



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Alzheimer Hastalığı In Vitro Modelinde EPPS ve NAC-
Nanopartikülü Kombine Etkisinin Araştırılması**

Doktora Tezi

Ezgi Keske

Aralık 2025



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Alzheimer Hastalığı *In Vitro* Modelinde EPPS ve NAC-
Nanopartikülü Kombine Etkisinin Araştırılması**

Doktora Tezi

Ezgi Keske

Danışman

Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı

Aralık 2025

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Ezgi Keske tarafından hazırlanan "Alzheimer Hastalığı *in vitro* modelinde EPPS ve NAC-Nanopartikülü Kombine Etkisinin Araştırılması" başlıklı bu Doktora Tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Doç. Dr. Ayşe Daut Özdemir
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Yeşim Neğiş
Bahçeşehir Üniversitesi

Doç. Dr. Saliha Ece Acuner Zorluuysal
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Dr. Öğr. Ü. Melike Güney Akkurt
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 29/12/ 2025

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin APA yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun metin içi kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Ezgi Keske

ÖZET

Alzheimer Hastalığı In Vitro Modelinde EPPS ve NAC-Nanopartikülü Kombine Etkisinin Araştırılması

Keske, Ezgi

Doktora, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr., Nagehan Ersoy Tunalı

Aralık 2025

Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici bilişsel kayıplara neden olan ve kesin tedavisi bulunmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu çalışmada, AH patofizyolojisinde rol oynayan amiloid beta oligomerleri ile ($A\beta_{42o}$) toksisitesiyle oluşturulmuş *in vitro* modelde, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinpropan sülfonik asit (EPPS) ve N-asetilsistein (NAC) yüklü polimer nanopartiküllerin (NAC-NP) monoterapötik ve co-terapötik etkileri değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı, mitokondriyal membran potansiyeli, oksidatif stres ve sitokin seviyeleri gibi parametreler üzerinden terapötik etkinlik belirlenmiştir. JC-10 analizi ile mitokondriyal disfonksiyon, ELISA ile IL-1 β düzeyi incelenmiştir. Ayrıca, SOD aktivite ve antioksidan ölçümleriyle oksidan savunma mekanizması değerlendirilmiştir. SynergyFinder analizinde Bliss modeline göre antagonist olmayan, nötre yakın edilmiştir. Yapılan analizlerden elde edilen bulgular, EPPS ve NAC kombinasyonunun sinerjik bir etki gösterdiğini ve $A\beta_{42o}$ kaynaklı toksisiteyi azalttığını göstermiştir. B6 ve QSH peptidleri ile fonksiyonellendirilen NAC-NP'nin kan-beyin bariyerini geçtiği ve amiloidleri hedeflediği *in vivo* koşullarda gözlenmiştir. NAC-NP'nin antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri gözlemlenirken, nanopartikülün sağladığı kontrollü salım ve EPPS'nin antiamiloid etkisi ile kombine uygulama mitokondriyal bütünlükte iyileşme sağlamıştır. Bu sonuçlar, kombine tedavinin AH'ye yönelik potansiyel bir yaklaşım olabileceğini ve gelecekte yapılacak *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, EPPS, N-asetilsistein, nanopartikül, sinerjik etki

ABSTRACT

Investigation of the Combined Effect of EPPS and NAC Nanoparticles in an In Vitro Model of Alzheimer's Disease

Keske, Ezgi

Ph. D., Department of Nanoscience and Nanoengineering

Supervisor: Assoc. Prof, Nagehan Ersoy Tunalı

December 2025

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that causes progressive cognitive decline and currently has no definitive treatment. In this study, the mono-therapeutic and co-therapeutic effects of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid (EPPS) and N-acetylcysteine (NAC)-loaded polymeric nanoparticles (NAC-NP) were evaluated in an *in vitro* model established by the toxicity of amyloid beta oligomers (A β 42o), which play a role in AD pathophysiology. Therapeutic efficacy was determined based on parameters such as cell viability, mitochondrial membrane potential, oxidative stress, and cytokine levels. Mitochondrial dysfunction was assessed using JC-10 analysis, and IL-1 β levels were measured by ELISA. In addition, antioxidant defense mechanisms were evaluated through SOD activity and antioxidant measurements. SynergyFinder analysis using the Bliss model indicated a non-antagonistic, near-neutral interaction. The results obtained from these analyses showed that the combination of EPPS and NAC exhibited a synergistic effect and reduced A β 42o-induced toxicity. Under *in vivo* conditions, it was observed that NAC-NP functionalized with B6 and QSH peptides crossed the blood-brain barrier and targeted amyloid structures. While the anti-inflammatory and antioxidant effects of NAC-NP were observed, the combined application of the nanoparticle's controlled release and the anti-amyloid effect of EPPS's resulted in improved mitochondrial integrity. These findings suggest that combination therapy may be a potential approach for AD and should be supported in future *in vivo* studies.

Keywords: Alzheimer's disease, EPPS, N-acetylcysteine, nanoparticle, synergistic effect

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Nanopartikülün hazırlanması ve karakterizasyonu sürecinde tecrübesini ve laboratuvar olanaklarını cömertçe paylaşan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Erdal CEVHER'e; polimer sentezini gerçekleştiren İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. M. Koray GÖK'e; nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasındaki emekleri için İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümü Arş. Gör. Dr. Emine SALDAMLı'ya, NMR analizlerinin gerçekleştirilebilmesindeki desteği için Doç. Dr. Ayşe Özdemir'e, in vivo çalışmayı gerçekleştiren Zeynep DİLHAN ÜN APAYDIN'a, biyoinformatik çalışmalardaki desteği için Doç. Dr. Salihe Ece ZorluUYSAL'a, ve yönlendirmeleriyle her zaman desteğini hissettiren Dr. Öğr. Ü. Melike GÜNEY AKKURT'a teşekkür ederim.

Ayrıca, doktora sürecim boyunca yalnızca akademik değil, manevi olarak da her an yanımda olan; desteklerini, sabırlarını ve inançlarını benden hiç esirgemeyen sevgili aileme ve değerli arkadaşlarım Derya AKYÜZ ŞENGÜN, Gülşen GÜNEL ve Pınar AYDINDAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki analiz süreçlerinde sağladıkları altyapı ve teknik destek için İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilim ve İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İMÜ-BİLTAM)'a teşekkür ederim.

“YÖK 100/2000-Öncelikli alan” ve 2211- Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağlanan destek için Yükseköğretim Kurulu'na ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK ARDEB-1001 kapsamında Proje No: 122S028 ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince. (Proje Numarası: 1652) desteklenmiştir.

Ezgi Keske

İÇİNDEKİLER

TEZ JÜRİSİ ONAYI	iii
BEYANLAR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SEMBOL LİSTESİ	xi
KISALTMA LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
TABLO LİSTESİ	xvii
1. Giriş	1
1.1. Alzheimer hastalığı	1
1.2. Alzheimer hastalığının patolojisi	5
1.3. Alzheimer hastalığında oksidatif stres ve nöroinflamasyon	9
1.4. N-Asetil Sistein	12
1.5. EPPS	17
1.6. Alzheimer hastalığı mevcut tedavi yöntemleri ve kombine ilaç terapisi	25
1.6.1. Kombine terapilerde sinerjistik etki	29
1.7. Alzheimer hastalığında nanoteknolojik yaklaşımlar	31
1.7.1. Nanopartikül çeşitleri ve sentez yöntemleri	37
2. TEZİN AMACI VE HİPOTEZİ	40
3. MATERYAL VE METOT	41
3.1. Materyal	41
3.2. Metot	44
3.2.1. Analitik metot geliştirme, polimer sentezi ve nanopartikül hazırlama	44
3.2.1.1. NAC'ın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	45
3.2.1.2. Polimerlerin sentezi	47
3.2.1.3. NAC yüklü B6-QSH nanopartiküllerinin hazırlanması	48
3.2.1.4. Polimer ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları	50
3.2.1.5. Enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi analizi	52
3.2.1.6. <i>In vitro</i> ilaç salım profili analizi	52
3.2.1.7. Nanopartiküllerin <i>in vitro</i> stabilite analizi	52

3.2.1.8. Nanopartiküllerin liyofilizasyonu	53
3.2.1.9. Nanopartikül formülasyonlarının sterilizasyonu	53
3.2.2. <i>In vitro</i> çalışmalar	53
3.2.2.1. Hücre kültürünün gerçekleştirilmesi.....	54
3.2.2.2. Hücre kültüründe A β 42 oligomerlerinin oluşturulması.....	54
3.2.2.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınması.....	54
3.2.2.4. NAC, EPPS ve nanopartikülün hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi...	55
3.2.2.5. A β 42o toksisitesi oluşturulan hücrelerde EPPS ve NAC-NP'nin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi	55
3.2.2.6. <i>In vivo</i> 'da nanopartiküllerin kan-beyin bariyerinden geçişi	57
3.2.2.7. Oksidatif stres tayini	58
3.2.2.8. SOD aktivitesinin belirlenmesi.....	58
3.2.2.9. Sitokin seviyeleri tayini	59
3.2.2.10. Mitokondriyal disfonksiyon analizi	59
3.2.2.11. İstatistiksel analiz.....	60
4. SONUÇLAR.....	61
4.1. Analitik metot geliştirme, polimer sentezi ve nanopartikül hazırlama	61
4.1.1. NAC'ın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu	61
4.1.2. Sentezlenen polimerlere ait bulgular	65
4.1.3. NAC yüklü B6-QSH nanopartiküllerinin hazırlanması partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinin belirlenmesi.....	67
4.1.4. Polimer ve nanopartiküllerin karakterizasyonlarına ait bulgular.....	71
4.2. <i>In vitro</i> çalışmalar	91
4.2.1. Hücre Kültürünün Gerçekleştirilmesi.....	91
4.2.2. Hücre kültüründe A β 42 oligomerlerinin oluşturulması.....	92
4.2.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınması.....	97
4.2.4. NAC, EPPS ve nanopartikülün hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi.....	98
4.2.5. <i>In vivo</i> 'da nanopartiküllerin kan-beyin bariyerinden geçişi	109
4.2.6. EPPS ve NAC-NP uygulaması	111
4.2.7. Oksidatif stres tayini	111
4.2.8. SOD aktivitesinin belirlenmesi	113
4.2.9. Sitokin seviyesi tayini	115
4.2.10. Mitokondriyal disfonksiyon analizi	116
5.TARTIŞMA	118

6. ETİK KURUL.....	134
7.KAYNAKÇA.....	135

SEMBOL LİSTESİ

- %:** Yüzde
° C: derece santigrat
µg: Mikrogram
µL: Mikrolitre
µM: Mikromolar
µm: Mikrometre
Da: Dalton
kDa: Kilodalton
mL: Mililitre
mm: Milimetre
mM: Milimolar
nm: Nanometre
O₂^{•-}: Süperoksit anyonu
-OH: Hidroksil radikali
PDI: polidispersite indeksi
ppm: Milyonda bir oran “parts per million”
α: Alfa
β: Beta
γ: Gama

KISALTMA LİSTESİ

AH:	Alzheimer Hastalığı
ApoE:	Apolipoprotein E
APP:	Amiloid Öncül Proteini
Aβ:	Amiloid Beta
Aβ42o:	A β 1-42 oligomer
BACE1:	β Amiloid Prekürsör Protein Kesme Enzimi 1
BSS:	Bağıl Standart Sapma
CAT:	Katalaz
DLS:	Dinamik Işık Saçılımı
EC₅₀:	Yarı maksimum etkili konsantrasyon
EE:	Enkapsülasyon etkinliği
EPPS:	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinpropansülfonik asit
FBS:	Fetal Sığır Serum
FDA:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FITC:	Florescein İzotiyosiyanat
FT-IR:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GPC/SEC:	Jel Permeasyon Kromatografisi / Boyut Dışlama Kromatografisi
GPX:	Glutatyon peroksidaz
GSH:	Glutatyon
HDMA:	Hekzadiamin
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH:	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IL-1β:	İnterlökin 1 β
IL-6:	İnterlökin 6
KBB:	Kan Beyin Bariyeri
MA:	Maleik Anhidrit
mPEG:	Metoksi (Polietilen Glikol)
NAC:	N-asetil sistein
NFY:	Nörofibriler Yumak
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans
NP:	Nanopartikül
PB:	Partikül Büyüklüğü

PEG: Polietilen Glikol
PLA: Poli Laktik Asit
PLGA: Poli Laktik Glikolik Asit
PLGA-PEG: Poli(Laktid- Ko- Glikolid)-Poli(Etilen Glikol)
PSEN1: Presenilin 1
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SEM: Taramalı Elektron Mikroskopisi
SOD: Süperoksit Dismutaz
SS: Standart Sapma
STEM: Taramalı Ve Geçirimli Elektron Mikroskopisi
TEM: Geçirimli Elektron Mikroskopisi
TNF- α : Tümör Nükleer Faktör A
TAS: Total Antioksidan Seviyesi
YK: Yükleme Kapasitesi
ZP: Zeta Potansiyeli

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Alzheimer Hastalığının nöropatolojik ve yapısal değişikliklerinin şematik gösterimi.	3
Şekil 2. Amiloid prekürsör proteininin hücre içi taşınması ve proteolitik yıkım yolları. .	6
Şekil 3. Alzheimer patolojisinin iki temel unsuru: Hücre dışı biriken Amiloid-beta plakları ve hücre içi Tau protein yumakları.	7
Şekil 4. Alzheimer Hastalığı patolojisinde oksidatif stres ve nöroinflamasyon arasındaki ilişki.	11
Şekil 5. NAC'ın Alzheimer hastalığı patolojisi üzerindeki çok yönlü terapötik mekanizmaları.	13
Şekil 6. EPPS küçük molekülünün amiloid ile etkileşimi.	18
Şekil 7. AH tedavisinde nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri ve hedefleme stratejileri.	35
Şekil 8. AH tedavisinde kan-beyin bariyerini aşarak ilaç taşınımını hedefleyen başlıca nanotaşıyıcı sistemlerin çeşitleri ve sentez yöntemlerinin şematik gösterimi.	38
Şekil 9. NAC'a ait HPLC kromatogram görüntüsü.	61
Şekil 10. NAC'a ait kalibrasyon eğri grafiği.	62
Şekil 11. Boş nanopartikül ve NAC stok çözeltisinin 213 nm'de ölçülen kromatogram görüntüsü.	64
Şekil 12. mPEG-PLGA diblok kopolimerinin sentez şeması.	65
Şekil 13. mPEG-PLGA-MA polimerinin sentez şeması.	66
Şekil 14. mPEG-PLGA-MA-NH ₂ polimerinin sentez ve peptid bağlanma şeması.	67
Şekil 15. mPEG-PLGA-MA-NH ₂ NAC yüklü nanopartiküllerin pH'a bağlı olarak partikül boyutu görüntüsü.	70
Şekil 16. mPEG-PLGA-MA-NH ₂ NAC yüklü nanopartiküllerine B6 ve QSH peptitlerinin bağlanmasından sonra partikül boyutu görüntüsü.	71
Şekil 17. PLGA ürününe ait FTIR grafiği.	73
Şekil 18. MPEG-PLGA ürününe ait FTIR grafiği.	74
Şekil 19. MPEG-PLGA-MA-NH ₂ ürününe ait FTIR grafiği.	74
Şekil 20. MPEG-PLGA-MA-NH ₂ -B6-QSH ürününe ait FTIR grafiği.	75
Şekil 21. MPEG-PLGA ürününe ait HNMR grafiği ve değerlendirmesi.	79
Şekil 22. MPEG-PLGA-MA-NH ₂ -B6-QSH ürününe ait HNMR grafiği ve değerlendirmesi.	80
Şekil 23. PLGA-PEG NAC, MPEG-PLGA-MA-NH ₂ NAC ve MPGE-PLGA-MA-NH ₂ -B6-QSH NAC ürünlerine ait DSC grafikleri.	82
Şekil 24. NAC yüklü nanopartiküllerin STEM görüntüleri.	83
Şekil 25. Serbest NAC ve mPEG-PLGA-MA-NH ₂ B6/QSH nanopartiküllerinin <i>in vitro</i> kümülatif ilaç salım profili.	85
Şekil 26. NAC yüklü nanopartiküllerinin farklı fizyolojik ortamlardaki zamana bağlı partikül boyut değişimleri.	86
Şekil 27. Nanopartikülün sterilizasyon etkinliğinin agar besiyerinde gösterimi. (A) Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>E. coli</i> ATCC 22951 suşunun agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası görünümü. (B) UV sterilizasyonu uygulanmış nanopartikül formülasyonuna ait agar plaklarındaki görünümü.	91
Şekil 28. SH-SY5Y hücrelerinin 5X (A) ve 10X (B) büyütme ile ışık mikroskobu görüntüleri.	92

