

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİ ATIKLARINDAN HAZIRLANAN EKSTRAKTIN KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİYLE ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice SERİN

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

AĞUSTOS 2023

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİ ATIKLARINDAN HAZIRLANAN EKSTRAKTIN KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİYLE ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice SERİN

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülnur ARABACI

AĞUSTOS 2023

Hatice SERİN tarafından hazırlanan “BİTKİ ATIKLARINDAN HAZIRLANAN EKSTRAKTIN KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİYLE ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO İNCELENMESİ ” adlı tez çalışması 01.06.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Unvan Adı SOYADI**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Unvan Adı SOYADI (Danışman)**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Unvan Adı SOYADI**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Unvan Adı SOYADI**
(Gerekliyse) Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Unvan Adı SOYADI**
(Gerekliyse) Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “BİTKİ ATIKLARINDAN HAZIRLANAN EKSTRAKTIN KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİYLE ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO İNCELENMESİ ” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(22/05/2023)

Hatice SERİN





Aileme...



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgisini, fikirlerini ve her anlamda desteğini esirgemeyen çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. Gülnur ARABACI'ya sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca fikirleriyle, yardımlarıyla beni destekleyen, sormaktan hiç çekinmediğim ve birlikte zaman geçirmekten keyif aldığım çalışma arkadaşlarıma,

Hep arkamda hissettiğim, desteklerini benden hiç esirgemeyen ve benim bütün stresime katlanan canım aileme sonsuz kez teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler birimi tarafından 2022-9-32-94 nolu genel Genel Araştırma Projesi-A (GAP-A) tarafından desteklenmiştir.

Hatice SERİN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti	1
1.2. Tezin Amacı	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Alzheimer Epidemiyolojisi ve Patolojisi	7
2.2. Tıbbi Bitkilerin Önemi	9
2.3. Alzheimer için Tıbbi Bitkiler	10
2.3.1. Tıbbi bitkilerin kullanım dezavantajları	10
2.4. Ceviz	11
2.4.1. Cevizin kullanım alanları	12
2.4.2. Ceviz endokarp zarının bileşenleri	12
2.5. Kan Beyin Bariyeri	14
2.6. Nano İlaç Taşıma Sistemleri	15
2.7. Kitosan ve Özellikleri	17
2.7.1. Kitosanın nöroprotektif etkileri	19
2.7.2. Kitosan nanopartiküllerinin elde edilme metotları	19
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Malzemeler	23
3.1.1. Nanopartikül sentezinde kullanılan kimyasallar	23
3.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	23
3.2. Metot	23
3.2.1. Ceviz endokarp zarı ekstraktının elde edilmesi	23
3.2.2. Kitosan nanopartiküllerinin(CSNP) oluşturulması	23
3.2.3. Ceviz endokarp zarı ekstraktı yüklü kitosan nanopartiküllerinin (JP/CSNP) oluşturulması	24
3.2.4. CSNP ve JP/CSNP' lerin partikül boyutu analizi ve zeta potansiyeli ölçümü	25
3.2.5. JP/CSNP lerin enkapsülasyon verimlerinin hesaplanması	25
3.2.5.1. Ceviz endokarp zarı ekstraktının kalibrasyon eğrisinin oluşturulması	26
3.2.6. JP/CSNP ilaç salım testi	26

3.2.7. Yapıların fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FT-IR) ile kimyasal yapılarının incelenmesi	27
3.2.8. Nanopartiküllerin SEM analizi.....	27
3.2.9. Antioksidan test.....	27
4. DENEYSEL SONUÇLAR.....	29
4.1. Ceviz Zarı Ekstraktı Yüklenen Kitosan Nanoparçacıklarının ve Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu	29
4.1.1. CSNP ve JP/CSNP' lerin partikül boyutu analizi ve zeta potansiyeli ölçümü.....	29
4.1.2. Ceviz endokarp zarı ekstraktının kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	33
4.1.3. JP/CSNP'lerin enkapsülasyon verimlerinin hesaplanması.....	34
4.1.4. JP/CSNP ilaç salım testi.....	34
4.1.5. Yapıların fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FT-IR) ile kimyasal yapılarının incelenmesi	35
4.1.6. CSNP ve JP/CSNP'lerin SEM analizi.....	38
4.1.7. Antioksidan test.....	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	51

KISALTMALAR

AB	:Amiloid Beta
ALS	:Amyotrofik lateral skleroz
AH	:Alzheimer
KBB	:Kan Beyin Bariyeri
DLS	:Dinamil ışık saçılım
ELS	:Elektroforetik ışık saçılım
PDI	:Polidispersite index
CSNP	:Kitosan nanopartikülleri
JP/CSNP	:Ceviz endokarp özütü enkapsüle edilmiş kitosan nanopartikülleri
PA2	:Fosfolipaz A2
UV	:Ultraviyole
TPP	:Tripolifosfat
NMDA	:N-metil-D-aspartat
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskop
FTIR	:Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
NaOH	:Sodyum hidroksit



SİMGELER

M	:Molar
nm	:Nanometre
mV	:Milivolt
mg	:Miligram
°C	:Santigrat derece
%	:Yüzde
rpm	:Dakikada devir sayısı
v/v	:Hacim/hacim
w/v	:Ağırlık//hacim
x	:Çarpı
cm	:Santimetre



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Nanopartiküllerin formülasyonları.....25

Tablo 4.1. CSNP ve JP/CSNP lerin boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri.....31

Tablo 4.2. JP/CSNPlerin enkapsülasyon oranları.....34





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Ceviz endokarp zarı.....	13
Şekil 2.2. Kitinden kitosan elde edilme süreci.....	18
Şekil 2.3. İyonik jelasyon tekniği ile kitosan nanopartiküllerin elde edilmesi.....	20
Şekil 4.1. CSNP boyut analizi.....	29
Şekil 4.2. Seri1 JP/CSNP boyut analizi	30
Şekil 4.3. Seri2 JP/CSNP boyut analizi	30
Şekil 4.4. Seri3 JP/CSNP boyut analizi	31
Şekil 4.5. CSNP zeta potansiyeli.....	32
Şekil 4.6. Seri1 JP/CSNP zeta potansiyeli.....	32
Şekil 4.7. Seri2 JP/CSNP zeta potansiyeli.....	33
Şekil 4.8. Seri3 JP/CSNP zeta potansiyeli.....	33
Şekil 4.9. Ceviz endokarp zarına ait kalibrasyon eğrisi	34
Şekil 4.10. JP/CSNP lerinin İlaç salım profili	35
Şekil 4.11. Kitosana ait FTIR spektrumu.....	36
Şekil 4.12. Ceviz endokarp zarına ait FTIR spektrumu.....	36
Şekil 4.13. JP/CSNP'ye ait FTIR spektrumu.....	37
Şekil 4.14. TPP ye ait FTIR spektrumu.....	37
Şekil 4.15. CSNP ye ait FTIR spektrumu.....	38
Şekil 4.16. CSNP ye ait SEM görüntüsü.....	38
Şekil 4.17. Seri2 JP/CSNP ye ait SEM görüntüsü.....	39
Şekil 4.18. CSNP ve JP/CSNP' lerin DPPH aktivitesi.....	39
Şekil 4.19. Ceviz endokarp ekstraktının DPPH aktivitesi.....	40



BİTKİ ATIKLARINDAN HAZIRLANAN EKSTRAKTIN KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİYLE ENKAPSÜLASYONU VE İN VİTRO İNCELENMESİ

ÖZET

Ceviz (*Juglans regia L.*) ağacı Juglandaceae familyasına ait bir ağaç türüdür. Cevizin meyvesi kadar diğer yapısal bileşenleri olan kabuk, yaprak, zar kısımları da içerdiği kompleks bileşenler sayesinde sağlık için önemli bir yere sahiptir. Cevizin iç kısmında bulunan endokarp zarı, içeriğindeki zengin bileşenleri yapılan çalışmalarla ortaya koyulmasına rağmen yeterince faydalanılmayan atık olarak kalmaktadır. Doğal bileşik olarak ceviz zarı ekstresinin, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip, fenolik asitler ve flavonoidler gibi yüksek konsantrasyonlarda biyoaktif bileşikler içerdiği bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla bu biyoaktif bileşiklerin, nöroinflamasyonu, oksidatif stresi ve beta-amiloid agregasyonunu azaltmak gibi nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel terapötik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Nanoteknoloji son zamanların en gözde çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. Kullanım alanı gittikçe genişleyen bu teknoloji sağlık sektöründe, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde ve daha birçok teşhis-tedavi amaçlı yapılan çalışmalarda araştırılmaktadır. Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin dokusunu kan kaynaklı toksinler, patojenler ve diğer zararlı maddelerden koruyan bir bariyer sistemidir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için ilaçların beyne ulaştırılması, KBB'nin işlevi nedeniyle zordur. Geleneksel ilaçlar, KBB'yi geçemezler veya sınırlı bir geçirgenlik gösterirler. Bu nedenle bilim insanları, KBB'nin geçilmesi için farklı teknikler geliştirmeye çalışmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemleri uygun taşıyıcı yapı malzemeleri kullanılarak etken maddelerin hedefe taşınmasında umut vadeden yaklaşımlar sunmaktadır. Kitosan, karides ve diğer kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarının hidrolizi sonrasında elde edilir. Kitosan, insanlar için biyoyumlu, biyobozunur ve biyoaktif bir polimerdir. Kitosan, yüksek mekanik dayanıklılık ve esnekliğe sahiptir. Ayrıca düşük toksisiteye sahiptir ve biyolojik olarak parçalanabilir, bu nedenle çevre dostudur. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan kitosan, dokularla uyumlu ve biyoyumlu olması nedeniyle yaygın olarak kullanılır.

Bu tez çalışması kapsamında, boyutları 150-300 nm arasında değişen, ceviz endokarp zarından elde edilen özütün enkapsüle edildiği kitosan nanopartikülleri (JP/CSNP) üretilmiş ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. İyonik jelasyon tekniği ile üretilen nanoparçacıklara farklı konsantrasyonlarda (seri1: 10 mg/ml, seri2: 5 mg/ml, seri3: 2,5 mg/ml) ekstrakt yüklemesi yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri sonucunda +17 mV ve + 44 mV arasında değişen değerler bulunmuştur. Nanopartikül boyutları zetasizer ile ölçülmüş ve boş olan nanopartiküllere (CSNP) ait ortalama partikül boyutu 281 nm olarak bulunmuştur. Bu değerler seri1 nanopartiküller için 197 nm, seri2 nanopartiküller için 194 nm ve seri3 nanopartiküller için 237 nm olarak ölçülmüştür. En yüksek enkapsülasyon oranı % 89 değerle seri2 nanopartiküllerde

hesaplanmıştır. Yapılan ilaç salım çalışmaları ile 10. saatin sonunda nanopartiküllere yüklenen ekstraktın % 33-% 12 oranlarında ortama salındığı görülmüştür. Antioksidan aktivitenin nanopartiküllere yüklenen ekstrakt konsantrasyonu ile doğrusal bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca FTIR ve SEM görüntülemeleri ile nanopartiküllerin daha detaylı incelenmeleri sağlanmıştır. Yapılan çalışma ile nörodejeneratif rahatsızlıklarda kullanılmak üzere doğal ilaç potansiyelinde ceviz endokarp özütü enkapsüle edilmiş kitosan nanopartikülleri sentezlenmiştir. Çalışmalar sonucunda üretilen nanopartiküllerin nörodejeneratif rahatsızlıklara karşı umut vadettiği görülmektedir.



ENCAPSULATION OF EXTRACT PREPARED FROM PLANT WASTES WITH CHITOSAN NANOPARTICLES AND IN VITRO INVESTIGATION

SUMMARY

Alzheimer's disease is a chronic and progressive neurodegenerative disease that usually occurs in individuals aged 65 and over. The disease is characterized by symptoms such as memory loss, reduced mental abilities, and personality changes due to disruptions in nerve cells in the brain. The exact cause of Alzheimer's disease is unknown, but research shows that genetic and environmental factors play a role in the development of the disease. Currently, there is no complete cure for Alzheimer's disease, but medications and therapies are available for the management of symptoms. This disease affects approximately 50 million people worldwide, and this number is expected to triple by 2050. Treatment strategies for Alzheimer's disease aim to slow or stop the damage to nerve cells caused by the disease.

Walnut (*Juglans regia* L.) tree is a tree species belonging to the Juglandaceae family. The shell, leaf and membrane parts of the walnut, which are other structural components as well as the fruit, have an important place for health thanks to the complex components they contain. The endocarp membrane in the inner part of the walnut remains as an underutilized waste, although its rich components have been revealed by studies. As a natural compound, walnut shell extract has been found to contain high concentrations of bioactive compounds such as phenolic acids and flavonoids with antioxidant and anti-inflammatory properties. Studies have shown that these bioactive compounds have potential therapeutic effects in neurodegenerative diseases such as reducing neuroinflammation, oxidative stress and beta-amyloid aggregation. Walnut fruit contains high levels of omega-3 fatty acids, which have a strong anti-inflammatory effect. The omega-3 fatty acids contained in the inner membrane of the walnut help protect and improve brain functions. Antioxidants, on the other hand, are important in protecting brain cells against oxidative damage and maintaining brain homeostasis.

Nanotechnology is one of the most popular fields of study in recent times. This technology, which is increasingly used, is being researched in the health sector, in the development of drug delivery systems and in many other diagnostic-therapeutic studies. These systems provide many advantages such as increasing the bioavailability of drugs, reducing their side effects, enabling drugs to reach the target tissue selectively, increasing the stability of drugs and allowing drugs to stay in the body longer.

The blood-brain barrier (BBB) is a barrier system that protects brain tissue from blood-borne toxins, pathogens and other harmful substances. Delivery of drugs to the brain for the treatment of neurodegenerative diseases is difficult due to the function of the BBB. Conventional drugs cannot cross the BBB or show limited permeability. For this

reason, scientists are trying to develop different techniques for the passage of KBB. Drug delivery systems offer promising approaches in the delivery of active substances to the target by using appropriate carrier building materials.

Chitosan is obtained after hydrolysis of the shells of shrimp and other shellfish. Chitosan is a biocompatible, biodegradable and bioactive polymer for humans. Chitosan has high mechanical strength and flexibility. It also has low toxicity and is biodegradable, so it is environmentally friendly. It is used in various industrial applications. Chitosan, which is used in biomedical applications, is widely used because it is compatible and biocompatible with tissues. In addition, as a result of studies, it is thought that chitosan can promote the growth and regeneration of nerve cells. This effect makes the use of chitosan in the treatment of neurological injuries and diseases even more attractive.

The effects of walnut endocarp membrane on brain health have been revealed in various studies. Our main goal is to facilitate the transport of walnut material to the target for neurodegenerative disorders in the brain, to increase its utilization by increasing its effects, and to evaluate its potential as a natural medicine by creating drug release profiles for this purpose. JP/CSNPs and empty CSNPs were synthesized by ionic gelation technique by encapsulating the walnut endocarp membrane extract into chitosan nanoparticles. The zeta potential, size analysis, encapsulation rates, drug release profiles, SEM and FTIR analyzes and antioxidant determination and characterization processes of the produced CSNP and JP/CSNP nanoparticles were performed. Within the scope of the master thesis study, characterization studies of nanoparticles were carried out by producing chitosan nanoparticles (JP/CSNP) and empty nanoparticles (CSNP) in which the extract obtained from walnut endocarp membrane, varying in size between 150-300 nm, is encapsulated. The nanoparticles produced by the ionic gelation technique were loaded with extract at different concentrations (seri1: 10 mg/ml, seri2: 5 mg/ml, seri3: 2,5 mg/ml). The size and potential measurements of the nanoparticles were carried out with the Zetasizer device. As a result of zeta potential measurements, values varying between +17 mV and + 44 mV were found. As a result of nanoparticle size measurements, the average particle size of the empty nanoparticles (CSNP) was found to be 281 nm. These values were measured as 197 nm for seri1 nanoparticles, 194 nm for seri2 nanoparticles and 237 nm for seri3 nanoparticles. The highest encapsulation rate was calculated in seri2 nanoparticles with a value of 89%. With the drug release studies, it was observed that at the end of the 10th hour, the extract loaded on the nanoparticles was released to the environment at a rate of 33%-12%. While the highest emission value was observed in seri1 nanoparticles, the lowest emission value was observed in seri3 nanoparticles. It is understood that there is a linear relationship between the amount of encapsulated extract and the time-dependent release profile. It was observed that the antioxidant activity increased linearly with the extract concentration loaded on the nanoparticles. In addition, nanoparticles were examined in more detail with FTIR and SEM imaging. In the spectra analyzed by FTIR analysis, it is understood that there is no adverse interaction between the active groups of the walnut skin extract and the functional groups of chitosan and that the extract is encapsulated into nanoparticles. When the CSNP and seri2 JP/CSNP results displayed by SEM are evaluated, it is thought that the particle sizes are higher than the zeta size measurement due to the adhesion of the particle structures and coalescence over time.

As a result of the studies, chitosan nanoparticles encapsulated in walnut endocarp extract have been synthesized with the potential of natural medicine for use in neurodegenerative disorders. It is seen that the nanoparticles produced are promising against neurodegenerative disorders.





1. GİRİŞ

Modern tıbbın en büyük zorluklarından birini nörodejeneratif hastalıklar oluşturmaktadır. Alzheimer, Parkinson, multipl skleroz ve diğer benzer rahatsızlıklar, bilişsel ve motor yeteneklerin bozulmasına yol açarak bireylerin yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu hastalıkların karmaşıklığı ve tedavi seçeneklerinin yetersizliği, araştırmacıları ve sağlık uzmanlarını yenilikçi ve sürdürülebilir yaklaşımlar arayışına yöneltmiştir.

Günümüzde, nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik geleneksel yöntemlerin ötesine geçen yeşil stratejilerin önemi giderek artmaktadır. Yeşil stratejiler, çevre dostu ve doğal kaynaklara dayalı yaklaşımları ifade eder. Bu yaklaşımlar, nörodejeneratif hastalıkların ana sebeplerini ele alarak hastalığın ilerlemesini durdurmayı veya semptomları hafifletmeyi amaçlar. Yeşil stratejilerin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmasının birden fazla avantajı bulunmaktadır. Bu stratejiler, kimyasal bileşenlerin minimum düzeyde kullanılmasını ve doğal kaynakların sürdürülebilir bir şekilde kullanılmasını teşvik eder. Ayrıca, doğal kaynaklı bileşenlerin kullanımı, olumsuz yan etkilerin azaltılmasına ve hastaların yaşam kalitesinin artırılmasına katkı sağlayabilir.

