



**ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNE
YÖNELİK BOR NANOTEKNOLOJİSİ TEMELLİ
İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Özge ÇAĞLAR YILDIRIM

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ**

2022

Her hakkı saklıdır



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ**

**ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNE YÖNELİK BOR
NANOTEKNOLOJİSİ TEMELLİ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Özge ÇAĞLAR YILDIRIM

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

30 / 12 / 2022

Özge ÇAĞLAR YILDIRIM

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİNE YÖNELİK BOR NANOTEKNOLOJİSİ TEMELLİ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Özge ÇAĞLAR YILDIRIM

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Son yıllarda Alzheimer gibi yıkıcı nörodejeneratif hastalıkların daha etkin ve yenilikçi tedavisini amaçlayan çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Bu tez çalışmasında esterifikasyon reaksiyonu ile yüzeyine folik asit (FA) tutturulmuş heksagonal bor nitrür (hBN) temelli taşıyıcı sistem tasarımı gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hBN-FA taşıma sisteminin SEM-EDX, UV-vis spektrumu, FTIR ve Zetasizer analizleri ile detaylı karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Taşıma sisteminin toksikolojik değerlendirilmesi insan dermal fibroblast hücre kültürlerinde gerçekleştirilmiştir. hBN-FA taşıma sisteminin Memantin(MEM) ve bor lipoik asit (BLA) yükleme ve salınım profili değerlendirilmiş ve ardından retinoik asit ile olgun nöron benzeri hücre dönüşümü sağlanan SHSY-5Y hücrelerinde MTT analizi ile sitotoksitesite çalışması yapılmıştır. İlaç yükleme sonuçları FA ile kaplanmayan hBN'nin BLA'yı yükleme yeteneğine sahip olmadığını ancak MEM için %84,3 ilaç yükleme etkinliğine sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan hBN-FA taşıma sisteminin BLA ve MEM için ilaç yükleme etkinliği sırasıyla %97,5 ve %95'tir. Dönüştürülmüş SHSY-5Y hücre kültüründe 20µM Aβ₍₁₋₄₂₎ peptidi ile in vitro Alzheimer hastalık modeli oluşturularak ilaç yüklü taşıma sisteminin Aβ₍₁₋₄₂₎ toksisitesine karşı nöron koyucu potansiyeli değerlendirilmiştir. hBN-FA+BLA in vitro AH modelinde %99 oranında hücre canlılığı gösterirken; hBN-FA+MEM'in aynı konsantrasyonu ile tedavi edilen hücre grubunda canlılık %94 olarak hesaplanmıştır. Dahası AChE aktivitesi tayini, TAK ve TOS analizi, Akış sitometrisi ve genotoksitesite çalışmaları sitotoksitesite verileriyle köreleydi. Tüm bulgular hazırlanan taşıyıcı sistemin in vitro deneysel AH modelindeki ilk kez aydınlatılmış nöroprotektif etkisinin umut verici olduğunu ve daha detaylı araştırmalar için önemli veriler sunduğunu göstermektedir.

2022, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: Heksagonal bor nitrür, Folik asit, Bor lipoik asit, Deneysel Alzheimer hastalık modeli, Nörodejenerasyon.

ABSTRACT

Ph.D

DEVELOPMENT OF BORON NANOTECHNOLOGY BASED DRUG CARRIAGE SYSTEM FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

Özge ÇAĞLAR YILDIRIM

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

In recent years, the number of studies aiming for more effective and innovative treatment of devastating neurodegenerative diseases such as Alzheimer's has been increasing rapidly. In this thesis, a carrier system based on hexagonal boron nitride (hBN) attached to the surface of folic acid (FA) by esterification reaction was carried out. Detailed characterization studies were performed with SEM-EDX, UV-vis spectrum, FTIR and Zetasizer analyzes for the prepared hBN-FA transport system. Toxicological evaluation of the delivery system was performed on human dermal fibroblast cell cultures. Memantine (MEM) and boron lipoic acid (BLA) loading and release profile of the hBN-FA transport system was evaluated, and then cytotoxicity analysis was performed by MTT assay on SHSY-5Y cells that were transformed into mature neuron-like cells via the use of retinoic acid. Drug loading results showed that non-coated hBN did not have the ability to load BLA, but showed a drug loading efficiency of 84,3% for MEM. On the other hand, the drug loading capacity of the hBN-FA delivery system for BLA and MEM was observed as 97,5% and 95%, respectively. Then, the *in vitro* Alzheimer's disease (AD) model was created with 20 μ M $A\beta_{(1-42)}$ peptide in the differentiated SHSY-5Y cell culture, and the drug delivery potential of the drug-loaded transport system against $A\beta_{(1-42)}$ toxicity was evaluated. While hBN-FA+BLA showed 99% cell viability in the *in vitro* AD model, cell viability was calculated as 94% in the cell group treated with the same concentration of hBN-FA+MEM. Moreover, AChE activity determination, TAK and TOS analysis, Flow cytometry, and genotoxicity studies were correlated with cytotoxicity data. All findings showed that the neuroprotective effect of the drug delivery system, which has been evaluated for the first time in the *in vitro* experimental AD model, is a promising tool and provides important data for further research.

2022, 95 page

Keywords: Hexagonal boron nitride, Folic acid, Boron lipoic acid, Alzheimer disease, Neurodegeneration.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tüm bilgi, tecrübe ve yetkinliğini benimle paylaşan, her zaman yol gösterici olan, tez çalışmamın her aşamasında bana güvenen ve inanan kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

Doktora eğitimim boyunca gerek tez çalışmamda gerekse diğer tüm bilimsel faaliyetlerimde sonsuz bir sabır ile daima yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN'a

Tez çalışmalarımı gerçekleştirme olanağı sağlayan Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine ve Yüksek Teknoloji Uygulama Araştırma Merkezi (YÜTAM)'ne,

Çalışmalarım boyunca her anımda yanımda olan, aynı laboratuvarı ve çalışma ortamını paylaştığım canım Sena ÖNER'e ve desteğini her zaman hissettiren sevgili arkadaşım Arş. Gör. Emine TORAMAN'a,

Bugünlere getiren en kıymetli destekçilerim canım annem Kadriye ÇAĞLAR'a ve babam Ziyeddin ÇAĞLAR'a, benimle ağlayıp benimle gülen ablam Dilek ÇAĞLAR'a, kardeşlerim Sercan ÇAĞLAR ve Ercan ÇAĞLAR'a,

Son olarak sonsuz sabrı, fedakarlığı ve ilgisiyle her koşulda yanımda olan çok sevgili eşim Tolga YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Özge ÇAĞLAR YILDIRIM
Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.2. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi	2
1.2.1. Amiloid plaklar	3
1.2.2. Nörofibriller yumaklar (NFTs)	5
1.2.3. Sinaptik kayıp	5
1.3. Alzheimer Hastalığının Aşamaları.....	5
1.4. Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Risk Faktörleri.....	6
1.4.1. Kolinergic hipotez.....	7
1.4.2. Amiloid kaskad hipotezi	7
1.5. Alzheimer Hastalığının Tedavisi.....	8
1.5.1. Tedavi stratejilerin avantaj ve dezavantajları.....	9
1.6. Nanoteknoloji.....	10
1.6.1. Tarihçe.....	10
1.6.2. Nanoteknolojinin uygulama alanları	13
1.7. İlaç Taşıma Sistemleri.....	17
1.8. Nano İlaç Taşıma ve Salınım Sistemleri.....	18
1.8.1. Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri.....	18
1.8.2. Polimerik nanopartiküller.....	20
1.8.3. Seramik nanopartiküller	20
1.8.4. Metalik nanopartiküller	20
1.8.5. Lipozomlar	20
1.8.6. Dendrimerler	21
1.8.7. Nanotüp ve grafen.....	21

1.9. Nano Taşıyıcı Sistemlerde Hedefleme Ligandları	22
1.9.1. Karbonhidratlar	23
1.9.2. Peptidler	23
1.9.3. Monoklonal antikolar.....	23
1.9.4. Hiyalüronik asit.....	24
1.9.5. Aptamer.....	24
1.9.6. Folik asit.....	24
1.10. Bor.....	25
1.10.1. Borun canlılar için önemi.....	26
1.10.2. Bor toksisitesi ve tolerans mekanizmaları	27
1.10.3. Bor nitrür ve nanoteknoloji	28
1.10.4. hBN nanomalzemelerin işlevselleştirilmesi.....	30
1.10.5. hBN nanomalzemelerin özellikleri ve uygulama alanları.....	31
2. KAYNAK ÖZETLERİ	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1. Materyaller	46
3.1.1. Kimyasallar	46
3.1.2. Cihazlar	47
3.2. Yöntem.....	47
3.2.1. hBN-FA nano konjugatlarının hazırlanması	47
3.2.2. Karakterizasyon.....	48
3.2.3. <i>İn vitro</i> toksisite çalışması.....	48
3.2.4. hBN-FA yapılarına BLA ve memantin ilaçlarının yüklenmesi ve ilaç yükleme ve salınım potansiyellerinin değerlendirilmesi	50
3.2.5. İlaç yüklü nano taşıyıcı sistemin <i>in vitro</i> Alzheimer hastalık modelinde etkinliğinin değerlendirilmesi.....	51
3.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	55
4.1. hBN-FA Nano Konjugatlarının Hazırlanması ve Karakterizasyon	55
4.2. <i>İn vitro</i> Toksikite Çalışması	62
4.3. hBN-FA Taşıyıcı Sistemine BLA ve MEM İlaçlarının Yüklenmesi, İlaç Yükleme ve Salınım Potansiyellerinin Değerlendirilmesi.....	64
4.4. İlaç Yüklü Nano Taşıyıcı Sistemin <i>İn vitro</i> Alzheimer Hastalık Modelinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	68

4.4.1. SHSY-5Y hücre hattıyla <i>in vitro</i> Alzheimer hastalık modelinin oluşturulması ...	68
4.4.2. İlaç yüklü taşıyıcı sistemin olgun nöron hücrelerine farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültüründe toksisitesinin belirlenmesi	70
4.4.3. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi.....	72
4.4.4. Toplam antioksidant kapasitesi ve oksidant durumu tayini	74
4.4.5. Akış sitometrisi analizi.....	75
4.4.6. Mikroçekirdek analizi	77
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	79
5.1. Sonuç.....	79
5.2. Öneriler	79
KAYNAKLAR	81



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°	Derece
µM	Mikromolar
dk	Dakika
mL	Mililitre
mg	Miligram
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin Esteraz
AH	Alzheimer Hastalığı
APP	Amiloid Prekürsör Protein
BLA	Bor Lipoik Asit
hBN	Hekzagonal Bor Nitrür
hBN-FA	Hekzagonal Bor Nitrür + Folik Asit
MEM	Memantin
NFT	Nörofibriler Yumaklar
NMDA	N-metil D-aspartat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Normal bir nöron (solda) ve Alzheimer hastalığından etkilenen bir nöron (sağda).....	2
Şekil 1.2.	Beyin ve nöronların fizyolojik yapısı a. Sağlıklı beyin ve b. AH beyin (Breijyeh and Karaman 2020).....	3
Şekil 1.3.	APP'den çözünmeyen β -amiloidlerin oluşumunu temsil eden şematik diyagram (Abeysinghe et al. 2020).....	4
Şekil 1.4.	Alzheimer hastalığının risk faktörleri (Moreno-Gonzalez et al. 2020).....	6
Şekil 1.5.	Nanopartikül sentezi özetleyen diyagram.....	11
Şekil 1.6.	Bazı yapıların boyutu hakkında bilgi veren ölçek (Rao and Cheetham, 2001).....	12
Şekil 1.7.	Nanoteknolojinin bazı uygulama alanları.....	13
Şekil 1.8.	Bazı nano dağıtım sistemlerinin şematik yapıları (Maghsoudnia et al. 2020).....	22
Şekil 1.9.	Bazı borlu nanoyapılar a. hBN nano levha b. hBN nano tabaka c. hBN nanotüp (Weng et al. 2016).....	29
Şekil 4.1.	hBN nanopartiküllerine ait SEM görüntüleme sonucu.....	56
Şekil 4.2.	hBN-FA nanopartiküllerine ait SEM görüntüleme sonucu.....	57
Şekil 4.3.	hBN'ye ait EDX analizi sonucu.....	58
Şekil 4.4.	hBN-FA'ya ait EDX analizi sonucu.....	59
Şekil 4.5.	hBN, FA ve hBN-FA'nın 290 nm'de UV-vis spektrofotometre sonucu.....	60
Şekil 4.6.	hBN ve hBN-FA'ya ait FTIR sonucu.....	62
Şekil 4.7.	hBN ve hBN-FA'nın insan dermal fibroblast hücreleri (HDFa) üzerinde 24 saat boyunca <i>in vitro</i> sitotoksitesini gösteren MTT analizi sonucu. Sembol (*), negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farkı temsil eder.	64
Şekil 4.8.	200-800nm aralığında BLA'nın UV-vis spektrumu.....	65
Şekil 4.9.	200-800nm aralığında MEM'in UV-vis spektrumu.....	65
Şekil 4.11.	Retinoik asit uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaştırılması A. Retinoik asit uygulaması yapılmayan SHSY-5Y hücreleri B. 11 gün süreyle 10 μ M trans retinoik asit uygulanan SHSY-5Y hücreleri.....	69

- Şekil 4.12.** MTT tahlili kullanılarak 24 saat boyunca farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hatlarında hBN-FA+BLA ve hBN-FA+MEM' in (0-500 µg/mL) sitotoksitesisi. 70
- Şekil 4.13.** 24 saat boyunca deneysel AH modelinde hücre canlılığı testleri (MTT ve LDH tahlilleri) hBN-FA, hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM ve β-amiloid (50 µg/mL ve 25 µg/mL). Sembol (*), önemli düzeyde artan hücre canlılığını temsil eder. 71
- Şekil 4.14.** 24 saat boyunca deneysel AH modelinde β-amiloid+hBN-FA, β-amiloid+hBN-FA-BLA, β-amiloid+hBN-FA+MEM ve β-amiloid (25 µg/mL) ve negatif kontrol gruplarındaki AChE aktivitesi. Sembol (*), önemli düzeyde artan AChE aktivitesini temsil eder. 73
- Şekil 4.15.** hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM, hBN'nin (25µg/mL) beta-amiloid sitotoksitesisine karşı akış sitometri analizi (annexin V- (FL1-H) ve PI- (FL2-H) etiketli hücreler). **A)** Negatif kontrol **B)** hBN-FA+BLA, **C)** hBN-FA+MEM, **D)** hBN-FA, **E)** sadece β-amiloid. İstatistiksel analiz, tek yönlü bir ANOVA ve ardından Tukey's post-hoc testi kullanılarak yapıldı. Sembol (*), beta-amiloid uygulamasına kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir artışı temsil eder. 76
- Şekil 4.16.** Hoechst 33258 floresan boyaması ile farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hatlarına 24 saat boyunca 25 µg/mL β-amiloid+hBN-FA, β-amiloid+hBN-FA-BLA, β-amiloid+hBN-FA-MEM ve β-amiloid uygulamalarının genotoksitesite üzerindeki etkisi (20X büyütme). **A)** β-amiloid+hBN-FA+BLA **B)** β-amiloid+hBN-FA+MEM **C)** sadece β-amiloid **D)** β-amiloid+hBN-FA..... 78

ÇİZELGELER DİZİNİ

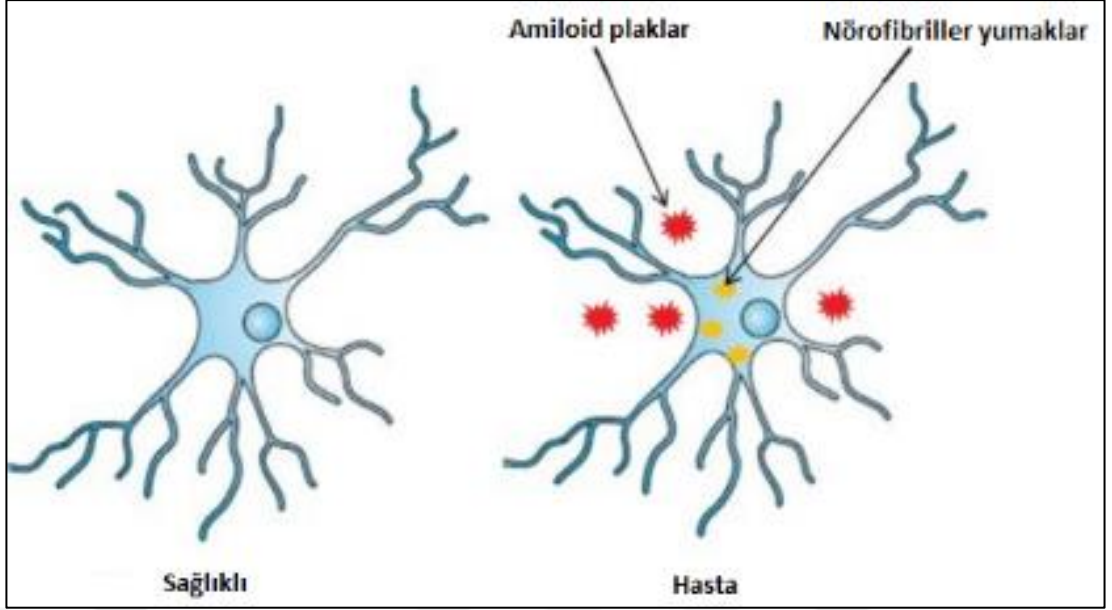
Çizelge 1.1. Bazı bor nanopartiküllerinin ilaç dağıtım sistemi olarak kullanıldığı çalışmalar.	33
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi.....	46
Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan cihaz listesi.....	47
Çizelge 4.1. hBN'ye ait elemental içeriği gösteren EDX analizi	58
Çizelge 4.2. hBN'ye ait elemental içeriği gösteren EDX analizi	59
Çizelge 4.3. hBN ve hBN-FA' ya ait Zetaseizer sonucu	61
Çizelge 4.4. hBN ve hBN-FA'nın BLA ve MEM için ilaç yükleme kapasiteleri	66
Çizelge 4.5. Olgun nöron hücre kültürüne farklılaştırılmış SHSY-5Y hücrelerinin akış sitometrisi analizi ile belirlenen hücre döngüsü.	69
Çizelge 4.6. 24 saat boyunca hBN-FA-BLA, hBN-FA+MEM ve hBN (25µg/mL) uygulamalarına karşı deneysel AH modelinde TAK ve TOD değerleri.	74
Çizelge 4.7. Hoechst 33258 floresan boyaması ile farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hatlarına 24 saat boyunca 25 µg/mL ve 50 µg/mL hBN-FA, hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM ve β-amiloid uygulamalarının genotoksisite üzerindeki etkisi.	77

1. GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), ilk kez 1907 yılında Alois Alzheimer tarafından tanımlanan, bilişsel bozukluk, hafıza kaybı ve karakterdeki anomaliler ile belirtiler gösteren ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (Fong et al. 2009). Tüm demans vakalarının %60-80'ini oluşturan AH demansın en yaygın sebebidir (Bondi et al. 2017). Hastalığın geç başlangıçlı (sporadik) ve erken başlangıçlı (ailesel) olmak üzere iki tipi vardır. Geç başlangıçlı AH tüm vakaların %90'ını oluşturur ve genellikle 65 yaş üstü bireylerde görülmektedir. Erken başlangıçlı AH'ye ise daha nadir olarak rastlanılmaktadır. 40'lı ya da 50'li yaşlarda semptomlar kendini göstermeye başlar. Erken başlangıçlı AH vakalarında amiloid öncü protein (APP), Presenilin 1(PS1) ve Presenilin 2 (PS2) proteinlerindeki genetik mutasyonların önemi bilinmektedir. Tüm bunların yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, alkol alımı, sigara kullanımı, yüksek kolesterol seviyesi ya da depresyon AH'nin olası risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir.

AH'nin nöropatolojisinde rol oynadığı bilinen, APP'nin bölünme ürünü olarak ortaya çıkan amiloid plakaların birikimiyle oluşan hücre dışı senil plakalar ve mikrotübüllerle ilişkili hiperfosforile tau proteinlerinin neden olduğu hücre içi nörofibriler yumaklar (NFT) önemli birer belirteçtir.

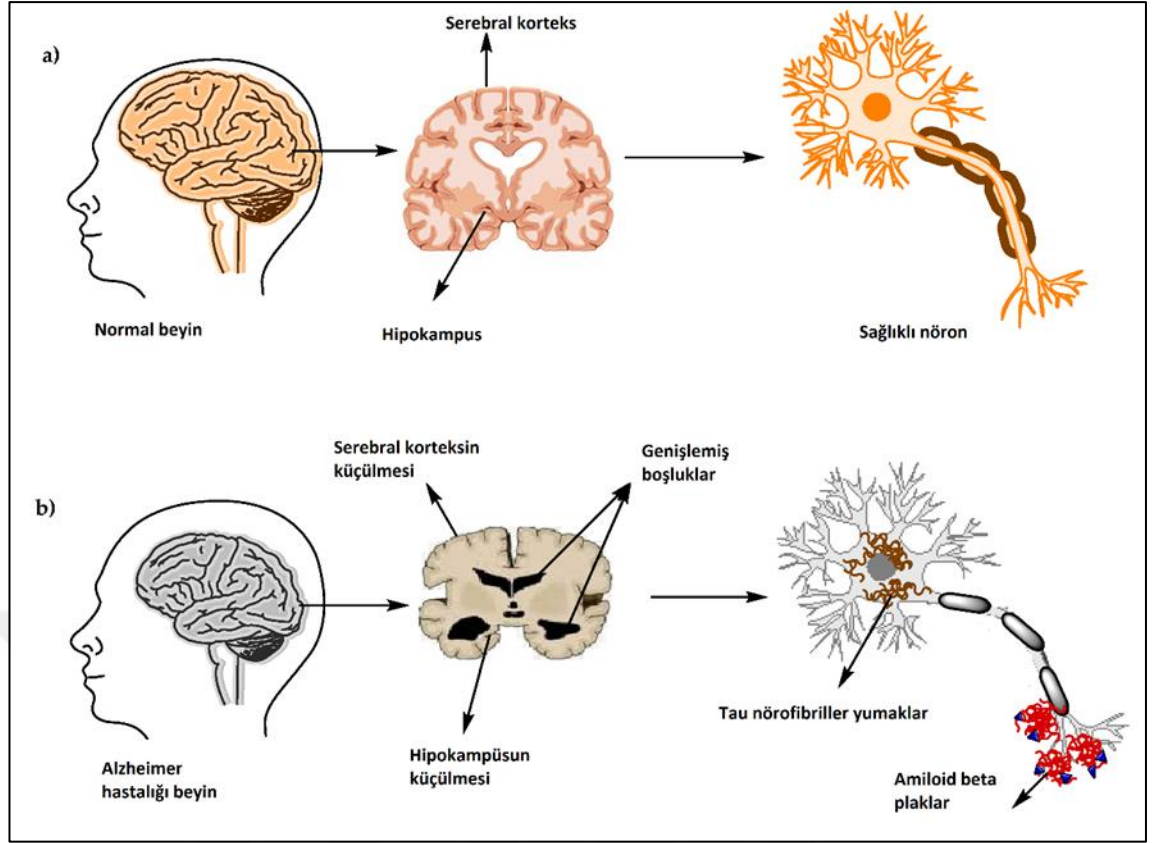


Şekil 1.1. Normal bir nöron (solda) ve Alzheimer hastalığından etkilenen bir nöron (sağda).

Şu anda dünya çapında yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır. Her 5 yılda bir iki katına çıkan hasta sayısının 2050 yılı itibarıyla 152 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Yiannopoulou and Papageorgiou 2020). Bireyleri, aileleri ve toplumları derinden etkileyen Alzheimer hastalığının yıllık ortalama maliyeti 1 trilyon doları geçmektedir. Hastalığın kesin bir tedavisi olmamakla birlikte mevcut yaklaşımlar hastalık belirtilerini iyileştirmeye yöneliktir (Livingston et al. 2020).

1.2. Alzheimer Hastalığının Nöropatolojisi

AH diğer birçok nörodejeneratif hastalığa benzer şekilde yanlış katlanmış proteinlerin birikimiyle karakterize edilmektedir. Alzheimer hastalığının ilerlemesi ve semptomları hakkında bilgi sunan iki tip nöropatolojik değişiklik vardır. Nörofibriller yumaklar ve amiloid plakalar en çok kabul gören biyo belirteçlerin başında sıralanmaktadır.



Şekil 1.2. Beyin ve nöronların fizyolojik yapısı **a.** Sağlıklı beyin ve **b.** AH beyin (Breijyeh and Karaman 2020).

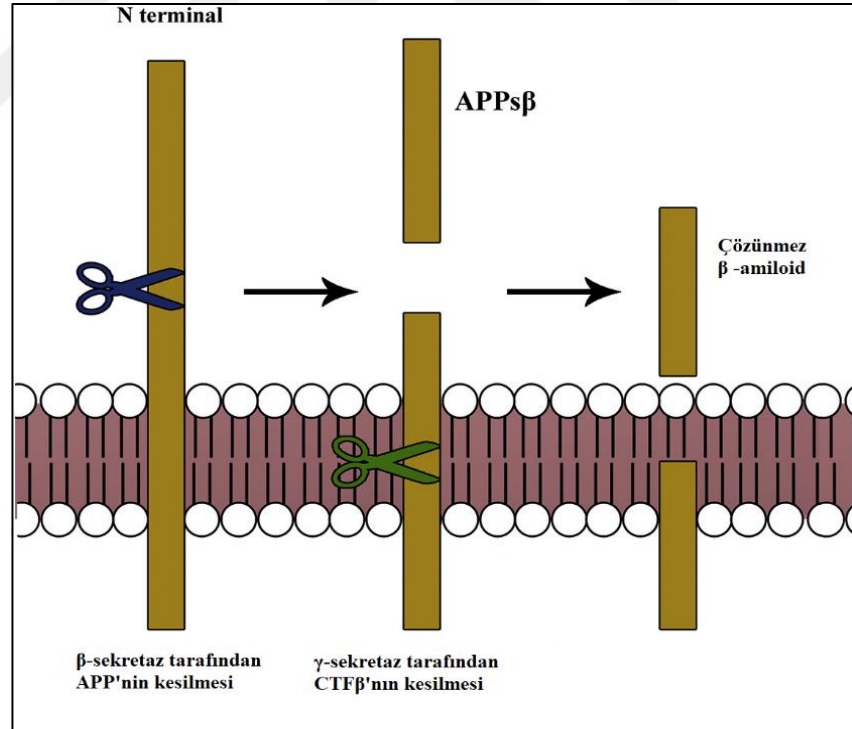
1.2.1. Amiloid plaklar

Amiloid öncül protein (APP) geni 21.kromozom üzerinde lokalizedir ve AH'nin nedeni olarak gösterilen genlerin başında gelir. APP vücutta fizyolojik süreçlerde hücreler tarafından eksprese edilen bir transmembran proteinidir. Normal işlevi tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen bilimsel kanıtlar sinaptik işlev, nöronal gelişim gibi önemli rollere sahip olduğunu desteklemektedir. Senil plaklar olarak da bilinen amiloid plaklar kümelenmiş beta amiloid ($A\beta$) peptidini içerir. APP α -, β -, γ -sekretaz enzimleri tarafından proteolitik olarak kesilir. APP kesiminde hangi enzimin etkin rol oynadığına bağlı olarak iki farklı kesim süreci mevcuttur. Bunlardan ilki 'amilodenejik yol' ikincisi ise 'amilodenejik olmayan yol' adını almaktadır. AH'nin önemli bir nöropatolojik belirteci olan $A\beta$ 'nin oluşup oluşmayacağı enzimlerin kesim sırasına bağlı olarak değişmektedir. Amilodejenik olmayan yolda ilk olarak α -sekretaz enzimi APP'yi 867.pozisyondan keser ve çözünebilir amiloid öncül proteini α ($APP\alpha$) oluşturur. Karboksil ucunda ise membrana bağlı olarak bulunan C terminal alfa (α -CTF) oluşmaktadır.

1. GİRİŞ

Ardından γ -sekretaz ikinci kesim işlemini tamamlar. Böylece p3 fragmanı ve 50 aminoasit uzunluğunda APP hücre içi domaini (AICD) oluşmaktadır. Amilodejenik yolda ise APP ilk olarak β -sekretaz enzimi tarafından amino ucuna yakın bir pozisyonda kesime uğrar. İlk basamak kesim ürünleri olan çözülebilir β amiloid öncül proteini (APPs β) ve C terminal fragman β (CTFs β) meydana gelir (Kumar et al. 2015). Sonrasında γ -sekretazın kesimi gerçekleştiği ve enzim kesim bölgesine bağlı olarak A β ₍₁₋₄₀₎ veya A β ₍₁₋₄₂₎ olarak iki farklı A β oluşumu bildirilmiştir. A β 40-42 aminoasit uzunluğuna sahip olabilir. Amino asit sayısı γ -sekretazın protein zincirinde parçaladığı noktaya bağlı olarak değişmektedir (Iwatsubo 2004).

A β , nörotoksisite ve nöral fonksiyonda önemli bir rol oynar. Bu nedenle hipokampus, amigdala ve serebral kortekste daha yoğun plakların birikmesi, bilişsel bozukluklara ek olarak astrositlerin ve mikrogliaların uyarılmasına, aksonlara, dendritlere ve sinaps kaybına neden olabilir (Chen et al. 2017).



Şekil 1.3. APP'den çözünmeyen β -amiloidlerin oluşumunu temsil eden şematik diyagram (Abeysinghe et al. 2020).

1. GİRİŞ

1.2.2. Nörofibriller yumaklar (NFTs)

A β plaklarının birikmesi, nöronların hücre iskeleti ile ilişkili yapısal bir protein olan tau proteininin hiperfosforilasyonunu başlatır ve tau proteininin yanlış katlanmasına ve nörofibriller yumaklar olarak adlandırılan agregatların oluşumuna neden olur. Bunlar nöronlar arasındaki iletişimin bozulmasına ve son olarak nöronun ölümüne yol açar (Wang et al. 2013). Mikrotübül ilişkili tau (MAPT) geni tarafından kodlanan tau proteini mikrotübüllerin stabilizasyonu, akson büyümesi ve gelişiminde önemli rollere sahiptir (Defina et al. 2013).

1.2.3. Sinaptik kayıp

Neokorteks ve limbik sistemlerdeki sinaptik kayıplar hafıza kaybına neden olmaktadır. Sinaptik kayıp mekanizmaları, aksonal taşıma, mitokondriyal hasar, oksidatif stres ve sinaptik bölgelerde A β ve tau birikimi gibi küçük fraksiyonlara katkıda bulunabilecek bazı süreçlerdeki hataları içerir (Overk and Masliah 2014).

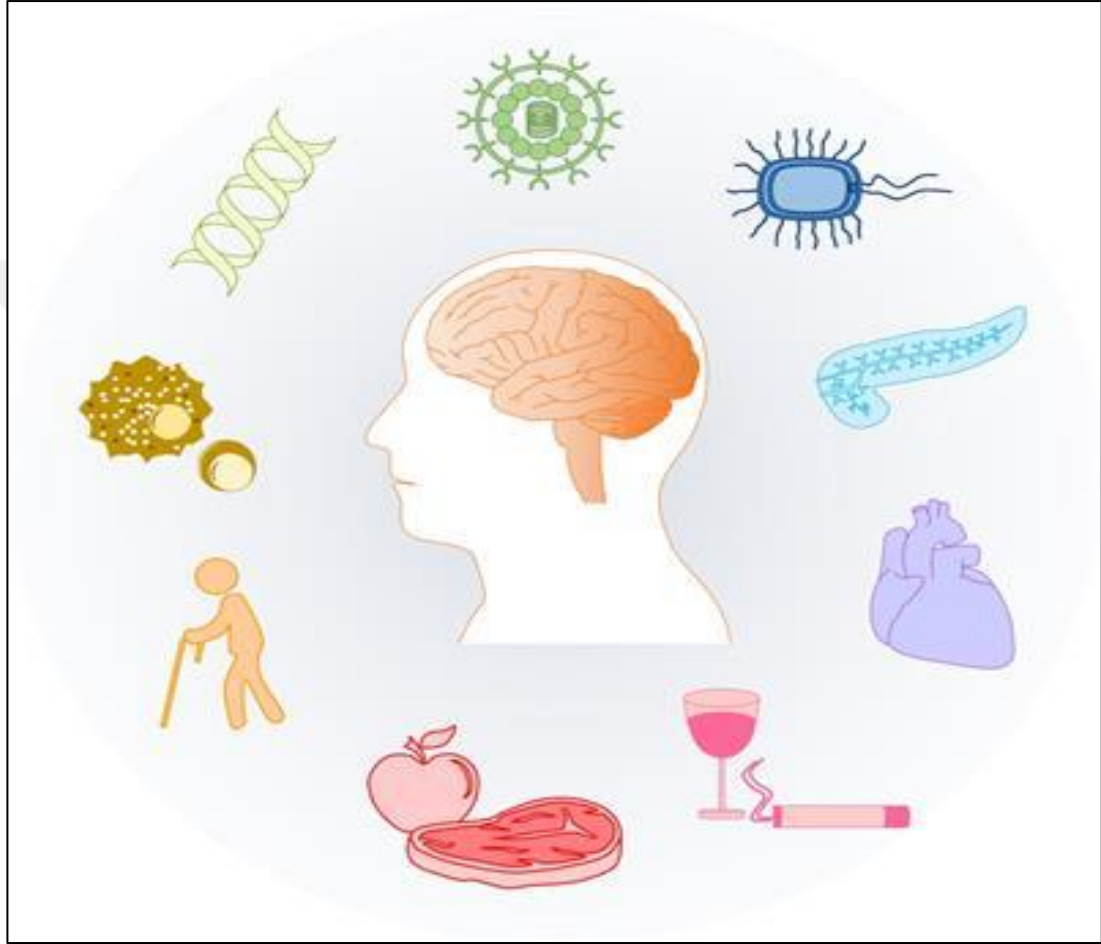
1.3. Alzheimer Hastalığının Aşamaları

Alzheimer hastalığının aşamaları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Semptomatik öncesi evre; birkaç yıl ya da daha fazla sürebilen klinik öncesi dönemdir (Dubois et al. 2016).
2. Hafif ya da erken evre; günlük yaşamında konsantrasyon ve hafıza kaybı, yer ve zaman oryantasyon bozukluğu, duygu durum değişikliği gibi çeşitli semptomların hastalarda ortaya çıkmaya başlar (Wattmo et al. 2016).
3. Orta dereceli AH evresi; serebral korteks alanlarına yayıldığı, aile ve arkadaşları tanımada güçlük, dürtü kontrolünün kaybı ve okuma, yazma ve konuşma gücünün ile artan hafıza kaybı görülmektedir (Ulep et al. 2018) .
4. Şiddetli AH veya geç evre; şiddetli bir nöritik plak ve nörofibriller yumak birikimi ile hastalığın tüm korteks alanına yayılmasını içeren ve hastaların ailelerini hiç tanıyamadıkları ilerleyici bir işlevsel ve bilişsel bozulmaya neden olan evredir.