Şekil 29. A β 42 oligomer oluşumunun Bis-ANS yöntemi ile analizi.....	93
Şekil 30. A β 42o örneklerinin SDS-PAGE elektroforezi görüntüleri. A) %12'lik SDS-PAGE jelinin Coomassie solüsyonu ile boyanmasının ardından görüntüleme cihazı ile kaydedilen negatif görüntüsü (M: Biolegend Prime Step Prestained Broad Range Protein Ladder; 1-5: sırasıyla 100, 50, 20, 10, 5 μ M A β 42o örnekleri). B) %12'lik SDS-PAGE jelinin Coomassie boyaması fotoğrafı (M: Biolegend Prime Step Prestained Broad Range Protein Ladder; 1: 10 μ M A β 42o, 2: 50 μ M A β 42o örneği.	95
Şekil 31. SH-SY5Y hücrelerinde amiloid oligomerlerinin hücre canlılığına etkisinin ışık mikroskopunda faz-kontrast görüntüleri. (A) A β 42o uygulanmamış, (B) 5 μ M A β 42o, (C) 10 μ M A β 42o hücreler, (D) 20 μ M A β 42o uygulanmış hücreler.....	96
Şekil 32. A β 42o oligomerlerinin hücre canlılığına etkisi.	97
Şekil 33. Uygulama yapılmayan kontrol hücreleri, NP uygulandıktan 1 ve 24 saat sonra toplanan hücrelerden alınan Flow sitometri ham verileri.	98
Şekil 34. Serbest formda uygulanan NAC'ın farklı konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığına etkisi.	99
Şekil 35. 10 μ M A β 42o ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde NAC'ın hücre canlılığına etkisi.....	100
Şekil 36. EPPS'nin farklı konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki etkisine ait doz-cevap eğrisi.	101
Şekil 37. B6-QSH-NAC-NP formülasyonunun hücre canlılığına etkisi.	102
Şekil 38. A β 42o toksisitesi oluşturulan hücrelerde B6-QSH-NAC-nanopartiküllerinin hücre canlılığına etkisi.	103
Şekil 39. Eşit stokiyometrik oranlarda A β :EPPS:QSH modelleri. A) 4:4:4 B) 5:5:5 C) 6:6:6 D) 8:8:8. Sarı renkli beta iplikler QSH peptidini, küçük moleküller ise EPPS'i göstermektedir.	106
Şekil 40. 10 monomerlik fibril A β yapılarının farklı stokiyometrik oranlarda EPPS ve QSH ile modelleri A) 10:0:0 B)10:10:0 C) 10:8:8 D) 10:5:5. Sarı renkli beta iplikler QSH peptidini, küçük moleküller ise EPPS'i göstermektedir.	107
Şekil 41. NAC ve EPPS kombinasyonlarının A β 42 oligomerlerine karşı gösterdiği inhibisyon yüzdelere gösteren ısı haritası.	108
Şekil 42. NAC ve EPPS kombinasyonlarının A β 42 oligomerlerine karşı gösterdiği etkileşimin ZIP ve Bliss sinerji modelleri ile değerlendirilmesi.	109
Şekil 43. Fare beyin dokusunda hipokampal bölgenin (CA1–CA3) immünohistokimyasal analizi. (A) Amiloid oligomerleri (Kırmızı). (B) Nanopartikül (Yeşil). (C) Amiloid oligomerleri ve nanopartikül sinyallerinin birlikte gösterimi. (D) Bregma -2,46mm koronal kesit anatomisi.	110
Şekil 44. (A) SH-SY5Y hücrelerinde uygulama yapılmamış hücreler ile uygulama gruplarının TAS düzeylerinin kıyaslanması. (B) SH-SY5Y hücrelerinde A β 42o toksisitesi ve farklı tedavi gruplarının TAS düzeylerine etkisi.	112
Şekil 45. A β 42o, NAC ve EPPS'nin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki SOD aktivitesinin gösterimi.	113
Şekil 46. A β 42o ile indüklenen oksidatif stres altında SH-SY5Y hücrelerinde SOD aktivitesinin, serbest NAC, EPPS ve NAC-B6-QSH nanopartikülleriyle yapılan tedavilere bağlı olarak nasıl modüle olduğunu gösteren grafik.....	114
Şekil 47. A β 42o toksisitesi altında IL-1 β düzeylerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....	115

Şekil 48. A β 42o toksisitesi altında farklı tedavi gruplarında mitokondriyal membran potansiyelinin karşılaştırılması.	117
--	-----

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Alzheimer Hastalığı tanısındaki temel kriterler ve doğrulayıcı biyobelirteçler (Jack vd., 2018).	4
Tablo 2. Tez çalışmasında planlanan deney grupları.....	56
Tablo 3. NAC'ın sistem uygunluk sonuçları.	62
Tablo 4. NAC'ın doğruluk parametresine ait bulgular.	63
Tablo 5. NAC'a ait tekrar edilebilirlik çalışmasına ait bulgular.....	63
Tablo 6. NAC'a ait tekrar elde edilebilirlik çalışmasına ait bulgular.	64
Tablo 7. Farklı mPEG-PLGA-MA-NH ₂ :NAC nanopartiküllerine ait DLS verileri.	68
Tablo 8. mPEG-PLGA-MA-NH ₂ polimeri ile soğuk ortamda hazırlanan nanopartiküllerine ait veriler.	68
Tablo 9. mPEG-PLGA-MA-NH ₂ Nanopartiküllerine ait karakterizasyon verileri.....	69
Tablo 10. Peptit bağlı mPEG-PLGA-MA-NH ₂ Nanopartiküllerine ait karakterizasyon verileri.....	70
Tablo 11. Sentezlenen polimer yapıların FT-IR bantları ve ilgili fonksiyonel grup değişimleri.	76
Tablo 12. PLGA, MPEG-PLGA-MA-NH ₂ ve MPEG-PLGA-MA-NH ₂ -B6-QSH ürünlerine ait karşılaştırmalı GPC molekül ağırlığı tayini.	81
Tablo 13. Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi.	84
Tablo 14. PBS, DMEM ve %50 FBS ortamında NAC yüklü nanopartiküllerin stabilite analizleri.	87
Tablo 15. Liyofilizasyon sonrası nanopartikül re-dispersiyonunun partikül boyutu, PDI ve Zeta potansiyeli üzerindeki etkileri.	89
Tablo 16. UV sterilizasyonu uygulanan nanopartiküllere ait karakterizasyon verileri. .	90
Tablo 17. SDS-PAGE jel hazırlanması için kullanılan malzemeler.	94
Tablo 18. Boltz-2 kullanılarak A β (6RHY) oligomerlerinin EPPS ve QSH ile farklı stokiyometrik oranlarda gerçekleştirilen in silico simülasyonlarından elde edilen bağlanma skorları.	104

1.Giriş

Alzheimer hastalığı (AH) demansın en yaygın görülen tipi, önemli bir halk sağlığı problemidir. Merkezi sinir sistemini etkileyen bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın patolojisinin ilerlemesi nöral hasara ve nöron ölümlerine ve nihayetinde hastaların ölümüne yol açmaktadır. Kesin olmayan tanı ve tedavi yöntemlerinin günümüzde mevcut olmaması, tedavinin semptomatik olması nedeniyle tanı ve tedaviye yönelik farklı bakış açıları ortaya çıkmıştır. Hastalığın ilerlemesi, beyinde sırasıyla anormal katlanmış A β peptitlerinden ve hiperfosforile tau proteininden oluşan amiloid- β (A β) plaklar ve nörofibriler yumaklarla yakından ilişkilidir (Castellani vd., 2010; Tiwari vd., 2019). Bu iki patolojik özellik oksidatif stres, nöroinflamasyon ve azalmış antioksidan kapasitesi gibi pek çok yolakta kilit rol oynadığı kanıtlanmıştır. İn vitro stratejilerde sitotoksik ajanlar tarafından amiloid agregat oluşumu tetiklenmekte daha sonra uygun tanı/tedavi metodolojisi uygulanmaktadır (Scheltens vd., 2021a; Trejo-Lopez vd., 2022). Mevcut stratejilerde patolojik özellikler ve bozulan yollar hedef alınması hastalığın özellikle tedavisinde ön plana çıkmıştır. Amiloid hedefli moleküller fizikokimyasal etkileşimler yoluyla amiloid 3 boyutlu yapılarının hidrofobik yüzeyleriyle etkileşime girmektedirler (Niu vd., 2024; Shao vd., 2022). Bu nedenle tez çalışmada; çözünemeyen toksik agregatları, toksik olmayan çözünür formlara dönüştürmek ve eş zamanlı olarak nöroinflamasyonun ve oksidatif stresin yarattığı sitotoksik yükü azaltmaya yönelik için alternatif ajan kullanma yoluna gidilmiştir. Bu doğrultuda çalışmada, küçük bir molekül olan 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinpropansülfonik asit (EPPS) ve N-asetilsitein (NAC) yüklü nanopartikülün kombine terapötik etki hedefiyle kullanımını, amiloid toksisitesi oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde etkilerini incelemeyi amaçladık.

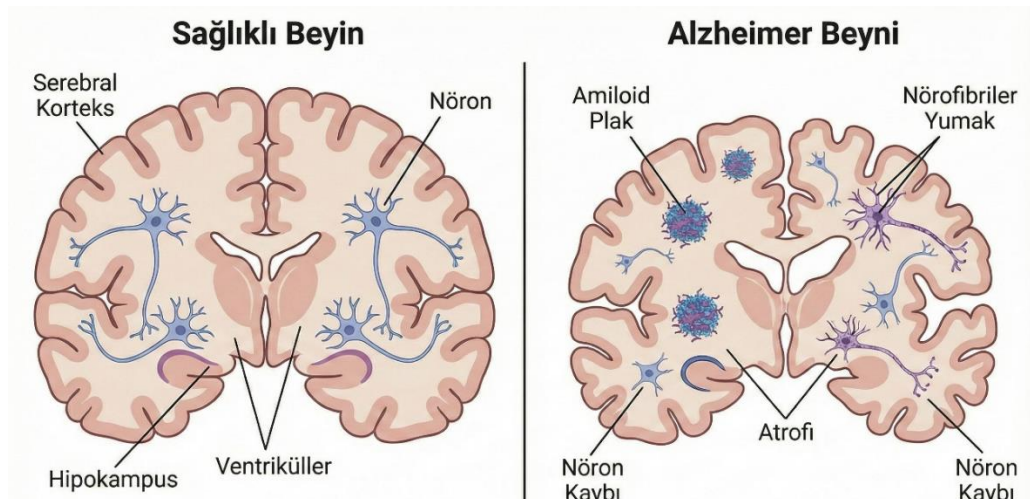
1.1. Alzheimer hastalığı

1906 yılında Alios Alzheimer tarafından tanımlanan Alzheimer Hastalığı yıkıcı etkiye sahip progresif ve nörodejeneratif bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Pek çok demans tipi içerisinde en sık rastlanan AH; başta amnezi olmak üzere afazi, apraksi, agnozi, karakter değişimleri gibi semptomlar ile kendini gösterir. Hastalığın gelişiminde birçok patolojik parametrenin etkileşimi söz konusudur. Beyin dokusunda, hücre dışı amiloid plak ve hücre içi nörofibriler yumak birikimleri ve bu anormal birikimlerden kaynaklanan oksidatif stres ve inflamasyon görülür. Genellikle beynin hipokampüste bulunan

entorhinal korteks bölgesinden başlayarak yayılır ve nöron ölümlerine bağlı beyinde atrofi meydana gelir. Nöron kaybına bağlı gelişen patolojik süreçler geri dönüşümsüzdür ve hastada günlük yaşam aktivitelerini ciddi ölçüde kısıtlayan bilişsel ve nörolojik yıkımlara neden olur. (Scheltens vd., 2021a; Trejo-Lopez vd., 2022).

AH kesin etiyolojisi hâlen tam olarak anlaşılamamıştır. İleri yaş, başta olmak üzere genetik yatkınlık (örneğin APOE ε4 aleli) ve vasküler/çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimleri hastalığın meydana gelmesinde rol oynamaktadır (Chopra vd., 2022). AH, demans tipleri arasında en sık görülen demans türüdür. 2021 verilerine göre 57 milyon kişi demans hastası olarak kayda geçmiş ve bu hastaların %60–70 kadarı Alzheimer Hastalığı'na bağlı demans hastaları olduğu görülmüştür (World Health Organization, 2024). Küresel yaşlı nüfus ile birlikte; hastalığın görülme sıklığının da artacağı tahmin edilmektedir. 2021'de dünya genelinde ≈50 milyon AH vakası kayıt altına alınmışken, 2030'a kadar bu sayının ≈78 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Hu vd., 2023a). Bu artış, hastalığın sağlık sistemi üzerindeki yükünü ciddi biçimde artırmaktadır.

Patolojik düzeyde AH, beyin dokusunda Aβ plakları ile hiperfosforile tau proteininden oluşan nörofibriler yumaklar birikimi ile tanımlanır (Hu vd., 2023a). Aβ birikimi mikroglia'yı aktive ederek kronik inflamasyonu tetikler ve oksidatif stres ile birlikte nöronal dejenerasyona yol açar. Sinaptik ve nöron kaybı sonucu medial temporal lobda belirgin atrofi gelişir (Şekil 1). AH'nın başlıca patolojik özellikleri –Aβ plakları, tau yumakları ve mikroglia aracılı inflamasyon– hastalığın ilerleyen dönemlerinde progresif sinir hücresi kaybıyla sonuçlanmasına neden olur. Patolojik süreçler nihayetinde hafıza ve diğer bilişsel işlevlerde kayıplara neden olarak günlük yaşam aktivitelerini ciddi ölçüde kısıtlar (den Haan vd., 2018; Hu vd., 2023a; Scheltens vd., 2021b).



Şekil 1. Alzheimer Hastalığının nöropatolojik ve yapısal değişikliklerinin şematik gösterimi.

Hastalığın progresif seyri Global Bozulma Ölçeği ile 7 evrede kategorize edilmiştir. İlk aşama, hastalıktan önceki kısım olan prekliniktir (aşama 1-2) burada belirgin semptomatik bulgu yoktur. Hafif hafıza ve dikkat kaybı görülebilir ama günlük yaşamı etkilemez. Hastalığın erken aşamalarında (aşama 3-4) hafif bilişsel bozulmalar başlar. Unutkanlık şikayetleri belirginleşir, öğrenme gücü, yeni bilgiler edinmede zorluk yaşanması gözlemlenir. Çevreden fark edilir ve hastada sosyalleşme azalır. Orta dönemde (aşama 5) kişisel tarih bilgilerini ve yakınlarını tanıyamama başlar. Yarı bağımlı bir yaşam görülür. Gelişmiş dönemde (aşama 6) tam bağımlı olmaya başlayan hastada iletişimsizlik görülür. Ajitasyon, uyku bozukluğu gibi davranışsal semptomlar gösterir. Son aşamada ise (aşama 7) ciddi unutkanlık söz konusudur. Motor fonksiyonları dahi yerine getirememeye başlar. (Reisberg vd., 1982; Scheltens vd., 2021b). Alzheimer hastalığının bu öngörülebilir klinik seyri, doğal olarak tanısal değerlendirmenin odak noktasını oluşturur. Klinik evreleme, sadece prognozu belirlemekle kalmaz, aynı zamanda semptomları patolojiyle ilişkilendirilerek tanı konulmasının da temelini oluşturur.