Bu bağlamda, ceviz endokarp ekstraktı ve kitosan nanopartiküller gibi doğal bileşenlerin nörodejeneratif hastalıkların tedavisindeki rolü, yeşil stratejilere dikkat çeken önemli bir araştırma alanını temsil ediyor. Bu bileşenlerin kullanımı, çevre dostu ve sürdürülebilir tedavi yöntemleri sunarak, hastalıkla mücadelede yeni bir umut kaynağı olabilir.

1.1. Literatür Özeti

Nörodejeneratif hastalıklar, beyin ve sinir sistemini etkileyen kronik hastalıklardır. Bu hastalıkların başlıca özellikleri, beyindeki nöronların yavaş yavaş bozulması, ölmesi veya işlevlerini yitirmesidir. Nörodejeneratif hastalıklar arasında Alzheimer, Parkinson, Huntington ve ALS gibi çeşitli tipler bulunmaktadır. Bu hastalıkların nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik faktörlerin yanı sıra çevresel ve

yaşam tarzı faktörleri de rol oynayabilir. Nörodejeneratif hastalıkların semptomları, hastalığın türüne bağlı olarak değişebilir ve hafıza kaybı, koordinasyon zorluğu, hareket güçlüğü ve bilişsel işlevlerde bozulma gibi belirtiler içerebilir [1].

Alzheimer hastalığı, genellikle 65 yaş ve üstü bireylerde görülen kronik ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalık, beyindeki sinir hücrelerindeki bozulmalar nedeniyle hafıza kaybı, zihinsel yetilerin azalması ve kişilik değişiklikleri gibi semptomlarla karakterizedir. Alzheimer hastalığının nedeni tam olarak bilinmemektedir ancak araştırmalar genetik ve çevresel faktörlerin hastalık gelişiminde rol oynadığını göstermektedir. Şu anda, Alzheimer hastalığının tamamen tedavisi yoktur ancak semptomların yönetimi için ilaçlar ve terapiler mevcuttur. Bu hastalık, dünya genelinde yaklaşık 50 milyon kişiyi etkilemektedir ve bu sayının 2050 yılına kadar üç kat artması beklenmektedir. Alzheimer hastalığı için geliştirilen tedavi stratejileri, hastalığın neden olduğu sinir hücrelerindeki hasarı yavaşlatmayı veya durdurmayı hedeflemektedir [2].

Birinci tedavi stratejisi, kolinesteraz inhibitörleri adı verilen ilaçlar kullanmaktır. Bu ilaçlar, beyindeki asetilkolin adı verilen kimyasal maddeyi arttırarak hafıza kaybı ve bilişsel işlevlerdeki bozulmayı geçici olarak iyileştirebilirler.

İkinci tedavi stratejisi, NMDA reseptör antagonistleri adı verilen ilaçları kullanmaktır. Bu ilaçlar, glutamat adı verilen bir kimyasal maddenin beyindeki aktivitesini azaltarak sinir hücrelerindeki hasarı yavaşlatmaya yardımcı olurlar.

Üçüncü tedavi stratejisi, beta amiloid plakları adı verilen protein birikimlerinin oluşumunu engellemeye veya azaltmaya yöneliktir. Bu tedavi stratejisi, henüz onaylanmamış olmasına rağmen, beta amiloid plaklarının oluşumunu engelleyen veya yok eden ilaçların geliştirilmesi üzerine yoğun araştırmalar devam etmektedir [3].

Nano taşıma sistemleri, çeşitli yapılar ve materyaller kullanılarak üretilir. Bunlar arasında en sık kullanılanlar nanopartiküller, nanokapsüller ve nanoliposomlardır. Bu yapıların üretiminde kullanılan materyaller arasında kitosan ve kitosan türevleri de yer almaktadır. Kitosan, doğal bir polisakkarit olan kitinin alkalik ortamda çözündürülmesiyle elde edilen bir polimerdir. Kitosan, düşük toksisitesi, biyolojik uyumluluğu, biyoyumluluğu, biyodegradasyonu ve antimikrobiyal aktivitesi gibi özellikleri ile nano taşıma sistemleri için ideal bir materyal olarak kabul edilmektedir.

Alzheimer hastalığında nano ilaç taşıma sistemlerinin kullanımı, geleneksel ilaçların kullanımına göre birçok avantaj bulunmaktadır. Bazı avantajları şunlardır [2,3]:

Hedefe özgü teslimat: Nano ilaç taşıma sistemleri, ilacın doğrudan beyindeki hedef bölgeye yönlendirilmesini sağlayarak, ilaçların hedefe özgü teslimatını artırır. Bu, ilacın beyindeki diğer bölgelere ulaşmadan hedef bölgede maksimum etkiye sahip olmasını sağlar.

İlaç dozunu azaltma: İlacın hedef bölgeye daha az dozda verilmesine olanak tanır. Bu, ilacın yan etkilerini azaltırken, hedef bölgede maksimum terapötik etkiye sahip olmasını sağlar.

Biyoyumluluk: Nano ilaç taşıma sistemleri, biyoyumlu malzemelerden yapıldığından, insan vücudunda daha az toksik etkiye sahiptir.

Uzun süreli etki: İlacın yavaş yavaş salınmasını sağlayarak, uzun süreli bir etki sağlar.

İlaç direncini azaltma: Nano ilaç taşıma sistemleri, ilaç direncini azaltabilir. Çünkü ilaç, hedef bölgede daha yüksek konsantrasyonlarda verilerek, ilaç direncini aşabilir.

Güvenilirlik: Geleneksel ilaçların kullanımına göre daha güvenilirdir. Çünkü nano ilaç taşıma sistemleri, ilacın doğrudan hedef bölgeye taşınmasını sağlayarak, ilacın vücutta farklı bölgelere dağılmasını önler.

Enkapsülasyon, bir maddenin başka bir madde ile kapsül içine alınması işlemidir. Bu işlem, ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle hidrofilik ilaçlar, hidrofobik madde içeren kapsüller içine alınarak stabil hale getirilebilmekte ve hedeflenen dokuya taşınabilmektedir. Bu sayede ilaçların etkinliği artırılabilen ve yan etkileri en aza indirilebilmektedir [4,7].

Kitosan, enkapsülasyon işleminde kullanılan sık tercih edilen materyallerden biridir. Kitosan nanopartiküller içindeki ilaçların hedef dokuda daha yavaş salınmasını sağlayarak ilaçların etkinliğini artırır. Bunun yanı sıra kitosan, sinir sistemi gibi hassas dokulara da nüfuz edebilir. Bu nedenle, nörodejeneratif hastalıklar gibi hassas dokulara yönelik ilaç taşıma sistemlerinde kitosan kullanımı özellikle önemlidir [5,6].

Kitosan nanoparçacıkları ve kan beyin bariyeri engeli (KBB) arasındaki ilişki, son yıllarda yapılan araştırmaların odak noktalarından biri haline gelmiştir. KBB, beyindeki kan damarları ile beyin hücrelerinin arasındaki bir bariyerdir ve beyne giren

moleküllerin seçici olarak geçişine izin verir. Bu nedenle, KBB, beyindeki sinir hücrelerinin normal işlevi için kritik öneme sahiptir [8].

Kitosan nanoparçacıklarının KBB'yi nasıl aştığına dair çeşitli hipotezler vardır. İlk hipotez, kitosan nanoparçacıklarının, yüksek yüzey alanı ve yüksek yüzey aktivitesi nedeniyle, KBB'de sıkı bağlantıları geçici olarak açarak, moleküllerin geçişine izin vermesidir. İkinci hipotez, kitosan nanoparçacıklarının, beyin hücrelerinin etrafındaki mikrogliya hücrelerinin aktivitesini artırarak, KBB'nin geçirgenliğini artırmasına neden olduğudur [8].

Kitosan nanoparçacıkları ve KBB arasındaki bu ilişki, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak faydalıdır. Örneğin, kitosan nanoparçacıkları, beyindeki beta amiloid proteininin birikmesine neden olan Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabilir. Kitosan nanoparçacıkları, beyindeki beta amiloid proteininin temizlenmesini hızlandırabilir ve beyindeki inflamasyonu azaltabilir [8]. Kitosan nanoparçacıkları ve KBB arasındaki ilişki, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir.

Ceviz (*Juglans regia* L.) endokarp zarı, cevizin sert kabuğunun iç kısmında bulunan ince bir zar tabakasıdır. Bu zar tabakası, cevizin besin değeri açısından önemli bir kaynağıdır ve son yıllarda yapılan araştırmalar, ceviz endokarp zarının sağlığa faydalarını ortaya koymaktadır [9-11].

Ceviz endokarp zarı, antioksidanlar ve polifenoller gibi besin maddeleri açısından zengin bir kaynaktır. Antioksidanlar, hücrelerin zararlı serbest radikallere karşı korunmasına yardımcı olurken, polifenoller ise iltihaplanmayı azaltarak sağlıklı bir bağışıklık sistemi fonksiyonu sağlayabilir [9].

Birçok çalışma, ceviz endokarp zarının sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bir araştırmada, ceviz endokarp zarı özütü tüketen farelerde, beyin hücrelerinin ölümünü azalttığı ve bellek fonksiyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir [9]. Ayrıca, bir diğer araştırmada, ceviz endokarp zarı özütü tüketen insanların, kan basıncı ve kan şekeri seviyelerinin daha düşük olduğu ve kolesterol seviyelerinin daha sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir [10]. Ceviz endokarp zarı, ayrıca bağırsak sağlığına da faydalar sağlayabilir. Bir çalışmada, ceviz endokarp zarı özütü tüketen farelerde, bağırsakta faydalı bakteri sayısının arttığı ve inflamasyonun azaldığı tespit edilmiştir

[11]. Sonuç olarak ceviz endokarp zarı, cevizin besin değeri açısından önemli bir kaynağıdır ve sağlığa birçok fayda sağlayabilir. Ancak, cevizin endokarp zarı genellikle çıkarılmakta ve tüketilmemektedir. Cevizin değerlendirilmeyen bu kısmı içerdiği bileşenler dolayısıyla beyin sağlığı için önemli bir potansiyel barındırmaktadır.

1.2. Tezin Amacı

Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklar, kognitif ve motor disfonksiyonla sonuçlanan ilerleyici nöron kaybı ile karakterize edilir. Bu hastalıklar için mevcut tedavilerin etkinliği sınırlıdır ve genellikle olumsuz yan etkilerle ilişkilendirilir [12,13]. Bu nedenle, beyne ilaç dağıtımını geliştirebilen ve yan etkileri azaltabilen yeni terapötik stratejilere ihtiyaç vardır. Potansiyel bir yaklaşım, ilaç dağıtımını için kitosan nanoparçacıklarına dahil edilen ceviz endokarp zarı özütü gibi doğal bileşiklerin kullanılmasıdır

Kitosan, bir ilaç taşıyıcı taşıyıcı olma potansiyeli açısından geniş çapta araştırılan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir polimerdir. Kitosan nanoparçacıkları, iyonik jelleşme, koaservasyon ve emülsiyon çapraz bağlama gibi çeşitli yöntemlerle hazırlanabilir. Bu nanopartiküller, gelişmiş çözünürlük ve biyoyararlanım, sürekli salım ve belirli dokulara hedeflenen dağıtım dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Kitosan nanoparçacıklarının kan-beyin bariyerini aşmada ve beyne ilaç vermede etkili olduğu gösterilmiştir [14,15].

Doğal bileşik olarak ceviz zarı ekstrelerinin, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip fenolik asitler ve flavonoidler gibi yüksek konsantrasyonlarda biyoaktif bileşikler içerdiği bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla bu biyoaktif bileşiklerin, nöroinflamasyonu, oksidatif stresi ve beta-amiloid agregasyonunu azaltmak gibi nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel terapötik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [16-19]. Ceviz kabuğu özünün, Alzheimer hastalığının hayvan modellerinde bilişsel işlevi iyileştirdiği de gösterilmiştir [21]. Buna rağmen, ceviz endokarp zarının nanopartiküler formülasyonu ile ilgili literatürde çalışma bulunamamıştır. Bu çalışmada iyonik jelyasyon tekniği ile ceviz endokarp zarı ekstraktının kitosan nanopartiküller içerisine enkapsülasyonu ve bu nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen nanopartiküllerin kontrollü

salım özelliklerinin incelenerek doğal ilaç olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya koyarak sonraki çalışmalar için altyapı olması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Epidemiyolojisi ve Patolojisi

Dünya üzerinde yaklaşık olarak 50 milyon insan Alzheimer hastalığıyla mücadele etmektedir. Alzheimer, merkezi sinir sistemi üzerinde nöron kaybıyla meydana gelen ve birtakım davranış bozuklukları, bilişsel aktivitede fark edilir biçimde azalma ile görülen ilerleyici nörodejeneratif bir rahatsızlıktır. Hipokampus, serebral korteks beyinde hafızayla ilgili önemli merkezlerdir. Hastalık buradan başlayarak beynin çeşitli kısımlarına dağılarak konuşma ve anlamada bozukluklara, geçmiş olayları, kişileri çabuk unutmaya sebep olur [28,29].

Alzheimerlı hastalarda depresyona yatkınlık ve duygu durumunda ani değişimler de görülebilmektedir. Genellikle AH hastası bireylerin beyindeki arter duvarlarında amiloid birikintiler ve çeşitli senil plaklar iltihaplanma ve sinaptik kayıplara yol açabilmektedir [22]. Tüm bu bahsettiğimiz belirtilerin meydana çıkmasında nöron kaybıyla birlikte, nöronlar arası iletimde etkili bir nörotransmitter olan asetilkolinin azalmasında büyük rol alır. AH ne yazık ki tedavi edilen bir hastalık değildir bu sebeple genellikle hastalığın etkilerini azaltmak için asetilkolinesteraz inhibitörleri kullanılarak mevcut tedaviler sağlanır [23].

Alzheimerda gözlemlenen temel değişiklikler amiloid beta plaklarının birikimi, nöron kaybı ve nörofibriler yumak birikimidir. Nörofibriler yumaklar Tau proteininin uygunsuz biçimde hiperfosforillenmiş halidir. Tau proteini bu halde hücredeki işlevlerini normal biçimde yerine getiremez. Tau proteini temelde yapısal ve işlevsel nöron organizasyonunu etkileyerek mikrotübüllerin oluşturur ve bunların kararlılığını düzenler. Mikrotübül diye bahsettiğimiz yapılar nöronlar üzerinden ulaşımı sağlar. Tau proteinleri hiperfosforilasyondan sonra mikrotübüller ile bağlantı sağlayamaz ve agregatları meydana getirirler. Agregatlar ise nörofibriler yumak oluşumunda önemli rol alır [24].

Alzheimer gözlenen hastalarda sağlıklı bireylere göre asetilkolin miktarında önemli ölçüde farklılık görülmektedir. Hastaların serebral korteksinde Asetilkolin transferaz isimli enzimin aktivitesinin azalmasıyla beraber kolin geri alımı da azalır bu nedenle

asetilkolin sentezinde azalma meydana gelir. Yapılan bir çalışmaya göre apolipoprotein E (APOE) ε4 varyantına sahip AH'lı bireylerde diğerlerine kıyasla şiddetli kolinerjik bozukluk görülür [26]. Ayrıca gözlemlenen bir diğer farklılıkta AH'lı bireylerde parietal ve frontal kortekslerinde PA2 oranındaki azalmanın daha düşük kolin seviyelerine yol açtığı bulunmuştur. Hafıza üzerinde etkin olan nikotinik reseptör ve presinaptik muskarinik reseptörlerde azalma meydana gelmiştir. Oluşan bu kolinerjik kayıp çeşitli nörolojik hastalıklara sebep olmaktadır. Nöronlar yani sinir hücreleri diğer hücreler gibi kendilerini yenileme özellikleri gelişmiş değildir, sınırlıdır. Bu durum beyinde hücre hasarlarından meydana gelen rahatsızlıklarda önemli etkindir [23,25]

Alzheimerda gözlenen bir diğer değişiklik ise glutaminerjik sistemin sık sık uyarılmasıyla hücre içi kalsiyum miktarında artış meydana gelir. Kalsiyumun hücre içinde yüksek konsantrasyonu nörolojik disfonksiyona ve hücre ölümlerine sebep olur. Ayrıca kalsiyum artışıyla beraber iyonun aktive ettiği kalpainlerin aktiviteside artış gösterir. Amiloid beta plaklarının kalsiyum konsantrasyonunu bozduğu bilinmekle beraber artan kalsiyum konsantrasyonlarının da amiloid beta plakları ve nörofibriller yumak oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir. AB birikimi metal aracılı nörotoksisite artışıyla da yakından ilgilidir. Alzheimerlı hastaların beyinlerinde rastlanan bol miktardaki mikrogliya hücresi, nitrikoksit, süperoksit radikalleri glutamat gibi çeşitli nörotoksik kimyasallar üretir. Bu hücreler AB ile etkileştiğinde interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi proinflamatuvar faktörler serbest bırakılır [23].

Oksidatif stres alzheimerda sebep olan etmenlerin bir diğeridir. Serbest radikallerin artması sonucu meydana gelen oksidatif stres hücre hasara neden olur. Ağır metal konsantrasyonlarındaki artış, enfeksiyonlar vb. etkenler serbest radikallerin artmasına neden olabilir [27].

Alzheimer hastalığı tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan birisi hastalığın henüz tam olarak anlaşılamamış olmasıdır. Karşılaşılan diğer sorunlardan biri ise mevcut tedavilerde kullanılan ilaçların yan etkileridir. Bu nedenle ilaçların yan etkileriyle baş etmek ayrı bir sorun oluşturmaktadır. Yan etkileri yüksek ilaçlar yerine doğal bileşiklerin bu amaçla araştırılması önem arz etmektedir. Bunların yanı sıra ilaçlar maliyetli ve her hasta tarafından ulaşılır olmamaktadır [30-32].

