

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARA YÖNELİK MEMANTİN
YÜKLÜ NANOSİSTEMLERİN TASARLANMASI,
OPTİMİZASYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ecz. Gizem TEZEL

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARA YÖNELİK MEMANTİN
YÜKLÜ NANOSİSTEMLERİN TASARLANMASI,
OPTİMİZASYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ecz. Gizem TEZEL

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hakan EROĞLU

ANKARA

2024

**NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARA YÖNELİK MEMANTİN YÜKLÜ
NANOSİSTEMLERİN TASARLANMASI, OPTİMİZASYONU VE
DEĞERLENDİRİLMESİ Gizem TEZEL**

Danışman: Prof. Dr. Hakan EROĞLU

İkinci Danışman: -

Bu tez çalışması 06.05.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Selma ŞAHİN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık

Fakültesi

Üye:

Prof. Dr. Kevser Özgen ÖZER

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye:

Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye:

Prof. Dr. Güneş ESENDAGLI

Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü

Üye:

Doç. Dr. Tuğba GÜLSÜN İNAL

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık

Fakültesi

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

1.5 Mayıs 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) 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 Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

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

15/05/2024

Gizem TEZEL

i

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

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** 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) 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 işbirliği 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 **danışmanın** 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. Hakan EROĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Ecz. Gizem TEZEL

TEŞEKKÜR

Eczacılık fakültesi 5.sınıfta bitirme projesinde yollarımızın keşiştiği devamında da doktora eğitimi yolculuğuna başladığımız çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan Eroğlu'na sadece eğitim hayatımda değil beraber yol aldığımız tüm zaman diliminde verdiği tüm destek ve katkılardan dolayı ve benim için zorlu olan bu yolculuğu birçok yönden kolaylaştırdığı için teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca her aşamada bana destek olan Sayın Doç. Dr. Selin Seda Timur'a, hücre kültürü çalışmaları ve in vivo deneyler süresince sayısız toplantıya katılıp bilgi ve tecrübesini paylaşan Sayın Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya, analitik metot geliştirme ve metabolomik analizlerinde tecrübeleriyle yol gösteren Sayın Prof. Dr. Emirhan Nemutlu'ya ve süreçteki tüm deneysel desteği için Sayın Doç. Dr. Tuba Reçber'e, sağladığı tüm imkanlar ve desteği için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Erem Bilensoy'a, ve önceki dönem Anabilim Dalı Başkanımız ayrıca Tez İzleme Komitesi jüri üyesi değerli hocam Sayın Prof. Dr. Levent Öner'e, destek ve katkılarında dolayı Tez İzleme Komitesi jüri üyem Sayın Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin'e, Mayo Klinik'te çalışma fırsatını bana sunan ve tüm tecrübelerini aktaran Sayın Dr. Hakan Ceylan'a, Sayın Prof. Dr. Filiz Kuralay'a

Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi dekanlığına, çalışma arkadaşlarıma, bu yolda her an tam destek arkamda duran Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Sıla Gülbağ Pınar'a,

Nanomotor üretim aşamalarındaki yardımları için Arş. Gör. Elif Öztürk'e, hücre kültürü çalışmalarındaki yardımları için Sıla Ulutürk'e, transfeksiyon ve in vivo deneylerdeki desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can Öztürk'e,

Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki Sayın Hocalarım, değerli arkadaşlarım, idari personel ve teknisyenlerimize, tüm süreçleri beraber yaşadığımız canım arkadaşım Ecz. Nurbanu Demirtürk'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her an yanımda olan, bana tüm desteğini sunan TEZEL ailesine, daima elimden tutan ve yükümü hafifletmeye çalışan sevgili nişanlım Abdüsselam Akın Temel'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına maddi destek sağlayan (1001 proje no:219S811) ve beni 2211-C ve 2214-A bursiyeri olarak da destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yine tez çalışmalarına destek sağlayan (Hızlı destek proje no:20387) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tezel, G., Nörodejeneratif Hastalıklara Yönelik Memantin Yüklü Nanosistemlerin Tasarlanması, Optimizasyonu ve Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Merkezi sinir sistemi nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer Hastalığı (AH), hem görülme sıklığı hem de sınırlayıcı faktörlere bağlı olarak henüz etkin tedavi edilememesi nedeniyle, tıbbi ihtiyaç oranı yüksek bir hastalık olarak ön plana çıkmaktadır.

Tez çalışmaları kapsamında, AH'nın tedavisine yönelik olarak karşılanmamış tıbbi ihtiyacı gidermek amacı ile ilk defa memantin yüklü nanomotor sistemleri tasarlanmıştır. Bu kapsamda memantin içeren nanomotor formülasyonlarının tasarlanması, bu formülasyonların etkinliklerinin nöronal kaynaklı hücre kültürü modellerinde *in vitro* olarak incelenmesi, AH'nda karşılaşılabilen metabolik değişiklikler üzerinde bu nanosistemlerin *in vitro* hücre kültürü modellerinde incelenmesi ve dökümanite edilmesi ile son olarak bu nanosistemlerin uygun teknikler kullanılarak Kan Beyin Engeli ve beyin dokusundaki birikimlerinin değerlendirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, kontrol edilebilir manyetik hareketli memantin yüklü nanomotorlar başarılı bir şekilde formüle edilmiştir. *In vitro* etkinlik çalışmaları, geliştirilen formülasyonun TrkB reseptör aktivitesini artırdığını ve BACE1 enzim aktivitesinde herhangi bir sitotoksik etki olmaksızın azalma sağladığını göstermiştir. Biyodağılım çalışmalarında, nanomotor formülasyonlarının kontrol grubuna göre beyinde daha fazla tutulumuna sahip olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Bu çalışmalar temel alınarak, tasarlanan memantin yüklü nanomotorların Alzheimer Hastalığı tedavisinde ilaç taşıma için umut vadeden yeni bir yaklaşım olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Demans, Alzheimer Hastalığı, Mikro/Nanomotor, Memantin

Söz konusu tez TÜBİTAK tarafından 219S811 numaralı 1001 projesi ve 2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Tezel, G., Design, Optimization and Evaluation of Nanosystems Loaded with Memantine for Neurodegenerative Diseases, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. Alzheimer's Disease (AD), a neurodegenerative disorder of the central nervous system, is highlighted as a disease with a high medical need due to both its frequency and the inability to effectively treat it yet, largely due to limiting factors.

Within the scope of thesis studies, in an effort to address the unmet medical need in the treatment of AD, memantine-loaded nanomotor systems have been designed for the first time. Within this framework, the design of nanomotor formulations containing memantine, the investigation of the effectiveness of these formulations in neuronal cell culture models in vitro, the examination and documentation of these nanosystems on metabolic changes encountered in AD in vitro cell culture models, and finally the evaluation of the accumulation of these nanosystems in the Blood-Brain Barrier (BBB) and brain tissue using appropriate techniques have been conducted, and the results have been evaluated.

As a result, memantine loaded nanomotors were formulated successfully with a controllable magnetic movement. In vitro efficacy studies showed that the developed formulation increased TrkB receptor activity, leading to a decrease in BACE1 enzyme activity without any cytotoxic effect. In biodegradation studies, it was determined that nanomotor formulations exhibited increased retention in the brain with respect to the control group ($p < 0.05$).

Based on these studies, it has been concluded that designed memantine loaded nanomotors could be a promising novel approach for drug delivery in the treatment of Alzheimer's Disease.

Keywords: Dementia, Alzheimer's Disease, Memantine, Nanomotor, Cell Culture

The thesis in question was supported by TÜBİTAK (1001 project) with project number 219S811 and the 2211-C Doctoral Scholarship Program.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Merkezi Sinir Sistemi	3
2.2. Nörodejeneratif Hastalıklar	4
2.2.1. Demans	4
2.3. Alzheimer Hastalığı	6
2.4. Beyne İlaç Hedeflendirme ve Kan Beyin Engeli	21
2.5. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler	25
2.6. Mikro/nanomotorlar	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Araç ve Gereçler	37
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler	38
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	38
3.2. Yöntem	40
3.2.1 LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu	40
3.2.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması	46
3.2.3 Nanomotor Formülasyonlarının Karakterizasyonu	50
3.2.4 Memantin HCl Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	53
3.2.5. Polisorbata-80 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	55
3.2.6. CRANAD-2 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	55
3.2.7. Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi	55

3.2.8. İn Vitro Salım Çalışmaları	56
3.2.9. Nanomotor Stabilite Çalışmaları	57
3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	57
3.2.11. İn-vitro Hücre Kültürü Modelinde Metabolomik Analizlerin Yapılması	63
3.2.12. İn Vivo Çalışmalar	65
3.2.13. İstatistiksel Değerlendirme	65
4. BULGULAR	67
4.1. Memantin'in Miktar Tayini Yapılmasına Yönelik LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyonu	67
4.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	75
4.2.1. Partikül Büyüklüğü, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli	79
4.2.2. Morfolojik Özellikler	81
4.2.3. DSC Analizleri	87
4.2.4. Enerji dağılımı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizleri	87
4.2.5. Memantin Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	88
4.2.6. Enkapsülasyon Etkinliği	91
4.3. Polisorbat-80 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	94
4.4. CRANAD-2 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	96
4.5. Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi	97
4.6. İn Vitro Salım Çalışmaları	100
4.7. Nanomotor Stabilite Çalışmaları	102
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	104
4.8.1. Nanomotorların Hücre Canlılığına Zarar Vermediğinin Doğrulanması	104
4.8.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hücre İçerisine Alım Analizleri	108
4.8.3. Tirozin reseptör kinaz B (TrkB) Enzimini Yüksek Düzeyde İfade Eden Hücrelerin Oluşturulması	109
4.8.4. Nanomotor Formülasyonuna Yüklenen Memantin TrkB'yi Uyararak BACE1 Enzim Aktivitesini Düşürme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	110
4.8.5. Nanomotor Formülasyonu ile Taşınan Etken Maddenin Kan-Beyin Engeli Varlığında TrkB ve Beta Sekretaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	114
4.9. İn-vitro Hücre Kültürü Modelinde Metabolomik Analizlerin Yapılması	117
4.10. İn Vivo Çalışmalar	122
5. TARTIŞMA	124
5.1. Memantin' in Miktar Tayini Yapılmasına Yönelik LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyonu	124

5.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	127
5.2.1. Partikül Büyüklüğü, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli	130
5.2.2. Morfolojik Özellikler	131
5.2.3. DSC Analizleri	131
5.2.4. Enerji dağılımı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizleri	131
5.2.5. Memantin Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	132
5.2.6. Enkapsülasyon Etkinliği	134
5.3. Polisorbat-80 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	136
5.4. CRANAD-2 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması	137
5.5 Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi	138
5.6. İn Vitro Salım Çalışmaları	140
5.7. Nanomotor Stabilite Çalışmaları	141
5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	143
5.8.1. Nanomotorların Hücre Canlılığına Zarar Vermediğinin Doğrulanması	146
5.8.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hücre İçerisine Alım Analizleri	147
5.8.3. Tirozin reseptör kinaz B (TrkB) Enzimini Yüksek Düzeyde İfade Eden Hücrelerin Oluşturulması	150
5.8.4. Nanomotor Formülasyonuna Yüklenen Memantin TrkB'yi Uyararak BACE1 Enzim Aktivitesini Düşürme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	152
5.8.5. Nanomotor Formülasyonu ile Taşınan Etken Maddenin Kan-Beyin Engeli Varlığında TrkB ve Beta Sekretaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	153
5.9. İn-vitro Hücre Kültürü Modelinde Metabolomik Analizlerin Yapılması	156
5.10. İn Vivo Çalışmalar	158
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	160
7. KAYNAKLAR	163
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Dijital Makbuz ve Orjinallik Raporu	
EK-3: Tez Kapsamında Üretilen Yayın 1	
EK-4: Tez Kapsamında Üretilen Yayın 2	
EK-5: Tez Kapsamında Üretilen Yayın 3	
EK-6: Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Patent Başvurusu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
A β	Amiloid Beta
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ag	Gümüş
AH	Alzheimer Hastalığı
APO-E	Apo lipoprotein E
APP	Amiloid Öncü (Prekürsör) Protein
ARIA	Amiloid İlişkili Görüntü Anormallığı
Au	Altın
BACE1	Beta amiloid öncü protein kesici enzim 1
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CSF	Serebrospinal Sıvı
Cu	Bakır
CV	Dönüşümlü Voltametri
DLB	Lewy cisimcikli Demans
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodimit
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
FA	Formik Asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Fe	Demir
FTD	Fronto-temporal Demans
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
GC	Gaz Kromatografisi
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
Ir	İridyum
KBE	Kan Beyin Engeli
LbL	Kat Kat Ekleme (Layer by Layer)

LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LOD	Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection)
LLOQ	En Düşük Tayin sınırı (Lower Limit of Quantification)
mab	Monoklonal antikor
MAP	Mikrotübül İlişkili Protein
MD	Karışık Demans
MemHCl	Memantin Hidroklorür
mmHg	Milimetre civa
MNM	Mikro/Nano motorlar
MRM	Pozitif İyonizasyonda Çoklu Reaksiyon İzleme
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	Kütle Spektroskopisi
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NHS	N-hidroksisüksinimit
Ni	Nikel
NMDA	N-metil-D-aspartat
PAH	Poli-allilamin hidroklorür
PBCA	Poli-bütül-siyanoakrilat
PCA	Principal Component Analysis- Temel Bileşenler Analizi
PCL	Polikaprolakton
PD	Parkinson Demansı
PEG	Polietilen Glikol
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PGE	Kalem Grafit Elektrotlar
PLA	Poli-laktik asit
PLGA	Poli(laktit-ko-glikolik) Asit
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis- En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi
PNIPAM	Poli N-izopropil akrilamid
PSS	Polistiren Sülfonat

Pt	Platin
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TBH	Travmatik Beyin Hasarı
TrkB	Tirozin kinaz B
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	Ultraviyole-Kızılötesi
V	Volt
VaD	Vasküler Demans
VIP	Variable importance in projection-Yansımadaki Değişken Önemi
YÖK	Yükseköğretim Kurulu
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Alzheimer Hastalığında beyinde gözlenen değişimlerin sağlıklı beyin ile karşılaştırmalı şematik gösterimi ve gerçek beyin kesitleri A)Sağlıklı insan beyin kesiti B) AH beyin kesiti.	6
2.2. Alzheimer Hastalığında beyinde gözlenen atrofi ve dereceleri.	7
2.3. A) Memantin ve B) Memantin HCl Moleküler Yapısı.	17
2.4. Kan Beyin Engeli ve Bileşenleri Şematik Gösterimi.	22
2.5. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler.	27
2.6. A) Katalitik nanoçubuk motorun ilaç yüklü PLGA partikülleri alması, taşınması ve salımı (B) İlaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiş Biohibrid sperm hücre mikromotorun şematik gösterimi, (C) Su ile indüklenen baloncuk ile hareket eden mikromotor sistemin şematik gösterimi, (D) Manyetik olarak yönlendirilen ve ultrason temelli harekete sahip nanomotor gösterimi.	29
2.7. Farklı yöntemlerle hazırlanan mikro/nanomotor örnekleri.	36
3.1. Alümina membranları Ag ile kaplamak için kullanılan Püskürtme Cihazı (Sputter) Bileşenleri	46
3.2. Alümina membranları Ag kaplama işlemi esnasında oluşan plazma ve işlem görüntüsü	47
3.3. Elektrokimyasal biriktirme işlemi ile nanomotor sentezinin şematik gösterimi.	48
3.4. Deneysel sürece ait görseller.	50
3.5. Salım çalışması devam ederken alınmış sistem görüntüsü.	56
3.6. Çift kompartmanlı hücre kültürü modelinin gösterimi.	63
4.1. Memantin'in MS/MS parçalanma modeli.	68
4.2. Optimum kromatografik koşullarda A) Memantin (1.00 µg/mL) ve B) İç standart (0.50 µg/mL) kromatogramları.	69
4.3. Memantin HCl kalibrasyon doğrusu.	70

4.4.	A)Kaplanmamış alümina membranlar B) Ag kaplanmış alümina membranlar	75
4.5.	CV yöntemi ile polimerik tabakanın oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğriler. A- 3 döngü B-10 döngü C-20 döngü	76
4.6.	i-t yöntemi ile polimerik tabakanın oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğri.	77
4.7.	Cu kurban tabaka oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğri.	77
4.8.	Au tabaka oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğriler.	78
4.9.	Ni tabaka oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğriler.	78
4.10.	i-t yöntemi ile hazırlanan nanomotorların optik mikroskop görüntüsü.	81
4.11.	İyi yıkanmamış bir nanomatora ait optik mikroskop görüntüsü.	82
4.12.	Ag kaplı elektrodun homojen bir yayılım (dağılım) göstermemesi durumunda oluşan yapılara ait optik mikroskop görüntüsü.	82
4.13.	Yıkama aşamalarında tam olarak membrandan ayrılmamış olan polimerik yapılara ait optik mikroskop görüntüsü	83
4.14.	Yıkama aşamalarından sonra membrandan ayrılmış olan tel şeklindeki polimerik yapılara ait optik mikroskop görüntüsü	83
4.15.	Polimerik tabaka 20 döngüde dönüşümlü voltametri ile hazırlandığında elde edilen nanomotora ait optik mikroskop görüntüsü.	84
4.16.	Polimerik tabaka temelli tel (çubuk) şeklindeki motorların optik mikroskop görüntüsü.	85
4.17.	Polimerik tabaka temelli tel (çubuk) şeklindeki motorların SEM görüntüleri	86
4.18.	Polimerik tabaka temelli tel (çubuk) şeklindeki motorların bir aradaki SEM görüntüleri.	86
4.19.	Boş nanomotor (lacivert) ve dolu nanomotor (yeşil) karşılaştırmalı DSC pikleri	87
4.20.	Nanomotora ait EDX spektrumu	88
4.21.	Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği	89

	dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler)	
4.22.	Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler)	90
4.23.	Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler)	90
4.24.	Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler)	91
4.25.	Polisorbat-80 kaplama sonrası motor modifiye elektroda ait yükseltgenme pik akımı cevapları (Ort. \pm SH, n=3).	94
4.26.	Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler)	95
4.27.	CRANAD-2'nin donör-alıcı-donör yapısının şematik gösterimi	96
4.28.	Mavi: Çıplak PGE, Kırmızı: 30 dk polisorbat-80 kaplı ve devamında CRANAD-2 ile etkileşen motor modifiye PGE, Yeşil: 60 dk polisorbat-80 kaplı ve devamında CRANAD-2 ile etkileşen motor modifiye PGE.	97
4.29.	Au-Ni-PLL nanomotorlarla kare şekil çizimi	99
4.30.	Au-Ni-PLL nanomotorlarla G harfi çizimi	99
4.31.	Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotora ait 72 saatlik % kümülatif salım grafiği (Ort. \pm SH, n=3).	100
4.32.	Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotora ait 24 saatlik % kümülatif salım grafiği (Ort. \pm SH, n=3).	101
4.33.	25°C \pm 2°C stabilite numunelerine ait elektrokimyasal eğriler	102
4.34.	5°C \pm 3°C stabilite numunelerine ait elektrokimyasal eğriler	102
4.35.	5°C \pm 3°C stabilite numunelerine ait elektrokimyasal eğriler	103
4.36.	HEK293T Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve memantin HCI çözeltisi ile 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri	105
4.37.	HEK293T Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve memantin HCI çözeltisi ile 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri	105
4.38.	SH-SY5Y Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor, Au-	106

- Ni-PLL motor ve memantin HCl çözeltisi ile 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri
- 4.39.** SH-SY5Y Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve memantin HCl çözeltisi ile 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri **106**
- 4.40.** hCMEC-D3 Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve memantin HCl çözeltisi ile 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri **107**
- 4.41.** hCMEC-D3 Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve memantin HCl çözeltisi ile 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri **107**
- 4.42.** Nil kırmızısı yüklü nanomotor formülasyonlarının SH-SY5Y hücreleri tarafından hücre içine alımlarının akış sitometri yöntemiyle değerlendirilmesi (n=2). **108**
- 4.43.** Nil kırmızısı yüklü nanomotor formülasyonlarının hCMEC-D3 hücreleri tarafından hücre içine alımlarının akış sitometri yöntemiyle değerlendirilmesi (n=2). **109**
- 4.44.** TrkB transfekte ve non-transfekte HEK293T hücrelerinde BACE1 enzim aktivite karşılaştırılması (Sonuçlar blank kontrol verilerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0.05$; olarak sunulmuştur.) **110**
- 4.45.** HEK293T hücre hattında TrkB antikor Western Blot analiz sonuçları **111**
- 4.46.** Transfekte HEK293T hücre hattında BACE1 enzim aktivitesinde değişikliği gösteren grafik (Sonuçlar transfekte HEK293T kontrol grubuna (uygulama yapılmamış hücreler) göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ olarak sunulmuştur.) **112**
- 4.47.** SHSY-5Y hücre hattında TrkB antikor Western Blot analiz sonuçları **113**
- 4.48.** SHSY-5Y hücre hattında BACE1 enzim aktivitesinde değişikliği gösteren grafik (Sonuçlar kontrol SHSY-5Y **114**

- hücrelerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ olarak sunulmuştur.)
- 4.49.** İn vitro KBE modeli oluşturma esnasında ölçülen hCMEC-D3 hücreleri TEER değerleri **115**
- 4.50.** in-vitro KBE modelinde alt kompartmandan alınan SHSY-5Y hücre hattında BACE1 enzim aktivitesinde değişikliği gösteren grafik (Sonuçlar kontrol SHSY-5Y hücrelerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ olarak sunulmuştur.) **116**
- 4.51.** Au-Ni-PLL nanomotor, Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor ve memantin çözeltisi uygulanmış hücre örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA (Principal Component Analysis) ve PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) skor grafikleri **119**
- 4.52.** Grupların metabolik profilinin karşılaştırılması. A) Au-Ni-PLL nanomotor, Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor ve memantin çözelti gruplarının ayrılmasında etkili olan metabolitlerin VIP (Variable importance in projection) grafiği (VIP de farklılaşmadaki en etkili ilk 15 metabolit alınmıştır.), B) Au-Ni-PLL nanomotor, Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor ve memantin gruplarındaki metabolitlerin ısı haritası (Heatmap) grafiği (Heat mapte farklılaşmadaki en etkili ilk 50 metabolit alınmıştır.) **119**
- 4.53.** Au-Ni-PLL nanomotor ile Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor uygulanmış hücre örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA (Principal Component Analysis) ve PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) skor grafikleri **120**
- 4.54.** Grupların metabolik profilinin karşılaştırılması. A) Au-Ni-PLL ile Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor gruplarının ayrılmasında etkili olan metabolitlerin VIP (Variable importance in projection) grafiği (VIP de farklılaşmadaki en etkili ilk 15 metabolit alınmıştır.), B) Au-Ni-PLL ile Au-Ni-PLL/MemHCI **120**

- nanomotor gruplarındaki metabolitlerin ısı haritası (Heatmap) grafiği (Heat mapte farklılaşmadaki en etkili ilk 50 metabolit alınmıştır.)
- 4.55.** Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor ile memantin çözeltisi uygulanmış hücre örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA (Principal Component Analysis) ve PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) skor grafikleri **121**
- 4.56.** Grupların metabolik profilinin karşılaştırılması. A) Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor ile memantin çözeltisi gruplarının ayrılmasında etkili olan metabolitlerin VIP (Variable importance in projection) grafiği (VIP de farklılaşmadaki en etkili ilk 15 metabolit alınmıştır.), B) Au-Ni-PLL/MemHCI ile memantin çözeltisi gruplarındaki metabolitlerin ısı haritası (Heatmap) grafiği (Heat mapte farklılaşmadaki en etkili ilk 50 metabolit alınmıştır.) **121**
- 4.57.** Nil kırmızısı yüklü nanomotorların farelere uygulanması sonucunda elde edilen farklı organlara ait 30 dk ve 2 saat post-enjeksiyon biyodağılım çalışması sonuçları (AC: Akciğer KC: Karaciğer) **122**
- 4.58.** Nil kırmızısı yüklü nanomotorların farelere uygulanması sonucunda elde edilen farklı organlara 30 dk ve 2 saat post-enjeksiyon ait biyodağılım çalışması sonuçları (AC: Akciğer KC: Karaciğer) (İstatistiksel farklılıklar sırasıyla; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ olarak belirtilmiştir.) **123**

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. AH tedavisinde FDA onaylı ilaçlar, onay yılları ve etki özellikleri.	20
2.2. KBE'nin hücresel elemanları ve görevleri.	23
2.3. AH tedavisine yönelik geliştirilmiş farklı nanosistem örnekleri.	28
2.4. MNM'ların hareket temelli sınıflandırması ve özellikleri.	31
3.1. Boş nanomotor sentezinde kullanılan parametreler.	49
3.2. Malvern Zetasizer'da gerçekleştirilen çalışma koşulları.	51
3.3. Nanomotor formülasyonları ve değiştirilen optimizasyon parametreleri.	54
3.4. Stabilite çalışmaları için kullanılan farklı saklama koşulları.	57
3.5. Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen nanomotorlar ve bu nanomotorlara ait formülasyon kodları.	66
4.1. Metot validasyonu için seçilen optimum kromatografik koşullar.	67
4.2. Memantin için sistem uygunluk parametreleri.	68
4.3. Memantin HCl için doğruluk verileri.	70
4.4. Memantin'in gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinliği.	72
4.5. Geliştirilen yöntemin tutarlılık verileri.	72
4.6. Memantin çözeltisinin 72 saatlik kararlılık verileri.	73
4.7. Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ilişkin sağlamlık sonuçları.	74
4.8. Nanomotor formülasyonlarına ait zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersite indeksi sonuçları.	80
4.9. Nanomotor formülasyonları ve bu formülasyonlara ait % etkin madde inkübasyon değerleri.	92
4.10. Nanomotorların Polisorbat 80 ile inkübasyon sürelerine karşılık zeta potansiyelleri.	96
4.11. Au-Ni-PLL ve Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorların 270 mT manyetik alan altında hız değerleri	98
4.12. SH-SY5Y hücre hattında Au-Ni-PLL, Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorlar ve memantin çözeltisi uygulaması sonucu TrkB aktivasyonunu gösteren analiz sonuçları (n=3)	101

- 4.13.** in-vitro KBE modeli alt kompartmandan toplanan besiyerinde memantinin LC-MS/MS ile tayini sonuçları ve yüzdeleri **117**

1. GİRİŞ

Sağlıklı bir insanın beyinde yaklaşık 100 milyar nöron bulunmaktadır. Her bir nöron birbiriyle sinaps adı verilen bağlantılar kurmakta ve bu bağlantılar nörotransmitter adı verilen kimyasal maddelerin salınması ile bilgi akışını sağlamaktadır. Beynimizde yaklaşık 100 trilyon sinaps bulunmaktadır. Bu sinapslar sinyallerin beyinde hızlı akışını sağlamaktadır. İletilen bu sinyaller ise beyin normal fonksiyonlarının yürümesinin yanı sıra hafıza, düşünce, duygu, his, hareket ve yeteneklerin hücresel temelini oluşturmaktadır (1).

Beta Amiloid protein fragmanlarının nöronların dışında birikerek plaklar oluşturması ve yine beyinde bulunan Tau proteinlerinin anormal bir forma dönüşerek nöronların içerisinde yumaklar halinde birikmesi beyinde iki büyük değişiklik oluşturmaktadır. Bu değişiklikleri nörodejenerasyon olarak adlandırılan nöron hasarı ve yıkımı takip etmektedir ve bu değişiklikler Alzheimer Hastalığı (AH) ile ilişkilendirilmektedir (1).

Demans, genel olarak, öğrenme ve hafıza, konuşma, yürütme işlevi, algısal motor beceriler ve sosyal bilişteki bozulmalar gibi semptomları içeren bilişsel gerileme ile karakterize edilen bir hastalıktır. Demansın birçok alt tipi bulunmakla beraber AH da bunlardan bir tanesidir ve tüm demans vakalarının % 60-80'ini oluşturmaktadır(2).

Alzheimer Hastalığı merkezi sinir sisteminde görülen ve demansın alt tipi olan nörodejeneratif bir hastalıktır. İlk olarak Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır(1).

AH'nın günümüzdeki görülme sıklığı ise özellikle son 10 yılda dramatik derecede artmıştır. 2009-2019 yılları arasında inme ve kalp damar yolu hastalıklarına bağlı ölümlerde azalma görülürken AH'na bağlı ölümlerde %145'ten fazla artış gözlenmiştir (3). Önümüzdeki 20 yıl içerisinde de AH hastalarının sayısının iki katına çıkacağı öngörülmektedir. AH'nın bu yüksek prevalansı hasta tedavi ve bakım maliyetinde artışı da beraberinde getirmektedir.

Çok sayıdaki AH vakasında ilk belirtiler yakın hafıza ve anıların kaybolması ile başlamaktadır. Hastalığın ilerleyişinde görsel ve kavramsal bozulma problemleri oluşmakta, dikkat eksikliği, kognitif disfonksiyonlar ile birlikte günlük hayatın idamesi ile ilişkili yürütücü fonksiyon kaybı da görülmektedir. Son otuz yılda çok

sayıda ilaç etkin maddesi AH tedavisi için araştırılmış olsa da etiyolojik olarak bu hastalığın tam olarak aydınlatılamamış olması, etkinlik bakımından sadece beş tanesinin otoriteler tarafından tatmin edici etkinlik göstermesine bağlı olarak onaylanmıştır. Bu duruma karşın, onaylanan ilaçlar, etkinliklerini AH'nda artmış kolinesteraz düzeyine bağlı olarak indüklenen kolinerjik bozulmanın inhibisyonu ile göstermektedir ve bu etkilerine bağlı olarak kolinesteraz inhibitörleri olarak adlandırılmaktadır. 2003 yılında FDA tarafından AH'nda kullanım için memantin (NMDA-N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti) onaylanmış ve kullanıma sunulmuştur.

En sık görülen hastalık grupları arasında yer alan kanser ve kardiyovasküler hastalıkları gölgede bırakacak bu tablo karşısında yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla AH'nın patofizyolojisinin altında yatan temel nedenleri aydınlatılması ve bunların etkilerinin azaltılması ile geri dönüşümlerinin sağlanabileceği yeni tedavi yaklaşımları üzerinde çalışılması gerekliliği bulunmaktadır.

Yukarıda kısaca bahsedilen bilgiler doğrultusunda bu tezin amacı memantin içeren nanomotor formülasyonlarının tasarlanması, bu formülasyonların etkinliklerinin nöronal kaynaklı hücre kültürü modellerinde in vitro olarak incelenmesi, AH'nda karşılaşılabilen metabolik değişiklikler üzerinde bu nanosistemlerin in vitro hücre kültürü modellerinde metabolomik olarak incelenmesi ve dökümanite edilmesi ile son olarak bu nanosistemlerin uygun teknikler kullanılarak Kan Beyin Engeli ve beyin dokusundaki birikimlerinin değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi

İnsan merkezi sinir sistemi beyin ve spinal korddan oluşmaktadır. Beyin altı ana bölümden oluşmakta ve her bir bölüm de kendi içerisinde birkaç anatomik ve fonksiyonel alana ayrılmaktadır. Beynin ana altı bölümü medulla, pons, serebellum, orta beyin, diensefalon ve telensefalon (serebral hemisfer)'dur.(4)

Spinal kord santral sinir sisteminin kuyruğa kadar inen, en uzun birçok açıdan da en basit bileşenidir. Kafatasından başlayıp ilk lumbar vertebraya kadar uzanmaktadır. Cilt ve kas uç noktalarından duyuşsal bilgiyi toplamaktadır. Kord gri madde ve onu çevreleyen beyaz maddeden oluşmaktadır. Gri madde sinir hücresi gövdelerini içermektedir. Beyaz madde ise miyelinli aksonların uzunlamasına oluşturduğu duyuşsal bilginin beyne ulaşmasını ve bunlara cevap verilmesini sağlayan yollardan oluşmaktadır (5).

İnsan beyni yaklaşık 1500 g'dır, bir diğer deyişle insan vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Beyin menenj olarak adlandırılan üç ana bağlayıcı doku ve bu dokuyucu çevreleyerek koruyan kafatasından meydana gelmektedir. Beyin serebrospinal sıvı içerisinde bulunmaktadır ve bu sıvı ani hareketlere karşı şok absorbe etmekle görevlidir. Ana arter ve venler beyni menenjler boyunca uzanarak beslemektedir (4).

Beynin fonksiyonları milyarlarca sinir hücresi (nöron) ve glial hücreler tarafından sürdürölmektedir. Nöronlar sinir sisteminin temel ünitesidir ve dört yapısal bölümden oluşur. Bunlar hücre gövdesi (soma), hücre gövdesinden yayılan tekli sinir olan akson, aksonun bittiği nokta olan presinaptik uç ve dentrit olarak isimlendirilen çeşitli çok sayıda dallanmadır (4).

Temel bileşen olan nöronlarda görölen hasar ve fonksiyon bozuklukları birçok hastalığa sebebiyet vermektedir. Hasar sonucu oluşun nörodejeneratif hastalıklar devam eden başlık altında daha detaylı incelenmiştir.

2.2. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif Hastalıklar nöronların spesifik popülasyonlarının ilerleyici şekilde fonksiyon kaybı ile karakterize edilmektedir. Nöronal kayıp hatalı katlanmış proteinlerin intraselüler ve ekstraselüler birikimleri ile oluşmaktadır (6, 7).

Nörodejenerasyona yol açan bu hücre ölümü farklı genetik, çevresel faktörler veya yaşlanma gibi endojen faktörlerden kaynaklanmaktadır. Fakat temel patolojik mekanizma hala tamamen anlaşılammıştır. Nörodejeneratif hastalıklar şu anda bilinen genetik mekanizmalara göre veya protein birikimlerindeki en fazla görünen bileşik üzerinden sınıflandırılmaktadır. Birçok nörodejeneratif hastalığın altında yatan sebepler birkaç madde ile aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir;

- Anormal protein işleyişleri, örneğin yanlış katlanmalar, bozukluklara yol açan degradasyonlar, sıklıkla moleküler şaperon mutasyonları ve hareketlilikleri ile birlikte olan proteozomal fonksiyon bozukluğu ve birikimi.
- Oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu
- Mitokondriyal disfonksiyon ve hücre içi enerji mekanizmasının bozukluğu, DNA hasarı
- Nöronal golgi cisimciğinin fragmantasyonu
- Hücreler ve aksonlar arası taşımanın yok olması
- Nörotropinlerin fonksiyonunun bozulması
- Nöro-inflamatuar süreçlerin gelişmesi

Bu mekanizmaların tümü karmaşık döngülerden oluşmakta ve sonuç olarak hücrelerin fonksiyon kaybı ve ölümüne yol açmaktadır (7).

Alzheimer Hastalığı, Parkinson hastalığı ve motor nöron hastalıkları en yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklardır (8).

2.2.1. Demans

Demans; genel olarak, öğrenme ve hafıza, konuşma, yürütme işlevi, algısal motor beceriler ve sosyal bilişteki bozulmalar gibi semptomları içeren bilişsel gerileme ile karakterize edilen bir hastalıktır. Genellikle tek başına bir hastalık yerine

birçok semptomu bir arada içeren ve birçok sebebi olan bir ‘sendrom’ olarak da tanımlanmaktadır.

Şu anda dünyada 46.8 milyon insan demans ile yaşamaktadır ve bu sayının 2050 yılında 131.5 milyona çıkacağı öngörülmektedir (9). Her yıl 10 milyon yeni vaka gözlenmektedir. Bu vakaların %60-80’ini AH oluşturmaktadır (10). Demansın farklı sebepleri olabilmekte bu farklı sebeplere göre de farklı sınıflara ayrılmaktadır. Demansın sebepleri arasında AH, serebrovasküler hastalıklar, Fronto-temporal dejenerasyon, hipokampal sklerozis, Huntington Hastalığı, Lewy cisimciği hastalığı, karışık (mixed) patolojiler ve Parkinson Hastalığı yer almaktadır. Temel aldığı bu nedenlere göre sınıflandırılmış demans alt tipleri aşağıda sıralanmıştır(11).

1. Alzheimer Hastalığı
2. Vasküler Demans (VaD)
3. Fronto-temporal Demans (FTD)
4. Huntington Demansı
5. Lewy cisimcikli Demans (DLB)
6. Karışık Demans (MD)
7. Parkinson Demansı (PD)

Vasküler demansta beyinde bulunan damarlar hasar görmüş veya beyin dokusuna yeterli oksijen, kan ve besin gitmemektedir (11).

Fronto-temporal demansta beynin ön (front) ve temporal (yan) loblarında bulunan sinir hücreleri ölmüştür ve bu loblarda sızıntılar gözlenmektedir. Korteksin üst tabakaları yumuşamıştır. Anormal yapıda ve düzeyde Tau proteini ayrıca geçişken cevaplı DNA-bağlayıcı protein (TDP-43) varlığı gözlenmiştir.

Huntington Demansı genetik olarak gözlenen Huntington hastalığına bağlı oluşmaktadır. Bu hastalıkta beyinde sinir hücrelerinin ciddi oranda dejenerasyonu gözlenmektedir.

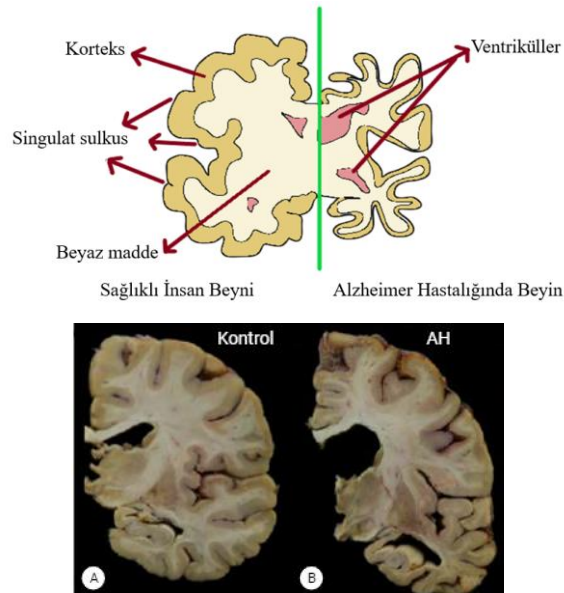
Lewy-cisimciği protein alfa-sinükleinin nöronlarda anormal şekilde agregasyonu sonucu oluşan yapılardır. Beynin korteks bölümünde bu yapıların oluşması sonucu demans gözlenmekte ve bu demansa *Lewy-cisimcikli demans* denmektedir.

Karışık Demansta bireyde tek bir semptom ya da neden değil birden fazla farklı patolojiler gözlenmektedir.

Protein alfa-sinüklein kümelerinin substantia nigra (kara madde) olarak isimlendirilen beynin daha derin bölgelerinde oluşması sonucu dopamin üreten sinir hücreleri hasar görmekte ve bu da Parkinson hastalığına sebep olmaktadır. Hastalık ilerledikçe bu kümeler kortekste de oluşmakta sonuç olarak *Parkinson Demansı* oluşmaktadır (11).

2.3. Alzheimer Hastalığı

AH santral sisteminde beyinde gözlenen progresif, nörodejeneratif bir hastalık olup nöronal hasar kaynaklı olarak gözlenmektedir. Progresif bir hastalık olması sebebiyle nöronal hasar zaman geçtikçe ilerlemekte bu da hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır. Demansın bir alt tipi olarak sınıflandırılır. Nöronal hasar öncelikle beynin hafıza, dil ve düşünmeden sorumlu bölgelerinde başlamaktadır. Sonuç olarak da hastalığın ilk semptomları hafıza, dil ve düşünme problemleri olmaktadır. Semptomlar bireysel olarak değişebilmektedir. Zaman geçtikçe nöronal hasar artmakta ve beyinde etkilenen bölge sayısı artmaktadır (2, 12). AH'da beyinde gözlenen değişimler Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Alzheimer Hastalığında beyinde gözlenen değişimlerin sağlıklı beyin ile karşılaştırmalı şematik gösterimi ve gerçek beyin kesitleri A) Sağlıklı insan beyin kesiti B) AH beyin kesiti (13)

AH semptomları çok çeşitli olabilmektedir. Bu semptomlar her evrede değişmekte veya var olan semptomlara yenileri eklenmektedir. AH evrelerini ve semptomlarını beraber incelemek daha faydalı olacaktır.

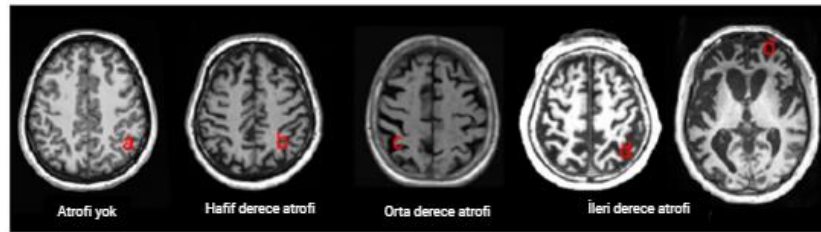
AH beş evreye ayrılmaktadır. Bunlardan ilki 'Preklinik evre'dir. Bu evrede hastada herhangi bir semptom gözlenmemekle birlikte beyinde biyolojik değişiklikler başlamaktadır. Amiloid- β plak ve nörofibriler yumak oluşumları hastalığın semptomlarının başlangıcından en az 20 yıl önce başlamaktadır. Hastalık ilerledikçe beyin median temporal lobda ve çevre dokularda atrofi gözlenmektedir.

İkinci evre günlük aktiviteleri etkilemeyecek hafif semptomların başladığı 'AH'na bağlı hafif bilişsel bozukluk' evresidir. Hasta yakınları genellikle hastalığa ait semptomları bu evrede fark edebilmektedir.

Üçüncü evre 'Erken evre' olarak adlandırılmaktadır. Bu evrede yakın zamanlı anıların kaybı, günlük unutkanlıklar, apati (ilgisizlik, kayıtsızlık) ve depresyon sık gözlenen semptomlardır.

Dördüncü evre 'Orta evredir. Orta evrede görsel ve mekânsal kavrama problemleri, dikkat eksikliği, bilişsel bozukluklar, praksi (eylemleri sıralayabilme, kontrol edebilme yeteneğinin kaybı) gözlenmektedir.

Son evre ise 'Geç evre' olup bu evrede artık semptomlar yaşamsal faaliyetleri etkilemektedir. Yürüyememe, sonuç olarak yatağa bağımlı hale gelme, yutma bozuklukları, solunum bozuklukları gözlenmektedir (11). AH'nın farklı evrelerinde beyinde gözlenen atrofi dereceleri Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Alzheimer Hastalığında beyinde gözlenen atrofi ve dereceleri (14)

AH teşhisinde ABD ulusal rehberlerinde izlenmesi gereken yol ve basamaklar güncellenerek paylaşılmaktadır. Alzheimer Derneğinin (Alzheimer's Association) 'Alzheimer Derneği, Amerika Birleşik Devletleri'nde Nörodejeneratif Bilişsel Davranışsal Sendromlar, Alzheimer hastalığı ve Demans'ın Değerlendirilmesi için En

İyi Klinik Uygulama Kılavuzu'na göre hastalık 9 ayrı başlıkta incelenmeli ve teşhisi için tüm bu testler tamamlanmalıdır. Bu başlıklar şu şekilde sıralanabilir;

- Medikal öykü
- Fiziksel muayene ve testler
- Nörolojik muayene
- Bilişsel, fonksiyonel ve davranışsal testler
- Bilgisayarlı bilişsel testler ve cihazlar
- Depresyon izlemi
- Beyin Görüntüleme
- Serebrospinal sıvı (CSF) analiz testleri
- Kan testleri

Öncelikle hastanın klinik öyküsü ve aile öyküsü alınmaktadır. Bunu takiben nörolojik muayene ve mental durum tespiti yapılmaktadır. Teşhiste sadece bunlar yeterli olmamakta bazı spesifik metabolik ve fizyolojik değişikliklerin tespiti için serebrospinal sıvı ve kan analizini de içeren laboratuvar testleri gerekmektedir. Manyetik Rezonans görüntüleme (MRI) ile beyin taraması da beynin fizyolojik durum tespiti için oldukça önemlidir (15, 16).

MRI görüntülerinde beynin temporal lobunda ve hipokampusu de içeren çevre dokularda atrofi yani nöronal hücre kaybına bağlı olarak beyinde küçülme gözlenmektedir. PET (Pozitron emisyon tomografisi) taramaları bu hastalıkta klasik olarak gözlenen bilateral temporo-parietal hipometabolizm ve birçok bölgede amiloid plak birikimini göstermektedir (15).

Serebrospinal sıvı biyo-belirteçleri beta amiloid proteininde azalma fosforile tau protein seviyelerinde ise artmayı göstermektedir. Kan testleri ise tek başına bu hastalığın teşhisinde önemsiz kalmakla beraber beyinde amiloid değişikliklerin ve nörolojik hasarın varlığı hakkında bilgi almak için yapılmaktadır. Diğer testlerle birlikte diagnostik taramanın bir parçasıdır (15).

Metabolomiks çalışmaları da AH erken teşhisinde kullanılmaktadır. Yine bu çalışmalarda da serebrospinal sıvı ve plazma analiz için kullanılmaktadır (17). Alzheimer hastası bireyler ile bilişsel olarak normal bireylerin birçok farklı biyobelirteç bu çalışmalarda kıyaslanmaktadır. Çalışmalarda tirozin, triptofan, pürin, tokoferol, nörepinefrin gibi biyobelirteçler karşılaştırılmıştır. Yine kolesterol de

incelenen bir diğerk moleküldür. Sonuç olarak AH'nda kolesterol seviyeleri oldukça düşük bulunmuştur (18).

Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

AH kademeli ve yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Hastalığın ilk semptomları ortaya çıkmadan 20 yıl önce başlayabilmektedir. AH'nın temel sebebi henüz tanımlanamamıştır. Her hastanın günlük yaşam özelliklerinin, karakteristiklerinin ve tüm yaşamı boyunca maruz kaldığı çevresel etkenlerin farklı olması bunun temel sebebidir. Temel nedeninin belirlenememesi hastalığın etkin tedavi edilememesine de sebep olmaktadır.

AH patolojisini moleküler düzeyde açıklayan birkaç farklı hipotez bulunmaktadır. Güncel olarak hastalığın temel patofizyolojisi Amiloid Beta ($A\beta$) ve Tau proteinlerin beyin parankimasında birikimine odaklanmaktadır (12).

Kolinerjik Hipotez

AH patolojisi hakkında öne sürülen en eski hipotezdir. Bu hipotez Alzheimer hastalarının beyin örneklerinde azalmış kolin alımı ve azalmış asetilkolin salımının keşfedilmesiyle ortaya çıkmıştır. Presinaptik kolinerjik hasara bağlı olarak gözlenen hafıza bozuklukları ve bilişsel (kognitif) bozuklukları açıklamaktadır.

Bu hipotezden yola çıkılarak kullanılan kolinerjik ilaçlar AH'nın semptomatik tedavisinde geniş bir yer kaplamaktadır.

Eksitotoksisite Hipotezi

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri sinaptik plastisite ve hafıza fonksiyonları üzerinde etkilidir. Glutamat ve glisin bu reseptörlere bağlandığında reseptörleri aktive etmektedir. Aktivasyon sonucu Ca^{+2} ve Na^{+} geçişine izin vermektedir. Reseptörün aşırı uyarılması ise aşırı Ca^{+2} yüklemesine ve apoptoza neden olur. Glutamerjik ilaçlar da NMDA reseptör inhibisyonunu sağlayarak bu yolak üzerinde etkili olmaktadır (19).

Amiloid Kaskad Hipotezi

İlk defa 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından keşfedilmiştir. AH hastalarının histolojik incelemesi sonucu amiloid- β peptit ve hiperfosforile Tau'nun sırasıyla beyindeki plaklar ve nörofibriler yumakların ana bileşeni olduğu tespit edilmiştir. Bu buluş sonucu Hardy ve Higgins (20) APP'nin ürünü olan Amiloid- β 'nin plakların ana bileşeni olduğunu ve bu plakların da AH'nın temel sebebi olduğu teorisini öne sürmüştür.

Amiloid öncü proteini (APP), birkaç hücre tipinde ifade edilen bir tip 1 transmembran gliko-proteinidir. APP'nin proteolizi, α -, β - ve γ -sekretazlar tarafından düzenlenmektedir. Amiloid kaskad hipotezi, değiştirilmiş APP proteolizinin amiloid proteinlerinin [$A\beta(1 \rightarrow 40)$ ve $A\beta(1 \rightarrow 42)$] birikimini tetiklediğini önermektedir; bunlar giderek oligomerler, fibriller ve plak halinde toplanmaktadır (20, 21).

Bu teori daha sonra AH'na sebep olan otozomal dominant mutasyonların bulunmasıyla desteklenmiştir. Bu mutasyonların ana bileşeninin ne olduğuna dair çalışmalar birçok bilim insanı tarafından yürütülmüştür. Bu bileşenlerden bir tanesi APP kodlayan gendir. Bu gendeki mutasyon yine Amiloid- β birikimine neden olan yolağın başlamasına sebep olmaktadır.

Tau Hipotezi

Normalde bir nöronda üç adet mikrotübül ilişkili protein (MAP) tauları bulunmaktadır. Bu proteinler mikrotübüler yapıların kurulumu ve stabil halde duruşundan sorumludur. Tau biyolojik aktivitesi fosforilasyon derecesi ile regüle edilmektedir. Tau hiper fosforilasyonu mikrotübüllere bağlanmayı etkilemekte ve nörofibriler yumakların birikimine neden olmaktadır. Bu birikim de daha önce bahsettiğimiz üzere nöronal ölüme ve sonuç olarak AH'na sebep olmaktadır (22).

Tüm bu bilgilere ek olarak çalışmalar AH'nın erken evrelerini yaşayan hastaların hipokampus ve serebral korteksinde beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve reseptörü tirozin kinaz B (TrkB) düzeylerinin azaldığı göstermektedir (23).

Nörotrofik faktörler, genel bakışta peptit veya küçük proteinlerden oluşan hem gelişmekte olan hem de gelişimini tamamlamış nöronların yaşamını sürdürmesine, büyümesine ve farklılaşmasına yardımcı olan biyomoleküllerdir. Sinir

sistemi gelişimi tamamlanıp olgunlaştıktan sonra nöronların yaşamını sürdürmesi için gereklidir. Bu faktörlerin en önemli görevlerinden birisi sinaptik plastisiteyi teşvik etmeleri ve uzun dönem hafızanın oluşumunu düzenlemeleridir. Henüz gelişimi devam eden nöronlarda büyümeyi ve gelişimi başlatırken, hasar gören nöronlarda ise aksonların onarılıp yeniden büyümesi için gereken kimyasal süreçleri başlatmaktadır. BDNF'nin sinaptik aktiviteyi düzenlemesi, nöronal plastisite, hafıza oluşumu ve depolama için önemlidir. TrkB'nin uyarılması, bilişsel işlevi iyileştirmiş ve sinaps yoğunluğunu artırmıştır (24, 25).

Bu verilerin bir sonucu olarak, BDNF-TrkB yolunun amiloid- β ile uyarılan nörotoksosite, sinaptik disfonksiyon ve hafızanın kötüleşmesi durumlarında aktif olduğu varsayılmıştır. Çalışmalar ayrıca TrkB aktivasyonunun etkilerinin amiloid- β ve tau patolojisinden bağımsız olduğunu göstermiştir (25).

Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri

AH genellikle 65 yaş üzerinde ortaya çıkmaktadır. Bu durum geç başlangıçlı Alzheimer olarak adlandırılmaktadır (13). AH'nın oluşmasında tek bir sebepten ziyade birçok faktör rol oynamaktadır (3, 12).

-Yaş

Yaş AH'da en önemli risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Alzheimer hastası bireylerin %5'i 65-74 yaş aralığında, %13.1'i 75-84 yaş aralığında, %33,2'si ise 85 yaş üstüdür. Bu durum hastalığın yaş ile birlikte nasıl dramatik olarak arttığını göstermektedir (26). Yine de yaş tek başına AH oluşması için yeterli bir sebep değildir. AH normal yaşlanmanın bir parçası değildir. AH sadece %5 oranında 65 yaş altında da görülebilmektedir ve buna 'erken başlangıçlı AH' denmektedir (3, 16, 27).

-Genetik

Yapılan araştırmalar ve çalışmalar sonucunda birkaç farklı genin AH riskini artırdığı tespit edilmiştir. Bunlar Apolipoprotein-E (APO-E), APP kodlayan gen ve Presenilin-1 ve Presenilin-2'dir (28).

APP'yi kodlayan gen. APP, amiloid- β peptidinin β -APP, parçalama enzimi ve γ -sekretaz tarafından ardışık kesme yoluyla kesilip uzaklaştırılan halo proteindir. Bu

genetik mutasyonlar için ek destekleyici veriler, presenilin 1 ve presenilin 2'deki otozomal dominant mutasyonlardan gelmektedir (29).

Hastalıkta risk faktörü olarak en etkili genetik faktör APO-E olarak belirtilmektedir. APO-E geni kan dolaşımında kolesterolü taşıyan protein için bir yol haritası sağlamaktadır. Bu genin APOE2, APOE3 ve APOE4 olmak üzere 3 farklı alleli bulunmakta ve tüm insanlara bu üç allelden bir tanesi genetik miras olarak ebeveynlerinden aktarılmaktadır (30).

Doğal olarak var olan APOE2, APOE3 ve APOE4 aleller sırasıyla AH'na karşı koruma sağlayabilir, üzerinde hiçbir etkisi olmayabilir ve AH'nın başlangıcını hızlandırabilir. Bu genlerin etki mekanizması maalesef hala bilinmemektedir. Yine de bu alellerin amiloid-beta atılımını sağladığı araştırmacılar tarafından düşünülmektedir (25).

Tamamen amiloid- β peptitlerine odaklanan klinik çalışmaların başarısızlıkları, bu bakış açısının sorgulanmasına neden olmakta ve kombinasyon fırsatının yanı sıra başka stratejilerin de düşünülmesine neden olmaktadır. Araştırmacıların AH hastalarında hipokampal bölgede amiloid plaklarının toplandığını gösterdikleri çalışmalarda, kan-beyin engelinden (BBE) kan sızıntısı da gösterilmiştir (31, 32).

-Aile Öyküsü

Aile öyküsü de Alzheimer Hastalarında gözlenmekte olan bir risk faktördür. Hastalığın ortaya çıkmasında tek başına etkili bir faktör değildir. Aile öyküsü bulunan her birey Alzheimer Hastası olmaz ancak Alzheimer Hastası olan her bireyde muhakkak aile öyküsü vardır.

Birinci dereceden bir akrabada (ebeveyn veya kardeş) AH gözlenen bireylerde hastalığın görülme riski artmaktadır (3).

Değiştirilebilir Risk Faktörleri

Yaş, genetik faktörler ve aile öyküsü değiştirilemeyen yani müdahale edilemeyen risk faktörleri iken farklı bazı risk faktörleri değiştirilebilir veya bilişsel bozukluklar ve demans riskinin düşürülmesi için etkileri modifiye edilebilir (3).

Değiştirilebilir risk faktörlerine örnek olarak, sigara kullanımı, fiziksel aktivite, eğitim düzeyi, sosyal ve mental olarak aktif kalma, beslenme ve kan basıncı kontrolü verilebilir. Yapılan bazı çalışmalara göre bu risk faktörleri üzerinde yapılacak değişiklikler AH'nı önleyebilir veya ortaya çıkışını %40'a kadar geciktirebilir (33).

-Kardiyovasküler Sağlık

Beynimiz vücut ağırlığımızın sadece %2'lik bir kısmını oluştursa da vücudun oksijen ve enerji depolarının %20'sini kullanmaktadır. Bu nedenle aslında kalp ve damar sağlığı beyni ve fonksiyonlarını da etkilemektedir. Sağlıklı bir kalp beyne yeterli seviyede oksijenin ve besince zengin kanın pompalanmasını sağlamaktadır. Kardiyovasküler hastalık riskini artıran dolayısıyla da artmış demans riski ile ilişkili birçok faktör bulunmaktadır. Hipertansiyon ve diyabet bu faktörlerdendir (28).

Örneğin orta yaşta görülen obezite, hipertansiyon, pre-hipertansiyon (sistolik kan basıncı 120-139 mm Hg arası veya diyastolik kan basıncı 80-89 mm Hg arası olması) ve yüksek kolesterolün ileri yaşlarda demans hastalığı görülmesi riskinin artışı ile ilişkilendirilmiştir (28).

-Sigara, Fiziksel Aktivite ve Beslenme

Kalp sağlığı ile beyin sağlığı arasında keşfedilen ilişki sonucu araştırmacılar kalp sağlığını etkileyecek faktörlerin beyin sağlığını da etkileyeceğini ve demans için bir risk faktörü olabileceğini bulmuştur.

Sigara demans ve AH riskini artıran bir faktördür (34, 35). Bunun tam tersi olarak fiziksel aktivite ise bu riski azaltmaktadır. Bununla birlikte araştırmacılar birçok farklı fiziksel aktivite tipini araştırmış ve spesifik olarak hangi aktivitenin iyi geleceği konusunda ise bir bilgi sunulmamıştır (36).

Fiziksel aktivite ile kalp dostu beslenmenin de yine demans riskini düşüreceği belirtilmiştir (37). Kalp dostu beslenme meyve, sebze, tam buğday unu, tavuk, balık, sağlıklı yağ ve kuruyemişlerin tüketimini içermektedir. Akdeniz mutfağı bu tarz beslenmeye örnek olarak verilebilir (38).

-Sosyal Aktivite

Yapılan araştırmalar kart oynamak, yürüyüş yapmak, bulmaca çözmek, kelime oyunları oynamak, aile üyeleri veya arkadaşlarla konuşmak gibi günlük aktivitelerin de mental sağlığa iyi geldiğini göstermektedir. Bu aktivitelerin birkaçının gün içerisinde yapılması ise hafıza bozuklukları ve demans gibi mental hastalıkların görülme riskini daha da düşürmektedir (39).

-Eğitim

Araştırmacılar eğitim seviyesindeki artışın AH riskinde azalmaya sebep olduğunu raporlamışlardır. Örgün eğitimi Alzheimer riskinin azalmasıyla ilişkilendiren araştırmaların çoğu, eğitimin demans semptomlarına yol açan beta-amiloid ve tau birikimi gibi Alzheimer biyo-belirteçlerini etkileyip etkilemediğine ışık tutabilecek beynin PET görüntülemesi gibi teknolojik taramalardan faydalanmadan yürütülmüştür. Bu teknolojik tarama ve testlerden faydalanarak yapılan çalışmaların çoğu ise eğitimin AH'na bağlı beyin değişikliklerinin görülmesini azaltmaktan ziyade hastalıkta semptom olarak görülen bilişsel bozuklukların ilerlemesini yavaşlattığını, semptomların ortaya çıkışını geciktirdiğini önermektedir (40).

Daha uzun süre devam eden örgün eğitim, bireylerde beyni daha uzun süre aktif tutmakta, nöronlar arası iletişimin aktifliği ile beynin daha esnek ve etkili bilişsel ağ kurmasını sağlamaktadır (41).

-Travmatik Beyin Hasarı (TBH)

TBH dışarıdan beyne veya vücuda gelen fiziksel bir darbe sonucunda beynin normal fonksiyonlarının bozulması olarak tanımlanmaktadır. TBH artan AH riski ile ilişkilendirilmektedir (42).

Alzheimer Hastalığının Tedavisi

Alzheimer Hastalığı için şu anda bir tedavi mevcut değildir ve ABD'de aducanumabın yakın zamanda onaylanmasına kadar ilerlemesini yavaşlatacak herhangi bir tedavi de mevcut değildi. Sadece semptomları geçici olarak yavaşlatmak

ve bilişsel işlevi iyileştirmek için terapötik müdahaleler mevcuttur (43). Tedavi planını kendi içerisinde konvansiyonel ve yeni tedavi seçenekleri olarak ikiye ayırabiliriz.

Bu bölümde AH tedavisine geniş bir perspektif ile bakıp tedavide halihazırda kullanılan ilaç molekülleri, yeni onay almış bazı moleküller, araştırmacılar tarafından çalışılmakta olan ilaç taşıyıcı yeni sistemler ve tüm bunların yanı sıra ilaç dışı tedaviyi destekleyici seçenekler açıklanacaktır.

Konvansiyonel Tedavi

Farmakolojik Tedavi

AH'nın tedavi edilemez doğası, onu sağlık profesyonelleri için en büyük zorluklardan biri haline getirmektedir. Birçok araştırma grubu Alzheimer hastalarına yönelik yeni ilaçlar geliştirmek için farklı stratejiler üzerinde çalışmaktadır. Bunlardan bir kısmı Faz II veya Faz III denemelerinde başarısız olmaktadır. Şu anda uygulanan tedavi seçenekleri esas olarak AH'nın temel özelliklerine, yani ön beyin nöronlarını içeren asetilkolin dejenerasyonuna odaklanmaktadır. Bu nedenle Alzheimer hastalarında ilk tedavi seçeneği kolinesteraz inhibitörleri kullanılarak beyin dokusundaki asetilkolin düzeyinin artırılmasıdır. Diğer seçenek ise NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptör antagonisti kullanımıdır.

Asetilkolin-esteraz inhibitörleri geliştirilmiş en iyi grup olup hafif ila ileri derece Alzheimer'da kullanılabilir. Hastalığın semptomlarını hafifletmekte bu grup ilaç kullanılmaktadır. Klinik araştırmalar asetilkolin-esteraz inhibitörlerinin bilişsel fonksiyonları iyileştirebildiğini göstermiştir (44).

FDA tarafından onaylanmış Asetilkolin-esteraz inhibitörü grubu 4 adet etkin madde bulunmaktadır. Bunlar Takrin, Rivastigmin, Donepezil ve Galantamin'dir. FDA tarafından ilk onay alan ve yaygın şekilde kullanılan etkin madde Takrin'dir. Fakat bu ilaca bağlı yaygın yan etki gözlemi (hepatotoksisite) ve biyoyararlanımının düşük olması sebebiyle daha sonra kullanımdan kaldırılmıştır (45, 46).

İkinci jenerasyon antikolinergik ilaçlar ise donepezil (piyasa adı Aricept®, Eisai Company ve Pfizer Inc.), galantamin (Hoechst Marion Roussel Inc., Shire Pharmaceutical Group, ve Janssen Pharmaceutical, piyasa adları Reminil® ve Nivalin, ABD piyasa adı Razadin®) ve rivastigmin (piyasa adı Exelon®, Novartis

Pharmaceuticals). Bu grubun yan etkileri takrine göre daha hafif ve uzun yarı ömürleri ile birlikte etkililikleri daha yüksektir (47).

Aricept®'in farmasötik etken maddesi olan Donepezil, ilk kez 1996 yılında AD tedavisinde kullanılmıştır. Günlük kullanım için farklı dozlarda hafif-orta ve orta-şiddetli AD tedavisinde kullanılmaktadır. Donepezil çalışmalarının meta-analizinde bu ilacın Alzheimer hastalarının bilişsel fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür. Donepezilin onaylanmış dozları hastalığın ciddiyetine göre 5 mg, 10 mg ve 23 mg/gündür (48).

2000 yılında onaylanan Rivastigmin, Exelon®'un aktif farmasötik bileşenidir. Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesterazın psödo geri dönüşümsüz inhibitörüdür. Yarılanma ömrü kısa olmasına rağmen (1-2 saat), aktivitesi bu enzimler üzerinde daha uzun bir süre (3,5-8,5 saat) ve başka bir çalışmada 10-12 saate kadar sürmektedir (49, 50). Proteinlere düşük oranda bağlanması Rivastigmin'in en büyük avantajıdır. Bu, yaşlı hastaların çeşitli amaçlar için birçok ilaç alabileceği göz önüne alındığında, diğer ilaçlarla etkileşime girme ihtimalinin düşük olduğu anlamına gelmektedir. Rivastigmin'in 26 hafta boyunca 6–12 mg/gün'lük dozlama ile bilişsel fonksiyonları iyileştirdiği gözlemlenmiştir (51).

FDA tarafından 2001 yılında onaylanan Galantamin Razadin®'in aktif farmasötik bileşenidir. İlk önce bitkilerden elde edilmiş ama aynı zamanda sentetik olarak da üretilen bir tersiyer alkaloid türevidir. Asetilkolinesterazı seçici ve kompetitif inhibe eder. Tablet, çözelti ve uzatılmış salımlı kapsül formunda 4 - 24 mg dozları aralığında piyasada mevcut preparatları bulunmaktadır(52, 53).

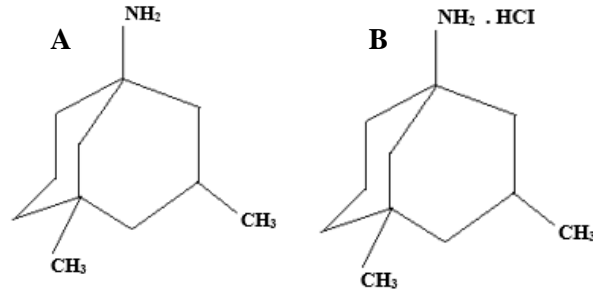
Memantin

Bahsedilen asetilkolinesteraz inhibitörlerinin yanı sıra AH'nı da içinde barındıran nörodejeneratif hastalıklar için son onay alan ilaçlardan birisi de Memantin'dir. Namenda®'nın etkin maddesi olan Memantin 2003'te FDA tarafından onaylanmıştır. Memantin NMDA reseptörlerinin non-kompetitif inhibisyonunu sağlamak ve glutamat seviyesini düzenleyici görev görmektedir (54).

