinde değil aynı zamanda tedavisinde de rol üstlenebileceğini göstermiştir. MS'nin tedavisi için klinik öncesi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla başarılı olduğu gösterilen bu sistemlerin klinik uygulamaya geçiş yapabilmesi için çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu derlemede MS tedavisine yönelik nanotaşıyıcılar konusunda literatürde yer alan en güncel gelişmeler değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Multipl Skleroz, kan-beyin engeli, ilaç taşıyıcı sistem, nanotaşıyıcı, nanopartikül

International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials
 DESIGN AND EVALUATION OF THE NANOPARTICLES CONTAINING KETOROLAC
 TROMETHAMINE IN GLIOBLASTOMA TREATMENT

Tuğba Çopur1‡, Nihat Kurt1‡, Esra Pezik2, Doruk Yalçın3, Sibel Bozdağ Pehlivan1,
 Levent Öner1

1 Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical
 Technology, 06100, Ankara, Turkey

2 Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Pharmacy, Department of
 Pharmaceutical Technology, Erzincan, Turkey

3 TED College, Ankara, Turkey

‡Authors contributed equally to this manuscript.

*Corresponding author: Sibel Bozdağ Pehlivan
 Tel. +90 312 305 12 41 Fax. +90 312 311 47 77
 E-mail address:

Mail address: Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical
 Technology, 06100, Altındag, Ankara, Turkey.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	233735136
Full Title:	<p>DESIGN AND EVALUATION OF THE NANOPARTICLES CONTAINING KETOROLAC TROMETHAMINE IN GLIOBLASTOMA TREATMENT</p> <p>Tuğba Çopur1‡, Nihat Kurt1‡, Esra Pezik2, Doruk Yalçın3, Sibel Bozdağ Pehlivan1, Levent Öner1</p> <p>1 Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100, Ankara, Turkey</p> <p>2 Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Erzincan, Turkey</p> <p>3 TED College, Ankara, Turkey</p> <p>‡Authors contributed equally to this manuscript.</p> <p>*Corresponding author: Sibel Bozdağ Pehlivan Tel. +90 312 305 12 41 Fax. +90 312 311 47 77 E-mail address: Mail address: Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Technology, 06100, Altındag, Ankara, Turkey.</p>
Article Type:	Original Article
Keywords:	Nanoparticle; cryoprotectant; anti-inflammatory drug; ketorolac tromethamine; RG2 cell line; glioblastoma
Order of Authors:	<p>Tuğba Çopur, PhD</p> <p>Nihat Kurt</p> <p>Esra Pezik, PhD</p> <p>Doruk Yalçın</p> <p>Sibel Bozdağ Pehlivan, Ph.D.</p> <p>Levent Öner, PhD</p>
Corresponding Author:	Sibel Bozdağ Pehlivan, Ph.D.

1 **DESIGN AND EVALUATION OF THE PLGA NANOPARTICLES CONTAINING**
 2 **KETOROLAC TROMETHAMINE IN GLIOBLASTOMA TREATMENT**

3 Tuğba Çopur^a‡, Nihat Kurt^a‡, Esra Pezik^b, Doruk Yalçın^c, *Sibel Bozdağ Pehlivan^a, Levent Öner^a

4 ^a Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100, Ankara, Turkey

5 ^b Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Erzincan, Turkey

6 ^c TED College, Ankara, Turkey

7 ‡Authors contributed equally to this manuscript.

9 *Corresponding author: Sibel Bozdağ Pehlivan

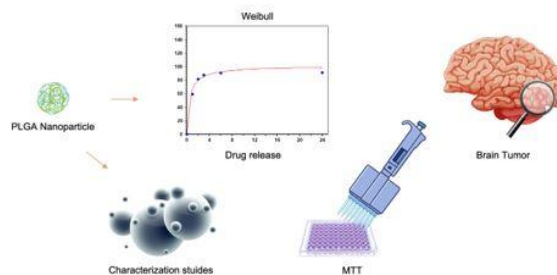
10 Tel. +90 312 305 12 41 Fax. +90 312 311 47 77

11 E-mail address:

12 Mail address: Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Technology, 06100, Altındag,
 13 Ankara, Turkey.

15 **ABSTRACT**

16 This study investigates whether Ketorolac tromethamine (KT) loaded nanoparticles might be an
 17 effective treatment option in glioblastoma. KT-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)
 18 nanoparticles were prepared using water/oil/water (W/O/W) emulsification solvent
 19 evaporation. KT-loaded nanoparticles have a particle size of 155.5 ± 2.08 nm, zeta potential of -
 20 12.9 ± 1.23 mV, polydispersity index of 0.111 ± 0.035 , encapsulation efficiency of 53.46%. A
 21 significant drug portion (>90%) was released in 6 hours and completed within 24 h. When 3%
 22 (w/v) mannitol and trehalose were used as cryoprotectants, nanoparticles were stable
 23 physically. KT-loaded nanoparticles are more effective than drug solutions at lower doses.



24 **Keywords:** PLGA nanoparticle, drug delivery, cryoprotectant, ketorolac tromethamine,
 25 glioblastoma, release kinetics

Ek 4.

Tez Başlığı: Nintedanib İçeren Hedeflendirilmiş Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Tasarlanması ve Multipl Skleroz Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı Soyadı: Nihat Kurt

Toplam Sayfa Sayısı: 137

Nintedanib İçeren Hedeflendirilmiş Hibrit Nanopartikül Formülasyonlarının Tasarlanması ve Multiple Skleroz Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi_NihatKurt_Doktoratez

ORJİNALLİK RAPORU

%10	%10	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
4	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.dovepress.com İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1

Ek-5: Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nihat Kurt
Ödev başlığı: Deneme Nihat
Gönderi Başlığı: Nintedanib İçeren Hedeflendirilmiş Hibrit Nanopartikül For...
Dosya adı: sindeki_Etkinli_inin_De_erlendirilmesi_NihatKurt_Doktoratez....
Dosya boyutu: 4.48M
Sayfa sayısı: 137
Kelime sayısı: 29,576
Karakter sayısı: 197,657
Gönderim Tarihi: 18-Oca-2024 05:32ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2249987058



9. ÖZGEÇMİŞ