



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ALZHEİMER TEDAVİSİNE YÖNELİK İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
KARAKTERİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Gizem Rüya TOPAL

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER TEDAVİSİNE YÖNELİK İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
KARAKTERİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Gizem Rüya TOPAL

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 18L0237011 numaralı projesi ve TÜBİTAK'ın 119S124 numaralı 1001 projesi ile desteklenmiştir.

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Alzheimer Tedavisine Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Etkinliğinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gizem Rüya TOPAL
Tarih: 20/04/2021
İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Gizem Rüya TOPAL tarafından hazırlanan
“Alzheimer Tedavisine Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi,
Karakterizasyonu ve Etkinliğinin İncelenmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ
ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/04/2021

Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. İmran VURAL
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Burcu DEVRİM
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	xii
Simgeler ve Kısaltmalar	xiv
Şekiller	xvi
Çizelgeler	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı	3
1.1.1. Hastalık İçin Risk Faktörleri	4
1.1.2. Hastalığın Fizyopatolojisi	4
1.1.2.1. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Hipotezi	5
1.1.2.2. Tau Hipotezi	6
1.1.2.3. Kolinerjik Hipotez	7
1.1.3. Hastalığın Genetik Boyutu	8
1.1.3.1. Ailesel/Erken Başlangıçlı	8
1.1.3.2. Sporadik/Geç Başlangıçlı	9
1.1.4. Hastalıkta Tedavi Yöntemleri	10
1.1.4.1. AH'ye Karşı Günümüzdeki Tedavi Yaklaşımları	10
1.1.4.1.1. Tedavide Görülen Yan Etkiler	11
1.1.4.2. AH'de Yeni Tedavi Yaklaşımları	12
1.2. Kan-Beyin Engeli (KBE)	13
1.2.1. Kan-Beyin Engelinden Geçiş ve Geçiş ile İlgili Mekanizmalar	15
1.2.2. Kan-Beyin Engelinden Geçiş Artırmak İçin Geliştirilen Stratejiler	20
1.3. Kan-Beyin Engelinden Geçiş Artırmak İçin Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler	25
1.3.1. Nanopartiküller	27
1.3.2. Katı Lipit Nanopartiküller (SLN)	28
1.3.2.1. Katı Lipit Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri	30
1.4. Katı Lipit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	32
1.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	32
1.4.2. Zeta Potansiyeli	33

1.4.3. Etken Madde Yükleme Kapasitesi	34
1.4.4. İn Vitro Salım (Çözünme Hızı)	35
1.4.5. Morfolojik İnceleme	36
1.4.6. Termal İnceleme	36
1.4.7. Sterilizasyon	37
1.4.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	37
1.4.9. Stabilite	38
1.5. Etken Madde	38
1.5.1. Donepezil HCl	38
1.5.2. Humanin	42
1.6. Hedeflendirme İçin Kullanılan Ajanlar	45
1.6.1. Transferrin	46
1.6.2. Apo-E	47
1.7. Yapısal Bütünlük Çalışmaları	48
1.7.1. Sirküler Dikroizm (CD) Analizi	48
1.7.2. Native-PAGE	49
1.8. Hücresel Çalışmalar	49
1.8.1. MTT Canlılık Testi	50
1.8.2. Empedans Ölçümü ile Canlılık Testi	51
1.8.3. Hücresel Alım Çalışmaları	51
1.9. Zebra Balıkları ile İn Vivo AH Modeli Çalışmaları	54
2. GEREÇ VE YÖNTEM	57
2.1. Gereçler	57
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	57
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	59
2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	60
2.1.4. Kullanılan Deney Hayvanları	61
2.2. Yöntemler	62
2.2.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	62
2.2.1.1. Humanin ve Donepezil HCL'in FTIR Spektrumu	62
2.2.1.2. Humanin ve Donepezil HCL'in Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi	62
2.2.1.3. Donepezil HCL'in Ultra Viyole (UV) Spektrumu	62
2.2.1.4. Humanin Yapısal Analizi İçin Sirküler Dikroizm (CD) Yöntemi	63

2.2.1.5. Etken Maddelerin Çeşitli Analitik Yöntemler ile Miktar Tayinlerinin Yapılması ve Kalibrasyonları	63
2.2.1.5.1. Humanin'in Spektroflorometri Yöntemi ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu	63
2.2.1.5.2. Donepezil HCL'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu	64
2.2.1.6. Etken Maddeler İçin Çizilen Kalibrasyon Doğrularının İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu	65
2.2.1.6.1. Doğrusallık ve Aralığı	65
2.2.1.6.2. Doğruluk ve Geri Elde	65
2.2.1.6.3. Kesinlik	66
2.2.1.6.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	67
2.2.1.6.5. Seçicilik	67
2.3. Katı Lipit Nanopartiküllerin (SLN) Hazırlanması	68
2.4. Hazırlanan Katı Lipit Nanopartiküller İçin Formülasyon Çalışmaları	69
2.4.1. Donepezil HCl Yüklü SLN'ler İçin Ön Formülasyon Çalışmaları	69
2.4.2. Donepezil HCl Yüklü SLN'ler İçin Formülasyon Çalışmaları	72
2.4.3. Humanin Yüklü SLN'ler İçin Ön Formülasyon Çalışmaları	75
2.4.4. Humanin Yüklü SLN'ler İçin Formülasyon Çalışmaları	77
2.5. Katı Lipit Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller	77
2.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması	77
2.5.2. Hazırlanan Formülasyonlarda Donepezil HCl ve Humanin Miktar Tayini	77
2.5.3. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	79
2.5.4. Zeta Potansiyel Ölçümü	79
2.5.5. Geliştirilen Katı Lipit Formülasyonunun Tekrarlanabilirliğinin Tayin Edilmesi	80
2.5.6. Çözünme Hızı Deneyi	80
2.5.7. Hazırlanan Humanin Yüklü SLN Formülasyonlarında Humanin'in Yapısal Bütünlük Kontrolü	81
2.5.7.1. Native-PAGE Analizi	81
2.5.7.2. CD Analizi	81
2.6. Formülasyon Seçimi	82
2.7. Seçilen SLN'lerin Apo-E ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılması	82
2.7.1. Apo-E'nin SLN Yüzeyine Bağlanma Etkinliğinin Tayini	83
2.8. Seçilen SLN'lerin Transferrin ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılması	84
2.8.1. Transferrinin SLN'ler Üzerine Bağlanma Etkinliğinin Tayini	85

2.9. Yüzey Modifikasyonu Yapılan Partiküller İçin Yapılan Kontroller	85
2.11. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	86
2.12. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	86
2.13. Stabilite Çalışmaları	87
2.13.1. +4°C’de Yapılan Stabilite Çalışmaları	87
2.13.2. 25°C’de Yapılan Stabilite Çalışmaları	87
2.13.3. Kolloidal Stabilite Çalışmaları	87
2.14. Hücre Kültürü Çalışmaları	88
2.14.1. Hücrelerin Çoğaltılması	88
2.14.2. Sitotoksosite Çalışmaları	88
2.14.2.1. MTT Çalışmaları	88
2.14.2.2. Empedans Ölçümü ile Hücre Canlılığı Tayini	89
2.14.3. Hücresel Alım Çalışmaları	89
2.14.4. İn Vitro Kan-Beyin Engeli Modelinden Geçiş Çalışmaları	90
2.14.4.1. Üçlü KBE Ortak Hücre Kültürü Modelinin Oluşturulması	90
2.14.4.2. İn Vitro KBE Modelinde Geçişin Değerlendirilmesi	91
2.15. Zebra Balıkları ile Yürütülen İn Vivo Çalışmalar	91
2.15.1. Sitotoksosite Çalışması	92
2.15.2. Beyine Geçiş Çalışması	92
2.16. İstatiksel Analiz	93
3. BULGULAR	94
3.2. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesine Dair Bulgular	94
3.2.1. Humanin ve Donepezil HCl’in FTIR Spektrumlarına Ait Bulgular	94
3.2.2. Humanin ve Donepezil HCl’in DSC Analizlerine Dair Bulgular	95
3.2.3. Donepezil HCl’in UV Spektrumuna Dair Bulgular	96
3.2.4. Humanin’in Yapısal Bütünlüğünün Sirküler Dikroizm ile Belirlenmesine Dair Bulgular	97
3.2.5. Etken Maddelerin Miktar Tayinleri için Kullanılan Analitik Yöntemlerin Kalibrasyonlarına Ait Bulgular	98
3.1.5.1. Humanin İçin Kullanılan Spektroflorometri Yönteminin Kalibrasyonuna Ait Bulgular	98
3.1.5.2. Donepezil HCl için Kullanılan HPLC Yönteminin Kalibrasyonuna Ait Bulgular	99
3.2.6. Donepezil HCl için Kullanılan HPLC Yönteminin Kalibrasyonuna Ait İstatiksel Veriler ve Analitik Validasyon Sonuçları	101

3.1.6.1. Doğrusallık ve Aralığı	101
3.6.1.2. Doğruluk ve Geri Elde	103
3.1.6.3. Kesinlik	104
3.1.6.3.1. Tekrarlanabilirlik	104
3.1.6.3.2. Ara Kesinlik	105
3.1.6.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	107
3.1.6.5. Seçicilik	108
3.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	108
3.2.1. Donepezil HCl Yüklü SLN'lerin Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	108
3.2.2. Donepezil HCl Yüklü SLN'lerin Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	111
3.2.2.1. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Yağ Konsantrasyonunun Etkisi	114
3.2.2.2. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Su fazı Hacminin Etkisi	115
3.2.2.3. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Karıştırma Hızının Etkisi	116
3.2.2.4. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Etken Madde Miktarı ve Eklenişinin Etkisi	117
3.2.2.5. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Eklenen Lesitin Etkisi	118
3.2.2.6. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Farklı Sürfaktanların Etkisi	119
3.2.2.7. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Sürfaktan Miktarının Etkisi	120
3.2.2.8. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Karıştırma Hızının Etkisi	121
3.2.2.9. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Sonikasyon Süresinin Etkisi	122
3.2.3. Humanin Yüklü SLN'lerin Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	123
3.2.4. Humanin Yüklü SLN'lerin Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	123
3.3. Çözünme Hızı Deneyi	126
3.4. Formülasyon Seçimi	128
3.5. Hazırlanan Formülasyonların Tekrarlanabilirliği	128
3.6. Seçilen Optimum Formülasyonların Apo-E ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılmasının Ardından Apo-E Bağlanma Etkinliği	131
3.7. Seçilen Optimum Formülasyonların Transferrin ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılmasının Ardından Tf Bağlanma Etkinliği	132
3.8. Yüzey Modifikasyonları Yapılan SLN'lere İlişkin Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	133
3.9. Hazırlanan Humanin Yüklü Formülasyonlarda Humanin'in Yapısal Bütünlük Kontrolü	135
3.10. Nanopartiküllerde Etken Madde-Lipit Etkileşimi Tayini	136
3.10.1. FTIR Spektrumları	136

3.10.2. DSC Termogramları	139
3.11. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	141
3.12. Stabilité Çalışmaları	142
3.12.1. +4°C’de Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmaları	142
3.12.2. 25°C’de Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmaları	143
3.12.3. Kolloidal Stabilité Çalışmaları	144
3.13. Hücre Kültürü Çalışmalarına Dair Bulgular	147
3.13.1. Sitotoksité Çalışmaları	147
3.13.1.1.MTT Çalışmalarına Dair Bulgular	147
3.13.1.2.Empedans Ölçümü Çalışmalarına Dair Bulgular	150
3.13.2. Hücresel Alım Çalışmaları	151
3.13.3. İn Vitro Kan Beyin Engeli Modelinde Geçiş Çalışmaları	152
3.14. İn Vivo Çalışmalara Dair Bulgular	153
3.14.1. Sitotoksité Çalışmalarına Ait Bulgular	153
3.14.2. Beyine Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular	153
4. TARTIŞMA	157
4.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine İncelemeler	157
4.1.1. Humanin ve Donepezil HCL’in FTIR Spektrumu	157
4.1.2. Humanin ve Donepezil HCL’in DSC Analizi	158
4.1.3. Donepezil HCL’in UV Spektrumu	158
4.1.4. Miktar Tayininin ve Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi	159
4.1.4.1. Humanin İçin Miktar Tayininin Değerlendirilmesi	159
4.1.4.2. Donepezil HCL’in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayininin ve Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi	160
4.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	161
4.2.1. Donepezil HCL ile Hazırlanan SLN’lerde Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	162
4.2.2. Donepezil HCL ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	164
4.2.2.1. Donepezil HCL ile Hazırlanan SLN’lere Yağ Konsantrasyonunun Etkisi	164
4.2.2.2. Donepezil HCL ile Hazırlanan SLN’lere Su Fazı Hacminin Etkisi	164
4.2.2.3. Donepezil HCL ile Hazırlanan SLN’lere Karıştırma Hızının Etkisi	165
4.2.2.4. Donepezil HCL ile Hazırlanan SLN’lere Etken Madde Miktarı ve Eklenişinin Etkisi	166

4.2.2.5. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Lesitin Etkisi	167
4.2.2.6. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Farklı Sürfactanların Etkisi	168
4.2.2.7. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Sürfactan Miktarının Etkisi	169
4.2.2.8. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Sürfactan Miktarı Değiştikten Sonra Karıştırma Hızının Etkisi	170
4.2.2.9. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Sonikasyon Süresinin Etkisi	170
4.2.3. Humanin ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	171
4.3. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi	173
4.4. Uygun Formülasyonların Seçimi	175
4.5. Tekrarlanabilirlik Çalışmalarına Dair Bulguların Değerlendirilmesi	175
4.6. Seçilen Optimum Formüllerin Apo-E ile Yüzey Modifikasyonu ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi	175
4.7. Seçilen Optimum Formüllerin Tf ile Yüzey Modifikasyonu ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi	177
4.8. Humanin Yüklenen Formüllerde Yapısal Bütünlüğün Değerlendirilmesi	178
4.9. Formülasyonlarda Yürütülen DSC Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	179
4.10. Formülasyonlarda Yürütülen FTIR Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	180
4.11. Hazırlanan SLN'lerin TEM Görüntülerinin Değerlendirilmesi	181
4.12. Formülasyonlarda Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmalarının Değerlendirilmesi	181
4.12.1. +4°C'de Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmalarından Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	181
4.12.2. 25°C'de Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmalarından Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	182
4.12.3. Kolloidal Stabilité Çalışmalarından Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	182
4.13. Formülasyonlarda Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi	183
4.13.1. Sitotoksité Bulgularının Değerlendirilmesi	183
4.13.2. Hücresel Alım Bulgularının Değerlendirilmesi	185
4.13.3. Kan Beyin Engeli Modelinden Geçiş Çalışmalarında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	186
4.14. Formülasyonlarda Gerçekleştirilen İn Vivo Çalışmaların Değerlendirilmesi	186
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	188

ÖZET	191
SUMMARY	192
KAYNAKLAR	193
EKLER	216
Ek-1: Etik Kurul Kararı	216
ÖZGEÇMİŞ	217



ÖNSÖZ

Bu tez kapsamında Humanin ve Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonları geliştirilmiş, bu formülasyonlar Apo-E ve Tf ile beyine hedeflendirilerek in vitro ve in vivo olarak değerlendirilmiştir. Böylece hem etken maddelere bağlı yan etkilerin azalması hem de biyoyararlanımın artması ve hastalığa alternatif bir tedavi yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, lisanüstü eğitimim boyunca tecrübesi ve bilgisiyle bana her daim yol gösterici olan, çalışkanlığına ve azmine hayran olduğum çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımı aksatmadan devam ettirebilmem için imkan sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR'e,

Lisans eğitimime başladığım günden itibaren mesleki birikimime sağladıkları katkılar ve tez çalışmam sırasındaki yardımları için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın sayın öğretim üyelerine,

Tez çalışmam sırasında ilgilerini, güleryüzlerini ve desteklerini eksik etmeyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eczacılık Fakültesi'nin değerli öğretim elemanları ve çalışanlarına, özellikle Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve elemanlarına,

Tez çalışmama başladığım günden itibaren karşılaştığım problemlerde yanımda olan ve yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN ve Dr. Ecz. Umut Can ÖZ'e,

Tez çalışmamın Humanin ile ilgili bölümünü 119S124 no'lu araştırma projesi kapsamında destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na ve 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı ve 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri İçin Doktora Burs Programı ile doktora eğitimim sürecinde beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

FTIR çalışmalarındaki yardımları için Doç. Dr. Mehmet ALP'e, Native-PAGE çalışmasındaki yardımı için Dr. Ecz. Merve DEMİRBÜGEN ÖZ'e, spektrofotometre cihazı kullanımı için Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN'a, hücre kültürü çalışmalarında yardımcı olan Prof. Dr. Maria DELİ ve Dr. Szilvia VESZELKA'ya ve in vivo çalışmaları yürüten Doç Dr. Hatice Güneş ÖZHAN BAYKAN ve Yusuf Kaan POYRAZ'a,

Bu tez çalışmasında kullanmış olduğum Donepezil HCl'in teminini sağlayan DEVA İlaç Şirketi'ne,

Bu tez çalışmasının Donepezil HCl ile ilgili bölümünü 18L0237011 nolu proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, benden manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eski iş arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bana manevi olarak destek olan tüm dostlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana olan destekleri ve güvenleri için canım annem, babam ve ağabeyime; son olarak hayatımda olduğu için çok şanslı hissettiğim, her kararında beni destekleyen ve akademik yolda ilerlememe her anlamda yardımcı olan canım eşim Ömürcan TOPAL'a hayatıma kattığı herşey için çok teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer hastalığı
ANOVA	Varyans analizi
APP	Amiloid prekürsör protein
Apo-E	Apolipoprotein E
A β	Amiloid beta
BSS	Bağıl standart sapma
CD	Sirküler Dikroizim
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DTR	Difteri toksin reseptörü
EBA	Evans blue albümin
HBMC	İnsan beyin kılcal endotel hücreleri
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HN	Humanin
IR	Kızılötesi
IV	İntravenöz
KBE	Kan-Beyin Engeli
LD	Lazer kırınımı
LDLR	Lipoprotein reseptörleri
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
LRP	Lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein
MA	Molekül ağırlığı
NFY	Nörofibriller yumaklar
NMDA	N-metil- D -aspartat
NP	Nanopartikül
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi

PI	Polidispersite indeksi
PSEN	Presenilin
RES	Retiküler endotel sistem
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLN	Katı lipit nanopartikül
SF	Sodyum floresin
SS	Standart sapma
SSS	Santral Sinir Sistemi
TEER	Transendotelyal elektrik direnci
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin reseptörleri
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Nöronal hücre ölümünü gösteren diyagram	7
Şekil 1.2. Kılcal seviyede nörovasküler bir ünitenin görünümü	15
Şekil 1.3. KBE'den geçiş mekanizmaları	17
Şekil 1.4. Beyine ilaç taşınımı için değişik yaklaşımlar	20
Şekil 1.5. Ultrasonikasyon-homojenizasyon yöntemi ile SLN üretimi	32
Şekil 1.6. Donepezil HCl kimyasal yapısı	39
Şekil 1.7. Humanin yapısı	43
Şekil 1.8. Üçlü KBE ortak hücre kültürü modeli örneği	53
Şekil 2.1. Katı lipit nanopartiküllerin üretim şeması	68
Şekil 2.2. Apo-E ile SLN modifikasyonu sırasında işlem basamakları	83
Şekil 2.3. Tf ile SLN modifikasyonu sırasında işlem basamakları	84
Şekil 2.4. Hazırlanan üçlü KBE ortak hücre kültürü modeli	90
Şekil 3.1. Donepezil HCl'e ait FTIR spektrumu	94
Şekil 3.2. Humanin'e ait FTIR spektrumu	95
Şekil 3.3. Donepezil HCl'e ait DSC termogramı	95
Şekil 3.4. Humanin'e ait DSC termogramı	96
Şekil 3.5. Donepezil HCl'in distile su içindeki UV spektrumu	96
Şekil 3.6. Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu içindeki UV spektrumu	97
Şekil 3.7. Humanin'e ait CD spektrumu	97
Şekil 3.8. Humanin'in distile sudaki kalibrasyon doğrusu	98
Şekil 3.9. Humanin'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu	99
Şekil 3.10. Donepezil HCl'in distile sudaki kalibrasyon doğrusu	100
Şekil 3.11. Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu	100
Şekil 3.12. Donepezil HCl'in distile sudaki doğrusallık grafiği	101
Şekil 3.13. Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki doğrusallık grafiği	102
Şekil 3.14. Donepezil HCl yüklü SLN'lere yağ konsantrasyonunun etkisi	114
Şekil 3.15. Donepezil HCl yüklü SLN'lere su fazı hacminin etkisi	115

Şekil 3.16. Donepezil HCl yüklü SLN'lere karıştırma hızının etkisi	116
Şekil 3.18. Donepezil HCl yüklü SLN'lere eklenen lesitinin etkisi	118
Şekil 3.19. Donepezil HCl yüklü SLN'lere farklı sürfaktanların etkisi	119
Şekil 3.20. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sürfaktan miktarının etkisi	120
Şekil 3.21. Donepezil HCl yüklü 150 mg Tween 80 içeren SLN'lere karıştırma hızının etkisi	121
Şekil 3.22. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sonikasyon süresinin etkisi	122
Şekil 3.23. Humanin yüklü SLN'lerde sonikasyon süresinin etkisi	123
Şekil 3.24. Humanin yüklü SLN'lerde farklı tamponun etkisi	124
Şekil 3.25. Humanin yüklü SLN'lerde karıştırma hızının etkisi	124
Şekil 3.26. Humanin yüklü SLN'lerde dış fazın etkisi	126
Şekil 3.27. Donepezil HCl yüklü DF1, DF10, DF13, DF14, DF26 ve Donepezil HCl'e ait salım grafikleri	127
Şekil 3.28. Humanin yüklü HF3, HF9 formülleri ve Humanin'e ait salım grafikleri	127
Şekil 3.29. DF26 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	129
Şekil 3.30. DF26 kodlu formülün zeta potansiyeli dağılımına ait grafik	129
Şekil 3.31. HF9 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	130
Şekil 3.32. HF9 kodlu formülün zeta potansiyeli dağılımına ait grafik	130
Şekil 3.33. Modifiye edilmiş formülde Apo-E'nin varlığını doğrulamak için biyotinlenmiş floresin kullanılarak yapılan florometrik test	132
Şekil 3.34. BCA yöntemi kullanılarak yapılan miktar tayininde BSA'ya ait kalibrasyon doğrusu	133
Şekil 3.35. DF26 kodlu Donepezil HCl yüklü formülden hareketle modifiye edilerek hedeflendirilen formülasyonlara ait salım grafiği	134
Şekil 3.36. HF9 kodlu Humanin yüklü formülden hareketle modifiye edilerek hedeflendirilen formülasyonlara ait salım grafiği	134
Şekil 3.37. a)HF-9 formülüne ait CD spektrumu; b) Apo-E Hum SLN'e ait CD spektrumu; c)Tf Hum SLN'e ait CD spektrumu	135
Şekil 3.38. Native-PAGE analizi; sırasıyla Humanin çözeltisi (kırmızı), Tf Hum SLN (mavi), Apo-E Hum SLN (turuncu) ve HF-9 (beyaz)	136

Şekil 3.39. a) Dynasan 116 b) Boş SLN c) DF26 d) Apo-E Don-SLN e) Tf Don SLN f) HF9 g) Apo-E Hum SLN h) Tf Hum SLN formüllerine ait FTIR spektrumları	139
Şekil 3.40. Donepezil HCl ile hazırlanan formüllere ait DSC termogramları	140
Şekil 3.41. Humanin ile hazırlanan formüllere ait DSC termogramları	140
Şekil 3.42. Hazırlanan SLN formülasyonlarına ait TEM görüntüleri	141
Şekil 3.44. 25°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulguların grafiksel gösterimi	144
Şekil 3.45. 37°C’de 24 saat süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarında saatlere göre partikül boyutu değişimi	145
Şekil 3.46. +4°C’de 1 ay süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarında zamana göre partikül boyutu değişimi	146
Şekil 3.47. RBEC hücrelerinde 2 saat inkübasyondan sonra MTT verileri	147
Şekil 3.48. hCMEC/D3 hücrelerinde 2 saat inkübasyondan sonra MTT verileri	148
Şekil 3.49. SH-SY5Y hücrelerinde 2 saat inkübasyondan sonra MTT verileri	149
Şekil 3.50. RBEC hücrelerinde 24 saatlik empedans ölçümü sonuçları	150
Şekil 3.51. hCMEC/D3 hücrelerinde 24 saatlik empedans ölçümü sonuçları	150
Şekil 3.52. RhoB ile etiketlenmiş hedefli ve hedefsiz Donepezil HCl ve Humanin yüklü SLN’lerde 2 saatlik inkübasyon sonrası RBEC hücreleri tarafından alınma miktarı	151
Şekil 3.53. RhoB ile etiketlenmiş hedefli ve hedefsiz Donepezil HCl ve Humanin yüklü SLN’lerde 2 saatlik inkübasyon sonrası hCMEC/D3 hücreleri tarafından alınma miktarı	151
Şekil 3.54. RhoB ile etiketlenmiş hedefli ve hedefsiz Donepezil HCl ve Humanin yüklü SLN’lerde 2 saatlik inkübasyon sonrası SH-SY5Y hücreleri tarafından alınma miktarı	152
Şekil 3.55. Hedefli ve hedeflendirilmemiş SLN’lerin (10 µg/mL) 2 saatlik inkübasyon sonrası KBE’den penetrasyonu	152
Şekil 3.56. Embriyolarda yapılan sitotoksikite çalışmaları	153
Şekil 3.57. SLN’lerin zebra balıklarına uygulanmasının ardından elde edilen görüntüler a) RhoB SLN b) Apo-E RhoB SLN c) Tf RhoB SLN	155
Şekil 3.58. Beyine geçiş çalışmasında elde edilen floresan yoğunlukları	156

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Günümüzde AH tedavisinde kullanılan ilaçların genel değerlendirmesi	11
Çizelge 1.2. AH'ye yönelik yeni tedavi yaklaşımları	12
Çizelge 2.1. Humanin ile yapılan floresan spektroskopisinin ölçüm parametreleri	63
Çizelge 2.2. Donepezil HCl'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar	64
Çizelge 2.3. Kritik formülasyon parametreleri	69
Çizelge 2.4. Donepezil HCl'in farklı fazlara eklendiği ve değişik yağlar kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonları	70
Çizelge 2.5. Farklı su fazları kullanılarak hazırlanan Donepezil HCl yüklü formülasyonlar	70
Çizelge 2.6. Farklı karıştırma ve sonikasyon süreleri ile hazırlanan Donepezil HCl yüklü formülasyonlar	71
Çizelge 2.7. Hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonları	73
Çizelge 2.8. Humanin yüklü formüllerde değişik tampon, etken madde ve sürfaktan miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait parametreler	76
Çizelge 2.9. Değişik yağlar ile hazırlanan Humanin yüklü formülasyonlara ait parametreler	76
Çizelge 2.10. Hazırlanan Humanin yüklü SLN formülasyonları	78
Çizelge 2.11. İn vivo deneylerde kullanılan hayvan grupları	92
Çizelge 3.1. Humanin'in kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	99
Çizelge 3.2. Donepezil HCl'in kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	100
Çizelge 3.3. Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin parametreleri	102
Çizelge 3.4. Donepezil hidroklorür'ün distile sudaki doğruluk ve geri elde bulguları	103
Çizelge 3.5. Donepezil hidroklorür'ün pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları	104
Çizelge 3.6. Donepezil hidroklorür'ün distile sudaki tekrarlanabilirlik bulguları	105

Çizelge 3.7. Donepezil hidroklorür'ün pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları	105
Çizelge 3.8. Donepezil hidroklorür'ün distile sudaki ara kesinlik bulguları	106
Çizelge 3.9. Donepezil hidroklorür'ün pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki ara kesinlik bulguları	107
Çizelge 3.10. Donepezil hidroklorür distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki miktar tayinin teşhis ve tayin sınırları	107
Çizelge 3.11. Donepezil HCl'in farklı fazlara eklendiği ve değişik yağlar kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonlarının sonuçları	108
Çizelge 3.12. Farklı su fazları kullanılarak hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonlarının sonuçları	109
Çizelge 3.13. Farklı karıştırma ve sonikasyon süreleri ile hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonlarının sonuçları	110
Çizelge 3.14. Donepezil HCL Yüklü SLN formülasyonlarına ait sonuçlar	112
Çizelge 3.15. Donepezil HCl yüklü SLN'lere yağ konsantrasyonunun etkisi	114
Çizelge 3.16. Donepezil HCl yüklü SLN'lere su fazı hacminin etkisi	115
Çizelge 3.17. Donepezil HCl yüklü SLN'lere karıştırma hızının etkisi	116
Çizelge 3.18. Donepezil HCl yüklü SLN'lere etken madde miktarı ve eklenişinin etkisi	117
Çizelge 3.19. Donepezil HCl yüklü SLN'lere eklenen lesitinin etkisi	118
Çizelge 3.20. Donepezil HCl yüklü SLN'lere farklı sürfaktanların etkisi	119
Çizelge 3.21. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sürfaktan miktarının etkisi	120
Çizelge 3.22. Donepezil HCl yüklü 150 mg Tween 80 içeren SLN'lere karıştırma hızının etkisi	121
Çizelge 3.23. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sonikasyon süresinin etkisi	122
Çizelge 3.24. Humanin yüklü SLN formülasyonlarına ait sonuçlar	125
Çizelge 3.25. Optimum formül olarak seçilen SLN'lerde formülasyon parametreleri	128
Çizelge 3.26. Optimum formülasyonlara ait bulgular	128
Çizelge 3.27. Donepezil HCl SLN formülasyonlarının tekrarlanabilirliği	129
Çizelge 3.28. Humanin SLN formülasyonlarının tekrarlanabilirliği	130
Çizelge 3.29. SLN yüzeyine bağlanan Tf miktarı	133

Çizelge 3.30. Yüzey modifikasyonu yapılmış SLN'lere ait bulgular	133
Çizelge 3.31. +4°C'de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulgular	142
Çizelge 3.32. 25°C'de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulgular	143
Çizelge 3.33. 37°C'de 24 saat süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarına ait bulgular	145
Çizelge 3.34. +4°C'de 1 ay süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarına ait bulgular	146



1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH) geri dönüşümsüz, ilerleyici bir beyin fonksiyon bozukluğudur ve insanlarda hafızayı, düşünme yeteneklerini ve en sonunda da günlük basit işleri yürütme yeteneğini dahi yok etmektedir (National Institute on Aging, 2019). 2015'te yayınlanan Dünya Alzheimer Raporu'na göre 2015'te dünya çapında 46,8 milyon insan demans ile yaşamaktadır ve bu sayının her 20 yılda ikiye katlanacağı ve 2030'da 74,7 milyona 2050'de ise 131,5 milyon insana ulaşacağı düşünülmektedir (Prince, 2015). Hastalığın nedeni tam olarak bilinmemekte ve günümüzde dejeneratif prosesi durduracak ya da ilerlemesini önleyecek bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hastalığın patolojisi bazı proteinlerin birikimi, enflamasyon değişiklikleri ve sinaptik temasın kaybı ve nöronal hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif stresle karakterizedir (Ahmed Nel ve ark., 2016). AH için kullanılan ilaçların kan-beyin engelini (KBE) aşamamaları nedeniyle yeterli doz beyine ulaşamamaktadır, ayrıca semptomatik tedavide sıklıkla kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörlerinin birçok gastrointestinal yan etkisi mevcuttur. AH'nin spesifik histopatolojik bulguları amiloid beta (A β) plakları, nörofibriler yumaklar, hiperfosforilasyona uğramış tau proteini ve beyin dokusunda nöronal kayıptır (Salari ve Bagheri, 2016). AH için şu an kullanılan tedaviler semptomatik olmakla beraber anti-amiloid peptit antikorlar, sekretaz inhibitörleri ve antienflamatuvar ajanların tek başlarına alzheimerli transgenik fare modellerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (Fernandez-Martos ve ark., 2016). Hastalığın temel nedenlerinden biri olduğu düşünülen amiloid plaklara yönelik tedavi yaklaşımlarının hastalığın ilerlemesini ya da oluşumunu önlemekte umut ışığı olabileceği birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Ahmed Nel ve ark., 2016; Cummings ve ark., 2016; Mangialasche ve ark., 2010).

Periferal organlarla kıyaslandığında santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarının tedavisi oldukça zordur ve nöronal ölümle sonuçlanan bir SSS hasarı rejeneratif değildir. Mevcut ilaçların çoğu SSS'deki hedef bölgesine ulaşmadaki başarısızlığı nedeniyle SSS hastalıklarının tedavisinde etkin değildir. İlaçların SSS'deki hedef bölgelerine ulaşamamasının başlıca sebepleri sistemik dolaşımdaki ilaçların ilk geçiş

metabolizmasına uğraması, vücuttaki diğer dokular tarafından alınması ve beyin parenkimasına ilaçların geçişini fiziksel ve kimyasal olarak engelleyen KBE'dir (Stockwell ve ark., 2014). Beyine ilaçların etkin konsantrasyonda geçişini artırabilecek yöntemler büyük ilgi çekmektedir ve yapılan son çalışmalar ilaçların beyine hedeflendirilmesini amaçlamaktadır (Gastaldi ve ark., 2014).

Kan ve beyin arasında seçici ve geçirgen bir bariyer olduğu ilk kez 1880 yılında Paul-Ehrlich tarafından bulunmuştur. 1900'de Lewandowsky, kan ve beyni ayıran mekanik bir membran olduğunu bazı intravenöz uygulanan ilaçların SSS'deki etkisini azalttığını belirtmiştir. Çalışmalar KBE'nin bitişik beyin endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda lokalize olduğunu göstermiştir (Zlokovic, 2008). Beynin ekstraselüler çevresine kandan bileşiklerin geçişini KBE önlemektedir. Büyük molekül ağırlığına sahip etken maddelerin genellikle tamamı KBE'den geçemezken; küçük molekül ağırlığına sahip etken maddelerin ise %98'i KBE'den geçemez (Pardridge, 2005).

Nanopartiküller, özellikleri ve fonksiyonlarıyla birbirinden belirgin şekilde farklı olan materyallerden hazırlanabilen nano-boyutlu partiküllerdir. Kan kapillerinin minimal çapı 6-9 µm olduğundan nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler kan dolaşımı ile organlara ulaşabilme yeteneğine sahiptir. Genellikle, ortalama 100 nm partikül boyutuna sahip ve yüzeyi nötral olan nanopartiküller kan dolaşımında daha uzun süre bulunmaktadır (Craparo ve ark., 2011). Bunun yanı sıra, nanopartiküllerin yüzeyleri hedefleme ligantlarıyla fonksiyonelleştirildiğinde, ilaçların KBE'den geçişini sağlayabilir (Li ve ark., 2016). Mevcut polimerlerin sitotoksitesi ve uygun büyük ölçekli üretim yöntemlerinin olmaması nedeniyle piyasada bulunan polimerik mikropartikül ya da nanopartikül bazlı ürün sayısı sınırlıdır. Polimerik nanopartiküllere alternatif olarak geliştirilen lipid nanopartiküller, yapılarında yer alan lipidlerin biyouyumlu olması ve büyük ölçekli üretimlerinin gerçekleştirilebilmesi nedeniyle farmasötik endüstri tarafından göz önüne alınan yeni bir teknoloji alanıdır (Kaur ve ark., 2008).

Bu çalışmada AH’de yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülen amiloid plakların oluşmasını inhibe ettiği son yıllarda yapılan etki çalışmaları ile kanıtlanmış ve bu nedenle AH’nin radikal tedavisini mümkün kılacak peptit yapısındaki bir etken madde olan Humanin’in KBE’den geçişinin, geliştirilecek lipit ilaç taşıyıcı sistem ile artırılması hedeflenmiştir. Geliştirilecek olan Humanin yüklü lipit nanopartikül formülasyonunun (SLN) spesifik hedefleyici ajanlarla beyine hedeflendirilerek hastalık bölgesine daha fazla etken madde geçişi sağlanarak tedavi etkinliğinin artırılması planlanmıştır. Ayrıca klasik tedavide kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörlerinden Donepezil HCl ile karşılaştırmalı çalışmalarının yapılabilmesi için iki etken madde ile de ayrı ayrı üretilmiş formülasyonlar tasarlanmıştır. Tasarlanan bu formülasyonların tedavi etkinliğini değerlendirmek ve KBE’deki davranışını belirlemek üzere üçlü ortak KBE hücre kültürü modeli ile geçiş çalışmaları ve ardından AH modeli oluşmuş zebra balıklarında çalışmalar yapılması planlanmıştır. Ayrıca hazırlanan ilaç taşıyıcı sistem Donepezil HCL’in tedavideki yan etkilerini azaltacak ve Humanin’in in vivo ortamdaki bozunmasını geciktirecektir. Böylece geleneksel tedavi yaklaşımından farklı olarak AH’a alternatif yeni tedavi yolağı geliştirmek ve bu tedavi değerini araştırmak, sağlanan desteğin hastalığın iyileşmesine katkısını değerlendirmek amaçlanmıştır.

1.1 Alzheimer Hastalığı

Demans öğrenme, hafıza, oryantasyon, dil fonksiyonları ve mental fonksiyonların bozulması ile karakterize, sosyal hayatı etkileyen, SSS’nin ilerleyici nörodejeneratif bir hastalığıdır. Ayrıca unutkanlığın ön planda olduğu birçok hastalığın genel adıdır ve yaşlılarda sık görülen hastalıkların başındadır. Güncel olarak 'bunama' dediğimiz durumdur. AH en sık rastlanan demans türüdür. AH için etkili tedaviler geliştirilmediği sürece hastalığın 2050 yılında tüm dünyada hasta sayısının 115 milyonu geçeceği düşünülmektedir (Ertekin-Taner, 2010). AH ilk kez 1906 yılında Alman Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. AH en kompleks ve uğraştırıcı nörodejenaratif hastalıklardan birisidir. Hastalık görülen zihinsel ve bilişsel azalma günlük yaşamdaki olağan aktiviteleri etkiler, ayrıca hastada davranışsal

bozukluklar ortaya çıkar. Hastanın yaşam kalitesi düşer ve hasta yakınlarına binen yük bununla bağlantılı olarak artar. Yetişkinlikte en çok görülen hastalıklardan birisidir (Wilson ve ark., 2010).

1.1.1 Hastalık İçin Risk Faktörleri

Alzheimer'ın hedef mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır; fakat hastalığın gelişimine katkısı olan risk faktörleri tanımlanmıştır. Yaşın ilerlemesi en büyük risk faktörüdür. 65 yaş üstü insanlarda insidans oldukça yüksektir, ancak 65 yaş altı insanlarda da erken evre AH görülebilmektedir (Korabecny ve ark., 2014). Hastalığın görülme riski yaşa bağlı olarak katlanarak artar. 60-65 yaş popülasyonunda görülme sıklığı yaklaşık olarak %0,1 iken, 85 yaş üzerinde görülme sıklığı %47'ye kadar çıkabilmektedir (Bahat-Öztürk ve Karan, 2009). Genetik faktör önemli bir rol oynar. Yakın akrabaları AH tanısı konmuş insanların, konmamışlara göre AH diagnozu gösterme olasılığının fazla olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır. AH genellikle apolipoprotein E'nin ε4 allelinin varlığı ile ilişkilidir. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar, beyin yaralanması, travma, depresyon, düşük eğitim seviyesi, sigara içmek, folat ve B12 eksikliği, yüksek kolesterol, tip 2 diyabet, plazmada artmış homosistein konsantrasyonu, yüksek tansiyon, obezite ve fiziksel aktivitede yetersizlik risk faktörleri olarak sayılabilir (Korabecny ve ark., 2014).

1.1.2 Hastalığın Fizyopatolojisi

Hastalığın patolojisi bazı proteinlerin birikimi, enflamasyon değişiklikleri ve sinaptik temasın kaybı ve nöronal hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif stresle karakterizedir (Ahmed Nel ve ark., 2016). AH'nin spesifik histopatolojik bulguları Aβ plakları, nörofibriler yumaklar, hiperfosforilasyona uğramış tau proteini ve beyin dokusunda nöronal kayıptır (Salari ve Bagheri, 2016).

Hastalığın gelişimini açıklamak için bu spesifik bulgular göz önünde bulundurularak araştırmacılar tarafından 3 adet hipotez öne sürülmüştür.

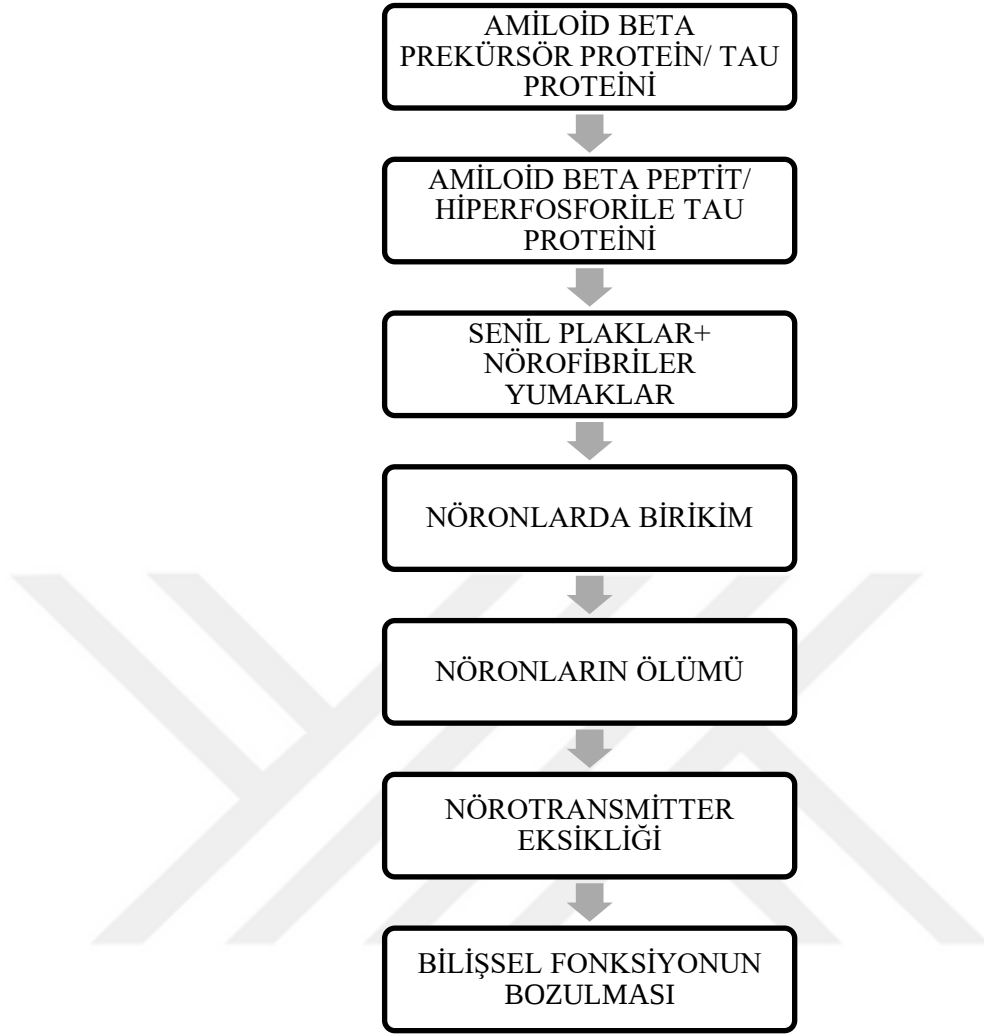
1.1.2.1. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Hipotezi

A β plakların bir diğer adı senil plaklardır ve A β peptitlerinin fibril formlarından meydana gelmektedirler. Senil plaklar 40-42 aminoasit uzunluğunda, hücre dışında biriken, büyük bir transmembran protein olan ve işlevi tam olarak anlaşılamamış amiloid prekürsör protein (APP)'den proteolitik yolla oluşan yapılardır (Bahat-Öztürk ve Karan, 2009). Alzheimer hastalarının beyinlerinde görülen A β plakları büyük çoğunlukla A β 1-40 ve A β 1-42 içermektedir. Anlamı C terminalinin 40. ve 42. aminoasitle sonlandığını gösterir. Genellikle erken evre AH'de görülürler (Salari ve Bagheri, 2016). Bunlardan plak oluşumuna daha fazla neden olanı 42 aminoasitlik form olandır; çünkü ilk çöken versiyondur. Bunun ardından amiloid β difüze olabilen plaklar halinde agregatlar oluşturur ve bunlar yoğun senil plaklara dönüşür (Cummings, 2004). APP öncelikle β -sekretaz tarafından N terminal alanından daha sonra gama sekretaz ile intraselüler C terminal alanından parçalanır. Gama sekretaz enzimatik kompleksi bir transmembran proteini olan presenilini de (PSEN) gerektiren 4 farklı proteinden oluşur. Erken evrede görülen proteindeki ya da enzimdeki mutasyonlar fibril üretimini etkiler ve A β toksik formu oluşur, bu da enflamasyon, sinaptik kayıp, anormal fosforilasyon ki nörofibriller yumak oluşumu ve hücre ölümü sağlar. Bu durum klinik demans patolojik bulgusudur (Ertekin-Taner, 2010).

AH'nin bilinen tüm genetik mekanizmaları amiloid β oluşumunu artırmaya yöneliktir. Genetik mekanizmaların sonucunda öncü madde olan APP miktarındaki artıştan dolayı veya APP'den amiloid β üreten β -sekretaz/ γ -sekretaz aktivasyonuna bağlı aşırı üretimin olması nedeniyle amiloid β miktarı artar. Bunun yanında, glikozis ve mikrogial aktivasyon ile meydana gelen inflamatuvar değişiklikler de plakların oluşumuna giden süreci tetikleyebilir (Bahat-Öztürk ve Karan, 2009).

1.1.2.2. Tau Hipotezi

Bir diğ er AH bulgusu olan n ro fibriller yumaklar (NFY) hiperfosforilasyona uğramış tau proteini parçalarından oluşmaktadır. Teori fyn kinaz yolağındaki anormal sinyalizasyonun tau proteininde aşırı fosforilasyona neden olduğu ile ilgilidir (Rafii ve Aisen, 2015). Tau proteini mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta rol oynayan bir proteindir. NFY ise çözünebilir tau proteininin çözünmeyen formlarından oluşur. NFY nöronları içeriden etkilemektedirler ve özellikle hücre iskeletinde değişikliğe yol açmaktadırlar. İskeletin bütünlüğünü bozan bu değişiklikler aksonal transportu etkiler ve sonuç olarak nöronlar etkilenir ve ölürlür. Nöronların ölmesiyle oligomerik formlar ve tau fibrilleri ekstraselüler çevreye salınırlar, mikroglialler aktive olur ve nöronal dejenarasyonun yayılmasına neden olan zararlı bir döngünün stimüle olmasına neden olur ve bunun sonucu olarak beyindeki sinaptik iletim etkilenir, zihinsel fonksiyonlarda ve hafızada kayıp oluşur (Bennett ve ark., 2004; Rafii ve Aisen, 2015; Salari ve Bagheri, 2016).



Şekil 1.1. Nöronal hücre ölümünü gösteren diyagram (Samanta ve ark., 2006).

1.1.2.3. Kolinergic Hipotez

“Eğer kolinergic sistem bilişsel işlevde önemli ise ve AH’de kolinergic sistem etkilenmişse; AH’nin kognitif ve diğer semptomları, kolinergic iletiyi artırarak yani; asetil kolin (Ach) yıkımını önleyerek, yerine koyarak ya da reseptörleri aktive ederek tedavi edilebilir” (Ergün, 2010).

Kolinergic hipotez AH’nin doğasını açıklayan ilk ve en yaygın kabul gören teoridir. Dahası günümüzde kullanılan semptomatik tedavide kullanılan ilaçların neredeyse hepsi bu hipoteze bağlıdır. Kolinergic teori AH hastalarında gözlenen

kolinerjik aktivite kaybı ile öğrenme-hatırlama fonksiyonları ve asetilkolin nörotransmitter ile ilişkili olduğunu destekler (Korabecny ve ark., 2014). Kolinerjik sistem öğrenme hafızada hayati rol oynar ve Alzheimer hastalarında görülen hafıza bozukluğu temelde kolinerjik bozukluk ile ilişkilendirilir (Wilson ve ark., 2010).

1.1.3. Hastalığın Genetik Boyutu

Son 30 yıldır AH'nin altta yatan genetik nedenleri hakkında önemli oranda veri toplanmıştır. AH'nin büyük çoğunluğu genetik olarak kalıtsal değildir; ancak bazı genler risk faktörü teşkil edebilir. Genellikle 65 yaşından önce başlayan AH'nin genetik olarak tanımlanmış formları mevcuttur ve vaka sayılarının %0,1'ine denk gelir. Güncel düşünce hastalığın sporadik/geç başlangıçlı ve ailesel/erken başlangıçlı durumlarının olduğu yönündedir (Blennow ve ark., 2006).

1.1.3.1. Ailesel/Erken Başlangıçlı

Ailesel AH, 65 yaşından önce görülen otozomal baskın kalıtsal (autosomal dominant Alzheimer disease - ADAD) bir bozukluktur. Birden çok nesilde, birçok aile üyesi etkilenebilmektedir. Genellikle 65 yaşından önce gelişen semptomlar bazen 30 ile 40 yaş arasındaki kişilerde dahi görünebilir. Otozomal baskın ailesel AH'nin çoğu, APP ve / veya PSEN 1 ve 2 genindeki mutasyonlara bağlanabilir (Blennow ve ark., 2006).

Hastalığın erken evresi ile ilgili 3 mutasyon mevcuttur, bunlar APP'de 21. kromozom, PSEN1'de 14. kromozom ve PSEN2'de 1. kromozomda yer alan mutasyonlarıdır. APP 21. kromozom mutasyonu down sendromu ile ilişkilidir. Bütün PSEN mutasyonları A β -42' de artışa ya da A β -40' da azalışa neden olur. Bundan dolayı A β -42/A β -40 oranı patojenik form lehine artar (Ertekin-Taner, 2010). APP ve PSEN genlerindeki mutasyonlar A β proteininin atılamayarak amiloid plaklarda biriken ve ilk çöken çeşidi olan A β -42'nin üretimine yol açar ve A β -42'nin aşırı

üretimine neden olarak nöronların ölümüne neden olur (Bahat-Öztürk ve Karan, 2009; Selkoe, 1999).

1.1.3.2. Sporadik/Geç Başlangıçlı

Otozomal baskın kalıtım göstermeyen diğer vakalar, sporadik AH olarak adlandırılır. Apolipoprotein allelinin (Apo-E) kalıtımı gibi genetik risk faktörleri tanımlanmıştır. Hastalığa dair risk teşkil ettiği düşünülen genler, hastalığa yakalanma olasılığını artırır; ancak bunun olacağını garanti etmez (Mahley ve ark., 2006).

Apo-E geni 19. kromozomdadır, doğrudan bir hastalık etmeni değildir; ancak sporadik AH ile ilişkisi ortaya konmuştur. Apolipoproteinler, lipoprotein sentez, sekresyon ve metabolizmasında rol oynar. Apo-E $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ adlı üç ayrı allelik forma sahiptir (Huynh ve ark., 2017). Apo-E $\epsilon 3$ bunlardan yaygın olanıdır, popülasyonun yaklaşık %72'sinde görülmektedir (Karch ve ark., 2014). Apo-E, beyinde bir kolesterol taşıyıcı görevi görür ve bu üç alelden Apo-E- $\epsilon 4$, membran lipidlerinin yeniden kullanımında ve nöronal onarımda diğer varyantlardan daha az etkilidir. Öte yandan, Apo-E- $\epsilon 4$ A β birikiminde görev alarak, A β fibrilasyonunu ve plak oluşumunu desteklediği; $\epsilon 2$ allelinin ise tam tersine AH'de koruyucu olduğu ve hastalığın başlamasını geciktirdiği bulunmuştur (Samanta ve ark., 2006). Apo-E- $\epsilon 4$ 'ün hastalık riskini 15 kata kadar artırdığı görülmüştür (Mahley ve ark., 2006). Ayrıca AH riskini doza bağlı bir şekilde artırmakta ve hastalık başlangıç yaşını düşürmektedir (Kanekiyo ve ark., 2014). Apo-E' nin senil plaklarında tanımlanması, bunun A β 'ya invitro olarak yüksek oranda bağlanma eğilimi olması Apo-E' deki $\epsilon 4$ allelinin sıklığı orantılı olarak artmıştır (Ertekin-Taner, 2010). Bunun yanı sıra bu alellerin A β 'ya farklı bağlandıkları bulunmuştur. A β -Apo-E $\epsilon 2$ ve A β -Apo-E $\epsilon 3$ komplekslerinin A β -Apo-E $\epsilon 4$ kompleksine göre KBE'den daha hızlı atıldığı belirlenmiştir (Lambert ve Amouyel, 2011).

1.1.4. Hastalıkta Tedavi Yöntemleri

1.1.4.1.AH'ye Karşı Günümüzdeki Tedavi Yaklaşımları

AH uzun yıllardır bilinmesine rağmen, tedavi için onaylı ilaç olarak sadece dört asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü ve Memantin kullanılmaktadır. Bu ilaçlar semptomatik tedavi sağlarlar; ancak hastalığın seyrini değiştirmezler (Anand ve ark., 2014).

Burada tedavide kolinerjik hipotezden göz önüne alınarak asetilkolini yıkan enzim olan asetilkolinesterazın inhibisyonu ile eksilen asetilkolin miktarının azaltılması amaçlanır. Günümüzde tedavide kullanılan asetil kolinesteraz inhibitörleri; Donepezil, Rivastigmin, Takrin ve Galantamin'dir. Memantin ise N-metil- D -aspartat (NMDA) antagonisti olup glutaminerjik aşırı uyarımı inhibe ederek hafıza ile ilgili NMDA reseptörlerini etkiler (Selekler, 2010).

Bunlardan Takrin hastalıkta ilk kullanılan AChE inhibitörüdür. Takrin kullanımı, daha sık doz programı, uzun süreli kan konsantrasyonu titrasyonu ve karaciğer enzimlerinin izlenmesini gerektirir. Takrin artık dar terapötik indeksi, sık görülen şiddetli hepatotoksisite vakaları ve gastrointestinal toksisite nedeniyle günümüzde pek kullanılmamaktadır (Korabecny ve ark., 2014). Tedavide kullanılan diğer kullanılan AChE inhibitörleri ve NMDA antagonisti olan Memantin'e ait değerlendirme Çizelge 1.1'de verilmiştir (Chinthapalli, 2017).

Çizelge 1.1. Günümüzde AH tedavisinde kullanılan ilaçların genel değerlendirmesi.

	Donepezil	Galantamin	Rivastigmin		Memantin
Mekanizma	AChE inhibitörü				NMDA reseptör agonisti
Endikasyon	Hafif-----Şiddetli AH				Orta---Şiddetli AH
Uygulama yolu	Tablet ya da ağızda dağılan tablet	Tablet Sıvı form MR tablet	Kapsül Sıvı form	Transdermal patch	Tablet Sıvı form
Başlangıç dozu	5 mg /gün	4 mg; günde 2 kere	1,5 mg; günde 2 kere	4,6 mg/gün	5 mg /gün
İdame dozu	5 mg / ay	8 mg/ ay	2 haftada bir 3 mg	4 mg / ay	5 mg / hafta
Maksimum dozu	10 mg /gün	12 mg; günde 2 kere	6 mg; günde 2 kere	3,3 mg/gün	20 mg / gün
Yaygın görülen yan etkiler	Gastrointestinal: Bulantı, kusma, diyare, anoreksiya, kilo kaybı, baş ağrısı, baş dönmesi				Kabızlık Baş ağrısı Baş dönmesi
Türkiye’de piyasada bulunan ticari preparat örnekleri	*Aricept Evess 10 mg Ağızda Dağılan Tablet *Aricept 5 mg Film Kaplı Tablet	*Reminyl 400 mg/100 ml Oral Çözelti *Reminyl 8 mg Uzatılmış Salımlı Kapsül	*Exelon 2 mg 120 ml Solüsyon	*Exelon Patch 13,3 mg/24 Saat Transdermal Flaster *Ristart 1,5 mg Kapsül	*Ebixa 20 mg Film Tablet *Korint 10 mg/g Oral Damla, Çözelti

1.1.4.1.1. Tedavide Görülen Yan Etkiler

Asetilkolin, sadece SSS’de yaygın değildir. Parasempatik sinir sistemi tarafından kullanılan, kalp atış hızını düşüren ve gastrointestinal sistem ve mesaneyi uyaran ana nörotransmitterdir. Asetilkolinesteraz burada da rol oynamaktadır ve asetilkolinesteraz inhibisyonu parasempatik aktivasyona neden olur. Bu durum mide bulantısı, kusma, diyare gibi etkilerle ilişkilidir. Bir diğer önemli yan etki ise bradikardi ve bayılma riskinin artmasıdır (Chinthapalli, 2017).

Genellikle hastalarda kilo kaybı, dispepsi, bulantı, kusma, ishal, yüzde ateş basması gibi yan etkiler görülür. Ayrıca halüsinasyon, delüzyon, anksiyete, ajitasyon, agresif davranışlar da görülebilmektedir. Seyrek de olsa kardiyovasküler yan etkiler olabilir (Ergün, 2010; RxMediaPharma, 2020).

1.1.4.2.AH’de Yeni Tedavi Yaklaşımları

AH için şu an kullanılan tedaviler semptomatik olmakla beraber anti-amiloid peptit antikorlar, sekretaz inhibitörleri ve antienflamatuvar ajanların tek başlarına Alzheimerli transgenik fare modellerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu ajanların kombine tedavilerde potansiyeli olduğu düşünülmektedir. AH’nin çeşitli hücrel ve patolojik olaylarla ilişkili olması nedeniyle kombine tedaviler denemek hastalığın tedavisi için yararlı bir yaklaşım olabilir (Fernandez-Martos ve ark., 2016).

Günümüzde hastalığa yönelik yeni tedavi yaklaşımları anti amiloid tedaviler, tau proteinine yönelik tedaviler, mitokondriyal bozulmaya yönelik tedaviler, nörotrofinler, antioksidanlar, statinler, non steroid antienflamatuvarlar sayılabilir (Ergün, 2010; Samanta ve ark., 2006). Çizelge 1.2’de (Anand ve ark., 2014; Ergün, 2010; Siedlak ve ark., 2009) AH’ye yönelik yeni tedavi yaklaşımları özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. AH’ye yönelik yeni tedavi yaklaşımları.

Yaklaşımın Temeli	Strateji
Amiloid temelli stratejiler	• Sekretaz enzimi modülasyonu • Amiloid transportu modifikasyonu • Amiloid üretimini azaltma • Amiloid agregasyonunu önleme • Amiloid atılımını hızlandırma • Amiloid bazlı immünoterapi
Tau proteini temelli stratejiler	• Tau fosforilasyonunun inhibisyonu • Mikrotübül stabilizasyonu • Tau oligomerizasyonunun önlenmesi • Tau degradasyonunun artırılması • Tau bazlı immünoterapi
Oksidatif stresi azaltmak	• Antioksidan desteği • Endojen savunmanın artırılması
Mitokondriyal bozulmaya yönelik tedaviler	• Koenzim Q10 • A-Lipoik asit • Karnitin
Diğer yaklaşımlar	• Gonadotropin desteği • Statinler • Büyüme faktörü desteği • Antienflamatuvar ajanlar • Nörotrofinler • Metal şelasyon

1.2. Kan-Beyin Engeli (KBE)

SSS'de bulunan nöronlar kimyasal ve elektriksel sinyallerin kombinasyonunu kullanarak iletişim kurarlar. Bu nedenle sinapsların ve aksonların çevresindeki sinirsel sinyalizasyon için kritik olan yerel iyonik mikroortamın hassas bir şekilde düzenlenmesi çok önemlidir. Kan ve sinir dokusu arasındaki arayüzeylerde yer alan bariyerler bu düzenlemede kritik rol oynar (Abbott ve ark., 2010).

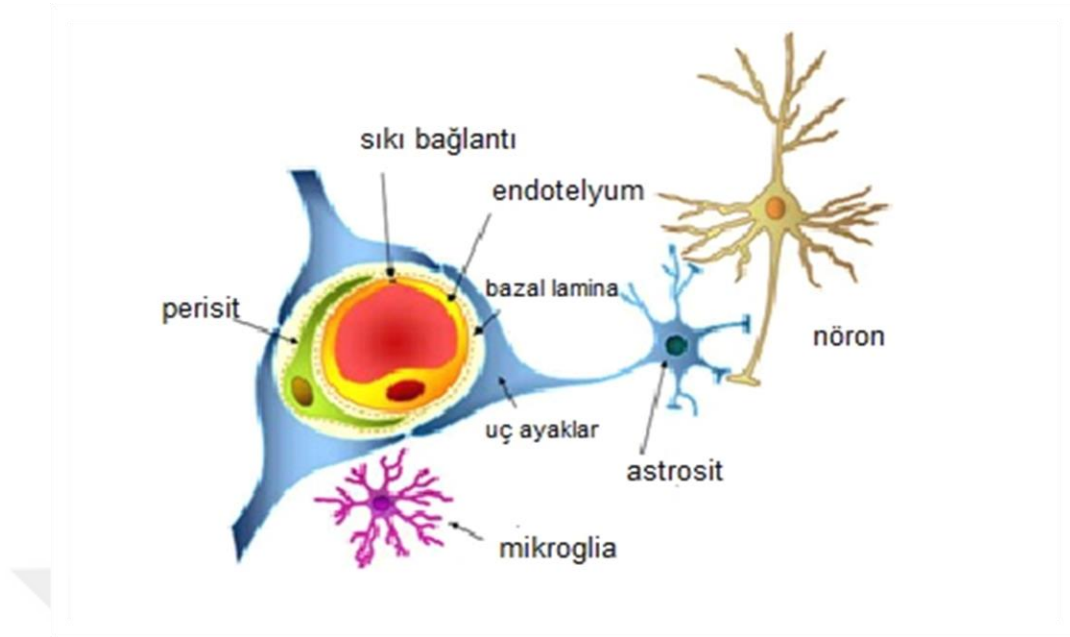
KBE ilk kez 1885 yılında Paul Ehrlich tarafından tanımlanmıştır. Esas amacı Santral Sinir Sistemi'nin iç ortamını korumak ve kandan besin maddelerinin geçişini sağlamaktır. KBE esas olarak beyni sistemik kan dolaşımından ayıran membran bir bariyerdir. Kan-beyin engeli, beyinde homeostazı (iç denge) sağlamak üzere, beyni kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden korurken, gerekli besinlerin geçişine izin veren yarı geçirgen özelleşmiş endotel hücre membranı dizisidir (Zenaro ve ark., 2017). Kan-beyin engeli beyine geçişi hem fiziksel (sıkı bağlantılar) hem metabolik (enzim) bariyerler vasıtasıyla engeller (Zlokovic, 2008). SSS bariyerlerinin temel işlevleri şu şekilde listelenebilir:

- Moleküler trafiği kontrol eder, toksinleri dışarıda tutar (nöronal hücre ölümünü en aza indirir, sinirsel bağlantıyı korur).
- Optimum sinir sinyali için iyon homeostazına katkıda bulunur.
- SSS'de düşük proteinli ortamı korur, hücre çoğalmasını sınırlar, sinirsel bağlantıyı korur.
- Merkezi ve çevresel nörotransmitter havuzlarını ayırır, bunların arasındaki karışmayı azaltır, SSS'de sinaptik olmayan sinyale izin verir.
- Minimum iltihaplanma ve hücre hasarı ile bağışıklık denetimi ve cevabına izin verir.

Bu işlevler SSS sağlığı için gerekli olduğundan, KBE'ye zarar veren patolojilerin, ister hemen ister uzun vadede SSS işlevleri üzerinde birçok zararlı etkiye sahip olacağı açıktır (Abbott, 2013).

KBE, beyinin mikrovasküler bütünlüğünü korumak için hücre-hücre bağlantılarıyla, esas olarak beyin endotel hücreleri ve bunların temel zarı tarafından oluşturulan bir kılcal duvardır. Hücre-hücre bağlantıları, adherent (yapışık) bağlantılar ve sıkı bağlantılar olarak kategorize edilebilir. Sıkı bağlantılar, moleküllerin ve iyonların çoğunun paraselüler hareketini engeller. Bu nedenle, moleküllerin çoğunun vasküler sistem ile beyin arasında taşınması esas olarak hücre içi taşıma yoluyla gerçekleşir (Wong ve ark., 2019). Beyin kılcal damarları, çözünen maddelerin difüzyonu ile ilgili olarak endotel tabakasının kısıtlayıcı özelliklerinin oluşumunu sağlayan karmaşık morfolojidedir; bu morfolojik durum beyni bitişik endotel hücrelerini birbirine bağlayan ve paraselüler boşlukları kapayan sıkı bağlantılar yardımı ile kandan gelen istenmeyen çözünen maddelerden korumak için önemli bir özelliktir (Redzic, 2011). KBE, periferik mikrodamarlardan 100 kat daha yüksek olan $1500 \Omega \text{ cm}^2$ civarında transendotelial elektrik direnci (TEER) ile iyonların hareketine güçlü bir direnç sağlar (Bors ve Erdő, 2019).

KBE'nin oluşumunda ve işlevinde yer alan pek çok bileşen vardır. Beyin kılcal damarları, iyon konsantrasyonunun düzenlenmesinde ve nörotransmitterlerin temizlenmesinde rol alan astrositlerin uç ayaklarıyla çevrilidir (Volterra ve Meldolesi, 2005). Perisitler, endotel hücrelerinin beyin yönü üzerinde yer alan vasküler duvar hücreleridir ve bu hücreler kılcal çapı kontrol ederek kan akışını düzenleyebilen astrosit uç ayakları tarafından sarılmıştır. Perisitler, KBE oluşumu ve olgun endotelial hücrelerde maddelerin hücreye taşınmasını sağlayan transsitoz aktivitesinin aşağı regülasyonu için önemlidir. Bu nedenle, perisitler KBE boyunca taşınmayla da ilgilidir (Wong ve ark., 2019). Endotel hücrelerin dış tarafında bulunan bazal lamina, astrosit uç ayaklarının hemen bitişğinde yer alır (Bors ve Erdő, 2019). Nöronlar ve mikroglia gibi diğer hücreler de KBE'nin oluşturulmasında rol alır. Bütün bu bahsedilen nöronlar ve nöronal olmayan hücreler arasındaki fonksiyonel etkileşimler ve sinyalleşme, “nörovasküler ünite” adı verilen dinamik ve fonksiyonel bir birimi oluşturur (Şekil 1.2) (Abbott, 2013). Tüm bu bileşenler KBE'nin normal fonksiyonları, stabilitesi ve patofizyolojik uyarılara cevabı için gereklidir (Wong ve ark., 2019).



Şekil 1.2. Kılcal seviyede nörovasküler bir ünitenin görünümü.

1.2.1. Kan-Beyin Engelinden Geçiş ve İlgili Mekanizmalar

Normal işlevinin bir parçası olarak endotel hücreleri, besinlerin ve düzenleyici moleküllerin pasif ve aktif mekanizmalar yoluyla beyne akışına izin verir. Normal koşullarda, çözünen maddelerin bazı pasif hareketi, sıkı bağlantılarda bulunan küçük hücreler arası gözenekler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sıkı bağlantılarda bulunan bir transmembran protein olan kladinlerin KBE 'deki sıkı bağlantılarda yer alan gözeneklerin oluşmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir (Irudayanathan ve ark., 2017; Krause ve ark., 2008).