Tanıda nörolojik muayene ve bilişsel testlerin yanı sıra beyin görüntüleme ve biyolojik belirteçler kullanılmaktadır. Yapısal MR’da tipik olarak temporal ve parietal kortikal atrofi görülürken, moleküler PET A β ve tau birikimlerinin varlığını gösterebilir. Ayrıca BOS veya kanda ölçülen A β /tau düzeyleri de AH patolojisini destekleyen bulgular sağlar (Tablo 1) (Dubois vd., 2023).

Tedavi seçenekleri, semptomatik bir etkiye sahip olup, hastalığın ilerlemesini durduracak etkileri bulunmamaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (donepezil, rivastigmin, galantamin, huperzin A) ve NMDA reseptör antagonisti memantin ile birlikte, hastalığın belirtilerinin geçici olarak hafiflemesini sağlar (Atri vd., 2013; Wilson vd., 2008). Hastalığın temel mekanizmalarını hedef alan birçok yeni ilaç adayı klinik denemelerde başarısız olmuştur. Örneğin çift terapötik etki için klinikte nöroinflamasyonu veya A β ’yi hedefleyen aducanumab ve gantenerumab denemeleri olumsuz sonuçlanmıştır. Olumlu sonuçlanan klinik çalışmaların sayısı az olsa da mevcuttur. Son dönemde A β protofibrillerine yönelik lekanemab antikoru Faz III denemesinde etkinlik göstererek Eylül 2022’de onay almıştır (Hu vd., 2023a). Fakat araştırmalar incelendiğinde etkinliğinin beklenin altında kaldığı görülmektedir. Bu durumlar göz önüne alındığında tedavi için hastalığa yeni yaklaşımlar gerektiği açıkça görülmektedir.

Tablo 1. Alzheimer Hastalığı tanısındaki temel kriterler ve doğrulayıcı biyobelirteçler (Jack vd., 2018).

Kategori / Kriter		Bileşenler / Biyobelirteçler	Açıklama
Klinik Kriterler (NIA-AA)		Epizodik bellek bozukluğu	AH'nin klinik tanısı için çerçeve sağlar. Biyobelirteçlerle birlikte tanıyı güçlendirir.
		Diğer bilişsel alanlarda bozulma (dil, yürütücü işlevler vb.)	
Biyobelirteçler	Amiloid Patoloji	CSF'de düşük A β 42 (veya A β 42/40 oranı)	Amiloid plak birikimini gösterir. Hastalığın erken patolojik göstergesidir.
		Pozitif Amiloid-PET	
	Tau Patolojisi	CSF'de yüksek fosfo-tau (p-tau)	Nöron içindeki nörofibriler yumakları gösterir. Nörodejenerasyonla daha güçlü ilişkilidir.
		Pozitif Tau-PET	
	Nörodejenerasyon	MRG'de hipokampal/ kortikal atrofi	Nöronal hasar ve hücre ölümünün dolaylı göstergesidir.
		FDG-PET'te hipometabolizma	

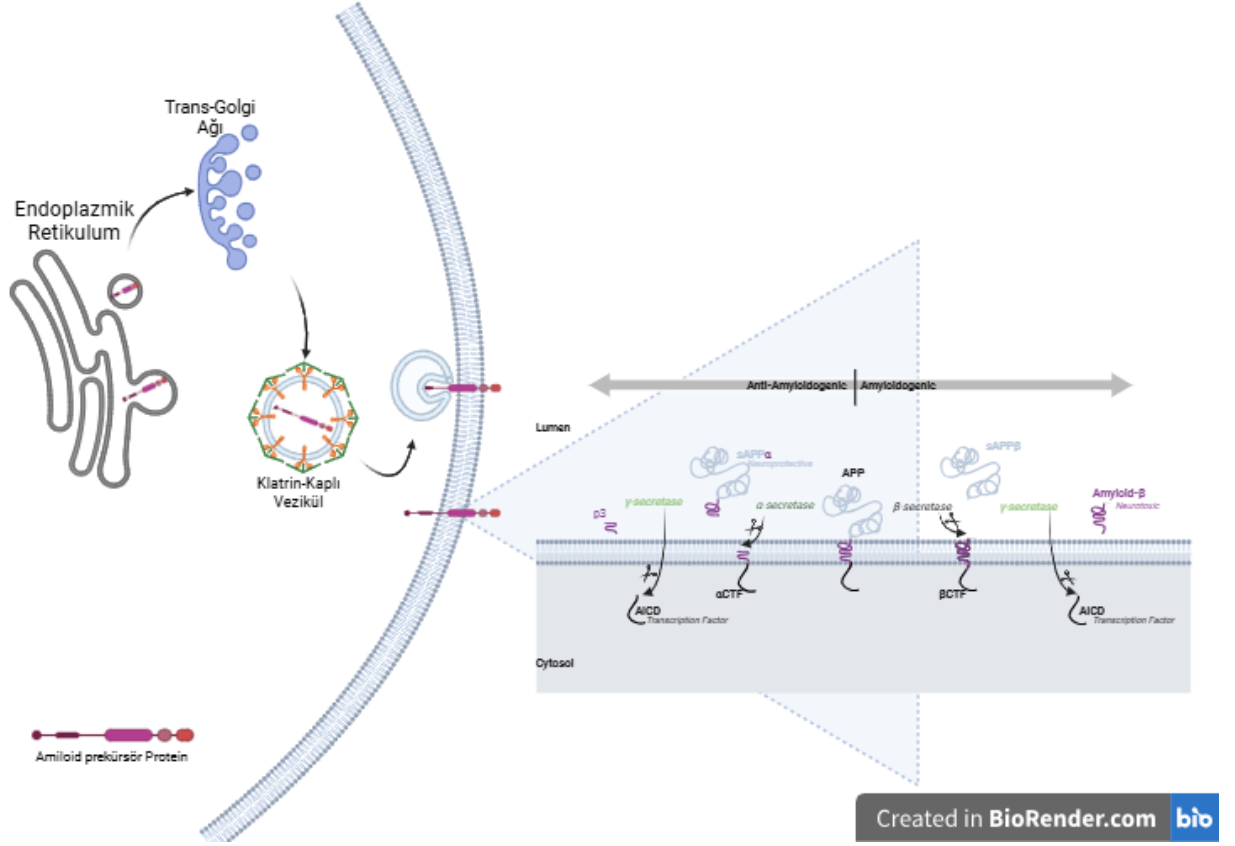
Hastalığın mevcut tanı ve tedavi yöntemleri yeterli kalmamakta ve yeni yöntem arayışlarına girilmektedir. Nanoteknolojik yaklaşımlar bize bu yöntem arayışında yeni bir bakış açısı katmıştır. Mevcut yöntemlerle karşılaşılan zorlukların aşılmasında, bölge hedeflemede etkili yöntemler sunmaktadır (Hu vd., 2023a). Multi disiplinler bir alan olan

nanoteknoloji tanı, tedavi ve teranostik yaklaşımları mümkün kılarak AH için yeni umutlar vaad eder.

1.2. Alzheimer hastalığının patolojisi

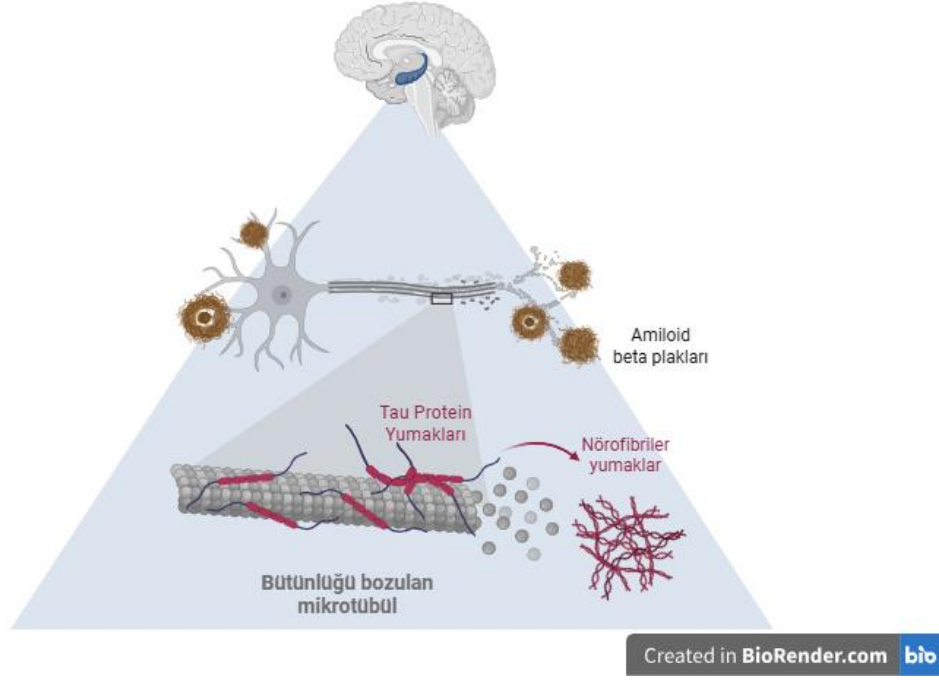
AH, hipokampüste yoğun olarak başlayan A β peptidlerinin beyinde anormal bir şekilde birikimi, tau proteinlerinin hiperfosforile olması şeklinde patoloji gösterir (Şekil 2). AH temelde bu iki patolojinin neden olduğu sinaptik kayıp, nöroinflamasyon ve oksidatif stres gibi multifaktöryel mekanizmalarla seyreden ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluktur (Selkoe & Hardy, 2016). A β , öncül bir protein olan Amiloid Prekürsör Proteinin (APP) proteolitik kesimi sonucu elde edilir. Tip I transmembran protein olan APP, bir glikoproteindir. Hücre içinde ribozomda sentezlenirken aynı zamanda endoplazmik retikulumda tranloke edilir. Burada glikolizasyona uğrayıp paketlenir (Orobets & Karamyshev, 2023). Paketlenen APP Golgi aygıtında Trans-Golgi ağına transfer olur ve burada modifikasyonlar gerçekleşir (Orobets & Karamyshev, 2023; Upadhyay, 2024). Buradan veziküllerle paketlenerek direkt ya da endozomlarla membrana taşınan APP amiloidojenik ya da amiloidojenik olmayan proteolitik kesimlere uğrar. Amiloidojenik olmayan yolakta APP'in A β bölgesinden α -sekretaz ile kesimi gerçekleşir. Bu ilk kesimle dışa salınan sAPP α fragmanı ve membran bağlı C83 fragmanı oluşur; α -sekretaz kesimi A β dizisini ortadan böldüğü için A β oluşumu engellenir (Sirisi vd., 2024). Bu ilk kesimle dışa salınan sAPP α fragmanı ve membran bağlı C83 fragmanı oluşur; α -sekretaz kesimi A β dizisini ortadan böldüğü için A β oluşumu engellenir (Orobets & Karamyshev, 2023). C83, γ -sekretaz tarafından kesilerek p3 peptidini ve AICD'yi oluşturur. p3 fragmenti nörotoksik değildir (Sirisi vd., 2024). sAPP α ise nöroprotektif özellik taşır ve β -sekretazı inhibe ederek A β üretimini baskılar (Orobets & Karamyshev, 2023). Sonuç olarak amiloidojenik olmayan yolakta toksik olmayan fragmentler oluşurken; amiloidojenik yolakta toksik amiloid-beta fragmentleri oluşur (Burgos vd., 2010; Orobets & Karamyshev, 2023; Thinakaran & Koo, 2008). Amiloidojenik yolakta APP önce β -sekretaz (BACE1) ile kesilir ve sAPP β ve membran bağlı C99 fragmanını üretir. C99 fragmenti γ -sekretaz kompleksi (presenilin alt birimi içeren 4 alt birimden oluşan) tarafından tekrar kesilerek AICD ve çeşitli uzunluklarda A β peptitleri (başta A β 40 ve A β 42) açığa çıkarır. Özellikle C-terminali hidrofobik A β 42 formu yüksek agregasyon eğilimindedir (Şekil 2) (Sirisi vd., 2024; Q. Zheng & Wang, 2025). APP'nin α -sekretazla kesilmesi, C99 fragmentinin oluşmamasını ve nörotoksik olmayan sAPP α oluşmasını sağlar ve amiloid oluşumunu engeller (Orobets &

Karamyshev, 2023; Sirisi vd., 2024). Toksik A β peptitleri, hidrofobik etkileşimler sonucu monomerlerden dimer, trimer gibi düşük ağırlıklı oligomerler oluşturur; bu oligomerler, daha büyük protofibriller ve fibriller halinde birikerek plakları meydana getirir (Novo vd., 2018; Q. Zheng & Wang, 2025).



Şekil 2. Amiloid prekürsör proteininin hücre içi taşınması ve proteolitik yıkım yolları.

AH'de nöropatolojik olarak A β plaklarına ek olarak tau proteini birikimlerinin birikimi sonucu oluşan nörofibriler yumaklar da öne çıkar (X. Zhang vd., 2024). Fakat amiloid-kaskad hipotezi, A β birikimini AH patogenezinin başlangıç noktası olarak tanımlar: A β agregasyonu, tau fosforilasyonunu tetikleyip NFT oluşumuna ve nöronal dejenerasyona yol açar (Behl, 2024; Q. Zheng & Wang, 2025) (Şekil 3).



Şekil 3. Alzheimer patolojisinin iki temel unsuru: Hücre dışı biriken Amiloid-beta plakları ve hücre içi Tau protein yumakları.

Normalde aksonlardaki mikrotübülleri stabilize eden tau proteini, AH'de aşırı fosforilasyon ve diğer post-translasyonel değişiklikler geçirir (X. Zhang vd., 2024; Q. Zheng & Wang, 2025). Tau proteininde yaklaşık 85 potansiyel fosforilasyon bölgesi bulunur; Alzheimer patolojisinde bu bölgelerdeki aşırı fosforilasyon tau'un nörofibriler yumaklara dönüşümünü kolaylaştırır (X. Zhang vd., 2024). Bu modifikasyonlar tau'nun mikrotübüllerden ayrılmasına; açığa çıkan tau, çift sarmallı filamentlere dönüşerek nörofibriler yumakların (NFY) oluşturmaya neden olur. Bu durum beraberinde mikrotübül destabilizasyonunu getirir (X. Zhang vd., 2024). Sağlıklı nöronlarda tau, mikrotübülleri stabilize ederken sinyal iletimine de katkıda bulunur (Q. Zheng & Wang, 2025). Tau proteinlerinin birikimi mikrotübül stabilitesini olumsuz etkileyerek nöronal taşımayı sekteye uğratır. Bu yumak yoğunluğu beyin atrofi ve bellek-kognitif gerileme ile doğrudan bağlantılıdır. (Novo vd., 2018; X. Zhang vd., 2024).

Alzheimer hastalığının patogenezi amiloid kaskad hipotezi ile açıklanabilir. Toksik A β peptidleri beyinde ekstraselüler matrikste birikir. Biriken A β peptidlerinin ROS hiperüretimi, hücre bileşenlerinin oksidatif hasarı, hücresel kalsiyum homeostazının değişmesi ve nöronal hücrelerde apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi gibi çeşitli

zararlı etkileri vardır. A β ayrıca hücre zarı, lizozomlar, mitokondri ve mikrotübüller dahil olmak üzere çeşitli hücre yapılarıyla birlikte bulunarak toksik olabilir. Nöronal hücrelerde A β peptid toksisitesinin mekanizması için birçok açıklama önerilmiştir (den Haan vd., 2018; Fedele, 2023; Sciacca vd., 2013).

