



**NIYOZOMAL TAŞIMA SİSTEMİ İLE HÜCRELERE
AKTARILAN DOĞAL TERPENLERİN DENEYSEL
PARKİNSON MODELİNDE NÖRON KORUYUCU
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Sena ÖNER ÇAĞLAR

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2026

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



NİYOZOMAL TAŞIMA SİSTEMİ İLE HÜCRELERE AKTARILAN DOĞAL
TERPENLERİN DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE NÖRON
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sena ÖNER ÇAĞLAR

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

ERZURUM, 2026

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

NİYOZOMAL TAŞIMA SİSTEMİ İLE HÜCRELERE AKTARILAN
DOĞAL TERPENLERİN DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE NÖRON
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN danışmanlığında Sena ÖNER ÇAĞLAR tarafından hazırlanan bu çalışma 30.01.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Mehmet Enes Arslan <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	<i>İmza</i>
Üye:	Doç. Dr. Özlem ÖZDEMİR TOZLU <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	<i>İmza</i>
Üye:	Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	<i>İmza</i>

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. İlker KAZAZ
Enstitü Müdürü

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ VE ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etik ilkelere uygun davrandığımı ve tezin hazırlanması sürecinde üretken yapay zekâ programlarından, içeriğin ve sonuçların özgünlük sorumluluğunun tarafıma ait olması ve çalışmanın bilimsel niteliğini etkilemeyecek düzeyde, yalnızca yardımcı bir araç olarak sınırlı düzeyde destek alındığını beyan ederim.

30.01.2026

İmzası

Sena ÖNER ÇAĞLAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm bilgi, tecrübe ve yetkinliğini benimle paylaşan, her zaman yol gösterici olan, tez çalışmamın her aşamasında bana güvenen ve inanan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN 'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek tez çalışmamda gerekse diğer tüm bilimsel faaliyetlerimde daima yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özge ÇAĞLAR YILDIRIM'a,

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, aynı laboratuvarı ve çalışma ortamını paylaştığım Ceren KARAGÖZ ve desteğini her zaman hissettiren sevgili arkadaşlarım Sümeyye ÖZTÜRK EREN ve Elif ARSLAN'a,

2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans eğitimim boyunca tarafıma maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na

Eğitim hayatım boyunca sabırla beni bekleyen ve destekleyen ailem Seda-Sevgi ÖNER ve kardeşlerim Sima-Seçkin ÖNER'e

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri beni her zaman destekleyen, kendime ve bilime olan inancımı arttırmamı sağlayan, fikirleriyle ufkumu açan yol arkadaşım Sercan ÇAĞLAR'a hep yanımda olduğunu hissettirdiği için teşekkür ederim.

Sena ÖNER ÇAĞLAR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ NİYOZOMAL TAŞIMA SİSTEMİ İLE HÜCRELERE AKTARILAN DOĞAL TERPENLERİN DENEYSEL PARKİNSON MODELİNDE NÖRON KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Sena ÖNER ÇAĞLAR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Parkinson hastalığı (PH), substantia nigra pars compacta bölgesindeki dopaminerjik nöronların ilerleyici kaybı ile karakterize edilen, prevalansı 65 yaş üzeri bireylerde %2–3 düzeyine ulaşan ve günümüzde küratif tedavisi bulunmayan bir nörodejeneratif hastalıktır. Mevcut tedavi yaklaşımları ağırlıklı olarak semptom kontrolüne yönelik olup, hastalığın patogenezinde rol oynayan oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve protein agregasyonu gibi mekanizmalar üzerinde sınırlı etkiye sahiptir. Bu nedenle, nöroprotektif ajanların geliştirilmesi ve hedef hücrelere etkin şekilde taşınması büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, doğal kaynaklı terpenlerin niyozomal taşıyıcı sistemler aracılığıyla hücrelere aktarımının, deneysel Parkinson hastalığı in vitro modelinde nöron koruyucu etkilerinin nicel olarak değerlendirilmesidir. Çalışmada SH-SY5Y hücre hattı dopaminerjik fenotipe farklılaştırılmış ve IC 50 konsantrasyonunda MPP⁺ uygulaması ile nörotoksisite modeli oluşturulmuştur. MPP⁺ uygulaması sonucunda hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla %100'den %42,6 ± 3,8 düzeyine düşmüştür (p < 0,001). Doğal terpenlerin serbest formda uygulanması hücre canlılığını %61,4 ± 4,2 seviyesine yükseltirken, aynı terpenlerin niyozomal enkapsülasyon sonrası uygulanması canlılığı %78,9 ± 3,1 düzeyine çıkarmıştır. Niyozomal terpen grubu ile MPP⁺ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p < 0,001). Oksidatif stres parametrelerinde, MPP⁺ uygulaması TOS düzeyini 18,6 ± 1,9 µmol H₂O₂ eşdeğeri/L seviyesine yükseltirken, niyozomal terpen uygulaması bu değeri 9,2 ± 1,3 seviyesine düşürmüştür (p < 0,01). Aynı şekilde TAC düzeyi MPP⁺ grubunda 0,82 ± 0,07 mmol Trolox eşdeğeri/L iken, niyozomal terpen grubunda 1,74 ± 0,11 seviyesine yükselmiştir (p < 0,001). Sonuç olarak, niyozomal taşıyıcı sistemler ile hücrelere aktarılan doğal terpenlerin, serbest formlarına kıyasla hücre içi biyoyararlanımının arttığı, MPP⁺ kaynaklı nöronal sitotoksitesiyi anlamlı düzeyde azalttığı ve oksidatif stres parametrelerini baskıladığı gösterilmiştir. Bu bulgular, niyozom-temelli doğal bileşiklerin Parkinson hastalığı için potansiyel yeni bir nöroprotektif nano-terapötik yaklaşım sunabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Parkinson hastalığı, Doğal terpenler, Niyozom, Nano ilaç taşıma sistemleri, Kan beyin bariyeri

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF NATURAL TERPENES DELIVERED TO CELLS VIA A NIOSOMAL TRANSPORT SYSTEM IN AN EXPERIMENTAL PARKINSON'S DISEASE MODEL

Sena ÖNER ÇAĞLAR

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology And Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, with a prevalence reaching 2–3% in individuals over the age of 65, and for which no curative treatment is currently available. Existing therapeutic approaches are primarily aimed at symptomatic management and have limited effects on pathogenic mechanisms such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and protein aggregation. Therefore, the development of neuroprotective agents and their effective delivery to target cells are of great importance. The aim of this thesis is to quantitatively evaluate the neuroprotective effects of naturally derived terpenes delivered to cells via niosomal carrier systems in an experimental in vitro model of Parkinson's disease. In this study, the SH-SY5Y cell line was differentiated into a dopaminergic phenotype, and a neurotoxicity model was established by the application of MPP⁺ at its IC₅₀ concentration. As a result of MPP⁺ treatment, cell viability decreased from 100% in the control group to 42.6 ± 3.8% (p < 0.001). While the application of natural terpenes in their free form increased cell viability to 61.4 ± 4.2%, the application of the same terpenes following niosomal encapsulation elevated viability to 78.9 ± 3.1%. A statistically significant difference was observed between the niosomal terpene group and the MPP⁺ group (p < 0.001). In terms of oxidative stress parameters, MPP⁺ treatment increased total oxidant status (TOS) to 18.6 ± 1.9 μmol H₂O₂ equivalent/L, whereas niosomal terpene treatment reduced this value to 9.2 ± 1.3 (p < 0.01). Similarly, total antioxidant capacity (TAC) was 0.82 ± 0.07 mmol Trolox equivalent/L in the MPP⁺ group and increased to 1.74 ± 0.11 in the niosomal terpene group (p < 0.001). In conclusion, it was demonstrated that natural terpenes delivered to cells via niosomal carrier systems exhibit increased intracellular bioavailability compared to their free forms, significantly reduce MPP⁺-induced neuronal cytotoxicity, and suppress oxidative stress parameters. These findings indicate that niosome-based natural compounds may offer a potential novel neuroprotective nano-therapeutic approach for Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson's disease, Natural terpenes, Niosomes, Nano drug delivery systems, Blood-brain barrier

İÇİNDEKİLER

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ VE ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Parkinson Hastalığı.....	1
1.1.1. Yaygınlık Oranları.....	1
1.1.2. Teşhis Kriterleri	2
1.2. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi.....	3
1.2.1. Genetik Faktörler	3
1.2.2. Çevresel Faktörler.....	4
1.2.3. Yaşlanma ve Parkinson Hastalığı	5
1.3. Parkinson Hastalığının Patogenezi	5
1.3.1. Oksidatif Stres	6
1.3.2. Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS)	7
1.3.3. Mikroglial Aktivasyon ve İnflamasyon	8
1.4 Parkinson Hastalığı Çalışmalarında Kullanılan İn Vitro Modeller	8
1.4.1. Nörotoksik Bileşikler.....	9
1.4.2. Sentetik Sinükleine Maruz Kalma	10
1.4.3 Genetik Modifikasyon	10
1.5. Nanoteknoloji	11
1.5.1. Nanoteknolojinin Tarihçesi	13
1.5.2. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	14
1.6. İlaç Taşıma Sistemleri	16
1.7. Nano İlaç Taşıma ve Salınım Sistemleri	16
1.7.1. Kontrollü İlaç Dağıtım Sistemleri	17
1.7.2. Polimerik Nanopartiküller	19

1.7.3. Dendrimerler.....	19
1.7.4. Nanokristaller	19
1.7.5. Silika Nanopartiküller.....	20
1.7.6. Metalik Nanopartiküller.....	20
1.7.7. Metal Oksitler	20
1.7.8. Karbon Bazlı Nanopartiküller	20
1.7.9. Lipid Nanopartiküller	21
1.7.10. Lipozom.....	21
1.8. Niyozom	22
1.8.1. Niyozomların Avantajları	24
1.8.2. Niyozom Hazırlama Yöntemleri.....	25
1.9. Terpenler	29
1.9.1. Seskiterpen.....	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	34
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Materyaller	37
3.1.1. Kimyasallar.....	37
3.1.2. Cihazlar.....	38
3.1.3. Kullanılan Hücre Hatları.....	38
3.2. Metot	39
3.2.1. Niyozomal Nano Partiküllerin Hazırlanması.....	39
3.2.2. Karakterizasyon	39
3.2.3. İn vitro toksisite çalışması	39
3.2.4 Niyozomal nanopartiküllere doğal terpenlerin yüklenmesi ve salınım potansiyellerinin değerlendirilmesi	41
3.2.5 İlaç yüklü nano taşıyıcı sistemin in vitro parkinson hastalık modelinde etkinliğinin değerlendirilmesi	41
3.3 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	46
4.1 Niyozomal Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyon	46
4.2. İlaç Enkapsülasyonu ve Salınım.....	48
4.3. İn vitro Toksisite Çalışma	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
5.1. Sonuç	65

5.2. Öneriler.....	66
KAYNAKÇA	68



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi	37
Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan cihazların marka ve modeline ait bilgiler	38
Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan hücre hatları cihazları ve katalog numarası	38
Tablo 4.1. F1-F4 için PDI değerleri ZP enerjisi	48
Tablo 4.2. Olgun nöron hücre kültürüne farklılaştırılmış SHSY-5Y hücrelerinin akış sitometrisi analizi ile belirlenen hücre döngüsü	52
Tablo 4.2. Tüm deney gruplarında Hoechst 33258 boyamasıyla değerlendirilen nükleer anormalliklerin (mikronükleus (MN), loblu çekirdekler (LB), çentikli çekirdekler (NC) ve ortalama nükleer anormallik indeksi (NAI) dahil) kantitatif analizi.	61
Tablo 4.3. Deneysel Parkinson hastalığına uygulanan terpenlerin Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres Durum (TOD) üzerine etkilerinin 24 saat sonunda incelenmesi. Üslü harfler gruplar arasında anlamlı farklılık olma durumunu ifade eder (a, b, c, d).....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Parkinson hastalığının etiyolojisi.....	6
Şekil 1.2. Parkinson hastalığının patogenezi	8
Şekil 1.3. Parkinson hastalığında in vitro modeller	11
Şekil 1.4. Nanopartikül sentezi özetleyen diyagram.....	13
Şekil 1.5. Nanoteknolojinin bazı uygulama alanları	15
Şekil 1.6. Bazı nano dağıtım sistemlerinin şematik yapıları.....	22
Şekil 1.7. Niyozomların boyutlarına göre sınıflandırılması	23
Şekil 1.8. Lipit tabaka hidrasyon yöntemi ile niyozom oluşumu	29
Şekil 1.9. Farnesen molekülünün kimyasal yapısı.....	32
Şekil 1.10. Terpinolen molekülünün kimyasal yapısı.....	32
Şekil 1.11. α -Pinen molekülünün kimyasal yapısı.....	33
Şekil 4.1. İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomlara ait SEM mikrografları. 240.000× büyütmede elde edilen SEM görüntüsü (ölçek çubuğu: 500 nm) .	47
Şekil 4.2. İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomlara ait SEM mikrografları. 120.000× büyütmede kaydedilen SEM mikrografı (ölçek çubuğu: 1 μ m)..	47
Şekil 4.3. İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomlara yüklenen Karvon, Terpinolen, Farnesen, α -Pinen ve L-DOPA için ilaç yükleme oranları	49
Şekil 4.4. Niyozomlara yüklenen Karvon, Terpinolen, Farnesen, α -Pinen ve L- DOPA'nın 48 saatlik in vitro kümülatif salım (%) profilleri	50
Şekil 4.5. Retinoik asit uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaştırılması. A. 4x büyütme B. 20x büyütme	52
Şekil 4.6. a. Farnesen ve Terpinolen, b. α -Pinen ve Karvon'un farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı (%) üzerine etkileri	54
Şekil 4.7. A. Farnesen–Terpinolen, B. α -Pinen–Karvon hücre canlılığı analizleri	56
Şekil 4.8. A. Niyozomal Farnesen–Terpinolen, B. Niyozomal α -Pinen–Karvon'un deneysel Parkinson modelinde 24 saat sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri	57
Şekil 4.9. A.Serbest ve B. Niyozomal L-DOPA hücre canlılığı analizleri.....	58
Şekil 4.10. Niyozomal Farnesen, Terpinolen, α -Pinen ve Karvon'un (50 μ g/mL) deneysel Parkinson modelinde 24 saat sonrası hücre canlılığının akış sitometrik analizi	59

- Şekil 4.11.** MPP⁺ indüklenmiş in vitro Parkinson modelinde niyozomal bileşiklerin (50 µg/mL) genotoksisite analizi (20×). A–E: Tedavi grupları; F: MPP⁺ kontrol 61
- Şekil.4.12.** Farnesen, Terpinolen, Alfa pinen, Karvon ve L-DOPA yüklü niyozomların in vitro kan-beyin bariyeri geçirgenlik testi kullanılarak Parkinson hastalığı modelinde hücre canlılığı üzerindeki nöroprotektif etkisi..... 63



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CPP	Kritik Paketleme Parametresi
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HLB	Hidrofilik-Lipofilik Denge
KBB	Kan Beyin Bariyeri
MAO-B	Monominoksidaz tip B
mM	Milimolar
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridin
mtDNA	Mitokondriyal DNA
PDI	Poli Dağılım İndeksi
PH	Parkinson Hastalığı
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SLN	Katı Lipit Nanopartikülleri
UPS	Ubiquitin-Proteazomal Sistem
ZP	Zeta Potansiyel
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°	Derece

1. GİRİŞ

1.1. Parkinson Hastalığı

James Parkinson'un "Titremeli Felç" üzerine yazdığı makalesinin üzerinden 2 asır geçmiş olmasına rağmen, klinik gözlemleri büyük ölçüde doğruluğunu korumuştur. Parkinson hastalığı, yalnızca bir hareket bozukluğu değil aynı zamanda, bilişsel bozukluk, otonomik disfonksiyon, depresyon, koku alma duyusunun azalması gibi birçok motor semptom olmayan belirtinin dahil olduğu daha kapsamlı bir tabloyla değerlendirilmektedir. Bu motor semptom olmayan özelliklerin, hastalığın seyrine önemli bir katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Parkinson hastalığı semptomlarının görülmesinde nörofizyolojik ve moleküler mekanizmaların bozulmasının etkili olduğu görülmüş ve bu mekanizmaların anlaşılmasında çeşitli ilerlemeler kaydedilmiştir. 1970'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanımı onaylanan L-DOPA, amantadin, monominoksidaz tip B(MAO-B) inhibitörleri ya da dopamin antagonistleri ve bunların türevleri geliştirilmişse de tüm bunlar semptomatik tedaviyi hedefler. Parkinson hastalığının henüz kesinleşmiş bir tedavisi yoktur. Mevcut tedavi yöntemleri hastalığı yavaşlatmak ve tedavi etmekten ziyade semptomları iyileştirmeye yöneliktir. Tüm bunlar göz önüne alındığında hastalıktan etkilenmiş bireylerin yaşam kalitesini arttırmak hem de küresel boyuttaki finansal yükü azaltmak için yeni tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Balestrino & Schapira, 2020).

1.1.1. Yaygınlık Oranları

Parkinson hastalığı 65 yaş ve üzeri bireylerin %2-3'ünü etkileyen, beynin substantia nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ile tanımlanan, en yaygın ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Parkinson hastalığının yaşa bağlı görülme oranı ülkemizde 111/100.000 iken dünya genelinde 10 milyondan fazla insana Parkinson hastalığı teşhisi konulmaktadır (Greenland & Barker, 2018). Parkinson hastalığı 50 yaşından önce nadir görülürken 60 ila 90 yaş arasında görülme oranı 5-10 kat artmaktadır. Parkinson hastalığı teşhisi konmuş bireylerin sayısının 2005 ile 2030 yılları arasında 2 katına çıkması beklenmektedir (Tolosa vd., 2021). Parkinson hastalığı çoğu popülasyonda erkeklerde kadınlardan 2 kat daha yaygındır. Parkinson hastalığının

görülme sıklığı, ırk, etnik köken, genotip veya çevre tarafından tanımlanan alt gruplar arasında değişiklik göstermektedir (Balestrino & Schapira, 2020).

1.1.2. Teşhis Kriterleri

Parkinson hastalığının klinik tanısı, yavaş hareket, rijidite, titreme ve duruşsal dengesizlik gibi bazı kardinal motor belirtilerinin kombinasyonları ile tanımlanırken bu belirtilere eşlik eden uyku bozuklukları, koku alma kaybı, depresyon ve anksiyete gibi motor olmayan semptomlar ile de tanımlanmaktadır. Motor semptomların görülmesi genellikle tek taraflıdır ve asimetri hastalığın seyri boyunca devam eder. Motor olmayan semptomlar hastalığın seyri boyunca yıllar içinde artabilmektedir bu durum bireyin hayat kalitesini azaltmaktadır (Greenland vd., 2019).

Hastalığın ortalama görülme yaşı 50 ila 80 yaş arasında geniş bir aralığı kapsamaktadır. 45 yaş altında olan ve hastalık teşhisi konmuş bireylerin yaklaşık %10'nun genetik bir yatkınlığı bulunmaktadır (Clark vd., 2007) . Klinik tanı, motor semptomların işlev kaybının azalması gözlemine dayalı birçok egzersiz içermektedir. Gözleme bağlı teşhis kriterlerinde birçok hata yapılabilmektedir bu durum hastalığın erken evre tanısı ve teşhisinde, tanı testlerine ve biyobelirteçlere ihtiyacı arttırmaktadır (Rizzo vd., 2016). Biyobelirteçlerin ve tanı testlerinin arasında; görüntüleme, genetik testler ve beyin omurilik sıvısı kan testleri bulunmaktadır. Görüntüleme tekniklerinde; dopaminerjik sistemin işlevsel görüntülenmesi için, tek foton emisyon tomografisi ve pozitron emisyon tomografisi gibi görüntüleme yöntemleri kullanılır (Mahlknecht vd., 2018).

Parkinson hastalığında PARK adı verilen 18 spesifik kromozomal bölge bulunmaktadır. Bunlar; otozomal dominant kalıtımda rol oynayan, SNCA, LRRK2, VPS35 iken otozomal resesif kalıtımda rol oynayanlar, PINK1, ATPaz, DJ-1 ve PARK2'dir.Yapılan genetik analizler hastalığın rutin tanı sürecinin bir parçası değildir. Bu gen mutasyonlarının anlaşılması ve terapötik hedefler belirlenmesi hastalığın tedavisinde gelecek için umut vaat etmektedir (Xiong vd., 2009).

Yapılan birkaç çalışma PH olan bireylerin beyin omurilik sıvısında (BOS) çeşitli proteinlerin farklı seviyelerini, en önemlisi farklı α -sinüklein türlerinin seviyelerini ölçmüş ve sağlıklı bireylerle karşılaştırmış olsa da duyarlılıklar ve özgüllükler beklenen değerlerin altında olmuştur ve şu anda Parkinson hastalığı için klinik olarak yararlı bir BOS tabanlı tanı testi yoktur. Serum veya plazma parametrelerinin hastalık ilerlemesiyle

ilişkileri tanımlanmıştır ancak bu parametrelerde beklenen değerlerin altında olup kan biyobelirteçleri açısından parkinson hastalığı için yararlı bir kan biyobelirteç tanı testi bulunmamaktadır (Kurkowska-Jastrzebska vd., 2004)

1.2. Parkinson Hastalığının Etiyolojisi

1.2.1. Genetik Faktörler

Parkinson hastalığının genetik faktörlerine bakıldığında ailesel kalıtılan nadir mutasyonların hastalığın %5-10'luk kısmını kapsadığı görülmektedir. Çevresel faktörler, epigenetik faktörler ve DNA sekans varyasyonları hastalığın geri kalan kısmını oluşturmaktadır ("2023 Alzheimer's disease facts ", 2023).

Nussbaum ve çalışma arkadaşları tarafından 1997'de keşfedilen Lewy cisimlerinin ve Lewy parçacıklarının ana bileşeni olan α -sinükleinlerdeki mutasyonların belirlenmesi PH'nın genetiği üzerindeki çalışmaların hız kazanmasını sağlamıştır. Sonrasında yapılan çalışmalar hastalık mutasyonları ve kalıtımı, etkilenen gen ve lokuslar hakkında araştırmacılara çeşitli bilgiler sunmuştur (Sang vd., 2021).

Günümüzde tanımlanmış ve PARK adı verilmiş 18 spesifik kromozomal bölge, lokus bulunmaktadır. Bunlar otozomal dominant kalıtımda rol oynayan SNCA (PARK1 ve 4), LRRK2 (PARK8) ve VPS35 (PARK17), otozomal resesif kalıtımda rol oynayanlar ise PINK1 (PARK6), DJ-1 (PARK7), ATPaz tipi 13A2 (ATP13A2/PARK9) ve Parkin (PARK2)'dir (Xiong vd., 2009).

SNCA; α -sinüklein proteinlerinden sorumlu olan SNCA geni üzerinde meydana gelen mutasyonlardır. Meydana gelen mutasyonlar, tüm-lokus multiplikasyonları, duplikasyon ve triplikasyon, tipindedir. SNCA duplikasyonuna sahip hastalar klasik PH fenotipi gösterir aynı zamanda hastaların beyin patolojilerinde bol miktarda Lewy cisimcikleri ve Lewy parçacıkları tanımlanmış (Volpicelli-Daley vd., 2011a).

LRRK2; PH'nın otozomal dominant kalıtımında en sık görülen mutasyondur ve günümüzde 50'ye yakın farklı mutasyonu bilinmektedir. Hasta patolojilerine bakıldığında dopaminerjik nöronların kaybı ve gliyoz ile karakterizedir ve çoğu hastada Lewy cisimcikleri mevcuttur (Healy vd., 2008).

VSP35; PH'nın otozomal dominant kalıtımına neden olduğu bilinmektedir. Yeni nesil tüm ekzon sekanslamaları sırasında tanımlanmıştır. Hastaların fenotiplerine

bakıldığında levodopa-duyarlı/cevap veren parkinsonizm, tremor, diskinezi, distoni ve bazen de demans görülmektedir (Vilariño-Güell vd., 2011).

PARK2 (PARKİN); insan genomunun ikinci en büyük genidir. Bu genden eksprese edilen protein 465 aminoasit barındıran Parkin proteinidir. Parkin homozigot mutasyonlarında erken yaşta PH görülüp bu hastalığın ortaya çıkma yaşı genellikle 21'dir (Kitada vd., 1998). Parkin mutasyonuna bağlı PH bulgularının en önemli belirtisi, bulguların çok büyük kısmında Lewy cisimciğinin bulunmamasıdır. Yapılan çalışmaların sonuçları ışığında, PARKİN genindeki mutasyonun ve Parkin proteinindeki işlev kaybının, nöronları sitotoksik etkilere karşı savunmasız hale getirdiği tespit edilmiştir (Hattori vd., 1998).

PINK 1(PARK 6); 8 ekzondan oluşmakta ve protein kinaz kodlamaktadır; serin/treonin kinaz aktivitesi vardır ve mitokondriyal hedefleme motifi içermektedir. PH patogenezindeki enzimatik aktivitesinin önemini göstermektedir. Ayrıca PINK1, Parkin ile birlikte mitokondri morfolojisini kontrolünde görev alır. PINK1'in mutasyonu mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açarak Parkinson hastalığına neden olur (Pickrell & Youle, 2015).

DJ-1 (PARK7); 7 ekzondan oluşur ve 189 aminoasitlik dimerik yapılı bir proteini eksprese eder. Nöroprotektif ve antioksidan işlevleri olduğu tespit edilmiştir. Erken dönem görülen PH'nın %1-2'si DJ-1 mutasyonuna sahip olduğu görülmüştür. Mutasyona uğramış DJ-1 proteini sıklıkla doğru bir şekilde katlanamaz ve hemen proteozom yoluyla degrade olur. Bu yüzden protein yokluğunda dopaminerjik nöronların nöroprotektivitesi ve antioksidan aktivitesi düşer ve PH meydana gelmektedir (Taira vd., 2004).

ATP13A2 (PARK9); Oldukça büyük olan bu genin kodladığı protein 10 adet transmembran domaini ve ATPaz domaini ile birlikte lizozomal membranda bulunur. Bu mutasyonlar bazal gangliada demir birikimine neden olmaktadır (Di Fonzo vd., 2007).

1.2.2. Çevresel Faktörler

Parkinson hastalığı da diğer nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi sadece genetik faktörlerden değil aynı zamanda çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda PH'nın ortaya çıkmasında etkili olan genetik faktörler belirlenmiş olmasına rağmen bu faktörlerin hastalığın görülmesinde ve seyrinde tek başına etkili olmadığı çevresel faktörler ile etkileşimli olduğu görülmektedir (Goldman, 2014).

Çevresel faktörlerin etkilerine dair yapılan çalışmalarda ilk olarak tarım ilaçlarının zararlarına dair bulgular elde edilmiştir. Tarım ilaçlarından parakuat ve maneb türevlerine maruz kalan kişilerde genç başlangıçlı Parkinson hastalığının görülme riskinin arttığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda SNCA geni mutasyonu ile tarım ilaçlarına maruz kalma arasında hastalığın başlangıç yaşını etkileyen bulgular elde edilmiştir (Costello vd., 2009).

Çevresel faktörlerden biri olarak demir, kurşun ve manganez gibi ağır metallerin substantia nigra bölgesinde birikerek oksidatif strese yol açtığı ve bu mekanizma aracılığıyla hastalığın görülme sıklığı üzerinde etkili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (Gatto vd., 2010).

Çevresel faktörlerin PH riskini düşürmesi gibi olumlu etkileri de bulunmaktadır. Özellikle yaşam tarzı ve gün içerisinde tüketilen maddelerin Parkinson hastalığına yönelik %30'a kadar riski önleme etkisi olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar içerisinde en dikkat çekici olanı ise sigara, alkol ve kahve gibi ürünlerin Parkinson hastalığına karşı koruyucu olarak görev yapmalarındadır (Ascherio & Schwarzschild, 2016).