1.4. Alzheimer Hastalığının Nedenleri ve Risk Faktörleri

İlerleyen yaş, genetik faktörler, kafa yaralanmaları, kardiyovasküler hastalıklar, enfeksiyonlar ve çevresel faktörler (ağır metaller, eser metaller ve diğerleri) gibi çeşitli risk faktörleriyle ilişkilendirilen AH çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilmiştir.



Şekil 1.4. Alzheimer hastalığının risk faktörleri (Moreno-Gonzalez et al. 2020)

A β , NFT'ler ve sinaptik kayıp gibi patolojik değişikliklerin altında yatan neden hala bilinmemekle birlikte birkaç hipotez öne sürülmüştür. Ancak bunlardan ikisi ana neden olarak kabul görmektedir. Temel iki hipotez kolinerjik fonksiyonlardaki bozulma ve amiloid β -proteinindeki değişiklik olarak sıralanabilmektedir. Bununla birlikte, şu anda AH patogenezini açıklamak için kabul edilmiş bir teori yoktur (Anand and Singh 2013).

1.4.1. Kolinerjik hipotez

1970'li yılların sonlarına doğru kolinerjik hipoteze ait elde edilen ilk veriler beyinin hipokampusünde kolin asetiltransferaz (ChAT) ve asetilkolin esteraz (AChE) enzim seviyelerinin düştüğüne dairdir. ACh'nin bilişsel işlevdeki temel rolü nedeniyle, AH'nin kolinerjik bir hipotezi önerilmiştir. ACh, kolinerjik nöronların sitoplazmasında kolin ve asetil-koenzim A'dan ChAT enzimi tarafından sentezlenir ardından veziküler asetilkolin taşıyıcısı (VAChT) ile sinaptik veziküllere taşınır. Beyinde ACh, hafıza, dikkat, duyuşsal bilgi, öğrenme ve diğer kritik işlevler gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alır. Hastaların kolinerjik nöronların dejenerasyonunun yer aldığı ve bilişsel işlevlerde değişime ve hafıza kaybına neden olduğu bu hipotez ile gösterilmiştir. β -amiloidin kolinerjik sinir iletimini etkilediği, kolin alımında azalma ve ACh salınımına neden olduğu düşünölmektedir (Francis et al. 1999). Yapılan araştırmalar amiloid fibril oluşumunu ve kolinerjik sinaptik kaybın $A\beta$ oligomerlerinin nörotoksitesitesi ve AChE ile $A\beta$ arasındaki etkileşimlerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca muskrinik ve nikotinik ACh reseptörlerindeki azalma, glutamat konsantrasyonu gibi diğer faktörler de AH'nin ilerlemesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Monczor 2005).

1.4.2. Amiloid kaskad hipotezi

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonucunda merkezi sinir sisteminde β tabakalarının anormal birikimi demans ile güçlü bir korelasyona sahip olduğu bilgisi amiloid hipotezine yol açmıştır. Ancak yaşla birlikte sağlıklı bireylerin beyinde de $A\beta$ biriktiğinin görölmesiyle birlikte $A\beta$ birikiminin AH başlangıcından sorumlu olup olmadığı konusundaki tartışmaları gündeme getirmiştir.

Amiloid β hipotezi APP'nin α - ve γ -sekretaz tarafından enzimatik kesimiyle oluşaın $A\beta$ bozulmasının yaş ve patolojik şartlardan ötürü azalmasını ve $A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$ peptidlerinin birikimine yol açmasını ileri sürer. $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ oranının arttırılması, $A\beta$ amiloid fibril oluşumunu indükler. Nörotoksite ve tau patoloji indüksiyonu ile sonuçlanan bu olay ile nöronal hücre ölümü ve nörodejenerasyon meydana gelir. APP, PSEN1 ve PSEN2 gibi çeşitli genleri hızla $A\beta$ birikimine ve nörodejenerasyonun hızlı

ilerlemesine neden olan A β katabolizmasını ve anabolizmasını etkilediği bulunmuştur (Kametani and Hasegawa 2018; Paroni et al. 2019).

1.5. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

AH'nin patolojik süreci A β peptidlerinin birikmesiyle başlamaktadır. Hiperfosforile tau proteinlerinin oluşturduğu NFTs ise nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır. Mevcut tedavi stratejileri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. α , β ve γ sekretazların inhibisyonu yoluyla A β oluşumu azaltılabilir ve böylece plak oluşumu önlenir.
2. Tau protein kinazların inhibisyonu gerçekleştirilerek NFT'lerin oluşumu yavaşlatılabilir.
3. Çeşitli kimyasal ajanların yardımıyla A β plakları ve NFT'lerin temizlenmesi sağlanabilir.
4. Kolinerjik hipotezine göre AH'de demansın sebebi nöronal hücre kaybının sonucunda düşük asetilkolin düzeyleridir. Bundan dolayı asetilkolin düzeylerinin artırılması ya da asetilkolin katabolizmasının inhibisyonu yoluyla demans semptomları iyileştirilebilir.
5. Kardiyovasküler hastalıklar ya da diyabet gibi bazı diğer hastalıklar AH riskini arttırdığı bildirilmektedir. Bu hastalıkların tedavisi de AH'den korunmayı sağlayabilir (Blake et al. 2017).

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilaçlar hali hazırda kullanılmakta olan ancak semptomatik tedavi sunan ilaçlardır. Bu ilaçlar etkin bir tedavi sunamazlar fakat Alzheimer hastalarının bilişsel işlevlerinde iyileştirme sağlarlar. Bu nedenle AH'nin tedavisine olanak sağlayan yeni tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. AH'nin tedavisinde kullanılan beş ilaç vardır. Bunlar: donepezil, rivastigmin, galantamin, memantin ve namzarik. AH'nin tedavisi için ilk onay alan ilaç takrindir. Ancak neden olduğu yüksek hepatoksisiteden dolayı kullanımdan kaldırılmıştır (Alcolea-Palafox et al. 2014).

1. GİRİŞ

AH'nin tedavisi için geliştirilen ilaçlar genel olarak iki grupta kategorize edilebilir: Asetilkolinesteraz inhibitörleri ve glutamat reseptör antagonistleri. Donepezil, rivastigmin, galantamin ve takrin asetilkolin esteraz inhibitörlerindedir (AChEIs). Asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu sinapslarda asetilkolin seviyesini arttırarak sinir iletimini iyileştirir. AChEI ilaçlar AH'nin ilerlemesini durduramaz ancak semptomatik iyileşme sağlarlar. Glutamat, N-metil D-aspartat reseptörlerine (NMDAR) bağlanan ve öğrenme ve hafızada önemli rol oynayan uyarıcı bir nörotransmitterdir. Glutamatın NMDAR'lere aşırı miktarlarda bağlanması eksitotoksositeye neden olan yüksek miktarda Ca^{+2} akışı ile sonuçlanır. Bu durumun ise nöronal hücre ölümüne yol açtığı bildirilmektedir (Liu et al. 2019). Memantin, NMDAR'ları antagonize ederek nöronal hasarın yanı sıra semptomları da azaltır. NMDAR'ın düşük afiniteli, rekabetçi olmayan bir antagonisti olan ilaç orta ya da şiddetli AH'nin tedavisinde tek başına ya da AChEI ile birlikte kullanılmaktadır. Düşük afinitesinden ötürü normal sinaptik iletimi engellemeden uyarıcı reseptörü bloke eder (Folch et al. 2018). Ayrıca hücrelerde $A\beta$ kaynaklı Ca^{+2} dengesizliğini düzenler. AH'nin semptomatik tedavisinin yanı sıra memantin nöroprotektif bir role de sahiptir (Santos et al. 2016).

1.5.1. Tedavi stratejilerin avantaj ve dezavantajları

Hali hazırda kullanılan tüm ilaçların esas sınırlaması hastalığın ilerlemesini durduramamaları ve sadece geçici rahatlama sağlamalarıdır. Yapılan araştırmalar 10 mg donapezil kullanımının bilişsel işlev ve sosyal aktiviteleri iyileştirmede etkili olduğunu ortaya koymuştur. Ancak hastaların davranışlarını değiştirmede etkin değildir. Ayrıca tedaviyi takiben dejenerasyonun ilerlemesi ve hastaneye yatış oranlarında bir azalma gösterememiştir. Araştırmalar donapezilin tedavi-maliyet etkinliği göstermediğini ve hasta bakım maliyetlerini arttırdığını ortaya koymaktadır (Birks and Harvey 2018). 24 mg galantaminin donapezilden daha etkin olduğunu ileri süren çalışmalarda küresel iyileşme ve daha az hastalık kötüleşme insidansı kaydedilmiştir. 20 mg memantin alımında plasebo grubuna kıyasla günlük aktivite, bilişsel bozulma ve hasta bakım maliyetlerinde iyileştirici etkiler kaydedilmiştir (Wimo et al. 2003). AChEI'lar ve NMDAR'ler ile kombinasyon tedavisi, orta ila şiddetli AD için en iyi tedavi seçeneği olarak kabul edilir (Calhoun et al. 2018).

1.6. Nanoteknoloji

Yunanca cüce anlamına gelen nano ön eki, bir metrenin milyonda birini (10^{-6}) ifade etmektedir. Nano bilim nanometre ölçeğindeki yapıları ve molekülleri inceler. Nanoteknoloji insan hücrelerinden 100-10.000 kat daha küçük olan boyutları 1-100 nm arasında değişen parçacıklarla ilgilenen teknolojiye verilen genel addır. Bu ölçek aralığında çalışan nanoteknoloji, malzemelerin manipüle edilerek aynı malzemeden daha güçlü, daha hafif, daha küçük gibi şaşırtıcı özelliklere sahip yeni malzemelerin oluşturulmasına olanak tanır. Başta tıp olmak üzere yeni malzemelerin geliştirilmesi veya mevcut malzemelerin özelliklerinin iyileştirilmesi için alternatif bir yol sunar. Nano bilimin tarihçesi maddenin sürekli olup olmadığı ya da sonsuza kadar bölünüp bölünemeyeceği gibi bilim insanlarının şu an atom olarak tanımladıkları kavram ile ilgili arayışlarının başladığı M.Ö.5.yüzyıla kadar dayandırılabilir (Gnach et al. 2015). Bir başka deyişle, 21. yüzyılım en umut verici teknolojilerinden biri olan nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde maddeyi gözlemlemek, ölçmek, manipüle etmek, kontrol edip üretim süreçlerine dahil ederek nano bilim teorisini faydalı hale getirme yeteneği olarak da tanımlanabilir (Allhoff 2007).

Bir malzeme boyutundan bağımsız olarak sabit fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Ancak nano boyuta indirildiği zaman iyi karakterize edilmiş malzemelerin bile özelliklerinin keskin bir şekilde değiştiği görülmektedir (Bayda et al. 2020).

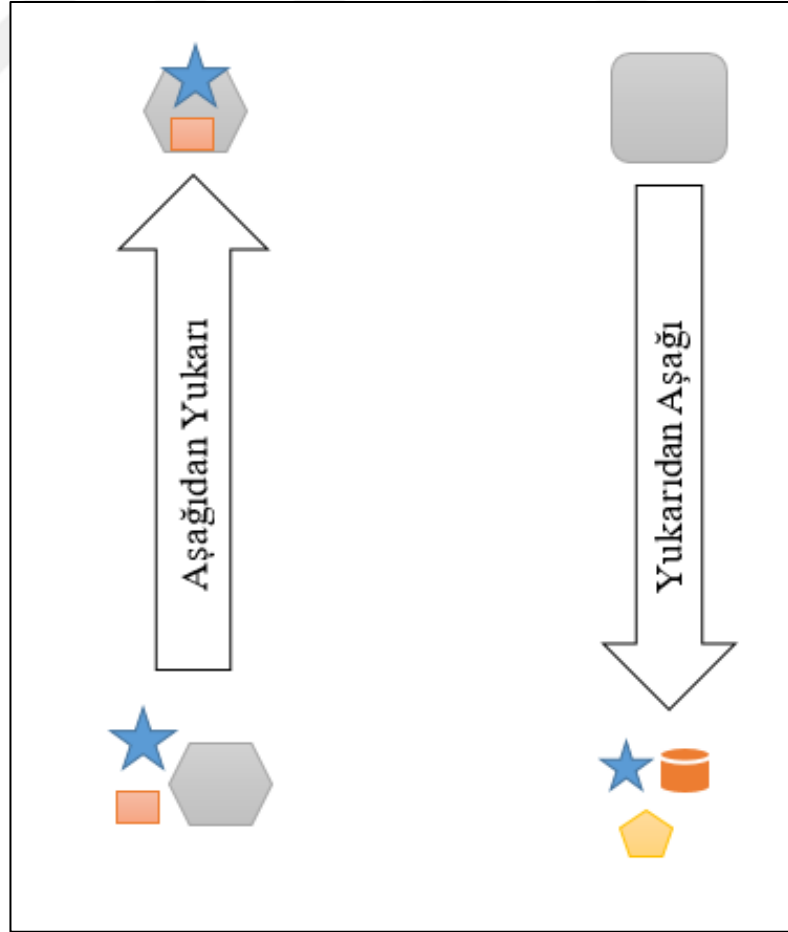
1.6.1. Tarihçe

Amerikalı fizikçi ve Nobel Ödülü sahibi Richard Feynman 1959'da nanoteknoloji kavramını ilk kez tanıtan bilim insanı olmuştur. Amerikan Fizik Derneğinin bir toplantısında 'Altta çok boşluk var' başlıklı bir konferans veren Feynman "Neden Britannica Ansiklopedisi'nin 24 cildinin tamamını bir toplu iğnenin başına yazamıyoruz?" hipotezini ortaya atmış ve makinelerin daha küçük makineler yapmak ve moleküler düzeye inmek için kullanılabilirliğini ifade etmiştir. Bu konferansındaki hipotezlerinin çok sonraları doğrulandığı Feynman, modern nanoteknolojinin babası olarak kabul edilmektedir. Feynman'ın ifadelerinden yaklaşık 15 yıl sonra Japon bilim

1. GİRİŞ

adamı Norio Taniguchi, 1974'te nanoteknoloji terimini ilk kullanan ve tanımlayan kişi olmuştur (Taniguchi 1974).

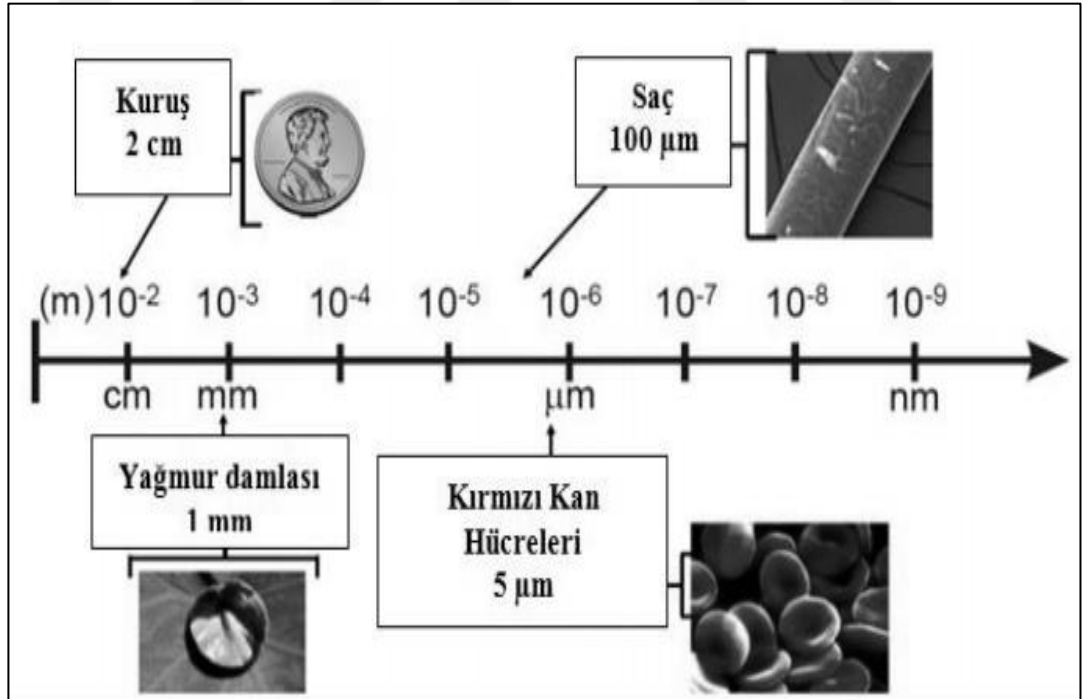
Pek çok bilim insanının ilgisini çeken bu yeni araştırma alanının keşfinin ardından nano yapıların sentezine yönelik farklı kalite, hız ve maliyet derecesine sahip olan iki sentez yöntemi belirlenmiştir: 1.Yukarıdan aşağı, 2. Aşağıdan yukarı. Dökme malzemelerin parçalanmasıyla nano boyutta malzemelerin eldesini sağlayan yukarıdan aşağı partikül sentezi yaklaşımında son yıllarda endüstri tarafından geliştirilen ve optimize edilebilen, hassas mühendislik ve litografi teknikleri kullanılmaktadır. Böylesi hassas mühendislik teknikleri tüm üretim süreci boyunca yüksek performans sağlamaktadır. Aşağıdan yukarı yaklaşım ile partiküllerin sentezinde atom ve moleküllerin kimyasal veya fiziksel yöntemler kullanılarak kontrollü manipülasyonlarını gerçekleştirmeye dayanır (Iqbal et al. 2012). Birbirinden farklı tekniklerin kullanıldığı bu iki genel yaklaşıma dayanan partikül sentez yöntemleri Şekil 1.5'de özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Nanopartikül sentezi özetleyen diyagram

1. GİRİŞ

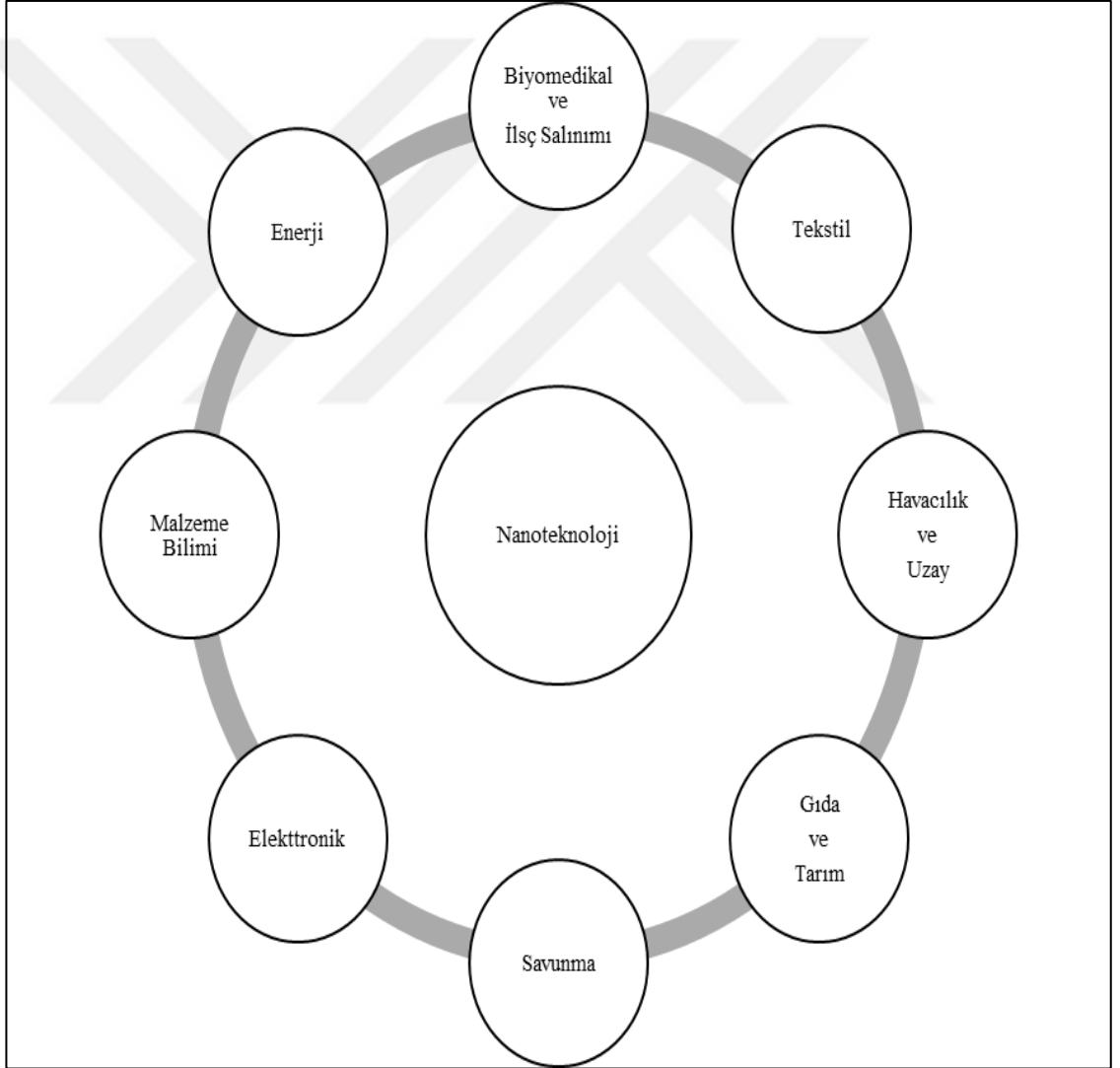
Nanopartiküller ya da nano malzemeler M.S 4.yy'da Romalılar tarafından kullanılan antik çağın en ilginç örnekleri arasındadır. British Museum koleksiyonundan Lycurgus kupası, antik cam endüstrisindeki en olağanüstü başarılarından birini temsil etmektedir. Belirli aydınlatma koşullarında renk değiştiren iki farklı cam türü olan Dikroik camın en eski ünlü örneğidir. 1990 yılında bilim insanları dikroik bir bardağın analizi için bir Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanmışlar ve bu iki renk geçişinin cam malzemede bulunan 50-100 nm çapındaki nanopartiküllerden kaynakladığını gözlemlemişlerdir. X-ışını analizi bu nanopartiküllerin gümüş-altın (Ag-Au) alaşımı olduğunu göstermiştir (Wagner et al. 2000; Freestone et al. 2008). 9-14.yy arasında önceleri İslam dünyasında sonrasında Avrupa'da yaygın olarak kullanılan parlak seramiklerin bakır (Cu) nanopartikülleri içerdiği bilinmektedir (Poole and Owens 2003). Bunun yanı sıra İtalyanlar çömlek yapımında nanopartikülleri kullanmıştır. Ayrıca bir Osmanlı tekniği kullanılarak hazırlanan Şam kılıç ve bıçakların içeriğinde sementit nanotellerin ve nanotüplerin kullanılması malzemelere güç, esneklik ve keskin bir kenar yeteneği kazandırmıştır (Reibold et al. 2006). Bazı yapıların boyutu hakkında bilgi veren görsel Şekil 1.6 aşağıdadır.



Şekil 1.6. Bazı yapıların boyutu hakkında bilgi veren ölçek (Rao and Cheetham 2001)

1.6.2. Nanoteknolojinin uygulama alanları

20 yıldan fazla süredir araştırmacılar nano boyuttaki malzemelerin sahip olduğu eşsiz özellikleri kullanarak çeşitli uygulama alanlarında devrim niteliğinde çalışmalar gerçekleştirmektedir. Nanoteknoloji, bilgi teknolojisi, güvenlik, ulaşım, tıp, gıda, evre, uzay araştırmaları, elektronik, haberleşme, savunma sanayii gibi birçok teknoloji ve endüstriyi önemli ölçüde geliştirmeye olanak sağlamaktadır. Çok geniş uygulama alanlarına sahip olmakla birlikte nanoteknolojinin yoğun olarak etkilediği alanlar Şekil 1.7’de özetlenmiştir (Nasrollahzadeh et al. 2019).



Şekil 1.7. Nanoteknolojinin bazı uygulama alanları

1. GİRİŞ

Tekstil ürünlerinin performansını arttırmak ve zayıf özelliklerinin geliştirilmesi için nanopartiküllerin kullanımı nispeten yeni bir alandır. Nanoparçacıkların polimerik olarak dağılımı ve kaplama malzemeleri olarak yeni nanokompozitlerin geliştirilmesi, çok işlevli ve akıllı yeni tekstil ürünlerinin araştırılması için umut vadetmektedir. Geleneksel yöntemlerle kumaşlara yeni özellik kazandırıldığında tekrarlı yıkamalarda ya da kullanımlarda özellik kaybolabilir. Aynı zamanda bu teknikler kumaşlarda istenmeyen kalıcı etkiler de bırakabilir. Çeşitli nanopartikül uygulamalarıyla kumaşlara kazandırılan özellikler kalıcı hale getirilebilir, kumaşlara arttırılmış dayanıklılık kazandırılabilir. Leke tutmayan giyisiler, UV dirençli kumaşlar, kendi kendini temizleyen giyisiler, ıslanmayan ya da kırıksık kontrollü kıyafetler gibi birçok yeni ve etkileyici özellikler Nanoteknolojik yaklaşımlarla tekstil endüstrisine kazandırılabilir (Hosne Asif and Hasan 2018).

Mevcut tarım teknolojileri tarımda üretim miktarını istenen seviyelerde arttıramaz ve zarar gören ekosistemleri iyileştirmeye yönelik bir yeteneğe sahip değildir. Nanoteknolojik müdahalelerle gübre veriminin arttırılması, tarım zararlılarının kontrolü, yeni nesil pestisitlerin geliştirilmesi, gıda ve gıda katkı maddelerinin korunması, paketlenme, toprak ve sudan kirleticilerin uzaklaştırılması, sebze ve çiçeklerin raf ömrünün iyileştirilmesi, tuzdan etkilenmiş toprakların ıslahı ve erozyona meyilli toprakların stabilizasyonu gibi istenen pek çok uygulama gerçekleştirilebilir (Mukhopadhyay 2014).

Nanoteknoloji savunma alanında ülkelere pek çok yeni seçenekler sunmaktadır. Ülkeler gelişen teknoloji ile beraber nanoteknolojik yeni savunma mekanizmalarına kayıtsız kalamamaktadır. Nanoteknoloji askeri ve savunma alanında devrim niteliğinde yenilikler sunar. Esnek anti balistik giysiler, hafif koruyucu kıyafetler, kimyasal ve biyolojik savaş korumaları, kendi kendini temizleyen nano kumaşlar, gelişmiş termal kontrol için değiştirilebilir kumaşlar, değiştirilebilir kamuflaj gibi uyarlanabilir giysiler, akıllı bir giysiye veya akıllı bir kaska entegre edilmiş mikro sensörler, görsel geri bildirim yardımcı destekleri için giyilebilir ve/veya esnek ekranlar: Ek güç için esnek/sert tekstiller, dış iskeletler ve insan görevlerine yardımcı olmak için robotik aletler bunlar arasında sıralanabilmektedir (Sharma et al. 2020).

Fosil yakıt kaynakları tükenbilir enerji kaynağıdır ve aynı zamanda sera gazı emülsiyonun da başlıca nedenleri arasındadır. Bu nedenle sürekli artan dünya nüfusunun

1. GİRİŞ

enerji ihtiyacını karşılayabilmesi için yenilenebilir enerji kaynak oranının artırılması gerektiği bilinmektedir. Biyoyakıt, jeotermal, güneş pili, hidrojen üretimi gibi birçok teknolojide nanoteknoloji uygulamaları mevcuttur. Nanoteknoloji ile çevreye daha az zararlı yeni enerji kaynakları sağlanabilir. Çalışmalarda nanoteknoloji uygulamalarının fotovoltaik/termal sistemlerde ısı transfer oranını arttırdığı, performansın iyileştiği, uygun maliyette yakıt hücre üretimi, yeni nanokatalizör üretimi, rüzgar enerjisi endüstrisinde kullanılmak üzere daha dayanıklı ve hafif malzeme üretimi rapor edilmiştir (Ahmadi et al. 2019).

İlerleyen nanoteknolojik gelişmeler günümüzde daha sağlam, ekonomik, uzun ömürlü ya da ergonomik özelliklere sahip malzemelerin araştırılmasını hızlandırmıştır. Nanomalzemeler metal, kompozit ya da seramik malzemelerin fonksiyonelliğinde bir gelişme, iyileşme sağlamaktadır. Günlük hayatta kullanılan pek çok malzeme yapısına nanoteknolojinin entegrasyonu ile daha iyi özelliklerle katılmıştır. Arttırılmış yüzey alanı ve kuantum etkisiyle klasik malzemelere kıyasla nanomalzemeler reaktiflik, direnç, elektriksel özellikler ve sağlamlık bakımından üstün hale gelmektedir. Bunun yanı sıra boyut azaldıkça kuantum etkisi artan nanoparçacıkların optik, elektrik ve manyetik özellikleri de neredeyse tamamen değişir. Nanoparçacıkların bu özellikleri son yıllarda imalat ve kaplama malzemelerde devrim niteliğinde yeniliklere ön ayak olmuştur. Kendi kendini temizleyen camlar, titanyum dioksit nanoparçacıklarla fonksiyonellik kazandırılarak su geçirmeyen ve antibakteriyel hale gelen yüzeyler, dokunmaya duyarlı ve tekrar tekrar kendini iyileştirebilen nikel nanoparçacık katkılı malzemeler bu alanda verilebilecek önemli örnekler arasındadır (Lines 2008; Ramsden 2016).

Nanoteknoloji ekonomik ve yüksek performanslı malzemeler üreterek, elektronik alanında büyük ilerlemelere katkı sağlamıştır. Nanoteknolojik uygulamalarla daha büyük miktarda ve daha hızlı bilgi işleme, saklama ve depolama imkanı doğmuştur. Hızlı, küçük ve taşınabilir sistemlerin kullanımına yol açan bu yeni teknolojiyle ilerlemeler hızlanmıştır. 130-250 nm arasında olan tipik bir transistör karbon nanotüpler ve molibdenum disülfid kullanılarak 1 nm'ye kadar küçültülmüştür. Şimdiye kadar yapılmış en küçük transistör olma özelliği taşıyan bu örnek elektronikte nanoteknolojinin etkisini açıklayabilmektedir (Desai et al. 2016).

1. GİRİŞ

Uzay yolculuklarında kullanılan yakıt hem ağırlık hem de verim bakımından birtakım sınırlamalara sahiptir. Nanomalzemelerin bu alana entegrasyonu ile sınırlamaların üstesinden gelinebilecektir. Uzay istasyonu ya da roket yapımında daha hafif, sıcaklığa daha dayanıklı olmaları nedeniyle nanomalzemeler ön plana çıkmaktadır (Sanghi and Verma 2009).

Nanoteknoloji, moleküler veya atomik ölçekte faydalı nesnelere ve fonksiyonel sistemlerin mühendisliğidir (Noebe 1997). Nanoteknoloji kullanılarak atomik seviyede müdahalelerle yeni malzeme veya nesne oluşturulabilir (Drexler 1988; Buzea et al. 2007). Nano ölçekte sahip oldukları optik, manyetik ya da elektronik gibi eşsiz özelliklerinden ötürü nanomalzemeler biyomedikal alanında da yoğun ilgi görmektedir. Nanomalzemelere bu eşsiz özelliği katan aslında onların sahip oldukları büyük yüzey/hacim oranıdır. Bu boyutta malzemelere klasik fizik ya da kimya kuralları değil kuantum mekaniği kanunları etki eder. Böylece nanomalzemeler yığın halindeki malzemelerden benzersiz özellikler sergiler. Nano materyaller ya da cihazlar tıp ve fizyolojideki uygulamalar için moleküler düzeyde hücre ya da dokularla etkileşime girecek şekilde tasarlanabilir. Nanoteknoloji tek başına ortaya çıkan bilimsel bir disiplin değildir aksine kimya, biyoloji, malzeme bilimi ve fizik gibi farklı geleneksel bilimlerin etkileşimlerinden meydana gelir (Silva 2004). Nanoteknoloji yalnızca mevcut teknikleri iyileştirmekle kalmaz aynı zamanda tamamen yeni bilimsel gelişmelerin de ortaya çıkmasına olanak sunan çok yönlü bir fonksiyona sahiptir. İlaçları ve diğer malzemeleri nanometre ölçeğinde manipüle ederek malzemelerin esas özellikleri ya da biyoaktivitesi değiştirilebilir. Böylece çözünürlük ya da kan dolaşımında tutma süresi, kısa veya uzun sürelerde kontrollü salınım, hedef bölgeye özel salınım gibi birçok faktör manipüle edilebilir (Caruthers et al. 2007).

Nanotıp, hastalıkları önlemek, teşhis ve tedavisini gerçekleştirmek için nano ölçekli ve nano etkin teknikleri kullanmaktadır (Farokhzad and Langer, 2006). Nanoteknoloji görüntüleme teknikleri ve tanı araçları, ilaç dağıtım sistemleri, doku mühendisliği yapıları, implantlar ve farmasötik terapötikler dahil olmak üzere tıp alanında önemli bir potansiyel sergilemektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, kanser, kas ve iskelet sistemi hastalıkları, psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklar, bakteriyel ve

viral enfeksiyonlar ve diyabet gibi durumlar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde yoğun olarak araştırılmaktadır (Farokhzad and Langer 2006).