Bazı uygun lipofilikliğe, molekül ağırlığına (MA) ve yüke sahip küçük moleküller kandan SSS'ye kolayca difüze olmaktadır; ancak bununla birlikte küçük moleküllerin büyük bir çoğunluğu (MA>500 Dalton), peptit ve proteinler KBE'yi geçemez. Küçük moleküllerin yaklaşık %98'i ve neredeyse rekombinant proteinler ve gen bazlı ilaçlar gibi bütün büyük moleküllerin (MA>1 kilodalton) KBE'yi geçemediği bildirilmiştir. Bu nedenle beyne ulaşmak için çoğu molekül spesifik taşıyıcılar ve /

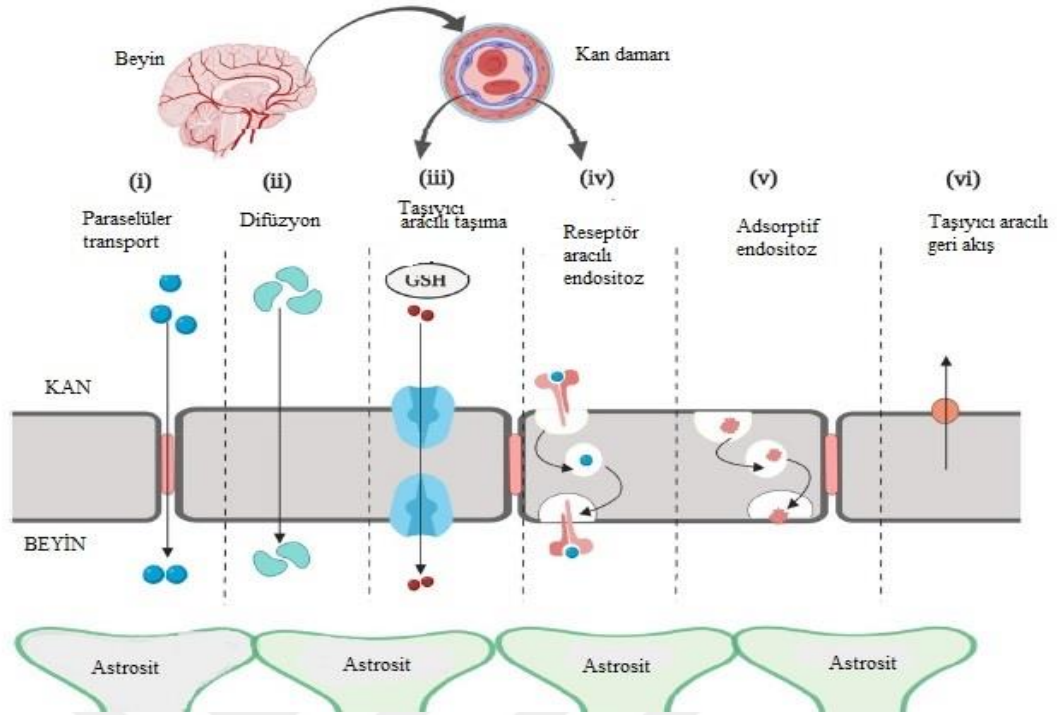
veya endotel hücrelerin kan (lümen) tarafında ifade edilen taşıyıcılarla etkileşime girerek KBE'yi aşmak zorunda kalır (Pardridge, 1985; Pardridge, 2007).

Amino asitler, glikoz ve benzeri küçük hidrofilik moleküller ve beyin hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olan diğer moleküller bazolateralde bölgedeki endotel hücrelerinde ve kanda bulunan taşıyıcıları kullanırlar.

Hormonlar, transferrin ve lipoproteinler gibi daha büyük ve/veya hidrofilik temelli moleküller endotel hücrelerinin luminal tarafında yüksek oranda ifade edilen spesifik reseptörler kullanırlar. Bu reseptörler KBE'yi geçen bileşenlerin endositoz ve transitoz aktivitelerinde de işlev görür.

Küçük hidrofilik moleküller KBE'den beyine pasif difüzyonla geçebilir; ancak dışarı akış pompalarına maruz kalırlar. Ayrıca beyin penetrasyonundan önce endotel hücrelerin sitoplazmasında lokalize parçalayıcı enzimlere de maruz kalabilirler (Gabathuler, 2010).

KBE'den geçiş mekanizmaları Şekil 1.3'de şematize edilmiştir (Dwivedi ve ark., 2020).



Şekil 1.3. KBE'den geçiş mekanizmaları.

Paraselüler transport ve difüzyon

Sıkı bağlantılar yoluyla paraselüler transport, basit suda çözünür moleküllerin taşınmasından sorumludur. Steroidler ve alkol gibi yağda çözünen maddeler, difüzyon yoluyla pasif olarak taşınır (Dwivedi ve ark., 2020). Sadece moleküler ağırlığı 400 Da'dan düşük ve sekizden az hidrojen bağına sahip küçük lipofilik moleküller veya küçük gaz molekülleri (CO_2 veya O_2 gibi), transmembran difüzyon yoluyla KBE'den serbestçe geçebilir (Sweeney ve ark., 2018).

Taşıyıcı aracılı taşıma

Aminoasit, nükleotitler ve glukoz gibi moleküller taşıyıcı proteinler ile konsantrasyon gradyanına bağlı şekilde ve enerji kaynağı olarak ATP kullanarak taşınırlar (Dwivedi ve ark., 2020). KBE beyni metabolizma için gerekli olan glikoz ve amino asitler gibi birçok temel polar besleyiciden izole eder. Bu nedenle KBE endoteli SSS'ye bu besleyici maddeleri sağlamak için birçok spesifik çözünen taşıyıcı

içermektedir. GLUT-1 en çok bilinen taşıyıcılardandır, glukozun taşınmasında rol oynar (Abbott ve ark., 2010).

Reseptör aracılı endositoz

Belirli bir taşıyıcıya sahip olmayan endojen moleküller beyne reseptör aracılı endositoz yoluyla da ulaşabilir (Lombardo ve ark., 2020). Reseptör aracılı endositoz, ligandın reseptöre bağlanmasını gerektirir ve KBE boyunca peptitler ve proteinler gibi çeşitli moleküller bu şekilde taşınabilir (Dwivedi ve ark., 2020). KBE'de transferrin (Tf) reseptörü, insülin reseptörü, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ile ilişkili protein, nikotinik asetilkolin reseptörü, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü, difteri toksin reseptörü, B tipi çöpçü reseptör, leptin reseptörü ve neonatal Fc reseptörü gibi birçok reseptörün aşırı ekspresyonu görülmüştür. Bu reseptörler spesifik olarak karşılık gelen ligantlara bağlanarak hücre içi alımı tetikler. Bu nedenle karşılık gelen ligantlarla modifikasyonlar yapılarak KBE'den taşınmaları sağlanabilir (Gao, 2016).

Transferrin reseptörleri (TfR): Transferrin kandaki serbest demiri bağlar ve TfR, bu yüklü transferrin proteinlerini KBE dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli doku engellerini aşarak taşımaktan sorumludur (Robinson ve ark., 2015).

İnsülin reseptörleri: İnsülin reseptörleri, beyindeki glikoz homeostazını sürdürmek için önemlidir.

Lipoprotein reseptörleri: Beyindeki süpürme ve sinyalizasyondan sorumlu geniş bir reseptör proteinleri sınıfıdır. Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR), lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein (LRP) 1 ve 2'nin tümü ilişkilidir ve KBE'de ifade edilir (Chen ve Liu, 2012; Robinson ve ark., 2015).

Difteri toksin reseptörü (DTR): DTR, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörünün (HB-EGF) öncüsü olarak da bilinir. KBE, nöron ve glial hücreler üzerinde

iyi karakterize edilmiş içselleştirici bir taşıma reseptörüdür. DTR ekspresyonunun yukarı regülasyonu beyin hastalıklarının neden olduğu birçok inflamatuvar durumda bildirildiğinden, bölgeye özgü hastalık hedeflemesi için yararlı bir reseptör olarak önerilmiştir (Chen ve Liu, 2012).

Nikotinik asetilkolin reseptörleri: 39 amino asitlik bir peptit olan kuduz virüsü glikoproteininin (RVG) hedefidirler. RVG, nöronlarda ve endotelial hücrelerde ifade edilen alfa-7 alt birimini bağlar; bu nedenle, özellikle RNA interferans stratejilerinde bir beyin hedefleme ligandı olarak geniş çapta araştırılmıştır (Liu ve ark., 2009).

Reseptör aracılı endositoz KBE geçirgenliğinin artması ve özgüllüğü nedeni ile ilaç taşıyıcı sistemlerin beyine spesifik hedeflenmesi için büyük bir potansiyele sahiptir.

Adsorptif endositoz

Adsorptif endositoz elektrostatik etkileşimler yoluyla bariyeri geçmek için katyonik peptit gibi yüklü moleküllerin transferini içerir. Burada pozitif yüklü protein veya peptit gibi bir molekül, beyin endotel hücrelerinin negatif yüklü lümen zarı ile elektrostatik olarak etkileşir. Bu süreç enerjiye, zamana ve konsantrasyona bağlıdır ve birkaç dakika sürer. Bu nedenle, taşıyıcı aracılı taşıma ile karşılaştırıldığında nispeten yavaştır (Bickel ve ark., 2001; Zhu ve ark., 2019).

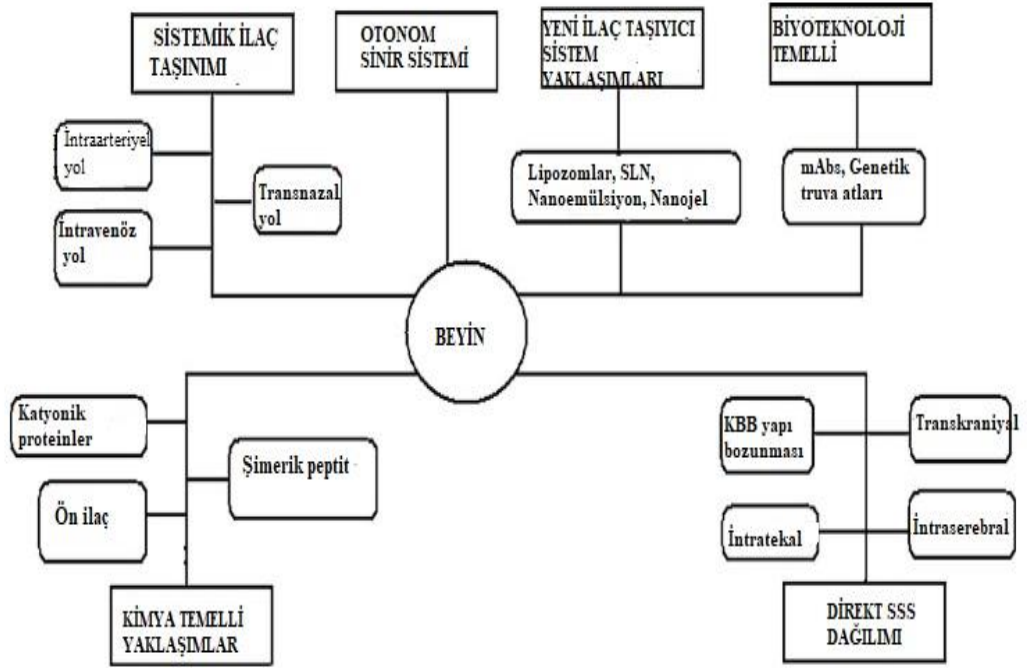
Taşıyıcı aracılı geri akış

Taşıyıcı aracılı geri akış, ilaçların beyin dışına atılmasından sorumludur. ATP bağlayıcı kaset taşıyıcılar (ABC) gibi ATP bağımlı dışa akış pompaları olası nörotoksik maddeleri atarak beyin homeostazının korunmasına katkıda bulunur. Geri akış için KBE'de taşıyıcılar arasında en kapsamlı olarak tanımlananlar P-glikoproteinler (P-gp veya ABCB1, MDR1), meme kanseri direnç proteinleri (BCRP

/ ABCG2) ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerdir (MRP1, 2, 4 ve 5, ABCC) (Lombardo ve ark., 2020).

1.2.2. Kan-Beyin Engelinden Geçişi Artırmak İçin Geliştirilen Stratejiler

KBE'yi atlamak ve terapötikleri beyne iletmek için, günümüzde farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bunlar genel olarak girişimsel, farmakolojik ve fizyolojik yaklaşımlar olarak üç ana başlık altında toplanabilir (Gabathuler, 2010). Beyine ilaç taşınımı için değişik yaklaşımlar Şekil 1.4'de özetlenmektedir (Alam ve ark., 2010) .



Şekil 1.4. Beyine ilaç taşınımı için değişik yaklaşımlar.

Girişimsel yaklaşımlar ile direkt SSS'ye dağılım

İlaçların beyne taşınması için girişimsel yaklaşımlar mekanik olarak KBE'yi atlayarak sağlanır (Gabathuler, 2010). Girişimsel yaklaşımlar ilacın bir iğne veya

kateter yoluyla doğrudan hedeflenen beyin bölgesine enjekte edilmesiyle gerçekleştirilebilir. Bu tür doğrudan enjeksiyonlar kafatasının açılmasını gerektirir. Bu yolla lokalize ilaç dağılımı sağlanabilir; ancak hedef olmayan beyin dokusunda ilacın penetrasyonuna neden olurlar ve beyin hasarı, kanama ve enfeksiyon riski taşırlar. İlaç konsantrasyonu enjeksiyon veya implantasyon bölgesinden katlanarak azaldığı için bu yöntemle ilaç dağılımının kontrolü zor olabilir. İlaçlar, beyin parankimine difüzyon yoluyla girmek için intratekal veya intraventriküler yollarla beyin omurilik sıvısına (BOS) verilebilir. Bu yaklaşım, hedef subaraknoid boşlukta olduğunda yararlı olabilir; ancak beyin parankimine penetrasyon sınırlı olabilir; çünkü ilaç difüzyonu beyin yüzeyinden üssel olarak düşer (Meairs, 2015).

KBE yapısının bozunması

Sistemik uygulama, hastalar tarafından iyi tolere edildiği ve uygulanması çok daha kolay olduğu için beyne terapötik uygulama için daha arzu edilen bir yoldur. Sistemik taşımanın başarısı, klinik ajanların KBE'yi geçme yeteneğine bağlıdır. Bu nedenle, bradikinin gibi kimyasal maddeler, mannitol gibi osmolitler veya odaklanmış ultrason ile KBE yapısını bozucu teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerinin çoğu, KBE'nin endotelial hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda stresi teşvik eder, bağlantıları etkin bir şekilde gevşeterek ve klinik ajanların beyne paraselüler taşınmasına izin verilmesini sağlar. Bu teknik, klinik ajanların kandan beyne kolayca geçmesine başarılı bir şekilde izin verse de, albumin ve diğer nöronal hasara neden olabilen nörotoksinlerin de KBE yoluyla geçmesine izin verir. Tüm bu yaklaşımlar nispeten maliyetlidir, anestezi ve hastanede kalmayı gerektirir ve hasta uyuncu iyi değildir. Bu teknikler, tümör yayılmasını artırabilir (Curley ve Cady, 2018; Gabathuler, 2010).

Sistemik ilaç taşınımı

Sistemik ilaç dağılımı için intavenöz, intaarteriyel ve transnazal yollar uygulanabilmektedir. İntravenöz (IV) yol, vücuda daha yüksek dozlarda ilaç verilmesi için yaygın olarak uygulanan yöntemdir. İlk geçiş metabolizmasından kaçınarak

ilaçları doğrudan genel dolaşıma verir ve ilaçları beyne taşıma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, periferik organlara ilaç maruziyeti yüksektir ve KBE ve hücre dışı sıvılardan materyalin hızlı temizlenmesi nedeniyle beyinde çok az ilaç birikimi vardır (Huynh ve ark., 2006). Bu yolla verildiğinde birçok ilaç klinik çalışmalarda terapötik bir etki göstermiştir. Örneğin inme hastalarında bir nöroprotektif faktör nörotrofinin yavaş intravenöz uygulaması ile kortikal felç hacminde %70'lik bir azalma gözlenmiştir (Zhang ve Pardridge, 2001).

IV yol gibi intraarteriyel yol da doğrudan kana enjeksiyon yoluyla beyne alternatif ilaç uygulama yollarından biri olarak bulunmuştur. İntraarteriyel uygulama, ilacın ilk geçiş metabolizmasından kaçınarak periferik dokuya girmeden önce beyin damar sistemine erişmesine izin verir (Pardridge, 2003).

Transnazal uygulama, ilaç maddelerini ve peptitleri SSS'ye iletmek için KBE'yi atlamanın girişimsel olmayan bir yöntemidir. Yüksek geçirgenliğe sahip nazal epitel, yüksek kan akışı, gözenekli endotel membranı, geniş yüzey alanı ve ilk geçiş metabolizmasının engellenmesi nedeniyle beyne hızlı ilaç emilimine izin verir. Transnazal uygulama, bu yolun sık kullanımında nazal mukozanın hasar görmesi, mukosiliyer klirens sistemi ile burun boşluğundan hızlı klirens, burun tıkanıklığına bağlı müdahale gibi sınırlamalara sahiptir (Alam ve ark., 2010).

Kimyasal modifikasyon ile yağdaki çözünürlüğü artırmak

KBE'yi pasif olarak geçme yeteneği, moleküler boyutun 500 Dalton'dan az olmasına, yüke (düşük hidrojen bağlama kapasitesi) ve lipofilikliğe (ne kadar lipofilik olursa, taşıma o kadar iyi olur) bağlıdır (Gabathuler, 2010). Bu yaklaşım, suda çözünen moleküllerin, KBE'yi geçebilen yağda çözünen moleküllere kimyasal olarak dönüştürülmesinden oluşur. Bu, etken madde moleküllerinin polar uçlarına lipit grupları veya fonksiyonel gruplar eklenerek gerçekleştirilir (Bellettato ve Scarpa, 2018).

Şimerik peptitler

Bu yöntem, başka türlü taşınamayan bir ilacın bir disülfid bağıyla KBE'den taşınabilen bir peptit vektörüne (örneğin katyonize albümin, insülin, transferrin, vb.) kovalent olarak bağlanmasıyla şimerik bir peptidin yapılmasından oluşur. Böyle bir şimerik peptit daha sonra kapiler endotelial hücreler tarafından reseptör aracılı endositoz yoluyla alınır ve beyne taşınır, burada beyin disülfid redüktazların varlığı sayesinde farmakolojik olarak aktif terapötik peptit vektöründen ayrılabilir (Bellettato ve Scarpa, 2018). Konjuge edilen vektör endojen bir peptit, monoklonal antikor, modifiye proteinler veya peptit benzeri antikorlar olabilir (Pardridge, 2001b).

Ön ilaç

Ön ilaçlar biyolojik olarak aktif bileşiklerin kimyasal modifikasyonu ile oluşan aktif olmayan bileşikleridir. Bu yaklaşım genellikle hidrofilik ilaçların beyne verilmesi için kullanılmaktadır. Bunlar, biyolojik toksisiteye veya aktiviteye sahip olmayan büyük hacimli yapıya sahip bir ürün elde etmek için orijinal etken maddenin kimyasal olarak modifiye edilmiş, inert alternatifleridir (Alam ve ark., 2010). Hedef bölgeye ulaştıklarında enzimatik ve/veya kimyasal dönüşümlere uğrarlar ve yapılarını değiştirerek istenen farmakolojik etkiyi uygulayabilen biyolojik olarak aktif bir forma ulaşırlar (Bellettato ve Scarpa, 2018).

Katyonik proteinler

Beyne temel bir izoelektrik noktası olan protein ve peptitleri iletmek için en uygun tekniktir. Genel olarak, proteinler yüksek moleküler ağırlıktadır ve bu nedenle bu büyük boyutlarından dolayı KBE'yi geçemezler. Dolayısıyla bu yöntem onların beyin yüzeyindeki anyonik gruplarla kolayca etkileşime girmesini sağlayan katyonik formlara dönüşmesini sağlayarak bir avantaj oluşturur. Katyonizasyondan sonra, transselüler adsorptif aracılı endositoz yolu ile kolayca girerler. Katyonizasyon, bir polipeptit üzerindeki asidik amino asit kalıntılarının serbest karboksil gruplarını

modifiye ederek polipeptit üzerindeki net pozitif yükü artıran bir işlemdir (Pardridge, 2001a).

SSS’de yer alan taşıyıcı sistemlerin kullanımı

İlaçlar doğal KBE besleyici molekülleri için kullanılan taşıma sistemleri göz önünde bulundurularak, KBE’de bulunan reseptörleri tanıyan ligantların konjugasyonu ile modifiye edilebilirler. Burada reseptör aracılı endositoz taşıma mekanizması olarak kullanılır (Gabathuler, 2010).

Yeni ilaç taşıyıcı sistem yaklaşımları

Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerle olan yaklaşımlar beyne ilaç hedefleme açısından ideal bir yöntem düşüncesiyle ortaya çıkmıştır. Esas olarak küçük kolloidal partiküllerin kullanımını kapsamaktadır. Bu taşıyıcıların genel kabulünün temel nedeni kontrol edilebilir profilleri ve etken madde salımları ve seçici hedefleme mekanizmalarıdır (Alam ve ark., 2010). 1.3. numaralı başlıkta bu taşıyıcı sistemlerden ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

Biyoteknoloji temelli yaklaşımlar

Hedefleme için monoklonal antikorların kullanımı, genomik uygulamalar ve Truva atı teknolojisi biyoteknoloji temelli yaklaşımlar içerisinde yer almaktadır.

Antikorlar, KBE ligandlarına yüksek afiniteleri ve özgüllükleri nedeniyle reseptör aracılı transitoz sistemlerini hedeflemek için özellikle uygundur. Bu nedenle monoklonal antikorlar (mAbs), protein ve peptitlerin beyne hedeflendirilmesinde kullanılmaktadır. Genellikle hibridoma teknolojisi ile üretilirler ve direkt olarak kullanımları yerine genetik olarak modifiye edilmiş monoklonal antikorlar kullanılır (Alam ve ark., 2010; Pathan ve ark., 2009).

Truva atı teknolojisi reseptör aracılı taşıyıcı sistemler baz alınarak geliştirilmiştir ve bu reseptörlere hedeflendirilmek üzere hazırlanmışlardır. Bu teknoloji ile rekombinant proteinler, monoklonal antikorlar, antisens ilaçlar, siRNA ve nonviral gen ilaçlar gibi birçok büyük molekülün taşınabilmesine olanak sağlamıştır (Doğan ve ark., 2013).

Gen terapisi ve genomik uygulamalar terapötik işlevi olan rekombinant DNA'nın doğrudan belirli organların hücrelerine aktarılmasını içerir. Bu yol özellikle nöropatolojinin tüm beyne yayıldığı nörodejenatif koşullarda umut verici bir çözüm sunmaktadır (Bellettato ve Scarpa, 2018).

1.3. Kan-Beyin Engelinden Geçiş Artırmak İçin Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Tedavi seçenekleri etken maddelerin KBE'yi geçememeleri veya oral yolla zayıf çözünürlük göstermeleri nedeniyle sınırlıdır. KBE'yi aşabilmek için lipozom, katı lipit nanopartiküller (SLNs), polimerik nanopartiküller, miseller, nanoemülsiyonlar, nanojeller gibi birçok ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir (Fonseca-Santos ve ark., 2015). Lipozomlar ve nanopartiküller, hazırlanmalarının ve ölçek büyütmelelerinin daha kolay olması nedeniyle beyin ilaç taşınımı için yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmışlardır (Pathan ve ark., 2009).

Lipozomlar, tek veya çok tabakalı fosfolipid çift katmanlarla çevrelenmiş hidrofilik bir iç çekirdeğe sahip nano boyutlu veziküllerdir. Fosfolipit çift tabakasının bir kısmını oluşturan ortak bileşenler, doğal olarak üretilen sfingomiyelin, fosfatidilkolin veya gliserofosfolipidlerdir. İyi biyolojik uyumluluğun yanı sıra hidrofilik çekirdeğe etken madde yükleme olasılığıyla lipozomlar, terapötiklerin sistemik dağıtımı için geniş çapta araştırılmıştır (Qin ve ark., 2007).

Polimerik nanopartiküller, doğal veya sentetik polimerlerden yapılan, 1 ila 1000 nm çap aralığında değişen katı taşıyıcı araçlardır. İlaç yükleme yöntemlerine

göre, polimerik nanopartiküller yüklenen terapötik moleküller, termodinamik olarak stabil olan nanokapsüller (etken madde polimerik matrisin her yerine veya hemen yüzeyine yüklenir) veya nanokapsüller (etken madde polimerik bir kabuk ile çevrelenmiştir) oluşturabilir. Polimer çeşitliliğinin bir sonucu olarak, polimerik nanopartiküller, kontrollü ve / veya sürekli etken madde salım profili gibi istenen özellikleri elde etmek ve ayrıca belirli bir süre boyunca hedeflenen bölgede etken madde salımına izin vermek için tasarlanabilir. Bu nedenle, beyne ilaç iletimi için çeşitli polimerler ile oluşturulan nanopartiküller araştırılmıştır (Li ve ark., 2017).

Miseller, hidrofobik bir çekirdek ve hidrofilik bir yüzeye sahip kararlı küresel nanoyapılar oluşturmak için sulu çözeltilerde agretagat oluşturan ve amfifilik blok kopolimerlerden oluşan yapılardır. Lipofilik bileşikleri çözündürme olasılığının yanı sıra belirli hedefleme ligandlarıyla konjuge olma kapasitesinin bir sonucu olarak, miseller, beyne ilaç taşınmasında umut vaat edicidir (Zhang ve ark., 2012).

Nanojeller, hidrojellerin nanopartikülleridir ve bütün KBE boyunca ilaç taşınması olasılığı sunar. Yüzey yüklü nanojellerin hücre zarında nötr olanlara göre daha iyi içselleştirme özelliği sergilediği bildirilmiştir (Li ve ark., 2017).

Nanoemülsiyonlar, yüzey aktif maddelerle stabilize edilmiş su içinde yağ (Y/S) veya yağda su (S/Y) formülasyonlarının heterojen dağılımlarıdır; burada iç fazın çapı nanometre boyuta indirgenir. Hedefleme için yüzey modifikasyonu olasılığı, hidrofobik (Y/S nanoemülsiyonlar) veya hidrofilik (S/Y nanoemülsiyonlar) maddeleri çözme yeteneği, nanoemülsiyonların içerisine hapsediği etken maddelerin alımını hücrelerin reseptör aracılı endositozu yoluyla kolaylaştırabilir, bu nedenle nanoemülsiyonlar KBE'den ilaç taşınmasında için umut verici bir yaklaşımdır (Ganta ve Amiji, 2009).

Tez kapsamında katı lipid nanopartikül formülasyonlarının çalışılmasından dolayı nanopartikül ve katı lipid nanopartikül konularına daha ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

1.3.1. Nanopartiküller

Beyne yönelik nanopartikül temelli ilaç taşıyıcı sistemler, son yıllarda sürekli gelişen bir alandır. Nanopartiküller (NP) boyutları 1-1000 nm arasında değişen, lipid, polimer, metaller, fosfolipitler gibi birçok çeşitli materyalden sentetik olarak üretilen, fiziksel ve kimyasal özellikleri boyutları ve yapılarına bağlı olan katı kolloidal partiküllerdir. Bunlar, serebral endotel hücrelerle etkileşime giren, KBE'nin üstesinden gelebilen ve içinde kovalan bağlanan, çözünen, yüzeyde adsorbe edilen veya tutulmuş olan etken madde moleküllerini serbest bırakabilen yüksek verimli ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Krizbai ve ark., 2016; Psimadas ve ark., 2015).

Nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey özellikleri, parenteral veya oral uygulanan ilaçların hem aktif hem de pasif hedeflenmesini sağlamak için kolaylıkla değiştirilmektedir (Dinda ve Pattnaik, 2013). Nanopartiküllerin hedefleme ligantları ile yüzey modifikasyonlarının yapılması onlara KBE'den geçebilme özelliği kazandırmaktadır (Li ve ark., 2017). Aynı zamanda partiküllerin yüzeyinde ve boyutundaki değişiklikler KBE gibi bariyerleri aşmasını sağlarken, bunun yanı sıra partikülleri atılımdan koruyarak dolaşımdaki kalış süresini artırmakta ve böylece ilacın yarı ömrünü uzatmakta ve emilim bölgesinde kalma süresini uzatmaktadır (Psimadas ve ark., 2015; Sung ve ark., 2007).

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri, aynı zamanda KBE boyunca geçiş mekanizmasının hangisi olduğunu da belirler. Aşağıda belirtilen mekanizmalarla nanopartiküller KBE'den geçebilir:

- NP'ler, endotelial hücreler arasındaki sıkı bağları açar veya lokal toksik etkileri indükler, bu da KBE'nin lokalize olarak geçirgenliğini artırarak ilacın serbest formda veya NP'ler ile konjuge olarak penetrasyonuna izin verir.
- NP'ler endotel hücresinden transsitozla geçer.

- NP'ler endositoz ile endotelyal hücreler aracılığıyla taşınır, içerikleri hücre sitoplazmasına salınır ve ardından endotelyumun beyin tarafında eksositoza uğrar.
- Geçiş yukarıda belirtilen birkaç mekanizmanın kombinasyonu ile olabilir (Saraiva ve ark., 2016).

Bir nanopartikülün SSS'de ilaç taşınımında uygun olması için gereksinimler şu şekilde özetlenebilir:

- 200 nm'den az parçacık boyutu
- Hafif pozitif yüzey yükü
- Dolaşımdaki stabil olması. Kanda agrege olmadan stabilitesini koruması önemlidir.
- Azalmış sistemik ve beyin toksisitesi
- Biyoparçalanır ve biyolojik olarak uyumlu
- Düşük immünojenisite
- Kontrollü ve sürekli etken madde salınımı
- Farklı molekülleri (peptit, protein, nükleik asitler gibi) taşıyabilme için bunlara uygulanabilirliği (Chen ve Liu, 2012; Kaur ve ark., 2008; Krizbai ve ark., 2016).

1.3.2. Katı Lipit Nanopartiküller (SLN)

SLN'ler vücut sıcaklığında katı olan lipidlerden hazırlanan yeni nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Polimerik nanopartiküllere alternatif olarak geliştirilmişlerdir. SLN'ler çeşitli etken maddeler yüklenebilen kompakt bir matris halinde oluşturulan biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen lipidlerle elde edilen sulu kolloidal dispersiyonlardır. Polimerik nanopartiküllerin, yağlı emülsiyonların ve lipozomların avantajlarının kombine edildiği yapılar olan SLN'ler aynı anda bunların dezavantajlarından da kaçınmaktadır (De Rosa ve ark., 2012; Kaur ve ark., 2008; Lombardo ve ark., 2020). Bir SLN tipik olarak, stabilize edici yüzey

aktif maddeler ve katı lipitten oluşan küresel bir parçacıktır. Çekirdek lipitler genellikle yağ asitleri, gliseroller, mumlar veya bu maddelerin karışımlarıdır. Stabilizatörler, fosfolipitler, sfingomiyelinler, safra tuzları (sodyum taurokolat) ve steroller (örn. kolesterol) dahil olmak üzere biyolojik membran lipitleri olabilir (Nguyen ve ark., 2017). Modifiye edilmiş salım, iyileştirilmiş biyoyararlanım, kimyasal olarak kararsız moleküllerin bozulmaya karşı korunması, uygun maliyetli yardımcı maddeler ve geniş uygulama spektrumu gibi önemli avantajlar sergilerler (De Rosa ve ark., 2012).

SLN'ler yapıları itibariyle lipofilik KBE ile benzerlik göstermekte ve boyutlarının nispeten daha küçük olması, beyine etken madde taşınımında ve KBE'den geçişte avantaj sağlamaktadır. Birçok çalışmada peptit protein maddeler için uygun taşıyıcı oldukları, bu maddelerin stabilite ve in vivo performanslarını artırdıkları gösterilmiştir (Almeida ve Souto, 2007; Gastaldi ve ark., 2014).

SLN'lere ait diğer avantajlar aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır:

- 120-200 nm aralığındaki SLN'ler retikülo endotel sistem (RES) hücreleri tarafından alınmazlar ve böylece karaciğer ve dalak eliminasyonu atlatılır.
- İlaç yüklenmiş SLN'ler haftalarca kontrollü salım yapabilir ve spesifik ligantların bağlanması ve kaplamayla SLN'ler başarılı şekilde spesifik bölgelere hedeflenebilir.
- Yapılan çalışmalarda SLN'lerin diğer kolloidal taşıyıcı sistemlere göre daha uzun stabil kalabildiği görülmüştür. Ayrıca hapsettiği etken maddeyi de çevre koşullarından ve fiziksel/kimyasal degradesyondan koruyabilirler.
- Yüksek etken madde yükleme kapasitesi mevcuttur.
- Hem hidrofilik hem lipofilik etken maddelerin yüklenmesinde kullanılabilir. Düşük suda çözünürlük problemini ortadan kaldırabilirler.
- Taşıyıcı yağlar biyoparçalanabilir; bu nedenle toksik değildirler.
- Organik çözücü kullanmadan üretim yapılabilir.
- Büyük ölçekli üretime ve sterilizasyona uygundur (Gastaldi ve ark., 2014; Kaur ve ark., 2008; Nguyen ve ark., 2017).

Kuersetin AH'de olumlu etkileri olduğu gösterilmiş olan flavonoid grubundan bir polifenoldür. Yapılan bir çalışmada KBE'yi kolayca aşabilecek SLN'ler üretilmesi amaçlanmış ve kuersetin yüklü SLN'ler hazırlanmıştır. Elde edilen SLN'lerin partikül boyutu 200 nm'nin altında, zeta potansiyelleri 22 mV olarak bulunmuştur. Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalarda kuersetin yüklü SLN'lerle tedavi edilen sıçanların biyoyaralanımının artmasından dolayı, yalnızca saf kuersetin ile tedavi edilen sıçanlara kıyasla daha iyi hafıza tutma sergilediğini göstermiştir (Dhawan ve ark., 2011).

Kurkumin SSS hastalıklarının tedavisinde büyük bir potansiyeli olduğu bilinen terapötik bir ajandır ve AH için kullanılabilir. Ancak geleneksel yöntemler kullanılarak beyine iletiminin sağlanması oldukça zordur. Malvajerd ve ark. (2019), yaptığı çalışmada kurkumin yüklü SLN'ler beyindeki birikimi artırmak amacıyla hazırlanmıştır. Yapılan farmakokinetik çalışmalarda serbest kurkuminle karşılaştırma yapıldığında kurkumin yüklü SLN'lerin beyinde tatmin edici miktarda olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu taşıyıcı sistemin beyne ilaç iletilmesinde potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Sadegh Malvajerd ve ark., 2019).

Bir AChE inhibitörü olan galantamin hidrobromürün, kolinerjik yan etkileri ve zayıf beyin penetrasyonu ve buna bağlı olarak hedef bölgede daha düşük biyoyaralanımı gibi sınırlamaları nedeniyle biyobozunur ve biyo-uyumlu bileşenler kullanılarak SLN formülasyonu geliştirilmiştir. İn vivo değerlendirmeler, bilişsel eksiklik olan sıçanlarda saf etken madde ile karşılaştırıldığında önemli hafıza yenileme kabiliyetinin arttığını göstermiştir. SLN taşıyıcılar, serbest etken maddenin yaklaşık iki katı biyoyaralanım sağlamıştır. Bu nedenle, SLN'lerin AH'de güvenli ve etkili ilaç taşınımı için umut verici bir araç olabileceği belirtilmiştir (Misra ve ark., 2016).

1.3.2.1.Katı Lipit Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri

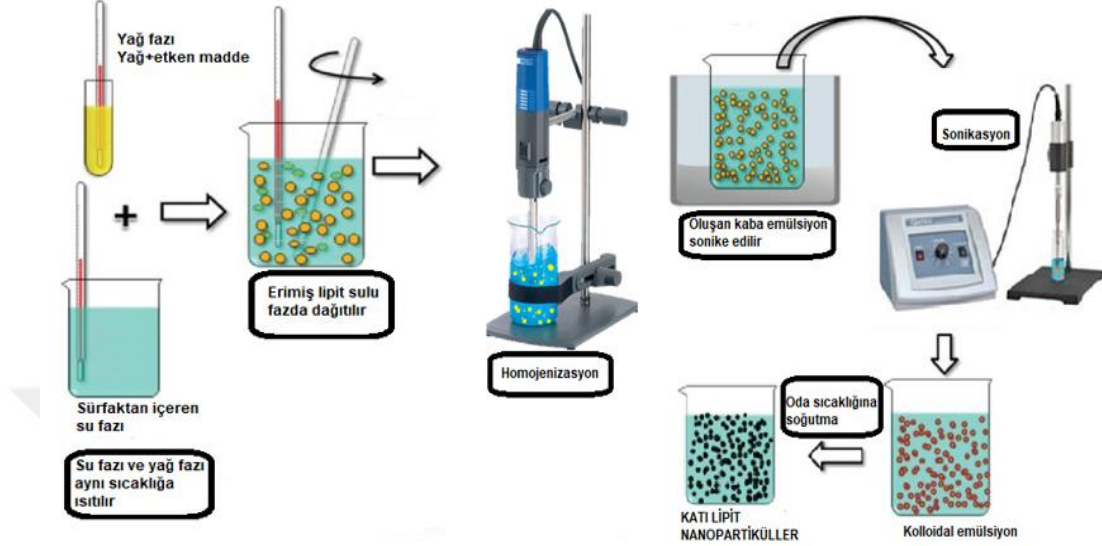
SLN'ler lipit, emülgatör ve su veya solvan kullanılarak aşağıdaki metotlar ile üretilbilirler:

- Yüksek basınçlı homojenizasyon (Sıcak-Soğuk homojenizasyon)
- Ultrasonikasyon/homojenizasyon
- Çözücü buharlaştırma metodu
- Çözücü emülsifikasyon-difüzyon metodu
- Süperkritik akışkan sıvı metodu
- Püskürterek kurutma
- Çift emülsiyon metodu
- Çöktürme tekniği
- Mikroemülsiyon (Fonseca-Santos ve ark., 2015; Prabhakaran ve ark., 2011).

Ultrasonikasyon-homojenizasyon tekniği SLN hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Özellikle laboratuvarda SLN hazırlamak için kullanılan basit, hassas ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Küçük partikül boyutu elde edebilmek için bu iki ayrı teknik kombine halinde kullanılır. Bu tekniğin avantajlarını sıralayacak olursak, kayma gerilimini azaltır, böylece üretim sırasında oluşan stres azalır (Manjunath ve ark., 2005; Mishra ve ark., 2018; Prabhakaran ve ark., 2011). Bir diğeri kullanılan ekipmanın laboratuvar ölçeğinde yaygın olarak bulunabilmesidir (Garud ve ark., 2012). Ayrıca bu yöntem sırasında organik çözücü kullanımına gerek kalmamaktadır. Uygulama sırasında belli bir süre boyunca yüksek sıcaklık uygulanmaktadır (Mukherjee ve ark., 2009). Yöntemde bir diğerk çok kullanılan yöntem olan yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemine kıyasla daha az miktarda lipit, sürfaktan ve çözücü kullanılır, bu da önemli bir avantaj olarak görülmektedir (Tapeinos ve ark., 2017).

Yöntemi kısaca özetlemek gerekirse lipit erime noktasının genelde 5-10 °C üzerine kadar ısıtılır ve eritilir. Kullanılacak etken madde çözünürlük özelliğine göre sulu fazda çözünebilir veya lipit faza ilave edilerek disperse edilebilir. Sürfaktan içeren sulu faz da lipit ile aynı sıcaklığa ısıtılır (yaklaşık 70-80°C). Daha sonra su fazı yağ fazı aynı sıcaklıkta karıştırılır ve homojenizatör yardımı ile kaba emülsiyon oluşumu sağlanır. Ardından partikül boyutunu küçültmek amacıyla sonikasyon işlemine tabi tutulur ve böylece nanoemülsiyon elde edilir. Bu emülsiyon oda sıcaklığına

soğutulduğunda SLN'ler oluşmuş olur (Tan ve ark., 2017). Yöntem Şekil 1.5'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.5. Ultrasonikasyon-homojenizasyon yöntemi ile SLN üretimi.

1.4. Katı Lipit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

1.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Bu parametre nanopartikülleri diğer ilaç dağıtım sistemlerinden ve kaba tozdan ayıran çok önemli bir parametredir (Jain ve Thareja, 2019). Partikül büyüklüğü nanopartikülün fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır; bu nedenle karakterizasyonunda özellikle göz önünde bulundurulmalıdır (Akabri ve ark., 2011). Ayrıca SLN'lerin fiziksel stabiliteleri de partikül boyutuna bağlıdır (Garud ve ark., 2012). Partikül boyutu ve dağılımı nanopartikül-hücre membranı etkileşmesi ve KBE'den nanopartikülün geçebilmesini önemli ölçüde etkilemektedir (Comoglu ve ark., 2017; Küçüktürkmen ve Bozkır, 2018).

Partikül boyutu 120-200 nm aralığındaki SLN'ler RES tarafından alınmazlar ve böylece karaciğer ve dalak eliminasyonu atlatılır (Nguyen ve ark., 2017). Bunun yanında KBE'den geçiş için partikül boyutunun 200 nm altında olması gerekmektedir (Kaur ve ark., 2008). Bu nedenle boyutun belirlenmesi, SLN'ler için önemlidir.

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı (LD), partikül boyutunun belirlenmesi için rutinde en çok kullanılan tekniklerdir. PCS (dinamik ışık saçılımı olarak da bilinir), parçacık hareketinin neden olduğu saçılan ışığın yoğunluğundaki dalgalanmayı ölçer, bu dalgalanma partikül çapı ile ilişkilidir. PCS ile partikül boyutunu belirlerken, 3 nm ila 3µm boyut aralığını tespit eder (Garud ve ark., 2012; Jain ve Thareja, 2019).

SLN'ler doğası gereği polidispers bir yapıdadır. Partiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı aralığı, polidispersite indeksi olarak tanımlanmaktadır. Partiküllerin ortalama büyüklük çevresindeki dağılımlarının bir göstergesidir. Polidispersite indeksi PCS yöntemiyle ölçülebilir. Bu aralığın dar ya da geniş olması SLN'lerin davranışını etkilemektedir. Küçük partiküller yanında yer alan büyük partiküller, kolloidal dispersiyon içerisindeki lipit ve etken madde yüzdesinin büyük bir kısmını kaplayabilir ve bu durumda sistemin her tarafında aynı etki gözlenmez. Büyük partiküller aynı zamanda koalesansa yatkındırlar. Bu nedenle geniş partikül büyüklüğü dağılımı, stabilitenin azalmasına da neden olacaktır. Polidispersite indeksinin (PI) küçük olması, partiküllerin benzer boyutlara sahip olduğunu ve sistemin bu açıdan homojen olduğunu ifade etmektedir, daha küçük değerler daha monodispers sistemleri işaret eder. Çoğu araştırmacı SLN'ler için 0,3'ten küçük PI değerlerini uygun kabul eder (Das ve Chaudhury, 2011).

1.4.2. Zeta Potansiyeli

Kolloidal partiküller dispersiyon ortamında iyon adsorbe ederek pozitif ve negatif yüklenirler. Her partikül yüküne göre tam tersi iyonlarla sarılır ve oluşan bu tek tabakalı yapının etrafında partikülden bağımsız olarak ikinci hareketli bir tabaka

yer alır. Bu ikinci tabakaya hareketli difüze çift tabaka denir. Partikülün yüzeyinin potansiyeli ile çift tabakanın dışındaki nötral alan arasındaki potansiyel farka zeta potansiyeli denir (Çelebi, 2009).

Zeta potansiyeli SLN'ler için önemli bir ürün özelliğidir; çünkü yüksek zeta potansiyeli değerlerinde partiküllerin sterik stabilizörler ve hidrofilik yüzey ajanları gibi diğer karmaşık faktörlerin yokluğunda agrege olmaması beklenir. Genellikle zetametre ile ölçülür (Mukherjee ve ark., 2009). Zeta potansiyeli değeri kolloidal dispersiyonların saklama koşullarındaki stabiliteleri ile ilgili tahminlere olanak sağlamaktadır (Garud ve ark., 2012). Zeta potansiyeli ayrıca azaltılmış RES alımıyla dozaj formunun tasarlanmasına yardımcı olur. RES alımını azaltmak için partikül yüzeyinin hidrofilik olması gerekir (Manjunath ve ark., 2005).

Genel olarak, $\pm 30\text{mV}$ 'den büyük zeta potansiyeli, elektrik itme nedeniyle parçacıklar arasındaki teması bloke ederek nano taşıyıcıların dağılımını stabilize eder. Ayrıca, NP'lerin yüzeysel elektrik potansiyeli, bitişik partiküllerle (komşu NP'ler dahil) ve biyolojik sistemle etkileşimi değiştirdiği için özellikle formülasyonda son derece önemlidir (Jain ve Thareja, 2019).

Zeta potansiyeli sıklıkla lazer doppler anemometresi ile belirlenir. Nanopartiküllerin seyreltilmiş süspansiyonundan zayıf bir elektrik alanı geçirilir ve elektroforetik hareketliliği hesaplamak için kullanılan bir frekans kayması için saçılan ışık gözlemlenir. Ek olarak, elektroforetik ışık saçılımı, zeta potansiyelinin belirlenmesine olanak sağlayan bir elektrik alanı altında partikül hızını belirlemek için kullanılır (Jain ve Thareja, 2019).

1.4.3. Etken Madde Yükleme Kapasitesi

Başarılı bir nanopartikül ilaç taşıyıcı sistem, matris oluşumu için ihtiyaç duyulan materyallerin miktarını azaltmak için yüksek bir etken madde yükleme kapasitesine sahip olmalıdır (Dinda ve Pattnaik, 2013). Etken maddenin salım profilini

etkilediği için SLN'deki en önemli karakteristik özelliklerindendir. Nanopartiküllerin birim ağırlığı başına enkapsüle olmuş etken madde miktarı, tutulan ilacın SLN formülasyonundan ayrılmasından sonra belirlenir. Bu ayırma, ultrasantrifüjleme, santrifüj filtrasyonu ve/veya jel geçirgenlik kromatografisi gibi teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir (Prabhakaran ve ark., 2011). Sulu fazda etken madde konsantrasyonunun analiz edilmesi enkapsülasyon etkinliğini verir (Manjunath ve ark., 2005). Yüklenen etken madde miktarı, SLN süspansiyonunun santrifüj filtrasyonundan/ultrasantrifüjünden sonra süpernatantta kalan etken madde miktarının belirlenmesiyle veya nanopartikül sedimenti uygun çözücüde çözülüp etken madde miktarı analiz edilmektedir (Kaur ve ark., 2008).

1.4.4. İn Vitro Salım (Çözünme Hızı)

Çözünme hızı belli bir zaman diliminde çözünen madde miktarıdır ve kinetik bir olaydır, Noyes-Whitney ve türevi denklemler ile ifade edilir (Takka ve ark., 2009). İn vitro çözünme hızı testleri genellikle ilaç geliştirme aşamasında insanlarda biyoyararlanımını ön görmeye yarayan testlerdir. İlacın performansı ve kalitesi ile ilgili fikir vermektedir. Katı farmasötik şekil içindeki etken maddenin yapay bir ortamda, belirli deney koşulları altında çözünme hızı saptanır. Testin sonucunda belirli bir sürede farmasötik şekil içindeki etken maddenin çözünen yüzde miktarı değerlendirilir. Genellikle uygun formülasyon geliştirmede, geliştirilen formülasyonun seriler arasındaki benzerliğinin tespiti, in vivo'daki performansı değerlendirmek ve biyoyararlanım veya biyoeşdeğerlik (BE) çalışması yapılmış seriye uygun üretimin devamını sağlamak için in vitro çözünme hızı çalışmaları yapılmaktadır (Storey, 1996; Yılmaz Usta ve Teksin, 2015).

SLN'lerde etken madde salımı, etken maddenin lipit matriksten difüzyonuna ve lipit matriksin in vivo parçalanmasına bağlıdır. Polimerik nanopartiküllerin aksine SLN'ler kanda lipaz enzimi ile parçalanabilirler ve bu da etken madde salınımına olanak verir (Manjunath ve ark., 2005).

1.4.5. Morfolojik İnceleme

SEM ve TEM nanopartikülleri direkt olarak gözlemlemeye ve morfolojik incelemeye olanak sağlar. Bu teknikler aynı zamanda partikül boyutu ve dağılımının tespitinde de kullanılabilir. Numuneden yayılan elektronlar ve numuneden geçen elektronlar sırasıyla SEM ve TEM'de görüntü oluşumu için kullanılır. TEM ile daha küçük boyuttaki partiküller incelenebilir, tespit limiti daha aşağıdadır, diğer metotlara göre validasyonu daha iyidir (Sarangi ve Padhi, 2016). TEM, SEM'in aksine daha yüksek bir çözünürlük gösterir; bu nedenle genellikle NP'lerin morfolojisini incelemek için kullanılır (Jain ve Thareja, 2019). SLN'lerin kabuk-çekirdek yapısını daha net görüntülemek için TEM'de örneklerin hazırlanması sırasında üranil asetat ve fosfotungstik asit gibi boyalar kullanılabilir (Das ve Chaudhury, 2011; Mandal ve ark., 2013).

1.4.6. Termal İnceleme

SLN'lerin kristallliği ve polimorfik davranışı, etken madde yüklenmesini ve salım oranlarını güçlü bir şekilde etkiler. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), camsı geçiş ve erime noktası sıcaklıklarının ve bunlarla ilişkili entalpilerinin ölçülmesi yoluyla nanopartiküllerin kristal yapısını belirlemek için kullanılabilir (Sarangi ve Padhi, 2016). DSC, farmasötik araştırmada malzemelerin yapısal modifikasyonlarının ölçülmesine dayanan, ısı alımı (eritme ile ilgili) veya ısı emisyonu (kristalizasyonda yer alan) gibi ısı değişimlerinin eşlik ettiği bir yöntemdir. Bu teknik, kontrollü sıcaklık programları altında gerçekleşen ve bir malzemenin fiziksel niteliklerine ilişkin bulguları göstermeye olanak sağlayan ısı değişimlerini hesaplamayı amaçlamaktadır (Jain ve Thareja, 2019). DSC deneyleri, katı çözeltiler, basit ötektik karışımlar veya etken madde ve lipit etkileşimleri gibi katı dağılımları ve farklı lipitlerin karışım davranışını anlamak için yararlıdır. DSC analizinin sunduğu bu olanak olası etken madde-yardımcı madde ya da yardımcı madde-yardımcı madde etkileşimleri anlayabilmek açısından formülasyon çalışmalarında avantaj sağlayabilir (Manjunath ve ark., 2005).

1.4.7. Sterilizasyon

Parenteral uygulama için SLN'ler steril olmalıdır. Otoklavlama ile sterilizasyon sırasında yüksek sıcaklık ulaşılması, otoklavda muhtemel bir mikroemülsiyonunun oluşmasına neden olur ve büyük olasılıkla sıcak nano damlacıkların boyutunu değiştirir. Hemen ardından yapılan yavaş soğutmada, SLN yeniden şekillenir, ancak bazı damlacıklar birleşerek SLN'nin ilk üretildiği zamankinden daha büyük partiküller oluşturabilir. SLN sterilizasyondan önce yıkandığından, sıcak sistemde bulunan yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde miktarları daha azalabilir, bu durumda nano damlacıklar yeterince stabilize edilemeyebilir. Yapılan çalışmalarda genellikle otoklav sterilizasyonundan sonra partikül boyutunun büyüdüğü bulunmuştur. Bu nedenle aseptik üretim yapılması ve partikül boyutu 0,2 µm altında ise filtrasyonla devam edilmesi düşünülebilir (Mehnert ve Mader, 2001; Prabhakaran ve ark., 2011; Sarangi ve Padhi, 2016).

1.4.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR spektroskopisi bir örneğin IR radyasyonu absorpsiyonunun, yoğunluğunun ve dalga boyunun ölçüldüğü bir yöntemdir. Moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekansları bu yöntemle ölçülebilmektedir ve böylece moleküldeki fonksiyonel gruplara dair fikir vermektedir (Kong ve Yu, 2007). Bu yöntem küçük moleküller için sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasının yanı sıra proteinlerin sekonder yapısı ile ilgili fikir vermektedir ve sekonder yapı analizi için kullanılmaktadır (Bunaciu ve ark., 2014). Polipeptit ve proteinlerin sekonder yapı analizinde 1650 cm⁻¹ civarında absorpsiyon veren amit I bandı, analize daha duyarlı olması nedeniyle ile kullanılmaktadır. Amit I vibrasyonunun sekonder yapıya olan bu hassaslığı sayesinde IR spektroskopisi ile protein yapısındaki katlanma, açılma ya da agregasyon hakkında bilgi edinilmektedir (Barth, 2007).

FTIR spektroskopisi hazırlanan SLN formülasyonlarında etken madde ve yardımcı maddeler arasındaki moleküler etkileşimi incelemek için de kullanılmaktadır. Etken madde ve yardımcı maddelere ait ana keskin ve karakteristik fonksiyonel grup pikleri SLN'ler hazırlandıktan sonra yapılan analizle yardımcı maddeler ve etken madde arasındaki kimyasal geçimlilik ile ilgili fikir vermektedir, bu nedenle formülasyon gelişimi sırasında bu analizin yapılması önerilmektedir (Newton ve Kaur, 2019).

1.4.9. Stabilite

Uzun süreli saklama sırasında SLN'lerin fiziksel özellikleri, zamana bağlı olarak zeta potansiyeli, partikül boyutu, etken madde içeriği, görünüm ve viskozitedeki değişiklikler izlenerek belirlenebilir. Sıcaklık ve ışık gibi harici parametreler, uzun süreli stabilite için birincil öneme sahiptir. 4° C en uygun saklama sıcaklığıdır; 20° C'de uzun süreli saklanan SLN'lerde yapılan incelemelerde, etken madde yüklü SLN'lerde agregasyon veya etken madde kaybı gözlenmemiştir. 50° C'de partikül boyutunda hızlı bir büyüme gözlenmiştir (Prabhakaran ve ark., 2011).

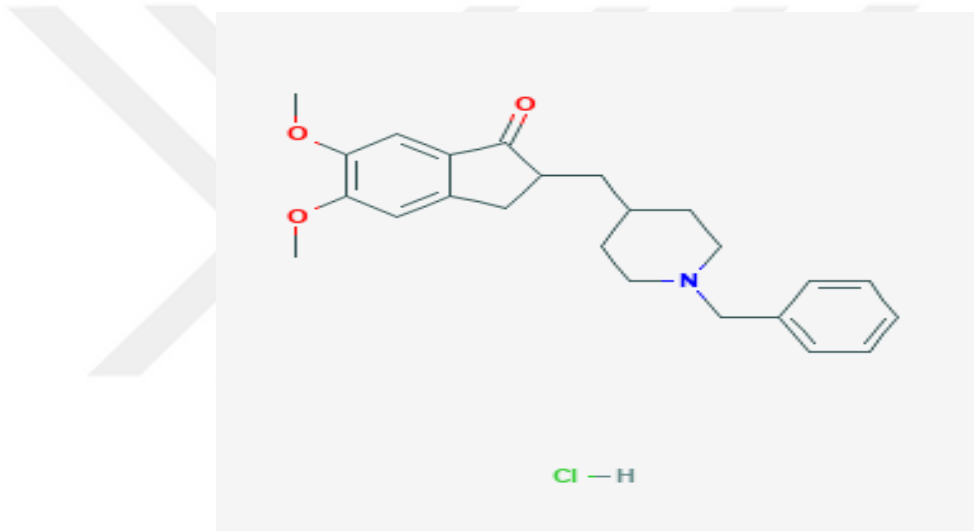
1.5. Etken Madde

1.5.1. Donepezil HCl

Donepezil hidroklorür beyinde predominant kolinesteraz olan asetilkolinesterazın selektif ve geri dönüşlü (tersinir) bir inhibitörüdür. Donepezil, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) AH için onaylanan ikinci antikolinesterazdır ve 1996'dan beri mevcuttur. Yapılan çalışmalarda hafiften ağır seyirliye kadar Alzheimer'lı hastalarda bilişsel özellikleri iyileştirdiği bulunmuştur (Chinthapalli, 2017; Korabecny ve ark., 2014).

Fizikokimyasal özellikleri

- *Kimyasal ismi:* (±)-2,3-dihidro-5,6-dimetoksi-2-[[1-(fenilmetil)-4 piperidinil]metil] –1*H*-inden-1-hidroklorür
- *Moleküler formülü:* C₂₄H₂₉NO₃HCl
- *Molekül ağırlığı:* 415.96
- *Görünüm:* Beyaz kristal toz
- *Çözünürlüğü:* Kloroformda serbestçe çözünür, suda ve glasiyel asetik asitte çözünür, etanol ve asetonitrilde hafif çözünür, etil asetat ve n-hekzanda pratik olarak çözünmez (FDA-CDER, 2009).



Şekil 1.6. Donepezil HCl kimyasal yapısı.

Farmakodinamik özellikleri

Alzheimer tipi demanslı hastaların katıldığı klinik çalışmalarda hastalara 5 mg veya 10 mg'lık donepezil hidroklorür günde tek doz olarak uygulanmış ve dozu takiben yapılan eritrosit membranlarında yapılan ölçümlerde sırasıyla %63,6 ve %77,3'lük asetilkolinesteraz aktivitesinin kararlı durum inhibisyonu gözlenmiştir (RxMediaPharma, 2020).

Farmakokinetik özellikleri

Donepezil iyi absorbe olabilen bir maddedir. Maksimum konsantrasyonuna uygulamadan yaklaşık 3-4 saat sonra ulaşır. Absorbsiyonu 3-5 saat sürer ve CYP 450 enzimlerinin 2D6 ve 3A4 izoenzimleri ile metabolize olur ve glukuronidasyona uğrar. Yarı ömrü çok uzundur yaklaşık 70 saattir. Donepezil hidroklorür yaklaşık olarak %95 oranında plazma proteinlerine bağlanır (RxMediaPharma, 2020; Samanta ve ark., 2006).

Endikasyonları

Donepezil hafif ve orta şiddette Alzheimer tipi demansın semptomatik tedavisinde endikedir (RxMediaPharma, 2020).

Tedavi dozu ve uygulanması

Donepezil günde bir kez uygulanan tek asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Kolay bir doz artırma programı mevcuttur. Başlangıç dozu günde 5 mg yatma vakti önerilir ve 4-6 haftadan sonra günlük 10 mg doza kadar çıkılabilir (Samanta ve ark., 2006).

Donepezil'in yan etkileri

Donepezil'in yan etkileri doz bağımlıdır hafif ve genellikle gastrointestinal sistem ile ilgilidir. En çok rapor edilen yan etkileri gastrointestinal sistemle ilgili olarak bulantı, kusma, diyare iken SSS ile ilgili baş ağrısı, uykusuzluk ve baş dönmesidir. Bu yan etkiler tipiktir, hafif seyirlidir ve geçicidir. Seyrek olarak huzursuz bacak, kekeleme, idrar kaçırma ve purpurik döküntüye neden olduğu bildirilmiştir (Samanta ve ark., 2006). 24 hafta boyunca 10 mg dozda donepezil kullanan hastalarda %5 anoreksi, %29 diyare, %3, baş dönmesi, %5 halüsinasyon, %7 kaslarda kramp, %9 bulantı ve %8 kusma görülmüştür. Görülen yan etkilerden dolayı bazı olgularda hasta ilacı bırakmak zorunda kalabilir (Chinthapalli, 2017).

Donepezil'in AH'de kullanımına ve etkisine yönelik araştırmalar

Yapılan alışmalarda Donepezil'in hastalığa olan kolinerjik etki ve katkılarının yanında A β 'nın nöral toksisitesini azalttığı ve APP prosesini de etkilediği gösterilmiştir. A β oluşumunda APP'nin toksik N-terminal bölgesinin maruziyet sürecine müdahale ederek etki gösterir ve kaskadın nörodejenerasyona başlamasını önlediği düşünölmektedir (Jacobson ve Sabbagh, 2008).

Rodent PC12 hücrelerinde, Donepezil'in A β (25–35) fragmanının nörotoksitesini zayıflattığı gösterilmiştir (Nordberg ve Svensson, 1998).

Rodent septal nöron kültüründe, Donepezil'in kolinerjik nöronları A β (1–42) maruziyetinden koruduğu bulunmuştur (Kimura ve ark., 2005).

APP prosesiyle ilişkili bir trombosit modelinde, Donepezil ile 30 günlük tedavinin α -sekretaz klivajını arttırdığı ve β -sekretaz klivajını azalttığı, böylece nörotoksik son ürünlerin oluşumunu azalttığı bulunmuştur (Zimmermann ve ark., 2005).

Sinaptik plastisitenin kolinerjik modülasyonu üzerinde Donepezil'in etkilerine bakıldığında, Donepezil'in bozunmayı uzun vadede önlediği ve nikotinik reseptörlerin hipokampal ve neokortikal sayılarını arttırdığı gösterilmiştir (Barnes ve ark., 2000). Yapılan başka bir PC12 hücre kültürü alışması Donepezil'in hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazın aktivasyonunu artırarak nöronal farklılaşmayı güçlendirdiğini göstermiştir (Oda ve ark., 2007).

Donepezil yüksek doku seçiciliğine sahip olmasına rağmen, kan-beyin engelini (KBE) tam olarak geçemez. Kolinesterazın periferel inhibisyonu, bir dizi yan etkiye neden olur. Yüksek dozda Donepezil, gastrointestinal rahatsızlık, mide bulantısı, kusma, ishal ve kas krampları gibi çeşitli yan olaylara yol açabilir (Berk ve Sabbagh, 2012).

Donepezil, FDA tarafından piyasada onaylanmış ve klinikte yaygın olarak uygulanan etkili, güvenli, tolere edilen ve anlamlı bir ilaç olmasına rağmen halen çeşitli sorunları bulunmaktadır. Yalnızca AH ilerlemesini geciktirebilir ve semptomları hafifletebilir ancak seyri sona erdiremez veya bilişsel disfonksiyonu tamamen ortadan kaldıramaz. Ayrıca Donepezil'in 6-12 ay süren genel ve günlük kullanımda fayda sağladığı gösterilmiştir. Diğer bir deyişle Donepezil, şiddetli ve ilerlemiş AH'nin tedavisinde çok sınırlı bir potansiyel sergilemektedir. Bu nedenle Donepezil'in etki süresini uzatmaya yönelik çabaya hala acil ihtiyaç vardır (Li ve ark., 2018).

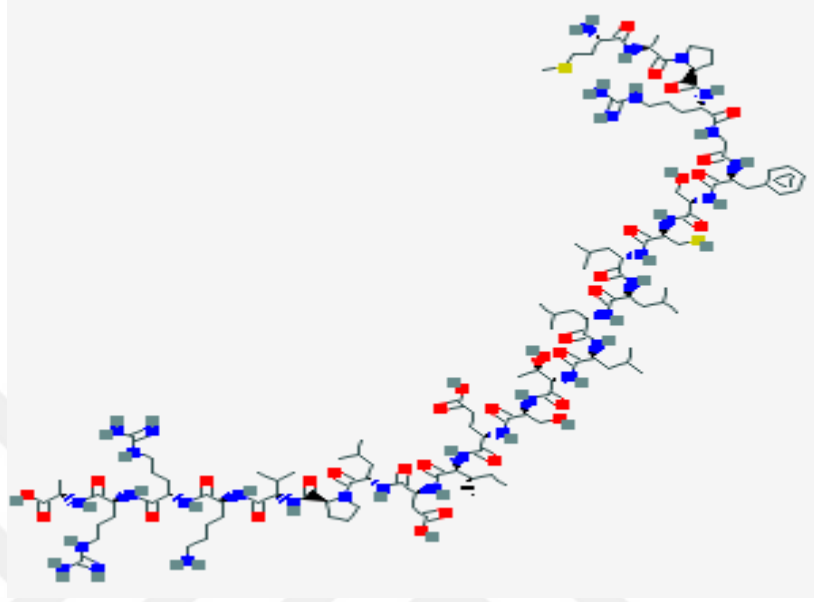
1.5.2. Humanin

Bir Alzheimer'lı hastanın beyninin hastalıktan etkilenmemiş kısımlarındaki çeşitli yaşamsal faktörleri araştıran Hashimoto ve ark. (2001), Humanin (HN) adlı peptiti keşfetmişlerdir. Humanin nöroprotektif bir ajandır. Görünüşte AH'li bir beynin hastalıktan etkilenmemiş normal bölgesinden alınan bir cDNA'dan izole edilmiştir ve 24 aminoasitlik bir peptiti kodlayan bir genden oluşur. Bu peptit nöron hücresine transfekte olduğunda A β 42'den dolayı oluşan sitotoksositeye karşı hücreyi korur. Hem sentetik hem de sekrete Humanin'in bu etkiyi gösterdiği ve Humanin etkisinin hücrel reseptörleri de kapsadığı saptanmıştır (Hashimoto ve ark., 2001; Yen ve ark., 2013; Ying ve ark., 2004). Humanin hem dolaşımda hem de hücre membranlarında tespit edilmiştir. Endotel hücreler, glial hücreler ve üreme hücreleri de dahil olmak üzere fizyolojik koşullarda birçok hücre tipinde bulunmuştur. Spesifik reseptörler aracılığı ile etkilerini gösterir. Metabolik hızı yüksektir, birçok dokuda lokalizedir ve yaşla birlikte ekspresyonu azalır (Gurunathan ve ark., 2019; Zárata ve ark., 2019).

Gly14-Humanin, Humanin'in bir varyantıdır ve Ser14 yerine Glisin substitüsyonu ile elde edilir ve Humanin'e göre 1000 kat daha aktif olduğu gösterilmiştir (Niikura ve ark., 2004; Nishimoto ve ark., 2004).

Sekansı

MAPRGFSCLLLLTSEID



Şekil 1.7. Humanin yapısı.

Etki mekanizması

Apoptozisi kontrol eden bir protein olan BCL-2-benzeri protein 4 (BAX)'e bağlanarak apoptozisi baskılar. BAX'ın sitozolden mitokondriye translasyonunu önler. İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 (IGFBP3)'e bağlanır ve spesifik olarak IGFBP3'e bağlı hücre ölümünü bloke eder. Formil peptid benzeri reseptör-2 (FPR2) aracılığıyla mononükleer fagositlerin kemotaksizini tetikler. APP'nin mononükleer fagositler üzerindeki etkisini baskılar ve G proteinine bağlı formilpeptid reseptörü-1 (FPRL1)'i yarışmalı olarak inhibe eder ve böylece agregasyon ve fibrilasyon oluşumunu azaltır (Yen ve ark., 2013; Ying ve ark., 2004). Ek olarak, çalışmalar sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT3) aktivasyonunun HN aktivitesi için gerekli olduğunu göstermektedir. HN, STAT3 sinyal yolunu aktive etmek için bir sitokin reseptörü olan glikoprotein-130 (GP130) aracılığıyla hareket etmektedir. Bu nedenle GP130 sinyallemedeki bir artışın AH'de

faydalı olabileceği öne sürülmektedir. Araştırmacılar, HN'nin anti-AH terapötik yararlarının, monomerik A β kalıntıları ile etkileşimin, A β oligomerizasyonunun önlenmesine yol açtığını ve bunun da nörolojik koruma sağladığını bildirmişlerdir (Alam ve ark., 2018).

Farmakodinamik özellikler

HN, apoptoz, hücre sağ kalımı, lipit akışı ve inflamasyon gibi çeşitli biyolojik süreçlerde kritik rol oynar. Çeşitli çalışmalar, HN'nin nöronlar, pankreas β hücreleri, testiküler germ hücreleri, Leydig hücreleri ve rat hipofiz hücre hattı olan GH3 hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde sitoprotektif etkilerini göstermiştir. HN, sitoprotektif etkilerine ek olarak, BAX ve B hücreli lenfoma-2 (BCL-2) gibi BCL-2 aile üyelerinin iç kaynaklı mitokondriyal yolunu ve ekspresyonunu ve hücre içi konumunu modüle ederek antiapoptotik aktivite gösterir. HN, proapoptotik BCL-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girer ve bunların BAX gibi mitokondriyal proteinlere translokasyonunu engeller, böylece apoptozom oluşumunu ve kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe eder (Gurunathan ve ark., 2019). HN, nöronları in vitro ve in vivo oksijen-glikoz yoksunluğu, hipoksiye bağlı hücre ölümü ve serebral enfarktüstten kaynaklanan oksidatif stres kaynaklı hasara karşı korur (Zarate ve ark., 2019).

Humanin ile yapılmış çalışmalar

HN, monomerik A β (1–42) agregasyonunu fibrillere önemli ölçüde inhibe edebilir ve önceden oluşmuş A β (1–42) fibrilleri destabilize edebilir. Yapılan bir çalışmada HN, A β (1–42) fibril oluşumunu inhibe etmede ve önceden oluşturulmuş A β (1–42) fibrilleri bozmada etkili bulunmuştur. Ayrıca, HN ile tedavi edilen monomerik veya fibriler A β (1–42)'nin, PC12 hücreleri üzerinde A β (1–42) aracılı sitotoksik etkileri önemli ölçüde azalttığı MTT testi ile bulunmuştur. Sonuçlar HN'nin sadece A β (1–42) fibril oluşumunu inhibe etmekle kalmayıp, aynı zamanda önceden oluşturulmuş A β (1–42) fibrilleri de ayrıştırdığını göstermiştir; bu HN'nin anti-A β agregasyonu ve fibrillogenez ve fibril stabilize edici özelliklere sahip olabileceğine dair yeni kanıtlar sağlar; bu nedenle HN, AH'nin önlenmesi ve/veya tedavisi için çok

hedefli bir ajan olarak umut verici terapötik potansiyele sahip olabilir (Zhang ve ark., 2014).

Gotoh ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada, HN'nin oksidatif stres, serum açlığı ve hipoksi dahil çeşitli hasarlara karşı koruyucu bir faktör olarak davrandığını göstermiştir.