NMDA reseptörü Glutamat reseptörlerinin üç majör alt tipinden bir tanesidir. En açık şekilde tanımlanmış glutamat reseptör alt tipi olan NMDA reseptörleri hem ligand hem de voltaj bağımlı çalışmaktadır. Voltaj bağımlı çalışmasının sebebi Mg^{+2}

iyonlarının blokajıdır. Bunun yanı sıra Ca^{+2} iyonlarına da diğer reseptörlerin aksine oldukça geçirgendir (55).

Glutamat, kortikal ve hipokampal sinir hücrelerinde temel uyarıcı bir nörotransmitterdir. Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde, glutamin sentetaz oksidasyon yoluyla aşırı glutamat birikimine neden olur. Bu durum, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına yol açar, merkezi sinir sistemi sinir hücrelerinin duyarlılığını artırır ve nöronal dejenerasyona yol açar. Memantin, glutamik asit kapılı NMDA kanallarını engelleyerek patolojik uyarımı önlerken, fizyolojik uyarımı korur. Asetilkolin esterase inhibitörleri sadece hastalığın başlangıç ve orta aşamaları için onaylanmışken, memantin Alzheimer hastalığının ileri evrelerinin tedavisi için onaylanmıştır. Memantin günde iki kez 10 mg ve 28 mg/gün dozunda uzatılmış salım kapsül formunda kullanımı önerilmektedir (54, 56).



Şekil 2.3. A) Memantin ve B) Memantin HCl Moleküler Yapısı

Memantin HCl suda çok çözünür bir maddedir. Kimyasal formülü $C_{12}H_{21}N$ 'dir (Şekil 2.3.) (57). Oral uygulama sonrası absorpsiyonu yüksektir. Kanda maksimum plazma konsantrasyonuna 3-7 saat arasında erişmektedir. Atılımı idrarla ve değişmeden gerçekleşmektedir. Eliminasyon yarılanma ömrü 60-80 saattir. Absorpsiyonu besinler tarafından etkilenmemektedir. Memantin'in ortalama dağılım hacmi 9-11 L/kg'dır ayrıca plazma proteinlerine bağlanma oranı düşüktür (%45). Memantin'in farmakokinetik parametreleri asetilkolin esterase inhibitörlerine karşı üstünlük sağlamaktadır (58). Etkileşim ve yan etki riski daha azdır. Fakat yine de konvansiyonel dozaj şekillerinde kullanımı hedef bölgeye geçiş kısıtlılığı ve hastalığın etkin tedavisi açısından yetersiz kalmaktadır.

Yukarıda bahsettiğimiz tüm bu konvansiyonel etkin maddelerin AH tedavisinde etkisi sınırlı kalmaktadır. Asetilkolin esteraz inhibitörlerinin bulantı, kusma, diyare, baş dönmesi ve sersemlik gibi hastanın hayatını olumsuz etkileyen çeşitli yan etkileri bulunmaktadır. Buna ek olarak Takrin ve Rivastigminin biyoyararlanımı düşüktür. Donepezil proteinlere yüksek oranda bağlanmakta bu da ilaç etkileşimi ve yan etki riskini artırmaktadır. Galantaminin ise yarılanma ömrü çok kısadır. Sonuç olarak da bu etkiler AH tedavisinde yeni arayışlara sebep olmuştur (2).

Non-farmakolojik Tedavi

AH tedavisinde izlenen ilaçla tedavi protokollerinin yanı sıra ilaçsız tedavi yöntemleri de bulunmaktadır. Fakat bu tedavi hastalığın altında yatan biyolojik sebepleri iyileştirememektedir. Bu tedavi çeşitleri daha çok bilişsel işlevlerin iyileşmesini desteklemek ve hastanın günlük yaşamı ile ilişkili aktiviteleri yapabilme yeteneğini iyileştirmek için kullanılmaktadır. Non-farmakolojik tedavi çeşitleri fiziksel egzersiz, hafıza güçlendirme egzersizleri, müzik ve sanat temelli aktivitelerdir. Bu tür aktiviteler hastada AH ile birlikte gözlenen depresyon, ajitasyon, uyku bozuklukları ve agresyon gibi davranışsal ve psikolojik semptomları spesifik olarak azaltma amacındadır (3).

Hastalarda non-farmakolojik tedavi işe yaramadığı takdirde doktorlar bazı antipsikotik ilaçları reçete edebilmektedir. Çoklu ilaç tedavisinin hastada oluşturabileceği yan etkiler de göz önüne alınarak bu tedavi şemaları belirlenmektedir(3).

AH hastalarının beslenmesi için de Akdeniz tipi beslenme önerilmektedir. Bu tip diyetin hastalığı iyileştirdiğine dair kesin sonuçlar bulunmasa da azalmış AH riski ile ilişkilendirilmektedir (59).

Antioksidan kullanımı da oksidatif stresi önlediği için AH tedavisinde ek olarak önerilmektedir. Oksidatif stres hücrel yaşlanma ile karakterizedir. Oksidatif stres belirteçlerinin AH'nda nörofibriler yumak ve amiloid- β plaklar dahil olmak üzere patolojik lezyonlardan önce geldiği tespit edilmiştir (60, 61).

Tedavide Yenilikçi Güncel Yaklaşımlar

Monoklonal Antikor Tedavisi

Son yıllarda monoklonal antikorlar (mab) da AH tedavisinde umut verici bir seçenek olarak gündeme gelmiştir. Konvansiyonel tedavide kullanılan ilaç moleküllerinin aksine antikorların hastalığın rasyonel tedavisini sağlayabileceği yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir.

FDA tarafından ilk onay alan anti-amiloid antikor Aducanumab'tır, Haziran 2021'de onaylanmıştır. Aducanumab 2003 yılından bu yana onay alan ve hastalığın patofizyolojisini hedefleyen ilk ilaçtır. Çözünmeyen fibril veya çözünebilir oligomerler gibi çeşitli formdaki Amiloid- β plakları hedeflemektedir. Çözünebilir A β plakları hedefleyen solanezumab ve crenezumab'ın amiloid plakları temizleyemediği ve plaseboya göre bir farklılık oluşturmadığı faz 3 çalışmalarda gözlenmiştir. Aducanumab'ın ise yapılan çift kör, plasebo kontrollü faz 1b çalışmasında, 1 yıl boyunca aylık olarak infüzyon şeklinde hastalara uygulanması sonucu Amiloid- β plakları zaman ve doz bağımlı halde temizleyebildiği kanıtlanmıştır (62). Bu çalışma yapılan 2 farklı randomize faz 3 çalışmasıyla da desteklenmiştir (63). Onaylandığından bu yana ilaca ait bazı yan etkiler raporlanmıştır. Temel yan etkisi amiloid ilişkili görüntü anormalliğidir (ARIA). Bu anormallik beyinde ödem, mikro hemoraji ve beyin parankimasında hemosiderin birikimi ile karakterizedir.

Lecanemab FDA tarafından onaylanmış bir diğer anti-amiloid monoklonal antikordur. Yüksek duyarlılıkla çözünür amiloid- β protofibrillerine bağlanmaktadır. Protofibrillerin sinir hücreleri için monomerler veya çözünmeyen fibrillere kıyasla daha toksik olduğu bilinmektedir. Bu ilaç Aducanumab'dan sonra en çok umut vaat eden antikor olmuştur. Yapılan faz 3 klinik çalışmalarının sonuçlarına dayanarak Ocak 2023'te FDA tarafından onaylanmıştır. Aynı faz 3 çalışmalar lecanemabın sadece erken AH'da amiloid belirteçlerini azalttığı ve bilişsel bozukluğu geciktirdiğini göstermektedir(64, 65). FDA onaylı tüm AH tedavisinde endike ilaçlar Tablo 2.1.'de etki mekanizmaları ve yan etkileri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 2.1. AH tedavisinde FDA onaylı ilaçlar, onay yılları ve etki özellikleri

İlaç Adı/Piyasa Adı	Onay Yılı (FDA)	Endikasyon	Etki Mekanizması	Yan Etki
Donepezil Aricept®	1996	Erken ila geç evre AH	Antikolinergik etki ile bilişsel bozukluk semptomlarının tedavisi	Bulantı, kusma sersemlik, iştah kaybı, diyare
Rivastigmin Exelon®	2000	Erken ila orta evre AH	Antikolinergik etki ile bilişsel bozukluk semptomlarının tedavisi	Bulantı, kusma sersemlik, iştah kaybı, diyare
Galantamin Razadyne®	2001	Erken ila orta evre AH	Antikolinergik etki ile bilişsel bozukluk semptomlarının tedavisi	Bulantı, kusma sersemlik, iştah kaybı, diyare
Memantin Namenda®	2003	Erken ila geç evre AH	NMDA reseptör antagonisti etki ile bilişsel bozukluk semptomlarının tedavisi	Baş ağrısı, konstipasyon, baş dönmesi, kafa karışıklığı
Memantin + Donepezil Namzaric®	2014	Erken ila geç evre AH	Kombine tedavi - bilişsel bozukluk semptomlarının tedavisi	Bulantı, kusma sersemlik, iştah kaybı, diyare, baş ağrısı, konstipasyon, baş dönmesi, kafa karışıklığı
Aducanumab Aduhelm®	2021	AH (AH'na bağlı hafif bilişsel bozukluk veya erken evre)	Anti Amiloid-β etki ile hastalık ilerleyişini değiştirir	ARIA, baş ağrısı ve düşme
Lecanemab Leqembi®	2023	AH (AH'na bağlı hafif bilişsel bozukluk veya erken evre)	Anti Amiloid-β etki ile hastalık ilerleyişini değiştirir	İnfüzyon ilişkili reaksiyonlar, ARIA ve baş ağrısı

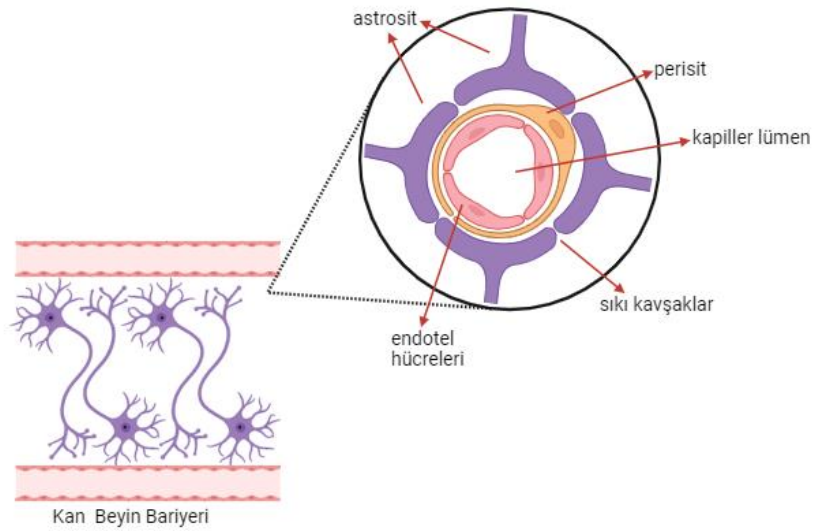
2.4. Beyne İlaç Hedeflendirme ve Kan Beyin Engeli

AH tedavisinde kısıtlayıcı temel faktör Kan Beyin Engelidir. Buna ek olarak Kan-Beyin Omurilik Sıvısı Bariyeri de sadece AH için değil tüm nörodejeneratif ve nörolojik bozukluklar için ikincil bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, AH'nı da içeren nörodejeneratif hastalıklara yeni tedavi seçenekleri oluşturmak için bu mekanizmaların tam olarak anlaşılması gerekmektedir.

Beyin canlı organizmaların en karmaşık ve önemli organlarından biridir. Bu nedenle sinir hücrelerinin iç ve dış konsantrasyonlarında değişiklikler sonrasında sinir iletiminde bozulmalara ve vücut kontrol süreçlerinde fonksiyon bozukluklarına yol açabilecek çevresel ve yabancı maddelerle kontaminasyona karşı korunması gerekmektedir (66).

Kan ve santral sinir sistemini birbirinden ayıran iki bariyer bulunmaktadır: İlki serebrovasküler ağın tamamında lokalize endotelial hücreler (kan-beyin engeli) diğeri beyin ventriküler sistemi içerisindeki koroid pleksusda yerleşmiş epitel hücreleridir (kan-serebrospinal sıvı bariyeri) ve bu iki güçlü engel sırasıyla beyin içi sıvıyı ve serebrospinal sıvıyı kan dolaşımından ayırır (67).

Kan-beyin engeli, seçici geçirgen sistemi sayesinde dolaşımdaki toksinlere ve hücrelere karşı yerel bir geçit görevi gören, beynin korunmasından sorumlu olan yapıdır. KBE beyni sistemik dolaşımdan ayırır ve hedefe yönelik tedaviler de dahil olmak üzere yabancı enfeksiyöz ve/veya toksik ajanlardan korur. Aslında, KBE'nin sistemik dolaşımdaki moleküllerin ~%98'inin beyne geçişini engellediği tahmin edilmektedir. Fizyolojik koşullar altında KBE o kadar kısıtlayıcıdır ki iyonlar bile bir taraftan diğere serbestçe geçemez, bu da deneysel ortam kurmayı ve çalışmayı zorlaştırır. KBE'nin bariyer görevini daha iyi anlamak için bu sistemi hücresel düzeyde incelemek ve açıklamak gerekmektedir (67). KBE'nin ve KBE'yi oluşturan hücresel elemanların şematik gösterimi Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Kan Beyin Engeli ve Bileşenleri Şematik Gösterimi (biorender ile hazırlandı)

KBE'nin çekirdek elemanı endotel hücreleridir. Endotel hücrelerinin benzersiz özellikleri beyni koruma işlevi için bir gerekliliktir. Bu özelliklerden ilki endotel hücrelerinin lipit çift katmanlıdır. Bu katman arasında bulunduğu iki ortam arası moleküler harekete izin vermekte ve KBE boyunca geçirgenliği belirlemektedir (68). Beyin endotel hücreleri, kanın damarlar ve beyin arası değişimi için 20 m²'lik bir yüzey alanı sağlarken, bu hücrelerin oluşturduğu sıkı kavşaklar (tight junctions) moleküler trafiği kan-beyin bariyeri üzerinden transselüler yol boyunca yönlendirmektedir (66). Bariyer özellikleri, sürekli endotelial bağlantılarla sağlanmakta, böylece endotel boyunca paraselüler akış sınırlandırılmaktadır. Ek olarak, hücre içi akış, KBE endotel hücrelerinin oldukça düşük seviyede olan transsitotik aktivitesi, yani hücrelerden geçişin düşük olması nedeniyle de sınırlanmaktadır. Ayrıca, çevre ile beyin arasındaki aktif molekül alışverişi, bir dizi spesifik taşıyıcı ve enzim tarafından düzenlenmekte ve geçişin kontrolü sağlanmaktadır (67).

KBE'nin hücreli olmayan üyesi bazal membrandır. Bu membran endotel hücrelerini KBE'nin diğer hücreli üyelerinden ayırmaktadır. Perisitler bazal membrana gömülüdür ve endotel tüpünün abluminal tarafını uzantılarıyla kaplamaktadır. Beyin parankimindeki astrositler ise, özel uç ayaklarını damar duvarına doğru uzatır ve parankimal tarafı tamamen çevreler. KBE'nin bu bileşenleri arasındaki etkileşimler, bariyer oluşumu ve işlevi için gereklidir. Buna göre, eğer bu

hücreler arası çapraz etkileşim bozulursa, KBE bütünlüğünün ve fonksiyonunun kaybına neden olabilmektedir. KBE’de bozulma ise kanla taşınan patojenlerin, toksinlerin veya oto antikoların penetrasyonu da dahil olmak üzere endotelyum boyunca düzeni bozulmuş ve kontrol edilemeyen bir geçişe yol açabilmektedir. Sonuç olarak da nöroinflamasyon gözlenebilmektedir (67).

Bariyer işlevi ve işlev bozukluğu yalnızca endotel hücreleri, perisitler, astrositler ve bazal membran tarafından düzenlenmez. İmmün düzenleyici faktörler de besin ve oksijen seviyesi değişikliklerine bağlı olarak aktive olmaktadır. Perivasküler makrofajlar periferik immün hücrelerinin çalışmasının düzenlenmesine yardım etmektedir. Bu durum otoimmün nörolojik hastalıklarda daha da önem kazanmaktadır (69, 70). KBE’nin hücresel elemanları ve bunların görevleri Tablo 2.2. ‘de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. KBE’nin hücresel elemanları ve görevleri

KBE hücresel bileşeni	Görevleri
Endotel Hücreleri	bariyer fonksiyonunun sağlanması, mikro besinlerin ve makro besinlerin taşınması, reseptör aracılı sinyalleşme, lökosit geçişi ve osmotik basıncın düzenlenmesi görevleridir.
Perisit	kan-beyin bariyerinin korunması, beyne bağışıklık hücresi girişinin düzenlenmesi, endotelial hücre çoğalmasının, hayatta kalmanın, göçün, farklılaşmanın ve anjiyogenezde yer alan damar dallanmasının düzenlenmesi, serebral kan akışının kontrolünden sorumludur.
Astrosit	Uygun nöron ve nörovasküler ünite fonksiyonlarının devamlılığında ve metabolizmanın kan-beyin bariyeri fenotipinin düzenlenmesinden, nöronal iletimin modülasyonundan, beyin gelişimi ve onarımından sorumludur.
Nöronlar	nöronal-mikrovasküler iletişimi sağlar ve kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin modülasyonunu gerçekleştirir.
Ekstraselüler matriks	kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin modülasyonunu ve sıkı kavşakların idamesini sağlar

Küçük moleküllerin karakteristik özelliklerine bağlı olarak KBE’ni aşarak beyin parankimasına ulaşmak için kullanabileceği üç farklı geçiş yolu vardır. Bunlardan

ilki su bazlı para-selüler geçiştir ve bu geçiş hidrofilitik moleküllere özeldir. Endotel hücreleri arasındaki sıkı kavşaklar bu geçişi sağlamak için serbestleşmekte ve bu serbestleşmenin regülasyonu ile geçiş kısıtlanabilmektedir. İkinci geçiş yolu olarak küçük lipofilik moleküllerin trans-selüler difüzyon aracılığı ile beyin dokusuna girişleri gösterilmiştir (71). Ancak trans-selüler difüzyon yolu luminal membran, sitosol ve akabinde beyin dokusuna ulaşmadan hemen önce abluminal membran geçişini içermektedir. Ki bu geçiş de lipofilik bileşiğin hücre membranı tarafından tutulması eğilimine bağlıdır. Bileşiğin membrana afinitesi yeni bir zorluğu ortaya çıkarmaktadır. Dahası molekülün efflux geçiş substratı olması da difüzyonu etkileyebilmektedir. Üçüncü ve son geçiş mekanizması ise kalan küçük moleküllerin çoğunun beyne geçişini sağlayan substrat-spesifik bir mekanizmadır. Endojen taşıyıcı veya taşıyıcı aracılı geçiş substratın konsantrasyon gradyanı ile kontrol edilmekte uygun bir taşıyıcı da bu geçişe yardım etmektedir (66).

Peptit ve proteinler gibi büyük moleküller ise KBE'ni endositoz aracılığıyla geçmektedir.

Klinik uygulamaya aktarıldığında bu benzersiz yapı, KBE'nin CNS ilaçlarının çoğunun beyin parankimine girmesine izin vermediği anlamına gelmektedir. Farklı olarak, anestezipler serbestçe CNS etkileri göstermeleri açısından önemli bir istisnadır ve bu istisnanın sebebinin ajanların lipofilisitesinin KBE'yi geçişini sağlaması olduğu kanıtlanmıştır. Yani ilaç moleküllerinin beyne girişini molekülün lipofilisitesi etkilemektedir (68, 72).

Log oktanol/su bölme katsayısı, bir diğer adı ile permeabilite katsayısı, bileşiklerin KBE'yi nasıl geçip geçmeyeceğini tahmin etmede önemli bir role sahiptir (72). Tipik olarak permeabilite katsayısı (P), hidrofilitik bir madde (su) ve hidrofobik bir madde (oktanol) kullanılarak belirlenmektedir. Yüksek log (P) değerine sahip bileşikler hidrofobik ortamları/kompartmanları tercih ederek membran lipit çift tabakasını geçmektedir, düşük log(P) değerine sahip bileşikler hidrofilitik ortamlar/kompartmanlarda (örn. serum) kalma eğiliminde olacak ve KBE'yi geçmeyecektir. Bu durumu genel bir kural ve eşitlik olarak verecek olursak $\log (P) > 0$ olan moleküller KBE'yi hızla geçebilmektedir ve bu geçiş için kısıtlayıcı faktör ise ilaç konsantrasyonudur. Diğer yandan, $\log (P) < -1$ olan moleküller ve bileşenlerin ise KBE'yi geçişleri kısıtlanmaktadır. Geçiş sadece log (P) değerine bağlı değildir,

benzer log (P) değerine sahip moleküllerin KBE'yi geçişleri birbirinden farklı olabilmektedir (68).

KBE'yi geçiş için sağlanması gereken şartları şu şekilde sıralayabiliriz:

- ✓ KBE'den geçiş için bileşenlerin boyutu 400 Da'dan küçük olmalıdır.
- ✓ İlaçların iyonlaşma durumlarının KBE'den geçişi etkilemektedir.
- ✓ Hipotermi geçişi engellerken hipertermi geçişi artırmaktadır (68).

2.5. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler

Alzheimer Hastalığının tedavisinde konvansiyonel yöntemler yetersiz kalmaktadır. Klinikte kullanılan tedavi yaklaşımları arasında, hastalığın semptomatik tedavisi ve ilerleyişinin yavaşlatılması, en sık tercih edilen yoldur. Hastalığın tamamen ortadan kaldırılmasında ise etkili bir yöntem bulunmamaktadır (2).

KBE'nin doğal yapısı nedeniyle aktif moleküllerin beyne geçişi sınırlıdır. KBE, sıkı kavşaklar içeren vasküler endotelial hücreli yapılarıdır. Dolayısıyla bu yapılar farmasötik etkin maddelerin sistemik dolaşımdan beyne geçişini sınırlandırmaktadır. Ancak ilaç taşıyıcı sistemler arasında yeni geliştirilenleri bu soruna birçok farklı çözüm sunmaktadır. En sık tercih edilen ise, etki istenen bölgede lokalize edilen ve hedeflendirilmiş şekilde ilaç taşımaya uygun kılınan nanoteknolojidir (73). Bu yaklaşımda nanopartiküler sistemler kullanılmaktadır ve ilaç yüklü bu sistemler KBE'ye nüfuz etmekte ve ilacı etki beklenen bölge olan beyne iletmektedir (71). Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin 0-100 nm aralığında olacak şekilde en az bir boyutu bulunmaktadır(74).

İlaç Taşıyıcı yeni sistemler farklı bileşimlere ve biyolojik özelliklere sahip olup bu nanosistemler ilaç ve gen dağıtım uygulamaları için kapsamlı bir şekilde araştırılmakta ve kullanılmaktadır (75).

Nanoteknolojik sistemler hedef doku ve hücreye direkt ilacı taşıırken biyoyararlanımı artırmakta ve buna bağlı olarak da etkinlik artmakta, yan etkiler azalmaktadır. Bu amaçla ilaç taşıyıcı sistem olarak çok geniş aralıkta nanoteknoloji temelli sistemler geliştirilmiştir (76). Yapılan birçok çalışma sonucu bu sistemlerin terapötik etkiyi belirgin olarak artırdığı kanıtlanmıştır. Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler ilaç moleküllerinin nanopartiküllere yüklenmesi ile kan dolaşımında daha uzun süre kalmasına, suda çözünürlüğü az olan moleküllerin çözünürlüğünün

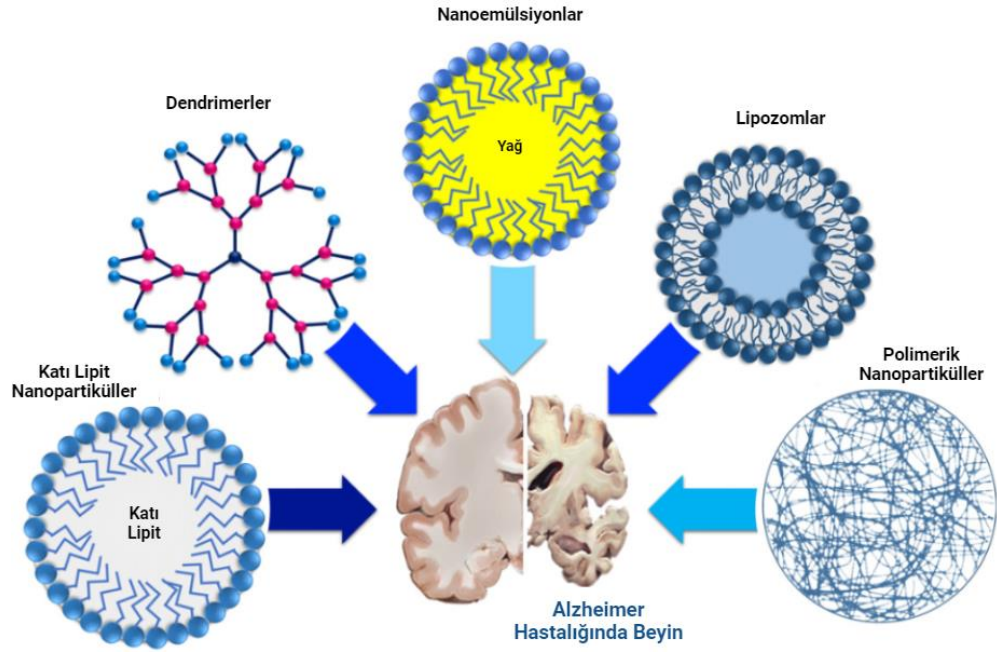
artırılmasına, birkaç farklı etkin maddenin veya etkin madde ile protein yapılı bileşiklerin kombine kullanımına, ilacın kontrollü salımının sağlanmasına imkân tanımaktadır (74-77).

Lipozomlar, Katı lipit nanopartiküller, nano emülsiyonlar, dendrimerler, polimerik miseller, polimerik nanopartiküller, nanokapsüller, karbon nanotübüller, nanomotorlar gibi pek çok nanosistem tipi bulunmaktadır ve her birisinin beklenen etki ve hedef bölgeye göre farklı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (73, 78). İlaç taşıyıcı sistemler olarak sağladıkları avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ Nanopartiküller nano ölçekte boyutları sayesinde damarlardan kolayca geçerek kan dolaşımına karışmaktadır.
- ✓ Yüzey alanı artışına bağlı olarak çözünürlük artışı gözlenmektedir.
- ✓ Artmış biyoyararlanım göstermektedir.
- ✓ İstenilen bölgeye, belirli bir hücre, doku veya organa hedeflendirmeyi sağlamaktadır.
- ✓ Yüzey modifikasyonları ile dolaşımda uzun süre kalım sağlanır (79, 80).

Etkili ilaç dağıtımını başarmak için öncelikle etki alanındaki biyolojik çevre, hedef hücre popülasyonu, hedef hücre yüzeyi reseptörü ile etkileşimlerinin anlaşılması gerekmekte ve nanosistemler bu doğrultuda hazırlanmalı ve modifiye edilmelidir.

Bu nanosistemler içerisinde polimerik nanopartiküller hem diğer hastalıkların tedavisi için hem de santral sinir sistemi hastalıklarında biyoyumlu olması sebebi ile sıkça tercih edilen bir nanosistem tipidir. PLGA (poli(laktit-ko-glikolik) asit), PLA (poli-laktit asit), kitosan en sıklıkla kullanılan polimerlerden bazılarıdır (81).



Şekil 2.5. AH Tedavisinde Kullanılan İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler (82)

Alzheimer tedavisinde de farklı tipte nanosistemler ile çalışılmaktadır. Bu sistemlerin şematik gösterimi Şekil 2.5.'te verilmiştir. Bunlara polimerik nanopartiküller, nano emülsiyonlar, lipozomlar, katı lipit partiküller örnek verilebilir (82). AH tedavisinde kullanılan farklı nanosistemlere ait örnek çalışmalar ve özellikleri Tablo 2.3.'te sunulmaktadır.

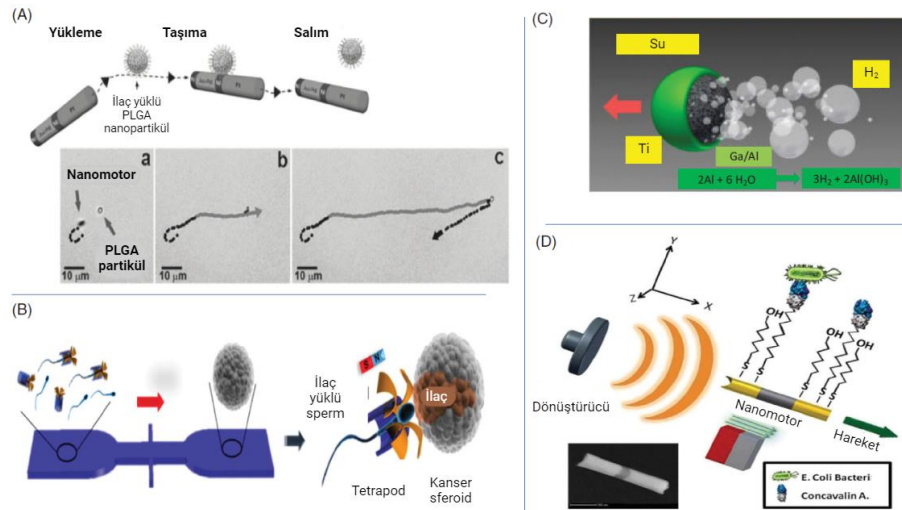
Tablo 2.3. AH tedavisine yönelik geliştirilmiş farklı nanosistem örnekleri

Etkin Madde	Sınıfı	Uygulama Yolu	Nanosistem Tipi	Hazırlama Yolu	Kaynak
Rivastigmin	Kolinesteraz İnhibitörü	İntravenöz	PBCA (Poli-bütil siyano akrilat) nanopartikül	Emülsiyon polimerizasyon	(83)
Rivastigmin	Kolinesteraz İnhibitörü	İntranazal	Kitosan nanopartikül	İyonik şelasyon	(84)
Rivastigmin	Kolinesteraz İnhibitörü	İntranazal	Lipozom	-	(85)
Galantamin	Kolinesteraz İnhibitörü	-	Lipozom	-	(86)
Galantamin	Kolinesteraz İnhibitörü	İntranazal	Katyonik Kitosan nanopartikül	İyonik şelasyon	(87)
Galantamin	Kolinesteraz İnhibitörü	Oral	Katı Lipit Nanopartikül	Mikroemülsiyon	(88)
Galantamin	Kolinesteraz İnhibitörü	İntranazal	Transferozom	Katı film hidrasyon	(89)
Donepezil	Kolinesteraz İnhibitörü	İntranazal	Kitosan Nanopartikül	İyonik Çarpaz bağlama	(90)
Donepezil	Kolinesteraz İnhibitörü	İntravenöz	PLGA nanopartikül	Solvent emülsifikasyon difüzyon evaporasyon	(91)
Donepezil	Kolinesteraz İnhibitörü	-	PLGA-b-PEG nanopartikül	Çift emülsiyon	(92)
Memantin	NMDA Reseptör Antagonisti	İntranazal	Nanoemülsiyon	Homojenizasyon	(93)
Memantin	NMDA Reseptör Antagonisti	İntravenöz	PLGA-b-PEG nanopartikül	Çift emülsiyon	(94)
Memantin (Lipoil)	NMDA Reseptör Antagonisti	Oral	Katı Lipit Nanopartikül	Emülsifikasyon evaporasyon solidifikasyon	(95)

2.6. Mikro/nanomotorlar

Günümüzde nanoteknoloji hedef bölgeye ilaç taşıma, etkin ve güvenilir tedavide konvansiyonel yöntemlere göre birçok avantaj sunmaktadır. Bu sistemler içerisinde mikro/nanomotorlar da son dönemde popüler hale gelmiştir.

Sentetik mikro/nanomotorlar (MNM) son yıllarda çalışılan en yeni nanosistemlerdir. Çok geniş kullanım alanları olmakla birlikte farmasötik araştırma çalışmalarında da odak noktası haline gelmiştir. MNM'lar mikro/nano ölçekli olup kimyasal veya dış bir enerjiyi mekanik harekete çeviren sistemler olarak tanımlanmaktadır (96). Çevredeki enerji kaynağını kullanarak serbestçe otonom hareket edebilmektedir. Farklı otonom harekete sahip nanomotor sistemlerine örnekler Şekil 2.6.'da verilmiştir. Simetrik yapı kaynaklı basınç yapının asimetrikleştirilmesi ile kırabilmektedir. Bu da kendi kendine sağlanan hareketin anahtar noktasıdır. MNM'lar ayrıca mikro/nano yüzücüler veya mikro/nanorobotlar olarak da isimlendirilmektedir. Bu isimlendirmede temel nokta hareket mekanizmalarının farklı olmasıdır. Mikro-nano ölçekteki boyutları ve kendi kendine sağlayabildikleri hareket kabiliyetleri insan vücudu boyunca geçiş ve dolaşımına izin vermektedir. MNM üretiminde farklı materyaller, geometriler, yüzeyler ve üretim metotları kullanılabilir (96-98).



Şekil 2.6. A) Katalitik nano-çubuk motorun ilaç yüklü PLGA partikülleri alması, taşınması ve salımı (99), (B) İlaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiş biyohibrit sperm hücre mikromotorunun şematik gösterimi (100), (C) Su ile indüklenen baloncuk ile hareket eden mikromotor sisteminin şematik gösterimi (101), (D) Manyetik olarak yönlendirilen ve ultrason temelli harekete sahip nanomotor gösterimi (102).

MNM'lar ilaç taşıma, hücre uyarımı ve izolasyonu, biyo-görüntüleme, teşhis ve görüntüleme, foto kataliz ve çevre temizliği gibi birçok farklı alanda kullanılabilir. Buna ek olarak tıpta birçok farklı araştırma alanında uygulamaları mevcuttur. Ateroskleroz, diyabet, immün hastalıklar, oftalmoloji, gen terapisi, vasküler hastalıklar ve kanser bu alanlara örnek olarak verilebilir (103).

Mikro/Nanomotorların Sınıflandırılması

MNM'lar boyut, şekil, bileşim veya hareketlerine göre sınıflara ayrılabilir. Sentetik MNM'lar hareket özelliklerine göre 2 ana gruba ayrılmaktadır. İlk grup Kimyasal reaksiyon temelli hareket, ikinci grup ise Fiziksel temelli hareket olarak adlandırılmaktadır. Kimyasal reaksiyon temelli harekette MNM yapısı veya yüzeyi ortam ile reaksiyona girebilecek bir maddeden oluşmakta ve reaksiyon sonucu ortaya çıkan baloncuklar MNM hareketi için bir itme kuvveti doğurmaktadır (104). MNM'ların hareket temelli sınıflandırması ve özellikleri Tablo 2.4.'te verilmiştir.

MNM teknolojisinde en yaygın grup Kimyasal Temelli Harekete sahip nanomotorlardır (105). Ancak bu grubun toksik yakıt oluşturması sebebiyle biyo-uygulamaları kısıtlanmaktadır. Bu kısıtlamayı ortadan kaldırabilmek için biyoyumlu yakıtlar (glukoz, üre vb.) ile oluşan reaksiyonlar alternatif olarak sunulmuştur (106). Herhangi bir kimyasal reaksiyona ihtiyaç duymadan hareketin sağlandığı MNM sınıfları araştırmacıların çok daha fazla dikkatini çekmektedir (107). Bunun başlıca sebebi biyolojik ortamda toksik bir etki yaratabilecek herhangi bir kimyasal reaksiyonun oluşmamasıdır. Aynı zamanda bu grubun komutaya bağlı hareketleri daha kontrollü uygulamaya olanak tanımaktadır. Örneğin manyetik mikromotorların hareketi dışarıdan uygulanan manyetik alan var oldukça devam etmekte, bu hareketin hızı ve yönü de manyetik alan kuvveti ve torku dışarıdan değiştirilerek kontrol edilmektedir. Manyetik alan durdurulduğu anda hareket de sonlanacaktır. Yine de MNM'ların tam kontrolü güncel iyileştirmelere ve gelişmelere rağmen hala büyük bir zorluk olarak görülmektedir. Laboratuvar ortamında tam kontrol sağlamak mümkün olsa dahi biyolojik ortamlarda özellikle insan vücudunda kan akış hızı, biyolojik bariyerler vb. farklı parametreler hareketi etkilemektedir.

Tablo 2.4. MNM'lerin hareket temelli sınıflandırması ve özellikleri

Hareket Çeşidi	Özellikler	Avantajları	Kısıtlamaları	Kaynak
Kendi kendine hareket				
Kimyasal temelli Hareket	Kimyasal reaksiyon sonucu açığa çıkan enerji kinetik enerjiye dönüşür ve baloncuklar sayesinde de hareket sağlanır.	Basit ve modifiye edilebilir yapıdadırlar, hareket hızı yüksek, maliyet düşük	Biyouyumlu değildir ve yakıt olarak kullanılan maddeler (H ₂ O ₂) yüksek konsantrasyonda toksik olabilir.	(108)
Alternatif yakıt temelli hareket	Enzim temelli katalitik reaksiyonlar ile hareket sağlanır. Üre, glukoz ve su yakıt olarak kullanılır.	Biyouyumlu hareket	Enzimlerin reaksiyon mekanizması ile ilgili	(109)
Dış uyarana bağlı hareket				
Ultrason ile hareket	Hareket yüksek enerjili ses dalgaları ile kontrol edilir.	Noninvaziv ve biyouyumlu	In vivo uygulaması geliştirilmeli	(110)
Manyetik alan ile hareket	Hareket bir kumanda ve manyetik alan ile sağlanır.	Noninvaziv ve biyouyumlu	Manyetik materyal kullanılmalı	(111)
Işık ile uyarılmaya bağlı hareket	UV, görünür ışık veya infrared ışık MNM'lerin hareketi için kullanılabilir.	Noninvaziv ve biyouyumlu	Farklı dalga boylarında kullanımı geliştirilmeli	(112)
Biyohibrit temelli hareket				
Bakteri esaslı hareket	Bakterinin kimyasal enerjisi hareket enerjisine dönüştürülür.	Aktif kargo taşıma	Düşük yapısal esneklik, kısa ömürlüler	(113)
Ökaryotik Hücre bazlı hareket	Hastanın kendi hücreleri MNM üretiminde kullanılır.	Kolay atılım yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve biyouyumlu	Serbest yüzme hızının kaybı	(114)

MNM'lar ayrıca geometrik yapıları esas alınarak da sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmada i-nanoçubuklar, ii-Janus küreler ve iii-tübüler motorlar olmak üzere üç ana grup bulunmaktadır.

Mikro/nanomotor Üretim Yöntemleri

Materyal Seçimi

Yüksek viskoz direnç mikro/nano ölçekteki eylemsizlik kuvveti ve MNM'ların yönlendirilmesine engel olan Brown hareketlerinin neden olduğu termal dalgalanma ile karşılaştırıldığında devamlı hareket için MNM'ların yapısal simetrisini kırmak gerekmektedir. Asimetrik reaksiyon yaratmak ve hareketi sağlamak için birçok farklı yöntem kullanılabilir. MNM üretiminde sentetik teknikler veya poröz kalıp aracılı teknikler kullanılmaktadır (115).

MNM üretiminde materyal seçimi de oldukça önemlidir. Farklı yapısal geometri tasarımlarına ve MNM hareketi için seçilen mekanizmaya göre materyal kullanılmaktadır(116). Genellikle, MNM üretimi için yaygın olarak kullanılan materyaller 3 gruba ayrılabilir. Bunlar; metal oksitler, saf metaller ve enzimlerdir.

Katalitik reaksiyon temelli hareket için en sık kullanılan katalist platindir (Pt). Bunun sebebi ise Pt'nin H_2O_2 parçalanması için gösterdiği yüksek katalitik aktivitedir. Bu sayede ortaya çıkan baloncuklar hareketi sağlamaktadır. Aynı reaksiyonun katalizi için Gümüş (Ag) de uygun bir metal olarak kullanılmaktadır. Diğer değerli metaller de örneğin altın (Au), iridyum (Ir) motor parçalarının üretiminde kullanılabilir. Demir (Fe) partikülleri de üretimde kullanıldığında farklı hareket mekanizmalarının bileşeni haline gelmektedir. Örneğin demir ve nikel (Ni) kullanımında manyetik alan altında hareket sağlanmaktadır (117).

Metal oksitler de (örneğin mangan oksit) değerli metallerin ucuz alternatifi olarak H_2O_2 parçalanma reaksiyonunda kullanılabilen katalizörlerdir. Çeşitli diğer metal oksitler TiO_2 gibi ışıkla uyarılma temelli hareket için kullanılabilir (117).

Enzim katalizi ile hareket eden MNM'lar ise biyolojik bir yakıtla çalışmaktadır. Çeşitli biyolojik reaksiyonlar bu MNM hareketini yaratmak için

kullanılabilmektedir. Burada da MNM bileşimine enzimatik reaksiyonu başlatacak materyaller girmektedir.

Grafen, karbon nanotüp ve aktif karbon gibi karbon bazlı materyaller MNM üretiminde katalitik degradasyon amacı ile tercih edilen bir diğer gruptur (117).

Tüm bu grupların yanı sıra polistiren sülfonat (PSS), poliallilamin hidroklorür (PAH), polikaprolakton (PCL), poli N-izopropil akrilamid (PNIPAM) gibi polimerler MNM üretiminde kullanılmaktadır. Bu polimer temelli MNM'lar aşağıdan yukarıya yaklaşımı veya membran kalıp yöntemi ile üretilmektedir. Polimerler motorun ana yapısı veya fonksiyonel parçaları olarak göre almaktadırlar. Bu fonksiyonlar ise sıcaklığa karşı duyarlılık, aktif taşınacak bileşiğe bağlanma, biyoyumluluk ve biyobozunurluktur (117).

Sentetik Üretim Teknikleri

Yapısal simetriyi bozmak gerektiği için genellikle çok basamaklı üretim yöntemleri gerekmektedir. Bunun için en sık kullanılan yöntemler ise fiziksel buhar biriktirme (PVD) ve elektrokimyasal biriktirmedir (118, 119).

PVD yönteminde katı bir hedeften alınan materyal yüksek sıcaklıkta bir vakum yardımı ile uçurulmaktadır. Uçurmayı takip eden yoğunlaşma ile yüzeyde film tabakası oluşmaktadır. PVD yöntemi kendi içerisinde de birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar elektron ışınıyla buharlaştırma, magnetron püskürtme, atomik tabaka biriktirme metodu ve diğerleridir. Bu yöntemlerde temel mantık yoğun materyallerin püskürtülmesi ve ince film tabakalar halinde biriktirilmesidir. En sık kullanılan film biriktirme yöntemleri ise püskürtme ve evaporasyon yani uçurmadır. Püskürtme hedef materyalin iyonize inert bir gaz ile (örneğin Argon) hedefe bombardımanıdır. İyonize gaz atomlarından hedef materyale bir kinetik enerji aktarımı olmakta bu işlemi takiben yapılan buharlaştırma ile de film tabakası oluşturulmaktadır. Uçurma ise materyal biriktirme için elektron ışını veya elektrik enerjisini kullanılmasına dayanan yöntemdir. Her biri farklı amaca hizmet edebilen katalitik materyaller (Pt), reaktif olmayan materyaller (Ti) veya manyetik materyaller (demir veya nikel) bu yöntemlerle biriktirilerek tabakalaştırılabilmektedir. Bu sayede MNM'ların fonksiyonlarını oluşturmaktadırlar (118).

Elektrokimyasal biriktirme yöntemi çeşitli birçok MNM üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (119). Yüksek maliyetli ürünler ve zorlayıcı reaksiyonların kullanımına gerek olmadan kolayca gerçekleştirilmektedir. Ayrıca ölçek büyütme ve küçültmeye de imkân sağlamaktadır. Elektrokimyasal biriktirme yönteminde dış bir elektrik akımının kullanımı gerekmektedir. Bunun yanı sıra elektro olmayan kimyasal biriktirme yöntemleri de vardır. Bu yöntemlerde ise elektrik akımdan ziyade kimyasal redoks reaksiyonlar ön plandadır (118). Elektrokimyasal biriktirmede yüksek vakumlu sistemlerin kullanımından kaçınılmaktadır. Bunun yanı sıra farklı kalıplar kullanılarak üretimde boyut ve yapı kontrolü sağlanabilmektedir. Kalıplar ise kendi içerisinde **membran kalıplar** ve **diğer kalıplar** olarak ikiye ayrılmaktadır.

Membran kalıp aracılı elektrokimyasal biriktirmede membranın gözenekleri kullanılarak değişik materyallerden oluşan istenen tüp ve çubuk şeklinde motorlar sentezlenmektedir. Her bir gözenek, istenen partikülün sentezlendiği birer reaktör görevi görmektedir. MNM sentezinde yaygın kullanılan membran kalıplara polikarbonat membranlar ve gözenekli alümina membranlar örnek verilebilir. Şimdiye kadar kullanılan en etkili ve güçlü mikro/nano ölçekte hareket stratejisi bu tasarıma dayanmaktadır. Membranların belirli çapta gözeneklerinin olması bu gözenekler içerisine biriktirme ile hedef çapta ve kontrollü bir şekilde nanomotor üretimine olanak vermektedir. Gözenekli alümina membranlar çapları 20-400 nm arasında değişmektedir ve çubuk (rod) şeklinde nanomotorların üretimi için oldukça uygun bir yöntem olarak kullanılmaktadır (118).

Elektrokimyasal biriktirme için kullanılan kalıplar sadece membran kalıplar ile sınırlı değildir. İstenen yapıya göre farklı şekillerde kalıplar kullanılmaktadır. Tübüler lipozomal mikroyapılar ve gümüş çubukların kalıp olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Bunlar bahsettiğimiz **diğer kalıplar** grubuna dahil edilmektedir.

Elektro olmayan kimyasal biriktirme yöntemi asimetrik bipolar elektrodpozisyonu olarak da incelenebilmektedir. Yöntemde sadece elektrik akımı değil redoks reaksiyonlar da işlem basamağı olarak yer almaktadır. Burada iletken bir nesne iki elektrot arası elektrik alana yerleştirildiğinde nesnenin iki ucu arasında potansiyel fark oluşmaktadır. Elektrik alanla doğru orantılı olan polarizasyon nesne

yüzeyinde asimetrik bir reaktivite yaratmaktadır. Polarizasyon yeteri kadar güçlü olduğunda nesnenin iki zıt ucu arasında oluşan elektrokimyasal reaksiyonlar simetriyi kırmaktadır. Bu yöntem özellikle Janus motorların üretiminde tercih edilmektedir. Metalin bipolar elektrokimyasal birikimi için dikey bir elektrik alan partikülün zıt uçlarına uygulanmakta bu sayede redoks reaksiyonlar indüklenmektedir (118).

MNM'lar fonksiyonel materyallerin tabaka eklenmesi gibi geleneksel kimyasal reaksiyonlarla da üretilebilmektedir. Ayrıca tabaka eklenme yönteminde de membran kalıplar kullanılabilir (115).

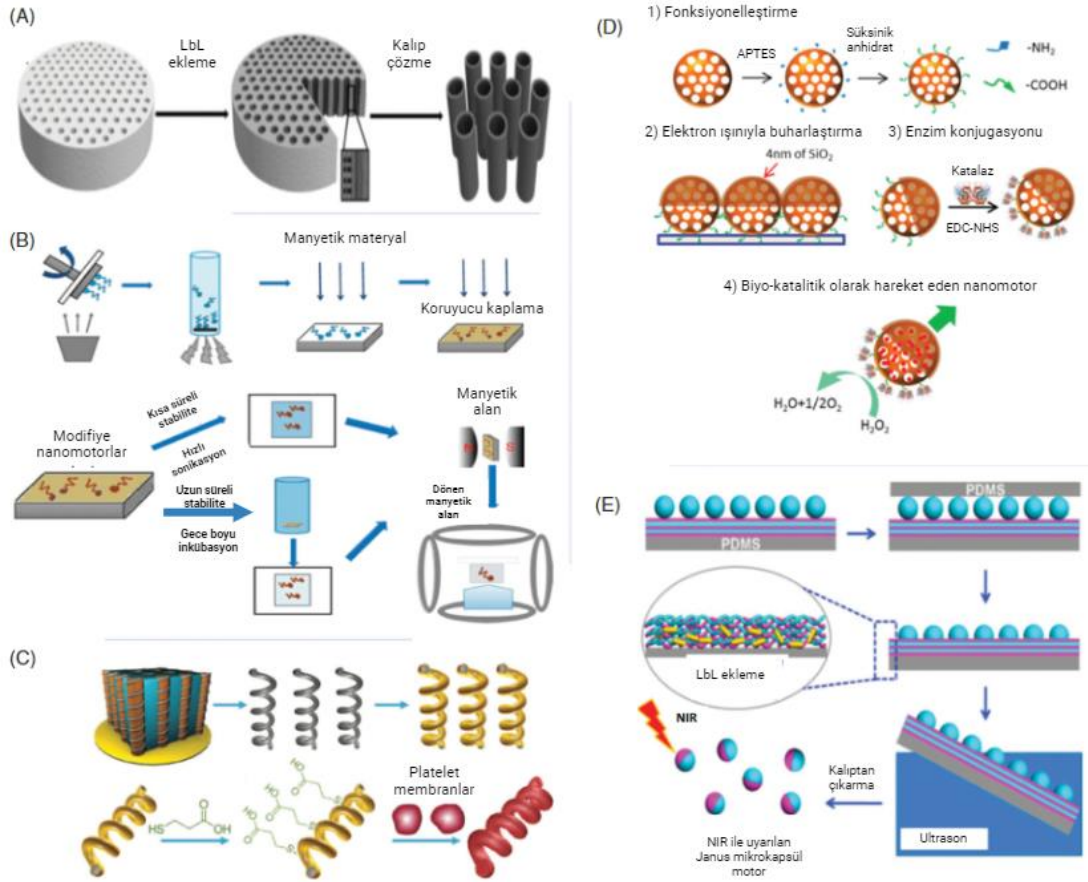
-Gerilim mühendisliği nano membranları 3 boyutlu mikro/nano yapılar olarak yeniden düzenleme için faydalı bir destek sunmaktadır. MNM üretiminde kullanılan bir diğer yöntemdir. Bu üretim tekniği için kullanılan materyaller oldukça çeşitlidir, uygun biriktirme tekniklerini içinde barındırır ve altta yatan kurban tabakayı seçici olarak kaldırmaktadır. Mikro/nano tüpler, helikal mikromotorlar üretiminde sıkça kullanılmaktadır(118).

-Materyallerin eklenmesi yöntemi de MNM üretiminde kullanılan bir diğer yöntemdir. Hedeflenen yapıyı hazırlamak için minyatür elementleri bir araya getirme stratejisidir. Proses geri dönüşümlüdür ve oluşan yapılar birbirine non-kovalent bağlarla bağlanmıştır. Tekli katmanların toplanmasıyla üç boyutlu yapılar oluşur(118).

-Kat kat ekleme yöntemi (LbL) ters yüklü katların biriktirilmesiyle çok katlı yapıların oluşturulmasıdır. Basit ve düşük maliyetli bir yöntem olup geniş aralıkla bir çözücü erişebilir yüzeylere uygulanabilmektedir. Bu da çok farklı çeşitlerde kalıplarla çalışmayı mümkün kılmaktadır. Çünkü kalıplardan yapıları kurtarma işlemi çözücü yardımıyla yapılmakta, ne kadar çeşitli çözücü ile çalışılırsa o kadar çeşitli kalıp ile de çalışılabilir demektir(118).

-Biyohibrit yöntem kimyasal enerjiyi harekete çevirecek biyomoleküllerin kullanımıyla MNM oluşturulmasıdır. Kinesin, miyozin en sık kullanılan biyomoleküllerdir. Biyolojik materyallerle kimyasal bileşenlerin birleştirilmesiyle oluşan Biyohibrit motorlar birçok yeni fırsat sunmaktadır. Ayrıca bakteri veya canlı hücreler de kendi kendine hareket edebildikleri için düşük Reynolds ortamında etkili hareket sağlamaktadırlar (115, 118).

Farklı üretim teknikleri ile hazırlanan nanomotorların bir arada gösterimi Şekil 2.7.'de sunulmuştur.



Şekil 2.7. Farklı yöntemlerle hazırlanan mikro/nanomotor örnekleri A) Kat kat ekleme yöntemi (LbL) ile tübül nanomotor hazırlama B) C)Membran kalıp tekniği ile spiral motor hazırlama D) Biyohibrit yöntem ile nanomotor hazırlama E) Kat kat ekleme yöntemi (LbL) ile Janus mikrokapsül motor hazırlama

Tüm bu bilgiler ışığında tez çalışmaları kapsamında AH tedavisinde kullanılması amacıyla manyetik uyarılma ile hareket eden nanomotorların membran kalıp tekniği ile hazırlanması ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Bunun için kullanılan gereç ve yöntemler devam eden bölümde verilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amantadin	Ali Raif Pharmaceuticals, Türkiye
Asetonitril (ACN)	Carlo Erba, Almanya
BACE1 Aktivite Kiti	BPS Bioscience, ABD
Borik Asit (H ₃ BO ₃)	Sigma Aldrich, ABD
CRANAD-2	Sigma Aldrich, ABD
Dimetilformamid (DMF)	Carlo Erba, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	J.T.Baker, ABD
DMEM Besiyeri	Cegrogen Biotech, Almanya
EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)- karbodimit)	Sigma Aldrich, ABD
FerroSiyamid (Fe(CN) ₆ ^{3-/4-})	Sigma Aldrich, ABD
Fetal Sığır Serum (FBS)	Cegrogen Biotech, Almanya
Formik Asit	J.T.Baker, ABD
Gümüş çözeltisi	Orotemp, Italgavano spa, Technic Group
L-glutamin	Cegrogen Biotech, Almanya
L-lisin	Sigma Aldrich, ABD
Lipofectamine 3000TM lipozomal transfeksiyon ajanı	Thermo Fisher Scientific, ABD
Memantin HCl	Ali Raif Pharmaceuticals, Türkiye
Metanol (MetOH)	Merck, Almanya
Metiltiyazoltetrazolyum (MTT)	Cegrogen Biotech, Almanya
NHS (N-hidroksisüksinimit)	Sigma Aldrich, ABD
Nikel Klorür	Sigma Aldrich, ABD
Nikel Sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Nil Kırmızısı	Sigma Aldrich, ABD
PBS pH 7,4 Tabletleri	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin / Streptomisin	Cegrogen Biotech, Almanya

Polisorbat-80	Sigma Aldrich, ABD
Polistiren sülfonat (PSS)	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck, Almanya
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck, Almanya
Tip I Kolajen	Sigma Aldrich, ABD
Tripan Mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin-EDTA Çözeltisi	Cegrogen Biotech, Almanya

3.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler

Balb/c Fare	Kobay, Türkiye
HcMEC-D3 Hücre Hattı	ATCC, ABD
HEK293T Hücre Hattı	ATCC, ABD
TrkB insan işaretli ORF plazmidi	Origene, ABD
SH-SY5Y Hücre Hattı	DSMZ, Almanya
TrkB Antikoru	Santa Cruz Biotechnology, ABD

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Akım Sitometri Cihazı (FACS Aria II)	BD Biosciences ABD
C18 (100 x 2.1 mm, 3 µm) kolon	GL Sciences, ABD
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Q-100)	TA Instruments, ABD
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (Spectrum™ BX II FTIR)	Perkin Elmer, ABD
GC-MS, Shimadzu (GCMS-QP2010 Ultra MSD)	Kyoto, Japonya
Görüntüleme Sistemi, Gel logic 1500, Molecular Imaging System	(Kodak, Carestream Health, Inc., ABD)
Hassas Terazı (XS 105)	Mettler Toledo, İsviçre
Işık Mikroskobu (BX53)	Olympus, Japonya
İnkübatör (Heracell 150i)	Thermo Scientific, ABD

<i>In Vivo</i> Görüntüleme Sistemi (Newton 7.0)	Vilber, Fransa
Jel Elektroforez Cihazı (Mini-Protean Tetra Cell)	Biorad Laboratories Inc., ABD
Jel Transfer Cihazı (Power Blotter)	Invitrogen, ABD
Laminar Akışlı Kabin (Hera Safe)	Thermo Fisher Scientific, ABD
LC-ESI-MS/MS Cihazı	Shimadzu, Japonya
Manyetik Karıştırıcı	IKA Ret Basic, Çin
Optik Mikroskop (Zeiss, AX10)	Zeiss, Almanya
Plaka Okuyucu (Spectra Max Plus)	Molecular Devices, ABD
Potentiyoostat/Galvanostat (Autolab)	Metrohm, İsviçre
Santrifüj Cihazı (FC5718R)	Ohaus, Kanada
Santrifüj Cihazı (Universal 320)	Hettich, Almanya
Spektrofotometre (UV-1800)	Shimadzu, Japonya
Sputter (Ag püskürtme cihazı)	Plazmatek, Almanya
Plazmatek	
Taramalı Elektron Mikroskobu (Quanta 400F Field Emission)	FEI Company, ABD
Ultra Saf Su Sistemi (Milli Q)	Millipore, ABD
Ultrasonik Banyo (AL 04-12)	Advantage-Lab, İsviçre
Ultrasonik Prob (Sonopuls HD 4200)	Bandelin, Almanya
Voltamogram	Autolab, İsviçre
Vorteks (Vortex 4 Basic)	IKA, Çin
Yatay Çalkalayıcılı Su Banyosu	Memmert, Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1 LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

Etkin madde olan Memantin HCl'nin (MemHCl) UV absorbansı bulunmamaktadır. Bu nedenle etkin madde miktar tayinine yönelik HPLC metodu kullanılmamıştır. HPLC metodu kullanabilmek için türevlendirme yapılması gerekmektedir (120, 121). Bunun yerine MemHCl miktar tayinini yapmaya yönelik özgün LC-MS/MS metodu tasarlanmış, geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Memantin'in Miktar Tayini Yapılmasına Yönelik LC-MS/MS analiz koşulları

LC-MS/MS sistemi (Shimadzu, Japonya), Shimadzu LC-20AXR LC sistemi ile entegre bir üçlü dört kutuplu tandem kütle spektrometresi (Shimadzu 8030 MS/MS) içermektedir. Kromatografik ayrılmalar için C18 kolonu (GL Sciences, 50 x 3.0 mm, 2.1 µm) kullanılmış ve bu kolon 40°C'de çalıştırılmıştır. Hareketli faz olarak su içinde %0.1 Formik Asit (FA) (faz A) ve Metanol (faz B) kullanılmış ve ayrılmalar gradyan elüsyonu yöntemiyle 0.4 ml/dk'lık bir akış hızında gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 1 µl'dir. Gradyan elüsyon profili şu şekildedir;

%5'ten %60 B'ye 0.0–2.0 dakika,

%60 B'de 2.0–3.0 dakika,

%60'tan %5 B'ye 3.0–4.0 dakika,

son olarak başlangıç koşullarında 1 dakika dengeleme (toplam analiz süresi 5 dk).

Miktar tayini, pozitif iyonizasyon modunda çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Optimum kaynak parametreleri şunlardır: 4,5 kV arayüz voltajı, -14 V çarpışma enerjisi, 250 °C desolvatör hattı sıcaklığı ve 400 °C ısı bloğu sıcaklığı. Nebulizatörün ve kurutma gazının akış hızları sırasıyla 3 L/dk ve 15 L/dk olarak ayarlanmıştır. MRM tespiti için öncü ve ürün iyonları, dört kutuplu voltajlar ve çarpışma enerjileri, MemHCl ve iç standart Amantadin için optimize edilmiştir. İyon geçişleri, MemHCl kantitatif analizi için 180 → 163 m/z, MemHCl doğrulaması için 180 → 107 m/z ve iç standardın nicelenmesi için 150 → 135 m/z

olarak belirlenmiştir. Her iki geçiş için bekleme süresi (dwell time) 200 ms olarak ayarlanmıştır.

Sistem uygunluk testi

LC-ESI-MS/MS sisteminin optimum analiz koşulları altında sistem uygunluğu, asimetri (%10), kolon verimliliği (teorik tabaka sayısı, N), kapasite faktörü (k') ve kuyruklanma faktörü parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, kullanılan cihazın, analiz yönteminin veya ölçüm prosedürünün belirlenen parametrelere uygunluğunun objektif olarak test edilmesi ve yazılı olarak kanıtlanmasıdır. Yani analitik yöntemlerin güvenilirliğini gösterme prosedürüdür. Validasyon, tüm analitik yöntemler için gereklidir, ancak kullanılan tekniğin karmaşıklığı arttıkça, iş miktarı ve karşılaşılan sorunların karmaşıklığı da artar. İlgili etkin maddenin kullanıldığı diğer analiz ve çalışmalarda verilecek pek çok karar, yapılan analitik ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilmektedir. Sonuçları doğru değerlendirebilmek ve seçim yapabilmek için analitik yöntem sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekmektedir (122).

LC-MS, son derece güçlü ve aynı zamanda oldukça karmaşık bir tekniktir. Çeşitli çalışma modları (tarama, MRM vb.), çok sayıda parametre ve çeşitli iyonizasyon olanakları sunar. Ancak, bu çok sayıda olanağın sonucu olarak LC-MS sistemleri oldukça karmaşıktır. Bu nedenle, LC-MS tabanlı analitik yöntemlerin güvenilirliğinin sağlanması son derece önemlidir ve bu, yöntemin doğrulanmasıyla yapılır (122).

Performans özelliklerinin belirlenmesi için ilk olarak aşağıdaki temel validasyon parametrelerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Eğer uygulanamayan parametre varsa, "uygulanamaz" ifadesi kullanılmalıdır. Metoda özgü diğer parametrelerin de incelenmesi ve değerlendirilmesi gerekiyorsa, bunlar da eklenerek validasyon gerçekleştirilmelidir.

- Kesinlik (Precision)
- Özgüllük (Specificity)
- Doğruluk (Accuracy)

- Doğrusallık (Linearity)
- Çalışma Aralığı (Range)
- Gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of Detection), Tayin sınırı (LOQ; Limit of Quantification)
- Sağlamlık ya da Kararlılık (Robustness)
- Tutarlılık (Ruggedness)
- Stabilité

Tez çalışmaları kapsamında MemHCI tayini için geliştirilen LC-MS/MS yöntemi, seçicilik, doğrusallık, duyarlılık, matriks etkisi, taşınma (carry over), kesinlik, doğruluk ve tutarlılık parametreleri üzerinden ICH biyoanalitik yöntem geçerliliği kılavuzuna göre valide edilmiştir.

Seçicilik

LC-MS/MS yönteminin seçiciliği, blank (plasebo boş matriks) ve LOQ konsantrasyonunda (0.01 µg/mL) MemHCI ve iç standart (belli derişimde (0.50 µg/mL) spike edilen matriks için elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak incelenmiştir. Tüm çalışmalar boyunca iç standart olarak Amantadin (Amt) kullanılmıştır.

Doğrusallık

Analitik bir yöntemin doğrusallığı, numune içindeki analit konsantrasyonu ile belirlenen ölçüm aralığında elde edilen sonuçların doğru orantılı olmasını sağlama yeteneği olarak tanımlanır. Doğrusallığın tespiti için yapılan çalışmalarda en az 5 farklı konsantrasyon kullanılması tavsiye edilmektedir. Doğrusallık çalışmalarda, farklı derişimlerde MemHCI (0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 ve 10.00 µg/mL) ve sabit derişimde Amt (0.5 µg/mL) içeren kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler geliştirilen LC-MS/MS yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması için, en küçük kareler doğrusal regresyon analizi uygulanmış, derişime (x) karşı pik alan oranı (MemHCI /Amt) (y) çizilmiştir.

Duyarlılık

Geliştirilen yöntemin duyarlılığının gösterilebilmesi için, MemHCI'ye ait kalibrasyon eğrileri kullanılarak gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri tespit edilmiş ve duyarlılık bu değerler ile değerlendirilmiştir. Değerler aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır. (Formül 3.1. ve Formül 3.2.). (S =sinyal, N=gürültü)

$$LOD \mu g / mL = \left(\frac{\text{Analitin bilinen en düşük konsantrasyonu}}{\frac{S}{N}} \right) \times 3 \quad (3.1.)$$

$$LOQ \mu g / mL = \left(\frac{\text{Analitin bilinen en düşük konsantrasyonu}}{\frac{S}{N}} \right) \times 10 \quad (3.2.)$$

Matriks etkisi

MemHCI ve Amt'nin iyonizasyonu üzerindeki matris etkisi, numune matrisinin varlığında ve yokluğunda elde edilen pik alanı değerlerinin oranı olarak ifade edilmektedir. Matriks etkisinin saptanması için, standart MemHCI ve iç standart Amt çözeltileri artan derişimlerde (0.01-10.00 µg/mL) hem boş matrikse hem de suya eklenmiştir. Hazırlanan numuneler geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş ve matriks etkisini değerlendirmek için her grupta MemHCI pik alanı karşılaştırılmıştır.

Carry over (Taşınma)

HPLC, LC-MS gibi otomatik enjeksiyonla çalışan sistemler için, önceki numuneden sonraki numuneye herhangi bir aktarım olup olmadığını belirlemek için yapılmaktadır. Validasyon çalışmalarında taşınma, yüksek derişimdeki bir numuneden veya en yüksek kalibrasyon standardından sonra kör örnek enjekte edilerek değerlendirilmelidir. Yüksek derişimde olan standarttan sonra çalışılan kör örnek (LOQ) %20'sinden ve iç standardın %5'inden büyük olmaması gerekmektedir. Validasyon çalışmaları kapsamında taşınma, en yüksek derişimdeki kalibrasyon standardının (10.00 µg/mL) analizinden hemen sonra kör çözeltilerin enjeksiyonu ile belirlenmiştir.