1.7. İlaç Taşıma Sistemleri

İlaç taşıma sistemleri geleneksel (konvansiyonel) ilaç taşıma sistemleri ve yeni ilaç taşıma sistemleri olarak iki başlığa ayrılabilir. Geleneksel ilaç taşıma sistemleri ilaçların vücuda verilmesi için klasik ilaçları bütünleştiren geleneksel bir çerçevedir. Bu yöntem ilaçların ağızdan, deriden, nazal, oküler ya da rektal yollardan vücuda alınımıdır. Sık ilaç uygulaması, belirli zaman aralıklarında ilaç uygulama gereksinimi, ilacın düşük yarılanma ömrü, dozaj hatalarından kaynaklanan hasta uyumsuzlukları, ilacın plazma konsantrasyonundaki kararsızlık ve istenmeyen yan etkiler geleneksel ilaç taşıma sistemlerinin sınırlamaları arasındadır.

Nano ilaç dağıtım sistemlerinin temel hedefi hastalıkların tedavisi için klinik olarak faydalı yeni ilaç formülasyonları geliştirmektir. Klinik uygulamalar ise FDA onayı gerektirir. Yeni bir ilaç adayının FDA onayı alması uzun ve yüksek maliyet isteyen bir süreçtir. Bu nedenle onay için test gerektirecek yeni ilaç adaylarına karşı ilaç sektöründe bir direnç vardır. Tam da bu noktada nanoteknoloji avantajlı hale gelmektedir. Bilim insanları mevcut ilaç dağıtım sistemlerinden daha yeni, teşhisle birlikte tedavi de sunan yeni mikro/nano cihazların tasarımı ve üretimi için yoğun olarak çalışmaktadır.

Nanoteknolojinin tıptaki yaygın kullanım alanı özellikle ilaç taşıma ve dağıtım sistemleri çalışmalarını hızlandırmıştır. Halihazırda birçok madde ilaç dağıtımı ve daha spesifik olarak kanser ya da diğer hastalıkların tedavisi için araştırılmaktadır. Nanotıp bağlamında ilaç dağıtım sistemi biri farmasötik olarak aktif olan en az iki bileşenden oluşan nanometre ölçekli sistemlerin bilim ve teknolojisi olarak tanımlanabilir (Duncan 2003). Dahası ilacın kendisinin de nanoparçacık formülasyonu mümkündür (Baran et al. 2002). Bu sistemde ilaç ya da terapötikler hastalıkların teşhisi, tedavisi ya da önlenmesi için özel işlevler sunar. İlaç taşıma ve dağıtım sistemlerinde nanobiyoteknolojinin amaçları arasında daha spesifik ilaç hedefleme ve dağıtımı, teröpotik etkileri korurken toksisitede azalma, güvenilir ve biyo uyumlu ilaçların daha hızlı geliştirilmesi sıralanabilir (LaVan et al. 2003). Birçok ilacın stabilize sorunu, düşük çözünürlük,

yetersiz seçicilik, toksisite ve istenmeyen yan etkiler gibi dezavantajı vardır. İyi ilaç taşıyıcıları bu sorunların çözümünde önemli bir rol oynamaktadır (Wang et al. 2011).

1.8. Nano İlaç Taşıma ve Salınım Sistemleri

Belirli bir hedefe ilaç taşıma ve salınımı için özelleştirilmiş nanopartikül ve ilaç bileşimlerini ifade etmektedir. Hedeflerinden oldukça küçük olan bu taşıma sistemlerinin nanobiyoteknolojideki ilerlemelerle gelişimi beklenmektedir (Schäfer et al. 1992). Nanoteknoloji ürünlerinin terapötik ajanlarla entegrasyonu son yıllarda hastalıkların tedavisi ve önlemi konusunda yeni bir eğilim oluşturmuştur (Brigger et al. 2012). DNA, protein ve peptidler de dahil olmak üzere pek çok terapötik ajan daha güçlü hale getirilmiştir. Ancak bu terapötiklerin klasik ilaç salınım yaklaşımındaki gibi ağızdan ya da enjeksiyon ile vücuda verilmesi ciddi derecede toksik ve faydasız olmaktadır. Yaygın oral kullanımlarda bu terapötik ajanlar genellikle bağırsak geçişlerinde yetersiz emilir ya da yok edilir. Bu nedenle etkisiz kalırlar. Terapötik ajanların nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemlerine entegrasyonu ile ilaçların iletimi ve salınımı sırasında meydana gelebilecek birçok sınırlamanın üstesinden gelinebilir. Bu taşıma sistemleriyle küçük boyutlarından ötürü ilaçların istenen bölgede etkin ilaç birikimi ve kılcal damarlar yoluyla hedef hücrelere ulaşması sağlanabilir (Unezaki et al. 1996; Hobbs et al. 1998). Böylece ilaçların toksisitesi ve yan etkileri azaltılırken, tedavinin etkinliği artırılabilir. Ayrıca tedavide kullanılacak olan etken maddeler bağışıklık sistemi tarafından tanınmayacak nanopartiküllere yüklenerek bazı enfekte olmuş bağışıklık sistemi hücreleri doğrudan hedeflenebilir (Schäfer et al. 1992).

Polimer, seramik ya da metal gibi farklı malzemeler kullanılarak sentezlenen nanopartiküller, üretim yöntemi ve kullanılan malzemeye bağlı olarak farklı boyut ya da şekilde olabilir, birbirinden çok farklı özellikler sergileyebilir (Yih and Al-Fandi 2006).

1.8.1. Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri

Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri (DDS) geleneksel ilaç formlarına kıyasla pek çok avantaja sahiptir. DDS ile ilaç doğrudan ilgili bölgeye taşınarak diğer dokular üzerindeki etkisi ve yan etkiler en aza indirilebilir. Hedef bölgedeki etken madde birikimi artarken

1. GİRİŞ

gerekli ilaç dozu azalır. Özel olarak tasarlanan taşıyıcılara ilaçların eklenmesi ile hedefe özgü taşıma sağlanabilir. Polimerler, lipozomlar, dendrimerler, seramik ya da metalik nanopartiküller bu amaç doğrultusunda tasarlanarak kontrollü ilaç dağıtım sistemleri olarak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Wilczewska et al. 2012). Çözünürlüğü zayıf ilaçların alınımı, ilaçların belli bir bölgeye hedeflendirilmesi ve ilgili bölgedeki biyoyararlanımını arttırmak için nanopartiküller kullanılabilir. Paksitaksel (Fonseca et al. 2002; Koziara et al. 2006) , doksorubisin (Yoo et al. 2000), 5-florourasil (Bhadra et al. 2003) ve deksametazon (Panyam and Labhasetwar 2004) gibi pek çok kanser ilacı ve diğer başka ilaçların nanopartiküller ile yeni formülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda belirli bir hastalığı tedavi etmek üzere bir ilacın taşınması ve salınımını sağlayan benzersiz bir mimariye ve sayısız üstün özelliklere sahip olan nano partiküller araştırmaların odak noktasındadır. Mevcut araştırmaların çoğu kanser, HIV, diyabet gibi yaşam boyu devam eden, bireylerin hayat kalitesini derinden etkileyen ve toplumlar üzerinde büyük mali yükleri olan hastalıklar üzerinedir. Böylesi sarsıcı hastalıkların geleneksel yöntemlerle tedavisi etkin değildir ve hastalıklardan etkilenen bireylerin çoğu yaşamını kaybetmektedir. Tedavide kullanılacak ilaçların ilgili bölgelere taşınması ve etkin biyolojik yararlanımın sağlanması için nanopartiküllerin kullanılması tedavi süreçlerinde fayda sağlamaktadır (Brigger et al. 2012).

Polimer, seramik, metal ya da biyolojik materyallerden sentezlenen küresel, kabuk ya da dallanmış şekilde olabilen nanopartiküllerin her biri, sahip olduğu eşsiz özelliklerinden ötürü farklı nano ilaç taşıma sistemi araştırmalarının ilgi odağı olmaktadır.

DDS'nin etkinliği küçük boyuta, azalmış ilaç toksisitesi, ilaç farmakokinetiği, salınım süresi, ilaç biyoyararlanımı ve biyolojik dağılıma bağlanabilir. Çoğu zaman kemoterapi kanseri tedavi etmede başarısız kalır çünkü kanser hücreleri çoklu kanser ilaçlarına karşı direnç geliştirir. Kanser ilaçları hücreden içeri girdiği zaman p-glikoprotein sentezleyerek ilaçları hücreden dışarı pompalar. Araştırmalar nanopartiküllerin p-glikoprotein pompası tetiklenmeden kanser ilaçlarını hücre içine verdiğini göstermiştir (Koziara et al. 2006).

1.8.2. Polimerik nanopartiküller

Özellikle biyolojik olarak parçalanabilen bir dizi polimerik nanopartikülün araştırılmasına ilişkin sayısız literatür raporu mevcuttur (Raghuvanshi et al. 2001; Kreuter et al. 2003). Uzun süreli ilaç salınımlarına ek olarak vücutta birikmezler bu nedenlerle ilaç taşıma araştırmalarında yoğun ilgi görmektedirler (Panyam and Labhasetwar 2012; Gagliardi et al. 2021). Çalışmalar polimerik nanopartiküllerin kanser, diyabet, kemik kırıkları ya da aşılama gibi farmakolojik tedavi için potansiyel ilaç taşıyıcısı olarak önermiştir.

Polimerik miseller biyolojik olarak parçalanamayan polimerik yapıların bir formunu temsil etmektedir. Biyolojik ortamlardaki kararlılıkları ilaçları hedef bölgeye taşımaları konusunda polimerik miselleri avantajlı kılar.

1.8.3. Seramik nanopartiküller

Gözenekli, inorganik sistemler olan seramik nanopartiküller istenen boyut ve gözenekle kolaylıkla tasarlanabilirler. Bu nedenle son zamanlarda ilaç taşıma sistemleri konusunda ilgi görmektedir. Özellikle kanser hastalığının tedavisinde biyo uyumlu silika, titanyum, alüminyum gibi seramik yapıdaki nanopartiküller araştırılmaktadır (Ma et al. 2015).

1.8.4. Metalik nanopartiküller

Metalik nanopartiküller 50 nm ve daha küçük boyutlarda sentezlenebilmektedir. Artan yüzey alanı metal nanopartiküllerinin daha fazla ilaç molekülü taşıyabilmesine imkân verir.

1.8.5. Lipozomlar

Lipozomlar kolesterol ve fosfolipitlerden sentezlenen küçük küresel sistemlerdendir. Bu yapılar üretimlerinde kullanılan lipite bağlı olarak farklı özellikler

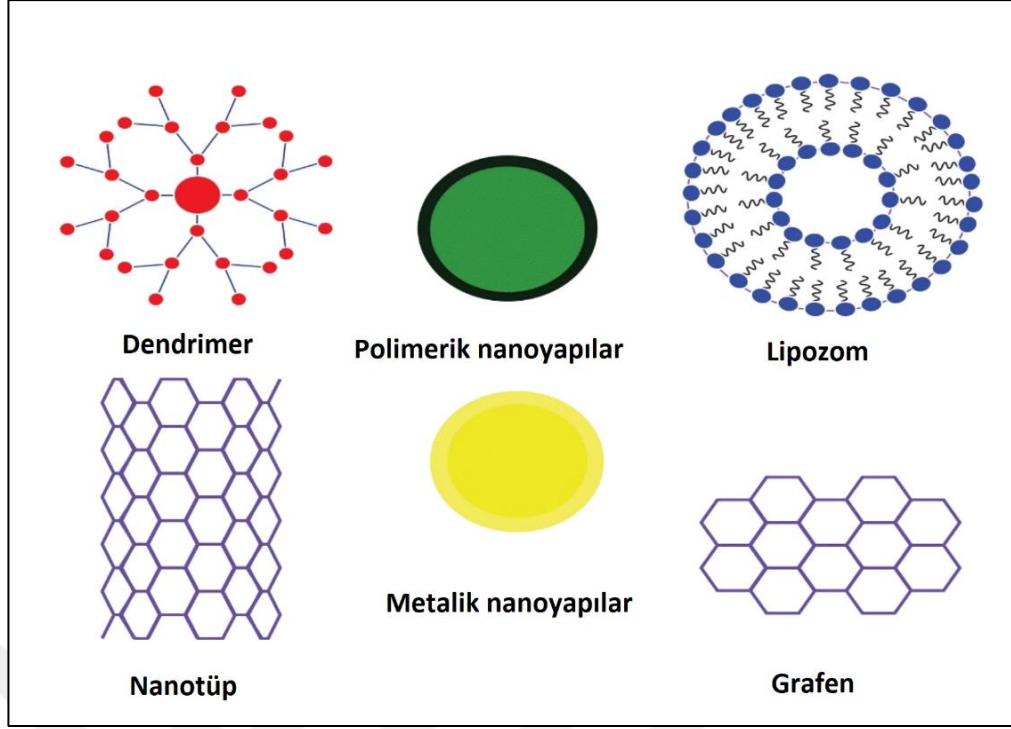
taşırlar. Yapılarındaki doğal moleküllerden dolayı kan dolaşımında uzun süre kalabilirler. Çeşitli kapsülleme teknikleri kullanılarak anti kanser ilaçların lipozomlarla taşınmasına ilişkin raporlar mevcuttur. Lipozomların sağlıklı dokuya zarar vermeden kanser ilacını ilgili dokuya taşıdığı bilinmektedir (Filipczak et al. 2020).

1.8.6. Dendrimerler

Dendrimerler çok değerlikli fonksiyonel uç gruplara sahip, sentetik 3D çok dallı nano polimerik yapılardır. Terapötik ilaçları ya da görüntüleme ajanlarını birleştirmek amacıyla kullanılan nanoyapılardır. Polimer sentezindeki ve tasarımdaki yenilikler dendrimerleri ilaç taşıma sistemleri için aday haline getirmiştir. Sahip oldukları nano boyut, dar polidağılım indeksi, birden fazla fonksiyonel grup ve iç kısımlarındaki boşluklarının yanı sıra üç boyutlu küresel yapıları ve dallanma noktaları dendrimerleri taşıma sistemlerinde öne çıkarmaktadır (Maghsoudnia et al. 2020).

1.8.7. Nanotüp ve grafen

Karbon nanotüpler (CNTs) mekanik, optik, elektriksel özellikleriyle birlikte yüksek çözünürlüğe sahip olmalarından ötürü çeşitli terapötiklerin taşınımı ve salınımı için araştırılmaktadır. Bu nano yapılar tek duvarlı karbon nanoyapılar (SWCNTs) ve çok duvarlı karbon nanoyapılar (MWCNTs) olarak iki gruba ayrılabilir. CNTs vektör olarak kullanılacakları zaman işlevselleştirilmeleri gerekir. Pozitif yüklü amonyum kullanılarak CNTs negatif yüklü nükleik asitleri bağlayabilmektedir (Caoduro et al. 2017). Grafen CNTs ve benzerleri inşa etmek için kullanılan 2D bir karbon atomu tabakasıdır. Grafen temelli nano yapılar görüntüleme, ilaç dağıtımını ya da teranostik gibi pek çok uygulamada kullanılmaktadır (Lin et al. 2016).



Şekil 1.8. Bazı nano dağıtım sistemlerinin şematik yapıları (Maghsoudnia et al. 2020)

1.9. Nano Taşıyıcı Sistemlerde Hedefleme Ligandları

Nanopartiküller ilaçların etkinliğini başarılı bir şekilde desteklemektedir. İdeal bir ilaç salınım sisteminde ilaç hedef bölgeye başarılı bir şekilde taşınmalıdır. Hastalığın tedavisinin gecikmesine ya da kesilmesine neden olan yan etkiler ancak doğru hedeflemeyle ortadan kaldırılabilir. Hücreler, özellikle tümör hücreleri, hedefleme aracı olarak kullanılabilir. Birçok reseptörü ve biyobelirteci yüzeylerinde eksprese eder. Yüzeylerinde hedefleyici kısımları bulunan nanopartiküller sayesinde ilaçların hedef bölgesindeki miktarı artırılabilir. Ayrıca tüm vücuda değil yalnızca hedefe iletim sağlandığı için yan etkiler azaltılabilir (Kumar Khanna 2012). Tüm bunlardan ötürü ilaç/gen içeren nanopartiküller dolaşımında kararlı olması gereken, ilgili ilaç/geni kolayca verebilen uygun bir bağlayıcı aracıyla hedef bölgeye özelleştirilmelidir. Birçok araştırmada kullanılan en yaygın hedefleme araçları aşağıda özetlenmiştir.

1.9.1. Karbonhidratlar

Karbonhidratlar endojen protein reseptörlerini hedefleyebilir böylece sahaya özgü modifikasyonlarla sınırlamaları aşabilirler. Bu bağlamda reseptörlerle girdikleri eşsiz etkileşimlerden ötürü diğer hedefleme ligandlarından üstündür.

1.9.2. Peptidler

Özellikle bazı tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen reseptörler ile bir taşıma sistemine entegre edilen hücre hedefleyici peptidler etkileşime girerek sitotoksik ajanların hücreye yüksek afinite sağlamasını dolayısıyla belli bir hücreye hedefleme sağlarlar (Vivès et al. 2008). Çalışmalar ilaç/gen taşıyan sistemlerde hedefleyici olarak peptid ligandlarının kullanılmasının ilacı/geni ilgili bölgeye seçici olarak hedeflendirilebileceğini, yan etkilerin azaltılabileceğini ve hücre transfeksiyonunun arttırılabileceğini göstermiştir. Ancak peptidlerin dolaşımdaki kararsızlığı hedefleme ligandı olarak kullanılabilirliklerini sınırlandırmaktadır (Jaracz et al. 2005).

1.9.3. Monoklonal antikorlar

Monoklonal antikorlar (mAb'ler), tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen ancak normal dokularda düşük ekspresyonu olan bir antijene bağlanarak sitotoksik bir ajanın tümör bölgelerine verilmesini spesifik olarak hedefleyebilir (Alley et al. 2010). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve kanser hücrelerinde belirli matris metalloproteinazlar gibi mAb'ler için anjiyogenezde yer alan birçok potansiyel hedef vardır (Brannon-Peppas and Blanchette 2012). mAb'lere dayalı terapiler artık kanser tedavisi için en başarılı ve önemli stratejiler arasında yer almaktadır, ancak yeni mAb'ler geliştirmek için çok yüksek üretim maliyetleri ve tümör hücrelerine penetrasyonlarını sınırlayan büyük boyutlara sahip olmaları gibi bazı önemli dezavantajları vardır (Heo et al. 2016).

1.9.4. Hiyalüronik asit

Doğal bir anyonik polisakkarit olan hiyalüronik asit (HA) için hücre yüzeyi glikoproteini CD44, hiyalüronik asit aracılı hareketlilik için reseptör, trans-membran proteini layilin, endositoz için hiyalüronik asit reseptörü, lenfatik damar endositik reseptörü gibi birçok örnek verilebilir. Akut lösemi, kolon, mide ya da yumurtalık gibi kanser türlerinde HA-bağlayıcı reseptörler aşırı ifade edilmektedir. Bu sebeple herhangi bir sitotoksik ajanla konjuge edilmiş HA'nın hücreleri hedeflemesi hedefe spesifik ilaç salınımı sağlayabilir, aynı zamanda sağlıklı hücrelerde yan etkilerden dolayı meydana gelebilecek hasarın önüne geçilebilir (Jaracz et al. 2005). İlaç/gen taşıyıcısında HA'nın uygulanması, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, HA-konjuge nanopartiküllerin immünojenik olmaması, ilgi alanlarına spesifik ilaç/gen dağıtımına aracılık etme gibi bazı üstün özelliklerinden dolayı önemlidir (Zhong et al. 2015).

1.9.5. Aptamer

Aptamerler, uzun tek sarmallı yapılandırılmış oligonükleotid (DNA veya RNA). Farklı hedeflere yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanabilen üç boyutlu konformasyonlara sahiptir. Hedefleme aracı olarak nano ilaç taşıma sistemlerinde kullanıldığında aptamerler tedavi süreçlerinde terapötik etkiyi arttırabilir. Kimyasal antikorlar olarak da bilinen aptamerler düşük immünojenik potansiyel, küçük boyut, yüksek afinite ve özgüllük, kolay modifiye edilebilirlik, yüksek esneklik ve güçlü stabilite gibi sahip oldukları özelliklerinden ötürü geleneksel antikorlara kıyasla avantajlıdır. Ancak aptamerler hücre içi nükleazlar tarafından parçalanırlar. Bu sınırlamanın üstesinden kilitli nükleik asit olarak adlandırılan yapay bazlar kullanılarak gelinebilir. Daha önceki çalışmalarda aptamer-aptamer, aptamer- siRNA, aptamer-miRNA, aptamer-antikor, aptamer-enzim yapıları oluşturulmuş ve tüm bu yapılar ana moleküllerden daha iyi stabilite ve fonksiyonellik gösterdiği rapor edilmiştir (Kanwar et al. 2011).

1.9.6. Folik asit

Beyin, akciğer, yumurtalık ya da meme kanseri gibi pek çok kanser türünde yüksek düzeyde eksprese olan folat reseptörleri normal dokularda düşük ekspresyona

1. GİRİŞ

sahiptir. Bu nedenle folik asit (FA) nanotüp, polimerik nanopartiküller, lipozomlar, miseller ya da emülsiyon gibi farklı formülasyonlara dahil edilerek hedefleme ligandı olarak kullanılabilir (Vance et al. 2009). Araştırmalar folik asit ligandları kullanılarak hazırlanan ilaç/gen nano taşıyıcı sistemlerin sağlıklı dokular üzerinde düşük toksisite sergilediğini, tümörlü dokularda ise daha spesifik hücresel alım nedeniyle tedavide etkin sonuç verdiğini bildirmiştir. Folik asitin küçük boyutu, düşük immünojenitesi ve eşsiz farmakokinetik özelliklerinin etkisi kaçınılmazdır (Guo and Lee 2001).

1.10. Bor

Bor, periyodik tablonun 13. grubunda yer alan, atom numarası 5 ve 10,811 g/mol atom kütlesine sahip olan, kimyasal olarak B ile sembolize edilen bir metaloiddir. Bor elementi yüzyıllardır bilinmesine rağmen element olarak keşfi Sir Humphry Davy ve Gay-Lussac tarafından 1808 yılında gerçekleşmiştir (Ulusik et al. 2018). ^{10}B ve ^{11}B borun en kararlı izotoplarından. Bor elementi doğada sodyum ve oksijen ile ogranobor kompleksi halinde bulunmaktadır. B elementi hidrojen, karbon, oksijen ve nitrojene kıyasla doğada daha az bulunur ancak organizmalar için fizyolojik önemlere sahiptir (Woods 1994). B-O ve B-N bağlarını ihtiva eden organoborlar biyolojik sistemlerde oldukça önemlidir. Organizmalarda bulunan borun %96'sı yüksüz borik asit $\text{B}(\text{OH})_3$ ve çok az miktarda borat anyonu $\text{B}(\text{OH})_4^-$ halindedir. pKa'sı 9,25 olan borik asit zayıf bir Lewis asitidir bu değer bor ligandları ile kovalent bağ oluşumu sırasında azalır ve tetrahedral borat anyonuna $\text{B}(\text{OH})_4^-$ dönüşür (Hunt 2003). Boraks ve borik asit riboflavin, adenzin monofosfat, askorbik asit gibi cis hidroksil grubuna sahip moleküllerle ve riboz, apioz gibi beş karbonlu şekerlerle etkileşim içindedir (Bolaños et al. 2004). Borun sodyum tuzları ve borik asit antiseptik, bakterisit, koruyucu, böcek öldürücü ve herbisit olarak kullanımdadır. Dahası cam üretimi, porselen emaye ve seramik metal alaşımlar gibi başka pek çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Moore 1997). Dünyada önemli bor yatakları Türkiye, ABD, Şili, Arjantin, Rusya, Mısır, Suriye ve Fas gibi ülkelerde yer almaktadır (Tanaka and Fujiwara 2008).

1.10.1. Borun canlılar için önemi

Bor elementi biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir ve bu nedenle mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanlar için büyük bir öneme sahiptir. Bor, mikroorganizmaların metabolik ve fizyolojik süreçlerinde önemli rollere sahiptir. İçeriğinde bor elementi bulunan ve *Streptomyces antibioticus* tarafından üretilen boromisin antibiyotiği özellikle gram pozitif bakteriler üzerinde etkidir (Hütter et al. 1967). Ayrıca diğer bakteriyel antibiyotiklerin yanı sıra bir deniz bakterisi tarafından üretilen bor içeren siderofor vibrioferrin ve *Solenopora jurassica* alglerinde pembe renk veren borolitokromların yapısında bulunmaktadır (Lewin and Chen 1976; Amin et al. 2007). Kahverengi algler, diatomlar ve alg kamçılılar gibi ökaryotlar için de gereklidir. Tek hücreli ökaryotik maya *Saccharomyces cerevisiae* büyümek için bora ihtiyaç duyar (Bennett et al. 1999).

Bitkilerde bor elementinin nükleik asit, karbonhidrat ve protein metabolizması, hücre duvar yapısı ve sentez süreci, zar bütünlüğü ve fenol metabolizması gibi birçok süreçte önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Ancak bu elementin süreçlerde moleküler seviyedeki etkinliği az bilinmektedir (Goldbach and Wimmer 2007).

Bor ve bileşiklerinin insan ve hayvanların metabolizması için gerekli olduğu bir süredir bilinmektedir. Hücre zar yapısı, kemik gelişim ve steroid hormon metabolizmasında etkilidir (Cui et al. 2004). Sebze, meyve, kabuklu yemiş ve bunların yanı sıra birçok üründe bol miktarda bulunan bor insanlar tarafından günlük 1-7mg tüketilebilir. İnsan vücudunda borik asit halinde bulunan bor, gastrointestinal sistem tarafından tamamen emilir (Hunt 1998). Hayvanlarda bor karbonhidrat ve mineral metabolizması, enerji tüketimi, enzim aktivitesi ve embriyonik gelişim gibi birçok süreçte önemlidir. Bor yoksunluğu kurbağa, fare, zebra balığı gibi birçok hayvan için üreme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilemektedir (Lanoue et al. 1998; Rowe and Eckhert 1999; Kot 2009). Yüksek miktarda bor tavuk ve sığırcılarda bazı organların gelişimini olumsuz etkilemektedir (Huang et al. 2015). Ayrıca bazı inflamatuvar hastalıkların gelişiminde etkili olan enzimlerin baskılanmasında da rol almaktadır. Örneğin bor, 6-fosfoglukonat ile kompleks oluşturarak pentoz fosfat yolağındaki 6-fosfoglukonat dehidrojenaz enzimini inhibe etmektedir (Hunt 1998).

1.10.2. Bor toksisitesi ve tolerans mekanizmaları

Metaloidler canlı sistemlerde oksidatif stres seviyesinde artış, DNA hasar ve onarım sistemlerindeki bozukluklar, protein katlanması ve fonksiyonundaki aksaklıklara bağlı olarak meydana gelen aktivite kayıplarına bağlı olarak toksisiteye yol açarlar (Camacho-cristóbal et al. 2008). Hücreler bu durumlarla başa çıkmak için metaloidlerin vücuttan uzaklaştırılması, organellerde depolama, metaloid bağlayıcı proteinlerin azaltılması gibi sayısız süreç geliştirmektedir (Verbruggen et al. 2009).

Bor toksisitesinin moleküler mekanizmasını açıklamak üzerine yapılan çalışmalarda borun efluks pompası ATR1 ve aminoasit biyosentez genlerinin ekspresyonu arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. Yüksek bor konsantrasyonu genellikle bakteri ve mantar enfeksiyonlarını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bitkilerde bor toksisitesinin toprak bor konsantrasyonunun yüksek olduğu kurak alanlarda nispeten daha yaygın görülmektedir. Bor ile zehirlenen bazı bitkilerde görülen semptomlar sürgün ve köklerde düşük büyüme oranı, klorofil ve lignin seviyesinde azalış gibi durumlardır (Brdar-Jokanović 2020). Borun bitkilerde neden olduğu toksisite yüksek olasılıkla hücre duvar yapısını bozarak ya da metabolizmada önemli süreçlere katılan bazı nükleotidlerin yapısındaki cis-diol içeren şeker moleküllerine bağlanma yoluyla gerçekleştirilmektedir (Reid et al. 2004).

Bor hemostazını sürdürmek için hücre içinde veya dışında taşınan bor seviyelerinin hücresel mekanizmalar aracılığıyla düzenlenmesi gerekir. Bitkiler toprak ile bora doğrudan maruz kalırlar ve bu nedenle borun etkisi ile ilgili genler ilk olarak bitkilerde tanımlanmıştır. Borik asit formunda topraktan emilen bor sürgünlere iletilmek üzere ksileme yüklenir ve uzun bir taşıma ardından yapraklarda birikir (Shelp et al. 1995).

İnsan ve hayvanlar tarafından alınan inorganik boratlar yüksek pKa'dan dolayı borik asit formunda bulunur. Bu nedenle bor bileşiklerinin toksikolojisi bor olarak ele alınmaktadır. Borik asitin toksikokinetiği insanlarda ve hayvanlarda araştırılmıştır. Oral olarak alınan borik asit ve boratlar vücuda hızla dağılır ve tamamen emilir. Ardından renal yolla borik asit formunda atılır. Tekrarlayan alıma bağlı olarak borik asitin dozu/alımı

arasında lineer bir korelasyon vardır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada 68 mg B/kg'ye denk gelen 9000 ppm'e kadar doz alımı araştırılmıştır (Ku et al. 1993).

Borun belirgin etkileri aşağıdaki gibi özetlenebilir (Pizzorno 2015):

- Kemik büyümesi ve gelişmesine olumlu katkı (Beattie and Peace 1993; Nielsen 2008)
- Yara iyileşmesini hızlandırır (Nzietchueng et al. 2002)
- Hücre dışı matriks proteinlerinin ifadesi (Ying et al. 2011)
- Cinsiyet hormonlarının düzenlenmesi (Naghii et al. 2011)
- D vitamininin eksikliğinin önlenmesi (Jones et al. 2012)
- Magnezyumun emilimi (Zofková et al. 2013)
- Antiinflamatuvar etkiler (Hunt and Idso 1999)
- Oksidatif strese karşı koruma (Coban et al. 2015)
- Beyin fonksiyonu ve psikolojik işlev (Penland 1998)
- Ağır metal toksisitesine karşı koruma (Turkez et al. 2012)
- Önemli biyomoleküllerin üretimi (Bolaños et al. 2004)
- Prostat, rahim ağzı, akciğer kanseri ve lenfoma gibi birçok kanser türüne karşı önleyici ve terapötik etki (Ayhan et al. 2009; Yao et al. 2013)
- Geleneksel terapötik ajanların olumsuz etkilerini iyileştirme (Turkez et al. 2010).

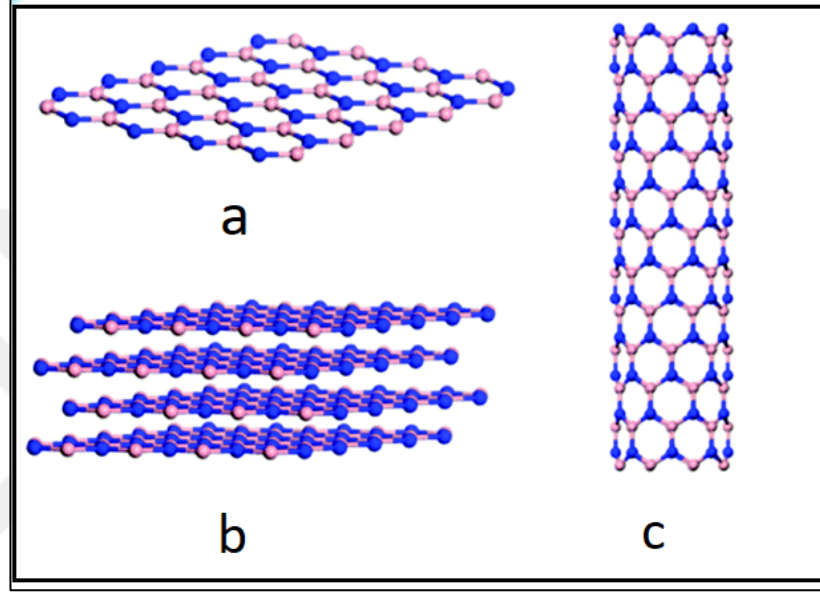
1.10.3. Bor nitür ve nanoteknoloji

Bor bileşikleri için yeni üretim tekniklerinin geliştirilmesi ve kullanım alanlarının her geçen gün genişlemesiyle birlikte borlu bileşiklere olan ilgi daha da artmıştır. Ferro, nikel ve kobalt bor gibi borlu alaşımlar, kristal bor, kübik ya da hekzagonal bor nitür amorf bor dışında sıralanabilecek örneklerdir (Alizadeh et al. 2004).

Fiziksel, kimyasal ve ısı özellikler yönünden birtakım avantajlar sunan bor nitür, hekzagonal (hBN), wüstitik (wBN) ya da kübik (cBN) bir yapıya sahip olabilmektedir. Yapı itibariyle karbona benzeten bor nitür beyaz grafit olarak adlandırılmaktadır.

1. GİRİŞ

Doğada doğal olarak bulunmayan, bor ve azot atomlarının bir araya gelmesiyle oluşan hekzagonal bor nitrür sıcaklık ve basınç etkisi ile kübik forma dönüştürüldüğünde elmas kadar sert olabilmektedir (Vogt 1998). hBN bal peteği yapısıyla grafene benzemektedir. Hem bor hem de nitrojen atomları bağ açısı 109° olacak şekilde B-N-B ve N-B-N sp^3 hibridizasyonu gösterirler. hBN ve cBN daha yaygın bulunduğundan sentez, uygulama ve araştırmalarda daha yoğun tercih edilmektedir (Zhang et al. 2007).



Şekil 1.9. Bazı borlu nanoyapılar a. hBN nano levha b. hBN nano tabaka c. hBN nanotüp (Weng et al. 2016).

Bor nitrürün kimyasal kararlılığı, elektriksel iletkenliği, oksitlenme sıcaklığı, bant aralığının genişliği ya da termal iletkenliği gibi birçok özelliği son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Lin et al. 2007). Bu özellikleri ile inorganik materyaller arasında son yıllarda yoğun ilgi gören malzemelerin geniş kullanım alanı belirtilen alanlarla sınırlı olmamakla birlikte aşağıdaki gibi özetlenebilir (Maity et al. 2020):

- Yüksek sıcaklık seramiklerinin yapımı
- Yağlayıcılar ve yapıştırıcılar
- Epoksi reçineleri için dolgu maddeleri
- Aşınmaya dayanıklı boyalar ve kaplamalar
- Kozmetik alanında kullanılabilen dolgu maddeleri
- Nötron dedektörlerinin yapımı

- Su arıtımı
- Kanser tedavisinde nötron yakalama yaklaşımı
- İlaç dağıtım sistemleri.