HN ve türevlerinin A β nedenli uzamsal öğrenme ve hafıza bozuklarını ratlarda uzun dönemde sinaptik protein ekspresyonu, dendritik dal sayısını etkileyerek önlediği bulunmuştur.

Yuan ve ark. (2016), ratlar üzerinde yaptıkları benzer bir çalışmada A β 'nin neden olduğu öğrenme ve hafıza sorunlarına yönelik Gly-14-Humanin etkisini incelemişlerdir. A β nedenli öğrenme ve hafıza bozukluklarına karşı ratları koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca A β 'den dolayı bozulan STAT3 aktivitesinin de korunduğu görülmüştür.

Chiba ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada Humanin'in presinaptik asetilkolin seviyelerini ve postsinaptik muskarinik M1 reseptör aracılı sinyal transdüksiyonlarını artırarak, kolinerjik nörotransmisyonu yukarı regüle ettiğini ve sonuçta kolinerjik nöronların işlev bozukluğunun neden olduğu bilişsel bozukluğun baskılanmasına yol açtığını göstermişlerdir.

1.6. Hedeflendirme İçin Kullanılan Ajanlar

SLN'ler, KBE'yi geçebilir; ancak ilaç birikiminde yalnızca sınırlı bir artışa yol açar. Son yıllarda, KBE ilaç hedefleme stratejileri geliştirmek için biyoloji temelli yaklaşımlar önerilmiştir. KBE içindeki farklı endojen nakil sistemlerinden yararlanarak beyne ilaç ulaştırmak, ilaç dağıtım sistemlerinin yeniden formüle edilmesini gerektirir. Spesifik ligantlar ile modifiye edilmiş SLN'ler spesifik bir hedefe taşınmayı sağlayabilir. SLN'lerin bu şekilde aktif hedeflendirme mekanizmaları

kullanılarak modifiye edilmesi, taşınım açısından büyük bir potansiyel oluşturabilir (Gastaldi ve ark., 2014).

1.6.1. Transferrin

SLN'lerin beyine hedeflendirilmesinde transferrin (Tf), laktoferrin (Lf), folik asit, betahidroksibütirik asit, apolipoprotein E gibi birçok ligand incelenmiştir. Tf kandaki serbest demiri bağlar ve TfR bu yüklü transferrin proteinlerini KBE dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli doku engellerini aşarak taşımaktan sorumludur. AH hastalarının TfR yoğunluğu serebral mikro damarlarda değişmezken hipokampusda azalır. AH'de reseptör aracılı yol kullanılarak maddelerin verilmesi için uygun bir adaydır (Robinson ve ark., 2015).

Kuo ve Wang'ın (2014), yapmış olduğu çalışmada sakunavir yüklü katı lipit nanopartiküllerin yüzeyi transferrin ile modifiye edilmiş ve insan beyin kılcal endotel hücreleri (HBMC'ler) ile oluşturulan KBE modelinden geçişine bakılmıştır. Transferrin modifikasyonu hücre alımına önemli ölçüde etki etmiştir ve Tf konsantrasyonundaki artış KBE'den geçişi artırmıştır.

Li ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışmada karbon noktacıları (C-dot) transferrin bağlanmış ve zebra balıklarında transferrin vasıtasıyla reseptör aracılı endositoz ile KBE'inden geçişi incelenmiştir. Çalışmada noktacı yapılarının tersine transferrin/C-noktacık yapılarının SSS'ne rahatlıkla girdiği gözlenmiştir.

Gupta ve ark. (2007), yapmış oldukları çalışmada Tf konjuge edilmiş SLN'leri kinin hidroklorür'ü serebral malaryanın tedavisi amaçlı beyne taşımak için kullanmışlardır. TfR çeşitli hücre tiplerinin yüzeyinde olduğu ve demire doymuş Tfnin reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine girmeye aracılık ettiği bilinmektedir. Kandan beyne giden Tfnin reseptör aracılı endositoz ile gittiği kanıtlanmıştır. Tf SLN yüzeyinde bulunan fosfatidiletanolamin aracılığı ile SLN'ye bağlanmıştır. Ardından in vivo çalışmalarda etken madde yüklü Tf SLN, Tf konjuge

edilmemiş SLN ve serbest kininin IV olarak uygulanmasından sonraki kinin plazma seviyeleri ve doku dağılımı incelenmiştir. Tf ile konjuge SLN'lerin serbest ve konjuge edilmemiş SLN ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde beyine kinin alımını artırdığı görülmüştür. Araştırmacılar etken madde yüklü SLN'nin Tf modifikasyonu ile aktif hedefleme yapılarak taşınmanın arttığını kanıtlamışlardır.

1.6.2. Apo-E

Lipoprotein reseptörleri (LDLR), beyindeki süpürme ve sinyalizasyondan sorumlu geniş bir reseptör proteinleri sınıfıdır. Düşük yoğunluklu lipoprotein olan Apo-E reseptörü, kolesterolün beyne taşınmasından sorumludur ve bu nedenle, iyileştirilmiş KBE permeasyonu için hedeflendirici olarak önerilmiştir (Robinson ve ark., 2015). Apo-E'nin 2,3 ve 4 olmak üzere 3 adet alleli mevcuttur. Bunlardan Apo-E-4'ün AH patogenezi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle hedeflendirici olarak kullanılırken bunun göz önünde bulundurulması gerekir. Yapılan çalışmalarda Lipoprotein reseptörlerine Apo-E 3 ve 4'ün bağlanma affinitelerinin aynı olduğu bulunmuştur (Yamazaki ve ark., 2016). Bu durum göz önüne alınarak AH patogenezinde rol oynamayan 3 allelini kullanmak mantıklı bir yaklaşım olabilir.

Neves ve ark. (2016), tarafından hazırlanan resveratrol yüklü SLN'ler, KBE'de ekspresyonu yüksek olan LDL reseptörleri tarafından tanınan apolipoprotein E ile fonksiyonelleştirilmiştir. Apolipoprotein E ile fonksiyonelleştirilmiş resveratrol yüklü SLN'ler, insan serebral mikrovasküler endotel hücreleri hCMEC/D3'ten permeabiliteyi önemli ölçüde artırmıştır.

Dal Magro ve ark. (2017), yaptıkları benzer çalışmada SLN'lerin KBE'den geçişini artırmak için partikül yüzeyi Apo-E ile modifiye edilmiş ve in vitro KBE modeli ile partikülün KBE'den geçişi incelenmiştir. Çalışma sonucunda SLN'lerin KBE'den geçişi arttırılmış ve Apo-E'nin umut vaat eden bir hedefleyici ajan olduğu belirtilmiştir.

Ayrıca iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin, Apo-E'nin NP'lerin yüzeyine adsorpsiyonunu teşvik edebildiği belirlenmiştir. Örneğin, FDA onaylı bir enjekte edilebilir yüzey aktif madde olan polisorbata 80, NP'lere konjuge edildiğinde serumda Apo-E'yi adsorbe edebilir ve polisorbata 80 kaplı NP'ler, birçok grup tarafından bir beyin hedefleme dağıtım sistemi olarak değerlendirilmiştir (Gao, 2016).

1.7. Yapısal Bütünlük Çalışmaları

1.7.1. Sirküler Dikroizm (CD) Analizi

Proteinlerin hızlı karakterizasyonu yapılacak olan proteomik ve genomik çalışmalar için önem taşımaktadır. Sirküler dikroizm (CD) proteinlerin ikincil yapısını; katlanma ve bağlanma özelliklerinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. CD kısaca sola ve sağa dönen polarize ışığın eşit olmayan soğurulması olarak tanımlanır. Asimetrik moleküller ışıkla etkileşime girdiğinde, sağ ve sol yönlü dairesel polarize ışığı farklı boyutlarda emebilirler ve ayrıca iki dalga için farklı kırılma indislerine sahip olabilirler. Sonuç, ışık dalgasının düzleminin döndürülmesi ve saat yönüne döndürme (ER) ve saat yönünün tersine döndürme (EL) vektörlerinin eklenmesinin bir elipsi izleyen bir vektörle sonuçlanması ve ışığın eliptik olarak polarize olduğu söylenmesidir. CD ya ΔE birimleri cinsinden, asimetrik bir molekül tarafından ER ve EL'nin emilmesindeki fark ya da eliptiklik derecesi cinsinden açıklanır (Greenfield, 2006).

α -heliks proteinler 222 nm, 208 nm'de negatif bant ve 193 nm'de pozitif bant göstermektedirler. β -heliks katlanmaya sahip olanlar ise 218 nm'de negatif ve 195 nm'de pozitif bant gösterirler (Wei ve ark., 2014).

1.7.2. Native-PAGE

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) biyolojik proteinlerin ayrılmasında en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Elektroforetik hareketliliğe göre ayırım sağlar (Petrov ve ark., 2013).

Akrilamid ile por büyüklüğü ayarlanabildiğinden poliakrilamid jel oluşturmak avantajlıdır. Küçük por genişliğinde akrilamid jel daha küçük moleküllerin ayrımının sağlanmasında yardımcı olur. Poliakrilamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör sistemi (amonyum persulfat-TEMED) tarafından kontrol edilir. Bir jelin ayrıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı akrilamidin ve bis-akrilamidin konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin analizi yapılabilir. Yüksek konsantrasyonda ise daha küçük porların oluşumu ile düşük molekül ağırlıklı yapılar analiz edilebilir. Elektroforezden sonra, jelde proteinler çeşitli boyalar kullanılarak tespit edilir. Gümüş boyama diğer boyama metodlarına göre daha hassastır (Ahmed, 2005).

Tüm jel elektroforez formlarında olduğu gibi, moleküller doğal hallerinde sürüklenilerek moleküllerin daha yüksek sıralı yapıları korunabilir. Bu yöntem native-PAGE denmektedir. Native-PAGE, oligomerik formu bozulmadan tutar ve jel üzerinde aktivite seviyesini temsil eden bir bant gösterir.

1.8. Hücresel Çalışmalar

AH'ye yönelik in vitro modeller geliştirilirken kanser hücre hatları (nöroblastom ve feokromositoma hücre hatları) birincil nöronal hücreler veya nöral kök hücreler sıklıkla kullanılmaktadır. KBE modelleri için insan, domuz ve rat gibi rodentlerden elde edilen beyin endotel hücreleri bazı sistemler oldukça yaygındır. Rat beyin endotel hücreleri (RBEC) ile oluşturulan KBE modelleri in vivo ile kolayca

karşılaştırma yapılması, ölçüm ve genetik olarak eş kültürler oluşturulabilmesi gibi avantajları mevcuttur (Deli ve ark., 2005). İnsan beyin mikrovasküler endotel hücreleri (hCMEC/D3) kolaylıkla büyütülebilen ve SSS ile alakalı patolojik durumlar ve ilaç taşıma mekanizması çalışmaları için hücresel ve moleküler düzeyde çalışmaya uygun olan bir tür insan KBE modelini temsil eden bir hücre hattıdır. Bu nedenle AH ile ilgili birçok çalışmada kullanılmaktadır (Chattopadhyay ve ark., 2008; Weksler ve ark., 2013).

SH-SY5Y hücreleri, nörodejenerasyon mekanizması çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, insan nöroblastoma hücresinden elde edilmektedir (Schlachetzki ve ark., 2013). SH-SY5Y hücre hattı, sempatik sinir sisteminde ve adrenal medullada bulunan sinir krestinden türetilmiş ilkel, pluripotent sempatik hücreler kullanılarak geliştirilmiştir (Calan ve ark., 2016). Bu hücre hattı, fizyolojik ve patolojik koşullarda nöronları taklit ettiği düşünüldüğünden AH için in vitro modellerde sıklıkla kullanılmaktadır (Calan ve ark., 2016; Gao ve ark., 2017). Bu hücreler sinaptik yapıdadırlar, fonksiyonel aksonal vezikül taşıyıcılara ve çeşitli nörospesifik proteinlere sahiptirler. Özellikle AH'nin Tau ve çeşitli mikrotübüler proteinlerle ilişkili olduğu düşünüldüğünde bu önem taşır. Bu hücre hattı hastalığın ilerlemesinin altında yatan mekanizmalarının anlaşılması ve ilaç geliştirilmesi için kullanılmaktadır (Carolindah ve ark., 2013).

1.8.1. MTT Canlılık Testi

MTT hücre canlılık testi in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak ölçüm yapan kantitatif ve kolorimetrik bir yöntemdir. Hücre canlılığını ve üremesini ölçen bu yöntemin daha hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahip olması diğer test yöntemlerine göre avantaj sağlamaktadır. Yalnızca canlı hücreler sarı boyayı 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromürü (MTT) mor-mavi, çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürür. Boya, canlı hücre mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanarak suda çözünmeyen koyu mavi renkte formazan kristallerini oluşturmaktadır. Formazan kristalleri, dimetil

sülfoksit (DMSO) vb. organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, hücrelerin ve kristallerin parçalanmasından sonra formazan miktarı konsantrasyonuna bağlı olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir. Boya indirgenmesindeki azalma hücre hasarıyla ve metabolik aktivite ile ilişkilidir (Aslantürk, 2018).

1.8.2. Empedans Ölçümü ile Canlılık Testi

Empedans (direnç) ölçümü etiket gerektirmeyen, gerçek zamanlı, girişimsel bir uygulama gerektirmeyen, hücre büyümesi ve yüzeye yapışması ile doğrusal olarak bağıntısı olan bir ölçüm yöntemidir. Elektriksel empedans ölçümleri hücrelere zarar vermeden hücre ve substrat arasındaki elektriksel empedansı ölçerek hücre davranışının izlenmesine olanak veren bir sistemdir. Bu etkileşimin ölçülmesi hücre morfoloji ve bozulma ile ilgili bilgi verir (Ngoc Le ve ark., 2019). Bu teknik dinamik olarak yaşayan hücrelerin izlenmesine olanak vermektedir. Sistem gerçek zamanlı olarak hücre proliferasyonunu ve canlılığı ile ilgili veriyi elektronik plakalarda bulunan hücreleri ve plaka elektrotları arasındaki etkileşimden türetilen empedansı kullanarak elde etmektedir (Kiss ve ark., 2013). Hücre ölümü, hücrelerin ölçüm elektrodunun yüzeyinden salınmasına yol açar. Bu, elektrotlar boyunca ölçülen empedansın azalmasına neden olur (Lei, 2014).

1.8.3. Hücresel Alım Çalışmaları

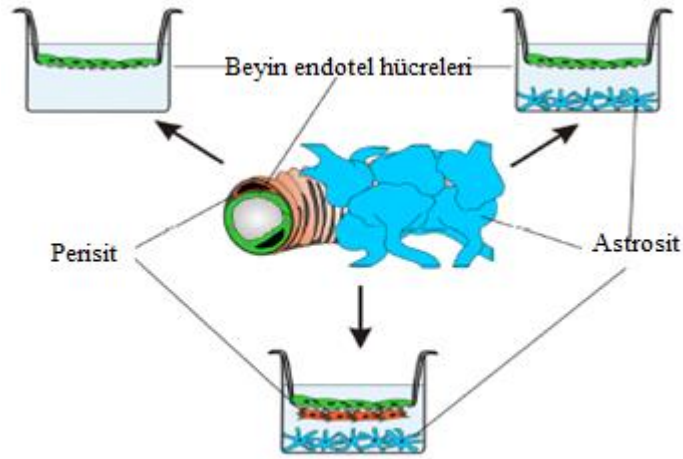
Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin yanında, hücre kültür ortamının bileşimi ve serumun kaynağı nanopartikülün hücresel alımına ve dağılımına aracılık eder.

Nanopartiküller, çözelti içerisinde inert malzemeler veya çözünür küçük moleküller gibi davranmazlar; ancak daha ziyade, nanopartiküllerin bazı agregasyon

süreçlerinden geçtiği ve sonuç olarak sıklıkla yeni çok boyutlu moleküller oluşturma eğilimi gösterdikleri gözlenmiştir. Biyolojik bir sıvıya girişin ardından, nanopartiküllerin yüzeyi, genellikle biyo-korona olarak adlandırılan proteinler ve lipidler gibi bir biyomolekül tabakası ile kaplanır. Nanoparçacıkların etkili boyutunun, yüzey yükünün ve topaklaşma durumunun değerlendirilmesinde ve dolayısıyla biyodağılım, kompleman aktivasyonu, hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşim ve hücre alım gibi biyolojik davranışlarının belirlenmesinde anahtar bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle hücre kültüründe yapılan hücre alım çalışmaları, bu belirtilen davranışların tespiti açısından fikir veren bir deneyim olmaktadır (Salatin ve Yari Khosroushahi, 2017). Hücre alım çalışmaları spesifik hücrelere nanopartiküllerin hedefleme potansiyellerini incelemek amacıyla da yürütülebilmektedir (Dağlıoğlu, 2018).

1.8.4. Kan-Beyin Engeli Modelinden Geçiş Çalışmaları

Alzheimer, felç, beyin tümörleri, epilepsi gibi SSS bozukluklarının farmasötik tedavisi zordur; çünkü KBE ilaçların beyne geçişini kısıtlar. KBE'nin anatomik temeli, serebral mikrovaskülatürü kaplayan beyin endotel hücreleridir. KBE'nin ana rolleri, nöronal fonksiyonlar için iyonik homeostazın oluşturulması, SSS'nin besinlenmesi ve nöral hücrelerin toksik zararlardan korunmasıdır (Mészáros ve ark., 2018). KBE, SSS'e yönelik başarılı ilaç taşıyıcı nanopartiküllerin başarılı geliştirmeye yönelik araştırma çabalarının odak noktasıdır. Mikroglia ve astrositler, merkezi sinir sistemindeki hücre defekti ile ilişkilidir. SSS astrositlerinin vasküler endotelial hücreler ile en bilinen ilişkisi, kan-beyin engelinin oluşumu ile ilgilidir. Kan-beyin engeli patolojisi nörovasküler hastalıklara neden olur ve tedavide önemli bir hedeftir. Bununla birlikte, KBE'nin patolojisini incelemek, ilgili ve basit modellerin olmaması nedeniyle zordur. İn vivo hayvan modelleri ayrıştırılması zor olan karmaşık, çok hücreli etkileşimler tarafından inhibe edilebilirler. İn vitro KBE modelleri daha basittir; ancak işlevsellikleri ve hastalık gelişimi ile ilişkileri sınırlıdır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, üçlü KBE ortak hücre kültürü modelleri kullanılır (Nakagawa ve ark., 2009; Veszelka ve ark., 2011; Veszelka ve ark., 2015).



Şekil 1.8. Üçlü KBE ortak hücre kültürü modeli örneği.

Hücre kültürü modelleri kan-beyin engelleri hakkındaki fizyoloji, patoloji ve farmakoloji bilgisi ile oldukça bağıntılıdır. 1973'te ilk in-vitro KBE modeli oluşturulduğundan beri kültür hücrelerden birçok model oluşturulmuştur. Tek tabakalı beyin endotel hücreleri yerlerini giderek çoklu kültür sistemlerine bırakmaktadır. Bunun nedeni serebral endotel hücreler kültür ortamında kolaylık spesifik özelliklerini kaybedebilirler. Ayrıca nörovasküler birim hücreleri KBE özelliklerinin indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Beyin kapiller endotel hücreleri astrosit, perisit, perivasküler mikrogliya ve nöron gibi komşu hücrelerle dinamik bir etkileşim içindedir. Bu ortaklaşma hem endotel hem de epitel özelliklerini sergileyen benzersiz karakteristiğine katkıda bulunur. Nörovasküler birimlerdeki hücreler arası iletişim KBE'nin oluşturulması ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde kritik rol oynar. Bütün bu hücrelerden astrositler beyin endotel hücrelerinin özelliklerini ve fonksiyonlarını düzenlediği tespit edilen ilk hücre tipi olmuştur. Astrositler diğer hücrelerin sıkı kavşak oluşturmalarını KBE'nin temel özelliklerin oluşturulmasını indükler. İn vitro KBE modeli olarak beyin endotel hücreleri ve astrositlerin kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Deli ve ark., 2005; Nakagawa ve ark., 2007). Beyin perisitleri endotel hücrelerin en yakın komşusudur ve ortak bazal membranları vardır. Beyin kapillerinin yapısını in vivo olarak stabilize etmeleri ve onlar üstündeki temel rollerine ve KBE geliştirilmesi, devamlılığı ve regülasyonu üzerindeki muhtemel etkilerine rağmen,

KBE üzerindeki fonksiyonel önemlerine dair çok az veri mevcuttur. Perisitler, astrositlere benzer olarak beyin endotel hücre kültüründe paraselüler bariyer oluşturabilmektedirler (Nakagawa ve ark., 2009).

İn vitro yeniden yapılandırılmış KBE modelleri, geçirgenlik çalışmaları için uzun yıllardır kullanılmaktadır ve bu çalışmalar, in vivo gözlemlerin sonuçlarıyla birlikte, KBE'nin fizyolojik ve patolojik koşullar altında yapısal ve fonksiyonel organizasyonu hakkındaki mevcut bilgilere katkıda bulunmaktadır. Güvenilir ve tekrarlanabilir in vitro KBE modelleri üzerine farmakolojik çalışmalar, merkezi sinir sistemine daha iyi nüfuz eden yeni ilaçların araştırılmasını ve geliştirilmesini hızlandırabilir (Deli ve ark., 2005).

Mészáros ve ark. (2018), yaptığı çalışmada üretmiş oldukları niozomlar için sitotoksikite, hücresel alım ve üçlü KBE hücre kültürü modelinde geçiş çalışmaları yürütmüşlerdir. Perisit, astrosit ve beyin endotel hücreleri ile oluşturdukları üçlü KBE hücre kültürü modelini başarı ile meydana getirmişlerdir ve geçiş çalışmalarını tamamlamışlar ve niozomların KBE'den geçişi ile ilgili fikir elde etmişlerdir (Mészáros ve ark., 2018).

1.9. Zebra Balıkları ile İn Vivo AH Modeli Çalışmaları

Alzheimer hastalığının patogenezi anılmanın önündeki en büyük engel, yeterli, uygun ve güvenilir hayvan modellerinin olmamasıdır. Alzheimer hastalığının etiyolojisini ve karmaşık patofizyolojisini anlamak için onlarca yıldır çeşitli hayvan modelleri kullanılmıştır. Bu problemin farklı yönlerini taklit eden ve ilerlemesine önemli ölçüde katkıda bulunan çeşitli hipotezler üzerine hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller yeni terapötik ilaç adaylarının test edilmesinde sıklıkla kullanılmasına rağmen, metodoloji ve bunların klinik önemi açısından güvenilirliği açısından büyük değişkenlik hala mevcuttur (Kumar ve ark., 2016). Solucanlar ve sineklerden kutup ayılarına ve genetik olarak tasarlanmış farelere kadar çok sayıda farklı tür, AH'nin gelişiminin altında yatan mekanizmaları açıklığa kavuşturmak ve

söz konusu hastalıkların tedavisi için uygun bir yaklaşım bulmak için farklı araştırmalarda kullanılmıştır (Salari ve Bagheri, 2016).

Alzheimer hastalığının moleküler mekanizmalarının araştırılması amacıyla bugüne dek kemirgen modelleri yaygın olarak kullanılmış ve bu çalışmaların sonuçları hastalığa ilişkin önemli bilgiler vermiştir. Bununla birlikte, AH'de görülen nörodejenerasyonu tetikleyen olaylar henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Zebrabalığı (*Danio rerio*) modelini kullanarak yapılan çok sayıda araştırma, Alzheimer oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilen genlerin diğer hayvan modellerinde gözlemlenmesi zor olan özelliklerini ortaya koymuştur (Liao ve ark., 2012; Newman ve ark., 2012; Newman ve ark., 2014).

Zebrabalığı, uzun bir süredir omurgalı gelişimi ve gen fonksiyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılan ve kolaylıkla çoğaltılabilen bir omurgalı modelidir (Mayden ve ark., 2007). Canlının genomu dizilimi bütünüyle açığa çıkmıştır, ayrıca kolayca gözlemlenebilen ve test edilebilen gelişimsel davranışları vardır. Organizmanın embriyonik gelişimi çok hızlıdır ve embriyoları sağlam, şeffaf olup gelişimleri ana canlının vücudu dışında gerçekleşme yetisine sahiptirler (Dahm ve Geisler, 2006). Bu balıklar 2-3 ay gibi bir sürede olgunluğa erişebilirler ve yeniden üreyebilecek duruma gelebilirler. Bu durum yapılan çalışmaların sonraki nesillerde takibi açısından avantaj sağlamaktadır. Balıkların gelişimi sırasında yaklaşık olarak büyüklükleri sabit kalmaktadır, bu da hücrelerin boyama yöntemleri ile takibine olanak tanır. Bu tür insan toksisite testlerinde ve günlük uyku döngüsünde memelilere benzerlik göstermektedir (Jones, 2007). Karşılaştırmalı genom analizleri insan referans genomu ile karşılaştırıldığında insan genlerinin yaklaşık %70'inin en az bir zebrabalığı ortoloğu olduğunu göstermektedir (Howe ve ark., 2013).

Zebra balıkları ile geliştirilen AH modellerinde nanopartikülerin uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmış ve partiküllerin sitotoksitesi, dağılımı, A β üzerine ve AH semptomları üzerine olan etkileri başarı ile gözlemlenmiştir (Javed ve ark., 2019).

Bu tez kapsamında Humanin ve Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonları geliştirilmesi ve optimum olduğu düşünölen formölasyonlardan hareketle bu formölasyonların Apo-E ve Tf ile beyine hedeflendirilerek in vitro ve in vivo olarak değerdendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece hem etken maddelere bağlı yan etkilerin azalması hem de biyoyararlanımın artması ve hastalığa alternatif bir tedavi yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid	: Sigma, Almanya
Amicon Ultra-4 santrifüj tüpü	: Millipore, ABD
Apolipoprotein ε3 human	: PeproTech, Inc., ABD
Aseton	: Merck, Almanya
Asetonitril	: Sigma, Almanya
Avidin	: Sigma, Almanya
Bikininik asit (BCA)	: Thermo Scientific, ABD
Centrisart santrifüj tüpü	: Sartorius, Fransa
Diklorometan	: Sigma, Almanya
Dimetilsülfoksit	: Carlo-Erba, Fransa
Disodyum EDTA	: Sigma, Almanya
Donepezil hidroklorür	: Deva Holding, Türkiye
DSPE-PEG(2000) Amin	: Avanti, ABD
Dulbecco's modified eagle medium	: Gibco, ABD
EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)	: Thermo Fisher, ABD
Evans blue albümin	: Sigma, Almanya
Ez-link™ sulfo-NHS-biotin	: Thermo Fisher, ABD
Etil asetat	: Merck, Almanya
Fetal bovin serum	: Pan-Biotech, Almanya
Fosfotidilkolin	: Sigma, Almanya
Gliseril behenat	: Gattefose, Fransa
Gliseril palmitostearat (Precirol ATO5)	: Gattefose, Fransa
Gliseril stearat (Imwitor 900K)	: IOI Oleochemical, Almanya

Gliseril tripalmitat	: Sigma, Almanya
Glisin	: Sigma, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma, Almanya
Hidrokortizon	: Sigma, Almanya
İnsülin-transferrin-selenyum (ITS)	: Sigma, Almanya
Matrigel	: Corning Costar, ABD
Metanol	: Carlo Elba, Fransa
MTT	: Sigma, Almanya
N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid	: Sigma, Almanya
Penisilin	: Roche, İsviçre
Pierce™ biotin-fluorescein konjugat	: Thermo Fisher, ABD
Pluronic F68	: Sigma, Almanya
Polivinil alkol (PVA) MW:30000-70000	: Sigma Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	: Carlo Elba, Fransa
Potasyum klorür	: Merck, Almanya
Setil palmitat	: Gattefose, Fransa
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	: Sigma, Almanya
Sodyum floresin	: Sigma, Almanya
Sodyum hidroksit	: Sigma, Almanya
Sodyum klorür	: Merck, Almanya
Streptomisin	: Roche, İsviçre
Tetrametiletildiamin	: Thermo Fischer, ABD
Transferrin Human	: Sigma, Almanya
Trimiristin (Dynasan 114)	: IOI Oleochemical, Almanya
Tripalmitin (Dynasan 116)	: IOI Oleochemical, Almanya
Tris bazi	: Sigma, Almanya
Triton X	: Sigma, Almanya
Tween 80	: Merck, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Cam malzeme	: İldam, Türkiye
Çalkalayıcı su banyosu	: Jeio Tech, Kore
Derin dondurucu	: Heto, Almanya
DSC cihazı	: Shimadzu DSC 60, Japonya
Elektrikli terazi	: Mettler Toledo, Almanya
Etüv	: Heraeus T 5042, Almanya
EVOM voltohm metre	: World Precision Instruments, ABD
Filtre	: Sartorius, Almanya
Grafik programı	: GraphPad Instant 3, ABD
Homojenizatör	: IKA Ultraturrax T-25, Almanya
Hücre kültürü plakları	: Corning Costar, ABD
Isıticılı mantolu karıştırıcı	: Daihan Scientific, Kore
İstatistik programı	: Graphpad Prisma8; SPSS20, IBM, ABD
Kolon	: ACE, İskoçya
Laminar flow	: Holten 1.2, ABD
Liyofilizatör	: Christ Gamma 2-16 LSC, Kanada
Manyetik karıştırıcı	: Daihan Scientific, Kore
Mikropipet	: Eppendorf, Almanya
Mikroplak okuyucu	: Clariostar, BMGLabtech, Almanya
Mikroplak (96 kuyucuklu)	: Greiner Bio-One, Almanya
Parafilm	: Bemis Packaging, ABD
Partikül büyüklüğü analizi cihazı	: Malvern Zetasizer, İngiltere
Plastik enjektör	: Set inject, Türkiye
pH metre	: Mettler Toledo, İsviçre
Santrifüj	: Sigma 2-16 P, Almanya
Sirküler dikroizm (CD)	: Jasco-J 1500, Japonya
Sonikatör	: Bandelin Sonoplus
Spektrofluorometre	: Horiba Fluorolog 3, ABD
Taramalı Elektron Mikroskobu	: FEI Tecnai G2, Japonya

Ultrasonik banyo	: Ultrasonic LC 30, Almanya
Vorteks cihazı	: Heidolph Reax Top, Almanya
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	: Agilent 1100 HPLC, ABD
Zeta potansiyeli ölçüm cihazı	: Malvern Zetasizer, İngiltere

2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

Özellikle Donepezil HCl içeren katı lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan pH 9 fosfat-salin tamponu ve etken maddenin üretilen formülasyonlardan çıkışının incelenmesinde kullanılan pH 7,4 fosfat-salin tamponu Avrupa Farmakopesi 9'a (EP9) göre hazırlanmıştır (EP9, 2016).

➤ pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu

Disodyum hidrojen fosfat	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0,19 g
Sodyum klorür	8,0 g
Distile su.....ym.....	1000 mL

Humanin içeren formüllerin in vitro salım çalışmalarında bu tampona %0,05 Tween 80 eklenmiştir ve çalışmalar bu şekilde gerçekleştirilmiştir.

➤ pH 9,0 Fosfat Tamponu

Potasyum dihidrojen fosfat.....	1,74 g/80 mL
1 M KOH	y.m
Distile su.....ym....	100 mL

Native-PAGE çalışmalarında kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilen oranlarda hazırlanmıştır.

➤ %30 Akrilamid-N,N Metilen Bisakrilamid Jel Çözeltisi

Akrilamid.....	14,6 gram
N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid.....	0,4 gram
Distile Su.....y.m.....	50 mL

➤ Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu

Tris-Bazı.....	108 gram
Borik Asit.....	55 gram
Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA).....	7,4 gram
Sodyum Hidroksit.....	0,5 gram
Distile Su.....y.m.....	1000 mL

➤ Ayırma Jel Çözeltisi

%30 Jel Çözeltisi.....	9,5 mL
Distile Su.....	6,75 mL
10x TBE Tamponu.....	2 mL
%10 Amonyum Persülfat Çözeltisi.....	110 µL
Tetrametiletildiamin (TEMED).....	28 µL

2.1.4. Kullanılan Deney Hayvanları

İn vivo hayvan çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 28.08.2018 tarihli ve 02/2018 protokol numaralı onay dahilinde gerçekleştirilmiştir. 12 adet 25 gram ağırlığında, erişkin erkek zebra balığı kullanılmıştır. Kullanılan deney hayvanları İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü tarafından temin edilmiş olup; çalışmalar da burada yürütülmüştür.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Humanin ve Donepezil HCL'in FTIR Spektrumu

Donepezil hidroklorür (HCl) ve Humanin'in FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında Agilent FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaza toz halinde yerleştirilen örneklerin 4000- 650 cm^{-1} dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.2.1.2. Humanin ve Donepezil HCL'in Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi

Etken maddelerin termal davranışının incelenmesi ve kristal formunun belirlenmesi amacıyla alüminyum pan içine konulan Donepezil HCl ve Humanin ayrı ayrı preslenmiş ve cihaza yerleştirilmiştir. 25–400°C sıcaklık aralığında 5°C/dk hızında termogramları alınmıştır.

2.2.1.3. Donepezil HCL'in Ultra Viyole (UV) Spektrumu

Donepezil HCL'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki konsantrasyonları bilinen çözeltilerinin 200-400 nm aralığında HPLC'de UV spektrumları alınmış ve maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λ_{max}) belirlenmiştir.

2.2.1.4. Humanin Yapısal Analizi İçin Sirküler Dikroizm (CD) Yöntemi

Humanin'in yapısal analizi için CD yöntemi kullanılmıştır. CD peptitin sekonder yapısı ve stabilitesinin anlaşılması için uygulanan hızlı ve kolay bir yöntemdir. Bu yöntem ile peptitin konformasyonel yapısı ile ilgili bilgiler tespit edilebilmektedir. Peptit 40 μM konsantrasyonda suda çözölmüş ve 0,1 mm quartz küvete aktarılmıştır. 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 190-260 nm'de 20 nm/dk'da 0,5 sn cevap zamanı ile ölçüm yapılmıştır. 6 ölçüm yapıldıktan sonra spektrumlar çıkarılmış ve ortalama kalan molar eliptisite hesaplanmıştır (Romeo ve ark., 2017).

2.2.1.5. Etken Maddelerin Çeşitli Analitik Yöntemler ile Miktar Tayinlerinin Yapılması ve Kalibrasyonları

2.2.1.5.1. Humanin'in Spektroflorometri Yöntemi ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu

Humanin için peptide floresin (FITC) bağılı olmasından dolayı miktar tayini yöntemi olarak spektroflorometri seçilmiştir. Etken maddenin yardımcı çözöcö kullanılarak 15 ng/mL, 30 ng/mL, 60 ng/mL, 120 ng/mL, 240 ng/mL, 480 ng/ mL ve 960 ng/ml konsantrasyonlarında distile su ve %0,1 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponunda sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Mikroplakada yapılan ölçömlerde plakadaki her bir kuyucuğa 150 μL örnek eklenmiştir. Humanin ile yapılan florometrik ölçömler parametreleri Çizelge 2.1'de verilmektedir.

Çizelge 2.1. Humanin ile yapılan floresan spektroskopisinin ölçömler parametreleri.

Eksitasyon Dalga Boyu (nm)	490-8
Emisyon Dalga Boyu (nm)	525-8
Dikroik	507
Kuyucuklardaki Örnek Hacmi	150 μL
Tarama	Spiral
Tarama çapı	mm

2.2.1.5.2. Donepezil HCl'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu

Donepezil HCl için yapılan literatür incelemeleri sonucunda miktar tayini yöntemi olarak Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) seçilmiştir. Etken maddenin 8 µg/mL, 12 µg/mL, 16 µg/mL, 20 µg/mL, 24 µg/mL, 28 µg/mL ve 32 µg/mL konsantrasyonlarında pH 7,4 fosfat-salin tamponu ile çözeltileri hazırlanarak farklı mobil faz oranları, mobil faz pH'ları, akış hızları, kolon sıcaklıkları ve enjeksiyon hacimleri denenmiştir. Bu ön çalışmalar sonucunda belirlenen en uygun yöntem parametreleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Chhalotiya ve ark., 2011).

Çizelge 2.2. Donepezil HCl'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Mobil faz	Metanol : distile su (85:15 h/h)
Akış hızı	0,5 ml/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Kolon	Ace5 C18 (5µm, 3,0 x 250 mm)
Dedektör	UV dedektör- 270 nm
Sıcaklık	37°C

Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki kalibrasyon çalışması için 1,0 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 8 µg/mL – 32 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 farklı noktada çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler Çizelge 2.2'de belirtilen koşullarda HPLC'de 270 nm'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşı elde edilen alanlardan hareketle doğru denklemi hesaplanmıştır. Deney üç kez tekrarlanmış ve elde edilen alan sonuçlarının ortalaması alınmıştır (Yasir ve Sara, 2014).

2.2.1.6. Etken Maddeler İçin Çizilen Kalibrasyon Doğrularının İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu

Validasyon çalışması Donepezil HCl için yapılmıştır. Humanin’e ait analitik yönteme dair bir validasyon yapılmamıştır. Bunun nedeni her bir ölçümde yeniden kalibrasyon yapılmasıdır. Ölçümler her seferinde Humanin çözeltisinin belirli konsantrasyondaki bir seri çözeltisi hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Önce konsantrasyonu belli Humanin çözeltilerinin floresan yoğunlukları cihazda okunmuş, daha sonra miktar tayini için numunenin floresan yoğunluğu ölçülmüştür. Her seferinde yeniden kalibrasyon denklemi oluşturulup buna göre miktar tayini yapılmıştır.

2.2.1.6.1. Doğrusallık ve Aralığı

Herhangi bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıkta örnek içindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan test sonuçlarının elde edilebilmesidir (ICH Q2(R1), 1995).

Donepezil HCl’in pH 7,4 fosfat-salin tamponu içindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 8 µg/mL – 32 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 farklı noktada çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlara karşılık gelen alan verileri kullanılarak “GraphPad InStat İstatistik Programı 3.1” aracılığıyla elde edilen doğrunun %95 olasılıklı güven sınırları gösterilmiştir.

2.2.1.6.2. Doğruluk ve Geri Elde

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Gerçek ve teorik değerlerin, pratikte bulunan değerlere yakınlığının saptanmasına olanak verir (ICH Q2(R1), 1995).

Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin içindeki 0,1 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 12 µg/mL, 20 µg/mL, 28 µg/mL konsantrasyonlardaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiler HPLC kullanılarak 6 kere analiz edilmiş ve elde edilen alan değerleri yardımıyla pratik konsantrasyonlar ve % geri elde değerleri, % geri elde değerlerinin ortalama, standart sapma (SS) ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır.

2.2.1.6.3.Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten çoklu örneklemeyle elde edilen ölçüm serileri arasındaki yakınlığı ifade etmektedir. Kesinlik, normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin ölçümüdür.

➤ Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşullarındaki kesinliği ifade eder (ICH Q2(R1), 1995).

Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin içindeki 0,1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 12 µg/mL, 20 µg/mL, 28 µg/mL konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltilerin HPLC kullanılarak elde edilen alanlar yardımıyla pratik konsantrasyonları hesaplanmış ve konsantrasyon değerlerinin ortalama, SS ve BSS değerleri bulunmuştur.

➤ Ara Kesinlik

Ara kesinlik; farklı gün, ekipman, analist gibi laboratuvar değişkenlerinin incelenmesini ifade etmektedir (ICH Q2(R1), 1995).

Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu içindeki miktar tayini yönteminin ara kesinliğinin belirlenebilmesi için; 12 µg/mL, 20 µg/mL, 28 µg/mL konsantrasyonlarda üç farklı çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin birbirini takip eden üç farklı günde HPLC analizleri yapılarak konsantrasyonlara karşılık gelen alanlar değerleri ve pratik konsantrasyonları bulunmuştur. Pratik konsantrasyonlardan hareketle üç farklı günde yapılan toplam 18 konsantrasyonun ortalaması, standart sapması ve % bağıl sapma değerleri bulunmuştur.

2.2.1.6.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Bir analitik işlemin teşhis sınırı, örnekteki analitin teşhis edilebilen fakat tayin edilemeyen en küçük miktarıdır (LOD); tayin sınırı ise, örnekteki analitin, uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebilen en düşük konsantrasyon değeridir (LOQ) (ICH Q2(R1), 1995).

ICH kaynaklarında verilen Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'ye göre, kalibrasyon doğrusunun eğimi ve kesişim değeri kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Denklemden S kalibrasyon doğrusunun eğimini; σ ise kalibrasyon doğrularının kesişim değerlerinin standart sapmalarını (n=3) ifade etmektedir.

$$LOQ = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad \text{Eşitlik 1}$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad \text{Eşitlik 2}$$

2.2.1.6.5. Seçicilik

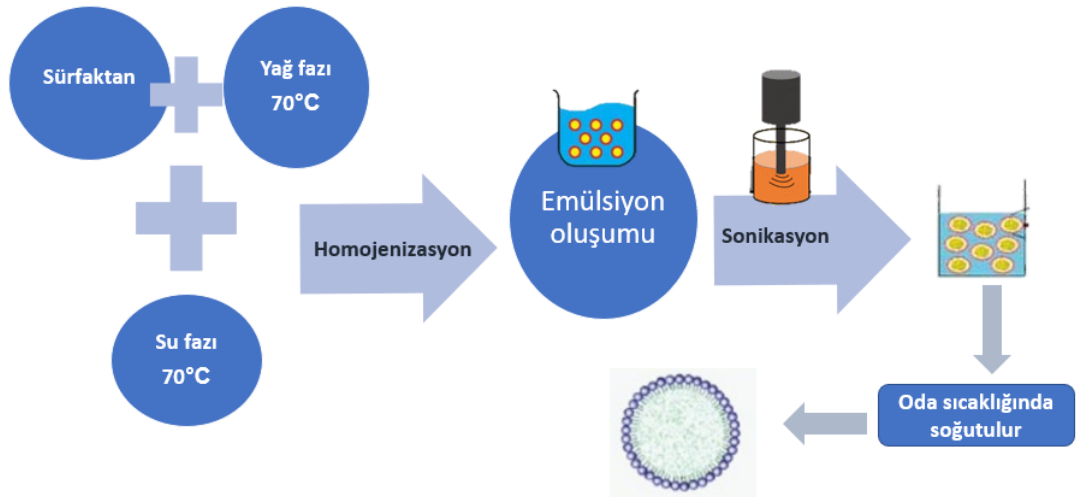
Seçicilik, analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir (ICH Q2(R1), 1995).

Seçicilik testi için pH 7,4 fosfat-salin tamponunda ve suda etken madde içermeyen lipit nanopartiküllerin belli konsantrasyonlarda dispersiyonu

hazırlanmıştır. 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek 270 nm'de HPLC analizleri yapılmış ve etken madde ile girişim yapıp yapmadıkları incelenmiştir.

2.3. Katı Lipit Nanopartiküllerin (SLN) Hazırlanması

SLN'ler homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada katı lipid formülasyonların (SLN) hazırlanışı şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Öncelikle lipidler 75-80°C'ye ısıtılmış, aynı şekilde Tween 80 yağ fazında disperse edilerek 75-80°C'ye ısıtılmıştır. Su fazı da aynı sıcaklığa ısıtılmış, su fazı yağ fazına yavaş yavaş ilave edilerek yüksek hızlı karıştırıcı ile farklı hızlar kullanılarak (9600 rpm, 15000 rpm, 20000 rpm) 5dk. karıştırılmıştır (Küçüktürkmen ve Bozkır, 2018). Elde edilen emülsiyon, ultrasonik prob ile %90 güç ile 10 dk sonike edilmiştir. Daha sonra soğuması için oda sıcaklığında bekletilmiştir (Şekil 2.1). Hazırlanan partiküllerin sterilite sorununu aşmak amacıyla üretimin steril laminar hava akımı kabini içinde steril alet ve malzemelerle gerçekleştirilmesi planlanmıştır. SLN'lerin üretimi sırasında farklı yağlar, sürfaktanlar, dış ortamlar kullanılmıştır. SLN'ler ağız sıkıca kapalı cam flakonlarda, +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Yöntemin imalat akış şeması Şekil 2.1'deki gibidir.



Şekil 2.1. Katı lipid nanopartiküllerin üretim şeması.

2.4. Hazırlanan Katı Lipit Nanopartiküller İçin Formülasyon Çalışmaları

Hazırlanacak olan katı lipit nanopartiküllerde hedef ürüne ulaşabilmek için öncelikle kritik parametreler belirlenmiştir ve bu parametreleri sağlamaya yönelik formülasyon çalışmaları yapılması planlanmıştır. Bu parametreler Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kritik formülasyon parametreleri.

Partikül boyutu (nm)	200 nm altında olmalı
Polidispersite indeksi (PDI)	0,3 altında olmalı
Zeta potansiyeli	-30 mV ve 0 mV arasında olmalı
Enkapsülasyon etkinliği	%50’den fazla olmalı

2.4.1. Donepezil HCl Yüklü SLN’ler İçin Ön Formülasyon Çalışmaları

SLN’ler Bölüm 2.3’de belirtilen şekilde homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Ön formülasyon çalışmalarında yağ seçimi, sonikasyon süresi, homojenizasyon süresi ve hızı, etken maddenin katılacağı fazın seçilmesi gibi parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Donepezil HCl’in SLN üretimi sırasında hangi faza katılacağını belirlemek için, yağ fazına ve su fazına ayrı ayrı eklenerek formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların hazırlanması sırasında farklı yağlar kullanılmıştır. Formülasyon parametreleri Çizelge 2.4’de verilmektedir.

Çizelge 2.4. Donepezil HCl'in farklı fazlara eklendiği ve değişik yağlar kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonları.

Kod	Lipit	EM Fazı	Lipit (% a/h)	Sulu faz hacmi (mL)	Süpfaktan (su) (100 mg)	K.Hızı (rpm)	K.Süre (dk)	S. Süresi (dk)	EM (mg)
ÖFD1	Compritol	Su	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD2	Dynasan 114	Su	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD3	Dynasan 116	Su	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD4	Imwitor K900*	Su	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD5	Precirol	Su	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD6	Compritol	Yağ	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD7	Dynasan 114	Yağ	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD8	Dynasan 116	Yağ	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD9	Imwitor K900**	Yağ	1	10	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD10	Precirol	Yağ	1	10	Tween 80	9600	10	2	10

*: Emülsiyon oluşmadı; EM: Etken madde; K. Hızı: Karıştırma hızı; K. Süre: Karıştırma süresi; S. süresi: Sonikasyon süresi.

Donepezil HCL çözünürlüğünün pH bağımlı olduğu görülmüş (Ruela ve ark., 2015) ve bu nedenle değişik tampon ortamlarıyla formülasyonlar hazırlanmıştır. Donepezil HCL yağ fazına katılarak formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Farklı su fazları kullanılarak hazırlanan Donepezil HCl yüklü formülasyonlar.

Kod	Lipit (%1 a/h)	Su fazı (10 mL)	Süpfaktan (su) (100 mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dk)	Sonikasyon Süresi (dk)	EM (mg)
ÖFD6	Compritol	Saf su	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD7	Dynasan 114	Saf su	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD8	Dynasan 116	Saf su	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD9	Imwitor K900*	Saf su	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD10	Precirol	Saf su	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD11	Compritol	PBS pH 7,4	Tween 80	9600	10	2	10

Çizelge 2.5. Devam. Farklı su fazları kullanılarak hazırlanan Donepezil HCl yüklü formülasyonlar.

Kod	Lipit (%1 a/h)	Su fazı (10 mL)	Sürfaktan (su) (100 mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dk)	Sonikasyon Süresi (dk)	EM (mg)
ÖFD 12	Dynasan 114	PBS pH 7,4	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 13	Dynasan 116	PBS pH 7,4	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 14	Imwitor K900*	PBS pH 7,4	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 15	Precirol	PBS pH 7,4	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 16	Compritol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 17	Dynasan 114	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 18	Dynasan 116	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 19	Imwitor K900*	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD 20	Precirol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10

*: Emülsiyon oluşmadı.

Enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek bulunması nedeniyle formülasyonlara pH 9,0 tampon ortamı ile devam edilmiştir. Karıştırma süresi ve sonikasyon süresinin belirlenmesi için değişik zamanlarda denemeler yapılmıştır (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. Farklı karıştırma ve sonikasyon süreleri ile hazırlanan Donepezil HCl yüklü formülasyonlar.

Kod	Lipit (%1 a/h)	Su fazı (10 mL)	Sürfaktan (su)	K. Hızı (rpm)	K. Süresi (dk)	S. Süresi (dk)	EM (mg)
ÖFD16	Compritol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD17	Dynasan 114	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD18	Dynasan 116	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD19	Imwitor K900*	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD20	Precirol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	10	2	10
ÖFD21	Compritol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	2	10
ÖFD 22	Dynasan 114	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	2	10
ÖFD23	Dynasan 116	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	2	10
ÖFD24	Imwitor K900*	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	2	10
ÖFD25	Precirol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	2	10
ÖFD26	Compritol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	5	10

Çizelge 2.6. Devam. Farklı karıştırma ve sonikasyon süreleri ile hazırlanan Donepezil HCl yüklü formülasyonlar.

Kod	Lipit (%1 a/h)	Su fazı (10 mL)	Sümfaktan (su)	K. Hızı (rpm)	K. Süresi (dk)	S. Süresi (dk)	EM (mg)
ÖFD27	Dynasan 114	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	5	10
ÖFD28	Dynasan 116	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	5	10
ÖFD 29	Imwitor K900*	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	5	10
ÖFD30	Precirol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	5	10
ÖFD31	Compritol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	10	10
ÖFD32	Dynasan 114	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	10	10
ÖFD33	Dynasan 116	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	10	10
ÖFD34	Imwitor K900*	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	10	10
ÖFD35	Precirol	pH 9,0 tampon	Tween 80	9600	5	10	10

*: Emülsiyon oluşmadı; K. Hızı: Karıştırma hızı; K. Süresi: Karıştırma süresi; S. Süresi: Sonikasyon süresi.

Imwitor K900 adlı yağ ile emülsiyon oluşmadığından bu yağ ile çalışmaya devam edilmemiştir. Karıştırma hızı 5 dk, sonikasyon süresi 2 dk olan formüllerin partikül büyüklükleri daha uygun olduğundan çalışmalar bu parametrelerle devam edilmiştir.

2.4.2. Donepezil HCl Yüklü SLN'ler İçin Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda SLN üretimi için optimum özelliklere sahip olduğu düşünülen ÖFD33 kodlu formülden hareketle Çizelge 2.7'de belirtilen formüller hazırlanmıştır. ÖFD33 adlı formüle DF1 kodu verilmiştir.

Çizelge 2.7. Hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonları.

Formül Kodu	LİPİT	Etken Maddenin Katıldığı Faz	Etken Maddenin Katılış Şekli	Lipit Miktarı (% a/h)	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan Oranı (% a/h)	Su fazı hacmi (mL)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Etken Madde Miktarı (mg)	Sonikasyon Süresi (dk)
DF1	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	10	10
DF2	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	2	--	--	10	Tween 80	100	9600	10	10
DF3	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	4	--	--	10	Tween 80	100	9600	10	10
DF4	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	8	--	--	10	Tween 80	100	9600	10	10
DF5	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	3	Tween 80	100	9600	10	10
DF6	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	50	Tween 80	100	9600	10	10
DF7	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	15000	10	10
DF8	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	20000	10	10
DF9	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	2	10
DF10	Dynasan 116	Yağ	Gliserin çözeltisi	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	2	10
DF11	Dynasan 116	Yağ	ACN:dioksan (1:1)	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	2	10
DF12	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	5	10
DF13	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	10	10
	Lesitin			0,25								
DF14	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	9600	10	10
	Lesitin			0,5								

ACN: Asetonitril.

Çizelge 2.7. Devam. Hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonları.

Formül Kodu	LİPİT	Etken Maddenin Katıldığı Faz	Etken Maddenin Katılış Şekli	Lipit Miktarı (% a/h)	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan Oranı (% a/h)	Su fazı hacmi (mL)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Etken Madde Miktarı (mg)	Sonikasyon Süresi (dk)
DF15	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Pluronik F68	100	9600	10	10
DF16	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	PVA	100	9600	10	10
DF17	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	Arlacel-C	10	10	Tween 80	100	9600	10	10
DF18	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	Arlacel-C	10	10	PVA	100	9600	10	10
DF19	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	Arlacel-C	10	10	Pluronik F68	100	9600	10	10
DF20	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	50	9600	10	10
DF21	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	9600	10	10
DF22	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	200	9600	10	10
DF23	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	250	9600	10	10
DF24	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	300	9600	10	10
DF25	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	15000	10	10
DF26	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	20000	10	10
DF27	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	20000	10	1
DF28	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	20000	10	2
DF29	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	20000	10	5

2.4.3. Humanin Yüklü SLN'ler İçin Ön Formülasyon Çalışmaları

Humanin yüklü SLN'ler Bölüm 2.3'de belirtilen şekilde homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Ön formülasyon çalışmalarında Donepezil HCl için hazırlanan formülasyonlardan yararlanılarak çeşitli formülasyon parametreleri modifiye edilmiştir ve böylece belirlenen kritik kalite özelliklerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Öncelikli olarak dış faz olarak çeşitli tamponlar kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonlarda sürfaktan oranları değiştirilerek stabil bir formül elde edilmeye çalışılmıştır. Etken madde/lipit oranının artması için etken maddenin artırıldığı formülasyonlar üretilmiştir. 9600 rpm karıştırma hızı kullanılmıştır. Bu formülasyonlara ilişkin parametreler Çizelge 2.8'de verilmektedir. Ardından kullanılan yağ değiştirilerek denemeler yapılmıştır. Bu formülasyonlara ilişkin parametreler Çizelge 2.9'da verilmektedir.

Çizelge 2.8. Humanin yüklü formüllerde değişik tampon, etken madde ve sürfaktan miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait parametreler.

Kod	Lipit (% 1 a/h)	EM Fazı	Su fazı	Sulu faz hacmi (mL)	Sürf. (su)	Sürf. miktarı (mg)	K. Süre (dk)	S. Süre (dk)	EM (% a/h)
ÖFH1	Dynasan 116	Yağ	PBS pH 7,4	1,5	Tween 80	25	5	10	1
ÖFH2	Dynasan 116	Yağ	PBS pH 7,4	1,5	Tween 80	30	5	10	1
ÖFH3	Dynasan 116	Yağ	PBS pH 7,4	1,5	Tween 80	35	5	10	1
ÖFH4	Dynasan 116	Yağ	PBS pH 7,4	1,5	Tween 80	40	5	10	1
ÖFH5	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	25	5	10	1
ÖFH6	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	30	5	10	1
ÖFH7	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	35	5	10	1
ÖFH8	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	40	5	10	1
ÖFH9	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	25	5	10	2
ÖFH10	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	25	5	10	3
ÖFH11	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	25	5	10	4
ÖFH12	Dynasan 116	Yağ	HEPES pH 7,4	1,5	Tween 80	25	5	10	5
ÖFH13	Dynasan 116	Yağ	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	5	10	1

EM: Etken madde; Sürf.: Sürfaktan; K. Süre: Karıştırma süresi; S. süre: Sonikasyon süresi.

Çizelge 2.9. Değişik yağlar ile hazırlanan Humanin yüklü formülasyonlara ait parametreler.

Kod	Lipit	EM Fazı	Lipit miktarı (%a/h)	Su fazı	Sulu faz hacmi (mL)	Tween 80 miktarı (mg)	K. Süre (dk)	S. Süre (dk)	EM (% a/h)
ÖFH13	Dynasan 116	Yağ	1	PBS pH 7,4	10	150	5	10	1
ÖFH14	Dynasan 114	Yağ	1	PBS pH 7,4	10	150	5	10	1
ÖFH15	Compritol	Yağ	1	PBS pH 7,4	10	150	5	10	1
ÖFH16	Precirol	Yağ	1	PBS pH 7,4	10	150	5	10	1
ÖFH17	Dynasan 116	Yağ	1	PBS pH 7,4	10	150	5	10	1
	Lesitin		0,25						
ÖFH18	Dynasan 116	Yağ	1	PBS pH 7,4	10	150	5	10	1
	Lesitin		0,5						

EM: Etken madde; Sürf.: Sürfaktan; K. Süre: Karıştırma süresi; S. süre: Sonikasyon süresi.

2.4.4. Humanin Yüklü SLN'ler İçin Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda SLN üretimi için optimum özelliklere sahip olduğu düşünülen ÖFH13 kodlu formülden hareketle Çizelge 2.10'da belirtilen formüller hazırlanmıştır.

2.5. Katı Lipit Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

2.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması

Elde edilen katı lipit nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımını saptamak için dinamik ışık saçılımı yöntemi (Malvern Zetasizer NanoZS) kullanılmıştır. Süspande haldeki katı lipit nanopartiküller distile su ile 200 µg/mL konsatrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Ultrasonik banyo kullanılarak 5 dk disperse edildikten sonra, ölçüm küvetine alınmış ve 3 seri şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.5.2. Hazırlanan Formülasyonlarda Donepezil HCl ve Humanin Miktar Tayini

Katı lipit nanopartikül formülasyonlarında etken madde miktar tayini süpernatanda nanopartiküle yüklenmeden kalan etken madde miktarı tayin edilerek indirekt yöntemle hesaplanmıştır. Bu amaçla formülasyon centrisart santrifüj tüpleri kullanılarak 4000 rpmde 30 dakika santrifüj edilmiştir (Kumar ve ark., 2007). Santrifüjden sonra süpernatanda yer alan Donepezil HCl miktarı HPLC cihazı ile Humanin miktarı ise spektrofotometre kullanılarak 3 seri şeklinde ölçülmüştür.

Çizelge 2.10. Hazırlanan Humanin yüklü SLN formülasyonları.

Formül Kodu	LİPİT	EM Katıldığı Faz	Etken Maddenin Katılış Şekli	Lipit Miktarı (% a/h)	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Su fazı	Su fazı hacmi (mL)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	K. Hızı (rpm)	K. Süre (dk)	Son. Süre (dk)	EM Miktarı (mg)
HF1	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	10	1
HF2	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	2	1
HF3	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	5	1
HF4	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	pH 9,0 tamponu	10	Tween 80	150	9600	5	5	1
HF5	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	10	5	1
HF6	Dynasan 116	Yağ	Gliserin çözeltisi (1 mg/mL)	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	5	1
HF7	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	20000	5	5	1
HF8	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	2	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	20000	5	5	1
HF9	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	Saf su	10	Tween 80	150	20000	5	5	1
HF10	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	Saf su	20	Tween 80	150	20000	5	5	2

EM: Etken madde; K. Hızı: Karıştırma hızı; K. Süre: Karıştırma süresi; Son. Süre: Sonikasyon süresi.

2.5.3. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Bölüm 2.5.2’de anlatılan şekilde indirekt yöntem kullanılarak elde edilen örnekler, Bölüm 2.2.1.5’te anlatılan miktar tayini metotlarına göre ölçülmüştür ve Eşitlik 3’e göre enkapsülasyon etkinliği (EE) hesaplanmıştır.

$$\% EE = \left(\frac{A}{B} \right) \times 100 \quad \text{Eşitlik 3}$$

A: Katı lipid nanopartiküllere yüklenen etken madde miktarı (mg)- Süpernatanda bulunan etken madde miktarı (mg)

B: Teorik etken madde miktarı (mg)

Optimum formülasyonlar için SLN formülasyonlarına yüklenen etkin madde miktarı (DL) Eşitlik 4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% DL = \left(\frac{\text{Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı}}{\text{Nanopartikül miktarı}} \right) \times 100 \quad \text{Eşitlik 4}$$

2.5.4. Zeta Potansiyel Ölçümü

Katı lipid nanopartiküllerin yüzey yüklerindeki değişimi belirlemek için zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. Çalışmalarda üretilen farklı nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Süspansiyon haldeki katı lipid nanopartiküller distile su ile 200 µg/mL konsantrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir ve 3 seri şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.5.5. Geliştirilen Katı Lipit Formülasyonunun Tekrarlanabilirliğinin Tayin Edilmesi

Hazırlanan formülasyonunun tekrarlanabilirliği için 3 adet formülasyon için gerekli çözeltiler ve maddeler ayrı ayrı olarak hazırlanmış ve üretim gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların tekrarlanabilirliği ayrı ayrı üretilen bu üç formülasyonun ortalama partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon etkinlikleri kıyaslanarak gösterilmiştir.

2.5.6. Çözünme Hızı Deneyi

Çözünme hızı tayininde diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır (Küçüktürkmen ve Bozkır, 2018). Deneylerde çözünme hızı ortamı olarak pH 7,4 fosfat-salin tamponu kullanılmıştır. 1 mg/mL konsantrasyonda Donepezil HCl içeren 1 mL formülasyon membrana aktarılmış (6-8 kDa) ve membranların iki tarafı klips ile kapanmıştır. Membranlar kaplara yerleştirildikten sonra üzerlerine 50 mL pH 7,4 fosfat-salin tamponu eklenmiştir. Kaplar sıcaklığı $37 \pm 0,5$ °C'e ve hızı 50 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında kaplardan 1 mL numune çekilmiş ve yerine taze tampon eklenmiştir. Alınan örnekler 0,45µm filtreden süzülerek ependorf tüplere alınmış ve HPLC ile analiz yapılmıştır.

Humanin içeren formülasyonlar için Donepezil HCl yüklü SLN'lerde olduğu gibi yine aynı deney düzeneği hazırlanmıştır. 0,1 mg/mL konsantrasyonda formül deney için kullanılmıştır. Alınan numuneler spektrofotometri ile analiz edilmiştir.

Elde edilen verilerden çıkan madde miktarları hesaplanarak çözünme hızı grafikleri hazırlanmıştır.

2.5.7. Hazırlanan Humanin Yüklü SLN Formülasyonlarında Humanin'in Yapısal Bütünlük Kontrolü

Humanin'e SLN hazırlama aşamalarının etkisini tespit etmek amacıyla in vitro salınan peptitin yapısal bütünlüğünün kontrolü Native-PAGE ve CD analizleri kullanılarak yapılmıştır. Böylece Humanin'in SLN enkapsülasyonu ve tekrar buradan salımı sonrasında yapısal ve konformasyonel bütünlüğünün devam edip etmediğinin kanıtlanması amaçlanmıştır.

2.5.7.1. Native-PAGE Analizi

Native-PAGE analizi için örnekler poliakrilamit jele uygulanmış ve elde edilen bantlar, standart Humanin çözeltisinin jeldeki bantları ile karşılaştırılmıştır. Bölüm 2.1.3'de belirtilen şekilde hazırlanan çözeltiler, %15'lik ayırma jeli ve %7,5'luk yükleme jeli kullanılmıştır (Devrim ve ark., 2011). Örnekler ve Humanin çözeltisi (40 µl) poliakrilamit jele uygulanmış ve TBE tamponu içinde 100 V'de 60 dakika süreyle yürütülmüştür. Oluşan bantların boyanması %0,1 (a/h) gümüş nitrat çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda örneklerden elde edilen bantlar, standart Humanin bantları ile karşılaştırılmıştır.

2.5.7.2. CD Analizi

Humanin içeren nanopartiküllerin hazırlaması aşamasında maruz kaldığı fiziksel koşullara karşı konformasyonunu koruyup korumadığının anlaşılması amacıyla CD spektroskopisi (Jasco-J 1500) kullanılmıştır. Bu amaçla nanopartiküllerden 24 saat sonunda salınan Humanin'in CD spektrumu alınmıştır ve elde edilen spektrumlar saf Humanin için elde edilen spektrum ile karşılaştırılmıştır.

Peptit içeren formülasyonlar yaklaşık 40 µM konsatrasyonda suda çözölmüş ve 0,1 mm quartz küvete aktarılmıştır. 25 °C'de 190-260 nm'de 20 nm/dk'da 0.5 sn cevap

zamanı ile ölçüm yapılmış, 6 ölçümden sonra spektrumlar çıkarılıp, ortalama kalan molar eliptisite hesaplanmıştır (Romeo ve ark., 2017).

2.6. Formülasyon Seçimi

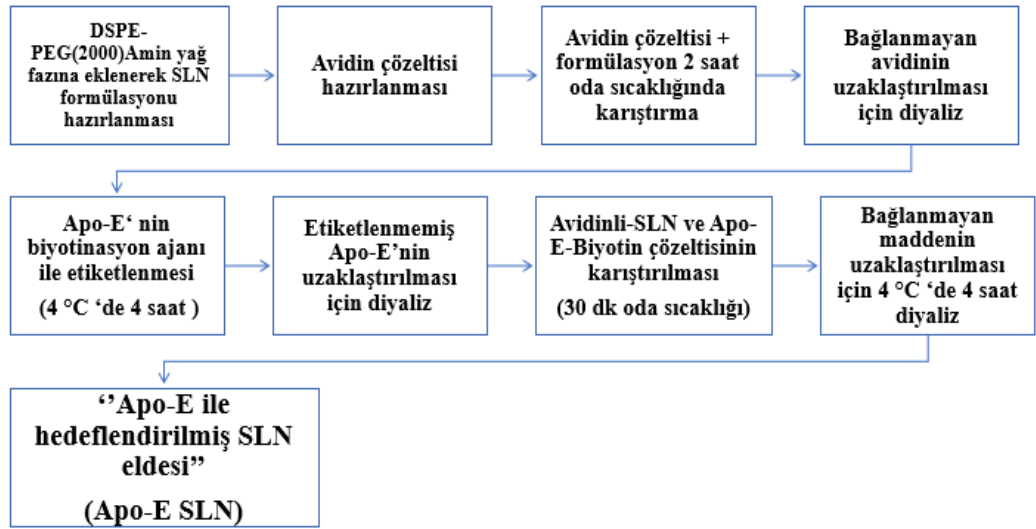
Hedeflendirilecek formülasyonların seçimi sırasında yukarıda belirtilen karakterizasyon testlerinin sonuçları göz önünde bulundurulmuştur. 200 nm’den küçük boyuta sahip SLN’lerin kan dolaşımında daha uzun süre kaldığını ve böylece etkin maddenin beyine geçişi için kan beyin engeli ile temasta bulunma süresinin de arttığı belirtilmiştir. Bu nedenle partikül boyutu 200 nm’ nin altında olan nanopartikül formülasyonları seçilmiştir. Literatürlerde elektrostatik stabilitenin sağlanması için zeta potansiyelinin en az 30mV olması gerektiği belirtilmiştir (Celia ve ark., 2011). Zeta potansiyeli bu değer göz önünde bulundurularak değerlendirilecektir. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli uygun olan formülasyonlar arasından enkapsülasyon etkinliği yüksek olan formülasyonların seçilmesi planlanmıştır. Formülasyon seçimi sırasında Humanin’in yapısal bütünlüğünün korunması göz önüne alınmıştır.

2.7. Seçilen SLN’lerin Apo-E ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılması

SLN’lerin hedeflenmesi sırasında kullanılacak yöntem için Neves ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmadaki yöntem baz alınmış, yöntem üzerinden modifikasyonlar yapılarak hedeflendirme çalışması yapılmıştır (Şekil 2.2). Kullanılan yöntemi kısaca özetlemek gerekirse; optimal olarak seçilen SLN formülü temel alınarak etken madde kullanmadan 5 mg 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[amino(polietilen glikol)-2000] -amoniyum tuzu (DSPE-PEG(2000) amin) yağ fazına ilave edilerek formülasyon hazırlanmıştır.

7,5 mg avidin 1,5 mL PBS pH 7,4’te çözünmüş ve üzerine 1,5 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) ilave edilmiştir. Böylece avidin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden belli bir miktar alınıp formülasyon ile 2 saat

boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bağlanmayan avidinin uzaklaşması için bu karışım diyaliz membran (100 kDa) kullanılarak diyaliz edilmiştir. Aynı bir yerde Apo-E biyotinyasyon ajanı (N-hidroksisüksinimid)-Biyotin (EZ-LinkSülfo-NHS) ile etiketlenmiştir. 5 ml fosfat-salin tamponu içerisinde 1 mg Apo-E 7,5 mg biyotinyasyon ajanı EZ-LinkSülfo-NHS ile 4 °C ‘de 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından yine aynı sıcaklıkta diyaliz membran (100 kDa) ile diyaliz edilmiştir. Son olarak avidin eklenmiş formülasyon ve avidin-biyotin çözeltisinden eşit hacimler alınarak 30 dk oda sıcaklığında karıştırılmıştır. En son 4 saat 4°C’de diyaliz membran (100 kDa) ile diyaliz yapılmıştır (Neves ve ark., 2015).



Şekil 2.2. Apo-E ile SLN modifikasyonu sırasında işlem basamakları.