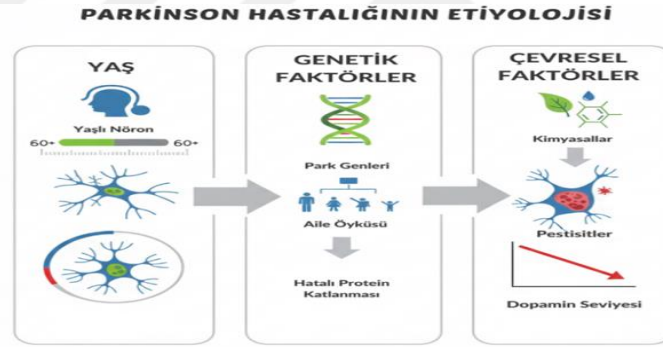
1.2.3. Yaşlanma ve Parkinson Hastalığı

Yaşlanmayla beraber oksidatif stres yanıtı ve enerji metabolizmasını içeren yolları tanımlayan gen ekspresyonundaki değişiklikler meydana gelmektedir. Yaşlanma PH ile beraber bütün nörodejeneratif hastalıklar için bir risk faktörüdür. Parkinson hastalığı 60 yaşın üzerinde toplumun %1'ini etkilerken, 85 yaşın üzerine çıkıldığında bu oran %5'e yükselmektedir. Parkinson patogenezinde rol oynayan substantia nigra'daki dopaminerjik nöronlar yaşlanmayla birlikte her on yılda %4,7-%9,8 oranında azalmaktadır (Fearnley & Lees, 1991).

1.3. Parkinson Hastalığının Patogenezi

Parkinson hastalığı ve mitokondriyal disfonksiyon arasındaki bağlantı 1983 yılında uyuşturucuya maruz kalmış hastalarda nörotoksik olan ve parkinson hastalığı semptomlarını ortaya çıkaran 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridin (MPTP)'in bulunmasıyla ortaya çıkmış ve MPTP'nin nörotoksitesi primat modelinde doğrulanmıştır. Parkinson hastalarının beyin örneklerinde, substantia nigralarında mitokondriyal kompleks I aktivitesinin belirgin olarak azaldığı ve mitokondriyal DNA (mtDNA) silinmesinin yüksek oranda olduğu görülmektedir. Bu oluşumlar parkinson

hastalığı patogenezinde mitokondriyal disfonksiyonun varlığının kanıtıdır (Bender vd., 2006). Aşırı ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi, mtDNA silinmesi, ATP tükenmesi, kaspaz salınımı ve elektron transport sisteminde oluşan bozulmalar mitokondriyal disfonksiyonun ortaya çıkmasındaki temel özelliklerdir (Exner vd., 2012). Mitokondriyal disfonksiyonun ortaya çıkmasında, ROS üretimi, mitokondriyal kompleks I ve III 'ün hasarını mitokondri ve sitoplazmada proteinlerin oksidasyonunu indükleyerek sebep olmaktadır. Artan oksidatif stres, ubiquitin-proteazomal sistemi (UPS) aşırı aktive etmekte ve bu da hasar görmüş ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine sebep olmaktadır (Schapira, 2008). Mitokondriyal disfonksiyon oksidatif strese yol açar, hücre içi sistemlerin hasar görmesine ve hücre ölümüne sebep veren bir takım hücresel yollara etki eder. Oksidatif stres, Parkinson hastalığında nigral dopaminerjik hücre ölümünün patojenik mekanizmalarından birisidir. Çevresel ve genetik faktörlerin bileşimleriyle oluşmaktadır ve bu faktörler bir arada mitokondriyal disfonksiyonu etkilemektedir (Schapira, 2008b).



Şekil 1. Parkinson hastalığının etiolojisi

1.3.1. Oksidatif Stres

Parkinson hastalığının patolojik süreçlerinden biri de oksidatif strestir. Yapılan çalışmalarda PH sahip bireylerin beyin dokularında oksidatif değişiklikler gözlemlenmiştir. Biyolojik sistemlerin aktivitelerinin devam edebilmesi için serbest radikallerin yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin sağlanması gerekmektedir. Nörodejenerasyona yol açabilecek serbest radikallerin yapımı ve yıkımı arasında bulunan dengenin serbest radikallerin yapımı sürecinde bozulması oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif strese maruz kalan hücreler DNA'yı ve lipidleri doğrudan hasara uğratar ve böylece hücreler işlevselliğini kaybeder. Serbest radikaller; reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen (RNS) olarak ikiye ayrılır ve bütün hücrelerde oksidatif fosforilasyon ile üretilirler. Kandaki oksijenin %20'sini beyin kullanmaktadır bu yüzden beyin

hücreleri ROS üretimine çok duyarlıdır. ROS/RNS'ler antioksidanlar aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılırlar (Cadet & Brannock, 1997). Glutasyon (GSH) beyni oksidatif stresten koruyan bir antioksidandır. SN'deki dopaminerjik nöronlar, monoaminoksidaz (MAO) enzimi aracılığıyla dopaminin oksidatif deaminasyonunu ve otooksidasyonunu sağlarlar. Dopaminin otooksidasyonu sonucu oluşan ürün melanindir. Melanin varlığı dopaminerjik nöronlardaki oksidasyon seviyesi hakkında bilgi verir. ROS'lar GSH redüktaz ile detoksifiye edilir. Ancak PH gibi patolojik bir durumda SN'de detoksifiye edilemeyen ROS, serbest demir iyonları ile hidroksil radikalleri oluşturur ve dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna neden olur. Ayrıca oksidatif stres varlığının görüldüğü PH olgularında son ürün olan melaninin bölgesel olarak birikip nöronlardaki serbest halde bulunan metallere bağlanarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Jenner vd., 2003).

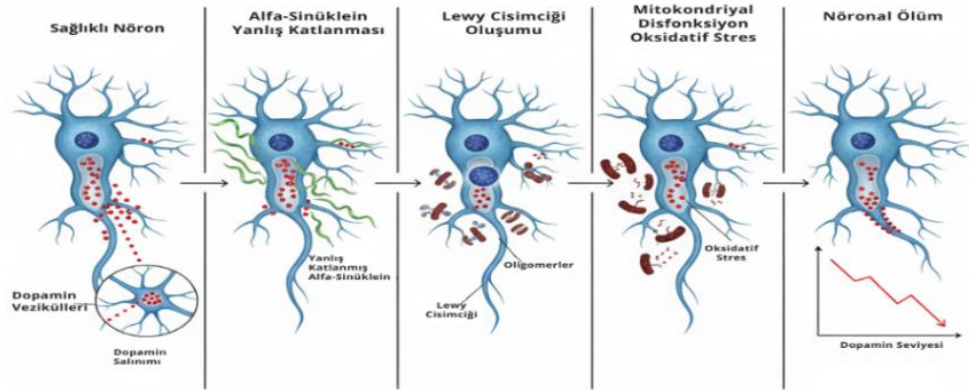
1.3.2. Ubikitin-Proteozom Sistemi (UPS)

Protein degradasyon yollarından biri de UPS'dir. Hücresel kontrol mekanizmaları sayesinde sağlıklı nöronlarda protein agregatları oluşmaz. Bozulmuş ve katlanmış proteinlerin agregasyonu; mutasyona uğramış, anormal ve okside olmuş proteinlerin degrede edilemeyecek kadar fazla olması ve proteozomal sistem fonksiyonlarının bozulması veya azalması şeklinde olmaktadır. Ubikitin-Proteozom sistemi hücrelerde iki şekilde oluşabilecek hatalı proteinleri kurtaran önemli bir sistemdir. Mutasyona uğramış alfa-sinüklein gibi protein degradasyonundan UPS sorumludur. Sinir hücrelerinde nörotoksin proteinlerin agregasyonu ve ubikitin pozitif formların birikimi UPS'nin fonksiyonelliğini yitirdiği durumda meydana gelmektedir (Ebrahimi-Fakhari vd., 2012). DJ-1 ve Parkin proteinleri birleşerek hatalı katlanmış, bozulmuş proteinlerin UPS tarafından yıkımını artıran bir protein kompleksi oluştururlar. Dolayısıyla PH oluşumu ile ilişkili olan PARK2, DJ-1, PINK ve UCHL1'in mutantları veya varyantları aynı zamanda UPS'nin fonksiyonunun yitirilmesine neden olmaktadır (Moore vd., 2005) Parkin proteininin, α -sinüklein ve siklin-E proteinleri olarak iki önemli substratı vardır. α -sinüklein dopaminerjik nöronların stabilitesini düzenleyen önemli bir proteindir. Mutant parkin, doğru şekilde α -sinüklein ile etkileşimde olamadığı için α -sinüklein'in ubikitinle işaretlenip degradasyonu yapılamaz ve Lewy cisimciklerinde α -sinüklein birikimine neden olur (Shimura vd., 2000).

1.3.3. Mikroglial Aktivasyon ve İnflamasyon

Parkinson hastalığının patogenezinde belirgin şekilde görülen bir diğer unsur ise nöroinflamasyondur. Yapılan çalışmalarda inflamasyonun mikroglia adı verilen hücrelerden kaynaklandığı ortaya çıkmıştır. Mikroglia hücreleri myleoid hücre kökeninden gelen merkezi sinir sistemi hücreleridir. Mikroglia hücreleri, zarar görmüş hücrelerin ve yabancı maddelerin fagositozundan sorumludur. Mikroglialar aktivasyon sırasında nitrik oksit salgılamakta ve hücrelerin aktivasyonu sırasında TNF- α , IL-1- β , NO, katepsin-B, glutamat gibi reaktif oksijen türleri açığa çıkararak, doku bozulmasına ve merkezi sinir sistemindeki komşu glia hücrelerinde nöronlarda inflamasyon cevabının oluşmasına neden olmaktadır (Przedborski, 2005). Parkinson hastalığına yönelik fare modellerinde gerçekleştirilen çalışmalar, substantia nigra bölgesindeki dopaminerjik nöron sayısının, mikroglial hücrelerin aşırı aktivasyonu sonucunda belirgin şekilde azaldığını ortaya koymuştur. Mikroglial aktivasyonun temel nedenleri arasında yanlış katlanmış α -sinüklein, lösin açısından zengin kinaz 2 (LRRK2), parkin ve DJ-1 gibi Parkinson hastalığı ile ilişkili proteinlerin yanı sıra matriks metalloproteinazları'nın (MMP) yer aldığı bildirilmektedir (Moehle vd., 2012).

Parkinson Hastalığının Patogenezi



Şekil 1.2. Parkinson hastalığının patogenezi

1.4 Parkinson Hastalığı Çalışmalarında Kullanılan İn Vitro Modeller

Parkinson hastalığı, nörodejeneratif hastalıklardan biri olup bazal gangliyonlardaki dopamin azalması sonucunda meydana gelmektedir. Hastalığın görülme sıklığı yaşla birlikte artmakta olup Lewy cisimcikleri adı verilen, çözünmeyen

α -sinüklein proteini içeren sitoplazmik kalıntıların birden fazla hücre tipinde birikmesi durumu söz konusudur. PH için kullanılan in vitro modeller, dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve alfa-sinüklein'in intranöronal birikimi gibi iki ana faktörü yeniden oluşturmaktadır. Parkinson hastalığında en çok kullanılan in vitro modeller ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının kültüre edilmesi ile oluşturulmaktadır. Hücre hatları önce hastalığın patofizyolojisinde etkilenen spesifik bir nöronal tipe doğru farklılaşmalıdır. PH için genellikle dopaminerjik nöronal fenotipe bir farklılaşma elde edilir (Falkenburger vd., 2016b).

İn vitro araştırmalarda kullanılan en yaygın hücre hattı insandan türetilen SH-SY5Y hücre hattıdır. Hücre hattı, tirozin hidroksilaz ve dopamin-beta-hidroksilaz enzimleriyle donatılmış bir katekolaminerjik fenotipe sahiptir ve hem dopamin hem de noradrenalin nörotransmitterlerini sentezleyebilir.

Farklılaşmamış SH-SY5Y hücre hattı yuvarlak bir gövde ve kısa nöritlere sahipken, farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattı piramitsel bir gövde ve uzun nöritlere sahiptir. Hücre hattı nöron benzeri bir fenotip N tipi ve epitel benzeri bir fenotip S tipi sergileyebilir. Bir fenotipten diğerine geçiş kendiliğinden gerçekleşir ve N tipi hücreler ile S tipi hücreler arasındaki oran deneysel modelleri etkileyebilir çünkü PH çalışması için yalnızca N tipi hücelere ihtiyaç vardır (Kovalevich & Langford, 2013). Parkinson hastalığını incelemek için oluşturulan in vitro deneysel tasarımda SH-SY5Y hücre hattının dopaminerjik nöronlarda farklılaşması, besiyerinin içerisine retinoik asit ve forbol esterleri gibi çeşitli kimyasalların düşük konsantrasyonlarda eklenmesi ile oluşmaktadır (Presgraves vd., 2003).

1.4.1. Nörotoksik Bileşikler

Nörotoksik bileşikler olan rotenon, 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA), nöronal apoptozu indüklemeye kapasiteleriyle dikkat çeker. Bu bileşiklerin neden olduğu nörotoksiteyi önleyen moleküllerin test edilmesi, yeni ilaç tedavilerinin geliştirilmesi için kritik bir araç olarak kullanılır. Rotenon, lipofilik yapısı sayesinde hücre zarını kolayca geçerek hücre içinde birikir ve bir insektisit olarak bilinmektedir. MPP+, dopamin taşıyıcısına yüksek afiniteye sahip olan ve dopaminerjik nöronlarda biriken 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) bir metabolitidir. 6-OHDA ise katekolaminlere yapısal benzerlik gösteren bir bileşik olup, bu taşıyıcıları kullanarak hücelere girer. Söz konusu üç bileşik, mitokondriyal disfonksiyonu tetikler,

oksidatif stresi artırır ve nöronal hücre ölümünü indükler. Aynı zamanda, bu modeller, α -sinükleinin artan ekspresyonunu ve agregasyonunu indükleyebilir, ancak bu etkiler genellikle ikincil olarak ele alınır. Ek olarak, bu nörotoksinler, substantia nigra pars compacta'daki dopaminerjik nöronların hücre ölümünü indüklemek için kullanılarak in vivo Parkinson hastalığı modellerinde fareler üzerinde uygulanabilir (Betarbet vd., 2000).

1.4.2. Sentetik Sinükleine Maruz Kalma

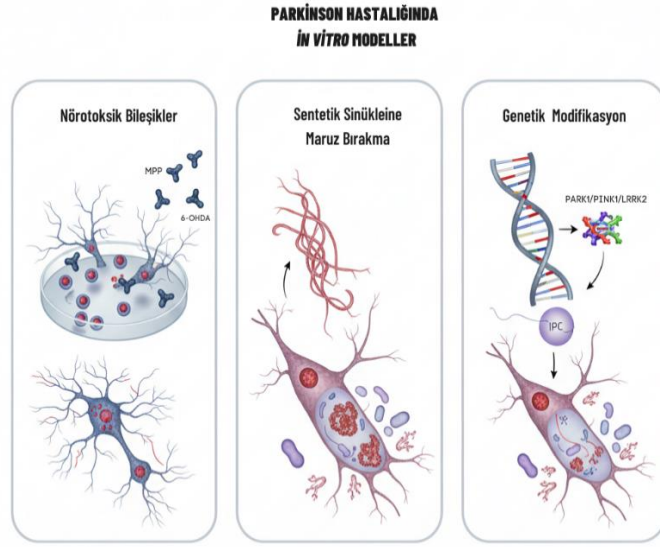
Alternatif bir in vitro Parkinson hastalığı modeli oluşturmak için, nöronal hücrelerin α -sinükleinin önceden oluşturulmuş fibrillere (PFF) maruz bırakılması yaygın bir yaklaşımdır. PFF, rekombinant α -sinükleinin moleküllerinin bir sonikasyon süreciyle küçük fibriller oluşacak şekilde şekillendirilmesiyle elde edilir. Bu fibriller, hücre kültürüne eklendiğinde, endojen α -sinükleinin agregasyonunu teşvik eder ve bu durum sinaptik işlev bozukluğuna ve hücre ölümünü tetikler. Bu model, Parkinson hastalığında gözlemlenen Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritlerinin oluşumunu taklit eder (Volpicelli-Daley vd., 2011a). PFF kullanılarak geliştirilen bu model, normal seviyelerde endojen α -sinükleinin varlığına dayanır ve α -sinükleinin aşırı ekspresyonuna gerek duymaz. Bu yöntem ilk olarak hipokampal birincil nöronal kültürlerde test edilmiş, ancak daha sonra SH-SY5Y hücre hattı gibi modellerde de uygulanmıştır. Bu yaklaşım, Parkinson hastalığı patofizyolojisinin moleküler mekanizmalarını incelemek ve potansiyel terapötik hedefleri belirlemek için önemli bir araç sunar (Luk vd., 2012).

1.4.3 Genetik Modifikasyon

α -Sinükleinin intranöronal agregasyonunun patolojik değişimini simüle etmek için, SH-SY5Y hücre hattı, α -sinükleini kodlayan genin doğal tip veya mutant formlarıyla transfeksiyon yoluyla genetik olarak değiştirilebilir. Bu transfeksiyon, hücre içi birikimi destekleyen α -sinükleinin aşırı ekspresyonunu indükler ve nörotoksik etkiye sahip protein agregatlarının oluşumuna yol açar. Bu agregatlar, nihayetinde hücre ölümüyle sonuçlanır (Falkenburger vd., 2016b).

Parkinson hastalığının patofizyolojisinde rol oynayan diğer genler, özellikle genetik formlarda görülen LRRK-2, DJ-1, Parkin ve PINK1 genleri, üç şekilde manipüle edilebilir: proteinin aşırı ekspresyonunu sağlamak, protein eksikliğine yol açan geni baskılamak veya değişmiş bir protein türünü üreten gen mutasyonları oluşturmak. Ancak,

bu yaklaşımlar in vitro modellerde daha az yaygın olarak kullanılmaktadır(Xicoy vd., 2017).



Şekil 1.3. Parkinson hastalığında in vitro modeller

1.5. Nanoteknoloji

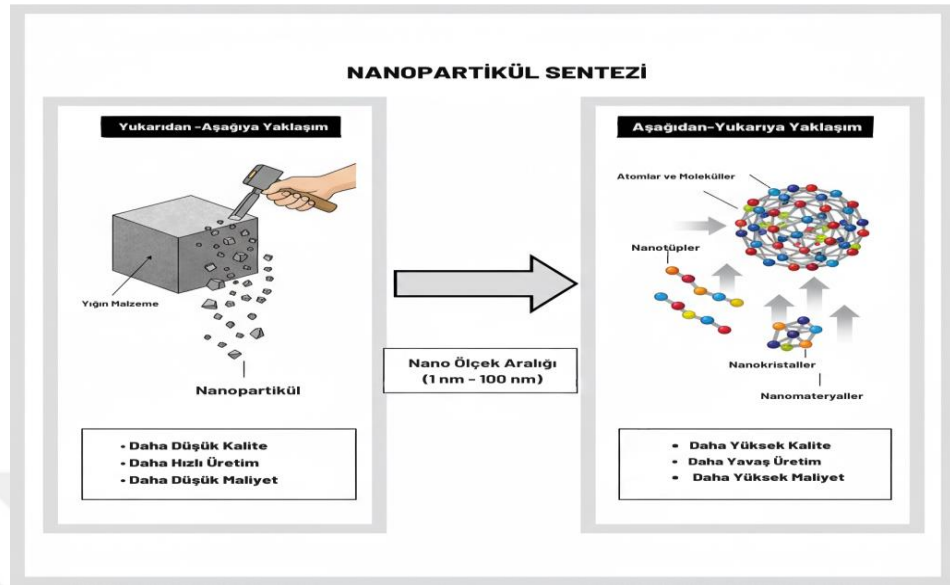
Nanoteknoloji, 1 ila 100 nanometre (nm) arasındaki boyutlarda maddenin anlaşılması ve kontrolü olarak tanımlanır; bu ölçek, benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik fenomenlerin yeni uygulamalara olanak sağladığı bir aralıktır. İnsanlık tarihindeki nanopartiküllere maruz kalma süreci, özellikle Sanayi Devrimi sırasında önemli ölçüde artış göstermiştir. Nanopartiküllerin incelenmesi yeni bir kavram değildir. "Nanometre" terimi ilk kez 1925 yılında Nobel Kimya Ödülü sahibi Richard Zsigmondy tarafından önerilmiştir. Zsigmondy, nanometre kavramını açıkça parçacık boyutlarını karakterize etmek amacıyla ortaya atmış ve mikroskop kullanarak altın kolloidleri gibi nano boyutlu parçacıkların ölçümünü gerçekleştiren ilk kişi olmuştur. Modern nanoteknoloji, 1965 Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feynman'ın vizyonuyla şekillenmiştir. Feynman, 1959 yılında Caltech'te düzenlenen Amerikan Fizik Derneği toplantısında yaptığı "Alta Çok Yer Var" başlıklı konferansında, maddeyi atom seviyesinde manipüle etme fikrini tanıtmıştır. Bu devrim niteliğindeki fikir, bilim dünyasında yeni düşünce yollarını açmış ve Feynman'ın hipotezleri daha sonra doğrulanmıştır. Bu nedenlerle kendisi modern nanoteknolojinin "babası" olarak kabul edilir. Feynman'ın konferansından yaklaşık 15 yıl sonra, Japon bilim insanı Norio Taniguchi, bir nanometre ölçeğinde gerçekleşen yarı iletken üretim süreçlerini tanımlamak için "nanoteknoloji" terimini kullanan ilk kişi olmuştur. Taniguchi,

nanoteknolojiyi atom ve molekül düzeyinde malzemelerin işlenmesi, ayrıştırılması, konsolidasyonu ve deformasyonu olarak tanımlamıştır. Nanoteknolojinin "altın çağı" 1980'lerde başlamıştır. Bu dönemde Kroto, Smalley ve Curl, fullerenleri keşfetmiş; Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden (MIT) Eric Drexler ise 1986 yılında yayımlanan "Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Yaklaşan Çağı" adlı kitabında, Feynman'ın fikirlerinden ve Taniguchi'nin "nanoteknoloji" tanımından ilham almıştır. Drexler, kendi kendini kopyalayabilen ve karmaşık yapılar oluşturabilen nano ölçekli bir "montajcı" konseptini öne sürmüştür. Bu vizyon, genellikle "moleküler nanoteknoloji" olarak anılmaktadır. Nanoteknoloji bilimi, Japon bilim insanı Sumio Iijima'nın karbon nanotüpleri keşfetmesiyle daha da ileri taşınmıştır. Bu buluş, nanoteknolojinin temel uygulama alanlarının genişlemesine önemli katkılar sağlamıştır (Hulla vd., 2015).

Feynman'ın, birçok bilim insanının ilgisini çeken bu yeni araştırma alanını keşfetmesinin ardından, nanoyapıların sentezi için iki temel yaklaşım tanımlanmıştır. Bu üretim yaklaşımları kalite, hız ve maliyet açısından farklılık gösteren yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) olmak üzere iki kategoriye ayrılır.

Yukarıdan aşağıya yaklaşım, yığın bir malzemenin daha küçük boyutlara getirilerek nano ölçekli parçacıklara dönüştürülmesini ifade eder. Bu yöntem, son yıllarda hassas mühendislik ve litografi gibi gelişmiş tekniklerle endüstri tarafından optimize edilmiştir. Hassas mühendislik, üretim sürecinin tüm aşamalarını destekleyen mikro-elektronik endüstrisinin temel taşıdır. Yüksek performans, çeşitli iyileştirme yöntemlerinin bir arada kullanılmasıyla elde edilir. Bu yöntemler arasında elmas veya kübik bor nitrür bazlı gelişmiş nanoyapılar, boyut kontrolüne yönelik sensörler, sayısal kontrol sistemleri ve gelişmiş servo tahrik teknolojileri yer alır. Aşağıdan yukarıya yaklaşım, nanoyapıların atom veya molekül seviyesinden başlayarak yukarı doğru inşa edilmesini ifade eder. Bu süreç, atom ve moleküllerin kendi kendine bir araya gelmesinin kontrollü manipülasyonu ile gerçekleştirilir ve nano skala aralığında (1 nm ila 100 nm) fiziksel ve kimyasal yöntemlere dayanır. Kimyasal sentez, genellikle toplu düzensiz formdaki ürünlerin doğrudan üretildiği veya daha gelişmiş düzenli malzemelerin yapı taşları olarak kullanılabilen kaba malzemelerin oluşturulmasında kullanılan bir yöntemdir. Kendi kendine bir araya gelme, atomların veya moleküllerin aralarındaki kimyasal ve fiziksel etkileşimler sayesinde düzenli nanoyapılar oluşturacak şekilde organize olduğu bir aşağıdan yukarıya yaklaşımdır. Konumsal bir araya getirme ise tek

atomların, moleküllerin veya kümelerin bireysel olarak serbestçe konumlandırılabilceği bir tekniktir ve bu bağlamda oldukça özgün bir yöntemdir (Iqbal vd., 2012).



Şekil 1.4. Nanopartikül sentezi özetleyen diyagram

1.5.1. Nanoteknolojinin Tarihçesi

Nanopartiküller ve nanoyapılar, MS 4. yüzyılda Romalılar tarafından kullanılmış ve antik dünyada nanoteknolojinin en dikkat çekici örneklerinden birini ortaya koymuştur. British Museum koleksiyonunda yer alan Lycurgus kupası, antik cam işçiliğinin en olağanüstü başarılarından birini temsil etmekte ve dikroik camın bilinen en eski örneği olarak kabul edilmektedir. Dikroik cam, belirli ışık koşullarında renk değiştiren özel bir cam türüdür. Bu özellik, Lycurgus kupasının iki farklı renge sahip olduğu anlamına gelir: doğrudan ışık altında yeşil, ışığın camdan geçtiği durumlarda ise kırmızı-mor bir görünüm sergiler. 1990 yılında bilim insanları, bu dikroizm olgusunu açıklayabilmek için Lycurgus kupasını transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile analiz etmişlerdir (I. Freestone vd., 2007). Gözlemler, kupadaki dikroizm özelliğinin çapı 50-100 nm arasında değişen nanopartiküllerin varlığından kaynaklandığını ortaya koymuştur. X-ışını analizleri, bu nanopartiküllerin yaklaşık %7:3 oranında gümüş-altın alaşımı olduğunu ve ayrıca bir cam matriste dağılmış yaklaşık %10 oranında bakır içerdiğini göstermiştir (Schaming & Remita, 2015). Altın nanopartikülleri, ışık Emilimi sonucu yaklaşık 520 nm dalga boyunda kırmızı bir renk üretirken, kırmızı-mor renk daha büyük partiküller tarafından gerçekleştirilen Emilimden kaynaklanır. Yeşil renk ise >40 nm boyutundaki gümüş nanopartiküllerinin koloidal dispersiyonlarının ışık saçmasıyla

ilişkilendirilmiştir. Bu özellikleriyle Lycurgus kupası, en eski sentetik nanomalzemelerden biri olarak kabul edilmektedir. Benzer etkiler, orta çağ kilise pencerelerindeki parlak kırmızı ve sarı renklerin oluşumunda da gözlemlenmiştir. Bu renkler, altın ve gümüş nanopartiküllerinin cama kaynaşması sonucu meydana gelmiştir. 9-17. yüzyıllar arasında İslam dünyasında ve daha sonra Avrupa'da kullanılan parlak ve ışıltılı "parıltılı" seramik sırları, gümüş, bakır veya diğer nanopartiküller içermekteydi (I. C. Freestone vd., 2003). 16. yüzyılda İtalyanlar, Rönesans çanak çömleklerini üretirken nanopartiküllerden faydalanmış ve bu süreçte Osmanlı tekniklerinden etkilenmişlerdir. 13. ve 18. yüzyıllar arasında üretilen "Şam" kılıç bıçakları, mukavemet, esneklik ve keskin bir kenar tutma yeteneği sağlamak amacıyla sementit nanotelleri ve karbon nanotüpleri içeriyordu (Reibold vd., 2009). Bu renkler ve malzeme özellikleri kasıtlı olarak üretilmiş olsa da Orta çağ sanatçıları ve zanaatkarları bu etkilerin nedenlerini bilimsel olarak açıklayamamışlardır. 1857 yılında Michael Faraday, "yakut altını" oluşturan kolloidal süspansiyonların hazırlanmasını ve özelliklerini incelemiştir. Altın nanopartiküllerinin benzersiz optik ve elektronik özellikleri, onları en ilginç nanopartiküllerden biri haline getirmiştir. Faraday, altın nanopartiküllerinin belirli aydınlatma koşullarında farklı renklerde çözeltiler üretebildiğini göstermiştir (Link & El-Sayed, 1999).

1.5.2. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Son yirmi yılı aşkın bir süredir araştırmacılar, nano boyutlu malzemelerin benzersiz özelliklerinden yararlanarak pek çok alanda çığır açıcı çalışmalar yürütmektedir. Nanoteknoloji, bilgi teknolojisinden güvenliğe, ulaşımdan tıbbı, gıda üretiminden çevre korumaya kadar geniş bir yelpazede teknolojik ve endüstriyel gelişimlere öncülük etmektedir. Bu yenilikçi alan, uzay araştırmaları, elektronik, haberleşme ve savunma sanayi gibi kritik sektörlerde de önemli bir etkiye sahiptir (Whitesides, 2005).