2.2. Tıbbi Bitkilerin Önemi

Tıbbi bitkiler binlerce yıldır tedavi amaçlı kullanılmaktadır ve hala birçok insan tarafından tercih edilmektedir. Tıbbi bitkiler, doğal bir yaklaşım sunarak çeşitli sağlık sorunlarının tedavisine yardımcı olabilir. Bu bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı, modern tıp yöntemleriyle desteklenerek sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılabilir [33].

Tıbbi bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı, bitkilerin içerdikleri aktif bileşenlere bağlıdır. Bitkilerin farklı kısımları (örneğin kök, yaprak, çiçek) farklı bileşenler içerir ve bu bileşenlerin sağlık üzerinde çeşitli etkileri olabilir. Örneğin, papatya çiçeği, rahatlatıcı ve uykuyu teşvik edici özellikleri nedeniyle sıklıkla uyku sorunlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı şekilde, zencefil kökü anti-inflamatuar özelliklere sahiptir ve eklem ağrısı gibi inflamatuvar durumların tedavisinde kullanılabilir.

Günümüzde mevcut farmasötik ilaçların önemli bir kısmı da bitkilerden elde edilmiş bileşiklerden oluşur. Son elli yıl içerisinde yaklaşık 1900 yeni ilaç onay almış ve bunların 930 tanesini doğal moleküller oluşturmaktadır. Geri kalan ilaçlar ise doğal moleküllerden esinlenerek oluşturulan sentetik ilaçlardır. İn vivo ve in vitro olarak çok sayıda tıbbi bitki çeşitli hastalıklara çare olarak araştırılmakta ve çalışılmaktadır [34-36].

2.3. Alzheimer İçin Tıbbi Bitkiler

Şifalı bitkiler üzerine yapılan çok sayıda araştırmalar ile bunların AH tedavisinde kullanılabilecek antioksidan, nöroprotektif aktivitelere sahip olduğu ispatlanmıştır. Anti inflamatuvar otlar, AH da beyin dokusunda meydana gelen iltihaplanmaları azaltabilir. Bilişsel işlev ve muhakeme yetisi için önemli olan asetilkolin nörotransmitterinin bu hastalıkla beraber anormal derecede düşük konsantrasyonları ulaşır. Bu sebeple beyindeki kolinerjik sistemi güçlendirecek bileşiklerin potansiyel tedavi seçenekleri olarak değerlendirilebilmektedir [37]. Elma, zencefil, ginkgo biloba, biberiye, lavanta, kekik, sarımsak, kakule, curcumin (zencefilin aktif bileşeni) gibi doğal bitki zleri, Alzheimer hastalığının tedavisinde ve önlenmesinde önemli bir rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Örneğin, ginkgo biloba özü, antioksidan özellikleri nedeniyle nöronların oksidatif stres ile hasar görmesini önlemeye yardımcı olabilir. Zencefil ise, antiinflamatuvar bileşikler içerir ve beyindeki iltihaplanmayı azaltabilir, bu da Alzheimer hastalığına bağlı hücre ölümünü azaltmaya yardımcı olabilir. Ayrıca, bazı çalışmalar, lavantanın anksiyete ve depresyon gibi Alzheimer hastalığına eşlik eden semptomları hafifletmeye yardımcı olabileceğini göstermektedir [37].

2.3.1. Tıbbi bitkilerin kullanım dezavantajları

Tıbbi bitkiler içerdikleri önemli bileşikler sayesinde geçmişten bu yana çeşitli hastalıkların tedavi edilmesinde önemli bir yere sahiptir. Mevcut terapötik ilaçlarla öngörülemeyen etkileşimleri ile toksisiteleri ciddi sorunlar yaratabilmektedir. Toksisiteleri yüzünden biyoyararlanımı sınırlandırılmış birçok bitki klinik uygulamalar için uygun değildir [38]. Aşağıda tıbbi bitkilerin kullanım dezavantajları özetlenmektedir:

Yan etkiler: Tıbbi bitkilerin kullanımı bazen yan etkilere neden olabilir. Bazı bitkiler, özellikle yüksek dozlarda alındığında, mide bulantısı, kusma, baş dönmesi, baş ağrısı, ishal gibi yan etkilere neden olabilir. Bazı tıbbi bitkiler, doğru şekilde kullanılmadıklarında veya yüksek dozlarda tüketildiğinde zehirlenme riski taşır. Özellikle ocuklar ve hamile kadınlar gibi hassas gruplar, bu riskten daha fazla etkilenebilirler.

Etkileşimler: Tıbbi bitkiler, bazı ilaçlarla etkileşime girebilir ve bu da ilaçların etkinliğini azaltabilir veya artırabilir. Bazı bitkiler, özellikle kan inceltici ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanama riskini artırabilir.

Kalite kontrolü eksikliği: Tıbbi bitkilerin kalitesi ve saflığı kontrol edilmediğinde, kontamine veya yanlışlıkla yanlış bitkilerin kullanımı riski ortaya çıkabilir. Bu da yan etkilere ve tedavi başarısızlığına neden olabilir.

Dozaj problemleri: Tıbbi bitkilerin kullanımı sırasında doğru dozajın belirlenmesi önemlidir. Dozaj yanlış belirlenirse, bitkilerin etkisi yetersiz kalabilir veya yan etkiler görülebilir.

2.4. Ceviz

Ceviz (*Juglans regia L.*) ağacı Juglandaceae familyasına ait bir ağaç türüdür ve dünya genelinde yetişmektedir. Ceviz, çekirdeği yenen bir meyve olarak bilinir ve çoğunlukla insan tüketimi için yetiştirilir. Ayrıca yağı, kabuğu ve yaprakları da farklı amaçlarla kullanılabilir. Cevizin yapısı oldukça kompleks ve içerdiği bileşiklerle birçok sağlık faydası sağlar. Cevizin kabuğu ve yaprakları, juglon ve nükleotidler gibi çeşitli bileşikler içerir. Cevizin yenilebilir kısmı ise protein, karbonhidrat, yağ, lif, mineraller ve vitaminler açısından zengindir. Ayrıca, cevizdeki omega-3 yağ asitleri, antioksidanlar ve fenolik bileşikler gibi diğer sağlıklı bileşikler de dahil olmak üzere bir dizi besin ögesi bulunmaktadır. Anti oksidatif, anti inflamatuvar, anti kanserojen ve anti mikrobiyal özellikleri tespit edilen ceviz halk tıbbında da çokça kullanılmaktadır [9,10].

Ceviz tüketimi, beyin için oldukça faydalıdır ve bu etkiler yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir. Yapılan insan ve hayvan deneylerinde uygulanan ceviz diyetinin beyindeki zarar görmüş protein yapılarının birikmesini engellediği, dolayısıyla yaşlılıkla ilişkili nöro inflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir [39]. İnsanın yaşlanma sürecinde hücrelerde meydana gelen oksidatif stres ve nöroinflamasyon bilişsel bozuklukları ve alzheimer hastalığını tetikleyebilmektedir. Tüm nörodejeneratif hastalıkların temelinde serbest radikaller yatar. Beyin ihtiyacı gereği oksijeni yüksek tüketimi sonucunda oluşabilecek oksidatif strese karşı hassas bir organdır. Yapılan çeşitli çalışmalarla, yüksek antioksidan ve cevizin antiinflamatuvar etkileri kanıtlanmıştır. Ceviz folik asit, fenolik asit, proantosiyanidinler, flavonoidler, melatonin, selenyum vb. farklı molekülleri yapısında bulunduran yüksek antioksidan

içeriğine sahiptir [39]. Ceviz meyvesi, güçlü antiinflatuar etkiye sahip yüksek oranlarda omega-3 yağ asitleri bulundurur. Beyindeki homeostazinin korunması için önemli olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca ceviz tüketiminin, bağırsak florası üzerindeki olumlu etkileri sayesinde kolon kanseri gibi ciddi kanser türlerini önleyebileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcut [40].

2.4.1. Cevizin kullanım alanları

Yapılan çalışmaları özetle ceviz (*Juglans regia L.*) sağlıklı beslenme açısından önemli bir kaynak olmasının yanı sıra tıbbi açıdan da kullanılan bir bitkidir. Cevizin yaprakları, kabuğu ve meyvesi tıbbi amaçlar için kullanılır. Bu bitkinin farklı kısımları, antioksidan, antiinflatuar, antimikrobiyal, antioksidan ve anti-kanser özellikleri gibi çeşitli sağlık yararları sağlayabilecek birçok biyoaktif bileşen içermektedir.

Ceviz kabuğu, özellikle antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle geleneksel olarak enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca ceviz kabuğu, yüksek miktarda tanen, fenolik asitler, juglon ve flavonoidler içermesi nedeniyle antioksidan ve anti-inflatuar etkiler gösterir. Ceviz yaprakları, kan şekerini düzenlemeye, antioksidan aktiviteye, hipertansiyonu düşürmeye ve anti-inflatuar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [39].

Ceviz meyvesi, omega-3 yağ asitleri, protein, lif, vitaminler ve mineraller açısından zengin olması nedeniyle kalp sağlığını korumaya, bağışıklık sistemini güçlendirmeye ve inflamasyonu azaltmaya yardımcı olabilir. Ayrıca ceviz meyvesi, nöroprotektif özelliklere sahip olan antioksidan bileşikler içermesi nedeniyle nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde de potansiyel bir rol oynayabilir [41].

2.4.2. Ceviz endokarp zarının bileşenleri

Cevizin iç kabuğu olarak da bilinen ceviz endokarp zarı (Şekil 2.1), yenilebilir kuruyemişi sert kabuğundan ayıran ince tabakadır. Bu zarın, potansiyel sağlık yararları olan çeşitli biyoaktif bileşikler içerdiği gösterilmiştir. Ceviz endokarp zarı, bir tür antioksidan olan polifenoller açısından zengindir. Polifenollerin anti-inflatuar ve antikanser özelliklerinin yanı sıra kalp sağlığı ve beyin fonksiyonu için potansiyel faydaları olduğu bilinmektedir [43].



Şekil 2.1. Ceviz endokarp zarı

Ceviz endokarp zarı, polifenollere ek olarak flavonoidler, tanenler ve fitosteroller dahil olmak üzere diğer biyoaktif bileşikler içerir. Flavonoidlerin antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Tanenlerin antiviral ve antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra sindirim sağlığı için potansiyel faydaları olduğu gösterilmiştir [42].

Bir çalışmada, ceviz endokarp zarının kimyasal bileşimi analiz edildi ve çeşitli bileşiklerin varlığı belirlendi. Bu bileşikler arasında, fenolik asitler (galik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit), flavonoidler (kaempferol, kvercetin ve izoramnetin), triterpenler (oleanolik asit, betulinik asit, maslinik asit ve ursolik asit) ve steroller (β -sitosterol, stigmasterol ve kampesterol) bulunduğu tespit edildi [46].

Bu bileşenlerin birçoğu antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir ve insan sağlığına faydaları vardır. Örneğin, fenolik asitler, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak kansere karşı koruyucu etkiye sahiptir. Flavonoidler, kalp sağlığına faydalıdır ve triterpenler, antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılır [44-46].

Birçok araştırma, ceviz tüketiminin beyin sağlığına faydaları olduğunu göstermektedir. Ceviz iç zarının da bu faydalı etkilere katkısı olduğu düşünülmektedir. İç zarın içerdiği omega-3 yağ asitleri, beyin fonksiyonlarının korunmasına ve geliştirilmesine yardımcı olabilir. Antioksidanlar ve polifenoller ise, beyindeki

hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasına ve beyin fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olabilir [45].

Bir araştırmada, ceviz iç zarı özütünün, laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan deneylerde bellek ve öğrenme fonksiyonlarını artırdığı bulunmuştur. Ayrıca, bir başka araştırmada, insanlarda yapılan bir çalışmada, ceviz tüketiminin bilişsel fonksiyonları artırdığı ve bellek performansını iyileştirdiği tespit edilmiştir [47].

Ceviz endokarp zarının nöroprotektif etkileri hakkında yapılmış araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin, Kim ve ark.(2019) Yaptıkları çalışmada ceviz endokarp ekstraktının Alzheimer hastalığına bağlı nöronal hasarı azalttığını ve antioksidan etkileri olduğunu belirtmiştir [48]. Ayrıca, Lee ve ark.(2019) ceviz endokarp özütünün Parkinson hastalığına bağlı nöronal hasarı önlediğini ve nöronal hücrelerin hayatta kalmasını artırdığını bildirmiştir [50]. Benzer şekilde, Zhang ve ark.(2020) ceviz endokarp özütünün serebral iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığını ve nöroprotektif etkileri olduğunu bulmuştur [49].

2.5. Kan Beyin Bariyeri

Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin dokusunu kan kaynaklı toksinler, patojenler ve diğer zararlı maddelerden koruyan bir bariyer sistemidir. KBB, beyin ile kan arasındaki bir çift katlı hücre katmanından oluşur. Bu hücreler arasında sıkı bağlantılar vardır ve sıvılar, moleküller ve hücrelerin beyine geçmesini sınırlar.

KBB, beyindeki hücrelerin normal fonksiyonları için gerekli olan besinleri ve molekülleri beyne taşıırken, zararlı maddelerin beyne girmesini de önler. Bu nedenle, KBB'nin bütünlüğünün korunması, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli beyin hastalıklarının tedavisi açısından kritik öneme sahiptir. Ancak, nörodejeneratif hastalıklar, beyin tümörleri ve enfeksiyonlar gibi durumlarda, KBB'nin işlevi değişebilir veya hasar görebilir. Bu durum, beyin hücrelerinin toksinler, inflamatuvar moleküller ve immün hücrelerine maruz kalmasına ve zarar görmesine neden olabilir [51].

Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için ilaçların beyne ulaştırılması, KBB'nin işlevi nedeniyle zordur. Geleneksel ilaçlar, KBB'yi geçemezler veya sınırlı bir geçirgenlik gösterirler. Bu nedenle bilim insanları, KBB'nin geçilmesi için farklı teknikler

geliştirmeye çalışmaktadır. Bu teknikler arasında, nanoteknolojik yöntemler ve biyolojik taşıyıcı sistemler yer almaktadır [52].

Nanoteknoloji, çok küçük boyutlu parçacıkların (nanopartiküller) kullanımıyla ilgili bir teknolojidir. Bu yöntemle, ilaç molekülleri, KBB'yi geçebilen küçük boyutlu nanopartiküllere yüklenerek beyne taşınabilirler. Ayrıca, biyolojik taşıyıcı sistemler, ilaç moleküllerinin KBB'yi geçmesine yardımcı olan ve beyne taşınmasına olanak tanıyan doğal moleküllerdir. Örneğin, lipozomlar gibi yapay lipid yapıları veya transferrin, insan serum albumin ve peptitler gibi doğal proteinler bu amaçla kullanılabilir [53].

Beyne ilaç taşınması için kullanılan nanoyapılar, ilacın hedef bölgeye daha etkili ve güvenli bir şekilde ulaştırılmasını sağlar. Nanopartiküller, genellikle ilaç moleküllerini korumak, ilacın kandan beyin bariyerini aşmasına yardımcı olmak ve ilacın hedef bölgeye doğru yönlendirilmesini sağlamak için kullanılır. Bu nanopartiküllerin birçok farklı türü vardır, ancak en yaygın olanları lipit bazlı nanopartiküller, polimer bazlı nanopartiküller ve metal bazlı nanopartiküllerdir. Lipit bazlı nanopartiküller, fosfolipitler veya sentetik lipidler gibi yağ benzeri bileşiklerden yapılmıştır. Polimer bazlı nanopartiküller ise, polimerlerin bir araya getirilmesiyle oluşur ve kitosan gibi doğal polimerler de kullanılabilir. Metal bazlı nanopartiküller, altın veya galyum gibi metallerden yapılmıştır.

Nanopartiküllerin boyutu, yüzey özellikleri ve yüzey kaplamaları, ilacın beyne ulaşma yeteneğini ve biyolojik etkilerini etkileyebilir. Bu nedenle, nanopartiküllerin tasarımı, ilaç taşıma sistemlerinin etkinliğini ve güvenliğini belirlemek için önemlidir. beyne ilaç taşınmasında kullanılan nanopartiküller, ilacın beyne etkili ve güvenli bir şekilde ulaşmasını sağlar ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynar [54-57].

2.6. Nano İlaç Taşıma Sistemleri

Nano ilaç taşıma sistemleri son yıllarda geliştirilen, ilaçların hedefe yönelik ve kontrollü bir şekilde taşınması için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu sistemler ilaçların biyoyararlılığını artırmak, yan etkilerini azaltmak, ilaçların hedef dokuya seçici olarak ulaşmasını sağlamak, ilaçların stabilitesini artırmak ve ilaçların vücutta daha uzun süre kalmasını sağlamak gibi birçok avantaj sağlar.

Nano ilaç taşıma sistemleri, farklı boyutlarda yapılar olarak tanımlanabilirler. Bunlar arasında nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, nanokapsüller, niosomlar, liposomlar, dendrimerler, mikrogüller ve manyetik nano partiküller yer alır. Bu yapılar, ilaçları hedef dokuya taşımak için farklı yollarla üretilirler. Bu yollar arasında fiziksel yöntemler (örneğin sıvı faz yöntemi, çöktürme yöntemi, öğütme yöntemi vb.), kimyasal yöntemler (örneğin mikroemülsiyon, sol jel, süperkritik kurutma vb.), biyolojik yöntemler (örneğin liposomlar, mikrosomal veziküller vb.) ve karma yöntemler (örneğin çift emülsiyon yöntemi, nanoemülsiyon yöntemi vb.) bulunur. Nano boyutlu ilaç taşıma sistemleri, farklı tiplerde ilaç molekülleriyle kullanılabilirler. Bunlar arasında hidrofobik (su itici) ilaç molekülleri, hidrofilik (suya çözünür) ilaç molekülleri, protein ve peptitler, nükleik asitler (örneğin DNA, RNA), aşılarda ve gen terapisi ürünleri yer alır [58].

Nanopartiküller, 10-1000 nm boyutunda partiküllerdir ve ilaçların hedef dokuya taşınması için kullanılan en yaygın nano yapıdır. Bu yapı, inorganik ve organik materyallerden üretilir. Organik nanopartiküller arasında polimerler, lipidler ve proteinler bulunurken, inorganik nanopartiküller arasında altın, gümüş, demir oksit ve silika bulunur.