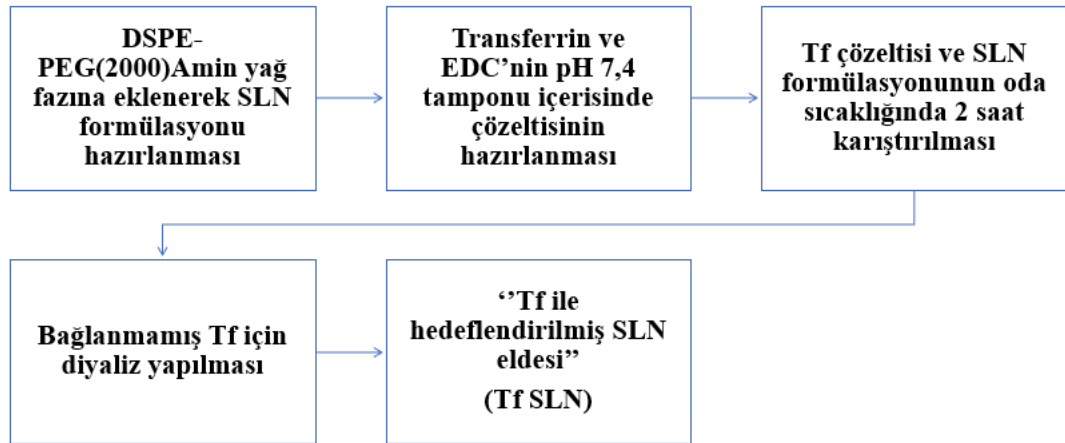
2.7.1. Apo-E'nin SLN Yüzeyine Bağlanma Etkinliğinin Tayini

Florometrik çalışma Apo-E'nin partikül üzerine bağlandığını kanıtlamak için yürütülmüştür. Bu amaçla biyotinlenmiş floresin lipit nanopartikül üzerindeki biyotin bağlanma bölgelerini ve serbest avidini belirlemek için kullanılmıştır. 30 µL lipit nanopartikül 2 mL pH 7,4 fosfat-salin tamponunda çözölmüş ve 5 µl biyotinlenmiş floresin (200 µg/mL) ile 30 dk oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra örnekler Amicon® Ultra-4 Santrifüj filtresine aktarılmış ve 4300 rpm’de 5 dakika

santrifüj edilmiştir. Örnek süpernatantları toplanmış ve multimod plaka okuyucu ile floresan yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Biotinlenmiş floresin pozitif ve inkübasyon olmayan floresanlı SLN çözeltisi negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Neves ve ark., 2017).

2.8. Seçilen SLN'lerin Transferrin ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılması

Transferrin karboksil grubundan, etken madde yüklü katı lipid partiküllerin yüzeyinde bulunan DSPE'nin amino grubuna kovalan olarak bağlanmıştır. Bunun için EDC bağlama ajanı olarak kullanılmıştır. Humanin yüklü DSPE-PEG(2000)-amin içeren SLN formülasyonundan 3 mL alınmış ve transferrin (lipit: Tf oranı 95:5 a/a) ve EDC (her 10 ml için lipit/Tf karışımı için 10 mg) içeren 0,25 mL pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde süspande edilmiştir. Daha sonra 2 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bağlanmamış fazla Tf, diyaliz membrandan (300 kDa) diyaliz edilerek ortamdan ayrılmıştır (Gupta ve ark., 2007). İşlem basamakları Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Tf ile SLN modifikasyonu sırasında işlem basamakları.

2.8.1. Transferrinin SLN'ler Üzerine Bağlanma Etkinliğinin Tayini

SLN'ler üzerine Tf konjugasyonun başarılı bir şekilde olduğunu kanıtlamak için ile bikiyoninik Asit (BCA) analiz yöntemi kullanılarak Tf miktar tayini yapılmıştır. Bikiyoninik asit yöntemi, peptit ve protein yapısındaki maddelerin miktar tayininin yapılmasında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Bunun için her bir kuyucuğa 150 µl Tf bağlanmış SLN ve 150 µL reajan A ve reajan B karışımından oluşan mikroBCA ajanı (50 kısım reajan A + 1 kısım reajan B) ilave edilmiş ve mikrolpaka 60 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaka önce oda sıcaklığına soğutulmuş, daha sonra mikrolpaka okuyucusunda 562 nm'de seyreltmelerin absorbansı ölçülmüştür. Miktar tayini amacıyla bovin serum albümin (BSA) kullanılarak 1-50 ppm arasında 6 noktada bir seri kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara denk gelen absorbans değerleri kullanılarak standart doğru denklemi oluşturulmuştur ve Tf bağlı SLN'den elde edilen absorbans bu denklemde yerine konarak Tf miktarı hesaplanmıştır. Tf bağlanması sırasında kullanılan toplam Tf miktarı baz alınarak yüzde bağlanma hesaplanmıştır (Smith ve ark., 1985; Soe ve ark., 2019; Spiers ve ark., 1999).

2.9. Yüzey Modifikasyonu Yapılan Partiküller İçin Yapılan Kontroller

SLN formülasyonları için yapılan partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyelinin ölçülmesi, enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi, in vitro salım çalışmaları gibi testler hedeflendirilmiş SLN'ler için de yapılmıştır. Bu testler Bölüm 2.5.1; 2.5.2; 2.5.3; 2.5.4 ve 2.5.6 başlıklarında belirtilen yöntemlere göre yürütülmüştür. Böylece formülasyonlar hedeflendirildikten sonra amaca uygunlukları açısından tekrar bir değerlendirme yapılmıştır. Deneyler üç paralel yürütülmüştür.

Ayrıca peptit yapısının hedeflendirme basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi için Bölüm 2.5.7'de anlatılan şekilde yapısal bütünlük analizleri yapılmıştır.

2.10. Hazırlanan Formülasyonların FTIR Analizi

Donepezil HCl, Humanin, yağ, boş SLN, etken madde yüklü SLN'ler ve etken madde yüklü hedeflendirilmiş SLN formülasyonlarının FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında Agilent FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaza toz halinde yerleştirilen örneklerin 4000 - 650 cm^{-1} dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.11. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Donepezil HCl, Humanin, yağ, boş SLN, etken madde yüklü SLN'ler ve etken madde yüklü hedeflendirilmiş SLN formülasyonlarının termal özellikleri Shimadzu DSC-60 cihazı ile incelenmiştir. Yaklaşık 3 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Azot gazı 50 mL/dak akış hızında kullanılarak, örnekler 25-250°C sıcaklık aralığında 5°C/dak doğrusal ısıtma hızında analiz edilmiştir. Boş pan kör olarak kullanılmıştır.

2.12. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Donepezil HCl ve Humanin içeren hedeflendirilmiş ve hedefli olmayan nanopartikül formülasyonları distile suda disperse edildikten sonra 200 mesh bakır grid üzerine damlatılarak fazlası filtre kağıdı ile alınmıştır. %2 uranil asetat çözeltisi ile 2 dakika boyandıktan sonra oda sıcaklığında kurutularak FEI Tecnai G2 marka TEM (120 Kw) cihazı ile görüntülenmiştir.

2.13. Stabilite Çalışmaları

2.13.1. +4°C’de Yapılan Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmaları için Donepezil HCl ve Humanin içeren hedeflendirilmiş ve hedefli olmayan nanopartikül formülasyonları +4°C’de 3 ay süreyle karanlık ortamda bekletilmiştir. 3 aylık sürenin başlangıcında ve sonunda formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak stabiliteleri incelenmiştir.

2.13.2. 25°C’de Yapılan Stabilite Çalışmaları

Donepezil HCl ve Humanin içeren hedeflendirilmiş ve hedefli olmayan nanopartikül formülasyonları 25°C ve %60 nem içeren stabilite dolabında 3 ay süre ile tutulmuş ve bu süre sonundaki partikül boyutu, polidispersite indeks ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak stabiliteleri değerlendirilmiştir.

2.13.3. Kolloidal Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan etken madde yüklü formülasyonların protein varlığındaki stabilitesini incelemek için, SLN’ler %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren pH 7,4 fosfat-salin çözeltisi içerisinde +4°C’de 1 ay ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve SLN’lerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelindeki değişim Malvern NanoZS cihazı kullanılarak izlenmiştir. Bu iki koşuldaki partikül büyüklüğü verileri, formülasyonun üretimi sonrasında hemen ölçülen partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı profili ve zeta potansiyeli ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

2.14. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) 2214-A Doktora Sırası Araştırma Bursu ile desteklenmiştir ve Hungarian Academy of Sciences Biological Reserach Center- Institute of Biophysics Biological Barriers Research Group laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2.14.1. Hücrelerin Çoğaltılması

hCMEC/D3 insan türevi bir beyin endotel hücre dizisidir. Hücreler başlangıçta %10 FBS ve 40 µg/mL endotel büyüme faktörü içeren Dulbecco's modified Eagle's ortamında (DMEM) %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de tutulmuştur. Bu hücreler 0.1% jelatin ile kaplanmış kuyucuklarda üretilmiştir. RBEC hücreleri de aynı işleme tabi tutulmuştur. SH-SY5Y insan türevi bir nöroblastoma hücre dizisidir ve nöronların fizyolojik ve patolojik durumların taklit edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışması için hücreler başlangıçta %10 FBS, 100 U/mL penisilin ve streptomisin içeren DMEM içerisinde %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de tutulmuştur (Gao ve ark., 2017).

2.14.2. Sitotoksosite Çalışmaları

2.14.2.1. MTT Çalışmaları

Sitotoksosite tayini için MTT çalışmalarında RBEC, hCMEC/D3 ve SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Hücreler ayrı ayrı 5x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuğa ekilmiştir. Triton X deterjanı (1 mg/mL) %100 hücre toksisitesini belirlemek için referans madde olarak kullanılmıştır. Etken madde yüklü hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nanopartiküller 0,03-1 µg/mL konsantrasyon aralığında hücrelere uygulanarak 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha

sonra hücre ortamı alınmış ve 20 µL 0,5 mg/mL MTT çözeltisi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücrelere eklenmiş ve CO₂ inkübatöründe 4 saat boyunca 37 °C’de tutulmuştur. Son olarak her bir kuyucuğa 100 µL dimetilsülfoksit (DMSO) formazan kristallerini çözmek için eklenmiş, 10 dk çalkalanmıştır ve optik dansite 570 nm’de ölçülmüştür. Hücre canlılığı kontrol grubuna göre boyadaki azalmanın yüzdesi olarak hesaplanmıştır (Mulik ve ark., 2010; Veszelka ve ark., 2017).

2.14.2.2. Empedans Ölçümü ile Hücre Canlılığı Tayini

RBEC ve hCMEC/D3 hücrelerinde hücrelerin SLN uygulamasına verdiği cevabı görebilmek için biyoelektrik empedans ölçümü yapılarak hücreler izlenmiştir. Zemin ölçümünden sonra hücreler 6×10^3 hücre/kuyucuk yoğunlukta altın elektrotlarla entegre edilmiş 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Hücreler 37°C’de 5-7 gün CO₂ inkübatöründe kültür edilmiştir. Daha sonra hücrelere SLN’ler (1 ve 10 µg/mL) uygulanmış ve 24 saat izlenmiştir. Hücre indeksi her bir ölçüm noktasında R_n-R_b olarak değerlendirilmiştir. Burada R_n kuyucukların hücre varken hücre-elektrot empedansıdır; R_b ise kuyucukların sadece kültür ortamı varken empedansıdır. Hücre indeks değerleri hücre sayısı ve canlılığını yansıtmaktadır (Mészáros ve ark., 2018).

2.14.3. Hücresel Alım Çalışmaları

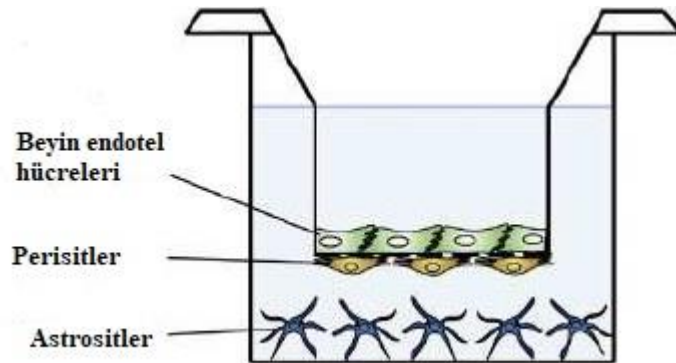
RBEC, hCMEC/D3 ve SH-SY5Y hücreleri, 3×10^4 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Bitişik tek tabakalı hücreler, 10 µg / mL’ye hücre kültürü ortamı ile seyreltilen Humanin yüklü SLN, Donepezil yüklü SLN Apo-E ile hedeflendirilmiş Humanin SLN ve Apo-E ile hedeflendirilmiş Donepezil SLN partikülleri CO₂ inkübatöründe 37 °C’de 2 saat kültür ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, hücre yüzeyiyle ilişkili SLN’leri yıkamak için %1 BSA ile desteklenmiş soğuk PBS ile bir kez, asit tamponu (glisin 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3) ile üç kez yıkanmıştır. Son olarak hücreler, Triton X-100

deterjan (10 mg/mL) ile PBS içinde parçalanmıştır ve floresan yoğunluğu, 549 nm eksitasyon ve 572 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometre ile tespit edilmiştir.

2.14.4. İn Vitro Kan-Beyin Engeli Modelinden Geçiş Çalışmaları

2.14.4.1. Üçlü KBE Ortak Hücre Kültürü Modelinin Oluşturulması

Geçirgenlik çalışmaları için üçlü bir ortak kültür KBE modeli oluşturulmuş ve kullanılmıştır (Nakagawa ve ark., 2009). KBE modeli hazırlamak için perisitler, doku kültürü insertlerinin (Transwell, polikarbonat membran, 3 µm gözenek boyutu) kollajen kaplı alt tarafına pasajlanmıştır (1.5×10^4 hücre/cm²) ve matrigel kaplı membranların üst tarafına beyin endotel hücreleri ekilmiştir (7.5×10^4 hücre/cm²). Daha sonra, zarın iki tarafında beyin endotel hücreleri ve perisitleri içeren insertler, altta glial hücrelerin yetiştirildiği 12 çukurlu plakalara yerleştirilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.4. Hazırlanan üçlü KBE ortak hücre kültürü modeli.

Bu sistemin üst ve alt sıvı bölmelerinin ikisi de, 550 nM hidrokortizon ile takviye edilmiş endotel kültür ortamına alınmıştır ve üç hücre türü, geçirgenlik deneylerinden önce dört gün boyunca birlikte kültürlenmiştir (Nakagawa ve ark., 2009; Walter ve ark., 2015).

2.14.4.2. İn Vitro KBE Modelinde Geçişin Değerlendirilmesi

KBE üçlü ortak kültür modelinin sıklığı, transendotelial elektrik direncinin (TEER), EVOM voltohmmetre ile ölçülmesiyle doğrulanmıştır. Kaplanmış ancak hücresiz filtrelerin TEER değerleri, ölçülen TEER değerlerinden çıkarılmıştır. Yüksek TEER değerleri ($210 \pm 18 \Omega \times \text{cm}^2$) elde edildiğinde model deneyler için kullanılmıştır. Hücreler, üst / donör bölmesinde (0,5 mL), 2 saat boyunca %1 İnsülin-transferrin-selenyum (ITS) ile desteklenen fenol kırmızısı içermeyen DMEM / F12'de seyreltilmiş SLN'ler (10 µg/mL) ile muamele edilmiştir. KBE modelinin işlevini test etmek için, geçirgenlik göstergesi olarak kullanılan sodyum floresin (SF, 376 Da) ve Evans mavisi etiketli serum albümininin (EBA, 67 kDa) endotelial tek tabakalar boyunca akışı belirlenmiştir. İşlemlerden sonra, alt / alıcı bölmelerden (1,5 mL) örnekler toplanmış ve 549 nm eksitasyon ve 572 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometre ile ölçülmüştür. Görünür geçirgenlik katsayıları (Papp), (Bocsik ve ark., 2016) Eşitlik 5 ile hesaplanmıştır:

$$P_{app} = \frac{\Delta[C]_A \times V_A}{A \times [C]_D \times \Delta t}$$

Eşitlik 5

P app : Görünür geçirgenlik katsayısı (cm/s)

$\Delta[C]_A$: 2 saat sonra alıcı bölmedeki konsantrasyon değişimi

$[C]_D$: Başlangıçta donör kompartman konsantrasyonu

V_A : Alıcı bölmenin hacmi (1,5 ml)

A : Geçirgenlik için mevcut yüzey alanı (1,12 cm²)

2.15. Zebra Balıkları ile Yürütülen İn Vivo Çalışmalar

İn vivo hayvan çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 28.08.2018 tarihli ve 02/2018 protokol numaralı onay dahilinde gerçekleştirilmiştir.

12 adet 25 gram ağırlığında, erişkin zebra balığı kullanılmıştır. Kullanılan deney hayvanları İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü tarafından temin edilmiş olup; çalışmalar burada yürütülmüştür.

İn vivo deneylerde kullanılacak olan hayvan grupları Çizelge 2.11’de belirtilen şekilde planlanmıştır. İn vivo denemeler her bir grupta en az n=3 sayıda hayvan kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.11. İn vivo deneylerde kullanılan hayvan grupları.

Grup numarası	Grup adı
Grup I	Kontrol grubu
Grup II	Boş SLN formülasyonu (Rhodamin B yüklü)
Grup III	Apo-E SLN formülasyonu (Rhodamin B yüklü)
Grup IV	Tf SLN formülasyonu (Rhodamin B yüklü)

2.15.1. Sitotoksite Çalışması

Formülasyonların in vivo toksisitesi zebra balığı embriyo miktar tayini ile değerlendirmiştir. Formülasyonlar embriyolar 6 saatlik iken 1 yumurta/kuyucuk olacak şekilde 50, 100, 200 ve 400 nmol konsantrasyonlarda 96 kuyucuğa ekilmiş ve zebra balığı embriyolarının gelişimi formülasyonların ilavesinden sonra 24. saatte ters mikroskop kullanılarak gözlenmiştir (Rizzo ve ark., 2013).

2.15.2. Beyine Geçiş Çalışması

Floresan mikroskopta balıklar görüntülenerek beyine geçiş olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu çalışmada floresan ölçüm yapılacağından dolayı Rhodamin B (RhoB) ile işaretlenmiş formülasyonlar kullanılmıştır (RhoB SLN; Apo-E RhoB SLN ve Tf RhoB SLN). Görüntülerin çekimi sırasında ölçülen floresan yoğunlukları grafiğe

geçirilmiştir. Belirtilen formülasyonlar uygulandıktan sonra belirlenen alanların floresan yoğunluk ölçümü “ImageJ” programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama “Seçili Alandaki Toplam Floresan Yoğunluğu = Entegre Yoğunluk - (Seçilen Bölge x Arka Plan Okumasının Ortalama Floresansı)” formülü ile hesaplanmıştır (McCloy ve ark., 2014). Bu grafiklere göre hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş formüllerin beyine geçiş karşılaştırması yapılmıştır.

2.16. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prizma 8 yazılımı ile tek/iki yönlü ANOVA analizi kullanılarak yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

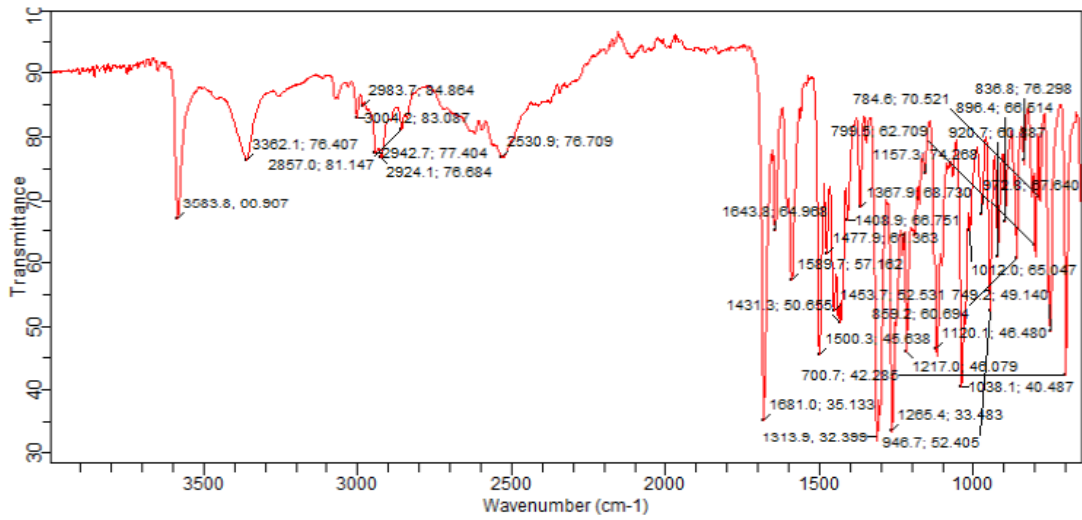
Hayvan deneyleri için istatistiki değerlendirmelerde kullanılacak olan ölçümler için sadece olfaktör bulb ile anteriyer komissürün kaudal ucu arasındaki bölümler kullanılmıştır. Ortalama sinyal yoğunluklarının ölçümü, ImageJ programının 3D nesne sayıcı modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde, SPSS 20 programı kullanılarak tek yönlü ANOVA testi ve ardından Tukey testi ve Student t testi yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesine Dair Bulgular

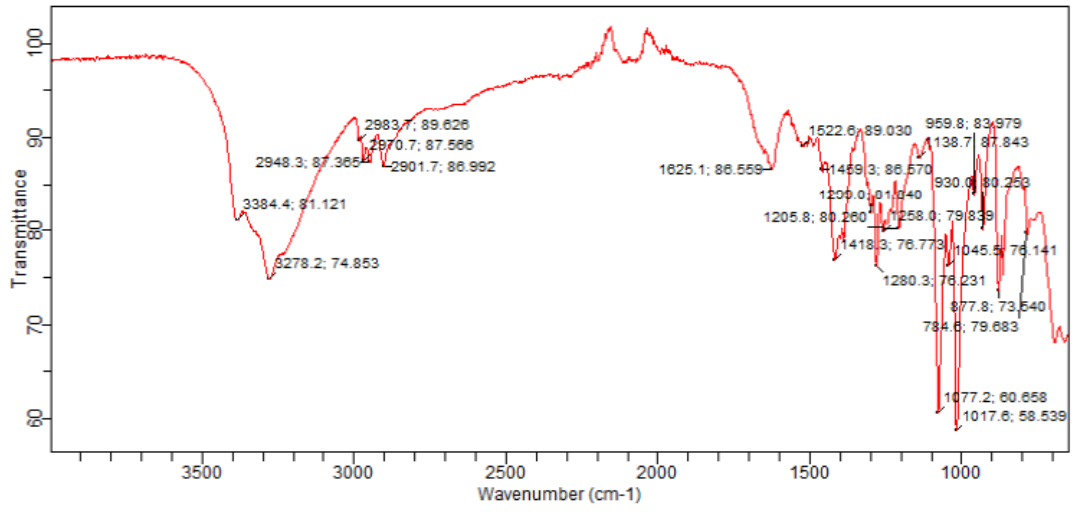
3.1.1. Humanin ve Donepezil HCl'in FTIR Spektrumlarına Ait Bulgular

Donepezil HCl'in FTIR spektrumu Bölüm 2.2.1.1'de ifade edildiği üzere elde edilmiştir ve fonksiyonel grupların absorpsiyon bantları Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Donepezil HCl'e ait FTIR spektrumu.

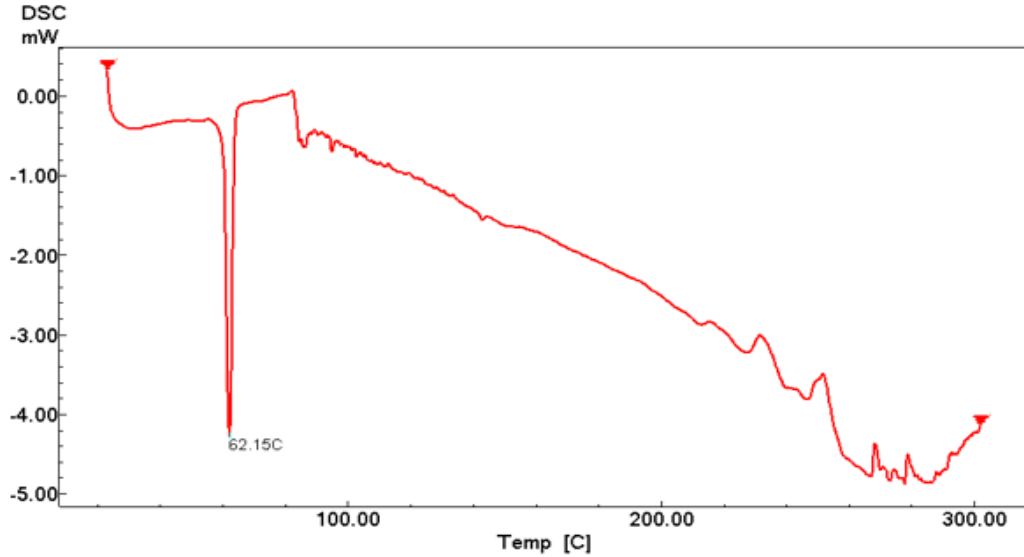
Humanin'in FTIR spektrumu Bölüm 2.2.1.1'de ifade edildiği üzere elde edilmiştir ve fonksiyonel grupların absorpsiyon bantları Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



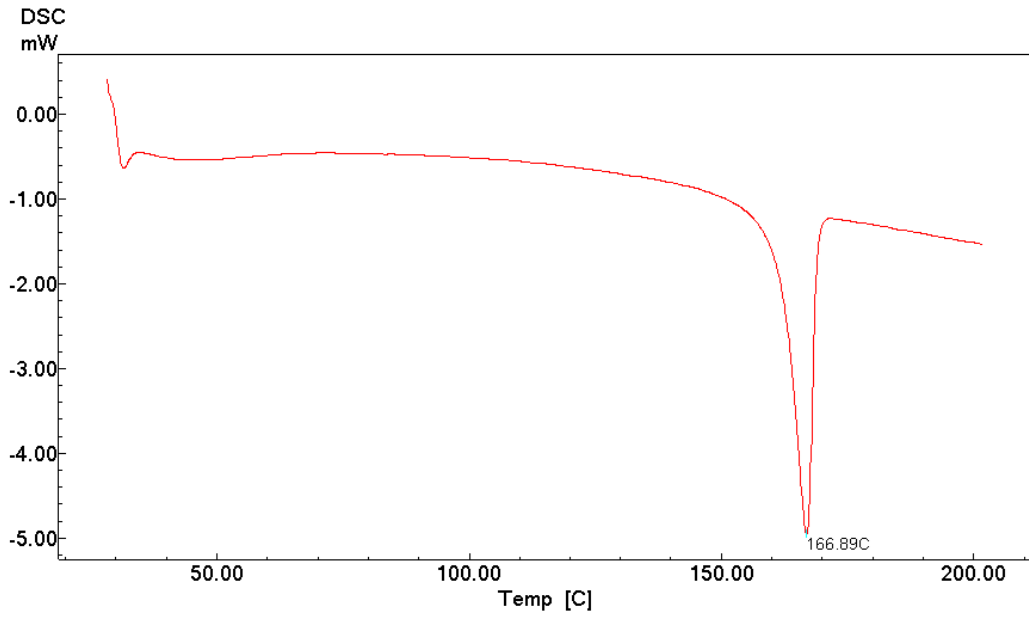
Şekil 3.2. Humanin'e ait FTIR spektrumu.

3.1.2. Humanin ve Donepezil HCl'in DSC Analizlerine Dair Bulgular

DSC analizi Bölüm 2.2.1.2'de belirtilen şekilde yapılmış ve Donepezil HCl için Şekil 3.3' deki; Humanin için Şekil 3.4'teki termogramlar elde edilmiştir.



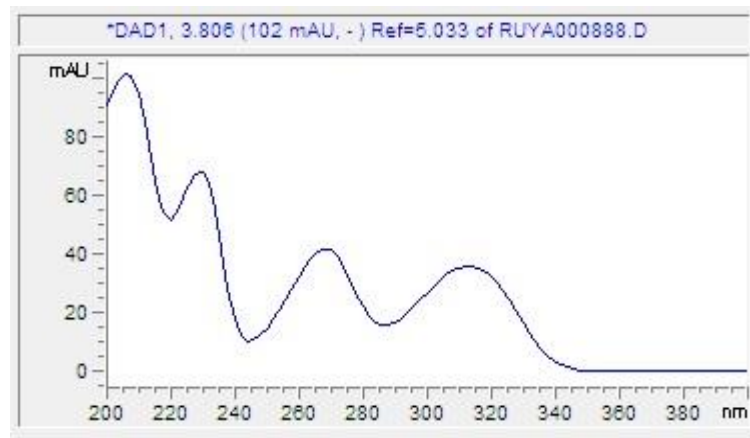
Şekil 3.3. Donepezil HCl'e ait DSC termogramı.



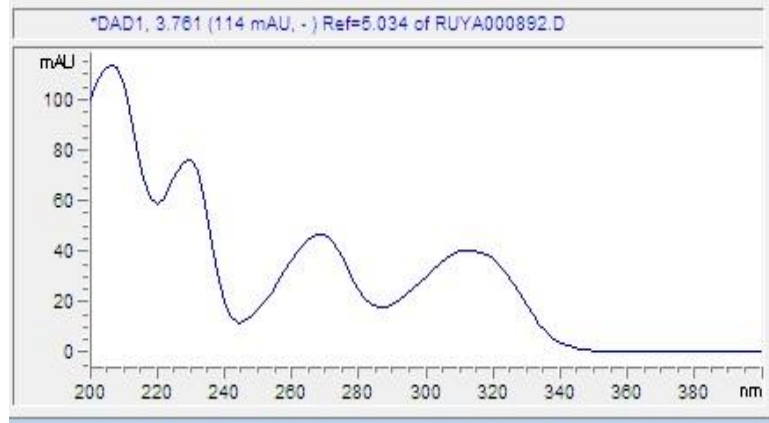
Şekil 3.4. Humanin'e ait DSC termogramı.

3.1.3. Donepezil HCl'in UV Spektrumuna Dair Bulgular

Donepezil HCl'in UV spektrumu Bölüm 2.2.1.3'de ifade edilen şekilde distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponunda alınmış ve maksimum pik noktası 270 nm'de gözlenmiştir. Elde edilen spektrumlar sırasıyla Şekil 3.5'de ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



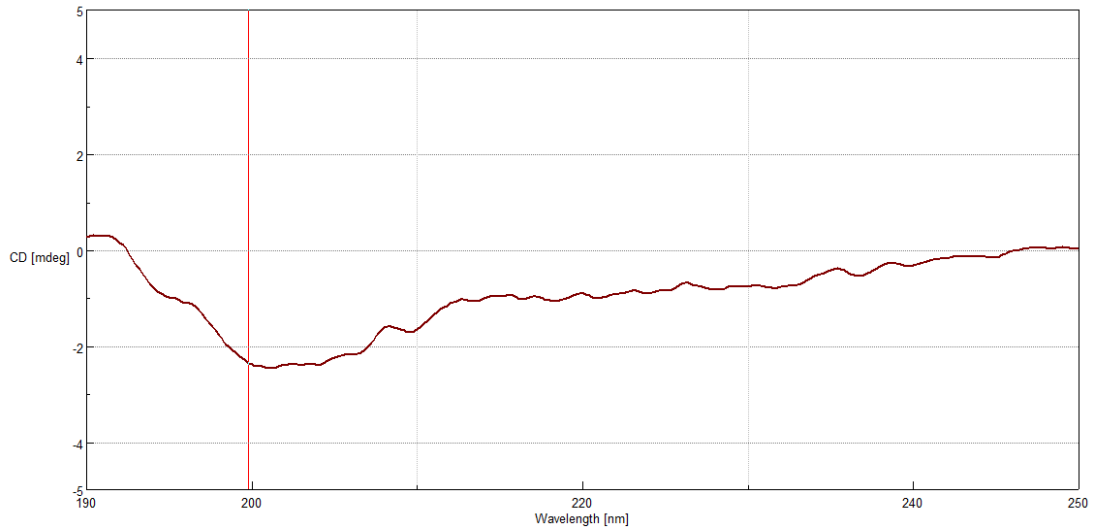
Şekil 3.5. Donepezil HCl'in distile su içindeki UV spektrumu.



Şekil 3.6. Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu içindeki UV spektrumu.

3.1.4. Humanin'in Yapısal Bütünlüğünün Sirküler Dikroizm ile Belirlenmesine Dair Bulgular

Humanin'in Bölüm 2.2.1.4'de anlatıldığı şekilde yapılan CD çalışması sonucu elde edilen spektrumu Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Spektruma göre minimum pik 208 nm ve 220 nm'de gözükmektedir.

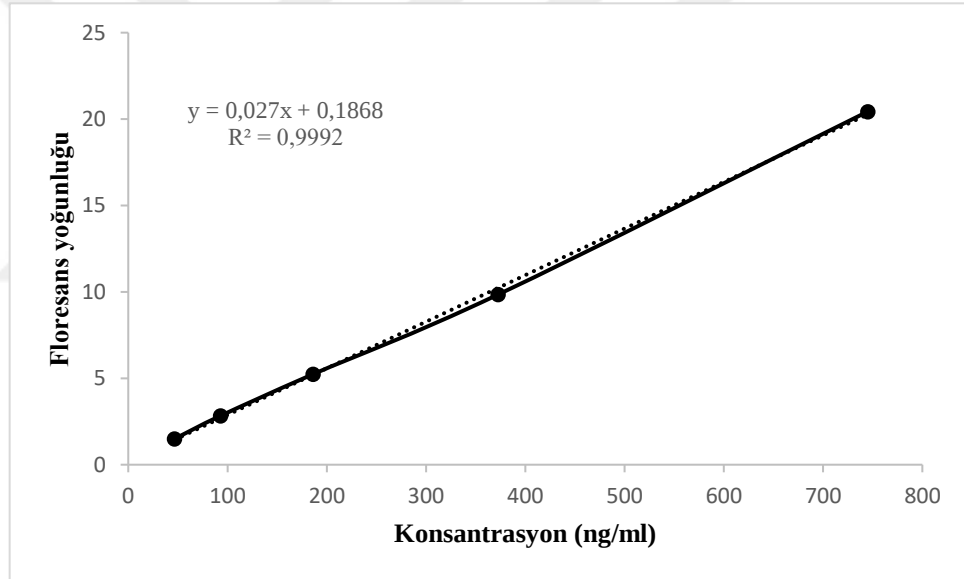


Şekil 3.7. Humanin'e ait CD spektrumu.

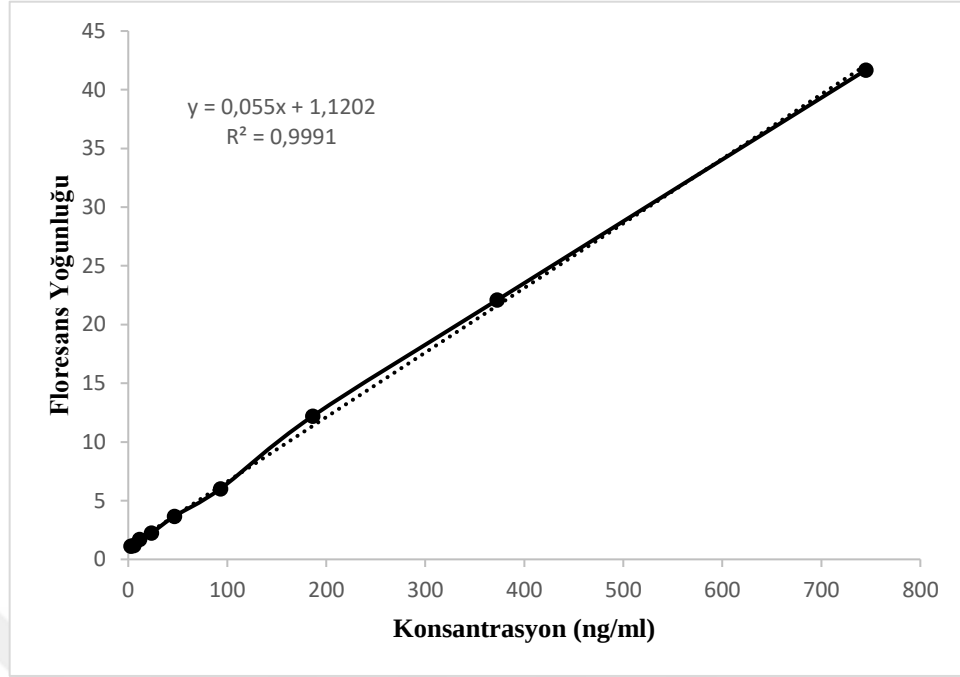
3.1.5. Etken Maddelerin Miktar Tayinleri için Kullanılan Analitik Yöntemlerin Kalibrasyonlarına Ait Bulgular

3.1.5.1. Humanin İçin Kullanılan Spektroflorometri Yönteminin Kalibrasyonuna Ait Bulgular

Humanin'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki ölçümleri Bölüm 2.2.1.5.1'de açıklanan şekilde yapılmış ve kalibrasyon grafik ve denklemi bulunmuştur. Grafikler sırasıyla distile su için Şekil 3.8'de, pH 7,4 fosfat-salin tamponu için Şekil 3.9'da; bu doğrulara ait parametreler Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Humanin'in distile sudaki kalibrasyon doğrusu (n=3).



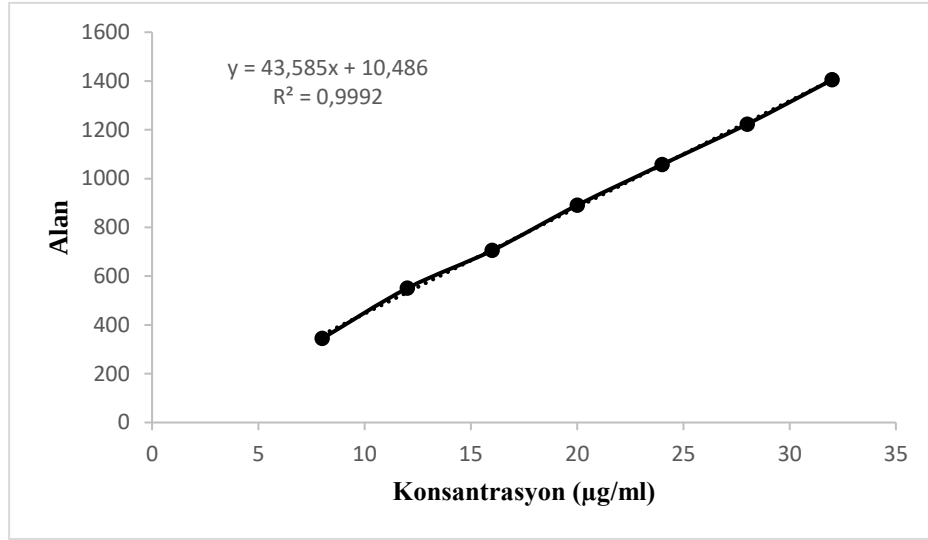
Şekil 3.9. Humanin'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3).

Çizelge 3.1. Humanin'in kalibrasyon doğrusuna ait parametreler.

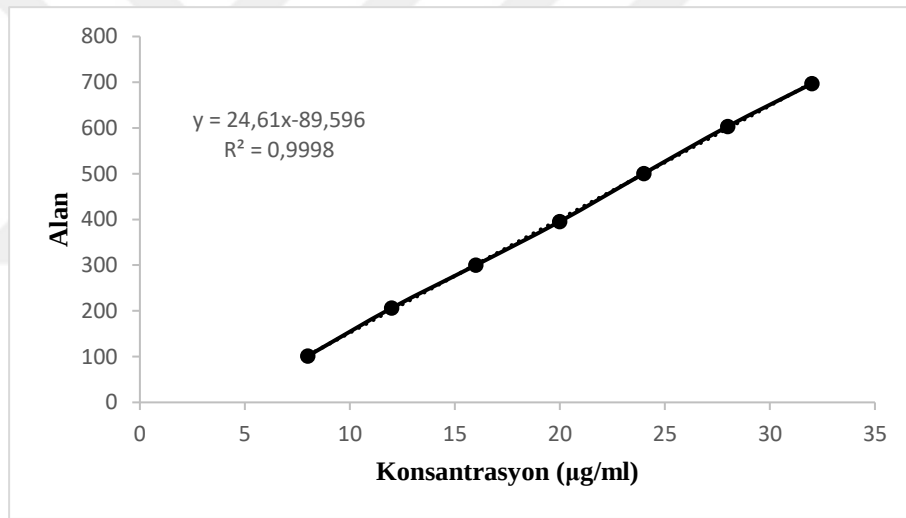
Ortam	Distile su	pH 7,4 fosfat-salin tamponu
Eğim	0,027	0,055
Kesişim	0,1868	1,1202
Doğru Denklemi	$y = 0,027x + 0,1868$	$y = 0,055x + 1,1202$
Determinasyon Katsayısı (r²)	0,9992	0,9991

3.1.5.2. Donepezil HCl için Kullanılan HPLC Yönteminin Kalibrasyonuna Ait Bulgular

Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki ölçümleri Bölüm 2.2.1.5.2'de açıklanan şekilde yapılmış ve kalibrasyon grafik ve denklemi bulunmuştur. Grafikler sırasıyla distile su için Şekil 3.10'da, pH 7,4 fosfat-salin tamponu için Şekil 3.11'de; bu doğrulara ait parametreler Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.10. Donepezil HCl'in distile sudaki kalibrasyon doğrusu (n=3).



Şekil 3.11. Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu (n=3).

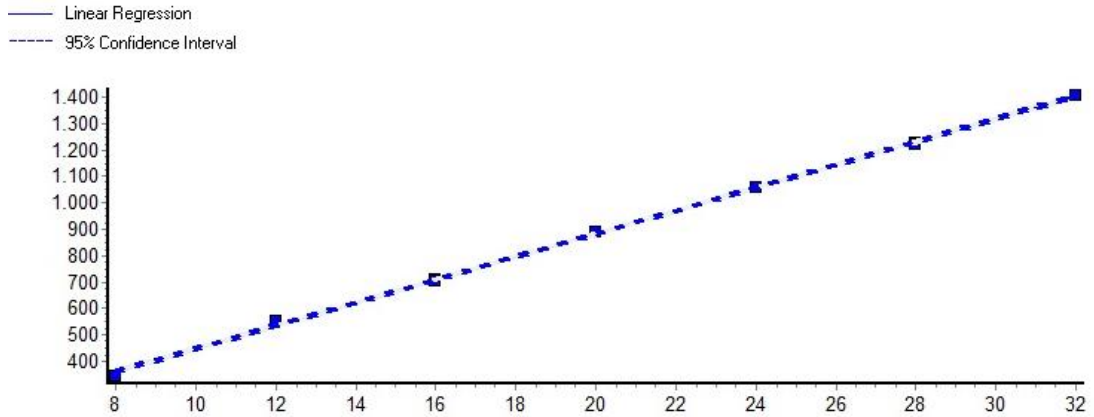
Çizelge 3.2. Donepezil HCl'in kalibrasyon doğrusuna ait parametreler.

Ortam	Distile su	pH 7,4 fosfat-salin tamponu
Eğim	43,585	24,61
Kesişim	10,486	89,596
Doğru Denklemi	$y = 43,585x + 10,486$	$y = 24,61x - 89,596$
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9992	0,9998

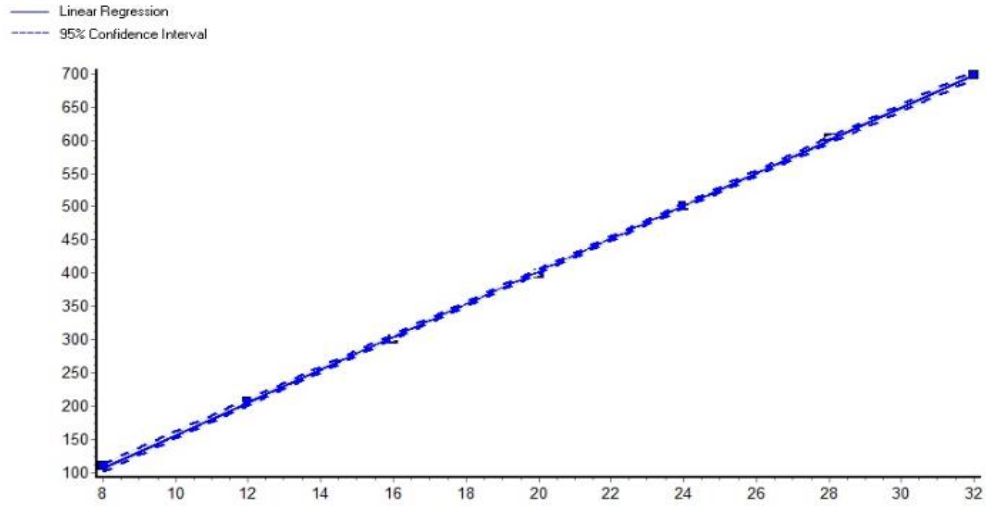
3.1.6. Donepezil HCl için Kullanılan HPLC Yönteminin Kalibrasyonuna Ait İstatiksel Veriler ve Analitik Validasyon Sonuçları

3.1.6.1. Doğrusallık ve Aralığı

Etken maddenin devamlı okunabileceği en düşük ve en yüksek konsantrasyonları arasında 8 nokta seçilmiş, distile su içinde 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan ve pH 7,4 fosfat-salin tamponu içinde 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan etken maddenin stok çözeltilerinden hareketle birbirinin katları şeklinde seçilen noktalara seyreltmeler yapılarak her bir ortam için bir seri farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerin absorbans değerleri 270 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu verilerden hesaplanmış doğrusallık ve doğrusallık aralığına ait doğrular Şekil 3.12 ve Şekil 3.13’de bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.12. Donepezil HCl'in distile sudaki doğrusallık grafiği (n=3).



Şekil 3.13. Donepezil HCl'in pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki doğrusallık grafiği (n=3).

Çizelge 3.3. Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin parametreleri.

	Distile su	pH 7,4 Fosfat –Salin Tamponu
Eğim (m) ± Güven sınırı (%95)	43,585	24,610
Eğimin standart hatası	0,2176	0,1626
Güven aralığı (%95)	43,134→44,018	24,192→25,028
Korelasyon katsayısı (r)	0,9996	0,9999
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,9992	0,9998
Kesişim (n)	10,486	-89,596
Kesişimin standart hatası	4,498	3,502
Kesişimin güven aralığı (%95)	2,340→ 20,615	-98,599→ -80,593
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart sapması (Sy.x)	9,988	3,441
Doğrusal regresyon kareler toplamı	4000485	271328
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	3491,6	59,197
Ortalamanın artık kareler toplamı	4003976	271387

3.1.6.2.Doğruluk ve Geri Elde

Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin içindeki 0,1 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltileri kullanılarak, ayrı ayrı 12 µg/mL, 20 µg/mL, 28 µg/mL konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır ve 6'şar kez HPLC'de analiz edildikten sonra elde edilen alan verilerlerinden yola çıkarak pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma (SS) ve % bağıl sapma verileri kullanılarak yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Elde edilen değerler ile bu değerlere ilişkin parametreler aşağıdaki Çizelge 3.4 ve 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Donepezil hidroklorür'ün distile sudaki doğruluk ve geri elde bulguları (n=3).

Teorik kons. (µg/mL)	Pratik kons. (µg/mL)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/mL)	Pratik kons. (µg/mL)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/mL)	Pratik kons. (µg/mL)	% Geri Elde
12,00	12,3899	103,25	20,00	20,2091	101,05	28,00	27,8218	99,36
12,00	12,4037	103,36	20,00	20,2068	101,03	28,00	27,8081	99,31
12,00	12,3761	103,13	20,00	20,2045	101,02	28,00	27,8425	99,44
12,00	12,3738	103,12	20,00	20,1724	100,86	28,00	27,7989	99,28
12,00	12,3532	102,94	20,00	20,1930	100,97	28,00	27,7966	99,27
12,00	12,3555	102,96	20,00	20,1678	100,84	28,00	27,8195	99,36
Ort. % Geri Elde		100,1281	Ort. % Geri Elde		100,9614	Ort. % Geri Elde		99,3377
SS*		0,1625	SS*		0,0905	SS*		0,0612
%BS**		0,1576	%BS**		0,0897	%BS**		0,0616

* Standart Sapma; **% Bağıl Sapma.

Çizelge 3.5. Donepezil hidroklorür'ün pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları (n=3).

Teorik kons. (µg/mL)	Pratik kons. (µg/mL)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/mL)	Pratik kons. (µg/mL)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/mL)	Pratik kons. (µg/mL)	% Geri Elde
12,00	12,0315	100,26	20,00	19,7154	98,5770	28,00	28,1672	100,5973
12,00	12,0315	100,26	20,00	19,7479	98,7395	28,00	28,1632	100,5828
12,00	12,0275	100,23	20,00	19,7398	98,6989	28,00	28,1388	100,4957
12,00	12,0234	100,20	20,00	19,7235	98,6176	28,00	28,1591	100,5683
12,00	12,0356	100,30	20,00	19,7317	98,6583	28,00	28,1591	100,5683
12,00	12,0518	100,43	20,00	19,7032	98,5161	28,00	28,1185	100,4232
Ort. % Geri Elde		100,2797	Ort. % Geri Elde		98,6346	Ort. % Geri Elde		100,5393
SS*		0,0822	SS*		0,0817	SS*		0,0668
%BS**		0,0820	%BS**		0,0828	%BS**		0,0665

* Standart Sapma; **% Bağıl Sapma.

3.1.6.3.Kesinlik

3.1.6.3.1.Tekrarlanabilirlik

Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin içindeki 0,1 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 12 µg/mL, 20 µg/mL, 28 µg/mL konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi ayrı ayrı hazırlanmıştır. Çözeltilerin HPLC kullanılarak elde edilen alan verileri yardımıyla pratik konsantrasyonları hesaplanarak ortalama konsantrasyon, standart sapma (SS) ve % bağıl sapma verilerlerinden hareketle yöntemin tekrarlanabilirliği ve kesinliği kanıtlanmıştır.

Çizelge 3.6. Donepezil hidroklorür'ün distile sudaki tekrarlanabilirlik bulguları (n=3).

Alan (12µg/mL)	Kons. (µg/mL)	Alan (20µg/mL)	Kons. (µg/mL)	Alan (28µg/mL)	Kons. (µg/mL)
550,5	12,3899	891,3	20,2091	1223,1	27,8218
551,1	12,4037	891,2	20,2068	1222,5	27,8081
549,9	12,3761	891,1	20,2045	1224	27,8425
549,8	12,3738	889,7	20,1724	1222,1	27,7989
548,9	12,3532	890,6	20,1930	1222	27,7966
549	12,3555	889,5	20,1678	1223	27,8195
Ortalama	12,3754	Ortalama	20,1923	Ortalama	27,8146
SS*	0,0195	SS*	0,0181	SS*	0,0171
%BS**	0,1576	%BS**	0,0897	%BS**	0,0616

* Standart Sapma; **% Bağıl Sapma.

Çizelge 3.7. Donepezil hidroklorür'ün pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları (n=3).

Alan (12µg/mL)	Kons. (µg/mL)	Alan (20µg/mL)	Kons. (µg/mL)	Alan (28µg/mL)	Kons. (µg/mL)
207,0	12,0518	397,9	19,8089	621,5	28,8946
206,5	12,0315	397,5	19,7926	621,1	28,8783
206,3	12,0234	396,2	19,7398	621,8	28,9068
206,4	12,0275	396,4	19,7479	621,8	28,9068
206,6	12,0356	396,2	19,7398	621,7	28,9027
206,5	12,0315	396,0	19,7317	621,7	28,9027
Ortalama	12,0336	Ortalama	19,7601	Ortalama	28,8987
SS*	0,0099	SS*	0,0323	SS*	0,0109
%BS**	0,0820	%BS**	0,1635	%BS**	0,0377

* Standart Sapma; **% Bağıl Sapma.

3.1.6.3.2.Ara Kesinlik

Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponu içindeki miktar tayini yönteminin ara kesinliğinin belirlenebilmesi için; 12 µg/mL, 20 µg/mL, 28 µg/mL konsantrasyonlarda üç farklı çözelti hazırlanarak, birbirini takip eden üç farklı

günde bu çözeltilerin HPLC analizleri yapılmış ve konsantrasyonlara karşılık gelen alanlar değerleri ve pratik konsantrasyonları bulunmuştur. Pratik konsantrasyonlardan hareketle üç farklı günde yapılan toplam 18 konsantrasyonun ortalaması, standart sapması ve % bağıl sapma değerleri bulunmuştur. Bağıl sapma değerlerinin de %2'nin altında olduğu görülmüş ve yöntemin ara kesinliği ispatlanmıştır.

Çizelge 3.8. Donepezil hidroklorür'ün distile sudaki ara kesinlik bulguları (n=3).

12 µg/mL			20 µg/mL			28 µg/mL		
Gün	Alan	Kons. (µg/mL)	Gün	Alan	Kons. (µg/mL)	Gün	Alan	Kons. (µg/mL)
1	550,5	12,3899	1	891,3	20,2091	1	1223,1	27,8218
1	551,1	12,4037	1	891,2	20,2068	1	1222,5	27,8081
1	549,9	12,3761	1	891,1	20,2045	1	1224,0	27,8425
1	549,8	12,3738	1	889,7	20,1724	1	1222,1	27,7989
1	548,9	12,3532	1	890,6	20,1930	1	1222,0	27,7966
1	549,0	12,3555	1	889,5	20,1678	1	1223,0	27,8195
2	548,8	12,3509	2	889,6	20,1701	2	1222,2	27,8012
2	550,2	12,3830	2	891,3	20,2091	2	1222,1	27,7989
2	549,8	12,3738	2	891,2	20,2068	2	1222,5	27,8081
2	550,5	12,3899	2	890,9	20,1999	2	1223,0	27,8195
2	549,1	12,3578	2	890,3	20,1862	2	1222,4	27,8058
2	548,9	12,3532	2	889,6	20,1701	2	1223,1	27,8218
3	549,5	12,3670	3	891,2	20,2068	3	1224,3	27,8494
3	550,5	12,3899	3	890,7	20,1953	3	1222,6	27,8103
3	549,9	12,3761	3	890,5	20,1908	3	1222,3	27,8035
3	550,5	12,3899	3	891,3	20,2091	3	1222,2	27,8012
3	548,3	12,3394	3	889,7	20,1724	3	1223,0	27,8195
3	549,5	12,3670	3	889,3	20,1632	3	1222,9	27,8172
Ort. Kons. (µg/mL) (n=18)		12,3717	Ort. Kons. (µg/mL) (n=18)		20,1908	Ort. Kons. (µg/mL) (n=18)		27,8135
SS*		0,0175	SS*		0,0170	SS*		0,0146
%BS**		0,1412	%BS**		0,0842	%BS**		0,0526

* Standart Sapma; **% Bağıl Sapma.

Çizelge 3.9. Donepezil hidroklorür'ün pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki ara kesinlik bulguları (n=3).

12 µg/mL			20 µg/mL			28 µg/mL		
Gün	Alan	Kons. (µg/mL)	Gün	Alan	Kons. (µg/mL)	Gün	Alan	Kons. (µg/mL)
1	206,5	12,0315	1	397,9	19,8089	1	621,5	28,8946
1	206,5	12,0315	1	397,5	19,7926	1	621,1	28,8783
1	206,4	12,0275	1	396,2	19,7398	1	623,0	28,9555
1	206,3	12,0234	1	396,4	19,7479	1	623,5	28,9759
1	206,6	12,0356	1	396,2	19,7398	1	623,0	28,9555
1	207,0	12,0518	1	395,6	19,7154	1	622,1	28,9190
2	210,0	12,1738	2	396,0	19,7317	2	622,1	28,9190
2	210,5	12,1941	2	395,8	19,7235	2	621,8	28,9068
2	210,0	12,1738	2	395,3	19,7032	2	621,8	28,9068
2	210,0	12,1738	2	395,2	19,6991	2	621,7	28,9027
2	209,4	12,1494	2	395,6	19,7154	2	621,7	28,9027
2	209,5	12,1534	2	395,8	19,7235	2	621,5	28,8946
3	209,7	12,1616	3	395,3	19,7032	3	602,9	28,1388
3	209,0	12,1331	3	395,2	19,6991	3	603,4	28,1591
3	209,2	12,1412	3	396,2	19,7398	3	603,4	28,1591
3	209,6	12,1575	3	396,4	19,7479	3	602,4	28,1185
3	209,4	12,1494	3	396,0	19,7317	3	603,6	28,1672
3	209,5	12,1534	3	396,2	19,7398	3	603,5	28,1632
Ort. Kons. (µg/mL) (n=18)		12,11754	Ort. Kons. (µg/mL) (n=18)		19,73274	Ort. Kons. (µg/mL) (n=18)		28,6621
SS*		0,06283	SS*		0,029515	SS*		0,3728
%BS**		0,518508	%BS**		0,149575	%BS**		1,3006

* Standart Sapma; **% Bağıl Sapma.

3.1.6.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Donepezil'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.1.6.4'de belirtildiği gibi belirlenmiştir. Çizelge 3.10'da teşhis ve tayin sınırları yer almaktadır.

Çizelge 3.10. Donepezil hidroklorür distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki miktar tayinin teşhis ve tayin sınırları.

	Distile su	pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu
Teşhis Sınırı LOD (µg/mL)	0,3406	0,4427
Tayin Sınırı LOQ (µg/mL)	1,0322	1,3415

3.1.6.5. Seçicilik

Bölüm 2.2.1.6.5'te anlatıldığı şekilde yapılan seçicilik çalışmalarında kullanılan yardımcı maddelerin 270 nm dalga boyunda yapılan HPLC analizleri sonucunda Donepezil HCl piki ile herhangi bir girişim gözlenmediği belirlenmiştir.

3.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.2.1. Donepezil HCl Yüklü SLN'lerin Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Donepezil HCl'in SLN üretimi sırasında hangi faza katılacağını belirlemek için, yağ fazına ve su fazına ayrı ayrı eklenerek formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların hazırlanması sırasında farklı yağlar kullanılmıştır. Formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Donepezil HCl'in farklı fazlara eklendiği ve değişik yağlar kullanılarak hazırlanan SLN formülasyonlarının sonuçları (n=3).

Kod	Lipit (%1 a/h)	EM Fazı	Partikül büyüklüğü (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta Potansiyeli (mV±SS)	EE (%±SS)
ÖFD1	Compritol	Su	157,1±2,10	0,45±0,02	-13,0±0,04	1,34±0,13
ÖFD2	Dynasan 114	Su	185,3±4,15	0,45±0,02	-7,5±1,49	0,00±0,00
ÖFD3	Dynasan 116	Su	93,1±1,06	0,29±0,03	-19,8±0,29	9,47±0,07
ÖFD4	Imwitor K900	Su	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD5	Precirol	Su	143,7±2,18	0,30±0,02	-31,7±2,24	0,00±0,00
ÖFD6	Compritol	Yağ	147,5±4,03	0,34±0,20	-13,0±0,46	1,44±0,03
ÖFD7	Dynasan 114	Yağ	226,0±5,29	0,41±0,01	-9,5±0,38	3,22±0,02
ÖFD8	Dynasan 116	Yağ	100,7±0,05	0,32±0,05	-19,8±0,15	13,35±0,01
ÖFD9	Imwitor K900	Yağ	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD10	Precirol	Yağ	150,3±1,83	0,35±0,12	-30,5±1,53	9,47±0,02

EM: Etken madde; EE: Enkapsülasyon etkinliği; PDI: Polidispersite indeksi; SS: Standart sapma.

Donepezil HCL çözünürlüğünün pH bağımlı olmasından kaynaklı değişik tampon ortamlarıyla formülasyonlar hazırlanan formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Farklı su fazları kullanılarak hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonlarının sonuçları (n=3).

Formül Kodu	Lipit (%1 a/h)	Kullanılan Su Fazı	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
ÖFD6	Compritol	Saf su	147,5±4,03	0,34±0,20	-13,0±0,46	1,44±0,03
ÖFD7	Dynasan 114	Saf su	226,0±5,29	0,41±0,01	-9,5±0,38	3,22±0,02
ÖFD8	Dynasan 116	Saf su	100,7±0,05	0,32±0,05	-19,8±0,15	13,35±0,01
ÖFD9	Imwitor K900	Saf su	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD10	Precirol	Saf su	150,3±1,83	0,35±0,12	-30,5±1,53	9,47±0,02
ÖFD11	Compritol	PBS pH 7,4	139,8±0,30	0,33±0,35	-30,7±0,60	38,62±0,12
ÖFD12	Dynasan 114	PBS pH 7,4	200,3±4,54	0,42±0,21	-29,1±1,50	43,20±0,01
ÖFD13	Dynasan 116	PBS pH 7,4	124,5±0,10	0,30±0,02	-24,1±0,50	57,85±0,32
ÖFD14	Imwitor K900	PBS pH 7,4	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD15	Precirol	PBS pH 7,4	129,6±1,03	0,35±0,36	-29,1±0,52	49,60±0,57
ÖFD 16	Compritol	pH 9,0 tampon	143,1±0,20	0,32±0,02	-42,7±0,55	75,70±0,33
ÖFD 17	Dynasan 114	pH 9,0 tampon	211,0±0,63	0,36±0,45	-33,2±0,66	82,30±0,02
ÖFD 18	Dynasan 116	pH 9,0 tampon	119,5±0,18	0,32±0,55	-17,3±0,52	88,45±0,08
ÖFD 19	Imwitor K900	pH 9,0 tampon	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD 20	Precirol	pH 9,0 tampon	130,4±0,02	0,41±1,93	-36,1±2,26	84,70±0,23

Enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek bulunması nedeniyle formülasyonlara pH 9,0 tampon ortamı ile devam edilmiştir. Karıştırma süresi ve sonikasyon süresinin belirlenmesi için değişik zamanlarda denemeler yapılmıştır. Formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.13’de verilmiştir. Şekil 3.14’de formülasyonlar parametreleri arasındaki değişim grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. Farklı karıştırma ve sonikasyon süreleri ile hazırlanan Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonlarının sonuçları (n=3).

Kod	Lipit (%1 a/h)	K. Süresi (dk)	Son. Süresi (dk)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
ÖFD16	Compritol	10	2	143,1±0,20	0,32±0,02	-42,7±0,55	75,70±0,33
ÖFD17	Dynasan 114	10	2	211,0±0,63	0,36±0,45	-33,2±0,66	82,30±0,02
ÖFD18	Dynasan 116	10	2	119,5±0,18	0,32±0,55	-17,3±0,52	88,45±0,08
ÖFD19	Imwitor K900	10	2	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD20	Precirol	10	2	130,4±0,02	0,41±1,93	-36,1±2,26	84,70±0,23
ÖFD21	Compritol	5	2	142,1±1,20	0,20±0,01	-20,0±0,02	76,30±0,01
ÖFD 22	Dynasan 114	5	2	129,4±0,67	0,34±0,01	-18,0±0,10	83,19±0,31
ÖFD23	Dynasan 116	5	2	121,4±3,72	0,25±0,04	-18,1±0,01	92,96±0,02
ÖFD24	Imwitor K900	5	2	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD25	Precirol	5	2	144,5±1,01	0,22±0,01	-15,3±0,01	75,86±0,52
ÖFD26	Compritol	5	5	333,8±0,70	0,27±0,20	-21,2±0,50	85,01±0,01
ÖFD27	Dynasan 114	5	5	105,5±0,50	0,25±0,01	-18,3±0,05	83,50±0,02
ÖFD28	Dynasan 116	5	5	109,2±0,31	0,25±0,03	-17,9±0,02	91,32±0,01
ÖFD 29	Imwitor K900	5	5	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD30	Precirol	5	5	114,8±3,74	0,42±0,01	-12,0±0,23	85,60±0,31
ÖFD31	Compritol	5	10	387,3±1,75	0,49±0,02	-19,0±1,00	84,69±0,03
ÖFD32	Dynasan 114	5	10	115,1±1,42	0,27±0,03	-17,3±0,05	82,56±0,02
ÖFD33	Dynasan 116	5	10	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±0,01
ÖFD34	Imwitor K900	5	10	Emülsiyon oluşmadı.			
ÖFD35	Precirol	5	10	134,9±0,91	0,22±0,01	-13,8±1,90	86,45±0,01

Imwitor K900 adlı yağ ile emülsiyon oluşmadığından bu yağ ile çalışmaya devam edilmemiştir. Karıştırma hızı 5 dk, sonikasyon süresi 10 dk olan formüllerin partikül büyüklükleri daha uygun olduğundan çalışmalar bu parametrelerle devam edilmiştir.

3.2.2. Donepezil HCl Yüklü SLN'lerin Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

ÖF33 kodlu formülden hareketle aşağıdaki formülasyonlar hazırlanmıştır ve formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.14'de verilmiştir. ÖF33 kodlu formül DF1 olarak belirtilmiştir.



Çizelge 3.14. Donepezil HCL yüklü SLN formülasyonlarına ait sonuçlar (n=3).

Formül Kodu	Lipit	Etken Madde'nin Katıldığı Faz	Etken Madde'nin Katılış Şekli	Lipit Miktarı (% a/h)	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan Oranı (% a/h)	Su fazı hacmi (ml)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Etken Madde Miktarı (mg)	K. Hızı (rpm)	K. Süresi (dk)	Son. Süresi (dk)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF1	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±1,21
DF2	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	2	--	--	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	1190,0±0,17	1,00±0,00	-22,3±0,21	*
DF3	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	4	--	--	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	8612,5±0,05	1,00±0,00	-17,3±0,62	*
DF4	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	8	--	--	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	Emülsiyon oluşmadı.			
DF5	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	3	Tween 80	100	10	9600	5	10	247,0±0,35	0,79±1,45	-8,9±0,45	83,40±3,29
DF6	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	50	Tween 80	100	10	9600	5	10	121,0±0,09	0,33±0,02	-11,3±0,22	86,20±2,85
DF7	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	10	15000	5	10	150,8±3,79	0,25±0,04	-14,5±0,10	88,73±2,30
DF8	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	10	20000	5	10	102,0±0,55	0,19±0,01	-10,1±0,01	89,65±2,25
DF9	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	2	9600	5	10	101,3±0,53	0,14±0,01	-12,3±0,23	80,02±1,21
DF10	Dynasan 116	Yağ	Gliserin çözeltisi	1	--	--	10	Tween 80	100	2	9600	5	10	62,8±0,22	0,23±0,20	-4,5±0,03	99,90±0,90
DF11	Dynasan 116	Yağ	ACN:dioksan	1	--	--	10	Tween 80	100	2	9600	5	10	58,0±0,45	0,22±0,01	-3,2±0,01	82,55±0,10
DF12	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	5	9600	5	10	102,4±0,23	0,20±0,03	-15,7±0,02	85,60±1,10
DF13	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	67,8±0,56	0,24±0,10	-7,4±0,02	99,89±0,30
	Lesitin			0,25													
DF14	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	72,4±0,15	0,35±0,05	-5,4±0,30	99,92±0,36
	Lesitin			0,5													
DF15	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	Pluronik F68	100	10	9600	5	10	204,3±0,36	0,36±0,04	-11,0±0,20	95,78±0,08

K.hızı: Karıştırma hızı; K. Süresi: Karıştırma süresi; Son süresi: sonikasyon süresi.

Çizelge 3.14. Devam. Donepezil HCL Yüklü SLN Formülasyonlarına Ait Sonuçlar (n=3).

Formül Kodu	Lipit	Etken Maddenin Katıldığı Faz	Etken Maddenin Katılış Şekli	Lipit Miktarı (% a/h)	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan Oranı (% a/h)	Su fazı hacmi (ml)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Etken Madde Miktarı (mg)	K. Hızı (rpm)	K. Süresi (dk)	Son. Süresi (dk)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF16	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	--	10	PVA	100	10	9600	5	10	120,6±0,12	0,45±0,33	-16,5±0,03	65,17±1,33
DF17	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	Arlacel-C	10	10	Tween 80	100	10	9600	5	10	156,8±0,22	0,22±1,56	-26,8±0,10	29,50±0,69
DF18	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	Arlacel-C	10	10	PVA	100	10	9600	5	10	250,4±0,23	0,18±0,25	-12,6±0,36	8,24±0,03
DF19	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	Arlacel-C	10	10	Pluronic F68	100	10	9600	5	10	303,5±1,37	0,18±0,66	-17,2±0,02	24,33±0,54
DF20	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	50	10	9600	5	10	889,5±5,23	0,80±0,19	-3,5± 0,01	*
DF21	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	10	9600	5	10	96,3±2,33	0,25±0,50	-18,3±0,01	86,34±0,02
DF22	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	200	10	9600	5	10	55,6±0,78	0,22±2,14	-17,0±0,30	82,37±0,03
DF23	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	250	10	9600	5	10	35,3±0,89	0,26±0,98	-4,5±0,36	85,69 ±0,38
DF24	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	300	10	9600	5	10	34,7±0,30	0,27±0,10	-2,3±0,27	93,65 ±0,02
DF25	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	10	15000	5	10	100,4±0,32	0,39±0,23	-23,3±0,02	87,29±0,01
DF26	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	10	20000	5	10	87,2±0,11	0,22±0,02	-17,0±0,12	93,84±0,01
DF27	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	10	20000	5	1	130,8±0,62	0,24±0,01	-16,6±0,49	85,20±0,56
DF28	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	10	20000	5	2	112,3±1,22	0,26±0,01	-15,6±0,98	86,70±0,06
DF29	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	10	10	Tween 80	150	10	20000	5	5	105,5±0,50	0,25±0,01	-12,3±0,65	86,30±0,03

K.hızı: Karıştırma hızı; K. Süresi: Karıştırma süresi; Son süresi: sonikasyon süresi.