Kesinlik ve Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, elde edilen sonuçların referans veya gerçek değerlere ne kadar yakın olduğunu gösterirken, kesinlik ise aynı analiz koşullarında yapılan farklı ölçümlerin ne kadar yakın olduğunu belirtir. Yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analizler gerçekleştirilmiştir. Gün içi analizler ve Günler arası analizler, sırasıyla aynı gün ve ardışık üç günde MemHCI' nin doğrusallık aralığında dört derişim seviyesinde (0.01, 0.05, 1.00 ve 5.00 µg/mL) üç tekrarlı analizle değerlendirilmiştir.

Ayrıca, MemHCI' nin artan derişimlerde (0.01-10.00 µg/mL) hem blank çözeltilisine hem de suya eklenmesiyle hazırlanan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerini karşılaştırarak yöntemin doğruluğunu test etmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Doğruluk, analizin ortalama geri kazanımı ile değerlendirilir ve FDA'ya göre bir maddenin analiz sonucundaki ortalama geri kazanımı 100 ± 2 olmalıdır.

Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşullarında tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi çalışmasıdır. Bu amaçla çalışmanın şu şekillerde yapılması gerekmektedir:

- a) Aynı laboratuvarında bulunan farklı cihazlar kullanılarak,
 - b) Aynı laboratuvarında bulunan farklı analistler tarafından çalışılarak,
 - c) Tamamen farklı laboratuvarlarda çalışılarak,
 - d) Kullanılan reaktif ve çözücü markaları değiştirilerek,
 - e) Aynı marka ve modelde yeni bir kolon kullanılarak
- yeniden yapılması gerekmektedir (122).

Geliştirilen yöntemin tutarlılığı, MemHCI'nin 1.00 µg/mL konsantrasyondaki standart çözeltilisinin daha önceden tespit edilmiş optimum analiz koşullarında iki farklı analist (Analist-1 ve Analist-2) tarafından analiz edilmesiyle elde edilmiştir.

Kararlılık

Etken maddenin analiz süresi boyunca stabilitesinin uygun olduğunu göstermek için etken maddenin pH 7.2 fosfat tamponunda sulu çözeltisi hazırlanmış (1.00 µg/mL) bu çözeltiler 72 saat süresince 37°C de yatay çalkalayıcıda 68 rpm'de çalkalamaya maruz bırakılmıştır. Toplamda 6 numune hazırlanmıştır. Bunlardan 3 tanesi sadece MemHCl içerirken diğer 3 numune MemHCl ile birlikte Amt de içermektedir. Bunda amaç iki maddenin birlikte de stabilitesini görebilmektir. 24, 36 ve 72 saat olmak üzere 3 zaman noktasında örnekler alınarak analize verilmiştir.

Sağlamlık

Geliştirilen yöntemin sağlamlık (robustness) çalışması için, yöntem parametrelerindeki (organik faz oranı, hareketli fazın akış hızı ve kolon sıcaklığı) küçük değişimlerin (artı ve eksi yönde) analiz sonuçlarını ne kadar etkilediği araştırılmıştır. Seçilen üç kromatografik parametre için organik faz oranı (%4.9-5.1), hareketli fazın akış hızı (0.395-0.405 mL/dk) ve kolon sıcaklığında (39-41°C) küçük değişiklikler yapılmış ve 1 ppm MemHCl ve 0.5 ppm Amt içeren standart çözelti analiz edilmiştir. Her bir değişiklik sonrası elde edilen analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca yöntemin sağlamlığı hem MemHCl hem de Amt için alıkonma zamanları ve pik alanındaki varyasyon değerleri ile de incelenmiştir.

Stabilite

MemHCl ve iç standart Amt'nin hareketli fazdaki stabilitesi, ilk enjeksiyondan sonra 24 saate kadar numunelerin tekrarlı enjeksiyonları ile periyodik olarak belirlenmiştir. Analitin pik alanları ve ilk döngüde elde edilen Amt pik alanı, sonraki noktalarda stabiliteyi belirlemek için referans olarak kullanılmıştır. 6 saat boyunca MemHCl'nin stabilitesi, n=6 olacak şekilde (0.01 µg/mL) oda sıcaklığında (25 ± 2°C) belirlendi. MemHCl'nin hareketli fazda dondurucu stabilitesi, -20 ± 10°C'de en az 30 gün süreyle saklanan LOQ numuneleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. Üç donma-çözülme döngüsünün ardından MemHCl'nin stabilitesi, MemHCl eklenmiş standart numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Numuneler, her döngü için en az 12 saat boyunca dondurma/çözülme döngüleri arasında $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Örnekler, yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında bekletilerek çözdürülmüştür. Numuneler daha sonra tekrar dondurucuya alınmıştır. Test değerleri kabul edilebilir doğruluk (yani, taze numunelerden %85-115) ve kesinlik (yani, \pm %15 RSD) sınırları içindeyse numuneler stabil olarak kabul edilmiştir.

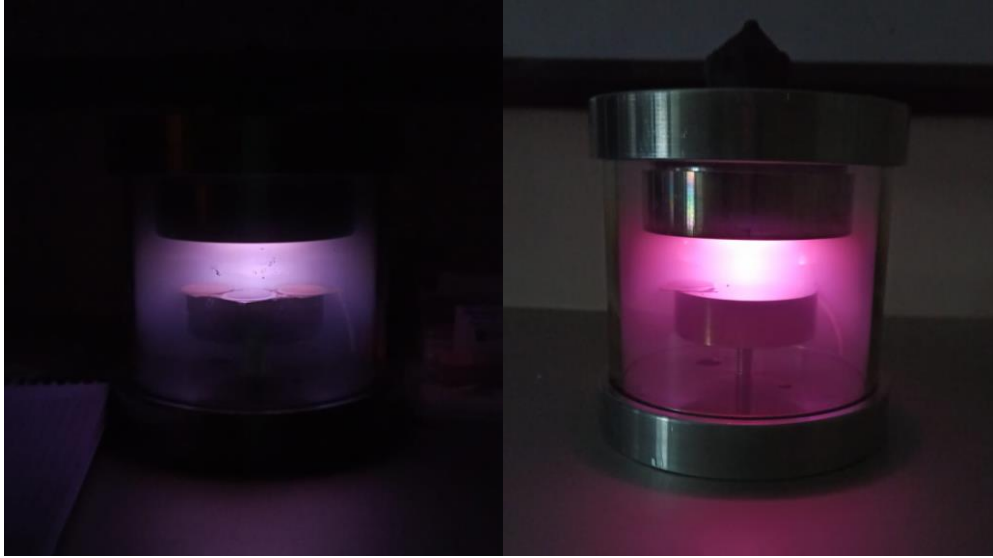
3.2.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması

AH tedavisinde kullanılmak üzere model ilaç olarak MemHCI yüklenecek, dış katmanı (nanomotorların uç katmanlarından biri) poli-L-lisin biyoyumlu polimeri olan nanomotorlar (nanoteller) sentezlenmiştir. Nanomotorların sentezlenmesinde membran-kalıp tekniği kullanılarak metal-elektroaktif polimer hazırlama aşamaları gerçekleştirilmiştir. Nanofabrikasyonda ana yöntem olarak elektrokimyasal yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla, silindirik alümina membranların bir tarafı çalışma elektrodu vazifesi görmesi amacıyla püskürtme (sputter) yöntemi ile ince bir şerit halinde gümüş (Ag) ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Daha sonra bu kaplı membranlar, teflon hücreye yerleştirilerek polimerizasyon ve metal biriktirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Membranların kaplandığı cihaza ait görseller Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



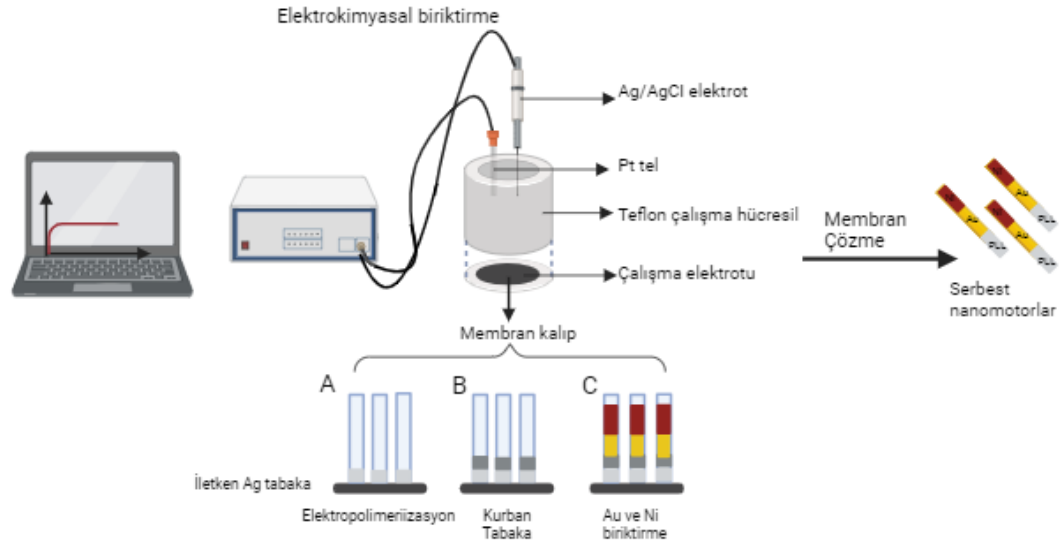
Şekil 3.1. Alümina membranları Ag ile kaplamak için kullanılan Püskürtme Cihazı (Sputter) Bileşenleri

Ayrıca membranları kaplama esnasında alınan görüntü Şekil 3.2.'de verilmiştir. Burada oluşan pembe renk plazma oluşumunu göstermektedir. Plazma, yüksek sıcaklıkta iyonlaşan ve elektriksel iletken hale gelen gazı tanımlayan bir terimdir. Yüzeylerin temiz bir kaplama işlemi için kullanılan bu teknoloji, yüzey bozulmasını azaltır ve çeşitli metalik veya seramik malzemelerin püskürtülmesine olanak tanır (123).



Şekil 3.2. Alümina membranları Ag kaplama işlemi esnasında oluşan plazma ve işlem görüntüsü

Teflon elektrokimyasal hücrede karşıt elektrot olarak Pt tel, referans elektrot olarak ise Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Amino asit monomerinden yola çıkılarak poli-L-lisin, yüzeye 0.1 M NaCl içeren 50 mM (pH 7.4) fosfat tamponunda 10 mM L-lisin varlığında biriktirilmiştir. Elektro-polimerizasyon -0.50 V ile +1.80 V arasında dönüşümlü voltametri tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 3, 5, 10, 20 döngü sayılarında polimerik tabaka oluşturulmuştur. Ayrıca, sabit gerilimde elektroliz (i-t)'de de polimerik tabaka oluşturularak karşılaştırma yapılmıştır. Bu aşama +1.6 V'da 100 sn gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyon çalışmaları hem ilaç yükleme basamağı hem de nanomotor hareketinin etkinliği açısından oldukça önemlidir. Sentezde kullanılan elektrokimyasal biriktirme işlemi şematik olarak Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Elektrokimyasal biriktirme işlemi ile nanomotor sentezinin şematik gösterimi (biorender ile hazırlandı)

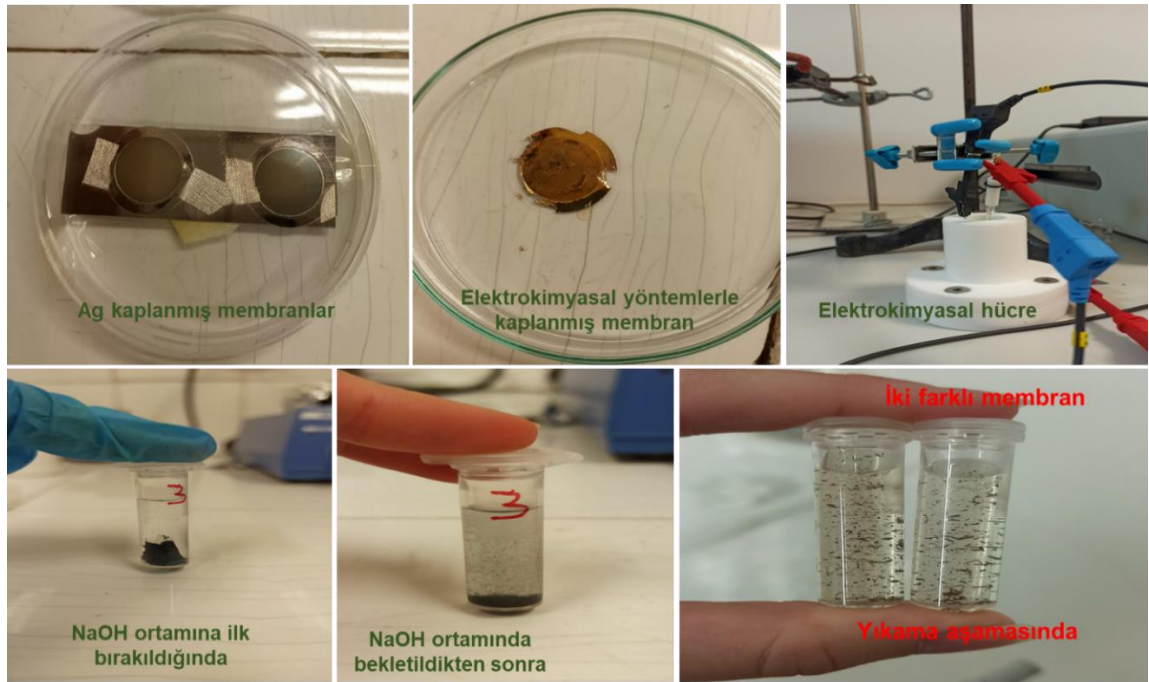
Metal biriktirme aşamalarında ise sabit gerilim veya akımda sistemden yük geçirilerek altın (Au) ve nikel (Ni) metallerinin biriktirilme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda, ilk aşamada -0.95 V'da kurban tabaka görevi gören bakır (Cu) metalik olarak bakır sülfat (CuSO_4) çözeltisinden biriktirilmiştir. Bu sırada sistemden 8 C'luk bir yük geçirilmiştir. Sonrasında Au biriktirme çalışmaları yapılmıştır. Sistemden sabit yük geçirebilmek adına sabit potansiyel ve akımda kaplama çalışmaları yapılmıştır. Sabit potansiyel -1.0 V'ta, sabit akım ise -0.05 A'de tutulmuştur. Kullanılan Au çözeltisi laboratuvarımızda kullanılan ticari kaplama çözeltisidir (Orotemp, Italgavano spa, Technic Group). Sonrasında ise Ni biriktirme çalışmaları yapılmıştır. Ni biriktirme çalışmalarında ise başlangıçta farklı tuz kombinasyonları denenmiştir. En iyi sonuç nikel klorür (45 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve nikel sülfat (300 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) varlığında gerçekleşmiştir. Ayrıca bu aşamada ortamın pH değeri önemli olduğu için borik asit (45 g/L H_3BO_3) eklemesi de yapılmıştır. Bu sırada sistemden geçen yük sabit potansiyelde (-0.95 V'ta) tutulmuştur. Bu değer -1.3 V'a kadar çekildiğinde de yine aynı sonuçlar elde edilmiştir. Devamında yapının daha iyi şekillenmesini sağlamak üzere yapılan son bir Au biriktirme çalışmaları yine aynı şekilde ilk Au tabaka gibi yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yapıda bu

tabakaya da gerek kalmadan düzgün morfolojide motorların hazırlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bu Au tabaka nanomotorun uzunluğunu gereksiz şekilde arttırdığı için tek tabaka Au tabakası yeterli olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen yapıların hareket ve kontrollü yönlendirme (Ni katman sayesinde) özellikleri kontrol edilmiştir. Nanomotor sentezinde değiştirilen parametreler Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Boş nanomotor sentezinde kullanılan parametreler

Parametre	Seçenekler
Farklı biriktirme yöntemi	Dönüşümlü voltametri (CV) tekniği Sabit gerilimde elektroliz (i-t) yönteminde
Polimer biriktirmede döngü sayısı	3, 5, 10 , 20
Polimer biriktirmede pH	5.5 ve 7.4
Uygulanan potansiyel	-0.95 V ile -1.3 aralığı
Farklı Ni çözeltileri	nikel klorür (45 g/L NiCl₂·6H₂O) nikel sülfat (300 g/L NiSO₄·6H₂O)
Au katman sayısı	1 ve 2

Elektrokimyasal olarak membran-kalıp tekniğine göre hazırlanan nanomotorların kalıptan ayrılma, yıkama işlemleri ise şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Ag tabaka alümina tozuyla dikkatlice çözülmüştür. Ardından 8 M HNO₃ ile kurban Cu tabaka çözülmüştür. Bu işlemlerin ardından, nanotellerin kalıptan ayrılması amacıyla membran 3 M NaOH çözeltisinde 1 saat boyunca bekletilmiş ve devamında nötral pH'a kadar saf su ile yıkanmıştır. Yıkama aşamalarında çöktürme basamakları santrifüjde 6000 rpm'de (5 dk) gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal deney düzeneği, membran ve membran çözünme aşamasına ait görseller de aşağıda Şekil 3.4.'te paylaşılmaktadır.



Şekil 3.4. Deneysel sürece ait görseller

3.2.3 Nanomotor Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Partikül Büyüklüğü, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Üretilen nanomotorlar öncelikle boş sonrasında da ara ajan, MemHCl, Polisorbat 80 ve CRANAD-2 maddeleriyle inkübasyon sonrasında partikül büyüklüğü (nm), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) değerlerinin ölçümü için Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Birleşik Krallık) ile analiz edilmiştir. Partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi ölçümleri dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibine dayanmaktadır, zeta potansiyel ölçümleri ise lazer doppler elektroforez prensibine göre yapılmaktadır. Lazer doppler elektroforez yöntemi değişken bir elektriksel alan altında sıvı bir ortamdaki nanomotorlara gönderilen lazerin saçılımı sırasındaki frekans değişikliklerini ölçmektedir (124). DLS yöntemi ise sıvı ortamdaki nanopartiküllerin Brown hareketlerinden kaynaklanan ışık yoğunluğundaki dalgalanmaları ölçmektedir (125). Her bir formülasyon için ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma koşulları Tablo 3.2.'de verilmiştir. Ancak nanomotorların çubuk şekli itibariyle çapları 200-300 nm aralığında olmasına rağmen boyları değişkenlik gösterebilmekte ve aralık olarak 3-5 mikrometre olarak ölçülmektedir. Bunun sonucu olarak Malvern Zetasizer Nano ZS

ile alınan partikül büyüklüğü sonuçları hem boyu hem de çapı algılamakta ve bu nedenle birbirinden farklı boyutta birçok partikül var gibi göstermektedir. Bu da PDI değerinin beklenenden yüksek çıkmasına ve ölçülen partikül büyüklüklerinin birbirinden çok farklı ölçülmesine neden olmaktadır. Bu nedenle partikül boyutunun doğru tespiti için taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi daha doğru sonuçlar vereceğinden bu yöntem hem morfolojik özelliklerin incelenmesinde hem de partikül büyüklüğünün saptanmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Malvern Zetasizer’da gerçekleştirilen çalışma koşulları

Ölçümün Gerçekleştiği Sıcaklık	25°C
Işık Saçılım Açısı	90°
Kullanılan Polimerin (poli-L-lisin) Refraktif İndeksi	1,45
Dispersiyon Ortamı	Deiyonize su
Dispersiyon Ortamı Refraktif İndeksi	1,33
Ölçümde kullanılan Küvet	DTS 1070 (folded capillary zeta cell)

Morfolojik Özellikler

Hazırlanan bu nanomotorlara ait morfolojinin nasıl olduğuna ait görüntüler her aşamada optik mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ayrıca farklı uzunluklarda ve aynı çap aralıklarında hazırlanabilen ve hareket, titreşim özellikleri gözlenen yapıların morfolojilerinin daha iyi ve açık bir şekilde SEM ile tespit edilebileceği bilinen bir gerçektir. Bu nedenle yapıların morfolojik karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanomotorların yoğun bir ortamı da SEM için örnek haznesine damlatılarak (etanol ortamında) kurutulmuştur ve 2 farklı bölgeden üst üste, yan yana gelen motorların görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler ile nanomotorların hem çap ve boy ölçüleri hem de morfolojik özellikleri net bir şekilde tespit edilmiştir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri

MemHCI, boş nanomotor ve MemHCI yüklü nanomotor formülasyonlarının DSC analizi Q 100 DSC (TA Instruments, USA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Özetle, 3-8 mg ağırlığında tartılan numuneler hermetik alüminyum panlar içerisinde tartılmış ve kapakları kapatılarak azot gazı (50 mL/dk) altında 0-300°C sıcaklık aralığında ve dakikada 10°C artış olacak şekilde ısıtılmıştır.

Enerji dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizleri

Nanomotorda yer alan metalik tabakaları ve polimerik poli-L-lisin yapısını elementel olarak görebilmek adına enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisinden (EDX) de faydalanılmıştır. Bu metod, sıvı, katı, toz ve ince film gibi çeşitli materyallerin (yarı katı maddeler için sık kullanılmaz) elementel bileşimini tespit etmek için kullanılan en basit, güvenilir ve maliyet-etkin analitik yöntemlerden biridir.

Bu metodun temel ilkesi şöyledir: Yüksek enerjili radyasyonla iyonize olan malzeme içindeki atomlar karakteristik X ışınları üretirler. Bir EDX sistemi genellikle yüksek enerjili bir radyasyon kaynağı (çoğunlukla elektronlar), numune, katı hal dedektörü (Si-Li) ve sinyal işleme ünitelerinden oluşur. Dedektör tarafından tespit edilen X ışınları, belirlenmiş yoğunluklara sahip piklere dönüştürülerek X ışını enerji histogramı oluşturulur. Bu X ışını histogramı ile malzemede bulunan her elementin türü ve miktarı belirlenebilir (126).

Bu analiz için bir miktar nanomotor etanolde disperse edilerek numune hazırlanmış ve analize bu şekilde alınmıştır.

Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi

MemHCI'nin nanomotor yüzeyine bağlandığını göstermek için enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nanomotorlar MemHCI ile inkübe edildikten sonra santrifüj ile çöktürülmüş, süpernatantlar ayrılarak LC-MS/MS ile analize alınmıştır. İndirekt yöntem ile geliştirilen nanosisteme (bizim için söz konusu nanomotorlardır) yüklenmemiş serbest durumda olan ilaç miktarı analitik metot ile tespit edilmektedir. Enkapsülasyon etkinliği (EE) aşağıdaki formül (Formül 3.3.) kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$EE (\%) = \frac{(\text{Formülasyona eklenen miktar}) - (\text{Süpernatandaki miktar})}{(\text{Formülasyona eklenen miktar})} \times 100 \quad (3.3.)$$

3.2.4 Memantin HCl Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

Boş nanomotorların sentezi sonrası nanomotorlar ile MemHCl etkileşimine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan poli-L-lisin temelli nanomotora farklı sürelerde ilaç yüklenmiştir. Yükleme optimizasyonu için farklı sürelerin denenmesi önemlidir. Etkin madde yükleme işleminin başarılı olup olmadığını kanıtlamak amacıyla hem nanomotorların elektrokimyasal eğrileri alınmış hem de inkübasyon sonrası nanomotorların bekletildiği MemHCl çözeltileri alınarak LC-MS’de miktar tayini analizleri yapılmıştır.

LC-MS yöntemiyle inkübasyon çözeltilerinin analiziyle amacımız elektrokimyasal eğrilerde gözlemleyebildiğimiz etkileşimi nicel olarak % inkübasyon şeklinde hesaplayabilmektir. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilen deney prosedürü aşağıda detaylıca açıklanmıştır.

Nanomotorların miktarını belirleyebilmek amacıyla boş halde ağırlığı belirlenmiş ependorf tüpe aktarılan nanomotorlar 6000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üzerinde bulunan su pipetle çekilip uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde ependorf tekrar tartılmış ve terazide okunan değer not edilmiştir. Sonrasında ependorf tüpün ağzı açık bırakılarak nanomotorların yüzeyinde kalmış olabilecek suyun tamamının uçarak uzaklaşması sağlanmıştır. Bunun için belirli aralıklarla tüp tartılmış ve ağırlık azalışı sabitlenene kadar bu işleme devam edilmiştir.

Nanomotorlar kuruyup bir tüpteki nanomotor miktarı belli olduktan sonra üzerine 100 µL’de 1.00 mg nanomotor olacak şekilde su eklenerek ependorflara paylaştırılmıştır. MemHCl ‘nin motorlara bağlanması için öncesinde motorlar farklı ara ajanlarla inkübe edilerek MemHCl için bağlanma yüzeyleri oluşturulmuştur. Burada üç farklı ajan denenmiştir. Bunlardan birincisi EDC-NHS [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodimit/N-hidroksisüksinimit], ikincisi PSS (polistiren sülfonat) ve sonuncusu PLGA’ dır.

Nanomotorlar ependorflara eşit şekilde bölündükten sonra 1 mg nanomotor üzerine 1 mL 10 mM EDC ve 20 mM NHS içerecek şekilde EDC-NHS çözeltisi hazırlanarak eklenmiş ve 15 dk inkübe edilmiştir. Diğer ara ajanların inkübasyon denemelerinde ise PSS 1 mg/mL yine PLGA’lar da 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 15 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında ara ajan çözeltisi santrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Devamında nanomotorlar üzerine farklı derişimlerde MemHCl

çözültisi eklenerek farklı sürelerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yine santrifüj ile nanomotorlar çöktürülmüş MemHCl çözeltisi ise alınarak analiz için ayrılmıştır. MemHCl yükleme basamağı optimizasyonu için değiştirilen parametreler Tablo 3.3 'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Nanomotor formülasyonları ve değiştirilen optimizasyon parametreleri

<i>No</i>	<i>Nanomotor Formülasyonu</i>	<i>Çalışılan pH</i>	<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Etkileşim ajanı ve inkübasyonu</i>	<i>MemHCl Derişimi</i>	<i>Etkin ile inkübasyon süresi</i>
1	Au-Ni-PLL	7.4	10	EDC-NHS /15 dk	75 µM	1 saat
2	Au-Ni-PLL	7.4	10	EDC-NHS /15 dk	300 µM	1 saat
3	Au-Ni-PLL	7.4	10	EDC-NHS /15 dk	5 mg/mL	1 saat
4	Au-Ni-PLL	7.4	10	EDC-NHS /15 dk	5 mg/mL	6 saat
5	Au-Ni-PLL	7.4	10	EDC-NHS /15 dk	5 mg/mL	24 saat
6	Au-Ni-PLL	7.4	10	Yok	5 mg/mL	1 saat
7	Au-Ni-PLL	7.4	10	PSS /15 dk	5 mg/mL	1 saat
8	Au-Ni-PLL	7.4	10	PLGA Asit /15 dk	5 mg/mL	1 saat
9	Au-Ni-PLL	7.4	10	PLGA Ester /15 dk	5 mg/mL	1 saat
10	Au-Ni-PLL	7.4	20	Yok	5 mg/mL	1 saat
11	Au-Ni-PLL	7.4	20	EDC-NHS /15 dk	5 mg/mL	1 saat
12	Au-Ni-PLL	7.4	20	PSS /15 dk	5 mg/mL	1 saat
13	Au-Ni-PLL	5.5	20	Yok	5 mg/mL	1 saat
14	Au-Ni-PLL	5.5	20	EDC-NHS /15 dk	5 mg/mL	1 saat
15	Au-Ni-PLL	5.5	20	PSS /15 dk	5 mg/mL	1 saat

3.2.5. Polisorbat-80 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

İlaç yüklü motorlara polisorbat-80 etkileşim işlemi için %1'lik polisorbat-80 çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiden 1 mL nanomotorlar üzerine eklenmiş, 10 dk, 30 dk ve 60 dk olmak üzere üç farklı sürede inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası nanomotorlar 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve polisorbat çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Bu motor ortamına kalem grafit elektrotlar (PGE'ler) daldırılarak modifikasyon gerçekleştirilmiş ve motor modifiye elektrotların bu işlem sonrası dönüşümlü voltametrik davranışı incelenmiştir. Elektrokimyasal cevaplar, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks çifti içeren 0.1 M KCl elektroliti içerisinde alınmıştır.

3.2.6. CRANAD-2 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

Polisorbat kaplı MemHCl yüklü motorlar ile CRANAD-2 etkileşimi ise bu boyanın 5 μM olacak şekilde pH 7.4 0.01 M fosfat tamponunda çözülmesi ve 45 dk inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu basamakta, motorlar alüminyum folyo ile kapatılarak muhafaza edilmiştir. Yıkamanın ardından nanomotorlar saf suda askıda bırakılmıştır. Bu motor ortamına PGE'ler daldırılarak modifikasyon gerçekleştirilmiş ve motor modifiye elektrotların bu işlem sonrası dönüşümlü voltametrik davranış incelenmiştir. Elektrokimyasal cevaplar, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks çifti içeren 0.1 M KCl elektroliti içerisinde alınmıştır.

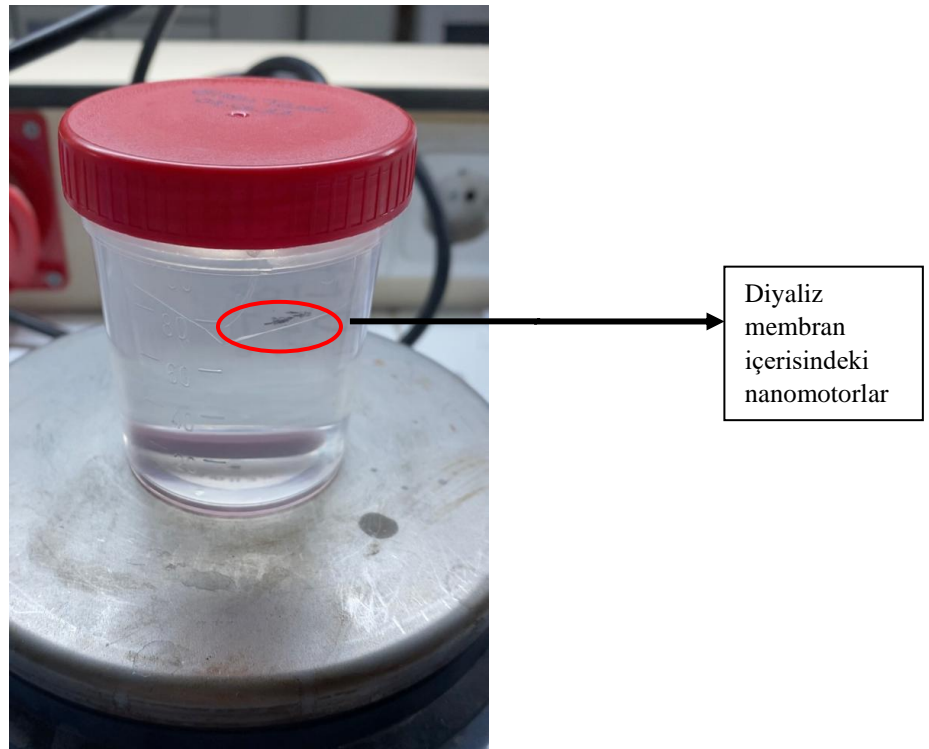
3.2.7. Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi

Hazırlanan nanomotor formülasyonlarının manyetik karakterizasyon çalışmaları Optik mikroskop altında kaydedilen videoların analizi ile yapılmıştır. Bir miktar su içerisinde dağıtılan nanomotorlar lamel üzerine damlatılarak mikroskopa yerleştirilmiştir. Mıknatıs ile farklı yön ve açılarda nanomotorlar hareket ettirilmiş ve $n=6$ olacak şekilde boş ve etkin madde yüklü nanomotorların videoları kaydedilmiştir. Kaydedilen videolar daha sonra ImageJ programı ile analiz edilerek motorların hızları (velocity) hesaplanmıştır.

Ayrıca boş nanomotorlara kare şekli ve G harfi çizdirilmiştir. Nanomotorlara çizdirilen şekiller ImageJ programında işaretlenerek nanomotorun hareketi takip edilmiştir.

3.2.8. In Vitro Salım Çalışmaları

Salım deneyi diyaliz membran yöntemi ile pH 7.4 fosfat tamponu ortamında $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırmaları sonucu 12-14 kD, 25mm 100ft 16 mm çaplı, selüloz membran (Spectra/Por 4) MemHCI salım çalışmaları için uygun bulunmuş ve çalışmalar bu membran ile gerçekleştirilmiştir. Membrana 5 mL hacimde dağıtılmış nanomotor sistemi eklenmiş, 100 mL hacimdeki dış ortama membran bırakılmıştır. Karıştırma işlemi 200 rpm'de gerçekleştirilmiştir. 72 saat boyunca salım devam etmiş ve belli aralıklarda numune alınmış her numune alınışında sink koşulun devamını sağlamak için aynı hacimde taze hazırlanmış tampon ortama eklenmiştir. 15.dk, 30.dk, 45.dk, 60.dk, 120.dk, 4 sa, 8 sa, 12 sa, 24 sa, 36 sa 48 sa ve 72 sa olmak üzere 12 noktada numune alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler LC-MS ile analiz edilmiştir. Salım çalışması devam ederken alınan görüntü Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Salım çalışması devam ederken alınmış sistem görüntüsü

3.2.9. Nanomotor Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan nanomotorların stabilitesi in vivo çalışmalara taşınması kararı verilen formülasyon üzerinden yapılmış ve ICH Rehberi doğrultusunda çalışmalar gerçekleştirilmiştir (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2003).

Seçilen formülasyon etkin madde yüklemeksizin hazırlandıktan sonra 2 mL'lik ependorf tüplere aktarılarak Tablo 3.4.'te gösterilen şekilde farklı koşullarda muhafaza edilmiştir. Formülasyonlar beklerken nanomotorların agregasyonunu önlemek amacıyla bir miktar (1 mL) su içerisinde bekletilerek saklanmıştır. Her bir zaman noktasında 6 numune alınarak elektrokimyasal eğrileri alınmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 3.4. Stabilite çalışmaları için kullanılan farklı saklama koşulları

Çalışma	Saklama Koşulu	Zaman	Örnekleme
Uzun Süreli (Buzdolabı Koşulunda)	5°C ± 3°C	12 ay	0-1-2-3-6-9-12
Hızlandırılmış (Oda Sıcaklığında)	25°C ± 2°C / %60 ± %5 RH	6 ay	0-1-2-3-4-5-6

3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında 3 farklı hücre hattı ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlar HEK293T hücreleri, nöronal kaynaklı SH-SY5Y ve hCMEC/D3 beyin mikrovasküler endotel hücreleridir. Önce her bir hücre hattı uygun ortamlarında açılmış, büyütülmüş ve çoğaltılmıştır. Her hücre grubu için gereken ortam koşulları aşağıda sırası ile verilmiştir.

HEK293T, %10 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren yüksek glikoz-DMEM kültür ortamında büyütülmüştür. SH-SY5Y, %10 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren düşük glikoz-DMEM kültür ortamında büyütülmüştür. hCMEC/D3 hücreleri ise sağlayıcı firmanın önerdiği kolajen kaplı kültür kapları içerisinde ve epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, hidrokortizon, %5 fetal dana serumu ile zenginleştirilmiş EndoGRO besi yerinde çoğaltılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa

ulaştığında Tripsin-EDTA ile pasajlanmıştır. Hücre kültürleri 37°C, %5 CO₂ ve %85 nem içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Hücreler için deney basamakları: Öncelikle flask içerisindeki medium atılır. Tekrar PBS ile hücreler yıkanır. Hücrelerin tutundukları flask yüzeyinden ayrılmaları için 600 µl Tripsin-EDTA eklenir. İnkübatöre 37°C’de 2 dk inkübe edilir. Tripsin-EDTA hücrelerin üzerinden alınır ve medium eklenir. Mediumda süspende halde bulunan hücreler 1800 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülür. Çöken hücreler 15 mL mediumda tekrar dağıtılır. Hücrelerden 10 µl alınarak üzerine de 10 µl tripan mavisi eklenir. Hemositometre ile mikroskop altında sayım yapılır.

Öncelikle MemHCl çözeltisinin her hücre grubunda etkili IC₅₀ dozu yani canlılığın veya aktivitenin % 50 oranında inhibe edilmesi için gereken dozu bulunmuştur. Ayrıca IC₂₀ dozu yani canlılığın veya aktivitenin % 20 oranında inhibe edildiği, hücrelerin %80 oranında canlılığını koruması için gereken dozu bulunmuştur. Bunun için her hücre grubunda daha önce yapılmış çalışmalar da referans alınarak konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. MemHCl hücreler üzerine her hücre hattının kendi ortamı (besi yeri) içerisinde çözeltisi hazırlanarak uygulanmıştır. Hazırlanan çözeltiliye yine hücre kültürü ortamı ile seri seyreltme uygulanarak doz titrasyonu sağlanmıştır. HEK293T hücreleri için konsantrasyon aralığı 9-300 µM arası, SH-SY5Y hücreleri için 200-1200 µM arası olarak belirlenmiştir. hCMEC-D3 hücre hattı ise pahalı bir hücre hattı olup aynı zamanda hücrelerin büyümesinin kullanılan diğer hücre gruplarına kıyasla daha zahmetli ve uzun bir süreç oluşu, uygun büyüme şartlarını sağlamak için kullanılan ortam koşullarının da birçok bileşen içermesi ve bu bileşenlerin de pahalı olması sebebiyle en son çalışılan hücre hattı olmuştur. Bu hücre hattı için doz seçiminde HEK293T ve SH-SY5Y için hesaplanan IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri kullanılmıştır. hCMEC-D3 hücreleri için seçilen bu dört doz 250 µM, 125 µM, 90 µM ve 45 µM’dir.

Literatür bilgisine göre HEK293T hücreleri için her kuyucuğa 4x10³ hücre ekilmesi planlanmıştır. SHSY5Y hücreleri için ise her kuyucuğa 15x10⁴ hücre ekilmiştir. hCMEC-D3 hücre hattı için ise ekilen hücre sayısı 20x10³’tür. Her kuyucuğa 50 µl hacimde olacak şekilde 96-kuyulu plaklara hücreler ekilmiştir. Hücreler plaklara ekiminden 24 saat sonra kontrol edilmiş yüzeye tutundukları ve canlılıklarının uygun olduğu saptandıktan sonra etkin maddenin yukarıda belirtildiği

gibi çözeltisi hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. Hücrelerin 48 saat bu çözeltiler ile inkübasyonundan sonra MTT (3-[4,5-dimetil tiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan MTT protokolü şu şekildedir:

Etkin madde çözeltisi uygulanan plaklara 24 ve 48 saatlik sürelerin sonunda 25 µl %0,5'lik MTT çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda her bir kuyucuğa 80 µl %23'lük SDS çözeltisi eklenerek oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Plaklarda gece boyunca bekletilmiş oluşan mor rengin absorbansı 24 saatin sonunda 570 nm'de ELISA plak okuyucu ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlardan hareketle memantinin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Nanomotorların hücre canlılığına zarar vermediğinin doğrulanması

Tespit edilen IC₅₀ ve IC₂₀ değerini verecek şekilde nanomotorlara MemHCl yüklenerek etkin yüklü motorların toksisitesi ve MemHCl' yi taşıyan motor miktarı tek başına da verilerek etkin yüklü olmayan (boş) nanomotorların toksisitesi saptanmıştır.

Hücre canlılığının tespit edilebilmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Yine formülasyon uygulanan plaklara 24 ve 48 saatlik sürelerin sonunda 25 µl %0,5'lik MTT çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda her bir kuyucuğa 80 µl %23'lük SDS çözeltisi eklenerek oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Plaklarda gece boyunca bekletilmiş oluşan mor rengin absorbansı 24 saatin sonunda 570 nm'de ELISA plak okuyucu ile ölçülmüştür.

Nanomotor formülasyonlarının hücre içerisine alın analizleri

Non-toksik konsantrasyonu ve toksisiteye neden olmayacak inkübasyon süresi belirlenen nanomotorlar Nil kırmızısı ile yüklenerek SH-SY5Y hücreleri (6-kuyulu plaklar, 2x10⁶ hücre) ve hCMEC-D3 hücreleri (6-kuyulu plaklar, 1x10⁶ hücre) ile 1,5, 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu aşamada, nanomotorların hareketliliklerinin sağlanmasına yönelik olarak nanomotorun hareketi manyetik alan ile gerçekleştirilmiştir. Mıknatıs blok ile nanomotorlara yön verilecek hücre içerisine girişleri takip edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda akım sitometri analizi ile hücrelerin nil kırmızısı ile boyanma yüzdesi ve floresan yoğunluğu akım sitometri analizi ile değerlendirilmiştir. Parçacıkların hücre içerisine

alım kinetiğine göre, en yüksek floresan yoğunluğunun elde edildiği zaman aralığında nanomotor formülasyonların hücre içerisindeki yerleşimi de floresan mikroskopi ile de görüntülenmiştir.

Tirozin reseptör kinaz B (TrkB) enzimini yüksek düzeyde ifade eden hücrelerin oluşturulması

Öncelikle plazmid çoğaltma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sipariş verilen plazmid (TrkB (NTRK2) (NM_006180) Human Tagged ORF Clone, Origene) E.Coli bakterisi içerisine yüklenmiş ve bakteri kolonileri oluşturularak çoğalan bakteri ile birlikte plazmidlerin de çoğaltılması sağlanmıştır. Çoğaltılmış plazmidin ilk seri ile aynı olup olmadığı jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir. Bu yöntem için ilk seri plazmid ve çoğaltılan koloniden alınan plazmidler agaroz jel içerisinde 2 saat elektrik akımında yürütülmüştür. Plazmidlerin bantları kontrol edilmiştir. Ayrıca transfeksiyon etkinliği farklı miktarlarda plazmid eklenmesi ile test edilmiş ve sonuçlar kıyaslanarak transfeksiyonun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan plazmidlerin uygun olduğu kararından sonra hücreye aktarım çalışmalarına geçilmiştir.

Bir gece önceden 6-kuyulu plaklara ekilen HEK293T hücrelerinin (2.5×10^5) üzerinden serumlu kültür ortamı çekilerek serumsuz ve antibiyotiksiz besi yeri eklenmiştir (Opti-MEM). TrkB plazmidini, Lipofectamine3000TM lipozomal transfeksiyon ajanı kullanılarak (500 ng – 2 ug plazmid DNA, 1:1 DNA:lipozom oranı, 24 saat transfeksiyon süresi) HEK293T hücrelerine aktarılmıştır. Bu aktarım için öncelikle DNA:lipid kompleksi hazırlanmıştır. Bunun için aşağıda anlatılan basamaklar takip edilmiştir.

125 µL Opti-MEM içerisine 7.5 µL Lipofectamine 3000 eklenmiştir. Bu lipid karışımı vortekslenerek kenara ayrılmıştır. Aynı bir tüpte yine 125 µL Opti-MEM içerisine 10 µL plazmid ve 2 µL P3000 reagent eklenmiştir. Karışım vortekslenmiştir. Sonrasında DNA içeren tüp Lipid içeren tüp içerisine eklenmiş ve karıştırılmıştır. Lipid:DNA kompleksi oluşumu için 15 dk beklenmiştir. Bekleme sonrası hücrelerin üzerine oluşan kompleks damla damla eklenerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra ilgili hücrelerde TrkB ekspresyonunun ve aktivitesinin artışı total TrkB düzeyinde Western-Blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

Nanomotor formülasyonuna yüklenen memantinin TrkB'yi uyararak BACE1 enzim aktivitesini düşürme etkinliğinin değerlendirilmesi

TrkB geni aktarılmış HEK293T ve hâlihazırda TrkB ifadesi bulunan SH-SY5Y hücreleri non-toksik olduğu belirlenen ilaç yüklü nanomotor konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Kontrol olarak hücelere yalnızca boş nanomotorlar, MemHCI çözeltisi ve sadece besi yeri uygulanmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak transfeksiyon gerçekleştirilmemiş HEK293T hücreleri de bu işlemin sonunda TrkB fosforilasyonundaki artış ve/veya devamlılık Western-Blot yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca, TrkB uyarımına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde azalması beklenen β -sekretaz BACE1 (Beta amiloid öncü protein kesici enzim 1) aktivitesindeki düşüş BACE1 Activity Assay kit (71656, BPS Bioscience) ile değerlendirilmiştir.

Western-Blot yöntemi: Total TrkB düzeyleri Western-Blot yöntemi ile araştırılmıştır. Kısaca, proteaz inhibitörlerini içeren RIPA tampon çözeltisi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak TrkB geni aktarılmış HEK293T ve hâlihazırda TrkB ifadesi bulunan SH-SY5Y hücrelerinden lizatlar hazırlanmıştır. Hücre lizatlarındaki protein miktarlarının belirlemesi Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak yapılmıştır. SDS-PAGE jel elektroforezi ile yürütülen protein lizati iBlot transfer cihazı (Invitrogen, ABD) kullanılarak PVDF membrana aktarılmıştır. Membranlar süt tozu ile bloklama, primer (total TrkB) antikolar ile inkübasyon, yıkama, sekonder antikolar ile inkübasyon ve yıkama aşamalarından geçirilmiştir. Kemilüminesans ECL ile muamele edilen membranda ilgili proteinlerin ekspresyon analizleri (Molecular Imaging System-Carestream Health, Inc) görüntüleme sistemi ile yapılmıştır.

BACE1 aktivite ölçüm yöntemi: 6 kuyulu plakalara ekilen hücreler üzerine ilaç yüklü nanomotor, boş nanomotor, MemHCI çözeltisi eklenmiştir. Kontrol olarak sadece besi yeri eklenen hücreler kullanılmıştır. Hücrelerden lizatlar alındıktan sonra BACE1 aktivite testi için kullanılan kit prosedürü takip edilerek örnekler ölçüm için hazır hale getirilmiştir. Ölçülecek örnekler haricinde blank, pozitif kontrol ve test inhibitörü kuyuları hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle kit içerisinde çıkan tampon çözeltisine (69 μ L) yine kit içerisinde çıkan BACE1 peptid substratı (1 μ L) eklenerek ana karışım oluşturulmuştur. Bu karışım blank olarak ölçülecek kuyu hariç tüm kuyulara eklenmiştir. Blank sadece 100 μ L tampon içermektedir. Pozitif kontrol

70 µL ana karışım, 10 µL tampon ve 20 µL BACE1 enzimi (8.2 ng/ µL) içermektedir. Test inhibitörü kuyucuğu yine 70 µL ana karışım, 10 µL %1 DMSO ve 20 µL BACE1 enzimi içermektedir. Örnekler ise 70 µL ana karışım ve 30 µL hücre lizati içermektedir. Numuneler hazırlandıktan sonra 96 kuyulu plakalara eklenmiştir. Çalışma duplike olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kit fluorojenik bir kit olduğu için floresans ölçüm yapabilen FLUOstar Omega (BMG LABTECH) plaka okuyucusu kullanılmıştır. Cihaz floresan okuma esnasında kinetik moda çalışmadığı için manuel olarak 1 dk'da bir ölçüm alınarak 20 dk boyunca ölçüm alınmıştır. Ölçüm sonuçları grafikleştirilmiştir.

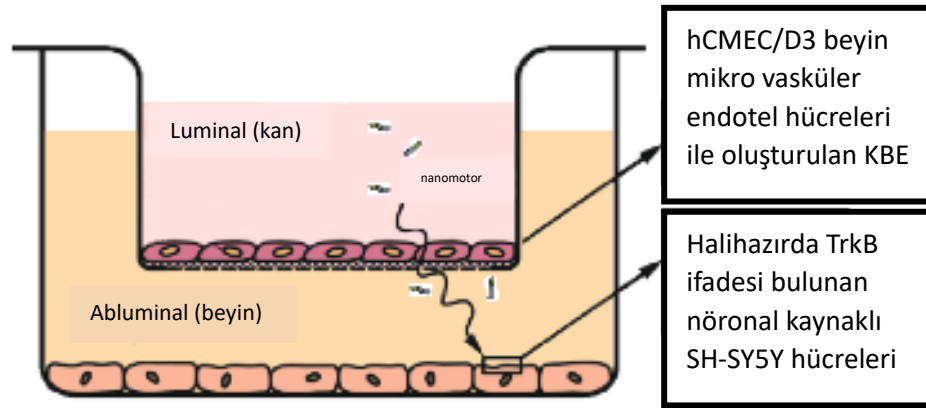
Nanomotor Formülasyonu ile Taşınan Etken Maddenin Kan-Beyin Engeli Varlığında TrkB ve Beta Sekretaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

KBE modelinin oluşturulması: hCMEC/D3 hücreleri 1 µm por açıklığına sahip polikarbonatmembranlar üzerine öncelikle Tip I kolajen kaplanmış ve daha sonra hücreler ekilerek tüm membran alanını kaplayıncaya kadar (*fullconfluency*) büyütülmüştür. Oluşan tek hücre tabakasının üst ve alt kompartmanlar arasında sızıntı yapmadığı transepitelyal elektrik direnci (*TEER, transepithelialelectricalresistance*) ölçümü ile belirlenmiştir. Elektrik direncinin $7\Omega\text{cm}^2$ 'den düşük ölçüldüğü kültür koşulunda endotelial hücrelerin bariyer görevine başladığı kabul edilmiştir.

Etken maddenin KBE'den geçiş analizleri: Üst kompartmana doğrudan MemHCI ve MemHCI yüklü nanomotor eklenip kan beyin engelini geçen madde miktarı, alt kompartmandan örnek alınarak geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile belirlenmiş, bu sayede geliştirilen kontrollü salım sisteminin salım özellikleri çift kompartmanlı hücre kültürü sisteminde analiz edilmiştir.

İn vitro KBE modeli altına yerleştirilen nöronal hücrelerde nanomotor formülasyonlarının etkinliğinin değerlendirilmesi: hCMEC/D3 hücreleri membran üzerinde üretilip TEER ölçümleri ile bariyer oluşumu doğrulandıktan sonra (yani KBE model oluşumu tamamlandıktan sonra) aynı kültür plağının alt kompartmanına nöronal SH-SY5Y hücreleri ekilmiştir. Daha sonra, membranın üst kısmına MemHCI çözeltisi, Au-Ni-PLL nanomotorlar ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor

formülasyonu eklenerek 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra SH-SY5Y hücrelerinin besiyeri toplanarak LC-MS/MS ile analize alınmıştır. SHSY5Y hücrelerinden ise lizatlar hazırlanarak BACE1 aktivitesi analiz edilmiştir. TrkB ifadesi ise yeterli miktarda protein çıkarılmadığı için analiz edilememiştir. Hazırlanan in vitro KBE modelinin şematik gösterimi Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Çift kompartımanlı hücre kültürü modelinin gösterimi (127)

3.2.11. İn-vitro Hücre Kültürü Modelinde Metabolomik Analizlerin Yapılması

Metabolomik analiz belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük moleküllü metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlaması ve miktarının belirlenmesidir. Diğer omik teknolojilerine göre en büyük avantajı yaşayan organizma fenotipinin anlık resmini göstermesidir. Tez çalışmaları kapsamında metabolomik analizler iki farklı analitik platform (GC-MS ve LC-qTOF-MS) kullanılarak SHSY-5Y hücre hattının Memantin çözeltisi, Au-Ni-PLL nanomotorlar ve Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor formülasyonu ile muamelesi sonrasında metabolomik profillindeki değişiklikler değerlendirilmiştir.

Metabolomik analizler başlıca üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar numune hazırlama, metabolitlerin analizi ve elde edilen verilerin analizleridir.

Numune hazırlama: %100 doluluğa ulaşmış SH-SY5Y hücre hattı, inkübasyon sonrası sonra üç defa izotonik NaCl çözeltisi ile hızlı bir şekilde yıkanıp buz soğukluğundaki metanol:su karışımından (8:1, h/h) 1 mL eklenmiştir. Petri kutusu hafifçe çalkalandıktan sonra sıvı azot içine konarak hücrelerin dondurulması

sağlanmıştır. Sıvı azot içinde 3 dakika bekleyen petri kutularındaki hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak alınmıştır. Hücreler 4 °C'de 15000 rpm'de çöktürüldükten sonra üst faz 2 mL'lik ependorf tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Metabolomik analizler: GC-MS; -80 °C'den çıkarılan metanol ekstraktları 5 mg iç standart (IS), miristik asit-d27, eklendikten sonra vakumlu santrifüjde tamamen kuruluğa kadar uçurulmuştur. Numunelerin tamamen kurduğuna emin olunduktan sonra metoksiaminhidroklorür ve N-metil-N-trimetilsililtrifloroasetamit+trimetilklorosilan (MSTFA + 1% TMCS) ile türevlendirilmiştir. Türevlendirilen numunelerin GC-MS ile DB5-MS kolon kullanılarak analizleri yapılmıştır. Sonucunda kompleks kromatogramlar elde edilmiş bunlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları SpectConnect yazılımı kullanılarak düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Elde edilen metabolit pikler alıkonma indeksli kütüphaneler kullanılarak (Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri) tanımlanmıştır (128, 129).

LC-qTOF-MS; -80 °C'den çıkarılan metanol ekstraktları 2 mg iç standart, 13C6 fenilalanin, eklendikten sonra vakumlu santrifüj ile tamamen kuruluğa kadar uçurulmuş ve su:asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile tekrar çözündürülmüştür. Metabolit analizleri HILIC (ZIC-pHILIC 50 mm 4.6 mm, 3 µm) ve C18 (HSS 2.1 x 50 mm, 3 µm) kolonlar kullanılarak negatif ve pozitif iyonizasyon modunda olmak üzere LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmiştir (130). Her iki kromatografik sistemde gradient elüsyon uygulanarak analizler yirmi dakikada gerçekleştirilmiştir. LC-qTOF-MS ile analizler Hacettepe Üniversitesi İlaç ve kozmetik Araştırma Geliştirme Laboratuvarı (HUNİKAL)'ından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar MPP (Agilent) yazılımı kullanarak düzenlendikten sonra veri matrisleri oluşturulmuştur. Oluşan veri matrisindeki piklerin tanımlanması METLIN Kütüphanesi (Agilent) kullanılarak ±5 ppm aralığında gerçekleştirilmiştir.

Veri analizi: GC-MS ve LC-qTOF-MS analizleri sonucunda elde edilen veri matrisleri ayrı ayrı Excel dosyasına aktarılarak kullanılan iç standartlara göre normalize edilmiştir. Data verilerindeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Her iki analitik cihazdan elde edilen veri setleri ve tanımlanan metabolitlerin pik alanları excel dosyasına aktarılarak

birleştirilmiştir. Sonrasında oluşturulan veri matrisi SIMCA-P+ programında temel bileşenler analizi (PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile değerlendirilerek grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur. Bu verilerden yararlanarak hücre hatlarının tedavi sonucunda metabolomik profilinin kontrol grubundan farklılığı değerlendirilmiştir.

3.2.12. İn Vivo Çalışmalar

Bu aşamada ilaç taşıyıcı sistemin sağlıklı BALB/C farelerde biyodağılımı ve KBE geçirgenliği üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma Kobay A.Ş. 21.03.2019 tarihli 365 numaralı etik kurul izni ile yürütülmüştür. Nil kırmızısı ile hazırlanmış ve UV altında sterilize edilmiş nanomotor formülasyonları farelere (n=2) i.v. yolla enjekte edilerek farklı zaman aralıklarında (30dk, 2 saat) in vivo görüntüleme sistemi ile (beyin, karaciğer, dalak, böbrek, kalp, akciğer) bölgelerindeki tutulumları incelenmiştir. Kontrol olarak tek başına PBS içerisinde Nil kırmızısı uygulaması yapılan grup ile karşılaştırma yapılmıştır. Zamana bağlı olarak elde edilen NIR floresan ışımaya verilerinin her organ için boya enjeksiyonu öncesinde alınan ışımaya değerlerine oranlanması ile biyodağılım kinetiği hakkında bilgi edinilmiştir.

Nil kırmızısı konsantrasyonu MemHCl'nin literatürle uyumlu olarak seçilen terapötik dozunu taşıyacak miktarda nanomotor sistemine yüklenmiştir. Nil kırmızısı yükleme işlemi için de etkin madde yükleme basamakları takip edilmiş ve etkin madde ile aynı 5 mg/mL konsantrasyon seçilmiştir.

Ayrıca, beyin dokusundan hücre süspansiyonları hazırlanarak akım sitometri analizleri ile pozitif hücre yüzdesi ve floresan yoğunluğunun da nicel olarak değerlendirilmiştir. Akım sitometri analizleri Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi Temel Onkoloji Anabilim dalında gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel Değerlendirme

Yukarıda detayları açıklanan iş paketleri dahilinde yapılacak çalışmalarda elde edilecek sonuçlar IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Armonk, New York, ABD) ve GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) yazılımları kullanılarak istatistiksel değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bu değerlendirme çalışmaları için yanılma düzeyi $p=0.05$ olarak alınmış ve gruplar arası farklılıklar

ANOVA testi ile incelenmiş ve ikili grupları arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

Tez Çalışmaları Kapsamında Tasarlanan ve Kullanılan Nanomotorlara İlişkin Formülasyon Kodları

Tez kapsamında geliştirilen formülasyonlar sonuçlarda verilen grafikler üzerinde kısaltmalar (kodlar) kullanılarak gösterilmiş bu sayede kolay bir sunum amaçlanmıştır. Hazırlanan kodlar ve bu kodların ifade ettiği formülasyon özellikleri Tablo 3.5.'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen nanomotorlar ve bu nanomotorlara ait formülasyon kodları

Formülasyon Kodu	Formülasyon Özellikleri
Au-Ni-PLL	Etkin madde yüklenmemiş (boş) nihai nanomotor formülasyonu
Au-Ni-PLL/MemHCl	Memantin HCl yüklü nihai nanomotor formülasyonu
Au-Ni-PLL/NR	Nil kırmızısı yüklü nihai nanomotor formülasyonu

4. BULGULAR

4.1. Memantin'in Miktar Tayini Yapılmasına Yönelik LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyonu

MemHCI etkin maddesinin miktar tayini için hazırlanan 1.0 µg/mL konsantrasyondaki çözelti gereç ve yöntem bölümü "3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu" kısmında verilen koşullarda gerçekleştirilen LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen pikler Şekil 4.2. 'de verilmiştir. Metot validasyonu için seçilen optimum kromatografik koşullar Tablo 4.1.'de sunulmaktadır. Etkin maddenin tayininin yapılabilmesi için Amantadin iç standart olarak kullanılmıştır (0.50 µg/mL).

Tablo 4.1. Metot validasyonu için seçilen optimum kromatografik koşullar

Cihaz	Shimadzu LC-20AXR ve Shimadzu 8030 MS/MS
Method	LC/MS-MS
Kolon	C18 kolon (GL Sciences, 50 x 3.0 mm, 2.1 µm)
Mobil Faz	%0.1 Formik asit ve metanol: su (50:50)
Analiz Türü	Gradient elüsyon
Enjeksiyon Hacmi	1 µL
Akış Hızı	0.4 mL/dk
Dedektör	Kütle Dedektörü (triple quatropol)
Sıcaklık	40°C
Analiz süresi	5 dk
Konsantrasyon Aralığı	0.01-10.00 µg/mL

Sistem uygunluk testi

LC-ESI-MS/MS sisteminin optimum analiz koşulları altında sistem uygunluğu, asimetri (%10), kolon verimliliği (teorik tabaka sayısı, N), kapasite faktörü (k') ve kuyruklanma faktörü parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Elde

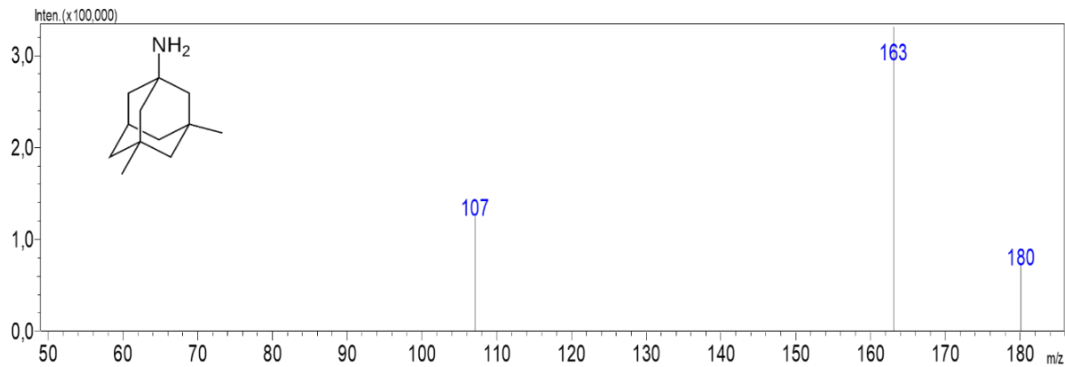
edilen değerlerin belirtilen limitler (ICH-Q2B) dahilinde olup, sistemin MemHCl analizi için uygun şartlarda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Memantin için sistem uygunluk parametreleri

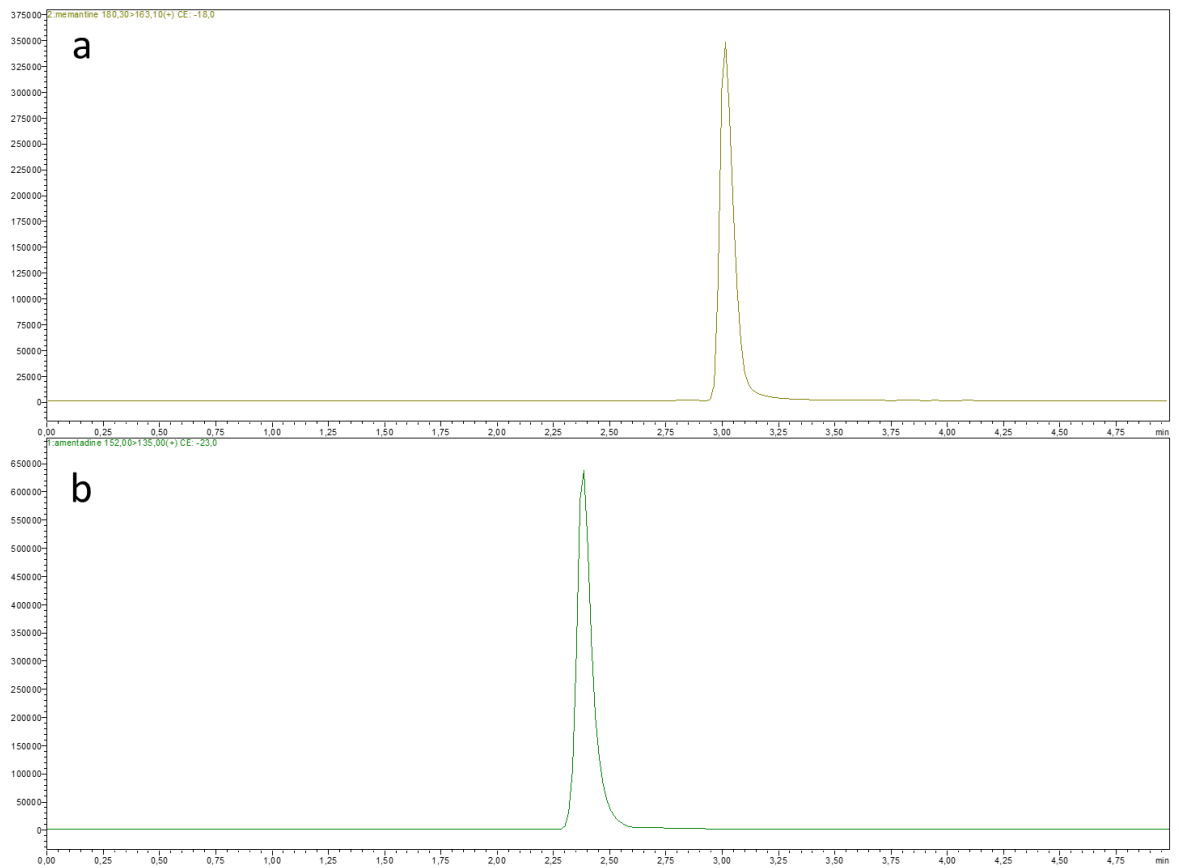
	Bulanan	Sınırlar
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği (BSS (t_R))	%0.21	<% 1
Teorik tabaka sayısı (N)	253060	>2000
Kapasite faktörü (k')	2.7	$1 < k' < 5$
Kuyruklanma faktörü	1.242	$T < 2$

Seçicilik

Gereç ve yöntem bölümünün “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında verilen koşullarda çalışmalar yapılmıştır. Analitik metot geliştirildikten sonra MemHCl 1.00 µg/mL ve Amantadin 0.50 µg/mL konsantrasyona sahip numunelerine ilişkin kromatogramlar alınmış ve sonuçlar aşağıda gösterilmektedir (Şekil 4.2.). MemHCl'nin MS/MS parçalanma modeli ise Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Memantin'in MS/MS parçalanma modeli (Quantifier iyon: 163 m/z, qualifier iyon: 107 m/z)



Şekil 4.2. Optimum kromatografik koşullarda A) Memantin (1.00 µg/mL) ve B) İç standart (0.50 µg/mL) kromatogramları

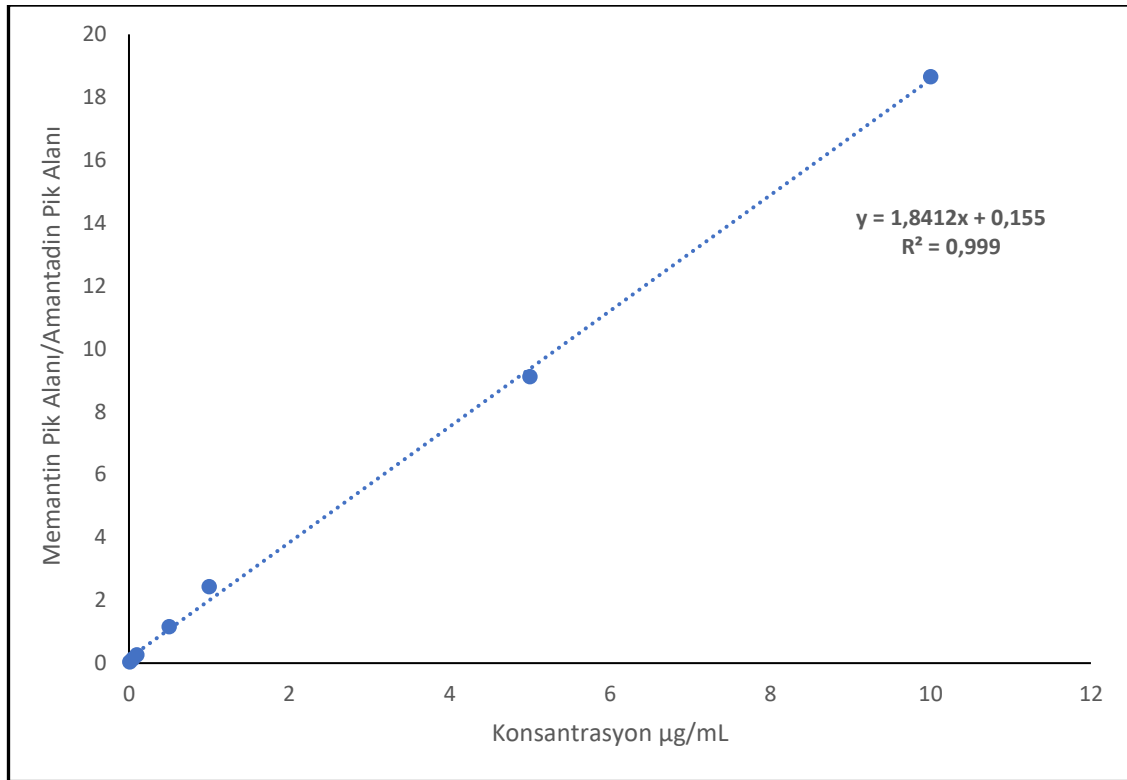
Doğrusallık

Gereç ve yöntem bölümü “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” başlığında açıklanan analiz koşullarında doğrusallık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayısı değeri 0.01-10.00 µg/mL konsantrasyon aralığında, 0.998 ± 0.0005 olarak belirlenmiştir. Eğim ve kesişim değerleri (ortalama \pm SH; n=10) sırasıyla $1.8493 \pm 0,0942$ ve $0.1648 \pm 0,0304$ olarak tespit edilmiştir. Alınan sonuçlar geliştirilen yöntemin çalışılan derişim aralığında MemHCl için kabul edilebilir bir doğrusallıkta olduğunu göstermektedir. MemHCl' ye ait doğrusallık verileri Tablo 4.3.'te verilmiştir. MemHCl' ye ait kalibrasyon doğrusu ise Şekil 4.3.'te sunulmuştur.