Nanoemülsiyonlar, 20-200 nm boyutunda yağ ve su fazlarının homojen karışımıdır. Bu yapı, suya duyarlı olmayan ilaçların taşınmasında kullanılır. Nanokapsüller ise, içerisinde sıvı veya katı ilaç bulunan kapalı küresel yapıdır. Bu yapı, ilaçların hedef dokuya seçici olarak taşınmasında kullanılır.

Liposomlar, 50-1000 nm boyutunda kapsüllerdir ve çift katlı bir lipid tabakası ile çevrilidirler. Bu yapı, suda çözünmeyen ilaçların taşınmasında kullanılır. Niosomlar ise, noniyonik surfaktanlar ve kolesterol içeren yapılardır ve ilaçların hedef dokuya taşınmasında kullanılır [59].

Dendrimerler, ağaç benzeri dallanmış polimer yapılarıdır ve yüzeyleri üzerine ilaç molekülleri bağlanabilir. Mikrogüller, sıvı kristal yapılı bir matrisin içerisinde ilaç moleküllerinin bulunduğu yapılar olup, bu yapılar ilaçların hedef dokuya seçici olarak taşınmasında kullanılır.

Manyetik nanopartiküller, genellikle metal oksitler veya karbon esaslı malzemelerden yapılan çok küçük boyutlu partiküllerdir. Bu partiküllerin yüzeyinde manyetik bir özellik vardır, bu nedenle manyetik alan etkisi altında hareket edebilirler.

Nano boyutlu ilaç taşıma sistemleri, çeşitli avantajlara sahiptirler. Bunlar arasında, ilaç moleküllerinin hedeflenen bölgeye ulaşmasını sağlama, ilacın stabilize edilmesi, ilacın farmakokinetiğinin ve farmakodinamiğinin iyileştirilmesi, ilacın toksisitesinin azaltılması ve ilaç moleküllerinin hedeflenen bölgede daha uzun süre kalması sayılabilir. Ancak, nano boyutlu ilaç taşıma sistemlerinin bazı dezavantajları da vardır. Bu sistemlerin üretimi oldukça maliyetlidir. Ayrıca, üretim sırasında kullanılan bazı maddelerin, özellikle değişik boyutlardaki nano parçacıkların, toksik etkileri olabilir. Bunun yanı sıra, bu sistemlerin stabilitesi ve depolanması ile ilgili bazı sorunlar da mevcuttur [60,61].

2.7. Kitosan ve Özellikleri

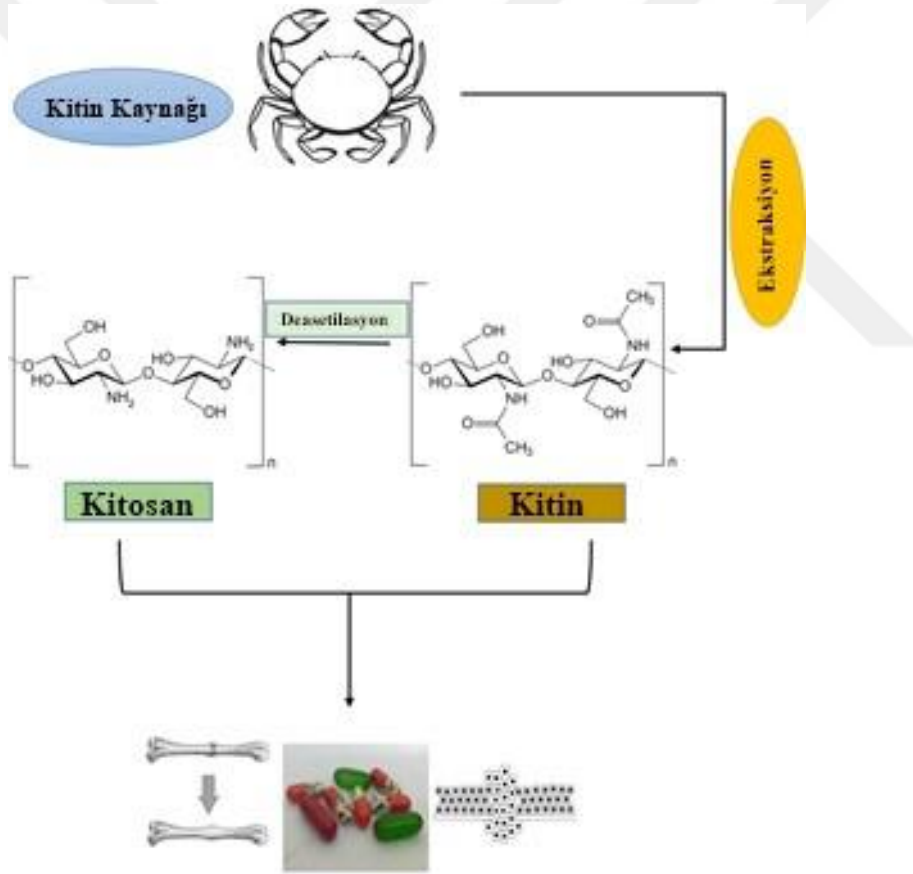
Kitosan, N-deasetillenmiş kitin polimeri olarak bilinen doğal bir polisakkarittir. Kitosan, karides, yengeç ve diğer kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarının hidrolizi sonrasında elde edilir. Kitosan, insanlar için biyouyumlu, biyobozunur ve biyoaktif bir polimerdir. Kitosan, yüksek mekanik dayanıklılık ve esnekliğe sahiptir. Ayrıca düşük toksisiteye sahiptir ve biyolojik olarak parçalanabilir, bu nedenle çevre dostudur. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan kitosan, dokularla uyumlu ve biyouyumlu olması nedeniyle yaygın olarak kullanılır.

Kitosan, toz veya partikül yapıda olan, tadı ve kokusu bulunmayan bir polimerdir ve kendine özgü pozitif yüklü amino gruplar içerir, bu nedenle asidik pH'da protonlaşır ve katyonik özellik gösterir. Bu özellikler, kitosanın çeşitli uygulamalarda kullanımını sağlar. Kitosan, yüksek düzeyde hidrofilik bir polimerdir ve su ile kolayca şişer, bu nedenle hidrojel oluşturmak için kullanılabilir [62].

Kitosanın ilk keşfedilişi 1811 yılında Fransa'da Bracannot tarafından mantarlardaki hücre duvarından fungin adını verdiği parçayı izole etmesine dayanır. Odier yaptığı bir çalışmada bu yapının böceklerde de olduğunu keşfetmiş ve fungine kitin ismini vermiştir. Kitosan 1894 yılında Hoppe Seyler tarafından kitinin potasyum hidroksit ile deasetile edilmesi sonucu elde edilmiştir. Kitosanın elde edileceği hammadde iyice temizlendikten sonra deproteinizasyon olarak isimlendirilen sodyum hidroksit ile kaynatma prosedürü uygulanır. Bir sonraki aşamada durulamanın ardından hammadde HCL ile muamele edilerek tekrar durulanır. Ürünün su oranı % 6'dan düşük olana kadar basınca tabi tutulur. Bu işlemin ardından elde edilen kitin deasetilasyon işlemine tabi tutulur. Deasetilasyon işlemi hammaddenin kostik asit içerisinde

bekletilmesi ve yıkanıp fazla suyunun uzaklaştırılması işlemlerini kapsar. Bu prosedürden elde edilen yaş kitosan ise nem miktarı belirlenen seviyelere indirilene dek kurutulur [62,63].

Kitinin alkali bir ortamda deasetile edilmesiyle oluşan kitosanın yaklaşık molekül ağırlığı 3000-2 000 000 g/mol civarındadır. Bu deasetilasyon sonucunda farklı deasetilasyon derecesine sahip kitosan elde edilir. Sulu ve asidik ortamlarda çözünebilen kitosan böyle ortamlarda polielektrolite dönüşür. Standart çözücüsü olarak çoğunlukla seyreltik asetik asit kullanılmaktadır. Çözünürlük kitosanın deasetilasyon seviyesine, pH'a, çözücü asitin türüne bağlı olarak değişebilir. Asit derişimi ve çözünürlük ters orantılıdır. İçeriğindeki zengin azot miktarı sayesinde kitosan şelatlama ajanı olarak da kullanılabilir.



Şekil 2.2. Kitinden Kitosan Elde edilme süreci [68]

Kitosanın kitinden ve selülozdan ayrı olarak bulundurduğu amin grubu çözünme esnasında protan alır ve bundan ötürü kitosan pozitif yüklenir. Bu özelliğinden dolayı kitosan, diğer polimerlerden ayrılarak pozitif yükle yüklenmiş hidrofilik

biyopolimerdir. Ayrıca su bağlama kapasitesi yüksek olan kitosan bu sayede film oluşturmak için etkili bir malzemedir [64].

Kitosanın kitine karşı bazı avantajları bulunmaktadır. Kitin ancak toksik olan lityum klorür gibi çözücülerde çözülebiliyorken kitosan seyreltik asit çözeltilerinde de kolaylıkla çözünür. Ayrıca kitosanda bulunan amin grubu sayesinde çeşitli reaksiyonlara girebilir.

Kitosan, antimikrobiyal, antioksidan, anti-tümör ve immünomodülatör etkilere sahiptir ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılır. Ayrıca kitosan, ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanılabilen nano boyutlu partiküllerin hazırlanmasında kullanılır.

Kitosanın kullanım alanlarının giderek artmasıyla doğadaki deniz kabuklarının atık yükünün önüne geçilmektedir. Bunun yanı sıra başta sağlık sektöründe yan etki göstermeyen uygulamaları kitosan biyopolimerinin önemli avantajlarından [64].

2.7.1. Kitosanın nöroprotektif etkileri

Son yıllarda, kitosanın nöroprotektif özellikleri üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalar, kitosanın sinir sistemi üzerinde çeşitli etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Bazı araştırmalar, kitosanın nörotoksisiteyi azaltarak nöronları koruduğunu göstermiştir. Ayrıca, kitosanın antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri, nöronların oksidatif stres ve inflamasyon gibi zararlı etkilerden korunmasına yardımcı olabilir. Bu nedenle, kitosan nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir [65]. Bunun yanı sıra, kitosanın sinir hücrelerinin büyümesini ve yenilenmesini de teşvik edebileceği düşünülmektedir. Bu etki, nörolojik yaralanmaların ve hastalıkların tedavisinde kitosanın kullanımını daha da cazip hale getirmektedir.

2.7.2. Kitosan nanopartiküllerinin elde edilme metotları

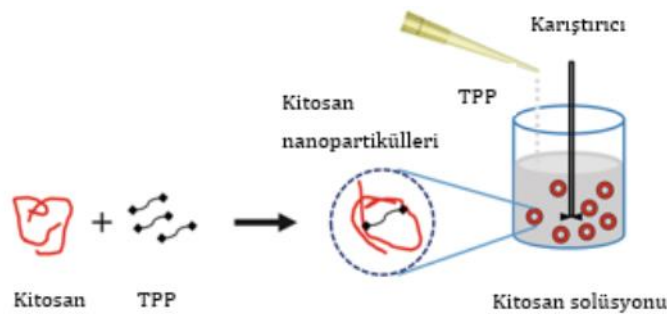
Solvent evaporasyon yöntemi: Bu yöntemde, kitosan ve çözücü madde (genellikle organik çözücüler) karıştırılır ve elde edilen çözelti yavaş yavaş solvent buharlaştırılarak partiküller oluşur.

Emülsiyon çapraz bağlama yöntemi: Bu yöntemde, kitosan polimeri bir yağ fazı içinde çözülür ve sonrasında su fazı içinde çapraz bağlama ajanı olan gluteraldehit veya TPP gibi bir madde ilave edilir. Bu yöntem, küresel şekilli partiküllerin üretiminde kullanışlıdır.

Ultrasonik dispersiyon yöntemi: Bu yöntemde, kitosan polimeri, bir çapraz bağlama ajanı ve su, ultrasonik titreşimler yardımıyla homojen bir dağılım elde edene kadar karıştırılır.

Mikroemülsiyon yöntemi: Bu yöntemde, kitosan polimeri, bir çapraz bağlama ajanı, bir yüzey aktif madde ve bir çözücü madde bir araya getirilir. Bu bileşenler, ultrasonik titreşimler yardımıyla bir mikroemülsiyon oluşturacak şekilde homojenleştirilir.

İyonotropik jelasyon yöntemi: Kitosan nanopartikülleri elde etmek için kullanılabilecek çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanlarıysa iyonik jelasyon metodu ve ters misel yöntemleridir. Ters misel metodunda daha küçük ve kararlı partiküller üretilebiliyor olmasına rağmen yöntemde kullanılan çapraz bağlayıcının toksik etki göstermesi büyük bir dezavantajdır. İyonik jelasyon metodunda fiziksel çapraz bağlayıcıların kullanılabilmesi, toksik etkileri ortadan kaldıracığı için genellikle daha sık tercih edilmektedir. Pozitif yüklü olan kitosan ile zıt yüke sahip bir çapraz bağlayıcı tersinir etkileşime girmesiyle enkapsülasyon işlemi gerçekleşir. Bu yöntemde sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcı, toksik olmayan ve gelişmiş bağlanma özellikleri olan TPP dir. TPP'nin yapısında bulunan polianyon grupları ile kitosanın (+) yüklü amin grupları arasında meydana gelen iyonik etkileşime dayanan bu metot sonucunda non-toksik ve uyumlu bir kompleks yapı oluşur. Alkali koşullarda çözünmeyen kitosan, yapılan çalışmaya uygun olarak organik veya inorganik asit çözeltiler içerisinde çözünebilir. İlk kitosan nanoparçacıkları TPP kullanılarak iyonik jelasyon metoduyla hazırlanmıştır. Bu yöntemin kontrol edilebilir oluşu, organik çözücülerin kullanılması önemli yönlerindendir. Bu yöntemle üretilen nanoparçacıklar ile ilaçlar ve çeşitli aktif moleküllerin enkapsülasyonları yapılabilmektedir [66].



Şekil 2.3. İyonik jelasyon tekniği ile kitosan nanopartiküllerin elde edilmesi [69]

İyonik jelasyon yönteminde, hazırlanan kitosan çözeltisi ile enkapsüle edilmek istenen maddenin homojen çözeltisi elde edildikten sonra TPP solüsyonunun şırınga ile yavaş bir şekilde çözeltiye ilave edilmesinin ardından partiküller elde edilir. Bu yöntemde, birçok faktör nanopartikül boyutunu etkileyebilir. Bunlar arasında kitosan konsantrasyonu, TPP konsantrasyonu, pH, karıştırma hızı ve süresi, sıcaklık ve kitosan/TPP oranı gibi faktörler bulunur [66,67].





3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Malzemeler

3.1.1. Nanopartikül sentezinde kullanılan kimyasallar

Ceviz, Mersin'den temin edilmiştir. Kitosan (Sigma-Aldrich), sodyum tripolifosfat (TPP) (Sigma-Aldrich), asetik asit (Sigma-Aldrich) firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Zetasizer cihazı (NanoPlus Zeta/Nano Particle Analyzer), FTIR (Perkin Elmer marka Spectrum Two model Fourier Dönüşümlü Infrared), Spektrometre (Shimadzu UV-2600), Taramalı Elektron Mikroskopu(SEM) (JSM-6060LV), pH metre (Lab 850 Schott), Santrifüj Cihazı (Nüve NF 200), Soğutmalı Santrifüj cihazı (Nüve NF 800R Soğutmalı Santrifüj), Sonikatör (Jingxin Technology Ultrasonic Cell Crusher), Hassas Terazî (ATX 220 Shimadzu), Buzdolabı (Beko), Etüv, Manyetik karıştırıcı, UV spektroskopisi (Shimadzu UV-2600 model), Blender(Hotmix 2155 Beko), Vortex (Heidolp Reaxtop)

3.2. Metot

3.2.1. Ceviz endokarp zarı ekstraktının elde edilmesi

Ceviz meyveleri Mersin-Tarsus'tan temin edildi. Cevizler kırılarak ortalarındaki endokarp zarları ayrıldı. Elde edilen zarlar blender yardımıyla ufak parçalara ayrıldı. Endokarp zarlarının ekstrakte edilmesi için saf suyla demleme metodu kullanıldı. Saf su kaynatılarak üzerine parçalanmış ceviz zarları ilave edildi ve 15 dk daha demlenmesi sağlandı. Soğuması için bekletilmesinin ardından filtre kağıdı kullanılarak posa kısmından ayrılan ekstrakt, 4500 rpm de 10 dk boyunca santrifüjlendi. Son olarak elde ettiğimiz ekstrakt kullanılmak üzere şişelenerek 4°C de buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.2. Kitosan nanopartiküllerinin(CSNP) oluşturulması

Nanopartiküllerin hazırlanması için iyonik jelasyon tekniği kullanılmıştır. İlk olarak kitosan polimeri(%0.3 w/v), %1(v/v) lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcıda 750 rpm de 5 saat karıştırılmaya bırakılmıştır. İyonik çapraz bağlayıcı molekül olarak sodyum tripolifosfat(TPP) kullanılmıştır. TPP çözeltisi 0.6 mg/ml konsantrasyonunda distile su kullanılarak haazırlanmıştır. Hazırlanan TPP solüsyonu 1 saat oda sıcaklığında 750 rpm de karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiştir. Ardından pH metre ile kitosan çözeltisinin pH'ı 4.8 olarak ayarlanmıştır. Bunun için 0,1 M NaOH tamponu kullanılmıştır. Kitosan çözeltisi beher içerisinde alınarak 1000 rpm de karıştırılmaya alınmış ve bu esnada üzerine TPP çözeltisi damla damla eklenmiştir. Kitosan/TPP oranı 5:2 hacimsel oranda olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde ettiğimiz çözelti 1 saat bu şekilde karıştırılmaya devam edilmiştir. Daha sonra karışım 10 000 rpm de 45 dk santrifüjlenerek nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküllerin bulunduğu pellet kısmı, diğer deneyler ve karakterizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere ayrılmış ve 4°C de saklanmıştır.