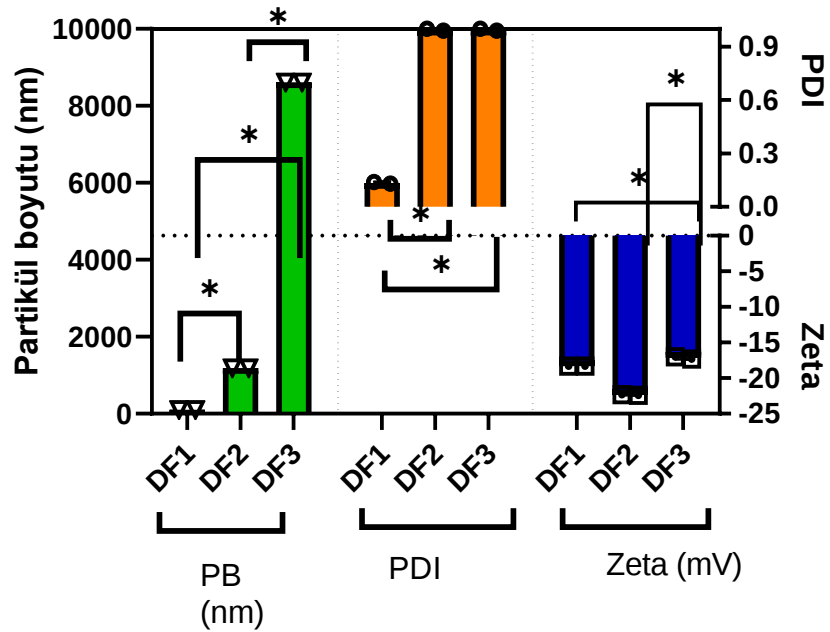
3.2.2.1. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Yağ Konsantrasyonunun Etkisi

Donepezil HCl yüklü SLN'lerin hazırlanması sırasında farklı yağ konsantrasyonları ile denemeler yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.15 ve Şekil 3.14'de verilmiştir. Anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafiklerde (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.15. Donepezil HCl yüklü SLN'lere yağ konsantrasyonunun etkisi.

Formül Kodu	Lipit Miktarı (% a/h)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF1	1	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±1,21
DF2	2	1190,0±0,17	1,00±0,00	-22,3±0,21	*
DF3	4	8612,5±0,05	1,00±0,00	-17,3±0,62	*
DF4	8	Emülsiyon oluşmadı.			

*Bu partiküllerin boyutları nanometre olmadıkları için enkapsülasyon etkinlikleri ölçülmemiştir.



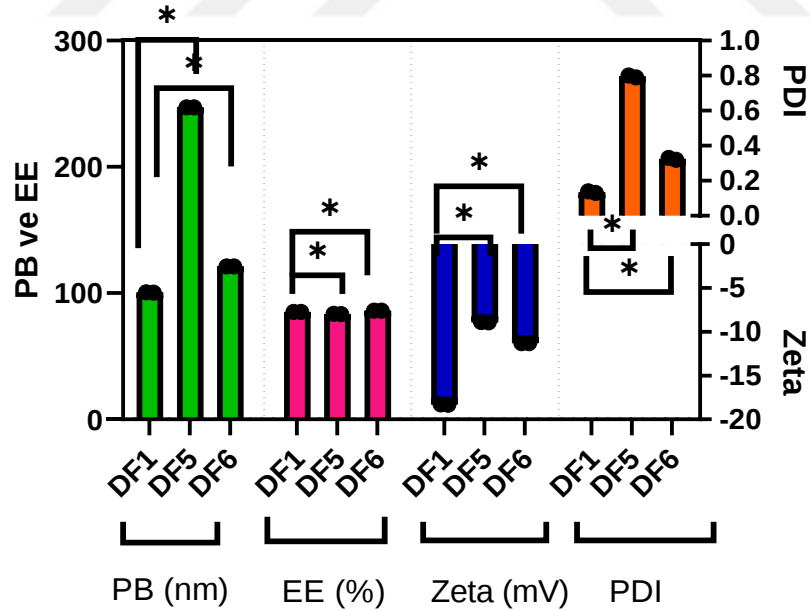
Şekil 3.14. Donepezil HCl yüklü SLN'lere yağ konsantrasyonunun etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.2.Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Su fazı Hacminin Etkisi

Su fazı hacminin partikül boyutu ve dağılımına dolaylı olarak da enkapsülasyon etkinliğine etki edebileceği düşünülmüş ve farklı hacimlerde formülasyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.16 ve Şekil 3.15’de verilmiştir. DF1 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.16. Donepezil HCl yüklü SLN'lere su fazı hacminin etkisi.

Formül Kodu	Su fazı hacmi (ml)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF1	10	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±1,21
DF5	3	247,0±0,35	0,79±1,45	-8,9±0,45	83,40±3,29
DF6	50	121,0±0,09	0,33±0,02	-11,3±0,22	86,20±2,85



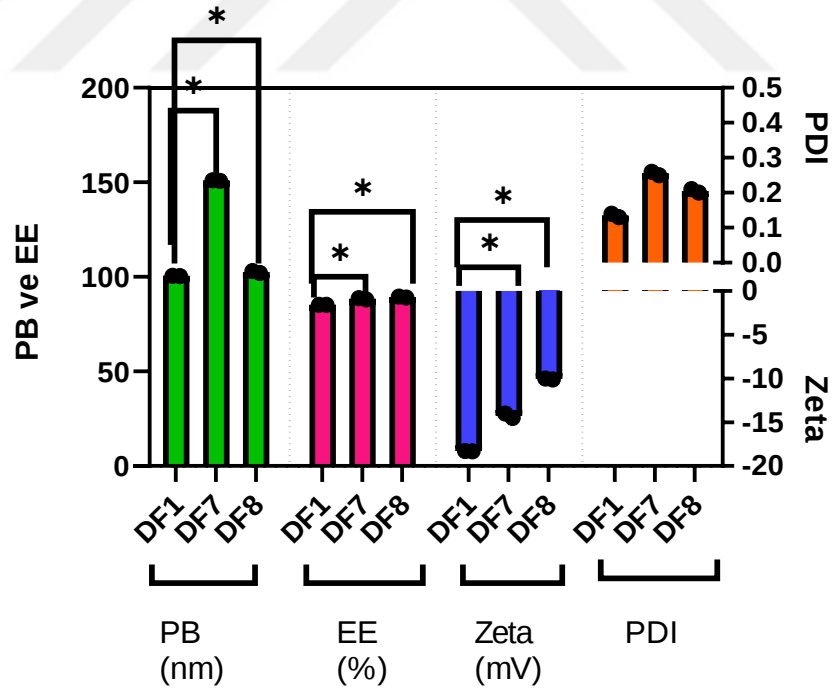
Şekil 3.15. Donepezil HCl yüklü SLN'lere su fazı hacminin etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.3.Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Karıştırma Hızının Etkisi

Karıştırma hızının partiküllere olan etkisini incelemek amacıyla 9600, 15 000 ve 20 000 rpm hızlarda formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.17 ve Şekil 3.16'da verilmiştir. DF1 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.17. Donepezil HCl yüklü SLN'lere karıştırma hızının etkisi.

Formül Kodu	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI (Ort $\pm$ SS)	Zeta (mV $\pm$ SS)	EE (% $\pm$ SS)
DF1	9600	100,4 $\pm$ 0,50	0,13 $\pm$ 0,01	-18,3 $\pm$ 0,36	85,17 $\pm$ 1,21
DF7	15000	150,8 $\pm$ 3,79	0,25 $\pm$ 0,04	-14,5 $\pm$ 0,10	88,73 $\pm$ 2,30
DF8	20000	102,0 $\pm$ 0,55	0,19 $\pm$ 0,01	-10,1 $\pm$ 0,01	89,65 $\pm$ 2,25



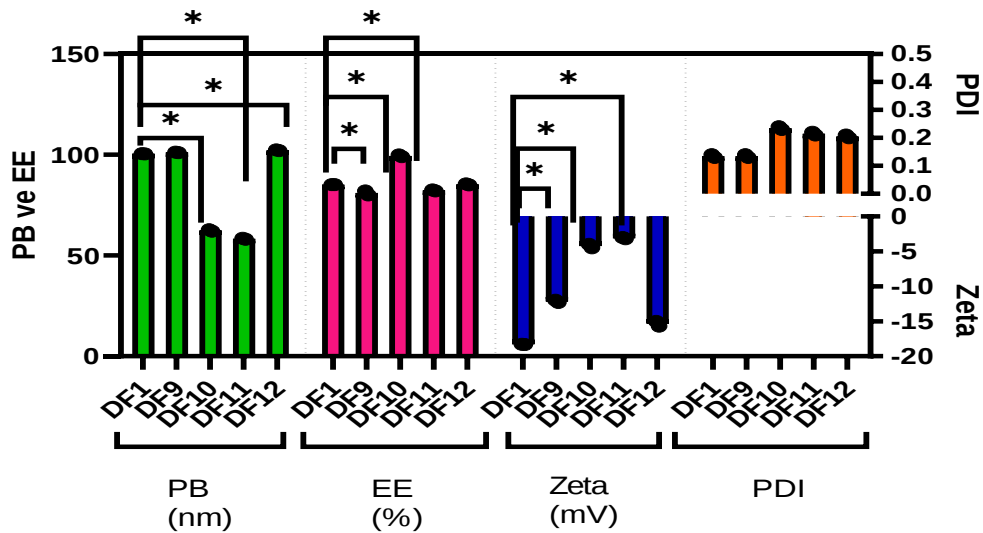
Şekil 3.16. Donepezil HCl yüklü SLN'lere karıştırma hızının etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.4. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Etken Madde Miktarı ve Eklenişinin Etkisi

Etken madde miktarının partiküllere olan etkisini incelemek amacıyla 10 mg, 5 mg ve 2 mg miktarlarda Donepezil HCl formülasyonlara eklenmiştir. Ayrıca Donepezil HCl'in gliserin ve ACN:Dioksan (1:1) karışımındaki çözeltileri partiküldeki Donepezil HCl konsantrasyonu 2 mg olacak şekilde formülasyona eklenmiş ve bu şekilde formülasyonlar hazırlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.18 ve Şekil 3.17'de verilmiştir. DF1 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.18. Donepezil HCl yüklü SLN'lere etken madde miktarı ve eklenişinin etkisi.

Formül Kodu	Etken Maddenin Katılış Şekli	Etken Madde Miktarı (mg)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF1	Katı toz	10	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±1,21
DF9	Katı toz	2	101,3±0,53	0,14±0,01	-12,3±0,23	80,02±1,21
DF10	Gliserin çözeltisi	2	62,8±0,22	0,23±0,20	-4,5±0,03	99,90±0,90
DF11	ACN:dioksan	2	58,0±0,45	0,22±0,01	-3,2±0,01	82,55±0,10
DF12	Katı toz	5	102,4±0,23	0,20±0,03	-15,7±0,02	85,60±1,10



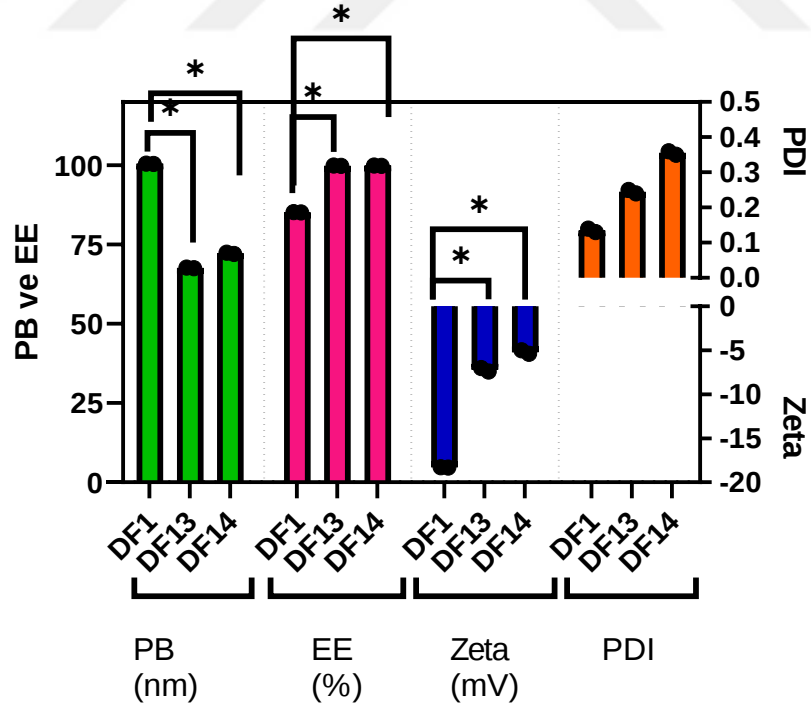
Şekil 3.17. Donepezil HCl yüklü SLN'lere etken madde miktarı ve eklenişinin etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.5.Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Eklenen Lesitin Etkisi

Donepezil HCl yüklü SLN'lere yüklenen Lesitin Etkisini gösteren sonuçlar Çizelge 3.19 ve Şekil 3.18'de verilmiştir. DF1 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.19. Donepezil HCl yüklü SLN'lere eklenen lesitin etkisi.

Formül Kodu	Lipit	Lipit Miktarı (% a/h)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF1	Dynasan 116	1	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±1,21
DF13	Dynasan 116	1	67,8±0,56	0,24±0,10	-7,4±0,02	99,89±0,30
	Lesitin	0,25				
DF14	Dynasan 116-	1	72,4±0,15	0,35±0,05	-5,4±0,30	99,89±0,36
	Lesitin	0,5				



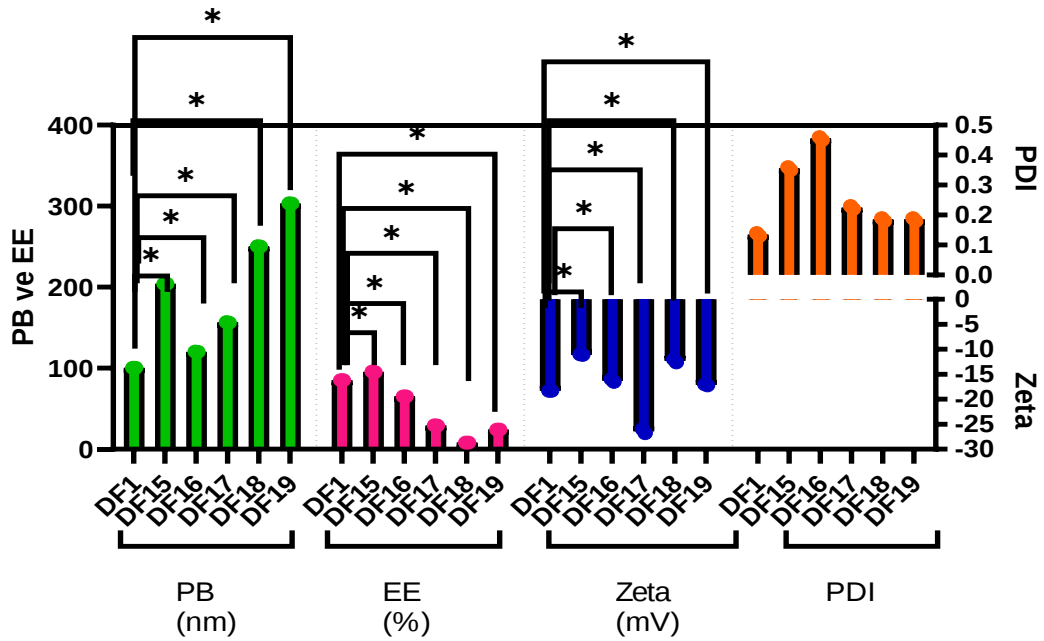
Şekil 3.18. Donepezil HCl yüklü SLN'lere eklenen lesitin etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.6.Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Farklı Sürfaktanların Etkisi

Donepezil HCl yüklü SLN'ler farklı sürfaktanlar ile hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.20 ve Şekil 3.19'da verilmiştir. DF1 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.20. Donepezil HCl yüklü SLN'lere farklı sürfaktanların etkisi.

Formül Kodu	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan Oranı (% a/h)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Partikül Boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI (Ort $\pm$ SS)	Zeta (mV $\pm$ SS)	EE (% $\pm$ SS)
DF1	--	10	Tween 80	100	100,4 $\pm$ 0,50	0,13 $\pm$ 0,01	-18,3 $\pm$ 0,36	85,17 $\pm$ 1,21
DF15	--		Pluronic F68		204,3 $\pm$ 0,36	0,36 $\pm$ 0,04	-11,0 $\pm$ 0,20	95,78 $\pm$ 0,08
DF16	--	--	PVA	100	120,6 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,33	-16,5 $\pm$ 0,03	65,17 $\pm$ 1,33
DF17	Arlacel-C	10	Tween 80	100	156,8 $\pm$ 0,22	0,22 $\pm$ 1,56	-26,8 $\pm$ 0,10	29,50 $\pm$ 0,69
DF18	Arlacel-C	10	PVA	100	250,4 $\pm$ 0,23	0,18 $\pm$ 0,25	-12,6 $\pm$ 0,36	8,24 $\pm$ 0,03
DF19	Arlacel-C	10	Pluronic F68	100	303,5 $\pm$ 1,37	0,18 $\pm$ 0,66	-17,2 $\pm$ 0,02	24,33 $\pm$ 0,54



Şekil 3.19. Donepezil HCl yüklü SLN'lere farklı sürfaktanların etkisi (* $p<0,05$).

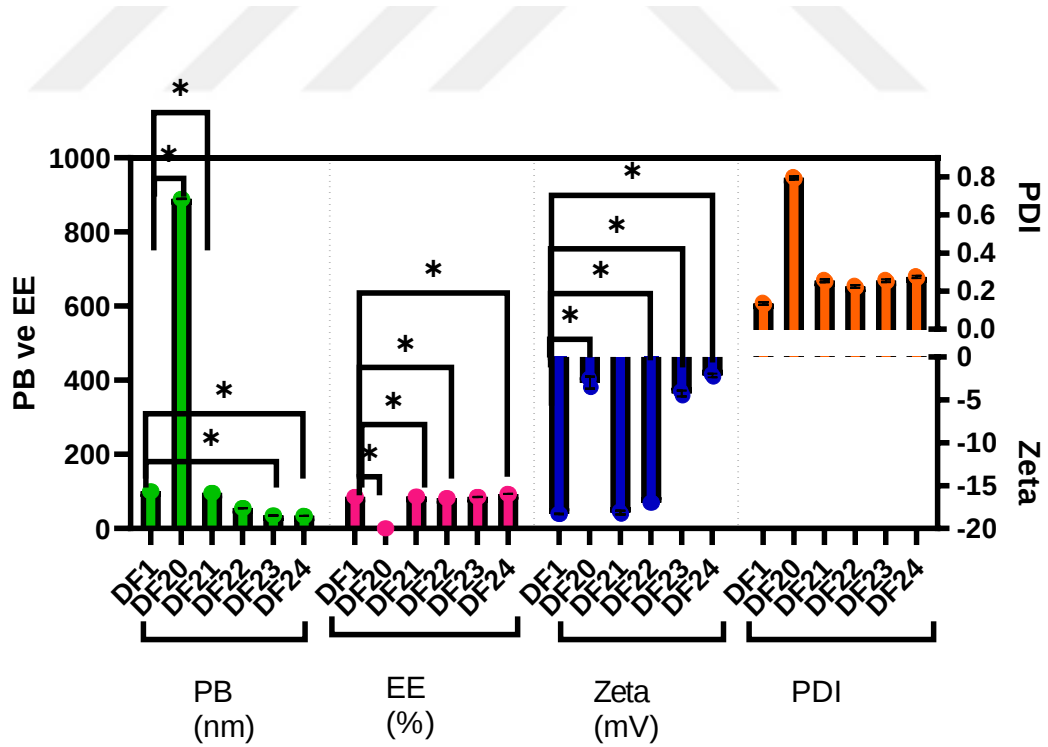
3.2.2.7.Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Sürfaktan Miktarının Etkisi

Donepezil HCl yüklü SLN'ler farklı Tween 80 miktarları ile hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.21 ve Şekil 3.20'de verilmiştir. DF1 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.21. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sürfaktan miktarının etkisi.

Formül Kodu	Sürfaktan miktarı (mg)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF1	100	100,4±0,50	0,13±0,01	-18,3±0,36	85,17±1,21
DF20	50	889,5±5,23	0,80±0,19	-3,5±0,01	*
DF21	150	96,3±2,33	0,25±0,50	-18,3±0,01	86,34±0,02
DF22	200	55,6±0,78	0,22±2,14	-17,0±0,30	82,37±0,03
DF23	250	35,3±0,89	0,26±0,98	-4,5±0,36	85,69 ±0,38
DF24	300	34,7±0,30	0,27±0,10	-2,3±0,27	93,65 ±0,02

*Bu partiküllerin boyutu nanometre olmadığı için enkapsülasyon etkinliği ölçülmemiştir.



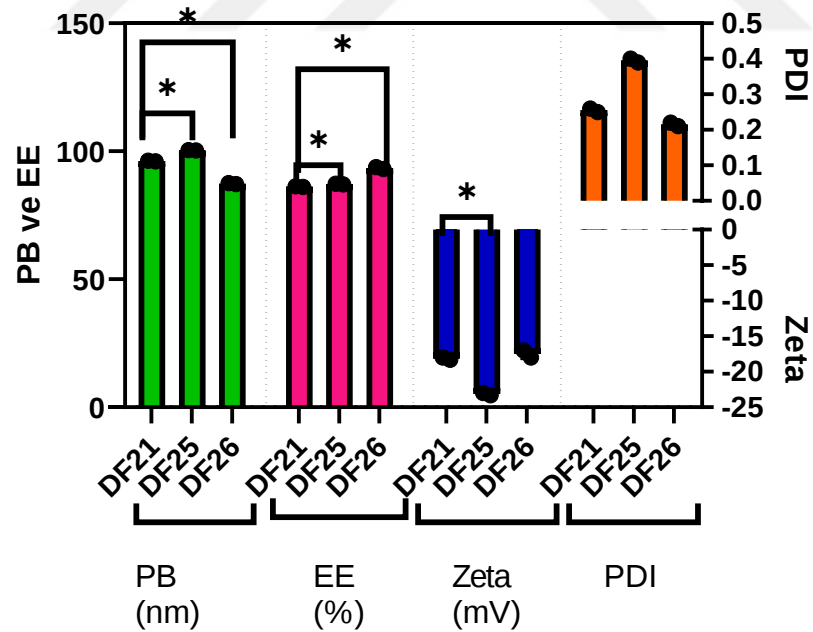
Şekil 3.20. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sürfaktan miktarının etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.8.Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Karıştırma Hızının Etkisi

Donepezil HCl yüklü 150 mg Tween 80 içeren SLN'ler 9600, 15 000 ve 20 000 rpm gibi farklı karıştırma hızları ile hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.22 ve Şekil 3.21'de verilmiştir. DF21 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.22. Donepezil HCl yüklü 150 mg Tween 80 içeren SLN'lere karıştırma hızının etkisi.

Formül Kodu	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dk)	Sonikasyon Süresi (dk)	Partikül Boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI (Ort $\pm$ SS)	Zeta (mV $\pm$ SS)	EE (% $\pm$ SS)
DF21	Tween 80	150	9600	5	10	96,3 $\pm$ 2,33	0,25 $\pm$ 0,50	-18,3 $\pm$ 0,01	86,34 $\pm$ 0,02
DF25	Tween 80	150	15000	5	10	100,4 $\pm$ 0,32	0,39 $\pm$ 0,23	-23,3 $\pm$ 0,02	87,29 $\pm$ 0,01
DF26	Tween 80	150	20000	5	10	87,2 $\pm$ 0,11	0,22 $\pm$ 0,02	-17,0 $\pm$ 0,12	93,84 $\pm$ 0,01



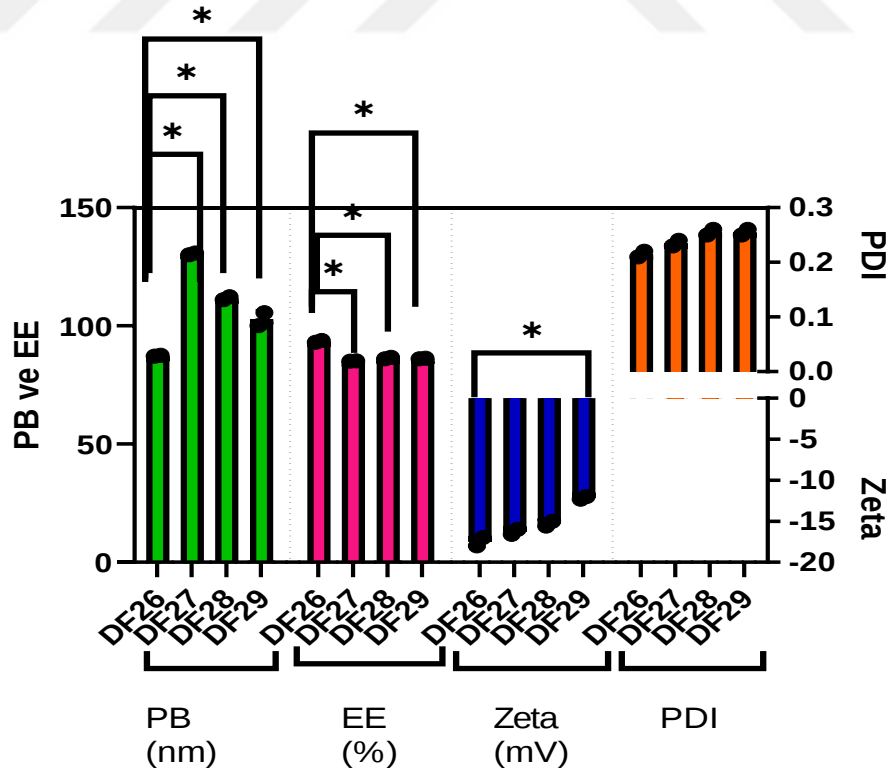
Şekil 3.21. Donepezil HCl yüklü 150 mg Tween 80 içeren SLN'lere karıştırma hızının etkisi (* $p<0,05$).

3.2.2.9. Donepezil HCl Yüklü SLN'lere Sonikasyon Süresinin Etkisi

Donepezil HCl yüklü 150 mg Tween 80 içeren SLN'ler 1, 2 5 ve 10 dk sürelerde sonike edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.23 ve Şekil 3.22'de verilmiştir. Homojenizasyon hızı 20000 rpm olarak uygulanmıştır. DF26 formülü ile karşılaştırma yapılmış ve anlamlı ($p<0,05$) değişkenler grafikte (*) olarak işaretlenmiştir.

Çizelge 3.23. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sonikasyon süresinin etkisi.

Formül Kodu	Sonikasyon Süresi (dk)	Partikül Boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI (Ort $\pm$ SS)	Zeta (mV $\pm$ SS)	EE (% $\pm$ SS)
DF26	10	87,2 $\pm$ 0,11	0,22 $\pm$ 0,02	-17,0 $\pm$ 0,12	93,84 $\pm$ 0,01
DF27	1	130,8 $\pm$ 0,62	0,24 $\pm$ 0,01	-16,6 $\pm$ 0,49	85,20 $\pm$ 0,56
DF28	2	112,3 $\pm$ 1,22	0,26 $\pm$ 0,01	-15,6 $\pm$ 0,98	86,70 $\pm$ 0,06
DF29	5	105,5 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,01	-12,3 $\pm$ 0,65	86,30 $\pm$ 0,03



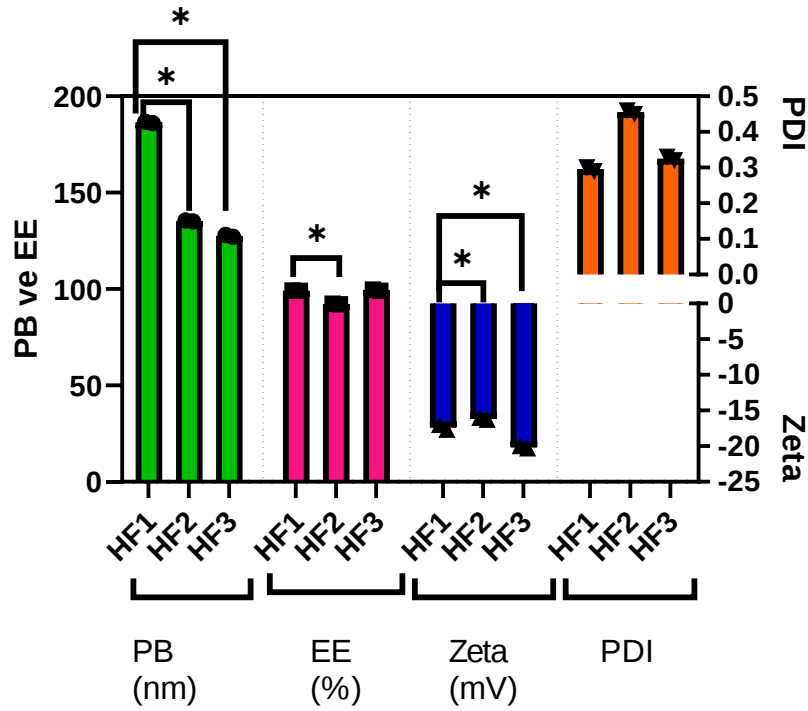
Şekil 3.22. Donepezil HCl yüklü SLN'lere sonikasyon süresinin etkisi (* $p<0,05$).

3.2.3. Humanin Yüklü SLN'lerin Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

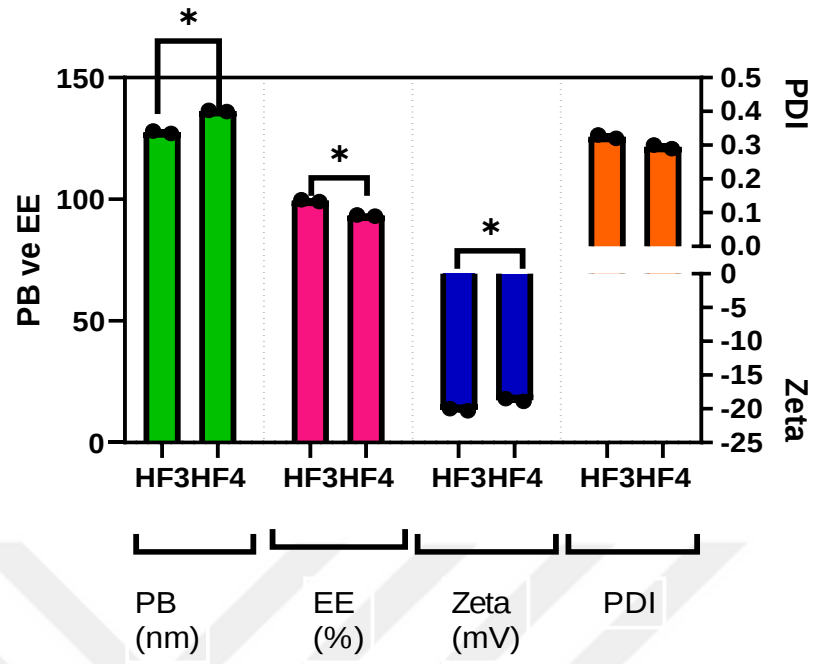
Çizelge 2.8.'de belirtilen Humanin için yapılan ön formülasyon çalışmalarında, beklemeyle ya da üretimin hemen sonrasında humaninde gözle görülür çökme olmamıştır. Çökme olmayan formül ÖFH13 kodlu formülden hareketle üretime devam edilmiştir.

3.2.4. Humanin Yüklü SLN'lerin Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

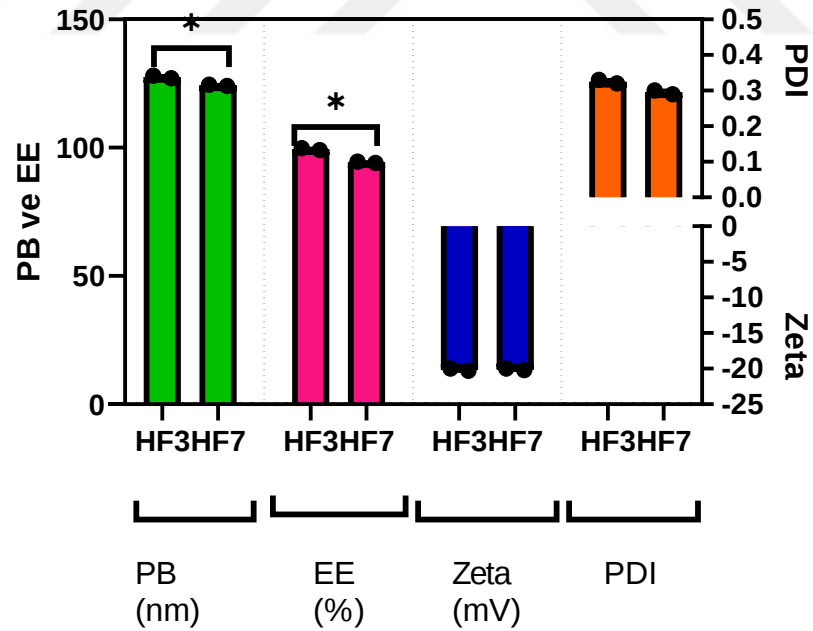
ÖHF13 kodlu formülden hareketle aşağıdaki formülasyonlar hazırlanmıştır ve formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.24'de verilmiştir. ÖHF13 kodlu formül HF1 olarak belirtilmiştir. Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'da değişik formülasyon parametrelerinin etkisi grafiksel olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.23. Humanin yüklü SLN'lerde sonikasyon süresinin etkisi (*p<0,05).



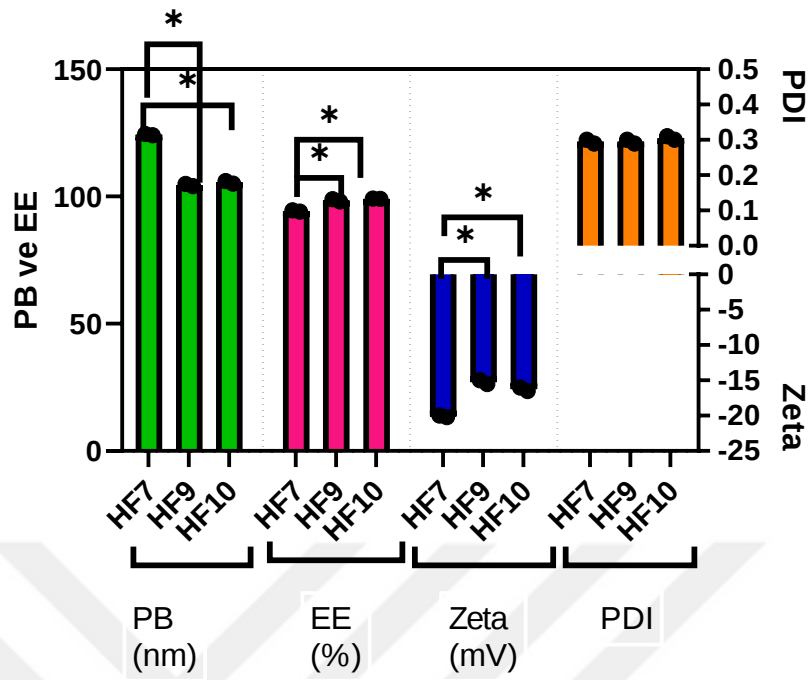
Şekil 3.24. Humanin yüklü SLN’lerde farklı tamponun etkisi (* $p < 0,05$).



Şekil 3.25. Humanin yüklü SLN’lerde karıştırma hızının etkisi (* $p < 0,05$).

Çizelge 3.24. Humanin yüklü SLN formülasyonlarına ait sonuçlar.

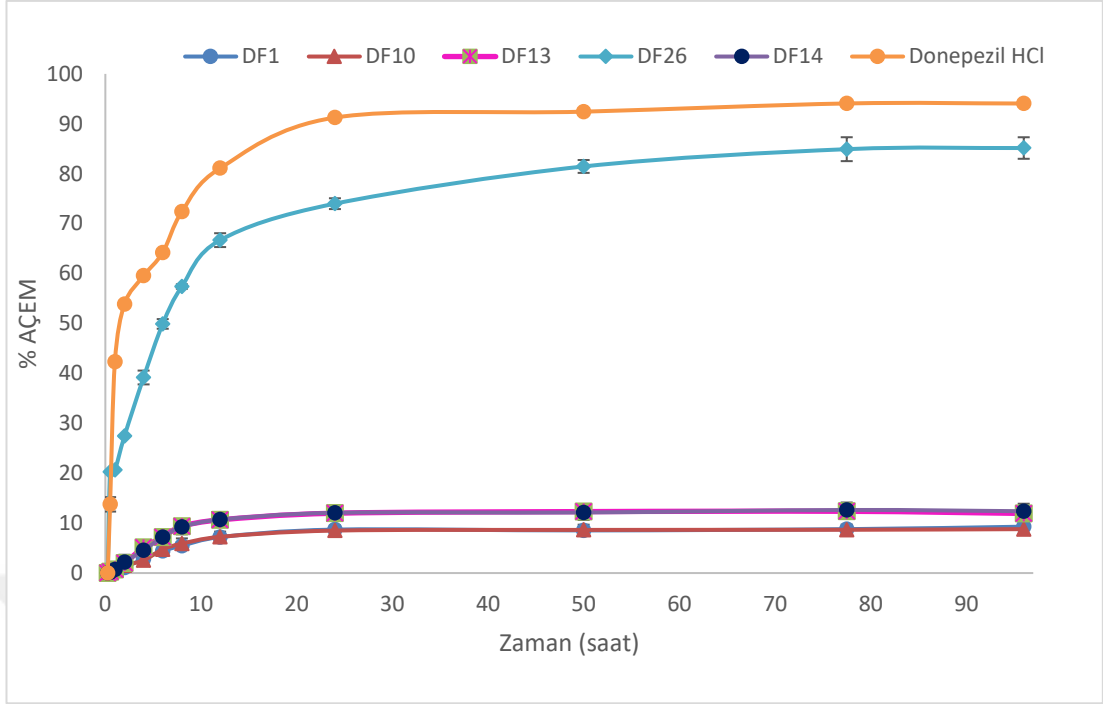
Formül Kodu	Lipit	Etken Maddenin Katıldığı Faz	Etken Maddenin Katılış Şekli	Lipit Miktarı (% a/h)	Lipit Fazında Kullanılan Sürfaktan	Su fazı	Su fazı hacmi (mL)	Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Sürfaktan miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dk)	Sonikasyon Süresi (dk)	Etken Madde Miktarı (mg)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
HF1	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	10	1	186,8±1,22	0,29±0,01	-17,7±0,32	99,18±0,02
HF2	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	2	1	135,0±0,36	0,45±0,02	-16,3±119	92,49±0,13
HF3	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	5	1	128,1±0,21	0,33±0,01	-20,3±0,61	99,80±0,02
HF4	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 9,0	10	Tween 80	150	9600	5	5	1	136,0±0,94	0,29±0,01	-18,9±1,08	93,55±0,01
HF5	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	10	5	1	153,8±2,15	0,41±0,01	-16,8±0,25	99,17±0,01
HF6	Dynasan 116	Yağ	Gliserin çözeltisi	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	9600	5	5	1	Çökme oldu.			
HF7	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	20000	5	5	1	124,6±1,44	0,29±0,01	-20,2±1,07	94,50±0,05
HF8	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	2	--	PBS pH 7,4	10	Tween 80	150	20000	5	5	1	149,3±1,37	0,35±0,01	-24,8±3,47	96,80±0,03
HF9	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	Saf su	10	Tween 80	150	20000	5	5	1	104,9±0,92	0,29±0,01	-15,0±0,96	98,99±0,03
HF10	Dynasan 116	Yağ	Katı toz	1	--	Saf su	20	Tween 80	150	20000	5	5	2	106,3±1,18	0,31±0,01	-16,0±0,73	99,20±0,05



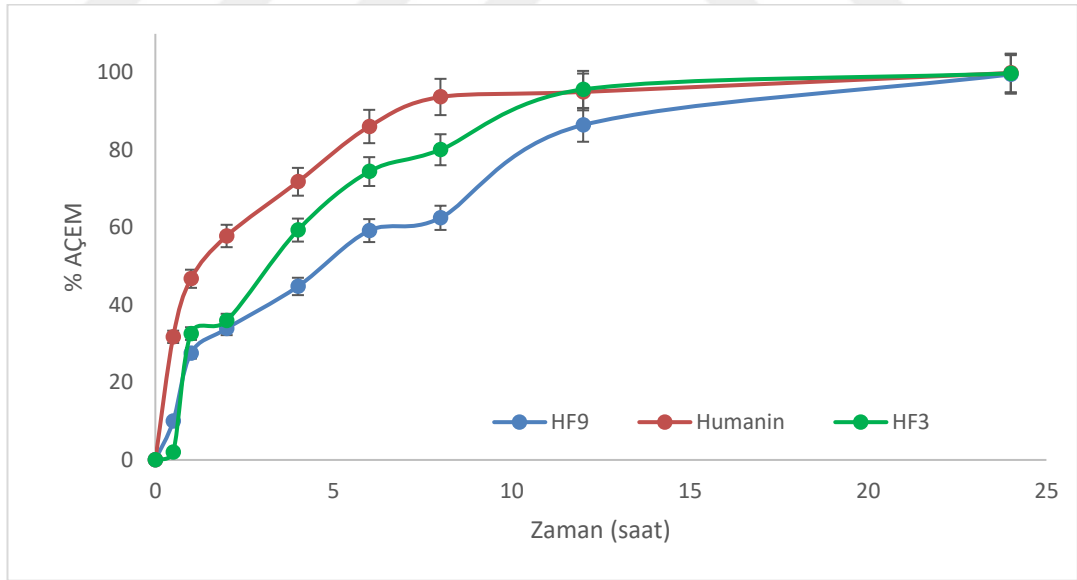
Şekil 3.26. Humanin yüklü SLN’lerde dış fazın etkisi (*p<0,05).

3.3. Çözünme Hızı Deneyi

Nanopartiküllerde çözünme hızı deneyleri Bölüm 2.5.6’da belirtildiği gibi statik yöntem kullanılarak, $37 \pm 0,5$ °C’de Donepezil HCl için içeren pH 7,4 fosfat-salin tamponunda, Humanin için %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat-salin tamponunda yapılmıştır. Hazırlanan formüllerden partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğine bakılarak uygun görülen formülasyonların çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çözünme hızı verilerine ait grafikler Şekil 3.27 ve Şekil 3.28’de verilmiştir.



Şekil 3.27. Donepezil HCl yüklü DF1, DF10, DF13, DF14, DF26 ve Donepezil HCl'e ait salım grafikleri.



Şekil 3.28. Humanin yüklü HF3, HF9 formülleri ve Humanin'e ait salım grafikleri.

3.4. Formülasyon Seçimi

Yukarıda bulguları verilen formülasyon çalışmalarının sonucunda Donepezil HCl yüklü formülasyonlardan “DF26” ve Humanin yüklü formülasyonlardan “HF9” kodlu formülasyonlar seçilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllere ilişkin formülasyon parametreleri Çizelge 3.25’de, in vitro özellikler ise Çizelge 3.26’da verilmektedir.

Çizelge 3.25. Optimum formül olarak seçilen SLN’lerde formülasyon parametreleri.

Parametre	DF26	HF9
Lipit	Dynasan 116	Dynasan 116
Etken Maddenin Katıldığı Faz	Katı toz olarak direkt yağ fazına	Katı toz olarak direkt yağ fazına
Lipit Miktarı (% a/h)	1	1
Su fazı hacmi (mL)	10	10
Su Fazında Kullanılan Sürfaktan	Tween 80	Tween 80
Sürfaktan miktarı (mg)	150	150
Etken Madde Miktarı (mg)	10	1
Karıştırma Hızı (rpm)	20 000	20 000
Karıştırma Süresi (dk)	5	5
Sonikasyon Süresi (dk)	10	5

Çizelge 3.26. Optimum formülasyonlara ait bulgular.

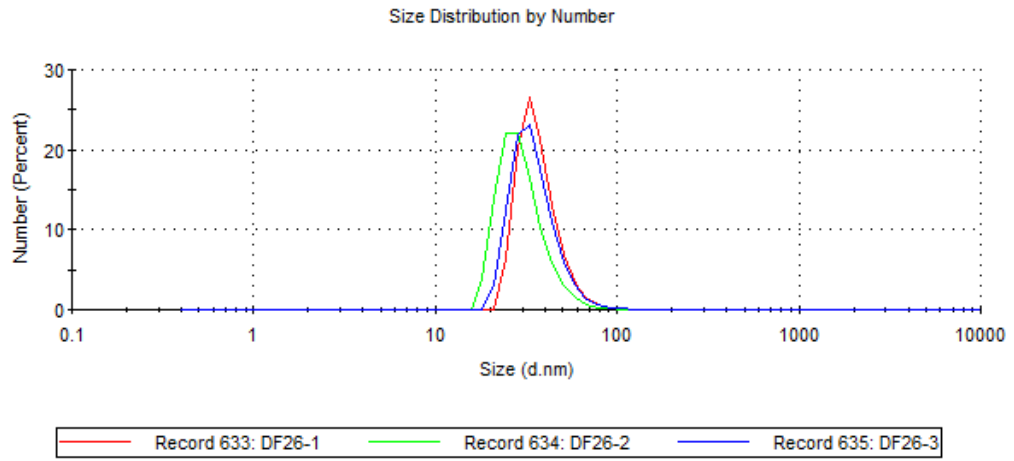
Özellik	DF26	HF9
Partikül büyüklüğü (nm±SS)	87,2±0,11	104,9±0,92
PDI (Ort±SS)	0,22±0,02	0,29±0,01
Zeta Potansiyeli (mV±SS)	-17,0±0,12	-15,0±0,096
Enkapsülasyon Etkinliği (%±SS)	93,84±0,01	98,99±0,03
Etken Madde İçeriği (%±SS)	3,61±0,01	0,38±0,01
24 saat sonunda açığa çıkan miktar (%)	85,15	99,5

3.5. Hazırlanan Formülasyonların Tekrarlanabilirliği

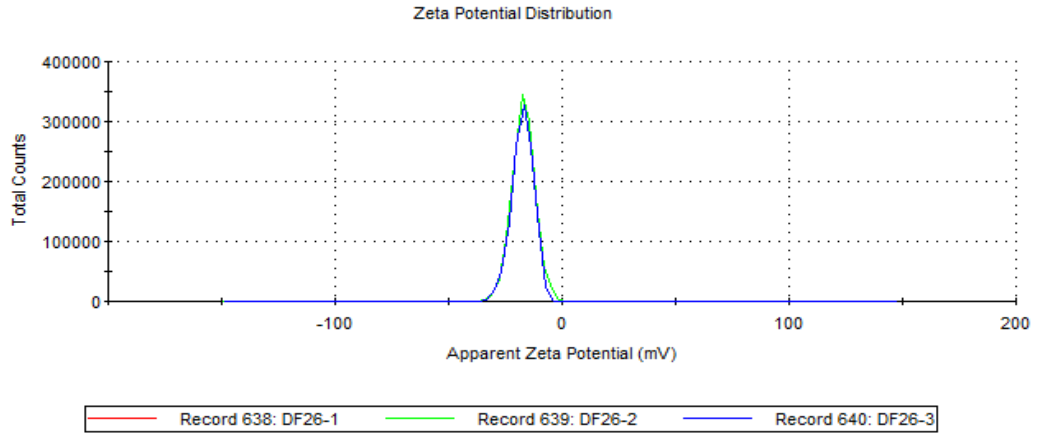
Hazırlanan formülasyonların tekrarlanabilirliği için 3 adet formülasyon için gerekli çözeltiler ve maddeler ayrı ayrı olarak hazırlanmış ve üretim gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar DF26 için Çizelge 3.27, Şekil 3.29 ve Şekil 3.30’da; HF9 için Çizelge 3.28, Şekil 3.31 ve Şekil 3.32’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.27. Donepezil HCl SLN formülasyonlarının tekrarlanabilirliği (n=3).

Formül Kodu	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
DF26-1	87,20±0,01	0,22±0,02	-17,0±0,02	93,84±0,02
DF26-2	88,39±0,32	0,22±0,03	-17,4±0,02	92,45±0,20
DF26-3	88,24±0,25	0,23±0,01	-17,4±0,36	93,26±0,12
Ortalama (Ort±SS)	87,89±0,75	0,22±0,01	-17,3±0,23	93,18±0,69



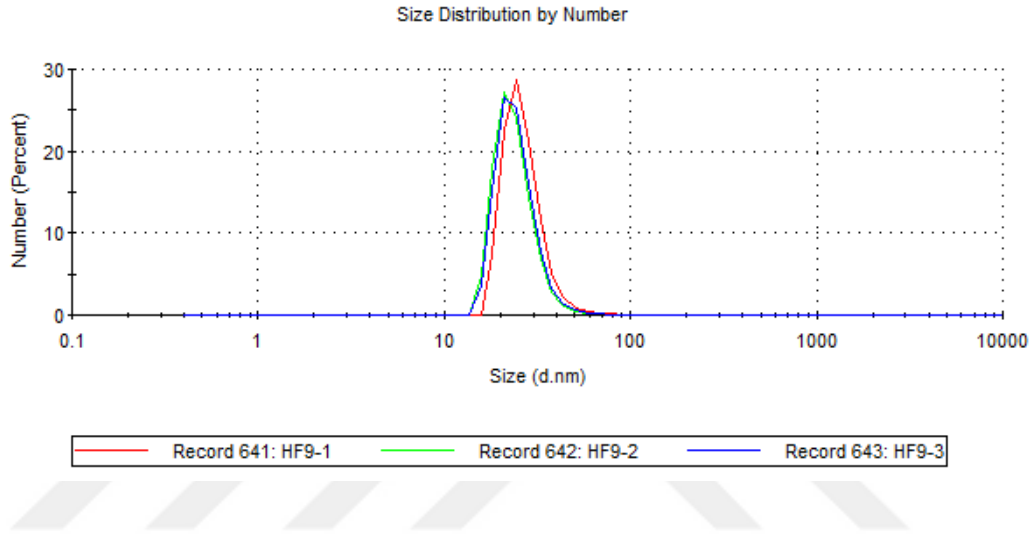
Şekil 3.29. DF26 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik.



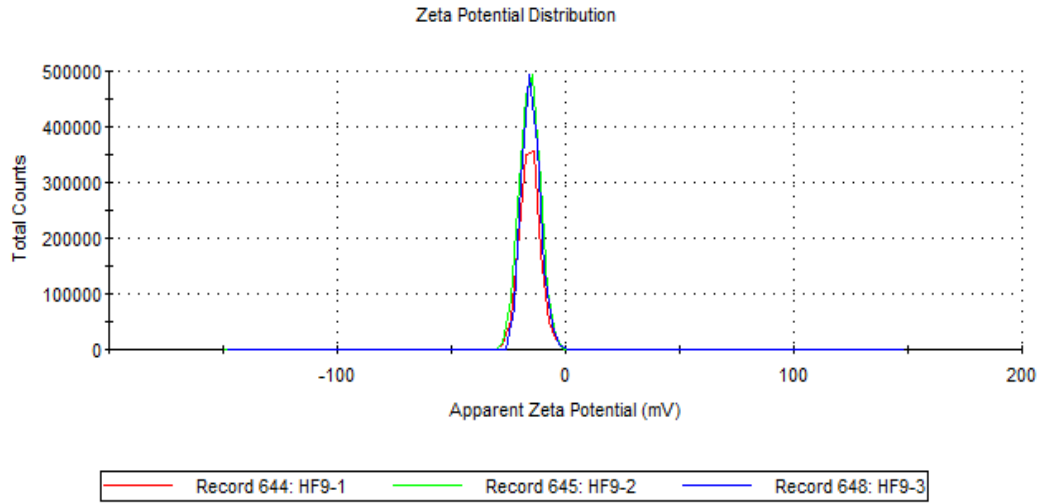
Şekil 3.30. DF26 kodlu formülün zeta potansiyeli dağılımına ait grafik.

Çizelge 3.28. Humanin SLN formülasyonlarının tekrarlanabilirliği (n=3).

Formül Kodu	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta (mV±SS)	EE (%±SS)
HF9-1	104,9±0,45	0,29±0,36	-15,0±0,11	98,99±0,22
HF9-2	104,2±0,24	0,28±0,75	-15,7±0,02	99,23±0,01
HF9-3	104,2±0,18	0,29±0,33	-15,5±0,13	99,01±0,01
Ortalama (Ort±SS)	104,4±0,40	0,29±0,01	-15,4±0,36	99,07±0,13



Şekil 3.31. HF9 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik.



Şekil 3.32. HF9 kodlu formülün zeta potansiyeli dağılımına ait grafik.

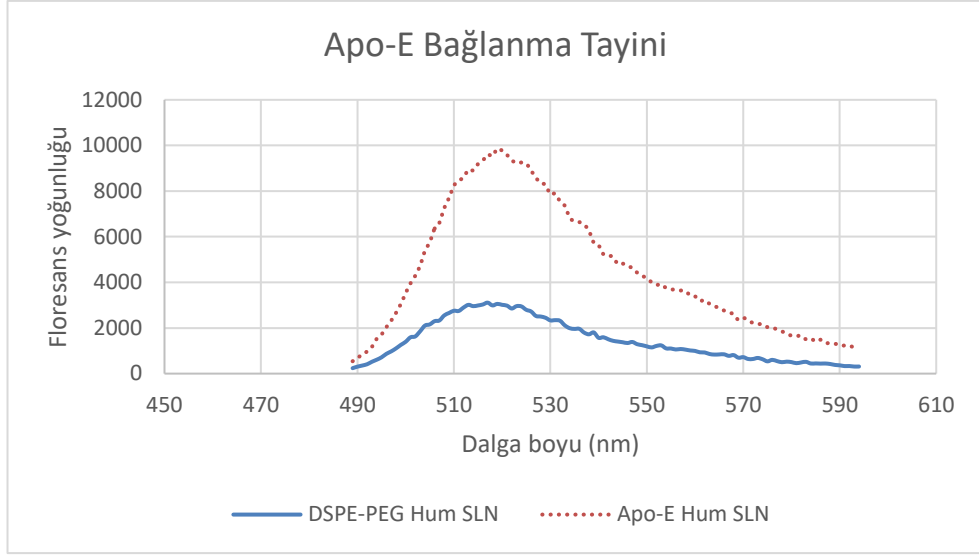
3.6. Seçilen Optimum Formülasyonların Apo-E ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılmasının Ardından Apo-E Bağlanma Etkinliği

Seçilen optimum Donepezil HCl ve Humanin yüklü formülasyonlar Bölüm 2.7.'de belirtilen şekilde Apo-E ile modifiye edilmiştir ve bu modifikasyonun sonunda Bölüm 2.7.1'de belirtilen şekilde Apo-E'nin partikül yüzeyine bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilmiştir.

Pozitif kontrol olarak biyotinlenmiş floresin çözeltisi ve negatif kontrol olarak da DSPE-PEG(2000)-Amin-Avidin kullanılarak üretilmiş; ancak Apo-E ile modifiye edilmemiş Humanin yüklü SLN kullanılmıştır. Floresan yoğunluklarına bakıldığında, Apo-E bağlı SLN'de dolu avidin gruplarından dolayı biyotinlenmiş floresin bu gruplara bağlanamamış ve bu da floresan yoğunluğu artırmıştır. Kontrole göre yaklaşık 3 kat floresan yoğunluğu Şekil 3.33'de açıkça görülmektedir.

Biyotinlenmiş floresin ile bir seri çözelti hazırlanmış (200-100-50-25-12,5-6,25-3,12-1,56 µg/mL), bu örneklerin floresan yoğunlukları okunarak bir kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur ($y=0,0011x-12,221$; $r^2=0,9939$). Buradan hareketle bağlanmamış floresin miktarı bulunmuş ve buradan hareketle Apo-E Hum SLN'e bağlanan Apo-E miktarı hesaplanmıştır.

%98,88 Apo-E'nin partiküle bağlandığı bulunmuştur.



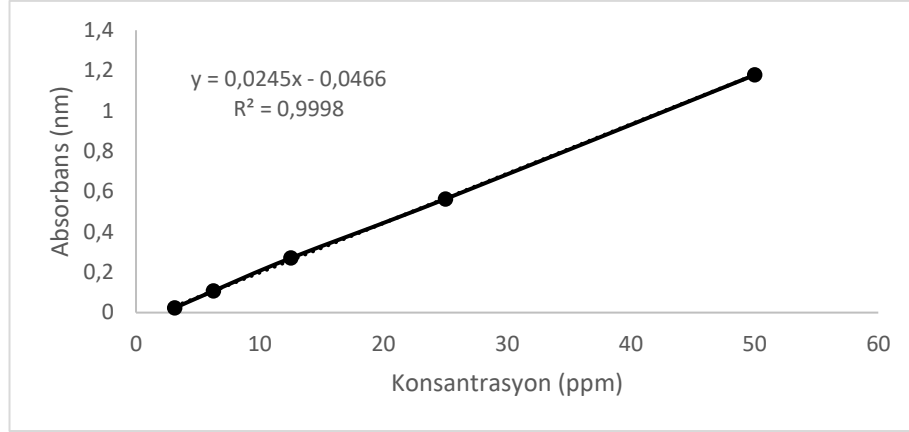
Şekil 3.33. Modifiye edilmiş formülde Apo-E'nin varlığını doğrulamak için biyotinlenmiş floresin kullanılarak yapılan florometrik test.

3.7. Seçilen Optimum Formülasyonların Transferrin ile Yüzey Modifikasyonlarının Yapılmasının Ardından Tf Bağlanma Etkinliği

Seçilen optimum Donepezil HCl ve Humanin yüklü formülasyonlar Bölüm 2.8.'de belirtilen şekilde Tf ile modifiye edilmiştir ve bu modifikasyonun sonunda Bölüm 2.8.1'de belirtilen şekilde Tf'nin partikül yüzeyine bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilmiştir.

BCA miktar tayini yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle Reajan karışımı eklenen BSA çözeltisi ile bir kalibrasyon serisi oluşturulmuştur (50-25-12,5-6,25-,3,12-1,56 ppm). Buradan 562 nm'de absorbans okunarak kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. BSA'ya ait kalibrasyon doğrusu Şekil 3.34'de gösterilmektedir. Yine reajan eklenen Tf bağlı SLN'nin aynı dalga boyunda absorbansı okunmuş ve absorbans kalibrasyon denkleminde yerine konarak SLN'ye bağlanan Tf miktarı bulunmuştur (Çizelge 3.29).

Yapılan bu hesaplama ile Tf'nin %90,60 oranında SLN yüzeyine bağlandığı belirlenmiştir.



Şekil 3.34. BCA yöntemi kullanılarak yapılan miktar tayininde BSA'ya ait kalibrasyon doğrusu.

Çizelge 3.29. SLN yüzeyine bağlanan Tf miktarı.

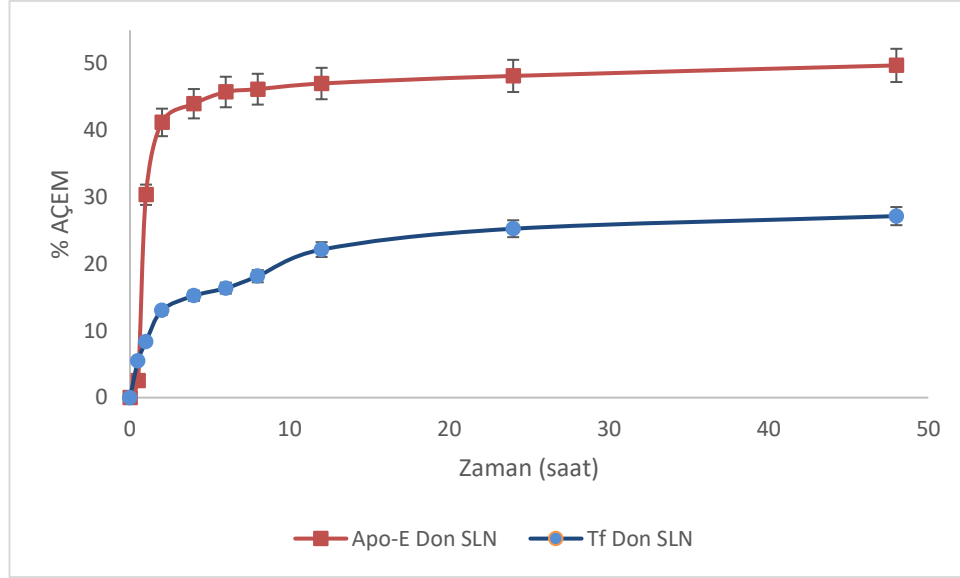
Tf miktarı (µg/mL)	% Bağlanan Tf
135,9	90,60

3.8. Yüzey Modifikasyonları Yapılan SLN'lere İlişkin Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

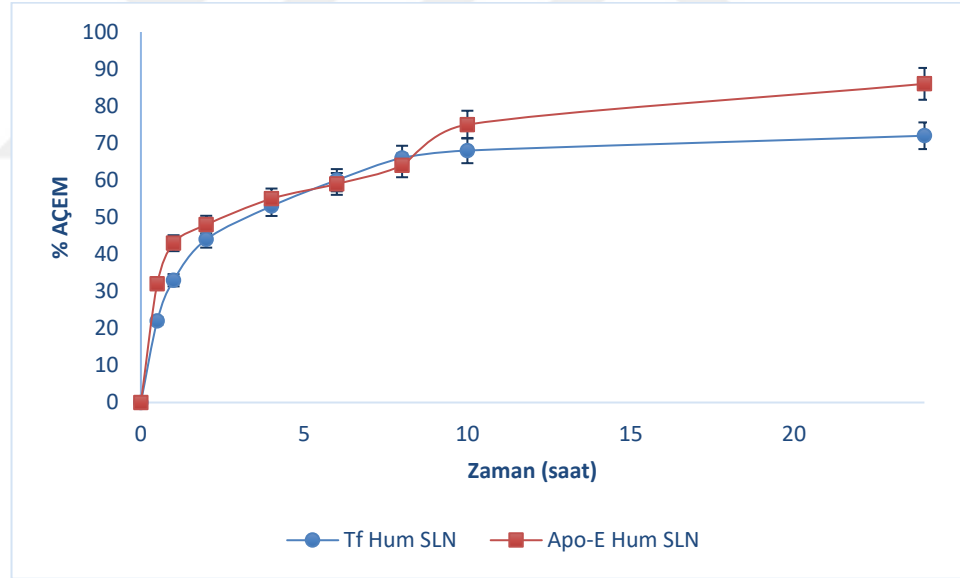
Partiküllerin Apo-E ve Tf ile yüzey modifikasyonları yapıldıktan sonra partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve salım profilleri incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarından elde edilen bulgular Çizelge 3.30'da, salım profili ise Şekil 3.35 ve 3.36'da verilmektedir.

Çizelge 3.30. Yüzey modifikasyonu yapılmış SLN'lere ait bulgular.

Parametre	Apo-E Don SLN	Apo-E Hum SLN	Tf Don SLN	Tf Hum SLN
Partikül büyüklüğü (nm±SS)	119,9±1,7	124,9±4,95	89,25±2,02	117,4±1,16
PDI (Ort±SS)	0,25±0,01	0,43±0,02	0,353±0,03	0,391±0,03
Zeta Potansiyeli (mV±SS)	-23,8±0,96	-20,3±0,64	-17,4±1,75	-9,10±0,39
Enkapsülasyon Etkinliği (%±SS)	98,12±0,02	99,99±0,00	92,48±0,01	99,97±0,00
Etken Madde İçeriği (%±SS)	3,69±0,01	0,39±0,00	3,40±0,01	0,38±0,00
24 saat sonunda açığa çıkan miktar (%)	%48,15	%86,08	%25,29	%72,43



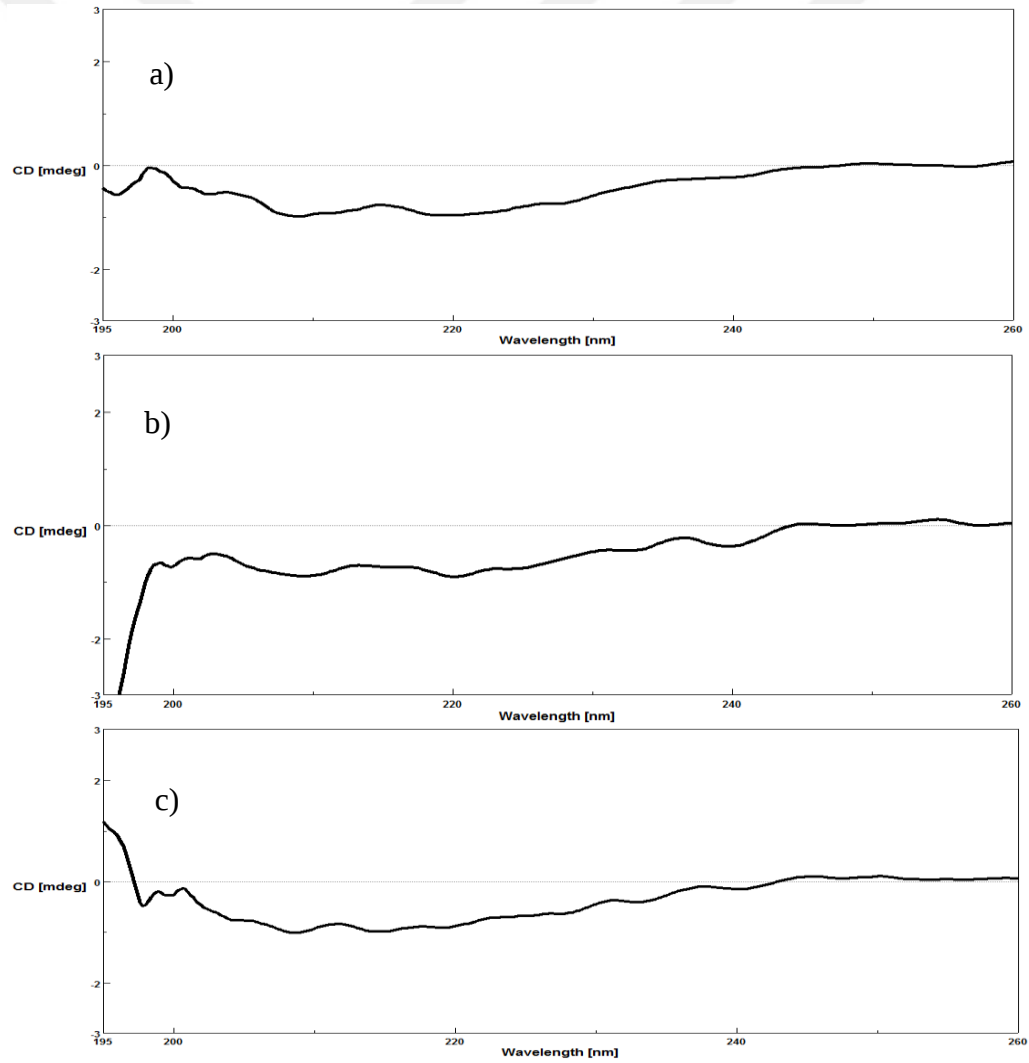
Şekil 3.35. DF26 kodlu Donepezil HCl yüklü formülden hareketle modifiye edilerek hedeflendirilen formülasyonlara ait salım grafiği.



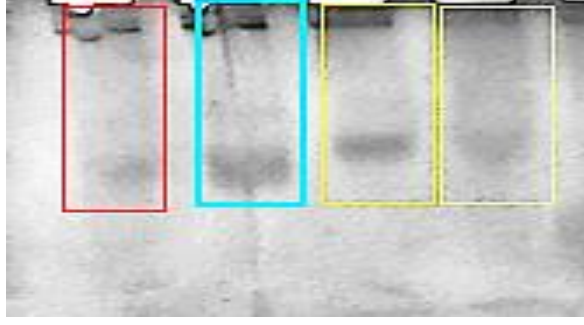
Şekil 3.36. HF9 kodlu Humanin yüklü formülden hareketle modifiye edilerek hedeflendirilen formülasyonlara ait salım grafiği.