Nanotıp, hastalıkların teşhis ve tedavisi için nano ölçekli teknikler kullanmaktadır. Nanoteknoloji, görüntüleme teknikleri, tanı araçları, ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği yapıları, implantlar ve farmasötik terapötikler dahil olmak üzere tıp alanında geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Nanoskopik boyuttaki ilaç taşıyıcılar (lipozom, niyozom, dendrimer, nanopartikül vb.) hastalıklı hücrelere hedefli ilaç salımı yaparak yan etkileri azaltır ve tedavi etkinliğini artırır (Farokhzad & Langer, 2009).



Şekil 1.5. Nanoteknolojinin bazı uygulama alanları

Havacılık ve uzay çalışmalarında, sınırlı miktarda yakıt kullanımı, kullanılan malzemelerin ve elektronik cihazların sıcaklığa ve radyasyona dayanıklılığı gibi sorunlar görev süresinin kısılmasıyla sonuçlanmaktadır. Nanoteknolojik çalışmalar ile beraber daha az maliyetlerle daha dayanıklı ürünlerin gelişmesine yol açabilir.

Tekstil endüstrisi nanoteknolojiden en çok etkilenecek sektörlerin başında gelmektedir. Günümüzde buruşmayan, leke tutmayan, ısıyı koruyan kıyafetler mevcut olup; gelecekte veri depolayacak, gerektiğinde ilgili birime haber verebilecek, enerji üretebilecek tekstil ürünleri üretilecektir.

Elektronik ve bilişim sistemlerinde nanoteknoloji araştırmalarının temel hedefi, ekonomik ve yüksek performanslı cihaz ve malzemeler üretmektir. Bilişim ve iletişim teknolojilerinde nanoteknoloji araştırmaları cihazlarda fonksiyonelliği ve kapasiteyi arttırmış, cihazlar daha dayanıklı, hafif ve kullanışlı bir hâle gelmiştir.

Savunma alanında nanoteknoloji uygulamaları üzerine araştırmalar, yoğunluk optik sistemlerde olmak üzere; nanomakineler, robotik sistemler, akıllı malzemeler, artırılmış gerçeklik uygulamaları, insan hafızasını artırıcı bellekler, askerin performansını artırıcı ilaç ve dış iskelet sistemleri, nanoelektronik, zırh teknolojisi, akıllı kıyafet, biyo uyumlu protez ve implant, yapay doku-organ-kas uygulamaları, kuantum bilgisayarlar ve iletişim sistemleri üzerine artış göstermektedir.

Ülkeler yenilenebilen, güvenli ve ucuz enerji kaynaklarına sahip olmak isterler. Artan nüfus ve sanayi alanındaki gelişmelerle birlikte geleneksel enerji kaynaklarının

rezervleri hızla azalmakta ve yakın zamanda tükeneceği öngörülmektedir. Artan enerji gereksinimi nedeniyle sürdürülebilir ve temiz enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Enerjinin verimli şekilde üretilmesinde, depolanmasında ve kullanılmasında nanoteknolojinin olumlu etkileri göz ardı edilemez (Haleem vd., 2023).

1.6. İlaç Taşıma Sistemleri

İlaç taşıma sistemleri, terapötik ajanların vücutta istenilen doku veya hücrelere güvenli, kontrollü ve etkin bir biçimde ulaştırılmasını amaçlayan ileri farmasötik ve biyoteknolojik yaklaşımlardır. İlaç taşıma sistemlerini konvansiyonel ve yenilikçi sistemler olarak ikiye ayırabiliriz. Konvansiyonel ilaç taşıma sistemlerinde etkin maddenin dolaşıma girdikten sonra hedef dışı dokulara dağılması, hedef bölgeye yeterli konsantrasyonda ulaşmaması, hızlı metabolize edilmesi, istenmeyen yan etkiler oluşturması konvansiyonel ilaç taşıma sistemlerinin klinik etkinliğini sınırlayan başlıca faktörlerdir. İlaç taşıma sistemleri, ilacın farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirerek terapötik indeksi arttırmayı hedefler. Yenilikçi ilaç taşıma sistemleri, özellikle nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemler konvansiyonel ilaç taşıma sisteminin klinik etkinliğini sınırlayan faktörleri optimize etmeyi amaçlamaktadır. Nano taşıyıcı sistemler, daha düşük dozlarda daha yüksek terapötik etki, ilacı hedef dokuya yönlendirme, ayarlanabilir partikül boyutu ve yüzey modifikasyonu özellikleri sayesinde modern ilaç geliştirme ve hedefli tedavi stratejilerinde önemli bir konuma sahiptir. Bu gelişmeler, nanoteknolojinin tıptaki kullanım alanlarını genişletmiş ve özellikle ilaç taşıma ve dağıtım sistemlerine yönelik çalışmaların hızla artmasına zemin hazırlamıştır (Allen & Cullis, 2004).

1.7. Nano İlaç Taşıma ve Salınım Sistemleri

Nano ilaç taşıma ve salınım sistemleri, ilaçların hedeflenen doku ve hücrelere güvenli ve etkili bir şekilde ulaştırılmasını amaçlayan nanotaşıyıcı sistemler ile sistemlerin salınım kinetiklerini inceleyen bir alandır. Konvansiyonel ilaç uygulamalarında etkin maddenin hedef dokuya spesifik olarak yönlendirilmemesi, doz sınırlamaları ve yan etki risklerinin artmasına yol açmaktadır. Bu dezavantajların önüne geçmek amacıyla ilacın korunmasını sağlayan, hedefe yönelik dağılımı mümkün kılan ve biyoyararlanımı artıran ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir (Scicluna & Vella-Zarb, 2020).

Avrupa Komisyonu tarafından “nanomalzemeler” teriminin tanımı, yalnızca 1–100 nm ölçek aralığındaki yapılarla sınırlı değildir. Özellikle tıp alanında, 1.000 nm’ye kadar olan taşıyıcı sistemler “nanotaşıyıcılar” olarak adlandırılmaktadır. Nanotaşıyıcı kavramı; boyut aralığı (1–1.000 nm) ile birlikte “işlevsellik” özelliğini de içerecek şekilde ele alınmıştır. Temel olarak, herhangi bir alt yapı veya malzeme, başka bir maddeyi içine alabilmesi, kapsüllenebilmesi ya da kimyasal olarak bağlayabilmesi durumunda nanotaşıyıcı işlevi görebilmektedir (Etheridge vd., 2013). Nanotaşıyıcı sistemler, ilacın fizikokimyasal özelliklerini iyileştirerek biyolojik bariyerlerin aşılmasını kolaylaştırmakta ve hedef dokuda kontrollü salım imkânı sunmaktadır. Nano taşıyıcıların yüzey özelliklerinin modifiye edilebilmesi, hedefleme ligandlarının bağlanmasına olanak tanıyarak hücre ve doku düzeyinde seçici dağılım sağlamaktadır. Ayrıca yüksek yüzey alanı/hacim oranları sayesinde ilaç yükleme kapasitesi artırılabilen ve ilacın dolaşım süresi uzatılabilmektedir. Bu özellikler, yan etkilerin azaltılmasına ve terapötik etkinliğin artırılmasına önemli katkılar sunmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemler; yapısal özellikleri, taşıyıcı materyalin türü ve ilaç salım mekanizmalarına göre farklı gruplar altında sınıflandırılmaktadır. Bu sistemler arasında lipozomlar, niyozomlar, polimerik nanopartiküller, polimerik miseller, dendrimerler ve inorganik nanopartiküller öne çıkmaktadır. Her bir nanotaşıyıcı sistem, ilacın türüne ve hedeflenen terapötik uygulamaya bağlı olarak farklı avantajlar sunmakta olup, uygun sistemin seçimi tedavi başarısını doğrudan etkilemektedir (Torchilin, 2005).

1.7.1. Kontrollü İlaç Dağıtım Sistemleri

Biyoteknoloji ve farmasötik alanlarda ilacın etki göstereceği biyolojik yapılara taşınması ana sorunlardan biridir. Bu nedenle ilaç taşıyıcı sistemler, araştırmacıların ilgisini çeken bir alan olmuştur. Yapılan çalışmalar sayesinde spesifik ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemler, biyoaktif ajanların kimyasal reaksiyonda belli hızda belli bir yapıya spesifik olacak şekilde salınmasıyla işlev göstermektedir (Peer vd., 2007).

Günümüzde kullanımda olan ilaçların önemli bir bölümü, hedef hücrelere ulaşma sürecinde hidrofobik bölgelerde istenilen farmakolojik etkiyi yeterli düzeyde gösterememektedir. Aynı zamanda ilaçların hedef doku dışında tüm vücutta etkisini göstermesi ve ilaçların etki süresinin kontrol edilememesi tedavi sürecini olumsuz etkilemektedir. Bir diğer önemli sorun ise etken maddenin biyolojik bariyerleri aşarak

hedef bölgeye yeterli miktarda ulaşamamasıdır. Etken madde kullanımında karşılaşılan bu sınırlılıkların giderilmesinde nanoteknoloji temelli yaklaşımlar çeşitli çözüm stratejileri sunmaktadır. Nano taşıyıcıların geliştirilmesi sayesinde kan-beyin bariyeri, solunum sistemindeki bronşöller ve derideki sıkı bağlantılar gibi çeşitli anatomik ve biyolojik yapılar aşılarak ilaçların hedef dokuya ulaştırılması sağlanmaktadır (Blanco vd., 2015).

Nanoteknoloji temelli ilaç taşıma sistemleri, farklı hastalık gruplarında kullanılan çeşitli terapötik ajanların etkinliğini artırmak amacıyla yaygın olarak uygulanmaktadır. Kanser araştırmalarında ve aşı geliştirme çalışmalarında modifiye edilmiş ve fonksiyonlaştırılmış nano-ilaç taşıma sistemlerinin etkinliği konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin, paklitaksel ve sisplatin gibi kemoterapötik ajanlar; lipozom, polimerik nanopartikül ve altın nanopartikül gibi nanotaşıyıcı sistemler ile hedef dokuya yönlendirilerek sistemik toksisiteyi azaltılmaktadır. Bu sistemler, etken maddenin doğrudan tümör dokusuna yönlendirilmesini sağlayarak sağlıklı dokular üzerindeki sistemik toksisiteyi azaltmakta ve terapötik indeksi anlamlı ölçüde genişletmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ise levodopa, dopamin agonistleri ve çeşitli nöroprotektif moleküllerin etkinliği büyük ölçüde kan-beyin bariyerinin (KBB) aşılabılmesine bağlıdır. Nanopartiküler taşıyıcı sistemler, KBB'yi geçebilme yetenekleri sayesinde bu ajanların serebral dokudaki biyoyararlanımını artırarak tedavi etkinliğine katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte nanoteknolojik ilaç taşıma yaklaşımları yalnızca onkoloji ve nöroloji alanlarıyla sınırlı kalmamakta; diyabet tedavisinde insülinin kontrollü salınımı, solunum yolu hastalıklarında kortikosteroidlerin lokalize iletimi ve antiviral tedavilerde nükleik asit temelli ajanların hedef dokuya özgül taşınması gibi birçok alanda yenilikçi çözümler sunmaktadır. Sonuç olarak nano-ilaç taşıma sistemleri, kontrollü salınım ve hedefe yönelik iletim mekanizmaları aracılığıyla modern tıpta çok boyutlu ve yüksek etkinliğe sahip bir tedavi paradigması oluşturmaktadır (Saraiva vd., 2016).

Lipid nanopartiküller (katı-lipid nanopartiküller, lipid nano-emülsiyonlar, nano yapılı lipid taşıyıcılar), lipozomlar, miseller, dendrimerler, polimerik sistemler, nanokristaller, silika nanopartiküller, metalik nanopartiküller, metal oksitler ve karbon bazlı nanopartiküller (karbon nanotüpler, kuantum noktaları, fullerenler) önemli taşıyıcı sistemlerden bazılarıdır.

1.7.2. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, 10-100 nm boyut aralığında, katı koloidal yapıya sahip nanoküreler ve nanokapsüller olarak iki gruba ayrılmaktadır. Bu nanopartiküller, sentetik hidrofobik veya doğal hidrofilik polimerlerden oluşmaktadırlar. Sentetik polimerlere polilaktik asit, polimetil, polistiren örnek olarak verilirken; doğal hidrofilik polimerler arasında proteinler, jelatin, albümin örnek teşkil etmektedir. Polimerik nanopartiküllerin üretim teknikleri kolaydır, fizyolojik ortamda parçalanabilirler ve parçalanma ürünleri toksik değildir. Oral yolla ilaç alımlarında biyoyararlanımı yüksektir. Rebinyn, Eligard, Adagen gibi ilaçlar ticari olarak kullanıma sunulmuş polimerik nanopartikül ilaç formülasyonlarına örnektir (Danhier vd., 2012).

1.7.3. Dendrimerler

Dendrimerler, bir çekirdek, çekirdek etrafındaki dallanma birimleri ve fonksiyonel grup olarak adlandırılan yüzey gruplarından oluşan polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Dendrimerler, biyoyumlu, monodispers, membran etkileşimi ve farmakokinetik özellikleri gibi gelişmiş fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Sağlık alanında kullanılan 50'den fazla dendrimer bulunmaktadır. Poliamidoamin (PAMAM) dendrimer, Polipropilenimin (PPI) dendrimer, Poli-l-lizin (PLL) dendrimer ve karbon silan dendrimer gibi türleri bulunmaktadır. VIVA GELTM, DEP® irinotecan, DEP® docetaxel/DTX-SPL8783 gibi ilaçlar ticari olarak kullanılan dendrimer-ilac formülasyonlarına örnektir (Tomalia vd., 1985).

1.7.4. Nanokristaller

Nanokristaller çözücü içermeyen nm boyutundaki kristal özelliklere sahip katı parçacıklardır. Çözünürlüğü az organik ve inorganik maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak, farmakokinetik özelliklerini geliştirmek için nanokristaller kullanılmaktadır. Nanokristaller aktif bir çekirdek ve bu çekirdeği dış etkenlerden koruyan bir membrandan oluşmaktadır. Nanokristaller diğer nanotaşıyıcılar ile kıyaslandığında yüksek oranda suda çözünürlüğe ve çözünme hızına sahiptirler. Çözücü içermemeleri sebebiyle sitotoksik etkileri oldukça azdır. Manyetik nanokristaller genellikle antitümoral ilaçların, katyonik nanokristaller ise genel olarak oftalmik ilaçların taşıma sistemi olarak kullanılmaktadır (Müller vd., 2011). EquivaBone®, Invega Sustenna, NanOss® ticari olarak kullanılan nanokristal ilaç formülasyonlarına örnektir.

1.7.5. Silika Nanopartiküller

Silika nanopartiküller mezo-gözenekli silika nanopartiküller ve kserojeller olarak sınıflandırılır. Mezo-gözenekli silika nanopartiküller, 2-50 nm boyutta içi boş kanallara sahip petek benzeri gözenekleri olan nanopartiküllerdir. Gözenek boyutlarının farklılaşabilmesi ilaçların çözünmesini sağlar ve ilaç moleküllerinin kristalleşmesini engellemektedir. Fenitoin, sisplatin, doksorubisin kserojellere yüklenebilen ilaç örnekleridir (Mamaeva vd., 2013)

1.7.6. Metalik Nanopartiküller

Metalik nanopartiküller, nm boyuttaki metal elementlerdir. Metalik nanopartiküller farklı elektronik ve optik özelliklere sahiptirler. İlaç taşınması, tanı ve görüntüleme gibi çeşitli uygulamalarda kullanılırlar. Metalik nanopartiküller içerisinde gümüş ve altın nanopartikülleri ilaç taşıma sisteminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bharatia vd., 2023). Acticoat®, SilvaSorb® ve Verigene® kullanımda olan metalik nanopartikül-ilaç formülasyonlarına örnektir.

1.7.7. Metal Oksitler

Nano boyuttaki metal oksitler, çinko oksit, demir oksit ve titanyum dioksit olmak üzere, ilaç, kozmetik maddeler ve farmasötik maddelerin taşınmasında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Çinko oksit nanopartiküller, antikanser, antidiyabetik, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antifungal etkinliği gösteren metal oksit nanopartikülleridir. Demir nanopartikülleri, manyetik rezonans görüntülemeye kontrast arttırıcı ajanlar olarak kullanılmasının yanı sıra ilaç taşıma sistemi olarak da kullanılmaktadır. Nanotherm® ve Feridex®/Endorem® kullanımda olan demir oksit nanopartikül ilaç formülasyonlarına örnektir (Rai vd., 2009).

1.7.8. Karbon Bazlı Nanopartiküller

Karbon nanotüpler, kuantum noktaları ve fullerenler ilaç taşıma sisteminde kullanılan toksisitesine ilişkin ciddi şüpheler bulunan karbon bazlı nanopartiküllerdir. Karbon nanotüpler karbon atomlarının bir araya gelmesiyle oluşan tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere iki tipi bulunan karbon bazlı nanopartiküllerdir. Kuantum noktaları, kadmiyum veya çinkonun kalkojenitlerinden elde edilen 2-10 nm arasında boyutlara sahip nanoparçacıklardır. Fullerenler, karbon atomları içeren farklı boyutlarda simetrik

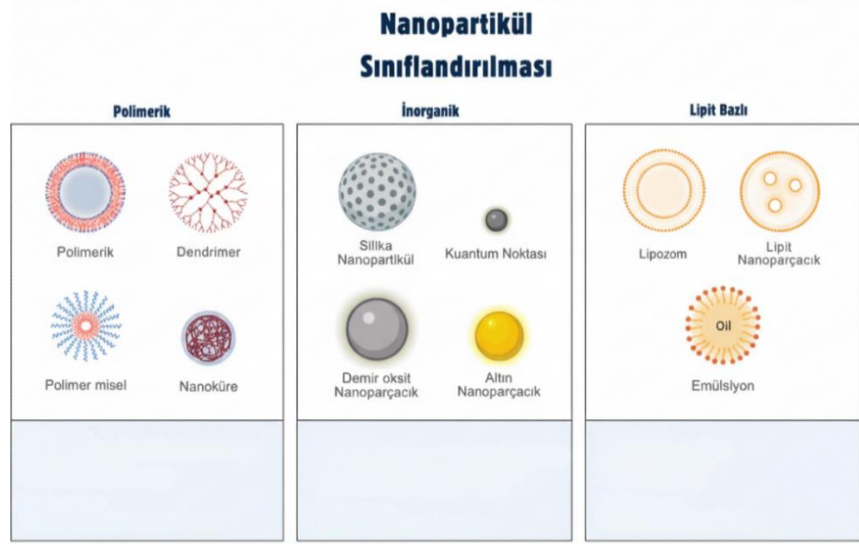
kafesli yapılardır. Görünür ışığa maruziyette oksijen üretebilmekte ve bu özellikleri dolayısıyla fotodinamik tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır (Bianco vd., 2005).

1.7.9. Lipid Nanopartiküller

Lipid nanopartiküller, sulu ortamda tek bir yüzey aktif madde ve lipid çekirdeğe sahip lipofilik sistemlerdir. Dermal, transdermal uygulamalarda ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Katı lipid nanopartiküller, lipid nano-emülsiyonlar ve nano yapıllı lipid taşıyıcılar önemli lipid nanopartikülleridir. Katı lipid nanopartikülleri, oda sıcaklığında katı halde bulunan lipidler, emülgatörler, aktif farmasötikler ve çözücülerden oluşan hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçlar taşınabilen nanotaşıyıcı sistemlerdir. Lipid nano-emülsiyonlar, su veya yağın başka bir yağ veya su içinde nano boyutlu damlacıklar halinde dağıldığı heterojen, 50-500 nm arasında damlacık boyutlarına sahip, biyoyumlu ve kolay parçalanabilen nanotaşıyıcı sistemlerdir (Mehnert & Mäder, 2001).

1.7.10. Lipozom

Lipozomlar, fosfolipitler ve kolesterolden sentezlenen, çift tabakalı membran yapısına sahip küresel nanotaşıyıcı sistemlerdir. Bu yapılar, üretimlerinde kullanılan lipid türüne ve bileşimine bağlı olarak farklı fizikokimyasal özellikler sergileyebilmektedir. Doğal lipid moleküllerinden oluşmaları sayesinde biyoyumlulukları yüksek olup, kan dolaşımında nispeten uzun süre kalabilmektedirler. Çeşitli kapsülleme teknikleri kullanılarak antikanser ilaçların lipozomlar aracılığıyla taşınmasına yönelik çok sayıda çalışma rapor edilmiştir. Lipozomal ilaç taşıma sistemlerinin, etkin maddenin sağlıklı dokulara zarar vermeden hedeflenen tümör dokusuna yönlendirilmesini sağladığı bilinmektedir (Torchilin, 2005b).



Şekil 1.6. Bazı nano dağıtım sistemlerinin şematik yapıları

1.8. Niyozom

Niyozomlar lipit bileşikler (kolesterol veya L-a-soya fosfatidilkolin) ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluşan veziküller nano taşıyıcılardır. Lipit bileşikler, niyozomlara uygun veziküler morfoloji sağlamak ve yapısal stabiliteyi arttırmak amacıyla kullanılır. İyonik olmayan yüzey aktif maddeler ise niyozom oluşumunda temel rol oynamaktadır. Niyozom formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif maddeler arasında Span serisi (Span 20, 40, 60, 80 ve 85), Tween serisi (Tween 20, 40, 60 ve 80) ile Brij serisi (Brij 30, 35, 52, 58, 72 ve 76) yer almaktadır (Ruckmani & Sankar, 2010).

Yüzey aktif madde seçimi, hidrofilik-lipofilik denge (HLB) ve kritik paketleme parametresi (CPP) değerlerine bağlıdır. Hidrofilik-lipofilik denge (HLB), yüzey aktif madde seçiminde yol gösterici olarak kullanılan, boyutsuz bir parametre olup ilaç tutma veriminin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. İyonik olmayan yüzey aktif maddeler için HLB değeri 0 ile 20 arasında değişmekte; düşük HLB değerleri lipofilik, yüksek HLB değerleri ise hidrofilik karakteri ifade etmektedir. HLB değeri 3–8 aralığında olan yüzey aktif maddeler, çift tabakalı veziküler yapıların hazırlanması için uygun kabul edilmektedir. Kritik paketleme parametresi (CPP), yüzey aktif maddenin farklı agregat yapıları oluşturma eğilimini tanımlamaktadır. Buna göre;

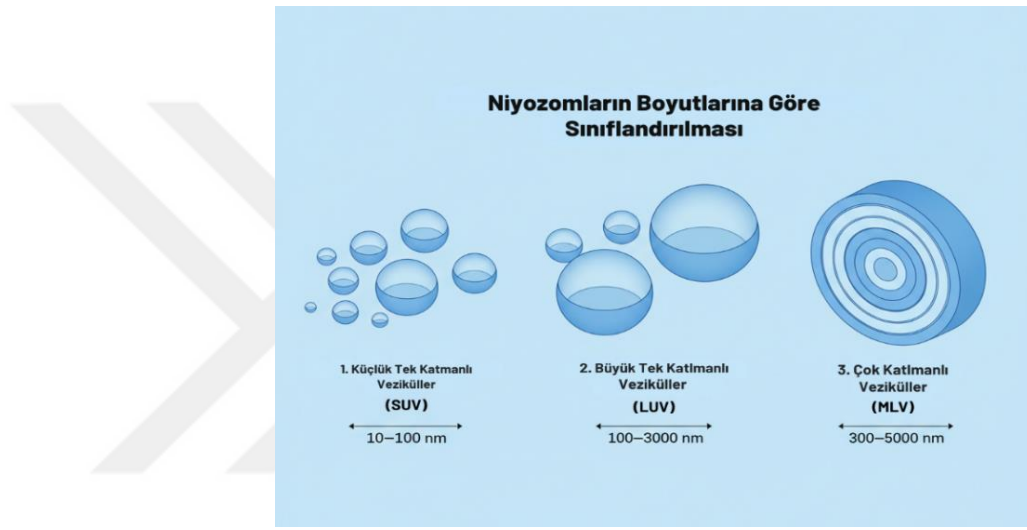
- CPP <1/3 değerlerinde küresel miseller,
- 1/3 <CPP <1/2 aralığında küresel olmayan miseller,

- $1/2 < CPP < CPP$ aralığında çift tabakalı veziküller
- $CPP \geq 1$ değerlerinde ise ters miseller oluşmaktadır.

Niyozomlar boyutlarına göre;

1. Küçük tek katmanlı veziküller (SUV) (10-100 nm)
2. Büyük tek katmanlı veziküller (LUV) (100–3000 nm)
3. Çok katmanlı veziküller (MLV) (300-5000 nm)

Olmak üzere üç kategoriye ayrılırlar (Israelachvili vd., 1976).



Şekil 1.7. Niyozomların boyutlarına göre sınıflandırılması

Niyozomlar; biyouyumlu ve biyobozunur yapıları, düşük toksisite profilleri sayesinde etkin ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Uzun süreli depolama stabilitesi göstermeleri, bu sistemlerin farmasötik uygulamalardaki kullanımını destekleyen önemli özelliklerdir. Veziküler bir taşıyıcı sistem olan niyozomlar, ilacın kontrollü, düzenli ve sürdürülebilir bir şekilde salınmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, hidrofilik, lipofilik ve amfifilik özellikteki ilaç moleküllerini taşıyabilme yetenekleri sayesinde farklı çözünürlük profillerine sahip etkin maddeler için geniş bir formülasyon esnekliği sunmaktadır. Ayrıca, enkapsüle edilen ilacın fizikokimyasal stabilitesini artırabilmekte ve uygun formülasyon stratejileri ile kan-beyin bariyerinin aşılmasına katkı sağlayarak etkin maddelerin beyin dokusuna hedefli taşınmasına olanak tanımaktadır. Niyozomların hazırlanmasında; transmembran pH gradyan yöntemi, ters faz buharlaştırma, eter enjeksiyon yöntemi, sonikasyon ve ince film hidrasyon gibi çeşitli

yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler arasında en sık kullanılan yöntem ince film hidrasyon yöntemidir (Gharbavi vd., 2018).

1.8.1. Niyozomların Avantajları

Niyozomlar lipid bazlı taşıyıcı sistemlere alternatif olarak öne çıkmaktadır. Biyouyumlulukları, üretim kolaylıkları ve çok yönlü kullanım alanları sayesinde farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda geniş bir ilgi görmektedir. Niyozomlar, biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu, immünojenik olmayan ve düşük toksisite profiline sahiptirler. Bu özellikler, niyozomların hasta uyumluluğunu artırmakta ve uzun süreli tedaviler için güvenli taşıyıcı sistemler olarak kullanılmalılarını mümkün kılmaktadır. Ayrıca ozmotik olarak aktif olmaları ve fizikokimyasal stabilitelerinin yüksek olması sayesinde, uygun koşullar altında uzun süre depolanabilmeleri önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Niyozomlar, kapsülledikleri ilaçlar için bir “rezervuar” görevi görerek ilacın kontrollü, istikrarlı ve sürdürülebilir bir şekilde salınmasına olanak tanır. Bu durum, plazma ilaç düzeylerinde ani dalgalanmaların önlenmesine ve terapötik etkinliğin uzatılmasına katkı sağlar. Veziküler yapıları sayesinde hidrofilitik, lipofilitik ve amfifilitik özellikteki ilaç moleküllerinin aynı sistem içinde taşınabilmesi, niyozomları geniş bir ilaç yelpazesi için uygun hale getirmektedir. Bununla birlikte niyozomlar, kapsüllenmiş etkin maddenin kimyasal ve enzimatik bozunmaya karşı korunmasını sağlayarak ilacın stabilitesini artırır. Özellikle transdermal uygulamalarda, stratum corneum bariyerini aşmayı kolaylaştırarak deriye nüfuzu iyileştirdiği ve lokal ya da sistemik biyoyararlanımı artırdığı gösterilmiştir. Yüzey modifikasyonu yoluyla hedef hücrelere özgüllüğün artırılması, ilacın sistemik temizlenmesini azaltarak terapötik performansın yükselmesine katkı sağlar. Ayrıca, uygun yüzey düzenlemeleri ile niyozomların kan-beyin bariyerini (KBB) aşma ve beyne ilaç taşınmasında potansiyel bir araç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir. Niyozomların hidrofilitik baş gruplarında bulunan fonksiyonel gruplar, yüzey modifikasyonunu nispeten kolay hale getirmekte; bu sayede hedefleme, dolaşım süresinin uzatılması ve hücrel etkileşimlerin düzenlenmesini mümkün kılmaktadır. Vezikül boyutu, yüzey yükü, yüzey aktif madde konsantrasyonu ve ilaç yükleme kapasitesi gibi formülasyon parametrelerinin kontrol edilebilir olması, niyozomların farklı terapötik ihtiyaçlara göre optimize edilmesine olanak tanır. Ek olarak, niyozomların oral uygulamalarda ilaçların biyoyararlanımını artırabildiği ve gastrointestinal ortamda etkin maddenin korunmasına katkı sağladığı

bildirilmektedir. Üretim açısından değerlendirildiğinde, noniyonik yüzey aktif maddelerin taşınması ve depolanması özel koşullar gerektirmemekte; niyozom hazırlama yöntemleri ise genellikle basit, tekrarlanabilir ve büyük ölçekli üretime uygun süreçler içermektedir. Bu durum, niyozomların endüstriyel uygulamalar için ekonomik ve uygulanabilir sistemler olmasını sağlamaktadır (Moghassemi & Hadjizadeh, 2014).