3.2.3. Ceviz endokarp zarı ekstraktı yüklü kitosan nanopartiküllerinin (JP/CSNP) oluşturulması

Nanopartiküllerin hazırlanması için iyonik jelasyon tekniği kullanılmıştır. İlk olarak kitosan çözeltisi(%0.3 w/v), %1 lik asetik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcıda 750 rpm de 5 saat karıştırılmaya bırakılmıştır. İyonik çapraz bağlayıcı molekül olarak sodyum tripolifosfaat(TPP) kullanılmıştır. TPP çözeltisi 0.6 mg/ml konsantrasyonunda distile su kullanılarak hazırlanmıştır. TPP solüsyonu 1 saat oda sıcaklığında 750 rpm de karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiştir. Ardından pH metre ile kitosan çözeltisinin pH'ı 4.8 olarak ayarlanmıştır. Bunun için 0,1 M NaOH tamponu kullanılmıştır. Kitosan çözeltisi 1000 rpm de karıştırılmaya alınmış ve karışım esnasında farklı oranlarda ekstrak (seri1: 10 mg/ml, seri2: 5 mg/ml, seri3: 2.5 mg/ml) ilave edilerek 3 farklı konsantrasyonda kitosan /ceviz zarı ekstrakt çözeltisi elde edilmiştir. Ardından 1000 rpm de karışmaya bırakılan çözeltilerin üzerine kitosan/TPP oranı 5:2 hacimsel oranda olacak şekilde damla damla TPP çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışım 10 000 rpm de 45 dk santrifüjlenerek nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküllerin bulunduğu pellet kısmı ve ayrılan süpernatantlar diğer deneyler ve karakterizasyon işlemlerinde

kullanılmak üzere 4°C de saklanmıştır. Nanopartiküllere yüklenen ekstrakt miktarları ve isimleri Tablo 3.1 de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Nanopartiküllerin formülasyonları.

Nanopartikül İsmi	Ekstrakt Miktarı (mg/ml)
CSNP	0
Seri1 JP/CSNP	10
Seri2 JP/CSNP	5
Seri3 JP/CSNP	2.5

3.2.4. CSNP ve JP/CSNP'lerin partikül boyutu analizi ve zeta potansiyeli ölçümü

Boş ve ceviz endokarp özütü yüklenmiş nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyelleri ve PDI değerlerinin analiz edilmesi amacıyla dinamik ışık saçılımı tekniği ve elektroforetik ışık saçılımı tekniği ile NanoPlus Zeta cihazı kullanılmıştır. Pellet içerisindeki nanopartiküller saf su ile seyreltilerek sonikatör ile 10 dakika homojenize edilmiş ve ölçümlerden önce vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Hazırlanan 1'er ml örnekler analiz için ölçüm küveti içine alınarak nanopartiküllerin boyut ve PDI değerleri DLS tekniği ile ölçülmüştür. Aynı şekilde hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümleri ELS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler her bir örnek için 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. JP/CSNP lerin enkapsülasyon verimlerinin hesaplanması

Ceviz endokarp zarı ekstraktının, kitosan nanoparçacıkları içerisine enkapsülasyon oranlarının belirlenmesi için UV spektrofotometre kullanıldı. Enkapsülasyon oranı, ceviz endokarp özütünün ne kadarının nanoparçacıkların içerisine hapsediğini gösterir.

JP/CSNP'lerin enkapsülasyon oranları denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon oranının belirlenmesi amacıyla öncelikle enkapsüle olmayan ekstrakt miktarı analiz edilmiştir. Bunun için süpernatanttan UV cihazında 280 nm'de absorbans ölçümü alınmıştır. Enkapsüle olan ekstrakt miktarı, kullanılan toplam ekstrakttan süpernatanttaki ekstrakt miktarı çıkarılarak elde edilmiştir [77].

$$\text{Enkapsülasyon oranı} = \frac{(\text{Enkapsüle Olmuş Ekstrakt Miktarı})}{(\text{Total Ekstrakt Miktarı})} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.5.1. Ceviz endokarp zarı ekstraktının kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

Ceviz endokarp zarı ekstraktına ait kalibrasyon eğrisi, farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek hazırlanan ekstraktın 280 nm’de absorbans ölçümlerinin gerçekleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Son konsantrasyonları 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml ve 8 mg/ml olacak şekilde hazırlanan ekstrakt dilüsyonları UV-spektrofotometre cihazında ekstrakta ait max absorbans değeri olan 280 nm’de absorbansının ölçülmesi ile kalibrasyon eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrisi ilaç salım profilinin oluşturulmasında ve enkapsülasyon oranlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.2.6. JP/CSNP ilaç salım testi

Ceviz endokarp zarı ekstraktı enkapsüle edilen kitosan nanopartiküllerinin ilaç salım profilleri, insan vücut ortamı pH değeri taklit edilerek incelenmiştir. 0.01 M değerinde pH 7.4 fosfat tampon solüsyonu hazırlanılarak salım ortamı için kullanılmıştır. Pellet içerisindeki nanopartiküller 10 ml tampon ortamına ilave edilmiştir. 0. saatte ilk ölçüm alınarak sonrasında nanopartiküller tampon içerisinde 37°C de 750 rpm altında manyetik karıştırıcıda karışması için bırakılmıştır. 2 saat aralıklarla 10. saate kadar karışımdan örnekler alınmış olup, alınan örneklerden UV spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Nanoparçacıkların ortamının değişmemesi için her ölçüm sonrasında ölçüm için alınan örnek hacmi kadar tampon ortama ilave edilmiştir.

UV spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda okunan absorbans değerleri ile daha önce elde ettiğimiz kalibrasyon eğrisi denkleminde yararlanılarak ortama salınan ekstrakt miktarı tespit edilmiştir. Salım yüzdesinin hesaplanabilmesi için formül 3.2’den yararlanılmıştır. Nanopartiküllerin salım profilinin oluşturulması için ise tespit edilen salım yüzdeslerinin zamana bağlı olarak grafiği oluşturulmuştur [77].

$$\text{Salım Yüzdesi (\%)} = \frac{(\text{Ortamda Salınan Ekstrakt Miktarı})}{(\text{Total Ekstrakt Miktarı})} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.7. Yapıların fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FT-IR) ile kimyasal yapılarının incelenmesi

Yapıların detaylı analizi için içerdikleri kimyasal bağ yapıları fourier transform infrared spektroskopisi kullanılarak tespit edildi. FTIR kimyasal bağların detaylı analizi için kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. Ceviz zarından elde edilen ekstrakt, TPP çözeltisi, kitosan çözeltisi, boş nanopartiküller ve JP/CSNP'ler kurutularak toz haline getirilerek hazırlanmıştır. Kullanılan malzemelerin aralarındaki etkileşimi belirlemek amacıyla tüm numunelerin ayrı ayrı FTIR spektrum ölçümleri alınmıştır. Numunelerin koyulduğu kısım her seferinde alkol ile temizlenmiştir. Örneklerden bir miktar numune ölçüm yerine koyularak dalga boyu 4000-400 cm^{-1} aralığında spektrumlar alınmıştır. Bu sayede nanopartiküllerin fonksiyonel grupları incelenerek analiz edilmiş, aynı zamanda elde edilen spektrumlar incelenerek ceviz zarı ekstraktının nanoparçacıklar içerisine enkapsüle olup olmaması değerlendirilmiştir.

3.2.8. Nanopartiküllerin SEM analizi

Üretilen boş kitosan nanopartiküllerin ve ekstrakt yüklü nanopartiküllerin yüzey morfolojilerini ve şekillerini detaylı araştırmak için SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) kullanılmıştır. Kurutulan CSNP ve JP/CSNP örnekleri SEM gridleri üzerine karbon bantlar vasıtasıyla yerleştirilmiş ve vakumlandıktan sonra üzeri altın karışımı ile kaplama yapılmıştır. Hazırlanan numunelerin SEM cihazında boyut ve yapıları incelenmiştir.

3.2.9. Antioksidan test

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderimi metodu kolay ve kısa sürede sonuç vermesi sebebiyle antiradikal aktivite tayinlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Aktivite tayini Blois metodu modifiye edilerek uygulandı. DPPH koyu menekşe renginde, 517 nm'de en yüksek absorbans değerini veren bir serbest radikaldir. Yöntem antioksidan madde ile birlikte absorbans değişiminin gözlenerek antioksidan aktivitenin belirlenmesi esasına dayanır [78]. Bu metot ile CSNP ve JP/CSNP lerin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda yükleme yapılan nanopartiküllerin, boş nanopartiküllerin ve yükleme yapılan konsantrasyonlarda hazırlanan (2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) ceviz endokarp ekstraktı örneklerinden 1'er ml alınarak üzerine 4 ml 0,1 mM DPPH eklendi. Kontrol çözeltisi, 4 ml DPPH üzerine 1 ml saf su eklenerek hazırlandı. Son olarak

25°C de yarım saat inkübasyona bırakılan numuneler 517 nm’de UV spektrofotometre ile ölçülmüştür. Serbest radikal süpürme aktivitesi denklem 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$(\% \text{ inhibisyon}) = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100 \quad (3.3)$$

A_{Kontrol}= kontrol absorbansı (517 nm’de)

A_{Örnek}= örnek absorbansı (517 nm’de)

4. DENEYSEL SONUÇLAR

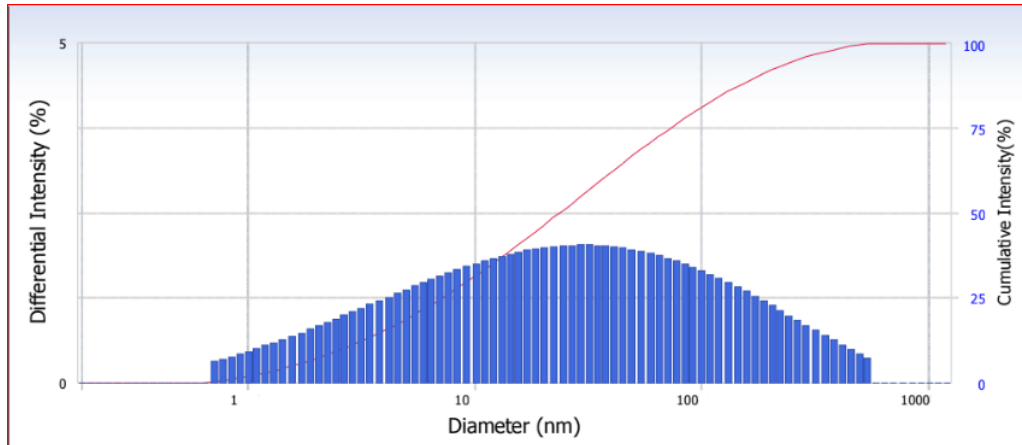
İyonik jelasyon tekniği ile kitosan nanopartikülleri 3 farklı konsantrasyonda ekstrakt yüklemesi yapılarak başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonuçları detaylı olarak aşağıda açıklanmaktadır

4.1. Ceviz Zarı Ekstraktı Yüklenen Kitosan Nanoparçacıklarının ve Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

4.1.1. CSNP ve JP/CSNP' lerin partikül boyutu analizi ve zeta potansiyeli ölçümü

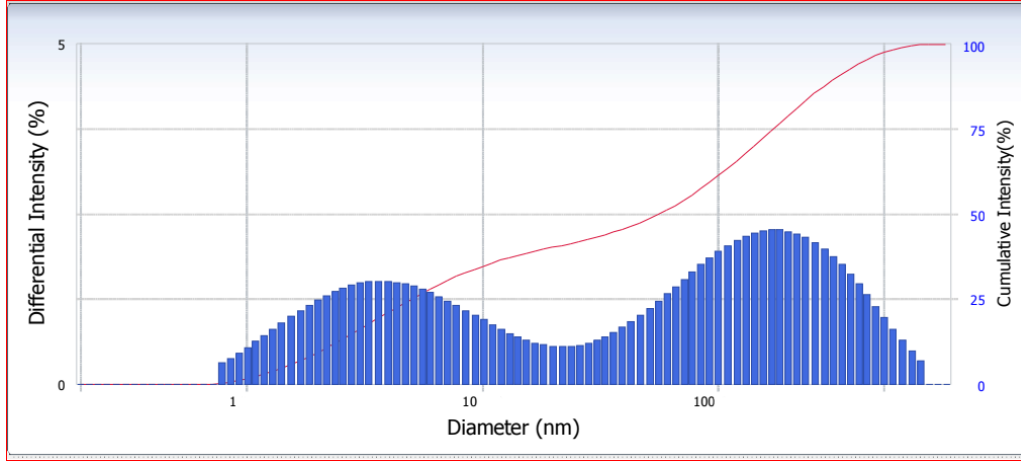
Elde edilen nanoparçacıkların DLS tekniği ile PDI değerleri ve partikül boyutları NanoPlus Zeta cihazı kullanılarak yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümü ise ELS tekniği ile ölçülmüştür. En etkili konsantrasyonu bulmak amacıyla 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan nanoparçacıkların optimizasyonu yapılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları birbiriyle tutarlılık gösterdiğinden nanopartiküllerin boyut ölçümü sonuçları doğrulanmıştır.

Kitosan nanopartiküllerinin boyutları NanoPlus Zeta ile yapılan analiz ile ortalama değer olarak CSNP için 281 nm ve PDI değeri 0.24 olarak bulunmuştur CSNP' ye ait boyut grafiği Şekil 4.1 de gösterilmektedir. Tüm nanopartikül boyut değerleri ve PDI değerleri Tablo 4.1'de verilmektedir.



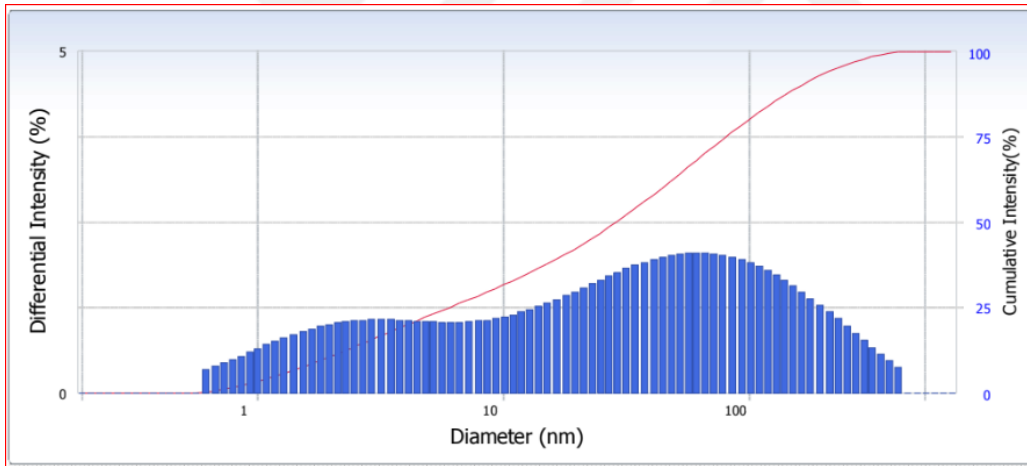
Şekil 4.1. CSNP Boyut Analizi

DLS ile yapılan ölçüm sonucu seri1 JP/CSNP için ortalama nanopartikül boyutu 197 nm ve PDI değeri 0.32 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).



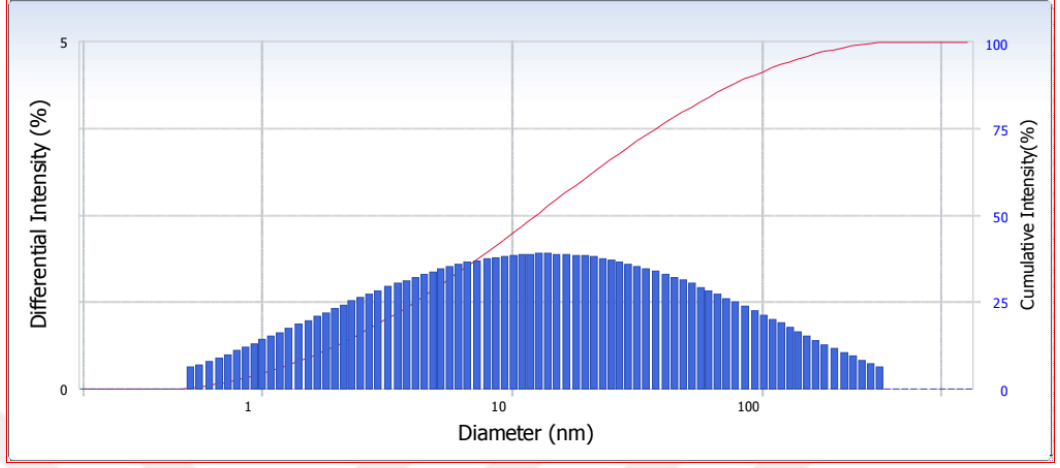
Şekil 4.2. Seri1 JP/CSNP Boyut Analizi

DLS ile yapılan ölçüm sonucunda seri2 JP/CSNP için ortalama nanopartikül boyutu 194 nm ve PDI değeri 0.34 olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Seri2 JP/CSNP Boyut Analizi

DLS ile yapılan ölçüm sonucunda seri3 JP/CSNP için ortalama nanopartikül boyutu 237 nm ve PDI değeri 0.27 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



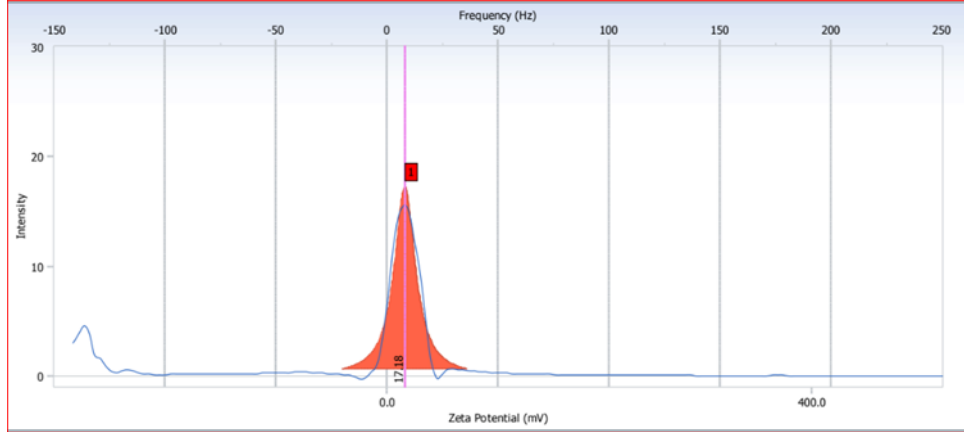
Şekil 4.4. Seri3 JP/CSNP Boyut Analizi

Nanoparçacıklara ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları Tablo 4.1’de ve Şekil 4.5-4.8 de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. CSNP ve JP/CSNP lerin boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri.