AH patogeneğinde A β plaklarının nörotoksik etkilerinden ziyade ara form olan A β oligomerlerinin sinaptik disfonksiyonunun birincil etmenleri olduğu giderek daha fazla kabul görmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, A β zincirlerinin çözünebilir oligomerik formlarının fibriler plaklardan çok daha nörotoksik olduğunu göstermiştir (Wang vd., 2023). A β monomerleri agregasyon sırasında ara ürün olarak oligomerler oluşturur; bu oligomerler, fibrillere göre nöronal hasara doğrudan yol açar. A β oligomerlerinin artışı plak oluşumundan önce bile nöronal ölümü tetikleyebilmektedir (Meng vd., 2024a; Wang vd., 2023). Bu oligomerik türler, hücre zarına entegre olarak iyon gradientlerini bozabilmekte veya spesifik yüzey reseptörlerine (NMDA reseptörü gibi) bağlanarak hücre sel sinyalizasyon kaskadlarını etkileyebilmektedir. Özellikle, glutamaterjik transmisyonun deregölasyonu, artmış intraselüler kalsiyum seviyeleri üzerinden mitokondrial disfonksiyonu, oksidatif stresi ve nihayetinde apoptozu tetikleyerek nöronal kayba yol açmaktadır (Kwon vd., 2016; Wang vd., 2023). Sonuç olarak hücre içi kalsiyum homeostazı bozulur, reaktif oksijen türü (ROS) üretimi artar ve apoptoz gibi ölüm yolları aktive olur. Bu bağlamda, A β oligomerlerinin uzun mesafeli potansiyasyon (LTP) üzerindeki inhibe edici etkileri ile kısa mesafeli potansiyasyon (LTD) mekanizmalarını güçlendirdiği deneysel olarak gösterilmiştir; bu durum, AH'nin erken evre bilişsel kayıplarının altında yatan temel fizyopatolojik olguya işaret etmektedir (Haass & Selkoe, 2007). Bu noktalardan hareketle oligomer ayrıştırıcı ajanlar geliştirilmiştir; örneğin EPPS, CLR01, epigallokateşin gibi küçük moleküllerin A β oligomerlerini çözerek toksisiteyi azalttığı ileri sürülmüştür (Kwon vd., 2016; Meng vd., 2024a; Sinha vd., 2012).

Klinik olarak AH, hafıza ve bilişsel işlev kayıplarıyla kendini gösterir. Hastalığın erken döneminde amiloid ve tau değişimleri başlamasına rağmen, semptomlar on yıllar sonra ortaya çıkar; bu yüzden AH, çoklu hücre sel stres yanıtlarının bir araya gelmesiyle ilerleyen karmaşık bir patolojiye sahiptir (Teleanu vd., 2022). Özetle, A β ve tau birikimleri, çevresinde inflamatuvar ve oksidatif süreçleri başlatan merkezi patolojilerdir.

1.3. Alzheimer hastalığında oksidatif stres ve nöroinflamasyon

AH, neredeyse eş zamanlı olarak çok yönlü patolojik mekanizma bozulmalarıyla karakterize nörodejeneratif bir hastalık olup, oksidatif stres ve nöroinflamasyon bu sürecin temel belirleyicilerindendir. (Dubois vd., 2023; Hardy, 2025). Amiloid ve Tau'nun oluşturduğu patolojik birikimler; sinaptik işlevselliğin bozulması, nöroinflamasyon, oksidatif hasar ve mitokondriyal disfonksiyon gibi ikincil süreçleri tetikler (Firdous vd., 2024). Normal fizyolojik koşullarda hücrel redoks dengesi, endojen antioksidan savunma mekanizmaları ile korunmakta; reaktif oksijen türleri (ROS) nötralize edilerek hücrel bütünlük sürdürülmektedir. Ama Alzheimer Hastalığı'nda bu denge bozulur ve A β (1-42) gibi biriken toksik peptidler, oksidatif stresi başlatan ana nedenlerdendir (Firdous vd., 2024; Suzuki, 2009). Beyin dokusu, çok fazla doymamış yağ asidi, aktif metal iyonları ve az antioksidan olduğu için oksidatif hasara çok duyarlıdır. A β biriktiğinde süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesi düşer; lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein oksidasyonu artar. Bu durum hem nöronal fonksiyonların bozulmasına hem de apoptoza sürüklenen hücre kayıplarına neden olur (Cheignon vd., 2018; Firdous vd., 2024).

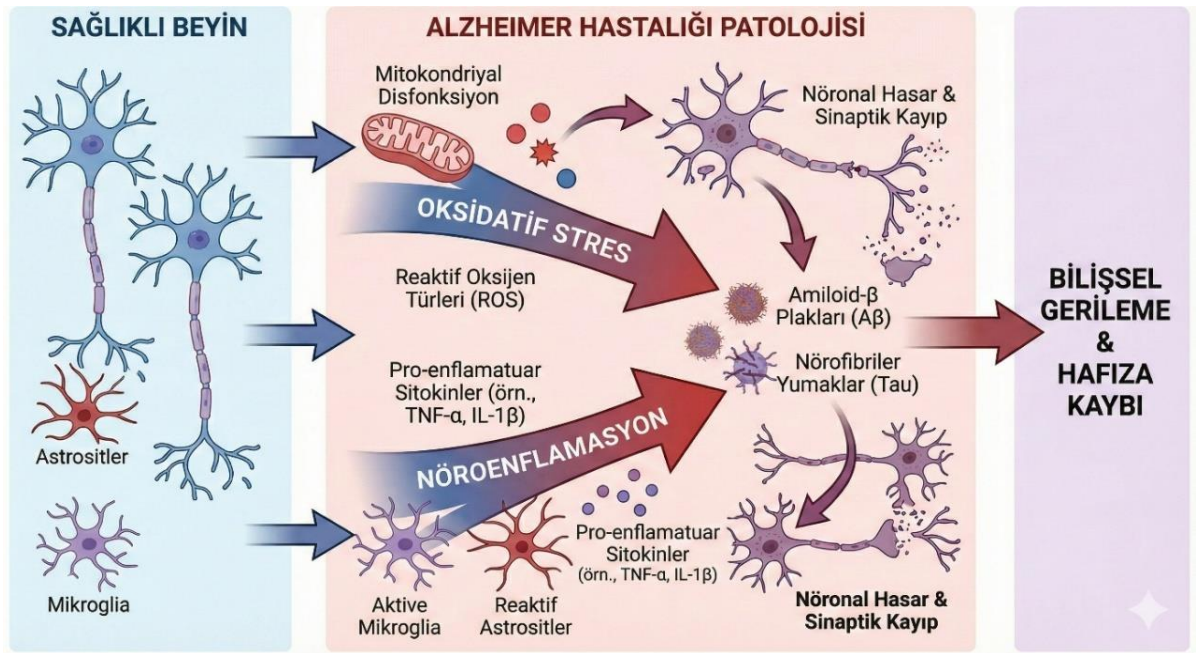
Nöronal canlılık ve sinaptik işlev için mitokondriyal fonksiyon kritik önemdedir. AH'de mitokondriyal disfonksiyon erken aşamalarda gözlenen temel bir özelliktir. Mitokondriyal kaskad hipotezine göre, mitokondriyal bozukluk AH patogenezinin temelini oluşturabilir; başlangıçtaki mitokondriyal performans ve değişim hızı bilişsel gerilemeyi etkiler (Ashleigh vd., 2023; Song vd., 2021). A β oligomerleri mitokondriye girebilir ve elektron taşıma zincirini bozarak ATP üretimini düşürür, ROS üretimini artırır ve matriks içi kalsiyum fazlalığına yol açar (Ashleigh vd., 2023; Meng vd., 2024a). A β o varlığında mitokondriyal parçalanmanın arttığı bildirilmiştir (Ashleigh vd., 2023; Kwon vd., 2016). Tüm bu durumlar hücre içi ölüm sinyallerini tetikler (sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu gibi) ve sonuç olarak geri dönüşü olmayan nöron kayıpları başlar. Mitokondri bozulmasıyla aynı anda sitokrom oksidaz gibi enzimlerin işlevini yitirir ve enerji eksikliği daha da artar (Alkhalifa vd., 2025). Hastalık süreçleri sinaps noktasında nöron kaybına ve zihinsel işlev bozukluğuna yol açar. Kısaca, mitokondriyal bozulma, Alzheimer hastalığının merkezinde durur (Alkhalifa vd., 2025; Song vd., 2021).

Oksidatif stresin yarattığı hücrel ortam, mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu tetikler ve nöroinflamatuvar sürecin başlamasına zemin hazırlar. Mikroglial hücreler, A β ile etkileşim sonrası aktive olarak proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 β , IL-6) ve

kemokinlerin salınımını başlatır, bu da inflamatuvar kaskadın daha da şiddetlenmesine yol açar. Uzun süreli glial aktivasyon, fizyolojik yanıtın ötesine geçerek patolojik bir hal alır; çevre dokulara zarar vererek sinaptik bağlantıların bozulmasına, nörotrofik mekanizmalarının zayıflamasına ve nöron kaybına neden olur (Alkhalifa vd., 2025; LaRocca vd., 2021).

Aktive glia hücreleri, NF- κ B/MAPK yolları üzerinden TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılar (Melchiorri vd., 2023; J. Zhang vd., 2024). Örneğin, TNF- α sinyali beyin-bariyerini bozarak periferik bağışıklık hücrelerinin girişini kolaylaştırır ve A β plak birikimini arttırarak Alzheimer patolojisine destek olur. Literatürde AH'li hastaların hem periferik kanında hem beyin dokusunda TNF- α seviyelerinin gerçekten anlamlı bir şekilde yükseldiğini bildirmiştir (Melchiorri vd., 2023). Benzer şekilde IL-1 β de artmıştır; artmış kan düzeyleri AH gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Bu sitokinler inflamasyonu tetiklemekle kalmaz, aynı zamanda sinaptik fonksiyonu bozar ve hücre ölümünü hızlandırır (LaRocca vd., 2021; Melchiorri vd., 2023; J. Zhang vd., 2024).

Beyin yüksek oksijen tüketimi, bol doymamış yağ asitleri ve nispeten zayıf antioksidan savunma nedeniyle oksidatif strese yatkındır (Alkhalifa vd., 2025). ROS birikimi nöronal hasarı güçlendirir. Hücredeki başlıca endojen antioksidan savunma bileşenlerinden biri süperoksit dismutaz (SOD) enzimleridir. SOD'lar süperoksit anyonlarını daha az zararlı hidrojen per oksit (H₂O₂)'ye dönüştürerek oksidatif hasarı önler. Klinik ve genetik çalışmalar, SOD geni bozukluklarıyla Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar arasında doğrudan bağlantı olduğunu göstermiştir (Chidambaram vd., 2024). Örneğin SOD1 gen mutasyonlarının nöronlarda oksidatif hasar birikimine ve AH gelişimine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. Bu çerçevede NAC (N-asetilsistein) gibi antioksidan ajanlar önem kazanır. NAC, glutatyon öncüsü olarak hem doğrudan ROS'u temizler hem de hücresel antioksidan mekanizmaları tetikler. Bir fare modelinde NAC tedavisi beyin A β 40 seviyelerini düşürmüş, lipid peroksidasyon belirteci 4-HNE'yi normale yaklaştırmış ve bilişsel performansı iyileştirmiştir (Ontawong vd., 2025). Bu bulgular, NAC'ın oksidatif stresi azaltarak AH patolojisini hafiflettiğini destekler. Dolayısıyla NAC benzeri moleküller, oksidatif strese ve A β toksisitesine çift yönlü karşı koyma potansiyeli taşır (Şekil 4).



Şekil 4. Alzheimer Hastalığı patolojisinde oksidatif stres ve nöroinflamasyon arasındaki ilişki.

Sonuç olarak, Alzheimer hastalığında patoloji çok boyutlu bir ağ şeklindedir. A β ve tau protein birikimleri, oligomerik A β 'in nörotoksik etkileri, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve yükselmiş proinflamatuvar sitokinler birbirini besleyen süreçler olarak işlev görür. Bu mekanizmalara karşı NAC gibi antioksidan savunmayı güçlendiren bileşikler ve EPPS gibi A β oligomerlerini hedef alan moleküller geliştirilmiştir. Patolojik yollardaki bu iç içe geçmiş değişikliklerin anlaşılması, NAC ve EPPS gibi tedavi ajanlarının etkinliğini değerlendirmek ve yeni terapötik stratejiler geliştirmek için temel oluşturmaktadır (Meng vd., 2024b; Ontawong vd., 2025).

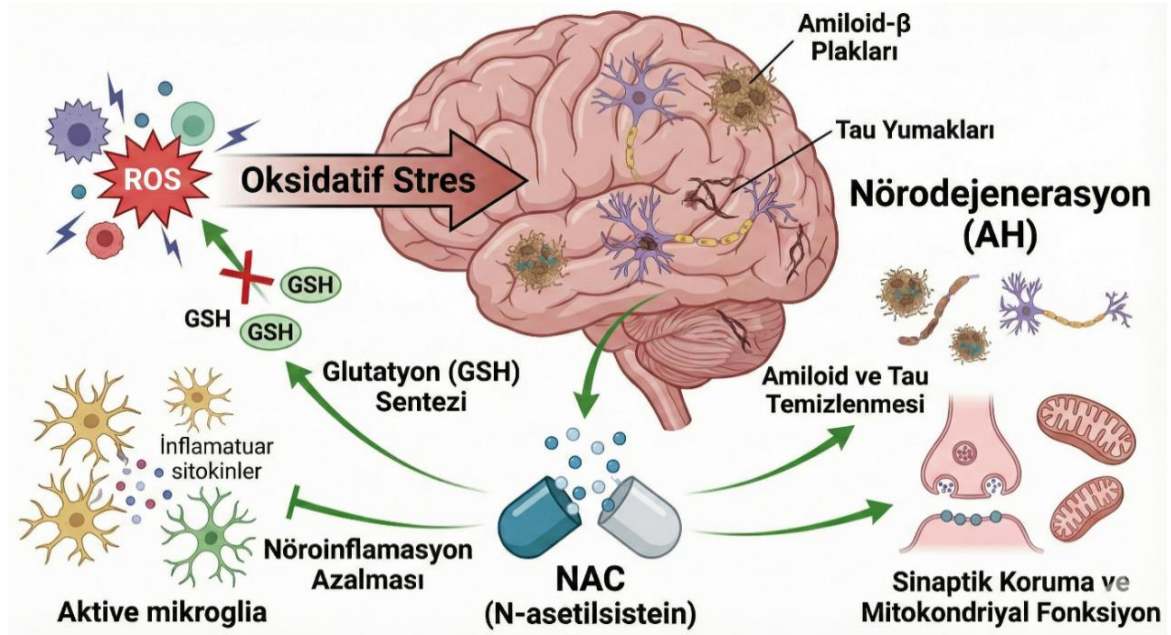
1.4. N-Asetil Sistein

Oksidatif stres özellikle AH patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. A β birikiminin, beyin dokusunda ROS üretimini artırdığı, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir. AH hastalarının beyinde normal yaşlanmaya kıyasla belirgin oksidatif hasar biomarkerleri saptanmıştır; temporal korteks ve hipokampusta yüksek düzeyde lipid peroksidasyon ürünleri, glutatyon (GSH) düzeylerinde ise kayda değer azalma bildirilmiştir. Bu bulgular, antioksidan ve anti-inflamatuvar stratejilerin AH'de önemli bir hedef olabileceğini göstermektedir (Markoutsas & Xu, 2017).