1.10.4. hBN nanomalzemelerin işlevselleştirilmesi

hBN'nin benzersiz yapısal optik, elektronik, kimyasal olarak malzemeye üstün bir çok özellik kazandırmasından dolayı hBN nanomalzemeleri bir çok endüstriyel alanda kullanım imkanı sunmaktadır. hBN'nin sahip olduğu elektron delokalizasyonu, büyük bir bant aralığına neden olur bu durumun bir sonucu olarak yalıtkan bir özellik ve renksiz bir görünüm ortaya çıkar.

Fiziksel ya da kimyasal olarak bir takım işlevselleştirme süreçlerinin ardından bir malzeme yeni ve üstün birçok özelliğe sahip olabilir. Bu modifikasyonların hBN malzemesi için uygulanabilir olduğunu gösteren birçok çalışma vardır.

Fiziksel işlevselleştirme; hBN nanomalzemelerinin fiziksel fonksiyonelleştirilemleri temelde yapısal/morfolojik aktivasyonu ile ilgilidir. Ticari olarak temin edilen hBN nanomalzemeleri yüzlerce nanometre boyutlara sahip olurlar ve malzemeler bazı işlemler sonucunda OD parçacıklar, 1D tüp/tel/şerit, 2D levha ya da 3D gözenekli yapılara dönüştürülebilir.

Kimyasal işlevselleştirme hem hBN hem de grafitin bazal düzlemdeki reaksiyonları her zaman polarize ya da eşit eşlenik π bağlarını içerir. Bir fonksiyonel grup B ve N ile tekli bağ oluşturursa toplam yükün eşitlenmesi için eşlenmemiş B ve N dengeleyici bir grup ile (fonksiyonel grup ile aynı olabilir ya da olmayabilir) bağ yapar. Şimdiye kadar hidroksil ($-OH$), amino ($-NH_2$), eter ($-OR$), amin ($-NHR$), arkil ($-COR$) dahil olmak üzere çok sayıda fonksiyonel grup ve halojen ($-X$) gruplarının yanı sıra hetero atomlar (C ve O) hBN nanomalzemesinin yapı iskeletine kimyasal olarak dahil edilmiştir (Weng et al. 2016).

1.10.5. hBN nanomalzemelerin özellikleri ve uygulama alanları

Suda çözünürlük; Biyolojik sistemler için bir malzemenin uygulanabilirliği sudaki çözünürlüğü ile ilgilidir. Saf BN malzemelerin su ve sulu çözeltilerde önemli bir hidrofobiklik gösterdiği bilinmektedir. Son on yılda BN nanomalzemelerinin yüzey işlevselleştirme, çözünürlük ve dağılımını arttırma amacıyla yoğun araştırmalar yapılmıştır. Araştırmalar suda 2 mg/mL^{-1} çözünürlüğe ulaşabilen BN nanomalzemelerine ait sonuçları raporlamışlardır. Pek çok araştırma raporu kimyasal işlevselleştirmeler ile BN nanomalzemelerinin sahip olduğu çözünürlük ve dağılılabirlik sorununun üstesinden gelinabileceğini ortaya koymaktadır (Pakdel et al. 2011).

Biyouyumluluk; Birçok karbon malzeme toksisite, en/boy oranı, biyolojik sistemlerdeki hücre, doku ya da organlardan etkilenme gibi sınırlamalara sahiptir. Farklı geometriye ve saflığa sahip olan BN malzemeleriyle yapılan birçok toksikoloji araştırması mevcuttur. Araştırma sonuçları bu malzemelerin toksik olmadığını ya da çok düşük bir toksisiteye neden olduğunu ortaya koymuştur. BN nanomalzemelerinin biyolojik ve biyomedikal uygulama alanlarında nispeten az sayıda araştırma raporundan ötürü yakın gelecekte bu malzemeler ile ilgili araştırmaların derinliğinin ve alanının geliştirilmesi beklenmektedir (Li et al. 2014).

Mikroelektronik; BN nanomalzemeleri için mikroelektronik alanda iki hedef uygulama noktası vardır: 1. Yalıtkan özellikleri ve 2. Yüzey yapısının düzgünlüğü. Bu iki durum hBN nanomalzemelerine yüksek termal ve kimyasal kararlılık sağlar. Bundan dolayı hBN nanomalzemeler yüksek kaliteli cihazların tasarlanması ve üretilmesi için 2D nanomalzemeler içinde dikkat çekici bir konuma gelmektedir (Bradford et al. 2019).

Nano fotonik; Nano fotonik nano ölçek sınırlarında ışığın nanomalzeme ile etkileşimini ifade eden bir terimdir. hBN nanomalzemelerinin fiziksel, kimyasal ve hetero yapılarının son yıllarda daha fazla aydınlatılması BN tabanlı yeni fotonik cihazların geliştirilmesine hız kazandırmıştır. BN gibi polar dielektrik malzemelerin karışımı bileşenlerin optik davranışlarından kaynaklanan yeni üstün özelliklerle fotonik cihazlar üretilebilir. Bu hetero malzemeler kızılötesinden terahertze kadar geniş bir aralıkta nanofotonik uygulamaları için kullanılabilir (Caldwell et al. 2016).

Kompozit uygulamalar; hBN nanomalzemeleri sert ve termal olarak en iyi iletken malzemeler arasındadır. Kompozit dolgu maddelerinde BN nanomalzemelerinin kullanılması ile malzemenin elektrik yalıtımı korunurken mekanik dayanıklılık ve termal iletkenlik arttırılabilir. Ayrıca yüksek dielektrik sabitine sahip kompozitler potansiyel yük depolama kapasitörleri için uygundur. Bu anlamda BN nanomalzemeler dielektrik özellikleri ile uygulamalarda ön plana çıkmaktadır. Dahası kompozit malzemelere eklenen BN nanotüpler ya da OH-BN nanotüpler polimerin gaz geçirgenliğinde bariyer özelliklerini önemli derecede iyileştirebilir (Kang et al. 2015).

Çevre ve enerji; Son çalışmalar BN nano tabakalarının ya da hetero yapılarının fotokatalitik H₂ üretimi ve kirletici oksidasyonu için etkili malzemeler olduğunu ortaya koymuştur (Huang et al. 2015). Elektrokimyasal kataliz uygulamaları için BCN nanomalzemelerinin yakıt hücreleri, Li-O₂ pilleri ya da sensörlerde önemli metal içermeyen katalizörler olduğu bilinmektedir (Wang et al. 2012). Kemisorpsiyon ve fizisorpsiyon mekanizmaları kullanılarak BN nanomalzemeleri hidrojen depolama uygulamaları için kullanılabilir. Gözenekli BN nano yapıları kirleticilerin absorpsiyonunu sağlayabilir. Yağlar, boyalar, organik çözücüler ya da metal iyonlarının sudan uzaklaştırılması çalışmalarında uygun nanomalzemeler olduğu bildirilmiştir (Wang et al. 2017).

İlaç Dağıtım Sistemleri; Nanotaşıyıcılar ile kombine edilerek hedefe iletilmesi amaçlanan ilaçların terapötik etkiyi iyileştirme ve istenmeyen yan etkileri en aza indirme potansiyeli vardır. Fizyolojik şartlarda biyouyumlu, çözünür ve kararlı olan ilaçları hedefe iletebilme yeteneğine sahip taşıma sistemlerinin tasarımı hala zor olmaktadır. Bu noktada yeni taşıma sistemlerinin dizaynında hBN nanopartiküllerinin kullanılması birçok avantaj sunar (Sharker 2019).

1. GİRİŞ

Çizelge 1.1. Bazı bor nanopartiküllerinin ilaç dağıtım sistemi olarak kullanıldığı çalışmalar.

BN yapısı	Yükleme/Modifikasyon	Uygulama
h-BN	Doksorubisin	Antikanser tedavisi
	Karboplatin	Antikanser tedavisi
	Hidroksilasyon	Hidrojel kompozit
B ₂₄ N ₂₄	5-Fluoro urasil	Antikanser tedavisi
B ₁₂ N ₁₂	Cisplatin	Antikanser tedavisi
Nanotüp (BNNT)	B(10) izotop	Radyasyon tedavisi
	Karboplatin	Antikanser tedavisi
	Kurkumin	Anti-inflamatuar

BN nanotüpleri ve hBN nanopartikülleri için birçok literatür raporu vardır. Hem BN nanotüpleri hem de hBN nanopartiküllerinin yüksek yükleme kapasitesine sahip olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Dahası folik asit ve hiyalüronik asit ile konjuge edilen kanser hücrelerine hedefli bu taşıma sistemleri yüksek sayıda kanser hücrelerinin ölümüne yol açmıştır (Li et al. 2014). BN nanomalzemelerin kontrol edilebilir yüzey zeta potansiyel enerjisi taşınan ilacın daha yüksek hücre içi endositozunu sağlar.

Gen Salınımı; İşlevselleştirilmiş BN nanoyapıları genler, proteinler, terapötik ajanlar gibi diğer moleküller için umut vadeden araçlardır. Gen iletiminde nükleaz bozulması ve azalmış hücresel internalizasyon nedeniyle sınırlamalar vardır. Tüm bu sınırlamalar nanoteknoloji ile aşılabilir. Kanser immüno terapisinde umut verici CpG

1. GİRİŞ

oligonükleotitleri BN nano küreleri aracılığıyla taşınabildiğini gösteren raporlar mevcuttur (Zhang et al. 2019).

Terapötik Ajanların Salınımı; hBN nanopartiküllerinin yüzeyine Pd biriktirilmesiyle elde edilen nano taşıyıcılar üstün foto termal özellik göstermektedir. İlaç taşıma sistemi olarak kullanılan bir çalışmada taşıyıcı sistemin yüksek oranda doksorubisin ilacını yüklediği bildirilmiştir. Ortamın pH'sının değişimine bağlı olarak ilacı salmak üzere tasarlanan bu taşıma sistemi ile tedavi edilen farelerde elde edilen sonuçlar tümör büyümesinin önemli derecede önüne geçildiğini kanıtlar niteliktedir (Ciofani et al. 2009).

Bor lipoik asit (BLA), oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde nöroprotektif potansiyeli olan, yeni bor bazlı bir hibrittir. A β (1-42) ile indüklenen AH modelinde BLA 'nın nöron koruyucu etkisi *in vitro* araştırmalarda değerlendirilmiştir. A β (1-42)'nin neden olduğu hücre ölümünü inhibe eden ve antioksidan araştırmalarda yüksek kapasitesini ortaya koyan bu molekül EP18207733 patent numarası ile Avrupa Patent Ofisi'nde tescillenmiştir (Cacciatore et al. 2018).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bor bileşiklerinin çeşitli dozlarının periferik kan kültürlerinde sitotoksik, genotoksik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, bileşiklerin özellikle düşük dozlarda antioksidan enzimlerin aktivitesi üzerinde olumlu etkileri olduğu rapor edilmiştir. Bileşiklerin yüksek doz uygulamasında genotoksisiteyi indüklediği, ancak artan doza bağlı olarak oksidatif stres parametrelerinde bir artış olduğu bildirilmiştir (Türkez et al. 2007).

$AlCl_3$ uygulamasının neden olduğu toksisite ile meydana gelen beyin hasarında borik asitin (BA) koruyucu potansiyelinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada araştırmacılar Sprague-Dawley sıçanları ile araştırmaları gerçekleştirmişlerdir. Tüm gruplarda beyin nöron sayısı hesaplanmıştır. Dahası histopatolojik incelemeler de gerçekleştirilmiştir. $AlCl_3$ ve yüksek dozda BA uygulanan gruplarda yüksek beyin hasarı gözlemlenmiş ancak BA'nın düşük dozlarıyla tedavi edilen gruplarda $AlCl_3$ toksisitesinde iyileşmeler rapor edilmiştir (Çolak et al. 2011).

Borun önemli biyolojik rollerinden ötürü özellikle son yıllarda hayvan besin maddesi olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Araştırmacılar borlu bileşiklerden olan üleksitin zebra balığı beyinde oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışma düşük üleksit uygulamasının zebra balığı beyinde oksidatif stres parametreleri üzerinde olumsuz bir duruma neden olmadığını bununla beraber antioksidant sistem üzerinde destekleyici etkiler sergilediğini rapor etmiştir (Alak et al. 2021).

Nanomalzemelerin geniş kullanım alanı göz önüne alındığında canlı sistemler üzerinde neden olabileceği toksisitenin araştırılması bir zorunluluktur. Kobalt borid nanopartikülleri ile tedavi edilen insan alveoller hücrelerinde transkriptom analizi gerçekleştirilen bir araştırmada, analiz edilen 40.000 genden 712'sinin ekspresyon durumunu değiştirdiği bildirilmiştir. P53 geni, hücre döngüsü ve kanser mekanizmalarında etkin olan genleri içeren bir dizi ekspresyon durumunu değiştirdiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bulgular ışığında kobalt borid

2. KAYNAK ÖZETLERİ

nanopartiküllerinin özellikle tıbbi uygulamalar ya da diğer endüstriyel süreçlerde kullanılabilirliklerinin güvenliğini bildirmiştir (Arslan et al. 2022).

Rahul ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada beyine donapezil HCl iletimini arttırmak için kübizomal mukoadhezif in situ nazal jel geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kübozomların hazırlanmasında gliserol mono-oleat (GDO) ve yüzey aktif madde poloksamer 407 kullanılmıştır. Geliştirilen formülasyonlar, partikül boyutu, polidağılım indeksi, zeta potansiyeli, transmisyon elektron mikroskobu (TEM), in vitro ilaç salımı ve in vivo biyo-dağılım çalışması ile karakterize edilmiştir. Optimizasyon amacı için merkezi kompozit tasarımı kullanılmış ve seçilen formülasyon (2 g GDO ve %1,5 poloksamer içeren), sırasıyla jelleştirici ajan ve mukoadhezif ajan olarak jellan sakızı ve konjak sakızı varlığında hazırlanmıştır. Optimal kübizomal dağılım ve optimal kübozomal mukoadhezif in situ nazal jel, sıçan modelinde in vivo biyo-dağılım çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Yalnız ilaç çözeltisine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek transnazal geçirgenlik ve beyne daha iyi dağılım gösterdiği kaydedilmiştir. Bu nedenle, formüle edilmiş kübozomal mukoadhezif in situ jel, transnazal yoldan merkezi sinir sistemine etkili ilaçların beyin hedeflemesi için umut verici bir taşıyıcı olarak düşünülebileceği vurgulanmaktadır (Patil et al. 2019).

Rivastigmin ilacını lipozomlarla tasarlayan bir çalışmada AH modeli oluşturulan sıçanlarda intranazal yolla ilacın beyine ulaştırılması amaçlanmıştır. Geleneksel lipozomlar, lipid bileşenleri olarak kolesterol ve soya lesitini kullanılarak lipid tabakası hidrasyon yöntemiyle formüle edilmiştir. Sıçan modellerinde intranazal lipozomlar, serbest ilaç ve oral uygulamadan sonra beyin ve plazmadaki rivastigmin konsantrasyonu incelenmiştir. Lipozomlara hapsedilerek iletilen rivastigmin intranazal ve oral yol iletimiyle karşılaştırıldığında daha yüksek bir ilaç seviyesi bulunduğu rapor edilmiştir. Alzheimer hastalığının tedavisi için intranazal yoldan rivastigmin lipozomlarının verilmesinin yeni bir terapötik yaklaşım olabileceği belirtilmektedir (Arumugam et al. 2008).

AH 'nin tedavisi için oral dozaj formunun alternatiflerinin araştırıldığı bir diğer çalışma, rivastigminin transdermal uygulamasını formülüle etmeyi, geliştirme ve sürekli ilaç dağıtımının plazma seviyelerini terapötik aralıkta tutmayı amaçlamıştır. *Ex vivo*

2. KAYNAK ÖZETLERİ

çalışmada sıçan derisi yoluyla geçirgenlik parametreleri ve *in vivo* çalışmada farmakokinetik parametreler değerlendirilmiştir. *Ex vivo* permeasyon çalışması, lipozomların, sulu kontrolün 2 katından daha fazla sabit durum akışı sağladığını göstermiş dahası *in vivo* deneylerde, optimize edilmiş rivastigmin lipozomlarının topikal uygulamasından sonra, C_{max} 208 ng/ml ve AUC 0-24 3605 (ng.saar/ml) de kontrol grubundan önemli ölçüde yüksek olduğu rapor edilmiştir. (Salimi et al. 2020).

Tavşanlar üzerinde yapılan bir araştırmada tiyotlanmış kitosan hidrojel (TCH) içinde dağıtılmış lipozomal donapezil HCl'nin (LDH) karakterizasyonun gerçekleştirilmesi, farmakokinetiğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan TCH ters yönlü buharlaştırma tekniği kullanılarak LDH ile birleştirilmiş, ardından hazırlanan yeni nano taşıma sistemi karakterize edilmiştir. Sonuçlar optimize edildikten sonra *in vivo* ortamda hidrojin farmakokinetiği araştırılmıştır. Ortalama LDH boyutu ve ilaç tutma verimliliği sırasıyla 438,7± 28,3 nm ve %62,5 ± 0,6 olarak kaydedilirken taşıyıcı sistem tarafından salınan ilacın yarı ömrünün yaklaşık 3,5 saat olduğunu ve lipozomal hidrojinlerin 4°C'de kararlı olduğunu rapor edilmiştir. Donapezil HCl'ye kıyaslandığı zaman optimize edilmiş hidrojin nazal yolla ortalama maksimum ilaç konsantrasyonunu ve eğri altındaki alanı sırasıyla %46 ve %39 arttırdığını göstermiştir. Dahası donapezil İntranazal olarak verilen ilaç sisteminin, oral tabletlerine kıyasla ilacın beyin dokusundaki miktarını ortalama %107 oranında arttırdığı da rapor edilmiştir. Araştırmacılar elde ettiği tüm bu verilerin ışığında TCH'ye dağılan lipozomların, donapezil HCl'nin nazal uygulaması için umut verici bir uygulama olduğunu ve Alzheimer hastalığının tedavisi için düşünülebileceğini rapor etmektedirler (Al Harthi et al. 2019).

Artan AH vakalarının sayısı ve mevcut tedavi yöntemlerinin sınırlamaları araştırmacıları yeni ilaç arayışı konusunda yoğun bir araştırmaya yönlendirmektedir. Donapezil yüklü nano emülsiyonlar hazırlanarak gerçekleştirilen bir araştırmada, karakterizasyon çalışmaları partikül boyutu, polidağılım indeksi ve zeta potansiyeli araştırılmıştır. Salınım çalışması tamamlanan nanoemülsiyoların burundan beyine ilaç iletiminin araştırılması amacıyla Sprague Dawley sıçanları kullanılmıştır. Nano emülsiyon, 0,084 PDI ve -10,7 mV zeta potansiyeli ile 65,36 nm partikül boyuta sahip olduğu gösterilmiştir. *In vitro* ilaç salım çalışmalarına ait sonuçlar nano emülsiyonun fosfat tamponu içinde 4 saatte %99 yapay beyin omurilik sıvısında 2 saatte %98 ve simüle

2. KAYNAK ÖZETLERİ

nazal sıvıda 2 saatte %96 maksimum salınımı göstermiştir. Nano emülsiyon sitotoksitesi ve antioksidan aktivitesi, doza bağlı sitotoksite ve % radikal süpürme aktivitesi göstermiştir. Ayrıca Giemsa boyama görüntüleri de geliştirilen formülasyonun hücre morfolojisi üzerinde hiçbir olumsuz etkisi olmadığını doğrulamıştır (Kaur et al. 2020).

Alzheimer hastalığının tedavisindeki en önemli sınırlayıcılardan biri kan-beyin bariyerini aşabilme potansiyelidir. Araştırma grubu emülsiyonlara hapsedilen memantin intranazal uygulama yoluyla beyine hedeflendirilmesi üzerine tasarladıkları çalışmada nano emülsiyonun *in vitro* ilaç salınım çalışması ve antioksidan kapasitesini analiz etmişlerdir. Nano emülsiyonların ortalama 11 nm partikül boyutuna sahip olduğunu ve %99'luk bir permeabiliteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapay nazal sıvıda %80'lik bir ilaç salınım aktivitesine sahip olan nano emülsiyonlar aynı zamanda %98'lik bir hücre canlılığı göstermiştir. Dahası gama görüntüleri ve biyo dağılım sonuçları intranazal olarak uygulanan ilacın sıçan beyinde 1,5 saatte %3,6 daha yüksek alınımına sahip olduğunu kanıtlamıştır. Böylece nano emülsiyonların doğrudan burundan beyine iletim için potansiyel bir memantin taşıyıcısı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Kaur and Nigam 2020).

Orta ve şiddetli Alzheimer hastaları için kullanımı onaylanan memantin etki mekanizması tam olarak gösterilememiştir. Yapılan bir çalışmada memantin (MEM), PLGA nanoparçacıklarına yüklenmiş ve MEM-PEG-PLGA nanopartiküllerinin Alzheimer hastalığının tedavisi için oral uygulama ile KBB hedeflemesi amaçlanmıştır. Tüm parametreleri optimize edilen çalışmada MEM-PEG-PLGA nanopartikülleri 200 nm'nin altında bir ortalama partikül boyutu, monomodal poli dağılıma ve negatif yüzey yüküne sahip olduğu gösterilmiştir. Fizikokimyasal karakterizasyon çalışması ilacın PLGA matrisi içinde dağıldığını doğrulamıştır. MEM-PEG-PLGA nanopartiküllerinin beyin hücre dizilerinde sitotoksik olmadığı bulunmuştur. Memantin, serbest ilaç çözeltilisine karşı NP'lerden daha yavaş bir salım profili izleyerek, *in vivo* ilaç uygulama sıklığının azaltılmasına izin verdiği rapor edilen araştırmada taşıma sistemi hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak KBB'yi geçebilmiştir. Tüm bunlara ek olarak histolojik çalışmalar, MEM-PEG-PLGA nanopartiküllerinin β -amiloid plaklarını ve Alzheimer hastalığının ilişkili inflamasyon özelliğini azalttığını doğrulamaktadır (Sánchez-López et al. 2018).

Galantamin hidroklorürün kolinerjik yan etkilerle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu bileşenler kullanılarak galantamin hidrobromürün katı lipid nanopartikül formülasyonu geliştirilmiştir. Seçilen galantamin hidrobromür yüklü katı lipid nanopartiküller, boyutu 100 nm'den küçük ve maksimum ilaç tutma oranı %83 olan nano koloidal sistemler oluşturmuştur. Bu küresel ilaç yüklü nanoparçacıklardan *in vitro* ilaç salınımının kontrollü bir şekilde 24 saat boyunca %90'dan fazla olduğu gözlemlendi. *In vivo* değerlendirmeler ilacın bilişsel bozukluğu olan sıçanlarda önemli bir hafıza restorasyon kapasitesi sergilediği rapor edilmiştir. Ayrıca normal ilaca göre yaklaşık iki kat biyoyararlanım sunan nanoyapılar özellikle Alzheimer gibi hastalıklarda güvenli ve etkili ilaç dağıtımında umut verici bir araç olarak önerilmektedir (Misra et al. 2016).

Artan kanıtlar Alzheimer hastalığının bozulmuş beyin insülin sinyalizasyonu ile ilişkili bir metabolik bozukluk olduğunu göstermektedir. Bu nedenle son yıllarda diyabetik ilaçlar AH'nin tedavisi için yeni bir terapötik seçenek olarak gündeme gelmiştir. Pioglitazon (PIO), AH tedavisi için en çok araştırılan diyabetik ilaçlardandır. PIO, AH modellerinde klinik öncesi çalışmalarda başarı gösterse de düşük KBB geçirgenliği ve önemli periferik yan etkileri PIO'nun başarısını ciddi bir derecede düşürmektedir. PIO'nun nano lipid taşıyıcılarla intranazal iletimini hedef alan yeni formülasyonu beyine hedeflendirilmiş ve taşıyıcı sistemin parametreleri optimize edilmiştir. Optimize edilmiş formülasyonun partikül boyutu 211 nm ve zeta potansiyeli 14,9 mV olarak hesaplanmıştır. Poli dağılım indeksi ve ilaç enkapsülasyon verimliliği sırasıyla %0,257 ve %70,18 olarak bulunmuştur. Gerçekleştirilen depolama stabilitesi çalışmaları, 4 °C ve 25 °C'de nano taşıyıcı sistemin stabilitesini doğrulamıştır. *In vitro* ilaç salımı çalışması, nano lipid taşıyıcıların sürekli bir ilaç salımı sergilediğini göstermiştir. Ayrıca sıçanlarda yapılan *in vivo* biyolojik dağılım çalışması, ilacın intranazal nano lipid taşıyıcısıyla, burundan beyne doğrudan taşındığını göstermiştir (Jojo et al. 2019).

Tarenflurbil zayıf beyin penetrasyonu nedeniyle faz II klinik deneyleri aşamasında başarısız olmuştur. Bundan dolayı tarenflurbil için etkin ilaç dağıtım sistemine büyük bir ihtiyaç vardır. Bir çalışmada intranazal olarak verilen nanotaşıyıcılar aracılığıyla beyine ilaç iletiminin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Tarenflurbil poli(laktid-

2. KAYNAK ÖZETLERİ

ko-glikolid) nanopartiküller (TFB-NP'ler) ve katı lipid nanopartiküller (TFB-SLN'ler) gibi iki farklı nanotaşıyıcıya yüklenmiştir. Dinamik ışık saçılım tekniği ve transmisyon elektron mikroskobu ile belirlendiği üzere nanotaşıyıcıların yaklaşık 200 nm partikül boyutu, çapı ~200 nm olan koku alma aksonları boyunca hücreler arası taşımayı gerçekleştirmiş ve daha sonra beyine doğrudan ulaşım sağlamıştır. İlacın burun boşluğunda kimyasal ve biyolojik bozunumdan korunmasını sağlayan TFB-NP'ler ve TFB-SLN'ler, sırasıyla %64,11 ve %57,81 oranında ilaç yükleme verimliliği göstermiştir. *In vitro* salım çalışmaları, TFB'nin TFB-NP'lerden ve TFB-SLN'lerden sürekli salımın verimini saf ilaca kıyasla kanıtlayarak, ilacın hedefleme bölgesinde uzun süreli kalma sürelerini ortaya koymuştur. Bu çalışma ile elde edilen veriler tarenflurbilin terapötik konsantrasyonlarının polimerik ve lipidik nanopartiküllerin intranazal uygulamasından sonra koku alma yolu yoluyla doğrudan beyne taşınabileceğini kanıtlamıştır (Muntimadugu et al. 2016).

Bir antioksidan flavonoid olan zerdeçalın AH'de oksidatif stresi baskılama üzerine yüksek etkinlik gösterdiği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Ancak düşük çözünürlük, düşük biyoyararlanım ve beyine ulaşımından kaynaklanan sınırlamalar nedeniyle terapötik etkinliği düşmektedir. Bilim insanları zerdeçal kapsüllü kitosan işlevselleştirilmiş PLGA çekirdek/kabuk NP'lerini (CH@Cur-PLGA C/S NP'leri) sentezlemiş ve intranazal yolla uygulamasını konu alan bir çalışma gerçekleştirmiştir. Üretilen NP'ler kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiş ve %75 ilaç yükleme verimi ve 200 nm aralığında parçacık boyutu ile zerdeçal kapsüllemesi doğrulanmıştır. TEM analizi, CH'nin PLGA NP'leri üzerinde tek tip kaplamasını ortaya koymuştur. Salım ve geçirgenlik çalışması, nazal mukozadan sürekli salım ve gelişmiş geçirgenlik göstermiştir. *In vitro* KBB modeli, C/SNP'ler için verimli geçiş sergilemektedir. *In vivo* toksisite analizleri nanoyapıların düşük toksisite gösterdiğini ortaya koymuştur (Dhas and Mehta 2021).

Saksagliptin (SAX), AH'nin tedavisinde potansiyele sahip olan, yeni keşfedilen bir dipeptidil peptidaz-4 enzim inhibitörü molekülüdür. Ancak ilacın yüksek hidrofilik özelliğinden ötürü kan beyin bariyerini geçememe sınırlamasına sahiptir. Mevcut çalışmada kitosan-l-valin konjugatı sentezlenmiş, ardından SAX'ı içine alan nano konjugatları hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller boyut, yüzey morfolojisi ve ilaç

yükleme verimi araştırılarak karakterize edilmiştir. Hazırlanan nano konjugatın kararlılığı, sıçan plazması ve beyin homojenatı örneklerinde araştırılmıştır. Çalışmada nanopartiküllerin kan beyin bariyeri geçirgenliği, nanopartiküllere floresan boya eklenerek başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Sıçanlarda *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar, nanopartiküllerin plazmada oldukça kararlı olduğunu ve saf SAX'ın çok az miktarda saldığını göstermiştir. Farmakokinetik çalışmalar, nanopartiküllerin saf SAX'tan 3,42 kat daha düşük bir (AUC_{0-t}) değerine sahip olduğunu göstermiştir (Fernandes et al. 2018).

Statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel olarak faydalı olabileceği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada simvastatin yüklü lesitin/kitosan nanoparçacıklarının (SVT-LCN'ler) nazal uygulamaya uygun olarak hazırlanması, karakterizasyonu, fizikokimyasal özellikleri ve *in vivo* biyolojik dağılımı değerlendirilmiştir. Üretilen SVT-LCN_MaiLab nanoparçacıkları küçük çaplı pozitif yüzey yükü ve yüksek kapsülleme verimliliği ile ideal fizikokimyasal özellikler sergilemiştir. Parçacıklar, simüle edilmiş burun sıvısında *in vitro* olarak nispeten hızlı bir simvastatin salınımı (6 saatte %35,6) göstermiştir. Boş nanopartiküllerin sitotoksitesite göstermemesi hazırlanan formülasyonun nazal uygulama için güvenli olduğunu kanıtlamıştır. Dahası simvastatin yüklü nanopartiküllerin sitotoksitesinin ilaç çözeltisinden üç kat daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Sıçanlarda, benzer bir simvastatin süspansiyonu dozu uygulamasına kıyasla simvastatin yüklü nanopartiküllerin burundan uygulanmasının beyinde önemli ölçüde daha yüksek bir radyoaktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Clementino et al. 2016).

Piperin, güçlü antioksidan etkiye yol açan ve asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden asetilkolin gibi üçüncül nitrojen sağlayan, polien bağ sistemine sahip doğal bir alkaloiddir. Alzheimer patolojisinde artan oksidatif stres ve asetilkolin konsantrasyonunda azalma rapor edilmektedir. Mevcut araştırma, beyne hedeflendirilmiş 2 mg/kg piperin deneysel AH modelinde katı lipid nanoparçacıklarına yüklenmiş ve karakterizasyonu tamamlanan taşıyıcı sistemin, davranışsal biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Emülsifikasyon çözücü difüzyon tekniği ile beyine hedeflemek üzere poli sorbant-80 kaplamalı piperin katı lipid nanopartikülleri hazırlanmıştır. *In vivo* deneysel Alzheimer hastalık modeli ibotenik asit kullanılarak oluşturulmuştur (Yusuf et al. 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son on yılda özellikle kan beyin bariyerini geçebilen, AH'nin tedavisinde daha etkin olabilecek yeni ilaç arayışları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Alzheimer hastalığı ile ilişkili agregatları inhibe edebilen ancak düşük KBB geçirgenlik-yüzey alanı nedeniyle beyne istenen konsantrasyonlarda ulaşamayan peptid $iA\beta 5$ 'in KBB yoluyla ilaç taşınmasını iyileştirme amaçlayan çalışmada yüzey anti-transferin reseptörü monoklonal antikoru (OX26) ve anti- $A\beta$ ile işlevselleştirilmiş olan poli(laktik-ko-glikolik asit) nanoparçacıkları üretilmiştir. Domuz beyni kılcal endotel hücreleri sistem etkinliğini ve toksisitesini değerlendirmek için bir KBB modeli olarak kullanılmıştır. Çalışmada peptid $iA\beta 5$ 'in kontrollü bir şekilde verilmesi ile immün nanopartiküllerin alımı, monoklonal antikor işlevselleştirme olmayan nanopartiküllere kıyasla önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Loureiro et al. 2016).

Bir araştırma grubu $A\beta_{(1-42)}$ enjekte edilerek oluşturulmuş *in vitro* AH modellerinde tek başına antosiyaninlerin ve antosiyanin yüklü poli (etilen glikol)-altın nanoparçacıklarının (PEG-AuNP'ler) nöroprotektif etkisini araştırmış ve karşılaştırmıştır. Tek başına veya PEG-AuNP'ler (AnPEG-AuNP'ler) ile konjuge antosiyaninlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* AH modellerinde p-JNK/NF- κ B/p-GSK3 β yolunu inhibe ederek $A\beta_{(1-42)}$ ile indüklenen nöroinflamatuvar ve nöroapoptotik belirteçleri azalttığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, PEG-AuNP'lerle yüklenen antosiyaninler, tek başına antosiyaninlere kıyasla daha etkili sonuç sergilediği belirtilen çalışmada, Tüm sonuçlar ele alındığında, PEG kaplı altın antosiyanin nanoparçacıklarının, AH gibi nörodejeneratif hastalıkları önlemek için nanotıp alanında yeni bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir (Kim et al. 2017).

Bir başka çalışmada, mezogözenekli silika nanopartiküllerin (P1-MSN) daha büyük gözenek boyutu ile sentezlenmiş ve ardından P1-MSN, süksinik anhidrit (S-P1-MSN) ve 3-aminopropiltrietoksilan (APTES) (AP-CO-P1) ile işlevselleştirilmiştir. P1-MSN'nin oda sıcaklığında süksinik anhidrit ile işlevselleştirilmesi için yeni bir yöntem olarak kullanılmıştır. Karakterize edilen nanopartiküllere rivastigmin (RT) yüklenmiştir. 24 saat boyunca P1-MSN, AP-CO-P1-MSN ve S-P1-MSN'ye maksimum yükleme yüzdesi %49,8, %11,9 ve %14,28 olarak rapor edilmiştir. Simüle edilmiş mide ve vücut sıvılarında, RT yüklü AP-CO-P1-MSN'nin (AP-CO-P1-MSN-RT) salım hızı, diğer RT yüklü nanoparçacıklarından daha düşük olduğu görülmüştür. Oral yolda, AP-CO-P1-

2. KAYNAK ÖZETLERİ

MSN-RT'de RT'nin sürekli salınımı gerçekleşirken ayrıca, P1-MSN için sitotoksikite etki gözlenmemiştir. Fakat AP-CO-P1-MSN ile tedavi edilen hücreler, bu nanopartiküllerin kolay girişi ve hücrenin farklı bölümlerinde birikmesi nedeniyle SY5Y hücre canlılığında bir etki gösterdiği bildirilmektedir (Karimzadeh et al. 2017).

Mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklanan anormal reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi nöronal hücre ölümüne yol açabilir. Seryum oksit (CeO_2) nanoparçacıklarının, Ce^{+3} ve Ce^{+4} oksidasyon durumları arasında gidip gelerek güçlü ve geri dönüştürülebilir ROS temizleyicileri olarak işlev gördüğü bilinmektedir. CeO_2 nanoparçacıklarının seçici olarak mitokondriye hedeflenmesi, nörodejeneratif hastalıklar için umut verici bir terapötik yaklaşım olabileceğini öneren bir araştırmada 5XFAD transgenik Alzheimer hastalığı fare modelinde mitokondriye lokalize olan ve nöronal ölümü baskılayan trifenilfosforyum-konjuge CeO_2 nanoparçacıklarının tasarımı ve sentezi rapor edilmiştir. Trifenilfosforyum-konjuge CeO_2 nanopartikülleri, bu farelerde gözlemlenen reaktif gliozis ve morfolojik mitokondri hasarını azaltmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri veriler doğrultusunda trifenilfosforyum-konjuge CeO_2 nanoparçacıklarının Alzheimer hastalığında mitokondriyal oksidatif stres için potansiyel bir terapötik aday olduğunu bildirmektedirler (Kwon et al. 2016).

Tau agregasyonunu *in vitro* olarak inhibe etme amacıyla ilk kez protein başlıklı (PC) metal nanopartiküllerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada floresan spektrometrisi, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ve elektron mikroskobu ile karakterize edilen güçlü Tau agregasyon inhibitörleri olarak tasarlanan PC- Fe_3O_4 ve PC-CdS nanoparçacıklarının AH'deki terapötik potansiyeli araştırılmıştır. Biyolojik olarak sentezlenmiş PC-metal nanoparçacıklarının, özellikle demir oksidin, nöroblastoma hücrelerinin canlılığını etkilemediğini ortaya konmuştur. Çalışmada nanopartiküllerin, güçlü Tau agregasyon inhibitörleri olarak öncülük edebileceği ve çok küçük boyutları nedeniyle spesifik ilaç dağıtımı için modifiye edilebileceği bildirilmiştir. Alzheimer hastalığında biyolojik nanoyapıların rolünü anlamak için ilginç bilgiler sağlayan anti-tau agregasyon ilaçları tasarlamak için yeni bir yaklaşım olarak önerilmektedir (Sonawane et al. 2019).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Araştırmacılar bir çalışmada ilk kez pH'dan bağımsız katyonik piridilfenilen dendrimerlerinin, koyun prion proteininin inklüzyon gövdeleriyle örneklendiği gibi fizyolojik pH'da amiloid protein agregatlarını bozabildiğini rapor etmiştir. Sonuçlar, inklüzyon cisimciklerinin dendrimerlere maruz kalmasının, nano boyutlu protein-dendrimer komplekslerinin kısmi ayrışmasına ve salınmasına yol açtığını göstermektedir. Kompleksler, SDS PAGE, DLS ve Western blot yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Thioflavin T floresansı, dendrimerlere maruz kalması üzerine prion proteininin amiloidojenik kabiliyetinde bir azalma olduğunu açıkça göstermiştir. Dahası elde ettikleri veriler ile araştırmacılar oluşan komplekslerin stabil olduğunu ve daha az kümelenme gösterdiğini de bildirmektedirler (Sorokina et al. 2016).

Sitotoksisite, çözünürlük ve kararlılık nanopartiküllerin tıbbi uygulamalarda kullanılması için önemli özelliklerindedir. 30-60 nm boyutuna 1,6 nm kalınlığa sahip olan hBN nanopartiküllerinin sentezlendiği bir çalışmada proteinlerin taşınması ve dağıtımı için güvenli bir sistem olduğu rapor edilmiştir. Bir antijen proteini bağlanarak oluşturulan taşıma sisteminin tek başına antijen proteinine kıyasla 4 kat yüksek bir antikor tepkisi oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırma hBN nanopartiküllerinin yüksek biyoyumluluk ve düşük reaktogenite ile verimli bir biyomedikal platform olarak hizmet edebileceğini ortaya koymaktadır (Lu et al. 2016).

Bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmadaki önemli bir sınırlama antikor kullanımınıdır. Uçucu çay ağacı yağının hBN nanopartikülleri ile taşınımını hedefleyen bir araştırma suda dağılım, biyoyumluluk ve yüksek biyoyararlanım ile umut vadeci yeni bir yaklaşım olduğu rapor edilmiştir (Guan et al. 2020).

Folik asit ile fonksiyonelleştirilerek fludarabin ve sitarabin antikanser ilaçları için bor nitrür oksidinin taşıyıcı sistem olarak araştırıldığı çalışmada ilaçların nano taşıyıcı üzerindeki absorpsiyonunun spontan ve ekzotermik gerçekleştiğini göstermiştir (Dehghan et al. 2021).

Son bulgular hBN nanopartiküllerinin yalnızca ilaç taşıyıcısı olarak hareket etmediğini aynı zamanda önemli biyolojik etkiler sergilediğini de ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada $A\beta_{(1-42)}$ ile indüklenen nörotoksisiteye karşı hBN

2. KAYNAK ÖZETLERİ

nanopartiküllerinin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Sentezlenen hBN nanopartiküllerinin detaylı karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve *in vitro* sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışması boyunca kullanılan tüm kimyasallar ve temin edilen ticari firmalara ait bilgiler Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi

Kitler	Alındığı Firma
MTT Kiti	Ecotechbiotechnology (Türkiye)
LDH Assay Kit	Thermo Scientific™ (ABD)
TAK Kiti	Rel Assay Diagnostics
TOD Kiti	Rel Assay Diagnostics
DMEM-F12	Gibco™
DMEM	Gibco™
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco® (ABD)
Retinoik asit	Sigma-Aldrich®
Memantin	
BLA (EP18207733)	
Sitoklazın-B	Chem cruz®(ABD)
Tripan Blue	Thermo Fisher Scientific® (ABD)
AP Site Kit	Sigma-Aldrich®
PBS	Sigma-Aldrich®
Tripan Blue	Sigma-Aldrich®
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich®
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich®
Etanol	Sigma-Aldrich®
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich®
Folik Asit	Sigma-Aldrich®
DMAP	Sigma-Aldrich®
EDC	Sigma-Aldrich®
N,N,dimetilasetamid	Chem cruz®
Hidrojen peroksit	Sigma-Aldrich®
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich®

3.1.2. Cihazlar

Tez çalışması boyunca kullanılan tüm cihazlara ait marka ve model bilgileri Çizelge 3.2 olarak aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan cihaz listesi

Cihazın Adı	Modeli
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
CO ₂ 'li Hücre Kültürü İnkübatörü	ESCO Celculture
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Dijital Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	ESCO, AC2-4E8M
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
Derin dondurucu – 86, Büyük Boy	Esco, uus-439b
Su Banyosu	ESCO
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Otoklav	JSR, JSAC-60
Analitik Terazî (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Taramalı Elektron Mikroskobu	Quanta FEG 250
Enerji Dağılım Spektroskopi	Quanta FEG 250
Frouier Kızılötesi Dönüşüm	Vertex 70v
Zetaseizer	Malvern Zetasizer Nano Series
UV-vis spektrofotometre	Biotek EPOCH

3.2. Yöntem

3.2.1. hBN-FA nano konjugatlarının hazırlanması

hBN nanopartikülleri kimyasal buhar biriktirme yöntemiyle hazırlanacaktır. Esterleşme reaksiyonuyla FA hBN nanopartiküllerinin yüzeyine kovalent olarak bağlanmıştır. 10 mg hBN nanopartikülleri 10 mL H₂O₂ ile 1 saat sonik su banyosunda muamele edildi, ardından 70°C'de gece boyu karıştırılmıştır. Böylece hBN yüzeyine hidroksil grupları eklendi. Oluşturulan hBN-OH molekülleri 9.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ortamdaki alınmıştır. Hava ile kurutulan hBN-OH yapıları sonraki adım

için kullanılıncaya kadar saklanmıştır. 10 mg FA, 10 mg N-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) ve 6.7mg 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) aynı anda 20ml N,N-dimetilasetamid (% 99,8) içinde süspansiyon edildikten sonra 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karışıma 10 mg kurutulmuş hBN-OH eklenip gece boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda oluşması beklenen hBN-FA nano konjugatları karakterizasyon analizlerinde kullanılmak üzere 9.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek ortamdaki toplanmıştır. hBN-FA nano yapıları sonraki analizlerde kullanılmak üzere PBS içinde süspansiyon edilmiştir.

3.2.2. Karakterizasyon

Hazırlanan hBN-FA nano konjugatlarının morfolojik ve elemental analizleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. hBN yüzeyine tutturulan FA'nın doğrulaması için hem hBN hem de hBN-FA için Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektrumu alınmıştır. Böylece hBN nanopartiküllerinin FA ile gerçekleştirdiği etkileşimler (B-N, B-N-B, C=O bağlarına ait titreşim frekansları) belirlenmiştir. Zeta potansiyel analizi partikül büyüklüğü ve partikül polidispersite indeksini (PDI) belirlemek için bir Zetaseizer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ultraviyole görünür soğurma (UV-vis) spektrumları hBN, hBN-FA ve FA için değerlendirilmiştir.

3.2.3. *In vitro* toksisite çalışması

Sağlıklı İnsan Dermal Fibroblast (HDFa) Hücre Kültürü

hBN-FA taşıyıcı sistemin toksisite analizleri için sağlıklı insan dermal fibroblast hücreleri (HDFa) kullanılmıştır. Bu amaçla -80°C'de tutulan, DMSO ile daha önceden hazırlanmış stok hücreler alınarak hücreler %10 fetal bovin serum (FBS, Sigma® ABD) büyüme faktörü ile desteklenmiş ve %1 penisilin/streptomisin (Thermo Fisher Scientific®, ABD) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerlerinde T-25 flask içinde geliştirildi. Her üç günde bir hücrelerin besiyeri tazelenmiştir. T-25 kültür kaplarında yeterli büyümeye ulaşıncaya kadar (%50 konfluensi) %5 CO₂ içeren ile 37 °C sıcaklıktaki kültür inkübatöründe tutulmuştur. Süre sonunda eski besiyeri uzaklaştırılmış, PBS ile hücreler iki kez yıkanmıştır. Ardından 3 mL tripsin-EDTA

eklenen kültür kapları 5 dk boyunca %5 CO₂ içeren ile 37 °C'de bekletilmiştir. Tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak amacıyla 6 mL taze DMEM besiyeri eklenmiştir. Hücre süspansiyonu nazikçe 15 mL'lik tüpe alınmıştır. Ardından hücrelerin çöktürülerek ortamdaki alınması amacıyla tüp 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılmış ve hücre peleti taze DMEM besiyeri ile nazikçe birkaç kez pipetaj yapılarak çözülmüştür. Hücre süspansiyonunun 25 µL'si 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılmış ve canlı hücrelerin sayısının belirlenmesi amacıyla boyanmıştır. Daha sonra canlı ve ölü hücreler bir Thoma lamı kullanılarak ışık mikroskobu altında 100X büyütmede sayılmıştır.

MTT analizi

HDFa hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile hazırlanan taze DMEM besiyeri içeren 96 oyuklu kültür plakalarında her oyuğa 10⁴ hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 24 saat boyunca hücrelerin gelişmesi için %5 CO₂ ve 37 °C şartlarını sağlayan kültür inkübatöründe bekletilmiştir. Süre sonunda hBN ve hBN-FA nano konjugatlarının değişen konsantrasyonları (1,95 µg/mL, 3,9 µg/mL, 7,8 µg/mL, 15,625 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 500 µg/mL) üç tekrarlı olarak oyuklara eklenmiştir. Çalışmada negatif kontrol grubu olarak hiçbir kimyasal eklenmeyen canlı HDFa hücreleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu ise TritonX-100 ile muamele edilen hücrelerden oluşturulmuştur. 24 saatlik inkübasyondan sonra, eski besiyeri uzaklaştırmış ve kültür plakası PBS ile yıkanmıştır. Her bir oyuğa 10 µL MTT reaktifi eklenerek plaka 3 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda bir mikropilaka okuyucu ile 590 nm'de absorbanslar kaydedilerek, doza bağlı canlılığı gösteren grafik aşağıdaki formül yardımıyla çizilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Negatif kontrol Absorbansı} - \text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Negatif Kontrol Absorbansı} - \text{Pozitif Kontrol Absorbansı}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.4. hBN-FA yapılarına BLA ve memantin ilaçlarının yüklenmesi ve ilaç yükleme ve salınım potansiyellerinin değerlendirilmesi

BLA ve memantin için standart grafik oluşturulması için her iki ilacın 200-800 nm aralığında maksimum tepe noktası değeri araştırılmıştır. İlaç yükleme ve salınım etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla BLA ve MEM ilaçlarının 0-100 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonuna sahip stok çözeltileri hazırlanmıştır. İlaçların maksimum tepe noktası verdiği dalga boyunda absorbansları kaydedilmiştir. Absorbansa bağlı konsantrasyonunu gösteren doğrusal grafik elde edilmiş ve denklemler yardımıyla ilaç yükleme ve zamana bağlı ilaç salınım etkinliği değerlendirilmiştir.

İlaç yükleme

2 mL hBN ve hBN-FA kompleksleri (PBS içerisinde 0,5mg / mL olacak şekilde hazırlanmış) konsantrasyonu 1mg/mL olarak hazırlanan memantin ve BLA'nın 100 µL çözeltisi ile karıştırılmıştır. Ardından karışım oda sıcaklığında 24 saat boyunca karanlıkta çalkalanmıştır. Yüklenmeden geriye kalan ilaçlar santrifüjle uzaklaştırılmıştır. Süpernatanta ait absorbans değerleri alınarak yüklenmeden geriye kalan ilaç miktarı standart grafikler yardımıyla hesaplanmıştır.

İlaç salınımı

İlaç salınım testi için, 1 mg hBN+MEM/BLA ve hBN-FA+BLA/MEM kompleksleri 2 mL PBS içinde (son pH 7.4 ve 5.0 pH değerlerinde olacak) süspansiyon edilecek ve oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (1h-2h-4h-8h-12h-24h) ortamdaki 0,5 mL PBS alınıp ve aynı hacimde taze PBS süspansiyona eklenmiştir. Ortama salınan ilaç konsantrasyonu spektrofotometrik ölçüm ile hesaplanmıştır.

3.2.5. İlaç yüklü nano taşıyıcı sistemin *in vitro* Alzheimer hastalık modelinde etkinliğinin değerlendirilmesi

SHSY-5Y hücre hattıyla *in vitro* Alzheimer modelinin oluşturulması

SHSY-5Y nöroblastoma hücre hatları retinoik asit (RA) kullanılarak nöron benzeri yapılara dönüştürülmekte ve *in vitro* Alzheimer hastalığı çalışmalarında kullanılabilir. %10 FBS ile desteklenmiş DMEM: F12 besiyeri ortamında kültüre alınarak çoğaltılan SHSY-5Y hücrelerine 10 µM RA içeren taze besiyerinden eklenerek hücre farklılaştırma çalışması başlatılmıştır. 3.günün ardından kültürler PBS ile 3 kez yıkanmıştır ve DMEM: F12 içerisinde inkübe edilmeye devam edilmiştir. Hücrelerin olgun nöron benzeri hücrelere farklılaşması morfolojik incelemeler ve akış sitometri sistemi kullanılarak hücre döngüsü analiziyle belirlenmiştir. Dönüşümü tamamlanan hücreler Aβ₍₁₋₄₂₎ toksik peptidinin IC₅₀ dozu ile muamele edilerek *in vitro* AH modeli oluşturulmuştur.

İlaç formülasyonlarının *in vitro* Alzheimer modeli üzerindeki toksisitesinin belirlenmesi

Hücresel farklılaşması tamamlanmış ve IC₅₀ konsantrasyonunda Aβ₍₁₋₄₂₎ eklenmiş hücre kültürlerine 3 tekrar halinde 0-500 µg/ml konsantrasyon aralığında (8,62 µg/ml, 16,13 µg/ml, 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) hazırlanmış nano ilaç formülasyonları uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak dönüştürülmüş hücre kültürleri ve pozitif kontrol olarak sadece β-amiloid uygulanmış hücre kültürleri sentezlenen moleküller eklenmeden kullanılmıştır. Oluşturulan *in vitro* AH modelinde canlılık oranları MTT ve LDH sitotoksosite testleriyle analiz edilmiştir.

MTT analizi

24 saat süre ile IC₅₀ konsantrasyonunda Aβ₍₁₋₄₂₎ eklenmiş ve belirli konsantrasyon aralığındaki nano ilaç formülasyonu ile muamele edilmiş SHSY-5Y hücre kültürleri sitotoksitesinin belirlenebilmesi amacıyla MTT testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla eski besiyeri uzaklaştırılan ve birkaç kez 3-4 mL PBS ile yıkanan kuyulara 10 µl MTT reaktifi

eklenmiş kültür plakaları 3 saat süre ile 37 °C'de %5 CO₂ içeren kültür inkübatöründe tutulmuştur. Süre sonunda oluşan formazan kristalleri kuyulara 100 µl DMSO eklenerek çözdürülmüştür. Plakanın 590 nm'de spektrofotometre yardımıyla absorbansları kaydedilerek hücre canlılığı belirlenmiştir.

LDH Salınım Testi

24 saat süre ile IC₅₀ konsantrasyonunda Aβ₍₁₋₄₂₎ eklenmiş ve belirli konsantrasyon aralığındaki nano ilaç formülasyonu ile muamele edilmiş SHSY-5Y hücre kültürleri sitotoksitenin belirlenebilmesi amacıyla LDH testiyle analiz edilmiştir. Süre sonunda kültür besiyerinden 90 µl alınarak yeni bir hücre kültür plakasına aktarılmıştır. Kuyulara 10 µl LDH reaktifi eklenen kültür plakası 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 450 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüş ve % canlılık oranları hesaplanmıştır.

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi

24 saat süre ile IC₅₀ konsantrasyonunda Aβ₍₁₋₄₂₎ eklenmiş ve belirli konsantrasyon aralığındaki nano ilaç formülasyonu ile muamele edilmiş SHSY-5Y hücre kültürleri Asetil Kolinesteraz Test Kiti (Abcam®, Cambridge, MA, ABD) kit prosedürü kullanılarak asetilkolinesteraz aktivitesi tayin edilmiştir. Bu amaçla kültür plakaları 100 ml liziz tamponu ile 15 dk muamele edilmiştir. Ardından kültür süpernatantı asetilkolin reaktifinin 50 µl'si ile 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 410 nm'de absorbans değerleri kaydedilerek enzim aktivitesi değerlendirilmiştir.

Akış sitometri analizi

Akış sitometri analizi için dönüşümü sağlanan SHSY-5Y hücreleri 6 kuyulu kültür plakalarında 5 x10⁵ olacak şekilde ekilecek ve 24 saat süre ile kültüre edilmiştir. Daha sonra, ilaç yüklü nanopartiküller 25 µg/mL ilaç konsantrasyonuyla eklenerek ve kültürler 24 h inkübe edilmiştir. Süre sonunda eski besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler iki kez soğuk PBS ile yıkanarak 100 µL tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılmıştır. Ardından 0,5 mL 1X bağlama tamponu içerisinde yeniden süspansiyon edilmiştir. 5 µL Annexin V-

FITC ve 5 µL propidyum iyodür eklenerek inkübe edilmiştir. Hücreler akış sitometrisi cihazından (CyFlow® Cube 6, Almanya) geçirilerek analiz edilmiştir. Herhangi bir işlem uygulanmamış hücreler negatif kontrol olarak kullanılır.

Mikroçekirdek analizi

Nöron benzeri hücelere farklılaştırılmış SHSY-5Y hücreleri DMEM temel besiyerinde konfluensiye ulaşmaya kadar geliştirilmiştir. İn vitro Alzheimer hastalığı modeli oluşturulan ve hazırlanan ilaç konjugatları ile 24 saat süreyle muamele edilen hücrelerin çekirdeklerinde mutasyonların saptanması amacıyla Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich®) floresan boyama tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla 24 saat süre ile 25 µg/mL nano ilaç formülasyonu ile muamele edilmiş SHSY-5Y hücre kuyularından eski besiyeri uzaklaştırılmış ardından birkaç kez PBS ile nazikçe yıkama yapılmıştır. % 4 glutaraldehit ile 4 °C'de 30 dk muamele edilerek kuyulara fikse edilerek hücreler bu basamaktan sonra PBS ile tekrar yıkanmıştır. Son olarak 1 µM Hoechst 33258 floresan boyasından kuyulara eklenmiş ve boya ile 5 dk karanlıkta gerçekleştirilen inkübasyonun ardından hücreler floresan mikroskobu (Leica® DM IL LED) ile analiz edilmiştir. Her grup için 1.000 hücre analiz edilmiş ve fotoğraflar kaydedilmiştir.

Toplam antioksidan kapasitesinin (TAK) belirlenmesi

Rel Assay Diagnostics® firmasından ticari olarak elde edilen TAS (Total Antioxidant Status) kitleri kullanılmıştır (Erel 2004). 30 µl kültür süpernatantı içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan eklenerek 660 nm'de ilk absorbans okutulmuştur. Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 660 nm'de ikinci absorbans değeri okunur. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun şekilde yerlerine konularak mmol Trolox Equiv./L cinsinden TAK düzeyleri tespit edilmiştir.

$$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = \frac{\Delta \text{Standart 1'in değeri} - \Delta \text{Örneğin değeri}}{\Delta \text{Standart 1'in değeri} - \Delta \text{Standart 2'in değeri}} \times 20 \quad (3.2)$$

Toplam oksidant durumu (TOD) tayini

Rel Assay Diagnostics® firmasından ticari olarak elde edilen TOS (Total Oxidant Status) kitleri kullanılmıştır (Erel 2004; Erel 2005). 75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilecek 530 nm’de ilk absorbansı kaydedilmiştir. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından 530 nm’de ikinci kez absorbansı kaydedilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edilmiştir.

$$\text{TOD } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) = \frac{\Delta\text{Örneğin değeri}}{\Delta\text{Standart 2'in değeri}} \times \Delta\text{Standart 2'nin değeri} \quad (3.3)$$

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

Analizler One-way Annova işlemi le gerçekleştirilecektir. Çalışmalar Dunnet (kontrolle karşı) ve Tukey çoklu kıyaslama analizleriyle ile karşılatılmıştır. Anlamlılık düzeyi %5 olarak belirlenmiştir (p <0,05). Hesaplamalar, GraphPad Prism versiyon 7,0 programı kullanılarak yapılmıştır.

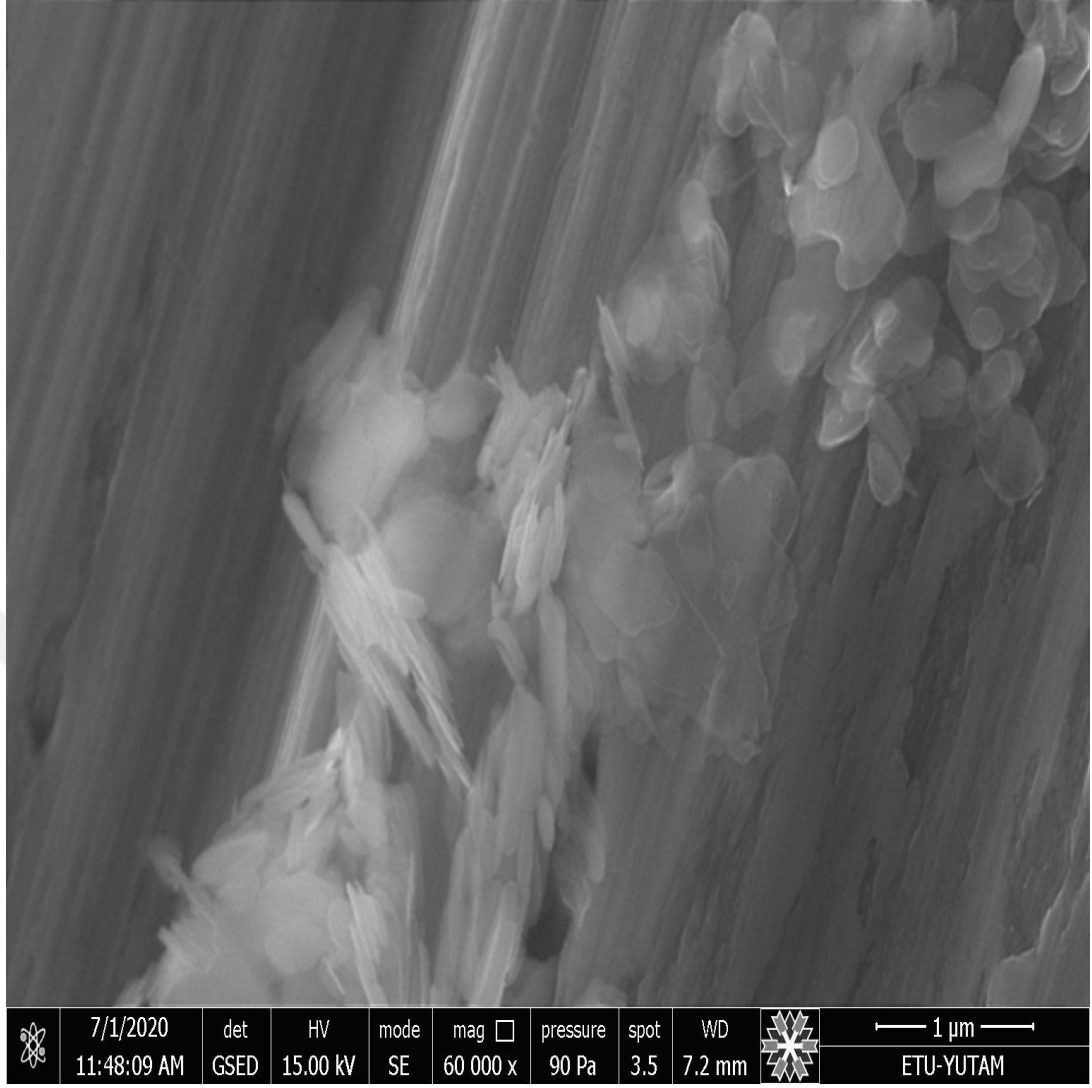
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. hBN-FA Nano Konjugatlarının Hazırlanması ve Karakterizasyon

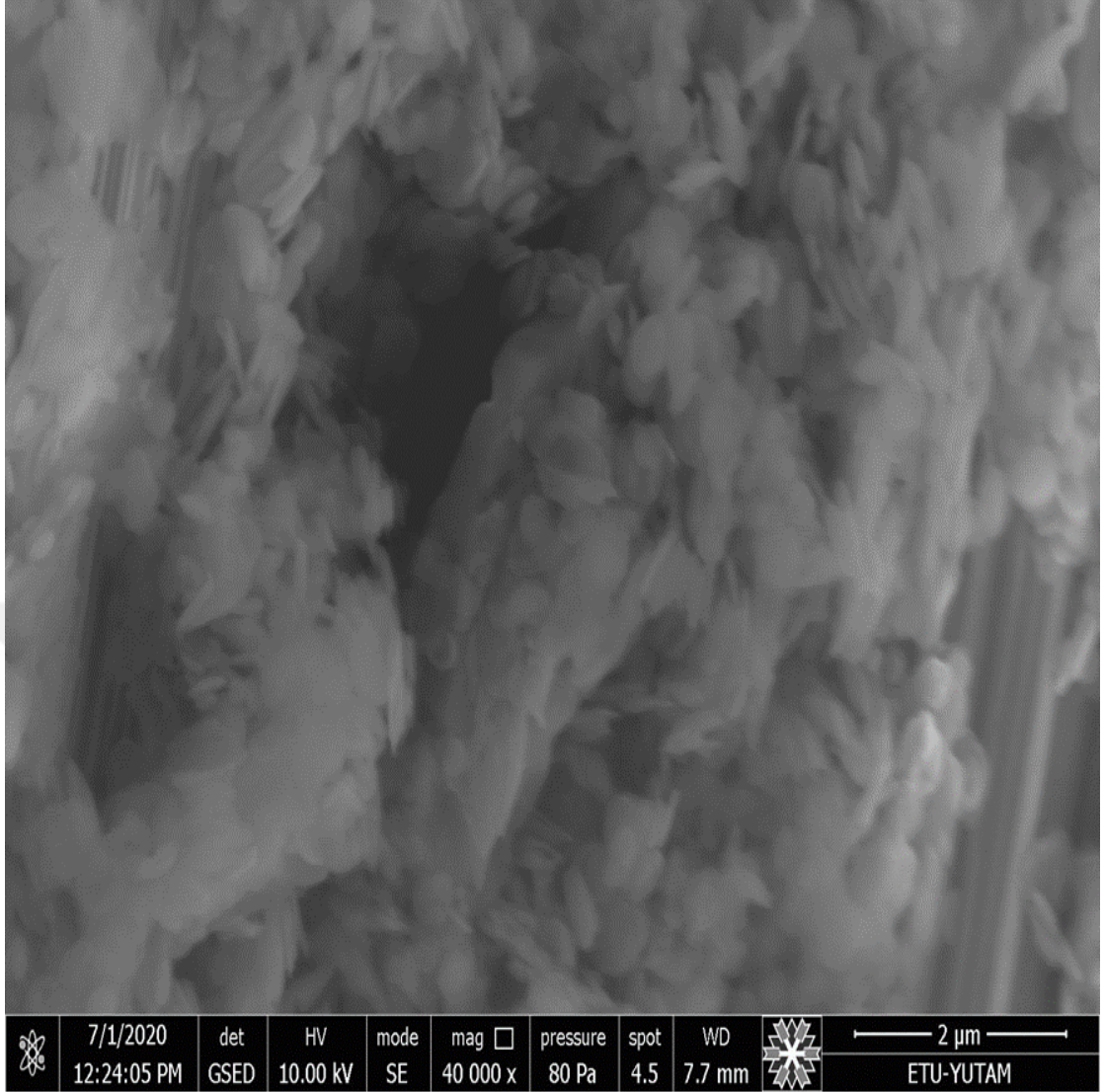
hBN yüzeyine FA molekülleri esterifikasyonu reaksiyonu ile tutturulmuştur. H₂O₂ ile muamele edilerek hBN yüzeyine aşılana -OH grubu ile hBN-OH oluşturulmuştur. Esterifikasyon reaksiyonu hBN-OH yapısındaki -OH ile FA moleküllerinin sahip olduğu -COOH grubu arasında gerçekleştirildi (Ciofani et al. 2012). Oluşturulan hBN-FA nano konjugatının ve hBN nanopartiküllerinin karakterizasyon çalışmaları SEM-EDX, Zetaseizer, FTIR, UV-vis spektrum analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Haızrlanan taşıma sisteminin yüzey morfolojisi ve elemental analizi SEM-EDX görüntüleme ile belirlenmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilen SEM görüntüleri hBN-FA nano konjugatının tek tip morfolojiye sahip olmadığını ve ortalama partikül boyutunun 200-250 nm arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de gösterilen EDX analizi ile hBN partiküllerinde bulunmayan ancak hBN-FA nano konjugatında FA’nın varlığını doğrulayan karbon ve oksijen atomlarının atomik kütle yüzdeleri sırasıyla 9,88 ve 8,60 olarak değerlendirilmiş dahası Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 olarak özetlenen EDX spektrumları hBN yüzeyine tutturulan FA’nın varlığı doğrular niteliktedir.

Nanopartikül temeli ilaç taşıma sistemleri ilaçların biyolojik dağılım ve farmakokinetik özelliklerini değiştirebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle nanopartiküllerin boyutu ve yüzey özellikleri terapötik uygulamalarda önemlidir. Özellikle nörodejeneratif hastalıkların tedavisini hedefleyen araştırmalarda aday ilaç ya da ilaç sistemlerinin kan beyin bariyeri (KBB) sınırlamasının aşabilme kabiliyeti önem arz etmektedir. İlaç ya da ilaç sistemleri ancak 1-1.000 nm boyuta sahip olduğu durumda KBB’yi endositoz ya da transsitoz yoluyla aşabilme potansiyeli sergileyebileceği yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile rapor edilmiştir (Lu et al. 2014). Mevcut tez çalışmasında tasarlanan hBN-FA temelli ilaç taşıma sisteminin 200-250 nm ortalama partikül boyutu bu bağlamda taşınan ilaçların KBB’yi geçebilme potansiyeline sahip olduğunu doğrular niteliktedir.