Tablo 4.3. Memantin HCl için doğrusallık verileri

	Memantin HCl
Analiz regresyon denklemi	$y = 1,8412x + 0,155$
Determinasyon katsayısı (R^2)	$0,998 \pm 0,0005$
Doğrusallık aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	0,01-10,00
Veri noktası sayısı	10
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0.005
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,01

**Şekil 4.3.** Memantin HCl için kalibrasyon doğrusu (Ort. \pm SH, n=3)

Duyarlılık

Gereç ve yöntem bölümünde “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında belirtilmiş olan çalışma koşullarında duyarlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

LOD ve LOQ değerleri sırasıyla sinyal/gürültü oranının 3:1 ve 10:1 olduğu MemHCI derişimi olarak tespit edilmiştir. LOD, 0,005 µg/mL ve LLOQ, 0.01 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çalışılan yöntemin hazırlanan formülasyonlarda ve ilaç sistemlerinde MemHCI analizi için yüksek hassasiyette olduğunu göstermiştir.

Matriks Etkisi

Gereç ve yöntem bölümünde “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında belirtilmiş olan çalışma koşullarında matriks etkisi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Matriks faktörü MemHCI için %91,20±14,29, iç standart için %93,07±5,70 olarak bulunmuştur. Nominal değerden sapma ±%15 olmalıdır. Bu sonuçlar, MemHCI' nin ve iç standardın iyonlaşması ve parçalanması üzerinde hiçbir matriks etkisinin tespit edilmediğini göstermektedir. Bu nedenle, geliştirilen yöntem için matriks etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür.

Carry over (Taşınma)

Carry over, en yüksek derişimdeki kalibrasyon standardının (10.00 µg/mL) analizinden hemen sonra kör çözeltilerin enjeksiyonu ile belirlenmiştir. Boş matriks numunelerinin hiçbirinde carry over görülmemiştir.

Kesinlik ve Doğruluk

Gereç ve yöntem bölümü “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında verilen koşullara göre analiz gerçekleştirilmiştir. MemHCI' nin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinliği Tablo 4.4'te verilmiştir.

Geri kazanım değeri %96.68±2.62 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, analitik metodun kesinlik ve doğruluğunun yapılacak analizler için yeterli olduğunu kanıtlamıştır.

Tablo 4.4. Memantin'in gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinliği

Derişim (µg/mL)	Gün içi (n = 6)		Günler arası (n = 6)	
	Doğruluk (BH ^a , %)	Kesinlik (BSS ^b , %)	Doğruluk (BH, %)	Kesinlik (BSS, %)
0,01	1,94	1,56	1,39	1,27
0,05	-0,72	1,79	0,98	1,83
1,00	1,70	0,42	1,99	1,26
5,00	-1,42	2,03	0,19	1,48

^a BH, bağıl hata. ^b BSS, bağıl standart sapma

Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığını saptamak için Gereç ve yöntem bölümü “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında verilmiş olan koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlar t-testi ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) ve sonuç olarak yöntemin tutarlı olduğu bulunmuştur (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Geliştirilen yöntemin tutarlılık çalışma sonuçları.

	Alıkonma zamanı*	Bulunan derişim (Ortalama ± SE)
Analist-1	3,032±0,002	1,04±0,01
Analist-2	3,030±0,003	1,05±0,01
P değeri	0,63	0,10

*BSS, bağıl standart sapma, Ortalama ± standart hata (n=6).

Kararlılık

Gereç ve yöntem bölümü “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında belirtilen koşullarda etken maddenin analiz süresi boyunca stabilitesinin uygun olduğunu göstermek için kararlılık çalışması gerçekleştirilmiştir. Tüm zaman noktalarında örneklerdeki MemHCI miktarı başta hazırlandığı gibi (1.00 µg/mL) olarak tespit edilmiştir. Bu da MemHCI sulu çözeltisinin pH 7,2 fosfat tamponunda minimum 72 saat kararlı olduğunu göstermektedir. Kararlılık verileri Tablo 4.6.’da verilmiştir.

Tablo 4.6. Memantin Çözeltisinin 72 saatlik Kararlılık Verileri

Örnek Adı	Memantin	Amantadin	Mem/Amt	ppm
stb24 saat mem_021.lcd	3.044.008	-	-	1,545517
stb48 saat mem_022.lcd	3.085.274	-	-	1,56615
stb72 saat mem_023.lcd	3.120.348	-	-	1,583687
stb24sa mem+amt_024.lcd	3.393.707	1,792.860	1,892901	1,720366
stb48sa mem+amt_025.lcd	2.915.477	1,790.113	1,628655	1,481251
stb72sa mem+amt_026.lcd	3.025.345	1,707.355	1,771948	1,536185

Sağlamlık

Sağlamlık analizleri gereç ve yöntem bölümü “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” başlığında belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Sonuçların optimum koşullarda elde edilen sonuçlar ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemesi yöntemin sağlamlığını kanıtlamaktadır ($p>0,05$). Ayrıca yöntemin sağlamlığı hem MemHCI hem de Amt için alıkonma

zamanları ve pik alanındaki varyasyon değerleri ile de incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.7.'de sunulmuştur.

Tablo 4.7. Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ilişkin sağlamlık sonuçları

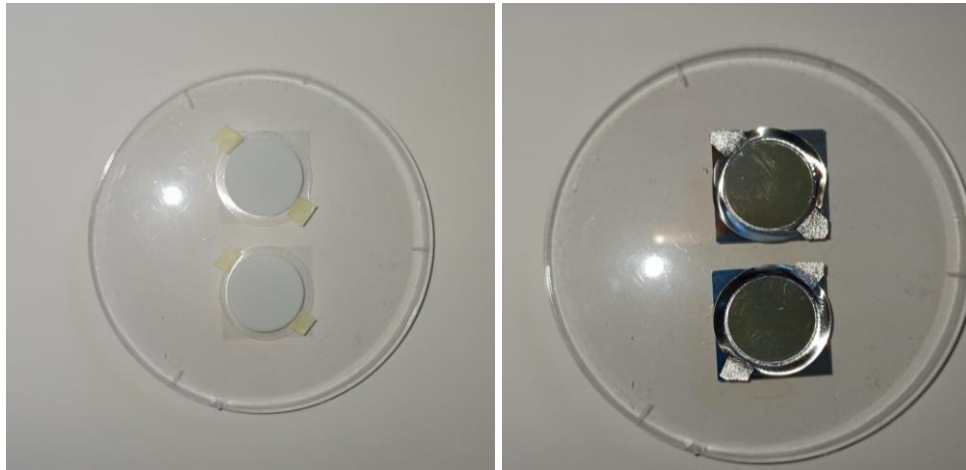
Değişkenler	Alıkonma zamanı (dk)		Pik alan oranı %BSS
	Memantin	Amt	Memantin/Amt
Optimum koşullar	3,034±0,003	2,364±0,002	1,12
Organik faz başlangıç oranı %4,9	3,037±0,002	2,330±0,002	1,64
Organik faz başlangıç oranı %5,1	3,037±0,001	2,328±0,005	0,95
Akış hızı 0.395 mL/dk	3,033±0,001	2,379±0,004	2,27
Akış hızı 0.405 mL/dk	3,038±0,001	2,337±0,001	0,50
Kolon sıcaklığı 39°C	3,038±0,003	2,333±0,002	1,04
Kolon sıcaklığı 41°C	3,036±0,003	2,322±0,004	2,51

Stabilite

Gereç ve yöntem bölümü “3.2.1. LC-MS/MS ile Etkin Madde Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu” kısmında belirtilmiş olan koşullarda gerçekleştirilen analiz sonucunda test değerleri kabul edilebilir doğruluk (yani, taze numunelerden %85-115) ve kesinlik (yani, \pm %15 RSD) sınırları içinde bulunmuş, numuneler stabil olarak kabul edilmiştir. MemHCI stok çözeltileri ise en az 1 ay süreyle -20 °C’de kararlı bulunmuştur. Kararlılık çalışmalarında 0.01 µg/mL standart karışım çözeltisi kullanılmıştır.

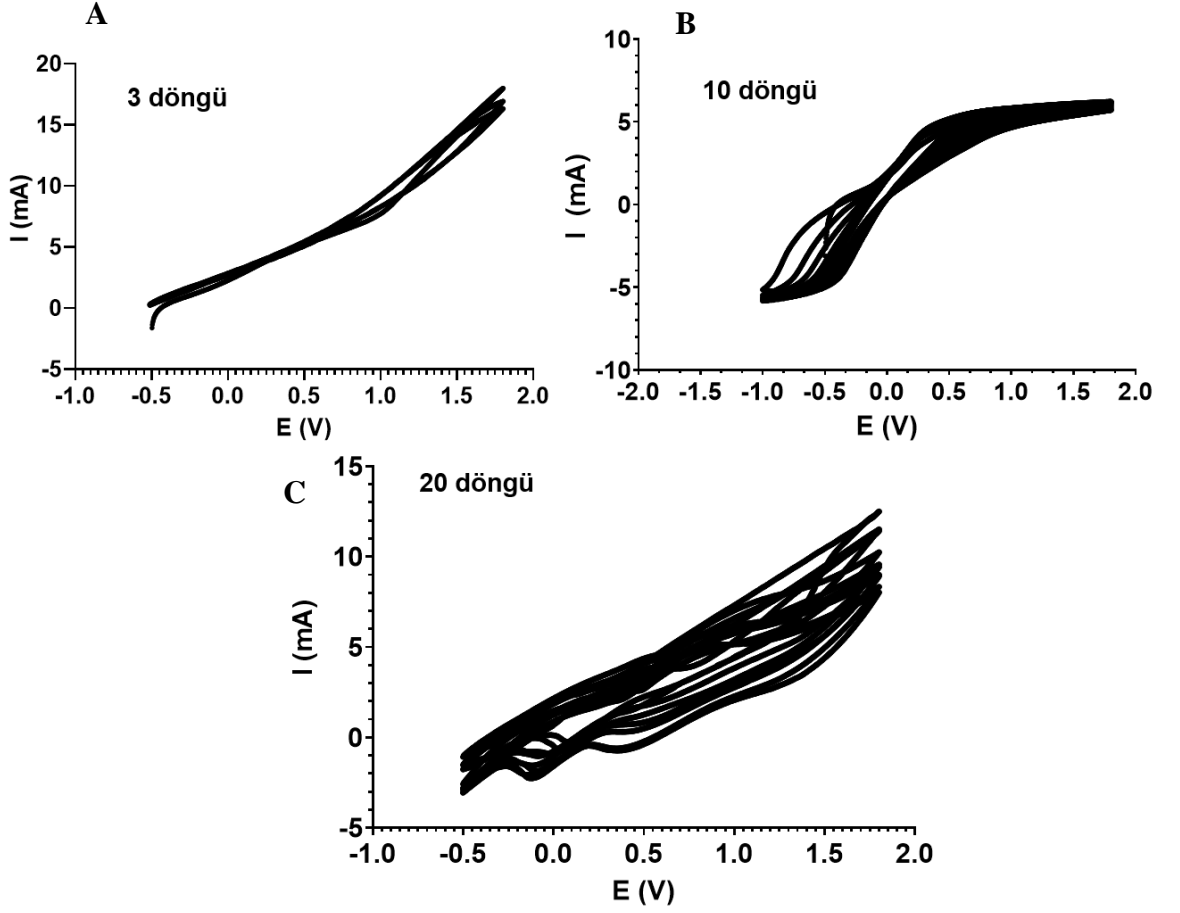
4.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Nanomotor formülasyonunun hazırlanması gereç ve yöntem bölümü '3.2.2. Nanomotor formülasyonlarının hazırlanması' kısmında anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kalıp olarak kullanılacak alümina membranlar çalışma elektrotu vazifesi görmesi için sputter ile ince bir tabaka halinde Ag kaplanmıştır. Membranların kaplama öncesi ve sonrası görüntüsü Şekil 4.4.'te gösterilmektedir.



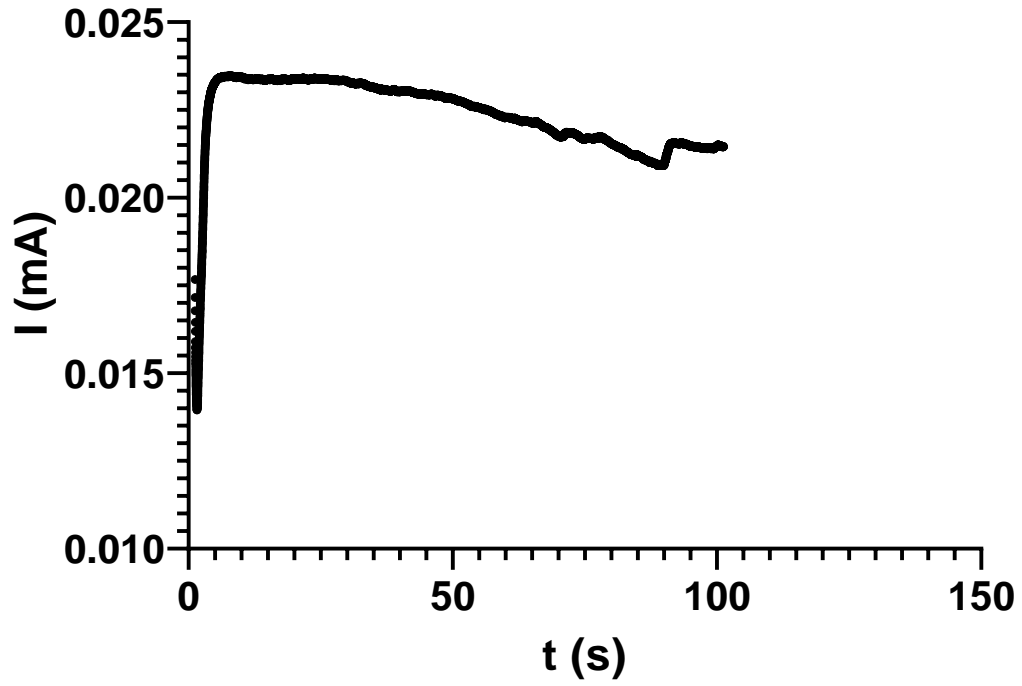
Şekil 4.4. A)Kapanmamış alümina membranlar B) Ag kaplanmış alümina membranlar

Elektropolimerizasyon ve metal biriktirme eğrileri (Şekil 4.5-4.9) aşağıda verilmiştir. Elektropolimerizasyon eğrileri ele alındığında monomerin yüksek bir akım skalasında (mA) her optimizasyonda (farklı döngü sayıları) gerçekleştiği görülmektedir. Aynı durum i-t eğrisi için de söz konusudur. Metal biriktirme aşamaları da yüksek akım skalasında gerçekleşmiştir. Sabit akım eğrisinde de potansiyel değişimi gözlenmiştir. Bu durum Ag kaplanmış membranda iletken tabakaların rahatlıkla biriktirildiğinin önemli göstergesidir.

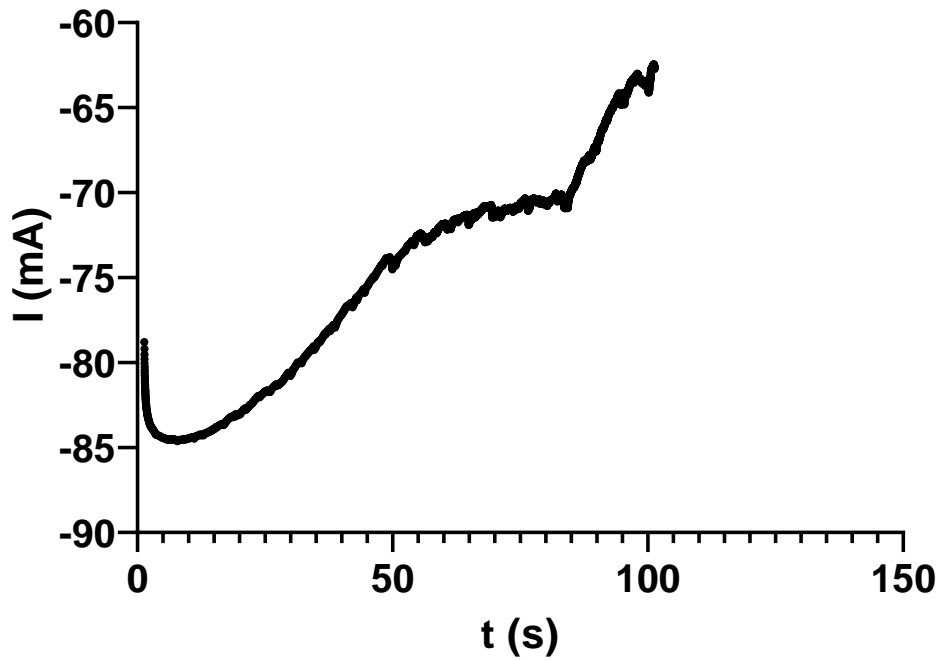


Şekil 4.5. CV yöntemi ile polimerik tabakanın oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğriler A- 3 döngü B-10 döngü C-20 döngü

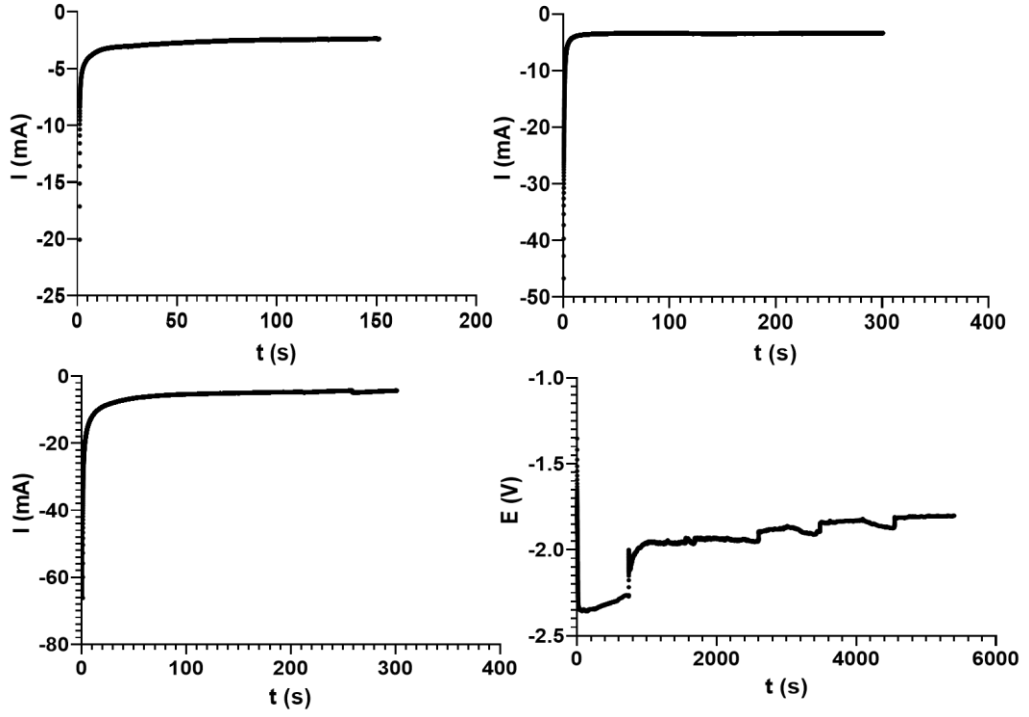
Şekil 4.5.'te belirli aralıkta uygulanan voltaja karşı alınan akım cevapları verilmiştir. A ile gösterilen grafikte uygulanan voltaj aralığında 3 kez çıkılıp inilerek yüzeye polimer biriktirme işlemi gerçekleştirilmiştir. B ve C ile gösterilen grafiklerde ise voltaj aralığında sırasıyla 10 ve 20 kez çıkılıp inilerek polimer biriktirilmiştir. Şekil 4.6.'da i-t yöntemi ile sabit akımda polimer biriktirilme çalışmasına ait grafik sunulmuştur. Şekil 4.7.'de ise aynı işlem artan akımda gösterilmiştir.



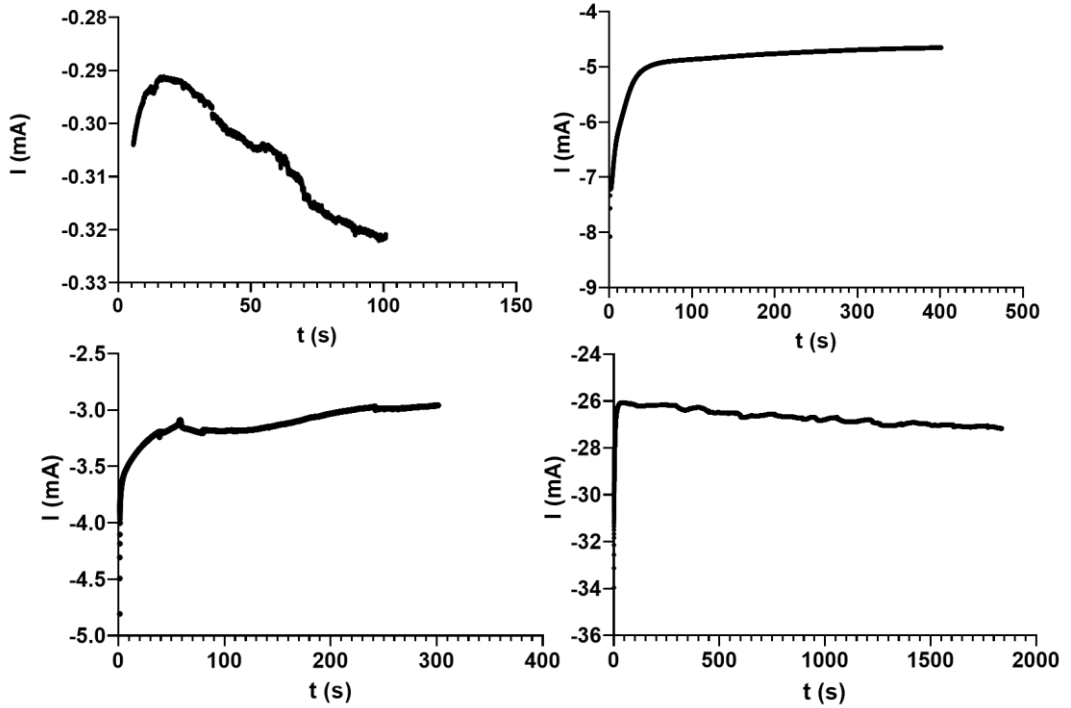
Şekil 4.6. i-t yöntemi ile polimerik tabakanın oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğri.



Şekil 4.7. Cu kurban tabaka oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğri.



Şekil 4.8. Au tabaka oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğriler.



Şekil 4.9. Ni tabaka oluşturulmasına ait elektrokimyasal eğriler.

Şekil 4.8.'de Au tabakasının sabit akımda belirli sürelerde biriktirilmesini gösteren grafikler paylaşılmıştır. Şekil 4.9.'da ise Ni tabakasının sabit akımda biriktirilmesi esnasında alınan grafikler paylaşılmıştır. Burada optimizasyonu sağlamak amacıyla sabit akım veya azalan akımda biriktirmeler denenmiştir.

Hazırlanan bu nanomotorlara ait morfolojinin nasıl olduğuna ait görüntüler her aşamada optik mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ayrıca, yıkama aşamalarından sonra halen alümina membrana rastlanıyorsa yıkama devam ettirilmiştir.

4.2.1. Partikül Büyüklüğü, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Yapılan formülasyon denemeleri kapsamında öncelikle membran kalıp tekniğiyle nanomotoru oluşturacak her bir katman elektrokimyasal biriktirme ile oluşturulmuştur. Bu sentez aşamasında öncelikle polimer biriktirme döngü sayısı, ortam pH'sı, Ni çözeltisi parametreleri değiştirilerek optimum morfolojide ve optimum hareketi gösteren nanomotorlar gereç ve yöntem bölümü "3.2.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması" kısmında anlatıldığı şekilde üretilmiştir. Nanomotorların hazırlanması sonrası karakterizasyon çalışmaları gereç ve yöntem bölümü "3.2.3. Nanomotor Formülasyonlarının Karakterizasyonu" kısmına göre gerçekleştirilmiştir. Motorların hareketinin sağlandığı gözlemlendikten sonra MemHCl, polisorb-80 ve CRANAD-2 yükleme işlemleri gerçekleştirilmiş ve üretilen bu nanomotorlara ilişkin Zetasizer NanoZS cihazı ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.8.'de sunulmuştur. Ayrıca etkin madde yükleme aşaması öncesi kullanılan ara ajanlar ile (EDC-NHS, PSS) inkübasyon sonrasında da nanomotorların partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri alınmıştır. Analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm SS olarak verilmiştir. Zeta potansiyel ölçümlerinde poli-L-lisin temelli motorların yanında Au-Ni nanomotorlar da hazırlanarak kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.8. Nanomotor formülasyonlarına ait zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersite indeksi sonuçları (n=3)

Numune	Zeta Potansiyel	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite indeksi
(Au-Ni nanomotor, kontrol grubu, PLL'siz)	-5,27±2,94	2122±1128	0,335±0,17
(Au-Ni nanomotor, kontrol grubu, PLL'li)	-4,91±0,02	2364±1864	0,821±0,12
(300uM Mem-60dk)	-10,2±0,95	3313±932	0,758±0,19
(75uM Mem-30dk)	-3,15±1,38	2697±1464	0,829±0,16
(75uM Mem-60dk)	-2,90±1,68	1767±705	0,646±0,04
(Polisorbat-60 dk)	-12,5±0,70	1147±18.38	0,736±0,01
(EDC-NHS -15 dk)	6,27±0,49	2232±315	0,729±0,01
(EDC-NHS -15 dk – 75uM Mem-60dk)	-2,75±2,24	1786±602	0,970±0,01
(PSS -30 dk)	-14,0±0,90	3051±877	0,807±0,33
(PSS -30 dk-75uM Mem-60dk)	-15,7±1,56	2638±1520	0,342±0,28

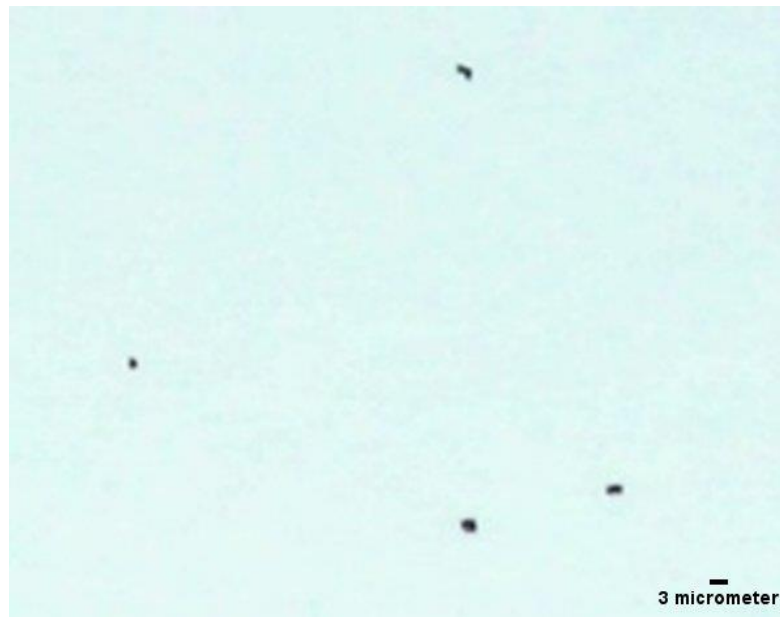
Nanomotorların çubuk şeklinde olması sebebiyle Zetasizer kullanılarak alınan partikül boyutu sonuçları ve PDI değerleri yanıltıcı olmaktadır. Tabloda verilen partikül büyüklüğü değerleri nanomotorların boylarına aittir. Cihaz hem uzunluğu

hem çapı algıladığı için aynı örnekte hem 200 nm hem de 3000 nm boyutunu farklı partiküllere ait olarak ayırmış ve bu nedenle PDI değerleri de yüksek gözlenmiştir.

4.2.2. Morfolojik Özellikler

Hazırlanan Au-Ni-PLL nanomotorlara ait morfolojinin nasıl olduğuna ait görüntüler her aşamada optik mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ayrıca, yıkama aşamalarından sonra halen alümina membrana rastlanıyorsa yıkama devam ettirilmiştir. Şekil 4.10.'da polimerik tabakanın i-t yöntemi ile oluşturulduğu yapılara ait optik mikroskop görüntüsü verilmektedir. Bu şekilde hazırlanan nanomotorların homojen olmadığı ve özellikle uç kısımlarında (polimerik taraf) morfolojinin düzgün olmadığı gözlenmiştir. İyi yıkanmamış bir nanomotora ait görüntü ise alümina membranın da ekranda olduğu bir kesit şeklinde Şekil 4.11.'de verilmektedir. Şekil 4.12.'de ise Ag ile düzgün ve homojen hale getirilemeyen alümina membranda elektrokimyasal kaplamaların kalıp şeklinden uzak bir şekilde oluştuğu açıkça gösterilmektedir. Bu nedenle alümina membranın çalışma elektrodu görmesi açısından iletken ve homojen bir elektrot da fabrikasyon için oldukça önemlidir.

Yıkama aşaması da istenen yapıda nanomotorların elde edilebilmesi için önemlidir. Düzgün yıkanamamış ve düzgün yıkanmış nanomotorlara ait optik mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'te verilmiştir.



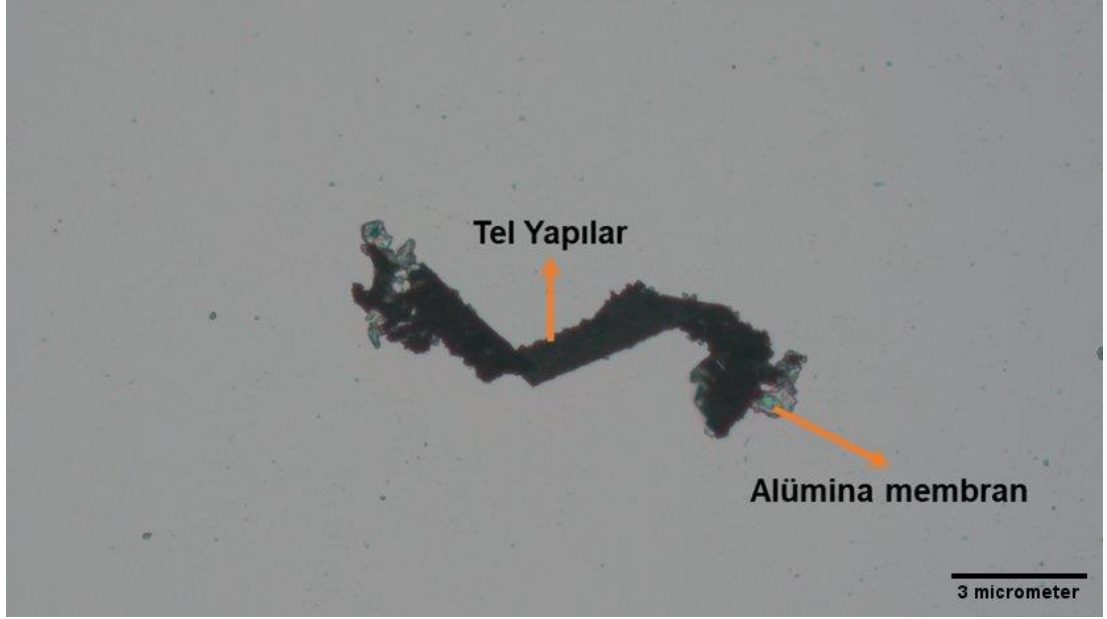
Şekil 4.10. i-t yöntemi ile hazırlanan nanomotorların optik mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.11. İyi yıkanmamış bir nanomotora ait optik mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.12. Ag kaplı elektrodun homojen bir yayılım (dağılım) göstermemesi durumunda oluşan yapılara ait optik mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.13. Yıkama aşamalarında tam olarak membrandan ayrılmamış olan polimerik yapılara ait optik mikroskop görüntüsü



Şekil 4.14. Yıkama aşamalarından sonra membrandan ayrılmış olan tel şeklindeki polimerik yapılara ait optik mikroskop görüntüsü

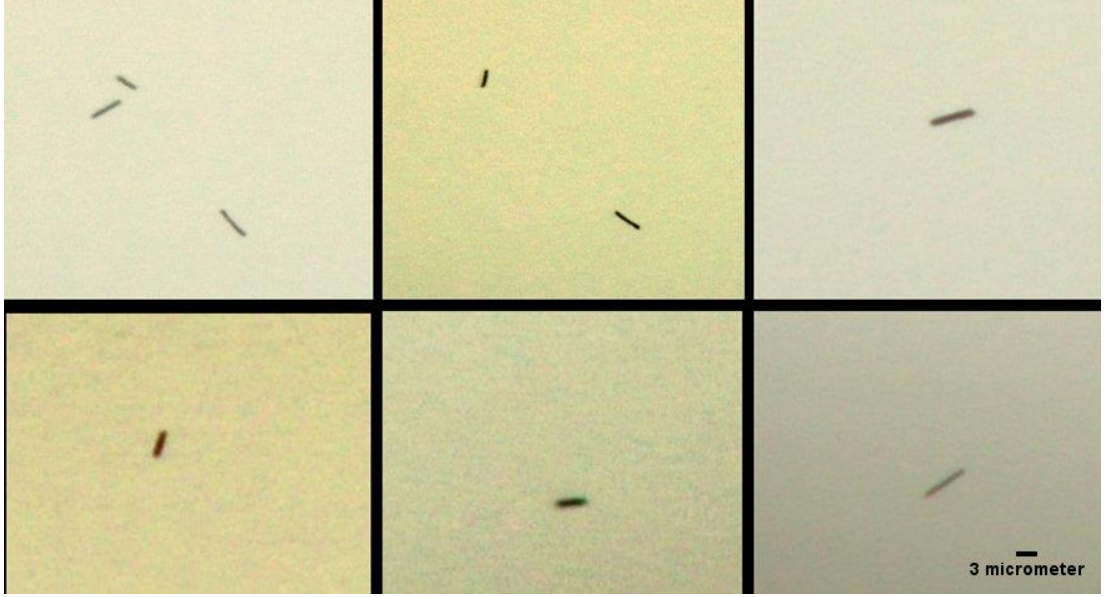
Bu çalışmalar sırasında literatüre ilk kez kazandırılacak olan poli-L-lisin temelli nanomotorların özellikleri hakkında yeterli tecrübeye sahip olunmuştur. Yukarıda da işaret edildiği gibi 10 döngünün üzerine çıkıldığında polimerik yapının

morfolojisinde (uç kısımlardan biri) yayılma olmaktadır. Bu durum Şekil 4.15.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.15. Polimerik tabaka 20 döngüde dönüşümlü voltametri ile hazırlandığında elde edilen nanomotora ait optik mikroskop görüntüsü.

Özetlenen optimum koşullarda hazırlanan nanomotora ait farklı sentez ve bölgelerden alınan optik mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.16.'da görülmektedir. Bu şekillerin hepsinde çap olarak birbiri ile özdeş, tel (çubuk) şeklindeki yapıların başarılı bir şekilde hazırlandığı görülmektedir. Bu yapıların uzunlukları da tabakaların istenilen şekilde manipüle edilmesi ile uzayıp kısalabilmektedir. Bu kontrolün istenilen morfolojiyi koruyarak yapılabilmesi de oldukça önemlidir. Yine işaret etmek gerekir ki en önemli unsur ise bu yapılara motor diyebilmek için hareket kabiliyetinin sağlanabilmesidir.



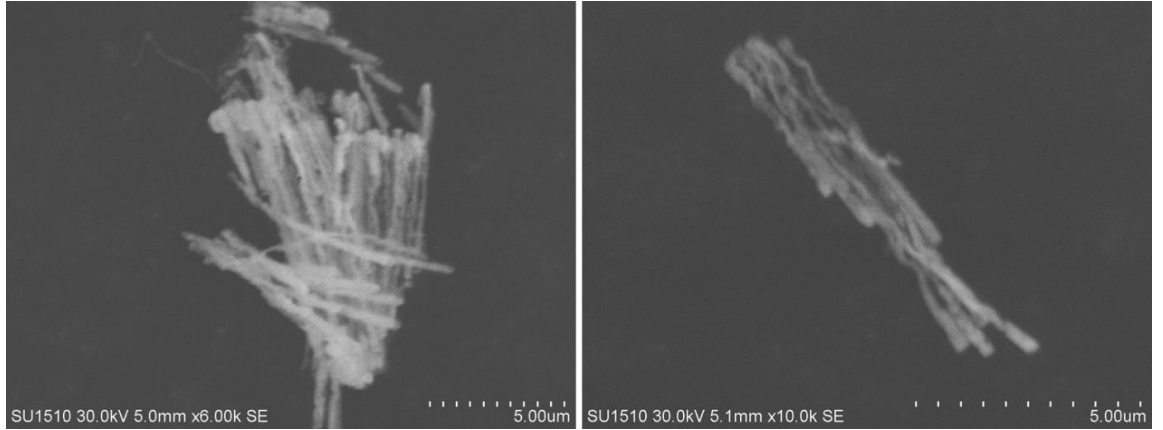
Şekil 4.16. Polimerik tabaka temelli tel (çubuk) şeklindeki motorların optik mikroskop görüntüsü.

Yapılan bir diğer karakterizasyon SEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17.'de bu nanomotorlara ait görüntüler verilmiştir. Ayrıca, hazırlanan nanomotorların yoğun bir ortamı da SEM için örnek haznesine damlatılarak (etanol ortamında) kurutulmuştur ve 2 farklı bölgeden üst üste, yan yana gelen motorların görüntüleri alınmıştır. Bu SEM görüntülerinde tel yapılarının tane tane görüntüleri belirgin bir şekilde gözlenmektedir ve herhangi bir agregasyon durumu ortaya çıkmamaktadır (Şekil 4.18.).

Ayrıca SEM analizine göre nanomotorların çaplarının 200-300 nm arasında boylarının ise 3 μm ile 6 μm arasına değiştiği gözlenmektedir. Bu sonuçlar zetasizerda ölçülen partikül büyüklüklerine göre daha net ve doğru sonuç vermektedir.



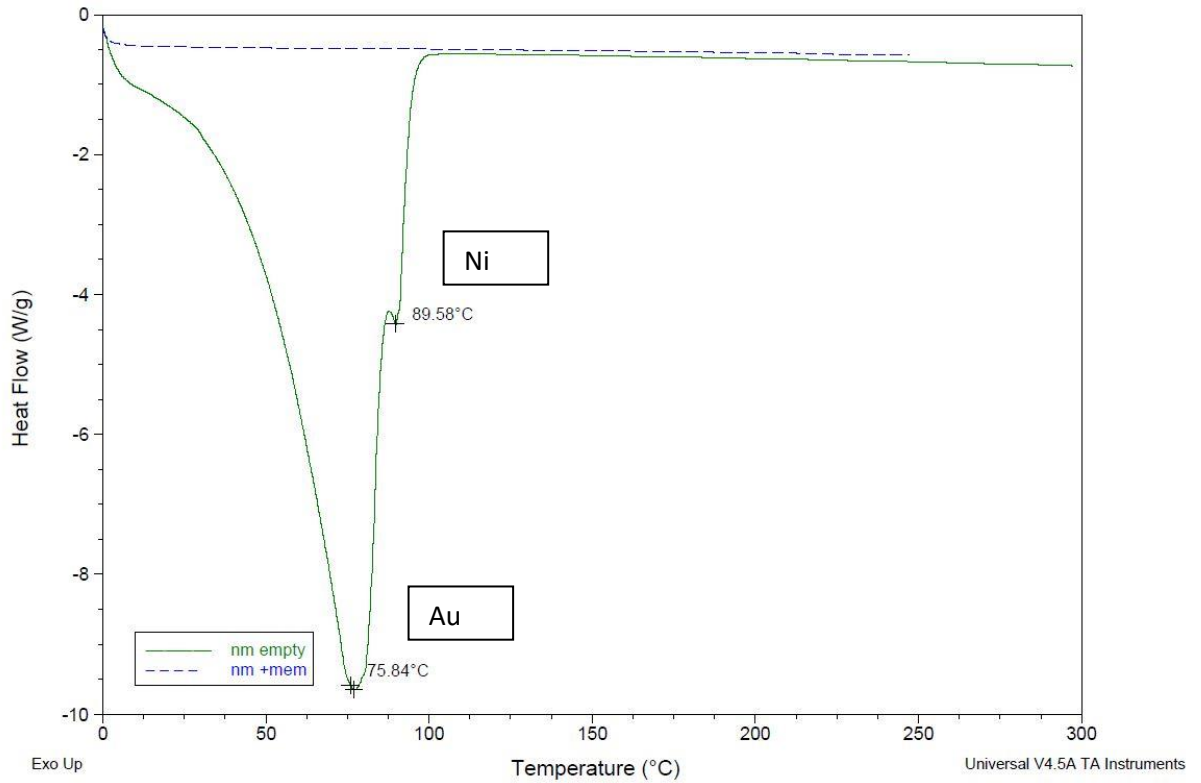
Şekil 4.17. Polimerik tabaka temelli tel (çubuk) şeklindeki motorların SEM görüntüleri



Şekil 4.18. Polimerik tabaka temelli tel (çubuk) şeklindeki motorların bir aradaki SEM görüntüleri.

4.2.3. DSC Analizleri

Au-Ni-PLL nanomotor ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların DSC analizler gereç ve yöntem bölümü ‘3.2.3 Nanomotor Formülasyonlarının Karakterizasyonu’ kısmında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda MemHCI ile inkübasyon sonrası Au-Ni-PLL nanomotorda gözlenen piklerin kaybolduğu görülmüştür. Etkin madde nanomotor yüzeyine bağlandığı için bu görülmesi beklenen bir durumdur. Au-Ni-PLL nanomotor ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorlara ait DSC pikleri Şekil 4.19.’ da verilmiştir.

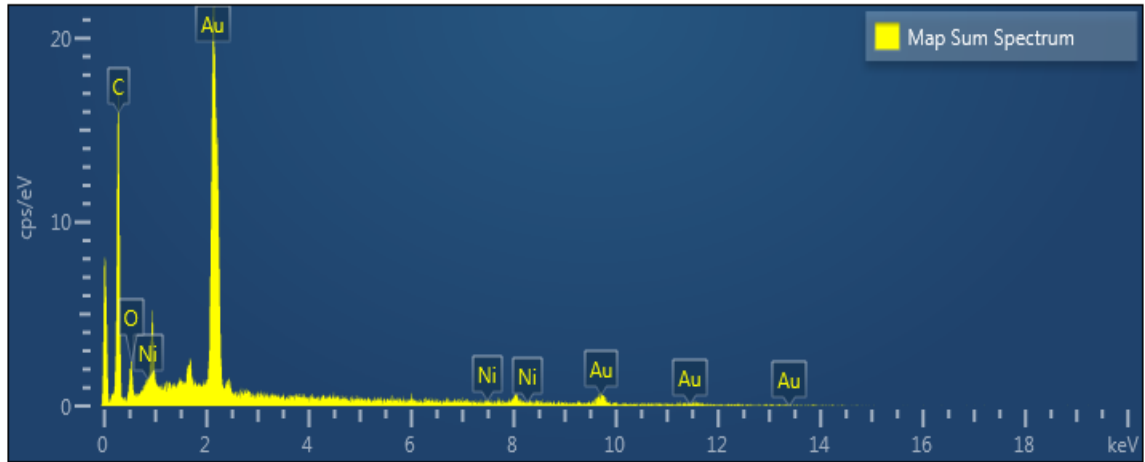


Şekil 4.19. Au-Ni-PLL nanomotor (lacivert) ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor (yeşil) karşılaştırmalı DSC pikleri

4.2.4. Enerji dağılımı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizleri

EDX analizleri gereç ve yöntem bölümü ‘3.2.3 Nanomotor Formülasyonlarının Karakterizasyonu’ kısmında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Au-Ni-PLL nanomotorun EDX spektrumunda yapıdaki karbon

(C), oksijen (O), Au ve Ni'nin varlığı gözlenmiştir. Analize ait spektrum Şekil 4.20.'de verilmiştir.



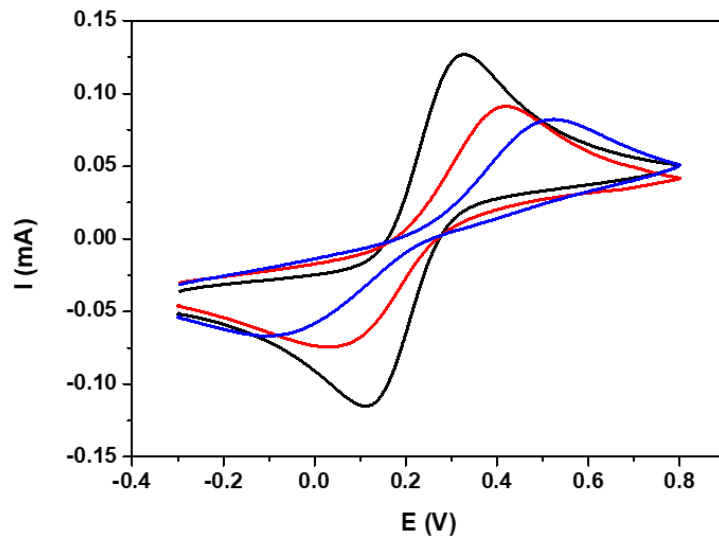
Şekil 4.20. Au-Ni-PLL nanomotorlara ait EDX spektrumu.

4.2.5. Memantin Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

Gereç ve yöntem bölümü '3.2.4 Memantin HCl Yüklü Nanomotorların Hazırlanması' kısmında belirtildiği üzere Au-Ni-PLL nanomotorlar memantin ile inkübe edilerek yükleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal karakterizasyon ve zeta potansiyel ölçümlerinde poli-L-lisin (Au-Ni-PLL) temelli motorların yanında Au-Ni nanomotorlar (polimer içermeyen) da hazırlanarak kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte sağlıklı bir karşılaştırma yapabilmek için çıplak (yüzeyinde hiçbir biriktirme bulunmayan) PGE (Kalem grafit elektrot) davranışı da voltamograma eklenmiştir. Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler) Şekil 4.21., 4.22. 4.23. ve 4.24.'te gösterilmektedir. Elektrokimyasal cevaplar, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/-4-}$ redoks çifti içeren 0.1 M KCl elektroliti içerisinde alınmıştır.

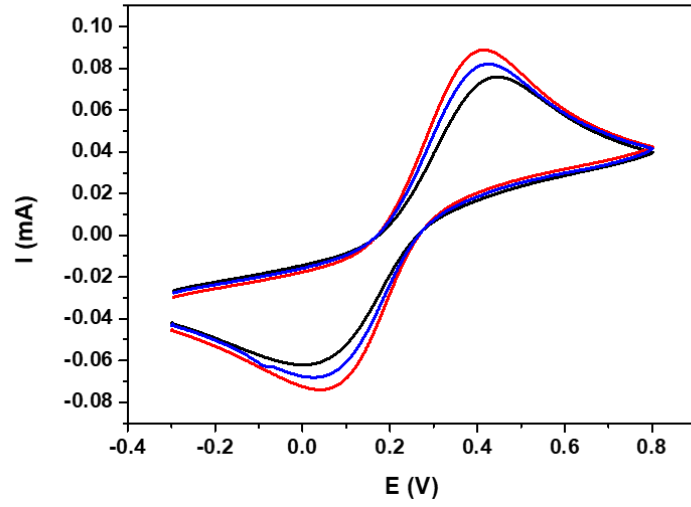
Elektrokimyasal eğriler yorumlanırken dikkat edilen nokta her bir eğrinin bir pozitif akımda yükselen bir de tersi yönde (negatif akımda) yükselen pik kısmının olduğu görülmektedir. Bu piklerin pozitif yönde olanı indirgenme negatif yönde olanı ise yükseltgenme pikidir. Yükseltgenme ve indirgenme pikleri ne kadar sivri ise pikin ait olduğu madde o kadar elektroaktif demektir. Piklerin yayvanlaşması pikin ait olduğu maddenin iletkenliğinin azaldığını göstermektedir. Aynı zamanda bu piklerin birbirine yaklaşması da elektro aktifliğin fazla olduğunu göstermektedir. Elektroaktif

olarak tasarlanmış Au-Ni nanomotorlar üzerine polimer, etkin madde, boya vb. malzemeler kaplanarak yapılan her bir modifikasyon sonrası bu eğriler takip edilerek modifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edilebilmektedir. Örneğin Şekil 4.21.'de polimerik nanomotorların da sadece metalik tabanlı nanomotorlar kadar olmasa da hiçbir modifikasyon içermeyen çıplak elektroda göre elektrokimyasal davranışının daha iyi olduğu görülmektedir. Bu yorum modifikasyonsuz elektrotun pikinin şiddetinin en az olduğu Au-Ni metalik nanomotorun pikinin en yüksek olduğu görülerek yapılmıştır. Au-Ni metalik nanomotorun polimer kaplanması sonucunda pik şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. Bu da nanomotorlara başarı ile polimer kaplandığını göstermektedir. Polimer kaplı olsa dahi metal nanomotorların elektro aktifliği çıplak elektrottan fazladır. Farklı ilaç yükleme aşamaları da elektrokimyasal cevaplar ile aydınlatılmıştır. Şekil 4.22.'de görüldüğü üzere yükleme için hazırlanan ilaç konsantrasyonu ve inkübasyon süresi arttıkça elektrokimyasal indirgenme-yükseltgenme pik şiddetleri azalmıştır. Bu da yüzeye ilacın başarılı bir şekilde bağlandığını göstermekte, konsantrasyon arttıkça da bağlanan ilacın miktarının yani enkapsülasyon etkinliğinin arttığını göstermektedir.



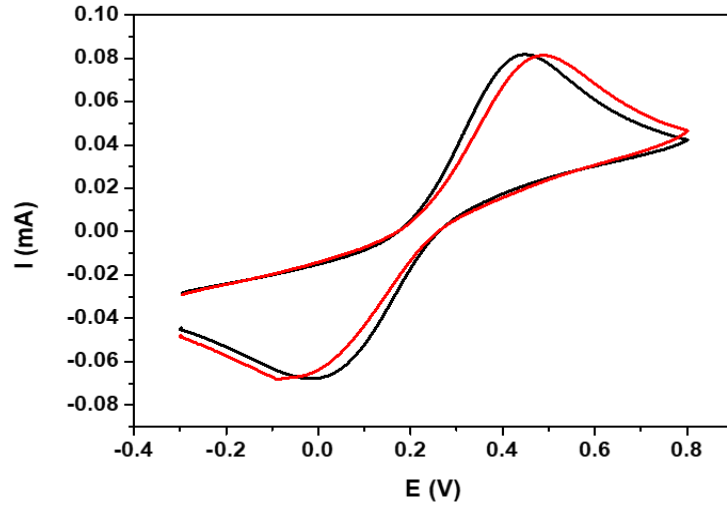
Mavi: Çıplak kalem grafit elektrot (PGE), **Kırmızı:** Polimer tabanlı nanomotorların modifiye edildiği PGE, **Siyah:** Au-Ni nanomotorların modifiye edildiği PGE

Şekil 4.21. Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler) (n=3).



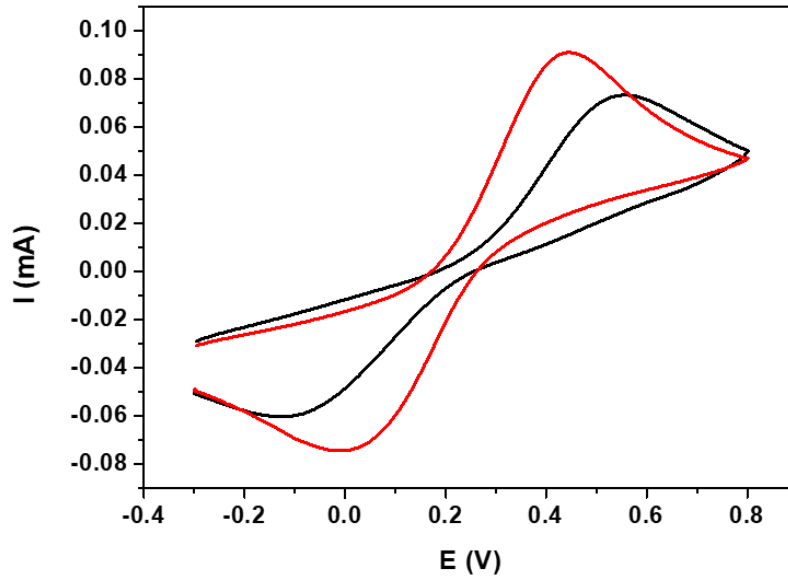
Mavi: 75 μM memantin yüklü nanomotorlar (1 saat inkübasyon), **Kırmızı:** 75 μM memantin yüklü nanomotorlar (30 dakika inkübasyon), **Siyah:** 300 μM memantin yüklü nanomotorlar (1 saat inkübasyon).

Şekil 4.22. Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler) (n=3).



Kırmızı: 15 dk EDC (10 mM)/NHS (20 mM) ile muameleden sonra 75 μM memantin yükleme, **Siyah:** 75 μM memantin yükleme.

Şekil 4.23. Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler) (n=3).



Kırmızı: PSS modifiye yüzeye 75 μ M memantin yükleme, **Siyah:** 1 mg/L PSS - 1 saat inkübasyon.

Şekil 4.24. Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler) (n=3).

Şekil 4.23.'te ara ajan olarak EDC-NHS kullanılarak Mem HCI yükleme ile ara ajan kullanılmadan direkt Mem HCI yükleme karşılaştırılmıştır. EDC-NHS kullanımı ile pikte hafif sağa kayma yani elektro aktiflikte azalma gözlenmiştir.

Şekil 4.24.'te ise ara ajan olarak PSS kullanılarak Mem HCI bağlanan yüzeyin elektro aktifliğinin sadece PSS bağlı yüzeyin elektro aktifliğinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

4.2.6. Enkapsülasyon Etkinliği

MemHCI ile inkübasyon sonrası nanomotorlar çöktürülmüş ve süpernatant ayrılarak LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Ayrıca elektrokimyasal analizlerle de motor yüzeyinde etkin madde varlığı kontrol edilmiştir. Hazırlanan farklı formülasyonlardaki değiştirilen formülasyon parametreleri ve LC-MS/MS yöntemiyle süpernatant analiz sonuçlarıyla hesaplanan inkübe etkin madde miktarları (%) Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Nanomotor formülasyonları ve bu formülasyonlara ait % enkapsülasyon etkinliği değerleri

No	Nanomotor Formülasyonu	Etkileşim ajanı ve inkübasyonu	Etkin ile inkübasyon parametresi	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
1	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	EDC-NHS 15 dk	MemHCl 24 saat	%9,41
2	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	EDC-NHS 15 dk	MemHCl 1 saat	%9,66
3	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	EDC-NHS 15 dk	MemHCl 6 saat	%9,32
4	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	Yok	MemHCl 1 saat	%3,71
5	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	PSS 15 dk	MemHCl 1 saat	%14,05
6	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	PLGA Asit	MemHCl 1 saat	%6,88
7	Au-Ni-PLL /10 Döngü, pH 7,4	PLGA Ester	MemHCl 1 saat	%5,37
8	Au-Ni-PLL /20 Döngü, pH 7,4	Yok	MemHCl 1 saat	%9,39
9	Au-Ni-PLL /20 Döngü, pH 7,4	EDC-NHS 15 dk	MemHCl 1 saat	%5,55
10	Au-Ni-PLL /20 Döngü, pH 7,4	PSS 15 dk	MemHCl 1 saat	%2,4
11	Au-Ni-PLL /20 Döngü, pH 5,5	Yok	MemHCl 1 saat	%2,14
12	Au-Ni-PLL /20 Döngü, pH 5,5	EDC-NHS 15 dk	MemHCl 1 saat	%5,20
13	Au-Ni-PLL /20 Döngü, pH 5,5	PSS 15 dk	MemHCl 1 saat	%3,22

İlk aşamada polimer tabakası (PLL) 10 döngü kaplanarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra 20 döngü polimer kaplanarak da bu tabakadaki artışın etkin madde ile etkileşime katkısının olup olmayacağı gözlemlenmek istenmiştir. Fakat 10 döngünün üzerine çıkıldığında polimerik yapının morfolojisinde (uç kısımlardan biri) yayılma olduğu gözlenmiştir. Bu yayılma Şekil 4.15.'te gösterilmiştir. Bu tabaka kaplanırken ortam pH'sı 7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bununla birlikte pH 5,5'te yapılacak kaplamanın da etkin madde ile etkileşime etkisi gözlenmek istenmiştir. Polimerdeki -COOH (karboksil) uçlarını aktifleştirmek ve polimer-etkin madde arası gerçekleştirmek istenilen etkileşimin gücünü artırmak için EDC-NHS ve PSS kullanılarak etkileşim çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle hiçbir ara etkileşim ajanı olmadan direkt MemHCl ile inkübasyon ve buna ek olarak EDC-NHS, PSS ve PLGA etkileşim ajanları ile inkübasyon sonrası MemHCl ile inkübasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PLGA iki formu olan bir biyoyumlu polimerdir. Polimerin uç kısmı asit karboksil grubu veya ester amin grubu açık kalacak şekilde bırakılabilmektedir. Çalışmamızda hem asit hem de ester uçlu PLGA ile deneme yapılmış ve etkin madde ile etkileşim üzerine etkisi incelenmiştir.

pH 5,5 ortamında yükleme oranı artmış gözükse de bu motorların manyetik alanda hareket sağlayamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle pH 7,4 ortamında üretime devam edilmiştir. Ara ajan kullanımının etkin madde bağlanmasını da artırdığı gözlenmiştir. En yüksek ve tekrarlanabilir ölçümler PSS ara ajanı varlığında elde edilmiştir.

Elektrokimyasal analizde etkin madde MemHCl'nin motora tutunduğu gözlenmiştir. Ancak bu sonuçlar bize sayısal bir değer verememektedir. Bu nedenle LC-MS analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan ilk çalışmaların sonucunda her ne kadar elektrokimyasal eğrilerde MemHCl'nin motora tutunduğu gözlenirse de gördüğümüz bu etkileşimin miktarının çok düşük olması sebebiyle LC-MS'de anlamlı bir sonuç alınamamıştır.

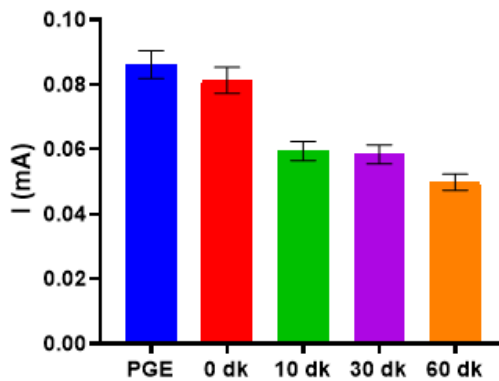
Etkin madde yüklemede mekanizma nanomotor yüzeyine MemHCl'nin bağlanmasıdır. Herhangi bir alan ya da katman arasına enkapsülasyon söz konusu değildir. Bu nedenle MemHCl yükleme çalışmalarında MemHCl'nin yüksek çözünürlüğü ve sulu faza geçme yatkınlığının da olumsuz etkisi sebebiyle ilk denemelerde istenen yükseklikte etkin madde yüklenmesi gözlenememiştir. Yeterli

inkübasyonun yapılamadığı tespit edilip çalışmalar inkübasyonu iyileştirmek üzere tekrarlanmıştır. İnkübasyonun etkileyebilecek parametrelerden en etkili olabilecek ilk iki parametre nanomotorlara eklenen MemHCI çözeltisi derişimi ve etkileşim süresi olarak tespit edilmiş ve öncelikle bu iki parametre üzerinde çalışılmıştır.

MemHCI çözeltisi ile inkübasyon çalışmaları ise sırasıyla 1 saat, 6 saat ve 24 saatlik (overnight) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu sürelerde alınan sonuçlara bakıldığında 1 saat ile 24 saat arası fark olmadığı gözlenmiştir. MemHCI derişiminin artırıldığı çözelti ile yapılacak çalışmalara geçilmiştir. MemHCI konsantrasyonu 5 mg/mL'ye çıkartılmıştır. Bu derişimde de 1 saat, 6 saat ve 24 saatlik çalışmalar gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar sonucunda da 1 saat ile 24 saat arası fark bulunmamıştır. Bu çalışmalar sonucu inkübasyon süresinin 1 saat olmasına karar verilmiştir. Fakat konsantrasyon artışı enkapsülasyon etkinliğini artırdığı için 5 mg/mL konsantrasyon değeri ileri çalışmalar için seçilmiştir. Nihai formülasyon %14 enkapsülasyon etkinliğine sahip 5 numaralı formülasyon seçilmiştir (Tablo 4.9.). Bu formülasyona ait ilaç yükleme kapasitesi ise % 58,58'dir.