3.9. Hazırlanan Humanin Yüklü Formülasyonlarda Humanin'in Yapısal Bütünlük Kontrolü

Humanin ile hazırlanan formülasyonlarda, humanin peptit yapısının işlem basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin kontrolü amacıyla HF-9, Apo-E Hum SLN ve Tf Hum SLN formülasyonlarının salım deneyleri sırasında elde edilen örneklerine Native-PAGE analizi ve CD analizi uygulanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 3.37 ve Şekil 3.38’de sunulmaktadır. Analizler için 24. saate ait salım numuneleri kullanılmıştır.



Şekil 3.37. a)HF-9 formülüne ait CD spektrumu; b) Apo-E Hum SLN’e ait CD spektrumu; c)Tf Hum SLN’e ait CD spektrumu.



Şekil 3.38. Native-PAGE analizi; sırasıyla Humanin çözeltisi (kırmızı), Tf Hum SLN (mavi), Apo-E Hum SLN (turuncu) ve HF-9 (beyaz).

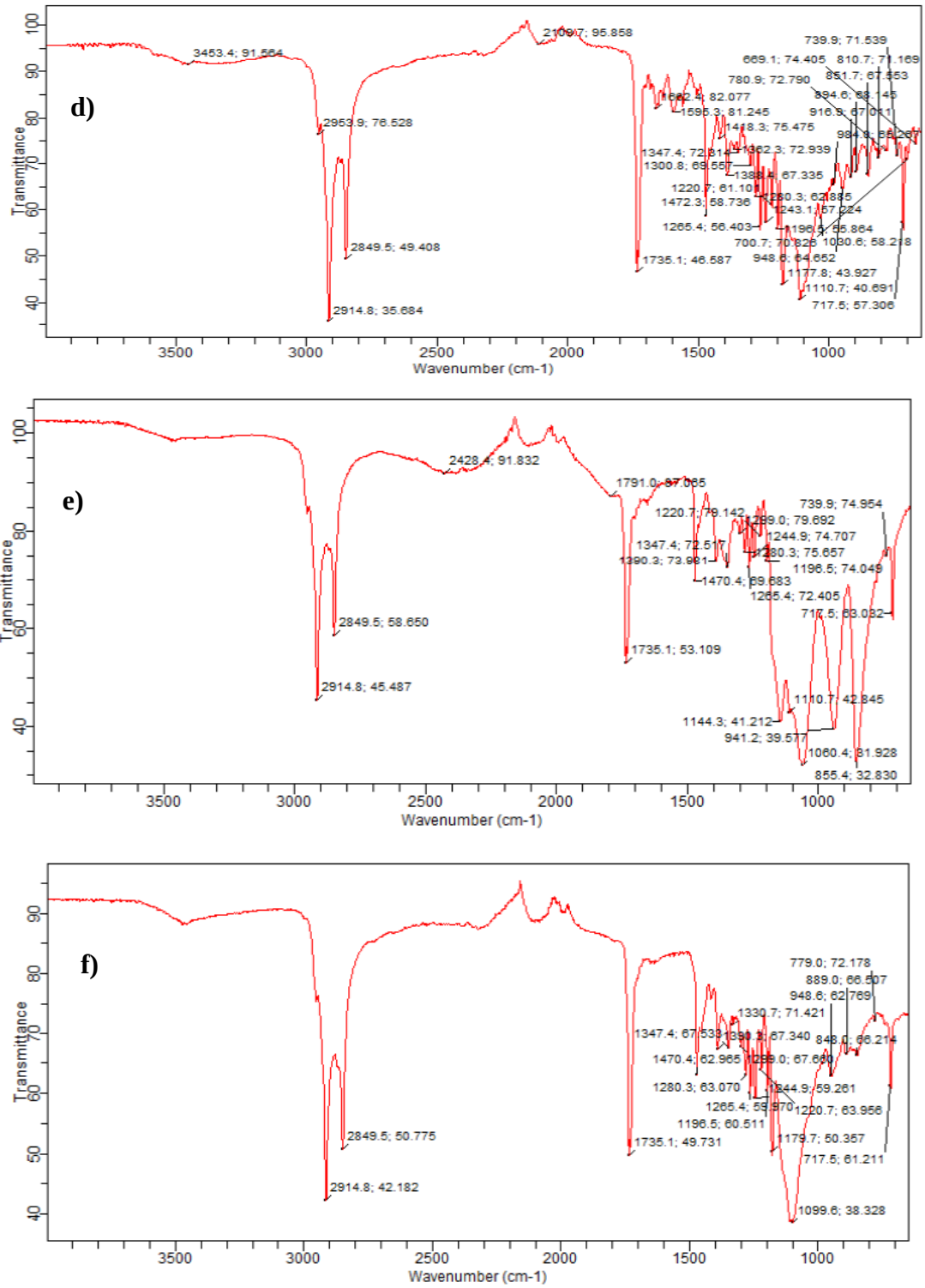
CD analizi sonucunda elde edilen spektrumlar incelendiğinde minimum pikin 208 nm ve 220 nm’de olduğu görülmüştür. Bu sonuç Humanin CD spektrumu ile karşılaştırıldığında benzerdir (Şekil 3.7).

Native-PAGE çalışmasında konsantrasyonun çok düşük olmasından dolayı bantlar belirgin şekilde oluşmamıştır; ancak Humanin çözeltisi bantıyla karşılaştırıldığında formülasyonların benzer bir sürüklenme gösterdiği görülebilmektedir.

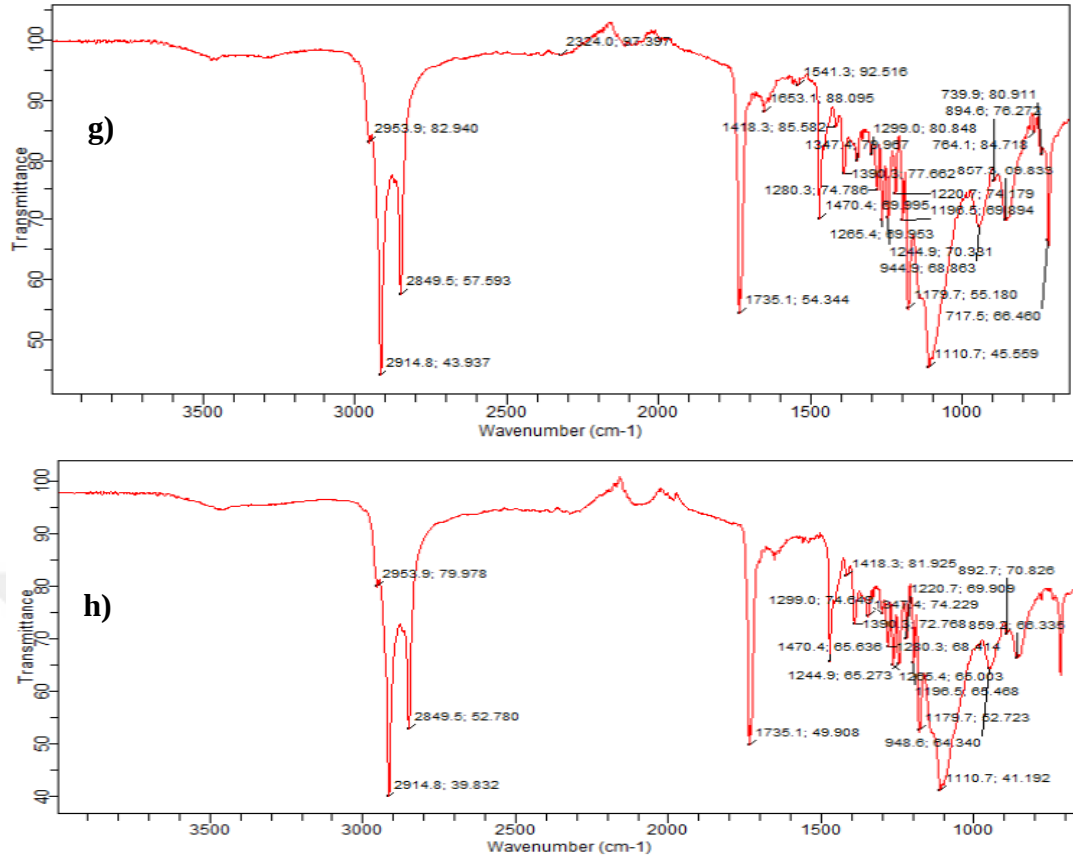
3.10. Nanopartiküllerde Etkin Madde-Lipit Etkileşimi Tayini

3.10.1. FTIR Spektrumları

Katı lipid nanopartiküllerde etken madde-yağ etkileşimini incelemek için Bölüm 2.10’da anlatılan yöntemle FTIR analizi yapılmıştır. Lipit (Dynasan 116) ve hazırlanan boş SLN, etken madde yüklü hedefli ve hedefli olmayan SLN formülasyonlarına ait FTIR spektrumları Şekil 3.39’da verilmiştir.



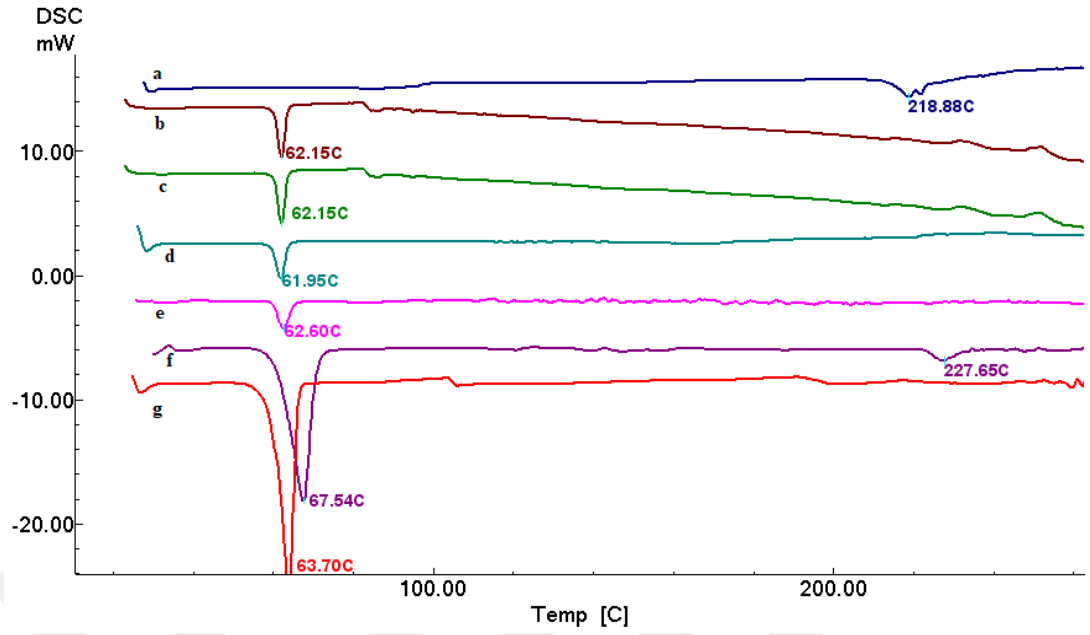
Şekil 3.40. Devam. a) Dynasan 116 b) Boş SLN c) DF26 d) Apo-E Don-SLN e) Tf Don SLN f) HF9 g) Apo-E Hum SLN h) Tf Hum SLN formüllerine ait FTIR spektrumları.



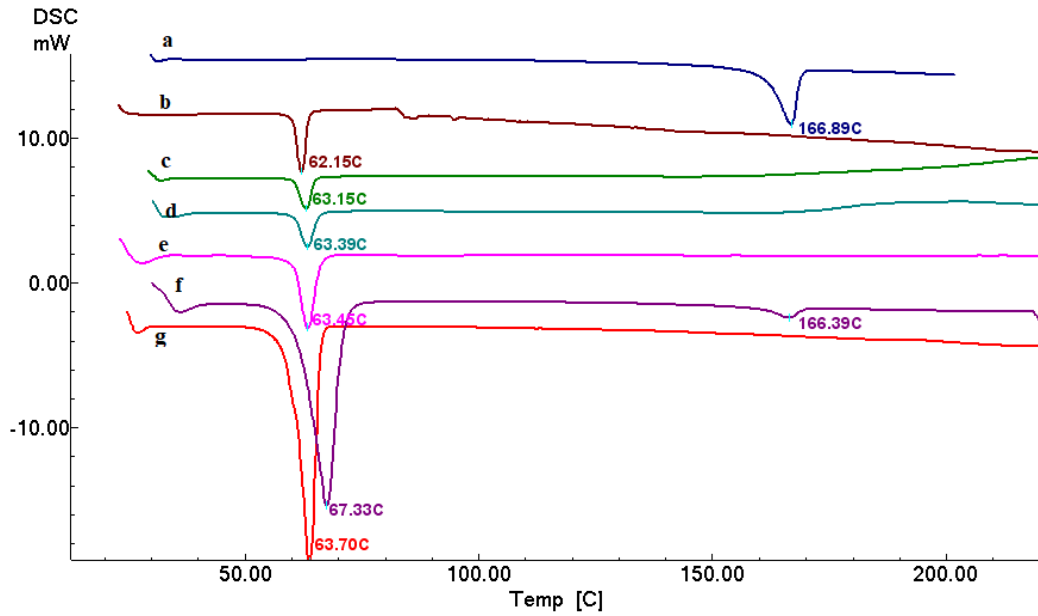
Şekil 3.41. Devam. a) Dynasan 116 b) Boş SLN c) DF26 d) Apo-E Don-SLN e) Tf Don SLN f) HF9 g) Apo-E Hum SLN h) Tf Hum SLN formüllerine ait FTIR spektrumları.

3.10.2. DSC Termogramları

Nanopartiküllerde etken madde-lipit etkileşimini incelemek için Bölüm 2.11’de anlatılan yöntemle DSC analizi yapılmıştır. Lipit (Dynasan 116) ve hazırlanan hedefli ve hedefli olmayan SLN formülasyonlarına ait DSC termogramları Donepezil HCl yüklü formülasyonlar için Şekil 3.40’da, Humanin yüklü formülasyonlar için Şekil 3.41’de verilmiştir.



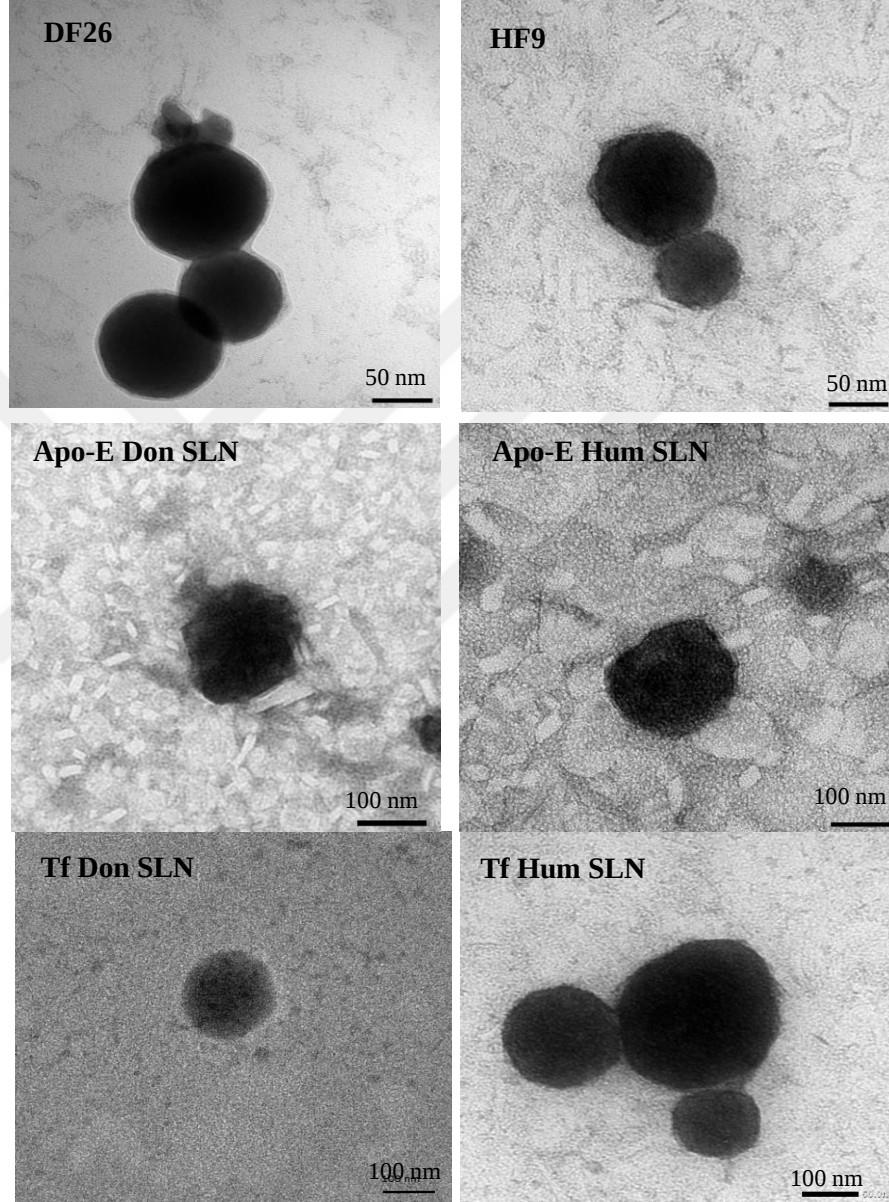
Şekil 3.42. Donepezil HCl ile hazırlanan formüllere ait DSC termogramları (a: Donepezil HCl; b: Boş SLN; c: DF26; d: Apo-E Don SLN; e: Tf Don SLN; f: Lipit ve Donepezil HCl fiziksel karışımı; g: Lipit-Dynasan 116).



Şekil 3.43. Humanin ile hazırlanan formüllere ait DSC termogramları (a: Humanin; b: Boş SLN; c: HF9; d: Apo-E Hum SLN; e: Tf Hum SLN; f: Lipit ve Humanin fiziksel karışımı; g: Lipit-Dynasan 116).

3.11. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin görüntüleri TEM analizi ile yapılmıştır. Şekil 3.42’de görüntüler verilmiştir.



Şekil 3.44. Hazırlanan SLN formülasyonlarına ait TEM görüntüleri.

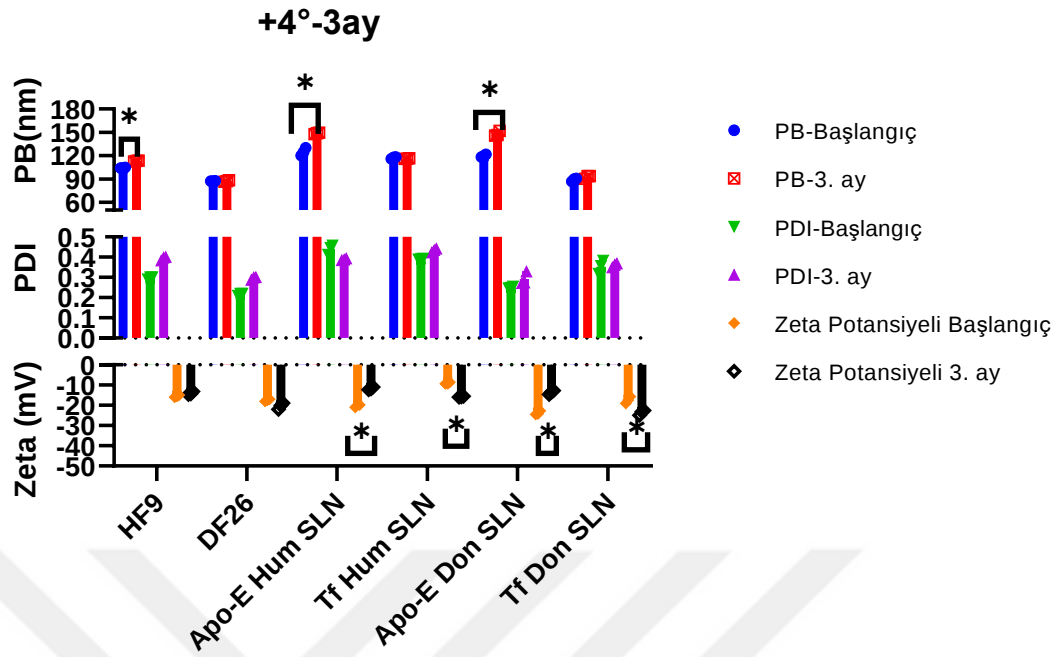
3.12. Stabilite Çalışmaları

3.12.1. +4°C’de Gerçekleştirilen Stabilite Çalışmaları

+4°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait başlangıç ve 3. ay bulguları Çizelge 3.31’de ve Şekil 3.43’de verilmektedir.

Çizelge 3.31. +4°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulgular (n=3).

Formül	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (başlangıç)	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (3. ay)	PDI (Ort±SS) (başlangıç)	PDI (Ort±SS) (3. ay)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (başlangıç)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (3. ay)
DF26	87,2±0,11	87,41±1,08	0,22±0,02	0,29±0,01	-17,0±0,12	-20,3±1,56
HF-9	104,9±0,92	113,2±0,62	0,29±0,01	0,39±0,01	-15,0±0,96	-14,1±0,79
Apo-E Don SLN	119,9±1,7	148,1±3,28	0,25±0,01	0,29±0,03	-23,8±0,96	-13,6±0,95
Apo-E Hum SLN	124,9±4,95	148,7±1,02	0,43±0,02	0,38±0,04	-20,3±0,64	-11,7±0,66
Tf Don SLN	89,25±2,02	92,56±1,47	0,35±0,03	0,36±0,01	-17,4±1,75	-23,6±1,27
Tf Hum SLN	117,4±1,16	116,2±0,18	0,39±0,03	0,43±0,01	-9,10±0,39	-15,7±0,21



Şekil 3.45. +4°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulguların grafiksel gösterimi (n=3 ve *p< 0,05).

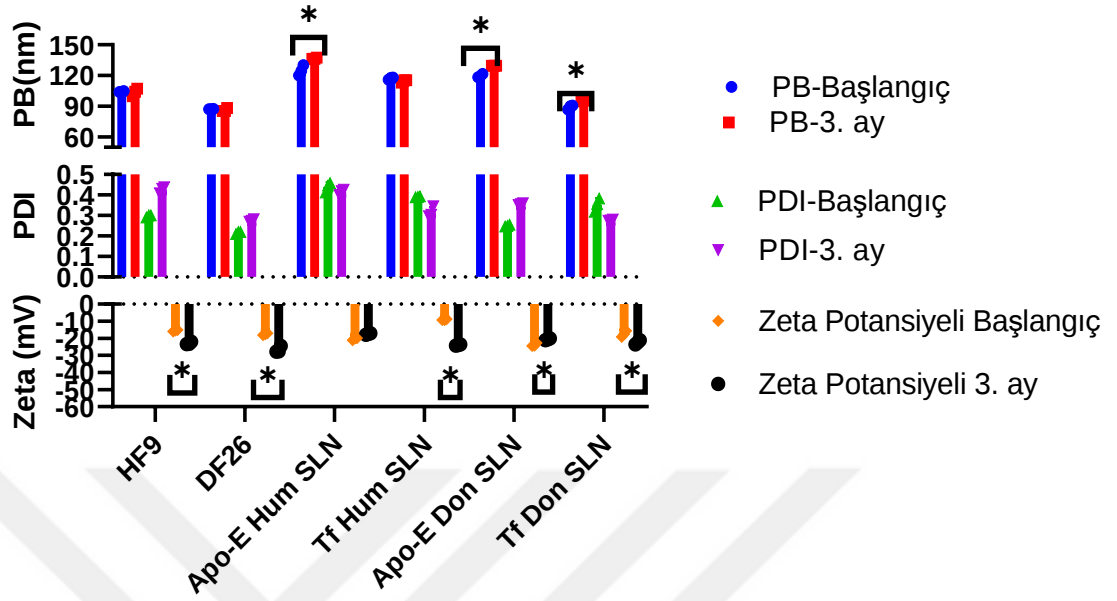
3.12.2. 25°C’de Gerçekleştirilen Stabilite Çalışmaları

25°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait başlangıç ve 3. ay bulguları Çizelge 3.32’de ve Şekil 3.44’de verilmektedir.

Çizelge 3.32. 25°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulgular (n=3).

Formül	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (başlangıç)	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (3. ay)	PDI (Ort±SS) (başlangıç)	PDI (Ort±SS) (3. ay)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (başlangıç)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (3. ay)
DF26	87,2±0,11	86,45±1,59	0,22±0,02	0,27±0,01	-17,0±0,12	-26,7±1,88
HF-9	104,9±0,92	103,8±3,68	0,29±0,01	0,42±0,02	-15,0±0,96	-22,8±0,81
Apo-E Don SLN	119,9±1,7	129,6±0,03	0,25±0,01	0,35±0,01	-23,8±0,96	-20,5±0,54
Apo-E Hum SLN	124,9±4,95	136,8±0,64	0,43±0,02	0,41±0,01	-20,3±0,64	-17,4±0,45
Tf Don SLN	89,25±2,02	95,45±0,47	0,35±0,03	0,27±0,03	-17,4±1,75	-22,3±1,25
Tf Hum SLN	117,4±1,16	114,63±2,40	0,39±0,03	0,32±0,03	-9,10±0,39	-23,9±0,35

25°C-3.ay



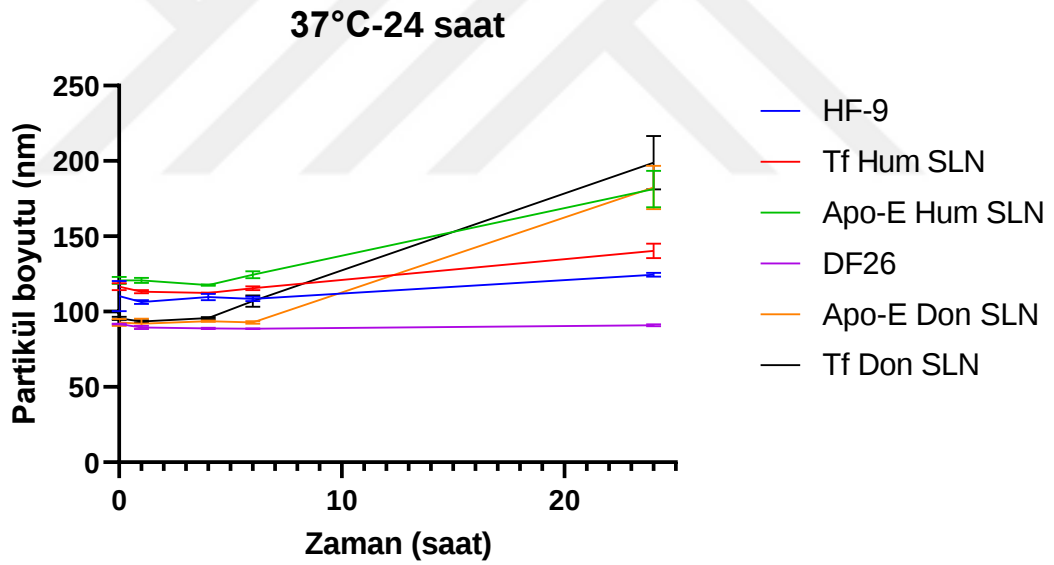
Şekil 3.46. 25°C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarına ait bulguların grafiksel gösterimi (n=3 ve *p< 0,05).

3.12.3. Kolloidal Stabilite Çalışmaları

Kolloidal stabilite çalışmaları %10 FBS içeren pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisinde 37°C’de 24 saat ve +4°C’de 1 ay süre ile gerçekleştirilmiştir. 37°C’de 24 saat süreyle gerçekleştirilen çalışmalara ait bulgular Çizelge 3.33’de ve Şekil 3.45’de, +4°C’de 1 ay süreyle gerçekleştirilen çalışmalara ait bulgular Çizelge 3.34’de ve Şekil 3.46’da yer almaktadır.

Çizelge 3.33. 37°C’de 24 saat süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarına ait bulgular (n=3).

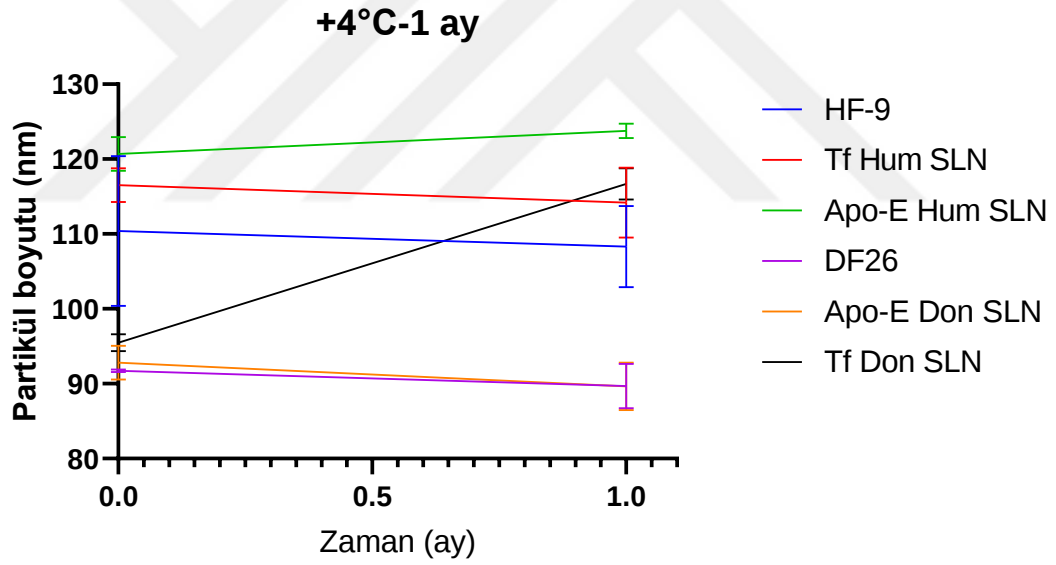
Formül	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (başlangıç)	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (24. Saat)	PDI (Ort±SS) (başlangıç)	PDI (Ort±SS) (24. Saat)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (başlangıç)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (24. Saat)
DF26	91,82±0,02	90,86±0,64	0,29±0,01	0,28±0,02	-2,38±0,92	-8,78±0,99
HF-9	110,40±0,92	124,4±1,31	0,48±0,03	0,48±0,01	-2,84±0,81	-3,91±0,66
Apo-E Don SLN	92,82±2,24	182,5±14,58	0,38±0,04	0,47±0,08	4,36±0,73	-6,87±0,33
Apo-E Hum SLN	120,70±2,27	181,4±12,05	0,46±0,01	0,58±0,17	-3,04±0,77	-13,2±0,85
Tf Don SLN	95,03±1,6	198,8±7,92	0,29±0,04	0,38±0,088	-4,20±1,02	-5,43±0,36
Tf Hum SLN	116,50±2,29	140,4±4,79	0,29±0,01	0,47±0,08	-5,47±0,19	-5,50±0,43



Şekil 3.47. 37°C’de 24 saat süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarında saatlere göre partikül boyutu değişimi.

Çizelge 3.34. +4°C’de 1 ay süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarına ait bulgular (n=3).

Formül	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (başlangıç)	Partikül büyüklüğü (nm±SS) (1 ay)	PDI (Ort±SS) (başlangıç)	PDI (Ort±SS) (1 ay)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (başlangıç)	Zeta Potansiyeli (mV±SS) (1 ay)
DF26	93,85±2,02	93,41±0,97	0,32±0,04	0,29±0,04	-2,58±0,22	-4,52±0,28
HF-9	110,40±0,92	108,40±5,40	0,48±0,03	0,39±0,06	-2,84±0,81	-3,10±0,69
Apo-E Don SLN	92,82±2,24	89,65±3,19	0,38±0,04	0,42±0,01	-4,36±0,73	-8,43±0,72
Apo-E Hum SLN	120,70±2,27	124,60±3,60	0,46±0,01	0,55±0,04	-3,04±0,77	-5,86±0,91
Tf Don SLN	94,86±1,40	116,70±2,12	0,44±0,01	0,54±0,05	-1,85±0,50	-7,31±1,86
Tf Hum SLN	116,50±2,29	114,20±4,69	0,29±0,01	0,40±0,05	-5,47±0,19	-6,45±0,63



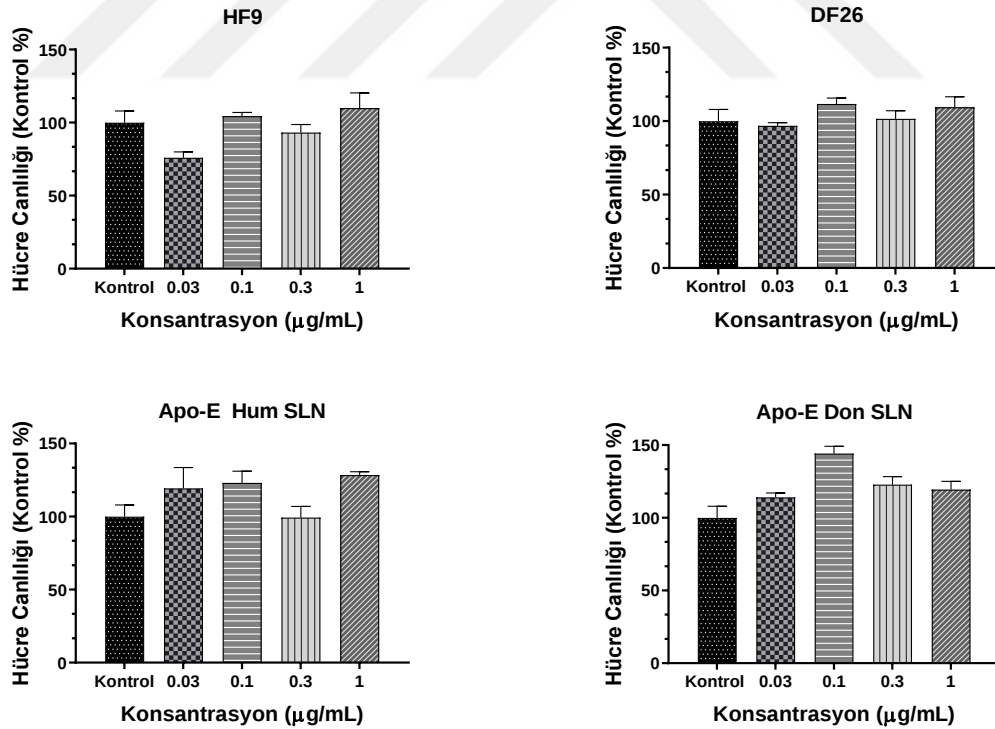
Şekil 3.48. +4°C’de 1 ay süreyle gerçekleştirilen kolloidal stabilite çalışmalarında zamana göre partikül boyutu değişimi.

3.13. Hücre Kültürü Çalışmalarına Dair Bulgular

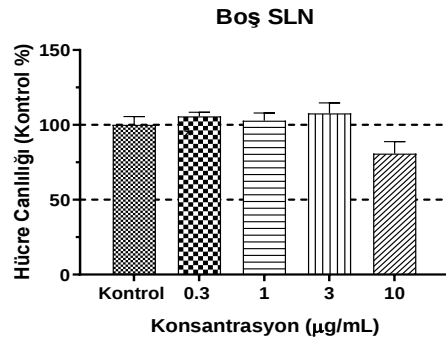
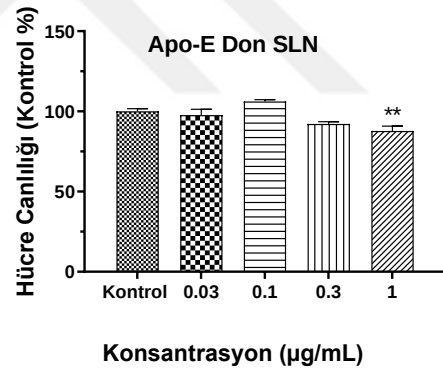
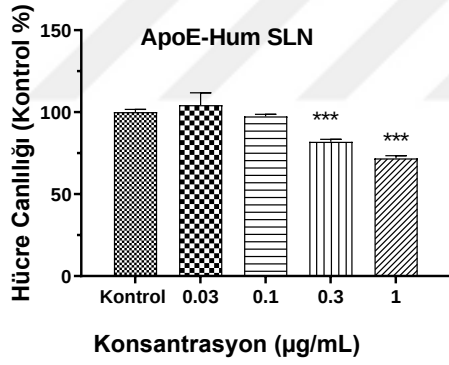
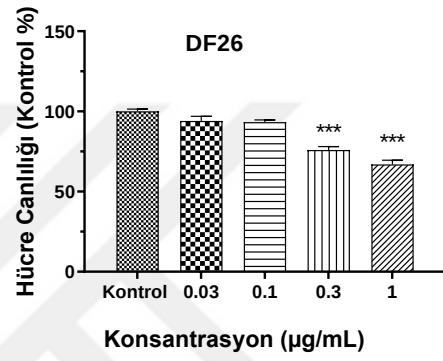
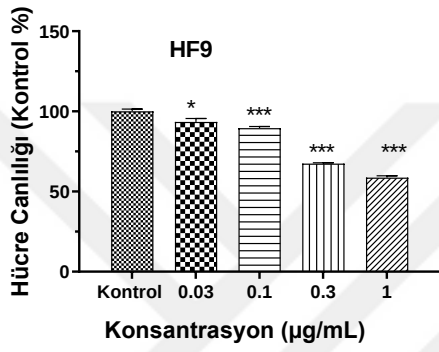
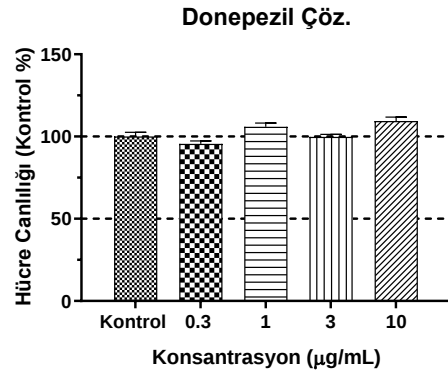
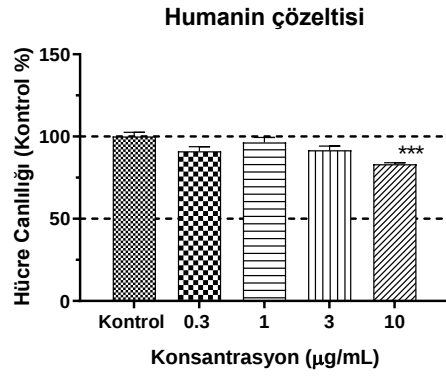
3.13.1. Sitotoksosite Çalışmaları

3.13.1.1.MTT Çalışmalarına Dair Bulgular

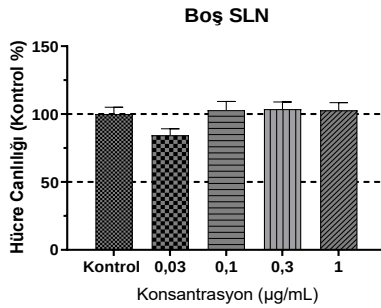
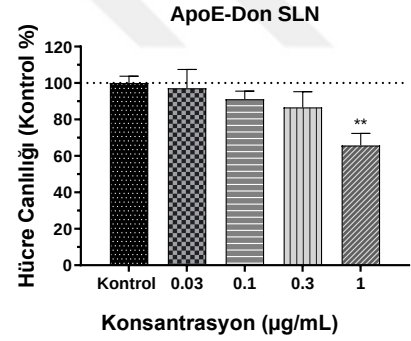
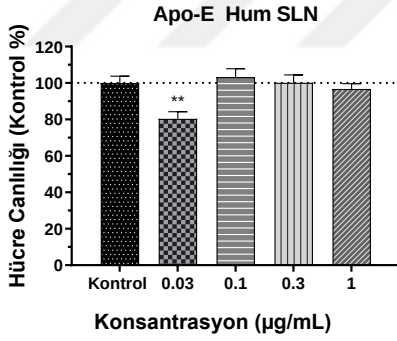
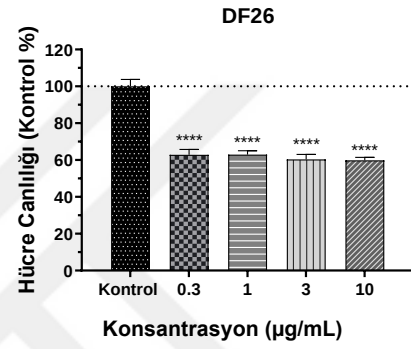
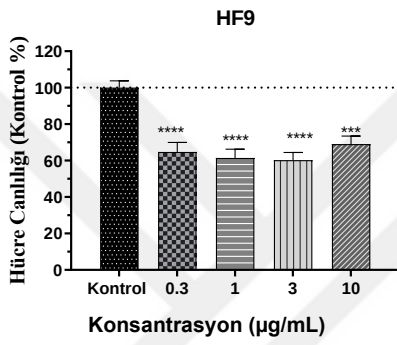
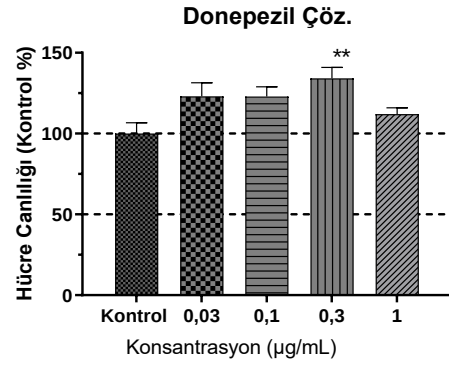
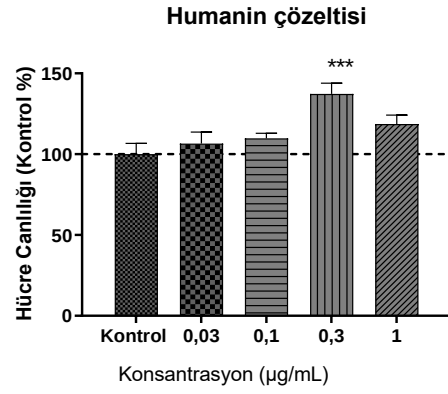
Yapılacak diğer çalışmalar için partiküllerin hücreler için güvenli olan dozu belirlemek adına sitotoksosite çalışmaları yürütülmüştür. SLN'ler belirtilen konsantrasyonlarda RBEC, hCMEC/D3 ve SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır ve 2 saat boyunca inkübasyon sağlanmıştır. Hücre canlılığı (%kontrol) ile ilgili elde edilen bulgular RBEC hücreleri için Şekil 3.47, hCMEC/D3 hücreleri için Şekil 3.48 ve SH-SY5Y hücreleri için ise Şekil 3.49'da verilmektedir.



Şekil 3.49. RBEC hücrelerinde 2 saat inkübasyondan sonra MTT verileri (n=6 ve p>0,05).



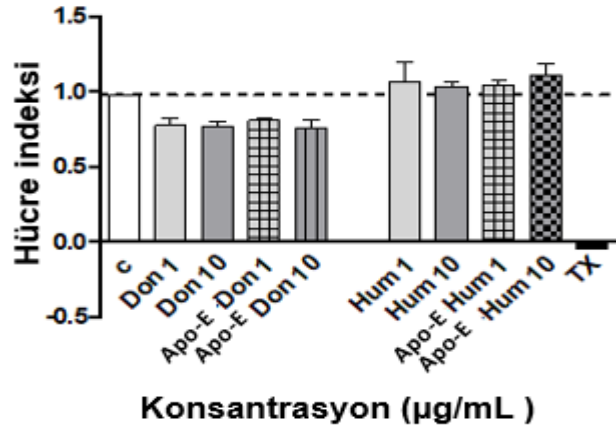
Şekil 3.50. hCMEC/D3 hücrelerinde 2 saat inkübasyondan sonra MTT verileri (n=6 ve p>0,05).



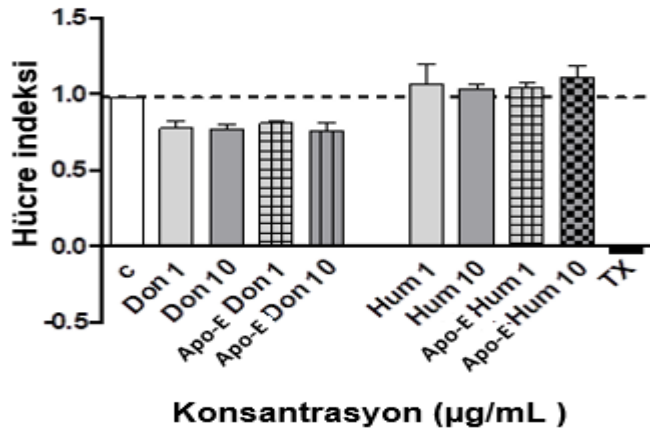
Şekil 3.51. SH-SY5Y hücrelerinde 2 saat inkübasyondan sonra MTT verileri (n=6 ve p>0,05).

3.13.1.2. Empedans Ölçümü Çalışmalarına Dair Bulgular

RBEC ve hCMEC/D3 hücrelerinde yapılan empedans ölçümlerine dair bulgular Şekil 3.50 ve 3.51’de verilmektedir. Uygulama 1 ve 10 µg/mL dozlarda yapılmıştır ve hücreler 24 saat gözlenmiştir. Uygulanan dozlarda toksik bir etki görülmemiştir.



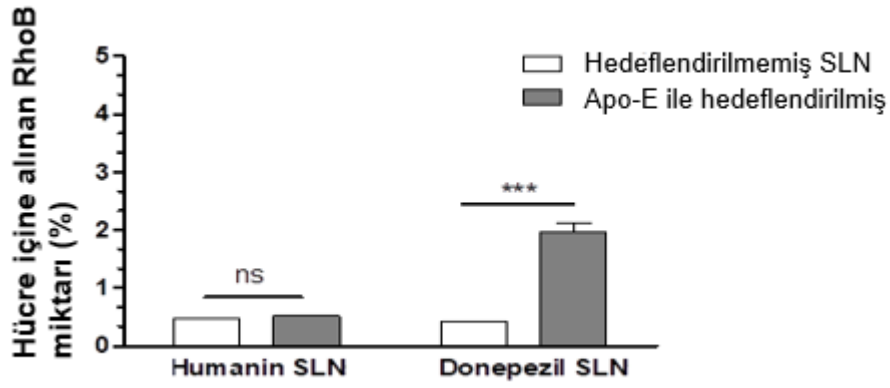
Şekil 3.52. RBEC hücrelerinde 24 saatlik empedans ölçümü sonuçları (**** p <0,0001 kontrol grubu ile karşılaştırma; n = 6–8. C: Kontrol grubu; Don:DF26; Hum: HF9; 1 ve 10: 1 ve 10 µg/mL ; TX: Triton X-100 uygulanan hücreler).



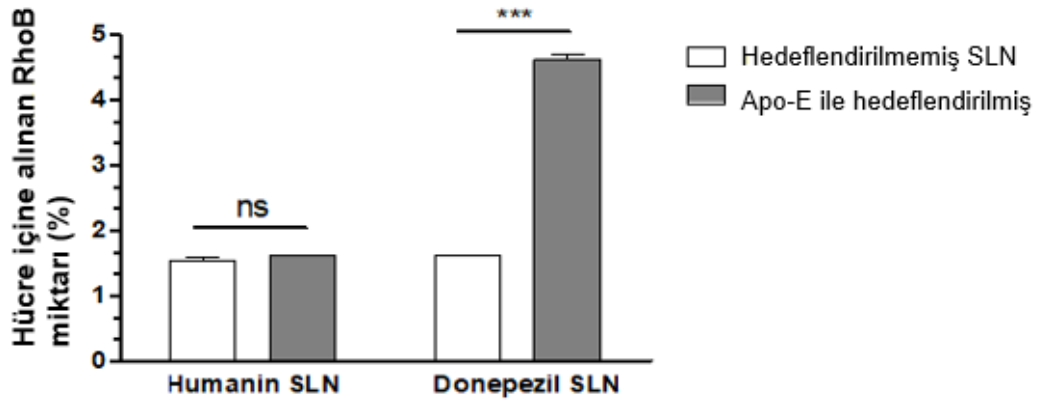
Şekil 3.53. hCMEC/D3 hücrelerinde 24 saatlik empedans ölçümü sonuçları (**** p <0,0001 kontrol grubu ile karşılaştırma; n = 6–8. C: Kontrol grubu; Don:DF26; Hum: HF9; 1 ve 10: 1 ve 10 µg/mL ; TX: Triton X-100 uygulanan hücreler).

3.13.2. Hücresel Alım Çalışmaları

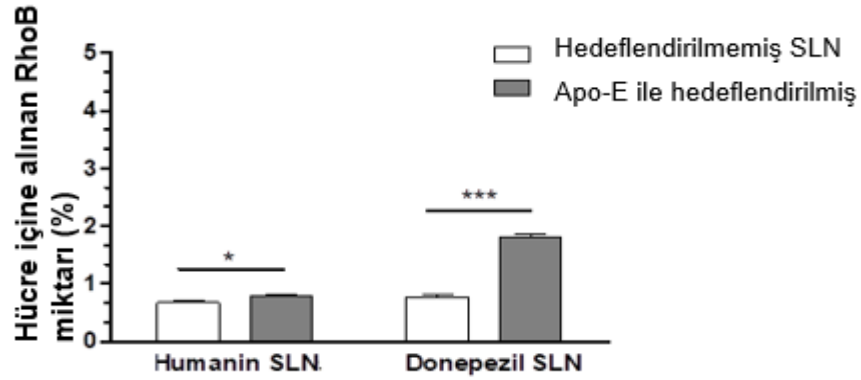
Hücresel alım çalışmaları hedeflendirilmemiş SLN'ler (DF26 ve HF9) ve Apo-E ile hedeflendirilmiş SLN'ler ile yürütülmüştür. Bu testler sırasında RBEC, hCMEC/D3 ve SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. 2 saatlik inkübasyonun ardından elde edilen sonuçlar Şekil 3.52, Şekil 3.53 ve Şekil 3.54'de verilmektedir.



Şekil 3.54. RhoB ile etiketlenmiş hedefli ve hedefsiz Donepezil HCl ve Humanin yüklü SLN'lerde 2 saatlik inkübasyon sonrası RBEC hücreleri tarafından alınma miktarı (n=6 ve ***p < 0,001; ns: not significant-anlamlı fark yoktur).



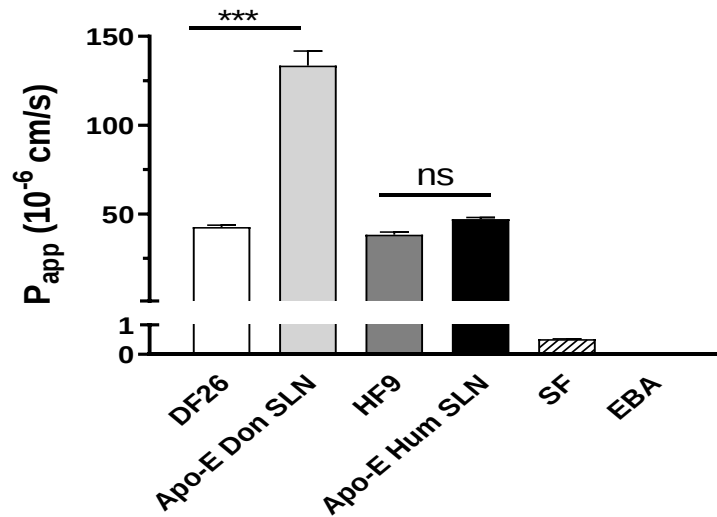
Şekil 3.55. RhoB ile etiketlenmiş hedefli ve hedefsiz Donepezil HCl ve Humanin yüklü SLN'lerde 2 saatlik inkübasyon sonrası hCMEC/D3 hücreleri tarafından alınma miktarı (n=6 ve ***p < 0,001; ns: not significant-anlamlı fark yoktur).



Şekil 3.56. RhoB ile etiketlenmiş hedefli ve hedefsiz Donepezil HCl ve Humanin yüklü SLN’lerde 2 saatlik inkübasyon sonrası SH-SY5Y hücreleri tarafından alınma miktarı (n=6 ve *p < 0,5 , ***p < 0,001).

3.13.3. İn Vitro Kan Beyin Engeli Modelinde Geçiş Çalışmaları

SLN’lerin 10 µg/mL konsantrasyonda uygulanıp 2 saat inkübe edildikten sonra KBE modelinde elde edilen etken madde geçişine dair sonuçlar Şekil 3.55’de verilmiştir.

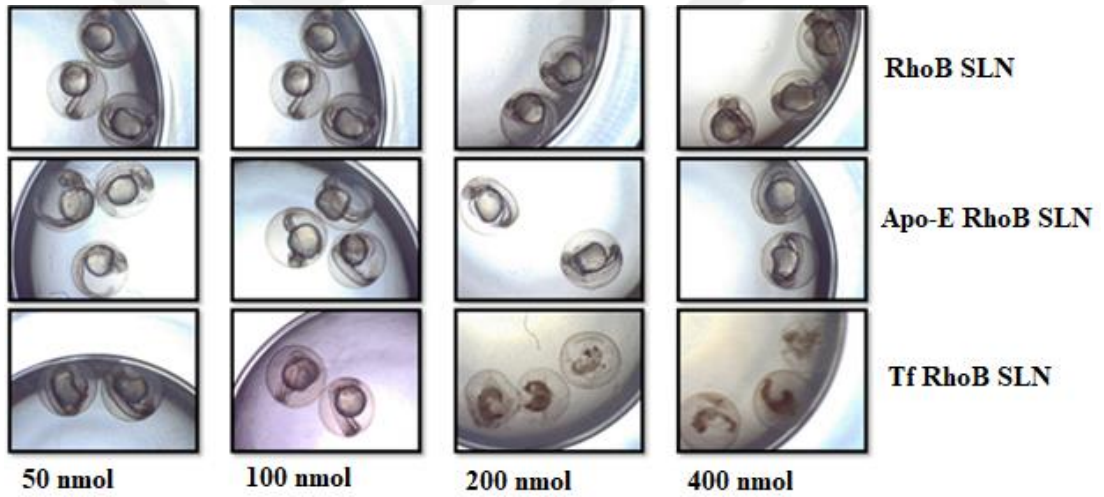


Şekil 3.57. Hedefli ve hedeflendirilmemiş SLN’lerin (10 µg/mL) 2 saatlik inkübasyon sonrası KBE’den penetrasyonu (n=4 ve ***p < 0,001; ns: not significant-anlamı fark yoktur).

3.14. İn Vivo Çalışmalara Dair Bulgular

3.14.1. Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular

İn vitro deneylerde hazırlanan formülasyonların zebra balığı embriyolarında neden olduğu toksisiteyi ve uygun konsantrasyonu belirlemek için sitotoksosite çalışmaları yürütülen çalışmalarda 18, 50, 180 ve 500 nmol konsantrasyonlarda uygulanan Rhodamin B ile boyanmış formülasyonlardan elde edilen sonuçlar Şekil 3.56'da gösterilmiştir. Embriolarda toksik olmayan konsantrasyon miktarı 100 nmol olarak belirlenmiştir.



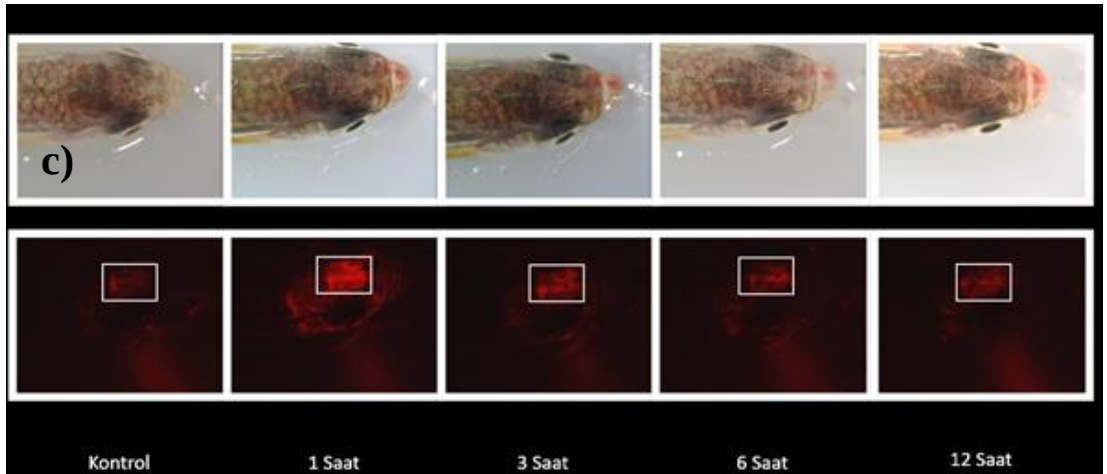
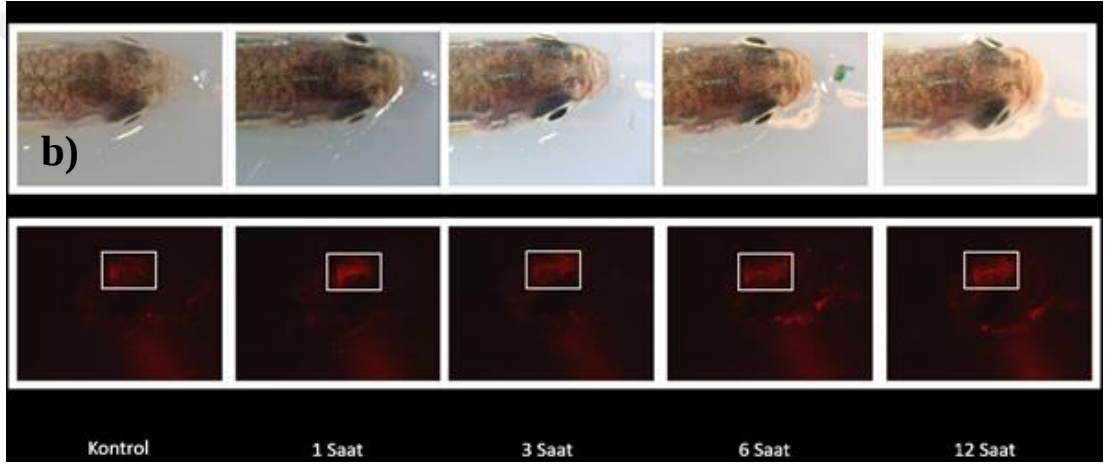
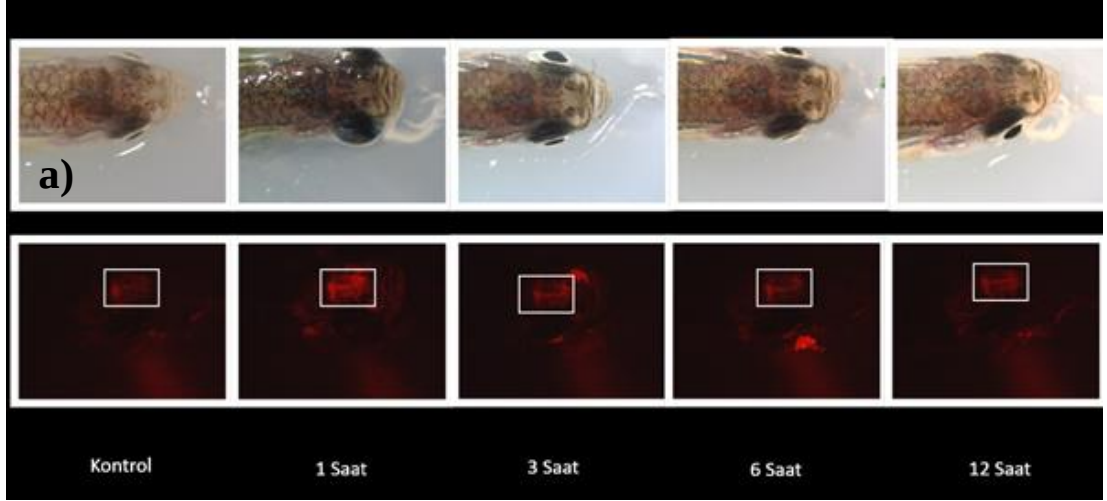
Şekil 3.58. Embriolarda yapılan sitotoksosite çalışmaları.

3.14.2. Beyine Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

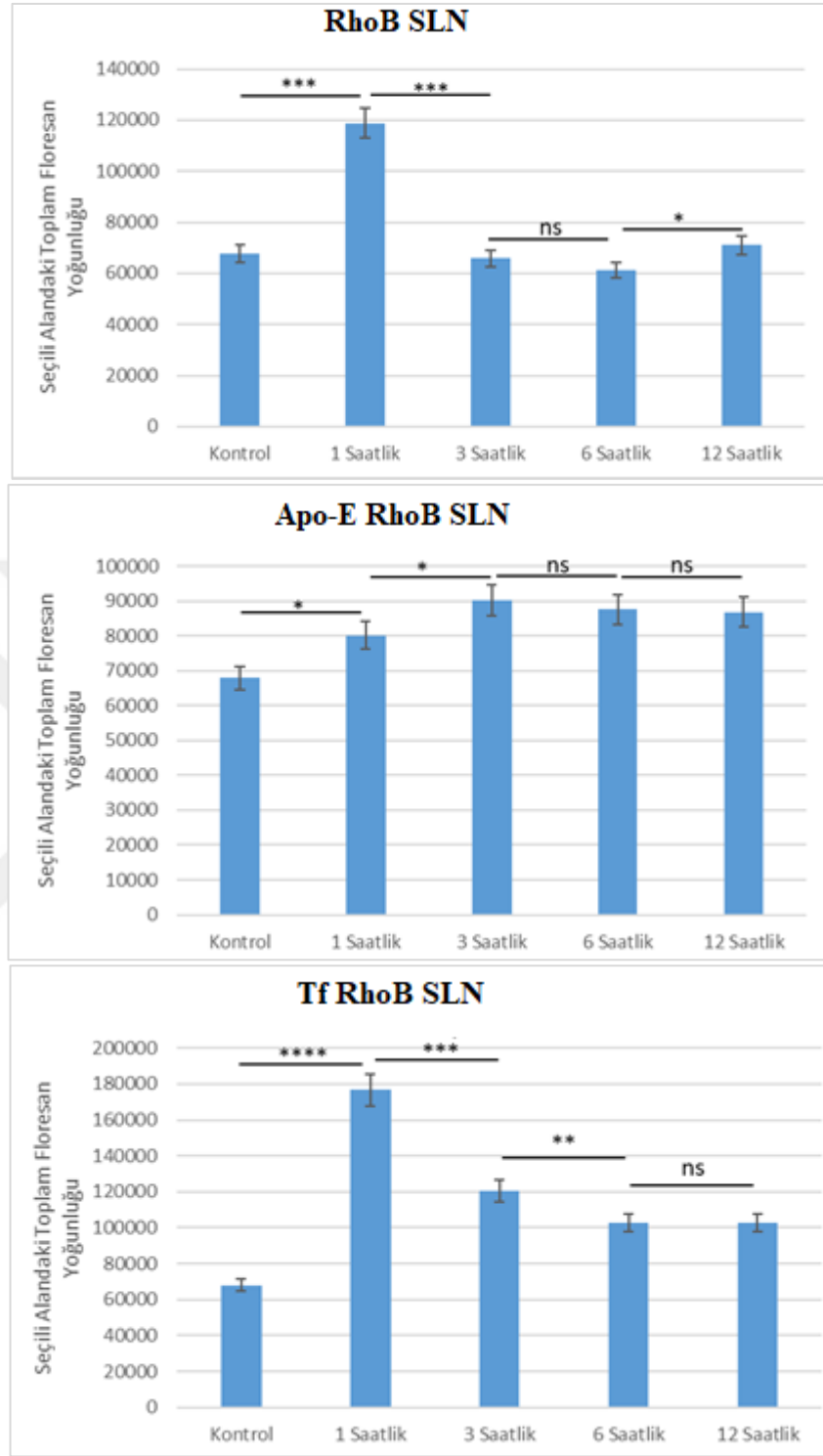
Zebra balıkları ile yürütülen in vivo çalışmalarda balıklara sırasıyla Rhodamin B yüklü hedeflendirilmemiş SLN (RhoB SLN), Rhodamin B yüklü Apo-E ile hedefli SLN (Apo-E RhoB SLN) ve Rhodamin B yüklü Tf ile hedefli (Tf RhoB SLN) uygulanmıştır ve elde edilen görüntüler Şekil 3.57'de verilmiştir.

Bu görüntülerin çekimi sırasında ölçülen floresan yoğunlukları grafiğe geçirilmiş ve Şekil 3.58'deki grafikler elde edilmiştir. Belirtilen formülasyonlar uygulandıktan sonra Şekil 3.57'de elde edilen görüntülerdeki kutucukla gösterilen alanların floresan yoğunluk ölçümü “ImageJ” programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu grafiklere göre hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş formüllerin beyine geçiş karşılaştırması yapıldığında, hedefli formüllerin floresan yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmektedir. Bunların arasında da Tf ile modifiye edilen formülasyonun daha fazla beyne geçtiği açıkça görülmektedir.





Şekil 3.59. SLN'lerin zebra balıklarına uygulanmasının ardından elde edilen görüntüler a) RhoB SLN b) Apo-E RhoB SLN c) Tf RhoB SLN.



Şekil 3.60. Beyine geçiş çalışmasında elde edilen floresan yoğunlukları (ns: not significant-anlamalı fark yoktur).

4. TARTIŞMA

4.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine İncelemeler

4.1.1. Humanin ve Donepezil HCl'in FTIR Spektrumu

Çalışmamızda etken madde olarak AH 'nin günümüzde tedavisinde kullanılan Donepezil HCl ve AH'de etkinliği kanıtlanmış bir nöroprotektif peptit olan Humanin kullanılmıştır. FTIR spektroskopisi ile bu etken maddelerin tanımlaması yapılmıştır.

Donepezil HCl'in FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum Şekil 3.1'de görülmektedir. Donepezil HCl FTIR spektrumunda 3583, 3004, 2942, 1681 ve 1589 cm^{-1} civarlarında görülen pikler donepezil HCl'e ait karakteristik fonksiyonel grup pikleridir ve literatürle uyumludur (Chuong ve ark., 2018; Md ve ark., 2014). Çalışmamızda elde ettiğimiz Donepezil HCl'e ait FTIR spektrumunda literatür ile uyumlu olarak 3583 cm^{-1} civarı su hidrasyonu, 3004 cm^{-1} civarında aromatik CH grubu gerilim vibrasyonu kaynaklı pik, 2942 cm^{-1} civarı alifatik CH_2 piki, 1681 cm^{-1} civarı karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$), 1589 cm^{-1} civarı aromatik $\text{C}=\text{C}$ grubu gerilim vibrasyonu görülmektedir.

Humanin'e ait FTIR spektrumu Şekil 3.2'de görülmektedir. FTIR spektroskopisi CD ve NMR gibi yöntemler kadar ayrıntılı olmasa da proteinlerin sekonder yapısı ile ilgili fikir vermektedir ve sekonder yapı analizi için kullanılmaktadır (Bunaciu ve ark., 2014). Proteinlerin sekonder yapı analizinde amit I ve amit II bantları genellikle kullanılmaktadır. Bunlar, amino asitleri birbirine bağlayan amit bağlarından kaynaklanır. Amit I bandı ile ilişkili absorpsiyon, amidin $\text{C}=\text{O}$ bağının gerilme titreşimlerine yol açar, amit II bandı ile ilişkili absorpsiyon, esas olarak N-H bağının bükülme titreşimlerine yol açar. Hem $\text{C}=\text{O}$, hem de N-H bağları, ikincil yapının farklı elemanları arasında gerçekleşen hidrojen bağına dahil olduğundan, hem amit I hem de amit II bantlarının konumları bir proteinin ikincil yapı

içeriğine duyarlıdır (Gallagher, 2009). 1600-1700 cm^{-1} civarında absorpsiyon veren amit I vibrasyonu esas olarak C=O gerilim vibrasyonundan kaynaklanmaktadır (Barth, 2007). Humanin FTIR spektrumuna bakıldığında, 1625 cm^{-1} 'de amit I bölgesine ait karakteristik pikin yer alması α -heliks yapısına sahip olduğunu ve sekonder yapısını koruduğunu göstermektedir. 3278 cm^{-1} 'de yer alan pik N-H gerilim vibrasyonu nedeniyle oluşan piktir (Kong ve Yu, 2007), 1522 cm^{-1} 'de yer alan pik ise amit II bölgesine ait bir piktir (Bunaciu ve ark., 2014).

4.1.2. Humanin ve Donepezil HCL'in DSC Analizi

Donepezil HCl'in DSC termogramında 218,88 °C'de Şekil 3.3'de görülen endotermik pik maddenin erime noktasını ifade etmekte olup, bu değer literatür verileriyle benzerdir (Chuong ve ark., 2018; Guo ve ark., 2015).

Benzer şekilde Humanin için Şekil 3.4'de görülen DSC termogramında 166,89 °C'de görülen endotermik pik maddenin erime noktasını ifade etmekte olduğu düşünülmektedir.