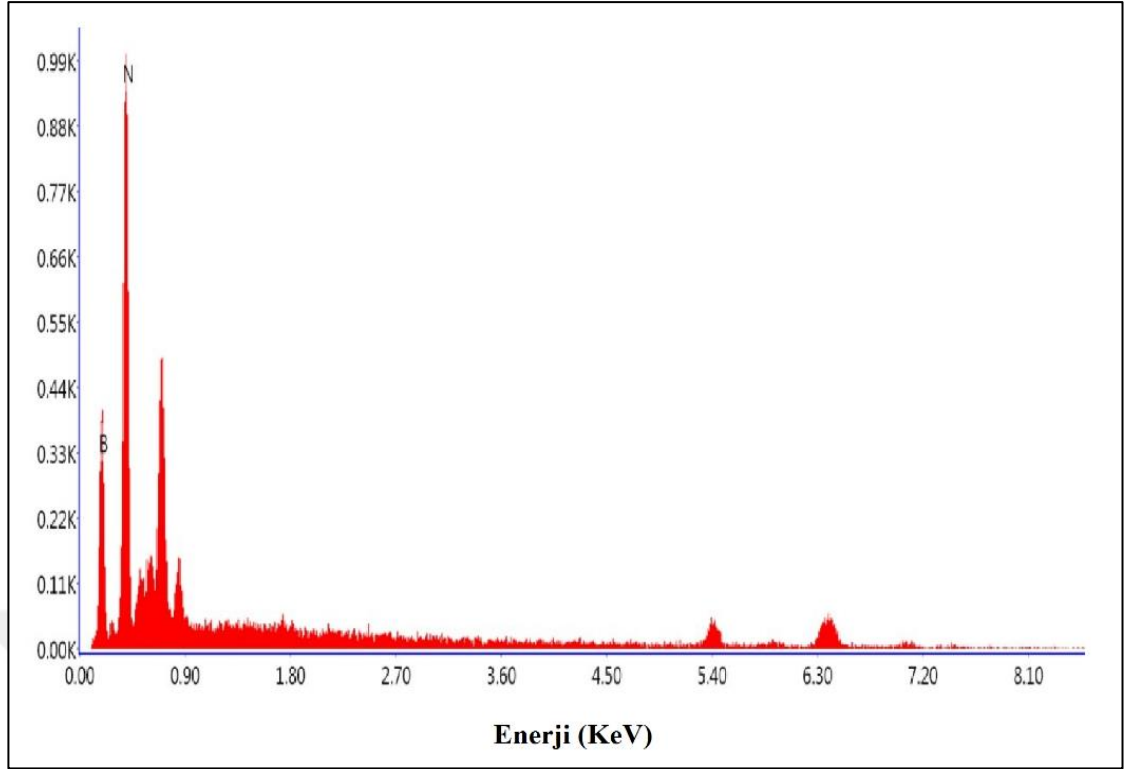


Şekil 4.1. hBN nanopartiküllerine ait SEM görüntüleme sonucu



Şekil 4.2. hBN-FA nanopartiküllerine ait SEM görüntüleme sonucu

Dahası literatür araştırmalarında hBN-FA temelli taşıma sistemi ile herhangi bir ilacın Alzheimer hastalığının tedavisi için hedeflendirildiği bir rapora rastlanmamıŐtır. İlk defa mevcut tez çalışması kapsamında hBN-FA temelli ilaç taşıma sistemi AH'nin tedavisine için BLA ve MEM ilaçları ile dizayn edilmiştir.

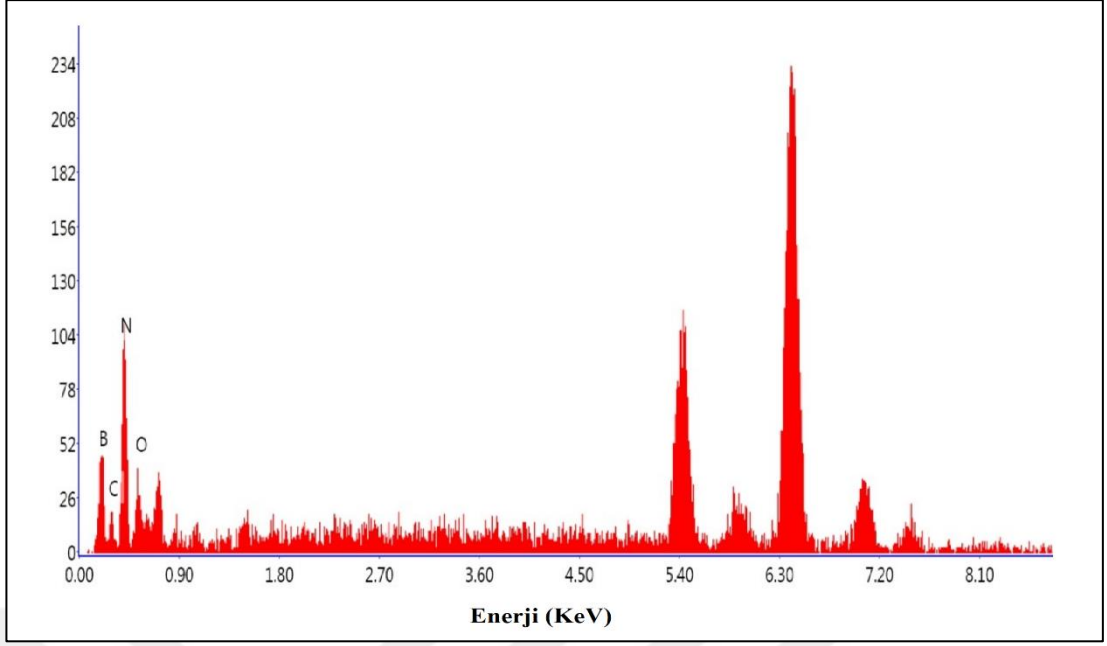


Şekil 4.3. hBN'ye ait EDX analizi sonucu

Çizelge 4.1. hBN'ye ait elemental içeriği gösteren EDX analizi

Element	Ağırlık (%)	Atomik (%)
B K	48,13	54,60
N K	51,87	45,40

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



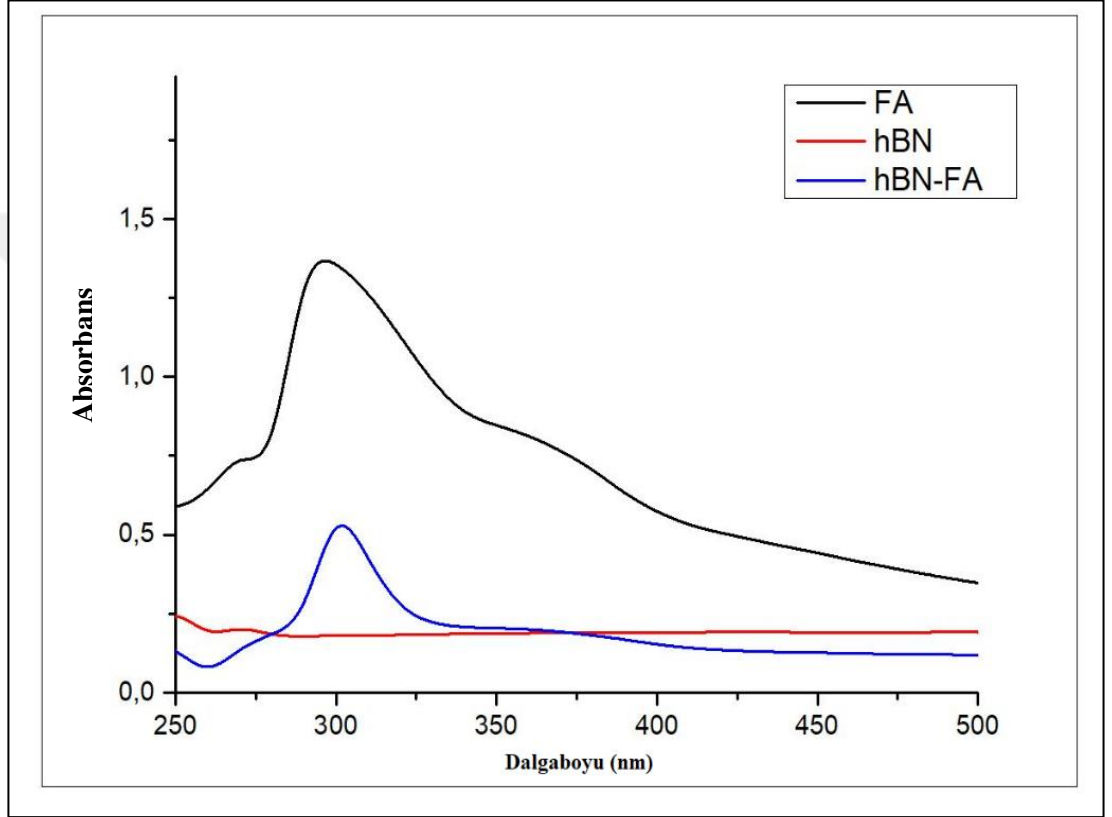
Şekil 4.4. hBN-FA'ya ait EDX analizi sonucu

Çizelge 4.2. hBN'ye ait elemental içeriği gösteren EDX analizi

Element	Ağırlık (%)	Atomik (%)
B K	43,17	49,35
C K	9,88	10,17
N K	38,35	33,84
O K	8,60	6,64

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Ultraviyole görünür bölge spektrum analizi hBN, FA ve hBN-FA için 290 nm’de gerçekleştirilmiştir. Burada FA’ya ait maksimum tepe noktası değeri dikkate alınarak her örnek için 290 nm’de verilen absorbans değerleri araştırılmıştır (Zhang et al. 2016a). hBN örnekleri 290 nm’de herhangi bir tepe noktası göstermezken; saf FA ve hBN-FA örnekleri bu noktada bir tepe değerine sahiptir. Şekil 4.5’de gösterilen UV-vis spektrum analizi de hBN yüzeyine tutturulan FA’yı doğrulamıştır.



Şekil 4.5. hBN, FA ve hBN-FA’nın 290 nm’de UV-vis spektrofotometre sonucu

Mevcut çalışmalar bor temelli nanopartiküllere folik asitin esterifikasyon reaksiyonu ile tutturulduğunu rapor etmektedir. Nitekim bor nitrür nano kürelerine FA tutturulan bir çalışmada hazırlanan taşıma sistemine klasik anti kanser ilaçlarından olan doksorubisin yüklenmiş ve taşıma sisteminin anti kanser etkinliği değerlendirilmiştir. 290 nm’de araştırılan tepe noktaları çalışmamıza benzer bir UV-vis spektrum grafiği ortaya koymuştur (Zhang et al. 2016b).

Zeta potansiyel analizi parçacıkların yüzey yükünü ölçmektedir. Zeta potansiyeli arttıkça parçacığın yüzey yükü artmaktadır. Bu durum parçacıkların birbirlerine

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

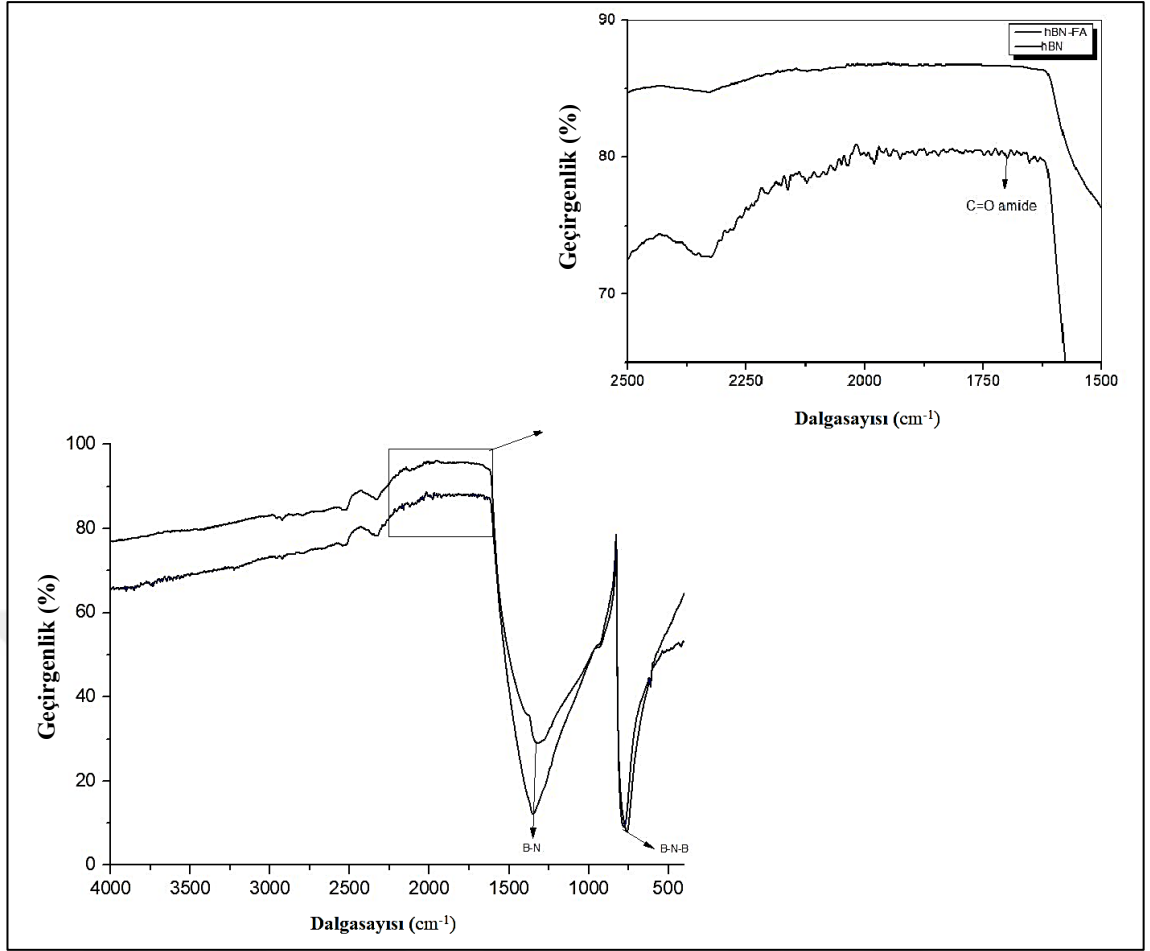
uyguladığı itme gücünü değiştireceği için partikül stabilitesini etkilemektedir. Partiküllerin arasındaki itici güçlerin artmasıyla daha düzgün bir boyut dağılımı sağlanabilir (Hans and Lowman 2002).

Çalışmada FA konjugasyonunun partikül enerjisi ve polidağılım indeksi üzerinde neden olduğu değişiklik Zetaseizer analizi ile araştırıldı. hBN nanopartiküllerinin yüzey enerjisi -10,8 mV ve polidağılım indeksi 0,368 olarak hesaplanırken bu değerler hBN-FA örnekleri için sırasıyla -17,8 mV ve 0,584 olarak kaydedildi. hBN yüzeyine FA'nın konjugasyonu partikül enerjisini kararlı aralıkta tuttu ve dikkate değer oranda değiştirmede. Ayrıca PDI değeri de özellikle nörodejenerasyon araştırmaları için istenen aralıktaydı. Çizelge 4.3'de hem hBN hem de hBN-FA nano konjugatı için gerçekleştirilen analize ait tüm sonuçlar verildi.

Çizelge 4.3. hBN ve hBN-FA' ya ait Zetaseizer sonucu

	Polidağılım İndeksi (PDI)	Zeta potansiyeli (mV)
hBN	0,368	-10,8
hBN-FA	0,584	-17,8

Moleküller arası etkileşimlerin araştırıldığı FTIR analizinde hBN nanoparçacıklarının B-N-B titreşimi 772 cm^{-1} iken, B-N'nin gerilme titreşimi 1.440 cm^{-1} bandındaydı. hBN-FA örneklerindeki FA'nın varlığı doğrulayan C=O amid bağı frekansı 1.707 cm^{-1} 'de kaydedildi. Daha önceki bir araştırma raporunda B-N-B ve C=O titreşim frekansı sırasıyla 780 cm^{-1} ve 1.700 cm^{-1} şeklinde bildirilmiştir (Zhang et al. 2016a; Vinothini et al. 2019). Analize ait sonuç aşağıda Şekil 4.6'da verildi.



Şekil 4.6. hBN ve hBN-FA' ya ait FTIR sonucu

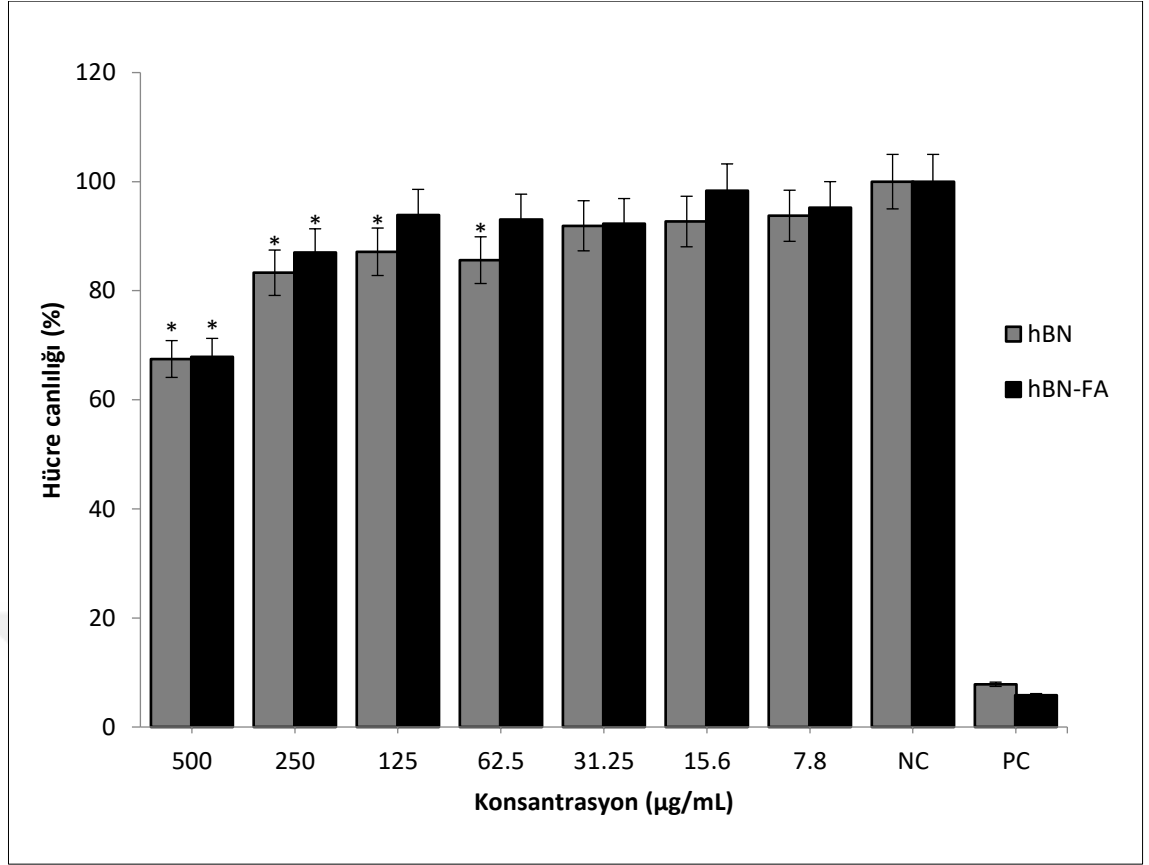
4.2. *In vitro* Toksikite Çalışması

Nanopartiküllerin tıbbi uygulamalarda kullanılması için aranan önemli bir kriter canlı dokular üzerindeki toksisitesidir. Partiküllerin kimyasal işlemlerle modifikasyonları onları birçok alanda avantajlı kıldığını gösteren sayısız çalışma mevcuttur (Xiao et al. 2015). hBN nanopartiküllerinin düşük toksisitesini raporlayan birçok çalışma mevcut olsa da partikül yüzeyine FA aşılmasının HDF hücrelerinde neden olabileceği toksisiteye ait veriler mevcut değildir.

İlaçların ya da aday moleküllerin canlı dokularda nasıl tepkime vereceğine ilişkin yapılan çalışmaların başında sitotoksikite testleri gelmektedir. Sitotoksikite test yöntemlerindeki ilerlemeler ile hücre hasarları ya da morfolojik değişiklikler saptanabilir ya da hücre ölümleri belirlenebilmektedir. Hücreler sitotoksik maddelere maruz kaldıklarında doza ve maruziyet süresine bağlı olarak apoptoz, nekroz veya otofaji

yoluyla ölebilirler. Bu testler toksik etkisi bilinmeyen ya da ilaç adayları hakkında temel bilgiler sunarak hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar için ipuçları sunar. Sitotoksitesiyi belirleyen sayısız *in vitro* test tekniği bulunmakla beraber en yaygın ve kolay hücre canlılığı ve proliferasyon yöntemi kolorimetrik bir test tekniği olan MTT 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) analizidir. Proliferasyona uğrayan hücreler dehidrojenaz enzimleri ile MTT reaktifini mor renkli suda çözünmeyen formazan kristali formuna dönüştürürler ve spektrofotometrik ölçüm ile hücrelerdeki canlılık tespit edilebilir (Mosmann 1983).

Tez çalışmasında hazırlanan taşıyıcı sistemin toksikolojik özelliklerinin araştırılması amacıyla hBN ve hBN-FA 'nın belirli konsantrasyonu (1,95µg/mL, 3,9µg/mL, 7,8µg/mL, 15,625µg/mL, 31,25µg/mL, 62,5µg/mL, 125µg/mL, 500µg/mL) ile 24 saat muamele edilen HDF hücre kültürlerinde MTT analizi gerçekleştirildi. Özellikle hBN'nin 62,5 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonu negatif kontrol grubuna kıyasla önemli bir sitotoksitesite gösterdi. Öte yandan hBN-FA'nın sitotoksitesitesi ise 250 µg/mL uygulama konsantrasyonunda dikkate değer seviyedeydi. hBN yüzeyine FA konjugasyonu HDF hücre hattında toksitesiyi önemli ölçüde azalttı. MTT analizi ile elde edilen *in vitro* sitotoksitesite sonuçları hazırlanan hBN-FA taşıma sisteminin ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Hücre canlılık oranları Şekil 4.7'de verilmiştir.



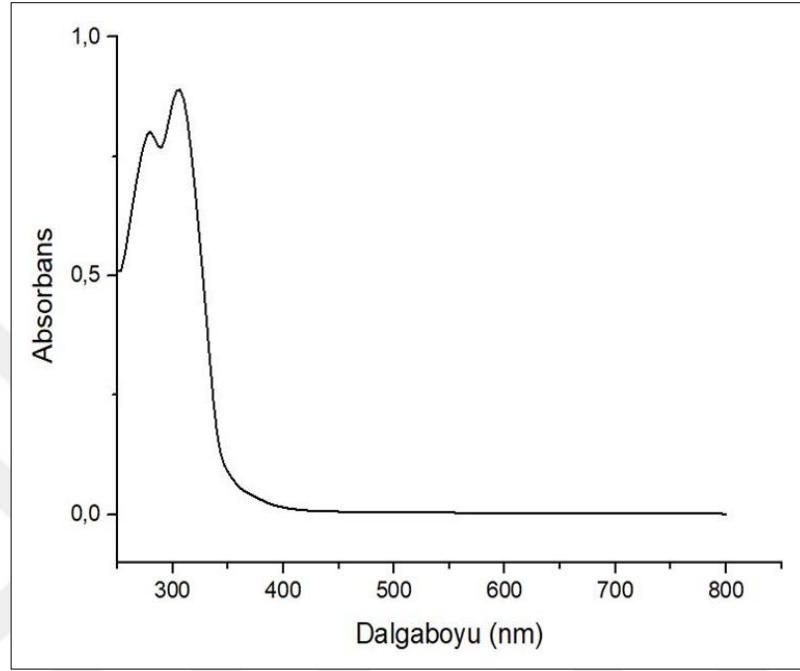
Şekil 4.7. hBN ve hBN-FA'nın insan dermal fibroblast hücreleri (HDFa) üzerinde 24 saat boyunca *in vitro* sitotoksitesini gösteren MTT analizi sonucu. Sembol (*), negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farkı temsil eder.

4.3. hBN-FA Taşıyıcı Sistemine BLA ve MEM İlaçlarının Yükleme, İlaç Yükleme ve Salınım Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

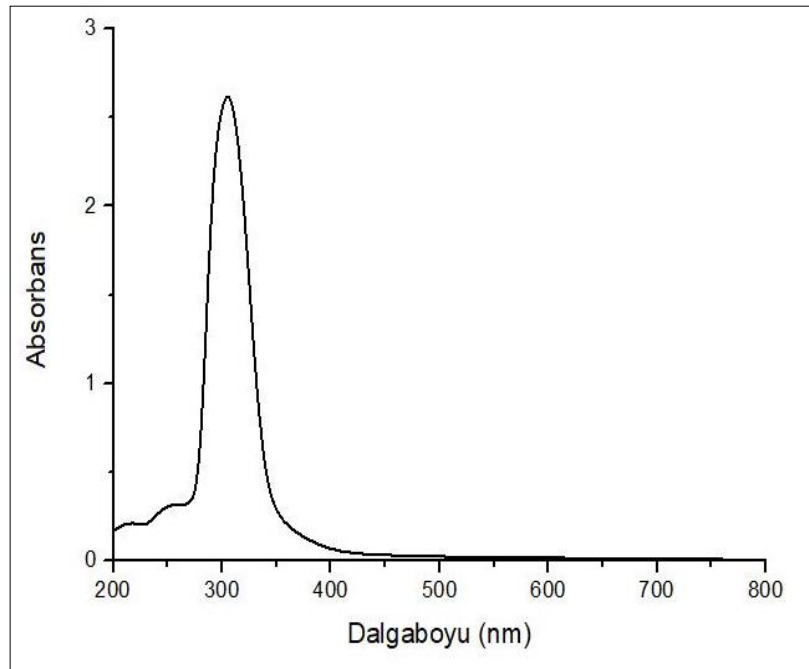
0,5 mg/mL konsantrasyonunda hBN ve hBN-FA nanoyapılarının 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL MEM/BLA ilaçlarını yükleme ve salınım potansiyellerini UV-vis spektroskopisi ile değerlendirildi. Bu amaçla MEM ve BLA için 200-800 nm görünür bölgede maksimum zirvesini belirlendi. Taşıma sisteminin ilaç yükleme ve salınım etkinliğinin hesaplanması için MEM ve BLA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren çözeltileri kullanılarak standart eğriler hazırlandı. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'de sunulan sonuçlara göre, BLA ve MEM için 200-800 nm görünür bölgede tepe değerleri sırasıyla 300 ve 310 nm'dir. hBN nanoparçacıkları üzerinde MEM ve BLA ilaçlarının 1:1 ve 1:2 olmak üzere iki yükleme deneyi gerçekleştirilmiştir. hBN nanopartikülleri, MEM ilacı için sırasıyla 1:1 ve 1:2 yükleme oranlarında %40,1 ve %84,3 ilaç yükleme kapasitesi göstermiştir. Nanoparçacık, BLA ilacını her iki karıştırma oranında da yükledi. Öte yandan hBN-

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

FA nano konjugatı 1:1 ve 1:2 oranlarında sırasıyla %97,5 ve %99,8 BLA ilacı yüklemiŐtir. Çizelge 4.4’de verilen sonuçlara göre, FA konjuge hBN nanopartikülleri ayrıca 1:1 ve 1:2 MEM oranları için sırasıyla %52,6 ve %95 olarak artan bir ilaç yükleme kapasitesi sergiledi.



Şekil 4.8. 200-800nm aralığında BLA'nın UV-vis spektrumu



Şekil 4.9. 200-800nm aralığında MEM'in UV-vis spektrumu

İlaçların nanopartikül sistemleriyle kombine edilmesi hedefe özel salınımın yanında aynı anda görüntüleme ve tedavi gibi birden farklı amaç taşıyan ajanların tek bir taşıma sistemiyle iletimini sağlar. Ancak taşıma sistemlerinin birçoğu düşük ilaç yükleme kapasitesine sahiptir. Taşıma sistemi olarak dizayn edilen birçok sistemin ilaç yükleme kapasitesi %10 ile sınırlıdır (Liu et al. 2020). Hazırlanan taşıma sistemi BLA ve MEM için yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahipti. Özellikle FA konjuge edilmeyen çıplak haldeki hBN nanopartiküllerinin BLA'yı her iki taşıma sistemi:ilaç oranında da yüklememesi yapıdaki bor elementinden kaynaklanan benzer yüzey enerjisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Nitekim yüzeyine FA tutturulan hBN örneklerinde her iki ilaç yükleme oranında da oldukça iyi yükleme kapasitesi sergilemiştir.

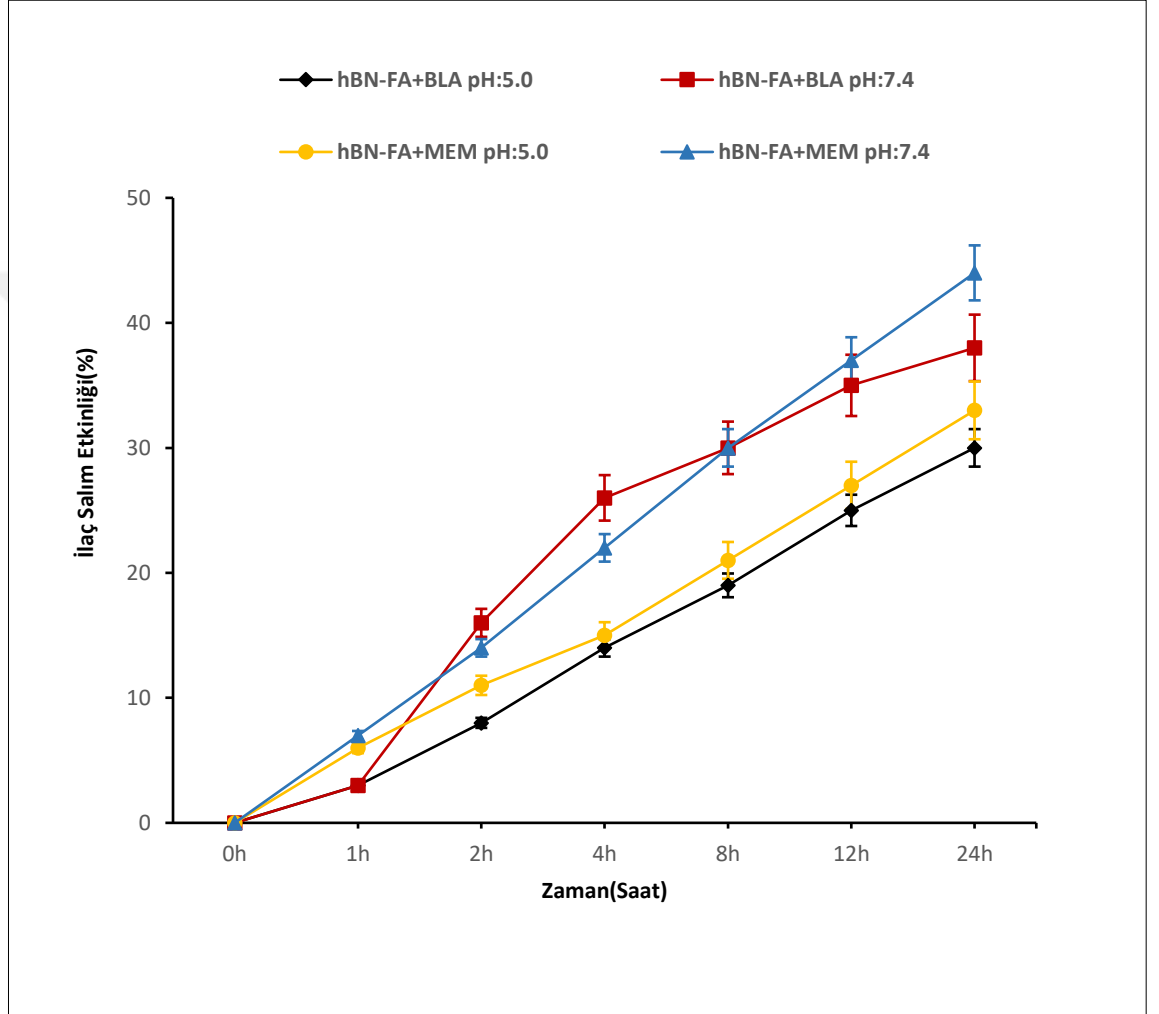
Çizelge 4.4. hBN ve hBN-FA'nın BLA ve MEM için ilaç yükleme kapasiteleri

Formülasyon	Oran	İlaç Yükleme (%)
hBN + MEM	1:2	84,3
hBN + MEM	1:1	40,1
hBN-FA + MEM	1:2	95
hBN-FA+ MEM	1:1	52,6
hBN + BLA	1:2	-
hBN + BLA	1:1	-
hBN-FA+BLA	1:2	97,5
hBN-FA+BLA	1:1	99,8

MEM ve BLA yüklü hBN-FA nano taşıyıcısı için ilaç salınım etkinliği pH:5.0 ve pH:7.4 olmak üzere iki farklı pH değerine sahip olan PBS ortamında gerçekleştirildi. Belirli zaman aralıklarında ortamdan 0,5 mL alınıp yerine 0,5 mL taze PBS eklendi ve 0-

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

2-4-8-12-24 saat boyunca hBN-FA nano taşıyıcısının MEM ve BLA ilaçları için zamana bağlı olarak düzenli bir ilaç salım profili sergilediği gözlemlendi. 24 saatlik gözlemler sonucunda hBN-FA nano taşıyıcısının MEM ve BLA için ilaç salım yüzdesi sırasıyla pH:5.0 için %33 ve %30 iken; pH: 7.4’de bu oranlar sırasıyla %44 ve %38 olarak kaydedildi. İlaç salım etkinliğini gösteren Şekil 4.10 aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.10. pH: 5.0 ve pH:7.4 PBS ortamında hBN-FA nano taşıyıcısının MEM ve BLA için ilaç salım etkinliği.