1.8.2. Niyozom Hazırlama Yöntemleri

Niyozomlar, noniyonik yüzey aktif maddelerin sulu ortamda kendiliğinden organize olarak çift tabakalı veziküler yapılar oluşturmasıyla elde edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemlerin fizikokimyasal özellikleri; kullanılan yüzey aktif madde tipi, kolesterol oranı, hidrasyon ortamı ve uygulanan hazırlama yöntemine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Niyozom hazırlama yöntemleri genel olarak noniyonik yüzey aktif maddelerin uygun bir hidrasyon ortamında hidrate edilmesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, literatürde niyozom üretimi için transmembran pH gradyan yöntemi, lipit tabaka hidrasyonu, ters faz buharlaştırma, eter enjeksiyonu, azot kabarcıklandırma, sonikasyon, enzimatik yöntemler, tek geçiş tekniği ve mikroakışkanlaştırma gibi farklı tekniklerin kullanıldığı bildirilmektedir (Larson & Ghandehari, 2012).

1.8.2.1. Lipit Tabaka Hidrasyon Yöntemi

Lipit tabaka hidrasyon yönteminde, öncelikle noniyonik yüzey aktif maddeler ve stabiliteyi artırmak amacıyla kolesterol gibi bileşenler, kloroform, metanol veya bunların karışımı gibi uçucu bir organik çözücü içerisinde çözülür. Elde edilen bu çözelti, döner buharlaştırıcı yardımıyla düşük basınç altında çözücünün uzaklaştırılmasıyla yuvarlak tabanlı şişenin iç yüzeyinde ince ve homojen bir lipit tabaka oluşturacak şekilde kurutulur. Bu aşamada çözücünün tamamen uzaklaştırılması, elde edilecek niyozomların stabilitesi açısından kritik öneme sahiptir. Oluşturulan kuru lipit filmi, genellikle tamponlu bir sulu faz ile belirli bir sıcaklıkta hidrate edilir. Hidrasyon sırasında yüzey aktif madde molekülleri kendiliğinden organize olarak çift tabakalı veziküler yapılar oluşturur ve çoğunlukla çok katmanlı niyozomlar meydana gelir. Elde edilen veziküllerin boyutu ve homojenliği; hidrasyon süresi, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Gerekli durumlarda sonikasyon, ekstrüzyon veya yüksek basınçlı homojenizasyon gibi ek işlemler uygulanarak daha küçük boyut dağılımına sahip niyozomlar elde edilebilmektedir. Lipit tabaka hidrasyon yöntemi,

niyozom üretiminde basit, güvenilir ve geniş ölçüde uygulanabilir bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Yöntemin sağladığı esneklik, farklı ilaç moleküllerinin kapsüllemesine ve formülasyon parametrelerinin kontrol edilmesine olanak tanımaktadır. Bu özellikleri sayesinde lipit tabaka hidrasyon yöntemi, niyozomal sistemlerin geliştirilmesinde temel bir yaklaşım olarak önemini korumaktadır (Moammeri vd., 2023).

1.8.2.2 Transmembran pH Gradyan Yöntemi

Transmembran pH gradyan yöntemi, niyozomlar içerisine özellikle zayıf bazik karaktere sahip ilaçların etkin ve kontrollü şekilde yüklenmesini sağlayan gelişmiş bir hazırlama tekniğidir. Bu yöntemin temelinde, niyozom vezikülünün iç ve dış ortamı arasında kontrollü bir pH farkı oluşturulması ve bu farktan yararlanılarak ilacın vezikül içine yönlendirilmesi yer almaktadır. Lipit tabaka hidrasyon yöntemi kullanılarak boş niyozom vezikülleri hazırlanır ve niyozomların iç fazı asidik bir tampon çözelti ile doldurulur. Daha sonra niyozomların dış ortamındaki asidik tampon, nötr veya hafif bazik bir tamponla değiştirilerek vezikül membranı boyunca bir pH gradyanı oluşturulur. Oluşturulan bu pH farkı, zayıf bazik özellikteki ilaç moleküllerinin yüksüz formda membranı geçerek niyozomun iç fazına difüze olmasını sağlar. Vezikül içerisine giren ilaç molekülleri, asidik ortamda protonlanarak yüklü hale gelir ve membranı geri geçemediği için niyozom içerisinde hapsolür. Bu aktif yükleme mekanizması sayesinde, transmembran pH gradyan yöntemi pasif yükleme yöntemlerine kıyasla daha yüksek kapsülleme verimi ve daha stabil ilaç-niyozom kompleksleri oluşturulmasına olanak tanır. Yöntemin etkinliği; pH farkının büyüklüğü, inkübasyon süresi, sıcaklık ve ilacın pKa değeri gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Uygun optimizasyon koşullarında, ilacın sızıntısı minimuma indirilerek uzun süreli ve kontrollü salım profilleri elde edilebilmektedir (Torchilin, 2014).

1.8.2.3 Ters Fazlı Buharlaştırma Yöntemi

Ters fazlı buharlaştırma yöntemi yüzey aktif maddelerin organik faz içerisinde çözündürülmesi ve sulu faz ile emülsiyon oluşturulması esasına dayanmakta olup, veziküler yapıların kontrollü şekilde oluşturulmasına olanak tanımaktadır. Özellikle hidrofilik ilaçların kapsüllemesinde sağladığı avantajlar nedeniyle, ters fazlı buharlaştırma yöntemi niyozomal ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Ters fazlı buharlaştırma yönteminde ilk olarak noniyonik yüzey aktif

maddeler ve stabiliteyi artırıcı bileşenler, genellikle kloroform veya dietil eter gibi uçucu bir organik çözücü içerisinde çözülür. Ardından kapsüllenmesi hedeflenen ilaç molekülünü içeren sulu faz, organik faza yavaşça eklenerek su-yağ (W/O) tipi bir emülsiyon oluşturulur. Bu emülsiyon, sonikasyon veya mekanik karıştırma gibi işlemlerle stabilize edilir. Daha sonra organik çözücü, düşük basınç altında kontrollü bir şekilde uzaklaştırılarak sistemin faz davranışı değiştirilir ve emülsiyon yapısı giderek çift tabakalı veziküllere dönüşür. Organik çözücünün uzaklaştırılması sırasında yüzey aktif madde molekülleri yeniden düzenlenerek geniş iç hacme sahip tek veya az katmanlı niyozomların oluşmasını sağlar. Bu özellik, özellikle hidrofilik ilaçların niyozom iç fazında daha yüksek oranda tutulmasına olanak tanımaktadır. Yöntemin etkinliği; kullanılan çözücü tipi, yüzey aktif madde/kolesterol oranı, sonikasyon süresi ve buharlaştırma koşulları gibi parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Karn vd., 2013).

1.8.2.4. Eter Enjeksiyon Yöntemi

Eter enjeksiyon yöntemi, noniyonik yüzey aktif maddelerin uçucu bir organik çözücü içerisinde çözündürülmesi ve bu çözeltinin ısıtılmış sulu faza enjekte edilmesi prensibine dayanmaktadır. Noniyonik yüzey aktif maddeler ve stabiliteyi artırmak amacıyla kolesterol gibi yardımcı bileşenler genellikle dietil eter veya benzeri uçucu bir organik çözücü içerisinde çözülür. Hazırlanan bu organik faz, kontrollü bir hızda ve ince bir akış halinde, genellikle 55–65 °C arasında tutulan sulu faz içerisine enjekte edilir. Enjeksiyon sırasında organik çözücü hızla buharlaşır ve yüzey aktif madde molekülleri sulu ortamda kendiliğinden organize olarak çift tabakalı veziküler yapılar oluşturur. Bu süreç sonucunda genellikle büyük tek katmanlı niyozomlar meydana gelmektedir. Yöntemle elde edilen niyozomların boyutu ve dağılımı; enjeksiyon hızı, iğne çapı, sulu faz sıcaklığı ve yüzey aktif madde konsantrasyonu gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Jain vd., 2014).

1.8.2.5. Azotun Kabarcıklandırılması Tekniği

Azot kabarcıklandırma yöntemi, niyozomların hazırlanmasında organik çözücü kullanımını en aza indirmesi nedeniyle dikkat çeken alternatif tekniklerden biridir. Bu yöntem, özellikle çözücü kalıntısı riskinin azaltılmasının hedeflendiği formülasyon çalışmalarında tercih edilmektedir. Bu yöntemde noniyonik yüzey aktif maddeler ve

kolesterol gibi yardımcı bileşenler, doğrudan sulu bir ortamda belirli bir sıcaklıkta çözündürülür. Ardından sistem içerisine kontrollü bir şekilde azot gazı verilerek sürekli kabarcık oluşumu sağlanır. Azot kabarcıklarının oluşturduğu mekanik etki ve karıştırma, yüzey aktif madde moleküllerinin çift tabakalı veziküler yapılara organize olmasına katkıda bulunur. Yöntem sırasında organik çözücü kullanılmaması, niyozomların toksik kalıntı içermeden hazırlanmasına olanak tanır. Bu yöntemde noniyonik yüzey aktif maddeler ve kolesterol gibi yardımcı bileşenler, doğrudan sulu bir ortamda belirli bir sıcaklıkta çözündürülür. Ardından sistem içerisine kontrollü bir şekilde azot gazı verilerek sürekli kabarcık oluşumu sağlanır. Azot kabarcıklarının oluşturduğu mekanik etki ve karıştırma, yüzey aktif madde moleküllerinin çift tabakalı veziküler yapılara organize olmasına katkıda bulunur. Yöntem sırasında organik çözücü kullanılmaması, niyozomların toksik kalıntı içermeden hazırlanmasına olanak tanır. Elde edilen niyozomların boyutu, gaz akış hızı, sıcaklık ve yüzey aktif madde konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir (Sou vd., 2008).

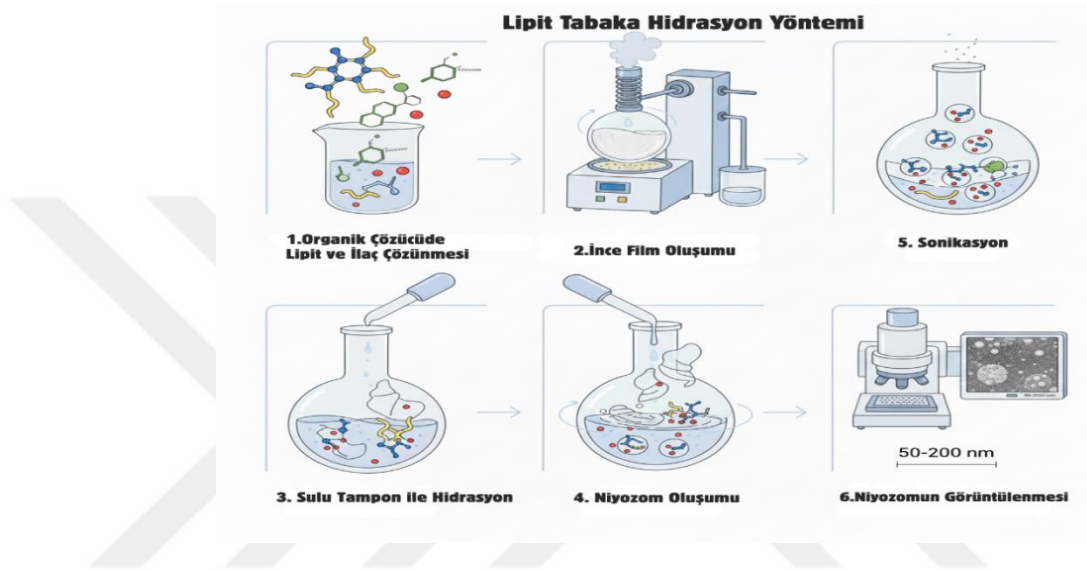
1.8.2.6. Sonikasyon Yöntemi

Sonikasyon yöntemi, niyozomların hazırlanmasında tek başına bir üretim tekniği olarak kullanılabildiği gibi, sıklıkla diğer yöntemlerle elde edilen veziküllerin boyutlarının küçültülmesi amacıyla yardımcı bir işlem olarak uygulanmaktadır. Sonikasyon işleminde, genellikle lipit tabaka hidrasyon yöntemiyle elde edilen çok katmanlı niyozom süspansiyonu, prob veya banyolu sonikatör yardımıyla ultrasonik dalgalara maruz bırakılır. Uygulanan enerji, büyük ve çok katmanlı veziküllerin daha küçük ve daha homojen yapılar hâline dönüşmesini sağlar. Sonikasyon süresi, uygulanan güç ve sıcaklık kontrolü; elde edilen niyozomların boyutu ve stabilitesi üzerinde belirleyici etkiye sahiptir. Ancak aşırı sonikasyon, vezikül bütünlüğünün bozulmasına ve kapsüllenmiş ilacın sızmasına yol açabilmektedir (Samed vd., 2018).

1.8.2.7. Mikroakışkanlaştırma Yöntemi

Mikroakışkanlaştırma yöntemi, niyozomların hazırlanmasında modern ve ileri bir teknik olarak öne çıkmakta olup, özellikle kontrollü boyut dağılımı ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlamasıyla dikkat çekmektedir. Bu yöntem, mikro ölçekli kanallar içerisinde akışkanların kontrollü etkileşimine dayanmaktadır ve son yıllarda nanotaşıyıcı sistemlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Mikroakışkanlaştırma

yönteminde, noniyonik yüzey aktif maddeler ve sulu faz ayrı akışlar hâlinde mikrokanallar içerisine beslenir. Akışkanların kontrollü çarpışması ve kesme kuvvetleri sayesinde yüzey aktif madde molekülleri düzenli bir şekilde organize olarak niyozomları oluşturur. Bu yöntemin en önemli avantajı, vezikül boyutu, polidispersite indeksi ve kapsülleme verimi gibi parametrelerin hassas bir şekilde kontrol edilebilmesidir. Ayrıca mikroakışkanlaştırma, ölçeklenebilir olması nedeniyle endüstriyel üretime uyumlu bir yaklaşım sunmaktadır (Weber vd., 2012).



Şekil 1.8. Lipit tabaka hidrasyon yöntemi ile niyozom oluşumu

1.9. Terpenler

Terpenler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve beş karbonlu izopren alt birimlerinden oluşan hidrokarbon bileşikler grubudur. Bu bileşikler, genellikle uçucu yağların ana bileşenleri olarak bulunur ve doğal ürünlerin en büyük sınıflarından biridir. Terpenler, kimyasal olarak değişime uğradıklarında "terpenoid" olarak adlandırılırlar. Terpenler içerdikleri karbon sayılarına göre sınıflandırılmaktadır. Temel birim olarak kabul edilen on karbonlu (C₁₀) monoterpen yapısı baz alınarak, içerdikleri karbon sayılarına göre sınıflandırılırlar. Terpen bileşiklerinin sistematik sınıflandırılması; seskiterpenler (C₁₅), diterpenler (C₂₀), sesterterpenler (C₂₅), triterpenler (C₃₀), tetraterpenler (C₄₀) ve (C₄₀)'tan fazla karbon içeren politerpenler şeklinde sınıflandırılmaktadır. 1960'da keşfedilen izopren, hemiterpen (C₅) kabul edilmiştir (Drasar & Khripach, 2021).

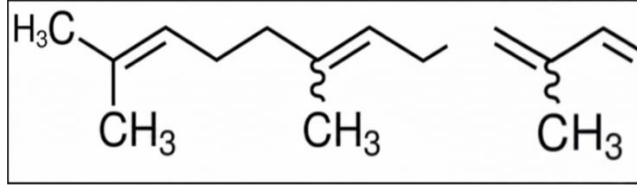
1.9.1. Seskiterpen

Seskiterpenler, terpen ailesinin önemli bir alt grubunu oluşturmakta olup, 15 karbon atomundan meydana gelen lipofilik ve genellikle renksiz doğal bileşiklerdir. Yapısal açıdan yüksek çeşitlilik göstermeleri, bu bileşiklerin biyolojik işlevlerini doğrudan etkilemektedir. Özellikle siklik yapıya sahip seskiterpenlerin biyolojik aktivite açısından daha etkin formlar olduğu bildirilmektedir. Literatürde seskiterpen laktonlarının biosentezinin ayrıntılı şekilde karakterize edildiği ve ilaç kimyası alanında yoğun olarak araştırıldığı görülmektedir. Asteraceae familyasına ait seskiterpen laktonları başta olmak üzere bu bileşikler, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok patolojik durumda terapötik potansiyel göstermeleri nedeniyle farmasötik açıdan büyük ilgi görmektedir. Geleneksel tıp uygulamalarına yönelik çalışmalar, seskiterpen laktonlarının diyare, yanıklar, influenza ve sinir sistemi bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde etkin bileşenler olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır. Bu bileşiklerin antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra, tümör hücrelerine karşı sitotoksik ve antitümör aktivite sergiledikleri de literatürde yaygın olarak rapor edilmiştir. Seskiterpen laktonlarını diğer seskiterpenlerden ayıran temel yapısal özellik, α -metilen- γ -lakton halkası içermeleridir. Ayrıca birçok seskiterpen lakton, α,β -doymamış karbonil grupları barındırmakta olup bu yapıların biyolojik aktivitede önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bileşikler; Acanthaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae ve Rutaceae gibi çok sayıda bitki familyasında tanımlanmış, biyolojik olarak aktif fitokimyasalların geniş ve yapısal açıdan zengin bir grubunu oluşturmaktadır. Üç izopren biriminin kafa-kuyruk kondenzasyonu ile oluşan öncül yapıların siklizasyon ve oksidatif dönüşüm basamaklarından geçmesiyle sentezlenen seskiterpen laktonlar, uçucu yağların önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. Bu grup içerisinde yer alan farnesen, ilk olarak elma kabuklarında tanımlanmış ve bitkinin savunma mekanizmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Farnesenin *Matricaria recutita* L., *Artemisia lavandulaefolia* ve *Asarum insigne* gibi bitkilerde farklı oranlarda bulunduğu rapor edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar, özellikle β -farnesenin antioksidan, antifungal, antimikrobiyal ve antibakteriyel özellikler sergilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca farnesenin vazodilatör etkisinin deneysel olarak gösterildiği bildirilmektedir. Bir diğer önemli terpen bileşiği olan terpinolen, cam balzamu, turunçgiller, ardıç ve *Myristica* türlerinden damıtma yöntemiyle elde edilen bir monoterpendir ve genellikle aroma ve koku verici madde olarak kullanılmaktadır.

Terpinolenin biyolojik etkileri, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. İnsan kan plazması ile gerçekleştirilen inkübasyon çalışmalarında, belirli konsantrasyonların üzerinde terpinolenin LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca nöronal hücre modellerinde yapılan çalışmalar, terpinolenin doza bağlı olarak toplam antioksidan kapasiteyi artırabildiğini ve oksidatif stres parametrelerini modüle edebildiğini ortaya koymuştur (Sommano vd., 2020).

1.9.1.1. Farnesen

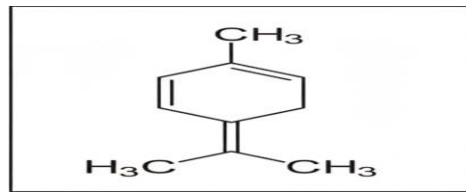
Farnesen, bitkisel uçucu yağlarda yaygın olarak bulunan ve seskiterpen sınıfına ait bir terpen bileşiğidir. Doğada genellikle bitkilerin çevresel stres faktörlerine ve biyotik tehditlere karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarının bir parçası olarak sentezlenmektedir. Kimyasal yapısı ve lipofilik karakteri nedeniyle biyolojik membranlarla etkileşime girebilme kapasitesi, farneseni farmasötik ve biyomedikal araştırmalar açısından ilgi çekici bir molekül haline getirmiştir. Literatürde farnesinin antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktiviteler sergilediği gösterilmiştir. Özellikle β -farnesen izomerinin, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde hücre membran bütünlüğünü bozarak antimikrobiyal etki oluşturduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra, farnesinin reaktif oksijen türlerini (ROS) baskılayıcı etkisi sayesinde oksidatif stresle ilişkili hücre hasarı azaltabildiği ifade edilmektedir. Literatürde farnesinin antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktiviteler sergilediği gösterilmiştir. Özellikle β -farnesen izomerinin, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde hücre membran bütünlüğünü bozarak antimikrobiyal etki oluşturduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra, farnesinin reaktif oksijen türlerini (ROS) baskılayıcı etkisi sayesinde oksidatif stresle ilişkili hücre hasarı azaltabildiği ifade edilmektedir. Antikanser potansiyeli açısından değerlendirildiğinde, farnesinin hücre döngüsü düzenleyici proteinler üzerinde etkili olabildiği ve bazı tümör hücre hatlarında proliferasyonu baskıladığı rapor edilmiştir (Edris, 2007). Nörodejeneratif hastalıklar bağlamında ise, farnesinin antioksidan kapasitesi dolaylı olarak önem taşımaktadır. Parkinson hastalığı modellerinde temel patofizyolojik mekanizmalardan biri olan oksidatif stresin azaltılmasının, dopaminerjik nöronların korunmasında kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bu çerçevede, farnesen içeren uçucu yağ fraksiyonlarının MPTP ve 6-OHDA ile oluşturulan deneysel Parkinson modellerinde nöroprotektif etkilere katkı sağlayabileceği öne sürülmektedir (Turkez vd., 2013).



Şekil 1.9. Farnesen molekülünün kimyasal yapısı

1.9.1.2. Terpinolen

Terpinolen, monoterpenler sınıfında yer alan ve başta turuncgiller, ardıç ve bazı aromatik bitkiler olmak üzere birçok bitkisel kaynaktan bulunan uçucu bir bileşiktir. Hoş aromatik karakteri nedeniyle gıda ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra, biyolojik aktiviteleri nedeniyle farmakolojik araştırmalarda da dikkat çekmektedir. Terpinolenin antibakteriyel ve antifungal etkileri, özellikle hücre zarında lipid peroksidasyonunu tetikleyerek mikroorganizmaların canlılığını azaltmasıyla ilişkilendirilmektedir. Çeşitli çalışmalarda, terpinolenin *Candida* türleri ve bazı patojen bakterilere karşı anlamlı inhibisyon sağladığı bildirilmiştir. Antioksidan kapasitesi açısından terpinolen, LDL oksidasyonunu baskılayabilen ve hücrel redoks dengesini koruyabilen bir monoterpen olarak tanımlanmaktadır. Nöronal hücre kültürlerinde yapılan deneyler, terpinolenin toplam antioksidan kapasiteyi artırabildiğini ve oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını sınırlayabildiğini göstermiştir. Bu özellik, Parkinson hastalığı patogeneğinde merkezi rol oynayan mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres mekanizmalarıyla doğrudan ilişkilidir (Aydın vd., 2013).

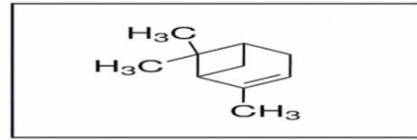


Şekil 1.10. Terpinolen molekülünün kimyasal yapısı

1.9.1.3. Alfa-Pinen

Pinen ($C_{10}H_{16}$), bisiklik yapıya sahip, çift bağ içeren bir terpenoid hidrokarbon olup, monoterpenler sınıfında yer almaktadır. α -Pinen ve β -Pinen, yapısal olarak birbirlerinin izomeri olup, doğada en yaygın bulunan monoterpenoidler arasında yer almaktadır. α -Pinen, renksiz, suda çözünmeyen; buna karşın yağda ve etanolde

çözünebilen organik bir sıvıdır ve 155 °C kaynama noktasına sahiptir. α -Pinen; Pinus türleri (çam), Salvia türleri (adaçayı), Rosmarinus officinalis (biberiye), Helichrysum türleri, Pistacia vera (fıstık), siyah erik ve Cannabis sativa gibi başta iğne yapraklı bitkiler olmak üzere en az 40 farklı esansiyel yağın bileşiminde yer almaktadır. Literatürde α -Pinenin, antifungal, antiviral ve antimikrobiyal özellikler başta olmak üzere çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca α -Pinenin; hücre döngüsünün modülasyonu, antioksidan ve antiinflamatuvar etki ile apoptozun indüklenmesi gibi farklı moleküler mekanizmalar aracılığıyla antikanserojen aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomuna karşı α - ve β -Pinenin antikanser etkileri tanımlanmış; bunun yanı sıra meme kanseri ve lösemi hücre hatlarında hücresel proliferasyonu inhibe edici etkiler sergiledikleri bildirilmiştir (Little & Croteau, 2002).



Şekil 1.11. α -Pinen molekülünün kimyasal yapısı

1.9.1.4. Karvon

Karvon ($C_{10}H_{14}O$), monoterenoidler sınıfında yer alan ve yapısında keton fonksiyonel grubu bulunan oksijenli bir terpen bileşimidir. Doğada R(-)-karvon ve S-(+)-karvon olmak üzere iki enantiyomer halinde bulunmakta olup, bu izomerler farklı bitki türlerinde karakteristik aroma ve biyolojik özellikler göstermektedir. Karvon, özellikle kimyon, dere otu ve yeşil nane gibi bitkilerin uçucu yağlarında yüksek oranlarda yer almaktadır. Literatürde karvonun antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca karvonun, hücre proliferasyonunun baskılanması, oksidatif stresin modülasyonu ve apoptozun indüklenmesi gibi mekanizmalar aracılığıyla antikanser potansiyel sergilediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, karvonun farklı kanser hücre hatlarında hücresel büyümeyi inhibe edici etkilere sahip olduğunu ve doğal kaynaklı terapötik ajanlar arasında değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Pina vd., 2022).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sahoo ve ark. 2024 yılında yapmış olduğu bir çalışmada terpenoidlerin kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyelini ele aldıkları derleme çalışmalarında, bu doğal bileşiklerin çeşitli kanser türlerine karşı umut verici antikanser etkiler sergilediğini bildirmiştir. Çalışmada terpenoidlerin başlıca etki mekanizmalarının apoptozun indüklenmesi, hücre döngüsünün durdurulması ve anjiyogenez ile metastazın baskılanması olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca bazı terpenoidlerin, doksorubisin, sisplatin, paklitaksel ve 5-florourasil gibi konvansiyonel kemoterapötik ajanlarla sinerjik etki gösterdiği ve ilaç direnci gelişmiş kanser hücrelerine karşı da etkin olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular terpenoidlerin kanser tedavisinde tamamlayıcı veya alternatif antikanser ajanlar olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Sahoo vd., 2024).

Guo ve meslektaşları 2024 yılında yapmış olduğu bir çalışmada terpenoidlerin antikanser potansiyelini mitokondriyal hücre ölümü yolakları odağında inceleyen bir derleme sunmuşlardır. Çalışmada; seskiterpen, diterpen ve triterpen sınıfı bileşiklerin malign hücrelerde mitokondri üzerinden apoptoz, otofaji, piroptoz, nekroptoz ve ferroptoz gibi çeşitli ölüm mekanizmalarını tetikleyebildiği vurgulanmaktadır. Yazarlar terpenoidlerin klinik kullanımını kısıtlayan düşük stabilite ve yetersiz biyoyararlanım sorunlarına dikkat çekerek bu engellerin aşılmasında kimyasal modifikasyonlar ve kombinasyon kemoterapisi yaklaşımlarının kritik rol oynadığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak bu kapsamlı inceleme terpenoidlerin mitokondri odaklı yeni nesil antikanser stratejilerinde temel bir bileşen olarak kullanılabileceğine dair güçlü bir bilimsel zemin oluşturmaktadır (Guo vd., 2024).