N-Asetil-sistein (NAC), güçlü antioksidan etkileriyle bilinen ve glutatyon prekürsörü olan küçük bir moleküldür. NAC'ın temel etki mekanizması, hücresel GSH seviyelerini yükselterek veya GSH tükenmesini önleyerek oksidatif stresi azaltmasıdır. İçerisinde serbest bir tiol grubu bulunduran NAC, bu sayede serbest radikalleri süpürüp etkisizleştirebilir ve hem hücre içinde hem de hücre dışında ROS detoksifikasyonuna katkıda bulunur (Markoutsas & Xu, 2017). Literatürde NAC, özellikle reaktif oksijen ve azot türlerinin neden olduğu hasarı engellemek için çeşitli mekanizmalara sahip bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Bunlar arasında serbest radikallere doğrudan elektron vererek nötralize etme, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri aktive ederek endojen antioksidan savunmayı güçlendirme ve metal iyonlarını şelatlayarak Fenton reaksiyonlarını yavaşlatma sayılabilir. NAC aynı zamanda inflamatuvar süreçleri modüle edebilme kapasitesiyle de dikkat çeker. Örneğin *in vitro* çalışmalarda NAC varlığında proinflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin nükleusa geçişinin engellendiği, interlökin-1 β (IL-1 β) ile indüklenen siklooksijenaz-2 (COX-2) gen ifadesinin baskılandığı gösterilmiştir. NAC'ın fosfolipaz A2 enzim aktivitesini düşürerek araşidonik asit ve dolayısıyla prostaglandin üretimini azalttığı da rapor edilmiştir. Bu bulgular, NAC'ın antioksidan etkilerinin yanı sıra anti-inflamatuvar ve hücre koruyucu rollerinin de olduğunu ortaya koymaktadır (Tenório vd., 2021).

Oksidatif stres ve nöroinflamasyonun AH patolojisine katkıda bulunduğu göz önüne alındığında, NAC bu hastalık için umut vadeden bir terapötik molekül olarak araştırılmaktadır. Hem *in vitro* hücre modellerinde hem de *in vivo* deney hayvanlarında yapılan birçok çalışma, NAC takviyesinin AH ile ilişkili hasarları hafifletebildiğini göstermiştir. NAC uygulanmış transgenik AH hayvan modellerinde, beta-amyloid plak birikiminin azaldığı, tau proteininde hiperfosforilasyonun gerilediği ve sinaptik protein

seviyelerinin iyileştiği bildirilmiştir. Kolşisin ile deneysel AH modeli oluşturulan sıçanlarda NAC verilmesi, A β plak oluşumunu ve mikroglia aktivasyonunu azaltmış, bellek fonksiyonlarında iyileşme sağlamıştır. Farklı transgenik mouse modellerini derleyen bir incelemede, NAC tedavisinin kronik uygulamasının beyindeki TNF- α ve IL-6 gibi proinflatuvar sitokin düzeylerini düşürdüğü, apoptoza yol açan sinyalleri zayıflattığı ve mikroglia aktivasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmalarda NAC alan hayvanlarda β -amiloid birikiminin daha düşük, tau protein fosforilasyonunun ise daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. İn vitro olarak, NAC'ın nöronal hücre hatlarında oksidatif hasar göstergelerini (ör. 4-hidroksinonenal, malondialdehit gibi lipid peroksidasyon ürünleri) azalttığı, hücre yaşamını olumsuz etkileyen reaktif karbonil oluşumunu engellediği gözlenmiştir (Pan vd., 2025; Tenório vd., 2021) (Şekil 5).



Şekil 5. NAC'ın Alzheimer hastalığı patolojisi üzerindeki çok yönlü terapötik mekanizmaları.

NAC'ın bilişsel işlevlere etkisi, klinik düzeyde de araştırılmaktadır. Hafif ve orta evre AH hastalarında antioksidan tedavilerin hastalık progresyonunu yavaşlatabileceğine dair bazı kanıtlar mevcuttur. Özellikle NAC'ın bir destek tedavi (adjuvan) olarak kullanıldığı pilot çalışmalar, plaseboya kıyasla bilişsel test skorlarında mütevazı iyileşmeler ve kan/tükürük biyobelirteçlerinde oksidatif stresin azaldığını bildirmektedir. 2025 yılında yapılan bir çalışmada, günde 600 mg oral NAC takviyesinin AH hastalarında güvenle tolere edildiği ve bellek, yürütücü işlevler gibi bilişsel alanlarda ölçülebilir derecede iyileşme sağladığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada NAC alan hastalarda plazma oksidatif stres markırlarının düştüğü, endojen antioksidan kapasitenin arttığı ve inflamasyon göstergelerinin (örn. TNF- α) gerilediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, daha geniş katılımlı klinik çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır; zira önceki bazı antioksidan denemelerinde (E vitamini, C vitamini, α -lipoik asit ve NAC kombinasyonları gibi) istenen düzeyde klinik fayda sağlanamadığı da bildirilmiştir. Yine de mevcut veriler NAC'ın nöroprotektif etkileri sayesinde AH'de hastalığın temel patolojik mekanizmalarını çok yönlü olarak hedefleyebileceğini göstermektedir. NAC, bir yandan A β ve tau kaynaklı sinir hücresi hasarlarını azaltırken diğer yandan mitokondriyal fonksiyonu iyileştirmekte, apoptotik süreçleri yavaşlatmakta ve sinaptik kaybı önlemeye yardımcı olmaktadır (Pan vd., 2025; Tardiolo vd., 2018; Zafarullah vd., 2003).

Her ne kadar NAC umut veren bir molekül olsa da serbest halde uygulandığında farmakokinetik ve farmakodinamik bazı kısıtlılıklara sahiptir. Oral NAC'ın biyoyararlanımı oldukça düşüktür (%4–10 aralığında) ve çok hızlı bir şekilde metabolize olur. İntravenöz uygulamada ilacın plazmada büyük oranda albümin ve diğer proteinlere bağlandığı, bu nedenle serbest fraksiyonun sınırlı kaldığı bilinmektedir. NAC'ın yarı ömrü de kısa olup yaklaşık 5-6 saattir, bu da sık dozlama gerekliliğine ve tedavi etkinliğinde dalgalanmalara yol açabilir. Daha da önemlisi, NAC'ın merkezi sinir sistemine geçişi konusunda bazı belirsizlikler vardır. Kan-beyin bariyerini (KBB) doğrudan aşıp aşmadığı tam net değildir; bazı çalışmalar, beyin dokusunda oksidatif stres arttığında NAC'ın bariyeri kısmen geçebildiğini öne sürerken, diğerleri deasetilasyon gibi ön işlemlerin ve uygulama yolunun (örn. intra-arteriyel veya intravenöz) KBB geçişinde belirleyici olduğunu göstermiştir. Bu kısıtlılıklar, NAC'ın doğrudan uygulanmasındansa yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerle verilmesini daha cazip hale getirmektedir (Karimi Zarchi vd., 2015; Lancheros vd., 2018; Ontawong vd., 2025).

Nanopartikül (NP) sistemleri, NAC gibi moleküllerin hedef dokuya etkin biçimde ulaştırılması ve kontrollü salımı için geliştirilen güçlü araçlardır. Nanosistemler, aktif maddeyi çevresel yıkımdan koruyarak biyoyararlanımını artırabilir ve istenen bölgeye yönlendirilmiş taşıma sağlayabilir. NAC, yüksek suda çözünürlüğü ve küçük molekül yapısı nedeniyle, klasik formülasyonlarda uygun farmakokinetik profili yakalamakta zorlanır. Bu nedenle polimerik, lipid veya hibrit nanopartiküller içerisinde yüklenerek verilmesi, terapötik etkinliğini yükseltebilir. Nitekim çeşitli çalışmalar, NAC yüklü nanotaşıyıcıların serbest NAC'a kıyasla üstün nörolojik faydalar sağladığını göstermiştir. Örneğin, yakın tarihli bir çalışmada transferrin ile yüzey modifiye edilmiş lipid-polimer hibrit nanopartiküllerle (LPHNP) beyne hedefli NAC taşıması gerçekleştirilmiştir. Bu nanopartiküller, *in vitro* AH modeli olarak kullanılan insan kök hücre kaynaklı astroglial hücrelerde güçlü anti-inflamatuvar etki göstermiştir. Transferrin konjugasyonu sayesinde KBB'yi aşabilen NAC yüklü LPHNP'ler, lipopolisakkaritle aktive edilmiş astrositlerde IL-1 β , IL-6 ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin salımını belirgin biçimde azaltmış; ayrıca amyloid prekürsör proteini (APP) ve glial fibriler asidik protein (GFAP) gen ekspresyonlarını baskılamıştır (Vargas-Barona vd., 2024). Aynı koşullarda serbest NAC verildiğinde ise sadece IL-1 β ve kısmen IL-6 düzeylerinde düşüş gözlenmiş, APP gibi kritik bir gen üzerinde etkili olunamamıştır. Bu bulgu, nanopartikül içindeki NAC'ın hücrelere alınımının ve hücre içi etkinliğinin serbest formuna kıyasla çok daha yüksek olduğuna işaret etmektedir (Y. Chen vd., 2025; Vargas-Barona vd., 2024).

NAC'ın nanotaşıyıcılarla ulaştırılmasının bir diğer avantajı da hedefe yönelik etkinlik ve kontrollü salım sağlamasıdır. Mikroglia aktivasyonunun ve buna bağlı nöroinflamasyonun baskılanması, AH dahil pek çok nörodejeneratif hastalıkta tedavi açısından kritiktir. Örneğin Markoutsas ve arkadaşları, NAC'ı yapısında disülfid bağı içeren bir polimere kovalent bağlayarak ~50 nm çapında NAC nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Bu nanopartiküller, yüksek düzeyde ROS bulunan ortamlarda disülfid bağlarının kırılmasıyla yüklü NAC'ı hızla serbest bırakmaktadır. Mikroglia aktivasyonunun belirteci olan Iba-1 proteininin ifadesini ve hücre morfolojisini, uyarılmamış kontrol hücreler düzeyine indirgeyebilmiştir. Serbest NAC ise aynı şartlarda daha sınırlı bir etki gösterebilmiştir. Dahası, NAC-NP ile ön işlem görmüş mikrogliaların ürettikleri ROS, nitrit/nitrat, TNF- α ve IL-1 β seviyeleri, eşdeğer dozda serbest NAC uygulamasına göre belirgin ölçüde daha düşük bulunmuştur. Mikrogliaların komşu nöronlara zarar veren fagositik aktivitesi de NAC-NP varlığında kayda değer biçimde azalırken serbest NAC ile tam olarak önlenememiştir. Bu sonuçlar, uygun şekilde

tasarlanmış nanopartikül sistemlerinin NAC'ın nöroinflamasyonu baskılama ve nöronları koruma potansiyelini maksimize ettiğini ortaya koymaktadır (Markoutsas & Xu, 2017).

Nanopartiküller taşıyıcılar sadece sistemik uygulamada değil, intranasal gibi alternatif uygulama yollarında da NAC'ın beyne ulaştırılmasını kolaylaştırabilir. Intranazal yol, burun mukozasından doğrudan santral sinir sistemine ilaç geçişine olanak tanıyan invazif olmayan bir yöntemdir. Ancak çözünür formdaki NAC burun mukozasından hızla temizlenip sınırlı miktarda beyne geçebilmektedir. Bunu aşmak için geliştirilmiş bir ipek fibroin bazlı NAC nanopartikülü (SF-NAC NP) formülasyonu, intranasal uygulamada serbest NAC solüsyonuna kıyasla belirgin avantajlar göstermiştir. Sıçanlarda canlı görüntüleme (IVIS) yöntemiyle yapılan ölçümlerde, SF/NAC nanopartikülü ile taşınan NAC'ın beyin dokusuna geçişinin 1.4–2.6 kat arttığı ve nazal kavitede kalma süresinin uzadığı tespit edilmiştir (Chung vd., 2022). Bu sayede intranasal NAC taşınmasının etkinliği yükseltilerek, non-invazif yoldan beyin hedefli tedavi mümkün olabilmektedir.

NAC için en yaygın çalışılan nanosistemlerden biri, biyobozunur polimerik nanopartiküllerdir. Özellikle polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) gibi biyouyumlu polimerlerden hazırlanan nanopartiküller, ilaç salımını kontrol altında tutabilmeleri ve güvenli profilleri nedeniyle tercih edilmektedir. Bununla birlikte, hidrofilik ve düşük molekül ağırlıklı bir bileşik olan NAC'ın hidrofobik polimer matriks içinde kapsüllenmesi bazı zorluklar barındırır. Çift emülsiyon gibi klasik yöntemlerle hazırlanan PLGA nanopartiküllerde, NAC'ın sulu fazı tercih etmesi nedeniyle polimer içerisinde tutma (enkapsülasyon) verimi genellikle düşüktür (bir çalışmada %15 civarı bildirilmiştir). Bu sorunu gidermek amacıyla alternatif üretim teknikleri denenmiştir. Örneğin elektrosprey yöntemi, hidrofobik bir polimer çözeltisinden nanopartikül oluşturmaya olanak tanıırken aktif maddenin polimer matriksinde tutulma oranını artırmaktadır. Karimi Zarchi ve arkadaşları, elektrospreyle ürettikleri NAC yüklü PLGA nanopartiküllerde enkapsülasyon verimini belirgin biçimde yükseltmiş ve monodispers boyutta (çap ~200 nm) partiküller elde etmeyi başarmışlardır. Bu nanopartiküller, ilacın kısa yarı ömrünü uzatmak üzere kontrollü salım davranışı sergilemiştir. İn vitro salım testlerinde NAC-PLGA nanopartiküllerinin, ilk birkaç saatte yükünün yaklaşık %30'unu hızla saldırdığı, ardından polimer matriksinden difüzyon ve erime kontrollü daha yavaş bir salım fazına geçtiği gözlenmiştir. Toplamda 48 saat içinde NAC yükünün büyük kısmı salınmış, bu da tek bir doz nanopartikül ile ilacın birkaç gün boyunca terapötik düzeyde tutulabileceğini göstermiştir. Kontrollü salım, AH gibi kronik

hastalıklarda ilaç düzeylerinin stabil tutulması ve hasta uyuncunun artırılması açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Polimerik nanopartiküllerin bir diğer önemli özelliği, farklı yüzey modifikasyonlarıyla aktif hedefleme yeteneğinin kazandırılabilmesidir (Karimi Zarchi vd., 2015, 2017; Lancheros vd., 2018).

1.5. EPPS

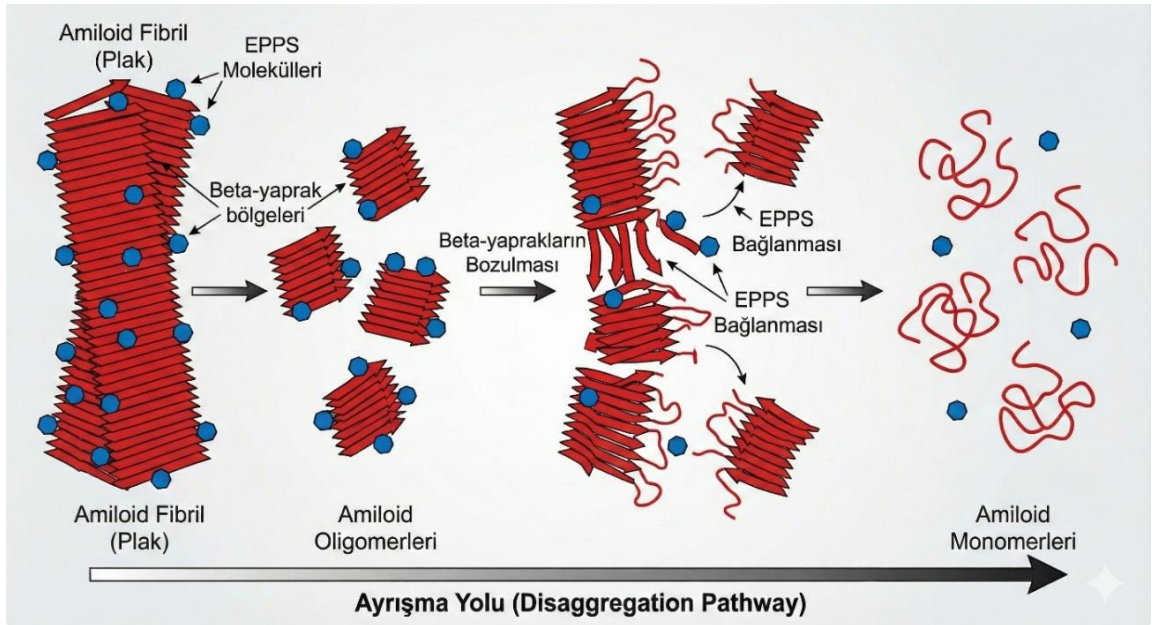
EPPS (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinpropanesülfonik asit), başlangıçta biyolojik tampon olarak tanımlanmış küçük molekülü bir bileşik olmasına rağmen, son yıllarda AH ile ilişkili A β agregatlarının çözünmesini sağladığı yönünde bulgular elde edilmiştir.