4.1.3. Donepezil HCL'in UV Spektrumu

UV analizi sonucunda Donepezil HCL ile hazırlanacak olan formüllerden etken madde çıkışı incelemeleri için kullanılan pH 7,4 fosfat-salin tamponu ve miktar tayininin saptanabilmesi için kullanılan distile su ortamı içinde 270 nm olarak saptanan λ max değerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Kafkale ve ark., 2008; Liew ve ark., 2012; Yasir ve Sara, 2014). Literatürde benzer şekilde araştırmacıların Donepezil HCl ile çalışırken 270 nm dalga boyunda analiz yaptıkları bulunmuştur.

4.1.4. Miktar Tayininin ve Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi

4.1.4.1. Humanin İçin Miktar Tayininin Değerlendirilmesi

Humanin için floresan spektrometrisi ile yapılan miktar tayinine ait yardımcı çözelti kullanılarak hazırlanan distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin 1'e yakın ve standart hata değerlerinin düşük olması, okunan absorbanlardan bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olacağını göstermiştir.

Çoğu araştırmacı kolay ve ucuz bir yöntem olması nedeniyle floresan spektrometrisi ile ölçümlerde kalibrasyon doğruları kullanarak analit konsantrasyonu ile floresan yoğunluğunu ilişkilendirmişlerdir (DeRose, 2008). Ölçümler her seferinde Humanin'in çözeltisinin belirli konsantrasyondaki bir seri çözeltisi hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Önce konsantrasyonu belli Humanin çözeltilerinin floresanları cihazda okunmuş, daha sonra miktar tayini için numunenin floresanı ölçülmüştür. Her seferinde yeniden kalibrasyon denklemi oluşturulup buna göre miktar tayini yapılmıştır. Dolayısıyla Humanin'e ait analitik yonteme dair bir validasyon yapmak yerine her ölçüm için ayrıca kalibrasyon serisi hazırlanması ve bu optimize edilmiş olan doğrusal çalışma aralığında ölçüm yapılması nedeniyle validasyon yapma gereği ortadan kaldırılmıştır. Ayrıca her ölçümde kullanılan floresan mikropalaklarından kaynaklanacak farklılıkların oluşturacağı değişkenlerde, her ölçümde, o mikropalakada yapılan kalibrasyon serisinin oluşturulması ile ortadan kaldırılmıştır. Bunun yanında her ölçümde mikropalakdaki en düşük floresan yoğunluğu veren kuyucuğa göre cihaz kendini ayarlamaktadır ve bu değer değiştiğinde cihazın örnek için verdiği floresan verisi değişmektedir. Her seferinde kalibrasyon yapılarak cihazın bu özelliğinden dolayı oluşabilecek bir hatayı ortadan kaldırmak amaçlanmıştır.

4.1.4.2. Donepezil HCl'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayininin ve Yöntemin Validasyonunun Değerlendirilmesi

Donepezil HCl'in UV absorbanısı 270 nm olarak bulunduktan sonra etken maddenin distile su pH 7,4 fosfat-salin tamponundan elde edilen kalibrasyon doğrularının r^2 değerlerinin 1'e yakın ve bunun yanı sıra standart hata değerlerinin düşük olması, okunan absorbanılardan bulunan konsantrasyon verilerinin güvenilir sonuçlar olacağını göstermiştir.

Donepezil HCl'in kalibrasyonun validasyonu amacı ile HPLC analizi sonucu elde edilen değerler sonucunda doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik) teşhis sınırı, tayin sınırı, doğrusallık ve seçicilik parametreleri incelenmiştir. Analitik yönteminin validasyonuna ilişkin olarak incelenen parametrelerden, doğrusallık ve aralığı deneyi sonucunda her bir ortam için elde edilen doğrulara ait r^2 değerlerinin yüksek ve regresyondan sapma standart hatasının düşük olması, elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 ve 3.9'da yer alan doğruluk ve tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik gibi kesinlik parametreleri sonucunda elde edilen verilere ait bağıl sapma değerlerinin %2'nin altında olması, kalibrasyon denkleminin doğru ve kesin sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Donepezil HCl'in distile su ve pH 7,4 fosfat-salin tamponundaki miktar tayini yöntemi için belirlenen teşhis ve tayin sınırları (Çizelge 3.10) doğrusallık aralığını oluşturan alt sınırın aşağısında yer almaktadır. Bu durum etken maddenin tayin edilebildiği sınırlar içerisinde çalıştığımızı kanıtlamaktadır. HPLC analizi sonucunda etken madde ile girişim yapmaması yöntemin etken maddemiz için seçici olduğunu doğrulamıştır.

4.2. SLN Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

SLN formülasyonlarının hazırlanmasında homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem SLN hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bir üretim metodudur (Duong ve ark., 2020). Hazırlanacak olan katı lipit nanopartiküllerde hedef ürüne ulaşabilmek için öncelikle Çizele 2.3’de bulunan kritik parametreler belirlenmiştir ve bu parametreleri sağlamaya yönelik formülasyon çalışmaları yapılması planlanmıştır. Kritik parametreler belirlenirken formülasyon hedeflerimiz göz önünde bulundurulmuştur. Üretilcek nanopartiküllerin beyine uygulanacağı dikkate alınarak belirli partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesi için, kaynaklar uygun üretim yöntemi açısından taranmıştır. Nanopartiküllerin üretimi için Küçüktürkmen ve Bozkır’ın 2018’de yapmış olduğu çalışma esas alınarak, bu yöntem laboratuvar şartlarımıza göre modifiye edilmiş ve homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi kullanılmıştır.

Etken maddelerin beyine geçişi için SLN formülasyonlarının partikül boyutunun 200 nm’den küçük olması, kan dolaşımında daha uzun süre kalması ve kan beyin engeli ile temas süresinin artması nedeniyle avantajlı bulunmuştur (Kaur ve ark., 2008; Nguyen ve ark., 2017). Bu nedenle partikül boyutunda amacımız 200 nm ve altı olmuştur.

Polidispersite indeksinin (PI) küçük olması, partiküllerin benzer boyutlara sahip olduğunu ve sistemin bu açıdan homojen olduğunu ifade etmektedir ve çoğu araştırmacı SLN’ler için 0,3’ten küçük PDI değerlerini uygun kabul eder (Das ve Chaudhury, 2011); buradan yola çıkarak SLN PDI değeri 0,3’ten küçük tutulmaya çalışılmıştır.

Genel olarak, $\pm 30\text{mV}$ ’den büyük zeta potansiyeline sahip partikülleri daha stabil olduğu bulunmuştur (Jain ve Thareja, 2019). Zeta potansiyelinde bu değere dikkat edilmiştir.

4.2.1. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN’lerde Ön Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

SLN’lerin hazırlanmasında öncelikle emülsiyon oluşumu dikkate alınmıştır. Bu amaçla farklı lipidler, farklı sulu ortamlar, değişik karıştırma ve sonikasyon süreleri ve etken maddenin değişik fazlara eklendiği formülasyonlar denenmiştir.

Farklı yağlar ile yapılan çalışmalarda İmwitor K900 ile belirtilen tüm bu parametrelerde emülsiyon oluşmamıştır ve bu lipid ön formülasyon çalışmalarında bu nedenle elenmiştir.

Compritol, Dynasan 114, Dynasan 116 ve Precirol ile hazırlanan SLN’lerde etken maddenin yağ fazına ve su fazına ayrı ayrı katıldığı formülasyonlarda, Donepezil HCl’in yağ fazına eklenerek formülasyon hazırlanması ile belirgin şekilde enkapsülasyon etkinliğini değiştirmiştir ($p<0,05$). 2018’de yapılan SLN formülasyonuna yönelik bir çalışmada etken madde benzer şekilde yağ fazına direk eklenmiş ve yüksek enkapsülasyon sonuçlarına ulaşılmıştır (Doktorovova ve ark., 2018). Benzer üretim yönteminin kullanıldığı çalışmalarda etken maddenin direkt yağ fazında disperse edilerek formülasyonların hazırlanması literatür taramasında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Chalikwar ve ark., 2012; Guo ve ark., 2018; Vakilinezhad ve ark., 2018). Bu partiküllerin boyutları ve dağılımları ve zeta potansiyelleri incelendiğinde çoğunlukla kabul edilebilir ya da geliştirilebilir formülasyonlar olduğu düşünülmüştür.

Yapılan literatür taramasında Donepezil HCl’in pH’ya bağlı çözünürlük durumu olduğu belirlenmiştir (Daldal ve ark., 2017). Donepezil HCl zayıf bir bazdır ve yüksek pH’da serbest baz formu halini alır. Bu nedenle Donepezil sulu çözeltilerinde pH’nın düşürülmesi iyonize olan etken madde fraksiyonunun artmasına neden olacağından çözünürlüğü artıracaktır (Ruela ve ark., 2015). Çizelge 3.12 incelendiğinde pH 9,0 baz tamponunda enkapsülasyon etkinliğinin diğer ortamlara göre bariz şekilde yüksek olduğu görülmektedir. Bu da yukarıdaki durumu desteklemektedir. Baz ortamda Donepezil HCl’in çözünürlüğü azalacağından, SLN

içine yüklediğimiz etken madde su fazına geçmeyi tercih etmeyecektir ve partikül içinde kalmaya devam edecektir. Bu durum enkapsülasyon etkinliğinin artışı ile sonuçlanır. Bu nedenle bundan sonraki formülasyonlarda su fazı olarak pH 9,0 tamponu kullanılmıştır.

Karıştırma süresi ve sonikasyon süresi partikül boyutu ve dağılımına etki eden önemli parametrelerdir. Bu nedenle değişik süreler kullanılarak denemeler yapılmıştır. Karıştırma süresinin düşmesiyle özellikle PDI'de anlamlı şekilde bir düşüş görülmüştür ($p < 0,05$). Enkapsülasyon etkinlikleri hala yüksektir. Partikül boyutlarında ise değişim gözlenirse de, bizim istediğimiz boyutta bir farklılık yaratmamıştır. PDI'nın 0,3'ten düşük olması istediğimiz bir durumdur (Das ve Chaudhury, 2011); bu nedenle 5 dk karıştırma süresi ile formülasyonlara devam edilmiştir.

2, 5 ve 10 dk'lık sonikasyon süreleri uygulanan formüller incelendiğinde ise partikül boyutlarındaki değişim belirgin şekilde Çizelge 3.13'ten görülebilmektedir. Sonikasyon sırasında oluşan enerji partikül boyutunu küçültmektedir; ancak açığa çıkan ısı işlem süresi uzadıkça artar ve SLN'lerde yağın sıcaklıktan dolayı değişimine neden olabilir; bu durum da partikülde olumsuz değişime yol açabilir. Küçük partiküller birbirine yapışıp daha büyük partiküllere dönüşebilirler (Siddiqui ve ark., 2013). Bu nedenle bu sürenin ayarlanması önemlidir. 2 dk'dan 5 dk'ya ve 10 dk'ya süre uzatıldığında özellikle Dynsan 116 ile yapılan formülasyonda belirgin şekilde partikül boyutunda düşüş gözlenmiştir ($p < 0,05$). Siddiqui ve ark. (2013), yaptıkları benzer bir çalışmada SLN üretimi sırasında sonikasyon süreleri 5-15 dk arasında uygulanmış ve süre uzadığında partikül boyutunun azaldığı edildiği tespit edilmiştir. Das ve ark. (2011) Precirol SLN'lerin hazırlanmasına ilişkin yaptığı çalışmada sonikasyon süresi 1 dk'dan 10 dk'ya uzadığında partikül büyüklüğü sırasıyla 322,9 nm'den 113,5 nm'ye, PDI ise 0,55'ten 0,18'e düşmüştür (Das ve ark., 2011).

Yapılan bu ön formülasyon çalışmaları sonucunda en iyi verilerin ÖF33 kodlu formül ile elde edildiği bulunmuş ve Donepezil HCl yüklü SLN formülasyon çalışmalarına bu formülasyon ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2.2. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

4.2.2.1.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Yağ Konsantrasyonunun Etkisi

Yağ konsantrasyonunun değişmesi etken maddenin çözünen miktarına etki edeceği için enkapsülasyon etkinliği açısından önemlidir; ancak konsantrasyon değiştirilirken partikül büyüklüğü ve dağılımı göz önünde bulundurulmalıdır; çünkü yağ konsantrasyonundaki değişim genel olarak partikül boyutunun büyümesi ile sonuçlanır. Çizelge 3.15'den görülebileceği gibi partikül boyutu ve dağılımı lipit konsantrasyonunun %1 (a/h)'den %2 (a/h) ve %4 (a/h)'e artmasıyla büyümüştür. Partiküller nano boyuttan mikron boyutuna geçmiştir. Zeta potansiyelinde küçük değişiklikler görülmektedir ($p<0,0001$). Enkapsülasyon etkinliği partiküllerin mikron boyutunda olmasından ve amacımızı sağlamamasından ötürü incelenmemiştir. %1 (a/h) konsantrasyonda sonuçların daha iyi olmasından dolayı, DF1 formülü ile devam edilmiştir. Martins ve arkadaşları'nın 2012'de yapmış olduğu çalışmada setil palmitat ve trimiristin ile farklı yağ konsantrasyonlarında SLN'ler hazırlanmış ve her iki lipitle de hazırlanan SLN'ler için, lipit konsantrasyonu arttıkça partikül büyüklerinin arttığı bulunmuştur. Setil palmitat ile hazırlanan SLN'ler için partikül boyutu yağ konsantrasyonunun %5 (a/a)'den %15 (a/a)'e artmasıyla 188,27 nm'den 303,7 nm'ye; trimiristin ile hazırlanan SLN'lerde ise 223,75 nm'den 299,10 nm'ye çıkmıştır (Martins,Costa-Lima ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada SLN'lerin lipit konsantrasyonu arttıkça PDI belirgin ölçüde artmıştır (Pooja ve ark., 2016). PDI lipit miktarının 100 mg'dan 120 mg'a çıkarılması ile 0,23'ten 0,3'e artmıştır.

4.2.2.2.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Su Fazı Hacminin Etkisi

Dış fazda kullanılan sulu faz hacmi karıştırma ve sonikasyonun etkinliğine tesir ederek partikül oluşumunu ve boyutu etkileyebilmektedir. Çizelge 3.16'da verilen sonuçlarda 10 ml'lik DF1 ve 50 ml'lik DF6 kodlu formüllerin bütün özellikleri arasında DF1 daha olumlu olacak şekilde anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Bu

durumun daha fazla olan su fazı hacmine karıştırma hızının/süresinin ve sonikasyon süresi ve gücünün yeterli olmadığı ve bu durumun partikül boyutu ve dağılımının büyümesine ve zeta potansiyelin düşmesine yol açtığı öngörülmüştür. Enkapsülasyon etkinliğindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı olsa da ihmal edilebilecek düzeydedir.

Daha küçük su fazı hacmine sahip olan DF5 kodlu formül ile DF1 kodlu formül karşılaştırıldığında ise DF5 kodlu formülde partikül boyutunun büyüdüğü ve zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü görülmektedir ($p<0,05$). Bu durum, formülasyonun oluşumu sırasında uygulanan sonikasyon gücü ve süresi ile alakalı olabilir; bu güç ve süre formülasyona fazla gelmiş olabilir ve açığa çıkan ısı ile partiküller bozulmuş ya da fazla oluşan enerjiden dolayı partiküller arasındaki etkileşim artmış ve bu da onları agregasyona meyilli hale getirmiş olabilir. Bu durum zeta potansiyelinin düşmesini açıklamaktadır. Ayrıca bütün bu nedenlerden dolayı partikül boyutu ve dağılımı büyüyebilir (Behbahani ve ark., 2017). Aynı zamanda etken madde miktarı bu yağ miktarı için fazla gelmiş ve etken madde yağ içerisinde düzgün bir şekilde disperse olamamış olabilir. Etken madde miktarı arttıkça partikül boyutu ve dağılımı artmaktadır (Yassin ve ark., 2013).

4.2.2.3.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Karıştırma Hızının Etkisi

Karıştırma hızı SLN'lerin oluşumuna ve de bununla bağlı olarak partikül boyutu ve dağılımı ve zeta potansiyeli üzerinde etkilidir. Homojenizasyon hızının azaltılması yağ damlacıklarının yeteri ölçüde kırılmamasına yol açabilir ve bu durum formülasyonda büyük partikül boyutu ve geniş dağılım aralığına neden olacak şekilde sonuçlanabilir (Siddiqui ve ark., 2013). Bu nedenle farklı karıştırma hızlarında (9600, 15000 ve 20000 rpm) üretimler yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.17'de karşılaştırılmıştır. 9600 rpm'de partikül boyutu $100,4\pm0,50$ ve PDI $0,13\pm0,01$ iken 20 000 rpm'de sırasıyla $102,0\pm0,55$ nm ve $0,19\pm0,01$ şeklindedir ($p<0,05$). 9600 rpm'de daha iyi sonuçlar elde edilmesi yukarıda belirtilen nedene bağlanmıştır. Priyanka ve arkadaşları'nın 2018'de yaptığı çalışmada gliseril monostearat SLN'lerinin hazırlanışı sırasında karıştırma hızı 15000 rpm'den 20000 rpm'e çıkardıklarında partikül boyutu ve dağılımı bundan etkilenmemiştir (Priyanka ve ark., 2018).

Karıştırma hızı yağın su fazı içerisinde emülsifikasyonunu etkilediğinden zeta potansiyeline etki edebilmektedir. Yüksek zeta potansiyeli elektriksel itmelerden dolayı partiküllerin agrege olmasını önler ve yüksek stabilite sağlar (Das ve ark., 2011). 9600 rpm kullanılan DF1 kodlu formülde zeta potansiyeli DF7 ve DF8 kodlu formüllere kıyasla daha yüksektir ($p<0,05$) ve bu durum yine DF1 kodlu formülü tercih sebebidir.

Enkapsülasyon etkinlikleri arasında küçük farklılıklar bulunmaktadır ($p<0,05$); ancak formülasyon seçimimizi etkileyecek bir farklılık değildir.

4.2.2.4. Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Etken Madde Miktarı ve Eklenişinin Etkisi

Etken madde miktarının genellikle partikül üzerine miktar arttıkça partikül büyümesi ile sonuçlanan bir etkisi vardır. Bu durum etken maddenin nanopartiküllerin çekirdeğine dahil edilmesinden kaynaklanıyor olabilir ve sonuçta artan partikül boyutu ile sonuçlanır (Behbahani ve ark., 2017). 10 mg etken madde içeren DF1, 2 mg etken madde içeren DF9 ve 5 mg etken madde içeren DF12 kodlu formüllerde etken madde yağ fazına direkt katı toz olarak katılmıştır ve Çizelge 3.18' den görülebileceği üzere yukarıda açıklanan durumun tersine en az etken madde içeren DF9 ile DF1 arasında partikül boyutu ve PDI açısından anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu durumda DF1'de kullanılan etken madde/yağ oranının partikül boyutunu değiştirmeye etkisi olmadığı, bu miktarın yağ tarafından tolere edilebildiği söylenebilir. Zeta potansiyelleri arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). DF1 kodlu formül stabilitesi daha iyidir. Enkapsülasyon etkinliği açısından DF1 ve DF9 arasında anlamlı fark bulunurken ($p>0,05$); DF1 ve DF12 arasında anlamlı fark yoktur. Enkapsülasyon etkinliği direkt olarak eklenen madde ile orantılıdır; bu nedenle 2 mg'dan 5 ve 10 mg'a artırıldığında, yükleme etkinliği de artmıştır; ancak her lipidin bir yükleme kapasitesi vardır ve bu maksimuma ulaştığında enkapsülasyon etkinliği artık yükselmeyecektir; bu durum fazla etken maddenin yüklenmemesine ve sulu fazda kalmasına neden olur

(Das ve ark., 2011). DF1 ve DF12 arasında enkapsülasyon açısından anlamlı fark bulunmaması bu şekilde açıklanabilir.

Etken maddenin çözelti şeklinde yağ fazına katılmasının partikül boyutunu ve enkapsülasyon etkinliğini etkileyebileceği öngörülmüştür ve sonuçlar beklenen şekilde çıkmıştır. DF10 ve D11 kodlu formüller DF9 kodlu formülle karşılaştırıldığında PDI hariç bütün değerlerde anlamlı farklılık olmuştur ve partikül boyutu ve zeta potansiyeli değeri düşerken enkapsülasyon etkinliği yükselmiştir ($p<0,05$). Etken maddenin çözelti halinde katılması, onun yağ içinde daha kolay dispers olmasını ve bu nedenle partikül büyüklüğünde düşüşe yol açmasını sağlamış olabilir. Zeta potansiyeli oldukça düşmüştür ($p<0,05$). DF9 kodlu formül bu açıdan daha stabil gözükmektedir. DF10 kodlu formülde enkapsülasyon etkinliği oldukça yüksektir ($p<0,05$). Gliserin çözeltisi-yağ arasındaki etkileşimden kaynaklı yükselmiş olabileceği öngörülmüştür. Yapılan bir çalışmada partiküllerin hazırlanması sırasında formülasyona gliserin eklenmiş ve değişen viskoziteden dolayı emülsiyon oluşumu sırasında yağ-su fazı arasındaki difüzyon hızının değişmesinden dolayı partikül boyutunun azaldığı belirtilmiştir (Shahgaldian ve ark., 2003).

4.2.2.5.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Lesitin Etkisi

Lesitin SLN'lerde yardımcı sürfaktan olarak katılmaktadır ve iç faz sürfaktanı gibi davranır; partikül boyutuna ve stabilizeye olumlu etkisi bulunmaktadır (Pooja ve ark., 2016). DF1 ve DF13, DF14 formülleri karşılaştırıldığında lesitin içeren DF13 ve DF14 formüllerinde partikül boyutunun belirgin şekilde düştüğü ve enkapsülasyon etkinliğinin arttığı görülmektedir ($p<0,05$). PDI ve zeta potansiyeli lesitinden olumsuz etkilenmiştir ($p<0,05$). Benzer sonucu Liu ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada elde etmişlerdir. Hazırlamış oldukları Precirol SLN'lerde lesitin partikül boyutunu düşürmüş (42,7 nm'den 37,33 nm'ye) ve enkapsülasyon etkinliğini artırmıştır (%82,62'den %95,59'a). Lesitin amforetik yapısı nedeniyle etken maddenin yağdaki çözünürlüğünü artmış olabilir; bu durum enkapsülasyon etkinliğini olumlu etkileyecektir, elde ettiğimiz sonuç bu tahmini desteklemektedir.

4.2.2.6.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Farklı Sürfaktanların Etkisi

SLN'ler katı lipitlerin sulu faz içinde sürfaktanlar vasıtasıyla stabilize edildiği ve oluşturulduğu kolloidal sistemlerdir. Bu nedenle sürfaktan seçimi çok önemlidir (Gupta ve ark., 2017). Bu amaçla su fazına ve yağ fazına farklı sürfaktanlar eklenerek SLN'ler değerlendirilmiştir.

Sürfaktan tipi etkisine literatürde bakıldığında genel eğilim polisorbhatların (Tween 80) poloksamerlerden (Pluronic F68) daha küçük partikül boyutuna sahip SLN'ler oluşturduğu yönündedir (Martins ve ark., 2012). Pluronic F68 (Poloksamer 188) ile hazırlanan DF15 ve DF19 kodlu formüllerde diğer formüllere kıyasla partikül boyutundaki büyüme belirgin şekilde görülmektedir ($p<0,05$). Martins ve arkadaşları 2012'de yapmış oldukları çalışmada setil palmitat ile hazırlanan SLN'lerde benzer bir sonuç elde etmiştir. Setil palmitat SLN'lerde Tween 80 kullanılan SLN'lerde partikül boyutu 181,5 nm iken, Pluronic F68 ile hazırlanan SLN'lerde partikül boyutu 216,4 nm olarak kaydedilmiştir ve PDI'larda belirgin bir değişim gözlenmemiştir. DF1 ve DF15 kodlu formüllerin enkapsülasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olmuştur ($p<0,05$). Bu artışın partikül boyutunun büyümesi nedeniyle içerisine yüklenen etken madde miktarının fazla olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür. DF1 kodlu formülün zeta potansiyeli daha yüksektir; yapısında Tween 80 olan formüllerde genel olarak zeta potansiyelinin daha yüksek olduğu Çizelge 3.20'den görülebilmektedir; Tween 80 partiküllere daha iyi bir stabilite sağlamaktadır.

PVA ile hazırlanan DF16 kodlu formülde partikül boyutu küçük olsa da PDI çok büyümüştür ($p<0,05$) ve enkapsülasyon etkinliğinde düşme gözlenmiştir ($p<0,05$). PVA ile hazırlanan partiküllerde partikül oluşum aşamasında homojenizasyon sırasında PVA emülsiyon damlacıklarının çevresine absorbe olmaktadır ve spontan damlacık oluşumu mikron aralığında partikül oluşumu ile sonlanır. Lipidin ve etken maddenin azalan çözünürlüğü ile ara yüzeyde etken madde içeren emülsiyon damlacıkları oluşur (Hu ve ark., 2002). Bu oluşumun hızından dolayı bu aşamada etken maddenin sulu faza kaçtığı ve bu nedenle enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü düşünülmüştür. Ayrıca PDI yüksek olmasından kaynaklı bu aşamada oluşan sub-

mikron düzeydeki partiküllere uygulanan sonikasyonun yeterli olmadığı sonucu çıkarılmıştır. Zeta potansiyeli DF1 kodlu formül ile çok yakındır.

Yağ fazına Arlacel-C eklenen formülasyonlarda ise partikül boyutunda büyüme ve enkapsülasyon etkinliğinde düşme gözlenmiştir ($p<0,05$). Arlacel-C etken maddelerin enkapsülasyonu için kullanılan HLB değeri 11 olan hidrofilik bir sürfaktandır (Küçüktürkmen ve ark., 2017). Bu sürfaktanın formülasyona katılması etken maddenin su fazındaki çözünürlüğünü artırmış ve bu nedenle etken maddenin su fazına kaçmasını sağlamış olabilir. Enkapsülasyon etkinliğindeki düşüş bu şekilde açıklanabilir.

4.2.2.7.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Sürfaktan Miktarının Etkisi

Sürfaktan konsantrasyonu partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerine etkisi oldukça büyüktür. Çizelge 3.21 incelendiğinde partikül boyutu sürfaktan miktarı artmasıyla düşmektedir ($p<0,05$). Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da bulunmuştur (Hu ve ark., 2004; Liu ve ark., 2007). PDI incelendiğinde 200 mg'a kadar partikül boyutundaki benzer sonuçla karşılaşılmıştır ve PDI düşmüştür ($p<0,05$). Bu sonuç yüksek konsantrasyondaki sürfaktanla üretimin küçük ve daha stabil partiküller oluşturduğunu göstermektedir, bu durum nanodamlacıkları stabilize etmeye yeterli sürfaktanın ortamda bulunması nedeniyle meydana gelmiş olabilir. Düşük miktardaki sürfaktan damlacıkların çevresini yeterince iyi kaplayamaz ve bu durum partiküllerin agregasyonuna yol açar (Pooja ve ark., 2016). Bu sonucun tersine 250 mg ve 300 mg'da PDI tekrar yükselmiştir. Benzer sonucu Das ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada bulmuşlardır. Sürfaktan miktarının artması ile belli bir konsantrasyona kadar partikül büyüklüğü ve dağılımı düşmüş; daha sonra tekrar yükselmiştir.

Sırasıyla 150 mg ve 200 mg Tween 80 içeren DF21 ve DF22 kodlu formüllerde zeta potansiyeli daha yüksektir; bu durum bu formüllerin daha stabil olduğunu düşündürmüştür.

Genel olarak bütün formülasyonlarda enkapsülasyon etkinlikleri yüksektir. Bu durum ortamda yeterli derecede bulunan sürfaktanın, etken maddenin lipit partikülde veya partikül yüzeyinde kalmasına yardımcı olmasından kaynaklanmış olabilir. 300 mg Tween 80 içeren formülasyonda her ne kadar enkapsülasyon etkinliği anlamlı şekilde yükselmiş olsa da, fazla Tween 80 konsantrasyonu toksisiteye neden olabilir (Pooja ve ark., 2016).

4.2.2.8.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Sürfaktan Miktarı Değiştikten Sonra Karıştırma Hızının Etkisi

Çizelge 3.22'de 150 mg Tween 80 kullanılmaya başlandıktan sonra farklı karıştırma hızlarıyla hazırlanan partiküllere ait veriler görülmektedir ve 9600 rpm'den 20000 rpm'e çıkıldığında partikül boyutunda anlamlı şekilde düşme görülmüştür ($p<0,05$). PDI değerleri karşılaştırıldığında yine en düşük PDI en yüksek karıştırma hızıyla çalışılan formül olan DF26'ya aittir. Pooja ve arkadaşları 2016'da yaptıkları çalışmada benzer bir sonuçla karşılaşmışlardır. Karıştırma hızı arttıkça partikül boyutunda küçülme görülmüştür.

DF25 kodlu formülün zeta potansiyeli anlamlı şekilde diğer formülasyonlara göre yüksektir ($p<0,05$). Enkapsülasyon etkinliği ise DF26 kodlu formülde oldukça yüksektir ($p<0,05$).

4.2.2.9.Donepezil HCl ile Hazırlanan SLN'lere Sonikasyon Süresinin Etkisi

Sonikasyon süresi daha önce de belirtildiği gibi partikül boyutu ve dağılımına etki eden en önemli formülasyon parametrelerinden birisidir. Genellikle sonikasyon süresi uzadıkça partikül büyüklüğü ve dağılımı azalmaktadır. Bu beklenen bir durumdur; çünkü sonikasyon kaba emülsiyon damlacıklarını kırarak emülsiyonu nanoemülsiyona çevirir ki bu durumda partikül boyutu ve dağılımında azalmaya yol açar (Das ve ark., 2011). Çizelge 3.23 incelendiğinde belirtilen durumla uyumlu olarak sonikasyon süresinin uzaması ile partikül boyutu ve PDI azalmıştır ($p<0,05$). Das ve

ark. (2011), yaptıkları çalışmada Precirol SLN'lerin üretimi sırasında 1 dk'dan 10 dk'ya sonikasyon süresinin uzamasıyla partikül boyutunun 322,9 nm'den 113,5 nm'ye geldiğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada PDI'de benzer şekilde 0,41'den 0,18'e düşmüştür.

Bu formülasyonların zeta potansiyelleri birbirine çok benzerdir ve DF26, DF27 ve DF28 formüllerine ait zeta potansiyelleri arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Priyanka ve ark. (2016), benzer şekilde aynı sonucu bulmuşlardır ve sonikasyon süresinin zeta potansiyelini fazla etkilemediğini belirtmişlerdir.

DF26 formülasyonun enkapsülasyon etkinliği anlamlı olarak diğer formülasyonlardan farklıdır ($p<0,05$) ve daha yüksektir.

4.2.3. Humanin ile Hazırlanan SLN Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

Humanin ile yapılan ön formülasyon çalışmalarında formüllerde, beklemeyle ya da üretimin hemen ardından Humanin'de çökmesinin gözlemlenmesinden ötürü çalışmalara ÖHF13 ile devam edilmiş ve formülasyon tablosunda HF1 olarak kodlanmıştır.

HF1, HF2 ve HF3 kodlu formüllerde sırasıyla 10 dk, 2 dk ve 5 dk gibi farklı sonikasyon süreleri uygulanmıştır. 2 dk sonikasyon süresi uygulanan HF2 kodlu formülden 5 dk sonikasyon uygulanan HF3 kodlu formüle geçildiğinde partikül boyutunda ve PDI'da anlamlı şekilde azalma olurken zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğinde ise anlamlı artış olmuştur ($p<0,05$). Sonikasyon süresi ile partikül büyüklüğü ve dağılımının ilişkili olduğu Donepezil HCl ile hazırlanan formüllerde de gözlenmiş ve açıklanmıştır (Bölüm 4.2.1. ve 4.2.2.9). Sonikasyon ile emülsiyondaki damlacıklar kırılır ve nano damlacıklar içeren bir emülsiyona dönüşür (Das ve ark., 2011); ancak süre uzadıkça partiküllerin birbiri ile olan etkileşimi artarak agregasyon eğilimine girebilirler; bu da boyutta büyümeye yol açar. Behbahani ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada benzer bir durumla karşılaşmışlardır. HF1 kodlu 10 dk

sonikasyon uygulanan formülasyonda partikül boyutunun büyümesi bu şekilde açıklanabilir. Her üç formülünde enkapsülasyon etkinliği oldukça yüksektir. Zeta potansiyeli ise çalışılmaya devam edilecek olan HF3 kodlu formülde daha yüksektir ($-20,3 \pm 0,61$). Bu formülde diğerlerine göre formül stabilitesi daha yüksektir diyebiliriz ($p < 0,05$).

Donepezil HCl çözeltisinde kullanılan dış ortam olan pH 9,0 tamponu ile hazırlanan formülyonda partikül boyutunda anlamlı bir artış olmuştur ($p < 0,05$). Zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve PDI'da anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

HF3 ve HF5 kodlu karıştırma süreleri farklı formülasyonlardan HF5' de partikül boyutu ve dağılımı oldukça büyümüştür ($p < 0,05$). Karıştırma süresi SLN oluşumu ile ilgilidir. Behbahani ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada SLN'leri hazırlarken 4 ve 8 dk karıştırma süresi uygulamış, 4 dk'da 132 nm; 8 dk'da ise 104 nm boyut elde etmişler ve süre enkapsülasyon etkinliğine etki etmemiştir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile bu durum uyumludur.

HF6 formülasyonunda Humanin'in çözündüğü bir ortam olan gliserin ile çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti yağ fazına eklenerek formülasyon hazırlanmıştır; ancak formülasyonda çökme olması nedeniyle formülasyon parametreleri incelenememiştir.

Karıştırma hızı 20000 rpm'e çıkarılan HF7 formülünde partikül boyutu ve dağılımı düşmüştür ($p < 0,05$). Homojenizasyon hızının artırılması yağ damlacıklarının kırılmasına ve partikül boyutu ve geniş dağılım aralığına neden olur (Siddiqui ve ark., 2013). Bu nedenle elde ettiğimiz sonuç anlamlıdır. Zeta potansiyeli anlamlı bir değişme olmamıştır.

Lipit konsantrasyonu SLN'in birçok özelliğine etki etmektedir. Konsantrasyon %1 (a/h)'den (HF7) %2 (a/h)'ye (HF8) çıkarıldığında partikül boyutu ve dağılımı oldukça artmıştır ($p < 0,05$). Lipit konsantrasyonu arttıkça genellikle partikül boyutu

büyür ve enkapsülasyon etkinliği artar (Martins ve ark., 2012). Bu durum bizim sonuçlarımızla uyumludur. Lipit konsantrasyonu arttıkça karıştırma ve sonikasyon gücü yeterli gelmeyip partikül boyutu ve dağılımında büyümeye yol açabilir. Etken maddenin dağıtıldığı yağ miktarının artırılması enkapsülasyon etkinliğinin yükselmesiyle sonuçlanmış olabilir.

Sulu faz olarak saf suyun kullanıldığı formülasyon olan HF9’da enkapsülasyon etkinliği anlamlı şekilde artmıştır ($p<0,05$). Bu durum etken maddenin tamponda ve sudaki çözünürlük farkından kaynaklanmış olabilir. Etken madde ile yapılan ön çalışmalarda etken maddenin pH 7,4 tamponunda sudan daha fazla çözündüğü bulunmuştur. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli anlamlı şekilde düşmüş ($p<0,05$); ancak PDI’da bir farklılık olmamıştır. Bu durum ortamın değişmesiyle sürfaktan çözünürlüğünün değişmesinden kaynaklanmış olabilir; değişen sürfaktan konsantrasyonu partikül boyutunu küçültmüş olabilir.

4.3. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerden etken maddenin çıkışı başarılı bir formülasyon için önemli parametrelerden bir tanesidir. Diyaliz membran yöntemi SLN’lerden etken madde çıkışının gözlenmesi için en çok kullanılan salım yöntemlerinden birisidir (D’Souza, 2014). Partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği sonuçlarına göre uygun formülasyon adayı olabileceği düşünülen DF1, DF10, DF13, DF14, DF26, HF3 ve HF9 kodlu formüllerde ve Donepezil HCl ve Humanin saf hallerinde (1 mg) in vitro salım çalışmaları yürütülmüş ve sonuçlar Şekil 3.27 ve Şekil 3.28’de verilmiştir.

DF1, DF10, DF13 ve DF14 kodlu formüllerde 96 saat sonundaki etken madde salımı sırasıyla %9,29, %8,79, %12,37 ve %12,63’tür. Bu formülasyonlarda 10. saatten sonra salımda çok fazla değişiklik olmamış ve salım hızı sabit duruma ulaşmıştır (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28).

DF1 ve DF26 kodlu formüller karşılaştırıldığında Tween 80 miktarının artması sudaki çözünürlüğü artırarak DF26 kodlu formülde salım hızını DF1'e göre artırmış olabilir.

DF13 ve DF14 kodlu lesitin içeren formüllerde ise lesitin amfoterik yapısından dolayı (Szuhaaj, 2003) etken maddenin yağdaki çözünürlüğü artırmış ve lipit matriks içinde kalmaya eğilimi artmış olabilir; bu durumun salımın yavaşlamasına neden olduğu elde edilen sonuçtan anlaşılmaktadır.

DF26 kodlu formülde etken madde çıkışı bifazik salım profili göstermektedir. İlk bir saatte hızlı bir çıkış (burst effect) gözlenmiş, daha sonra bunu yavaş bir salım fazı takip etmiştir. Araştırmacılar ilk saatlerde görülen ilk çıkış etkisinin nedeninin nanopartikül yüzeyinde bulunan serbest etken maddenin partikül yüzeyinden ayrılması olarak açıklamışlardır (D'Souza, 2014; Singh ve ark., 2010). Donepezil HCl'in ilk saatlerdeki bu hızlı çıkışı, etken maddenin yağdaki çözünürlüğünün az olmasından dolayı beklenen bir durumdur (Zur Muhlen ve ark., 1998). Formülasyondan ilk bir saatte etken maddenin %20,65'i çıkmıştır. Donepezil HCl'de ise ilk bir saatte %42,35 çıkış görülmüştür. 24 saat sonunda DF26 %74,01 Donepezil HCl ise %91,25 çıkış gözlenmiştir. Donepezil HCl maksimum çıkışına 24 saat sonunda ulaşmıştır. Bu durumda DF26 kodlu formülde etken maddenin salımının uzadığı söylenebilir. Bu yavaş salım etken maddenin lipit matriks içinde homojen olarak dağılması ve salımın etken maddenin lipit matriksten difüzyonuna bağlı olduğu söylenebilir (Amasya ve ark., 2021; Singh ve ark., 2010).

HF3, HF9 ve Humanin çözeltisi'nin salım profili karşılaştırıldığında 24 saatin sonunda sırasıyla %99,5, %99,8 ve 99,9 etken madde salınmıştır. 8. saatin sonunda Humanin çözeltisindeki etken maddenin %93,7'si, HF3 kodlu formülde %80'i ve HF9 kodlu formülde ise %62,5'i çıkmıştır. 12. saatten sonra salımın olmadığı gözlenmiştir. HF3 ve HF9 salım profillerinde ilk çıkış etkisi görülmektedir. İki formülde birbirine benzer bir salım profili göstermektedir ve taşıyıcı sistemin etkisiyle Humanin'in saf haline göre salım bir miktar yavaşlamıştır. HF3 kodlu formüle nazaran HF9 kodlu formülle salım bir miktar daha yavaşlamıştır. Bunun nedeni olarak formülasyona

yüklenen etken maddenin çözünürlüğünün su ve tampon ortamında farklı olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

4.4. Uygun Formülasyonların Seçimi

Hazırlanan tüm formüllerin partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve in vitro salım özellikleri birlikte değerlendirildiğinde DF26 ve HF9 kodlu formülasyonların özellikleri uygun bulunmuştur. Bu formülasyonlar Apo-E ve Tf ile modifikasyonların yapılması ve böylece partiküllerin beyne hedeflendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

4.5. Tekrarlanabilirlik Çalışmalarına Dair Bulguların Değerlendirilmesi

DF26 ve HF9 formülleri ile tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve bu formülasyonlar karakterizasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen karakterizasyon sonuçları arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 3.27 ve 3.28).

4.6. Seçilen Optimum Formüllerin Apo-E ile Yüzey Modifikasyonu ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Seçilen DF26 ve HF9 kodlu formülasyonları beyne hedeflendirilmek için Apo-E ile yüzey modifikasyonları yürütülmüştür. Bağlanma etkinliğini tayin etmek için floresan ölçüm biyotin-floresin çözeltisi ve üretiminde DSPE-PEG(2000)-Amin-Avidin kullanılmış; ancak Apo-E ile modifiye edilmemiş SLN'ler kullanılarak yapılmıştır. %98,88 Apo-E'nin SLN yüzeyine bağlandığı bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan biyotin-floresin modifiye edilmemiş SLN'de bulunan boş avidinlere bağlanır; Apo-E SLN'lerde bu avidinlere Apo-E bağlıdır. Bu nedenle süpernatanda yapılan florometrik ölçümde hedeflendirilmemiş SLN'ler ile Apo-E SLN'ler karşılaştırıldığında, Apo-E SLN'de partiküle bağlanmayan biyotin-floresinden dolayı fazla floresan yoğunluğu gösterecektir, elde ettiğimiz sonuçlar bu deneyin mantığı ile

uyumludur (Neves ve ark., 2015). Apo-E SLN'de yaklaşık 3 kat fazla floresan yoğunluk gözlenmiştir; bu durum boş avidin bölgeleri ile ters orantılıdır. Bu durum modifikasyonun başarılı olduğunu göstermektedir.

Apo-E Don SLN ve Apo-E Hum SLN partikül boyutları ve dağılımları modifiye edilmemiş DF26 ve HF9 formülleri ile karşılaştırıldığında modifiye edilmiş partiküllerde partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelleri belirgin şekilde artmıştır ($p<0,05$). Partikül büyüklüğünün artması Apo-E gibi büyük bir grubun partikül yüzeyine takılmasından dolayı normaldir. Partiküller hala 200 nm'nin altındadır, KBE'den geçiş için hala uygundur ve dolaşımda kalma süresi bu boyuttaki partiküller için daha uzundur (Kevadiya ve ark., 2019). Mulik ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada Apo-E ile modifiye ettikleri partiküllerin 178 nm'den 197 nm'ye büyüdüğünü görmüşlerdir. Zeta potansiyellerindeki artış partiküllerin agregasyonunu önleyeceğinden formülasyonlara olumlu etkisi olacaktır (Mulik ve ark., 2010). Ayrıca negatif SLN'ler KBE'den etkili şekilde endotele zarar vermeden alınabilmektedirler ve yüksek beyin penetrasyonları vardır; bu nedenle bu özelliği KBE'den geçişte partiküllere avantaj sağlayacaktır (Lockman ve ark., 2004; Neves ve ark., 2015). Enkapsülasyon etkinliklerindeki anlamlı artış olmuştur ($p<0,05$).

Bu formüllerin salım profilleri incelendiğinde DF26 ve Apo-E Don SLN arasında etken madde çıkışının oldukça yavaşladığı görülmektedir. 24 saatin sonunda DF26'dan etken maddenin %85,15'i çıkarken, Apo-E Don SLN'de %48,15'i çıkmıştır. Hedeflendirilen partiküllerde bu yavaşlamanın sebebi, Apo-E'nin SLN yüzeyine bağlanması için kullanılan DSPE-PEG(2000)-Amin olabileceği literatürde yer alan benzer sonuçlar nedeniyle düşünülmüştür. DSPE-PEG(2000)-Amin'nin lipit matriks içinde yağ ile olan etkileşimi nedeniyle etken madde stabilizasyonu sağlamış olabileceği, ayrıca SLN'nin yüzeyine bağlanan hedeflendirici grupların partikül yüzeyinde bir bariyer oluşturturması nedeniyle partikülden etken madde çıkışını yavaşlayabileceği belirtilmiştir (Neves ve ark., 2015). Apo-E'nin etken maddenin difüzyon yolunu uzattığı ve bu nedenle Donepezil HCl'in salım ortamına göçünün geciktiği düşünülmüştür. Apo-E Don SLN için kısa bir ilk çıkış etkisi ve uzun bir stabil salım basamağı vardır diyebiliriz. Bu nedenle Apo-E Donepezil HCl'in lipitten stabil

salımında önemli bir rol oynar (Kuo ve Cheng, 2016; Singh ve ark., 2016). Andreozzi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada benzer şekilde hazırlamış oldukları lipit partiküllerden etken maddenin salım hızının yavaş olduğunu görmüştür. Araştırmacılar ayrıca bu lipitlerin in vivo ortamda salımının aynı olmayacağını, in vivo ortamda lipazlar tarafından parçalanıp lipitlerin etken maddenin daha hızlı salımına neden olacağını belirtmişlerdir. İn vitro ortamda lipit parçalanmadığından bir süre sonra etken madde çıkışı gözlenmemektedir (Andreozzi ve ark., 2013).

Humanin yüklü formülasyonların salım profilleri Donepezil HCl yüklü formülasyonlar ile benzerlik göstermektedir. 24 saatin sonunda HF9 kodlu formülden etken maddenin %99,5'i salınırken, Apo-E Hum SLN'de bu değer %86,08'dir. Apo-E ile modifiye edilmiş formülasyonlar daha yavaş bir salım profili göstermektedir. Bu durum yukarıda belirtildiği gibi DSPE-PEG(2000)-Amin ve hedeflendirici ajanların partikül yüzeyinde bir bariyer oluşturarak etken madde için difüzyon yolunun uzamasına bağlanmıştır (Neves ve ark., 2015).

4.7. Seçilen Optimum Formüllerin Tf ile Yüzey Modifikasyonu ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Seçilen DF26 ve HF9 kodlu formülasyonları beyne hedeflendirilmek için Tf ile yüzey modifikasyonları yürütülmüştür. Bağlanma etkinliğini tayin etmek için Tf'nin BCA ile miktar tayini yapılmıştır ve Tf'nin %90,60 oranında SLN yüzeyine bağlandığı belirlenmiştir. Bu nedenle Tf'nin başarılı bir şekilde partikül yüzeyine bağlandığını söyleyebilmektedir.

Tf Don SLN ve Tf Hum SLN partikül boyutları ve dağılımları modifiye edilmemiş DF26 ve HF9 formülleri ile karşılaştırıldığında modifiye edilmiş partiküllerde bağlanan büyük gruptan dolayı Apo-E ile modifikasyonda da karşılaşılan benzer durumla karşılaşmıştır ve partikül büyüklüğü ve PDI'da artış görülmektedir ($p < 0,05$) (Gupta ve ark., 2007; Jain ve ark., 2013). DF26 ve Tf Don SLN arasında zeta potansiyeli açısından anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$); Tf Hum SLN'de ise

HF9 formülüne göre zeta potansiyelinde azalma görülmektedir ($p<0,05$); bu bağlanan Tf nedeni ile olmuş olabilir. Gupta ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada Tf bağladıkları partiküllerin zeta potansiyelinde benzer şekilde azalma gözlemlemişlerdir.

Salım profilleri incelendiğinde 24 saat sonunda DF26'dan etken maddenin %85,15'i çıkarken, Tf Don SLN'de %25,3'ü çıkmıştır. HF9 kodlu formülde ise bu süre sonunda etken maddenin %99,5'i salınırken bu değer Tf Hum SLN'de ise %72,43'tür. Tf ile modifiye edilmiş formülasyonlar aynı Apo-E ile modifiye edilenler gibi daha yavaş bir salım profili göstermektedir. Gupta ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada Tf ile konjuge olan ve olmayan SLN'lerde benzer bir sonuçla karşılaşmışlardır ve bu durumu Tf'nin yapısal bir bariyer oluşturmaya ve bu nedenle difüzyonun yavaşlamasına bağlamışlardır.

4.8. Humanin Yüklenen Formüllerde Yapısal Bütünlüğün Değerlendirilmesi

CD analizi proteinlerin ve peptitlerin ikincil yapı ve katlanma özelliklerini değerlendirmek için en etkili ve hızlı yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Greenfield, 2006). Çalışmamızda üretim ve hedeflendirme için kullandığımız modifikasyon yöntemlerinden Humanin'in etkilenip etkilenmediğini anlayabilmek için CD analizi yürütülmüştür. Standart Humanin çözeltisi için 208-220 nm aralığında pik değeri elde edilmiştir. Bu pik Humanin'in α -heliks yapısından kaynaklanmaktadır ve bu veri literatür bilgisi ile uyumludur (Pistolesi ve ark., 2009; Romeo ve ark., 2017). SLN'lerden salınan Humanin CD spektrumları incelendiğinde pik değerlerinin benzer aralıkta olduğu görülmüştür. Konsantrasyon düşük olduğu için pikler Humanin çözeltisindeki kadar belirgin değildir. SLN'lerden salınan Humanin ve standart Humanin çözeltisi'nin piklerinin aynı dalga boyunda olması kullanılan üretim yöntemlerinden Humanin'in etkilenmediğini ve konformasyonel yapısını koruduğunu göstermiştir.

Yapısal bütünlük tespiti için ayrıca Native-PAGE analizi de yürütülmüştür. Standart Humanin çözeltisi ve formülasyonlardan salınan Humanin jele uygulanmış

ve görüntüsü değerlendirilmiştir. Konsantrasyonların çok düşük olması nedeniyle bantlar belirgin şekilde elde edilememiştir; ancak bütün bantların aynı şekilde sürüklendiği anlaşılmaktadır. Standart Humanin çözeltisi ile SLN'lerden salınan etken maddeye ait bantların aynı seviyede olması, Humanin'in yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir.

CD ve Native-PAGE sonuçları birlikte değerlendirildiğinde Humanin'in yapısını koruduğu ve üretim basamaklarından etkilenmediği bulunmuştur.

4.9. Formülasyonlarda Yürütülen DSC Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DSC analizi sonuçları Bölüm 2.11'de anlatılan şartlar altında yapılan çalışmalarla elde edilmiştir.

Öncelikle, etken maddeler Donepezil HCl ve Humanin erime sıcaklığında sırasıyla 218,8 °C'de ve 166,8°C'de endotermik pikler görülmektedir. Lipit Dynasan 116 termogramında 63,7°C'de endotermik pik görülmektedir. Bu pikin Dynasan 116'ya ait olduğu yapılan literatür taraması ile doğrulanmıştır (Olbrich ve ark., 2002).

Fiziksel karışımlara ait termogramlarda hem lipitin hem de etken maddeler Humanin ve Donepezil HCl'in pikleri bunların tekli termogramlarında olduğu gibi aynı yerlerde pik vermiştir ve ayrı ayrı görülebilmektedir.

Formülasyonların termogramları incelendiğinde Donepezil HCl'li formülasyonlar için nanopartikül formülasyonlarında Donepezil HCl'e ait pik kaybolmuştur ve sadece lipite ait pikler görülmektedir. Bu durum Donepezil HCl'in lipit içerisinde homojen bir şekilde disperse olduğunu ve amorf halde SLN'lere yüklendiğini göstermektedir (Yasir ve ark., 2017).

Humanin içeren formülasyonlara ait termogramlar için ise lipit Dynasan 116, boş SLN ve HF3 kodlu formülasyon için ise yaklaşık 63 °C’de endotermik pik görülmektedir. Bu pikin nanopartikül formülasyonlarında görülme sebebi lipidin nanopartikül yüzeyini kaplayan tabakayı oluşturmasındandır. Humanin’e ait 166°C’de görülen piklerin formülasyonların DSC termogramında görülmemesi etken maddenin formülasyona amorf halde yüklendiğini ve homojen bir şekilde disperse olduğunu göstermiştir (Küçüktürkmen ve Bozkır, 2018).

4.10. Formülasyonlarda Yürütülen FTIR Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Donepezil HCl FTIR spektrumunda 3583 cm⁻¹, 3004 cm⁻¹, 2942 cm⁻¹, 1681 cm⁻¹ ve 1589 cm⁻¹ civarlarında görülen pikler Donepezil HCl’e ait karakteristik fonksiyonel grup pikleridir ve literatürle uyumludur (Chuong ve ark., 2018; Md ve ark., 2014). 2914 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹, 1729 cm⁻¹, 1470 cm⁻¹ ve 1330 cm⁻¹’de görülen boş SLN pikleri ve Dynasan 116 pikleri birbiri ile aynıdır. Donepezil HCl yüklü SLN’ler incelendiğinde Donepezil HCl’e ait karakteristik pikler kaybolmuştur ve Dynasan 116 ile ilişkili olan 2849 cm⁻¹ ve 2914 cm⁻¹’de yer alan pikler gözükmemektedir. Bu durum serbest etken maddenin partikül yüzeyinde değil lipit matriksin içinde olduğunu ve etken maddenin amorf yapıya dönüştüğünü göstermektedir (Başaran ve ark., 2010; Mendes ve ark., 2019; Yassin ve ark., 2013).

Humanin FTIR spektrumuna bakıldığında, 1625 cm⁻¹’de amit I bölgesine ait karakteristik pik, 3278 cm⁻¹’de N-H gerilim vibrasyonu nedeniyle oluşan pik (Kong ve Yu, 2007) ve 1522 cm⁻¹’de amit II bölgesine ait bir pikler görülmektedir (Bunaciu ve ark., 2014). 2914 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹, 1729 cm⁻¹, 1470 cm⁻¹ ve 1330 cm⁻¹’de görülen boş SLN pikleri ve Dynasan 116 pikleri birbiri ile aynıdır. Humanin yüklü SLN’lerde Humanin’ne ait amit I ve II bölgesindeki titreşimlerin SLN’lerin FTIR spektrumunda görülmemesi moleküller arasında etkileşim olduğunu göstermektedir. HF9, Apo-E Hum SLN ve Tf Hum SLN’de 2953 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹, 2914 cm⁻¹ ve 1735 cm⁻¹’de yer alan pikler lipit Dynasan 116 ile ilişkilidir (Başaran ve ark., 2010) ve lipitin FTIR

spektrumundan açıkça görülebilmektedir. Bu durum serbest etken maddenin partikül yüzeyinde değil lipit matriksin içinde olduğunu göstermektedir (Mendes ve ark., 2019).

FTIR sonuçları DSC sonuçlarını desteklemektedir.

4.11. Hazırlanan SLN’lerin TEM Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla TEM analizleri gerçekleştirilmiştir. SLN’lerin TEM görüntüleri incelendiğinde küresel ve yüzeyleri düzgün nanopartiküller elde edildiği gözlenmektedir. Ayrıca bütün formüllerde TEM ile gözlenen partikül boyutunun foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ile ölçülen ortalama partikül boyutuna benzer olduğu ve bu açıdan bu iki verinin birbirini desteklediği bulunmuştur. Bu görüntülere dayanarak başarılı bir şekilde nanopartikül hazırlandığını söyleyebiliriz.

4.12. Formülasyonlarda Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.12.1. +4°C’de Gerçekleştirilen Stabilité Çalışmalarından Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

+4°C’de 3 ay boyunca gerçekleştirilen stabilite çalışmalarında partikül büyüklüğü açısından DF26, Tf Don SLN ve Tf Hum SLN’de anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$); HF9, Apo-E Don SLN ve Apo-E Hum SLN’de ise bir miktar artış görülmektedir ($p<0,05$); ancak partikül boyutları hala 200 nm’nin altındadır. PDI değerleri büyümüştür, partiküller zamanla agrege olma eğiliminde olduğundan bu beklenen bir durumdur. Apo-E Don SLN ve Apo-E Hum SLN’de zeta potansiyelinde anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$); bu durumun partiküllerin agrege olmasından dolayı olabileceği öngörülmüştür. DF26 ve HF9

formülasyonlarında zeta potansiyeli açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Tf Don SLN ve Tf Hum SLN için zeta potansiyelinde artış görülmüştür; bu durumun salınan etken maddenin negatif yapısından dolayı olabileceği düşünülmüştür (Guo ve ark., 2018). Elde edilen bu sonuçlardan partiküllerin +4 C’de gayet stabil oldukları anlaşılmaktadır.

4.12.2. 25°C’de Gerçekleştirilen Stabilite Çalışmalarından Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

25°C’de 3 ay boyunca gerçekleştirilen stabilite çalışmalarında partikül büyüklükleri açısından DF26, HF9 ve Tf Hum SLN’de anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$); Apo-E Don SLN, Apo-E Hum SLN ve Tf Don SLN’de ise bir miktar artış görülmektedir ($p<0,05$). Bu artışlar dar bir aralıkta olup kabul edilebilir sınırlardadır, partikül boyutları hala 200 nm’nin altındadır. PDI değerleri büyümüştür. Zeta potansiyellerinde genel olarak bir artış mevcuttur ki bu stabilite açısından olumludur. Benzer sonuçları Martins ve ark. (2013), yapmış oldukları SLN stabilite çalışmasında elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara dayanarak partiküllerin 25°C’de stabil olduğu söylenebilmektedir.

4.12.3. Kolloidal Stabilite Çalışmalarından Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

IV uygulamadan sonra partiküllerin boyutu ve yükü çoğunlukla yüzeye adsorbe olan serum komponentleri tarafından belirlenmektedir (Radhakrishnan ve ark., 2016). SLN’ler ile serum proteinleri arasında bir etkileşim olup olmadığını tespiti için SLN formülasyonları %10 FBS içeren pH 7,4 fosfat-salin tamponu içerisinde 37 °C’de 24 saat ve +4 °C’de 1 ay boyunca inkübe edilmiş ve partiküllerin boyut, dağılım ve zeta potansiyellerindeki değişim gözlenmiştir.

37°C'deki çalışmalarda partikül boyutu DF26 kodlu formül hariç anlamlı olarak yükselmiştir ve bütün formüllerin zeta potansiyellerinde düşme görülmektedir ($p<0,05$). Artış özellikle hedeflendirilmiş partiküllerde daha büyüktür; ancak 24 saat sonunda partiküller hala 200 nm'nin altındadır.

+4°C'deki çalışmalarda ise partiküllerde yaşanan değişim anlamlı olarak farklı bulunmamıştır, hatta DF26 kodlu formülde partikül boyutu değişmemiştir ($p>0,05$). Sadece Tf Don SLN'de anlamlı olarak partikül büyümesi gözlenmiştir ($p<0,05$) Zeta potansiyellerinde yine düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$).

Partikül boyutlarında yaşanan artış serum proteinleri veya diğer komponentlerin SLN yüzeyine adsorpsiyonu ile açıklanabilir (Pooja ve ark., 2014).

37°C'deki 24 saatlik çalışmalarda partiküllerin bu süre sonuna kadar hedef bölgeye gitmesinin in vivo çalışmalarda kanıtlanmasından dolayı bu süredeki stabilite bizim için yeterlidir. +4°C'de çalışmalar için ise sonuçlar göz önüne alındığında +4°C'de partiküllerin stabil olduğunu söyleyebiliriz.

4.13. Formülasyonlarda Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.13.1. Sitotoksikite Bulgularının Değerlendirilmesi

0,03-0,1-0,3-1 µg/mL konsantrasyon aralığında RBEC hücrelerinde yapılan MTT çalışmasında hiçbir formülasyonun hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır.

hCMEC/D3 hücreleri için 0,3-10 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanan boş SLN, Donepezil HCl ve Humanin çözeltileri etken madde yüklü formülasyonlara göre daha yüksek konsantrasyonda uygulanmalarına rağmen toksik bulunmamıştır.

Etken madde yüklü formülasyonlar için ise 0,03-1 µg/mL konsantrasyon aralığında HF9'un tüm dozları hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır. DF26 ve Apo-E Hum SLN'de 0,3 ve 1 µg/mL; Apo-E Don SLN'de 1 µg/mL toksik gözükmemektedir. Bunun nedeni SLN'nin hızlıca hücre içine girerek içselleştirilmesi ve hızlıca partikülden salınan madde ile toksik etki göstermesinden kaynaklanabilir (Miglietta ve ark., 2000).

SH-SY5Y hücreleri için yapılan çalışmada 0,3-10 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanan tüm dozlarda HF9'un hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Diğer formülasyonlar ve etken madde çözeltileri için hücre canlılığı açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

Bu çalışmaları takiben 1 ve 10 µg/mL konsantrasyonda yapılan uygulamada empedans ölçümü yapılarak hücre canlılığına bakılmıştır. Bu konsantrasyonlarda hem RBEC hem de hCMEC/D3 hücreleri için hiçbir formülasyonun toksik etkisi gözükmemektedir. Bu nedenle hücresel alım ve KBE geçiş çalışmaları için 10 µg/mL uygulama dozu olarak belirlenmiştir.

İki metot arasında hücre canlılığı açısından fark görülmüştür. Bunun nedeninin MTT çalışmasının beraberinde getirdiği bazı sınırlamalardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. MTT çalışması kolorimetrik olarak yürütülmektedir ve formazan kristallerinin renk yoğunluğu ve buna bağlı olarak ölçüm hassasiyeti hücre tipine ve sayısına, hücrenin metabolizmasına, ortamda olan maddelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle etkileşmesine bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Wang ve ark., 2010). Ayrıca bazı çalışmalar MTT'nin kendisinin de ökaryotik hücrelerde toksik olduğunu göstermiştir. MTT deneyi, MTT'yi renkli bir formazan ürününe dönüştürmek için ko-enzim NADH gibi indirgeyici eşdeğerleri kullanır. NADH'yi kritik hücresel işlevlerden uzaklaştırıp MTT'nin azaltılmasına yönlendirmenin hücre sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olması muhtemeldir (Riss, 2017). Hücre canlılığının karşılaştırmasında empedans ölçüm yöntemi bizim formülasyonlarımız için daha uygundur diyebiliriz.

4.13.2. Hücresel Alım Bulgularının Değerlendirilmesi

Hücresel alım çalışmaları hedeflendirilmemiş SLN'ler (DF26 ve HF9) ve Apo-E ile hedeflendirilmiş SLN'ler ile yürütülmüştür. Bu testler sırasında RBEC, hCMEC/D3 ve SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. 2 saatlik inkübasyonun ardından Apo-E bağlı partiküllerin hedeflendirilmemiş partiküllere göre beyin endotel hücreleri tarafından içine daha çok alındığı tespit edilmiştir. (Şekil 3.52 ve Şekil 3.53). Apo-E Don SLN, DF26 kodlu formüle göre RBEC hücrelerinde hücresel alımı 4,7 kat; hCMEC/D3 hücrelerinde ise alımı 2,9 kat artırmıştır. Humanin yüklü partiküllerde Apo-e Hum SLN bir miktar fazla hücre içine alınmıştır; ancak beyin endotel hücreleri için anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

SH-SY5Y hücre dizisinde 2 saatlik inkübasyonun ardından Apo-E bağlı partiküllerin hedeflendirilmemiş partiküllere göre nöronlar tarafından içine daha çok alındığı tespit edilmiştir (Şekil 3.54). Apo-E Don SLN, DF26 kodlu formüle göre SH-SY5Y hücrelerinde hücresel alımı 2,3 kat; Humanin yüklü partiküllerde Apo-e Hum SLN 1,2 kat artırmıştır ($p > 0,05$).

SH-SY5Y ve hCMEC/D3 hücrelerinde alımın RBEC hücrelerine göre daha az olduğu görülmüştür. Apo-E hücre içine LDLR vasıtasıyla alınmaktadır ve farklı hücre dizilerinde reseptör sayısının farklı olması alımı değiştirebilmektedir.

Hedeflendirilmiş partiküllerin hedeflendirilmemiş SLN'lere göre daha fazla hücre içine alınmasının nedeni SLN yüzeyinde bulunan Apo-E'nin reseptör aracılı endositoz ile alım mekanizmasına bağlıdır (Neves ve ark., 2017). Hedeflendirilmiş partiküllerin hücre içine daha çok alınması beklenen bir sonuçtur.

Donepezil HCl yüklü partiküllerin Humanin yüklü partiküllere göre daha fazla hücre içine alınmasının nedeninin hücresel etki mekanizmalarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu iki etken maddenin farklı biyolojik yollara etki etmesi ikisi arasında hücresel alım bakımından farklılık yaratabilir.

4.13.3. Kan Beyin Engeli Modelinden Geçiş Çalışmalarında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

SLN'lerin penetrasyonu üçlü ortak KBE hücre kültürü modelinde test edilmiştir. Bu modelin geçirgenliğini ölçmek için küçük paraselüler penetrasyon etiketi olarak sodyum floresin (SF) ve büyük intraselüler biyomolekül olarak albümin (EBA) kullanılmıştır. İkisi içinde modelin geçirgenliği oldukça düşüktür ($0,52 \times 10^{-6}$ cm/s ve $0,06 \times 10^{-6}$ cm/s) bu durum sıkı bir bariyer yansıtmaktadır. Elde edilen sonuç daha önce benzer çalışmalarda elde edilen bir sonuçtur. RhoB ile etiketlenmiş SLN'lerin penetrasyonunun işaretleyici moleküllerden birkaç kat yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir. Donepezil HCl yüklü formülasyonlarda Apo-E Don SLN ($P_{app} = 133,4 \times 10^{-6}$ cm/s), DF26 ($P_{app} = 42,7 \times 10^{-6}$ cm/s) ile kıyaslandığında geçirgenliği 3,2 kat artırmıştır. Humanin yüklü formülasyonlarda ise Apo-E Hum SLN ($P_{app} = 49,7 \times 10^{-6}$ cm/s), HF9 ($P_{app} = 35,5 \times 10^{-6}$ cm/s) ile kıyaslandığında geçirgenliği 1,4 kat artırmıştır. Apo-E ile modifiye edilmiş formülasyonların hücre alımının fazla olmasının yanında KBE'den geçişinin de fazla olduğu bu çalışma ile bulunmuştur. Bu durum Apo-E'nin KBE'de yer alan LDL reseptörleri ile etkileşmesinden dolayı olmuş olabilir (Neves ve ark., 2017).

4.14. Formülasyonlarda Gerçekleştirilen İn Vivo Çalışmaların Değerlendirilmesi

Yapılan in vivo beyine geçiş çalışmalarında elde edilen görüntülerden ve floresan yoğunluklarından Apo-E ve Tf ile hedeflendirmenin işe yaradığı ve bu formülasyonların hücre alım ve permeabilite çalışmalarını destekleyici nitelikte daha fazla beyine geçtiği bulunmuştur.

İlk bir saat içerisinde tüm formülasyonlar beyine ulaşmış gözükmektedir. İlerleyen saatlerde RhoB SLN'nin etkinliğini kaybettiği ve beyinden atıldığını, bu nedenle floresan yoğunluğunun düştüğünü söyleyebiliriz. Apo-E ve Tf'li formülasyonlar ile floresan yoğunlukları azalsa da kontrol grubuna göre belirgin

şekilde fazla floresan olduğu ve beyinde hala partikül bulunduğu görülmektedir. 12 saatin sonunda beyindeki floresan yoğunlukları incelendiğinde hedeflendirilmemiş SLN'ye göre Apo-E'li SLN 1,2 kat ve Tf-SLN 1,33 kat daha fazla beyinde gözükmektedir. Apo-E LDL reseptörleri aracılığı ile ve Tf reseptör aracılı endositoz ile beyine alınmaktadır ve beyine alındıktan sonra alım mekanizmaları nedeniyle beyinden hedeflenmemiş SLN'ye göre daha az atılmaktadır. Bu nedenle hedeflenmiş partiküllerin etkisinin daha uzun olduğu düşünülmüştür. Apo-E ve Tf için olan bu spesifik beyne alım mekanizması sayesinde etken maddelerin etkisinin daha düşük dozla ve daha az toksik etkiyle daha fazla olmasını sağlanabilir (Li ve ark., 2016)

Modifiye edilen SLN'ler karşılaştırıldığında 12 saatin sonunda elde edilen floresan yoğunluğuna göre Tf ile hedeflemenin Apo-E ile hedeflemeye göre yaklaşık 1,2 kat daha fazla geçiş sağladığı görülmektedir. AH'da Apo-E'nin beyne alımını sağlayan LDL reseptörlerinin sayısı genelde azalır; Tf'nin alımı ile ilgili olan TfR yoğunluğu ise hipokampüste azalırken, serebral mikrodamarlarda genellikle azalmaz (Chen ve Liu, 2012). Reseptör sayısında olan bu değişimler Apo-E ve Tf ile hedeflendirilmiş SLN'lerin geçişi açısından bir farklılık yaratmış olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

AH’de etkili olduğu bilinen Humanin peptit ve ticari olarak tedavide kullanılan Donepezil HCl’in ilaç taşıyıcı sistem içerisindeki formülasyonlarının geliştirilmesi, beyine hedeflendirilmesi ve karşılaştırmalı çalışmalarının yapılması amacıyla yürütülen bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Nöroprotektif bir ajan olan Humanin peptitinin daha önce çalışılmamış bir formülasyon şekli hazırlanmış ve hedefleyici ajanlarla beyine hedeflenmesi başarı ile sağlanmıştır.
- AH tedavisinde günümüzde en çok kullanılan etken madde olan Donepezil HCl ile SLN formülasyonları geliştirilmiş ve beyine hedeflenmesi başarı ile sağlanmıştır.
- SLN’lerin hazırlanmasında homojenizasyon/ultrasonikasyon metodu kullanılmıştır. Birçok formülasyon parametresi karşılaştırılmıştır ve iki etken madde için de 200 nm’nin altında ve enkapsülasyon etkinliği yüksek formüller elde edilmiştir.
- Formülasyonlar için yürütülen karakterizasyon çalışmalarının sonuçları göz önünde bulundurulduğunda Humanin için HF9 ve Donepezil HCl için DF26 kodlu formüller optimum formül olarak seçilmiştir ve hedeflendirme basamağına bu formülasyonlarla devam edilmesi uygun görülmüştür.
- Formülasyonlar Apo-E ve Tf ile beyine hedeflendirmek amacıyla modifiye edilmişlerdir. Bağlanma kapasiteleri incelendiğinde Apo-E %98,88 ve Tf %90,60 oranında SLN yüzeyine bağlanmıştır. Modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Apo-E ve Tf ile modifikasyonun başarılı olduğu bulunduktan sonra in vitro karakterizasyon çalışmaları bu formülasyonlar için de yürütülmüştür ve 200 nm’nin altında yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip, salımı uzamış formüllere ulaşılmıştır.