Mahmoud ve meslektaşları 2018 yılında yapmış olduğu bir çalışmada kan-beyin bariyerinin (BBB) geçirgenlik kısıtlamalarını aşarak glioblastoma tedavisinde etkinliği artırmak amacıyla temozolomid yüklü, akıllı bir niosomal platform geliştirmişlerdir. Bu sistemde, temozolomid içeren niosomların yüzeyi, tümör hücrelerini seçici olarak tanıma yeteneğine sahip klorotoksin peptidi ile modifiye edilmiştir. Araştırma sonuçları nano ölçekli ve aktif hedefleme kapasiteli bu taşıyıcı sistemin ilacın beyin dokusundaki birikimini yaklaşık 3 kat artırdığını ve sistemik dolaşım yoluyla diğer organlara dağılımını önemli ölçüde azalttığını kanıtlamıştır. Elde edilen veriler yüzeyi peptidlerle fonksiyonelleştirilmiş nanotaşıyıcıların kan-beyin bariyerini geçmede ve beyin

tümörlerine yönelik hedeflendirilmiş kemoterapi uygulamalarında stratejik bir avantaj sunduğunu ortaya koymaktadır (Mahmoud vd., 2018).

Varshney ve meslektaşları 2023 yılında yapmış olduğu bir çalışmada beyne yönelik akıllı ilaç dağıtım stratejilerini inceledikleri çalışmalarında niyozomları yüksek stabilite ve biyoyararlanım sunan öncü lipid bazlı nanoveziküller olarak tanımlamışlardır. Araştırmada niyozomların kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilme yetenekleri sayesinde özellikle kompleks nörolojik hastalıkların tedavisinde stratejik birer nanotaşıyıcı platformu haline geldikleri vurgulanmıştır. Bununla birlikte niyozomal sistemlerin laboratuvar ölçeğinden klinik uygulamalara başarıyla aktarılabilmesi için formülasyon optimizasyonu, salım kinetiğinin kontrolü ve endüstriyel ölçeklenebilirlik gibi kritik aşamaların henüz geliştirilmeye muhtaç olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak çalışma niyozomların beyin hedefli yeni nesil tedavi yaklaşımlarında umut verici bir potansiyel taşıdığını, ancak ticarileşme süreci için kapsamlı araştırmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır (Varshney vd., 2023).

Agarwal ve arkadaşları 2018 yılında yapmış olduğu bir çalışmada suda çözünürlüğü düşük olan morusinin biyoyararlanım kısıtlamalarını aşmak ve antikanser etkinliğini artırmak amacıyla niyozomal bir taşıyıcı sistem tasarlamışlardır. İnce tabaka hidrasyon yöntemiyle hazırlanan Span 60 ve kolesterol tabanlı bu niyozomal formülasyonun, morusini %97 gibi yüksek bir verimle hapsettiği saptanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları; yaklaşık 479 nm boyutunda, homojen ve küresel morfolojiye sahip niyozomların yüksek biyoyuymuluk sergilediğini göstermiştir. Araştırma bulguları niyozomal sistemin morusine göre daha iyi bir dağılıbilirlik ve kontrollü salınım profili sunduğunu ortaya koymuştur. Bu farmakokinetik avantajların farklı kanser hücre hatları üzerinde serbest morusine kıyasla daha güçlü bir antitümoral etki sağladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışma morusinin niyozomal taşıyıcılar ile sunulmasının, hedefe yönelik kemoterapi stratejileri için umut verici bir alternatif olduğunu kanıtlamaktadır (Agarwal vd., 2018).

Qian ve meslektaşlarının 2025 yılında yaptığı bir çalışmada, geleneksel kemoterapötiklerin kan-beyin bariyerini (BBB) aşmadaki yetersizliği ve sistemik toksisite risklerine çözüm olarak yüzeyi transferrin ile modifiye edilmiş kurkumin yüklü niyozomal bir platform geliştirmişlerdir. Span 60 ve kolesterol temelinde hazırlanan bu biyobozunur sistem BBB üzerindeki reseptörler aracılığıyla transositozu tetiklemek ve ilacın beyne iletimini optimize etmek amacıyla transferrin ile fonksiyonelleştirilmiştir.

Araştırmadan elde edilen veriler hazırlanan transferrin-kurkumin-niyozom (TF-Cur-Nio) kompleksinin glioma dokularına spesifik hedefleme sağladığını ve antitümoral etkinliği belirgin şekilde artırdığını göstermiştir. Ayrıca *in vivo* çalışmalar bu sistemin yüksek biyouyumluluk sergilediğini ve yan etkileri minimize ettiğini doğrulamıştır. Sonuç olarak çalışma ligand modifikasyonuna dayalı niyozomal nanotaşıyıcıların, glioma tedavisinde karşılaşılan farmakolojik engelleri aşmada stratejik bir yaklaşım sunduğunu kanıtlamaktadır (Qian vd., 2025).

Pourmoghadasian ve meslektaşları (2022), paklitaksel yüklü niyozomal bir sistem geliştirerek bu formülasyonun meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Box–Behnken tasarımıyla optimize edilen niyozomların, 192 nm boyutunda ve %94,7 enkapsülasyon verimliliğinde olduğu; ayrıca pH bağımlı kontrollü salım özelliği sergilediği saptanmıştır. Farklı meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7, T-47D, SKBR3 ve MDA-MB-231) yürütülen *in vitro* analizler niyozomal paklitakselin serbest ilaca oranla daha yüksek antikanser etkinlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Özellikle Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranındaki artış, niyozomal taşıyıcının hücreleri apoptoza sevk etmede stratejik bir avantaj sunduğunu ortaya koymaktadır (Pourmoghadasian vd., 2022).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışması boyunca kullanılan tüm kimyasallar ve alındığı firmalara ait bilgiler Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi

Kitler	Alındığı Firma
MTT Kiti	Ecotechbiotechnology (Türkiye)
LDH Assay Kit	Thermo Scientific™ (ABD)
TAK Kiti	Rel Assay Diagnostics
TOD Kiti	Rel Assay Diagnostics
DMEM-F12	Gibco™
DMEM	Gibco™
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco® (ABD)
Retinoik asit	Sigma-Aldrich®
L-Dopa	Sigma-Aldrich®
Tripan Blue	Thermo Fisher Scientific® (ABD)
Sitoklazin-B	Chem cruz®(ABD)
PBS	Sigma-Aldrich®
Tripan Blue	Sigma-Aldrich®
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich®
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich®
Etanol	Sigma-Aldrich®
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich®
Kloroform	Sigma-Aldrich®
Kolesterol	Sigma-Aldrich®
Span 60	Sigma-Aldrich®
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich®

3.1.2. Cihazlar

Tez çalışması boyunca kullanılan tüm cihazların marka ve modeline ait bilgiler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan cihazların marka ve modeline ait bilgiler

CO2'li Hücre Kültürü İnkübatörü	ESCO Celculture
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Rotary Evaporatör	Onilab RE100
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
Derin dondurucu – 86, Büyük Boy	Esco, uus-439b
Su Banyosu	ESCO
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Otoklav	JSR, JSAC-60
Analitik Terazı (0,0001)	Shimadzu ATX 224
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Taramalı Elektron Mikroskobu	Quanta FEG 250
Enerji Dağılım Spektroskopi	Quanta FEG 250
Zetaseizer	Malvern Zetasizer Nano Series
UV-vis spektrofotometre	Biotek EPOCH

3.1.3. Kullanılan Hücre Hatları

Tez çalışması boyunca kullanılan hücre hatları cihazları ve katalog numarasına ait bilgiler Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan hücre hatları cihazları ve katalog numarası

Kullanılan Hücre Hatları	Katalog Numarası
İnsan Dermal Fibroblast Hücre Hattı (HDFa)	ATCC® PCS-201-012™
İnsan Nöroblastoma Kanseri Hücre Hattı (SHSY-5Y)	ATCC® CRL-2266™

3.2. Metot

3.2.1. Niyozomal Nano Partiküllerin Hazırlanması

Span 60 ve kolesterol, 1:1, 1:2 ve 1:3 oranlarında, bir çözücü karışımı olan kloroform ve metanol (9 ml, 2:1 hacim oranı) içerisinde çözülerek birleştirilmiştir. Karışım, 50 ml'lik yuvarlak tabanlı bir şişeye aktarılıp ,60°C'ye ayarlanmış bir döner buharlaştırıcı (Heidolph, Almanya) kullanılarak bir saat boyunca azaltılmış basınç altında buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma sonucunda, şişenin iç yüzeyinde ince bir film oluşumu gözlemlenmiştir. Oluşan ince film, 60°C'de 10 ml PBS (pH 7) ile yeniden sulandırılmıştır. Yeniden sulandırılmış film, homojen bir dağılım sağlamak amacıyla 7 dakika boyunca bir prob sonikatörü kullanılarak ultrasonik dispersiyona tabi tutulmuştur.

3.2.2. Karakterizasyon

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elementel analizler niyozomal nano yapılar için gerçekleştirildi. Zeta potansiyel analizi partikül büyüklüğü ve partikül polidispersite endeksini belirlemek için bir Zetasizer kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3. İn vitro toksisite çalışması

3.2.3.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü

SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı, retinoik asit (RA) kullanılarak nöron benzeri hücrelere farklılaştırılmış ve doğal terpenlerin in vitro toksisite çalışmasında kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal bovin serum (FBS) ile desteklenmiş DMEM: F12 besiyeri ortamında kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Farklılaştırma işlemi, hücrelere 10 µM retinoik asit içeren taze besiyerinin eklenmesiyle başlatılmıştır. Üç günlük inkübasyon süresinin ardından kültürler fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkanmış ve hücreler DMEM: F12 besiyeri içerisinde inkübasyona devam edilmiştir. Hücrelerin olgun nöron benzeri fenotipe farklılaşması, morfolojik değişimlerin incelenmesi ve akış sitometri sistemi kullanılarak gerçekleştirilen hücre döngüsü analizleri ile değerlendirilmiştir. Akış sitometri analizleri için hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla kültür kaplarına 3 mL tripsin-EDTA eklenmiş ve kaplar 37 °C'de, %5 CO₂ atmosferinde 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tripsin-EDTA aktivitesi, 6 mL taze DMEM: F12 besiyeri ilavesiyle durdurulmuştur. Elde edilen hücre süspansiyonu nazik pipetaj ile homojenize edilerek 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve hücreler 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek

çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, hücre peleti taze DMEM: F12 besiyeri içerisinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla hücre süspansiyonundan 25 µL alınarak 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılmış; canlı ve ölü hücrelerin sayımı Thoma lamı kullanılarak ışık mikroskobu altında 100× büyütmede gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. MTT analizi

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür], canlı hücreler tarafından koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine [(2E,4Z)-4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan] indirgenen sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. Bu dönüşüm, yalnızca metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştiğinden, hücre canlılığının ve sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre canlılığı ve niyozomlara yüklenen Farnesen, Terpinolen, a-pinen, Karvon doğal terpenlerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, üretici firmanın talimatları doğrultusunda (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, ABD) MTT canlılık testi uygulanmıştır. Bu kapsamda, dönüştürülmüş SH-SY5Y hücreleri %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren taze DMEM: F12 besiyeri kullanılarak 96 oyuklu hücre kültür plakalarına, her bir oyuğa 1×10^4 hücre düşecek şekilde ekilmiştir. Hücrelerin adezyon ve proliferasyonunun sağlanması amacıyla plakalar, %5 CO₂ içeren ve 37 °C'de ayarlanmış hücre kültür inkübatöründe 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, niyozomlara yüklenen doğal terpenlerin farklı konsantrasyonları üç tekrarlı olarak hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak herhangi bir kimyasal madde uygulanmayan canlı dönüştürülmüş SH-SY5Y hücreleri kullanılırken, pozitif kontrol grubu Triton X-100 ile muamele edilen hücrelerden oluşturulmuştur. Uygulamanın ardından hücreler 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda, hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırılmış ve kültür plakaları PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Her bir oyuğa 10 µL MTT reaktifi eklenmiş ve plakalar 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan formazan ürünlerinin absorbans değerleri, mikropilaka okuyucu kullanılarak 590 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hücre canlılığı, aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve doza bağlı hücre canlılığı grafikleri oluşturulmuştur:

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Negatif kontrol Absorbansı} - \text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Negatif Kontrol Absorbansı} - \text{Pozitif Kontrol Absorbansı}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.4 Niyozomal nanopartiküllere doğal terpenlerin yüklenmesi ve salınım potansiyellerinin değerlendirilmesi

Doğal Terpenlerin (Farnesen, Terpinolen, a-pinen, Karvon) niyozomlar içerisinde kapsülleme etkinliği, kapsüllenmemiş doğal Terpen miktarının belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Bu amaçla, niyozomal karışımlar 4 °C'de, 4000 rpm hızında 20 dakika boyunca santrifüj edilerek, serbest doğal terpenler süpernatanttan ayrılmıştır. Ayrılan süpernatant, Amicon Ultra santrifüj filtre ünitesi (Millipore Merck) kullanılarak toplanmıştır. Serbest doğal terpenlerin optik yoğunluğu her bir molekülün maksimum tepe noktası belirlenerek, niyozomal formülasyona yüklenen miktar bu tepe noktasında çalışan bir UV-Vis spektrofotometresi (Ependroff® 580R santrifüj, Almanya) ile ölçülmüştür. Süpernatanttaki serbest doğal terpen 'in konsantrasyonu belirlenmiş, kapsüllemiş ilacın miktarı hesaplanmıştır. Kapsülleme etkinliği yüzdesi, başlangıçtaki doğal terpen konsantrasyonu (Ci) ile santrifüj sonrası serbest doğal terpen konsantrasyonu (Cf) karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

3.2.5 İlaç yüklü nano taşıyıcı sistemin in vitro parkinson hastalık modelinde etkinliğinin değerlendirilmesi

3.2.5.1. SH-SY5Y'den Olgun Nöron Dönüşümü

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı, 2 mM L-glutamin, penisilin (20 ünite/mL), streptomisin (20 µg/mL) ve %15 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serumu (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich®, ABD) içerisinde kültüre edilmiştir. Hücreler, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde inkübe edilmiştir.

Hücreler, daha önceden 0,05 mg/mL kollajen ile kaplanmış kültür yüzeylerine 1×10^4 hücre/cm² yoğunluğunda ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra, diferansiyasyonun başlatılması amacıyla, %5 FBS içeren DMEM içerisinde 10 µM all-trans-retinoik asit (RA) ilave edilmiştir. Hücreler, 5 gün boyunca RA varlığında inkübe edilmiştir. Beşinci günün sonunda, hücreler RA içeren ortamdan uzaklaştırılarak DMEM ile üç kez yıkanmış ve ardından 50 ng/mL beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) içeren ortamda farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin olgun nöron benzeri hücrelere farklılaşması morfolojik incelemeler ve akış sitometri sistemi kullanılarak hücre döngüsü analiziyle belirlenmiştir.

3.2.5.2. SH-SY5Y Hücre Hattıyla In vitro Parkinson Modelinin Oluşturulması

SH-SY5Y nöroblastom hücre hatları retinoik asit (RA) kullanılarak nöron benzeri yapılara dönüştürülebilir ve in vitro Parkinson hastalığı çalışmalarında kullanılabilir. %10 FBS ile desteklenmiş DMEM: F12 besiyeri ortamında kültüre alınarak çoğaltılan SH-SY5Y hücrelerine 10 µM RA içeren taze besiyerinden eklenerek hücre farklılaştırma çalışması yapılmıştır. 7 günün ardından kültürler PBS ile 3 kez yıkanmış ve DMEM: F12 içerisinde inkübe edilmiştir. Hücrelerin farklılaşması akış sitometri sistemi kullanılarak hücre döngüsü analiziyle belirlenmiştir. Ardından MPP+ molekülü geniş konsantrasyon aralığında (8,62 µg/ml, 16,13 µg/ml, 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) hücre kültürüne eklenerek hücrelerin %50'sini öldüren doz (IC50) hesaplanmıştır.

3.2.5.3. İlaç Formülasyonlarının In vitro Parkinson Modeli Üzerindeki Toksikitesinin Belirlenmesi

Hücresel farklılaşması tamamlanmış ve IC50 konsantrasyonunda MPP+ eklenmiş hücre kültürlerine 3 tekrar halinde farklı konsantrasyon aralığında hazırlanmış nano ilaç formülasyonları uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak dönüştürülmüş hücre kültürleri ve pozitif kontrol olarak sadece MPP+ uygulanmış hücre kültürleri sentezlenen moleküller eklenmeden kullanılmıştır. Oluşturulacak in vitro Parkinson Hastalığı modelinde canlılık oranları MTT sitotoksikite testiyle analiz edilmiştir.

3.2.5.4. MTT Analizi

24 saat süre ile IC50 konsantrasyonunda MPP+ eklenmiş ve belirli konsantrasyon aralığındaki nano ilaç formülasyonu ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücre kültürleri sitotoksikitenin belirlenebilmesi amacıyla MTT testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla eski besiyeri uzaklaştırılan kuyulara 10µl MTT reaktifi eklenmiş kültür plakaları 3 saat süre ile 37°C 'de %5 CO2 içeren kültür inkübatöründe tutulmuştur. Süre sonunda formazan kristallerinin oluşturulması amacıyla kuyulara 100µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Plakanın 590 nm'de spektrofotometre yardımıyla absorbansları kaydedilmiştir.

3.2.5.5. Akış sitometri analizi

Akış sitometrisi analizi için diferansiye edilen SH-SY5Y hücreleri, 6 kuyulu kültür plakalarına kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, ilaç yüklü nanopartiküller 50µg/mL nihai ilaç konsantrasyonunda hücre kültürlerine ilave edilmiş ve hücreler ek olarak 24 saat inkübe edilmiştir. Deney süresinin sonunda kültür ortamı uzaklaştırılmış, hücreler iki kez soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış ve 100 µL tripsin-EDTA kullanılarak yüzeyden ayrılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 0,5 mL 1X bağlanma tamponu içerisinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Takiben, hücre süspansiyonuna 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL propidyum iyodür eklenmiş ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Boyanan hücreler akış sitometrisi cihazı (CyFlow® Cube 6, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir. Herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmamış hücreler negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.6. Mikroçekirdek Analizi

Nöron benzeri hücreye dönüştürülen SH-SY5Y hücre hattı DMEM:12 temel besiyerinde konfluensiye ulaşmaya kadar büyütülmüştür. Oluşturulan nano ilaç konjugatlarının SH-SY5Y hücre çekirdeklerinde neden olabilecekleri mutasyonların saptanması amacıyla Hoechst 33258 floresan boyama tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla 24 saat süre ile belirli konsantrasyon aralığındaki nano ilaç formülasyonu ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücre kuyularından eski besiyeri uzaklaştırılacak ardından birkaç kez PBS ile yıkama yapılmıştır. %4 paraformaldehit ile 4°C'de 30dk muamele edilerek kuyulara fikse edilecek olan hücreler bu basamaktan sonra PBS ile tekrar yıkanmıştır. Son olarak 1µM Hoechst 33258 floresan boyasından kuyulara eklenmiştir. Boya ile 5dk inkübasyonun ardından hücreler floresan mikroskobu (Leica® DM IL LED) ile incelenerek fotoğraflar kaydedilmiştir.

3.2.5.7. Toplam Antioksidan Kapasitesinin (TAK) Belirlenmesi

Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan düzey (TOD) ölçümleri, ticari olarak temin edilen test kitleri kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye). TAK analizinin prensibi, numunede bulunan antioksidan bileşenlerin ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) radikal katyonunu indirgemesi esasına

dayanmaktadır. Bu indirgeme reaksiyonu sonucunda koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikali renksiz formuna dönüşmekte olup, 660 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değişimi, numunenin toplam antioksidan kapasitesi ile doğru orantılıdır. Ölçümler, yaygın olarak referans antioksidan standart olarak kullanılan Trolox (vitamin E analogu) ile kalibre edilmiştir ve sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L cinsinden ifade edilmiştir. Rel Assay Diagnostics® firmasına ait TAS (Total Antioxidant Status) kitleri (Erel, 2004) kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde, her bir kuyucuğa 30 µL örnek eklenmiş ve üzerine 500 µL Reaktif 1 ilave edilerek 660 nm'de ilk absorbans değeri kaydedilmiştir. Ardından aynı kuyucuklara 75 µL Reaktif 2 eklenmiş ve plakalar oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda 660 nm'de ikinci absorbans ölçümü alınmıştır. Elde edilen absorbans farkları kullanılarak TAK düzeyleri aşağıda verilen eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır:

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

3.2.5.8. Toplam Oksidant Durumu (TOD) Tayini

TOD analizinde ise numunedeki oksidan moleküllerin, ferroz iyon-şelatlayıcı kompleksini ferrik iyonla oksitlemesi esas alınmıştır. Bu oksidasyon reaksiyonu, ortamda bulunan yükseltici (amplifikatör) moleküller aracılığıyla güçlendirilmekte ve oluşan ferrik iyonlar asidik koşullarda bir kromojen ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Ortaya çıkan renk yoğunluğu, spektrofotometrik olarak ölçülmekte ve numunedeki toplam oksidan miktarı ile ilişkilendirilmektedir. TOD ölçümleri hidrojen peroksit (H₂O₂) standartları ile kalibre edilmiş olup, sonuçlar µmol H₂O₂ eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir.

$$\text{TOD (µmol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L)} = \frac{\Delta\text{Örneğin değeri}}{\Delta\text{Standart 2'nin değeri}} \times \Delta\text{Standart 2'nin değeri} \quad (3)$$

3.2.5.9. *In Vitro* Kan Beyin Bariyeri Modeli

In vitro kan-beyin bariyeri (KBB) modelleri, KBB geçirgenliğini analiz etmek amacıyla bir transwell kültür sistemi kullanılarak oluşturulmuştur. İlk olarak, bEnd.3 hücreleri, 1x10⁵ hücre/kuyu başlangıç yoğunluğunda plakanın zarına ekildi ve %10 fetal bovine serumu ile desteklenerek DMEM büyüme ortamında yaklaşık bir hafta boyunca kültüre edilecektir. Ardından, bEnd.3 hücre monolayerleri içeren üst bölmeler, alt bölmelerin tabanına kaplanmış SHSY-5Y hücrelerinin bulunduğu plakalara transfer

edilmiştir. Sonrasında, taşıyıcı partiküller, KBB modellerinin apikal üst bölmelerine 0,1 mg/mL son konsantrasyon olacak şekilde ekilecektir. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, alt katmandaki SHSY-5Y hastalık modelinde geçirgenlik kapasitesini değerlendirmek amacıyla canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

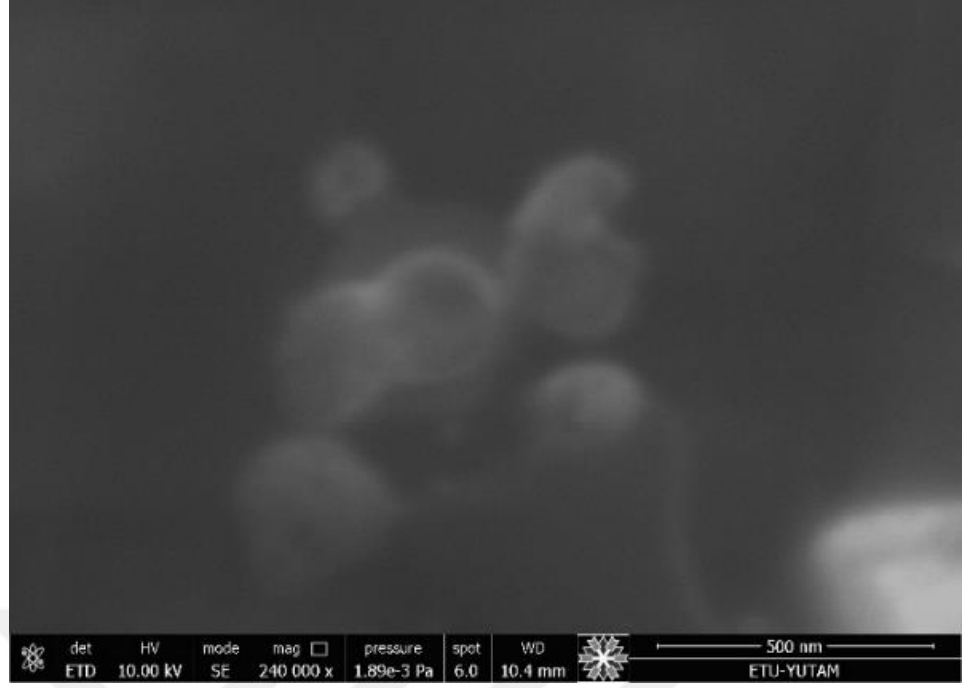
İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde, kontrole karşı karşılaştırmalar için Dunnett testi ve çoklu grup karşılaştırmaları için Tukey post-hoc testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak kabul edilmiş olup $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism yazılımı (versiyon 7.0) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

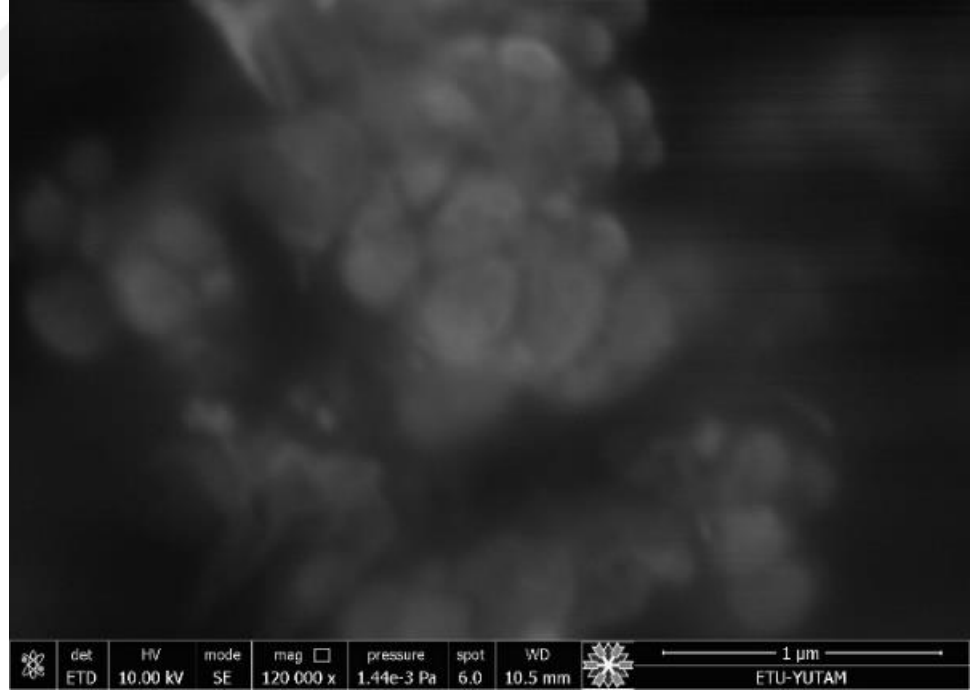
4.1 Niyozomal Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyon

Bu çalışmada, noniyonik yüzey aktif madde temelli niyozomal nanopartiküller, Span 60 ve kolesterol kullanılarak farklı molar oranlarda (1:1, 1:2 ve 1:3) başarıyla sentezlenmiştir. Yüzey aktif madde ve kolesterol, kloroform ve metanol içeren (2:1, v/v) organik çözücü karışımı içerisinde tamamen çözündürülerek homojen bir faz elde edilmiştir. Hazırlanan bu karışımın, yuvarlak tabanlı cam şişe içerisinde döner buharlaştırıcı altında kontrollü sıcaklık ve azaltılmış basınç koşullarında işlenmesi sonucunda, şişe iç yüzeyinde homojen ve süreklilik gösteren ince bir film tabakası oluştuğu gözlemlenmiştir. Elde edilen ince filmin fosfat tamponu (PBS, pH 7) ile yeniden sulandırılmasıyla birlikte, yüzey aktif madde moleküllerinin kendiliğinden organize olarak veziküler yapılar oluşturduğu değerlendirilmiştir. Hidratasyon sürecinin ardından uygulanan ultrasonik dispersiyon işlemi sayesinde, oluşan çok katmanlı veziküler yapıların parçalanarak daha homojen ve nanoskopik boyutlara indirgendikleri gözlemlenmiştir. Bu aşamanın, niyozomların dağılımını iyileştirdiği ve sistemin kolloidal stabilitesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Farklı Span 60/kolesterol oranlarında elde edilen niyozomal sistemlerin sentezlenebilir olduğu ve ince film hidrasyon temelli yaklaşımın bu yüzey aktif madde kombinasyonu için uygun bir yöntem sunduğu belirlenmiştir. Kolesterol oranındaki artışın, literatürle uyumlu şekilde, vezikül bütünlüğü ve membran stabilitesi üzerinde etkili olabileceği öngörülmektedir. Elde edilen bulgular, geliştirilen niyozomal nanopartiküllerin ileri fizikokimyasal karakterizasyon ve biyolojik etkinlik çalışmalarına uygun bir taşıyıcı sistem potansiyeli taşıdığını ortaya koymaktadır.

İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomal taşıyıcıların yapısal ve morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile araştırıldı. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi niyozomların genel olarak küresel morfoloji sergilediği ve nispeten agregasyon eğiliminde olduğu görülmektedir. SEM mikrografları kullanılarak ortalama partikül boyutu 150 nm olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Farklı formülasyonlar için PDI ve zeta potansiyel enerjisi de Tablo 4.1.'de sunulmuştur. PDI ve ZP değerleri açısından F3 ile ilaç yükleme ve salınım çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 4.1. İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomlara ait SEM mikrografları.
240.000× büyütmede elde edilen SEM görüntüsü (ölçek çubuğu: 500 nm)



Şekil 4.2. İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomlara ait SEM mikrografları.
120.000× büyütmede kaydedilen SEM mikrografı (ölçek çubuğu: 1 µm)

Akıllı ilaç taşıma sistemleri geleneksel ilaç uygulamalarının ciddi yan etkiler ve düşük tedavi etkinliği gibi önemli sınırlamalarını azaltarak ilaçların ya da aday

moleküllerin terapötik etkinliğini iyileştirir. Tez çalışmasında hazırlanan niyozomal taşıyıcılar non-iyonik yüzey aktif maddelerden oluşan çift katlı veziküller yapılarıdır. Bu sayede kararlı, biyouyumlu ve akıllı ilaç salım mekanizmalarına sahip olmalarıyla diğer birçok bilimsel raporda da ön plana çıkmaktadır (Hemati vd., 2019). Bu tez çalışması kapsamında niyozomlar ince film hidrasyon tekniği ile başarı ile sentezlenmiştir. Hazırlanan niyozomların morfolojik ve yapısal özelliklerini aydınlatan SEM mikrograflarında veziküllerin pürüzsüz yüzey görüntüsü ve hafif agromelasyonu dikkat çekicidir. Bu kümelenme nano taşıyıcıların kurutulması sırasında meydana gelen yüzey gerilimine atfedilmiştir (Gharbavi vd., 2018b). PDI süspansiyon içindeki nanotaşıyıcıların boyut dağılımının homojenitesi hakkında kritik bilgiler sunan önemli bir parametredir. Özellikle 0-1 arasındaki PDI kararlı ve dar aralıktaki değişen boyutu ifade eder. Yapılan literatür araştırmasında birçok rapor PDI'nın taşıma sistemleri üzerindeki rolüne vurgu yapmaktadır. Tez çalışmasında hazırlanan dört farklı formülasyon içerisinde (F1-F4) bu kriter bakımından ön plana çıkan F3 kodlu formülasyonu olmuştur. F3'ün PDI'sı 0,38 olarak hesaplanmıştır ve bu özellikle nörodejeneratif hastalıkları hedef alan taşıma sistemlerinin sahip olması gereken 0,3-0,5 PDI ile oldukça uyumludur (Pahuja vd., 2015a). ZP partikül yüzeyindeki enerjiyi ifade eder ve mutlak değer bakımından artan ZP enerjisi daha güçlü bir itme kuvveti sergiler. F3 niyozomların sahip olduğu-15.5 eV'lik ZP değeri SEM görüntülemelemedeki hafif agromelasyonu açıklamaktadır. ± 30 eV ve üzerindeki zeta potansiyeli stabilite ile ilişkilendirilmiş olsa da özellikle niyozom ve diğer veziküller taşıma sistemlerinde ± 10 eV ve düşük PDI değerinin kararlı taşıma sistemleri olduğu da bilinmektedir (Honary & Zahir, 2013).

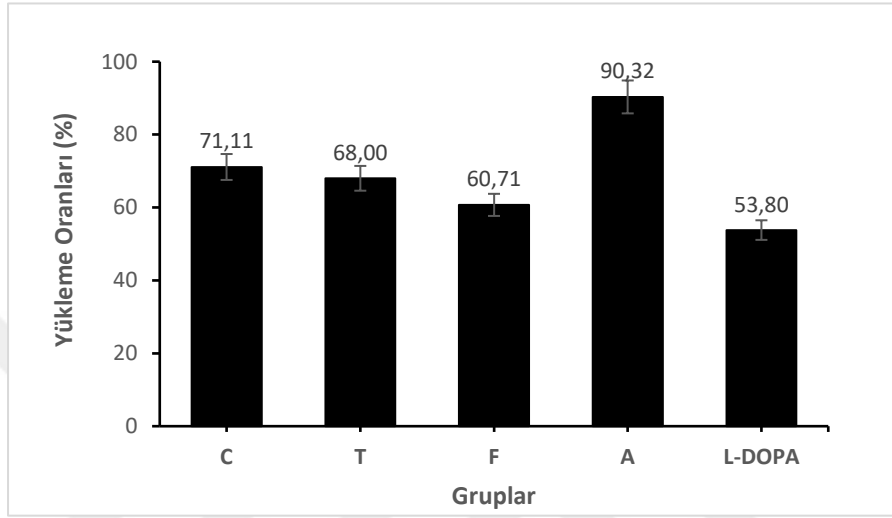
Tablo 4.1. F1-F4 için PDI değerleri ZP enerjisi

Formülasyon Kodu	PDI	Zeta potansiyel enerjisi (mV)
F1	0,97	-13,7
F2	1	-13,6
F3	0,38	-15,5
F4	0,70	-14,7

4.2. İlaç Enkapsülasyonu ve Salınım

1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan doğal terpen türevi ilaçların ilaç yükleme ve salınım çalışması UV-vis spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan ilaç çözeltilerinin 200-800 nm görünür bölgede maksimum tepe noktası değerleri daha önceden belirlendi. Bu amaçla moleküllerin farklı konsantrasyonlarını içeren dilüsyon

çözeltileri hazırlandı ve maksimum tepe noktası değerleri kullanılarak madde miktarına bağlı absorpsiyon gösteren standart eğriler hazırlandı. Tüm yükleme ve salınım çalışmasında bu standart eğriler kullanıldı. % Yükleme oranlarını gösteren grafik Şekil 4.3'de sunulmuştur. Tüm doğal terpen türevleri ve L-DOPA ile yapılan yükleme çalışmasında %90,32 ile α -Pinen maddesinin en yüksek orana sahip olduğu görülmüştür. Farnesen ise %60,71 ile en düşük yükleme oranına sahip olan moleküldür.

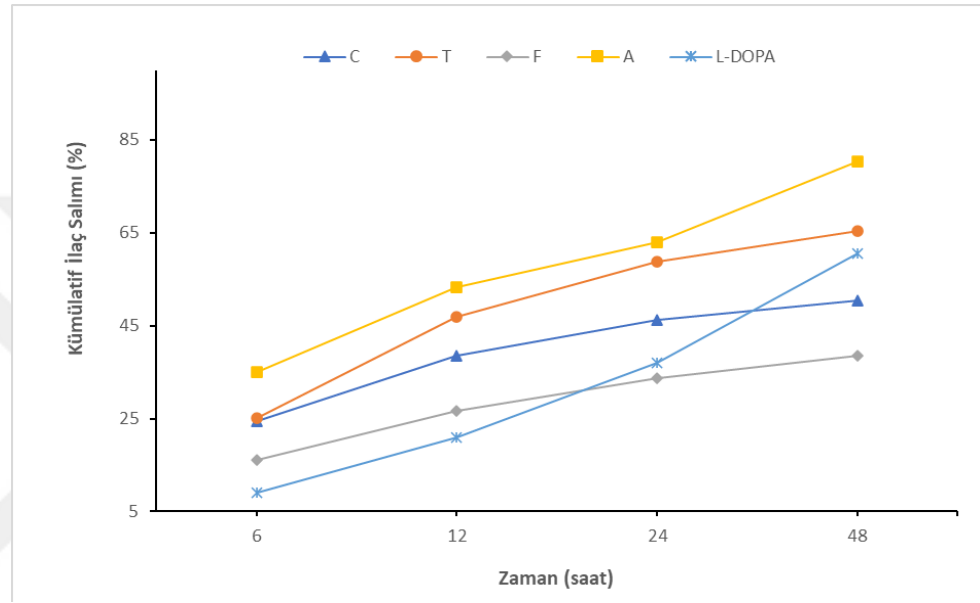


Şekil 4.3. İnce film hidrasyon tekniği ile hazırlanan niyozomlara yüklenen Karvon, Terpinolen, Farnesen, α -Pinen ve L-DOPA için ilaç yükleme oranları

Nanotaşıyıcı içine enkapsüle edilen ilacın miktarının belirlenmesi (EE) hazırlanan akıllı ilaç taşıyıcı sistemin başarımı değerlendirmede önemli bir kriterdir (Daneshmand vd., 2018). Nanotaşıyıcıların hazırlanması sırasında kullanılan materyal, kristallik organik/sulu fazda ilacın çözünürlüğü gibi sayısız faktör EE etkilemektedir. Fakat genellikle %70 ve üzerindeki EE başarılı bir taşıma sisteminin göstergesidir (Varsha vd., 2022). Bu tez çalışması kapsamında L-DOPA ve farklı terpen türevlerinin niyozomlar tarafından enkapsülasyon etkinliği UV-vis spektroskopisi ile başarılı bir şekilde tayin edildi. EE bakımından en yüksek değer α -pinen için %90,32 olarak hesaplanırken en düşük EE Farnesen için %60,7 olarak değerlendirildi. Özellikle karvon ve α -pinen için %70 üzerindeki EE ile tez çalışmasında hazırlanan F3 niyozomlar oldukça başarılı ve daha önceki bilimsel raporlar ile uyum içindedir (Kim vd., 2022).

Niyozomların zamana bağlı ilaç salım oranları 6,12,24 ve 48.saatlerde ortamdaki salınım süpernatant örneklerindeki serbest ilacın miktarının ölçülmesi ile hesaplandı. 48 saat boyunca devam ettirilen salım çalışmasının tüm zaman noktalarındaki salım oranları

Şekil 4.4’de verildi. Tüm formülasyonlarda kümülatif ilaç salım yüzdesi 6. saatten 48. saate kadar artış gösterdiği ve niyozomal veziküllerin bu ilaçları kademeli olarak saldıgı görüldü. Özellikle en yüksek salım oranı gözlenen α -Pinen ve Terpinolen yüklü taşıma sistemleri 24 saatin sonunda α -Pinen ve Terpinolen için salım oranı sırasıyla %63 ve %58,9 olarak hesaplandı. Öte yandan Farnesen ve Karvon gruplarında daha düşük salım yüzdeleri gözlemlendi ve bu moleküller için salım oranları sırasıyla %33,8 ve %46,2 olarak hesaplandı.



Şekil 4.4. Niyozomlara yüklenen Karvon, Terpinolen, Farnesen, α -Pinen ve L-DOPA'nın 48 saatlik in vitro kümülatif salım (%) profilleri

Niyozomal taşıyıcılar gibi lipid temelli nanotaşıyıcılar enkapsüle ettikleri ilacı erozyon ve difüzyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile salabilirler. İlaç yüklemesi, partikül boyutu, boyut dağılımı, lipid içeriği, salınım ortamı, morfolojiler, uygulanan yüzey aktif maddeler ve hazırlama teknikleri dahil olmak üzere sayısız parametre salım profilini büyük oranda etkilemektedir (Patra vd., 2018). Akıllı ilaç salım sistemlerinin arzu edilen düzeyde EE sahip olmasıyla birlikte enkapsüle edilen terapötik ajanın ani salınmaması ve patlama etkisi göstermemesi de istenir. Bu tez kapsamında ilaç salım çalışması 48 saat boyunca devam ettirildi ve her bir ilaç için salım profilleri belirlendi. İn vitro salım sonuçlarında Karvon, Terpinolen ve Farnesen için zamana bağlı salım hızının azalması, ilacın membran yapısından kademeli ve kontrollü şekilde difüze olduğunu göstermektedir. Öte yandan niyozomlara enkapsüle edilen α -pinen için salım profili

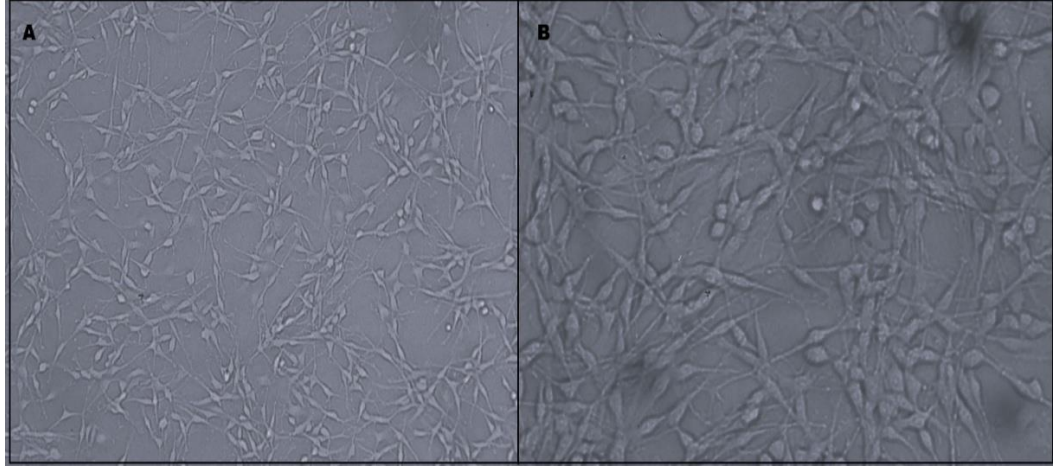
özellikle son 12 saatte yüksek artış sergilemiştir ki bu durum da erozyon ile ilişkili salım mekanizmasını düşündürmektedir (Kamel vd., 2021).

4.3. İn vitro Toksikite Çalışma

Terpenler beyin dokusunda çeşitli etkileri ve terapötik yararları kanıtlanmış olan nörodejeneratif süreçlerde antioksidan ve enflamasyon karşıtı ajanlar olarak önemli bir rol üstlenmektedir. Söz konusu etkiler, bu maddelerin nöronal tahribatı hafifletme kapasitesine sahip olduğunu ve hastaların yaşam kalitesine olumlu katkılar sunarak gelecekteki tedaviler için ciddi bir potansiyel taşıdığını göstermektedir.

SH-SY5Y hücre hatları stres, nörodejenerasyon ya da psikolojik bozuklukları hedef alan çalışmalarda sıklıkla tercih edilen hücre hattıdır. Dahası sayısız pek çok araştırma all trans retinoik asit kullanılarak SH-SY5Y hücrelerinin nöronal hücre farklılaşmasına yönlendirebildiğini de rapor etmiştir (Lazzeri vd., 2025).

Bu tez çalışmasında farnesen, terpinolen, α -Pinen ve karvon terpenlerinin 10 μ M retinoik asit kullanılarak nöron benzeri hücrelere farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürlerindeki toksikolojik etkileri MTT analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri 10 μ M retinoik asit ile 10 gün süreyle muamele edilerek nöron benzeri hücrelere farklılaştırılmıştır. Farklılaşma sürecinin ardından hücrelerin morfolojik özellikleri ters mikroskop altında değerlendirilmiştir. Dönüşümü tamamlanan hücrelerin gövde yapılarında başlangıçtaki kübik-elipsoid yapıdan daha ince ve uzamış bir forma geçtiği ve akson ve dendrit benzeri uzantıların belirginleştiği gözlemlenmiştir. Retinoik asit muamelesinden önce ve sonra SH-SY5Y hücrelerinin yapısal ve morfolojik özelliklerini gösteren mikroskop görüntüleri Şekil 4.5’de verilmiştir. Dahası dönüşüm sonundaki hücreler arası bağlantıların arttığı gözlemlenmiştir. Bu morfolojik değişimler, SH-SY5Y hücrelerinin nöronal morfolojiye başarıyla yönlendirildiğini göstermektedir. Retinoik asit uygulaması sonrasında gözlenen ince hücre gövdeleri ile uzamış dendrit ve akson benzeri uzantılar, RA’nın SH-SY5Y hücrelerinde nöronal farklılaşmayı indüklediğini bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (Korecka vd., 2013).



Şekil 4.5. Retinoik asit uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinin nöron benzeri hücrelere farklılaştırılması. A. 4x büyütme B. 20x büyütme

Tablo 4.2. Olgun nöron hücre kültürüne farklılaştırılmış SHSY-5Y hücrelerinin akış sitometrisi analizi ile belirlenen hücre döngüsü

Grup	Hücre popülasyonu (%)			
	G1	G2	S	G1/G2
Kontrol	30.86±1.64	16.12±0,70	53.02±2.65	1.91±0.01
10 µM RA ile tedavi edilen SHSY-5Y hücreleri	49.50±2.47*	19.20±0,96*	19.79±0,98*	2.57±0,12*

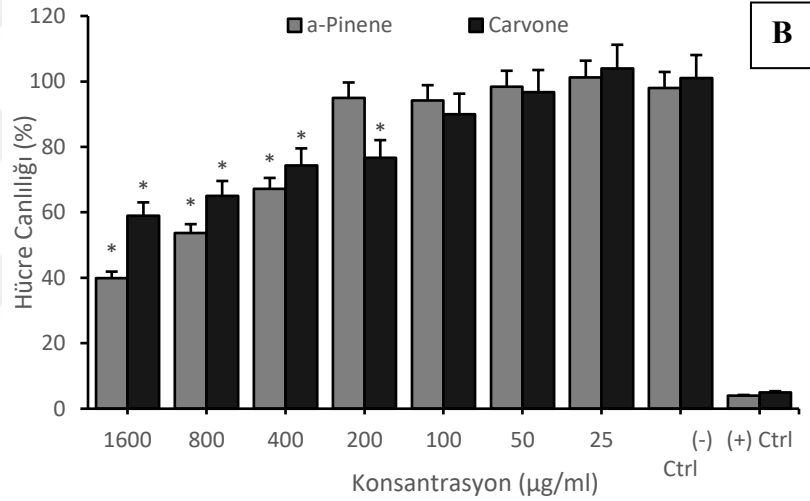
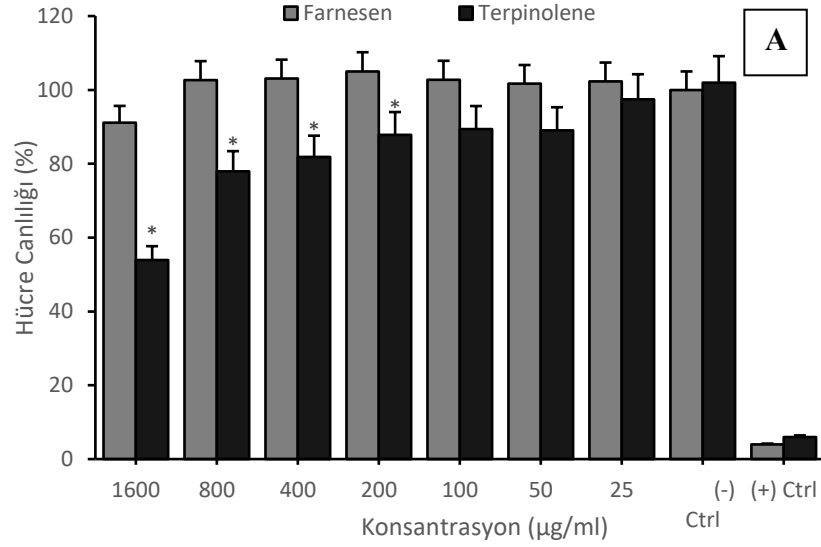
Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Sembol (*), kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı ($P<0.01$) temsil eder.

Yeni nesil terapötiklerin geliştirilmesi her aşamada yüksek güvenlik ve etkinlik standartları gerektiren zorlu bir süreçtir. İlaç keşif çalışmalarında başvurulan sitotoksikite testleri, bir maddenin canlı doku ve hücredeki güvenliğini denetleyen kritik bir role sahiptir. Bu yöntemle araştırmacılar, normal hücrelere zarar vermeyen ancak hedef hücreler üzerinde etki gösteren bileşiklerin seçimini yapabilirler. Böylece aday bileşiklerin hem yan etkileri azaltılmış hem de tedavi gücü yüksek yeni moleküllerin keşfi sağlanabilir (Fotakis & Timbrell, 2006).

Bu tez çalışmasında dört farklı terpen türevinin değişen aralıktaki (25–1.600 µg/mL) konsantrasyonuna 24 saat süreyle maruz bırakılan kültürlerde hücre canlılık oranları negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. MTT analizi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.6'de sunulmuştur. Farnesen uygulamasının tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde belirgin bir toksik etki oluşturmadığı ve canlılık oranlarının genel olarak kontrol grubuna yakın seyrettiği görülmüştür. Nitekim bu veriler retinoik asit ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde farnesenin nöron

koruyucu etkisini doğrulayan diğer bilimsel raporların sunduğu verileriyle uyumludur (Arslan vd., 2023). Diğer yandan terpinolen tedavisi özellikle 400 µg ve üzerindeki konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hücrelerin canlılığında azalmaya neden olmuştur. Daha düşük konsantrasyonlarda bu etkinin azaldığı gözlenmiştir. α-Pinen 200 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda önemli bir toksisiteye neden olmuştur. Bu konsantrasyonda hücresel canlılık oranı ancak %67,1 ile sınırlanmıştır. Konsantrasyon azaldıkça hücre canlılığının azalan doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Nöroprotektif ajanlar üzerine yapılan çalışmalar; hem *Petasites japonicas* bitki özütünün hem de mür reçinesinden izole edilen K – N (1 – 4) serisi seskiterpenlerin sinir hücrelerini savunma noktasında önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir (Salehi vd., 2019a). MTT sonuçları ile elde edilen veriler dönüştürülmüş SH-SY5Y hücre kültürlerinde terpenin türüne ve uygulanan doza bağlı olarak in vitro toksisite etkisinin değiştiğini ve bu terpenlerin nöronal hücre sağkalımında konsantrasyon bağımlı etkiler sergilediğini göstermektedir.

Parkinson hastalığı temelinde orta beyindeki substantia nigra bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize olan, en sarsıcı nörodejeneratif hastalıkların başında gelmektedir. Bu nöronal kayıp etkilenen bireylerde hem motor becerilerin hem de bilişsel yetilerin bozulmasına neden olarak kişilerin yaşam kalitesini düşürmektedir. Hastalığın gerçek kökeni henüz tam anlamıyla aydınlatılamamış olsa da bilim insanları hastalık modelleri üzerinde yoğun araştırmalar yapmaktadır ve ilgili literatür her geçen gün artmaktadır. 6-OHDA, Rotenon veya MPP+ gibi kimyasal ajanların yanı sıra, patolojinin önemli bir parçası olan α-sinüklein protein lifleri kullanılarak in vitro ve in vivo deneysel Parkinson modelleri oluşturulmaktadır (Poewe vd., 2017).



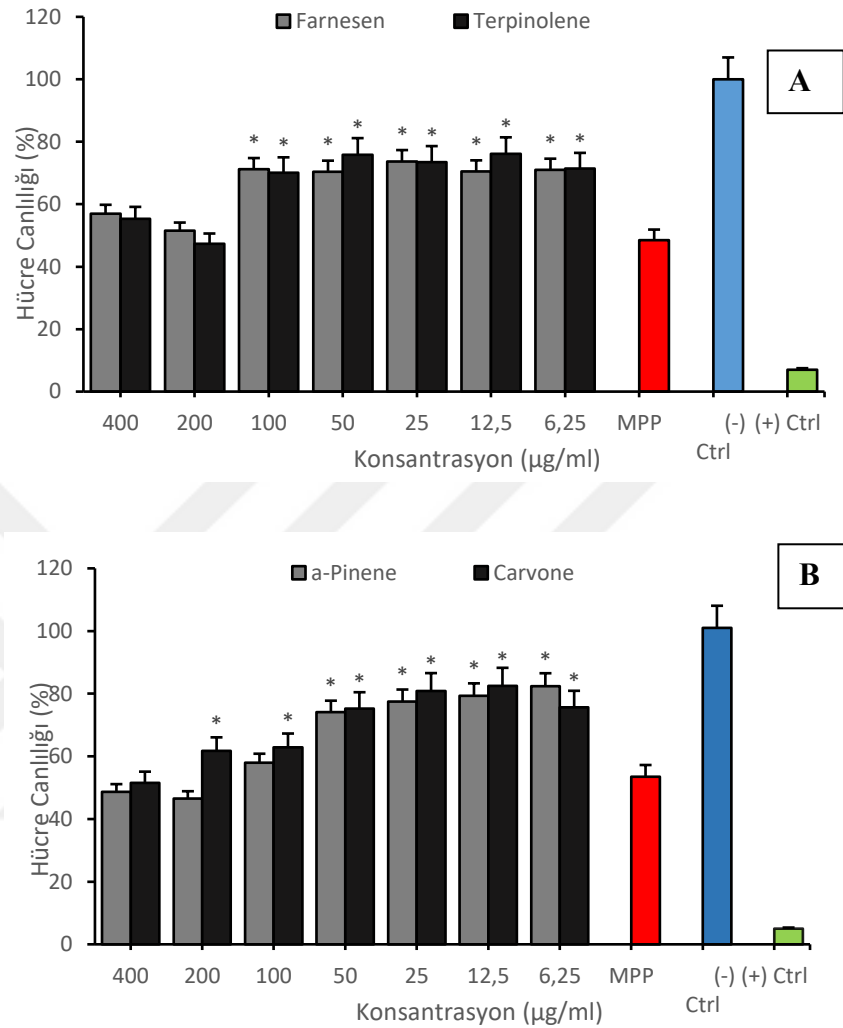
Şekil 4.6. a. Farnesen ve Terpinolene, b. α -Pinen ve Karvon'un farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı (%) üzerine etkileri

Bu tez çalışmasında nöron benzeri hücelere dönüştürülen SH-SY5Y hücre kültürlerinde MPP⁺ toksini kullanılarak in vitro Parkinson hastalığı modeli oluşturulmuştur. Farnesen, Terpinolene, α -Pinen ve karvon terpenlerinin serbest formlarının nöron koruyucu etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Hücreler terpenlerin 0–400 µg/mL konsantrasyon aralığında 24 saat süreyle muamele edilmiş ve elde edilen hücre canlılık oranları MPP⁺ kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.7'de de verilen MTT sonucuna göre yalnızca MPP⁺ uygulanan grupta hücre canlılık oranı %48,49 olarak belirlenmiştir. Kontrol gruplarına kıyasla farnesen uygulanan gruplarda hücre canlılığı 100 µg/mL'de %71,22, 50 µg/mL'de %70,43 ve 25 µg/mL'de %73,66 olarak hesaplanmıştır ve bu değerlerin MPP⁺ kontrolüne kıyasla istatistiksel olarak

anlamli düzeyde yuiksek olduğu saptanmiştır. Fakat 100 µg/mL ve uzerimdeki konsantrasyonda hucre sel canlilik onemli düzeyde duşuiktur. Terpinolen uygulamasında ise hucre canlilik oranları 100 µg/mL’de %70,11, 50 µg/mL’de %75,86 ve 25 µg/mL’de %73,46 olarak belirlenmiştir. α-Pinen uygulanan hucrelerde canlilik oranı ozellikle 50–12,5 µg/mL konsantrasyon aralığında artış goştermiştir. Bu konsantrasyonlar sırasıyla %74,06, %77,45 ve %79,33 canlilik oranını desteklemektedir. Karvon grubunda ise hucre canlilik oranlarının 50 µg/mL’de %75,20, 25 µg/mL’de %80,90 ve 12,5 µg/mL’de %82,48 seviyelerine ulaştığı belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ozellikle Farnesen ve Terpinolen konsantrasyonu arttıka hucre sağlığının bozulduğunu goştermektedir. MTT sonuçları literatürdeki dozla ilişkili sitotoksisite raporlarıyla oldukça uyumludur(Arslan vd., 2021). Ayrıca azalan dozlarda α-Pinen ile karvonun hucre proliferasyonunu koruyucu bir etki sergilediği gozlenmesi de daha onceki araştırmalarda bu bileşiklerin mitokondriyal stabilizasyon ve reaktif oksijen turlerini (ROS) noştralize etme potansiyeline atfedilmiştir (Salehi vd., 2019b).