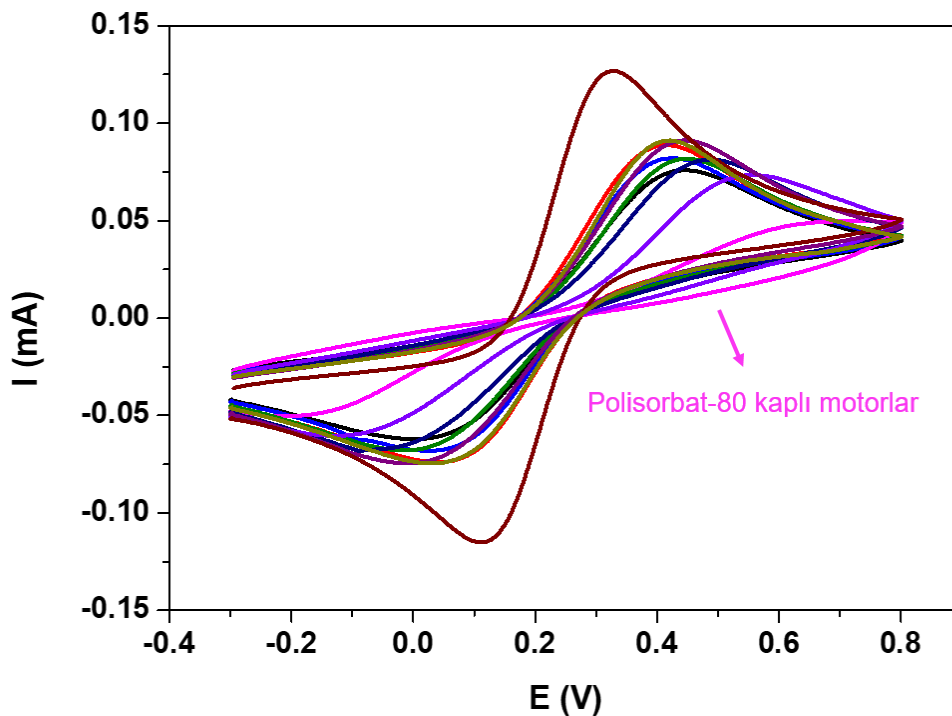
4.3. Polisorbat-80 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

Polisorbat-80 ile nanomotorların optimizasyonu da 10 dk, 30 dk ve 60 dk olmak üzere 3 farklı sürede çalışılmıştır. %1'lik polisorbat-80 çözeltisinde belirlenen sürelerde inkübe edilen nanomotorların daha sonra elektrokimyasal eğrileri alınmıştır. Ayrıca, polisorbat kaplamadan sonraki motor modifiye elektrot davranışları da ele alınarak toplu halde Şekil 4.25.'te verilen grafik oluşturulmuştur.



Şekil 4.25. Polisorbat-80 kaplama sonrası motor modifiye elektroda ait yükseltgenme pik akımı cevapları (Ort. \pm SH, n=3).

Bu şekilde yükseltgenme pik akımları oluşturularak elde edilen durum ele alındığında 10 dk ve 30 dk kaplamadan sonra çıplak elektroda göre sinyal azalmakla beraber 60 dk'da sinyalin daha çok azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.26.'da tüm modifikasyonlar ile polisorb-80 modifikasyonu sonrası elektrokimyasal eğri karşılaştırması verilmiştir. Karşılaştırılan tüm cevaplar içerisinde de polisorb-80 kaplı nanomotorların yükseltgenme indirgenme pik şiddeti en az olarak tespit edilmiştir. Bu durum da yüzeye başarılı bir polisorb-80 modifikasyonunun bir kanıtıdır.



Bütün cevaplar üst üste örtüştürülmüştür. Ayrıca Polisorb-80 kaplı motorların cevabı da eklenmiştir.

Şekil 4.26. Farklı modifikasyon ve etkileşim aşamalarının gösterildiği dönüşümlü voltamogramlar (elektrokimyasal eğriler) ($n=3$).

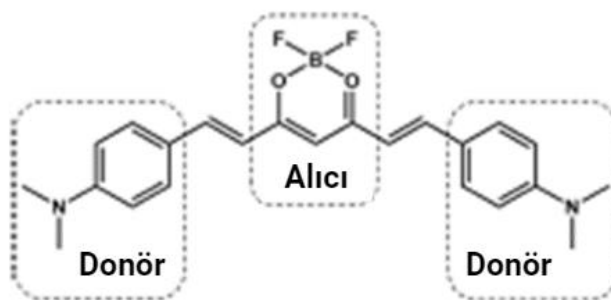
Sonrasında da zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Polisorb-80 ile inkübasyon süresi arttıkça zeta potansiyel negatife doğru artış göstermiştir. Polisorb-80 ile farklı sürelerde inkübe edilen nanomotora ait zeta potansiyel ölçümleri Tablo 4.10.'da verilmiştir.

Tablo 4.10. Nanomotorların Polisorbat-80 ile İnkübasyon Sürelerine Karşılık Zeta Potansiyelleri (n=3)

Nanomotorlar	Zeta Potansiyel (mv)
Au-Ni-PLL nanomotor + 10 dk %1 polisorbat-80	-8,99±1,24
Au-Ni-PLL nanomotor + 30 dk %1 polisorbat-80	-9,56±0,65
Au-Ni-PLL nanomotor + 60 dk %1 polisorbat-80	-12,2±1,13

4.4. CRANAD-2 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

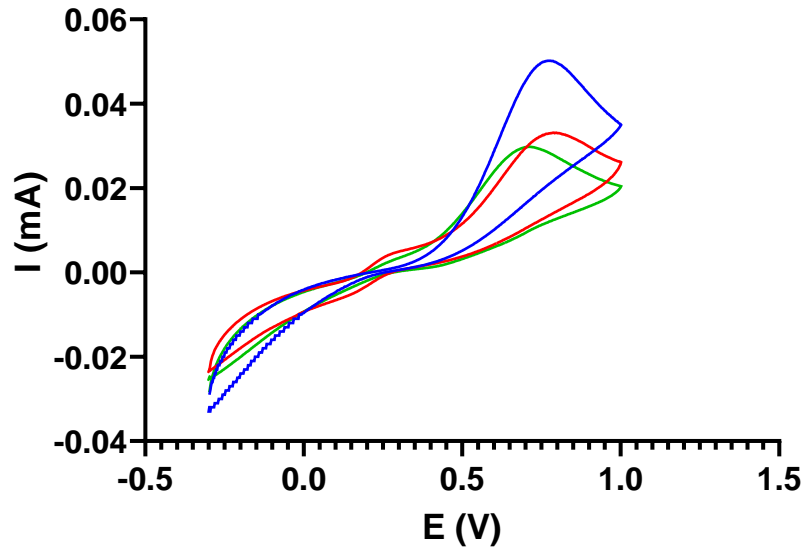
CRANAD-2, donör-alıcı-donör mimarisine sahip ticari olarak temin edilebilen bir kurkumin türevidir ve amiloid tespiti ve NIR görüntüleme için prob özelliklerinin çoğunu karşıladığı için umut verici bir amiloid florofor olarak kabul edilir. Moleküler yapısı Şekil 4.27.'de gösterilmiştir. CRANAD-2 nanomolar afiniteye sahip çözünmeyen amiloid plakları tanır, KBE'den geçer ve amiloid plaklara bağlanması üzerine NIR floresansında çarpıcı bir artış gösterir. Özellikle floresansı amiloid plaklara bağlandıktan sonra göstermekte bağlanana kadar herhangi bir floresan ışımaya göstermemektedir (131).



Şekil 4.27. CRANAD-2'nin donör-alıcı-donör yapısının şematik gösterimi

Şekil 4.28.'de 60 dk ve 30 dk polisorbat-80 kaplandıktan sonra CRANAD-2 yüklenen motorların modifiye edildiği elektrotların elektrokimyasal cevapları verilmektedir. Elektrokimyasal cevaplar, 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks çifti içeren 0.1 M KCl elektroliti içerisinde alınmıştır. Ayrıca, kıyaslama yapabilmek için çıplak elektrodun davranışı da incelenmiştir. Her iki durumdaki CRANAD-2 etkileşiminden

sonra elektroda ait davranışlarda da değişiklikler meydana gelmiştir. Çıplak elektrotta gözlenmeyen +0,30 V civarında omuz şeklinde bir yükseltgenme piki özellikle 30 dk polisorb-80 kaplanan motor modifiye elektrotlarda gözlenmiştir. Ayrıca, bu elektrotta +0,20 civarında bir de omuz şeklinde bir indirgenme piki bulunmaktadır.



Şekil 4.28. Mavi: Çıplak PGE, Kırmızı: 30 dk polisorb-80 kaplı ve devamında CRANAD-2 ile etkileşen motor modifiye PGE, Yeşil: 60 dk polisorb-80 kaplı ve devamında CRANAD-2 ile etkileşen motor modifiye PGE.

Bu pikler bize daha önce de grafiklerin yorumlanmasında anlatıldığı üzere nanomotor üzerinde artan modifikasyona bağlı olarak iletkenlikte azalma ve pik şiddetlerinde azalmayı göstermektedir. Sonuç olarak CRANAD-2 nanomotor yüzeyine bağlanmıştır.

4.5. Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi

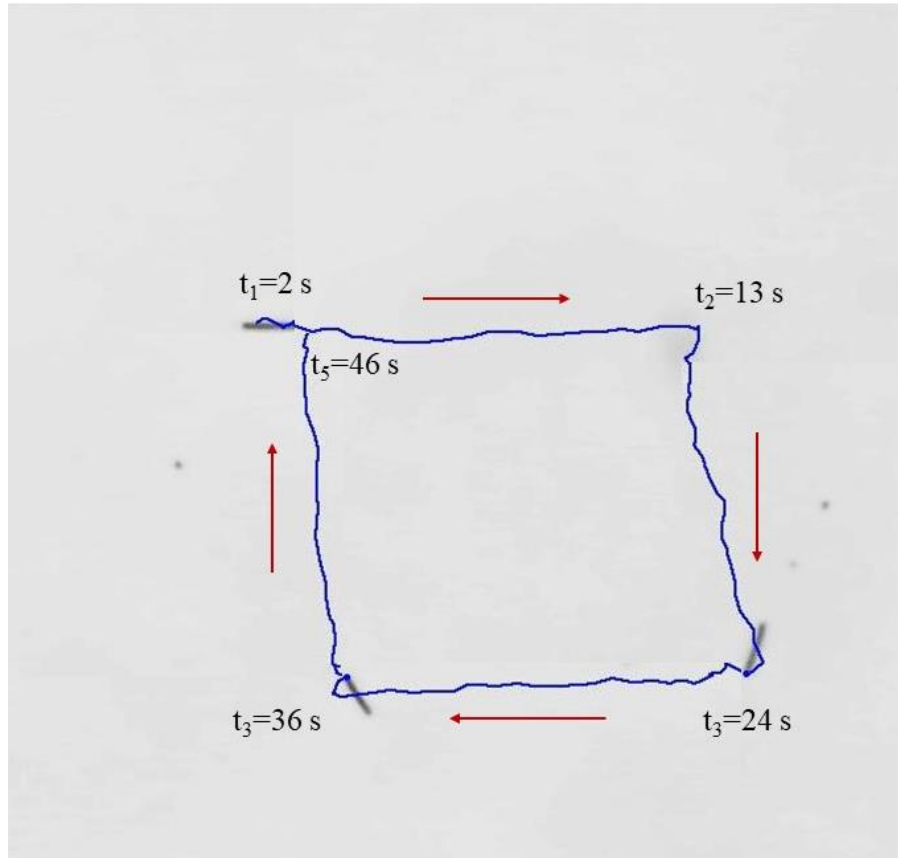
Nanomotorların manyetik karakterizasyon çalışmaları gereç ve yöntem bölümü '3.2.7. Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi' kısmında verildiği üzere gerçekleştirilmiştir. Au-Ni-PLL ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların uygulanan manyetik alan altındaki hareket hızları Image J programı ile analiz edilmiştir (n=5). Elde edilen hız değerleri Tablo 4.11.'de karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

Tablo 4.11. Au-Ni-PLL ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların 270 mT manyetik alan altında hız değerleri (n=5)

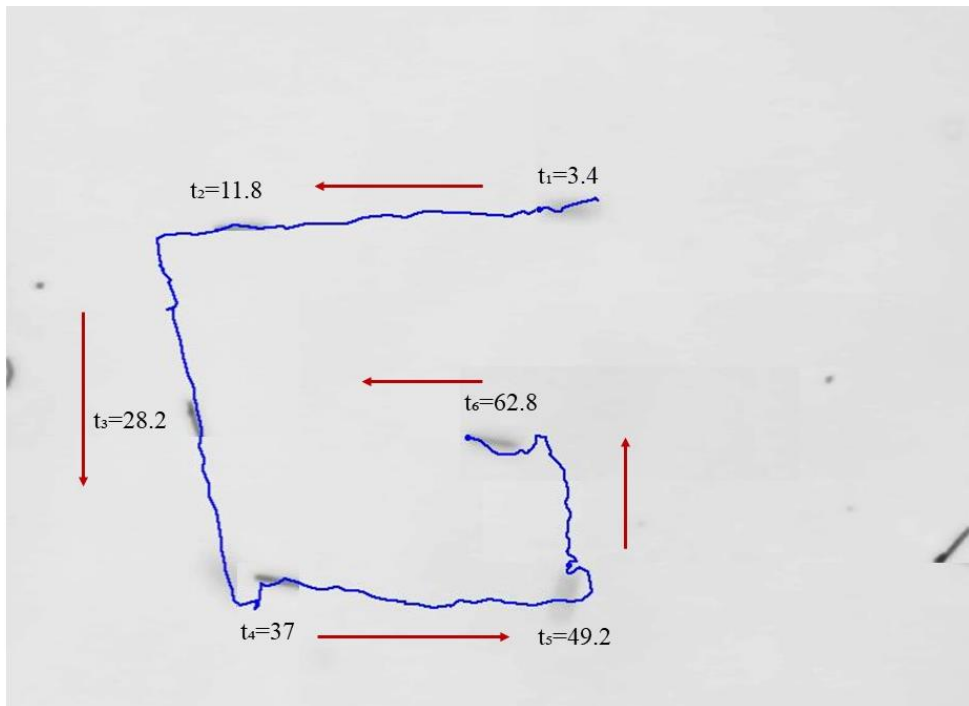
	Au-Ni-PLL	Au-Ni-PLL/MemHCI
Hız Değerleri (µm/sn)		
n=1	29,5	18,3
n=2	32,6	14,1
n=3	35,8	14,8
n=4	36,6	14,9
n=5	37,8	19,3
Ortalama (µm/sn)	34,5	16,3
Standart Sapma	3,4	2,3
RSD	9,9	14,1

Ayrıca nanomotorların hareket özellikleri Au-Ni-PLL nanomotor ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor olarak Videolar (Video 1-3) halinde gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda manyetik ortamda (dış bir mıknatıs) bu nanomotorların istenilen rotada düzgün bir şekilde hem MemHCI yükleme hem de yükleme olmadan rahatlıkla hareket edebildiğini göstermektedir. Fakat MemHCI yükleme ile nanomotorların hızında anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$).

Au-Ni-PLL nanomotorlar hareket ettirilerek hem kare şekli çizilmiş hem de G harfi çizilmiştir. (Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.) Bu hareketlere ait videolar da '8. Ekler' bölümünde sunulmuştur. (Video 4-5) Verilen şekillerde biraz bulanık noktaların olmasının sebebi mikroskopun otomatik odaklama yapamaması, nanomotor hareket ettikçe odağın bozulmasıdır. Odaklama işlemi manuel olarak motoru takip ederek yapılmıştır.



Şekil 4.29. Au-Ni-PLL nanomotorlarla kare şekil çizimi

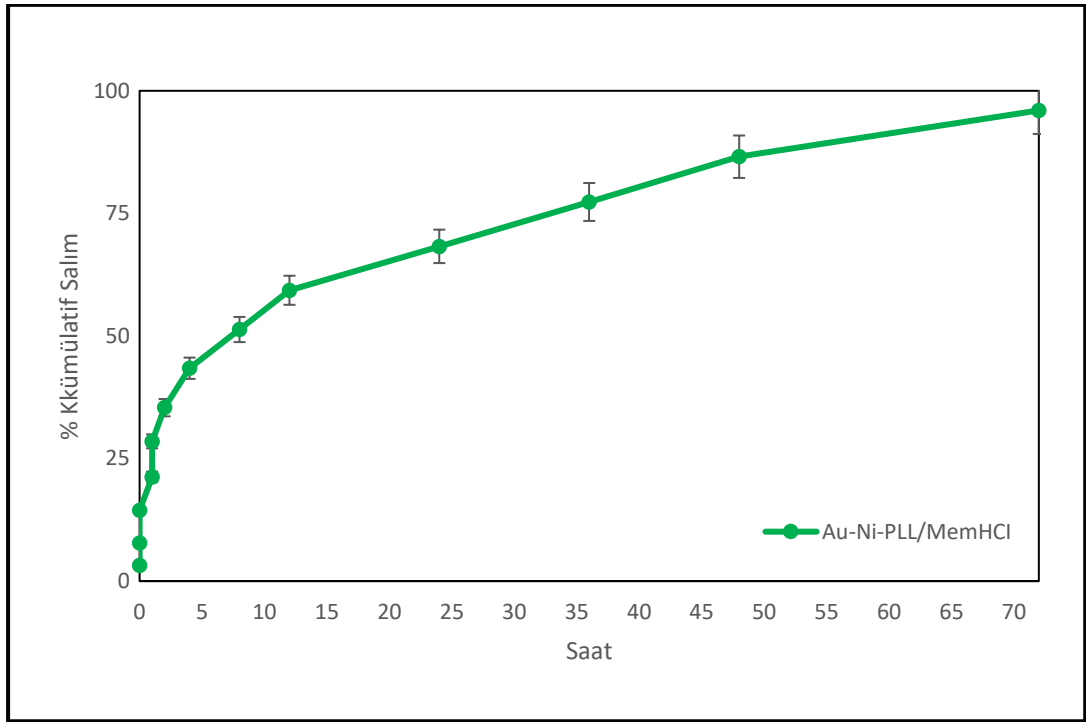


Şekil 4.30. Au-Ni-PLL nanomotorlarla G harfi çizimi

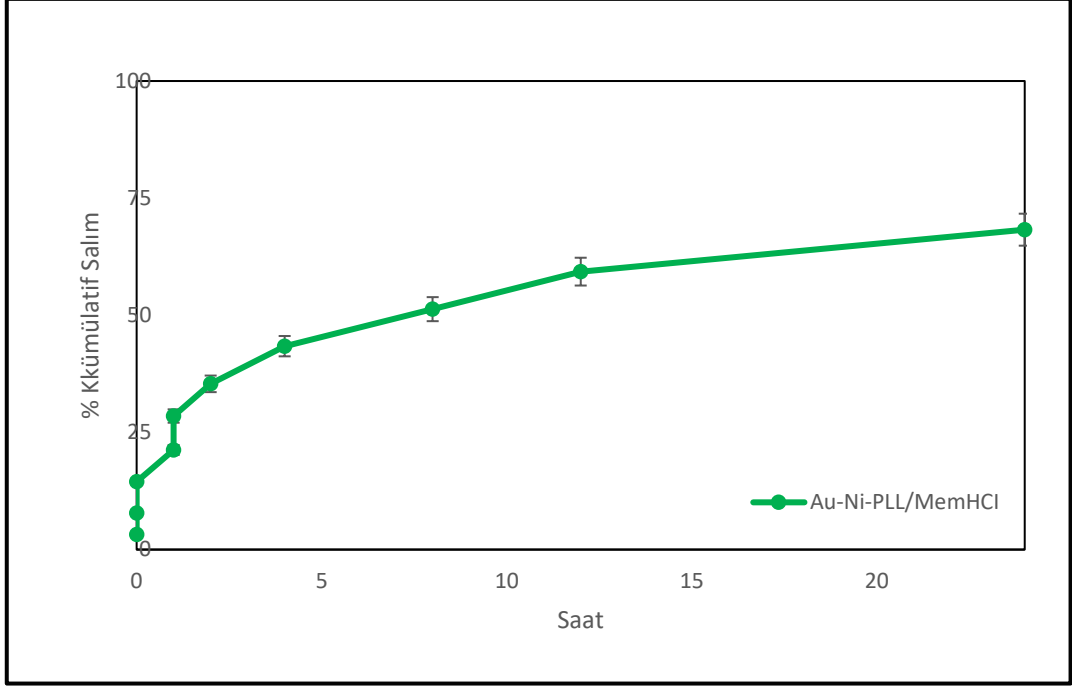
4.6. İn Vitro Salım Çalışmaları

Gereç ve yöntem bölümü “3.2.10. *In Vitro* Salım Çalışmaları” kısmında belirtildiği üzere Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyonunda in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorlardan pH 7,4 PBS ortamlarında 72 saat boyunca diyaliz membran yöntemi ile gerçekleştirilen salım çalışmalarına ilişkin sonuçlar Şekil 4.31.’de verilmektedir.

Bu sonuçların daha iyi incelenebilmesi ve yorumlanabilmesi için, ilk 24 saatteki salım profilleri detaylandırılarak ek grafik olarak Şekil 4.32. içerisinde sunulmuştur.



Şekil 4.31. Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorlara ait 72 saatlik % kümülatif salım grafiği (Ort. \pm SH, n=3).



Şekil 4.32. Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorlara ait 24 saatlik % kümülatif salım grafiği (Ort. \pm SH, n=3)

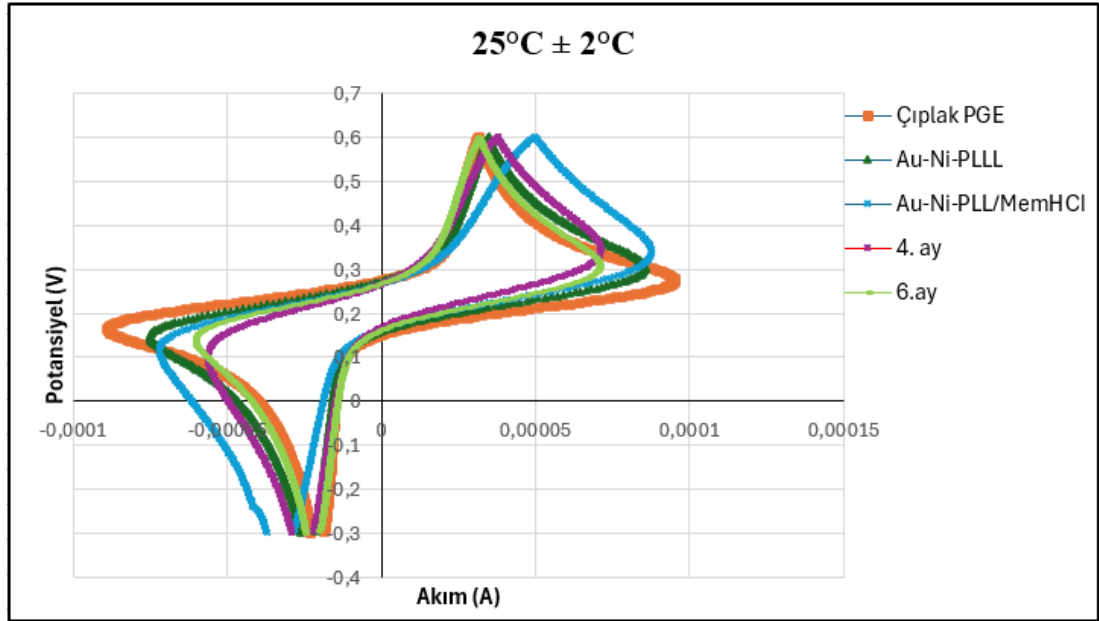
Salım sonuçları Ege Üniversitesi tarafından geliştirilen kinetik programında analiz edilerek salım kinetiği tespiti yapılmıştır. Buradan alınan sonuçlar Tablo 4.12.'de sunulmaktadır. Alınan sonuçlara göre Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor sistemi birinci derece salım kinetiğine sahiptir. r^2 değeri 0,9736'dır.

Tablo 4.12. Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorların salım kinetiği analizi sonucu alınan r^2 değerleri

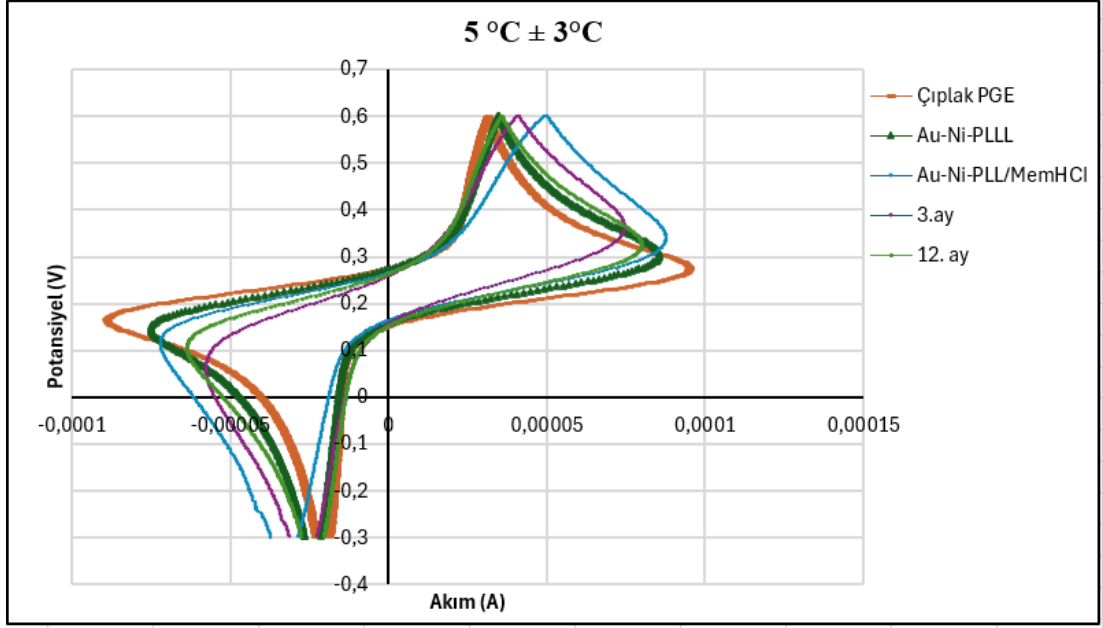
Salım Tipi	r^2
RRSBW	0,9353
M. Langenbucher	0,9470
BTa	0,9148
Higuchi	0,9278
Langenbucher	0,8929
Birinci derece	0,9736
Hopfenberg	0,7835
Hixon Crowel	0,9413
Sıfırıncı derece	0,7835

4.7. Nanomotor Stabilite Çalışmaları

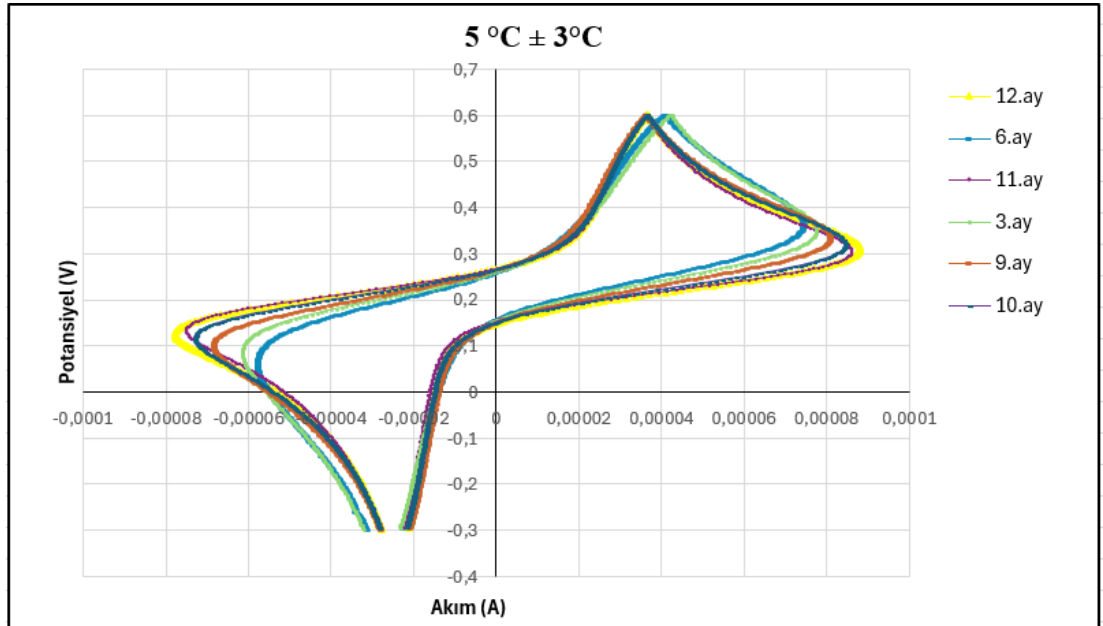
Nanomotorlarda stabilite çalışmaları gereç ve yöntem bölümü '3.2.9. Nanomotor Stabilite Çalışmaları' kısmında belirtildiği üzere etkin madde yüklü olmayan nanomotorlar (Au-Ni-PLL) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Nanomotorlar saklama sırasında agregasyonunu önlemek için bir miktar su içerisinde tutulmaktadır. Bu nedenle memantin yüklü nanomotorlar saklanmak istediğinde üzerindeki memantini ortama salacaktır. Bu nedenle memantin yüklü nanomotorların stabilitesini incelemek mümkün olmamaktadır. Ayrıca suya geçen memantin de ortamda stabil kalamayacaktır. Boş nanomotorların stabilite çalışmalarının tespiti için farklı zaman noktalarında alınan örnekler PGE elektrota tutturularak iletkenlik özellikleri incelenmiştir. $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de alınan akıma karşı potansiyel grafikleri Şekil 4.33.'te sunulmaktadır. $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de alınan eğriler ise Şekil 4.34. ve 4.35.'te sunulmuştur.



Şekil 4.33. $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ stabilite numunelerine ait elektrokimyasal eğriler



Şekil 4.34. $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ stabilite numunelerine ait elektrokimyasal eğriler



Şekil 4.35. $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ stabilite numunelerine ait elektrokimyasal eğriler

Bu eğriler incelendiğinde $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 6. ayda nanomotorların çıplak PGE elektrotla çok benzer bir indirgenme- yükseltgenme eğrisi verdiği gözlenmiştir. Bu durum nanomotorların 6. Aydan itibaren elektriksel iletkenliğinde meydana gelebilecek değişimi işaret etmektedir.

5°C±3°C’de ise eğriler incelendiğinde tüm numuneler arası ufak farklılıklar gözlenmiş olup 12. Ay numunesinde alınan eğrinin taze hazırlanmış Au-Ni-PLL nanomotorlar ile benzer olduğu gözlenmiş, bu da stabilitesini 12.ayda koruduğunu düşündürmüştür.

4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.8.1. Nanomotorların Hücre Canlılığına Zarar Vermediğinin Doğrulanması

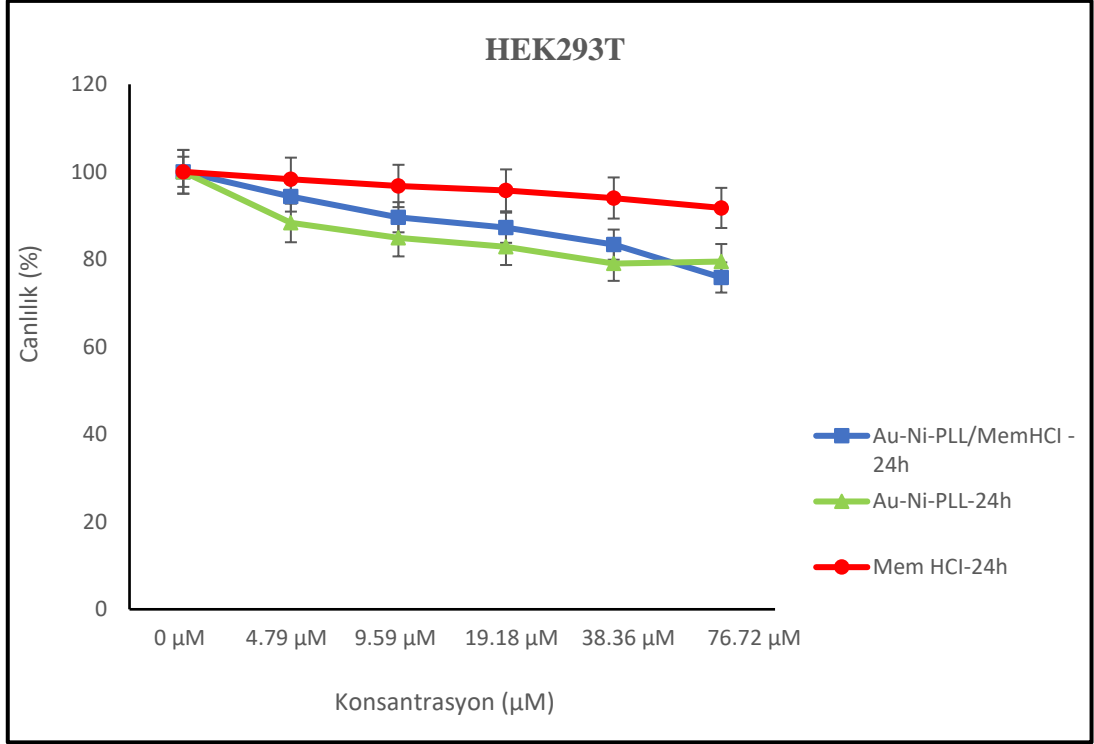
Nanomotorların hücre canlılığına zarar vermediğinin doğrulanması çalışmaları Gereç ve Yöntem ‘3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları’ bölümünde verilen basamaklara göre gerçekleştirilmiştir. HEK293T, SH-SY5Y ve hCMEC-D3 hücreleri 48 saat boyunca belirlenen konsantrasyonlardaki etkin madde çözeltileri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda MTT analizi gerçekleştirilmiş ve hücre canlılıklarından yola çıkarak IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri hesaplanmıştır.

Bu hesaplamalar sonucunda, HEK293T hücrelerinin %50’sinin canlılığını kaybettiği değer (IC₅₀) MemHCl çözeltisi için 136 µM olarak belirlenmiştir. IC₂₀ değeri ise yani hücrelerin %20’sinin canlılığını kaybettiği değer 43,70 µM olarak belirlenmiştir.

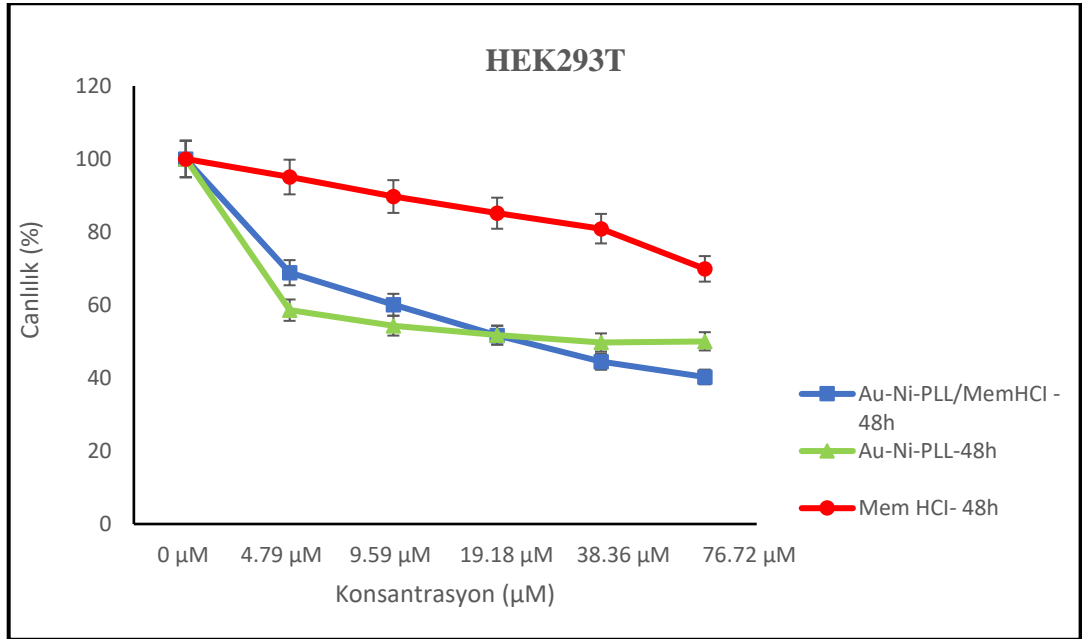
SH-SY5Y hücreleri üzerindeki MemHCl çözeltisi IC₅₀ değeri ise 242 µM olarak belirlenmiştir. IC₂₀ değeri ise 90 µM olarak belirlenmiştir.

Aynı şekilde hCMEC-D3 hücreleri üzerindeki MemHCl çözeltisi IC₅₀ değeri 692 µM olarak belirlenmiştir. IC₂₀ değeri ise 234 µM olarak belirlenmiştir.

HEK293T Hücre hattına ait 24 saat ve 48 saatlik MTT test sonuçları sırasıyla Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.’de verilmektedir.

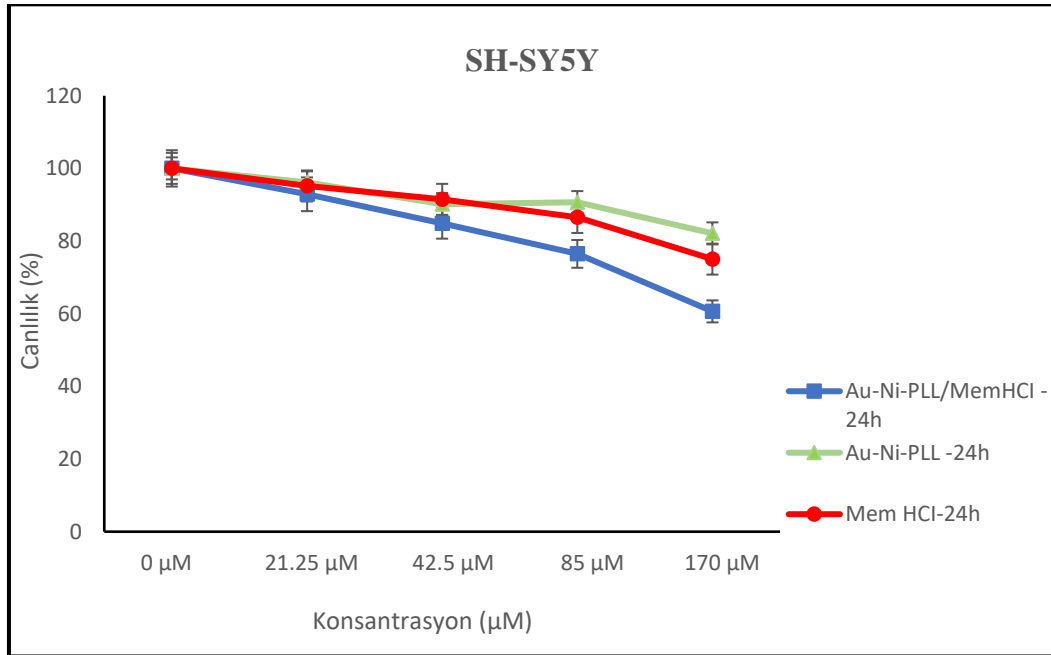


Şekil 4.36. HEK293T Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve MemHCl çözeltisi ile 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri (Ort. \pm SH, n=3).

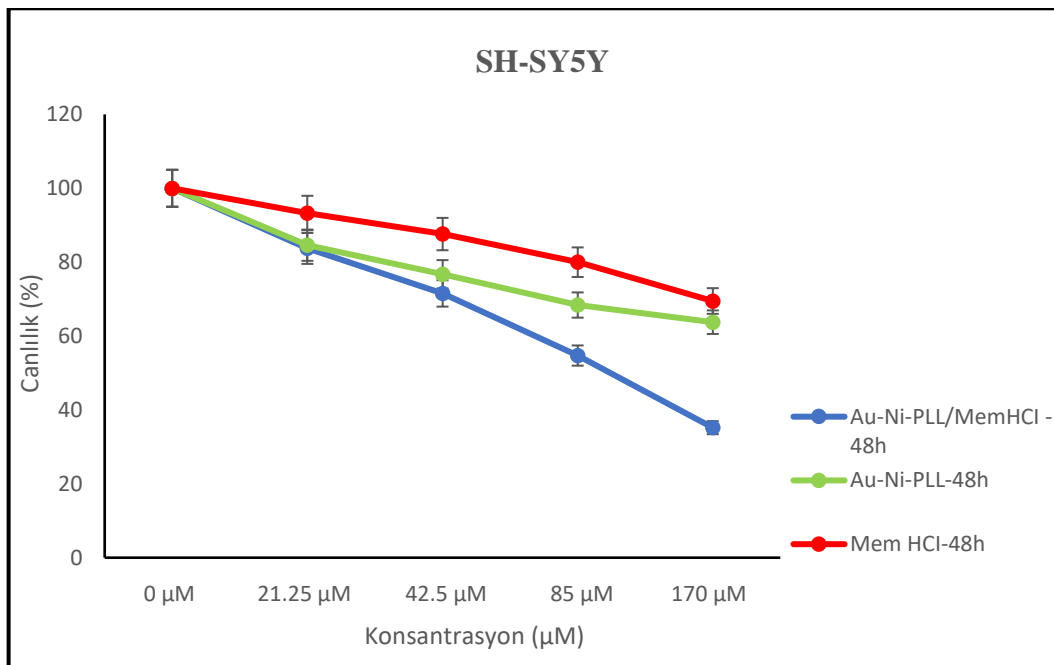


Şekil 4.37. HEK293T Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve MemHCl çözeltisi ile 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri (Ort. \pm SH, n=3).

SH-SY5Y Hücre hattında gerçekleştirilen canlılık çalışmalarına ait 24 saat ve 48 saatlik MTT sonuçları ise sırasıyla Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.'da verilmiştir.

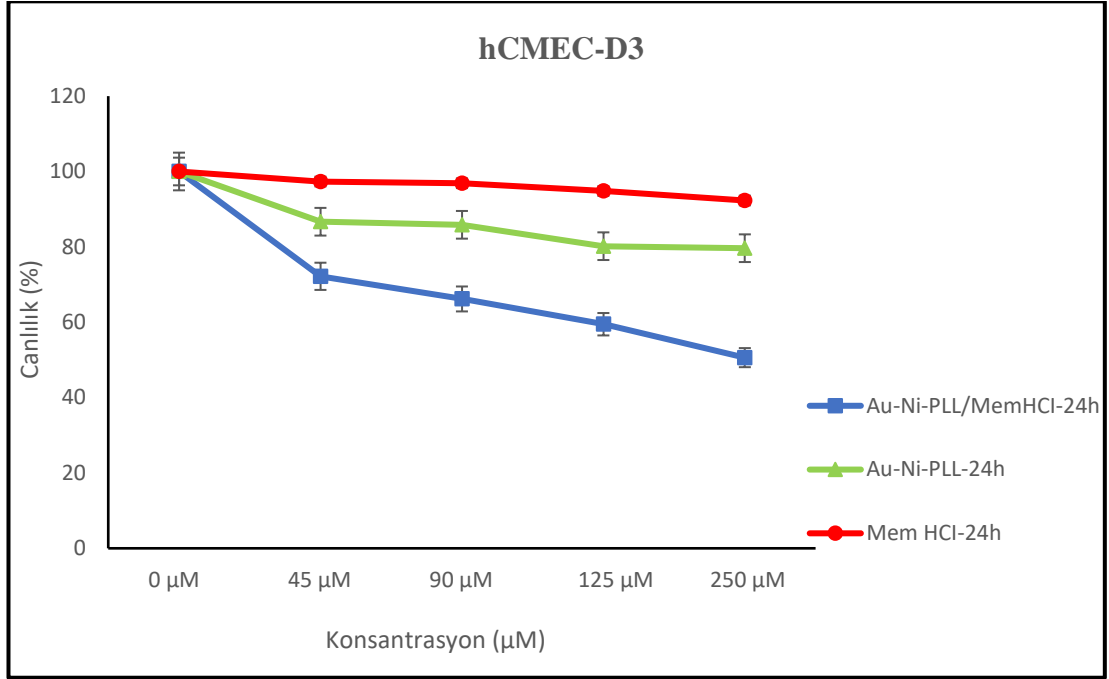


Şekil 4.38. SH-SY5Y Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve MemHCl çözeltisi ile 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri (Ort. \pm SH, n=3).

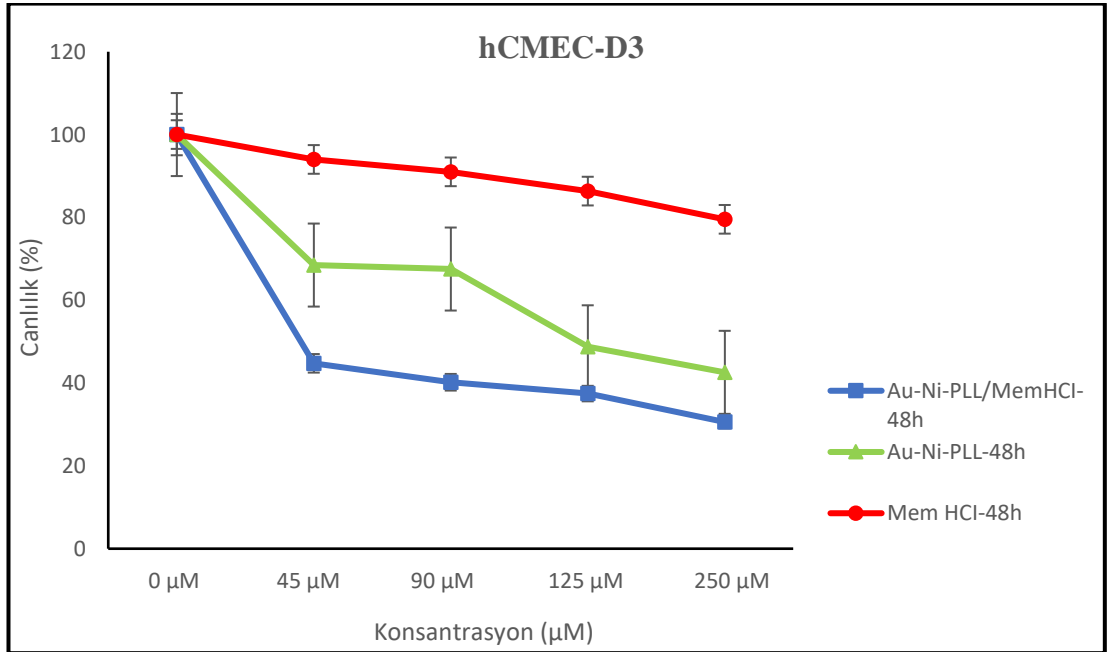


Şekil 4.39. SH-SY5Y Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve MemHCl çözeltisi ile 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri (Ort. \pm SH, n=3).

hCMEC-D3 hücre hattında gerçekleştirilen canlılık çalışmalarına ait 24 saat ve 48 saatlik MTT sonuçları ise sırasıyla Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.'de verilmiştir.



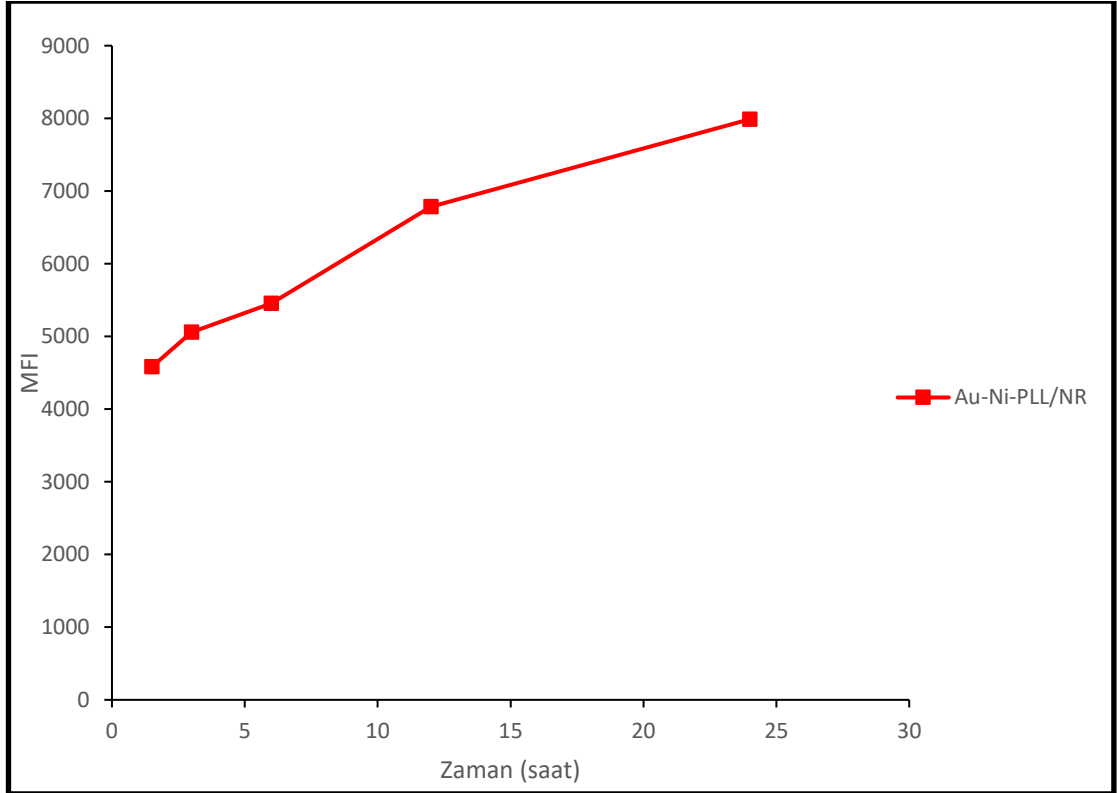
Şekil 4.40. hCMEC-D3 Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve MemHCl çözeltisi ile 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri (Ort. \pm SH, n=3).



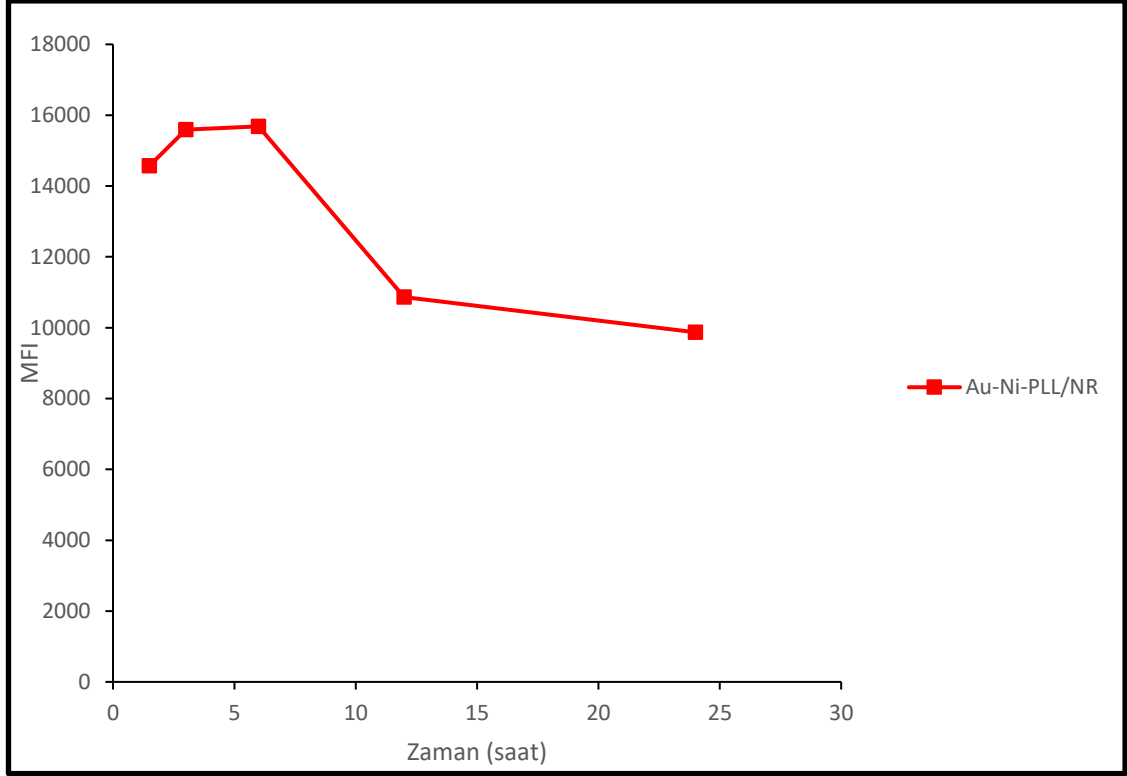
Şekil 4.41. hCMEC-D3 Hücrelerinin Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor, Au-Ni-PLL motor ve MemHCl çözeltisi ile 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen % canlılık değerleri (Ort. \pm SH, n=3).

4.8.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hücre İçerisine Alım Analizleri

Gereç ve yöntem bölümü “3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları”, Nanomotor Formülasyonlarının Hücre İçerisine Alım Analizleri kısmında belirtildiği üzere nanomotorlar Nil kırmızı ile yüklendikten sonra hücelere uygulanmıştır. Uygulama sonrası nanomotorlara 270 mT değerinde manyetik alanda mıknatıs ile hücelere doğru itme kuvveti uygulanmıştır. 1.5, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde hücre inkübasyonları kontrol edilmiştir. Hücre içine alım sonuçlarının değerlendirilmesi için, zamana karşı ortalama floresan yoğunluk (MFI) grafiği oluşturulmuştur. SH-SY5Y hücreleri için bu grafik Şekil 4.42.’de sunulmuştur. hCMEC-D3 hücreleri için ise grafik Şekil 4.43.’te sunulmuştur.



Şekil 4.42. Nil kırmızısı yüklü nanomotor formülasyonlarının SH-SY5Y hücreleri tarafından hücre içine alımlarının akış sitometri yöntemiyle değerlendirilmesi (n=2).

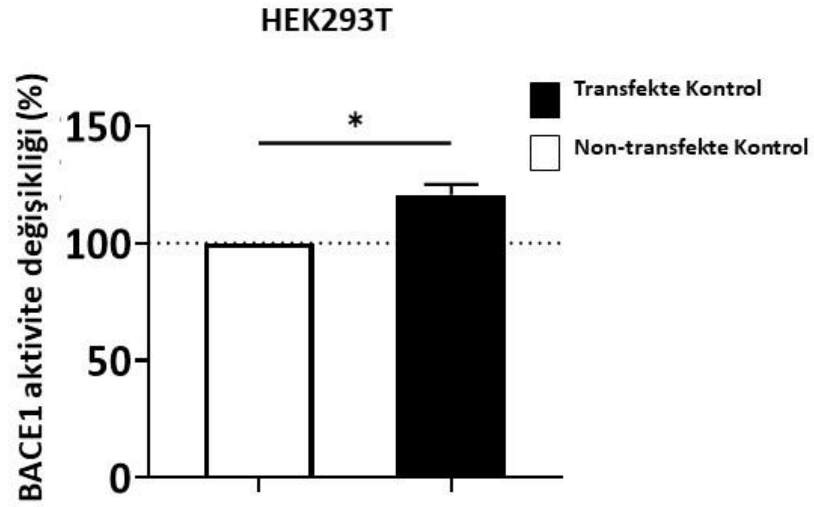


Şekil 4.43. Nil kırmızısı yüklü nanomotor formülasyonlarının hCMEC-D3 hücreleri tarafından hücre içine alımlarının akış sitometri yöntemiyle değerlendirilmesi (n=2).

Alınan sonuçlar SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat boyunca artan hücre içine alımı göstermektedir. hCMEC-D3 hücrelerinde ise maksimum hücre içerisine alım 6. saatte gözlenmiştir.

4.8.3. Tirozin reseptör kinaz B (TrkB) Enzimini Yüksek Düzeyde İfade Eden Hücrelerin Oluşturulması

TrkB enzimini yüksek düzeyde ifade eden HEK293T hücreleri (TrkB (NTRK2) plazmid aktarımıyla oluşturulmuştur. Gen transfeksiyonundan 24 saat sonra yapılan BACE1 enzim aktivite testi ile transfekte ve non-transfekte hücrelerde enzim aktivitesi karşılaştırılmıştır. Test sonucu Şekil 4.44.'de verilmiştir. Alınan sonuçlarda non-transfekte hücrelerde enzim aktivitesi gözlenmezken transfeksiyon yapılmış hücreler enzim aktivitesi gözlenmiştir. Bu sonuçlar da transfeksiyonun başarılı olduğunu doğrulamaktadır.

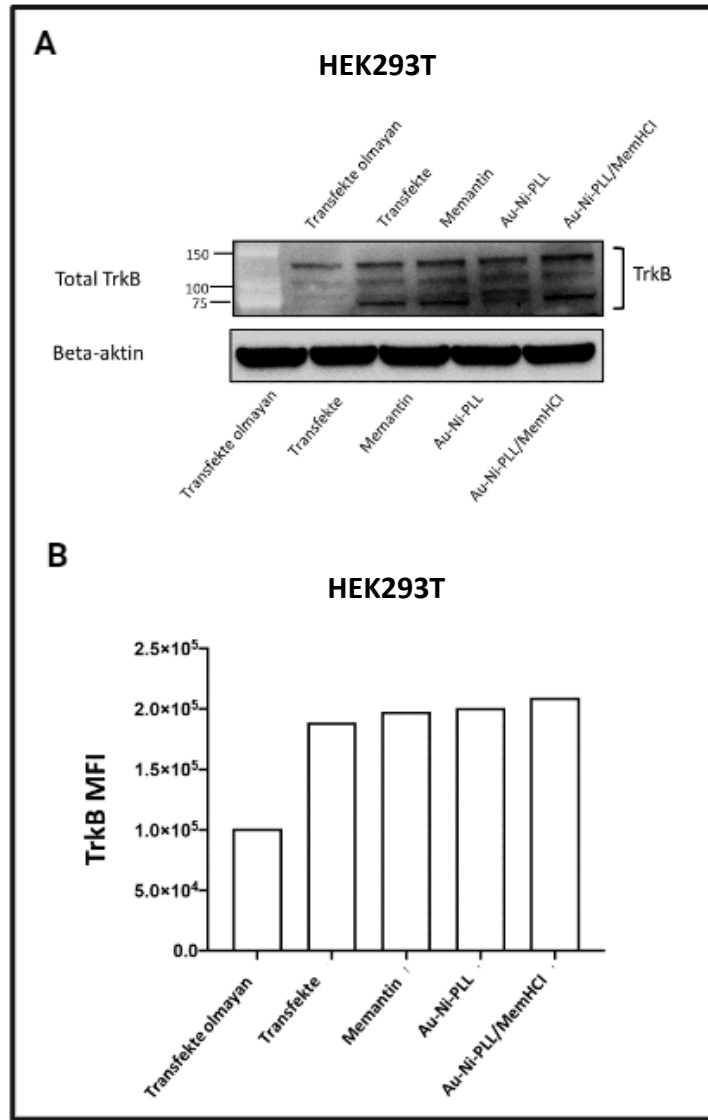


Şekil 4.44. TrkB transfekte ve non-transfekte HEK293T hücrelerinde BACE1 enzim aktivite karşılaştırılması (Sonuçlar blank kontrol verilerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0.05$; olarak sunulmuştur.)

4.8.4. Nanomotor Formülasyonuna Yüklenen Memantin TrkB'yi Uyararak BACE1 Enzim Aktivitesini Düşürme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

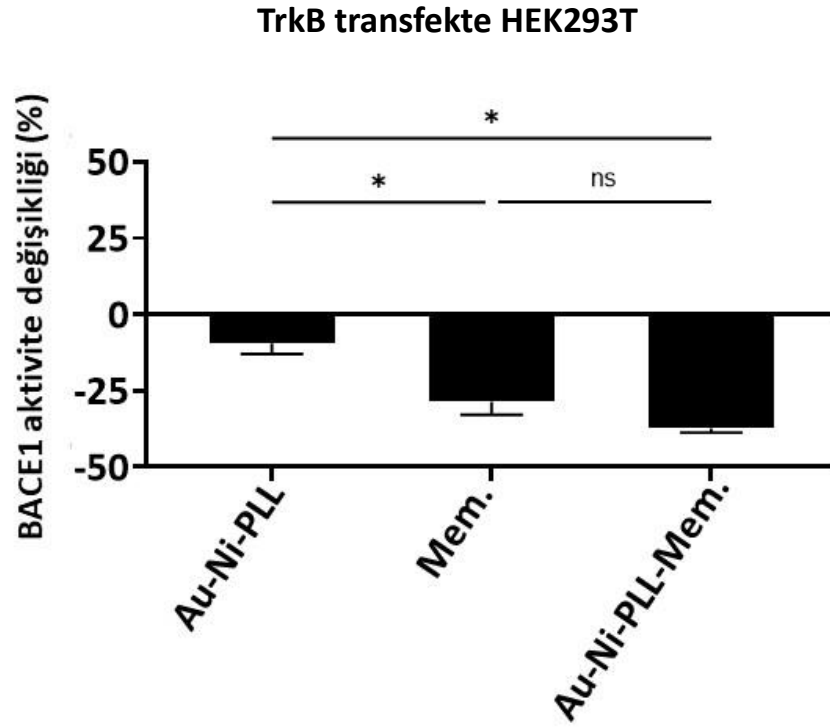
Memantin yüklü nanomotorların BACE1 enzim aktivitesini düşürme etkinliğinin değerlendirilmesi için Au-Ni-PLL-MemHCI nanomotorlar SH-SY5Y ve transfekte HEK293T hücrelerine uygulanmış ve karşılaştırmak için sadece Au-Ni-PLL nanomotorlar, memantin çözeltisi ve sadece besiyeri uygulanan gruplar kullanılmıştır. Sonuçlar Western Blot yöntemi ve BACE1 enzim aktivite testi ile değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlar aşağıda verilmiş olup Şekil 4.45. Transfekte HEK293T hücrelerinde alınan Western Blot yöntemi sonucunda elde edilen bantları göstermektedir.

Şekil 4.46. ise Transfekte HEK293T hücrelerinde yapılan uygulamalar sonucu alınan BACE1 enzim aktivite test sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.45. HEK293T hücre hattında Au-Ni-PLL, Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorlar ve memantin çözeltisi uygulaması sonucu TrkB aktivasyonunu gösteren Western Blot analiz sonuçları (n=3)

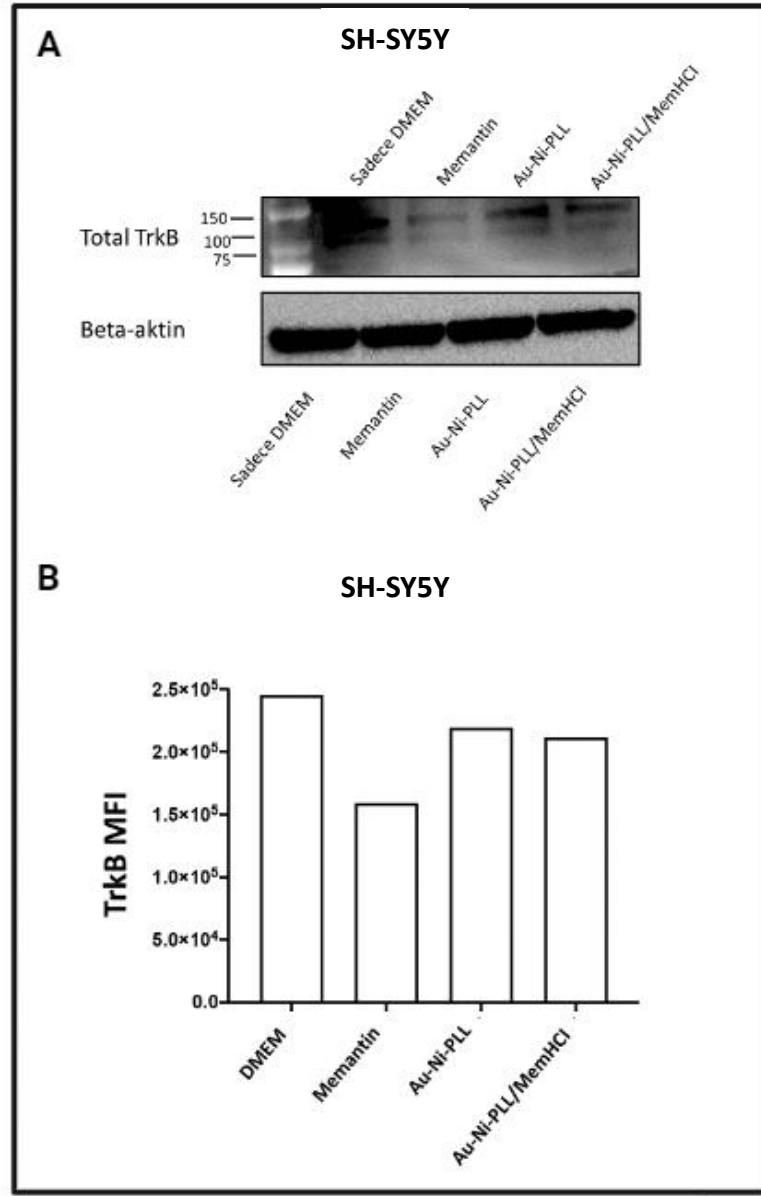
HEK293T hücre grubunda Alınan sonuçlar TrkB gen transfeksiyonu yapılan hücrelerde TrkB bandı varlığını göstermiştir. Bu da transfeksiyonun başarılı olduğu doğrulamaktadır. Transfekte grup ile diğer uygulama grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyon grubunda total TrkB ifadesi diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur ($p > 0,05$).



Şekil 4.46. Transfekte HEK293T hücre hattında BACE1 enzim aktivitesinde değişikliği gösteren grafik (Sonuçlar transfekte HEK293T kontrol grubuna (uygulama yapılmamış hücreler) göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ olarak sunulmuştur.)