- Humanin'in bu üretim ve modifikasyon aşamalarından ne ölçüde etkilendiğini anlayabilmek için CD ve Native-PAGE çalışmaları yürütülmüştür ve Humanin'in bu işlemlerden bozunmadığı bulunmuştur.
- +4°C'de ve 25°C'de 3 ay süreyle bekletilmesi sonucu formülasyonların stabilitelerini koruduğu belirlenmiştir.
- Yapılan kolloidal stabilite çalışmaları sonucunda partiküllerin serum ortamında stabil olduğu görülmüştür.
- Hazırlanan formülasyonlar ile hücresel toksisite çalışmaları yürütülmüştür. MTT çalışmalarında RBEC hücrelerinde toksik etki görülmezken, hCMEC/D3 sadece Donepezil HCl yüklü formülasyonlar toksik etki göstermiştir. SH-SY5Y hücrelerinde bütün formülasyonlar toksiktir. Empedans ölçümü ile toksisite tayininde ise aynı dozlarda formülasyonlar toksik çıkmamıştır. Bu durumun MTT çalışmalarında karşılaşılan bazı sınırlamalardan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür ve hücre canlılığı karşılaştırması için empedans ölçümünün daha uygun olduğu bulunmuştur.
- Hazırlanan formülasyonlar ile yapılan hücresel alım çalışmalarında Apo-E Don SLN, DF26 kodlu formüle göre RBEC hücrelerinde hücresel alımı 4,7 kat; hCMEC/D3 hücrelerinde ise alımı 2,9 kat artırmıştır. Humanin yüklü partiküllerde Apo-e Hum SLN bir miktar fazla hücre içine alınmıştır; ancak beyin endotel hücreleri için anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).
- Apo-E Don SLN, DF26 kodlu formüle göre SH-SY5Y hücrelerinde hücresel alımı 2,3 kat; Humanin yüklü partiküllerde Apo-e Hum SLN 1,2 kat artırmıştır ($p > 0,05$).
- Yürütülen üçlü ortak KBE modeli hücre kültürü çalışmasında Donepezil HCl yüklü formülasyonlarda Apo-E Don SLN, DF26 ile kıyaslandığında geçirgenliği 3,2 kat artırmıştır. Humanin yüklü formülasyonlarda ise Apo-E Hum SLN, HF9 ile kıyaslandığında geçirgenliği 1,4 kat artırmıştır.
- Zebra balıklarında yürütülen beyine geçiş çalışmalarında Apo-E ve Tf ile modifiye edilen formülasyonların, hedefsiz formülasyona kıyasla beyine daha fazla geçtiği belirlenmiştir. Bu sonuç hücre kültüründen elde edilen sonucu destekler niteliktedir.

Hazırlanan tüm formülasyonlar üzerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda elde edilen formülasyonlar ile bu tez çalışmasının hedeflenen amacına yönelik başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmamız sırasında gerçekleştirilemeyen, hem de çalışma sırasında oluşan düşünce ve öneriler doğrultusunda 1001 projemiz kapsamında gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalar şu şekildedir:

- Seçilen formülasyonlarla uzun süreli stabilite çalışmalarının yürütülmesi
- Aynı SLN'ye hem Donepezil HCl, hem de Humanin yüklenerek kombine formülasyonların hazırlanması ve gerekli karakterizasyon çalışmalarının yürütülmesi
- Hazırlanacak iki etken maddenin birlikte yüklendiği formülasyonların, bu etken maddelerin yalnız yüklü olduğu SLN'leri ile in vitro ve in vivo karşılaştırılmasının yapılması
- Hazırlanan formülasyonlar zebra balıklarına uygulanarak hastalığa yararının in vivo olarak test edilmesidir.

ÖZET

Alzheimer Tedavisine Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Etkinliğinin İncelenmesi

Bu doktora tezinde Humanin ve Donepezil HCl yüklü SLN formülasyonlarının geliştirilmesi, Apo-E ve Tf ile beyine hedeflendirilmesi, in vitro ve in vivo olarak KBE'den geçişinin değerlendirilmesi böylece hem yan etkilerin azaltan hem de biyoyararlanımın artıran hastalığa alternatif bir tedavi yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Demans; öğrenme, hafıza, oryantasyon, dil fonksiyonları ve mental fonksiyonların bozulması ile karakterize, sosyal hayatı etkileyen, progresif nörodejeneratif bir santral sinir sistemi (SSS) hastalığıdır. Alzheimer hastalığı en sık rastlanan demans türüdür. Alzheimer için etkili tedaviler geliştirilmediği sürece, 2050 yılında hasta sayısının tüm dünyada 115 milyonun üzerine çıkacağı öngörülmektedir. Alzheimer, zihinsel ve bilişsel azalma ile günlük yaşamdaki olağan aktiviteleri etkileyerek hastanın yaşam kalitesini düşürür. Alzheimer için mevcut tedaviler semptomatiktir; bu nedenle hastalığı önlemeye veya ilerlemesini geciktirmeye yönelik yeni tedavi yöntemlerine acilen ihtiyaç vardır.

Katı lipit nanopartiküller (SLN), yapılarında yer alan lipitlerin biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması, akut ve kronik toksisitesinin olmaması ve büyük ölçekli üretimlerinin gerçekleştirilebilmesi nedeniyle ilgi çeken bir taşıyıcı sistemdir. Çalışmamızda SLN'ler homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında yağ/süpfaktan tipi, yağ/süpfaktan konsantrasyonu, dış fazda kullanılan sulu ortamın tipi, etken madde miktarı homojenizasyon/sonikasyon hızı ve süreleri gibi parametreler değiştirilerek formülasyonların partikül boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, in vitro salım profilleri, morfolojileri incelenmiş ve bu özellikleri uygun olanlar seçilerek, Apo-E ve Tf ile modifiye edilmiştir. Hedeflendirilmiş formüllerde de aynı karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Hedefli ve hedeflendirilmemiş partiküller hCMEC/D3, RBEC ve SH-SY5Y hücrelerine uygulanarak in vitro sitotoksitesite, hücresel alım ve KBE'den geçiş; zebra balıklarına uygulanarak in vivo ortamdaki sitotoksitesiteleri ve beyine geçişleri değerlendirilmiştir.

Sonuçlarımız Humanin ve Donepezil HCl içeren hedeflendirilmiş SLN'lerin başarı ile beyine geçtiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer hastalığı, Hedeflendirme, İlaç taşıyıcı sistem, Kan beyin engeli, Katı lipit nanopartikül.

SUMMARY

Preparation, Characterisation and Investigation of Drug Delivery Systems for Alzheimer's Disease

In this Ph.D. thesis, it was aimed to develop Humanin and Donepezil HCl loaded SLN formulations, target them with Apo-E and Tf, and evaluate them in vitro and in vivo, thus reducing side effects and increasing bioavailability and developing an alternative treatment method for the disease.

Dementia is a progressive neurodegenerative CNS disease characterized by learning, memory, orientation, language functions and impaired mental functions, affecting social life. Alzheimer's disease is the most common type of dementia. As long as the effective treatments for Alzheimer's are not developed, the number of patients in 2050 is projected to exceed 115 million worldwide. Alzheimer's reduces the quality of life of the patient by affecting mental/cognitive decline and the usual activities in daily life. Current treatments for Alzheimer's are symptomatic, so there is an urgent need for new treatment modalities to prevent or delay disease progression.

Solid lipid nanoparticles (SLNs) are an attractive carrier system because of the lipids in their structure are biocompatible and biodegradable, have no acute and chronic toxicity, and can be produced on a large scale. In our study, SLNs were prepared by homogenization / ultrasonication method.

The effects of type of the lipid/surfactant and their amounts, quantity of active substance, type of aqueous solution which is used as external phase, homogenization/sonication times and speeds, on particle size, encapsulation efficiencies, zeta potentials, drug release profiles and morphology of nanoparticles were investigated. Apo-E and TF were binded to suitable formulations for targeting. In vitro characterisation studies were also carried out for targetted formulations.

Cellular effects of SLNs in terms of cytotoxicity, uptake and permeability by hCMEC/D3, RBEC and SH-SY5Y cells were evaluated. Also by applying SLNs to zebrafish, their in vivo cytotoxicity and their transition to the brain were determined.

Our results show that targeted SLNs containing Humanin and Donepezil HCl are successfully transferred to the brain.

Keywords: Alzheimer's disease, Blood-brain barrier, Drug delivery, Drug targeting, Solid lipid nanoparticle.

KAYNAKLAR

- ABBOTT NJ (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **36(3)**: 437-449. doi:10.1007/s10545-013-9608-0
- ABBOTT NJ, PATABENDIGE AAK, DOLMAN DEM, YUSOF SR, BEGLEY DJ (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, **37(1)**: 13-25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- AHMED NEL M, MURAKAMI M, HIROSE Y, NAKASHIMA M (2016). Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cell Secretome for Alzheimer's Disease Treatment: An In Vitro Study. *Stem Cells Int*, **2016**: 8102478. doi:10.1155/2016/8102478
- AKABRI B, PIRHADI TAVANDASHTI M, ZANDRAHIMI M (2011). Particle size characterization of nanoparticles - A practical approach. *Iranian Journal of Materials Science and Engineering*, **8(2)**: 48-56.
- ALAM MI, BEG S, SAMAD A, BABOOTA S, KOHLI K, ALI J, AHUJA A, AKBAR M (2010). Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40(5)**: 385-403. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.003>
- ALAM MP, BILOUSOVA T, SPILMAN P, VADIVEL K, BAI D, ELIAS CJ, EVSEENKO D, JOHN V (2018). A Small Molecule Mimetic of the Humanin Peptide as a Candidate for Modulating NMDA-Induced Neurotoxicity. *ACS Chem Neurosci*, **9(3)**: 462-468. doi:10.1021/acscchemneuro.7b00350
- ALMEIDA AJ, SOUTO E (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, **59(6)**: 478-490. doi:10.1016/j.addr.2007.04.007
- AMASYA G, BAKAR-ATES F, WINTGENS V, AMIEL C (2021). Layer by layer assembly of core-corona structured solid lipid nanoparticles with β -cyclodextrin polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, **592**: 119994. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119994>
- ANAND R, GILL KD, MAHDI AA (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, **76**: 27-50. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.004
- ANDREOZZI E, WANG P, VALENZUELA A, TU C, GORIN F, DHENAIN M, LOUIE A (2013). Size-stable solid lipid nanoparticles loaded with Gd-DOTA for magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem*, **24(9)**: 1455-1467. doi:10.1021/bc300605f

- ASLANTÜRK ÖS (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Ed.: InTech.
- AVRUPA FARMAKOPESİ 9 (EP9) (2016). Avrupa Komisyonu, Strazburg, Fransa.
- BAHAT-ÖZTÜRK G, KARAN MA (2009). Alzheimer Hastalığının Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, **22**: 36-45.
- BARNES CA, MELTZER J, HOUSTON F, ORR G, MCGANN K, WENK GL (2000). Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*, **99(1)**: 17-23. doi:10.1016/s0306-4522(00)00180-9
- BARTH A (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1767(9)**: 1073-1101. doi:10.1016/j.bbabo.2007.06.004
- BAŞARAN E, DEMIREL M, SIRMAGÜL B, YAZAN Y (2010). Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Journal of Microencapsulation*, **27(1)**: 37-47. doi:10.3109/02652040902846883
- BEHBAHANI ES, GHAEDI M, ABBASPOUR M, ROSTAMIZADEH K (2017). Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. *Ultrasonics Sonochemistry*, **38**: 271-280. doi:10.1016/j.ultsonch.2017.03.013
- BELLETTATO CM, SCARPA M (2018). Possible strategies to cross the blood–brain barrier. *Italian Journal of Pediatrics*, **44(S2)**. doi:10.1186/s13052-018-0563-0
- BENNETT DA, SCHNEIDER JA, WILSON RS, BIENIAS JL, ARNOLD SE (2004). Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol*, **61(3)**: 378-384. doi:10.1001/archneur.61.3.378
- BERK C, SABBAGH M (2012). Broader Considerations of Higher Doses of Donepezil in the Treatment of Mild, Moderate, and Severe Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, **2012**: 1-4. doi:10.1155/2012/707468
- BICKEL U, YOSHIKAWA T, PARDRIDGE WM (2001). Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, **46(1-3)**: 247-279. doi:10.1016/s0169-409x(00)00139-3
- BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, **368(9533)**: 387-403. doi:10.1016/S0140-6736(06)69113-7
- BOCSIK A, WALTER FR, GYEBROVSZKI A, FÜLÖP L, BLASIG IE, DABROWSKI S, ÖTVÖS F, TÓTH A, RÁKHELY G, VESZELKA S,

- VASTAG M, SZABÓ-RÉVÉSZ P, DELI MA (2016). Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105(2)**: 754-765. doi:<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.018>
- BORS L, ERDŐ F (2019). Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*, **87(1)**: 6. doi:10.3390/scipharm87010006
- BUNACIU AA, FLESCHEIN Ș, ABOUL-ENEIN H (2014). Evaluation of the protein secondary structures using fourier transform infrared spectroscopy. *Gazi University Journal of Science*, **27**: 637-644.
- CALAN OG, AKAN P, CATALER A, DOGAN C, KOCTURK S (2016). Amyloid Beta Peptides Affect Pregnenolone and Pregnenolone Sulfate Levels in PC-12 and SH-SY5Y Cells Depending on Cholesterol. *Neurochemical Research*, **41(7)**: 1700-1712. doi:10.1007/s11064-016-1886-0
- CAROLINDAH MN, ROZITA R, NORSHARIZA N (2013). An overview of in vitro research models for Alzheimer`s disease (AD). *Regenerative Research*, **2(2)**: 8-13.
- CELIA C, COSCO D, PAOLINO D, FRESTA M (2011). Nanoparticulate devices for brain drug delivery. *Med Res Rev*, **31(5)**: 716-756. doi:10.1002/med.20201
- CHAI GS, DUAN DX, MA RH, SHEN JY, LI HL, MA ZW, LUO Y, WANG L, QI XH, WANG Q, WANG JZ, WEI Z, MOUSSEAU DD, WANG L, LIU G (2014). Humanin attenuates Alzheimer-like cognitive deficits and pathological changes induced by amyloid beta-peptide in rats. *Neurosci Bull*, **30(6)**: 923-935. doi:10.1007/s12264-014-1479-3
- CHALIKWAR SS, BELGAMWAR VS, TALELE VR, SURANA SJ, PATIL MU (2012). Formulation and evaluation of Nimodipine-loaded solid lipid nanoparticles delivered via lymphatic transport system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **97**: 109-116. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.027
- CHATTOPADHYAY N, ZASTRE J, WONG H-L, WU XY, BENDAYAN R (2008). Solid Lipid Nanoparticles Enhance the Delivery of the HIV Protease Inhibitor, Atazanavir, by a Human Brain Endothelial Cell Line. *Pharmaceutical Research*, **25(10)**: 2262-2271. doi:10.1007/s11095-008-9615-2
- CHEN Y, LIU L (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64(7)**: 640-665. doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>
- CHHALOTIYA U, KASHYAP B, SHAH D, NAGDA C (2011). Liquid Chromatographic Method for the estimation of Donepezil Hydrochloride in a Pharmaceutical Formulation. *International Journal of ChemTech Research*, **3**.

- CHIBA T, YAMADA M, SASABE J, TERASHITA K, SHIMODA M, MATSUOKA M, AISO S (2009). Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry*, **14(2)**: 206-222. doi:10.1038/mp.2008.105
- CHINTHAPALLI K. (2017). Pharmacological treatment of Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's Disease* Ed.: Waldemar, G. Burns, A., UK: Oxford University Press. 2, 61-71.
- CHUONG MC, KELLEY CJ, MUHAMMAD Y, CAPUTO TD, GOMES JM, OLIVEIRA D, PEIXOTO AC, PEREIRA BS, RIZG W, VAZQUEZ C, ZACARON TM, NGUYEN S, WILLIAMS DA (2018). Investigating effect of water of hydration on active pharmaceutical ingredients in a water-sensitive dosage form. *Journal of Analytical Science and Technology*, **9(1)**. doi:10.1186/s40543-018-0135-3
- COMOGLU T, ARISOY S, AKKUS ZB (2017). Nanocarriers for Effective Brain Drug Delivery. *Curr Top Med Chem*, **17(13)**: 1490-1506. doi:10.2174/1568026616666161222101355
- CRAPARO EF, BONDÌ ML, PITARRESI G, CAVALLARO G (2011). Nanoparticulate Systems for Drug Delivery and Targeting to the Central Nervous System. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **17(6)**: 670-677. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00199.x
- CUMMINGS J (2004). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, **351(1)**: 56-67. doi:10.1056/nejmra040223
- CUMMINGS J, MORSTORF T, LEE G (2016). Alzheimer's drug-development pipeline: 2016. *Alzheimers Dement (N Y)*, **2(4)**: 222-232. doi:10.1016/j.trci.2016.07.001
- CURLEY SM, CADY NC (2018). Biologically-Derived Nanomaterials for Targeted Therapeutic Delivery to the Brain. *Science Progress*, **101(3)**: 273-292. doi:10.3184/003685018x15306123582346
- ÇELEBI N. (2009). Kolloidler. In: *Modern Farmasötik Teknoloji* Ed.: F., A., İ., A., N., Ç., T., D., Z., D., T., D., S., T., F., T., Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını.
- D'SOUZA S (2014). A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, **2014**: 304757. doi:10.1155/2014/304757
- DAĞLIOĞLU C (2018). İlaç Taşıma Sistemleri olarak Nanopartiküller kullanılarak Pasif ve Aktif Tümör Hedeflemelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*. doi:10.21541/apjes.349889

- DAHM R, GEISLER R (2006). Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol (NY)*, **8(4)**: 329-345. doi:10.1007/s10126-006-5139-0
- DAL MAGRO R, ORNAGHI F, CAMBIANICA I, BERETTA S, RE F, MUSICANTI C, RIGOLIO R, DONZELLI E, CANTA A, BALLARINI E, CAVALETTI G, GASCO P, SANCINI G (2017). ApoE-modified solid lipid nanoparticles: A feasible strategy to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, **249**: 103-110. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.039>
- DALDAL Y, ÇUBUK DEMIRALAY E, ALSANCAK G (2017). Determination of spectrophotometric protonation constant of cholinesterase inhibitors. *International Journal of Chemistry and Technology*, **1**: 7-13. doi:10.32571/ijct.335934
- DAS S, CHAUDHURY A (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, **12(1)**: 62-76. doi:10.1208/s12249-010-9563-0
- DAS S, NG WK, KANAUIA P, KIM S, TAN RBH (2011). Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **88(1)**: 483-489. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.036>
- DE ROSA G, SALZANO G, CARAGLIA M, ABBRUZZESE A (2012). Nanotechnologies: a strategy to overcome blood-brain barrier. *Curr Drug Metab*, **13(1)**: 61-69. doi:10.2174/138920012798356943
- DELI MA, ABRAHÁM CS, KATAOKA Y, NIWA M (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*, **25(1)**: 59-127. doi:10.1007/s10571-004-1377-8
- DEROSE PC. (2008). Recommendations and Guidelines for Standardization of Fluorescence Spectroscopy (7457)
- DEVIRIM B, BOZKIR A, CANEFE K (2011). Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2 : I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *J Microencapsul*, **28(6)**: 582-594. doi:10.3109/02652048.2011.599438
- DHAWAN S, KAPIL R, SINGH B (2011). Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **63(3)**: 342-351. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01225.x

- DINDA SC, PATTNAIK G (2013). Nanobiotechnology-based drug delivery in brain targeting. *Curr Pharm Biotechnol*, **14(15)**: 1264-1274. doi:10.2174/1389201015666140608143719
- DOĞAN SS, ÇABAN S, ÇAPAN Y (2013). Beyine İlaç Hedeflendirme Stratejileri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **33(2)**: 231-250.
- DOKTOROVOVA S, SOUTO EB, SILVA AM (2018). Hansen solubility parameters (HSP) for prescreening formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): in vitro testing of curcumin-loaded SLN in MCF-7 and BT-474 cell lines. *Pharmaceutical Development and Technology*, **23(1)**: 96-105. doi:10.1080/10837450.2017.1384491
- DUONG VA, NGUYEN TT, MAENG HJ (2020). Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*, **25(20)**. doi:10.3390/molecules25204781
- DWIVEDI D, MEGHA K, MISHRA R, MANDAL PK (2020). Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. *Neurochemical Research*, **45(7)**: 1461-1480. doi:10.1007/s11064-020-03030-1
- ERGÜN U (2010). Demansta Kognitif Semptomların Güncel Tedavisi. *Turkish Journal Of Geriatrics*, **13**: 53-60.
- ERTEKİN-TANER N (2010). Genetics of Alzheimer's Disease: Lessons Learned in Two Decades. *Türk Nöroloji Dergisi*, **16**: 1-11.
- FERNANDEZ-MARTOS C, ATKINSON R, CHUAH M, KING A, VICKERS J (2016). Combination treatment with leptin and pioglitazone in a mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, **3**. doi:10.1016/j.trci.2016.11.002
- FONSECA-SANTOS B, GREMIAO MP, CHORILLI M (2015). Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*, **10**: 4981-5003. doi:10.2147/IJN.S87148
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-CENTER OF DRUG EVALUATION (FDA- CFDE) (2009). Aricept (Donepezil HCl) Tablets, 23 mg
- GABATHULER R (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, **37(1)**: 48-57. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.028
- GALLAGHER W (2009). FTIR analysis of protein structure. *Course Manuel Chem*, **455**.

- GANTA S, AMIJI M (2009). Coadministration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. *Mol Pharm*, **6(3)**: 928-939. doi:10.1021/mp800240j
- GAO GS, LI Y, ZHAI H, BI JW, ZHANG FS, ZHANG XY, FAN SH (2017). Humanin analogue, S14G-humanin, has neuroprotective effects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation by reactivating Jak2/Stat3 signaling through the PI3K/AKT pathway. *Exp Ther Med*, **14(4)**: 3926-3934. doi:10.3892/etm.2017.4934
- GAO H (2016). Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **6(4)**: 268-286. doi:10.1016/j.apsb.2016.05.013
- GARUD A, SINGH D, GARUD N (2012). Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *International Current Pharmaceutical Journal*, **1(11)**: 384-393. doi:10.3329/icpj.v1i11.12065
- GASTALDI L, BATTAGLIA L, PEIRA E, CHIRIO D, MUNTONI E, SOLAZZI I, GALLARATE M, DOSIO F (2014). Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **87(3)**: 433-444. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.004>
- GOTOH T, TERADA K, OYADOMARI S, MORI M (2004). hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, **11(4)**: 390-402. doi:10.1038/sj.cdd.4401369
- GREENFIELD NJ (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, **1(6)**: 2876-2890. doi:10.1038/nprot.2006.202
- GUO D, DOU D, LI X, ZHANG Q, BHUTTO ZA, WANG L (2018). Ivermectin-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterisation, stability and transdermal behaviour. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **46(2)**: 255-262. doi:10.1080/21691401.2017.1307207
- GUO W, QUAN P, FANG L, CUN D, YANG M (2015). Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10(5)**: 405-414. doi:10.1016/j.ajps.2015.06.001
- GUPTA S, KESARLA R, CHOTAI N, MISRA A, OMRI A (2017). Systematic Approach for the Formulation and Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Efavirenz by High Pressure Homogenization Using Design of Experiments for Brain Targeting and Enhanced Bioavailability. *BioMed Research International*, **2017**: 5984014. doi:10.1155/2017/5984014

- GUPTA Y, JAIN A, JAIN SK (2007). Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain. *J Pharm Pharmacol*, **59(7)**: 935-940. doi:10.1211/jpp.59.7.0004
- GURUNATHAN, JEYARAJ, KANG, KIM (2019). Mitochondrial Peptide Humanin Protects Silver Nanoparticles-Induced Neurotoxicity in Human Neuroblastoma Cancer Cells (SH-SY5Y). *International Journal of Molecular Sciences*, **20(18)**: 4439. doi:10.3390/ijms20184439
- HASHIMOTO Y, ITO Y, NIIKURA T, SHAO Z, HATA M, OYAMA F, NISHIMOTO I (2001). Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **283(2)**: 460-468. doi:10.1006/bbrc.2001.4765
- HOWE K, CLARK MD, TORROJA CF, TORRANCE J, BERTHELOT C, MUFFATO M, COLLINS JE, HUMPHRAY S, MCLAREN K, MATTHEWS L, MCLAREN S, SEALY I, CACCAMO M, CHURCHER C, SCOTT C, BARRETT JC, KOCH R, RAUCH G-J, WHITE S, CHOW W, KILIAN B, QUINTAIS LT, GUERRA-ASSUNÇÃO JA, ZHOU Y, GU Y, YEN J, VOGEL J-H, EYRE T, REDMOND S, BANERJEE R, CHI J, FU B, LANGLEY E, MAGUIRE SF, LAIRD GK, LLOYD D, KENYON E, DONALDSON S, SEHRA H, ALMEIDA-KING J, LOVELAND J, TREVANION S, JONES M, QUAIL M, WILLEY D, HUNT A, BURTON J, SIMS S, MCLAY K, PLUMB B, DAVIS J, CLEE C, OLIVER K, CLARK R, RIDDLE C, ELLIOTT D, THREADGOLD G, HARDEN G, WARE D, BEGUM S, MORTIMORE B, KERRY G, HEATH P, PHILLIMORE B, TRACEY A, CORBY N, DUNN M, JOHNSON C, WOOD J, CLARK S, PELAN S, GRIFFITHS G, SMITH M, GLITHERO R, HOWDEN P, BARKER N, LLOYD C, STEVENS C, HARLEY J, HOLT K, PANAGIOTIDIS G, LOVELL J, BEASLEY H, HENDERSON C, GORDON D, AUGER K, WRIGHT D, COLLINS J, RAISEN C, DYER L, LEUNG K, ROBERTSON L, AMBRIDGE K, LEONGAMORNLEET D, MCGUIRE S, GILDERTHORP R, GRIFFITHS C, MANTHRAVADI D, NICHOL S, BARKER G, WHITEHEAD S, KAY M, BROWN J, MURNANE C, GRAY E, HUMPHRIES M, SYCAMORE N, BARKER D, SAUNDERS D, WALLIS J, BABBAGE A, HAMMOND S, MASHREGHI-MOHAMMADI M, BARR L, MARTIN S, WRAY P, ELLINGTON A, MATTHEWS N, ELLWOOD M, WOODMANSEY R, CLARK G, COOPER JD, TROMANS A, GRAFHAM D, SKUCE C, PANDIAN R, ANDREWS R, HARRISON E, KIMBERLEY A, GARNETT J, FOSKER N, HALL R, GARNER P, KELLY D, BIRD C, PALMER S, GEHRING I, BERGER A, DOOLEY CM, ERSAN-ÜRÜN Z, ESER C, GEIGER H, GEISLER M, KAROTKI L, KIRN A, KONANTZ J, KONANTZ M, OBERLÄNDER M, RUDOLPH-GEIGER S, TEUCKE M, LANZ C, RADDATZ G, OSOEGAWA K, ZHU B, RAPP A, WIDAA S, LANGFORD C, YANG F, SCHUSTER SC, CARTER NP, HARROW J, NING Z, HERRERO J, SEARLE SMJ, ENRIGHT A, GEISLER R, PLASTERK RHA, LEE C, WESTERFIELD M, DE JONG PJ, ZON LI, POSTLETHWAIT JH, NÜSSLEIN-VOLHARD C, HUBBARD TJP,

- CROLLIUS HR, ROGERS J, STEMPLE DL (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, **496(7446)**: 498-503. doi:10.1038/nature12111
- HU FQ, YUAN H, ZHANG HH, FANG M (2002). Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm*, **239(1-2)**: 121-128.
- HU L, TANG X, CUI F (2004). Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56(12)**: 1527-1535. doi:10.1211/0022357044959
- HUYNH GH, DEEN DF, SZOKA FC, JR. (2006). Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J Control Release*, **110(2)**: 236-259. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.053
- HUYNH TV, DAVIS AA, ULRICH JD, HOLTZMAN DM (2017). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res*, **58(5)**: 824-836. doi:10.1194/jlr.R075481
- ICH Q2(R1) (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, (Erişim tarihi: 11.01.2021), European Medicines Agency, London, UK.
- IRUDAYANATHAN FJ, WANG N, WANG X, NANGIA S (2017). Architecture of the paracellular channels formed by claudins of the blood-brain barrier tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, **1405(1)**: 131-146. doi:10.1111/nyas.13378
- JACOBSON SA, SABBAGH MN (2008). Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **4(10)**: 1363-1369. doi:10.1517/17425255.4.10.1363
- JAIN A, SINGHAI P, GURNANY E, UPDHAYAY S, MODY N (2013). Transferrin-tailored solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of temozolomide to brain. *Journal of Nanoparticle Research*, **15(3)**. doi:10.1007/s11051-013-1518-4
- JAIN AK, THAREJA S (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **47(1)**: 524-539. doi:10.1080/21691401.2018.1561457
- JAVED I, PENG G, XING Y, YU T, ZHAO M, KAKINEN A, FARIDI A, PARISH CL, DING F, DAVIS TP, KE PC, LIN S (2019). Inhibition of amyloid beta toxicity in zebrafish with a chaperone-gold nanoparticle dual strategy. *Nature Communications*, **10(1)**. doi:10.1038/s41467-019-11762-0

- JONES R (2007). Let Sleeping Zebrafish Lie: A New Model for Sleep Studies. *PLoS Biology*, **5(10)**: e281. doi:10.1371/journal.pbio.0050281
- KAFKALA S, MATTHAIOU S, ALEXAKI P, ABATZIS M, BARTZELIOTIS A, KATSIABANI M (2008). New gradient high-performance liquid chromatography method for determination of donepezil hydrochloride assay and impurities content in oral pharmaceutical formulation. *J Chromatogr A*, **1189(1-2)**: 392-397. doi:10.1016/j.chroma.2007.12.015
- KANEKIYO T, XU H, BU G (2014). ApoE and Abeta in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron*, **81(4)**: 740-754. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.045
- KARCH CM, CRUCHAGA C, GOATE AM (2014). Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic. *Neuron*, **83(1)**: 11-26. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.041
- KAUR IP, BHANDARI R, BHANDARI S, KAKKAR V (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *J Control Release*, **127(2)**: 97-109. doi:10.1016/j.jconrel.2007.12.018
- KEVADIYA BD, OTTEMANN BM, THOMAS MB, MUKADAM I, NIGAM S, MCMILLAN J, GORANTLA S, BRONICH TK, EDAGWA B, GENDELMAN HE (2019). Neurotheranostics as personalized medicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **148**: 252-289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.011>
- KIMURA M, AKASOFU S, OGURA H, SAWADA K (2005). Protective effect of donepezil against Abeta(1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. *Brain Res*, **1047(1)**: 72-84. doi:10.1016/j.brainres.2005.04.014
- KISS L, WALTER FR, BOCSIK A, VESZELKA S, OZSVÁRI B, PUSKÁS LG, SZABÓ-RÉVÉSZ P, DELI MA (2013). Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J Pharm Sci*, **102(4)**: 1173-1181. doi:10.1002/jps.23458
- KONG J, YU S (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **39(8)**: 549-559. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x
- KORABECNY J, ZEMEK F, SOUKUP O, SPILOVSKA K, MUSILEK K, JUN D, NEPOVIMOVA E, KUCA K. (2014). Chapter 1 - Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future Perspectives. In: *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease* Ed.: Atta ur, R. Choudhary, M. I.: Elsevier. 3-39.

- KRAUSE G, WINKLER L, MUELLER SL, HASELOFF RF, PIONTEK J, BLASIG IE (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et biophysica acta*, **1778(3)**: 631-645. doi:10.1016/j.bbamem.2007.10.018
- KRIZBAI IA, NYÚL-TÓTH Á, BAUER HC, FARKAS AE, TRAWEGER A, HASKÓ J, BAUER H, WILHELM I (2016). Pharmaceutical Targeting of the Brain. *Curr Pharm Des*, **22(35)**: 5442-5462. doi:10.2174/1381612822666160726144203
- KUMAR A, AGGARWAL A, SINGH A, PATTIPATI S (2016). Animal Models in Drug Discovery of Alzheimer's Disease: A Mini Review. *EC PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY*, **2**: 60-79.
- KUMAR VV, CHANDRASEKAR D, RAMAKRISHNA S, KISHAN V, RAO YM, DIWAN PV (2007). Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: Influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, **335(1)**: 167-175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.004>
- KUO Y-C, CHENG S-J (2016). Brain targeted delivery of carmustine using solid lipid nanoparticles modified with tamoxifen and lactoferrin for antitumor proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, **499(1)**: 10-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.054>
- KUO Y-C, WANG L-J (2014). Transferrin-grafted cationic solid lipid nanoparticles for targeting delivery of saquinavir to the brain. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **45(3)**: 755-763. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.09.024>
- KÜÇÜKTÜRKMEN B, BOZKIR A (2018). Development and characterization of cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide to glioblastoma cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **44(2)**: 306-315. doi:10.1080/03639045.2017.1391835
- KÜÇÜKTÜRKMEN B, ÖZ UC, BOZKIR A (2017). In Situ Hydrogel Formulation for Intra-Articular Application of Diclofenac Sodium-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, **14(1)**: 56-64. doi:10.4274/tjps.84803
- LAMBERT J-C, AMOUEL P (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Current Opinion in Genetics & Development*, **21(3)**: 295-301. doi:10.1016/j.gde.2011.02.002
- LEI K (2014). Review on Impedance Detection of Cellular Responses in Micro/Nano Environment. *Micromachines*, **5(1)**: 1-12. doi:10.3390/mi5010001

- LI Q, HE S, CHEN Y, FENG F, QU W, SUN H (2018). Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, **158**: 463-477. doi:10.1016/j.ejmech.2018.09.031
- LI S, PENG Z, DALLMAN J, BAKER J, OTHMAN AM, BLACKWELDER PL, LEBLANC RM (2016). Crossing the blood–brain–barrier with transferrin conjugated carbon dots: A zebrafish model study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **145**: 251-256. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.007
- LI X, TSIBOUKLIS J, WENG T, ZHANG B, YIN G, FENG G, CUI Y, SAVINA IN, MIKHALOVSKA LI, SANDEMAN SR, HOWEL CA, MIKHALOVSKY SV (2017). Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, **25(1)**: 17-28. doi:10.1080/1061186x.2016.1184272
- LIAO H-K, WANG Y, NOACK WATT KE, WEN Q, BREITBACH J, KEMMET CK, CLARK KJ, EKKER SC, ESSNER JJ, MCGRIL M (2012). Tol2 gene trap integrations in the zebrafish amyloid precursor protein genes *appa* and *aplp2* reveal accumulation of secreted APP at the embryonic veins. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **241(2)**: 415-425. doi:10.1002/dvdy.23725
- LIEW KB, TAN YT, PEH KK (2012). Characterization of oral disintegrating film containing donepezil for Alzheimer disease. *AAPS PharmSciTech*, **13(1)**: 134-142. doi:10.1208/s12249-011-9729-4
- LIU J, HU W, CHEN H, NI Q, XU H, YANG X (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **328(2)**: 191-195. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.007>
- LIU Y, HUANG R, HAN L, KE W, SHAO K, YE L, LOU J, JIANG C (2009). Brain-targeting gene delivery and cellular internalization mechanisms for modified rabies virus glycoprotein RVG29 nanoparticles. *Biomaterials*, **30(25)**: 4195-4202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.051>
- LOCKMAN PR, KOZIARA JM, MUMPER RJ, ALLEN DD (2004). Nanoparticle Surface Charges Alter Blood–Brain Barrier Integrity and Permeability. *Journal of Drug Targeting*, **12(9-10)**: 635-641. doi:10.1080/10611860400015936
- LOMBARDO SM, SCHNEIDER M, TÜRELI AE, GÜNDAY TÜRELI N (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **11**: 866-883. doi:10.3762/bjnano.11.72
- MAHLEY RW, WEISGRABER KH, HUANG Y (2006). Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103(15)**: 5644-5651. doi:10.1073/pnas.0600549103

- MANDAL B, BHATTACHARJEE H, MITTAL N, SAH H, BALABATHULA P, THOMA LA, WOOD GC (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine*, **9(4)**: 474-491. doi:10.1016/j.nano.2012.11.010
- MANGIALASCHE F, SOLOMON A, WINBLAD B, MECOCCHI P, KIVIPELTO M (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, **9(7)**: 702-716. doi:10.1016/s1474-4422(10)70119-8
- MANJUNATH K, REDDY JS, VENKATESWARLU V (2005). Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **27(2)**: 127-144. doi:10.1358/mf.2005.27.2.876286
- MARTINS S, COSTA-LIMA S, CARNEIRO T, CORDEIRO-DA-SILVA A, SOUTO EB, FERREIRA DC (2012). Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *International Journal of Pharmaceutics*, **430(1)**: 216-227. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.032>
- MARTINS S, THO I, SOUTO E, FERREIRA D, BRANDL M (2012). Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **45(5)**: 613-623. doi:10.1016/j.ejps.2011.12.015
- MAYDEN RL, TANG KL, CONWAY KW, FREYHOF J, CHAMBERLAIN S, HASKINS M, SCHNEIDER L, SUDKAMP M, WOOD RM, AGNEW M, BUFALINO A, SULAIMAN Z, MIYA M, SAITOH K, HE S (2007). Phylogenetic relationships of Danio within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **308(5)**: 642-654. doi:10.1002/jez.b.21175
- MCCLOY RA, ROGERS S, CALDON CE, LORCA T, CASTRO A, BURGESS A (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*, **13(9)**: 1400-1412. doi:10.4161/cc.28401
- MD S, ALI M, BABOOTA S, SAHNI JK, BHATNAGAR A, ALI J (2014). Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm*, **40(2)**: 278-287. doi:10.3109/03639045.2012.758130
- MEAIRS S (2015). Facilitation of Drug Transport across the Blood–Brain Barrier with Ultrasound and Microbubbles. *Pharmaceutics*, **7(3)**: 275-293. doi:10.3390/pharmaceutics7030275
- MEHNERT W, MADER K (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*, **47(2-3)**: 165-196.

- MENDES IT, RUELA ALM, CARVALHO FC, FREITAS JTJ, BONFILIO R, PEREIRA GR (2019). Development and characterization of nanostructured lipid carrier-based gels for the transdermal delivery of donepezil. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **177**: 274-281. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.02.007
- MÉSZÁROS M, PORKOLÁB G, KISS L, PILBAT A, KÓTA Z, KUPIHÁR Z, KÉRI A, GALBÁCS G, SIKLÓS L, TÓTH A, FÜLÖP L, CSETE M, SIPOS Á, HÜLPER P, SIPOS P, PÁLI T, RÁKHELY G, SZABÓ-RÉVÉSZ P, DELI MA, VESZELKA S (2018). Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **123**: 228-240. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.042>
- MIGLIETTA A, CAVALLI R, BOCCA C, GABRIEL L, GASCO MR (2000). Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int J Pharm*, **210(1-2)**: 61-67. doi:10.1016/s0378-5173(00)00562-7
- MISHRA V, BANSAL K, VERMA A, YADAV N, THAKUR S, SUDHAKAR K, ROSENHOLM J (2018). Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, **10(4)**: 191. doi:10.3390/pharmaceutics10040191
- MISRA S, CHOPRA K, SINHA VR, MEDHI B (2016). Galantamine-loaded solid-lipid nanoparticles for enhanced brain delivery: preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluations. *Drug Delivery*, **23(4)**: 1434-1443. doi:10.3109/10717544.2015.1089956
- MUKHERJEE S, RAY S, THAKUR RS (2009). Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, **71(4)**: 349-358. doi:10.4103/0250-474X.57282
- MULIK RS, MÖNKKÖNEN J, JUVONEN RO, MAHADIK KR, PARADKAR AR (2010). ApoE3 Mediated Poly(butyl) Cyanoacrylate Nanoparticles Containing Curcumin: Study of Enhanced Activity of Curcumin against Beta Amyloid Induced Cytotoxicity Using In Vitro Cell Culture Model. *Molecular Pharmaceutics*, **7(3)**: 815-825. doi:10.1021/mp900306x
- NAKAGAWA S, DELI MA, KAWAGUCHI H, SHIMIZUDANI T, SHIMONO T, KITTEL A, TANAKA K, NIWA M (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, **54(3-4)**: 253-263. doi:10.1016/j.neuint.2008.12.002
- NAKAGAWA S, DELI MA, NAKAO S, HONDA M, HAYASHI K, NAKAOKE R, KATAOKA Y, NIWA M (2007). Pericytes from Brain Microvessels Strengthen the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **27(6)**: 687-694. doi:10.1007/s10571-007-9195-4

- NATIONAL INSTITUTE ON AGING (2019). Alzheimer's Disease Fact Sheet. Erişim: [<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>]. Erişim Tarihi: [10.03.2021]
- NEVES AR, QUEIROZ JF, LIMA SAC, REIS S (2017). Apo E-Functionalization of Solid Lipid Nanoparticles Enhances Brain Drug Delivery: Uptake Mechanism and Transport Pathways. *Bioconjugate Chemistry*, **28(4)**: 995-1004. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00705
- NEVES AR, QUEIROZ JF, REIS S (2016). Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. **14(1)**. doi:10.1186/s12951-016-0177-x
- NEVES AR, QUEIROZ JF, WEKSLER B, ROMERO IA, COURAUD P-O, REIS S (2015). Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: two new strategies of functionalization with apolipoprotein E. **26(49)**: 495103. doi:10.1088/0957-4484/26/49/495103
- NEWMAN M, EBRAHIMIE E, LARDELLI M (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*, **5**. doi:10.3389/fgene.2014.00189
- NEWMAN M, NORNES S, MARTINS RN, LARDELLI MT (2012). Robust homeostasis of Presenilin1 protein levels by transcript regulation. *Neurosci Lett*, **519(1)**: 14-19. doi:10.1016/j.neulet.2012.04.064
- NEWTON AMJ, KAUR S. (2019). Chapter 9 - Solid lipid nanoparticles for skin and drug delivery: Methods of preparation and characterization techniques and applications. In: *Nanoarchitectonics in Biomedicine* Ed.: Grumezescu, A. M.: William Andrew Publishing. 295-334.
- NGOC LE HT, KIM J, PARK J, CHO S (2019). A Review of Electrical Impedance Characterization of Cells for Label-Free and Real-Time Assays. *BioChip Journal*, **13(4)**: 295-305. doi:10.1007/s13206-019-3401-6
- NGUYEN KT, PHAM MN, VO TV, DUAN W, TRAN PH, TRAN TT (2017). Strategies of Engineering Nanoparticles for Treating Neurodegenerative Disorders. *Curr Drug Metab*, **18(9)**: 786-797. doi:10.2174/1389200218666170125114751
- NIIKURA T, CHIBA T, AISO S, MATSUOKA M, NISHIMOTO I (2004). Humanin: after the discovery. *Mol Neurobiol*, **30(3)**: 327-340. doi:10.1385/MN:30:3:327
- NISHIMOTO I, MATSUOKA M, NIIKURA T (2004). Unravelling the role of Humanin. *Trends Mol Med*, **10(3)**: 102-105.

- NORDBERG A, SVENSSON AL (1998). Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf*, **19(6)**: 465-480. doi:10.2165/00002018-199819060-00004
- ODA T, KUME T, KATSUKI H, NIIDOME T, SUGIMOTO H, AKAIKE A (2007). Donepezil Potentiates Nerve Growth Factor-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, **104(4)**: 349-354. doi:10.1254/jphs.fp0070563
- OLBRICH C, KAYSER O, MÜLLER RH (2002). Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)—effect of surfactants, storage time and crystallinity. *International Journal of Pharmaceutics*, **237(1-2)**: 119-128. doi:10.1016/s0378-5173(02)00035-2
- PARDRIDGE WM. (1985). Chapter 31. Strategies for Delivery of Drugs Through the Blood-Brain Barrier. In: *Annual Reports in Medicinal Chemistry* Ed.: Bailey, D. M.: Academic Press. Vol. 20, 305-313.
- PARDRIDGE WM. (2001a). Drug targeting, drug discovery, and brain drug development. In: *Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development* Ed.: Pardridge, W. M., Cambridge: Cambridge University Press. 1-12.
- PARDRIDGE WM. (2001b). Vector discovery: genetically engineered Trojan horses for drug targeting. In: *Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development* Ed.: Pardridge, W. M., Cambridge: Cambridge University Press. 126-154.
- PARDRIDGE WM (2003). BLOOD-BRAIN BARRIER DRUG TARGETING: THE FUTURE OF BRAIN DRUG DEVELOPMENT. *Molecular Interventions*, **3(2)**: 90-105. doi:10.1124/mi.3.2.90
- PARDRIDGE WM (2005). The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRX*, **2(1)**: 3-14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
- PARDRIDGE WM (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, **12(1-2)**: 54-61. doi:10.1016/j.drudis.2006.10.013
- PATHAN SA, IQBAL Z, ZAIDI SM, TALEGAONKAR S, VOHRA D, JAIN GK, AZEEM A, JAIN N, LALANI JR, KHAR RK, AHMAD FJ (2009). CNS drug delivery systems: novel approaches. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, **3(1)**: 71-89. doi:10.2174/187221109787158355
- PETROV A, TSA A, PUGLISI JD (2013). Analysis of RNA by analytical polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, **530**: 301-313. doi:10.1016/b978-0-12-420037-1.00016-6

- PISTOLESI S, ROSSINI L, FERRO E, BASOSI R, TRABALZINI L, POGNI R (2009). Humanin structural versatility and interaction with model cerebral cortex membranes. *Biochemistry*, **48(22)**: 5026-5033. doi:10.1021/bi900187s
- POOJA D, PANYARAM S, KULHARI H, RACHAMALLA SS, SISTLA R (2014). Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers*, **110**: 1-9. doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.041
- POOJA D, TUNKI L, KULHARI H, REDDY BB, SISTLA R (2016). Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *Data in Brief*, **6**: 15-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.038>
- PRABHAKARAN E, HASAN A, KARUNANIDHI P (2011). Solid lipid nanoparticles: A review. **2**.
- PRINCE MWA. (2015). World Alzheimer Report 2015. Alzheimer's Disease International (ADI), London.
- PRIYANKA K, SAHU PL, SINGH S (2018). Optimization of processing parameters for the development of Ficus religiosa L. extract loaded solid lipid nanoparticles using central composite design and evaluation of antidiabetic efficacy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **43**: 94-102. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.08.006>
- PSIMADAS D, TSOTAKOS T, FRAGOGEORGI E, LOUDOS G (2015). Nanomedicinal Approach of Getting Across the Blood-Brain Barrier with Nanomedicinal Nanoparticles. *Curr Med Chem*, **22(37)**: 4257-4270. doi:10.2174/0929867322666151029105302
- QIN J, CHEN D, HU H, CUI Q, QIAO M, CHEN B (2007). Surface modification of RGD-liposomes for selective drug delivery to monocytes/neutrophils in brain. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **55(8)**: 1192-1197. doi:10.1248/cpb.55.1192
- RADHAKRISHNAN R, KULHARI H, POOJA D, GUDEM S, BHARGAVA S, SHUKLA R, SISTLA R (2016). Encapsulation of biophenolic phytochemical EGCG within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer. *Chemistry and Physics of Lipids*, **198**: 51-60. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.05.006
- RAFII MS, AISEN PS (2015). Advances in Alzheimer's Disease Drug Development. *BMC Medicine*, **13(1)**. doi:10.1186/s12916-015-0297-4
- REDZIC Z (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and Barriers of the CNS*, **8(1)**: 3. doi:10.1186/2045-8118-8-3

- RISS T (2017). Is your MTT assay really the best choice. *Promega Corporation website* <http://www.promega.in/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/> (Accessed March 19 2018).
- RIZZO LY, GOLOMBEK SK, MERTENS ME, PAN Y, LAAF D, BRODA J, JAYAPPAUL J, MÖCKEL D, SUBR V, HENNINK WE, STORM G, SIMON U, JAHNEN-DECHENT W, KIESSLING F, LAMMERS T (2013). In vivo nanotoxicity testing using the zebrafish embryo assay. *Journal of Materials Chemistry B*, **1(32)**: 3918. doi:10.1039/c3tb20528b
- ROBINSON M, LEE B, LEONENKO Z (2015). Drugs and Drug Delivery Systems Targeting Amyloid-beta in Alzheimers Disease. *AIMS Molecular Science*, **2(3)**: 332-358.
- ROMEO M, STRAVALACI M, BEEG M, ROSSI A, FIORDALISO F, CORBELLI A, SALMONA M, GOBBI M, CAGNOTTO A, DIOMEDE L (2017). Humanin Specifically Interacts with Amyloid-beta Oligomers and Counteracts Their in vivo Toxicity. *J Alzheimers Dis*, **57(3)**: 857-871. doi:10.3233/JAD-160951
- RUELA A, CARVALHO F, PEREIRA G (2015). Exploring the Phase Behavior of Monoolein/Oleic Acid/Water Systems for Enhanced Donepezil Administration for Alzheimer Disease Treatment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **105**. doi:10.1016/j.xphs.2015.10.016
- RXMEDIAPHARMA (2017). İnteraktif İlaç Kaynağı, (Erişim tarihi: Aralık 2020), Gemaş A.Ş., İzmir, Türkiye.
- SADEGH MALVAJERD S, AZADI A, IZADI Z, KURD M, DARA T, DIBAEI M, SHARIF ZADEH M, AKBARI JAVAR H, HAMIDI M (2019). Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. *ACS Chemical Neuroscience*, **10(1)**: 728-739. doi:10.1021/acscemneuro.8b00510
- SALARI S, BAGHERI M (2016). A review of animal models of Alzheimer's disease. *Physiology and Pharmacology*, **20**: 5-11.
- SALATIN S, YARI KHOSROUSHAHI A (2017). Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21(9)**: 1668-1686. doi:10.1111/jcmm.13110
- SAMANTA MK, WILSON B, SANTHI K, KUMAR KP, SURESH B (2006). Alzheimer disease and its management: a review. *Am J Ther*, **13(6)**: 516-526. doi:10.1097/01.mjt.0000208274.80496.f1
- SARAIVA C, PRACA C, FERREIRA R, SANTOS T, FERREIRA L, BERNARDINO L (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain

barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release*, **235**: 34-47. doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.044

SARANGI M, PADHI S (2016). Solid Lipid Nanoparticles- A Review. *Journal of Critical Reviews*, **3**: 5-12.

SCHLACHETZKI JCM, SALIBA SW, OLIVEIRA ACPD (2013). Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, **35(suppl 2)**: S92-S100. doi:10.1590/1516-4446-2013-1159

SELEKLER K (2010). ALOIS ALZHEIMER ve ALZHEIMER HASTALIĞI. *TURKISH JOURNAL OF GERIATRICS*, **13**: 9-14.

SELKOE DJ (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, **399(6738)**: A23-A31. doi:10.1038/399a023

SHAHGALDIAN P, DA SILVA E, COLEMAN AW, RATHER B, ZAWOROTKO MJ (2003). Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters. *Int J Pharm*, **253(1-2)**: 23-38.

SIDDIQUI A, ALAYOUBI A, EL-MALAH Y, NAZZAL S (2013). Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM). *Pharmaceutical Development and Technology*, **19**. doi:10.3109/10837450.2013.784336

SIEDLAK SL, CASADESUS G, WEBBER KM, PAPPOLLA MA, ATWOOD CS, SMITH MA, PERRY G (2009). Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res*, **43(2)**: 156-164. doi:10.1080/10715760802644694

SINGH I, SWAMI R, POOJA D, JEENGAR MK, KHAN W, SISTLA R (2016). Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: a new drug delivery system for potential brain targeting. *Journal of Drug Targeting*, **24(3)**: 212-223. doi:10.3109/1061186x.2015.1068320

SINGH S, DOBHAL AK, JAIN A, PANDIT JK, CHAKRABORTY S (2010). Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of a Water Soluble Drug: Zidovudine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58(5)**: 650-655. doi:10.1248/cpb.58.650

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150(1)**: 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7

- SOE ZC, KWON JB, THAPA RK, OU W, NGUYEN HT, GAUTAM M, OH KT, CHOI H-G, KU SK, YONG CS, KIM JO (2019). Transferrin-Conjugated Polymeric Nanoparticle for Receptor-Mediated Delivery of Doxorubicin in Doxorubicin-Resistant Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics*, **11(2)**: 63. doi:10.3390/pharmaceutics11020063
- SPIERS ID, ALPAR HO, EYLES JE, BOZKIR A, MILLER J, WILLIAMSON ED (1999). Studies on the co-encapsulation, release and integrity of two subunit antigens: rV and rF1 from *Yersinia pestis*. *J Pharm Pharmacol*, **51(9)**: 991-997. doi:10.1211/0022357991773456
- STOCKWELL J, ABDI N, LU X, MAHESHWARI O, TAGHIBIGLOU C (2014). Novel Central Nervous System Drug Delivery Systems. *Chemical Biology & Drug Design*, **83(5)**: 507-520. doi:<https://doi.org/10.1111/cbdd.12268>
- STOREY DE (1996). The Role of Dissolution Testing in the Design of Immediate Release Dosage Forms. *Drug Information Journal*, **30(4)**: 1039-1044. doi:10.1177/009286159603000420
- SUNG JC, PULLIAM BL, EDWARDS DA (2007). Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends in Biotechnology*, **25(12)**: 563-570. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.09.005>
- SWEENEY MD, SAGARE AP, ZLOKOVIC BV (2018). Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, **14(3)**: 133-150. doi:10.1038/nrneurol.2017.188
- SZUHAJ BF. (2003). PHOSPHOLIPIDS | Properties and Occurrence. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* Ed.: Caballero, B., Oxford: Academic Press. 4514-4519.
- TAKKA S, ACARTÜRK F, AĞABEYOĞLU İ., ÇELEBİ N, DEĞİM T, DEĞİM Z. (2009). Önformülasyon. In: *Modern Farmasötik Teknoloji* Ed.: F., A., İ., A., N., Ç., T., D., Z., D., T., D., S., T., F., T., Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını.
- TAN M-E, HE C-H, JIANG W, ZENG C, YU N, HUANG W, GAO Z-G, XING J-G (2017). Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. and their therapeutic effect against myocardial ischemia–reperfusion injury in rats. *International Journal of Nanomedicine*, **Volume 12**: 3253-3265. doi:10.2147/ijn.s131893
- TAPEINOS C, BATTAGLINI M, CIOFANI G (2017). Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release*, **264**: 306-332. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.033>

- VAKILINEZHAD MA, AMINI A, AKBARI JAVAR H, BAHAA'DDINI BEIGI ZARANDI BF, MONTASERI H, DINARVAND R (2018). Nicotinamide loaded functionalized solid lipid nanoparticles improves cognition in Alzheimer's disease animal model by reducing Tau hyperphosphorylation. *Daru*, **26(2)**: 165-177. doi:10.1007/s40199-018-0221-5
- VESZELKA S, BOCSIK A, WALTER FR, HANTOSI D, DELI MA (2015). Blood-brain barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: Focus on co-culture systems. **59**: 157-168.
- VESZELKA S, KITTEL A, DELI MA. (2011). Tools of Modelling Blood-Brain Barrier Penetrability. In: Ed. 166-188.
- VESZELKA S, MESZAROS M, KISS L, KOTA Z, PALI T, HOYK Z, BOZSO Z, FULOP L, TOTH A, RAKHELY G, DELI MA (2017). Biotin and Glutathione Targeting of Solid Nanoparticles to Cross Human Brain Endothelial Cells. *Curr Pharm Des*, **23(28)**: 4198-4205. doi:10.2174/1381612823666170727144450
- VOLTERRA A, MELDOLESI J (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, **6(8)**: 626-640. doi:10.1038/nrn1722
- WALTER FR, VESZELKA S, PÁSZTÓI M, PÉTERFI ZA, TÓTH A, RÁKHELY G, CERVENAK L, ÁBRAHÁM CRS, DELI MA (2015). Tesmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *Journal of Neurochemistry*, **134(6)**: 1040-1054. doi:10.1111/jnc.13207
- WANG P, HENNING SM, HEBER D (2010). Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS One*, **5(4)**: e10202. doi:10.1371/journal.pone.0010202
- WEI Y, THYPARAMBIL AA, LATOUR RA (2014). Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230nm. *Biochimica et biophysica acta*, **1844(12)**: 2331-2337. doi:10.1016/j.bbapap.2014.10.001
- WEKSLER B, ROMERO IA, COURAUD P-O (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, **10(1)**: 16. doi:10.1186/2045-8118-10-16
- WILSON B, SAMANTA MK, SANTHI K, KUMAR KP, RAMASAMY M, SURESH B (2010). Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine*, **6(1)**: 144-152. doi:10.1016/j.nano.2009.04.001
- WONG KH, RIAZ MK, XIE Y, ZHANG X, LIU Q, CHEN H, BIAN Z, CHEN X, LU A, YANG Z (2019). Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's

Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, **20(2)**: 381. doi:10.3390/ijms20020381

YAMAZAKI Y, PAINTER MM, BU G, KANEKIYO T (2016). Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs*, **30(9)**: 773-789. doi:10.1007/s40263-016-0361-4

YASIR M, SARA U (2014). DEVELOPMENT OF UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **6(9)**: 128-131.

YASIR M, SARA UVS, CHAUHAN I, GAUR PK, SINGH AP, PURI D, AMEEDUZZAFAR (2017). Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of donepezil: formulation, optimization by Box–Behnken design, in vitro and in vivo evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*: 1-14. doi:10.1080/21691401.2017.1394872

YASSIN AE, IBRAHIM W, AL-OMRANI A (2013). Novel sulpiride-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. *International Journal of Nanomedicine*: 129. doi:10.2147/ijn.s54413

YEN K, LEE C, MEHTA H, COHEN P (2013). The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol*, **50(1)**: R11-19. doi:10.1530/JME-12-0203

YILMAZ USTA D, TEKSİN ZŞ (2015). İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmalarında Yeni Yaklaşımlar. *FABAD J. Pharm. Sci.*, **40**: 33-44.

YING G, IRIBARREN P, ZHOU Y, GONG W, ZHANG N, YU ZX, LE Y, CUI Y, WANG JM (2004). Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol*, **172(11)**: 7078-7085. doi:10.4049/jimmunol.172.11.7078

YUAN L, LIU XJ, HAN WN, LI QS, WANG ZJ, WU MN, YANG W, QI JS (2016). [Gly14]-Humanin Protects Against Amyloid beta Peptide-Induced Impairment of Spatial Learning and Memory in Rats. *Neurosci Bull*, **32(4)**: 374-382. doi:10.1007/s12264-016-0041-x

ZARATE SC, TRAETTA ME, CODAGNONE MG, SEILICOVICH A, REINES AG (2019). Humanin, a Mitochondrial-Derived Peptide Released by Astrocytes, Prevents Synapse Loss in Hippocampal Neurons. *Front Aging Neurosci*, **11**: 123. doi:10.3389/fnagi.2019.00123

ZÁRATE SC, TRAETTA ME, CODAGNONE MG, SEILICOVICH A, REINÉS AG (2019). Humanin, a Mitochondrial-Derived Peptide Released by Astrocytes,

Prevents Synapse Loss in Hippocampal Neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **11**. doi:10.3389/fnagi.2019.00123

ZENARO E, PIACENTINO G, CONSTANTIN G (2017). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, **107**: 41-56. doi:10.1016/j.nbd.2016.07.007

ZHANG C, WAN X, ZHENG X, SHAO X, LIU Q, ZHANG Q, QIAN Y (2014). Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. *Biomaterials*, **35(1)**: 456-465. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.063

ZHANG P, HU L, YIN Q, FENG L, LI Y (2012). Transferrin-modified c[RGDfK]-paclitaxel loaded hybrid micelle for sequential blood-brain barrier penetration and glioma targeting therapy. *Mol Pharm*, **9(6)**: 1590-1598. doi:10.1021/mp200600t

ZHANG Y, PARDRIDGE WM (2001). Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, **76(5)**: 1597-1600. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00222.x

ZHU X, JIN K, HUANG Y, PANG Z. (2019). 7 - Brain drug delivery by adsorption-mediated transcytosis. In: *Brain Targeted Drug Delivery System* Ed.: Gao, H. Gao, X.: Academic Press. 159-183.

ZIMMERMANN M, BORRONI B, CATTABENI F, PADOVANI A, DI LUCA M (2005). Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. *Neurobiology of Disease*, **19**: 237-242. doi:10.1016/j.nbd.2005.01.002

ZLOKOVIC BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, **57(2)**: 178-201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003

ZUR MUHLEN A, SCHWARZ C, MEHNERT W (1998). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm*, **45(2)**: 149-155.

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Kararı



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
İZMİR ULUSLARARASI BİYOTİP VE GENOM ENSTİTÜSÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK)
KARARI



TOPLANTI TARİHİ	28/02/2018	TOPLANTI GÜNÜ	Çarşamba
TOPLANTI SAYISI	02	TOPLANTI SAATİ	15.00

Sayın Prof. Dr. Asuman Bozkır,

02/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Alzheimer Hastalığı Tedavisine Yönelik Humanin İçeren Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, İn-vitro ve İn-vivo Değerlendirilmesi" başlıklı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr. Enişari GÜNELİ Başkan	Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK Başkan Yardımcısı
(Katılamamıştır) Prof. Dr. Belgin ÜNAL Üye	Doç.Dr. Ralph Meuwissen Üye
(Katılamamıştır) Yrd. Doç. Dr. Ayşe Banu DEMİR Üye	(Araştırmacı) Doç. Dr. H. Güneş ÖZHAN BAYHAN Üye
Uzm. Kerem ESMEN Üye	Uzm. Umur KELEŞ Üye
H. Muammer KARAGÖZ Üye	

ÖZGEÇMİŞ

I - Bireysel Bilgiler

Adı : Gizem Rüya
Soyadı : TOPAL
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Evli

II- Eğitimi

2011-2014 Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Eğitimi)
2005-2010 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans Eğitimi)
2000-2005 Samsun Anadolu Lisesi (Lise Eğitimi)
Yabancı dili İngilizce

III- Ünvanları

2010 Eczacı
2014 Uzman Eczacı

IV- Mesleki Deneyim

2010-2011 Ar-Ge Sorumlusu (Adeka İlaç A.Ş.)
2011-2015 Ruhsatlandırma Uzmanı (Polifarma İlaç A.Ş.)
2015-2017 Eczacı (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu)
2017-2020 Araştırma Görevlisi (Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı)
2020- Öğretim Görevlisi (Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı)

V. Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler – SCI/SCI Expanded

1. Topal G.R., Devrim B., Eryılmaz M., Bozkır A., Design of Ciprofloxacin-Loaded Nano-and Microcomposite Particles for Dry Powder Inhaler Formulations: Preparation, Invitro Characterization and Antimicrobial Efficacy, *Journal of Microencapsulation* 35(6) (2018) 533–547.

2. Topal G.R., Mészáros M., Porkoláb G., Szecskó A., Polgár T. F., Siklós L., Deli M.A, Veszeka S., Bozkır A. Apo-E-Targeting Increases the Transfer of Solid Lipid Nanoparticles with Donepezil Cargo across a Culture Model of the Blood–Brain Barrier, *Pharmaceutics*,13(38) (2021) 1-19.

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler

1. Topal G.R., Küçüktürkmen B., Bozkır A., Eczacılıkta Yenilikler-3, Biyobenzer Ürünler, Genel Bakış ve Kılavuzlar Doğrultusunda Değerlendirmeler, *Ankara Üniversitesi Basımevi, Editör: Gülbin Özçelikay İlkay Yıldız 1* (2020).

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Kılıçarslan M., Çamca R., İmamoğlu S., Antep M.N., Ocak B., Yüksel N., Investigation On The Flow Properties And Compresibilities Of Different Direct Tableting Agents By Using Pyridoxine Hydrochloride As A Model Drug, *Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm* 38 (4) (2012) 331-344.

Ulusal ve Uluslararası Konferanslarda Yapılan Sözlü Bildiriler

1. Topal G.R., Devrim B., Eryılmaz M., Bozkır A., Estimation and Preparation of Dry Powder Inhaler Formulations that Consisting of Ciprofloxacin HCl Loaded Nano and Microcomposite Particles For Pulmonary Administration, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 26-29 Haziran 2018, Ankara, Türkiye.

Ulusal ve Uluslararası Konferanslarda Yapılan Yazılı Bildiriler

1. Kiliçarslan M., Çamca R., İmamoğlu S., Antep M.N., Ocak B., Yüksel N., Effects of Different Direct Tableting Agents on The Flow Propeties and Compresibility of Pyridoxine Hydrochloride. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 26-29 Haziran 2012, Ankara, Türkiye.
2. Gun O., Ergin A.D., Gorgoz M., Camca G.R., Arisoy S., Yuksel N., Comparative Evaluation Of Granulac®-Starch Granules Produced By Wet Granulation Method Using PVP Binder In A Low Shear Mixer Granulator, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 Haziran 2015, Ankara, Türkiye.

3. Çamca G.R., Devrim B., Bozkır A., Evaluation and Development Of Ciprofloxacin-Loaded Nanoparticles For Administration By Pulmonary Route. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 Haziran 2015, Ankara, Türkiye.
4. Camca Topal G.R., Devrim B., Bozkır A., Effect of External Aqueous Phase On The Ciprofloxacin HCL Loaded PCL Nanoparticles For Administration By Pulmonary Route, 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 22-24 Eylül 2016, Belgrad-Sırbistan.
5. Camca Topal G.R., Devrim B., Bozkır A., Evaluation And Development Of Dry Powder Inhaler Formulations That Comprising Nanoparticulate Drug Delivery Systems For Administration By Pulmonary Route, 4th Conference on Innovation in Drug Delivery – Site-Specific Drug Delivery, 25-28 Eylül 2016, Juan-les-Pins -Antibes, Fransa.
6. Camca Topal G.R., Devrim B., Bozkır A., Characterization and Efficacy of Inhalable Nanocomposite Microparticles Loaded Ciprofloxacin Hydrochloride, 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 12-14 Mayıs 2017, Ankara-Türkiye.

VI. Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

1. TÜBİTAK Yüksek Lisans Öğrencileri İçin Doktora Burs Programı-2014.
2. DİA-Young Professionals Fellowship-2014.
3. TÜBİTAK Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Bursu-2018.

Projeler

Proje Adı	Proje Destek Kurumu	Görev	Proje Tarihi
Alzheimer Tedavisine Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Etkinliğinin İncelenmesi (18L0237011)	Ankara Üniversitesi BAP	Araştırmacı	2018–2020
Alzheimer Hastalığı Tedavisine Yönelik Humanin İçeren Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, İn-vitro ve İn-vivo Değerlendirilmesi (119S124)	TÜBİTAK	Bursiyer	2019–2021

Üniversite Dışı Deneyim

2019 - 2020 Araştırmacı Hungarian Academy of Sciences Biological Research Center-Szeged.

Verdiği seminerler

1. Pulmoner Yolla Uygulanan Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Temel Yöntemler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Seminer, 10 Nisan 2012.
2. Kanser Tedavisinde siRNA'lar ve siRNA Taşıyıcı Sistemler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Seminer, 25 Ocak 2016.

VII. Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

1. Akademik Personel Oryantasyon Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi, Sertifika, 28/09/2017-02/10/2017.
2. Eğitimcilerin Eğitimi Sertifikası, Ankara Üniversitesi, Sertifika, 04/12/2017-09/01/2018.
3. Biyoteknolojik Ürünlerde Üretim ve İyi İmalat Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Sertifika, 06/04/2018-06/04/2018.
4. İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi Tandoğan Yerleşkesi, Sertifika, 20/03/2019-20/03/2019.
5. Online Öğretici Sertifikası, Ankara Üniversitesi Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi, Sertifika, 20/07/2020-26/07/2020.

Bilimsel kuruluşlara üyelikler

1. Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği, Üye.