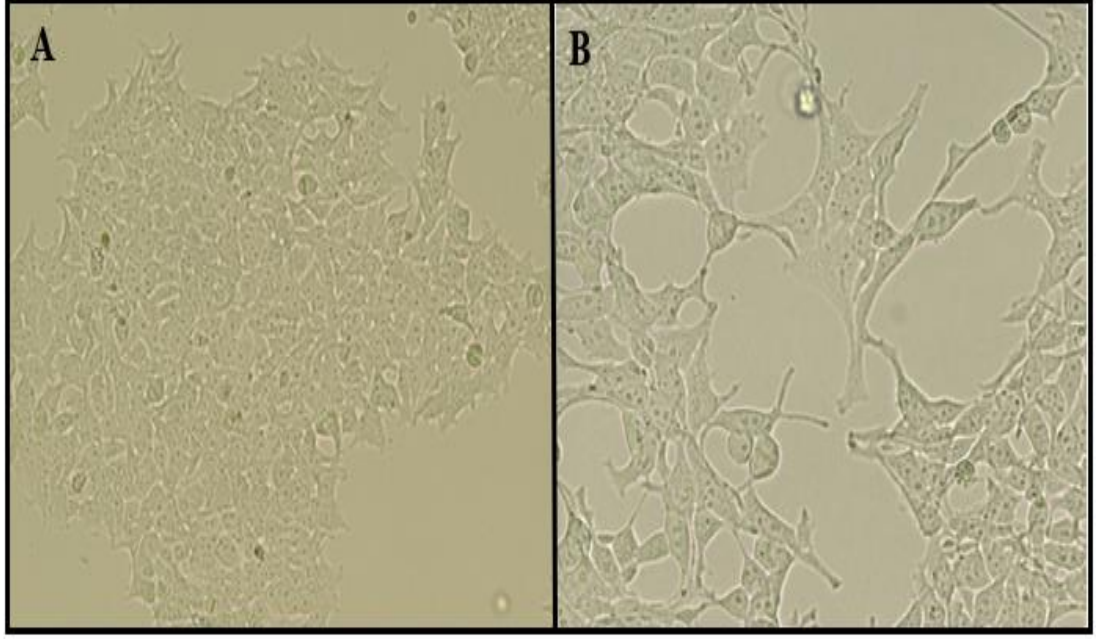
hBN-FA taşıma sistemine yüklü MEM ve BLA ilaçlarının salınımı pH ‘ya bağlı gerçekleşmektedir. Taşıma sistemi her iki ilaç için de özellikle nötr pH ortamında daha iyi salınım profili sergilemiştir. hBN nanotüplerine antikanser ilaç yüklemesini amaçlayan araştırmada hBN nanotüplerinin anti kanser ilaçları için özellikle düşük pH’ da iyi salınım profili sergilediği vurgulanmıştır (Zhang et al. 2016a).

4.4. İlaç Yüklü Nano Taşıyıcı Sistemin *In vitro* Alzheimer Hastalık Modelinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi

SHSY-5Y hücre hattı nörodejenerasyon, stres ya da psikolojik bozuklukların araştırıldığı çalışmalarda nöronal hastalık modelleri oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Şahin et al. 2021). Nöronal farklılaşmayı tetiklemek amacıyla trans all retinoik asit kullanım protokolünü öneren sayısız çalışma mevcuttur (Påhlman et al. 1984; Arslan et al. 2020).

4.4.1. SHSY-5Y hücre hattıyla *in vitro* Alzheimer hastalık modelinin oluşturulması

11 gün süreyle 10 µM retinoik asit tedavisinin ardından SHSY-5Y insan nöroblastoma hücreleri başarılı bir şekilde nöron benzeri hücrelere farklılaştırıldı. Farklılaşma süreci tamamlanan hücreler ters mikroskop kullanılarak incelendi. SHSY-5Y hücre gövdelerinin kübik-elipsiodik görünümünden daha ince ve uzun yapılara dönüştüğü gösteren Şekil 4.11 aşağıdadır. Dahası, uzamış akson ve dendrit yapılarının oluşumu ve hücreler arasındaki etkileşimlerin görünür hale geldiği de kaydedildi. Akış sitometrisi analizi ile retinoik asit tedavisinin ardından hücre döngüsündeki değişimler değerlendirildi. SHSY-5Y hücreleri retinoik asit uygulanan hücre grubunda S ve G2 fazından G1 fazına geçtiğini gösteren sonuçlar Çizelge 4.5’de özetlendi. Akış sitometrisi analizi SHSY-5Y hücrelerinin nöronal hücrelere benzer şekilde DNA sentezinin ardından interfaz evresine geçtiğini doğruladı.



Şekil 4.11. Retinoik asit uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinin nöron benzeri hücelere farklılaştırılması **A.** Retinoik asit uygulaması yapılmayan SHSY-5Y hücreleri **B.** 11 gün süreyle 10 µM trans retinoik asit uygulanan SHSY-5Y hücreleri.

Çizelge 4.5. Olgun nöron hücre kültürüne farklılaştırılmış SHSY-5Y hücrelerinin akış sitometrisi analizi ile belirlenen hücre döngüsü.

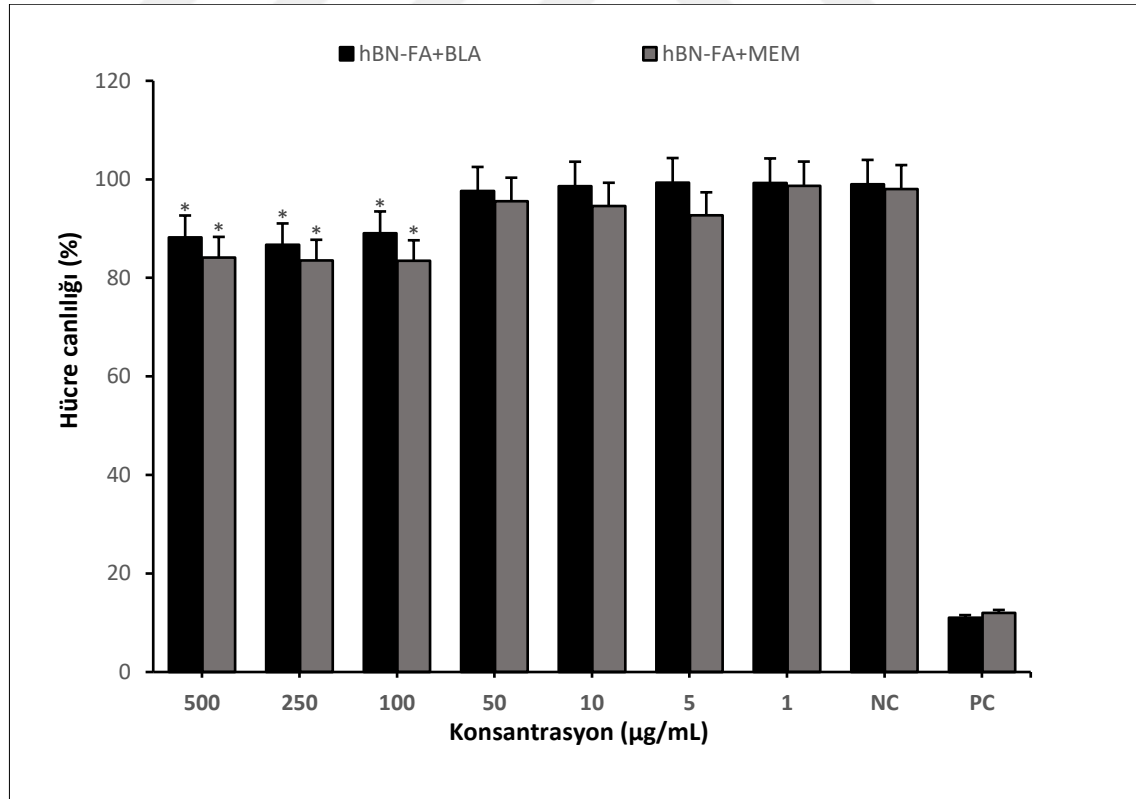
Grup	Hücre popülasyonu (%)			
	G1	G2	S	G2/G1
Kontrol	34,49±1,72	16,22±0,81	46,27±1,31	3,02±0,15
RA ile tedavi edilen SHSY-5Y hücreleri	70,96±3,54*	9,83±0,61*	15,79±0,78*	3,42±0,18*

Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sembol (*), kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı (P<0.01) temsil eder.

Farmakolojik çalışmalarda maksimum yarı inhibisyon konsantrasyonu genellikle ilaçların ya da muhtemel ilaç moleküllerinin etkisini araştırmak amacıyla kullanılır. Yapılan bir araştırma A β (1-42)'nin IC₅₀ değerinin retinoik asit ile dönüştürülmüş SHSY-5Y hücreleri için 24 saatlik uygulama periyodunda %51,8 canlılık sergileyen 20 µM olduğunu rapor etmiştir (Turkez et al. 2021). Bu tez çakışmasında *in vitro* AH modeli oluşturmak için 20 µM A β (1-42) kullanılmıştır.

4.4.2. İlaç yüklü taşıyıcı sistemin olgun nöron hücrelerine farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültüründe toksisitesinin belirlenmesi

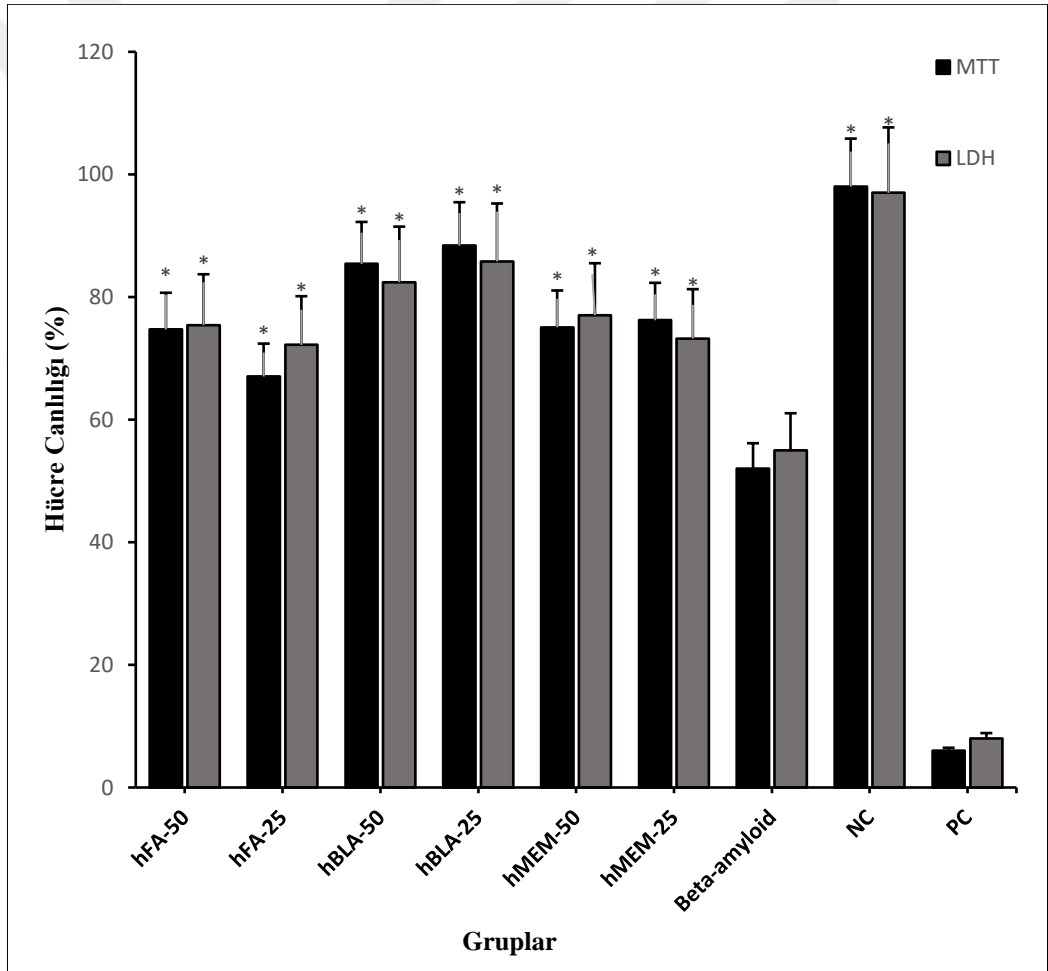
hBN-FA+MEM ve hBN-FA+BLA ilaç sisteminin olgun nöron benzeri hücrelere farklılaştırılan SHS-5Y hücre kültürü üzerindeki toksisitesi 0-500 µg/mL aralığındaki belirli konsantrasyonları uygulanarak araştırılmıştır. 24 saatlik inkübasyonu periyodunun ardından MTT canlılık analiziyle değerlendirilen sonuçlar hem hBN-FA+MEM hem de hBN-FA+BLA için 500, 250 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültüründe belirgin bir toksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Ancak Şekil 4.12’de belirtildiği gibi her iki ilaç grubunun özellikle 50 µg/mL ve altındaki konsantrasyonu ile muamele edilen gruplarda dikkate değer bir sitotoksikite gözlenmemiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen verileri doğrulayan araştırma raporları 100 µM MEM konsantrasyonunun insan periferik kan hücre kültürü ve N2a hücre kültüründe bildirmektedir toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Laserra et al. 2015).



Şekil 4.12. MTT tahlili kullanılarak 24 saat boyunca farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hatlarında hBN-FA+BLA ve hBN-FA+MEM’ in (0-500 µg/mL) sitotoksitesisi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültüründe sitotoksosite araştırmalarının ardından 20 μM $\text{A}\beta_{(1-42)}$ uygulanarak oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalığı modelinde hBN, hBN-FA, hBN-FA+MEM ve hBN-FA+BLA için 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarının neden olduğu sitotoksosite ve genotoksosite değerlendirilmiştir. hBN-FA'nın 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonları uygulanan gruplarda yalnızca 20 μM $\text{A}\beta_{(1-42)}$ uygulanan gruplara kıyasla hücre canlılık oranı dikkat çekici düzeyde yüksekti. MEM yüklü ilaç taşıyıcı sistemin her iki dozunda da hücre canlılığı ilaç yüklememiş taşıyıcı sistemin gösterdiği canlılık oranından daha yüksekti. Şekil 4.13'de gösterilen sonuçlara göre hBN-FA+BLA'nın 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ uygulandığı grupta hücre canlılık oranı en yüksekti ve bu değerler sırasıyla %85 ve %88 olarak hesaplandı.

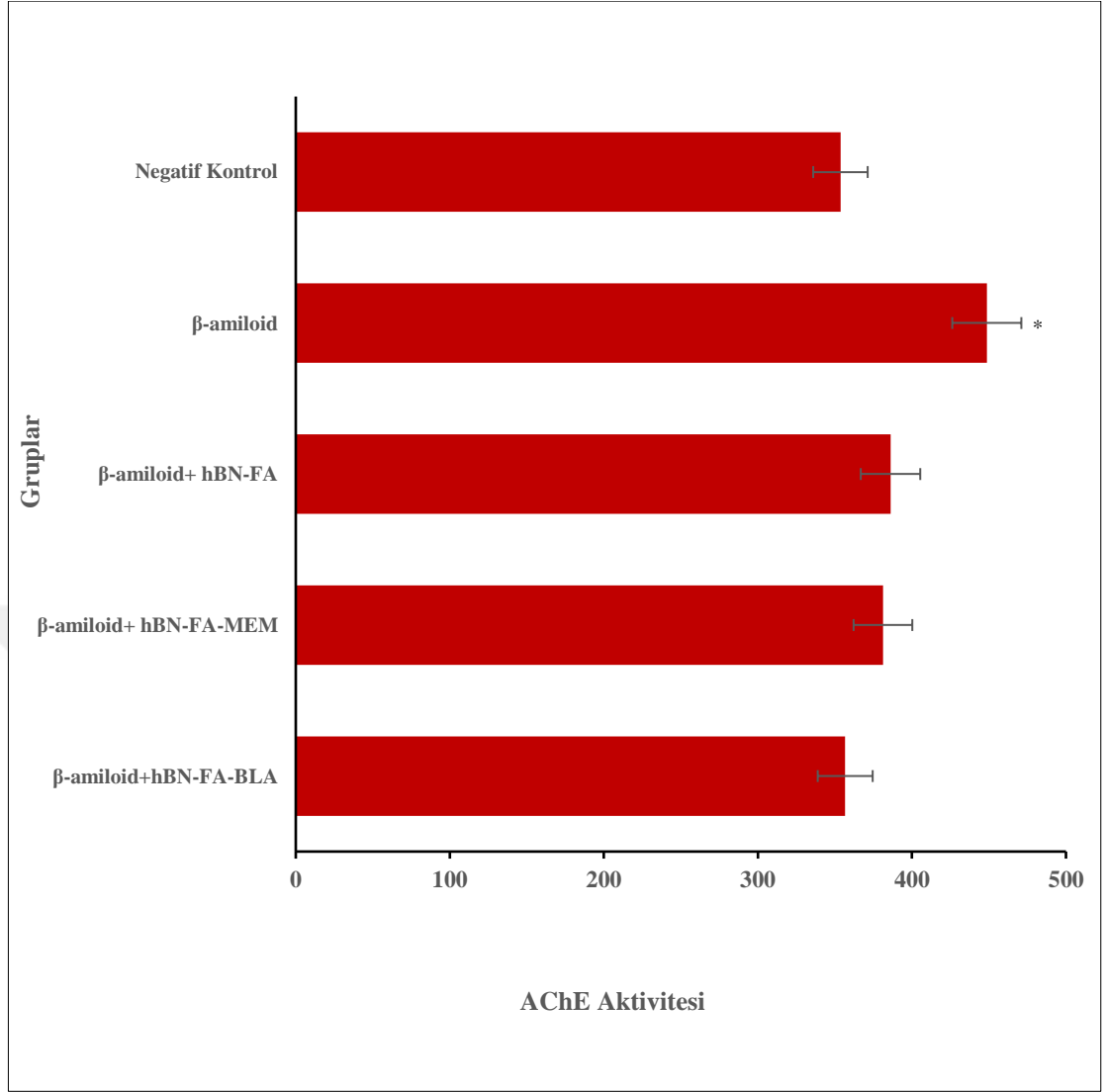


Şekil 4.13. 24 saat boyunca deneysel AH modelinde hücre canlılığı testleri (MTT ve LDH tahlilleri) hBN-FA, hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM ve β -amiloid (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sembol (*), önemli düzeyde artan hücre canlılığını temsil eder.

Son yıllarda yeni bor temelli bileşiklerin sentezi araştırma gruplarının yoğun ilgisini çekmektedir. Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik sentezlenen BLA ile yapılan araştırmalar BLA'nın 25-100 µM ile tedavi edilen SHSY-5Y hücre kültüründe canlılığın %63-71 aralığında olduğunu raporlamıştır (Cacciatore et al. 2021). hBN-FA taşıma sistemine yüksek verimle yüklenen BLA'nın ise hücre canlılığını daha fazla desteklediği mevcut çalışma kapsamında ortaya konmuştur. Bu sonuçlar hazırlanan taşıma sisteminin daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine ve daha iyileştirilmiş nöron koruyucu etkinliğe sahip olabileceğini kanıtlar niteliktedir.

4.4.3. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi AH'nin tedavisi için ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan en önemli değerlendirme parametrelerinden biridir. Çalışmada MEM ve BLA yüklenmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin 20 µM Aβ₍₁₋₄₂₎ ile indüklenen deneysel AH modelinde AchE aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Deneysel AH modelinde 25 µg/mL hBN-FA+MEM ve hBN-FA+BLA ile 24 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde AChE aktivitesine ait sonuçlarını gösteren Şekil 4.14'de hem hBN-FA+MEM hem de hBN-FA+BLA tedavisinin negatif kontrol grubuna kıyasla AChE aktivitesini azalttığı gösterilmektedir. Öte yandan ilaç yüklü olmayan hBN-FA taşıyıcı sistemin uygulandığı deney grubunda AchE aktivitesi nispeten düşük olmasına rağmen bu seviye negatif kontrol grubundakine yakın değildir.



Şekil 4.14. 24 saat boyunca deneysel AH modelinde β-amiloid+hBN-FA, β-amiloid+hBN-FA-BLA, β-amiloid+hBN-FA+MEM ve β-amiloid (25 µg/mL) ve negatif kontrol gruplarındaki AChE aktivitesi. Sembol (*), önemli düzeyde artan AChE aktivitesini temsil eder.

Nanopartiküller memeli sinir sisteminde önemli bir enzim olan asetilkolin esteraz enzimine bağlanabilir ve AChE aktivitesini etkileyebilirler. Beyin ve kanda yaygın olarak bulunan AChE esasen nöronlar ve eritrositlerin dış yüzeyinde bulunmaktadır (Wang et al. 2009). AChE enzimi asetilkolinin hidrolizinde anahtar bir rol oynamaktadır. Dahası bu enzim AH'nin tedavisinde kullanım potansiyeli olan pek çok ilacın esas hedefi olsa da AChE inhibisyonu hastaların semptomatik tedavisini sağlamaktan öteye geçememiştir (Saxena and Dubey 2019). Nanopartiküllerin AChE enzim aktivitesi ve etkileşimine değinen çalışmaların sayısı nispeten sınırlıdır. Tez çalışması kapsamında ilaç yüklü ve yüksüz taşıma sisteminin deneysel AH modelinde AChE aktivitesi değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilerin özellikle nörodejenerasyonu hedef alan yeni tasarım taşıma sistemleri için temel oluşturacağı kanısındayız.

4.4.4. Toplam antioksidant kapasitesi ve oksidant durumu tayini

Serbest radikaller en dış kabuğunda en az bir eşleşmemiş elektrona sahip elementleri ifade eder bu nedenle yüksek seviyede reaktiftirler. Yapısında oksijen bulunan serbest radikaller reaktif oksijen türleri olarak adlandırılırlar ve ROS olarak kısaltılmışlardır. Oksidatif stres; biyolojik sistemin reaktif ara ürünleri detoksifiye etme yeteneğinde meydana gelen dengesizliğin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi yaygın nörodejeneratif hastalıkların ilerleyişinde kritik öneme sahiptir. Alzheimer hastalığında yaşlı bireylerin metabolizmasında yanlış katlanan proteinler oksidatif ve inflamatuvar yanıtı tetikler. Bunun sonucunda enerji yetmezliği ve sinaptik disfonksiyon meydana gelmektedir (Niedzielska et al. 2016).

Çizelge 4.6. 24 saat boyunca hBN-FA-BLA, hBN-FA+MEM ve hBN (25µg/mL) uygulamalarına karşı deneysel AH modelinde TAK ve TOD değerleri.

Deneysel Gruplar	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TOD (µmol H₂O₂ Equiv./l)
Negatif Kontrol	1,74 ^a	0,38 ^c
β-amiloid +hBN-FA-BLA	1,62 ^a	0,44 ^c
β-amiloid +hBN-FA-MEM	1,13 ^b	0,87 ^d
β-amiloid +hBN-FA	1,04 ^b	0,54 ^c
β-amiloid	0,80 ^b	0,89 ^d

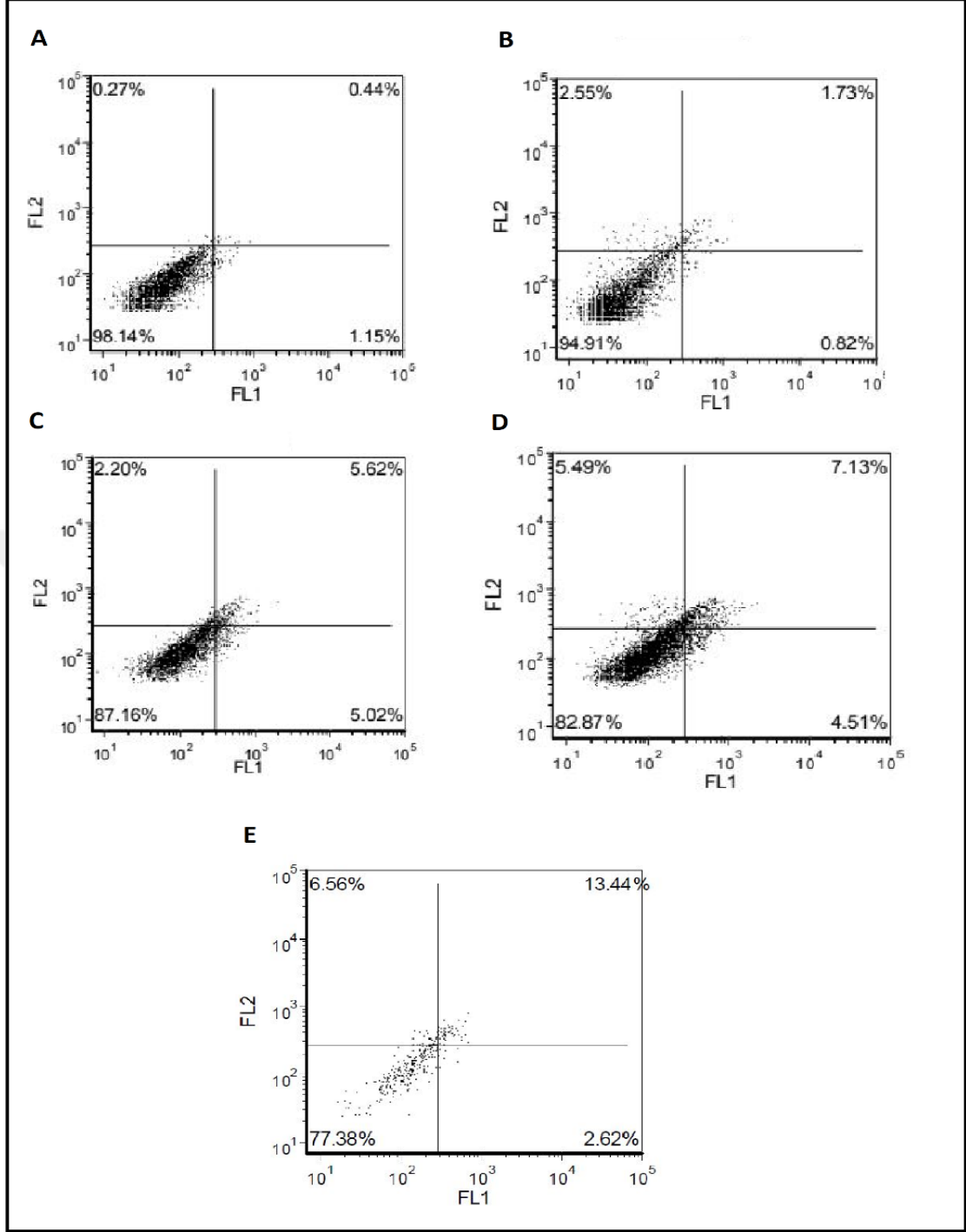
MEM ve BLA yüklü hBN-FA ilaç taşıyıcı sistemin deneysel AH modelinde oksidant ve antioksidant seviyelerine olan etkisi araştırılmış ve tüm sonuçlar Çizelge 4.6'da özetlenmiştir. hBN-FA+BLA'nın 25 µg/mL uygulandığı grupta 20 µM β-amiloid'in neden olduğu oksidatif stres seviyesi azalmış ve yalnızca β-amiloid uygulanan gruba kıyasla antioksidant seviyesi önemli düzeyde artmıştır. hBN-FA-BLA tedavisi in vitro AH modelinde TAK yaklaşık iki kat arttırmıştır. Bu değer hBN-FA-MEM tedavi grubu için yaklaşık 0,5 kat artış şeklinde hesaplanmıştır. Oksidatif stres parametrelerinde

yapılan araştırmalar BLA yüklü taşıma sisteminin MEM yüklü taşıma sistemine kıyasla daha yüksek koruyucu potansiyelini vurgulamaktadır.

4.4.5. Akış sitometrisi analizi

Akış sitometrisi analizi gruplarda 25 µg/mL konsantrasyonunun 24 saatlik uygulaması için gerçekleştirilmiştir. hBN-FA ilaç taşıma sisteminin canlılık oramı hiçbir ilaç uygulaması yapılmayan negatif kontrol grubuna çok yakındır ki bu oran %94,91 olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.15 akış sitometrisi analizine ait sonuçları göstermektedir. Yalnız 20 µM β-amiloid uygulanan grup ile kıyaslandığı zaman hBN-FA+BLA ve hBN-FA+MEM ilaç grupları için canlılık sırasıyla %17,53 ve %9,78 artmıştır. Akış sitometrisi sonuçları BLA yüklü hBN-FA'nın MEM yüklü hBN-FA'ya kıyasla SHSY-5Y hücrelerini iyileştirme etkisinin daha fazla olduğunu açıkça göstermiştir.

Akış sitometrisi analizi süspansiyon halindeki hücre, protoplast, kromozom gibi yapıların sayım, sıralama ya analiz işlemlerinde kullanılan güçlü tekniklerden biridir. Işık saçılımı ya da floresans özelliklere dayanarak hücre popülasyonlarının eş zamanlı ve birden fazla parametreye bağlı analizine imkan sunar. Bu nedenle bilim insanları tarafından biyoteknolojik birçok çalışmada başvurulan güvenilir bir testtir (Gaurav et al. 2010). Tez çalışmasında akış sitometrisi analizi ile tüm deney gruplarında tedavi sonrası hücre canlılık oranları, apoptoz ve nekroz durumları değerlendirilmiştir. MTT analizinin sonuçlarını destekleyen akış sitometrisi sonuçları taşıma sisteminin nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut verici potansiyelini bir kere daha kanıtlar niteliktedir.



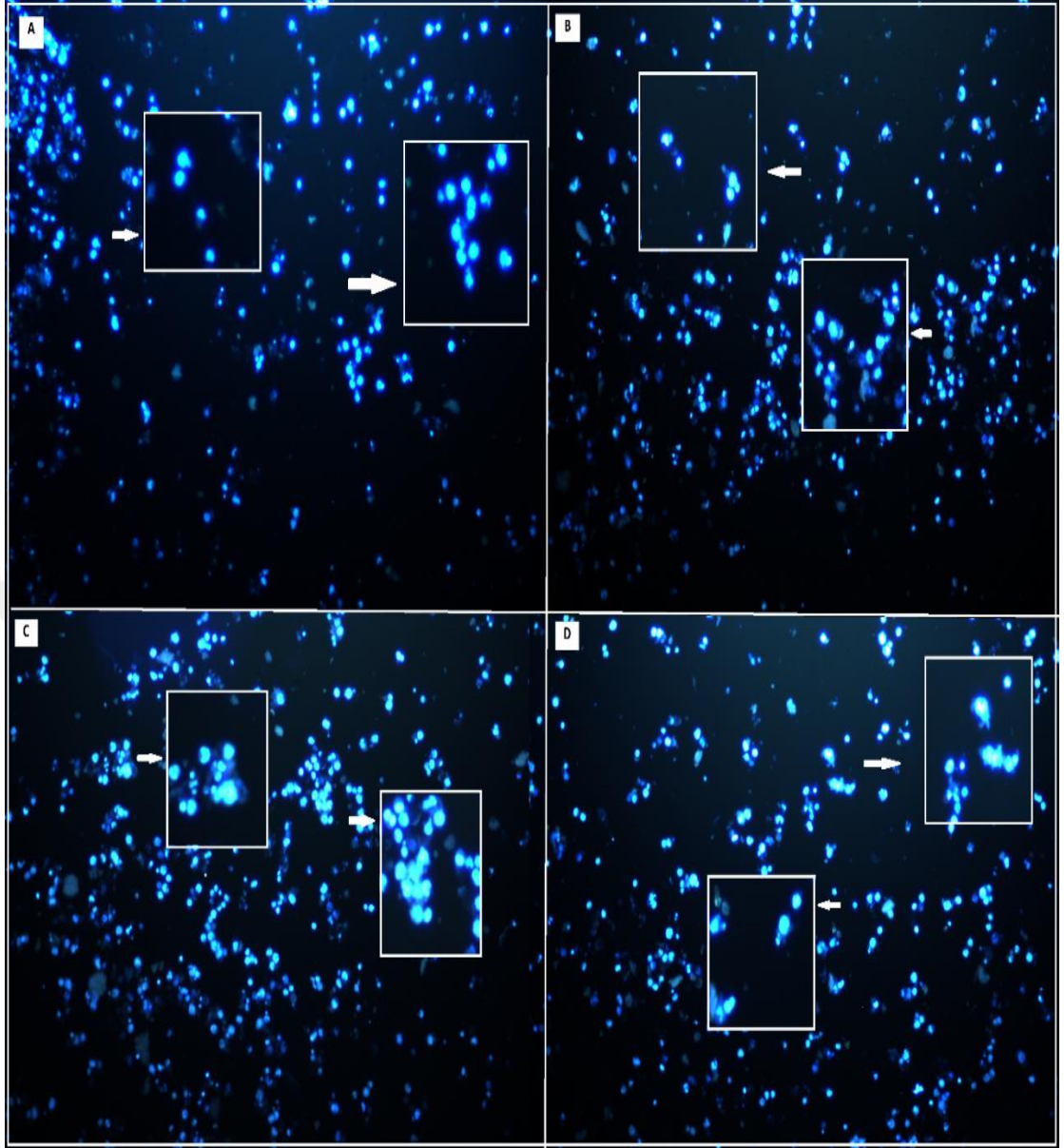
Şekil 4.15. hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM, hBN'nin (25µg/mL) beta-amiloid sitotoksitesine karşı akış sitometri analizi (annexin V- (FL1-H) ve PI- (FL2-H) etiketli hücreler). **A)** Negatif kontrol **B)** hBN-FA+BLA, **C)** hBN-FA+MEM, **D)** hBN-FA, **E)** sadece β-amiloid. İstatistiksel analiz, tek yönlü bir ANOVA ve ardından Tukey's post-hoc testi kullanılarak yapıldı. Sembol (*), beta-amiloid uygulamasına kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir artışı temsil eder.

4.4.6. Mikroçekirdek analizi

Olgun nöron hücrelerine dönüştürülen SHSY-5Y kültürlerinde hBN-FA, hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM 'in β -amiloid ile indüklenen deneysel AH modelinde nükleer seviyedeki genotoksitesite Hoechst 33258 floresan nükleer boyama tekniği kullanılarak araştırıldı. Yapılan araştırmalar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.16 olarak aşağıda verildi. Hoechst boyama sonuçları negatif kontrol grubu ile hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM ve hBN-FA uygulamaları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığını ortaya koyarken, β -amiloid uygulamasının negatif kontrole kıyasla nükleer anomaliliği önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Çizelge 4.7. Hoechst 33258 floresan boyaması ile farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hatlarına 24 saat boyunca 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hBN-FA, hBN-FA+BLA, hBN-FA+MEM ve β -amiloid uygulamalarının genotoksitesite üzerindeki etkisi.