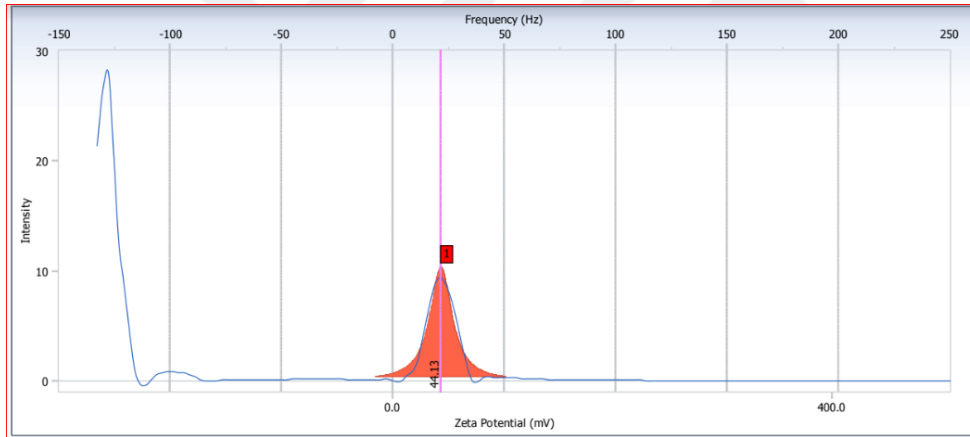
Nanopartikül	Boyut (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	PDI Değeri
CSNP	281	17.18	0.24
Seri 1	197	44.13	0.32
Seri 2	194	38.72	0.34
Seri 3	237	20.41	0.27

Yapılan analiz sonucunda CSNP'ye ait zeta potansiyeli değeri 17.18 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).



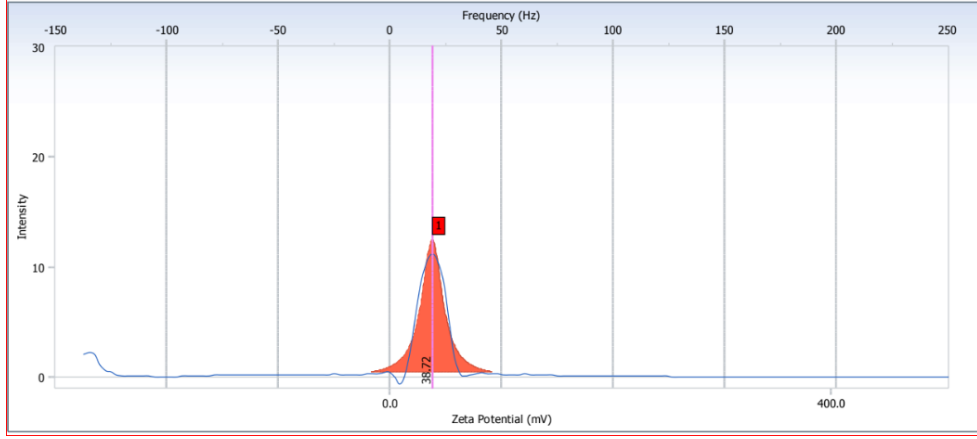
Şekil 4.5. CSNP zeta potansiyeli

ELS ile yapılan ölçüm sonucunda seri1 JP/CSNP için zeta potansiyeli değeri 44.13 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



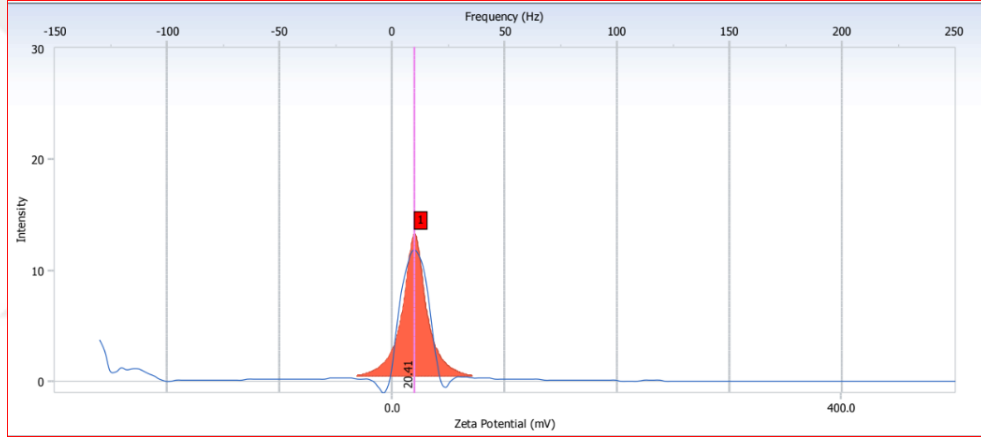
Şekil 4.6. Seri1 JP/CSNP zeta potansiyeli

ELS ile yapılan ölçüm sonucunda seri2 JP/CSNP için zeta potansiyeli değeri 38.72 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Seri2 JP/CSNP zeta potansiyeli

ELS ile yapılan ölçüm sonucunda seri3 JP/CSNP için zeta potansiyeli değeri 20.41 mV olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).

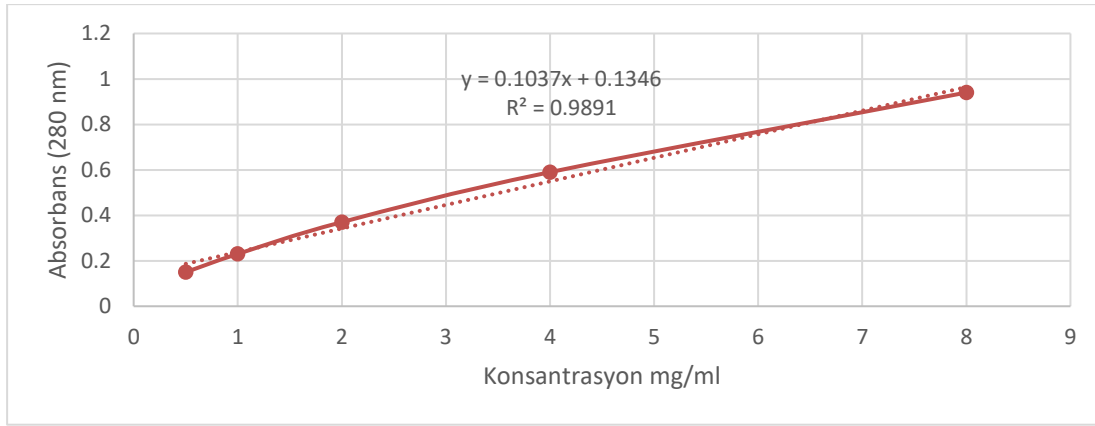


Şekil 4.8. Seri3 JP/CSNP zeta potansiyeli

4.1.2. Ceviz endokarp zarı ekstraktının kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

Ceviz endokarp zarı ekstraktına ait kalibrasyon eğrisi farklı konsantrasyonlarda seyreltilen ekstraktın 280 nm’de absorbans ölçümü ile elde edildi. Son konsantrasyonları 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml ve 8 mg/ml olacak şekilde hazırlanan ekstrakt çözeltileri absorbans ölçümleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Elde edilen eğrinin denklemi ekstraktın nanoparçacıklara enkapsülasyonu ve ilaç salım profilinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Ceviz zarı ekstraktının kalibrasyon eğrisi ve denklemi Şekil 4.9’da gösterilmektedir.



Şekil 4.9. Ceviz endokarp zarına ait kalibrasyon eğrisi

4.1.3. JP/CSNP'lerin enkapsülasyon verimlerinin hesaplanması

Nanopartiküller elde edilirken oluşan süpernatant kısımlarının 280 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisi denkleminde (Denklem 4.1) yerine koyularak enkapsüle olmayan ekstrakt miktarı hesaplanmıştır. Hesaplamalar her bir seri için ayrı ayrı yapılmıştır.

$$y = 0.1037x + 0.1346 \quad (4.1)$$

Hesaplama sonucunda toplam kullanılan ekstrakt miktarından enkapsüle olmayan ekstrakt miktarının çıkarılmasıyla enkapsüle olan ekstrakt miktarları bulunmuştur. Bu değerler denklem 3.1 de yerine koyularak enkapsülasyon oranları seri1 JP/CSNP için %87, seri2 JP/CSNP için % 89 ve seri3 JP/CSNP için %80 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Tablo 4.1 de de verilmektedir.

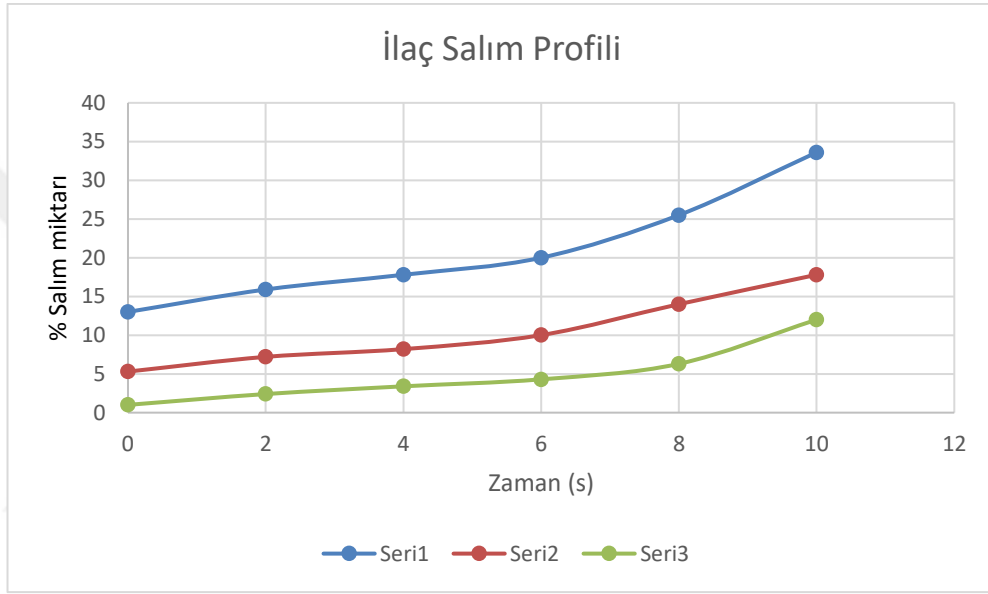
Tablo 4.2. JP/CSNPlerin enkapsülasyon oranları.

Nanopartikül	Enkapsülasyon Oranı (%)
Seri1 JP/CSNP	87
Seri2 JP/CSNP	89
Seri3 JP/CSNP	80

4.1.4. JP/CSNP ilaç salım testi

Ekstrakt yüklü nanopartiküllerin ilaç salım profilleri PBS içerisinde manyetik karıştırıcıda karışan nanopartiküllerin 2 saat aralıklarla 6 kez UV absorbans ölçümleri

alınarak oluşturulmuştur. Absorbans değerleri kullanılarak salım yüzdeleri hesaplanmış ve ardından JP/CSNP lerin zamana bağlı salım grafikleri oluşturulmuştur. Elde edilen salım profili incelendiğinde Ceviz zarı ekstraktı yüklü kitosan nanopartiküllerinin seri1 JP/CSNP için 10. Saat sonunda %33'lük salım oranına ulaştığı gözlemlenmiştir. 10. saatin sonunda diğer nanopartiküller için bu değerler seri2 JP/CSNP için %20, seri3 JP/CSNP için %12 olarak hesaplanmıştır. Nanopartiküllere yüklenen ekstraktın konsantrasyonu ile salım miktarı arasında doğru bir orantı gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.10'da verilmektedir



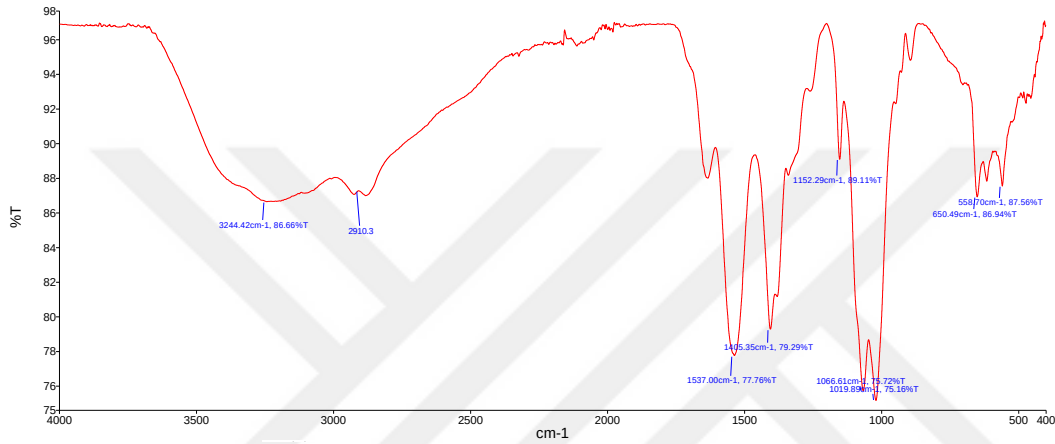
Şekil 4.10. JP/CSNP'lerin ilaç salım profili

4.1.5. Yapıların fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FT-IR) ile kimyasal yapılarının incelenmesi

Ceviz zarı ekstraktının nanoparçacıkların içerisine enkapsülasyonunun görülebilmesi amacıyla formülasyonda kullanılan malzemelerin kimyasal yapıları belirlenmiştir. Bu amaçla ceviz zarı ekstraktı, kitosan, TPP, CSNP ve JP/CSNP'lerin her birinin toz formları FTIR ile analiz edilmiştir. Spektrumlarda oluşan spesifik pikler incelenerek yapıların kimyasal etkileşimleri gözlemlenmiştir. Örneklerin FTIR spektrumları aşağıdaki Şekil 4.11-4.15 de gösterilmektedir.

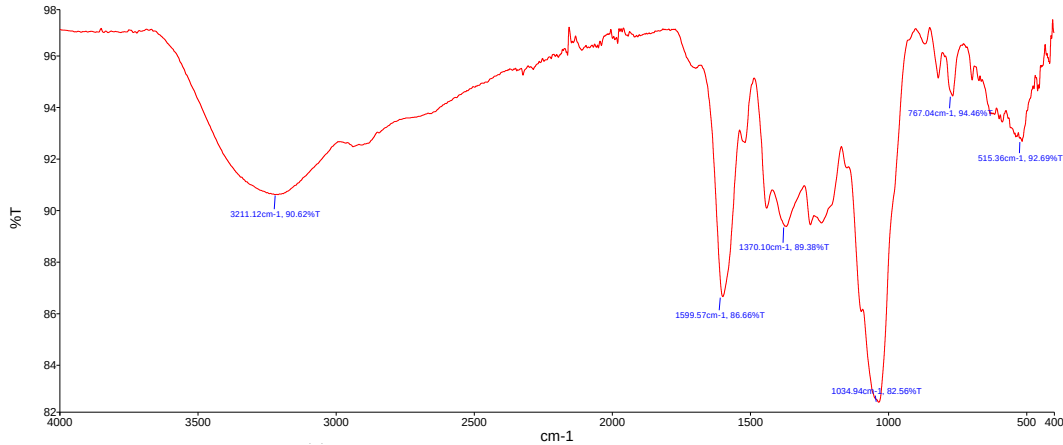
FTIR analiz sonuçları incelendiğinde, kitosan yapısına ait 3244 cm^{-1} de beliren pik hidrojen bağlarından kaynaklanan O-H ve N-H streç bantlarını temsil eder (Şekil 4.11). Spektrumda görülen 2910 cm^{-1} da görülen bant metil veya metilen gruplarının streç titreşimlerine işaret eder. 1537 cm^{-1} de görünen pik aromatik halkaların varlığını veya aromatik C=C streç bantlarına işaret etmektedir. 874 cm^{-1} ve 1200 cm^{-1}

aralığındaki pikler ise C-O-C streç titreşimlerine işaret etmektedir. Bununla beraber CSNP ve JP/CSNP ye ait pikler benzer aralıklarda ve benzer yapılardadır. Kitosan nanopartiküller içerisine bitkisel ekstrakt enkapsülasyonu ile piklerin ve dalga boylarının şiddetinde büyük değişiklik oluşmadığı daha önce yapılan benzer çalışmalarda belirtilmiştir [70]. Ancak ceviz endokarp zarına ait piklerden bazıları JP/CSNP ye ait spektrumda görünmemekte ve kitosana ait bazı pikler spektrumda görünmektedir. Dolayısıyla ekstraktın nanopartiküller içerisine enkapsülasyonunun olduğu anlaşılmaktadır.



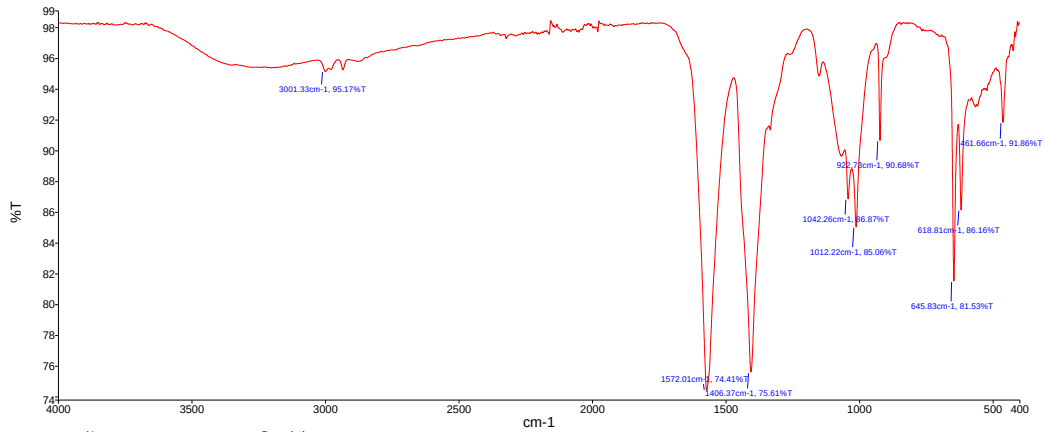
Şekil 4.11. Kitosana ait FTIR spektrumu

Ceviz endokarp zarına ait 1599 cm⁻¹ da bulunan absorpsiyon piki (Şekil 4.12) içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin veya flavonoidlerin varlığını gösterir [71].