A β oligomerleri ve fibrilleri, nörodejeneratif hastalıkların ilerleyişinde önemli rol oynayan nörotoksik ve nöroenflamatuvar etkilere sahiptir. A β peptitleri normalde çözünür monomerler halinde bulunurken patogeneze sırasında toksik oligomerler, protofibriller ve olgun fibriller şeklinde çökelerek plaklar oluştururlar. Bu agregasyon süreci, A β monomerlerinin β -tabaka yapılı yığınlar oluşturmak üzere şekil değiştirip birbirine yapışmasıyla gelişir; özellikle A β 1-42 formu yüksek agregasyon eğilimi gösterir ve nöronal işlevi bozan nörotoksik yapılar meydana getirir (Choi vd., 2025a). EPPS, A β agregatlarına doğrudan bağlanarak onların yapısını bozan ve toksik özelliklerini ortadan kaldıran bir moleküldür. Nitekim *in vitro* biyokimyasal ve biyofiziksel analizler, EPPS'nin A β oligomer ve fibrillerine seçici şekilde bağlandığını, monomerik A β 'ye ise anlamlı bağlanma göstermediğini ortaya koymuştur (H. Y. Kim vd., 2015). EPPS'nin toksik A β oligomerlerine bağlanıp onları toksik olmayan monomerlere dönüştürdüğü hem *in vitro* ortamda hem de *in vivo* AH modellerinde gösterilmiştir (H. Y. Kim vd., 2015; H. Y. Kim & Kim, 2024).

EPPS uygulaması sonrasında beyin dokusunda A β birikimleri azalırken, monomerik A β düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir. Monomer halindeki A β 'nin toksik olmaması ve kolaylıkla temizlenebilir olması, EPPS'nin agregatları monomerlere çözerek A β toksisitesini etkisiz hale getirmesi sonucunu doğurmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında EPPS ile muamele edilmiş A β agregatlarının sinir hücreleri üzerinde belirgin bir toksisite oluşturmadığı, EPPS varlığında A β 'nin hücre canlılığını tehdit etmediği saptanmıştır (H. Y. Kim vd., 2015).

Moleküler düzeyde, dinamik simülasyonlara ve biyofiziksel çalışmalar, yapılan *in silico* modelleme çalışmaları EPPS molekülünün A β agregatlarında dış yüzeyindeki

iplikçiklere tercihli olarak tutunduğunu göstermiştir. A β peptidinin 17. ve 23. amino asitleri arasındaki bölge, özellikle A β 'nin 22. pozisyonundaki glutamat kalıntısıyla (Glu22), iyonik etkileşimler kuran EPPS, fibrilin kenar bölgelerinde yapısal dalgalanmalara yol açmaktadır. Bu bağlanma, fibril yapısını bir arada tutan intermoleküler hidrojen bağlarını ve β -tabaka düzenini bozarak agregatın dağılmasını tetikler (Choi vd., 2025b). Benzer şekilde, EPPS'nin *in vitro* olarak hazırlanan sentetik A β fibrillerine eklenmesiyle fibrillerin kısa süre içinde çözündüğü, β -yapı göstergesi olan Thioflavin-T fluoresansının azaldığı ve elektron mikroskobu görüntülerinde saçaklı fibril yapılarının kaybolduğu gözlenmiştir. Bu veriler, EPPS'nin monomerik formda olmayan A β uçlarına veya yüzeylerine bağlanarak monomer alt birimlerin kopmasına neden olduğu ve zamanla plak yapıyı tamamen denilebilecek bir oranda çözebildiği şeklinde yorumlanmaktadır. Yapılan literatür çalışmasında 7 günlük EPPS muamelesi sonunda saç telini andıran A β fibriller yapıların tamamen dağıldığı ve yalnızca amorf/düzensiz küçük parçaların kaldığı bildirilmiştir (H. Y. Kim vd., 2015) (Şekil 6).



Şekil 6. EPPS küçük molekülünün amiloid ile etkileşimi.

EPPS'nin amiloid ile etkileşimi için bir teori daha mevcuttur. Kesin olan konu gösterdiği seçiciliktir. Yüzey plazmon rezonans (SPR) analizleri, EPPS'nin A β 40 oligomerlerine doz-bağımlı biçimde güçlü bağlandığını, buna karşın monomerik A β ile kayda değer bir

etkileşime girmediğini net olarak ortaya koymuştur. EPPS'nin kimyasal yapısı bu seçici bağlanma yeteneğiyle tutarlı özellikler taşır. Moleküldeki amino-sülfonik asit grubu, A β 'nin 13-16. amino asitlerinden oluşan HHQK olarak adlandırılan bölgesine glikozaminoglikanların bağlanmasında kritik rol oynayan sülfat iyonlarını taklit edebilmektedir. EPPS'nin sülfonat grubunun, A β 'nin Histidin13-Histidin14-Glutamin15-Lizin16 dizisine elektrostatik olarak çekilip bağlanabileceği, bunun da agregat stabilitesini bozabileceği ileri sürülmüştür (H. Y. Kim vd., 2015).

EPPS'nin etki modu, bu açıdan bazı immünoterapötik antikorlarına benzetilmektedir. Belirli antikorların A β 'ye bağlanıp onu çözünebilir hale getirerek beyinden uzaklaştırdıkları gibi, EPPS de küçük bir molekül olarak benzer bir strateji gerçekleştirmektedir (H. Y. Kim vd., 2015). EPPS'nin antikorlara kıyasla önemli pratik üstünlükleri bulunmaktadır: Ağızdan verilebilir, kan-beyin bariyerini geçebilir ve üretim maliyeti düşüktür. Bu nedenle, EPPS gibi çeşitli molekül ağırlığındaki A β türlerini hedef alabilen kimyasallar, AH tedavisinde tek bir hedefe yönelik yaklaşımların ötesine geçerek daha geniş spektrumlu bir çözüm sunabilir.

EPPS'nin Alzheimer modelindeki terapötik potansiyeli *in vivo* olarak da değerlendirilmiştir. Kim ve arkadaşlarının 2015 yılında fareler üzerinde yürüttüğü çalışmada, sistemik yolla uygulanan EPPS'nin beyindeki amiloid plak yükünü azalttığı ve buna paralel olarak bilişsel fonksiyonlarda anlamlı iyileşme sağladığı rapor edilmiştir. EPPS'nin bu etkisinin, A β agregatlarının yapısal stabilitesini bozarak onları çözünür ve daha az toksik monomerik formlara dönüştürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (H. Y. Kim vd., 2015). Bu monomerleşme süreci, hipokampus-bağımlı davranış bozukluklarının hafiflemesine ve glial hücrelerdeki γ -aminobütirik asit (GABA) salınımının azalmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca EPPS uygulamasının, nöronal strese yanıt olarak aktive olan c-Jun N-terminal kinaz (JNK) fosforilasyonunu baskıladığı; astrosit ve mikroglia aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Tüm bu etkiler, amiloid kaynaklı hücre hasarı azaltırken, aynı zamanda siklik AMP (cAMP) düzeylerini artırarak hafıza süreçlerinde iyileşme sağladığına işaret etmektedir. Aynı zamanda yapılan farmakokinetik ve toksisite analizleri EPPS'nin yüksek biyoyararlanıma sahip, güvenli bir ajan olduğunu göstermektedir (H. Y. Kim vd., 2015).

EPPS'nin Alzheimer bağlamında bir tedavi adayı olarak önem kazanabilmesi için farmakokinetik özelliklerinin de elverişli olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, EPPS'nin ağız yoluyla uygulanabilen ve beyne ulaşabilen bir molekül olduğunu

göstermiştir (H. Y. Kim vd., 2015, 2016). EPPS'nin moleköl ağırlığı ~252 dalton civarında olup, piperazin yapısı ve sülfonat grubuyla hem hidrofilik hem de kısmen lipofilik özellikler taşıyan zwitteriyonik bir tampondur. Bu özellikleriyle EPPS'nin büyük olasılıkla pasif difüzyon yoluyla, belki kısmen de polar besin molekülleri için var olan taşıyıcılar aracılığıyla, KBB endotelini geçtiği düşünülmektedir. Nitekim farmakokinetik incelemelerde EPPS'nin beyne geçiş etkinliğinin dozla ilişkili ancak saturasyona açık bir profil sergilediği bulunmuştur. Örneğin sıçanlarda 10 mg/kg/gün dozunda 7 gün boyunca oral EPPS verildiğinde, beyin dokusunda EPPS birikimi 72. saatte plato seviyesine ulaşarak ~7.5 ng/gram düzeyinde sabitlenmiştir. Bu dozda ölçülen beyin/plazma konsantrasyon oranı ~2.0 mL/gram olup, EPPS'nin plazmaya kıyasla beyin dokusuna belirgin şekilde dağıldığını olduğunu göstermektedir. Ancak daha yüksek doz olan 100 mg/kg/gün düzeyinde, mutlak beyin konsantrasyonu artsa da beyin/plazma oranının ~0.34 mL/gram düzeyine düştüğü rapor edilmiştir. Bu durum, yüksek dozlarda EPPS geçişinin oransal olarak azaldığına, muhtemelen taşıyıcı sistemlerin saturasyonuna veya doza bağlı farmakokinetik non-lineerliklere işaret etmektedir. EPPS'nin plazma yarılanma ömrü net olarak bildirilmemekle birlikte, sürekli uygulamada 3 gün içinde kararlı düzeye ulaşması eliminasyonunun gün mertebesinde gerçekleştiğini düşündürmektedir. Başka bir deyişle, EPPS'nin vücutta kalış süresi çok uzun olmayıp, birkaç saat ile birkaç on saat arasında bir yarılanma ömrüne sahip olabilir; bu nedenle etkin düzeylerin korunması için günlük uygulama gerekmektedir (H. Y. Kim vd., 2015).

EPPS'nin oral biyoyararlanımı da uygulanan dozlara kıyasla plazmada ölçülen düşük konsantrasyonlardan anlaşılabileceği üzere kısmen sınırlı olabilir; örneğin 10 mg/kg dozunda plazma EPPS seviyesi ancak ng/mL mertebelerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, plazmadaki düşük düzeylere rağmen EPPS'nin beyin dokusuna geçiş yaparak etkinlik gösterdiği deneysel olarak kanıtlanmıştır. EPPS yüksek suda çözünürlük gösteren bir bileşik olduğundan, büyük oranda değişmeden böbrek yoluyla atıldığı tahmin edilmektedir; toksisite çalışmalarında EPPS'nin vücutta birikime yol açmadığı ve uzun süreli uygulamalarda bile tolere edilebildiği görülmüştür. Özellikle farelerde hiçbir ölümcül toksisite belirtisi olmaksızın 2 ay boyunca günde 2000 mg/kg gibi son derece yüksek dozda verilebilmiş olması (LD₅₀ > 2000 mg/kg) EPPS'nin güvenli bir farmakolojik profilinin olduğuna işaret etmektedir. EPPS uygulanan hayvanlarda vücut ağırlığı, beslenme, davranış gibi parametrelerde olumsuz bir değişiklik izlenmemiştir. Ayrıca EPPS'nin serbest radikal temizleyici veya antioksidan bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir, yani gözlenen nöroprotektif etkiler doğrudan A β 'ye etki mekanizmasına

atfedilmelidir. Bu farmakokinetik bilgiler ışığında, EPPS'nin oral yoldan uygulanabilir, BBB'yi geçen ve merkezi sinir sisteminde hedefe ulaşabilen bir aday olduğu sonucuna varılmaktadır (H. Y. Kim vd., 2015).

EPPS'nin A β agregatlarını çözündürücü etkisi hem *in vitro* ortamlarda biyokimyasal yöntemlerle hem de *in vivo* hayvan modellerinde davranışsal ve histopatolojik yöntemlerle kapsamlı biçimde incelenmiştir. *In vitro* deneyler, EPPS'nin hem A β fibrillerini hem de oligomerlerini parçalayabildiğini net bir şekilde ortaya koymuştur. Örneğin thioflavin-T (ThT) floresans deneylerinde, preformasyon ile elde edilmiş β -tabaka zengini A β fibrillerine EPPS eklendiğinde ThT sinyalinin doz ve zaman bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Sonuçlar EPPS'nin plakların yapısını bozarak β -tabaka yapısını çözündürdüğünü göstermektedir (H. Y. Kim vd., 2015). Dahası, en toksik form olarak kabul edilen oligomerler, EPPS'nin birincil hedefidir. EPPS, oligomerik yapıları monomerlerine kadar ayrıştırarak sinaptotoksiteyi önler. Elektrokimyasal analizlerin (Ngoc Le & Cho, 2021) yanı sıra EPPS'nin A β oligomerleri üzerindeki etkisini saptamak amacıyla, kimyasal çapraz bağlama (PICUP) ile stabilize edilmiş A β oligomer karışımları SDS-PAGE jel elektroforezinde incelenmiştir. Gümüş boyama ile görselleştirilen oligomer bantları, EPPS muamelesi yapılan örneklerde çarpıcı biçimde değişime uğramıştır: 250 kDa üzerinde molekül ağırlığına sahip büyük oligomer bandı dahil olmak üzere çeşitli oligomerik A β bantlarının yoğunluklarında belirgin azalma görülürken, buna karşılık ~4 kDa monomerik A β bandının yoğunluğu bariz şekilde artmıştır.

Nicel analizler, EPPS varlığında yüksek moleküler ağırlıklı A β türlerinin azalıp monomer fraksiyonunun yükseldiğini, yani EPPS'nin toksik oligomerleri monomerlere kadar ayrıştırdığını doğrulamaktadır. Benzer sonuçlar, EPPS ile muamele öncesi ve sonrasında A β örneklerinin boyut-ayrımli kromatografi (SEC) ile analiz edilmesiyle de elde edilmiştir: 7 gün EPPS uygulanmış A β 42 numunelerinde, başlangıçta >60 kDa boyutunda görülen oligomerik popülasyonun önemli ölçüde azaldığı, monomer pikinin ise yükseldiği gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamında yapılan toksisite deneyleri de bu biyokimyasal bulguları desteklemektedir. Fare hipokampal nöronal hücre hattı (HT-22) üzerinde yapılan canlılık testlerinde, preform A β oligomerlerinin hücre canlılığını ciddi şekilde azalttığı, ancak aynı oligomerlerin EPPS ile 7 gün inkübe edildikten sonra hücrelere zararsız hale geldiği saptanmıştır. EPPS ile muamele görmüş A β agregatlarının verilmesi durumunda hücre yaşama oranı kontrol seviyelerine yakın bulunurken, EPPS uygulanmamış toksik A β agregatları hücre ölümüne yol açmıştır. Ayrıca EPPS'nin tek

başına hücre kültürüne eklenmesinin herhangi bir ölümcül etki yaratmadığı da gözlenmiştir (H. Y. Kim vd., 2015). Fibril boyutundaki çok büyük agregatların çözülmesi için EPPS'nin daha uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlu uygulanması gerekebilmektedir. Örneğin *in vitro* ortamda preform plak benzeri A β agregatlarını dağıtmak için yüksek EPPS konsantrasyonlarına ve birkaç günlük inkübasyona ihtiyaç duyulmuşken, *in vivo* deneylerde beyin içindeki agregatları azaltmak için daha düşük dozlar yeterli olabilmektedir (Choi vd., 2025b; H. Y. Kim vd., 2015). Bu fark kısmen *in vitro* deneylerdeki A β yoğunluğunun çok daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Laboratuvar koşullarında A β agregat oluşumunu gözlemlemek için mikromolar seviyelerde peptit kullanılırken, beynin interstisyel sıvısında A β derişimi nanomolar düzeydedir. Dolayısıyla *in vitro* agregatları çözmek için EPPS'nin de görece yüksek konsantrasyona çıkması gerekmektedir. Ayrıca canlı beyinde EPPS'nin dağıttığı monomerler eşzamanlı temizlenme mekanizmalarına maruz kalır (örn. mikrogial fagositöz, damar yolu ile perifere taşınma), bu da fibril çözünmesinin daha etkin ilerlemesini sağlar. *In vitro* ortamda ise kopan monomerler ortamda birikmeye devam ettiği için tekrar agregasyon veya denge etkileri görülebilir; bu da daha yüksek EPPS dozu gerektirebilir.