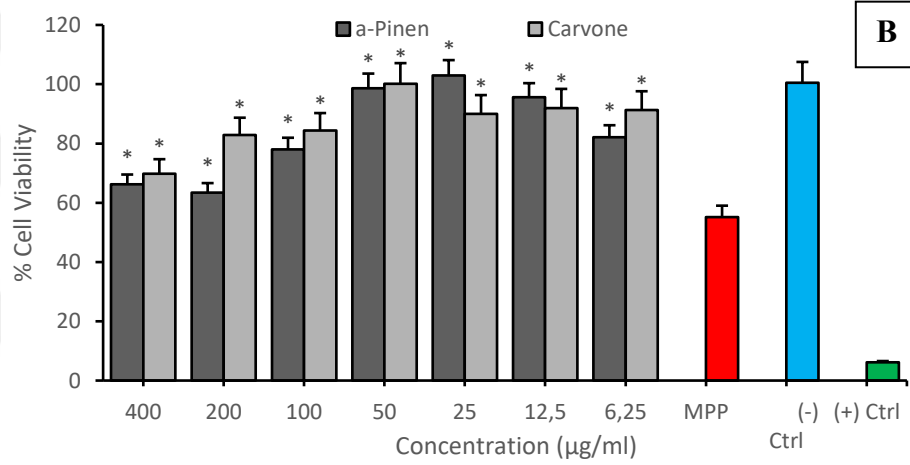
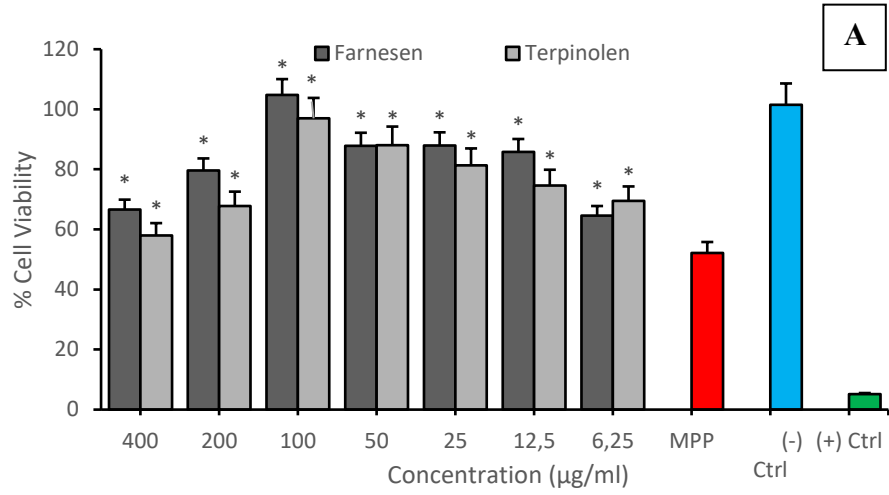
Tez çalışması kapsamında niyozomal taşıma sistemine yuiklenen terpen turevlerinin MPP⁺ ile oluşturulan in vitro Parkinson hastalığı modelindeki noşroprotektif etkileri detaylı olarak araştırılmıştır. MTT sonuçları MPP⁺ ile PH modeli oluşturulan fakat herhangi bir tedavi uygulanmamış grupta hucre canlilik oranını %52,15 olarak vermiştir. Diğer taraftan MPP⁺ uygulanan ve niyozomal taşıyıcı sisteme yuiklenen terpenlerle muamele edilen gruplarda kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hesaplanan hucre canliliğındaki anlamli artış oranları ozellikle dikkat çekicidir. Farnesen yuiklu niyozomların 100 µg/mL konsantrasyonunda hucre canlilik oranı %99,81’e yuikselirken, 50 ve 25 µg/mL konsantrasyon aralığında bu değerler sırasıyla %87,79 ve %87,93 olarak hesaplanmıştır. Terpinolen yuiklu grupta ise hucre canliliğı 100 µg/mL’de %96,99, 50 µg/mL’de %88,08 ve 25 µg/mL’de %81,29 olarak belirlenmiştir. Diğer bir deneysel grupta α-Pinen içeren niyozomlar hucre canlilik oranları ozellikle 50 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %98,66 ve %99,99 olarak hesaplanmıştır ki bu oranlar sağlıklı SH-SY5Y hucrelerine oldukça yakındır. Son olarak karvon yuiklu niyozomlarda ise hucre canliliğı 50 µg/mL’de %99,11, 25 µg/mL’de %90,03 ve 12,5 µg/mL’de %91,98 şeklinde hesaplanmıştır. Tım bu gruplarda elde edilen hucre canlilik oranları yalnızca MPP⁺ uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamli düzeyde yuiksek olduğunu goştermektedir. Tım bu sonuçlar in vitro PH modelinde niyozomal taşıyıcılara yuiklu terpen turevlerinin çıplak haldeki terpen turevlerine kıyasla MPP⁺ kaynaklı hucre sel

toksisiteyi azalttığını ve Parkinson hastalığı hücre modelinde hücre canlılığını belirgin biçimde artırdığını açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7. A. Farnesen–Terpinolen, B. α-Pinen–Karvon hücre canlılığı analizleri

Bu çalışmada niyozomlar içine enkapsüle edilen terpen türevi bileşikler MPP⁺ ile oluşturulan in vitro PH modelinde hücresel canlılık oranlarını serbest terpenlere kıyasla iyileştirmiştir. Niyozomal gruplarda gözlemlenen yüksek canlılık oranları tez çalışması kapsamında hazırlanan niyozomların yalnızca bir taşıyıcı olarak değil aynı zamanda terpenler için biyoyararlanımı destekleyen ve nöroproteksiyonu sağlayan birer araç olduğunu da göstermiştir. Ayrıca Span60/kolesterol niyozomları içinde terpenlerin zamana bağlı ve kontrollü salım profilleri de sitotoksitenin azaltılmasında kritik rol oynamaktadır (Patel vd., 2012).

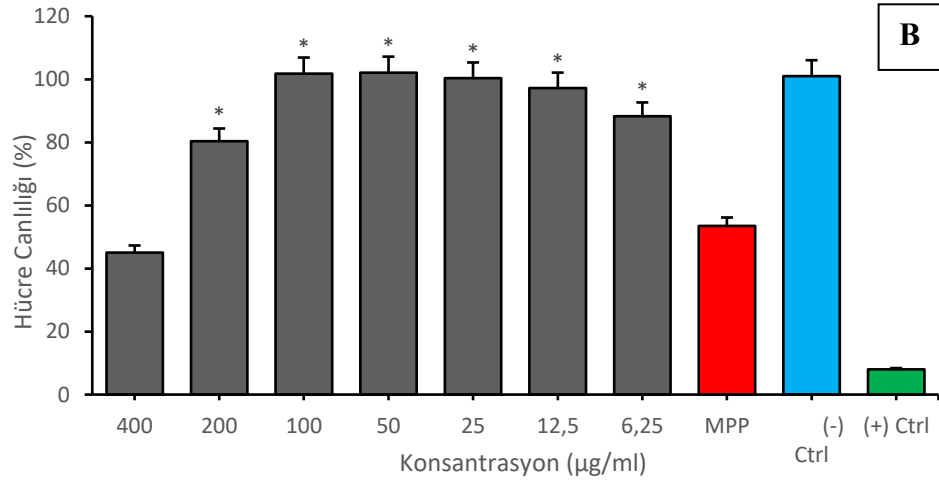
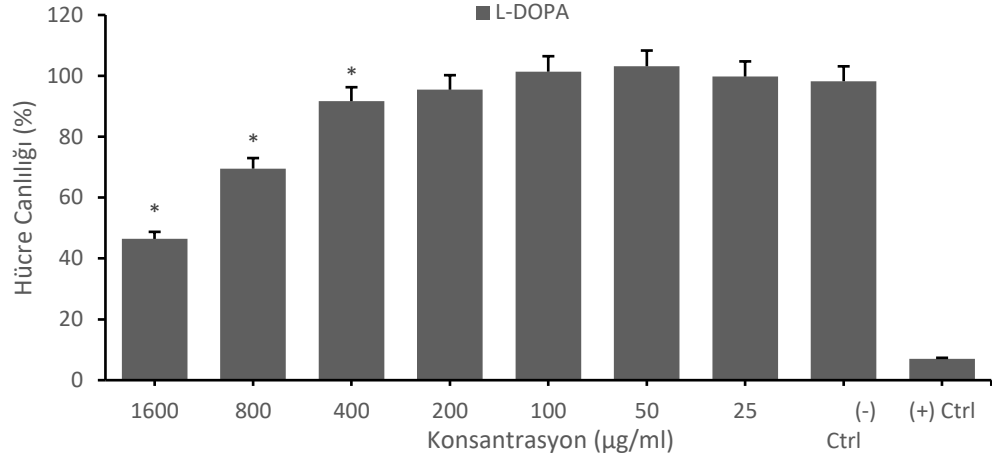


Şekil 4.8. A. Niyozomal Farnesen–Terpinolen, B. Niyozomal α -Pinen–Karvon’un deneysel Parkinson modelinde 24 saat sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri

Daha önceki araştırma raporları niyozomlar gibi diğer bazı veziküler nanotaşıyıcıların özellikle 300 nm boyuta kadar nöronal hücre hatlarında iyi seviyede internalize olduğunu vurgulamaktadır (Rejman vd., 2004). Dahası boyut ile birlikte niyozomal nanotaşıyıcıların-15,5 eV olarak hesaplanan negatif yüzey yükünün hücre membranıyla olan etkileşimi desteklemesi de ilaçların terapötik etkinliğinin armasına neden olduğu düşünülmektedir.

Sitotoksosite araştırmasının son basamağında Parkinson hastalığının tedavisinde klasik olarak kullanılan L-DOPA’nın çıplak haldeki ve niyozomal taşıma sistemi içindeki nöron benzeri SH-SY5Y hücrelerindeki etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Serbest L-DOPA uygulamasında 1.600 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılık oranının %46,4’e düştüğünü ve azalan doza bağlı olarak hücresel canlılık oranının arttığı ortaya

konmuştur. 800, 400 ve 200 µg/mL’de hücre canlılık oranları sırasıyla %69,5, %91,7 ve %95,5 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca MTT analizi daha düşük konsantrasyonlarda (özellikle 100 µg/mL ve altında) hücre canlılık oranlarının %99,8–99,2 aralığında olduğunu göstermektedir.

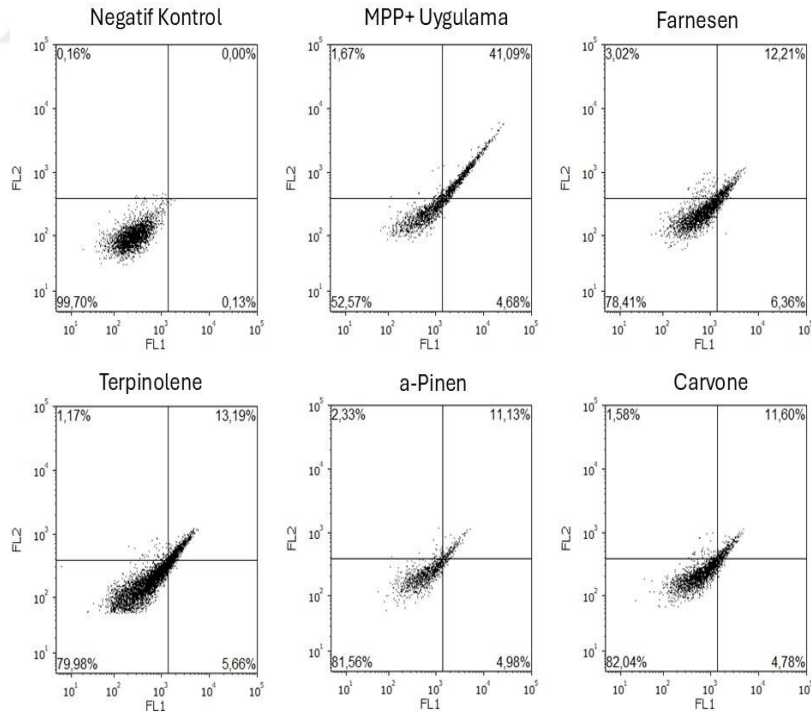


Şekil 4.9. A.Serbest ve B. Niyozomal L-DOPA hücre canlılığı analizleri

Tüm bu sitotoksosite analizleri ile elde edilen hücre canlılık oranları L-DOPA’nın yüksek dozlarda hücre canlılığı azalttığını, terpen türevleri ile yüklü niyozomal taşıma sisteminin ise L-DOPA’ya ve çıplak haldeki terpen türevlerine kıyasla in vitro PH modelinde nöroprotektif etkinliği güçlendirdiğini ortaya koymaktadır.

Akış sitometrisi analizi MPP⁺ ile oluşturulan in vitro Parkinson hastalığı modelinde, niyozomal taşıma sistemine yüklenen terpen türevlerinin 50 µg/mL konsantrasyonda 24 saat süreyle tedavisi sonucu hücre canlılığı üzerindeki etkilerini

değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol grubunda canlı hücre oranı %99,7 olarak hesaplanırken yalnızca MPP⁺ uygulanan grupta hücre canlılığı %52,57 şeklindedir. MPP⁺ ile muamele edilen fakat herhangi bir tedavi uygulanmayan grupta kıyaslanan farnesen yüklü niyozomlar canlı hücre oranı %25,8 oranında desteklemiş ve bu grupta hücre canlılığı %78,41 hesaplanmıştır. Diğer taraftan terpinolen yüklü niyozomlarda canlı hücre oranı %79,98 şeklindedir ve bu grupta da tedavi edilmeyen MPP⁺ grubuna kıyasla hücre canlılık %27,4 artmıştır. α -Pinen yüklü niyozom ile 24 saat süreyle tedavi edilen deneysel gruptaki %81,56 ve karvon yüklü niyozom grubundaki %82,0 hücre canlılığı terpen yüklü niyozomal taşıyıcıların in vitro PH modelindeki nöron koruyucu etkiyi kanıtlar niteliktedir. Tüm terpen yüklü niyozom gruplarında MPP⁺ kaynaklı apoptotik ve nekrotik hücre oranlarında belirgin azalma gözlenmiş ve canlı hücre yüzdesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Akış sitometri analizi bulguları ışığında terpen türevleri ile yüklenmiş niyozomal taşıma sistemlerinin MPP⁺'ye bağlı sitotoksisteye karşı koruyucu etki gösterdiğini ve özellikle karvon ile α -Pinen'in hücre canlılığını desteklemedeki başarısını göstermektedir. Akış sitometrisine ait tüm sonuçlar Şekil 4.10'de detaylı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.10. Niyozomal Farnesen, Terpinolen, α -Pinen ve Karvon'un (50 μ g/mL) deneysel Parkinson modelinde 24 saat sonrası hücre canlılığının akış sitometrik analizi

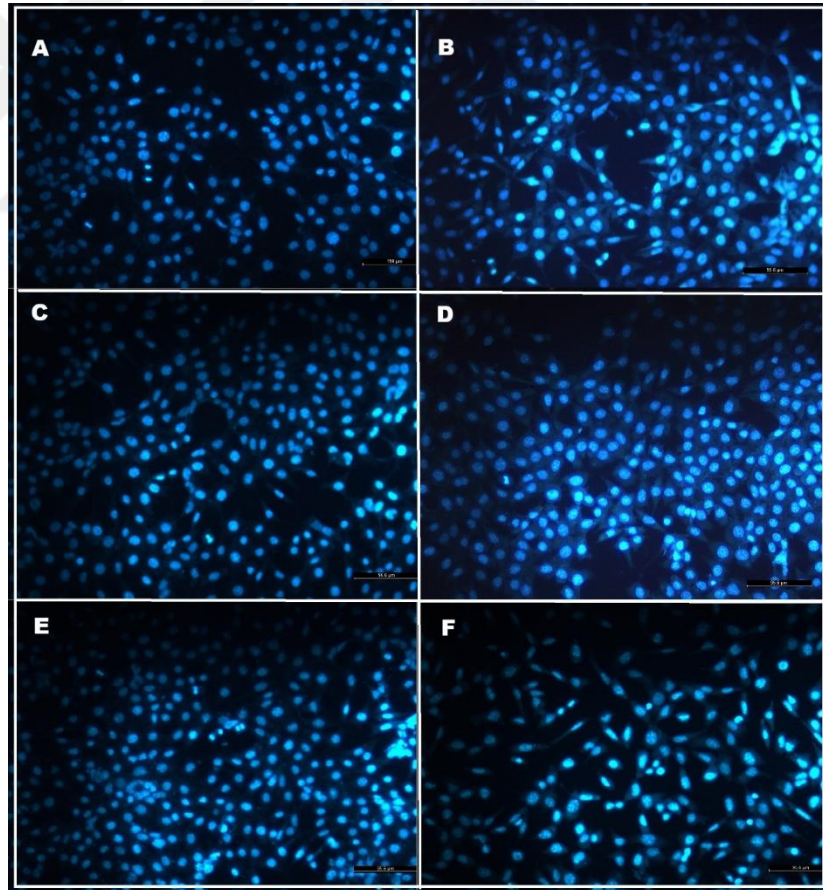
Akıllı taşıma sistemlerinin partikül boyutu ve zeta potansiyel enerjisi gibi fizikokimyasal özellikleri hedef hücrelerin sayısı, morfoloji ve süspansiyon içindeki davranışlarını etkileyen kritik parametrelerdendir (Green & Llambi, 2015). Nanotaşıyıcıların hücre ölüm yolları üzerindeki düzenleyici etkilerinin neticesinde akış sitometrisi sonuçları terpenlerin apoptoz, nekroz ve geç apoptoz ölüm yollarını farklı düzeyde etkilediğini ortaya koymaktadır (Pahuja vd., 2015b). Niyozomal taşıyıcıların terpenleri kontrollü olarak salmasından ötürü terpenlerin doza bağlı olarak hücre membran bütünlüğündeki hasar minimize edilmiştir. Daha önceki araştırma raporları nanotaşıyıcıların kaspaz aktivasyonu, mitokondriyal fonksiyonlarda iyileştirme ve nekrotik yolların baskılanmasıyla ilaç ya da aday moleküllerin terapötik etkisini desteklediğini bildirmektedir.

Hücre çekirdeğinde meydana gelen morfolojik değişimler hücrelerin programlanmış ölüm mekanizması ya da genotoksisiteyi işaret eden önemli ipuçlarıdır. Bu tez çalışmasında Hoechst 33258 boyaması ile analiz edilen nükleer anomaliler MPP⁺'nin neden olduğu nörodejenerasyonda çekirdek yapısındaki değişimleri ve niyozomlar içine enkapsüle edilen terpen türevlerinin bu süreçteki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Hoechst 33258 floresan boyaması ile gerçekleştirilen nükleer anomali analizi sonucunda, tüm deney gruplarında Tablo 4.2. de belirtildiği üzere MN, loblu çekirdekler (LB), çentikli çekirdekler (NC) saptanarak her grup için ortalama nükleer anomali indeksi (NA_i) hesaplanmıştır. Niyozomlara enkapsüle edilen Farnesen, Terpinolen, α -pinen, Karvon ve L-DOPA muamele edilen hücrelerde nükleer anomalilerin sınırlı düzeyde olduğu gözlenmiştir. MN yapılarıyla LB ve NC sayılarının da benzer şekilde düşük olduğu belirlenmiştir. En düşük NA_i farnesen yüklü niyozom tedavisi için 0.002 ± 0.001 olarak hesaplanmıştır. Terpinolen, α -pinen, Karvon ve L-DOPA yüklü niyozomlarla tedavi edilen kültürlerde bu NA_i değeri sırasıyla $0,003 \pm 0,002$, $0,003 \pm 0,002$, $0,004 \pm 0,003$ ve $0,003 \pm 0,002$ şeklindedir. Diğer taraftan MPP⁺ ile muamele edilen hücrelerde ise önemli nükleer değişimi gösteren NA_i değeri $0,008 \pm 0,002$ olarak hesaplanmıştır. Hoechst 33258 floresan boyama sonuçları ele alındığında tez çalışmasında niyozomlara yüklenen terpen türevlerinin genetik stabilizasyonun ve nükleer bütünlüğün devam ettirilmesinde in vitro nörotoksisite modelleri için umut verici birer aday olduğunu kanıtlamaktadır.

Tablo 4.2. Tüm deney gruplarında Hoechst 33258 boyamasıyla değerlendirilen nükleer anormalliklerin (mikronükleus (MN), loblu çekirdekler (LB), çentikli çekirdekler (NC) ve ortalama nükleer anormallik indeksi (NAI) dahil) kantitatif analizi

Gruplar	Hücre Sayısı	MN	LB	NC	NAI± SD
Farnesen	1.000	-	1	1	0,002±0,001 ^b
Terpinolen	1.000	-	2	1	0,003±0,002 ^b
α -pinen	1.000	-	1	2	0,003±0,002 ^b
Karvon	1.000	1	-	3	0,004±0,003 ^b
L-DOPA	1.000	-	2	1	0,003±0,002 ^b
MPP+	1.000	4	1	3	0,008±0,002 ^a



Şekil 4.11. MPP⁺ indüklenmiş in vitro Parkinson modelinde niyozomal bileşiklerin (50 μ g/mL) genotoksisite analizi (20 \times). A–E: Tedavi grupları; F: MPP⁺ kontrol

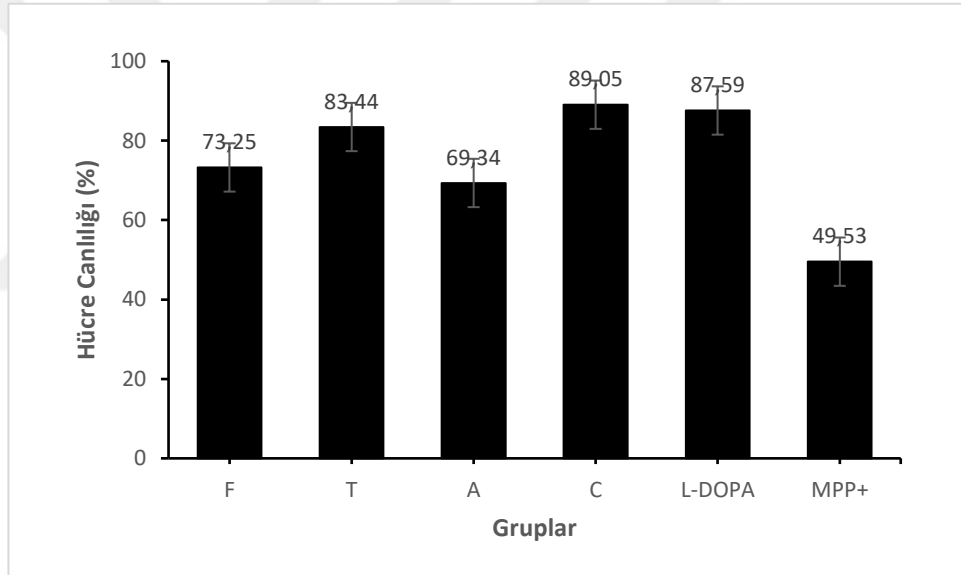
Niyozomal taşıma sistemine yüklenen terpen türevlerinin, MPP⁺ ile oluşturulan deneysel Parkinson hastalığı modelinde oksidatif stres ve antioksidan kapasite üzerindeki etkileri in vitro TAK ve TOD analizi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.3.'de sunulmuştur. Retinoik asit ile dönüştürülen hücreleri temsil eden negatif kontrol grubunda TAK değeri 1,86±0,08 mmol Trolox Equiv./l olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan yalnızca MPP⁺ uygulanan grupta bu değer 1,35±0,05 mmol Trolox Eşd./L'ye düştüğü ve MPP⁺'nin hücrel antioksidan kapasiteyi anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. Farnesen, Terpinolen ve α -Pinen yüklü niyozomların MPP⁺ ile birlikte uygulandığı gruplarda TAK değerlerinin sırasıyla 1,93±0,07, 1,88±0,04 ve 1,90±0,06 mmol Trolox Eşd./L düzeylerine yükseldiği görülmüştür. Bu artış %39 oranında bir yükselişi temsil etmektedir. Karvon yüklü niyozom grubunda ise TAK değeri 1,79±0,03 mmol Trolox Eşd./L olarak hesaplanmış ve MPP⁺ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artışı göstermektedir. Tüm bu grupların TOD değerleri MPP⁺ uygulanan grupta 16,5±0,8 μ mol H₂O₂ Equiv./l ile en yüksek oksidatif stres düzeyi gösterirken, terpen yüklü niyozom uygulanan tüm gruplarda bu değer 14,1–14,5 μ mol H₂O₂ Equiv./l aralığına olduğu ve negatif kontrol ile herhangi bir istatistiksel farklılık bulunmadığını göstermektedir. Bu bulgular, terpen yüklü niyozomların MPP⁺ kaynaklı oksidatif parametrelerde iyileştirme sağlayabildiğini göstermektedir.

Tablo 4.3. Deneysel Parkinson hastalığına uygulanan terpenlerin Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) ve Toplam Oksidatif Stres Durum (TOD) üzerine etkilerinin 24 saat sonunda incelenmesi. Üslü harfler gruplar arasında anlamlı farklılık olma durumunu ifade eder (a, b, c, d)

Uygulama	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TOD (μ mol H ₂ O ₂ Equiv./l)
Negatif Kontrol	1,86±0,08 ^a	13,8±0,9 ^c
MPP ⁺ Uygulama	1,35±0,05 ^b	16,5±0,8 ^d
Farnesen + MPP ⁺	1,93±0,07 ^a	14,2±0,7 ^c
Terpinolen + MPP ⁺	1,88±0,04 ^a	14,5±0,5 ^c
α -Pinen + MPP ⁺	1,90±0,06 ^a	14,1±0,6 ^c
Karvon + MPP ⁺	1,79±0,03 ^a	14,3±0,5 ^c

Parkinson hastalığında antioksidan savunma mekanizmasında meydana gelen bozukluklar, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon kritik öneme sahiptir. MPP⁺ hücrelerde kontrolsüz ROS üretimini tetikler ve TAK seviyelerinde ciddi düzeyde düşümlere neden olmaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen oksidatif stres

parametre verileri terpen yüklü niyozomların TAK değerini %39 oranında iyileştirmiş ve TOD değerlerindeki stabilizasyonu korumuştur. MPP+ maruziyetinin hücre homeostasisini oksidatif stres belirteçleri lehine bozduğunu vurgulayan tez verileri aynı zamanda terpen yüklü niyozomların bozulan oksidatif dengeyi antioksidan kapasitesini arttırarak iyileştirdiğini kanıtlar niteliktedir (Przedborski vd., 2004). Elde edilen veriler niyozomların nano boyut ve yüzey yükü gibi üstün özellikleri ile terpenlerin biyoyararlanımının artmasına atfedilebilir. Terpenlerin enkapsülasyon sayesinde sağlanan bu kontrollü salım mekanizması, terpenlerin hücre sitoplazmasında ve özellikle oksidatif stresin kaynağı olan mitokondriyal bölgelerde yoğunlaşmasına bağlı olabilir (Somiya & Kuroda, 2015). Dahası oksidatif stres parametrelerindeki bu önemli etki serbest terpenlerin aksine, niyozomal sistemlerin hücresel hedeflere daha etkin ulaştığının bir göstergesidir.