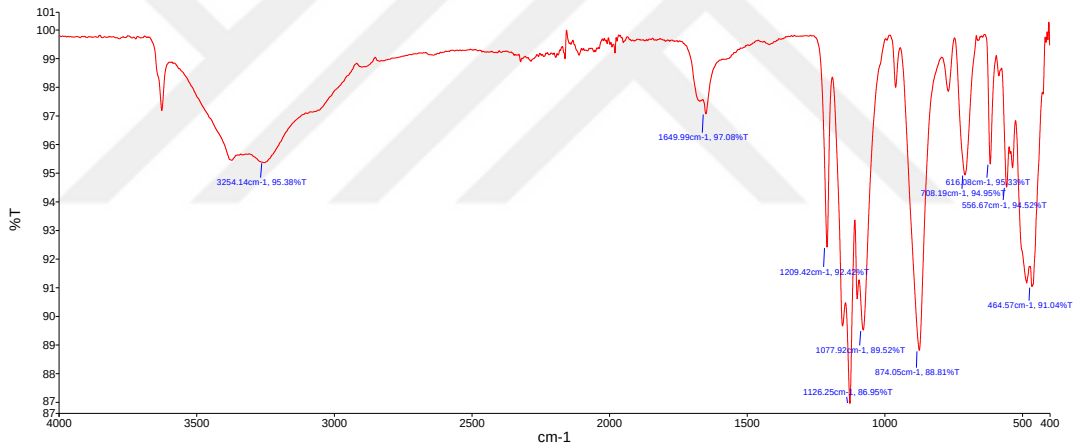
Şekil 4.12. Ceviz endokarp zarına ait FTIR spektrumu

JP/CSNP ye ait spektrum görüntüsü Şekil 4.13'te görülmektedir. Ceviz endokarp zarına ait spesifik piklerin görülmemesi ve kitosana ait piklerin spektrumda belirmesi ile ekstraktın nanopartiküllere yüklendiği görülmektedir.



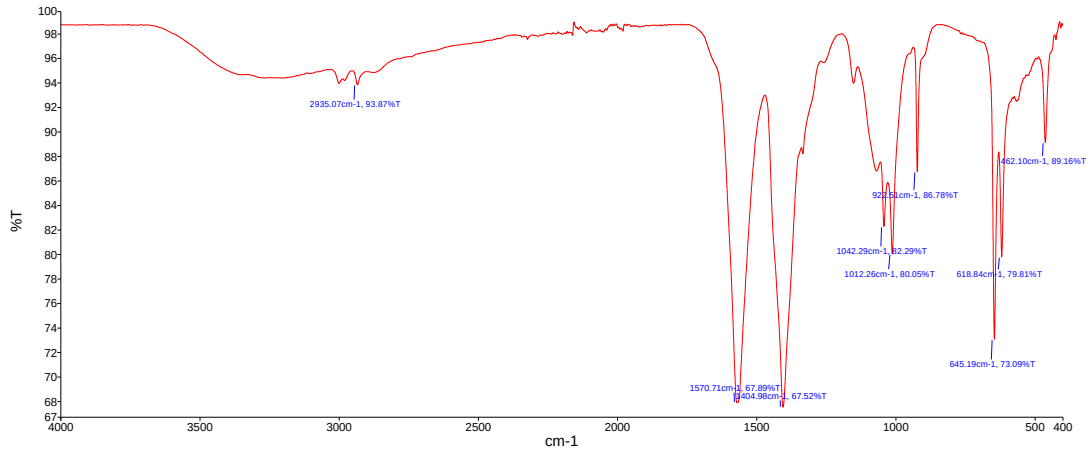
Şekil.4.13. JP/CSNP'ye ait FTIR spektrumu

TPP ye ait spektrumda 1209 cm⁻¹ da ki karakteristik pik yapısındaki P=O streç titreşimlerine karşılık gelmektedir (Şekil 4.14). TPP spektrumundaki 1077 cm⁻¹ ve 874 cm⁻¹'deki bantlar PO₃ gruplarının asimetrik ve simetrik streç titreşiminden ötürü oluşmaktadır [71].



Şekil 4.14. TPP ye ait FTIR spektrumu

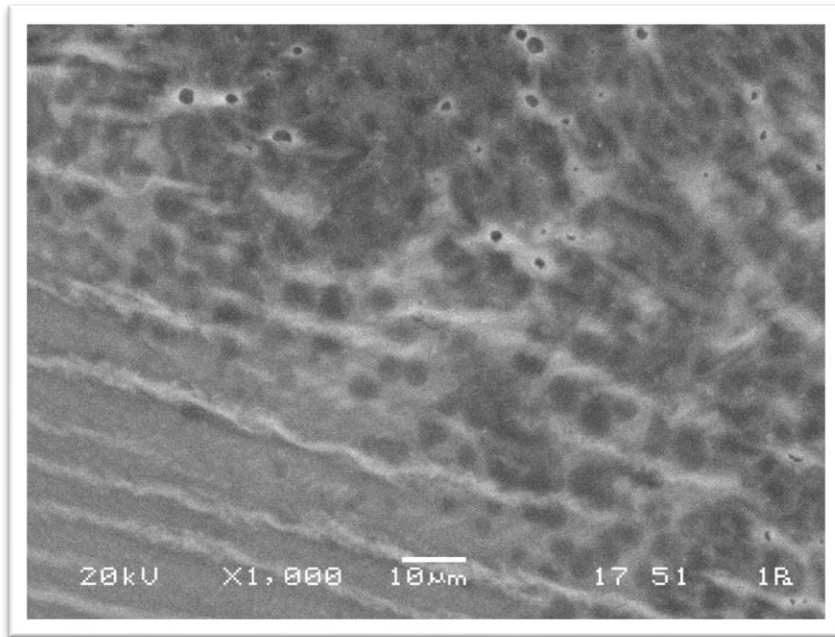
CSNP ye ait FTIR spektrumu Şekil 4.15'de verilmektedir. 1600-1400 cm⁻¹ aralığında görünen pikler protonlanan amino gruplarındaki N-H bağlanma titreşimlerini belirtmektedir.



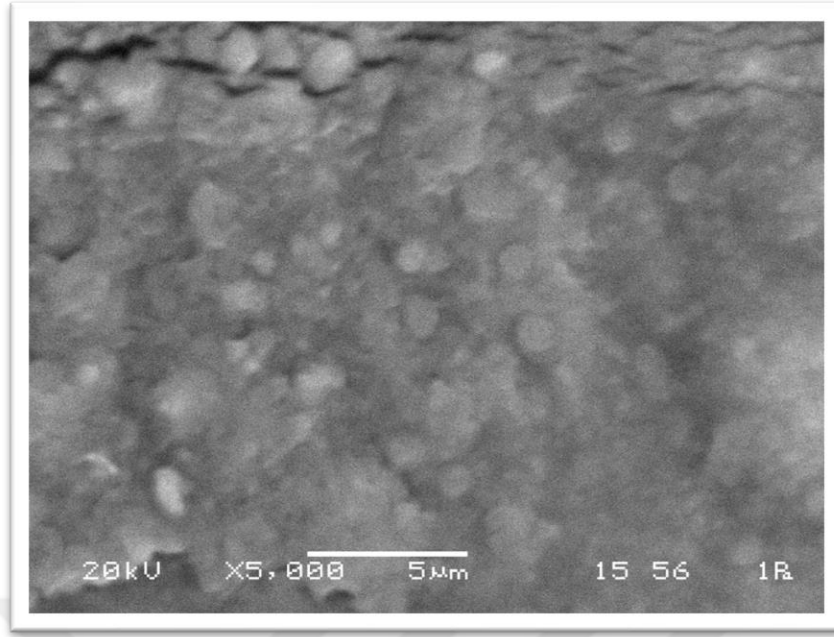
Şekil 4.15. CSNP ye ait FTIR spektrumu

4.1.6. CSNP ve JP/CSNP lerin SEM analizi

SEM ile yapılan görüntüleme parçacıkların morfolojik yapıları hakkında bilgi edinilmektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16-4.17’de verilmektedir. CSNP ve seri2 JP/CSNP’e ait nanopartiküllerin küresel yapılarda oldukları ve benzer büyüklüklerde oldukları görülebilmektedir. Elde edilen görüntülerde parçacık boyutları 150-350 nm arasında değişkenlik göstermektedir. Ayrıca SEM görüntülerinde elde edilen parçacık boyutları Zetasizer ile yapılan ölçüm sonucundaki parçacık boyutlarıyla karşılaştırıldığında SEM görüntülerinin daha büyük görüldüğü gözlemlenmiştir. Buna parçacıklardaki agregasyonun sebep olabileceği düşünülmektedir [79].



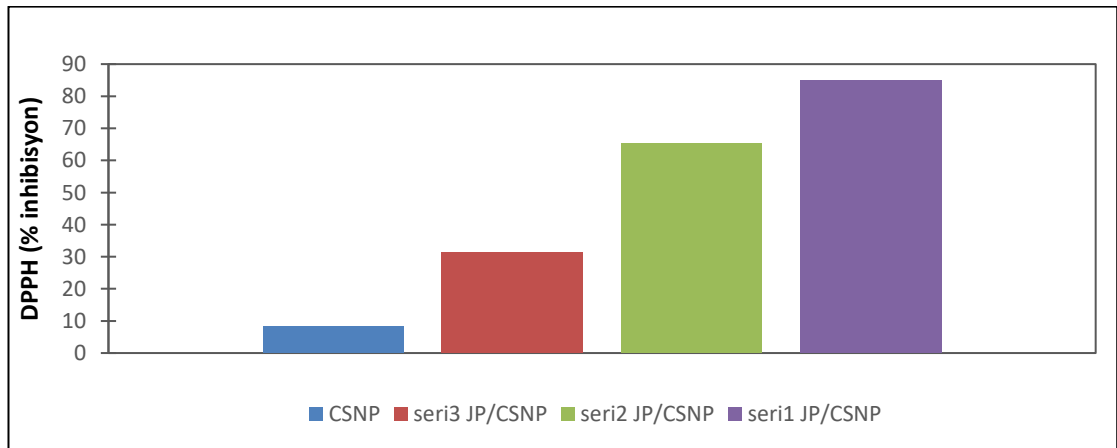
Şekil 4.16. CSNP ye ait SEM görüntüsü



Şekil 4.17. Seri2 JP/CSNP ye ait SEM görüntüsü

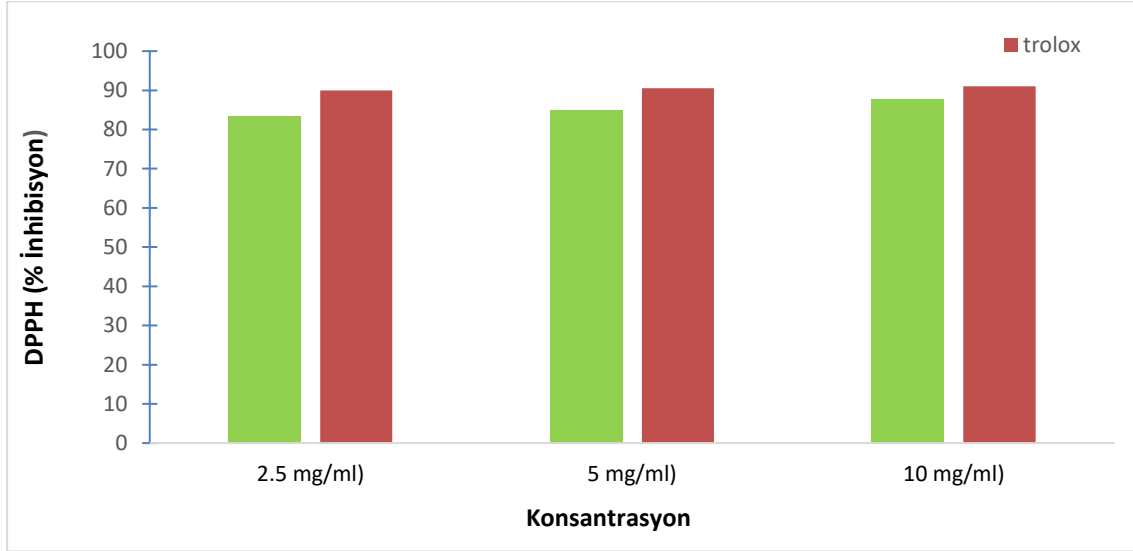
4.1.7. Antioksidan test

CSNP ve JP/CSNP'lerin serbest radikal giderim aktivitesi DPPH ile belirlenmiştir. % inhibisyon oranları denklem 3.3 ile hesaplanarak Şekil 4.18'de verilmiştir. Kitosan nanopartiküller içerisine enkapsüle edilen ekstrakt miktarının artmasıyla inhibisyon aktivitesinin de arttığı gözlemlenmiştir. 10 mg/ml ekstrakt enkapsüle edilen seri1 JP/CSNP ler % 85 inhibisyon değeri gösterirken 2.5 mg/ml ekstrakt enkapsüle edilen seri3 JP/CSNP'ler % 31.2 inhibisyon oranı göstermiştir. Boş olan CSNP'ler ise % 8.7 inhibisyon aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.18. CSNP ve JP/CSNP'lerin DPPH aktivitesi

Ceviz endokarp zarı ekstraktı ile yapılan DPPH giderim aktivitesi ölçüm sonuçları Şekil 4.19’da verilmektedir. 10 mg/ml konsantrasyonu için % 87.7 inhibisyon değeri ölçülürken 5 mg/ml için % 85 ve 2.5 mg/ml için % 83.3 inhibisyon değeri gözlemlenmiştir. Standart olarak kullanılan trolox için inhibisyon aktivitesi tüm konsantrasyonlarda %90-91 aralığında hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. Ceviz endokarp ekstraktının DPPH aktivitesi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ceviz endokarp zarının beyin sağlığına etkileri çeşitli çalışmalarda ortaya koyulmuştur. Temel hedefimiz beyindeki nörodejeneratif rahatsızlıklar için ceviz malzemesinin hedefe taşınımını kolaylaştırmak etkilerini arttırarak yararlanımını yükseltmek ve bu amaç doğrultusunda ilaç salımı profillerinin oluşturularak doğal ilaç olabilme potansiyelini değerlendirmektir.

Tez çalışması kapsamında, ceviz endokarp zarından elde ettiğimiz ekstraktın farklı konsantrasyonlarda (10 mg/ml seri1, 5 mg/ml seri2, 2,5 mg/ml seri3) iyonik jelasyon tekniği ile oluşturulan kitosan nanopartiküller içerisine enkapsüle edilmiştir. Yapılan karakterizasyon işlemleri sonuçlar aşağıda özetlenmektedir:

Ceviz endokarp zarı ekstraktı kitosan nanopartiküllere enkapsüle edilerek JP/CSNP ler ve boş olan CSNP'ler iyonik jelasyon tekniği ile sentezlendi. Üretilen CSNP ve JP/CSNP nanoparçacıklarının zeta potansiyeli, boyut analizleri, enkapsülasyon oranları, ilaç salım profillerinin oluşturulması, SEM ve FTIR analizlerinin yapılması ve antioksidan tayini ile karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

Sentezlenen nanopartiküllerden boyut ve zeta potansiyeli çalışmaları sonucunda CSNP'ler için ortalama 281 nm parçacık boyutu, 17.18 mV zeta potansiyel değeri gözlemlenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda ekstrakt yüklemesi yapılan nanoparçacıklarda seri1 JP/CSNP'ler ortalama 197 nm parçacık boyutu, 44.13 mV zeta potansiyeli, seri2 JP/CSNP'ler de 194 nm parçacık boyutu 38.72 mV zeta potansiyeli ve seri3 JP/CSNP'ler için 237 nm parçacık boyutu, 20.41 mV zeta potansiyeli gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda nanopartiküllerin boyutlarının içerisine yüklenen etken maddenin etkinliğini değiştirerek toksisiteyi etkilediği görülmüştür [72]. Genel olarak terapötik amaçlarla üretilen polimerik nanopartiküllerin 100-400 nm arasında değişen boyutları vardır [73]. Çok büyük nanopartiküller genellikle KBB'yi geçmek için zorluklarla karşılaşır çünkü boyutları nedeniyle sıkı bağlantılardan geçmekte zorlanırlar. Bunun yanı sıra, çok küçük nanopartiküller de KBB'yi geçmek için zorluklarla karşılaşabilir çünkü hızlı bir şekilde kandan uzaklaşabilir veya vücut tarafından temizlenirler. Bu nedenle, 10 ila 200

nanometre arasındaki nanopartikül boyutu, optimum geçirgenliği ve etkili bir ilaç taşıma yeteneğini sağlamak için tercih edilen bir boyut aralığıdır [73].

Polidispersite değeri olarak tanımladığımız PDI partiküllerin homojenitesinin ölçümüdür. Mümkün olduğunca sifıra yakın ve düşük olması beklenilmektedir [72]. Elde ettiğimiz sonuçlarda PDI değerleri incelendiğinde CSNP'ler için 0.24, seri1 JP/CSNP'ler için 0.32, seri2 JP/CSNP'ler için 0.34 ve seri3 JP/CSNP'ler için 0.27 olarak tespit edilmiştir.

Sentezlenen nanopartiküllerin enkapsülasyon oranları hesaplanarak nanopartiküllerin %89-80 değerleri arasında enkapsülasyon oranı gösterdiği bulunmuştur. Enkapsülasyon oranı en yüksek olan seri2 JP/CSNP ler % 89 değerinde enkapsülasyon oranı göstermiştir. Elde edilen bulgular kapsamında CSNP ve JP/CSNP'lerin başarıyla sentezlendiği ve enkapsülasyon oranlarının yeterince yüksek olduğu belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki JP/CSNP'lerin ilaç salım değerleri incelendiğinde 10. saat sonunda seri1 JP/ CSNP'ler % 33 oranında salım gösterdiği, seri2 JP/CSNP'lerin %20 oranında ve seri3 JP/CSNP'lerin % 12 oranında ortama salım yaptığı hesaplanmıştır. Böylelikle uzun süreler endokarp zarı ekstraktının etkinliğinin devam edeceği düşünülmektedir.