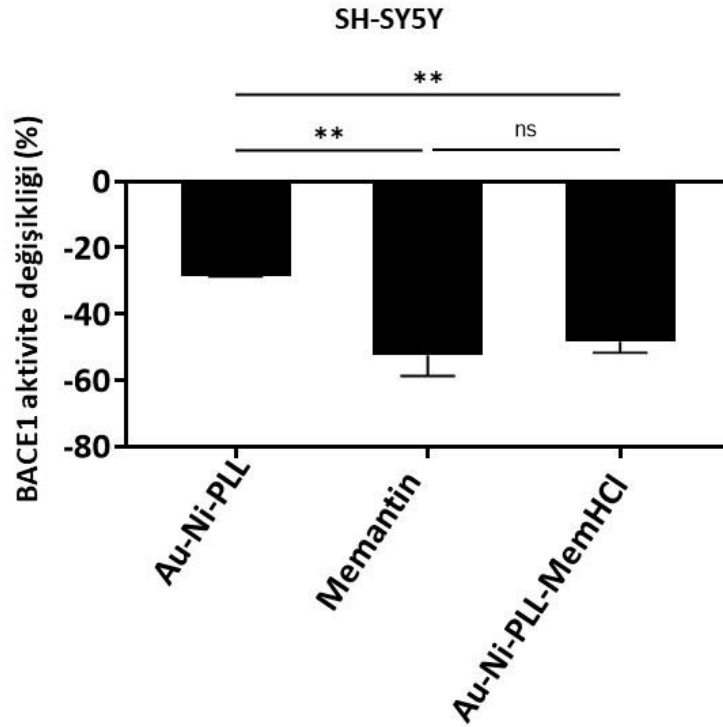
Alınan BACE1 enzim aktivite testi sonuçları transfekte HEK293T hücre hattında uygulanan Au-Ni-PLL/MemHCI formülasyon grubunun enzim aktivitesinde en yüksek düşüşe sebep olan grup olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.47. ise SH-SY5Y hücre hattında alınan Western Blot yöntemi sonucunda elde edilen bantları göstermektedir. Şekil 4.48. ise SH-SY5Y hücre hattında BACE1 enzim aktivite testi sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.47. SH-SY5Y hücre hattında Au-Ni-PLL, Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotorlar ve memantin çözeltisi uygulaması sonucu TrkB aktivasyonunu gösteren analiz sonuçları (n=3)

SH-SY5Y hücre hattında gerçekleştirilen Western Blot analizi sonuçları Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyon grubunda total TrkB düzeyinde artışı göstermektedir. Burada Au-Ni-PLL ve Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyon grupları arası yüksek farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.48. SH-SY5Y hücre hattında BACE1 enzim aktivitesinde değişikliği gösteren grafik (Sonuçlar kontrol SH-SY5Y hücrelerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ olarak sunulmuştur.)

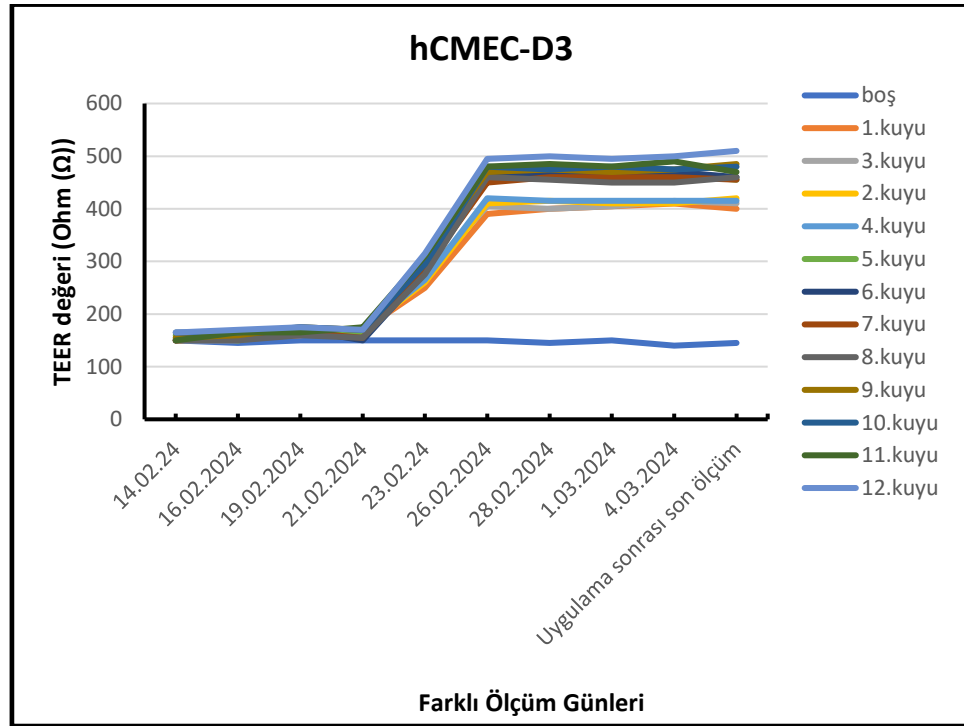
Alınan sonuçlar SH-SY5Y hücre hattında Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyon grubunun en az memantin çözeltisi düzeyinde enzim aktivite düşüşüne sebep olduğunu göstermiştir. Ayrıca boş nanomotorların da aktivite de düşüş yarattığı gözlenmiştir.

4.8.5. Nanomotor Formülasyonu ile Taşınan Etken Maddenin Kan-Beyin Engeli Varlığında TrkB ve Beta Sekretaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Kan Beyin Engeli in-vitro modeli gereç ve yöntem bölümü '3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları' kısmı 'Nanomotor Formülasyonu ile Taşınan Etken Maddenin Kan-Beyin Engeli Varlığında TrkB ve Beta Sekretaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi' alt başlığında anlatıldığı üzere hazırlanmış ve analiz gerçekleştirilmiştir. Burada uygulama yapılacak motor dozu SH-SY5Y hücrelerinde belirlenen IC_{20} değeri olarak seçilmiştir. Bunun sebebi üst katmanda hCMEC-D3 hücreleri ve alt katmanda bulunan SH-SY5Y hücrelerinden ikisine de toksik etki yaratmayacak olan yani IC_{20}

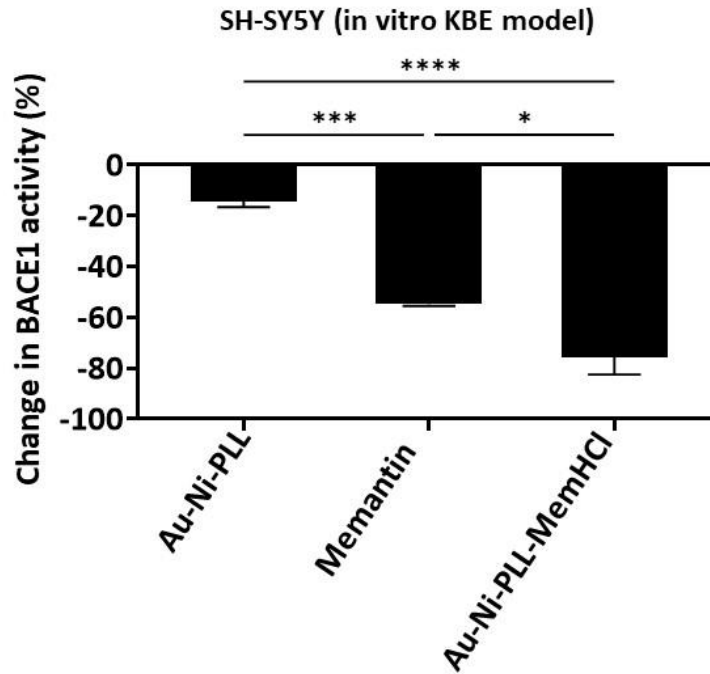
dozlarından düşük olanının seçilmesidir. hCMEC-D3 hücrelerine ait IC₂₀ değeri daha yüksek olup bu dozun seçilmesi durumunda alt katmana geçen (yani KBE'yi geçen) nanomotorlar burada bulunan SH-SY5Y hücrelerinin ölümüne neden olup deneysel sonuçları etkileyecektir. Bu nedenle iki hücre hattında da canlılık kaybına yol açmayacak değer seçilmiştir. Au-Ni-PLL, Au-Ni-PLL/MemHCI ve Memantin çözeltisi uygulanmış, uygulamadan 24 saat sonra önce alt kompartmandan hücre besiyerleri toplanarak LC-MS/MS ile analize alınmış, SH-SY5Y hücrelerinden ise WB analizi için lizatlar çıkarılmıştır. Ancak lizatlardan yeterli miktarda protein çıkarılamadığı için Western Blot analizi gerçekleştirilememiştir. Hazırlanan lizatlar ile BACE1 aktivite testi gerçekleştirilmiştir.

KBE modelinde bariyerin oluşup oluşmadığının kontrolü ve sonrasında formülasyon uygulamasını takiben bariyerin bütünlüğünü korumaya devam edip etmediğinin kontrolü TEER ölçümleri alınarak sağlanmıştır. Gün aşırı alınan ölçümlerin değeri zamana karşı grafikleştirilmiştir. hCMEC-D3 hücrelerine ait TEER değerleri Şekil 4.49.'da verilmiştir. Sonuçlar 14. Günde bariyerin oluştuğu ve nanomotor uygulaması sonrası da bariyerin bütünlüğünün bozulmadığını göstermektedir.



Şekil 4.49. İn vitro KBE modeli oluşturma esnasında ölçülen hCMEC-D3 hücreleri TEER değerleri

Şekil 4.50.'de KBE'de üst kompartmana uygulanan formülasyonun alt kompartmana geçişine bağlı olarak alt kompartmanda bulunan SH-SY5Y hücrelerindeki BACE1 enzim aktivite değişikliklerini gösteren grafik sunulmaktadır.



Şekil 4.50. İn-vitro KBE modelinde alt kompartmandan alınan SH-SY5Y hücre hattında BACE1 enzim aktivitesinde değişikliği gösteren grafik (Sonuçlar kontrol SH-SY5Y hücrelerine göre normalize edilmiştir. İstatistiksel farklılık; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ olarak sunulmuştur.)

BACE1 enzim aktivite testi sonuçlarına göre Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyon grubunun enzim aktivitesinde önemli derecede düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Diğer grupları içerisinde en yüksek aktivite düşüşü Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyon uygulaması sonrası gözlenmiştir. En az düşüş boş Au-Ni-PLL nanomotorlarda gözlenmiş, memantin çözeltisi ise boş Au-Ni-PLL grubundan daha yüksek seviyede aktivite düşüşüne neden olmuştur.

Alt kompartmandan toplanan besiyeri içerisindeki memantin LC-MS/MS ile tayini sonuçları aşağıda verilmiştir. Bu miktarlar KBE'yi geçen miktarları yansıtmaktadır. Üst kompartmana uygulanan memantin miktarı çözeltide de nanomotorlarda da $90 \mu\text{M}$ 'dir. Bu başlangıç derişiminden hareketle KBE'yi geçiş yüzdeleri de hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.12.'de sunulmaktadır.

Tablo 4.13. in-vitro KBE modeli alt kompartmandan toplanan besiyerinde memantin LC-MS/MS ile tayini sonuçları ve yüzdeleri (n=4)

	Konsantrasyon	%
Au-Ni-PLL	0	0
Au-Ni-PLL	0	0
Au-Ni-PLL	0	0
Au-Ni-PLL	0	0
Au-Ni-PLL/MemHCl	19,25 μ M	21,39
Au-Ni-PLL/MemHCl	16,60 μ M	18,44
Au-Ni-PLL/MemHCl	16,88 μ M	18,76
Au-Ni-PLL/MemHCl	17,67 μ M	19,63
Ortalama	17,60 μ M	19,56
Standart Sapma	1,19	1,32
Memantin	16,28 μ M	18,08
Memantin	15,10 μ M	16,77
Memantin	15,45 μ M	17,27
Memantin	19,02 μ M	21,13
Ortalama	16,46 μ M	18,31
Standart Sapma	1,76	1,95

Sonuçlar incelendiğinde Au-Ni-PLL/MemHCl formülasyonu uygulanan grupta hesaplanan alt kompartmandaki etkin madde miktarı $17,60 \pm 1,19 \mu\text{M}$ 'dir. Bu da $19,56 \pm 1,32$ 'ye denk gelmektedir.

Sadece memantin çözeltisi uygulanan grupta ise alt kompartmandaki etkin madde miktarı $16,46 \pm 1,76 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Bu miktarın yüzde değeri ise $18,31 \pm 1,95$ 'tir. İki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

4.9. İn-vitro Hücre Kültürü Modelinde Metabolomik Analizlerin Yapılması

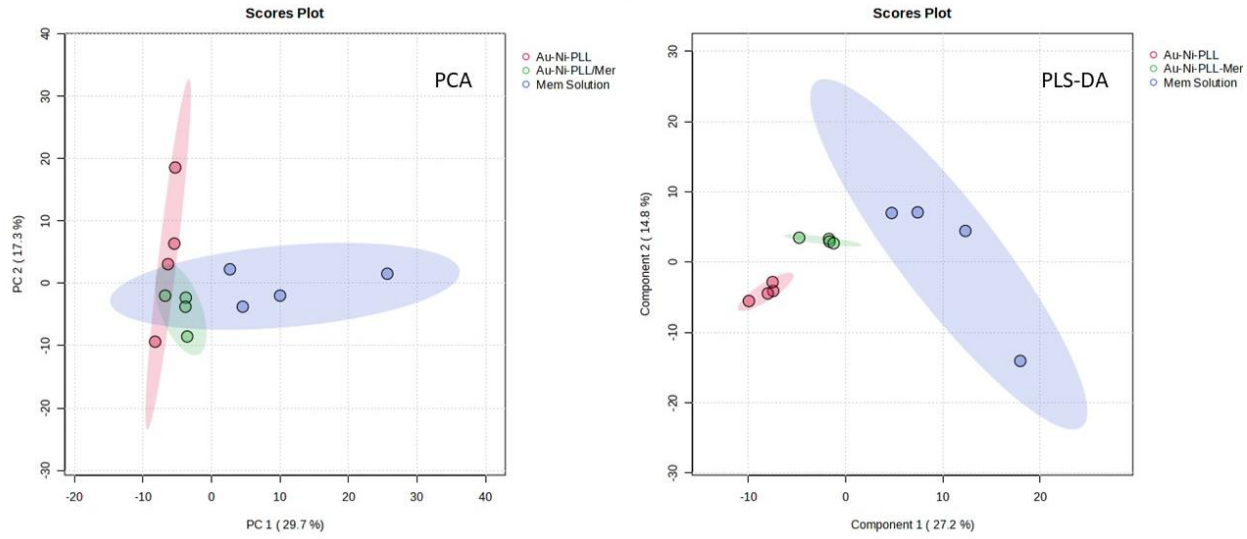
Metabolomik analiz çalışmaları gereç ve yöntem bölümü '3.2.11 İn-vitro hücre kültürü modelinde metabolomik analizlerin yapılması' kısmında verildiği üzere iki ayrı yöntemle gerçekleştirilerek daha fazla miktarda metabolit taranmıştır. Bunun

için kullanılan yöntemler GC-MS ve LCqTOF-MS'dir. Alınan sonuçlar PCA (Principal Component Analysis - Temel Bileşenler Analizi), PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis - En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi), VIP (Variable Importance in Projection - Yansımadaki Değişken Önemi) grafikleri ve Metabolit Isı Haritası (Heat Map) ile verilmiştir. Tüm metabolitlerin Au-Ni-PLL nanomotorlar, Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorlar ve memantin çözeltisi uygulama grupları arasında anlamlı farklılığının olup olmadığı yapılan t testi ile değerlendirilmiştir. Test sonucunda elde edilen p-değerinin 0.05'ten küçük bulunduğu gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edilmiştir.

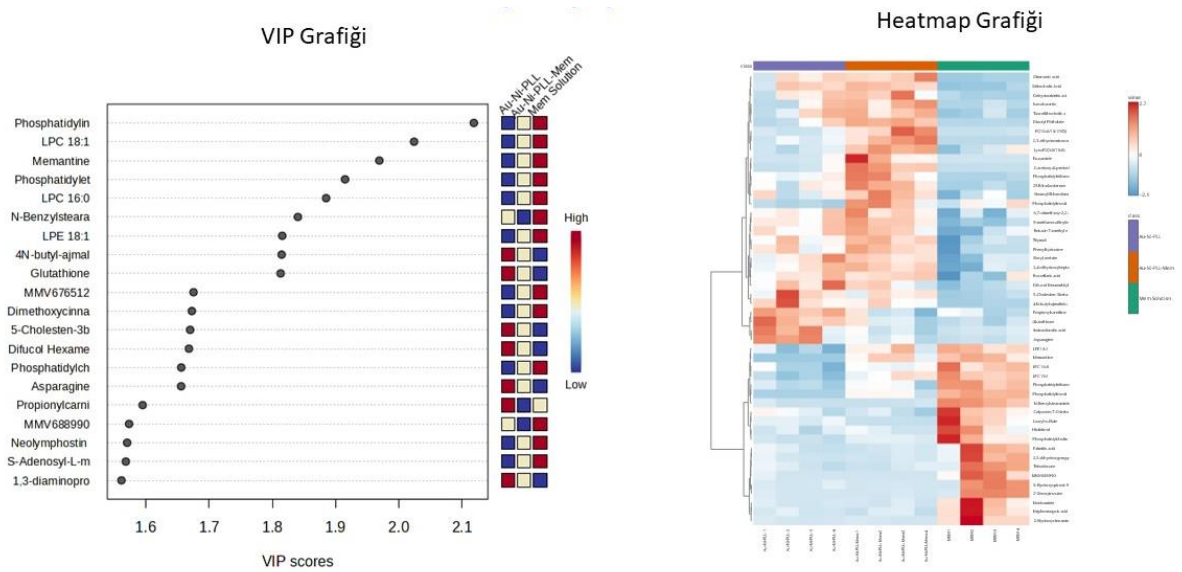
Alınan üçlü karşılaştırma sonuçlarının PCA grafiği ve PLS-DA grafiği Şekil 4.51.'de sunulmuştur. Aynı gruplarda tespit edilen metabolitlerin Metabolit Isı Haritası (Heat Map) olarak sunumu ve VIP (Variable Importance in Projection - Yansımadaki Değişken Önemi) grafiği şekil 4.52.'de verilmiştir. Beklendiği üzere Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların metabolik profilinin hem Au-Ni-PLL nanomotorlar ile hem de memantin çözeltisi ile ortak noktaları bulunmaktadır.

Au-Ni-PLL nanomotorlar ile Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların karşılaştırıldığı PCA grafiği ve PLS-DA grafiği Şekil 4.53.'te sunulmuştur. Aynı gruplarda tespit edilen metabolitlerin Metabolit Isı Haritası (Heat Map) olarak sunumu ve VIP (Variable Importance in Projection - Yansımadaki Değişken Önemi) grafiği şekil 4.54.'te verilmiştir. Sonuçlara göre Au-Ni-PLL nanomotorlar ile Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların metabolomik profili birbirinden farklı seyretmektedir. Bu farklılığın kaynağı memantin yükleme işlemidir ve başarılı bir şekilde yüklenen memantin metabolomik profili etkilediğini göstermektedir.

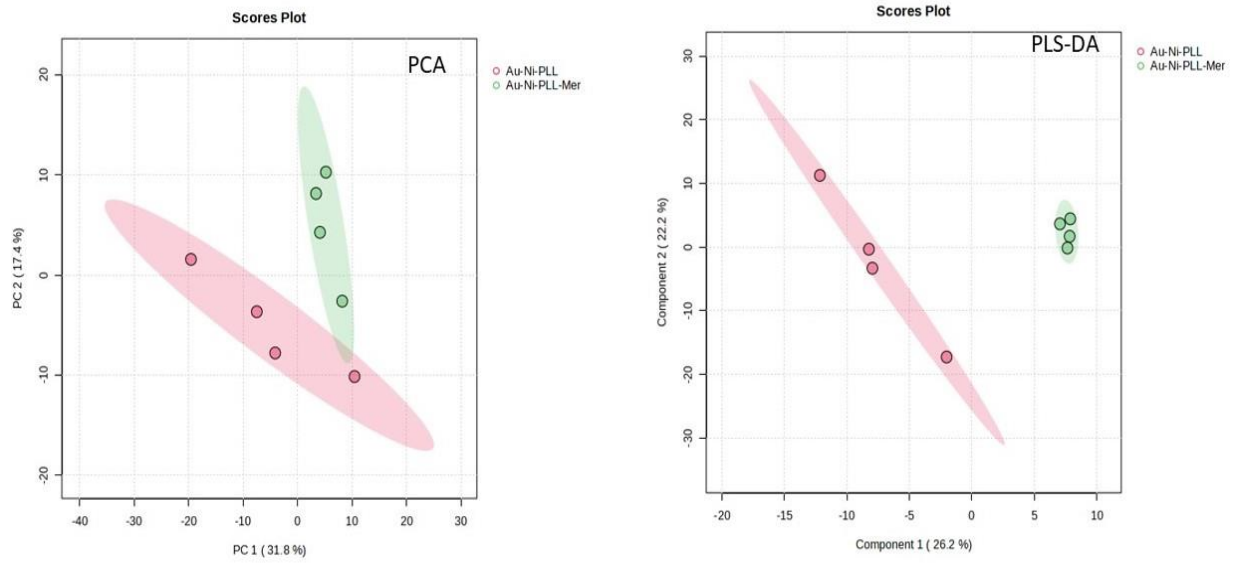
Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorlar ile memantin çözeltisi karşılaştırıldığı PCA grafiği ve PLS-DA grafiği ise Şekil 4.55.'te sunulmuştur. Aynı gruplarda tespit edilen metabolitlerin Metabolit Isı Haritası (Heat Map) olarak sunumu ve VIP (Variable Importance in Projection - Yansımadaki Değişken Önemi) grafiği ise şekil 4.56.'da verilmiştir. Bu karşılaştırmada iki grubun metabolit profilinde yine farklılıklar gözükmemektedir. Tek başına Au-Ni-PLL yapısının da metabolomik profile etkisi bulunmaktadır.



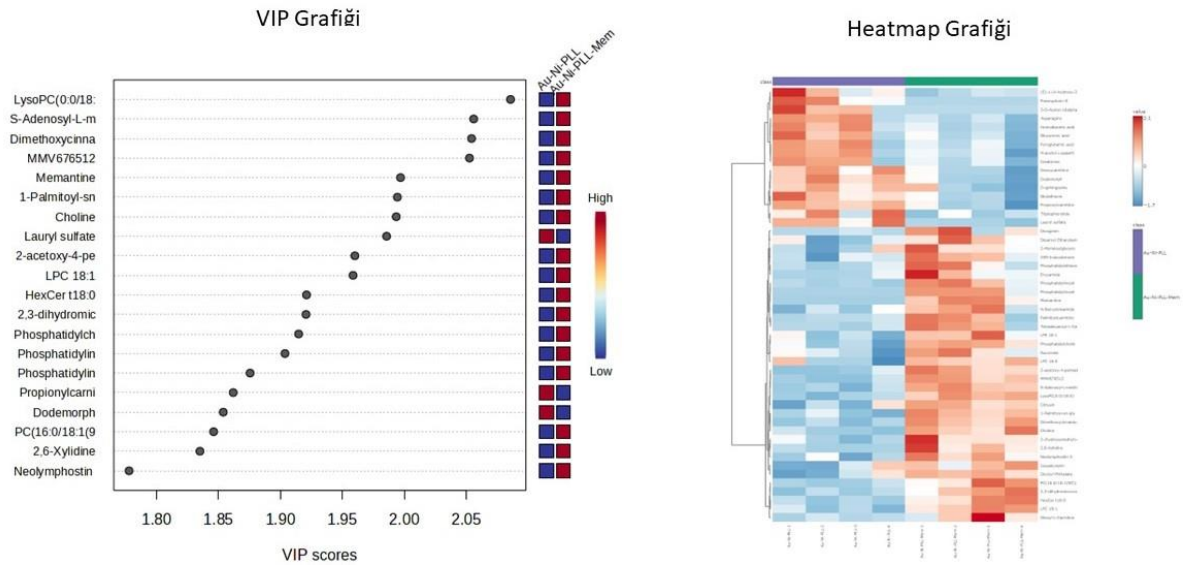
Şekil 4.51. Au-Ni-PLL nanomotor, Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor ve memantin çözeltisi uygulanmış hücre örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA (Principal Component Analysis) ve PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) skor grafikleri



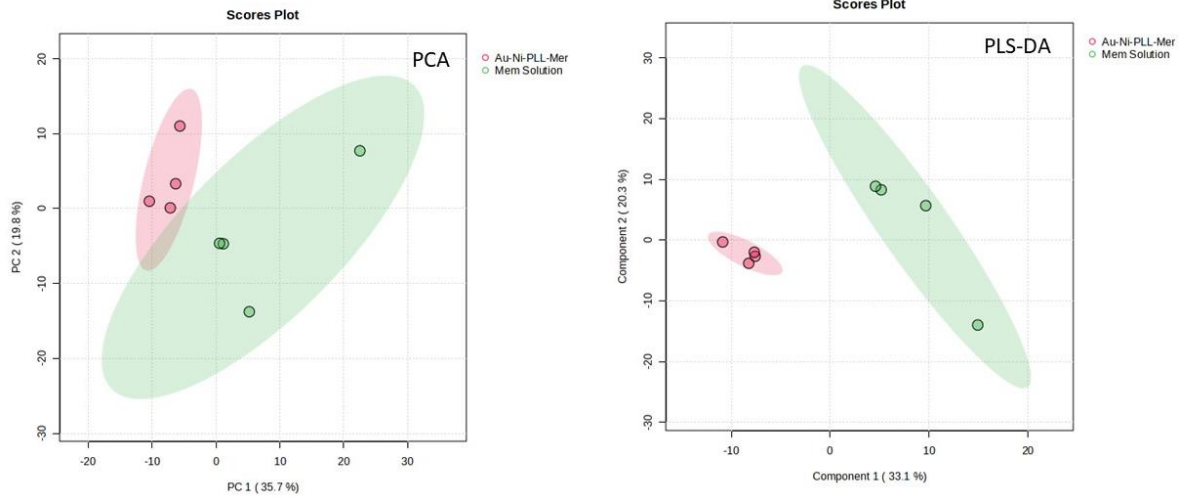
Şekil 4.52. Grupların metabolik profilinin karşılaştırılması. A) Au-Ni-PLL nanomotor, Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor ve memantin çözeltisi gruplarının ayrılmasında etkili olan metabolitlerin VIP (Variable importance in projection) grafikü (VIP de farklılaşmadaki en etkili ilk 15 metabolit alınmıştır.), B) Au-Ni-PLL nanomotor, Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor ve memantin gruplarındaki metabolitlerin ısı haritası (Heatmap) grafikü (Heat mapte farklılaşmadaki en etkili ilk 50 metabolit alınmıştır.)



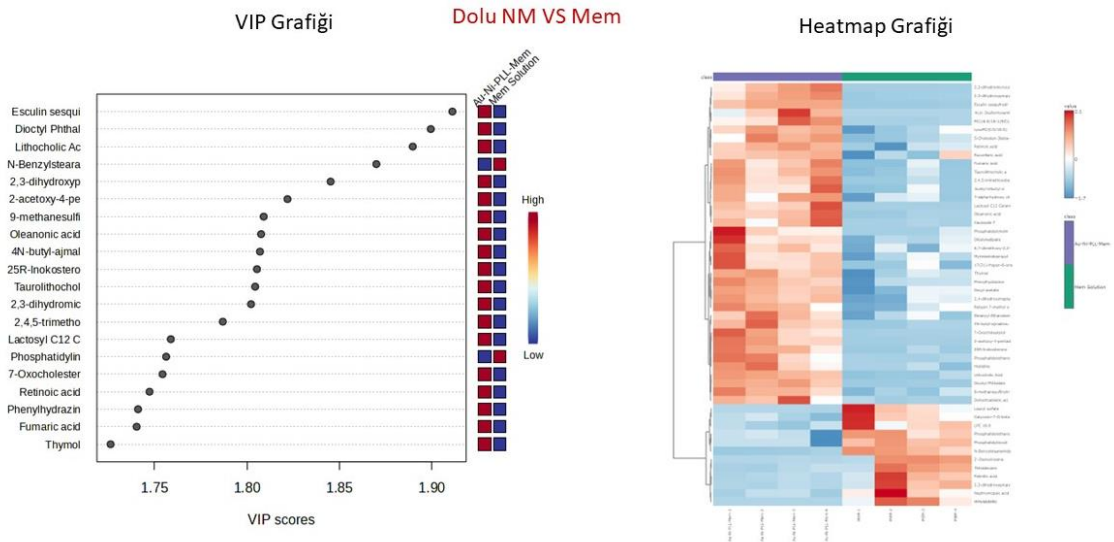
Şekil 4.53. Au-Ni-PLL nanomotor ile Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor uygulanmış hücre örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA (Principal Component Analysis) ve PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) skor grafikleri



Şekil 4.54. Grupların metabolik profilinin karşılaştırılması. A) Au-Ni-PLL ile Au-Ni PLL/MemHCI nanomotor gruplarının ayrılmasında etkili olan metabolitlerin VIP (Variable importance in projection) grafiği (VIP de farklılaşmadaki en etkili ilk 15 metabolit alınmıştır.), B) Au-Ni-PLL ile Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor gruplarındaki metabolitlerin ısı haritası (Heatmap) grafiği (Heat mapte farklılaşmadaki en etkili ilk 50 metabolit alınmıştır.)



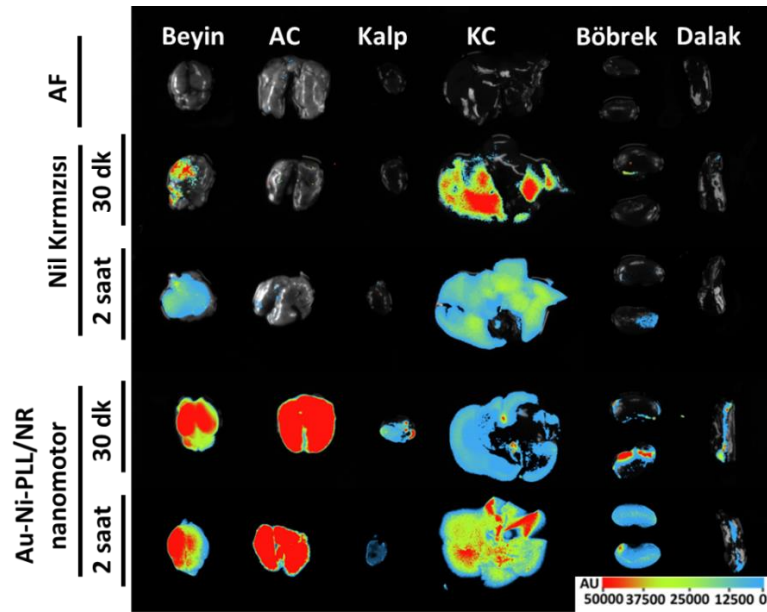
Şekil 4.55. Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor ile memantin çözeltisi uygulanmış hücre örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA (Principal Component Analysis) ve PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) skor grafikleri



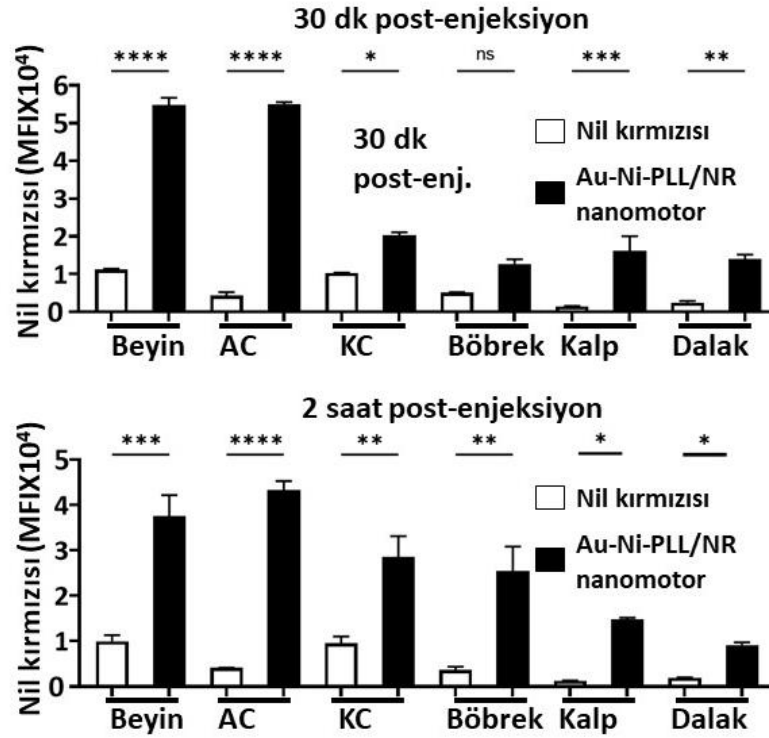
Şekil 4.56. Grupların metabolik profilinin karşılaştırılması. A) Au-Ni-PLL/MemHCl nanomotor ile memantin çözeltisi gruplarının ayrılmasında etkili olan metabolitlerin VIP (Variable importance in projection) grafiği (VIP de farklılaşmadaki en etkili ilk 15 metabolit alınmıştır.), B) Au-Ni-PLL/MemHCl ile memantin çözeltisi gruplarındaki metabolitlerin ısı haritası (Heatmap) grafiği (Heat mapte farklılaşmadaki en etkili ilk 50 metabolit alınmıştır.)

4.10. İn Vivo Çalışmalar

Gereç ve yöntem bölümü '3.2.12. İn vivo Çalışmalar' kısmında verildiği üzere sağlıklı BALB-C farelerde gerçekleştirilen biyodağılım çalışmalarına ilişkin sonuçlar Şekil 4.57. ve Şekil 4.58.'de verilmektedir. Nanomotorların enjekte edilmesinden 30 dk ve 2 saat sonra sakrifikasyon sonrası disekte edilmiş organların görüntülenmesi Newton 7.0 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Nil kırmızısı yüklü nanomotorlar (Au-Ni-PLL/NR) uygulama formülasyonu olup formülasyonun hedeflendirme etkinliğinin tespit edilebilmesi amacıyla önce %1 DMSO'da çözülerek PBS içerisinde eklenmiş nil kırmızı kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ayrıca alınan oto floresan (AF) değeri de kontrol olarak eklenmiştir. Görüntülerden elde edilen ortalama floresan yoğunluk değerleri standart sapmaları ile grafik olarak bildirilmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Au-Ni-PLL/NR nanomotorların en yoğun olarak beyin dokusunda tutulum gösterdiği görülmektedir. Ayrıca nanomotorların akciğerde de yoğun tutulumu uğradığı tespit edilmiştir. Şekil 4.57.'de Nil kırmızısı yüklü nanomotorların farelere uygulanması sonucunda organların Newton 7.0 cihazı altındaki görüntüleri sunulmuştur. Şekil 4.58.'de ise Nil kırmızısı yüklü nanomotorların farelere uygulanması sonucunda MFI değerlerinin kıyaslandığı grafik sunulmuştur.



Şekil 4.57. Nil kırmızısı yüklü nanomotorların farelere uygulanması sonucunda elde edilen farklı organlara ait 30 dk ve 2 saat post-enjeksiyon biyodağılım çalışması sonuçları (AC: Akciğer KC: Karaciğer)



Şekil 4.58. Nil kırmızısı yüklü nanomotorların farelere uygulanması sonucunda elde edilen farklı organlara 30 dk ve 2 saat post-enjeksiyon ait biyodağılım çalışması sonuçları (AC: Akciğer KC: Karaciğer) (İstatistiksel farklılıklar sırasıyla; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ olarak belirtilmiştir.)

Alınan sonuçlar 30 dk post-enjeksiyon noktasında beyinde en yüksek oranda Au-Ni-PLL/NR tutulumunu göstermektedir. 2 saat post-enjeksiyonda ise böbrek ve karaciğer tutulumunda da artış gözlenmiştir. Her iki zaman noktasında da kontrol grubuna kıyasla beyin dokusunda daha yüksek oranda tutulum gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmaları kapsamında Alzheimer Hastalığının tedavisi amacıyla MemHCI yüklü nanomotor formülasyonları ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanmış ve tasarlanan bu sistem başarılı bir şekilde geliştirilerek in vitro ve in vivo karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlar bu bölümde bilimsel olarak tartışılmış ve literatür ile kıyaslama yapılmıştır.

5.1. Memantin' in Miktar Tayini Yapılmasına Yönelik LC-MS/MS Analitik Yöntem Validasyonu

Diğer kromatografik dedektörlere kıyasla kütle spektrofotometresinin (MS) hassas ve oldukça spesifik doğası nedeniyle, MS'nin kromatografik tekniklerle birleştirilmesi her zaman istenmiştir. Gaz kromatografisinin MS'ye (GC-MS) bağlanması, 1950'lerde, 1970'lerden itibaren sağlanmıştır. Nispeten ucuz ve güvenilir GC-MS sistemleri artık birçok klinik biyokimya laboratuvarında kullanılabilir ve karmaşık karışımların analizinin ve açık tanımlamanın gerekli olduğu çeşitli alanlarda vazgeçilmezdir. MS'nin sıvı kromatografisi (LC), (LC-MS) ile birleştirilmesi de bir diğer ilerleme olarak değerlendirilmiştir, ancak mevcut MS iyon kaynaklarının sürekli bir sıvı akışı ile göreceli uyumsuzluğu nedeniyle bu alandaki ilerleme uzun yıllar sınırlı kalmıştır. Bu durum, 1980'lerde Fenn tarafından elektrosprey iyon kaynağının geliştirilmesiyle değişmiştir. Fenn, biyolojik moleküllerin analizi için son derece kullanışlı bir başka MS iyonizasyon tekniği olan matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonunu geliştiren Koichi Tanaka ile 2002 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür (132).

Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS), sıvı kromatografi (HPLC) ve kütle spektrometresinin (MS) birleşiminden oluşan bir analitik kimya tekniğidir. Bu teknik hem fiziksel ayırma yeteneklerini hem de kütle analizi yeteneklerini bir araya getirmektedir. (133). Eşleşmiş kromatografi - MS sistemleri kimyasal analizde yaygın olarak kullanılmaktadır çünkü her iki tekniğin de bireysel yetenekleri birleştirilmiş ve sinerjik hale getirilmiştir. Sıvı kromatografisi, karışımları farklı bileşenlere ayırırken, kütle spektrometresi, yüksek moleküler özgüllük ve algılama duyarlılığı ile her bir bileşiğin yapısal kimliğini belirlemeye yardımcı olmaktadır (133). LC sistemi tarafından ayrıştırılan analitler,

iyonlaştırılarak MS/MS sistemine iletilmektedir. Bu tandem teknoloji, karmaşık çevresel ve biyolojik örneklerde bulunan biyokimyasal, organik ve inorganik bileşikleri hassas bir şekilde analiz etmek için tercih edilmektedir. Bu nedenle, LC-MS/MS, biyoteknoloji, çevre izleme, gıda işleme, farmasötik, zirai ilaç ve kozmetik endüstrileri gibi birçok farklı sektörde kullanılabilir (132, 134).

LC-MS/MS, analitlerin niteliksel ve niceliksel olarak incelenmesine olanak tanımaktadır. Karmaşık ortamlarda tek veya çoklu analitlerin tespit edilmesi, eser düzeydeki bileşiklerin analizi, ilaç etken maddelerinin yanı sıra kirlilik ve metabolitlerinin incelenmesi, gıdalardaki katkı maddeleri veya pestisitlerin tespiti, kan, idrar, doku gibi biyolojik örneklerin hassas ve doğru bir şekilde analiz edilmesi için bu teknik kullanılabilir (132-134).

LC-MS/MS, çeşitli analitlerin tespitinin yanı sıra numunelerdeki eser miktarlardaki maddelerin belirlenmesi için tercih edilen en hassas yöntemlerden biridir. Numunenin bileşimini, miktarını ve moleküler özelliklerini belirlemede önemli bir role sahiptir. Küçük moleküllerden büyük proteinlere kadar geniş bir yelpazede kullanılabilir, bu da polar, iyonik, termal kararlılık gösteren ve uçucu olmayan bileşiklerin analizini içerir. (132, 133).

Çalışma Prensipleri

LC-MS/MS tekniğinde moleküller öncelikle fizikokimyasal özelliklerine göre HPLC cihazı ile ayrılır ve sonrasında ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Moleküllerin iyonizasyon ile uyarılması işlemi kütle spektrometreleri ile gerçekleşmekte ve uyarım sonucu moleküller yüklü iyonize moleküller haline dönüşmektedir. Moleküller birinci kuadropol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılmakta ve collision gazı adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile (Azot) parçalanmaktadır. Parçalanma sonucu oluşan iyonların ikinci kuadropol filtrede daughter veya product ion olarak isimlendirilen ana ve parçalanma iyonları üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Aynı m/z oranına sahip birçok molekül olabilir, ancak aynı parçalanma iyonlarına sahip olma olasılığı 1/10000'dir. Bu aşama örnekte bulunan bileşenlerin yapısı, miktarı ve molekül ağırlığı hakkında bilgi vermektedir.

Küçük moleküllerden büyük proteinlere kadar, polar, iyonik, termal olarak kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri yüksek hassasiyetle ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. LC-MS/MS, madde miktarının çok düşük konsantrasyonlarda (ng/pg) tayin edilmesine olanak tanır. Alınan sonuçların validasyonunun sağlanması şarttır. (134, 135).

Analitik bir yöntemin validasyonu, istenilen kullanım amacına uygun olacak şekilde analitik yöntemin uygunluğunu göstermek için yapılan deneysel çalışmaların tamamını ifade etmektedir.

Deneysel çalışmalar sonucunda MemHCI' nin numune içerisinden miktar tayini yapılabilmesine olanak sağlayacak LC-MS/MS analitik yöntemi başarı ile geliştirilmiş ve tüm parametreler üzerinden valide edilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemin 0.01-10 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu MemHCI için elde edilen r^2 değerleri olan 0.998 ile gösterilmiştir. MemHCI için 0.08 µg/mL olarak bulunan LOQ değeri, geliştirilen analitik yöntem kullanılarak nanomotor formülasyonlarından salınan etkin madde miktarlarının tayin edilebilmesine olanak sağlayacak yeterli bir düzeyde hassasiyet sağlamıştır.

Analitik yöntemin seçiciliği açısından değerlendirildiği zaman ise, MemHCI ve Amt piklerinin tespit edildiği zaman noktalarında mobil faz veya formülasyonda yer alan diğer maddelerin girişim yapmadığı ve bu yöntemin etkin madde ve iç standart için seçici olduğu gösterilmiştir.

Validasyon çalışmalarından olan doğrusallık çalışmaları 0.01-10 µg/mL konsantrasyon aralığında gerçekleştirilerek çalışılan konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltinin konsantrasyonu ile LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen pik alanı arasında doğrusal bir orantı olduğu tespit edilmiştir. Analize ilişkin sonuçlar, Tablo 4.3.'te verilmiş olup MemHCI'nin kalibrasyon doğrusu için r^2 değeri 0.998 ± 0.0005 olarak bulunmuştur. Literatürde de belirtildiği ve ilgili sağlık otoriteleri ve kılavuzları tarafından da onaylandığı üzere, r^2 değerinin 1'e yakın olması değişkenler arası ilişkinin güçlü olduğunu ifade eder. Bu bulgular doğrultusunda, yöntemin doğrusallığı, çalışılan konsantrasyon aralığında gösterilmiştir (136).

Doğruluk çalışmaları 0.01, 0.05, 1.00 ve 5.00 µg/mL olmak üzere kalibrasyon aralığında bulunan dört farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ve % geri kazanım

değerleri 96.68 ± 2.62 olarak belirlenmiştir. Alınan sonuçlarda ortalama geri kazanım değerlerinin literatür ile ve FDA kılavuzları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak yöntemin doğruluğu gösterilmiştir (136).

Analitik metodun kesinliği de aynı 4 konsantrasyonda (0.01, 0.05, 1.00 ve 5.00 $\mu\text{g/mL}$) yapılan gün içi ve günler arası çalışmalarla belirlenmiştir. Gün içi analizler tekrarlanabilirlik günler arası analizler ise tekrar elde edilebilirliği değerlendirmeyi sağlamaktadır. Çalışmalara ait sonuçlar Tablo 4.4.'de sunulmuştur. Ölçümlerden hesaplanan % varyasyon katsayısının % 2'ye eşit veya daha küçük olması beklenmektedir. Her iki parametre için değerlendirilen varyasyon katsayılarının % 2'yi aşmadığı ve yöntemin tekrarlanabilir ve gün içi ile günler arası elde edilebilirliğinin gösterildiği tespit edilmiştir (122, 136).

Yöntemin sağlamlığını test etmek için yapılan çalışmalarda optimum koşullar değiştirilmesine rağmen sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p < 0,05$).

Kararlılık çalışmaları MemHCl sulu çözeltisinin pH 7,4 fosfat tamponunda 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde yürütülmüştür. 1.00 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda 72 saat boyunca konsantrasyonda bir farklılık görülmediği gösterilmiştir.

Yapılan stabilite çalışmalarında 0.01 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan MemHCl stok çözeltileri en az 1 ay süreyle $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de kararlı bulunmuştur. Test değerleri kabul edilebilir doğruluk (yani, taze numunelerden %85-115) ve kesinlik (yani, $\pm 15\text{ RSD}$) sınırları içerisinde bulunmuştur (136).

Yöntemin tutarlılığının testi için iki farklı analist tarafından hazırlanan MemHCl çözeltileri analiz edilmiştir. Analiz sonuçları t-testi ile karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) gözlenmiştir.

Tüm bu çalışmalar sonucunda geliştirilen LC-MS/MS yönteminin ilgili ICH kılavuzuna göre validasyonu gerçekleştirilmiş ve geçerli bir yöntem olduğu değerlendirilmiştir.

5.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Nanomotor formülasyonu hazırlamada membran kalıp tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte nanomotor bileşeni olarak kullanılacak malzemeler kalıp içerisine

elektrokimyasal yolla biriktirilmiştir ve kalıptan ayrıldığında, ki bahsedilen bu kalıp alümina membrandır, motorlar serbest kalmaktadır. Elektrokimyasal biriktirme nanomotor sentezinde sıkça kullanılan bir yöntemdir (137, 138). Biriktirme yapılırken kullanılan Membran kalıp yönteminin büyük bir avantajı kalıp çapı belirli olduğu için kalıptan ayrılan her motorun aynı çapta olmasıdır. Elektropolimerizasyon ve elektrokimyasal kaplama teknikleri homojen, kararlı ve sağlam yapıların oluşturulabilmesi adına belirli avantajlara sahiptir (139, 140).

Nanomotor yapısında L-lisin aminoasitinden yola çıkılarak oluşturulan poli-L-lisin polimer tabakası kullanılmıştır. Bu polimer, biyoyumlu olmasının yanında yapısında $-COOH$ ve $-NH_2$ fonksiyonel grupları içermektedir ve elektrokimyasal polimerizasyonla lisin amino asidinin monomer olarak kullanılması ile kendiliğinden fonksiyonel yüzeylere sahip polimer tabanlı platformların oluşmasına sebep olmaktadır (141). Böylelikle çalışmada, farklı bir fonksiyonelleştirme işlemine gerek duyulmamaktadır. Sentezlenen motorlar fonksiyonel gruplar içerdiğinden herhangi bir ekstra modifikasyon basamağına gerek kalmaması ve literatürde amino asit bazlı biyoyumlu nanomotorların MemHCI taşıma ve salım amaçlı olarak bulunmaması bu nanomotor tasarımının en önemli avantajlarından ve özgünlüklerinden biridir.

Giriş bölümünde de bahsedildiği üzere farklı tasarım ve özelliklere sahip nanomotorlar literatürde bulunmaktadır. Tez kapsamında üretilen ve ilaç taşıyıcı nanosistem olarak kullanılan Au-Ni-PLL nanomotorlar manyetik alan etkisi altında hareket eden nanomotorlar grubundadır. Bu nanomotorun kullanımının avantajı, katalitik motorlara alternatif olarak geliştirilen yakıtsız nanomotorlar grubunda olması ve katalitik nanomotorların yakıtlarından kaynaklanabilecek toksisitenin bu grupta görülmemesidir. Bu nano/mikromotor grubunda hareket mekanizması olarak günümüze kadar rapor edilen çalışmalar ele alındığında sadece Manyetik Alan değil Akustik Alan, Elektrik Alan, Ultrason ve Işık etkileri yer almaktadır (102, 142-145). Son zamanlarda ortaya konulan çalışmalar, bu etkilerden özellikle Manyetik Alan altında etkin hale getirilen ve hareket ettirilen nano/mikromotorların gerçek yaşam uygulamaları açısından avantajlar ortaya koyabileceğini işaret etmektedir (146, 147).

Diğer hareket mekanizmalarının doku veya hücrelere hasar gibi problemler yaratmasından dolayı uygulama anlamında biraz daha yol katetmesi gerektiği bildirilmektedir. Ayrıca, ultrason gibi etkiler varlığında biyomedikal uygulamalarda

kontrolün zor olduğu bilinmektedir. Ek olarak, in vivo görüntüleme arayüzeye bağlı olarak ultrasonik sistemde kuvvetli bir yansıma olduğu ve bu nedenle sinyal çevirici ve biyolojik örnek arasında direkt bir temas kurulması gerektiği bilinmektedir (148-150).

Sentezde kullanılan Ni katmanı nanomotor temel yapısında yer almaktadır. Manyetik özellikli bir madde olduğu için motorlara manyetik alanda hareket kabiliyetini vermektedir. Au katmanı ise nanomotorlarda istenilen morfolojinin oluşturulmasını sağlamaktadır. Bu katmanın uzunluğu optimize edilmiştir. Önce iki kez yani iki tabaka olarak Au katmanı biriktirilmiştir. Nanomotorların optik mikroskopla incelenmesi ve manyetik alanda hareketlerinin takibi sonucunda yapıda ikinci Au tabasına da gerek kalmadan düzgün morfolojide motorların hazırlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bu Au tabaka nanomotorun uzunluğunu gereksiz şekilde arttırdığı için tek tabaka Au tabakası yeterli olmuştur. Ayrıca sentez aşamasında kullanılıp daha sonra yapıdan ayrılan Cu kurban tabaka da tel olarak membranda yapıların düzgün (konkav formatta) şekilde hazırlanmasına yardımcı olmaktadır (151).

Au tabakası morfolojik düzenlemenin yanı sıra PSS aracılığıyla etkin maddeye motorlara bağlanmada ek bir yüzey sunmuştur. Burada temel prensip PSS'in negatif yüklü sülfonat grubu ile MemHCl'nin pozitif yüklü amin grubu arası elektrostatik etkileşim gözlenmesidir. Böylece etkin madde bağlanmasına katkı sağlamıştır.

Tabakalar oluşturulurken kullanılan akım değerleri ve sonuçta alınan elektrokimyasal eğriler literatürle uyumludur (145, 152). Sistemden geçen yükü sabit bir şekilde tutmak adına yapılan çalışmalarda biriktirme süresinde oynamalar elde edilen tabakaların üst üste eklenmesi aşamasında değişiklik gösterilmektedir. Bu durum elektrokimyasal çalışmalar da beklenen bir süreçtir (140, 153). Optimizasyon çalışmalarında görülen/elde edilen önemli durum ve sonuçlar şu şekilde paylaşılabilir:

- Nanomotorların hareketini ve yönlenmesini etkileyen en önemli unsur manyetik Ni tabakasıdır. Bu nedenle nanomotor kontrolünü, hızını ve manevra kabiliyetini artırmak için bu tabakanın optimizasyonu önemlidir. Bu

nedenle farklı biriktirme sürelerinde sadece titreşen (salınan), hareket eden ve çok hızlı hareket eden motorları sentezlemek olasıdır.

- 2. kez eklenen Au tabakası yapıyı gereğinden fazla boy anlamında uzatmaktadır. Yapıya ait çaplar 200 nm gözenek çapına sahip alümina membranlarda gerçekleştiği için bütün optimizasyon çalışmalarında belirli bir aralıkta kalmaktadır (ortalama 200-300 nm civarı). Boy/çap oranı arttıkça motor hızı arttırabilmektedir.
- Polimerik tabakanın fabrikasyonu için en uygun koşulun dönüşümlü voltametri (CV) tekniği olduğu görülmüştür. Sabit gerilimde elektroliz (i-t) yönteminde elde edilen polimerik tabakanın nanomotor morfolojisini bozduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CV yönteminde de düzgün yapılar 10 döngü sayısında elde edilmiştir.

5.2.1. Partikül Büyüklüğü, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Nanomotorların üretim tekniği olarak membran kalıp tekniği kullanıldığı için çaplarının bu kalıbın çapı ile aynı boyutlarda olması beklenmektedir. Kullanılan alümina membranın çapı 200 nm'dir. Sentezlenen motorların çapları da uyumlu olarak 200-300 nm arasındadır. Membran kalıptan motorları çıkarma işlemi sırasında çapta bir miktar genişleme olabilmektedir. Beyne hedeflendirme için hazırlanan nanopartiküllerin çaplarının <200 nm olması gerekmektedir (154). Hazırlanan nanomotorların çapları bu limitin üst sınırındadır. Ancak hedeflendirmede aynı zamanda manyetik alan kullanılacaktır. Bu nedenle boyutun hedeflendirmede başarı için tek bir parametre olarak değerlendirilmemesi gerekmektedir. Partikül boyutunun belirlenmesinde ise Malvern Zetasizer cihazı yetersiz kalmaktadır. Bunun sebebi nanomotorların çubuk şeklinde olmasıdır. Çubuk yapıların boyları ile çapları birbirinden anlamlı derecede farklı boyutlarda olduğu için cihaz her boyutu farklı bir motor olarak algılamakta ve PDI değerini yüksek vermektedir. Bu cihaz ile ölçüm küresel şekilli nanopartiküller için daha uygundur (155). Bu nedenle SEM ile görüntülemeye motor boy ve çapları da ölçülerek karşılaştırma yapılmış ve değerlendirilmiştir.

Bunun haricinde nanomotorların zeta potansiyelleri de Malvern Zetasizer ile ölçülmüştür. Sonuçlar yorumlandığında MemHCl yüklemesi ile nanomotorların zeta potansiyellerinin negatife kaydığı gözlenmektedir (Tablo 4.8.)

5.2.2. Morfolojik Özellikler

Sentezlenen nanomotorların SEM analizi ile morfolojisi incelenmiş ve nanomotorların uzunluk ve yapılarının literatürdeki metal bazlı yapılar ile de uyumlu olduğu görülmüştür (102, 110, 156, 157). Çubuk şeklinde gözlenen nanomotorların çaplarının membran kalıp çapı ile (200 nm) uyumlu olduğu gözlenmiştir. Boylarına dair net bilgi de bu yöntemler elde edilmiştir ve Malvern Zetasizer ile ölçülen değerler ile uyumludur.

Nano Elektrokimyasal teknikler kullanılarak elde edilen kararlı (robust) ve aynı (uniform) yapılar polimerik katmanı ile birlikte başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

5.2.3. DSC Analizleri

Nanomotorların in vitro karakterizasyon çalışmaları kapsamında DSC ile termal özellik belirlenmesi ve enkapsülasyonun doğrulanması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

DSC Analizleri kapsamında boş nanomotor ve MemHCl yüklü nanomotorların DSC termogramları çekilerek kıyaslama yapılmıştır. Şekil 4.18.'de verilen termogramları incelendiğinde 75.84°C ve 89.58°C'de işaretlenmiş erime piklerinin sırasıyla boş nanomotor yapısında bulunan Au ve Ni'yi gösteren pikler olduğu gözlenmiştir (158, 159). Memantin HCl yüklü nanomotorlarda ise motor yüzeyi MemHCl ile kaplandığı için boş motor yapısında gözlenen pikler kaybolmuştur. Bu da bize MemHCl' nin başarılı bir şekilde nanomotorlara yüklendiğini göstermektedir.

5.2.4. Enerji dağılımı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizleri

EDX analizi, enerji dağılımı X-ışını spektroskopisi olarak da adlandırılır ve bir numunenin yüzeyindeki elementlerin kimyasal bileşimini belirlemek için

kullanılan bir tekniktir. Bu analiz, numunenin X-ışınına maruz bırakılmasıyla elementlerin karakteristik X-ışını yayılımını ölçer (160).

EDX analizi, bir numunenin hangi elementleri içerdiğini ve bu elementlerin yoğunluğunu belirlemek için kullanılır. Özellikle katı numunelerin yüzey bileşimlerinin analizinde yaygın olarak kullanılır. Örnek olarak, malzeme bilimi, kimya, metalurji, jeoloji ve biyoloji gibi birçok alanında kullanılır (160).

Nanomotorlar, çok küçük boyutlara sahip oldukları için, onların bileşimlerini ve yapılarını belirlemek için geleneksel analiz yöntemleri genellikle yetersiz kalabilmektedir. EDX, nanomotorların yüzeyindeki elementlerin belirlenmesi için yararlıdır çünkü bu teknik, numunenin yüzeyindeki elementlerin kimyasal bileşimini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu nedenle, nanomotorların EDX analizi, bunların bileşimlerini ve yapılarını anlamak için önemli bir araçtır. Hızlı ve kullanışlı bir yöntemdir, aynı anda birden çok elementin analizine olanak vermektedir. Modern EDX cihazları yüksek hassasiyet sağlar ve çok düşük konsantrasyonlardaki elementleri bile tespit edebilir. Bu, nanomotorların bileşimindeki bileşenlerin çok düşük konsantrasyonlarda bile doğru bir şekilde belirlenebilmesini sağlamaktadır (161, 162). Bu nedenle elementel analiz için EDX yöntemi seçilmiştir.

EDX analizleri sentezlenen Au-Ni-PLL nanomotor yapıları içerisindeki Ni ve Au varlığını Şekil 4.20.'de belirtildiği üzere açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca yapıdaki C ve O'da spektrumda gözlenmiştir. Bu da yapıdaki polimeri işaret etmektedir. Sentez aşamasında nanomotor yapısına eklenen her bir bileşene sonuçta elde edilen EDX spektrumunda rastlanmıştır.

5.2.5. Memantin Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmak amacıyla geliştirilen nanomotor sistemlerine yüklenmek üzere Memantin model ilaç olarak seçilmiştir. Etkin madde MemHCl'nin suda çok çözünmesi nedeniyle nanomotorlar ile inkübasyon çalışmalarında MemHCl'nin sulu çözeltisi kullanılmıştır. Literatürde daha önce nanomotorlara MemHCl yükleme ile ilgili referans alınabilecek bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ilk defa ekibimizce gerçekleştirilmiştir.

Mikro/nanomotor sistemlerinde ilaç yükleme ve taşıma çalışmaları diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre daha yeni bir alan olup yapılmış çalışma sayısı da oldukça sınırlıdır (98). Au-Ni nanomotorlara daha önce yükleme çalışması yapılan iki etkin madde bulunmaktadır. Bunlardan ilki doksorubisin diğeri ise paklitakseldir (110, 163, 164). Bunun haricinde Klaritromisin yüklü magnezyum yapılu nanomotorlar ve mikromotorlar da çalışılmıştır (165, 166). Bu üç etkin madde de hidrofobik özelliktedir. Aslında maddelerin hidrofobik özellikte olması nanomotor yüzeyine tutunmasında bir avantaj sağlamaktadır. Sulu ortam içerisine kolayca kaçamayan etkin madde motor yüzeyine tutunmaya meyilli davranmaktadır. Bu noktada MemHCl'nin bir dezavantajı gündeme gelmektedir. Suda çözünürlüğünün yüksek olması sebebiyle MemHCl sulu ortamda kalmaya meyilli olmakta, nanomotor yüzeyine yüksek yüzdelerde inkübe edilememektedir. Tek başına MemHCl sulu çözeltisi ile inkübasyon etkin maddeyi nanomotor yüzeyine yeterli oranda tutturmayı sağlayamamıştır. Bu nedenle MemHCl ile inkübasyon öncesi nanomotor yüzeyi ara ajanlarla muamele edilerek MemHCl'nin tutunabileceği farklı yüzey bileşenleri oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu noktada literatür çalışmaları da referans alınarak EDC-NHS, PSS ve PLGA kullanılacak ara ajanlar olarak seçilmiştir (102, 167-172). Literatürdeki yaygın kullanımı sebebiyle çalışmalara EDC-NHS ile başlanmıştır ve derişimleri yine literatür referans alınarak 10 ve 20 μM olarak hazırlanmıştır (173). EDC-NHS ile inkübasyon süresi 15 dk, 1 saat ve 4 saat olarak çalışılmıştır. Süreler arasında belirgin bir fark gözlenmediği için süre olarak 15 dk seçilmiştir. PSS için ise yine literatürden faydalanılarak 1 mg/mL konsantrasyon ve 15 dk inkübasyon süresi seçilmiştir (145). PLGA için de aynı süre kullanılmış, konsantrasyon ise literatür referans alınarak seçilmiştir (170).

Takip eden MemHCl inkübasyon işlemi için ise öncelikle 75 μM ve 300 μM konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar ilk aşamada yapılan IC_{50} belirleme çalışmalarından yola çıkılarak seçilmiştir. Inkübasyon süresi ise 1 saat, 6 saat ve 24 saat olarak seçilmiştir. Bu konsantrasyonlarda yapılan çalışmalar sonucunda inkübasyon süresi fark etmeksizin konsantrasyonların yetersiz kaldığı görülmüştür. MemHCl'nin nanomotor yüzeyine bağlandığı elektrokimyasal eğrilerde gözlenmiştir. Ancak LC-MS/MS yöntemi ile enkapsülasyon etkinliği ölçülmek istendiğinde enkapsülasyon saptanamamıştır. Bunun nedeni etkin maddenin

nanomotor yüzeyine çok düşük oranda bağlanmasıdır. Bu nedenle MemHCl konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde artırılarak yeni bir çözelti hazırlanmış ve inkübasyon bu çözelti ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon çözeltisi için bu yüksek konsantrasyon seçiminin sebebi fazla miktarda etkin madde ile nanomotor inkübasyonu sağlayıp mümkün olan en yüksek oranda etkin madde yüklenmesini sağlamaktır. Bu konsantrasyon literatür incelenerek seçilmiştir (94). 1 saat, 6 saat ve 24 saat olarak çalışılan etkin madde inkübasyon süreleri arasında belirgin bir fark gözlenmediği için süre 1 saat olarak seçilmiştir.

Etkin madde inkübasyonu için konsantrasyon ve süresi optimize edildikten sonra ara ajan seçilmiştir. Bu aşamada PSS ile ara etkileşim sonrası enkapsülasyonun ve salımın daha yüksek olduğu gözlenmiştir. PSS'in negatif yüklü sülfonat grubu ile pozitif yüklü MemHCl'nin amin grubu arası elektrostatik etkileşim ile etkin madde bağlanmaktadır. Bu nedenle bu ara ajan ile etkileşimin daha yüksek olması bu bilgi ile uyumludur (145).

EDC-NHS ile de yüksek enkapsülasyon etkinliği gözlenmesine rağmen salım çalışmalarında salım ortamında ölçülen etkin madde miktarı çok çok düşük olarak gözlenmiştir. Bunun sebebinin EDC-NHS ile kovalent bağlanan etkin maddenin bu kolayca kırılmadığı için salım ortamında saptanamaması olarak yorumlanmıştır. Bu nedenle optimum formülasyon seçilirken EDC-NHS ara ajan kullanımından vazgeçilmiştir.

PLGA ile yapılan çalışmalarda PLGA için çözücü olarak Etil asetat kullanılmıştır. Bu noktada PLGA'dan hemen sonra MemHCl inkübe edileceğinde çözücüsü su olduğu için etil asetat fazını ayırıp sulu MemHCl çözeltisi ekleme aşamasında motorların bu farklı çözücü geçişi sırasında tam dağıtılamadığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra alınan enkapsülasyon sonuçları arası varyasyon gözlenmektedir. Bu nedenle optimum formülasyon seçiminde PLGA tercih edilmemiştir.

5.2.6. Enkapsülasyon Etkinliği

Tez kapsamında yürütülecek in vitro ve in vivo çalışmalara temel sağlamak ve üretilen nanomotorlara yüklenen etkin madde miktarlarının belirlenebilmesi için

enkapsülasyon etkinliği çalışmaları gerçekleştirilmiş ve çalışma sonuçları Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği (EE) nanopartiküllerin içerisine enkapsüle edilmesi hedeflenen etkin maddenin ne derecede başarılı bir şekilde yüklendiğinin matematiksel gösterimi şeklinde tanımlanabilmektedir. Tez kapsamında çalışılan nanomotorlar için bu tanım nanomotorların yüzeyine bağlanabilen etkin madde miktarına karşılık gelmektedir. Bu bağlamda Tablo 4.9.'da gösterildiği şekilde hazırlanan tüm formülasyonlar için MemHCI' nin enkapsülasyon etkinliği tayin edilmiştir. Kullanılan MemHCI çözeltisi derişimi arttıkça MemHCI yükleme oranının arttığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasının (24 sa) enkapsülasyona olumlu bir katkısı gözlenmemiştir. Bunun sebebinin motor yüzeyinin doygunluğa ulaşması olduğu düşünülmüştür.

Genel itibariyle enkapsülasyon etkinliği analiz sonuçlarında bir varyasyon gözlenmiştir. Tüm çalışmalar n=3 olarak tekrarlanırsa da gözlenen bu varyasyonlar ilk aşamada sonuçları yorumlamayı güçleştirmiştir. Bu varyasyonun sebebi nanomotorların her üretimde aynı verimle kalıptan ayrılabilmesi ve her üretimde aynı etkililikle elektrokimyasal biriktirme sağlanabilmesi olabilir. Varyasyonu önlemek için her aşamada öncelikle nanomotorlar kurutulmuş ve kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. Kuru ağırlıkların üzerine bilinen miktarda su eklenerek konsantrasyonu belirli nanomotor dispersiyonları hazırlanmıştır. Nanomotor pozolojisi bu şekilde yapılarak her seferinde aynı miktarda motor alımı sağlanmıştır.