Nükleer Abnormaliler (NA)				
Grup / konsantrasyon	Toplam MN	Lobb	Notch	Ortalama NA/1000 hücre $\pm\text{SD}$
Negatif Kontrol	4	3	4	0,011 \pm 0,002 ^a
β -amiloid+hBN-FA+BLA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	4	3	3	0,010 \pm 0,004 ^a
β -amiloid+hBN-FA+BLA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	3	3	4	0,010 \pm 0,008 ^a
β -amiloid+hBN-FA+MEM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	5	4	2	0,011 \pm 0,007 ^a
β -amiloid+hBN-FA+MEM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	4	5	3	0,012 \pm 0,009 ^a
β -amiloid+hBN-FA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	5	3	4	0,012 \pm 0,003 ^a
β -amiloid+hBN-FA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	6	2	2	0,010 \pm 0,003 ^a
β -amiloid	9	5	4	0,019 \pm 0,001 ^c



Şekil 4.16. Hoechst 33258 floresan boyaması ile farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hatlarına 24 saat boyunca 25 µg/mL β-amiloid+hBN-FA, β-amiloid+hBN-FA-BLA, β-amiloid+hBN-FA-MEM ve β-amiloid uygulamalarının genotoksisite üzerindeki etkisi (20X büyütme). **A)** β-amiloid+hBN-FA+BLA **B)** β-amiloid+hBN-FA+MEM **C)** sadece β-amiloid **D)** β-amiloid+hBN-FA.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Sonuç olarak bu araştırma çalışması ile hBN-FA temelli bir taşıma sistemi dizayn edilerek AH'nin tedavisinde kullanılabilme potansiyeli ilk kez değerlendirilmiştir. Geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan ticari ilaç MEM ve yeni ilaç adayı BLA ilk defa ilaç taşıma sistemine entegre edilmiştir. Böylece geleneksel tedavi yöntemlerinin mevcut sınırlamalarının üstesinden gelinerek daha etkin ve yenilikçi bir tedavi sisteminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler hBN-FA+MEM ve hBN-FA+BLA ilaç sistemlerinin yüksek nöron koruyucu potansiyelini ortaya koyarken aynı zamanda genotoksik ve oksidatif stres etkisinin olmadığını da göstermiştir. Dolayısıyla tasarlanan bu yeni ilaç taşıma sisteminin AH'nin tedavisinde kullanılabilirliğini daha güvenli hale getirmektedir.

Tez çalışmasına ait sonuçlarımız bu taşıma sisteminin özellikle nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik nanoteknoloji temelli yenilikçi taşıma sistemi çalışmaları için son derece önemli katkılar sunacağını düşünmekteyiz. Daha etkin ve üstün özelliklere sahip olan taşıma sistemi ile AH'den etkilenmiş bireyler, aileleri ve küresel çapta toplumlar için umut vaadeden bir yaklaşım olduğunu düşünmekteyiz. Bor rezervleri bakımından dünyada önde gelen ülkelerin başında yer alan ülkemiz için, bor temelli ilaç araştırmalarına ve taşıma sistemi çalışmalarına önderlik edebileceğini, böylece ilaç sektöründe söz sahibi ülkelerden biri haline gelebileceğimiz kanaatindeyiz.

5.2. Öneriler

Elde ettiğimiz tüm verilerin ışığında önerilerimiz aşağıdaki gibi özetlenebilir,

1. *In vitro* koşullar sağlanarak tekrarlı gerçekleştirilen analizler *in vivo* deneylerle desteklenmeli,
2. Bor temelli diğer nanopartiküllerin AH modelinde taşıma sistemi olarak kullanılabilirliği araştırılmalı,

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

3. hBN-FA taşıma sisteminin diğer nörodejeneratif hastalıklar için ilaç taşıma potansiyeli detaylı analizlerle araştırılmalı,
4. Elde edilecek olası başarılı verilerle tasarlanan bu yeni taşıma sisteminin ulusal ve uluslararası patent süreçleri gerçekleştirilmelidir.



KAYNAKLAR

- Abeyasinghe, A. A. D. T., Deshapriya, R. D. U. S. and Udawatte, C. 2020. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. *Life Sciences*, 1(256), 117996.
- Ahmadi, M. H., Ghazvini, M., Nazari, M. A., Ahmadi, M. A., Pourfayaz, F., Lorenzini, G. and Ming, T. 2019. Renewable energy harvesting with the application of nanotechnology: A review. *International Journal of Energy Research*, 43,1387–1410.
- Al Harthi, S., Alavi, S. E., Radwan, M. A., El Khatib, M. M. and AlSarraf, I. A. 2019. Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 9(1), 9563.
- Alak, G., Ucar, A., Parlak, V., Yeltekin, A. Ç., Özgeriş, F. B., Atamanalp, M. and Türkez, H. 2021. Antioxidant Potential of Ulexite in Zebrafish Brain: Assessment of Oxidative DNA Damage, Apoptosis, and Response of Antioxidant Defense System. *Biological Trace Element Research*, 199(3), 1092–1099.
- Alcolea-Palafox, M., Posada-Moreno, P., Ortuño-Soriano, I., Pacheco-del-Cerro, J. L., Martínez-Rincón, C., Rodríguez-Martínez, D. and Pacheco-Cuevas, L. 2014. Research strategies developed for the treatment of alzheimer's disease. Reversible and pseudo-irreversible inhibitors of acetylcholinesterase: Structure-activity relationships and drug design. *Çinde Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, 426 – 477.
- Alizadeh, A., Taheri-Nassaj, E. and Ehsani, N. 2004. Synthesis of boron carbide powder by a carbothermic reduction method. *Journal of the European Ceramic Society*, 24(11–14), 3227-3234.
- Alley, S. C., Okeley, N. M. and Senter, P. D. 2010. Antibody-drug conjugates: Targeted drug delivery for cancer. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(4), 529–537.
- Allhoff, F. 2007. On the autonomy and justification of nanoethics. *NanoEthics*, 1(3), 185–210.
- Amin, S. A., Küpper, F. C., Green, D. H., Harris, W. R. and Carrano, C. J. 2007. Boron binding by a siderophore isolated from marine bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of the American Chemical Society*, 129(3), 478–479.
- Anand, P. and Singh, B. 2013. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 36(4), 375–99.
- Arslan, M. E., Tatar, A., Yıldırım, Ö. Ç., Şahin, İ. O., Ozdemir, O., Sonmez, E. and Türkez, H. 2022. In Vitro Transcriptome Analysis of Cobalt Boride Nanoparticles on Human Pulmonary Alveolar Cells. *Materials*, 15(23), 1–13.

- Arslan, M. E., Türkez, H. and Mardinoğlu, A. 2020. In vitro neuroprotective effects of farnesene sesquiterpene on alzheimer's disease model of differentiated neuroblastoma cell line. *International Journal of Neuroscience*, 131(8), 745–754.
- Arumugam, K., Subramanian, G. S., Mallayasamy, S. R., Averineni, R. K., Reddy, M. S. and Udupa, N. 2008. A study of rivastigmine liposomes for delivery into the brain through intranasal route. *Acta Pharmaceutica*, 58(3), 287–297.
- Ayhan, A., Dursun, P., Kuşçu, E., Mülayim, B., Haberal, N., Özen, Ö. and Şam, A. D. 2009. Prevalence of cervical cytological abnormalities in Turkey. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 106(3):206–209.
- Baran, E. T., Özer, N. and Hasirci, V. 2002. In vivo half life of nanoencapsulated L-asparaginase. *Çinde Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13, 1113–1121.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. and Rizzolio, F. 2020. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112.
- Beattie, J. H. and Peace, H. S. 1993. The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 69(3), 871–884.
- Bennett, A., Rowe, R. I., Soch, N. and Eckhert, C. D. 1999. Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth. *Journal of Nutrition*, 129(12), 2236–2238.
- Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, S. and Jain, N. K. 2003. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1–2), 111–124.
- Birks, J. S. and Harvey, R. J. 2018. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, 1190.
- Blake, D. T., Terry, A. V., Plagenhoef, M., Constantinidis, C. and Liu, R. 2017. Potential for intermittent stimulation of nucleus basalis of meynert to impact treatment of alzheimer's disease. *Communicative and Integrative Biology*, 10(5–6).
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I. and Blevins, D. 2004. Why boron?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(11), 907–912.
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C. and Salmon, D. P. 2017. Alzheimer's disease: Past, present, and future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 23(9-10), 818–831.
- Bradford, J., Shafiei, M., MacLeod, J. and Motta, N. 2019. Transfer-Free Synthesis of Lateral Graphene–Hexagonal Boron Nitride Heterostructures from Chemically Converted Epitaxial Graphene. *Advanced Materials Interfaces*, 6, 1900419.

- Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J. O. 2012. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(11), 1649-1659.
- Brdar-Jokanović, M. 2020. Boron toxicity and deficiency in agricultural plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1424.
- Brejijeh, Z. and Karaman, R. 2020. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24), 5789.
- Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P. 2012. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 173.
- Buzea, C., Pacheco, I. I. and Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), 17–71.
- Cacciatore, I., Turkez, H., Di Rienzo, A., Ciulla, M., Mardinoglu, A. and Di Stefano, A. 2021. Boron-based hybrids as novel scaffolds for the development of drugs with neuroprotective properties. *RSC Medicinal Chemistry*.
- Caldwell, J. D., Vurgaftman, I., Tischler, J. G., Glembocki, O. J., Owrutsky, J. C. and Reinecke, T. L. 2016. Atomic-scale photonic hybrids for mid-infrared and terahertz nanophotonics. *Nature Nanotechnology*, 11(1), 9-15.
- Calhoun, A., King, C., Khoury, R. and Grossberg, G. T. 2018. An evaluation of memantine ER + donepezil for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(15), 1711–1717.
- Camacho-cristóbal, J. J., Rexach, J. and González-Fontes, A. 2008. Boron in plants: Deficiency and toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 21(4), 1424.
- Caoduro, C., Hervouet, E., Girard-Thernier, C., Gharbi, T., Boulahdour, H., Delage-Mourroux, R. and Pudlo, M. 2017. Carbon nanotubes as gene carriers: Focus on internalization pathways related to functionalization and properties. *Acta Biomaterialia*, 49, 36–44.
- Caruthers, S. D., Wickline, S. A. and Lanza, G. M. 2007. Nanotechnological applications in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(1), 26–30.
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y. and Melcher, K., Xu, H. E. 2017. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 1205–1235.
- Ciofani, G., Genchi, G. G., Liakos, I., Athanassiou, A., Dinucci, D., Chiellini, F. and Mattoli, V. 2012. A simple approach to covalent functionalization of boron nitride nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 374(1), 308–314.
- Ciofani, G., Raffa, V., Menciassi, A. and Cuschieri, A. 2009. Folate Functionalized Boron Nitride Nanotubes and their Selective Uptake by Glioblastoma Multiforme Cells: Implications for their Use as Boron Carriers in Clinical Boron Neutron Capture Therapy. *Nanoscale Research Letters*, 4(2), 113.

- Clementino, A., Batger, M., Garrastazu, G., Pozzoli, M., Del Favero, E., Rondelli, V. and Sonvico, F. 2016. The nasal delivery of nanoencapsulated statins – An approach for brain delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 6575–6590.
- Coban, F. K., Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H. and Hazman, O. 2015. Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(4), 391–399.
- Çolak, S., Geyikoğlu, F., Keles, O. N., Türkez, H., Topal, A. and Unal, B. 2011. The neuroprotective role of boric acid on aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 27(8), 700–710.
- Cui, Y., Winton, M. I., Zhang, Z. F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J. B. and Eckhert, C. D. 2004. Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology Reports*, 11(4), 887–892.
- Defina, P. A., Moser, R. S., Glenn, M., Lichtenstein, J. D. and Fellus, J. 2013. Alzheimer's disease clinical and research update for health care practitioners. *Journal of Aging Research*, 2013(2013), 207178.
- Dehghan banadaki, M., Aghaie, M. and Aghaie, H. 2021. Folic acid functionalized boron nitride oxide as targeted drug delivery system for fludarabine and cytarabine anticancer drugs: A DFT study. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116753.
- Desai, S. B., Madhvapathy, S. R., Sachid, A. B., Llinas, J. P., Wang, Q., Ahn, G. H. and Javey, A. 2016. MoS₂ transistors with 1-nanometer gate lengths. *Science*, 354(6308), 99–102.
- Dhas, N. and Mehta, T. 2021. Intranasal delivery of chitosan decorated PLGA core /shell nanoparticles containing flavonoid to reduce oxidative stress in the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102242.
- Drexler, K. E. 1988. The Coming Era of Nanotechnology. *The Materials Revolution: Superconductors, New Materials, and the Japanese Challenge*, 361–373.
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S. and Jack, C. R. 2016. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's and Dementia*, 2(3), 292–323.
- Duncan, R. 2003. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 347–360.
- Farokhzad, O. C. and Langer, R. 2006. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14), 1456–1459.
- Fernandes, J., Ghate, M. V., Basu Mallik, S. and Lewis, S. A. 2018. Amino acid conjugated chitosan nanoparticles for the brain targeting of a model dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1–2), 563–571.

- Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S. S. K. and Torchilin, V. P. 2020. Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, 4–22.
- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E. and Camins, A. 2018. Memantine for the treatment of dementia: A review on its current and future applications. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1223–1240.
- Fong, T. G., Tulebaev, S. R. and Inouye, S. K. 2009. Delirium in elderly adults: Diagnosis, prevention and treatment. *Nature Reviews Neurology*, 5(4), 210–20.
- Fonseca, C., Simões, S. and Gaspar, R. 2002. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: Preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*, 83(2), 273–286.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. and Wilcock, G. K. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2), 137–47.
- Freestone, I., Meeks, N., Sax, M. and Higgitt, C. 2008. The Lycurgus Cup-A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, 40(4), 270–277.
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V. and Cosco, D. 2021. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Gaurav, V., Kolewe, M. E. and Roberts, S. C. 2010. Flow cytometric methods to investigate culture heterogeneities for plant metabolic engineering. *Methods in Molecular Biology*, 643, 243–262.
- Gnach, A., Lipinski, T., Bednarkiewicz, A., Rybka, J. and Capobianco, J. A. 2015. Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1561–1584.
- Goldbach, H. E. and Wimmer, M. A. 2007. Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure?. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170, 39–48.
- Guan, M., Hao, L., Chen, L., Gao, F., Qiu, S., Zhou, H. and Zhou, X. 2020. Facile Mechanical-Induced Functionalization of Hexagonal Boron Nitride and Its Application as Vehicles for Antibacterial Essential Oil. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(40), 15120–15133.
- Guo, W. and Lee, R. J. 2001. Efficient gene delivery via non-covalent complexes of folic acid and polyethylenimine. *Journal of Controlled Release*, 77(1–2), 131–138.
- Hans, M. L. and Lowman, A. M. 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319–327.

- Heo, K., Min, S. W., Sung, H. J., Kim, H. G., Kim, H. J., Kim, Y. H. and Kim, I. H. 2016. An aptamer-antibody complex (oligobody) as a novel delivery platform for targeted cancer therapies. *Journal of Controlled Release*, 229, 1–9.
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P. and Jain, R. K. 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4607–4612.
- Hosne Asif, A. K. M. A. and Hasan, M. Z. 2018. Application of Nanotechnology in Modern Textiles: A Review. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 8(02), 227–231.
- Huang, C., Chen, C., Zhang, M., Lin, L., Ye, X., Lin, S. and Wang, X. 2015. Carbon-doped BN nanosheets for metal-free photoredox catalysis. *Nature Communications*, 6, 7698.
- Huang, H. B., Xiao, K., Lu, S., Yang, K. L., Ansari, A. R., Khaliq, H. and Peng, K. M. 2015. Increased thymic cell turnover under boron stress may bypass TLR3/4 pathway in African ostrich. *PLoS ONE*, 10(6), e0129596.
- Hunt, C. D. 1998. Regulation of enzymatic activity: One possible role of dietary Boron in higher animals and humans. *Biological Trace Element Research*, 66.
- Hunt, C. D. 2003. Dietary Boron: An Overview of the Evidence for Its Role in Immune Function. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 6, 291–306.
- Hunt, C. D. and Idso, J. P. 1999. Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: A review and current research progress. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 2, 221–233.
- Hütter, R., Keller-Schien, W., Knüsel, F., Prelog, V., Rodgers, G. C., Suter, P. and Zähler, H. 1967. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 57. Mitteilung. Boromycin. *Helvetica Chimica Acta*, 73, 65–76.
- Iqbal, P., Preece, J. A. and Mendes, P. M. 2012. Nanotechnology: The Top-Down and Bottom-Up Approaches. *Supramolecular Chemistry*, DOI: 10.1002/9780470661345.smc19.
- Iwatsubo, T. 2004. Pathogenesis of Alzheimer's disease: Implications from amyloid research front. *Clinical Neurology*, 44, 768–770.
- Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L. V. and Ojima, I. 2005. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5043–5054.
- Jojo, G. M., Kuppusamy, G., De, A. and Karri, V. V. S. N. R. 2019. Formulation and optimization of intranasal nanolipid carriers of pioglitazone for the repurposing in

- Alzheimer's disease using Box-Behnken design. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(7), 1061–1072.
- Jones, G., Prosser, D. E. and Kaufmann, M. 2012. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 9–18.
- Kametani, F. and Hasegawa, M. 2018. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 25.
- Kang, J. H., Sauti, G., Park, C., Yamakov, V. I., Wise, K. E., Lowther, S. E. and Bryant, R. G. 2015. Multifunctional Electroactive Nanocomposites Based on Piezoelectric Boron Nitride Nanotubes. *ACS Nano*, 9(12), 11942–11950.
- Kanwar, J. R., Roy, K. and Kanwar, R. K. 2011. Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(6), 459–477.
- Karimzadeh, M., Rashidi, L. and Ganji, F. 2017. Mesoporous silica nanoparticles for efficient rivastigmine hydrogen tartrate delivery into SY5Y cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(4), 628–636.
- Kaur, A., Nigam, K., Bhatnagar, I., Sukhpal, H., Awasthy, S., Shankar, S. and Dang, S. 2020. Treatment of Alzheimer's diseases using donepezil nanoemulsion: an intranasal approach. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(6), 1862–1875.
- Kaur, A., Nigam, K., Srivastava, S., Tyagi, A. and Dang, S. 2020. Memantine nanoemulsion: a new approach to treat Alzheimer's disease. *Journal of Microencapsulation*, 37(5), 355–365.
- Kim, M. J., Rehman, S. U., Amin, F. U. and Kim, M. O. 2017. Enhanced neuroprotection of anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles against A β 1-42-induced neuroinflammation and neurodegeneration via the NF-KB /JNK/GSK3 β signaling pathway. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(8), 2533–2544.
- Kot, F. S. 2009. Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8(1), 3–28.
- Koziara, J. M., Lockman, P. R., Allen, D. D. and Mumper, R. J. 2004. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *Journal of Controlled Release*, 99(2), 259–269.
- Koziara, J. M., Whisman, T. R., Tseng, M. T. and Mumper, R. J. 2006. In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *Journal of Controlled Release*, 112(3), 312–319.
- Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S. E., Engelhardt, B. and Begley, D. J. 2003. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate)

- nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 20(3), 409–416.
- Ku, W. W., Chapin, R. E., Wine, R. N., and Gladen, B. C. 1993. Testicular toxicity of boric acid (BA): Relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. *Reproductive Toxicology*, 7(4), 305–319.
- Kumar, A., Singh, A. and Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195–203.
- Kumar Khanna, V. 2012. Targeted Delivery of Nanomedicines. *ISRN Pharmacology*, 2012, 1–9.
- Kwon, H. J., Cha, M. Y., Kim, D., Kim, D. K., Soh, M., Shin, K. and Mook-Jung, I. 2016. Mitochondria-Targeting Ceria Nanoparticles as Antioxidants for Alzheimer's Disease. *ACS Nano*, 10(2), 2860–2870.
- Lanoue, L., Taubeneck, M. W., Muniz, J., Hanna, L. A., Strong, P. L., Murray, F. J. and Keen, C. L. 1998. Assessing the effects of low Boron diets on embryonic and fetal development in rodents using in vitro and in vivo model systems. *Biological Trace Element Research*, 66(1-3), 271–298.
- Laserra, S., Basit, A., Sozio, P., Marinelli, L., Fornasari, E., Cacciatore, I. and Di Stefano, A. 2015. Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl-memantine codrug: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1-2), 183–191.
- LaVan, D. A., McGuire, T. and Langer, R. 2003. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1184–1191.
- Lewin, J. and Chen, C. H. 1976. Effects of boron deficiency on the chemical composition of a marine diatom. *Journal of Experimental Botany*, 27(100), 916–921.
- Li, X., Hanagata, N., Wang, X., Yi, W., Bando, Y. and Golberg, D. 2014. Multimodal luminescent-magnetic boron nitride nanotubes@NaGdF₄:Eu structures for cancer therapy. *Chemical Communications*, 50, 4371–4374.
- Lin, J., Chen, X. and Huang, P. 2016. Graphene-based nanomaterials for bioimaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, 242–254.
- Lin, L., Zheng, Y., Li, Z., Shen, X. and Wei, K. 2007. A simple method to synthesize polyhedral hexagonal boron nitride nanofibers. *Solid State Sciences*, 9(12), 1099–1104.
- Lines, M. G. 2008. Nanomaterials for practical functional uses. *Journal of Alloys and Compounds*, 449(1–2), 242–245.
- Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H. and Wu, Y. 2019. The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 43.

- Liu, Y., Yang, G., Jin, S., Xu, L. and Zhao, C. X. 2020. Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. *ChemPlusChem*, 5(9), 2143–2157.
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S. and Mukadam, N. 2020. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*, 396(10248), 413–446.
- Loureiro, J. A., Gomes, B., Fricker, G., Coelho, M. A. N., Rocha, S. and Pereira, M. C. 2016. Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer's disease treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 8–13.
- Lu, C. T., Zhao, Y. Z., Wong, H. L., Cai, J., Peng, L. and Tian, X. Q. 2014. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *International Journal of Nanomedicine*, 10(9), 2241–2257.
- Lu, T., Wang, L., Jiang, Y., Liu, Q. and Huang, C. 2016. Hexagonal boron nitride nanoplates as emerging biological nanovectors and their potential applications in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 1–3.
- Ma, P., Xiao, H., Li, C., Dai, Y., Cheng, Z., Hou, Z. and Lin, J. 2015. Inorganic nanocarriers for platinum drug delivery. *Materials Today*, 18(10), 554–564.
- Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., Sohi, A. N., Zamzami, A. and Dorkoosh, F. A. 2020. Application of nano-based systems for drug delivery and targeting: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 22, 245.
- Maity, A., Grenadier, S. J., Li, J., Lin, J. Y. and Jiang, H. X. 2020. High efficiency hexagonal boron nitride neutron detectors with 1 cm² detection areas. *Applied Physics Letters*, 116, 142102.
- Misra, S., Chopra, K., Sinha, V. R. and 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.
- Monczor, M. 2005. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents*.
- Moore, J. A. 1997. An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology*, 11(1), 123-160.
- Moreno-Gonzalez, I., Morales, R., Baglietto-Vargas, D. and Sanchez-Varo, R. 2020. Risk Factors for Alzheimer's Disease. Lausanne: Frontiers Media SA. doi: 10.3389/978-2-88963-855-0.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.

- Mukhopadhyay, S. S. 2014. Nanotechnology in agriculture: Prospects and constraints. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4(7), 63–71.
- Muntimadugu, E., Dhommatai, R., Jain, A., Challa, V. G. S., Shaheen, M. and Khan, W. 2016. Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 224–234.
- Naghii, M. R., Mofid, M., Asgari, A. R., Hedayati, M. and Daneshpour, M. S. 2011. Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *Physiology and Pharmacology*, 25(1), 54–58.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M. and Issaabadi, Z. 2019. Applications of Nanotechnology in Daily Life. *Interface Science and Technology* 28, 113–143.
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., and Filip, M. 2016. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 7(5), 376–385.
- Nielsen, F. H. 2008. Is boron nutritionally relevant?. *Nutrition Reviews*, 66(4), 183–191.
- Noebe, R. 1997. *Nanosystems Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation* Edited by K. Eric Drexler. *Materials and Manufacturing Processes*, 12(1), 160–162.
- Nzietchueng, R. M., Dousset, B., Franck, P., Benderdour, M., Nabet, P., and Hess, K. 2002. Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 16(4), 239–244.
- Overk, C. R. and Masliah, E. 2014. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 508–516.
- Pählman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E. K. and Esscher, T. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*, 14(2), 135–144.
- Pakdel, A., Zhi, C., Bando, Y., Nakayama, T. and Golberg, D. 2011. Boron nitride nanosheet coatings with controllable water repellency. *ACS Nano*, 5(8), 6507–6515.
- Panyam, J. and Labhasetwar, V. 2004. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 1(1), 77–84.
- Panyam, J. and Labhasetwar, V. 2012. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 329–347.

- Paroni, G., Bisceglia, P. and Seripa, D. 2019. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 68(2), 493–510.
- Patil, R. P., Pawara, D. D., Gudewar, C. S. and Tekade, A. R. 2019. Nanostructured cubosomes in an in situ nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain. *Journal of Liposome Research*, 29(3), 264–273.
- Penland, J. G. 1998. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological Trace Element Research*, 66(1–3), 299–317.
- Pizzorno, L. 2015. Nothing Boring About Boron. *Integrative Medicine*, 14(4), 35–48.
- Poole, C. P. and Owens, F. J. 2003. *Introduction To Nanotechnology*. John Wiley & Sons, 400, Canada.
- Raghuvanshi, R. J., Mistra, A., Talwar, G. P., Levy, R. J. and Labhasetwar, V. 2001. Enhanced immune response with a combination of alum and biodegradable nanoparticles containing tetanus toxoid. *Journal of Microencapsulation*, 18(6), 723–732.
- Ramsden, J. J. 2016. *Nanotechnology: An Introduction: Second Edition*. Elsevier, 358, London.
- Rao, C. N. R. and Cheetham, A. K. 2001. Science and technology of nanomaterials: Current status and future prospects. *Journal of Materials Chemistry*, 11, 2887–2894.
- Reibold, M., Paufler, P., Levin, A. A., Kochmann, W., Pätzke, N. and Meyer, D. C. 2006. Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature*, 444(7117), 286.
- Reid, R. J., Hayes, J. E., Post, A., Stangoulis, J. C. R. and Graham, R. D. 2004. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. *Plant, Cell and Environment*, 25, 1405–1414.
- Rowe, R. I., and Eckhert, C. D. 1999. Boron is required for zebrafish embryogenesis. *Journal of Experimental Biology*, 202(12), 1649–1654.
- Şahin, M., Öncü, G., Yılmaz, M. A., Özkan, D. and Saybaşılı, H. 2021. Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. *Neuroscience Letters*, 6(745), 135628.
- Salimi, A., Gobadian, H. and Sharif Makhmalzadeh, B. 2020. Dermal pharmacokinetics of rivastigmine-loaded liposomes: an ex vivo–in vivo correlation study. *Journal of Liposome Research*, 1–9.
- Sánchez-López, E., Ettcheto, M., Egea, M. A., Espina, M., Cano, A., Calpena, A. C. and García, M. L. 2018. Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for

- Alzheimer's disease: In vitro and in vivo characterization. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1).
- Sanghi, R. and Verma, P. 2009. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresource Technology*, 100(1), 501–504.
- Santos, M. A., Chand, K. and Chaves, S. 2016. Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. *Coordination Chemistry Reviews*, (327–328), 287–303.
- Saxena, M. and Dubey, R. 2019. Target Enzyme in Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(4), 264–275.
- Schäfer, V., von Briesen, H., Andreesen, R., Steffan, A. M., Royer, C., Tröster, S., and Rübsamen-Waigmann, H. 1992. Phagocytosis of Nanoparticles by Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Macrophages: A Possibility for Antiviral Drug Targeting. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 9(4), 541–546.
- Sharker, S. M. 2019. Hexagonal Boron Nitrides (White Graphene): A Promising Method for Cancer Drug Delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9983–9993.
- Sharma, P., Bhardwaj, N. and Kumar, V. 2020. Defence applications Of Nanotechnology: Development And Strategies. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(7), 4310–4316.
- Shelp, B. J., Marentes, E., Kitheka, A. M. and Vivekanandan, P. 1995. Boron mobility in plants. *Physiologia Plantarum*, 193, 85–101.
- Silva, G. A. 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61(3), 216–220.
- Sonawane, S. K., Ahmad, A. and Chinnathambi, S. 2019. Protein-Capped Metal Nanoparticles Inhibit Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *ACS Omega*, 4(7), 12833–12840.
- Sorokina, S. A., Stroylova, Y. Y., Shifrina, Z. B. and Muronetz, V. I. 2016. Disruption of Amyloid Prion Protein Aggregates by Cationic Pyridylphenylene Dendrimers. *Macromolecular Bioscience*, 16(2), 266–275.
- Tanaka, M. and Fujiwara, T. 2008. Physiological roles and transport mechanisms of boron: Perspectives from plants. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 456(4), 671-677.
- Taniguchi, N. 1974. On the Basic Concept of Nanotechnology. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, 18-23, Tokyo.

- Turkez, H., Cacciatore, I., Marinelli, L., Fornasari, E., Aslan, M. E., Cadirci, K. and Mardinoglu, A. 2021. Glycyl-L-Prolyl-L-Glutamate Pseudotriptides for Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 11(1), 126.
- Turkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A., Keles, M. S. and Kaplan, I. 2012. The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(1–2), 93–101.
- Türkez, H., Geyikoğlu, F., Tatar, A., Keleş, S. and Özkan, A. 2007. Effects of Some Boron Compounds on Peripheral Human Blood. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11–12), 889–896.
- Turkez, H., Tatar, A., Hacimuftuoglu, A. and Ozdemir, E. 2010. Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. *Acta Biochimica Polonica*, 57(1), 95–97.
- Ulep, M. G., Saraon, S. K. and McLea, S. 2018. Alzheimer Disease. *Journal for Nurse Practitioners*, 14(3), 129–135.
- Uluisik, I., Karakaya, H. C. and Koc, A. 2018. The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45, 156–162.
- Unezaki, S., Maruyama, K., Hosoda, J. I., Nagae, I., Koyanagi, Y., Nakata, M. and Tsuchiya, S. 1996. Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by in vivo fluorescence microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 144(1), 11–17.
- Vance, D., Martin, J., Patke, S. and Kane, R. S. 2009. Advanced Drug Delivery Reviews. The Design of Polyvalent Scaffolds for Targeted Delivery, 61(11), 931–939.
- Verbruggen, N., Hermans, C. and Schat, H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 364–372
- Vinothini, K., Rajendran, N. K., Ramu, A., Elumalai, N. and Rajan, M. 2019. Folate receptor targeted delivery of paclitaxel to breast cancer cells via folic acid conjugated graphene oxide grafted methyl acrylate nanocarrier. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 110, 906–917.
- Vivès, E., Schmidt, J. and Pèlerin, A. 2008. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1786(2), 126–138.
- Vogt, U. 1998. Carbide, nitride and boride materials—Synthesis and processing. *Journal of the European Ceramic Society*, 18(6), 735–736.
- Wagner, F. E., Haslbeck, S., Stievano, L., Calogero, S., Pankhurst, Q. A. and Martinek, K. P. 2000. Before striking gold in gold-ruby glass. *Nature*, 407(6805), 691–692.
- Wang, J., Hao, J., Liu, D., Qin, S., Chen, C., Yang, C. and Lei, W. 2017. Flower stamen-like porous boron carbon nitride nanoscrolls for water cleaning. *Nanoscale*, 1–3.

- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R. and Wang, S. L. 2011. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 6, 765–774.
- Wang, J. Z., Xia, Y. Y., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. 2013. Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1, 123–139.
- Wang, S., Zhang, L., Xia, Z., Roy, A., Chang, D. W., Baek, J. B. and Dai, L. 2012. BCN graphene as efficient metal-free electrocatalyst for the oxygen reduction reaction. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(17), 4209–4212.
- Wang, Z., Zhao, J., Li, F., Gao, D. and Xing, B. 2009. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, 77(1), 67–73.
- Wattmo, C., Minthon, L. and Wallin, Å. K. 2016. Mild versus moderate stages of Alzheimer's disease: Three-year outcomes in a routine clinical setting of cholinesterase inhibitor therapy. *Alzheimer's Research and Therapy*, 8(1), 2-15.
- Weng, Q., Wang, X., Wang, X., Bando, Y. and Golberg, D. 2016. Functionalized hexagonal boron nitride nanomaterials: Emerging properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 45(14), 3989–4012.
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. and Car, H. 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020–1037.
- Wimo, A., Winblad, B., Stöfler, A., Wirth, Y. and Möbius, H. J. 2003. Resource utilisation and cost analysis of memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *Pharmacoeconomics*, 21(5), 327–340.
- Woods, W. G. 1994. An Introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspectives*, 102(7), 5–11.
- Xiao, F., Naficy, S., Casillas, G., Khan, M. H., Katkus, T., Jiang, L. and Huang, Z. 2015. Edge-hydroxylated boron nitride nanosheets as an effective additive to improve the thermal response of hydrogels. *Advanced Materials*, 27(44), 7196–7203.
- Yao, Y., Gu, X., Zhu, J., Yuan, D. and Song, Y. 2013. Hormone replacement therapy in females can decrease the risk of lung cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE*, 8(8), e71236.
- Yiannopoulou, K. G. and Papageorgiou, S. G. 2020. Current and future treatments in Alzheimer disease: an update. *Journal of Central Nervous System Disease*, 12, 117957352090739.
- Yih, T. C. and Al-Fandi, M. 2006. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(6), 1184–1190.

- Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W. and Lu, C. Z. 2011. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biological Trace Element Research*, 144(1–3), 306–315.
- Yoo, H. S., Lee, K. H., Oh, J. E. and Park, T. G. 2000. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *Journal of Controlled Release*, 68(3), 419–431.
- Yusuf, M., Khan, M., Khan, R. A. and Ahmed, B. 2013. Preparation, characterization, in vivo and biochemical evaluation of brain targeted Piperine solid lipid nanoparticles in an experimentally induced Alzheimer's disease model. *Journal of Drug Targeting*, 21(3), 300–311.
- Zhang, H., Feng, S., Yan, T., Huang, D., Zhi, C., Nakanishi, H. and Gao, X.-D. 2016. Folate-conjugated boron nitride nanospheres for targeted delivery of anticancer drug. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4573–4582.
- Zhang, X. W., You, J. B. and Chen, N. F. 2007. Recent advances in synthesis and properties of cubic boron nitride films. *Wuji Cailiao Xuebao/Journal of Inorganic Materials*, 22, 385–390.
- Zhang, Y., Guo, R., Wang, D., Sun, X. and Xu, Z. 2019. Pd nanoparticle-decorated hydroxy boron nitride nanosheets as a novel drug carrier for chemo-photothermal therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1(176), 300–308.
- Zhong, Y., Zhang, J., Cheng, R., Deng, C., Meng, F., Xie, F. and Zhong, Z. 2015. Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44+ human breast tumor xenografts. *Journal of Controlled Release*, 205, 144–154.
- Zofková, I., Nemcikova, P. and Matucha, P. 2013. Trace elements and bone health. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(8), 1555–1561.