Şekil.4.12. Farnesen, Terpinolen, Alfa pinen, Karvon ve L-DOPA yüklü niyozomların in vitro kan-beyin bariyeri geçirgenlik testi kullanılarak Parkinson hastalığı modelinde hücre canlılığı üzerindeki nöroprotektif etkisi

Parkinson hastalığında dopaminerjik nöron kaybının temel patofizyolojik bileşenleri arasında mitokondriyal kompleks I inhibisyonu, artmış reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve buna bağlı gelişen hücresel enerji yetersizliği yer almaktadır. MPP+ maruziyeti hücrelerde kontrolsüz ROS üretimini tetikleyerek mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya, ATP sentezinde düşüğe ve antioksidan savunma sistemlerinde baskılanmaya neden olmaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen hücre canlılığı

verileri, MPP⁺ uygulanan grupta canlılığın %49,52 seviyesine gerilediğini; buna karşın terpen yüklü niyozom uygulanan gruplarda canlılığın belirgin şekilde arttığını göstermektedir (F: %73,24; T: %83,43; A: %69,34; K: %89,05; L-DOPA: %87,59) Bu bulgular, MPP⁺'nin hücrel homeostazı oksidatif stres lehine bozduğunu, ancak niyozomal sistemlerin bu bozulan dengeyi hücrel düzeyde iyileştirebildiğini ortaya koymaktadır. Terpen yüklü niyozomların sağladığı bu nöroprotektif etkinin, oksidatif stres parametrelerinde gözlenen iyileşme ile paralel olduğu düşünülmektedir. Nitekim tez kapsamında belirlenen toplam antioksidan kapasite (TAK) değerlerindeki artış ve toplam oksidan düzey (TOD) parametrelerindeki stabilizasyon, niyozomal sistemlerin antioksidan savunma mekanizmalarını desteklediğini göstermektedir. Bu durum, MPP⁺'nin tetiklediği mitokondriyal disfonksiyonun kısmen baskılandığını ve hücrel redoks dengesinin yeniden sağlanabildiğini düşündürmektedir (Nicklas vd., 1985). Elde edilen sonuçlar, niyozomların nano boyut, uygun yüzey yükü ve membran benzeri yapısal özellikleri sayesinde terpenlerin biyoyararlanımını artırmasına bağlanabilir. Enkapsülasyon ile sağlanan kontrollü ve zamana bağlı salım mekanizması, terpenlerin hücre sitoplazmasında daha uzun süre stabil kalmasına ve özellikle oksidatif stresin temel kaynağı olan mitokondriyal bölgelerde daha etkin konsantrasyonlara ulaşmasına olanak tanımış olabilir. Bu yönüyle niyozomal sistemler, serbest terpen uygulamalarına kıyasla hücrel hedeflere daha etkin ulaşım sağlayarak redoks dengesini düzenleme kapasitesini artırmaktadır. Sonuç olarak, tez verileri MPP⁺ ile indüklenen oksidatif hasarın yalnızca sitotoksik bir yanıt oluşturmadığını, aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarında belirgin bir baskılanmaya yol açtığını göstermektedir. Buna karşılık terpen yüklü niyozomların hem hücre canlılığını artırması hem de oksidatif stres parametrelerinde iyileşme sağlaması, nano-taşıyıcı sistemlerin Parkinson hastalığında mitokondriyal kaynaklı oksidatif hasara karşı potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini güçlü biçimde desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bu tez çalışmasında, doğal terpenlerin niyozomal nanotaşıyıcı sistemler aracılığıyla hücrelere aktarımının, deneysel Parkinson hastalığı in vitro modelinde nöroprotektif potansiyeli çok boyutlu analizlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, hem nanoteknolojik taşıma sistemlerinin biyoyararlanımı anlamlı düzeyde artırdığını hem de doğal terpenlerin hücresel düzeyde belirgin koruyucu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur.

Niyozomal nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonunda, partikül boyutlarının 150 nm aralığında olduğu, zeta potansiyel değerlerinin -28 ila -35 mV arasında değiştiği ve enkapsülasyon verimliliğinin %72–85 aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu değerler, hazırlanan niyozomların kolloidal stabilite açısından uygun olduğunu ve hücresel alıma elverişli boyut aralığında bulunduğunu göstermektedir. İn vitro salınım analizlerinde ise terpenlerin serbest formda ilk 6 saatte %68 oranında salındığı, niyozomal formülasyonlarda ise aynı sürede yalnızca %31 salınım gerçekleştiği, 48. saat sonunda ise kümülatif salınımın %82'ye ulaştığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, niyozomal sistemlerin kontrollü ve sürdürülebilir ilaç salımı sağladığını göstermektedir.

SH-SY5Y hücre hattında oluşturulan MPP⁺ kaynaklı Parkinson modelinde, hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla $42,6 \pm 3,8$ düzeyine düşerken ($p < 0,001$), serbest terpen uygulaması canlılığı $61,4 \pm 4,2$ seviyesine yükseltmiş, niyozomal terpen uygulaması ise $78,9 \pm 3,1$ düzeyine çıkarmıştır. Niyozomal terpen grubunun hem MPP⁺ grubuna hem de serbest terpen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek hücre canlılığı sağladığı saptanmıştır ($p < 0,001$).

Akış sitometrisi analizleri de benzer şekilde, apoptoz oranlarının MPP⁺ grubunda %34 iken, niyozomal terpen grubunda %11'e gerilediğini göstermiştir.

Oksidatif stres parametrelerinde, MPP⁺ uygulaması sonrası toplam oksidatif durum (TOS) $18,6 \pm 1,9$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L olarak belirlenirken, niyozomal terpen uygulaması bu değeri $9,2 \pm 1,3$ seviyesine düşürmüştür ($p < 0,01$). Toplam antioksidan kapasite (TAC) ise MPP⁺ grubunda $0,82 \pm 0,07$ mmol Trolox eşdeğeri/L iken, niyozomal terpen grubunda $1,74 \pm 0,11$ düzeyine yükselmiştir ($p < 0,001$). Mikroçekirdek analizleri,

genotoksik hasarın niyozomal terpen grubunda kontrol düzeylerine yakın olduğunu ve MPP⁺ grubuna göre anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir (p <0,05).

Sonuç olarak bu tez çalışması, doğal terpenlerin niyozomal nano taşıyıcı sistemler ile hücrelere aktarımının, Parkinson hastalığı in vitro modelinde hücresel canlılığı artırdığını, oksidatif stres yanıtını baskıladığını, nükleer hasarı ve apoptotik hücre ölümünü anlamlı düzeyde azalttığını nicel verilerle ortaya koymuştur. Bu bulgular, niyozom temelli doğal terpenlerin nörodejeneratif hastalıklarda güvenli, etkili ve hedefli bir nano-terapötik yaklaşım sunabileceğini güçlü biçimde desteklemektedir.

5.2. Öneriler

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular, niyozomal taşıma sistemi içerisine entegre edilmiş doğal terpenlerin, in vitro Parkinson hastalık modelinde hücresel düzeyde nöroprotektif etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Özellikle hücresel canlılık, oksidatif stres parametreleri ve enzimatik aktiviteler üzerinden elde edilen sonuçlar, değerlendirilen nanoformülasyonların dopaminerjik nöron hasarını sınırlama potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, gözlenen bu etkilerin kapsamı, sürekliliği ve altta yatan moleküler mekanizmaların detaylı olarak aydınlatılması gerekmektedir. Bu yöndeki ileri çalışmalar, mevcut bulguların güçlendirilmesi ve klinik uygulamalara taşınabilmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Çalışmanın başlıca sınırlılıklarından biri, deneylerin yalnızca in vitro hücre kültürü modelleri ile gerçekleştirilmiş olmasıdır. Elde edilen sonuçların biyolojik geçerliliğinin artırılması amacıyla, insan kaynaklı dopaminerjik nöronlar, astrositler ve mikroglyal hücrelerin birlikte kültüre edildiği ko-kültür sistemleri ile daha fizyolojik koşulları yansıtan 3 boyutlu (3D) beyin organoid modellerinde benzer analizlerin yapılması önerilmektedir. Bu tür kompleks sistemler, niyozomal sistemlerin hücreler arası etkileşimler üzerindeki etkilerinin daha gerçekçi şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Terpen yüklü niyozomların etki mekanizmalarının daha net ortaya konabilmesi için, apoptotik ve antiapoptotik yollara ait gen ve protein ekspresyonlarının qPCR, Western blot ve ELISA gibi ileri moleküler biyoloji teknikleri ile incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, GPx) ve mitokondriyal fonksiyon parametrelerinin detaylı olarak

analiz edilmesi, gözlenen nöroprotektif etkinin moleküler temellerinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

İn vitro düzeyde elde edilen olumlu sonuçların translasyonel değerinin artırılabilmesi için, geliştirilen niyozomal nanoformülasyonların MPTP veya 6-OHDA ile indüklenmiş Parkinson hastalık hayvan modellerinde in vivo olarak test edilmesi önerilmektedir. Bu kapsamda davranışsal testler, biyokimyasal analizler ve beyin doku kesitlerinde tirozin hidroksilaz (TH) immünoaktivitesi gibi immünohistokimyasal yöntemlerle dopaminerjik nöron kaybının değerlendirilmesi, tedavi etkinliğinin daha kapsamlı biçimde ortaya konmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen bulgular niyozomal temelli seskiterpen taşıma sistemlerinin Parkinson hastalığında umut vadeden bir yaklaşım sunduğunu göstermekte; ancak bu potansiyelin klinik uygulamaya taşınabilmesi için çok katmanlı, mekanistik ve in vivo destekli ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 19(4), 1598-1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Agarwal, S., Mohamed, M. S., Raveendran, S., Rochani, A. K., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2018). Formulation, characterization and evaluation of morusin loaded niosomes for potentiation of anticancer therapy. *RSC Advances*, 8(57), 32621-32636. <https://doi.org/10.1039/c8ra06362a>
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
- Arslan, M. E., Türkez, H., & Mardinoğlu, A. (2021). In vitro neuroprotective effects of farnesene sesquiterpene on alzheimer's disease model of differentiated neuroblastoma cell line. *International Journal of Neuroscience*, 131(8), 745-754. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1754211>
- Arslan, M. E., Türkez, H., Sevim, Y., Selvitopi, H., Kadi, A., Öner, S., & Mardinoğlu, A. (2023). Costunolide and Parthenolide Ameliorate MPP+ Induced Apoptosis in the Cellular Parkinson's Disease Model. *Cells* 2023, Vol. 12, 12(7). <https://doi.org/10.3390/cells12070992>
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, 15(12), 1257-1272. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
- Aydin, E., Türkez, H., & Taşdemir, Ş. (2013). Anticancer and Antioxidant Properties of Terpinolene in Rat Brain Cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(3), 415-424. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2365>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European journal of neurology*, 27(1), 27-42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hersheson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics* 2006 38:5, 38(5), 515-517. <https://doi.org/10.1038/ng1769>

- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* 2000 3:12, 3(12), 1301-1306. <https://doi.org/10.1038/81834>
- Bianco, A., Kostarelos, K., & Prato, M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(6), 674-679. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* 2015 33:9, 33(9), 941-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
- Cadet, J. L., & Brannock, C. (1997). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry International*, 32(2), 117-131. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00031-4)
- Clark, L. N., Ross, B. M., Wang, Y., Mejia-Santana, H., Harris, J., Louis, E. D., Cote, L. J., Andrews, H., Fahn, S., Waters, C., Ford, B., Frucht, S., Ottman, R., & Marder, K. (2007). Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*, 69(12), 1270-1277. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02>
- Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., & Ritz, B. (2009). Parkinson's Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat From Agricultural Applications in the Central Valley of California. *American Journal of Epidemiology*, 169(8), 919-926. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp006>
- Daneshmand, S., Patel, S., Lotan, Y., Pohar, K., Trabulsi, E., Woods, M., Downs, T., Huang, W., Jones, J., O'Donnell, M., Bivalacqua, T., DeCastro, J., Steinberg, G., Kamat, A., Resnick, M., Konety, B., Schoenberg, M., Jones, J. S., Bazargani, S., ... Weight, C. (2018). Efficacy and Safety of Blue Light Flexible Cystoscopy with Hexaminolevulinate in the Surveillance of Bladder Cancer: A Phase III, Comparative, Multicenter Study. *The Journal of urology*, 199(5), 1158-1165. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.11.096>
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505-522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>

- Di Fonzo, A., Chien, H. F., Socal, M., Giraud, S., Tassorelli, C., Iliceto, G., Fabbrini, G., Marconi, R., Fincati, E., Abbruzzese, G., Marini, P., Squitieri, F., Horstink, M. W., Montagna, P., Libera, A. D., Stocchi, F., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Meco, G., ... Saraiva-Pereira, M. L. (2007). ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*, *68*(19), 1557-1562. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260963.08711.08>
- Drasar, P. B., & Khripach, V. A. (2021). Terpene Research Is Providing New Inspiration for Scientists. *Molecules* *2021*, Vol. *26*, 26(18). <https://doi.org/10.3390/molecules26185480>
- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., & McLean, P. J. (2012). Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathologica* *2012* *124*:2, *124*(2), 153-172. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1004-6>
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research : PTR*, *21*(4), 308-323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *9*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>
- Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., & Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO Journal*, *31*(14), 3038-3062. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.170>
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T., & Dinter, E. (2016a). Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 121-130. <https://doi.org/10.1111/jnc.13618>
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T., & Dinter, E. (2016b). Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 121-130. <https://doi.org/10.1111/jnc.13618>
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, *3*(1), 16-20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>

- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain: a journal of neurology*, *114* (Pt 5)(5), 2283-2301. <https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, *160*(2), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- Freestone, I. C., Leslie, K. A., Thirlwall, M., & Gorin-Rosen, Y. (2003). Strontium isotopes in the investigation of early glass production: Byzantine and early islamic glass from the near East. *Archaeometry*, *45*(1), 19-32. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.00094>
- Freestone, I., Meeks, N., Sax, M., & Higgitt, C. (2007). The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin* 2007 40:4, 40(4), 270-277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>
- Gatto, N. M., Rhodes, S. L., Manthripragada, A. D., Bronstein, J., Cockburn, M., Farrer, M., & Ritz, B. (2010). α -Synuclein Gene May Interact with Environmental Factors in Increasing Risk of Parkinson's Disease. *Neuroepidemiology*, *35*(3), 191-195. <https://doi.org/10.1159/000315157>
- Gharbavi, M., Amani, J., Kheiri-Manjili, H., Danafar, H., & Sharafi, A. (2018a). Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 6847971. <https://doi.org/10.1155/2018/6847971>
- Gharbavi, M., Amani, J., Kheiri-Manjili, H., Danafar, H., & Sharafi, A. (2018b). Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2018(1), 6847971. <https://doi.org/10.1155/2018/6847971>
- Goldman, S. M. (2014). Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *54*(Volume 54, 2014), 141-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *7*(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>

- Greenland, J. C., & Barker, R. A. (2018). The Differential Diagnosis of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, 109-128. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch6>
- Greenland, J. C., Williams-Gray, C. H., & Barker, R. A. (2019). The clinical heterogeneity of Parkinson's disease and its therapeutic implications. *European Journal of Neuroscience*, 49(3), 328-338. <https://doi.org/10.1111/ejn.14094>
- Guo, J., Huang, M., Hou, S., Yuan, J., Chang, X., Gao, S., Zhang, Z., Wu, Z., & Li, J. (2024). Therapeutic Potential of Terpenoids in Cancer Treatment: Targeting Mitochondrial Pathways. *Cancer Reports*, 7(9), e70006. <https://doi.org/10.1002/cnr2.70006>
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Rab, S., & Suman, R. (2023). Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*, 7(2), 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.glohj.2023.02.008>
- Hattori, N., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Yamamura, Y., Yoshino, H., Kobayashi, T., Yokochi, M., Wang, M., Yoritaka, A., Kondo, T., Kuzuhara, S., Nakamura, S., Shimizu, N., & Mizuno, Y. (1998). Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: Evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Annals of Neurology*, 44(6), 935-941. <https://doi.org/10.1002/ana.410440612>
- Healy, D. G., Falchi, M., O'Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C. P., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Tolosa, E., Kay, D. M., Klein, C., Williams, D. R., Marras, C., Lang, A. E., Wszolek, Z. K., Berciano, J., ... Wood, N. W. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet Neurology*, 7(7), 583-590. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70117-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70117-0)
- Hemati, M., Haghirsadat, F., Yazdian, F., Jafari, F., Moradi, A., & Malekpour-Dehkordi, Z. (2019). Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 1295-1311. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1489271>

- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 255-264. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327115603588>, 34(12), 1318-1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
- Iqbal, P., Preece, J. A., & Mendes, P. M. (2012). Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramolecular Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.SMC195>
- Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., & Ninham, B. W. (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 72(0), 1525-1568. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>
- Jain, S., Jain, V., & Mahajan, S. C. (2014). Lipid Based Vesicular Drug Delivery Systems. *Advances in Pharmaceutics*, 2014(1), 574673. <https://doi.org/10.1155/2014/574673>
- Jenner, P., Hunot, Olanow, Beal, Kordower, Tatton, & Schapira. (2003). Oxidative stress in Parkinson’s disease. *Annals of Neurology*, 53(SUPPL. 3), S26-S38. <https://doi.org/10.1002/ana.10483>
- Kamel, R., Elmotasem, H., Abdelsalam, E., & Salama, A. (2021). Lepidium sativum seed oil 3D nano-oleogel for the management of diabetic wounds: GC/MS analysis, in-vitro and in-vivo studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102504. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102504>
- Kang, J. B., Shen, A. Z., Gurajala, S., Nathan, A., Rumker, L., Aguiar, V. R. C., Valencia, C., Lagattuta, K. A., Zhang, F., Jonsson, A. H., Yazar, S., Alquicira-Hernandez, J., Khalili, H., Ananthakrishnan, A. N., Jagadeesh, K., Dey, K., Albrecht, J., Apruzzese, W., Banda, N., ... Raychaudhuri, S. (2023). Mapping the dynamic genetic regulatory architecture of HLA genes at single-cell resolution. *Nature genetics*, 55(12), 2255-2268. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01586-6>
- Karn, P. R., Cho, W., & Hwang, S. J. (2013). Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes. *Nanomedicine*, 8(9), 1529-1548. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.131>

- Kim, M., Kim, J. H., Kim, S., Maharjan, R., Kim, N. A., & Jeong, S. H. (2022). New long-acting injectable microspheres prepared by IVL-DrugFluidic™ system: 1-month and 3-month in vivo drug delivery of leuprolide. *International Journal of Pharmaceutics*, 622, 121875. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121875>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998 392:6676, 392(6676), 605-608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Korecka, J. A., van Kesteren, R. E., Blaas, E., Spitzer, S. O., Kamstra, J. H., Smit, A. B., Swaab, D. F., Verhaagen, J., & Bossers, K. (2013). Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLOS ONE*, 8(5), e63862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063862>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1078, 9-21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Kurkowska-Jastrzębska, I., Litwin, T., Joniec, I., Ciesielska, A., Przybyłkowski, A., Członkowski, A., & Członkowska, A. (2004). Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *International Immunopharmacology*, 4(10-11), 1307-1318. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.05.006>
- Larson, N., & Ghandehari, H. (2012). Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of materials: a publication of the American Chemical Society*, 24(5), 840. <https://doi.org/10.1021/cm2031569>
- Lazzeri, G., Lenzi, P., Signorini, G., Raffaelli, S., Giammattei, E., Natale, G., Ruffoli, R., Fornai, F., & Ferrucci, M. (2025). Retinoic Acid Promotes Neuronal Differentiation While Increasing Proteins and Organelles Related to Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, 26(4). <https://doi.org/10.3390/ijms26041691>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(21), 4212-4217. <https://doi.org/10.1021/jp984796o>

- Little, D. B., & Croteau, R. B. (2002). Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases δ -selinene synthase and γ -humulene synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 402(1), 120-135. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00068-1)
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. *Science*, 338(6109), 949-953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Mahlknecht, P., Gasperi, A., Djamshidian, A., Kiechl, S., Stockner, H., Willeit, P., Willeit, J., Rungger, G., Poewe, W., & Seppi, K. (2018). Performance of the Movement Disorders Society criteria for prodromal Parkinson's disease: A population-based 10-year study. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 33(3), 405-413. <https://doi.org/10.1002/mds.27281>
- Mahmoud, G., Jedelská, J., Omar, S. M., Strehlow, B., Schneider, M., & Bakowsky, U. (2018). Stabilized tetraether lipids based particles guided porphyrins photodynamic therapy. *Drug Delivery*, 25(1), 1526-1536. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1482970>
- Mamaeva, V., Sahlgren, C., & Lindén, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), 689-702. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.018>
- Mehnert, W., & Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 165-196. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)
- Moammeri, A., Chegeni, M. M., Sahrayi, H., Ghafelehbash, R., Memarzadeh, F., Mansouri, A., Akbarzadeh, I., Abtahi, M. S., Hejabi, F., & Ren, Q. (2023). Current advances in niosomes applications for drug delivery and cancer treatment. *Materials Today Bio*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100837>
- Moehle, M. S., Webber, P. J., Tse, T., Sukar, N., Standaert, D. G., Desilva, T. M., Cowell, R. M., & West, A. B. (2012). LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses. *Journal of Neuroscience*, 32(5), 1602-1611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5601-11.2012>

- Moghassemi, S., & Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release*, *185*(1), 22-36. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015>
- Moore, D. J., Zhang, L., Troncoso, J., Lee, M. K., Hattori, N., Mizuno, Y., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2005). Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Human molecular genetics*, *14*(1), 71-84. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi007>
- Müller, R. H., Gohla, S., & Keck, C. M. (2011). State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *78*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
- Nicklas, W. m. dot J., Vyas, I., & Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sciences*, *36*(26), 2503-2508. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90146-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90146-8)
- Pahuja, R., Seth, K., Shukla, A., Shukla, R. K., Bhatnagar, P., Chauhan, L. K. S., Saxena, P. N., Arun, J., Chaudhari, B. P., Patel, D. K., Singh, S. P., Shukla, R., Khanna, V. K., Kumar, P., Chaturvedi, R. K., & Gupta, K. C. (2015a). Trans-Blood Brain Barrier Delivery of Dopamine-Loaded Nanoparticles Reverses Functional Deficits in Parkinsonian Rats. *ACS Nano*, *9*(5), 4850-4871. <https://doi.org/10.1021/nn506408v>
- Pahuja, R., Seth, K., Shukla, A., Shukla, R. K., Bhatnagar, P., Chauhan, L. K. S., Saxena, P. N., Arun, J., Chaudhari, B. P., Patel, D. K., Singh, S. P., Shukla, R., Khanna, V. K., Kumar, P., Chaturvedi, R. K., & Gupta, K. C. (2015b). Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats. *ACS nano*, *9*(5), 4850-4871. <https://doi.org/10.1021/nn506408v>
- Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., & Saltzman, W. M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(7), 701-705. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.006>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent

- developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2007 2:12, 2(12), 751-760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*, 85(2), 257-273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Pina, L. T. S., Serafini, M. R., Oliveira, M. A., Sampaio, L. A., Guimarães, J. O., & Guimarães, A. G. (2022). Carvone and its pharmacological activities: A systematic review. *Phytochemistry*, 196, 113080. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113080>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers* 2017 3:1, 3(1), 17013-. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Pourmoghadasian, B., Tavakkoli, F., Beram, F. M., Badmasti, F., Mirzaie, A., Kazempour, R., Rahimi, S., Larijani, S. F., Hejabi, F., & Sedaghatnia, K. (2022). Nanosized paclitaxel-loaded niosomes: formulation, in vitro cytotoxicity, and apoptosis gene expression in breast cancer cell lines. *Molecular Biology Reports* 2022 49:5, 49(5), 3597-3608. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07199-2>
- Presgraves, S. P., Ahmed, T., Borwege, S., & Joyce, J. N. (2003). Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity Research* 2004 5:8, 5(8), 579-598. <https://doi.org/10.1007/BF03033178>
- Przedborski, S. (2005). Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 11(SUPPL. 1), S3-S7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.10.012>
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., & Vila, M. (2004). MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(4 SPEC.ISS.), 375-379. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041771.66775.d5>

- Qian, H., Lv, J., & Hu, X. (2025). Development and evaluation of curcumin nanosomes for glioma-targeted therapy. *Scientific Reports*, *15*(1), 10520-. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95348-5>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, *27*(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Reibold, M., Paufler, P., Levin, A. A., Kochmann, W., Pätzke, N., & Meyer, D. C. (2009). Discovery of Nanotubes in Ancient Damascus Steel. *Springer Proceedings in Physics*, *127*, 305-310. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88201-5_35
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, *377*(1), 159-169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>
- Rizzo, G., Copetti, M., Arcuti, S., Martino, D., Fontana, A., & Logroscino, G. (2016). Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, *86*(6), 566-576. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002350>
- Ruckmani, K., & Sankar, V. (2010). Formulation and optimization of Zidovudine niosomes. *AAPS PharmSciTech*, *11*(3), 1119-1127. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9480-2>
- Sahoo, B. M., Banik, B. K., Sharma, S., & Singh, B. (2024). Current Insights into Therapeutic Potential of Terpenoids as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *25*(5), 339-356. <https://doi.org/10.2174/0118715206342920241008062115>
- Salehi, B., Upadhyay, S., Orhan, I. E., Jugran, A. K., Jayaweera, S. L. D., Dias, D. A., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W. C., & Sharifi-Rad, J. (2019a). Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules* *2019*, Vol. *9*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- Salehi, B., Upadhyay, S., Orhan, I. E., Jugran, A. K., Jayaweera, S. L. D., Dias, D. A., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W. C., & Sharifi-Rad,

- J. (2019b). Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules* 2019, Vol. 9, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- Samed, N., Sharma, V., & Sundaramurthy, A. (2018). Hydrogen bonded niosomes for encapsulation and release of hydrophilic and hydrophobic anti-diabetic drugs: An efficient system for oral anti-diabetic formulation. *Applied Surface Science*, 449, 567-573. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.055>
- Sang, J. C., Hidari, E., Meisl, G., Ranasinghe, R. T., Spillantini, M. G., & Klenerman, D. (2021). Super-resolution imaging reveals α -synuclein seeded aggregation in SH-SY5Y cells. *Communications Biology* 2021 4:1, 4(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02126-w>
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 235(12), 34-47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Schaming, D., & Remita, H. (2015). Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry* 2015 17:3, 17(3), 187-205. <https://doi.org/10.1007/s10698-015-9235-y>
- Schapira, A. H. (2008a). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7(1), 97-109. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70327-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70327-7)
- Schapira, A. H. (2008b). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7(1), 97-109. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70327-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70327-7)
- Scicluna, M. C., & Vella-Zarb, L. (2020). Evolution of Nanocarrier Drug-Delivery Systems and Recent Advancements in Covalent Organic Framework–Drug Systems. *ACS Applied Nano Materials*, 3(4), 3097-3115. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b02603>
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. I., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., & Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin–protein ligase. *Nature Genetics* 2000 25:3, 25(3), 302-305. <https://doi.org/10.1038/77060>

- Somiya, M., & Kuroda, S. (2015). Development of a virus-mimicking nanocarrier for drug delivery systems: The bio-nanocapsule. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *95*, 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.003>
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The Cannabis Terpenes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245792>
- Sou, K., Inenaga, S., Takeoka, S., & Tsuchida, E. (2008). Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *352*(1-2), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.033>
- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M. M., Takahashi, K., & Ariga, H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Reports*, *5*(2), 213-218. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400074>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, *20*(5), 385. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., & Smith, P. (1985). A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, *17*(1), 117-132. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.117>
- Torchilin, V. P. (2005a). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*(2), 145-160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
- Torchilin, V. P. (2005b). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*(2), 145-160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
- Torchilin, V. P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery 2014 13:11*, *13*(11), 813-827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
- Turkez, H., Sozio, P., Geyikoglu, F., Tatar, A., Hacimuftuoglu, A., & Di Stefano, A. (2013). Neuroprotective Effects of Farnesene Against Hydrogen Peroxide-Induced Neurotoxicity In vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology 2013 34:1*, *34*(1), 101-111. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9991-y>

- Varsha, M., Senthil Kumar, P., & Senthil Rathi, B. (2022). A review on recent trends in the removal of emerging contaminants from aquatic environment using low-cost adsorbents. *Chemosphere*, 287, 132270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132270>
- Varshney, S., Alam, Md. A., Kaur, A., & Dhoundiyal, S. (2023). Niosomes: A Smart Drug Delivery System for Brain Targeting. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 12(2), 108-125. <https://doi.org/10.2174/2211738511666230524143832>
- Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O. A., Dachsel, J. C., Kachergus, J. M., Lincoln, S. J., Soto-Ortolaza, A. I., Cobb, S. A., Wilhoite, G. J., Bacon, J. A., Bahareh Behrouz, Melrose, H. L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D. M., Conibear, E., Wasserman, W. W., Aasly, J. O., Burkhard, P. R., ... Farrer, M. J. (2011). VPS35 mutations in parkinson disease. *American Journal of Human Genetics*, 89(1), 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.001>
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2011a). Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron*, 72(1), 57-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033>
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2011b). Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron*, 72(1), 57-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033>
- Weber, N. D., Merkel, O. M., Kissel, T., & Muñoz-Fernández, M. Á. (2012). PEGylated poly(ethylene imine) copolymer-delivered siRNA inhibits HIV replication in vitro. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.059>
- Whitesides, G. M. (2005). Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*, 1(2), 172-179. <https://doi.org/10.1002/sml.200400130>
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>

Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Yeun, S. C., Ma, H., Tang, C., Xia, K., Jiang, W., Ronai, Z., Zhuang, X., & Zhang, Z. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *The Journal of clinical investigation*, 119(3), 650-660. <https://doi.org/10.1172/JCI37617>