Kundu S. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada(2018) irinotekan adlı ilacın kitosan nanopartiküllere enkapsülasyon oranını %60 olarak rapor etmişlerdir. Nanopartiküllerin boyutlarının 150-200 nm arasında olduğunu ve pozitif zeta potansiyeli (+25 mV ile +35 mV arası) gözlemlemişlerdir [74].

Sun ve arkadaşları(2019) rivastigmin adlı ilacın kitosan nanopartiküllere enkapsülasyonu ve karakterizasyonunu içeren çalışmalarında 200-300 nm boyutunda kitosan nanopartiküller üretmişler. Pozitif zeta potansiyeli (+20 mV ile +30 mV arası) gözlemlemişler ve rivastigminin enkapsülasyon oranını % 85 olarak rapor etmişlerdir [75].

Bir diğer çalışmada ise Lin ve ark(2020) ürettikleri kitosan nanopartiküllerine doksetaksel adlı ilacın enkapsülasyon oranını % 65 olarak rapor etmektedir. Yaklaşık 150-200 nm boyutunda kitosan nanopartiküller oluşturmuşlar ve +30 mV ile +40 mV arası pozitif zeta potansiyeli gözlemlemişlerdir [76].

FTIR analizi ile incelenen spektrumlarda ceviz zarına ait ekstraktın aktif grupları ile kitosanın fonksiyonel grupları arasında ters bir etkileşim olmadığı ve ekstraktın nanoparçacıklar içerisine enkapsüle olduğu anlaşılmaktadır.

SEM ile görüntülenen CSNP ve seri2 JP/CSNP sonuçları değerlendirildiğinde partikül yapılarının zamanla birbirine yapışması ve birleşmelerin olmasından ötürü partikül boyutlarının daha yüksek olduğu düşünülmektedir [79]. Zetasizer ile boyut ölçümünde nanopartiküllerin seyreltilerek sonikatörde sonike edilmesiyle partiküllerin birbirine yapışma eğiliminin azaldığı dolayısıyla nanopartikül boyutlarının azaldığı düşünülmektedir. Nanoparçacıklara yüklenen ekstrakt konsantrasyonu ile nanoparçacık boyutu arasında bir ilişki olmadığı anlaşılmaktadır.

Antioksidan aktivitesi sonuçların göre JP/CSNP'lere yüklü ekstrakt konsantrasyonu arttıkça antioksidan etkinliğinin de arttığı ancak ekstraktın ve nanopartiküllerin antioksidan etkileri kıyaslandığında nanokapsülasyonun antioksidan aktiviteyi düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Son olarak uygun maliyetle sentezlenen CSNP ve ceviz endokarp zarının polimer kitosan içerisine enkapsüle edilmesiyle literatürde rastlanmayan bir nanoformülasyon olan JP/CSNP'lerin yüksek antioksidan özellikleri, yeterli enkapsülasyon verimi, uygun kontrollü salımı ve ceviz endokarp zarının daha önceki çalışmalarla kanıtlanmış beyin için terapötik etkileri göz önünde bulundurulduğunda nörodejeneratif rahatsızlıklarda kullanılmak üzere önemli potansiyel olduğu anlaşılmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar tezin hipotezini desteklemektedir. Daha sonraki çalışmalar için nanoparçacıkların sitotoksikite çalışmalarının gerçekleştirilmesi önerilebilir.



KAYNAKLAR

- [1] Keskin, S., Ramakrishnan, S., & Latha, M. S. (2018). Alzheimer hastalığında nanoilaç taşıma sistemleri: Mevcut durum ve gelecekteki yönelimler. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 9(11), 25-35.
- [2] Cao, Y., Mao, X., Sun, C., & Zheng, Z. (2018). Treatment of Alzheimer's disease with nanodrug delivery systems: Advances and future directions. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 7345-7358. <https://doi.org/10.2147/IJN.S182274>
- [3] Shi, Y., Pan, L., Liu, X., & Wang, Y. (2020). Nanoilaç taşıma sistemleri ile Alzheimer hastalığının tedavisi: Mevcut durum ve gelecekteki yönelimler. *Current Alzheimer Research*, 17(5), 412-421. <https://doi.org/10.2174/1567205017666200522114354>
- [4] Goycoolea FM, Argüelles-Monal WM. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Curr Pharmaceutical Distribution* 2011;8(3):207-227. doi:10.2174/156720111795256203
- [5] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biyobozunur polimerik nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemleri. *Kolloidler Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- [6] Ferreira DM, Faria L, Vilas Boas C ve ark. Kontrollü ve hedefli ilaç dağıtımı için kitosan bazlı nanopartiküller. *Nanotıp (Londra)*. 2018;13(8):823-846. doi:10.2217/nnm-2017-0374
- [7] Shah M, Badwaik H, Kherde Y, Jain R, Kadam V. Nanoparticles: a boon for drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *nanomedicine*. 2012;8(2):147-166. doi:10.1016/j.nano.2011.05.016
- [8] Fernandes, J. C., & Eaton, P. (2017). Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kitosan nanoparçacıkları. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 7(8), 243. <https://doi.org/>
- [9] Domínguez-Perles, R., Medina, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 93, 151-184.
- [10] Kuszewski, J. C., & Wong, A. (2019). A Review of the Use of Neuroimaging in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 3(1), 59-71.
- [11] Morris, M. C., Tangney, C. C., Wang, Y., Sacks, F. M., Barnes, L. L., Bennett, D. A., & Aggarwal, N. T. (2015). MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*, 11(9), 1007-1014.
- [12] Akhtar, MJ, Ahamed, M., Alhadlaq, HA, Alshamsan, A., Alrokayan, SA ve Kumar, S. (2018). Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi ve biyomedikal uygulamaları. *Gıda endüstrisi için biyoteknolojideki gelişmeler* (s. 77-91). Springer, Singapur.

- [13] Dizaj, SM, Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, MH ve Adibkia, K. (2015). Kitosan polimerlerinin farmasötik ve biyomedikal uygulamaları. Polimer bilimi serisi A, 57(5), 559-572.
- [14] Jyoti, K. ve Baunthiyal, M. (2016). Nanoteknolojideki son trendler ve sürdürülebilir tarım için uygulamaları. Çevre uluslararası, 89, 24-35.
- [15] Kavitha, K. ve Baker, S. (2017). Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi ve biyomedikal uygulamaları. Green sentezinde, nanoparçacıkların karakterizasyonu ve uygulamaları (s. 265-292). Elsevier.
- [16] Mohan, YM ve Lee, K. (2018). Çevresel ve endüstriyel uygulamalar için mühendislik ligninolitik enzimler. Biyomühendislik, 9(1), 362-372.
- [17] Raman, J. and Rajthilak, C. (2019). Green synthesis and evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles using Eclipta alba leaf extract. Today's Materials: Proceedings, 18, 2391-2396.
- [18] Raman, J. and Rajthilak, C. (2020). Antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles using Eclipta alba leaf extract against gram positive and gram negative bacteria. Today's Materials: Proceedings, 33, 648-653.
- [19] Ruman, U., Haque, S., Arif, S. and Islam, MS (2021). Walnut shell extract encapsulated chitosan nanoparticles as a drug delivery carrier for neurodegenerative diseases. International Journal of Biological Macromolecules, 167, 209-221.
- [20] Thakkar, KN, Mhatre, SS ve Parikh, RY (2010). Metalik nanoparçacıkların biyolojik sentezi. Nanotıp: Nanoteknoloji, Biyoloji ve Tıp, 6(2), 257-262.
- [21] Tiwari, V., Mishra, N., Gadewar, M., and Tiwari, M. (2010). Phytochemical and pharmacological properties of Gymnema sylvestre: an important medicinal plant. Biomedical and environmental sciences: BES, 23(4), 232-239.
- [22] Dennis, J. S. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins and Therapy. Physiol Rev, 81(2), 741-766.
- [23] Özkay, Ü.D., Öztürk, Y., Can, Ö.D. (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg, 18(1), 35-42.
- [24] Saka, E. (2010). Alzheimer hastalığı patofizyolojisi: Deneysel ve Genetik Bulgular. Turkish Journal of Geriatrics, 3, 21-26.
- [25] Özpak, L., Pazarbaşı, A., Keser, N. (2017). Alzheimer Hastalığının Genetiği ve Epigenetiği. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 26(1), 34-49.
- [26] Soininen, H., Kosunen, O., Helisalmi, S., Mannermaa, A., Paljärvi, L., Talasniemi, S., ... & Riekkinen Sr, P. (1995). A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein ε4 allele. *Neuroscience letters*, 187(2), 79-82.
- [27] Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L.T., Brody, E.N. (2015). Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biology*, 4, 340-345.
- [28] Alzheimer's Association. (2021). Alzheimer's Disease and Dementia: Treatments and Therapies. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments>

- [29] Alzheimer's Association. (2021). Alzheimer's Disease Fact Sheet. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers/facts-figures>
- [30] Cummings, J. L., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), 37. <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/alzrt269>
- [31] National Institute on Aging. (2021). Alzheimer's Disease and Related Dementias Research: Progress and Challenges. <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-and-related-dementias-research-progress-and-challenges>
- [32] Vellas, B., Carrillo, M. C., Sampaio, C., Brashear, H. R., Siemers, E., Hampel, H., Schneider, L. S., Weiner, M., Doody, R., Khachaturian, Z., Cedarbaum, J., Grundman, M., Broich, K., Giacobini, E., Dubois, B., & Sperling, R. (2013). Designing drug trials for Alzheimer's disease: what we have learned from the release of the phase III antibody trials: a report from the EU/US/CTAD Task Force. *Alzheimer's & Dementia*, 9(4), 438-444. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3663646/>
- [33] Kuhn, M. A., & Winston, D. (2000). Herbal therapy and supplements: A scientific and traditional approach. Lippincott Williams & Wilkins.
- [34] National Center for Complementary and Integrative Health. (2022). Herbs at a Glance. <https://www.nccih.nih.gov/health/herbsataglance.htm> adresinden 28 Mart 2023 tarihinde alınmıştır.
- [35] Natural Medicines. (2022). Herbs & Supplements. <https://naturalmedicines.therapeuticresearch.com/> adresinden 28 Mart 2023 tarihinde alınmıştır.
- [36] World Health Organization. (2013). WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 3. https://www.who.int/medicines/publications/WHO_Monographs_on_Selecte_d_Medicinal_Plants/Volume_3/en/ adresinden 28 Mart 2023 tarihinde alınmıştır.
- [37] El-Demerdash et al. (2021). Potential natural compounds targeting multiple pathways in Alzheimer's disease: A review. *Journal of Advanced Research*, 30, 121-136.
- [38] Ernst, E. (2000). Risks of herbal medicinal products. *Pharmaceutical Journal*, 264(7087), 757-758.
- [39] Bolling BW, McKay DL, Blumberg JB. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(1):117-123.
- [40] Rıdvan T, Fırat K. Yararlı Gıdalar: Ceviz. *TAF Prev Med Bull*. 2011;10(1):85-92.
- [41] Hasanloo T, Ramakrishnan Y, Omidian K, Sahebkar A. Medicinal properties of walnut (*Juglans regia* L.): Recent advances and challenges for health promotion. *J Cell Physiol*. 2019 Nov;234(11):16255-16263. doi: 10.1002/jcp.28347. Epub 2019 May 17. PMID: 31001897.

- [42] Ha, M. J., Lee, J. H., & Kim, J. H. (2016). Potential health benefits of natural bioactive compounds from the walnut (*Juglans regia* L.). *Nutrition Research and Practice*, 10(6), 589-594.
- [43] Patil, B. S., & Jayaprakasha, G. K. (2009). Cholesterol-lowering and type 2 diabetes-reducing potential of nutraceuticals from walnut (*Juglans regia* L.) kernel and walnut-enclosed fruits. *Journal of Food Science*, 74(7), R113-R120
- [44] Mokhtari, M., Ebrahimzadeh, M. A., & Fathi, H. (2015). Chemical composition of walnut (*Juglans regia* L.) endocarp in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 14(3), 899.
- [45] Alasalvar, C., Amaral, J. S., & Shahidi, F. (2013). Functional constituents of walnut. In *Walnut and walnut oil* (pp. 1-18). AOCS Press.
- [46] Krishnan, S., & Intahphuak, S. (2014). Bioactive compounds in underutilized tropical fruits and nuts. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 89-96.
- [47] Muthaiyah, B., Essa, M. M., Lee, M., Chauhan, V., & Kaur, K. (2014). Cholinergic and dopaminergic modulation of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of neurodegenerative diseases*, 2014.
- [48] Kim, J., Lee, H., Lee, J., Oh, S., Jeong, Y., & Lee, K. (2019). Neuroprotective effects of walnut extract (*Juglans regia* L.) and its constituents against oxidative stress-induced cytotoxicity in amyloid β -protein-induced rat cortical neurons. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(11), 3165-3173.
- [49] Wu, S., Zhang, Y., Zhang, X., Zhou, L., Zhou, Y., Xie, Y., ... & Xu, B. (2020). Extraction optimization, characterization and biological activities of polysaccharides from walnut endocarp. *International journal of biological macromolecules*, 164, 476-484.
- [50] Li, Y., Li, X., Cheng, S., Nie, S., Zhang, J., Niu, M., ... & Wang, C. (2021). Walnut Endocarp Extracts Alleviate Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction in APP/PS1 Mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(9), 2759-2771
- [51] Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007;12(1-2):54-61.
- [52] Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*. 2003;61:39-78.
- [53] Kumar P, Kakkar V, Dutta R. Strategies for Brain Targeting of Nanoparticles. *J Drug Target*. 2018;26(5-6):382-391.
- [54] Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. *Int J Pharm*. 2007;331(1):1-10. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.010
- [55] Gao H, Pang Z, Jiang X. Targeted delivery of nano-therapeutics for major disorders of the central nervous system. *Pharm Res*. 2013;30(10):2485-2498. doi:10.1007/s11095-013-1109-8
- [56] Sarmiento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr Polym*. 2006;66(1):1-7. doi:10.1016/j.carbpol.2006.02.011

- [57] Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(7):957-972. doi:10.1517/17425247.2013.789034
- [58] Torchilin, V. P. (2008). Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 60(10), 1171-1177.
- [59] Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- [60] Kesharwani, P., & Gajbhiye, V. (2015). Jain SK. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials*, 33(27), 7138-7150.
- [61] Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical research*, 33(10), 2373-2387.
- [62] Khor E, Lim LY (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13), 2339-2349.
- [63] Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H, (2010). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 28(1), 1-8.
- [64] Rinaudo M (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- [65] Yang, J., Tian, F., Wang, Z., Wang, Q., & Zeng, Y. J. (2014). Neuroprotective effects of chitosan oligosaccharides on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28(5), 214-220.
- [66] Shariatnia Z, Jalali SAH, Zohuriaan-Mehr MJ. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles by tripolyphosphate cross-linking with the aid of sodium lauryl sulfate. *Carbohydr Polym.* 2010;82(3): 933-937. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.019
- [67] Tan, S., Gao, B., Tao, Y., & Chen, J. (2020). Factors influencing the preparation of chitosan nanoparticles: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 442-454.
- [68] M. Yadav, P. Goswami, K. Paritosh, M. Kumar, N. Pareek, and V. Vivekanand, "Seafood waste: A source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 6, p. 8, 2019.
- [69] R. C. Choudhary, R. Kumaraswamy, S. Kumari, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, et al., "Synthesis, characterization, and application of chitosan nanomaterials loaded with zinc and copper for plant growth and protection," in *Nanotechnology*, ed: Springer, 2017, pp. 227-247.
- [70] Keawchaoon, L.ve Yoksan, R., (2011). "Preparation, Characterization and in vitro Release Study of Carvacrol-Loaded Chitosan Nanoparticles", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1): 163-171.

- [71] Saleem M, Sultan S, Ullah R, Ahmad B. Walnut (*Juglans regia* L.) Husk: A Review of its Phytochemical Composition, Bioactivity, and Pharmacological Potential. *Phytother Res.* 2020;34(3):526-543. doi:10.1002/ptr.6567
- [72] Pardridge WM. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2005;2(1):3-14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
- [73] Seo JH, Rahimian R, Van Hoecke M, et al. The blood-brain barrier is preserved after targeted neuronal deletion of the transcription factor Npas4. *J Neurosci.* 2018;38(44):9513-9527. doi:10.1523/JNEUROSCI.0499-18.2018
- [74] Kundu, S., Bhattacharya, D., Ghosh, S., & Kundu, S. C. (2018). Dextrin conjugated hybrid nanoparticles of chitosan, irinotecan and gold nanoparticles: synergistic anticancer effect and targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 196, 274-283.
- [75] Sun, L., Wu, P., Lv, J., Liu, Y., Yang, X., Yang, Y., ... & Chen, X. (2019). Chitosan-based nanoparticles for brain-targeted drug delivery: Preparation, characterization and in vivo studies. *Current Drug Delivery*, 16(5), 438-447.
- [76] Lin, C. J., Chu, F. H., Wang, Y. T., Huang, C. S., Lu, F. J., & Huang, Y. B. (2020). Docetaxel-loaded core-shell chitosan nanoparticles for overcoming multidrug resistance in breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 192, 111029.
- [77] G. Deepa, K. Sivakumar, and T. Sajeewan, "Molecular simulation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for the controlled release of anticancer drug cytarabine against solid tumours," *3 Biotech*, vol. 8, p. 493, 2018.
- [78] Blois M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199–1200.
- [79] Abreu, F.O. M.S., Oliveira, E.F., Paula, H.C.B. ve de Paula, R.C.M., (2012). "Chitosan/Cashew Gum Nanogels for Essential Oil Encapsulation", *Carbohydrate Polymers*, 89(4): 1277-1282.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad :Hatice SERİN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** :2020, Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği
- **Yüksek lisans** : 2023, Sakarya Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER:

Serin H., Arabacı G.(2023, 4-6 April). Ceviz Bitki Ekstraktı Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. *2nd International Conference on Engineering, Natural and Social Sciences*, Konya, Turkey