Tekrarlanabilir sonuçlar vererek en yüksek EE değerinin gözlendiği çalışmalar 5 mg/mL MemHCI çözeltisi ile hazırlanan PSS ile ara inkübasyonu gerçekleştirilmiş Au-Ni-PLL nanomotorlar ile gerçekleştirilen çalışmalar olmuştur. Bu nedenle in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılacak formül olarak bu formül seçilmiştir.

Literatürde nanomotorlara ilaç yükleme çalışmaları incelendiğinde Au-Ni nanomotorlar kapsamında sadece iki etkin madde ile yükleme çalışmalarına rastlanmıştır. Bunlardan ilki doksorubisin diğeri ise paklitakseldir (110, 163, 164). Daha önce nanomotorlara MemHCI yükleme çalışması hiç gerçekleştirilmemiş olup ilk defa grubumuzca çalışılmıştır. Literatürde bulunan iki etkin maddeye ait yükleme çalışmalarında alınan sonuçlar incelendiğinde doksorubisinin maksimum yüklenme

kapasitesi %40-45 paklitakselin ise %25'tir (164, 174). Ek olarak mikromotor ve Mg temelli nanomotorlara klaritromisin yükleme çalışmasına da rastlanmıştır. Klaritromisin yüklemede maksimum değer ise %26'dır (166). Bu durum nanomotorlara ilaç yüklemede beklenen oranların düşük olduğunu göstermektedir. Tez çalışmaları kapsamında da MemHCI doksorubisin ve paklitakselin aksine suda çok çözünür bir madde olmasına rağmen geliştirilen ve seçilen nihai formülasyonda ortalama %14.06 enkapsülasyon gözlenmiştir. Bu oran nanomotor sistemleri için bununla birlikte suda çözünür etkin madde özelinde literatür ile karşılaştırıldığında da başarılı bir oran olarak yorumlanmıştır.

5.3. Polisorbat-80 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

Polisorbat-80 yüklü Au-Ni-PLL nanomotorlar bölüm '3.2.5. Polisorbat-80 yüklü nanomotorların hazırlanması' kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.25.'te verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde değişen elektrokimyasal eğriler nanomotor yüzeylerinin başarılı bir şekilde polisorbat-80 ile kaplandığını göstermiştir. 1 saate kadar artan süre ile de bu kaplama oranı artmıştır. Literatür çalışmalarında polisorbat-80 yükleme prosedürü genellikle 1 saat olarak uygulandığı için tez çalışmalarında da süre olarak 1 saat tercih edilmiştir (175-177).

Polisorbat-80 kaplamada amaç nanomotorların Retiküloendotelial sistemden (RES) kaçışını sağlamaktır. RES monosit hücrelerinden oluşmaktadır ve vücuda giren yabancı partikül ve patojenleri yakalayarak fagosite etmekle sorumludur. %90'ı karaciğerde lokalizedir (178). Bu nedenle ilaç hedeflendirmede geliştirilen nanopartiküller uygun modifikasyonlara uğratılmadığında RES tarafından karaciğerde tutulmakta ve hedef bölgeye ilerleyememektedir (179). Literatür incelendiğinde ilaç taşıyıcı yeni sistemleri hedeflendirmede RES'i geçmek için farklı yöntemler ve yüzey modifikasyonları kullanıldığı görülmüştür. (180-184). Polisorbat-80 kaplama da bu yüzey modifikasyonlarından bir tanesidir ve literatürde birçok örneği görülmüştür (185).

Beyne hedeflendirmede de polisorbat-80 ile yüzey modifikasyonu literatürde sıkça kullanılan bir yöntem olup formülasyonun beyne gidişini artırması beklenmektedir (186-190). Bu etkinin varlığı tez çalışmaları kapsamında in vivo

biyodağılım çalışmaları ile test edilmiştir (177). Bu amaç doğrultusunda nanomotorlar polisorb-80 ile başarılı bir şekilde kaplanmış ve elektrokimyasal eğrilerle modifikasyon kanıtlanmıştır.

5.4. CRANAD-2 Yüklü Nanomotorların Hazırlanması

CRANAD-2 boya yükleme çalışmalarının gerçekleştirilme sebebi Alzheimer Hastalarında beyinde gözlenen amiloid- β plaklara bu boyanın spesifik olarak bağlanması ve bu sayede nanomotorların bu plaklara ulaşım ulaşımadığının gözlenmesini sağlamaktır (191-193).

Yapılan in vivo çalışmalar incelendiğinde beyinde bulunan amiloid plakların incelenmesinde floresans boyaların kullanılmasında bu boyaların bazı kriterleri karşılaması gerektiği belirtilmiştir. Sahip olması gereken özellikler başlıca; boyaların NIR (650-900 nm) aralıkta eksitasyon ve emisyon verebilmesi, yüksek KBE geçirgenliğine sahip olması (logP değerinin 2 ve 3.5 arasında olması), amiloid plaklara spesifik olarak bağlanabilmesi ve beyinde bulunan diğer proteinlere non-spesifik olması, bağlanmamış boyanın beyinden hızla atılabilmesi, amiloid plaklara bağlandığında floresans özelliklerinin istenilenden farklı olmaması olarak sıralanabilir (194). Bu özelliklere sahip çeşitli floresans maddeler geliştirilmiş ve etkinlikleri in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Bu maddelerden biri olan CRANAD-2, amiloid plaklara seçiciliği ile bilinen kurkuminin yapısından yola çıkarak dizayn edilmiş ve sentezlenmiştir. CRANAD-2'nin amiloid plaklara spesifik bağlandığı, KBE'den geçebildiği ve plaklara bağlandığı zaman NIR aralıkta floresans yoğunluğunu 70 kat arttığı in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Boya plaklara bağlandığı müddetçe ışımaya göstermektedir (191, 195). Bu nedenle başka bir ortamda boyanın gözlenmesi mümkün değildir. Boyanın bağlandığının kanıtlanmasına dair çalışmalar bu doğrultuda elektrokimyasal eğrilerin incelenmesi ile gerçekleştirilmiş, amiloid- β plak bulunan fareler ile çalışmalar yapılmadığı için herhangi bir görüntüleme çalışması gerçekleştirilmemiştir. Elde edilen elektrokimyasal eğriler Şekil 4.28.'de sunulmuş olup aynı gözlenen değişimler boyanın da başarılı bir şekilde nanomotor yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Nanomotor yüzeyine yapılan her bir bağlamada motora ait indirgenme ve yükseltgenme piklerinin şiddeti azalmaktadır.

Literatür çalışmaları tarandığında CRANAD-2 boyası ile amiloid- β plakları görüntüleme Alzheimer hastalığında hem teşhis hem tedavi amaçlı kullanıldığı görülmüştür (193, 196-198).

Bu çalışma gelecekte Alzheimer hastası hayvanlarla gerçekleştirilecek in vivo etkinlik çalışmaları için oldukça önemlidir. Hasta hayvanlarda nanomotor formülasyonlarının beyindeki plaklara ulaşımının bir belirteci olarak bu boya kullanılmaktadır. Bu aşamada başarı ile bu boyanın bağlanması gösterilmesi geliştirilen Au-Ni-PLL nanomotor formülasyonunun CRANAD-2 yüklenerek in vivo etkinlik çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

5.5 Motorların Manyetik Karakterizasyonu ve Hareketlerinin Gösterilmesi

Au-Ni-PLL ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların uygulanan manyetik alanda hızlarının belirlenmesi amacıyla kuvvetli bir mıknatıs (permanent magnet) yardımıyla 270 mT'da hareket ettirilen nanomotorların optik mikroskop ile video görüntüleri alınmış ve ImageJ programı kullanılarak hızları analiz edilmiştir.

Değişen manyetik alan yönüne karşılık Au-Ni-PLL nanomotorun hareket yönünün değişimini gösteren video görüntüleri optik mikroskop kullanılarak kaydedilmiştir.

Uygulanan manyetik alanın yönü mıknatısın tutuş açısı değiştirilerek değiştirilmiş ve nanomotorlar istenilen doğrultuda hareket ettirilip istenilen bölgelere taşınabilmiştir. Bunun ölçülebilir bir şekilde gösterilmesi için tek bir nanomotora kare şekil ve G harfi şekli başarılı bir şekilde çizdirilmiştir.

Literatürde manyetik metalik tabakalar içeren (Ni, Fe veya Co varlığında) nanomotorların manyetik olarak rahatlıkla hareketi sağlanmaktadır (199, 200). Ni tabakasının bu özelliği nanomotor yapısında fonksiyonel bir elektroaktif tabaka (ekstra eklenen polimer tabakası/segmenti) varken de tek başına sağlaması oldukça sevindirici olmuştur. Zira manyetik alanın son zamanlara ait çoğu biyomedikal uygulamanın gözdesi olduğu bilinmektedir. Bu durum detaylı optimizasyon çalışmalarının bir sonucu olmuştur ve karşımıza sadece metalik motorlar gibi iyi harekete ve manevra özelliklerine sahip kontrollü bir şekilde hareket eden motorlar çıkmıştır. Ayrıca tüm tabakaların elektrokimyasal olarak hazırlanması da önemli bir

özgünlüktür. Bu çıktılarının da yaygın etkisinin yüksek olacağı değerlendirilmektedir. Yapıya kargosunu alan (ilaç yüklenen) motorların hızı yüklemeye/etkileşime bağlı olarak azalmaktadır. Bu beklenen ve normal bir davranıştır (145, 164). Yapının üzerinde modifikasyon yapıldıkça aslında yapıdaki Ni katmanı ile manyetik alan arasına manyetik özelliği bulunmayan bu modifikasyon ajanları girmektedir. Bu da hem ana nanomotor yapısının manyetizasyonunu dolaylı yoldan azaltmakta hem de yapıyı serbest nanomotorlara kıyasla ağırlaştırmaktadır. Tüm bunlar sebebiyle de memantin içeren Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorlar serbest Au-Ni-PLL nanomotorlara kıyasla daha yavaş hareket etmektedir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde manyetik mikro/nanomotorların hareketlerinin karakterizasyonu için yapılan farklı çalışmalar görülmüştür (114, 201). Simülasyon uygulamaları ile (Comsol), tasarlanan nanomotorların belli özelliklerinin değişimine bağlı olarak ya da manyetik alanın değişen yön ve kuvvetine bağlı olarak hareket özelliklerinin nasıl etkileneceği simüle edilebilmektedir (202, 203). Ayrıca nanomotorların manyetik alanda (mT) artan frekans (Hz) ile hareket ettirilerek kaydedilen canlı videolarının çeşitli uygulamalar ile (örneğin MatLab) analizi sonucunda adım dışı (step-out) frekansı tespit edilmektedir (204-206). Manyetik mikro/nanomotorların hızları belli bir seviyeye kadar artabilmekte ve maksimum değere ulaştığı noktada plato yapmakta yani hızları sabit kalmakta ya da biraz azalmaktadır. Bu maksimum nokta adım dışı frekansı olarak tanımlanmaktadır. Bir diğer deyişle uygulanan manyetik alan yeterince düşük frekansta olduğunda, mikro/nanomotorlar manyetik alanla senkronize şekilde hareket etmektedir. Uygulanan manyetik torkun mikro/nanomotorun manyetik alandaki senkronizasyonunu sürdürece kadar güçlü olmadığı frekans olarak da açıklanabilir (205). Adım dışı (step-out) frekans hız karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Üretilen motorların manyetik hareket kapasitesini anlamaya yardımcı olmaktadır.

Tez çalışmaları kapsamında manyetik hareketi sağlamak için blok mıknatis kullanılmıştır. Bu nedenle uygulanan manyetik alan ve frekans değiştirilememektedir. Artan frekans uygulaması yapılamadığı için nanomotorlarda adım dışı frekansı belirleme çalışması gerçekleştirilmemiştir. Fakat yapılan hız tespit çalışmaları ve nanomotorların hareketinin kontrolünün istenen şekilde sağlanması

geliştirilen Au-Ni-PLL nanomotorların manyetik hareket kabiliyetlerinin başarılı olduğunu göstermektedir.

İlerleyen çalışmalarda laboratuvarlarımıza bu testler için gerekli cihazlar alınarak tüm karakterizasyonların gerçekleştirilebilmesi için gerekli düzenin sağlanması planlanmaktadır. Gelecek çalışmalar için de umut vaat eden manyetik Au-Ni-PLL nanomotorlar başarı ile sentezlenerek hareketleri gösterilmiştir.

5.6. İn Vitro Salım Çalışmaları

Etkin madde memantin yüklü nanomotorlardan diyaliz membran ile gerçekleştirilen salım çalışmalarına ilişkin sonuçlar Şekil 4.31.'de verilmiştir. % kümülatif salım-zaman grafikleri incelendiğinde nihai formülasyon olan Au-Ni-PLL-MemHCI nanomotor formülasyonlarında 72 saat boyunca MemHCI salımının devam ettiği gözlenmiştir. Fakat ilk 24 saatte ilacın %70 gibi bir oranının salındığı gözlenmiştir. Nanomotorlarda polimerik nanopartikül gibi sistemlerin aksine daha hızlı bir salım gözlenmesi beklendik bir durumdur (207, 208). Burada iki temel sebep bulunmaktadır. Bunlardan ilki etkin madde MemHCI'nin suda çözünürlüğünün (22 mg/mL) çok yüksek olması ve bu nedenle hidrofilik ortamlara afinitesinin yüksek olması prensibine dayandırılabilir. İkincisi ise etkin maddenin nanomotor sistemi içerisine enkapsülasyon yoluyla değil yüzeye bağlanma yoluyla yüklenmesidir. Etkin maddenin enkapsüle edildiği sistemlerde öncelikle bu nanosistem yapısındaki polimer çözücü ortamında parçalanmakta ve sonrasında ilaç difüzyonu gerçekleşmektedir (209). Etkin maddenin yüzeye tutunduğu sistemlerde ise yüzeyden ayrılma çok daha hızlı olmaktadır. Çalışılan ve etkin madde yükleme kapasitesi yüksek olarak gözlenen diğer formüller ile yapılan salım çalışmaları nihai formülasyon ile karşılaştırıldığı zaman salım oranlarının nihai formülden düşük kaldığı gözlenmiştir. Hatta bazı formüllerde salım ortamında etkin madde çok az olması sebebiyle tespit edilememiş ve sonuçlar bu nedenle verilememiştir. Bunun sebebinin ara ajan olarak kullanılan EDC-NHS ile kuvvetli bağlanma olduğu düşünülmüştür. Ayrıca PLGA ara ajan olarak kullanılan sistemlerde de de 24 saat içerisinde yaklaşık %6,28 salım oranı ile diğer nanomotor formülasyonlarına kıyasla çok daha düşük oranda salım gözlenmiştir.

Literatür taraması yapılarak çalışmalar incelendiğinde daha önce Au-Ni-PLL motor çalışarak gerçekleştirilen bir salım çalışmasına rastlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada nanomotorlardan ilaç salımı pH'ya bağlı olarak indüklenmiş ve ilaç salımı olup olmadığı 1 saat süreyle UV floresans değişimi takip edilerek incelenmiştir (145). Diğer bir çalışmada stomasit nanomotorlar hazırlanmış ve doksorubisin yüklenerek salımı kontrol edilmiştir. Bu çalışmada da in vitro salım nasıl yürütüldüğüne dair detaylı bilgi verilmemiştir (210). Bir diğer çalışmada Tural ve arkadaşları Janus mikromotorlardan dosetaksel salımını incelemiştir. Bu çalışmada tüp yöntemi kullanılmış, pH 6.8 ortamında çalışma gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlar % kümülatif salım grafiği şeklinde verilmiştir (211).

Tez kapsamında nanomotorlar üzerinde Farmasötik Teknoloji bakış açısıyla in vitro salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Literatürde mevcut çalışmalar daha çok “proof of concept” yani kavramın ispatına yönelik çalışmalardır. Bu nedenle bu tez çalışmaları da nanomotor sistemlerine ilaç yükleme ve salım çalışmaları açısından detaylı bir bakış açısı yaratmıştır.

Memantin yüklü nanomotorlardan ilaç salım kinetiği Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde tasarlanmış olan kinetik programı ile incelenmiştir (212). Burada karşılaştırılan kinetik modeller arasında sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson–Crowell ve RRSBW (Weibull) modelleri bulunmaktadır. Sonucunda r^2 değeri en yüksek olan (0,9736) model seçilmiş olup bu model birinci derece kinetiktir. Birinci derece kinetik ilaçların çoğunun salımında gözlenen modeldir. Salım kinetiği değerlendirilmesinin sadece r^2 değerleri üzerinden gerçekleştirilmesi de tek başına yeterli olmayacaktır. Daha detaylı bir çalışma gereklidir.

5.7. Nanomotor Stabilite Çalışmaları

Nanomotorların stabilite çalışmaları kapsamında 2 farklı koşulda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki 25°C’de oda koşullarındaki stabilite çalışmaları diğeri ise 5°C’de buzdolabı koşullarındaki stabilite çalışmalarıdır. Au-Ni-PLL nanomotorların 5°C ± 3°C koşulunda 12 ay, 25°C ± 2°C koşulu için de ise 6 ay

stabiliteleri takip edilmiş ve elektrokimyasal eğrileri alınarak 0. Gündeki eğriler ile kıyaslanmıştır.

İlaç taşıyıcı diğer yeni sistemlerde genellikle partikül boyutu ve zeta potansiyel stabilitede bir değerlendirme aracı olarak kullanılmaktadır. Saklama süresi sonunda bakılan partikül boyutu değerleri ilk ölçüm ile kıyaslanmakta gerçekleşen değişimlere göre stabilite yorumlanabilmektedir. Yani aslında formülasyona ait bir karakterizasyon parametresinin ne kadar süre boyunca özelliğini koruduğu saptanmaktadır. Ancak nanomotorların partikül boyutu ölçümü kısmında bahsedildiği üzere zetasizer ile ölçüm çubuk şekilleri sebebi ile yanıltıcı olmaktadır. Her seferinde SEM ile ölçüm almak hem maliyeti artıracaktır hem de nanomotorlar için uygun bir değerlendirme yöntemi olup olmadığı kesin değildir. Bu nedenle değerlendirmede nanomotor boyutu kullanılmamıştır. Bunun yanı sıra etkin madde yüklü nanosistemde etkin maddenin aynı miktarda var olmaya devam edip etmediği de geliştirilen analitik metot ile değerlendirilebilmektedir. Ancak nanomotorların saklama süresince bir miktar su içerisinde bekletilerek saklanması önerilmektedir. Kuru halde saklanan nanomotorlar agregat olmakta ve kullanılacağı zaman suda saklananlar kadar homojen dağıtılamamaktadır. Bu nedenle nanomotorlar stabilite çalışmaları boyunca da ependorf tüplerde 1 mL su içerisinde saklanmıştır. Bu durumun diğer bir etkisi ise etkin madde yüklü nanomotorların saklama sürelerinin çok kısa hale getirmesidir. Su içerisinde saklanan etkin madde yüklü nanomotorlar zamanla etkin maddeyi salacak ve tüm etkin madde ortama geçecektir. Ayrıca MemHCl' nin çözelti stabilitesi de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ buzdolabı koşullarında 7 gün ile sınırlıdır. Bu nedenle stabilite çalışmalarında sadece boş nanomotorlar kullanılmış, koşulların boş nanomotorlar üzerine etkisi incelenmiştir. Nanomotor sistemlerinde eczacılık bakış açısıyla yapılmış bir stabilite çalışmasına literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle değerlendirme açısından en uygun yöntem düşünülmüş ve elektrokimyasal eğrilerin değerlendirilmesinin bir çözüm olabileceği sonucuna varılmıştır.

Şekil 4.33., 4.34. ve 4.35'te sunulan elektrokimyasal eğrileri incelendiğinde boş nanomotorların uzun dönem $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 60% RH koşulunda 6.aydan itibaren indirgenme ve yükseltgenme eğrilerinin şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu da yapıda meydana gelen birtakım değişiklikler sebebiyle yapının elektro aktifliğinin

(iletkenliğin) azaldığının ve bozulmaların meydana geldiğinin göstergesi olabilir. Yapılarda gözle görülebilir değişiklikler saptanmamıştır.

Uzun dönem $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ buzdolabı koşullarında ise boş nanomotor yapılarında 12 ay boyunca herhangi bir değişiklik ve bozulma gözlenmemiştir. Yapılarda gözle görülebilir değişiklikler de saptanmamıştır. Bu durum hazırlanan nanomotorların raf ömrünün minimum 12 ay olduğunun göstergesi olabilir. Bu eğrilerin yorumlanması bize stabilite açısından küçük bir fikir verse de sadece bu yorum ile genel bir stabilite değerlendirmesi yapmak mümkün değildir. Sadece morfolojik yapının incelenmesi yeterli değil etkin maddenin de nanomotor sistemi ile beraber stabilitesinin araştırılması gereklidir.

5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Etkin madde yüklü ve boş nanomotorların hücre kültürü çalışmaları kapsamında öncelikle etkin maddenin farklı hücrelerdeki (HEK293T, SH-SY5Y, hCMEC-D3) toksik olmayan dozu belirlenmiştir.

HEK293T hücreleri, tez çalışmalarında kullanılan bir hücre hattıdır. Bu hücreler, normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin kültürde transformasyonu ile oluşturulmuş ve Alex Van der Eb tarafından adenovirüs 5 DNA ile geliştirilmiştir. Orijinal HEK293 hücre hattının 293. deney ürünü olan bu hücreler, böbrekte bol bulunan fibroblastik, endotelial veya epitelyal hücrelerin transformasyonu ile elde edilmiştir (213). HEK293T hücreleri, sodyum kanallarına ilaç etkilerinin araştırılması, indüklenebilir RNA interferans sisteminin test edilmesi, protein-protein etkileşimlerinin araştırılması ve nükleer çıkış sinyallerinin incelenmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu hücreler ayrıca gen transfeksiyonu ile istenilen genin aktarılmasını sağlar ve Alzheimer hastalığı araştırmalarında sıkça kullanılmaktadır (213). Tez çalışmalarında, gen transfeksiyonu yoluyla TrkB ve BACE1 enzim aktivitesi incelemelerinde kullanılmıştır (214).

Farklı araştırmalarda kullanılan bir diğer hücre hattı, insan kaynaklı nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y'dir. Bu hücre serisi, nörofeksiyonların tanımlanması ve farklılaşmasının araştırılmasında sıkça tercih edilir. SH-SY5Y hücre

hattı, Alzheimer hastalığının etkinliğinin gösterildiği pek çok çalışmada rol oynamıştır, çünkü TrkB reseptörüne ve BACE1 enzimine sahiptir (215, 216). Ayrıca, TrkB reseptörü ve BACE1 enzimi bulunmayan HEK293T hücrelerine TrkB geni transfeksiyonu yapılarak, bu genin zaten bulunduğu SH-SY5Y hücreleriyle karşılaştırmalar yapılmıştır.

Gelişen imkanlar KBE'nin fizyoloji ve patolojisine gösterilen önemli endüstriyel ve bilimsel ilgiyle birleşerek çeşitli in vitro KBE modellerinin gelişmesine yol açmıştır. Takip eden birkaç yıl içinde KBE modellerinde önemli bir adım atılarak kapiller endotel hücrelerinin başarıyla izole edilmesiyle ilk serebral endotel kültürleri oluşturulmuştur. Bu modeller santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılacak potansiyel ilaçların geçişi, geçiş mekanizmaları ve KBE ile etkileşiminin incelemesinde temel araştırmayı oluşturmuştur. Bu modelleri sağlamakta sıklıkla kullanılan hCMEC-D3 hücre hattı epilepsi kontrolü için cerrahi sırasında çıkarılan dokudan izole edilen beşeri temporal lob mikro damarlarından elde edilmiştir. İlk pasajda, hücreler sırayla insan telomeraz (hTERT) katalitik alt birimi ile lentiviral vektör transdüksiyon ile ölümsüzleştirilmiştir. KBE modellerinin oluşturulmasında adheren kavşaklar ve sıkı kavşakların oluşturulması büyük önem taşımaktadır. hCMEC-D3 hücrelerinde yapılan kültürlerde sıkı kavşak oluşmasında önem taşıyan sıkı kavşak proteinlerinin (VE-cadherin, Claudin-3,-5 ve occludin, beta katenin ve zonula okludinler (ZO) protein-1 ve 2) her zaman oluştuğu gözlemlenmiştir. Edilen sonuçlar, dünya çapında hCMEC-D3 hücrelerin çoğu taşıyıcıları ve reseptörleri (MDR1, BCRP, MRP4, transferin reseptörü, insülin alıcısının, GLUT1, metabolize enzimler ve TJ proteinleri de dahil olmak üzere) koruduğunu göstermektedir. Çalışmalar hCMEC-D3 hücre hattının insan beyin endotel biyolojisini araştırmak için özgün bir model teşkil ettiği sonucunu göstermektedir (217-220). Tez çalışmalarında da KBE modeli hCMEC-D3 hücreleri ile oluşturulmuştur.

Kullanılacak tüm hücre hatlarında doz seçimi ve uygulama yapılacak hücre sayısının belirlenmesi için öncelikle literatür araştırması yapılmış ve bu literatürler referans alınarak her hücre grubu için ilk dozlar belirlenmiştir (221-224). hCMEC-D3 hücre hattındaki çalışmalar ise en son gerçekleştirilmiş, burada HEK293T ve SH-

SY5Y hücre hattında gerçekleştirilen çalışma sonuçlarına göre doz seçilmiştir. Bir etkin maddenin IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri etkinliğinin incelendiği hücrenin tipine, çoğalma hızına, hücrenin o anda bulunduğu döngü basamağına göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle her hücre hattı için ayrı ayrı çalışmalar gerçekleştirilmiş ve her hücre hattında o hücrelere spesifik değerler elde edilmiştir. HEK293T hücrelerinin 48 saat boyunca belirlenen konsantrasyonlardaki etkin madde çözeltileri ile inkübasyonu sonucunda IC₅₀ değeri 136 µM olarak hesaplanmıştır. IC₂₀ değeri ise 42.70 µM olarak hesaplanmıştır. IC₂₀ değeri hücrelerin %20'sinin canlılığını kaybettiği %80'inin ise canlılığını koruduğu konsantrasyonu ifade etmektedir. Bu konsantrasyon tedavide toksisite ve hücre ölümü görülmek istenmemesi sebebiyle önemlidir. SH-SY5Y hücrelerinde ise 48 saat süresince belirlenen konsantrasyonlardaki etkin madde çözeltileri ile inkübasyonu sonrası IC₅₀ değeri 242 µM, IC₂₀ değeri ise 90 µM olarak hesaplanmıştır. hCMEC-D3 hücreleri ile 48 saat boyunca belirlenen konsantrasyonlardaki etkin madde çözeltilerinin inkübasyonu sonucunda IC₅₀ değeri 692 µM, IC₂₀ değeri ise 234 µM olarak hesaplanmıştır. Nanomotorlara yükleme ve ileri uygulamalar için kullanılacak doz olarak IC₂₀ dozları seçilmiştir. Çünkü uygulanan nanomotor sisteminin mümkün olan en düşük toksisite değerinde en etkili dozu vermesi istenmektedir. Seçilen dozlar nanomotorlara yüklenerek etkin madde yüklü nanomotorların sitotoksitesisi incelenmiştir.

Literatürde memantin için yapılan toksisite çalışmaları incelendiğinde farklı nano formülasyonların sitotoksitesite testleri için uygulama yolu da göz önünde bulundurularak farklı hücre hatlarının kullanıldığı gözlenmiştir. Örneğin memantin yüklü kitosan nanokristal formülasyonlarının in vitro sitotoksitesite çalışması uygulama yolu olarak nazal yol seçildiği için insan nazal hücre hattı kullanılarak test edilmiştir (225). Bir başka çalışmada ise memantin nano emülsiyonunun nöroblastoma (Neuro 2a) hücre hattı üzerinde sitotoksitesite çalışmasını gerçekleştirmiş ve çözeltileri ile karşılaştırmışlardır (93). Çalışmanın amacına yönelik kullanılacak hücre hatlarında yapılan ilk test genellikle etkin maddenin hücreler üzerinde çalışılacak doz aralığının belirlenmesi olup planlanmış in vitro etkililik testlerinde kullanılacak hücre hatlarında toksik ve toksik olmayan dozu belirleme çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır.

5.8.1. Nanomotorların Hücre Canlılığına Zarar Vermediğinin Doğrulanması

Etkin madde yüklü ve boş nanomotorların HEK293T hücreleri ile 24 ve 48 saat inkübe edilmesiyle elde edilen % canlılık grafikleri sırasıyla Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 24. Saatte etkin madde yüklü nanomotorların % canlılığı 76.72 μM 'da %75,84 \pm 8.6 iken boş nanomotorlarda %79.52 \pm 5.4'tür. MemHCl' nin çözelti halinde aynı konsantrasyonda uygulanması ile hücrelerde gözlenen canlılık ise %91.74 \pm 1.8'dür. 48 saat sonunda ise bu değerler sırasıyla %40.28 \pm 8.4, %50.05 \pm 8.5 ve %69.89 \pm 3.0'dur. Bu sonuçlar doğrultusunda etkin madde enkapsülasyonunun ve hedeflendirmeye yönelik hazırlanan nanomotor formülasyonunun HEK293T hücreleri üzerindeki sitotoksitesini artırdığı söylenebilmektedir.

SH-SY5Y hücre hattında etkin madde yüklü ve boş nanomotorların 24 ve 48 saat inkübe edilmesiyle elde edilen % canlılık grafikleri sırasıyla Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 170 μM uygulama konsantrasyonunda 48. saatte nanomotor yapısının (%63.76 \pm 3.1) MemHCl çözeltisine (%69.49 \pm 4.0) kıyasla sitotoksitesini artırdığı ve yine MemHCl yüklü nanomotorların (%35.20 \pm 4.0) en yüksek sitotoksitesinin gözlemlendiği grup olduğu söylenebilmektedir.

HEK293T ve SH-SY5Y hücre hattından elde edilen IC₅₀ sonuçlarından yola çıkılarak hCMEC-D3 hücre hattı hücre canlılığı çalışmaları için 4 doz belirlenmiştir. Bunlardan ilk ikisi SH-SY5Y hücre hattında MemHCl çözeltisinin IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri olan 250 μM ve 90 μM 'dır. Diğer ikisi ise HEK293T hücre hattında MemHCl çözeltisinin IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri olan 125 μM ve 45 μM 'dır. Bu dört dozda yapılan 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon sonuçları Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.'de verilmiş olup yine diğer hücre hatlarında olduğu gibi MemHCl yüklü nanomotorların (%30.92 \pm 2.1) sitotoksitesinin boş nanomotorlara (%45.28 \pm 8.1) ve MemHCl çözeltisine kıyasla (%79.41 \pm 1.9) daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu hücre hattında da enkapsülasyon ve nanomotor sistemi kullanımıyla sitotoksitesini artmıştır. hCMEC-D3 hücrelerinin SH-SY5Y hücre hattına oranla da daha hassas olduğu ve uygulama sonrası canlılıklarındaki azalmanın daha fazla olduğu söylenebilir.

Nanomotorlar temel alınarak literatür incelendiğinde Karaca ve arkadaşlarının kanser tedavisinde kullanılmak üzere Au-Ni nanomotorlar sentezlediği ve bunların sitotoksikite çalışmalarını fare embriyonik fibroblast hücrelerinde gerçekleştirdiği gözlenmiştir (145). Burada kullanılan ara ajan ve etkin madde farklılıkları sebebiyle tez çalışmalarımız ile tam bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamaktadır. Bu çalışma haricinde Au-Ni nanomotorlara ait bir sitotoksikite çalışmasına rastlanmamıştır.

Memantin HCl temel alınarak literatür incelendiğinde ise etkin maddeyi içeren farklı nano formülasyonlara rastlanmış ve bu formülasyonların çalışmada kullanılacak hücre hatlarına yönelik sitotoksikite çalışmalarının gerçekleştirildiği gözlenmiştir (93, 94, 225). Tahmin edileceği üzere burada da kullanılan her hücre hattına ve formülasyona bağlı olarak uygulama dozlarında ve tespit edilen sitotoksik dozlarda farklılıklar gözlenmektedir. Bu nedenle tez çalışmaları kapsamında bu çalışmalara özel olacak in vitro uygulama dozu belirlenmesi amacıyla tüm çalışmalar teze spesifik olacak şekilde tasarlanmış ve gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen Au-Ni nanomotor formülasyonlarının hücreler üzerinde toksik etki oluşturmayan dozları başarıyla tespit edilmiştir ve gelecek olan hücre kültürü çalışmaları için bu dozlar kullanılmıştır.

5.8.2. Nanomotor Formülasyonlarının Hücre İçerisine Alım Analizleri

Hücre canlılığının tespiti çalışmalarından sonra, nil kırmızı yüklenmiş Au-Ni-PLL nanomotorların SHSY-5Y ve hMEC-D3 hücreleri tarafından hücre içine alımları incelenmiştir. Akış sitometri sonuçları incelendiğinde nanomotor formülasyonlarının SHSY-5Y hücreleri inkübasyonu sonrası 24.saatte en yüksek düzeyde hücre içerisinde sinyal verdiği gözlenmiştir. hMEC-D3 hücreleri için ise en yüksek sinyal 6.saatte gözlenmiştir.

Literatürde farklı tipte mikro/nanomotorlara nil kırmızı yükleme çalışmalarına rastlanmıştır. Bu çalışmalarda genellikle nil kırmızısı model molekül olarak kullanılmış ve yükleme etkinliğinin tespiti için kullanılmıştır (226). Görüntüleme amacıyla da yapılan yükleme çalışmaları mevcuttur.

Örneğin Xiong ve arkadaşları Nil kırmızısını ışıkla hareketi uyarılan polimerik nanomotorlara yüklemiştir ve bu sayede nanomotorların hareketini takip etmişlerdir (227). Hücre içerisine alım analizleri de gerçekleştirmişler ve bu analizde hücre aktin ve statin yapılarını da boyamak için aktin işaretleyici yeşil boya (actin-tracker green) kullanmışlardır. 24 saat devam eden inkübasyonda ışık kullanarak (UV) hareketi uyarıp nanomotorların hücre içerisine alımlarını takip etmişlerdir. Burada kullandıkları hücre hattı ise HepG2 (hepatoselüler karsinoma) hücreleridir. Sonuç olarak ışıkla hareketi uyarılan nanomotorların hücre içerisine alımının arttığını gözlemlemişlerdir (227).

Bir diğer çalışmada da Tu ve arkadaşları katalitik platin nanopartikül yüklü ve kase şeklinde polimerik nanomotorlar sentezlemiş ve bu nanomotorların görüntülemesi amacıyla nil kırmızısını model boya olarak seçmişlerdir (228). Çalışmada herhangi bir hücre içerisine alım analizi gerçekleştirilmemiştir. Jiao ve arkadaşları ise Janus mikromotorlar sentezlemişlerdir. Bu mikromotorların üretiminde manyetik nanopartiküller ve nil kırmızı kullanılmış böylece motorlar manyetik alanda hareket edebilir hale getirilmiş ayrıca kullanım amacı da görüntüleme floresan etiket olarak uygulanması olarak açıklanmıştır (229). Yine bu çalışmada bir hücre içerisine alım analizi yapılmamıştır.

Bunların yanı sıra literatürde nanomotorların hücre içerisine alım analizleri için kullanılan yöntemler taranmıştır. Farklı çalışmalarda kullanılan farklı yöntemlere rastlanmıştır. Örneğin Zheng ve arkadaşları tümör dokularının MR (manyetik rezonans) görüntülemesinde diagnostik olarak kullanılmak üzere Janus mezoporoz silika nanomotorlar sentezlemiştir. Bu nanomotorlar gadolinyum işaretli olup NIR (yakın kızılötesi) ışık uyarımı ile nanomotorların hedef bölgeye hareketi amaçlanmıştır. Bu nanomotorların tümör hücrelerinin içerisine alımının kontrolü için in vitro hücre kültürü testleri yapılmıştır. 4T1 hücre hattı kullanılan çalışmada nanomotorlar hücreler üzerine inkübe edilmiş ve 30 dk sonra hücreler DAPI ile boyanarak mikroskop yardımıyla incelenmiş ve hücre içerisine nanomotor alımı gözlenmiştir (230). Bu çalışmada nanomotorlara nil kırmızısı yükleme çalışması gerçekleştirilmemiştir.

Bir diğ er ç alışmada Ren ve arkadaşları doksorubisin yüklü katalitik nanomotorlar sentezlemiş ve hücre içerisine alım ç alışmalarında 4T1 hücrelerine nanomotorları 2 saat boyunca inkübe ederek UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile hücre içerisine alım oranlarını hesaplamışlardır. Burada hücreler ile inkübe edilen nanomotorların inkübe olmayan kısmından indirekt yöntemle alım oranı hesaplamışlardır (231). Tural ve arkadaşları polimerik Janus mikromotora nil kırmızıısı yükleme ç alışmaları gerçekleştirmiş ve floresan mikroskopi ile görüntüleme gerçekleştirmişlerdir (211).

Tam olarak tez ç alışmalarında kullandığımız yapıda Au-Ni nanomotorlarda bir nil kırmızıısı yükleme ve hücre içerisine alım ç alışması literatürde bulunmamaktadır. Tezimizde bu ç alışma planlanırken tüm nanopartiküllerde kullanılan floresan boya yüklü nano sistemin hücreler ile inkübasyonu sonrası MFI değerlerinin incelenmesi yöntemi kullanılmıştır. Hem yaygın bir yöntem olarak kullanılması hem de uygulama kolaylığı sebebiyle tercih edilen bu yöntem için de nil kırmızı floresan boya olarak seçilmiştir. Nil kırmızıısının hidrofobik olması nanomotor yüzeyine tutunmasını kolaylaştırmıştır. Öncelikle hazırlanan Au-Ni-PLL/NR nanomotorlar tek başına FACS cihazından geçirilerek nil kırmızıısı oranları tespit edilmiştir. Hayli yüksek olarak (yaklaşık %50 civarında) tespit edilen bu yükleme oranı sonrası hücreler uygulama aşamasına geçilmiştir. Literatürde rnekleri de verilen farklı farklı nanomotor sistemlerinde hareketi sağlamaya yönelik kullanılan parametrelerin (ışık, kimyasal reaksiyon vb.) hücre içerisine alım analizlerinde de deneyin bir parçası olarak dahil edildiği gözlenmiştir. Tez ç alışmaları kapsamında da aynı şekilde manyetik alanı sağlayacak olan mıknatıs, hücrelerin Au-Ni-PLL/NR nanomotorlar ile inkübasyonu boyunca inkübatör içerisinde tutularak devamlı manyetik alan uygulaması sağlanmıştır. Sonuçlar nanomotorların başarılı bir şekilde hücre içerisine alımlarını göstermektedir. Bu da aynı zamanda in vitro KBE modeli ç alışmalarında avantaj sağlayacak bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

5.8.3. Tirozin reseptör kinaz B (TrkB) Enzimini Yüksek Düzeyde İfade Eden Hücrelerin Oluşturulması

Alzheimer hastalığı genellikle amiloid beta peptitlerinin birikimi ve tau proteininin anormal hiperfosforilasyonu gibi patolojik özelliklerle ilişkilidir. Son araştırmalar, TrkB proteininin Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. TrkB, sinir hücrelerinin hayatta kalması ve sinaptik plastisite gibi önemli işlevler için gereklidir. TrkB beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) reseptörüdür, BDNF ise nöronal sağkalım, büyüme ve sinaptik plastisite üzerinde kritik rol oynamaktadır (232). Alzheimer hastalığında, TrkB düzeylerinin azalması veya TrkB'nin işlevinin bozulması sinir hücrelerinin sağlığını etkileyebilir ve nörodejeneratif süreci hızlandırabilir (233). Detaylı olarak incelediğimizde TrkB ve Alzheimer ilişkisini 5 maddede açıklayabiliriz.

Nöronal sağkalım: BDNF'nin, TrkB ile etkileşimi yoluyla nöronal sağkalımı teşvik ettiği ve nörodejenerasyona karşı koruduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde BDNF ve TrkB sinyalizasyonunun düşük seviyeleri gözlemlenmiştir. Bu, bozulmuş TrkB sinyalizasyonunun Alzheimer hastalığında nöronal hassasiyete katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (232, 234).

Sinaptik Fonksiyon: TrkB sinyalizasyonu, öğrenme ve bellek süreçleri için hayati öneme sahip sinaptik plastisiteyi düzenlemede rol almaktadır. Sinaptik plastisitenin işlev bozukluğu, Alzheimer hastalığının bir belirtisi olup, TrkB sinyalizasyonundaki değişiklikler Alzheimer hastalığında gözlemlenen sinaptik işlev bozukluğuna katkıda bulunabilir (232).

Nörogenez: BDNF-TrkB sinyalizasyonu, yetişkin beyinde nörogenezin (yeni nöronların oluşumu) teşvikinde rol oynar. Alzheimer hastalığı olan bireylerde, öğrenme ve bellek için kritik olan hipokampus bölgelerinde azalmış nörogenez rapor edilmiştir. Değişen TrkB sinyalizasyonu, Alzheimer hastalığında gözlenen nörogenezin düzenlenmesinde rol oynayabilir (232, 235).

Tau Patolojisi: Bazı çalışmalar, TrkB aktivasyonunun Alzheimer hastalığının patolojik bir işareti olan nörofibriler yumaklar oluşturan tau proteini fosforilasyonu ve agregasyonunu etkileyebileceğini öne sürmektedir. Bozulmuş TrkB

sinyalizasyonunun, Alzheimer hastalığında tau patolojisine katkıda bulunabileceği düşünülebilir (232, 236).

Potansiyel Terapötik Hedef: TrkB'nin nöronal hayatta kalım, sinaptik fonksiyon ve nörogenezdeki rolü nedeniyle Alzheimer hastalığı için potansiyel bir terapötik hedef olarak önerilmiştir. TrkB sinyalizasyonunu artırma veya BDNF'nin TrkB üzerindeki etkilerini taklit etme, Alzheimer hastalığında nöronal işlevi koruyucu ve bilişsel gelişimi artırıcı etkilere sahip olabilir (237).

Dolayısıyla, SH-SY5Y hücreleri, TrkB proteinini içermesi sebebiyle ve bu proteinin kullanılmasıyla sinirsel sinyal iletimini ve nöronal işlevleri incelemek için bir araç olarak kullanılabilir. Bu bağlamda, SH-SY5Y hücreleri ve TrkB proteini kombinasyonu, nörolojik araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır.

Literatür incelendiğinde Bai ve arkadaşlarının BDNF ile uyarılan TrkB yolağını incelemek için SH-SY5Y hücre hattını kullandığı görülmüştür (238). Başka bir çalışmada yine Nishina ve arkadaşları TrkB aracılı sinyal yolları ile regüle edilen genlerin tespiti için SH-SY5Y hücre hattını kullanmıştır (239). Aynı yolak üzerinde farklı bileşenlerin etkisini test eden çalışmalar mevcuttur (240, 241).

Bunun yanı sıra TrkB proteini içermeyen HEK293T hücre hattı da tez çalışmaları kapsamında TrkB geni aktarılarak kullanılmıştır. Bu hücreler gen transfeksiyonu ile istenilen genin aktarılmasına olanak sağlamak ve transfekte edilmiş hücreler birçok Alzheimer araştırmasında kullanılmaktadır. Tez kapsamında da TrkB geni aktarılan HEK293T hücreleri ve halihazırda TrkB geni içeren SHSY5Y hücrelerine nanomotor formülasyonları eklenerek bu iki grup TrkB gen aktivitesi ve BACE1 enzim aktivitesi açısından incelenerek kıyaslanmıştır.

Bu amaçla TrkB geni bakteri kolonileri yardımıyla plazmid aktarımı yapılarak çoğaltılmış ve çoğaltılan plazmidin aktivitesi kontrol edilmiştir. Daha sonra plazmid HEK293T hücrelerine aktarılarak 24 saat inkübe halde bırakılmış ve transfekte hücrelerin oluşumu sağlanmıştır.

Sonuçların gösterilmesi için transfekte ve non-transfekte hücrelerde BACE1 enzim aktivite testi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan hücre lizatlarında total TrkB miktarı Western blot yöntemi ile incelenmiştir. Alınan Western Blot analiz

sonuçlarında non-transfekte hücrelerde TrkB bandına rastlanmazken transfekte hücrelerde bu bant gözlenmiştir. Ayrıca BACE1 enzim aktivite test sonuçlarında da transfekte hücrelerde BACE1 aktivitesi gözlenirken non-transfekte grupta bu durum söz konusu değildir. Bu sonuçlar transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Literatürde HEK293T hücre hattı gen transfeksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (242-244). Farklı uyarıların TrkB sinyalizasyon yolağı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla transfekte HEK293T hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışma da mevcuttur (245).

5.8.4. Nanomotor Formülasyonuna Yüklenen Memantinın TrkB'yi Uyararak BACE1 Enzim Aktivitesini Düşürme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

BACE1, Alzheimer hastalığının patogeneğinde önemli rol oynayan bir enzimdir. Bu enzim, beyindeki APP'yi keserek A β adı verilen kısa peptit zincirlerini oluşturmaktadır. A β birikimi Alzheimer hastalığı patolojisinde en etkili hipotezlerden birisi olarak değerlendirilmekte ve bu karakteristik birikim plakların oluşumuna sebep olmaktadır. BACE1, APP molekülünün özgül bir bölgesi olan beta-sitelerini keserek A β 'nin oluşumunu başlatmaktadır. Bu nedenle, BACE1'in aktivitesi, A β seviyelerini artırarak Alzheimer hastalığının patolojisinde rol oynamaktadır. BACE1'in inhibe edilmesi, A β birikiminin azaltılması ve Alzheimer hastalığının ilerlemesinin yavaşlatılması için bir tedavi stratejisi olarak araştırılmaktadır (246).

TrkB ve BACE1 enzimi arasındaki ilişki, Alzheimer hastalığı (AH) patolojisi bağlamında BACE1 ifade düzenlemesi, nöronal sağ kalım, sinaptik fonksiyon ve potansiyel terapötik hedef olmak üzere dört kategoride inceleyebiliriz (215, 247).

İlk olarak TrkB sinyalizasyonunun, BACE1'in ifadesi ve aktivitesini etkileyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. BACE1, APP'yi keserek Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde plak oluşturan A β peptitlerini üretmekten sorumludur. Bazı çalışmalar, TrkB sinyalizasyonunun aktive edilmesinin BACE1 ifadesini azaltabileceğini ve A β üretimini azaltabileceğini, bu da Alzheimer patolojisini hafifletebileceğini bildirmiştir (246).

BDNF-TrkB sinyalizasyonunun, nöronal sağkalımı teşvik ettiği ve nörodejenerasyona karşı koruduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, yüksek BACE1 aktivitesi ve A β birikimi Alzheimer hastalığında nöronal toksisite ve sinaptik işlev bozukluğu ile ilişkilendirilmektedir. TrkB sinyalizasyonunun modülasyonu, dolaylı olarak BACE1 aktivitesini düzenleyerek ve A β üretimini azaltarak dolaylı nöronal işlev koruyucu etkilere sahip olabilir (248).

Ayrıca hem TrkB sinyalizasyonu hem de BACE1 aktivitesi, Alzheimer hastalığında bozulan sinaptik fonksiyonu düzenlemekte rol oynar. BDNF-TrkB sinyalizasyonu, sinaptik plastisiteyi ve nörotransmitter salınımını uyarırken, aşırı BACE1 aktivitesi ve A β birikimi sinaptik fonksiyonu bozabilir ve sinaps kaybına yol açabilir. TrkB sinyalizasyonu ve BACE1 aktivitesi arasındaki etkileşimler, sinaptik bütünlüğü ve bilişsel fonksiyonu etkileyebilir (249).

Son olarak da TrkB sinyalizasyonu ve BACE1 aktivitesinin AH patolojisindeki rolleri göz önüne alındığında, bunlar Alzheimer hastalığının tedavisi için potansiyel terapötik hedefler olarak önerilmektedir. TrkB sinyalizasyonunu artırmaya veya BACE1 aktivitesini inhibe etmeye yönelik stratejiler, A β üretimini azaltmak, sinaptik işlev bozukluğunu hafifletmek ve AH'de nörodejenerasyonu yavaşlatmak için potansiyel yaklaşımlar olarak araştırılmaktadır (250).

Tez çalışmaları kapsamında da formülasyonun etkinliğinin kontrolü için de TrkB artışı ve BACE1 enzim aktivite azalması açısından değerlendirme yapılmıştır. SH-SY5Y hücre hattında ve transfekte HEK293T hücre hattında gerçekleştirilen BACE1 enzim aktivite testi sonuçlarına göre her iki hücre hattında da Au-Ni-PLL/MemHCI formülasyon uygulaması sonrası enzim aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Bu da geliştirilen formülasyon ile enzim aktivitesini düşürerek AH tedavisini sağlama stratejisinin in vitro çalışmalarda başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

5.8.5. Nanomotor Formülasyonu ile Taşınan Etken Maddenin Kan-Beyin Engeli Varlığında TrkB ve Beta Sekretaz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde en büyük problemlerden birisi KBE'dir. Hazırladığımız nanomotor sisteminin hücre düzeyinde etkililik testlerinin

yapılmasının yanı sıra KBE penetrasyon ve geçiş çalışmalarının yapılması ve yine in vitro KBE modelinde etkililiğin gösterilmesi nanomotorun hedef bölgedeki etkisinin değerlendirilmesine katkı sağlaması açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle hazırlanan Au-Ni-PLL formülasyonları geliştirilen KBE modelinde üst kompartmana uygulanmış ve 24 saat sonra alt kompartmanda bulunan SHSY5Y hücrelerinden lizatlar hazırlanmıştır. Bu lizatlar TrkB aktivitesi ve BACE1 enzim aktivitesi açısından değerlendirilmiştir.

KBE modeli literatürde de sıklıkla kullanılan hCMEC-D3 hücre hattı ile oluşturulmuştur. hCMEC-D3 hücreleri, beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin özelliklerini sergilemektedir. Bu hücreler, doğal olarak beyin kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan endotel hücrelerine benzer özelliklere sahiptir. hCMEC-D3 hücreleri, birçok laboratuvar çalışmasında, in vitro KBE modelinin temelini oluşturmak için kullanılan ana hücre türüdür. hCMEC-D3 hücreleri, doğal olarak endotel hücrelerin özelliklerini sergilemektedir. Bu hücreler, birbirlerine sıkıca bağlanarak damar duvarında bir bariyer oluşturmakta ayrıca sıkı kavşakların oluşumunda rol oynayan çeşitli proteinlerin ekspresyonunu göstermektedir. Bu proteinler arasında okludin, zona okludens ve kaudin gibi sıkı kavşak proteinleri bulunmaktadır. Ek olarak , hCMEC-D3 hücreleri, sıkı kavşakların oluşumunu düzenleyen sinyal moleküllerini salgılayabilir veya algılayabilir. Bu sinyal molekülleri arasında vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) ve diğer büyüme faktörleri bulunmaktadır. Tüm bu özellikleri sebebiyle in vitro KBE modeli oluşturulurken en sık kullanılan hücre tipidir (251).

Bunun haricinde KBE oluşumunda HBMEC (İnsan Beyin Mikrovasküler Endotelyal Hücresi), astrositler, perisitler kullanılabilir. Ayrıca fare kaynaklı hücrelerden bEnd.3 (fare beyin endotelyumu), MBEC4 (fare beyin endotelyal hücreleri) ve RBE4 (sıçan beyin endotelyal hücreleri) kullanılabilir (252). Fakat kullanılan hücre tipinin insan kaynaklı olması her zaman daha avantajlıdır. Tüm bu belirtilen bilgiler ışığında tez çalışmaları için oluşturulacak in vitro KBE modelinde hCMEC-D3 hücreleri kullanılmıştır.

Nano formülasyonların KBE'yi aşmada izleyebileceği farklı yollar bulunmaktadır. Bu yollar formülasyonun türüne, fizikokimyasal özelliklerine ve yüzey modifikasyonlarına göre değişmektedir (253, 254). Shan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada hCMEC-D3 hücreleri ile hazırlanan in vitro KBE modelinde nanopartiküllerin bariyeri aşmada endositozis mekanizmasını kullandığı düşünülmüştür (255). Başka bir çalışmada ise Markautsa ve arkadaşları hazırladıkları lipozom formülasyonlarının yüzeyinde çeşitli modifikasyonlar yaparak (transferin ve apolipoprotein) KBE geçişini in vitro hCMEC-D3 KBE modeli ile test etmişlerdir. Floresan işaretleme ile in vitro KBE geçişini kontrol etmişler ve geçişin kontrol grubuna kıyasla yüzey modifikasyonu yapılmış formülasyon grubunda daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun sonucunda da yüzey modifikasyonu sayesinde düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünü (LPR) aracılığıyla KBE geçişinde artış olduğunu yorumlamışlardır (256).

Tez çalışmaları kapsamında çift kompartmanlı olarak tasarlanan KBE modelinde formülasyon uygulaması sonrası alınan BACE1 enzim aktivite testi sonuçlarına göre alt kompartmanda bulunan SH-SY5Y hücre hattında belirgin oranda enzim aktivite düşüşü gözlenmiştir. Bu durum memantin KBE'yi geçip etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bu etkinin sebebinin salım sonrası serbest kalan memantin KBE'yi aşması mı yoksa nanomotor sisteminin bütünüyle KBE'yi aşması mı olduğu tartışılmıştır. Enzim aktivite testi sonuçlarına göre Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor formülasyonu memantin çözeltisine göre daha etkilidir. Bu sonuç memantin Au-Ni-PLL nanomotor ile taşınmasının tedavide avantaj sağlayacağını göstermektedir. Ancak sistemin bütünüyle KBE'yi aşip aşmadığını incelemek için daha detaylı çalışmalar gerekmektedir. Bu etki artışının Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor formülasyonlarının KBE modelinde üst kompartmanda olan hCMEC-D3 hücreleri üzerine penetre olup lokalize depo etki ve kontrollü salım ile sağlanabileceği de düşünülmüştür. Bu kontrollü salıma sahip olmayan memantin çözelti formu BACE-1 enzim aktivitesini düşürmede de Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor formülasyonlarına göre geride kalmıştır.

5.9. İn-vitro Hücre Kültürü Modelinde Metabolomik Analizlerin Yapılması

Son yıllarda gelişen omiks analizler AH'nın altında yatan nedenlere farklı yaklaşımlarda sunmuşlardır. Trushina, Nemutlu vd.'nin AH fare modelleri üzerinde yaptığı metabolomik çalışma ile mitokondriyal işlevler ve hücresel enerji metabolizmasının amiloid depoları ve hafıza kaydından daha önde yer aldığı gösterilmiştir. Mitokondriyal aktivite ve morfolojisindeki değişimlerin oksidatif strese yol açan reaktif oksijen türlerini artırdığı gösterilmiş; bu durumun da kademeli olarak hücresel hasarı artırdığı ve hücre ölümüne varan bir takım hücresel hasara neden olduğu gösterilmiştir (129, 257, 258). Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen tedavi yönteminin hücre düzeyindeki etkilerinin incelenmesi için metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir. AH gibi hastalıklar karmaşık ve çok faktörlüdür; hastalığın fenotipi, hücre, doku ve organizma düzeyinde meydana gelen değişikliklerin analiziyle, birden çok genin, yolun, proteinin ve metabolitin katkılarının belirlenmesiyle anlaşılabilir.

Bugünün yenilikçi teknolojileri, genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi ayrıntılı tarama analizlerini mümkün kılar. Bu "omik" analizlerden elde edilen kapsamlı bilgi, hastalıkların mekanizmasını anlamak için önemli bir araçtır ve erken teşhislerde yardımcı olabilirken, bireysel tedavi stratejilerinin belirlenmesi ve bunların etkinliğinin değerlendirilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir (128, 259). Omiks analizleri arasında fenotipi en iyi yansıtan ve en yeni olan metabolomik analizler; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde veya fizyolojik sıvılarda bulunan çok sayıda ve farklı fiziksel özelliklere sahip küçük moleküllerin (molekül ağırlığı <1000 Da) tanımlanması ve miktarının belirlenmesidir (260).

Daha önce birçok metabolomik çalışma, metabolizma ile Alzheimer hastalığı patolojisi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Serum, plazma ve beyin omurilik sıvısı üzerinde yapılan çalışmalar, safra asitleri, sfingolipidler, antioksidanlar, fosfolipidler ve amino asitler gibi birkaç metabolik yolun hastalıkla ilişkilendirildiğini belirlemiştir (261).

Alzheimer hastalığını bilişsel olarak normal olan kişilerden ayıran otuz dört önemli değişen metabolit, altı metabolik yolakla ilişkilendirilmiştir. Bunlar; (1) alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, (2) arginin ve prolin metabolizması, (3) sistin ve metiyonin metabolizması, (4) glisin, serin ve treonin metabolizması, (5) purin metabolizması ve (6) pantotenat ve CoA biyosentezi. Sonuçlar, alanin, aspartat ve glutamat metabolizmasının Alzheimer hastalığı durumu ile en güçlü şekilde ilişkilendirildiğini göstermiştir (18).

AH'nın Hafif Bilişsel Bozukluk (MCI) evresinde gözlenen erken anormallikler, FDG-PET kullanılarak tespit edilen azalmış glikoz kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Bu beyin hipometabolizması, klinik belirtilerin ortaya çıkmasından yaklaşık 20 yıl önce meydana gelmektedir, bu da metabolik disfonksiyonun AH'nın gelişimine katkıda bulunan bir faktör olduğunu öne sürmektedir. Beyin, toplam glukozdan elde edilen enerjinin yaklaşık %20'sini tüketerek vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan glukoz açısından yüksek derecede bağımlı bir organdır (18). Beyinde glikolitik fonksiyonlar bozulduğunda, kompensatör mekanizmalar enerji homeostazını korumak için alternatif yakıt kaynaklarına geçiş yapmaktadır. Gerçekten de yaşlı vahşi-tip farelerin beyin dokusunda beyaz madde dejenerasyonu, azalan glukoz kullanımını telafi etmek için lipidlerin katabolizması ile ilişkilendirilmiştir, bu da yaşlanan dişi beyinde gözlemlenenlerle benzer olarak nitelendirilmiştir (262).

Değişen beyin enerjisi ve mitokondriyal işlev bozukluğu da dahil olmak üzere Alzheimer hastalığının erken mekanizmalarını anlamak, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncü olabilir.

Tez çalışmaları kapsamında metabolomik analizler iki farklı teknik kullanılarak (GC-MS ve LC-QTF MS) gerçekleştirilmiştir. Böylece daha geniş bir metabolit grubu taranarak memantin yüklü nanomotor, sadece nanomotor ve sadece memantin çözeltisi kullanıldığında hücre düzeyindeki etkileri gösterilmiştir. Bu da geliştirilen nanomotor sisteminin etkinliği hakkında bilgi vermiştir. SH-SY5Y hücre hattı metabolomik analizler için kullanılmıştır. Toplamda 318 metabolit taranmıştır. Sonuçlar gruplar arası t-test yapılarak değerlendirilmiş, farklılık gözlenen ($p < 0,05$) metabolitler listelenmiştir.

SH-SY5Y hücreleri üzerine uygulanan Au-Ni-PLL ve Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorlar sergilediği metabolomik profil açısından karşılaştırıldığında birbirinden farklı profiller göstermiştir. Belirgin farklılık gözlenen metabolitlere ait PCA ve PCS-DA grafikleri Şekil 4.53.'te verilmiştir ($p < 0,05$). Bu iki grupta formülasyonun memantin içerip içermemesi kaynaklı olarak metabolomik profil farklılığı gözlenmiştir. Glutasyon, asparajin, farklı fosfatidilkolin formları ve farklı fosfatidilinositol formları tespit edilen ve belirgin farklılık gözlenen metabolitler arasındadır. Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda, oksidatif stresin artması ve antioksidan sistemlerin zayıflaması, glutasyon düzeylerinin değişmesine neden olabilir. Fosfatidilkolin, hücre zarının yapı taşlarından biri olan fosfolipidlerin bir türüdür. Beyin dokusunda bulunan önemli bir fosfolipid olan fosfatidilkolin, hücre zarının bütünlüğünü korumak ve sinir iletimini sağlamak için gereklidir. Alzheimer hastalığında, fosfatidilkolin düzeylerinde değişiklikler gözlenebilir. Yapılan AH metabolomik çalışmalarında bu metabolitlerin değerlendirilmesi ve incelenmesi önemli olarak bildirilmiştir (18). Alınan sonuçlarda da bu metabolitlerin gözlenmesi geliştirilen nanomotor formülasyonunun metabolomik düzeyde de etkili olabileceğine işaret etmektedir. Tez çalışmaları kapsamında metabolomik analizler in vitro hücre kültürü ortamında gerçekleştirilmiş bu nedenle direkt hastalığı taşıyan bir numunede metabolomik profil incelenmemiştir. Bu ön çalışmaların ışığında bir sonraki hedefimiz Alzheimer Hastalığı taşıyan farelerde in vivo metabolomik çalışması yapmak olacaktır. Böylece hasta farelerde nanomotor uygulaması sonrası metabolomik profil değişimi incelenebilecektir.

5.10. İn Vivo Çalışmalar

İN vivo çalışmalarda sağlıklı BALBC farelerde geliştirilen nanomotor sisteminin uygulama sonrası biyodağılımı incelenmiştir. Ölçümler 30 dk ve 2 saat olmak üzere iki ayrı zaman noktasında gerçekleştirilmiş, 2 saat sonrası vücutta atılım başlayacağı için daha uzun sürede çalışılmamıştır. Sonuçlar alındığında Au-Ni-PLL/NR nanomotorların en yoğun olarak beyin dokusunda tutulumu uğradığı gösterilmiştir. 30 dk gibi kısa bir sürede gözlenen bu yüksek tutulum hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin hızla beyne ulaştığını göstermektedir. Bunun yanı sıra karaciğerde gözlenen düşük miktarda tutulum vücutta alınan her yabancı maddenin karaciğerden

geçmesi (RES) sebebi ile gözlenmektedir. Nanomotorların polisorb-80 ile kaplı olması in vivo biyodağılım çalışmalarında avantaj sağlanmış ve nanomotorların RES'ten kaçarak karaciğere takılma oranının düşük olmasına ve beyne gitme oranının fazla olmasına katkı sağlamıştır.

Bunun yanı sıra beyinde gözlenen floresan ışımaya beyin sağ lobunda gözlenmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda beyne giden ana damarın beyin sol lobunda olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu da aslında sol lobda yüksek oranda floresan görmeyi düşündürmektedir. Uygulanan Au-Ni-PLL/NR formülasyonları ise hem sağ hem sol lobda ışımaya göstermiştir ki bunun da bir avantaj olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca akciğerde de yüksek oranda tutulum gözlenmektedir. Bunun sebebinin akciğerde yüksek miktarda ApoE reseptörü bulunması ve bu reseptör ile nanomotor yüzeyindeki polisorb-80'in yüksek afinitesinin bulunması olabilir.

Beyinde gözlenen yüksek oranda tutulum dokudaki tutulumu göstermektedir. Nanomotorların KBE'yi aşım aşmadığı yalnızca bu test ile anlaşılabilir. İn vivo biyodağılım sonrası beyinden alınan kesitlerin doku için ayrı endotel için ayrı işaret (marker) ve boya kullanılarak işaretlenmesi sonrası mikroskop ile incelenmesi nanomotorların KBE'yi aşım durumu hakkında bilgi verecektir. Endoteli boyamak için en sık kullanılan işaretlerden bir tanesi CD31'dir. Bununla birlikte DAPI ve FITC boya kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur (263-266).

Yapılan uygulamanın biyofarmasötik ve farmakokinetik açıdan da incelenip yorumlanması bir diğer gerekliliktir. Bunun için çeşitli IVIV ilişki, IVIVC programları kullanılabilir ve daha detaylı in vivo çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Farklı türde nanoformülasyonların in vivo biyodağılım çalışmalarını incelemek amacıyla literatür taraması yapılmıştır (267-271). Bunları AH özelinde taradığımızda Alzheimerlı transgenik farelerin kullanıldığı çalışmalar yoğunluktadır (91, 272). Tez kapsamında ilk çalışma olarak sağlıklı hayvanda yapılan biyodağılım çalışması bir sonraki aşamada Alzheimerlı transgenik farelerde in vivo etkililik çalışmaları ile birlikte gerçekleştirilecektir. Bu çalışmalar öncesinde sağlıklı farede elde ettiğimiz başarılı sonuçlar bize hasta hayvan çalışmaları için de umut vermiş ve yol gösterici olmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmaları kapsamında günümüzde henüz kesin bir tedavisi bulunmamış olan ve artan yaşlı nüfus oranı sebebiyle gün geçtikçe daha büyük bir popülasyonu etkileyen Alzheimer Hastalığı tedavisi için ilk defa MemHCI yüklü nanomotor sistemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen MemHCI yüklü nanomotorların yapısal ve manyetik hareket karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 3 farklı hücre hattında sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiş, nanomotor formülasyonuna yüklenen MemHCI'nin TrkB'yi uyararak BACE1 enzim aktivitesini düşürme etkinliği değerlendirilmiştir. Geliştirilen in vitro KBE modeli ile de MemHCI yüklü nanomotorların KBE'yi geçişleri test edilmiştir. Metabolomik analizler ile nanomotorların insan Nöroblastoma hücrelerinde oluşturacağı metabolomik değişimler incelenmiştir. Tez çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- MemHCI tayini ve karakterizasyonu için LC-MS/MS yöntemi başarıyla geliştirilmiş ve yöntem ilgili kılavuzlar kapsamında valide edilmiştir. Validasyon sonucunda yöntemin MemHCI tayini için uygun doğruluk, kesinlik, seçicilik, duyarlılık, doğrusallıkta olduğu gösterilmiştir.
- PLL tabakası bulunduran Au-Ni nanomotorlar uygun morfolojik özelliklere sahip (çubuk şekilli, 200 nm çapında ve 3-5 µm boyunda) olarak membran kalıp tekniği ve elektrokimyasal biriktirme ile başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Sentezlenen nanomotorlar bileşen olarak bulundurduğu Ni katmanı sayesinde manyetik özellikte olup manyetik alan altında kendi kendine hareket edebilmektedir. Dış mıknatıs ile bu hareketin yönü kontrol edilmiş ve bu özelliği sayesinde sentezlenen nanomotorlar istenen doğrultuda hareket ettirilerek hedef bölgeye yönlendirilmiştir.
- Sentezlenen Au-Ni-PLL nanomotorlara MemHCI başarılı bir şekilde yüklenmiş (dış yüzeye bağlanarak) ve in vitro karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği ilaç taşıyıcı yeni sistemler içerisinde bulunan diğer gruplara oranla nanomotor sistemlerinde daha düşük seviyede kalmıştır. Ancak MemHCI yükleme çalışması nanomotorlar özelinde ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirilmiş olup literatürdeki diğer

etkin madde yüklü nanomotorların enkapsülasyon etkinlikleri ile kıyaslandığında başarılı bulunmuştur.