Düşük moleküler ağırlıklı oligomerler– dimer, trimer, tetramer gibi – sinaptik aralığa kolayca girip hasar veren en toksik türlerdir. EPPS, yüksek moleküler ağırlıklı türlerini parçalarken toksik düşük moleküler ağırlıklı türlerinin birikmesine izin vermez; aksine süreci sonuna kadar götürerek monomerlere ulaşır. Ayrıca, bazı çalışmalar EPPS'nin zararsız düşük moleküler ağırlıklı agregatlarını stabilize ederek bunların toksik prefibrillar formlara dönüşmesini engellediğini (ikincil agregasyonun inhibisyonu) öne sürmektedir (Zarrilli vd., 2024b).

EPPS'nin kronik AH modellerinde daha uzun vadeli etkileri, A β 'nin birikimi ve bilişsel bozukluklar gibi AH patolojilerinin birlikte gözleendiği transgenik hayvanlar üzerinde incelenmiştir. Kim ve arkadaşlarının yaptığı deneylerde, tedavi öncesi yapılan Y-labirent testleri, transgenik farelerin aynı yaştaki yabanıl tip farelere kıyasla ciddi bilişsel defisitleri olduğunu doğrulamıştır; 14 aylık yaşa ulaşıldığında, EPPS almış transgenik farelerin davranış performanslarında çarpıcı iyileşmeler görülmüştür. Davranışsal veriler, EPPS'nin uzun süreli uygulanmasıyla AH benzeri bilişsel bozuklukların önemli ölçüde geriletebildiğini ortaya koymaktadır. Dahası, EPPS tedavisinin beyindeki patolojik A β birikimleri üzerinde de belirgin etkileri gözlenmiştir, Thioflavin-S ile boyanan A β plak

yükünün tedavi almayan transgeniklere göre dramatik biçimde azaldığı tespit edilmiştir. A11 antikoru ile saptanan oligomerik A β türlerinin sinyalinde EPPS tedavisi sonrası azalma saptanmıştır. Bu veriler, EPPS'nin *in vivo* ortamda da A β plaklarını küçülterek çözündürdüğünü ve oligomerik türleri azalttığını göstermektedir (H. Y. Kim vd., 2015).

EPPS tedavisi APP/PS1 farelerinde sadece A β birikimini değil, aynı zamanda ikincil bazı patolojileri de azaltmıştır. Çalışmada EPPS verilen transgenik farelerin hipokampusünde nöroinflamasyon göstergelerinde ve anormal GABA salgısında azalma gözlenmiş; bu da EPPS'nin A β 'ye bağlı sinir sistemi bozukluklarını geniş ölçekte iyileştirebildiğini düşündürmektedir (Kim ve ark., 2015). Ayrıca EPPS tedavisinin yabanıl tip farelerde sinaptik plastiklik üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı, uzun süreli potansiyasyon (LTP) deneylerinde EPPS alan sağlıklı farelerin LTP kapasitesinin normal farelerle aynı olduğu görülmüştür. Bu da EPPS'nin normal fizyolojik koşullarda yan etki oluşturmadığı, sadece patolojik A β varlığında fark yarattığı anlamına gelmektedir. Sonuç olarak hem akut A β infüzyon modelleri hem de kronik transgenik AD modelleri üzerindeki deneysel bulgular birleştiğinde, EPPS'nin A β agregatlarını dağıtarak bilişsel fonksiyonları koruduğu ve düzelttiği güçlü şekilde ortaya konmuştur (Kim ve ark., 2015; Kim ve ark., 2016). Bu bulgular, A β birikiminin gerçekten de bilişsel bozuklukların altında yatan başlıca etkenlerden biri olduğunu da desteklemektedir; EPPS ile A β plakları ortadan kaldırıldığında bellek fonksiyonlarının düzeldiği gösterilmiştir.

Alzheimer hastalığında güncel tedaviler incelendiğinde, semptomatik iyileştiriciler (örn. kolinesteraz inhibitörleri donepezil, rivastigmin vb. veya NMDA antagonisti memantin) ile hastalığı modifiye edici ajanların (özellikle anti-A β veya anti-tau yaklaşımları) bir arada kullanılmasının potansiyel faydaları üzerinde durulmaktadır. EPPS, A β birikimini tersine çevirebilen bir molekül olarak, hastalık modifiye edici stratejiler kapsamında değerlidir. Ancak EPPS'nin A β temizleyici etkisi zaman içinde plakları azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatma amacına hizmet ederken, bilişsel semptomların derhal düzelmesi için genellikle nörotransmitter düzeylerini etkileyen ilaçlara ihtiyaç duyulur. Bu nedenle araştırmacılar, EPPS'yi var olan semptomatik tedavilerle birlikte kullanmanın sinerjistik veya tamamlayıcı etkiler sağlayıp sağlamayacağını incelemiştirler. Özellikle en yaygın kullanılan bilişsel semptom ilacı olan donepezil (bir asetilkolinesteraz inhibitörü) ile EPPS'nin birlikte uygulanması üzerinde durulmuştur. Hye Yun Kim ve arkadaşları (2016), 50 haftalık (yaşlı) APP/PS1 transgenik fareleri dört gruba ayırarak yalnız EPPS, yalnız donepezil, EPPS+donepezil kombine ve kontrol tedavilerini

kıyaslamışlardır (H. Y. Kim vd., 2015, 2016). Bu çalışmada EPPS (anti-amiloid ajan) ve donepezil (kolinerjik ajan) birlikte verildiğinde, bilişsel iyileşmenin daha hızlı ve sürekli gerçekleştiği gözlenmiştir. Y-maze gibi bellek testlerinde kombine tedavi grubundaki transgenik fareler, tek başına EPPS veya tek başına donepezil alan gruplara kıyasla daha erken dönemde belirgin bilişsel düzelme sergilemiştir. Bununla birlikte, istatistiksel analizler bu etkinin katkılayıcı (additif) olduğunu, yani EPPS ve donepezil arasında çarpıcı bir sinerjistik etkileşim saptanmadığını ortaya koymuştur. Başka bir deyişle, EPPS ve donepezil birlikte verildiğinde birbirlerinin etkisini engellememekte, aksine her biri kendi hedefinde etkin olup toplamda daha kapsamlı bir fayda sağlamaktadır. Nitekim çalışmada EPPS'nin A β plaklarını temizleme işlevini donepezilin etkilemediği, donepezilin kolinerjik iyileştirici etkisinin de EPPS tarafından değiştirilmediği rapor edilmiştir (H. Y. Kim vd., 2016). Böylece kombine tedavinin her iki ilacın da kendi maksimum faydasını göstermesine olanak tanıdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, AH tedavisinde hastalığın altında yatan mekanizmaya yönelik (A β temizleyici) bir ajan ile semptomları hedef alan (kolinerjik destekleyici) bir ajanın birlikte kullanılmasının daha hızlı ve sürdürülebilir klinik yarar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Klinik uygulamada da benzer bir yaklaşım halihazırda kısmen mevcuttur: Örneğin donepezil ve memantinin birlikte kullanımı orta-ileri evre AH hastalarında yaygındır ve bu kombinasyonun tek başına ilaç kullanımına göre bilişsel skorlarda iyileşme sağladığı bildirilmiştir. EPPS gibi bir bileşiğin mevcut tedavilere eklenmesi ise, semptomatik iyileşmeye ek olarak hastalığın seyrini değiştirme potansiyeli taşıyacaktır. Henüz EPPS insanlarda klinik olarak kullanılsa da hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular ışığında kombine tedavilerin rasyoneli güç kazanmıştır. Özellikle EPPS + donepezil kombinasyonunun transgenik modelde gösterdiği hızlı ve kalıcı bellek düzelmesi, AH tedavisinde “iki ucu tutma” stratejisinin (hem altta yatan patolojiyi durdurma hem mevcut semptomları hafifletme) değerini ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, gelecekte EPPS veya benzeri A β temizleyici küçük moleküllerin donepezil gibi bilişsel güçlendiricilerle birlikte klinik denemelerde test edilmesi gündeme gelebilir. Araştırmacılar, kombine tedavi yaklaşımının AH'nin karmaşık patolojisine karşı daha kapsamlı bir etki yaratabileceğini ve tekli tedavilere kıyasla daha etkili sonuçlar verebileceğini vurgulamaktadır (H. Y. Kim vd., 2016). Sonuç olarak, EPPS'nin donepezil gibi ilaçlarla birlikte kullanımı sinerjistik olmasa da tamamlayıcı nitelikte olumlu etkiler ortaya koymuştur ve bu kombinasyon stratejisi AH tedavisinde ümit vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

1.6. Alzheimer hastalığı mevcut tedavi yöntemleri ve kombine ilaç terapisi

AH, klinik olarak ilerleyici bilişsel yıkım ile seyredip erken evrede hafıza bozukluğu ve davranış değişiklikleriyle başlar, ileri evrelerde ağır demans ve işlev kaybına yol açar. Mevcut tedaviler, hastalığın altta yatan seyrini durduramamakta, yalnızca semptomatik iyileşme sağlayabilmektedir. Bununla birlikte son yıllarda hastalık modifiye edici tedaviler geliştirme yönünde önemli adımlar atılmış; özellikle 2021 sonrası Aβ hedefli monoklonal antikorlar gibi yeni ajanlar gündeme gelmiştir (J. Zhang vd., 2024).

AH tedavisinde halen semptomatik farmakolojik ajanlar standarttır. Özellikle kolinesteraz inhibitörleri (donepezil, rivastigmin, galantamin) ve NMDA reseptör antagonisti memantin, hafif evreden ileri evreye kadar kognitif belirtilerin yönetiminde kullanılır. Kolinesteraz inhibitörleri, merkezi sinir sisteminde asetilkolin yıkımını engelleyerek kolinerjik nöron kaybına bağlı demans belirtilerini bir ölçüde hafifletir. Donepezil, rivastigmin ve galantamin 1990'lar ve 2000'lerin başında onaylanmış olup dört farklı etken maddeyle temsil edilirken, memantin 2003'te onaylanarak orta-ileri evre AH'de eksitator glutamat toksisitesini azaltan ilk ajan olmuştur (J. L. Cummings vd., 2014). Bu ilaçlar, bilişsel işlevlerde mütevazı iyileşme ve günlük yaşam aktivitelerinde geçici stabilizasyon sağlayabilsede, altta yatan nörodejeneratif süreci durduramaz ve hastalığın ilerleyişini önemli ölçüde değiştiremez. Ayrıca bu tedaviler sıklıkla gastrointestinal rahatsızlıklar, bradikardi veya baş dönmesi gibi istenmeyen etkilerle ilişkilidir ve etkinlikleri hastalığın ileri evrelerinde belirgin biçimde azalır (J. Zhang vd., 2024).

Son yıllarda, hastalık seyrini değiştirici ilk tedaviler olarak amiloid-beta hedefli immünoterapiler ortaya çıkmıştır (Y. Jin vd., 2024). Özellikle aducanumab, lecanemab ve deneysel aşamadaki donanemab gibi monoklonal antikorlar, Aβ plaklarını hedefleyerek beyinde birikmiş amiloidi temizlemeyi amaçlar. Aducanumab 2021'de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından hızlandırılmış onay alarak yaklaşık 20 yıl aradan sonra ilk yeni Alzheimer ilacı olmuştur (A. Y. Kim vd., 2024; Vaz vd., 2022; W. Wu vd., 2023). Bu antikor, Aβ agregatlarına bağlanarak mikrogliyaların plakları fagosite etmesini tetikler. Ancak klinik çalışmalarda aducanumab'ın bilişsel gerilemeyi çok sınırlı oranda yavaşlattığı ve ciddi yan etkilerinin bulunduğu rapor edilmiştir. Özellikle beyin ödemi ve mikrohemoraji ile karakterize amiloid ilişkili görüntüleme anormallikleri (ARIA), aducanumab kullanan hastalarda %30'lara varan oranda görülmüş ve bazı vakalarda ölümle sonuçlanmıştır. Bu nedenle FDA ilacı onaylamış olsa da ABD'de geri

ödeme kurumları kullanımını klinik araştırma şartıyla sınırlamış; Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ise 2021’de aducanumab başvurusunu yarar-risk dengesi olumsuz olduğu gerekçesiyle reddetmiştir (Vaz vd., 2022).

Aducanumab ile benzer şekilde lecanemab adlı antikor da A β birikimini hedef alır ve 2023’te FDA tarafından önce hızlandırılmış, Temmuz 2023’te ise tam onay almıştır (Chowdhury & Chowdhury, 2023). EMA, klinik faydasının belirsiz ve risklerinin yüksek olduğu gerekçesiyle Temmuz 2024’te lecanemab’a onay vermemiştir (ema.europa.eu). Donanemab ise 2023 yılında tamamlanan bir faz 3 çalışmada erken evre AH’de kognitif yavaşlamayı %30 civarında azalttığı gösterilen bir diğer A β antikorudur; FDA değerlendirmesine sunulmuş olup yakın gelecekte onay alması beklenmektedir (Zimmer vd., 2025). Bu yeni antikor tedavileri, AH patolojisindeki amiloid hipotezini klinik olarak test eden, amiloidin hastalık patolojisindeki önemine değinen ilk somut başarılar olarak görülmekle birlikte, etkinliklerinin sınırlı, yan etki risklerinin ise yüksek oluşu nedeniyle tek başına çığır açıcı bir çözüm sunmaktan uzaktır.

Mevcut farmakolojik tedavilerin yanı sıra farmakolojik olmayan yaklaşımlar da AH yönetiminde önemlidir. Bilişsel rehabilitasyon programları, hafıza strateji eğitimleri ve fiziksel egzersiz, hastaların yaşam kalitesini artırmada ve semptomları yavaşlatmada yardımcıdır. Ayrıca hastalığın ileri evrelerinde psikiyatrik belirtiler için antidepresan veya antipsikotik ilaçlar semptomatik olarak kullanılabilir. Ancak bu destekleyici yaklaşımlar da hastalığın nörodejeneratif sürecini değiştiremediği için, günümüzde AH’nin kesin tedavisi bulunmamaktadır (J. L. Cummings vd., 2014; J. Zhang vd., 2024).

Klinik deneme aşamasındaki tedaviler arasında tau proteini hedefleyen yaklaşımlar önemli yer tutar. Tau’nın anormal hiperfosforilasyonu ve agregasyonu AH’de nöronal hasarın bir diğer ana etkeni olduğundan, anti-tau monoklonal antikorları (örn. gosunekimab, semorinemab), tau aşıları ve antisens oligonükleotid tedavileri geliştirilmektedir (J. Zhang vd., 2024).