- Nanomotor formülasyonun modifikasyon çalışmaları kapsamında beyne hedeflendirmede sıklıkla kullanılan polisorbata 80 ile kaplama yöntemi ile nanomotor yüzeyi kaplanmıştır. Ayrıca AH'da beyinde gözlenen amiloid- β plaklara spesifik olarak bağlanan CRANAD-2 boyası da geliştirilen nanomotor formülasyonuna başarılı bir şekilde yüklenmiştir. İn vivo etkinlik testlerinde bu boya nanomotor sisteminin plaklara ulaşip ulaşmadığını kanıtlamada kullanılmıştır.
- MemHCI yüklü nanomotorların toksik olmayan dozları belirlenmiş ve hücre içerisine alım analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu tespit edilen dozlar ile in vitro etkinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- hCMEC-D3 hücre hattı ile in vitro KBE modeli oluşturularak nanomotor formülasyonlarının bu modelde bariyeri geçişleri incelenmiş ve memantin çözelti formuyla karşılaştırma yapılmıştır. Modelde alt kompartmana ekilen SH-SY5Y hücrelerinde BACE1 enzim aktivitesini düşürme etkinlikleri değerlendirilmiştir.
- İnsan Nöroblastoma hücre hattına nanomotorların uygulanması sonrası gözlenebilecek metabolomik değişiklikler omiks analizleri gerçekleştirilerek incelenmiştir.
- MemHCI'nin terapötik dozunu taşıyacak miktarda nanomotor ile in vivo biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nanomotorların başarılı bir şekilde beyin dokusuna ulaştığı tespit edilmiştir. Fakat bu in vivo çalışmalar nanomotorların KBE'yi aşip aşmadığı konusunda net bir bilgi vermemektedir. Yine de AH'na sahip genetiği değiştirilmiş fareler ile yapılabilecek etkinlik çalışmalarına ışık tutmuştur.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde Au-Ni-PLL nanomotor formülasyonları başarı ile sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu formülasyonlar ilk defa hazırlanarak literatüre katkıda bulunulmuştur. Tabii ki literatürde ilk olan bu sistemin çalışılması bazı zorlukları da beraberinde getirmiştir. Tüm bu zorluklar aşılarak Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotor formülasyonlarının in vitro hücre kültüründe etkisi başarıyla gösterilmiştir. Ayrıca umut vaat eden in vivo biyodağılım çalışma sonuçları

alınmıştır. In vivo çalışmalar genişletilerek hazırlanan formülasyonların biyofarmasötik ve farmakokinetik açıdan değerlendirilmesi gerekmektedir. Şu anda gerçekleştirilen çalışmalar yalnızca salım kinetiği ile ilgili yorum yapmayı sağlamış ve ayrıca da farmakokinetikte önemli birer parametre olan dağılım ve atılımın ilk aşamada sağlıklı farelerde gözlenebilmesini sağlamıştır. Kullanılan hayvan sayısı artırılarak ve deneyler çeşitlendirilerek detaylı yorumlama için harekete geçilmelidir. KBE modelinde de hem başarıyla BACE1 enzim aktivitesini düşürmesi hem de bu etkinin çözelti formuna göre de daha yüksek düzeyde olması sebebiyle nanomotor formülasyonları AH tedavisinde etkin bir sistem olma yolunda umut vaat edici bulunmuştur. Bu sistemin daha detaylı ve kapsamlı araştırılması gerekliliği de söz konusudur. Çalışmaların oldukça güncel olması ve ülkemizde de bu alanda çalışan ekip sayısının az olması sebebiyle bazı detaylı analizler için yeterli ekipman bulunmamaktadır. Sistemin manyetik hareketinin flow altında çalışılması, manyetik alan uygulamasının optimizasyonu ve standardizasyonu için magnetin robotik kol ile hareket ettirilmesi, ex vivo çalışmalar ile damar içinde yine hareketin gözlenmesi, MRI sistemler kurularak farelerde görüntülüne yapılması gibi çalışmalar şu anda yurt dışında güncel olarak yürütülebilen çalışmalar olup tasarladığımız Au-Ni-PLL/MemHCI nanomotorların da bu ek karakterizasyonlarının tamamlanması sistemin güvenilirliğini artıracaktır. Bu çalışmaların örneklerini Mayo Klinik'te araştırmacı olarak bulunduğum süre boyunca gözleme şansım olmuştur. Bir sonraki aşamada çalışılacak bir diğer konu ise Alzheimerlı farelerde in vivo etkililik çalışmalarının yapılması olacaktır. Tüm bu adımlar nanomotor formülasyonlarını klinik uygulamaya taşımak için tamamlanması gereken yollardır.

7. KAYNAKLAR

1. Gauthier S WC, Servaes S, Morais JA, Rosa-Neto P. World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. London, England: Alzheimer's Disease International.; 2022.
2. Tezel G, Timur SS, Bozkurt İ, Türkoğlu Ö F, Eroğlu İ, Nemutlu E, et al. A Snapshot on the Current Status of Alzheimer's Disease, Treatment Perspectives, in-Vitro and in-Vivo Research Studies and Future Opportunities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 2019;67(10):1030-41.
3. Long S, Benoit, C., Weidner, W. World Alzheimer Report 2023: Reducing dementia risk: never too early, never too late. London, England: Alzheimer's Disease International; 2023.
4. Noback C, Reehilgvre, Ruggiero D, Aechilgvre, Demarest R, Jeehilgvre, Strominger N, Leehilgvre. *The Human Nervous System Structure and Function*. 6th ed. 2005. ed2005.
5. Amaral DG. The anatomical organization of the central nervous system. *Principles of neural science*. 2000;4:317-36.
6. Jellinger KA, editor *General aspects of neurodegeneration. Advances in Research on Neurodegeneration; 2003 2003//; Vienna: Springer Vienna*.
7. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(3):457-87.
8. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*. 2003;26:81-104.
9. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*. 2022;7(2):e105-e25.
10. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*. 2013;9(1):63-75. e2.
11. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2023;19(4):1598-695.
12. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021;397(10284):1577-90.
13. Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology*. 2020;40(1):22-9.
14. Ekman U, Ferreira D, Westman E. The A/T/N biomarker scheme and patterns of brain atrophy assessed in mild cognitive impairment. *Scientific Reports*. 2018;8(1):8431.

- 15.Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, Pirtila T, Popescu BO, Rektorova I, et al. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*. 2010;17(10):1236-48.
- 16.Gale SA, Acar D, Daffner KR. Dementia. *American Journal of Medicine*. 2018;131(10):1161-9.
- 17.Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, et al. Metabolomics in Early Alzheimer's Disease: Identification of Altered Plasma Sphingolipidome Using Shotgun Lipidomics. *PLOS ONE*. 2011;6(7):e21643.
- 18.Wilkins JM, Trushina E. Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*. 2018;8:719.1-20.
- 19.Dong X-x, Wang Y, Qin Z-h. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009;30(4):379-87.
- 20.Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of Neurochemistry*. 2009;110(4):1129-34.
- 21.O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience*. 2011;34(1):185-204.
- 22.Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739(2-3):198-210.
- 23.Allen SJ, Wilcock GK, Dawbarn D. Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochemical Biophysical Research Community*. 1999;264(3):648-51.
- 24.Ferrer I, Marín C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, et al. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathology Exp Neurology*. 1999;58(7):729-39.
- 25.Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiology*. 2001;63(1):71-124.
- 26.Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, McAninch EA, Wilson RS, Evans DA. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020-2060). *Alzheimer's & Dementia*. 2021;17(12):1966-75.
- 27.Choi SH, Tanzi RE. Adult neurogenesis in Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 2023;33(4):307-21.
- 28.Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JB. Genetics of dementia. *Lancet*. 2014;383(9919):828-40.
- 29.Kelleher RJ, Shen J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(4):629-31.

30. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. New England Journal of Medicine.* 1998;338(8):506-11.
31. Herrup K, Carrillo MC, Schenk D, Cacace A, Desanti S, Fremeau R, et al. Beyond amyloid: getting real about nonamyloid targets in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia.* 2013;9(4):452-8. e1.
32. Liu K, Lin H-H, Pi R, Mak S, Han Y, Hu Y. Research and development of anti-Alzheimer's disease drugs: an update from the perspective of technology flows. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2018;28(4):341-50.
33. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet.* 2020;396(10248):413-46.
34. Anstey KJ, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am Journal of Epidemiology.* 2007;166(4):367-78.
35. Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Jr., Zhou J, Whitmer RA. Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch International Medicine.* 2011;171(4):333-9.
36. Buchman AS, Yu L, Wilson RS, Lim A, Dawe RJ, Gaiteri C, et al. Physical activity, common brain pathologies, and cognition in community-dwelling older adults. *Neurology.* 2019;92(8):e811-e22.
37. Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, Berr C, Tzourio C, Dartigues JF, et al. Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology.* 2007;69(20):1921-30.
38. Lourida I, Soni M, Thompson-Coon J, Purandare N, Lang IA, Ukoumunne OC, et al. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. *Epidemiology.* 2013;24(4):479-89.
39. Krakovska O, Christie GJ, Farzan F, Sixsmith A, Ester M, Moreno S. Healthy memory aging - the benefits of regular daily activities increase with age. *Aging (Albany NY).* 2021;13(24):25643-52.
40. Rawlings AM, Sharrett AR, Mosley TH, Wong DF, Knopman DS, Gottesman RF. Cognitive Reserve in Midlife is not Associated with Amyloid- β Deposition in Late-Life. *Journal of Alzheimers Disease.* 2019;68(2):517-21.
41. Stern Y, Arenaza-Urquijo EM, Bartrés-Faz D, Belleville S, Cantilon M, Chetelat G, et al. Whitepaper: Defining and investigating cognitive reserve, brain reserve, and brain maintenance. *Alzheimer's & Dementia.* 2020;16(9):1305-11.
42. LoBue C, Munro C, Schaffert J, Didehbani N, Hart J, Batjer H, et al. Traumatic Brain Injury and Risk of Long-Term Brain Changes, Accumulation of Pathological

Markers, and Developing Dementia: A Review. *Journal of Alzheimers Disease*. 2019;70(3):629-54.

43.Garcia MJ, Leadley R, Lang S, Ross J, Vinand E, Ballard C, et al. Real-World Use of Symptomatic Treatments in Early Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2023:1-17.

44.Shah RS, Lee HG, Xiongwei Z, Perry G, Smith MA, Castellani RJ. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacotherapy*. 2008;62(4):199-207.

45.Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA*. 1994;271(13):992-8.

46.Wagstaff AJ, McTavish D. Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. 1994;4(6):510-40.

47.Raschetti R, Albanese E, Vanacore N, Maggini M. Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials. *PLoS Med*. 2007;4(11):e338.

48.Birks J, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(1):Cd001190.

49.Sramek JJ, Anand R, Wardle TS, Irwin P, Hartman RD, Cutler NR. Safety/tolerability trial of SDZ ENA 713 in patients with probable Alzheimer's disease. *Life Sciences*. 1996;58(15):1201-7.

50.Noetzli M, Eap CB. Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Aspects of Drugs Used in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clinical Pharmacokinetics*. 2013;52(4):225-41.

51.Hogan DB, Patterson C. Progress in Clinical Neurosciences: Treatment of Alzheimer's Disease and Other Dementias - Review and Comparison of the Cholinesterase Inhibitors. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. 2002;29(4):306-14.

52.Lilienfeld S. Galantamine — a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews*. 2002;8(2):159-76.

53.Grossman H, Samuels SC. Emerging Therapeutics for Alzheimer's Disease: An Avenue of Hope. *CNS Spectrums*. 2003;8(11):834-45.

54.Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 1999;38(6):735-67.

55.Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*. 1995;34(10):1219-37.

56. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2003;18(S1):S23-S32.
57. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 181458, Memantine Hydrochloride [Internet]. 2023.
58. Robinson DM, Keating GM. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2006;66(11):1515-34.
59. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annual Neurology*. 2006;59(6):912-21.
60. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(6):1959-64.
61. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*. 2001;60(8):759-67.
62. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016;537(7618):50-6.
63. Budd Haeberlein S, Aisen PS, Barkhof F, Chalkias S, Chen T, Cohen S, et al. Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *Journal of Prevention of Alzheimers Disease*. 2022;9(2):197-210.
64. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2023;388(1):9-21.
65. Rahman A, Hossen MA, Chowdhury MFI, Bari S, Tamanna N, Sultana SS, et al. Aducanumab for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review. *Psychogeriatrics*. 2023;23(3):512-22.
66. Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Volceanov A, Teleanu RI. Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology. *Pharmaceutics*. 2018;10(4).
67. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handbook of Clinical Neurology*. 2016;133:39-59.
68. ESSENTIALS OF NEUROANESTHESIA. 1 ed. 125 London Wall, London EC2Y 5AS, United Kingdom: Academic Press; 2017. 1036 p.
69. Abbott A. Dementia: A problem for our age. *Nature*. 2011;475(7355):S2-S4.
70. Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature Reviews Neuroscience*. 2011;12(3):169-82.
71. Barar J, Rafi MA, Pourseif MM, Omidi Y. Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *Bioimpacts*. 2016;6(4):225-48.

- 72.Liu X, Testa B, Fahr A. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharmaceutical Research*. 2011;28(5):962-77.
- 73.Li X, Tsibouklis J, Weng T, Zhang B, Yin G, Feng G, et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Drug Targeting*. 2017;25(1):17-28.
- 74.Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*. 2011;12(7):620-36.
- 75.Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine & Toxicology*. 2007;2:16.
- 76.Sahu T, Ratre YK, Chauhan S, Bhaskar LVKS, Nair MP, Verma HK. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;63:102487.
- 77.Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16(1):71.1-33.
- 78.Rana V, Sharma R. Chapter 5 - Recent Advances in Development of Nano Drug Delivery. In: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra RK, Thomas S, editors. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*: Elsevier; 2019. p. 93-131.
- 79.Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Advances and challenges of nanotechnology-based drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2007;4(6):621-33.
- 80.Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009;3(1):16-20.
- 81.Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18.
- 82.Wen MM, El-Salamouni NS, El-Refaie WM, Hazzah HA, Ali MM, Tosi G, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *Journal of Controlled Release*. 2017;245:95-107.
- 83.Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KP, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research*. 2008;1200:159-68.
- 84.Fazil M, Md S, Haque S, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, et al. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 2012;47(1):6-15.

85. Yang ZZ, Wang ZZ, Wu K, Qi XR. [Preparation of rivastigmine liposome and its pharmacokinetics in rats after intranasal administration]. *Yao Xue Xue Bao*. 2011;46(7):859-63.
86. Mufamadi MS, Choonara YE, Kumar P, Modi G, Naidoo D, van Vuuren S, et al. Ligand-functionalized nanoliposomes for targeted delivery of galantamine. *International Journal of Pharmacology*. 2013;448(1):267-81.
87. Hanafy AS, Farid RM, ElGamal SS. Complexation as an approach to entrap cationic drugs into cationic nanoparticles administered intranasally for Alzheimer's disease management: preparation and detection in rat brain. *Drug Development & Industrial Pharmacology*. 2015;41(12):2055-68.
88. Misra S, Chopra K, Sinha VR, Medhi B. Galantamine-loaded solid-lipid nanoparticles for enhanced brain delivery: preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluations. *Drug Delivery*. 2016;23(4):1434-43.
89. Li DD, Zhang YH, Zhang W, Zhao P. Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials on the Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontier Neuroscience*. 2019;13:472.1-18.
90. Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, et al. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *International Journal of Biology Macromolecules*. 2014;67:418-25.
91. Bhavna, Md S, Ali M, Baboota S, Sahni JK, Bhatnagar A, et al. Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40(2):278-87.
92. Çınar E, Mutluay SU, Baysal İ, Gültekinoglu M, Ulubayram K, Çiftçi SY, et al. Donepezil-loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles Enhance the Learning and Memory Function of Beta-Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Noro Psikiyatı Ars*. 2022;59(4):281-9.
93. Kaur A, Nigam K, Srivastava S, Tyagi A, Dang S. Memantine nanoemulsion: a new approach to treat Alzheimer's disease. *Journal of Microencapsulation*. 2020;37(5):355-65.
94. Sánchez-López E, Ettcheto M, Egea MA, Espina M, Cano A, Calpena AC, et al. Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer's disease: in vitro and in vivo characterization. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16(1):32.
95. Laserra S, Basit A, Sozio P, Marinelli L, Fornasari E, Cacciatore I, et al. Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl-memantine codrug: preparation and characterization. *International Journal of Pharmacology*. 2015;485(1-2):183-91.
96. Gao W, Wang J. Synthetic micro/nanomotors in drug delivery. *Nanoscale*. 2014;6(18):10486-94.

97. Patel GM, Patel GC, Patel RB, Patel JK, Patel M. Nanorobot: a versatile tool in nanomedicine. *Journal of Drug Targeting*. 2006;14(2):63-7.
98. Wang S, Liu K, Wang F, Peng F, Tu Y. The Application of Micro- and Nanomotors in Classified Drug Delivery. *Chemistry – An Asian Journal*. 2019;14(14):2336-47.
99. Kagan D, Laocharoensuk R, Zimmerman M, Clawson C, Balasubramanian S, Kang D, et al. Rapid delivery of drug carriers propelled and navigated by catalytic nanoshuttles. *Small*. 2010;6(23):2741-7.
100. Xu H, Medina-Sánchez M, Magdanz V, Schwarz L, Hebenstreit F, Schmidt OG. Sperm-Hybrid Micromotor for Targeted Drug Delivery. *ACS Nano*. 2018;12(1):327-37.
101. Gao W, Pei A, Wang J. Water-driven micromotors. *ACS Nano*. 2012;6(9):8432-8.
102. Garcia-Gradilla V, Orozco J, Sattayasamitsathit S, Soto F, Kuralay F, Pourazary A, et al. Functionalized ultrasound-propelled magnetically guided nanomotors: toward practical biomedical applications. *ACS Nano*. 2013;7(10):9232-40.
103. Tezel G, Timur SS, Kuralay F, Gürsoy RN, Ulubayram K, Öner L, et al. Current status of micro/nanomotors in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 2021;29(1):29-45.
104. Teo WZ, Pumera M. Motion Control of Micro-/Nanomotors. *Chemistry*. 2016;22(42):14796-804.
105. Somasundar A, Sen A. Chemically Propelled Nano and Micromotors in the Body: Quo Vadis? *Small*. 2021;17(5):2007102.
106. Hermanová S, Pumera M. Biocatalytic Micro- and Nanomotors. *Chemistry – A European Journal*. 2020;26(49):11085-92.
107. Wang S, Liu X, Wang Y, Xu D, Liang C, Guo J, et al. Biocompatibility of artificial micro/nanomotors for use in biomedicine. *Nanoscale*. 2019;11(30):14099-112.
108. Ma X, Hahn K, Sanchez S. Catalytic mesoporous Janus nanomotors for active cargo delivery. *Journal of American Chemical Society*. 2015;137(15):4976-9.
109. Ma X, Jannasch A, Albrecht UR, Hahn K, Miguel-López A, Schäffer E, et al. Enzyme-Powered Hollow Mesoporous Janus Nanomotors. *Nano Lett*. 2015;15(10):7043-50.
110. Garcia-Gradilla V, Sattayasamitsathit S, Soto F, Kuralay F, Yardımcı C, Wiitala D, et al. Ultrasound-Propelled Nanoporous Gold Wire for Efficient Drug Loading and Release. *Small*. 2014;10(20):4154-9.
111. Qiu F, Fujita S, Mhanna R, Zhang L, Simona BR, Nelson BJ. Magnetic Helical Microswimmers Functionalized with Lipoplexes for Targeted Gene Delivery. *Advanced Functional Materials*. 2015;25:1666-1671.
112. Choi H, Lee GH, Kim KS, Hahn SK. Light-Guided Nanomotor Systems for Autonomous Photothermal Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(3):2338-46.

113. Stanton MM, Park BW, Miguel-López A, Ma X, Sitti M, Sánchez S. Biohybrid Microtube Swimmers Driven by Single Captured Bacteria. *Small*. 2017;13:1603679.
114. Dogan NO, Ceylan H, Suadiye E, Sheehan D, Aydin A, Yasa IC, et al. Remotely Guided Immunobots Engaged in Anti-Tumorigenic Phenotypes for Targeted Cancer Immunotherapy. *Small*. 2022;18(46):2204016.
115. Ye H, Wang Y, Xu D, Liu X, Liu S, Ma X. Design and fabrication of micro/nanomotors for environmental and sensing applications. *Applied Materials Today*. 2021;23:101007.
116. Wang H, Pumera M. Emerging materials for the fabrication of micro/nanomotors. *Nanoscale*. 2017;9(6):2109-16.
117. Safdar M, Khan SU, Jänis J. Progress toward Catalytic Micro- and Nanomotors for Biomedical and Environmental Applications. *Advanced Materials*. 2018;30(24):1703660.
118. Wang H, Pumera M. Fabrication of Micro/Nanoscale Motors. *Chemical Reviews*. 2015;115(16):8704-35.
119. Sun J, Tan H, Lan S, Peng F, Tu Y. Progress on the fabrication strategies of self-propelled micro/nanomotors. *Journal of Colloid and Interface Science Open*. 2021;2:100011.
120. Navneet K, Karan M, Rishabh N, Ashutosh U, Kunal N, Arti T. Estimation of memantine hydrochloride using ultraviolet-visible spectrophotometry in bulk drug and formulation. *Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10(2):80-2.
121. Amin A, Sheikh R, Fattah GMA, Ali M, Abdelnaby BM, Gouda AA. Spectrophotometric methods for the quantitative determination of memantine hydrochloride in pure form and pharmaceutical formulations. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2022;14(2):206-14.
122. Peters FT. Method validation using LC-MS. *Applications of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Toxicology*, Pharmaceutical Press, London. 2006:71-96.
123. Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2002;36(5):143-206.
124. Tucker I, Corbett J, Fatkin J, Jack R, Kaszuba M, MacCreath B, et al. Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces. *Current opinion in colloid & interface science*. 2015;20(4):215-26.
125. Sandhu R, Singh N, Dhankhar J, Kama G, Sharma R. Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications. *Nano-Technological and Biochemical Techniques for Assessing the Quality and Safety of Milk and Milk Products*. 2018:135-7.
126. Statham PJ. Prospects for improvement in EDX microanalysis. *Journal of Microscopy*. 1983;130(2):165-76.

127. Meister S, Zlatev I, Stab J, Docter D, Baches S, Stauber RH, et al. Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid- β 42 generation in an in vitro blood–brain barrier model. *Alzheimer's research & therapy*. 2013;5(6):1-12.
128. Nemetlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18 O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):529-34.
129. Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PloS one*. 2012;7(2):e32737.
130. Dutta T, Chai HS, Ward LE, Ghosh A, Persson X-MT, Ford GC, et al. Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(5):1004-16.
131. Torra J, Viela F, Megías D, Sot B, Flors C. Versatile Near-Infrared Super-Resolution Imaging of Amyloid Fibrils with the Fluorogenic Probe CRANAD-2. *Chemistry – A European Journal*. 2022;28(19):e202200026.
132. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry Reviews*. 2009;30(1):19-34.
133. Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug development. *Mass spectrometry reviews*. 1999;18(3-4):187-279.
134. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I. *Analytical Chim Acta*. 2015;870:29-44.
135. Kang J-S. Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. *Tandem Mass Spectrometry–Applications and Principles*. 2012;29:441-92.
136. Whitmire M, Ammerman J, De Lisio P, Killmer J, Kyle D, Mainstone E, et al. LC-MS/MS bioanalysis method development, validation, and sample analysis: points to consider when conducting nonclinical and clinical studies in accordance with current regulatory guidances. *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques S*. 2011;4(2).
137. Serrà A, García-Torres J. Electrochemistry: A basic and powerful tool for micro- and nanomotor fabrication and characterization. *Applied Materials Today*. 2021;22:100939.
138. Moo JGS, Mayorga-Martinez CC, Wang H, Khezri B, Teo WZ, Pumera M. Nano/microrobots meet electrochemistry. *Advanced Functional Materials*. 2017;27(12):1604759.
139. Gao W, Dong R, Thamphiwatana S, Li J, Gao W, Zhang L, et al. Artificial micromotors in the mouse's stomach: a step toward in vivo use of synthetic motors. *ACS Nano*. 2015;9(1):117-23.

140. Yurdabak Karaca G, Kaya HK, Kuralay F, Uygun Oksuz A. Chitosan functionalized gold-nickel bimetallic magnetic nanomachines for motion-based deoxyribonucleic acid recognition. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;193(Pt A):370-7.
141. Hermanová S, Pumera M. Polymer platforms for micro- and nanomotor fabrication. *Nanoscale*. 2018;10(16):7332-42.
142. Ahmed S, Wang W, Bai L, Gentekos DT, Hoyos M, Mallouk TE. Density and Shape Effects in the Acoustic Propulsion of Bimetallic Nanorod Motors. *ACS Nano*. 2016;10(4):4763-9.
143. Jurado-Sánchez B, Escarpa A. Milli, micro and nanomotors: Novel analytical tools for real-world applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;84.
144. Zhang YM, Zhang NY, Xiao K, Yu Q, Liu Y. Photo-Controlled Reversible Microtubule Assembly Mediated by Paclitaxel-Modified Cyclodextrin. *Angewandte Chemie International Edition Engl*. 2018;57(28):8649-53.
145. Yurdabak Karaca G, Kuralay F, Uygun E, Ozaltin K, Eren Demirbuken S, Garipcan B, et al. Gold–Nickel Nanowires as Nanomotors for Cancer Marker Biodetection and Chemotherapeutic Drug Delivery. *ACS Applied Nano Materials*. 2021;4.
146. Yuan K, de la Asunción-Nadal V, Cuntín-Abal C, Jurado-Sánchez B, Escarpa A. On-board smartphone micromotor-based fluorescence assays. *Lab Chip*. 2022;22(5):928-35.
147. Sun M, Fan X, Meng X, Song J, Chen W, Sun L, et al. Magnetic biohybrid micromotors with high maneuverability for efficient drug loading and targeted drug delivery. *Nanoscale*. 2019;11(39):18382-92.
148. Xu D, Wang Y, Liang C, You Y, Sanchez S, Ma X. Self-Propelled Micro/Nanomotors for On-Demand Biomedical Cargo Transportation. *Small*. 2020;16(27):e1902464.
149. Gao C, Wang Y, Ye Z, Lin Z, Ma X, He Q. Biomedical Micro-/Nanomotors: From Overcoming Biological Barriers to In Vivo Imaging. *Advanced Materials*. 2021;33(6):e2000512.
150. Yuan K, Pacheco M, Jurado-Sánchez B, Escarpa A. Design and Control of the Micromotor Swarm Toward Smart Applications. *Advanced Intelligent Systems*. 2021;3.2100002.1-15.
151. Wang W, Castro LA, Hoyos M, Mallouk TE. Autonomous motion of metallic microrods propelled by ultrasound. *ACS Nano*. 2012;6(7):6122-32.
152. Gao W, Sattayasamitsathit S, Orozco J, Wang J. Highly Efficient Catalytic Microengines: Template Electrosynthesis of Polyaniline/Platinum Microtubes. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(31):11862-4.

- 153.Kuralay F, Sattayasamitsathit S, Gao W, Uygun A, Katzenberg A, Wang J. Self-propelled carbohydrate-sensitive microtransporters with built-in boronic acid recognition for isolating sugars and cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(37):15217-20.
- 154.Kulkarni SA, Feng S-S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2013;30(10):2512-22.
- 155.Bowen P. Particle Size Distribution Measurement from Millimeters to Nanometers and from Rods to Platelets. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2002;23(5):631-62.
- 156.Gao W, Sattayasamitsathit S, Manesh KM, Weihs D, Wang J. Magnetically powered flexible metal nanowire motors. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(41):14403-5.
- 157.Gao W, Kagan D, Pak OS, Clawson C, Campuzano S, Chuluun-Erdene E, et al. Cargo-Towing Fuel-Free Magnetic Nanoswimmers for Targeted Drug Delivery. *Small*. 2012;8(3):460-7.
- 158.Badia A, Singh S, Demers L, Cuccia L, Brown GR, Lennox RB. Self-assembled monolayers on gold nanoparticles. *Chemistry—A European Journal*. 1996;2(3):359-63.
- 159.Friesen M, Burt HM, Mitchell A. The dehydration of nickel sulfate. *Thermochimica Acta*. 1980;41(2):167-74.
- 160.Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*. 2018;62(1):2841.
- 161.Xuan M, Shao J, Lin X, Dai L, He Q. Self-Propelled Janus Mesoporous Silica Nanomotors with Sub-100 nm Diameters for Drug Encapsulation and Delivery. *ChemPhysChem*. 2014;15(11):2255-60.
- 162.Mafakheri F, Asakereh A, Khoe S, Kamankesh M. Synthesis of magnetic electroactive nanomotors based on sodium alginate/chitosan and investigation the influence of the external electric field on the mechanism of locomotion. *Scientific Reports*. 2023;13(1):10326.
- 163.Yu W, Lin R, He X, Yang X, Zhang H, Hu C, et al. Self-propelled nanomotor reconstructs tumor microenvironment through synergistic hypoxia alleviation and glycolysis inhibition for promoted anti-metastasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(9):2924-36.
- 164.Demirbuken SE, Karaca GY, Kaya HK, Oksuz L, Garipcan B, Oksuz AU, et al. Paclitaxel-conjugated phenylboronic acid-enriched catalytic robots as smart drug delivery systems. *Materials Today Chemistry*. 2022;26:101172.
- 165.Srivastava SK, Medina-Sánchez M, Koch B, Schmidt OG. Medibots: dual-action biogenic microdaggers for single-cell surgery and drug release. *Advanced Materials*. 2016;28(5):832-7.

- 166.de Ávila BE, Angsantikul P, Li J, Angel Lopez-Ramirez M, Ramírez-Herrera DE, Thamphiwatana S, et al. Micromotor-enabled active drug delivery for in vivo treatment of stomach infection. *Nature Community*. 2017;8(1):272.
- 167.Wu Z, Lin X, Si T, He Q. Recent Progress on Bioinspired Self-Propelled Micro/Nanomotors via Controlled Molecular Self-Assembly. *Small*. 2016;12(23):3080-93.
- 168.Beltrán-Gastélum M, Esteban-Fernández de Ávila B, Gong H, Venugopalan PL, Hianik T, Wang J, et al. Rapid Detection of AIB1 in Breast Cancer Cells Based on Aptamer-Functionalized Nanomotors. *ChemPhysChem*. 2019;20(23):3177-80.
- 169.Xu P, Yu Y, Li T, Chen H, Wang Q, Wang M, et al. Near-infrared-driven fluorescent nanomotors for detection of circulating tumor cells in whole blood. *Analytica Chimica Acta*. 2020;1129:60-8.
- 170.Subjakova V, Oravczova V, Hianik T. Polymer Nanoparticles and Nanomotors Modified by DNA/RNA Aptamers and Antibodies in Targeted Therapy of Cancer. *Polymers* 2021, 13, 341.
- 171.Yang Q, Gao Y, Xu L, Hong W, She Y, Yang G. Enzyme-driven micro/nanomotors: Recent advances and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;167:457-69.
- 172.Huang Y, Wu C, Dai J, Liu B, Cheng X, Li X, et al. Tunable Self-Thermophoretic Nanomotors with Polymeric Coating. *Journal of the American Chemical Society*. 2023;145(36):19945-52.
- 173.Fischer MJ. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Surface plasmon resonance: methods and protocols*. 2010:55-73.
- 174.Zhou H, Yuan Y, Wang Z, Ren Z, Hu M, Lu J, et al. Co-delivery of doxorubicin and quercetin by Janus hollow silica nanomotors for overcoming multidrug resistance in breast MCF-7/Adr cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2023;658:130654.
- 175.Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY, Kreuter J. Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 1999;16(10):1564-9.
- 176.Tian X-H, Lin X-N, Wei F, Feng W, Huang Z-C, Wang P, et al. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6(null):445-52.
- 177.Ray S, Sinha P, Laha B, Maiti S, Bhattacharyya UK, Nayak AK. Polysorbate 80 coated crosslinked chitosan nanoparticles of ropinirole hydrochloride for brain targeting. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;48:21-9.
- 178.Baas J, Senninger N, Elser H. [The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement]. *Z Gastroenterol*. 1994;32(2):117-23.

179. Tang Y, Wang X, Li J, Nie Y, Liao G, Yu Y, et al. Overcoming the Reticuloendothelial System Barrier to Drug Delivery with a “Don’t-Eat-Us” Strategy. *ACS Nano*. 2019;13(11):13015-26.
180. Basu MK, Lala S. Nanoparticulate Drug Delivery to the Reticuloendothelial System and to Nanoparticulates as Drug Carriers. 2006:463.
181. Li S-D, Huang L. Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: Role of the supported bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009;1788(10):2259-66.
182. Bartneck M, Keul HA, Wambach M, Bornemann J, Gbureck U, Chatain N, et al. Effects of nanoparticle surface-coupled peptides, functional endgroups, and charge on intracellular distribution and functionality of human primary reticuloendothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012;8(8):1282-92.
183. Liu X, Li H, Chen Y, Jin Q, Ren K, Ji J. Mixed-Charge Nanoparticles for Long Circulation, Low Reticuloendothelial System Clearance, and High Tumor Accumulation. *Advanced Healthcare Materials*. 2014;3(9):1439-47.
184. Cai Q, Wang L, Deng G, Liu J, Chen Q, Chen Z. Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles. *American Journal of Translational Research*. 2016;8(2):749-64.
185. Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Development Research*. 2006;67(1):47-54.
186. Sun W, Xie C, Wang H, Hu Y. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials*. 2004;25(15):3065-71.
187. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(1):75-84.
188. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research*. 2008;1200:159-68.
189. Kurakhmaeva KB, Voronina TA, Kapica IG, Kreuter J, Nerobkova LN, Seredenin SB, et al. Antiparkinsonian effect of nerve growth factor adsorbed on polybutylcyanoacrylate nanoparticles coated with polysorbate-80. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2008;145(2):259-62.
190. Ren T, Xu N, Cao C, Yuan W, Yu X, Chen J, et al. Preparation and Therapeutic Efficacy of Polysorbate-80-Coated Amphotericin B/PLA-b-PEG Nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2009;20(10):1369-80.

191. Tes D, Kratkiewicz K, Aber A, Horton L, Zafar M, Arafat N, et al. Development and Optimization of a Fluorescent Imaging System to Detect Amyloid- β Proteins: Phantom Study. *Biomedical Engineering and Computational Biology*. 2018;9:117959.
192. Ni R, Villos A, Dean-Ben XL, Chen Z, Vaas M, Stavarakis S, et al. In-vitro and in-vivo characterization of CRANAD-2 for multi-spectral optoacoustic tomography and fluorescence imaging of amyloid-beta deposits in Alzheimer mice. *Photoacoustics*. 2021;23:100285.
193. Sarabia-Vallejo Á, López-Alvarado P, Menéndez JC. Small-molecule theranostics in Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023;255:115382.
194. Tong H, Lou K, Wang W. Near-infrared fluorescent probes for imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(1):25-33.
195. Staderini M, Martín MA, Bolognesi ML, Menéndez JC. Imaging of β -amyloid plaques by near infrared fluorescent tracers: a new frontier for chemical neuroscience. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(7):1807-19.
196. Agraharam G, Saravanan N, Girigoswami A, Girigoswami K. Future of Alzheimer's Disease: Nanotechnology-Based Diagnostics and Therapeutic Approach. *BioNanoScience*. 2022;12(3):1002-17.
197. Bajad NG, Kumar A, Singh SK. Recent Advances in the Development of Near-Infrared Fluorescent Probes for the in Vivo Brain Imaging of Amyloid- β Species in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2023;14(17):2955-67.
198. Zhao X, Zhang R, Hu D, Li M, Liu Y, Xiu X, et al. Near-infrared fluorescent probes for imaging of amyloid- β at different stages in monitoring Alzheimer's disease. *Dyes and Pigments*. 2024:111993.
199. Zhou H, Mayorga-Martinez CC, Pané S, Zhang L, Pumera M. Magnetically Driven Micro and Nanorobots. *Chemical Reviews*. 2021;121(8):4999-5041.
200. Liu S, Xu D, Chen J, Peng N, Ma T, Liang F. Nanozymatic magnetic nanomotors for enhancing photothermal therapy and targeting intracellular SERS sensing. *Nanoscale*. 2023;15(31):12944-53.
201. Fountain TW, Kailat PV, Abbott JJ, editors. Wireless control of magnetic helical microrobots using a rotating-permanent-magnet manipulator. 2010 IEEE International Conference on Robotics and Automation; 2010: IEEE.
202. Hou K, Zhang Y, Bao M, Xin C, Wei Z, Lin G, et al. A Multifunctional Magnetic Red Blood Cell-Mimetic Micromotor for Drug Delivery and Image-Guided Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2022;14(3):3825-37.
203. López-Tapia A, Mares-Carreño J, Abarca-Jiménez GS, Reyes-Barranca MA. Design and Simulation of a Closed Loop Controlled Linear Displacement MEMS Micromotor, Based on a Floating Gate Transistor. *Silicon*. 2023;15(14):6047-60.

204. Diller E, Giltinan J, Sitti M. Independent control of multiple magnetic microrobots in three dimensions. *The International Journal of Robotics Research*. 2013;32(5):614-31.
205. Mahoney AW, Nelson ND, Peyer KE, Nelson BJ, Abbott JJ. Behavior of rotating magnetic microrobots above the step-out frequency with application to control of multi-microrobot systems. *Applied Physics Letters*. 2014;104(14).
206. Giltinan J, Katsamba P, Wang W, Lauga E, Sitti M. Selectively controlled magnetic microrobots with opposing helices. *Applied Physics Letters*. 2020;116(13).
207. Patri AK, Kukowska-Latallo JF, Baker JR. Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(15):2203-14.
208. Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*. 2015;125:75-84.
209. Wallace SJ, Li J, Nation RL, Boyd BJ. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Delivery and Translational Research*. 2012;2(4):284-92.
210. Tu Y, Peng F, White PB, Wilson DA. Redox-sensitive stomatocyte nanomotors: destruction and drug release in the presence of glutathione. *Angewandte Chemie International Edition*. 2017;56(26):7620-4.
211. Aybar Tural G, Bozuyuk U, Dogan NO, Alapan Y, Akolpoglu MB, Aghakhani A, et al. Magnetic Mesoporous Janus Microrollers for Combined Chemo-and Photothermal Ablation Therapy. *Advanced Therapeutics*. 2024;7(2):2300319.
212. Ertan G, Karasulu HY, Karasulu E, Ege MA, Köse T, Güneri T. A new in vitro/in vivo kinetic correlation method for nitrofurantoin matrix tablet formulations. *Drug Development & Industrial Pharmacy*. 2000;26(7):737-43.
213. Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, Giudici M, Chotteau V, Field R, et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*. 2020;10(1):18996.
214. Andrau D, Dumanchin-Njock C, Ayral E, Vizzavona J, Farzan M, Boisbrun M, et al. BACE1-and BACE2-expressing human cells: characterization of β -amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):25859-66.
215. Jämsä A, Belda O, Edlund M, Lindström E. BACE-1 inhibition prevents the γ -secretase inhibitor evoked $A\beta$ rise in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Biomedical Science*. 2011;18(1):76.
216. Zeng H, Huang P, Wang X, Wu J, Wu M, Huang J. Galangin-induced down-regulation of BACE1 by epigenetic mechanisms in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*. 2015;294:172-81.

217. Poller B, Gutmann H, Krähenbühl S, Weksler B, Romero I, Couraud PO, et al. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *Journal of neurochemistry*. 2008;107(5):1358-68.
218. Vu K, Weksler B, Romero I, Couraud P-O, Gelli A. Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*. 2009;8(11):1803-7.
219. Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2013;10:1-17.
220. Gaudin A, Tagit O, Sobot D, Lepetre-Mouelhi S, Mouglin J, Martens TF, et al. Transport mechanisms of squalenoyl-adenosine nanoparticles across the blood-brain barrier. *Chemistry of Materials*. 2015;27(10):3636-47.
221. Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SK. Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res*. 1996;738(2):196-204.
222. Datki Z, Juhász A, Gálfi M, Soós K, Papp R, Zádori D, et al. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*. 2003;62(3):223-9.
223. Mittapelly N, Rachumallu R, Pandey G, Sharma S, Arya A, Bhatta RS, et al. Investigation of salt formation between memantine and pamoic acid: Its exploitation in nanocrystalline form as long acting injection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;101:62-71.
224. Ameen F, Siddiqui S, Kausar T, Nayeem SM, Sarwar T, Rizvi MMA, et al. Interaction of memantine with calf thymus DNA: an in-vitro and in-silico approach and cytotoxic effect on the cancerous cell lines. *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*. 2022;40(3):1216-29.
225. Saleh MA, Mohamed JMM, Ruby JJ, Kanthiah S, Alanazi YF, Majrashi KA, et al. Preparation of Memantine-Loaded Chitosan Nanocrystals: In Vitro and Ex Vivo Toxicity Analysis. *Crystals*. 2023;13(1):21.
226. Mena-Giraldo P, Orozco J. Polymeric Micro/Nanocarriers and Motors for Cargo Transport and Phototriggered Delivery. *Polymers*. 2021;13(22):3920.
227. Xiong X, Huang X, Liu Y, Feng A, Wang Z, Cheng X, et al. Azobenzene-bearing polymer engine powered organic nanomotors for light-driven cargo transport. *Chemical Engineering Journal*. 2022;445:136576.
228. Tu Y, Peng F, Sui X, Men Y, White PB, van Hest JCM, et al. Self-propelled supramolecular nanomotors with temperature-responsive speed regulation. *Nature Chemistry*. 2017;9(5):480-6.

229. Jiao J, Xu D, Liu Y, Zhao W, Zhang J, Zheng T, et al. Mini-Emulsion Fabricated Magnetic and Fluorescent Hybrid Janus Micro-Motors. *Micromachines*. 2018;9(2):83.
230. Zheng S, Wang Y, Pan S, Ma E, Jin S, Jiao M, et al. Biocompatible Nanomotors as Active Diagnostic Imaging Agents for Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Tumor Tissues In Vivo. *Advanced Functional Materials*. 2021;31(24):2100936.
231. Ren J, Hu P, Ma E, Zhou X, Wang W, Zheng S, et al. Enzyme-powered nanomotors with enhanced cell uptake and lysosomal escape for combined therapy of cancer. *Applied Materials Today*. 2022;27:101445.
232. Tanila H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 2017;97:114-8.
233. Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ. Expression of BDNF and *trkB* as a function of age and cognitive performance. *Brain Research*. 1998;812(1):200-8.
234. Zhang F, Kang Z, Li W, Xiao Z, Zhou X. Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B (BDNF/TrkB) signalling in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2012;19(7):946-9.
235. Wei Z, Liao J, Qi F, Meng Z, Pan S. Evidence for the contribution of BDNF-TrkB signal strength in neurogenesis: An organotypic study. *Neuroscience Letters*. 2015;606:48-52.
236. Xiang J, Wang Z-H, Ahn EH, Liu X, Yu S-P, Manfredsson FP, et al. Delta-secretase-cleaved Tau antagonizes TrkB neurotrophic signalings, mediating Alzheimer's disease pathologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(18):9094-102.
237. Ferrer I, Marín C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, et al. BDNF and Full-length and Truncated TrkB Expression in Alzheimer Disease. Implications in Therapeutic Strategies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1999;58(7):729-39.
238. Bai L, Zhang S, Zhou X, Li Y, Bai J. Brain-derived neurotrophic factor induces thioredoxin-1 expression through TrkB/Akt/CREB pathway in SH-SY5Y cells. *Biochimie*. 2019;160:55-60.
239. Nishida Y, Adati N, Ozawa R, Maeda A, Sakaki Y, Takeda T. Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase- and TRKB-mediated signalling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *BMC Research Notes*. 2008;1(1):95.
240. Ruiz-León Y, Pascual A. Induction of tyrosine kinase receptor b by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human sh-sy5y neuroblastoma cells. *Neuroscience*. 2003;120(4):1019-26.
241. Olivieri G, Otten U, Meier F, Baysang G, Dimitriadis-Schmutz B, Müller-Spahn F, et al. β -amyloid modulates tyrosine kinase B receptor expression in SHSY5Y

neuroblastoma cells: influence of the antioxidant melatonin. *Neuroscience*. 2003;120(3):659-65.

242.Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R. Differential Gene Up-Regulation by Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Hypoxia-Inducible Factor-2 α in HEK293T Cells. *Cancer Research*. 2005;65(8):3299-306.

243.Leopoldino AM, Squarize CH, Garcia CB, Almeida LO, Pestana CR, Polizello ACM, et al. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;363(1):65-74.

244.Jiang P, Ren L, Zhi L, Hu X, Xiao R-P. Protocol for cell preparation and gene delivery in HEK293T and C2C12 cells. *STAR Protocols*. 2021;2(3):100497.

245.Sudarshan K, Boda AK, Dogra S, Bose I, Yadav PN, Aidhen IS. Discovery of an isocoumarin analogue that modulates neuronal functions via neurotrophin receptor TrkB. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019;29(4):585-90.

246.Decourt B, Sabbagh MN. BACE1 as a potential biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;24 Suppl 2(Suppl 2):53-9.

247.Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*. 2012;414:171-8.

248.Hu X, Zhou X, He W, Yang J, Xiong W, Wong P, et al. BACE1 Deficiency Causes Altered Neuronal Activity and Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(26):8819-29.

249.Das B, Yan R. Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Translational Neurodegeneration*. 2017;6(1):23.

250.Vassar R. BACE1 inhibition as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Journal of Sport Health Science*. 2016;5(4):388-90.

251.Rice O, Surian A, Chen Y. Modeling the blood-brain barrier for treatment of central nervous system (CNS) diseases. *Journal of Tissue Engineering*. 2022;13:204173.

252.Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016;36(5):862-90.

253.Lombardo SM, Schneider M, Türeli AE, Günday Türeli N. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2020;11:866-83.

254.Xie J, Shen Z, Anraku Y, Kataoka K, Chen X. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials*. 2019;224:119491.

255. Shan S, Zhang Y, Zhao H, Zeng T, Zhao X. Polystyrene nanoplastics penetrate across the blood-brain barrier and induce activation of microglia in the brain of mice. *Chemosphere*. 2022;298:134261.
256. Markoutsas E, Papadia K, Giannou AD, Spella M, Cagnotto A, Salmona M, et al. Mono and Dually Decorated Nanoliposomes for Brain Targeting, In Vitro and In Vivo Studies. *Pharmaceutical Research*. 2014;31(5):1275-89.
257. Zhang L, Zhang S, Maezawa I, Trushin S, Minhas P, Pinto M, et al. Modulation of mitochondrial complex I activity averts cognitive decline in multiple animal models of familial Alzheimer's Disease. *EBioMedicine*. 2015;2(4):294-305.
258. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-21.
259. Nemutlu E, Zhang S, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by 18O-assisted ³¹P NMR and mass spectrometry. *Physiological Genomics*. 2012;44(7):386-402.
260. Shulaev V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*. 2006;7(2):128-39.
261. Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, et al. Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med*. 2017;14(3):e1002266.
262. Klosinski LP, Yao J, Yin F, Fonteh AN, Harrington MG, Christensen TA, et al. White Matter Lipids as a Ketogenic Fuel Supply in Aging Female Brain: Implications for Alzheimer's Disease. *EBioMedicine*. 2015;2(12):1888-904.
263. Macdonald JA, Murugesan N, Pachter JS. Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. *Journal of Neuroscience Research*. 2010;88(7):1457-74.
264. Miyata S, Morita S. A new method for visualization of endothelial cells and extravascular leakage in adult mouse brain using fluorescein isothiocyanate. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011;202(1):9-16.
265. Willis CL. Imaging In Vivo Astrocyte/Endothelial Cell Interactions at the Blood–Brain Barrier. In: Milner R, editor. *Astrocytes: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 515-29.
266. Hoffmann A, Dege T, Kunze R, Ernst A-S, Lorenz H, Böhler L-I, et al. Early Blood–Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke Initiates Multifocally Around Capillaries/Venules. *Stroke*. 2018;49(6):1479-87.
267. Almeida JPM, Chen AL, Foster A, Drezek R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;6(5):815-35.

268. Liu Z, Cai W, He L, Nakayama N, Chen K, Sun X, et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature Nanotechnology*. 2007;2(1):47-52.
269. Salimi M, Sarkar S, Fathi S, Alizadeh AM, Saber R, Moradi F, et al. Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB/c mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2018;13(null):1483-93.
270. Yang K, Wan J, Zhang S, Zhang Y, Lee S-T, Liu Z. In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano*. 2011;5(1):516-22.
271. Vergoni AV, Tosi G, Tacchi R, Vandelli MA, Bertolini A, Costantino L. Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009;5(4):369-77.
272. Kulkarni PV, Roney CA, Antich PP, Bonte FJ, Raghu AV, Aminabhavi TM. Quinoline-n-butylcyanoacrylate-based nanoparticles for brain targeting for the diagnosis of Alzheimer's disease. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2010;2(1):35-47.

8. EKLER

EK-1:Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.
İsrb 21. Cadde 520. Sokak 2/2
Yenimahalle/Ankara
Tel:0312) 394 70 94
Fax:0312) 394 70 94

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	365
	Protokol Adı	Nörodejeneratif Hastalıklara Yönelik Memantin Yüklü Nanosistemlerin Tasarlanması, Optimizasyonu Ve Değerlendirilmesi
	Başvuru Tarihi	18.03.2019
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. HAKAN EROĞLU
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof.Dr. Hakan Eroğlu Prof.Dr. Güneş Esendağlı Prof.Dr. R.Neslihan Gürsoy Doç.Dr.Filiz Kuralay Doç. Dr. Emirhan Nemutlu Dr. Ecz. Selin Seda Timur Ecz. Gizem Tezel Prof. Dr. Levent Öner Prof. Dr. Kezban Ulubayram
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	365
	Onay Tarihi	21.03.2019
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	BALB/C Fare-12 Adet
	Onay Bilgileri	Proje Amaç, Gerekçe, Yaklaşım Ve Yöntem Yönünden İncelenmiş Çalışmanın Gerçekleşmesinde etik Sakınca Bulunmadığına Karar Verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	
	Etik Kurul Üyesi Sorumlu Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Biyolog Uygur SAÇIK	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem Yöyen ERMIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	

EK-2: Dijital Makbuz ve Orijinallik Raporu



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gizem Tezel
 Ödev başlığı: NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARA YÖNELİK MEMANTİN YÜK...
 Gönderi Başlığı: NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARA YÖNELİK MEMANTİN YÜK...
 Dosya adı: Gizem_TEZEL_tez_14052024_final_-_turnitin.docx
 Dosya boyutu: 9.09M
 Sayfa sayısı: 196
 Kelime sayısı: 41,377
 Karakter sayısı: 291,306
 Gönderim Tarihi: 15-May-2024 12:19ÖÖ (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2379489306



NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARA YÖNELİK MEMANTİN YÜKLÜ NANOSİSTEMLERİN TASARLANMASI, OPTİMİZASYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 10	% 9	% 3	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	repositorio.ufba.br İnternet Kaynağı	<% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

Submitted to Hacettepe University

/ *Review*

A Snapshot on the Current Status of Alzheimer's Disease, Treatment Perspectives, *in-Vitro* and *in-Vivo* Research Studies and Future Opportunities

Gizem Tezel,^a Selin Seda Timur,^a İsmail Bozkurt,^b Ö. Faruk Türkoğlu,^c İpek Eroğlu,^d Emirhan Nemitlu,^e Levent Öner,^a and Hakan Eroğlu^{*a}

^aDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey; ^bDepartment of Neurosurgery, Çankırı State Hospital, Çankırı 13000, Turkey;

^cDepartment of Neurosurgery, Ankara Atatürk Research and Education Hospital, Bilkent, Ankara 06800, Turkey; ^dDepartment of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Hacettepe

University, Ankara 06100, Turkey; and ^eDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy,

Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey.

Received June 19, 2019; accepted July 16, 2019; advance publication released online July 24, 2019

Alzheimer's Disease (AD) is one of the most challenging diseases faced by humankind. AD is still not classified as curable because of the complex structure of pathologies underlying it. As the mean life expectancy of the world population constantly increases, the prevalence of AD and treatment costs for AD also grow rapidly. Current state of the art for AD treatment mainly consists of palliative therapy aimed at providing symptomatic relief and improving the standard of living in patients with AD. However, different research groups are working on more effective and safe drug delivery options aimed at both symptomatic relief and treatment of the underlying mechanisms. In this review, the current prevalence of AD, health costs, pathologies, and available treatment options including the ones in the market and/or under trial have been reviewed. Data in the existing literature have been presented, and future opportunities have been discussed. It is our belief that these nanotechnological products provide the required efficacy and safety profiles to enable these formulations go through phase studies and enter the market after regulatory authority approval, as with cancer. Last, but not the least the metabolomic studies will be providing useful informative data on the early diagnosis of AD, thus may be clinical implications might be delayed with the administration of therapeutic agents at the initial state of the disease.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid- β peptide; tau; neurodegeneration; metabolomics; cell culture

1. Snapshot on the Current Status of Alzheimer's Disease

The primary cause of Alzheimer's Disease (AD) is still not known, although there are a few hypotheses on how to treat the disease. Several research groups are working on a spectrum of new ideas and treatment opportunities. However, they still lack a complete and standardized operational procedure for AD. Most of the drugs currently in the market for treatment of AD are used only for symptomatic relief or recovery.

AD is one of the most frequently occurring diseases, especially in those over 60 years. It is a neurodegenerative disease of the central nervous system, and is mainly classified under dementia.¹⁾ Dementia, in general terms, is a disorder that is mainly characterized by cognitive decline, including symptoms such as impairments in learning and memory, language, executive function, complex attention, perceptual-motor skills, and social cognition. These domains have been revised in The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) in 2013 to rename dementia as a *major*

neurocognitive disorder. Although AD is the leading cause of dementia, accounting for 60–80% of cases, the revised definition allows the diagnosis of dementia arising from other causes including dementia with Lewy bodies (DLB), frontotemporal dementia (FTD), vascular (multi-infarct) dementia (VaD) and Parkinson's disease with dementia (PDD).²⁾ As the global population is aging constantly and the mean life duration is increasing, there is a parallel increase in the prevalence of the AD. Therefore, the need to understand the background mechanisms of AD and its treatment opportunities is vital for humankind. Currently, 35.6 million patients suffer from dementia and/or AD.³⁾ It has been forecasted that the number of patients with dementia will double over the next 20 years.^{4,5)} This will result in the number of patients with dementia increasing to 65.7 million in 2030 and 115.4 million in 2050. It is expected that the greatest increase in AD diagnoses will be in highly developed countries, due to the higher life expectancy and income of citizens in these countries. These patients will be in need of professional health care that will

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: ehakan@hacettepe.edu.tr

EK-4: Tez Kapsamında Üretilen Yayın 2

JOURNAL OF DRUG TARGETING
2021, VOL. 29, NO. 1, 29–45
<https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1797052>



REVIEW ARTICLE



Current status of micro/nanomotors in drug delivery

Gizem Tezel^a, Selin Seda Timur^a, Filiz Kuralay^b, R. Neslihan Gürsoy^a, Kezban Ulubayram^c, Levent Öner^a and Hakan Eroğlu^a

^aDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey; ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Hacettepe University, Ankara, Turkey; ^cDepartment of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Synthetic micro/nanomotors (MNM) are novel, self-propelled nano or microscale devices that are widely used in drug transport, cell stimulation and isolation, bio-imaging, diagnostic and monitoring, sensing, photocatalysis and environmental remediation. Various preparation methods and propulsion mechanisms make MNMs “tailormade” nanosystems for the intended purpose or use. As the one of the newest members of nano carriers, MNMs open a new perspective especially for rapid drug transport and gene delivery. Although there exists limited number of *in-vivo* studies for drug delivery purposes, existence of *in-vitro* supportive data strongly encourages researchers to move on in this field and benefit from the manoeuvre capability of these novel systems. In this article, we reviewed the preparation and propulsion mechanisms of nanomotors in various fields with special attention to drug delivery systems.

ARTICLE HISTORY

Received 9 May 2020
Revised 1 July 2020
Accepted 14 July 2020

KEYWORDS

Micro/nanomotor; propulsion; drug delivery; nanotechnology; biodegradation

1. Introduction

In the last decades, nanotechnology offers many additional benefits in the area of drug delivery in terms of efficacy and precision as compared to conventional treatment. In this era, many novel drug delivery systems such as polymeric nanoparticles (NPs) [1], liposomes [2], micelles [3], nanofibers [4], nanocrystals [5], nanoemulsions [6], solid lipid nanoparticles [7] and dendrimers [8,9] were reported to show promising results when it comes to solving unmet medical needs in many diseases. In addition to NPs, liposomes are the other promising reflections of nanotechnology in drug delivery era due to the existence of approved liposomal formulations in the market for many years. The unique structure of liposomes makes them desirable in the field of theragnostic, drug delivery, food industry as well as cosmetics [10–12]. Another significant tool in nanomedicine is nanoparticles (NPs); they provide many benefits in terms of improved pharmacokinetic (PK), safety, efficacy, and drug targeting when they are included in drug formulations [13]. The particle shape, size, and surface chemistry of NPs have significant importance in determining PK criteria, such as adsorption, cellular uptake, biodistribution patterns, and clearance mechanisms.

Although nanotechnology products are novel systems, many of them are currently in the market after the necessary regulatory approval for human use was obtained. Nanotechnology concept in this field was firstly defined in the late 1960s [14]. In a broad sense, nanomedicine can be classified under 3 major groups as nanopharmaceuticals, nanoimaging agents, and nanotheragnostics [15]. Since 1995, more than 50 nanopharmaceuticals have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and these are now available for clinical use (Table 1). Most of the approved nanodrugs have demonstrated attenuated toxicity rather than improved efficacy when compared to conventional

formulations [15]. Nanotechnology brings many advantages with respect to conventional drug delivery systems: *i*-materials and carriers prepared in nanoscale seem to be very advantageous and promising in diagnosis and treatment of diseases *via* targeted drug delivery and immunotherapy, *ii*- it provides opportunity to work with proteins, genes and cellular structures in the field of biotechnology and *iii*- diagnosis and treatment including the improvement of body's natural physiological functions using molecular machine systems and nanomotors at chromosomal level could be achieved [16].

Nanotechnology-based systems target tissues and cells with enhanced efficacy while reducing side effects. For this purpose, a wide range of nanotechnology-based systems have been developed and designed for drug delivery applications. These systems significantly increase the therapeutic efficacy of active pharmaceutical ingredients (API) that are loaded in nanoparticles by allowing longer systemic circulation life-time, enhanced solubility of poorly water-soluble drugs, combination and co-delivery of two or more APIs and/or imaging agents within the same delivery system as well as controlled or triggered release of the loaded cargo [19]. As mentioned earlier, one of the major limitations in conventional drug delivery systems is the lack of power to cell/tissue penetration and motion controllability. In order to achieve such active or passive targeting and deliver the cargo to predetermined locations in the body, next generation of drug delivery vehicles may be needed to integrate their movement and navigation capabilities [20,21]. In this regard, micro/nanomotors in drug delivery systems has been gaining much attention.

Man-made synthetic micro/nanomotors (MNM) are one of the newest nanotechnology systems that have been introduced within the last decade [19,22]. Since MNMs have a wide range of applications, they have become the centre of focus in pharmaceutical research [23]. MNMs are defined as micro/nanoscale devices that

CONTACT Hakan Eroğlu ehakan@hacettepe.edu.tr Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Nano4DD Research Group, Hacettepe University, Sıhhiye-Ankara, Turkey

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

EK-5: Tez Kapsamında Üretilen Yayın 3

Journal of Drug Delivery Science and Technology
Preparation and In Vitro Characterization of Memantine HCl Loaded PLGA Nanoparticles for Alzheimer's Disease
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Alzheimer's disease; memantine HCl; PLGA nanoparticles; drug delivery; LC-MS/MS; TPGS
Corresponding Author:	HAKAN EROGLU Hacettepe University Faculty of Pharmacy Ankara, Turkey
First Author:	HAKAN EROGLU, Prof.Dr.
Order of Authors:	HAKAN EROGLU, Prof.Dr. Gizem TEZEL Sıla ULUTÜRK Tuba REÇBER, Assistant Professor Selin Seda TİMUR, Associate Professor Emirhan NEMUTLU, Prof.Dr. Güneş ESENDAĞLI, Prof.Dr. Sıla GÜLBAĞ PINAR, Assistant Professor
Abstract:	<p>Alzheimer's disease (AD) is a form of dementia marked by neuronal damage and the buildup of abnormal proteins like beta-amyloid and phosphorylated tau. PLGA (Poly (lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles serve as extensively employed drug delivery platforms, known for their biocompatibility, biodegradability, sustained drug release, and targeted delivery capabilities. Leveraging PLGA nanoparticle formulations as targeted drug carriers in AD treatment can significantly impact disease management and progression control.</p> <p>In the present study, memantine (MEM) loaded PLGA nanoparticle formulations were prepared by double emulsion method, optimized, and characterized for the treatment of AD. A novel LC-MS/MS method was developed by our group and was used to analyze MEM-loaded formulations. The characterization of MEM-loaded PLGA nanoparticles included analyses of morphology, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency, and in vitro release. Particle size optimization parameters, including MEM concentration, PLGA concentration, surfactant concentration, and sonication time were tested. In-vitro drug release studies were conducted for two different formulations that contained two different surfactants. D-α-tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) was used as an alternative surfactant to polyvinyl alcohol (PVA).</p> <p>The studies have shown that encapsulation of highly water-soluble drug molecules depended on surfactant type and concentration, polymer concentration and drug molecule concentration. The TPGS-containing formulation had higher encapsulation efficiency (EE) which was $55\pm 5.6\%$. The same formulation also had higher in vitro drug release which was approximately 25%. The morphological analysis of nanoparticles across all formulations revealed their spherical shape. Cytotoxicity evaluation was conducted using the MTT assay with the SH-SY5Y cell line, indicating a maximum cytotoxicity of $74.94\pm 7.7\%$ following a 48-hour incubation period. In vitro characterization studies demonstrated that formulations loaded with MEM could provide targeted and sustained drug delivery for Alzheimer's disease treatment without inducing cytotoxic effects.</p>
Suggested Reviewers:	

EK-6: Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Patent Başvurusu



PATENT BAŞVURUSU			
Tahakkuk No		Başvuru Numarası	2022/019723
Evrak Numarası		Evrak Tarihi	19.12.2022 17:54:13
Erken Yayın Talebi	Hayır, başvurum 18 aylık süre dolduktan sonra yayımlansın.	Başvuru ile Birlikte Araştırma/ İnceleme Talebi	Araştırma
Tarifname Dili	Türkçe	Genetik Kaynak	Hayır
Tarifname Sayfa Sayısı	6	Kaynağın / Bilginin Coğrafi Kökeni	-
İstem Sayısı	8	Kamu Desteği	Evet
Resim Sayfa Sayısı	2	Destek Sağlayan Kamu Kurumu	TÜBİTAK
Patent Sınıfı	-	Proje Numarası	
Referans No	P22-1147		

BULUŞ BAŞLIĞI / ÖZETİ	
Buluş Başlığı	NÖROPROTEKTİF ETKİN MADDE YÜKLENMİŞ NANOMOTOR FORMÜLASYONLARI
Buluş Özeti	Buluş, farmasötik etkin madde yüklenmiş amino grubu içeren polimer tabakası ve manyetik alan ile yönlendirme için metal tabaka içeren nanomotor ile ilgilidir.

BAŞVURU SAHİPLERİ			
Ad Soyad/Unvan	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ	Sahip Türü	Tüzel
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hak Oranı	
Uyruk		E-Posta	
Telefon			

BULUŞ SAHİPLERİ			
Ad Soyad/Unvan		Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			
Ad Soyad/Unvan		Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			
Ad Soyad/Unvan	GİZEM TEZEL	Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			
Ad Soyad/Unvan		Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			
Ad Soyad/Unvan		Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			
Ad Soyad/Unvan		Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			
Ad Soyad/Unvan		Gizlilik Beyanı	Hayır
TC Kimlik/Vergi No		Başvuru Hakkı Beyanı	Hizmet İlişkisi
Uyruk		E-Posta	
Telefon			

9. ÖZGEÇMİŞ