Diğer yandan, nöroinflamasyonu hedef alan yeni tedaviler de dikkat çekmektedir. Mikroglia’yı ve beyin bağışıklığını modüle etmeyi amaçlayan anti-inflamatuvar sitokin inhibitörleri, mikroglia yüzey reseptör antikorları (ör. TREM2 agonistleri) ve inflammasom inhibitörleri geliştirilmektedir (Lee & Chang, 2025). Bunların hedefi, AH’de kronik iltihabi döngüyü kırarak ikincil hasarı azaltmaktır. Örneğin, NLRP3 inflammasom aktivasyonunu baskılayan moleküller hayvan modellerinde tau patolojisini

hafifletmiştir (Lee & Chang, 2025; J. Zhang vd., 2024). Benzer şekilde kompleman sistemi veya TNF- α gibi inflamatuvar yolların engellenmesi üzerine klinik araştırmalar bulunmaktadır (Batista vd., 2024).

AH ile ilişkili metabolik ve vasküler faktörler de yeni tedavi hedefleri arasındadır. Tip 2 diyabet ilaçları olan GLP-1 agonistlerinin nöroprotektif etkileri fark edilmiş ve semaglutid gibi bir GLP-1 analogu, Alzheimer için 2020’de başlatılan bir faz III denemesinde değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu ilacın deneysel olarak beyin insülin sinyalini iyileştirdiği, nöroinflamasyonu azalttığı ve bilişsel işlevlere olumlu yansıdığı gösterilmiştir (Nowell vd., 2023).

Ayrıca beyin mikrobiotasını düzenlemeye yönelik probiyotik tedaviler, metallerin şelasyonu ile A β birikiminin azaltılması (örn. bakır/çinko şelatörleri), oksidatif stres yükünü azaltan yüksek doz antioksidan kombinasyonları (E vitamini, omega-3, resveratrol vb.) klinik araştırmalarda test edilmektedir (Cherny vd., 2001; Naomi vd., 2021; Xu Lou vd., 2023). Modern yaklaşımlardan bir diğeri rejeneratif tedavilerdir: Kök hücre tedavileri ve nörotrofik faktör uygulamaları seçilmiş hasta gruplarında güvenlik açısından test edilmektedir. Özellikle mezenkimal kök hücrelerin nöroinflamasyonu azaltıp nörojenezi teşvik etme potansiyeli, devam eden faz I/II çalışmalarla araştırılmaktadır.

Bu geniş yelpazedeki denemeler göz önüne alındığında, Alzheimer ilaç geliştirme hattı oldukça kalabalıktır. 2022 itibariyle 143 aday ilaç klinik geliştirme aşamasındadır ve bunların %83’ünden fazlası hastalık modifiye edici mekanizmaları hedeflemektedir (J. Cummings vd., 2022). Fakat, bugüne kadar yapılan yüzlerce deneme başarısızlıkla sonuçlanmış ve 2003-2020 arasında yeni onaylanan bir tedavi olmamıştır.

AH patogenezi birbiriyle etkileşen çok sayıda biyolojik süreci içerir; dolayısıyla tek bir hedefe yönelik monoterapilerle yeterli klinik başarıya ulaşılamaması, kombinasyon tedavilerinin kaçınılmaz bir gereklilik olduğu düşüncesini güçlendirmiştir (J. L. Cummings vd., 2024). Tıpkı kanser veya HIV enfeksiyonunda olduğu gibi, hastalığın farklı kollarını eşzamanlı baskılamak için birden fazla ilacın rasyonel kombinasyonuna ihtiyaç vardır.

Güncel uygulamada halihazırda donepezil + memantin kombinasyonu, orta-ileri evre Alzheimer’da klinik pratikte yerleşik bir stratejidir. Bu iki ilacın farklı etki mekanizmaları

(kolinerjik destek vs. glutamat antagonizması) sayesinde birlikte kullanımının biliş, günlük işlevler ve davranışlar üzerinde tek başına donepezil tedavisine kıyasla ek yarar sağladığı gösterilmiştir (Xiong & Doraiswamy, 2005). Özellikle memantin, devamlı donepezil kullanan hastalarda eklenmesi halinde hastalığın orta evresinde bir süre için stabilizasyonu koruduğu bildirilmektedir (R. Chen vd., 2017). Bunun dışında henüz onaylanmamış olsa da yapılan bazı çalışmalarda kolinesteraz inhibitörü + antidepresan/anksiyolitik veya kolinesteraz inhibitörü + anti-inflamatuvar gibi ikili tedavilerin belirti yönetimine katkısı araştırılmıştır. Örneğin serotonin 5-HT₆ reseptör antagonisti idalopirdinin donepezil ile kullanımını değerlendiren çalışmalar yapılmış ancak istenen düzeyde etkinlik kanıtlanamamıştır. Yine de uzmanlar, eğer güvenlik sorunları aşılabılırsa, semptomatik ilaçların uygun kombinasyonlarının hastalara önemli yararlar sağlayabileceği görüşündedir (Atri vd., 2018).

Teorik olarak birden fazla farklı hastalık mekanizmasını hedefleyen ajan eş zamanlı verildiğinde, hastalığın ilerleyişini yavaşlatmada sinerjik etki ortaya çıkabilir. Örneğin, bir yandan Aβ plak temizleyen bir antikor ile diğer yandan tau protein birikimini engelleyen bir ilacın birlikte uygulanması, iki patoloji arasındaki etkileşimleri bozarak toplamda daha büyük bir klinik fayda yaratabilir. Benzer şekilde, anti-amiloid tedavilerin yanına bir anti-inflamatuvar ajan eklemek, amiloid temizliğiyle tetiklenen nöroinflamatuvar reaksiyonları baskılayarak tamamlayıcı mekanizmalarla sinerji sağlayabilir. Nitekim güncel araştırmalarda, örneğin bir anti-TNF alfa antikorunun anti-amiloid aşı ile verilmesi veya beyin insülin direncini kıran bir ilacın kolinerjik tedaviye eklenmesi gibi kombine yaklaşımlar hayvan modellerinde umut vadeden sonuçlar vermiştir (J. L. Cummings vd., 2024).

Kombinasyon tedavilerinin avantajları arasında, hastalığın çoklu patolojik yollarına eşzamanlı müdahale ederek tek başına ajanların ulaşamadığı düzeyde bir etki elde edebilme potansiyeli sayılır. Ayrıca daha düşük dozlarda birden fazla ilaç kullanımı, her bir ilacın yüksek dozda tek başına kullanımına kıyasla yan etki profilini iyileştirebilir (örneğin her bir ilacın dozu azaltılarak toksisite limiti aşılmadan etki sağlanabilir). Bazı durumlarda ilaçlar arasında pozitif etkileşim de gözlenebilir: Bir ilacın hücresel yolda açtığı kapıdan diğerinin etkisi artabilir. Örneğin, kolinerjik aktiviteyi artıran donepezilin, bir nörotrofik faktör tedavisiyle beraber verilmesi kognitif iyileşmeyi destekleyebilir; çünkü nörotrofik onarımın etkili olabilmesi için mevcut kolinerjik durumun korunması gerekir (J. L. Cummings vd., 2024; Mintzer vd., 2002).

Öte yandan dezavantajlar da göz ardı edilmemelidir. Birden fazla ilacın birlikte kullanımı yaşlı Alzheimer hastalarında polifarmasi riskini doğurur ve istenmeyen etki olasılıklarını katlayabilir. İlaç-ilaç etkileşimleri, farmakokinetik uyumsuzluklar ve kombine kullanımın organ yükü gibi sorunlar yakından izlenmelidir. Klinik araştırma tasarımı açısından da kombinasyon denemeleri oldukça karmaşıktır: İki veya daha fazla etken maddenin birlikte etkisini değerlendirmek için daha büyük örneklemli ve çok kollu çalışmalar gerekir. Örneğin, bir plasebo-kontrollü iki kollu monoterapi çalışmasına kıyasla, tam faktöriyel bir kombinasyon denemesinde gerekli örneklem büyüklüğü katbekat artabilir. Dolayısıyla kombinasyon stratejilerinde seçilecek ajanların tamamlayıcı ve ayrı patolojik süreçleri hedefleyen nitelikte olmasına özen gösterilmelidir (J. L. Cummings vd., 2024; Schmitt vd., 2004).

1.6.1. Kombine tedavilerde sinerjistik etki

Kombine tedavilerde sinerji, iki veya daha fazla ajanın toplam etkinliğinin, tek başlarına gösterdikleri etkilerin toplamından daha fazla olması şeklinde tanımlanır. Bu sinerjistik etkinin değerlendirilmesinde Bliss independence (Fouquier & Guedj, 2015), Loewe (De Mulder & Kuiper, 2020), additivity ZIP (Zero Interaction Potency) ve HSA (Highest Single Agent) gibi modeller kullanılmaktadır (Ianevski vd., 2020).

Bliss yaklaşımı, ajanların birbirinden bağımsız etki gösterdiği varsayımıyla, birleşik etkilerini olasılık çarpımı temelli olarak tahmin eden sinerji analizi sunarken; Loewe modeli aynı biyolojik hedefe etki eden ajanlarda “eşdeğer etki” prensibiyle değerlendirme yapılmasını mümkün kılar. ZIP modeli kullanılan ajanların birbirlerinin doz-cevap eğrilerini değiştirmedeği varsayımından hareket eder. Son olarak HSA modeli ise karışımdaki en güçlü tek ajanın etkisinden daha yüksek olması durumunda sinerji kabul eden, karşılaştırmayı yalnızca en iyi tek ajan üzerinden yapan modeldir (Ianevski vd., 2020). Bu modeller sayesinde, AH patofizyolojisine müdahale eden moleküllerin hangi konsantrasyonlarda sinerjistik etkileşim gösterdiği objektif olarak belirlenebilmektedir.

AH için yapılan bir araştırmada hastalığı birden fazla yolak üzerinden tedavi etme fikri ile gelişen bir preklinik çalışmada iki terapötik ajan kombinasyonu kullanılarak nöroinflamasyon ve oksidatif stres hedeflenmiştir. Sonucunda redoks düzenleme

yolakları üzerinden bu ajanların güçlü sinerjileri olduğu ortaya çıkmıştır (S. Liu vd., 2025).

NAC ve EPPS, farklı patolojik mekanizmaları hedeflemeleri nedeniyle kombine terapi açısından rasyonel bir çift oluşturmaktadır. NAC, glutatyon prekürsörü olarak antioksidan savunmayı güçlendirirken, oksidatif stres aracılı A β toksisitesini azaltır. EPPS ise amiloid agregatlarına bağlanarak toksik oligomerleri monomerik forma dönüştürebilen bir kimyasal şaperon işlevi görür. Bu iki ajan birlikte uygulandığında, bir yandan oksidatif stresin azaltılmasıyla hücresel savunma mekanizmaları güçlenmekte, diğer yandan EPPS'nin A β çözme kapasitesi sayesinde hücre üzerinde toksik yük hafiflemektedir. 2020 sonrası yayınlanan bazı çalışmalarda, antioksidan ajanlarla amiloid çözündürücü moleküllerin eş zamanlı kullanımının nöroinflamatuvar yanıtı azalttığı, mitokondriyal membran potansiyelini stabilize ettiği ve sinaptik bütünlüğü koruduğu gösterilmiştir (Jalouli vd., 2025). Bu bulgular NAC–EPPS kombinasyonunun sinerjistik bir nöroprotektif profil oluşturabileceğini desteklemektedir.

NAC ve EPPS molekülü, Alzheimer patolojisinde farklı ancak birbirini tamamlayıcı hedeflere etki eden iki ajan olarak dikkat çekmektedir. NAC, güçlü bir antioksidan ve glutatyon prekürsörü olması sayesinde AH'de önemli bir patolojik bileşen olan oksidatif stresi azaltma potansiyeline sahiptir (Bilski vd., 2025). EPPS ise küçük bir kimyasal molekül olup A β plaklarını doğrudan çözerek amiloid yükünü azaltabilmektedir (H. Y. Kim vd., 2015). Bu iki ajanının kombinasyon halinde kullanılması, hastalığın hem amiloid patolojisini hem de oksidatif hasar ve iltihap boyutunu eşzamanlı hedef alma imkânı sunar.

NAC'nin etki mekanizmalarına bakıldığında, hücre içinde sistein sağlayarak GSH sentezini artırdığı, serbest radikalleri doğrudan nötralize edebildiği ve ayrıca nükleer faktör kapp B (NF- κ B) gibi pro-inflamatuvar sinyal yollarını inhibe ettiği görülür. Preklinik Alzheimer modellerinde NAC tedavisi, beyinde lipit peroksidasyon ürünü olan 4-HNE düzeylerini azaltmış, A β 40 seviyelerini düşürmüş, kan-beyin bariyeri bütünlüğünü iyileştirerek inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltmış ve P-glikoprotein gibi A β taşıyıcılarını aktive etmiştir. Bu sayede NAC, hayvan çalışmalarında bilişsel performansı düzeltici etkiler göstermiştir. Bununla birlikte NAC'nin klinik kullanımında en büyük kısıt, düşük oral biyoyararlanımı ve kan-beyin bariyerini geçişinin sınırlı oluşudur; ağızdan alındığında biyoyararlanımının <%10 olması, merkezi sinir sisteminde yeterli derişime ulaşmayı zorlaştırmaktadır (Bilski vd., 2025). Bu sorunu aşmak üzere

NAC türevleri geliştirilmiş (ör. N-acetilsistein amid, NAC-etil ester) ve nanoteknolojik taşıyıcı sistemlerle NAC'nin beyne iletiminin artırılması amaçlanmıştır. Nitekim nanoparçacık tabanlı taşıyıcılar ile NAC'nin beyne geçişini ve etkinliğini artırmaya yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır (Budama-Kilinc vd., 2018; Stephen vd., 2021). Klinik düzeyde, NAC'ye dair ilk çalışmalar genellikle güvenli olduğunu ve oksidatif stres biyobelirteçlerini iyileştirebildiğini göstermiş; ancak net bilişsel faydayı saptamak için daha geniş ölçekli, uzun süreli ve monoterapi odaklı denemelere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

EPPS molekülü ise bir zwitteriyonik piperazin türevi olup laboratuvar ortamında bir tampon maddesi olarak bilinen “Good's buffer” ailesinden gelmektedir. Mekanistik olarak EPPS, Aβ agregatlarına bağlanıp onları çözünebilen hale getirerek mikrogliaların temizlemesini kolaylaştırır; bu süreç sonunda plaklardan çözülerek kana geçen Aβ miktarında artış gözlenmiş ve beyin dışına atılımın arttığı saptanmıştır. EPPS'nin bir avantajı da yüksek beyin geçişi ve düşük toksisitesidir. EPPS uygulaması yapılan transgenik Alzheimer farelerinde nöroinflamasyon belirteçleri (aktif mikroglia ve astrosit düzeyleri, inflamatuvar sitokinler) anlamlı biçimde azalmakta, anormal glial GABA salınımı düzelmekte ve sinaptik fonksiyon iyileşmektedir. Ayrıca EPPS ve türevlerinin kan-beyin bariyerini geçebilme kapasitesi ile monoklonal antikorlara kıyasla çok daha düşük maliyetle üretilebilmesi de önemli avantajlar olarak vurgulanmıştır (H. Y. Kim vd., 2015). Ancak EPPS henüz insanlarda klinik deneme aşamasına gelmemiş bir moleküldür; dolayısıyla etkinliğinin ve güvenliğinin insan beyinde de tekrarlanıp tekrarlanmayacağı ileri çalışmalarla belirlenmelidir.

NAC ve EPPS kombinasyonu, Alzheimer hastalığında çok hedefli bir terapötik strateji olarak öne çıkmaktadır. NAC'nin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri ile EPPS'nin amiloid çözücü etkisinin bileşimi, patolojinin farklı kollarını eşzamanlı baskılayarak sinerjik bir nöroprotektif etki yaratabilir. Bu yaklaşım, literatürde giderek daha fazla destek bulan “multifaktöriyel hastalıklara multifaktöriyel tedavi” prensibinin somut bir örneğidir.

1.7. Alzheimer hastalığında nanoteknolojik yaklaşımlar

AH, günümüzde dünya çapında on milyonlarca insanı etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Hu vd., 2023b). Mevcut farmakolojik tedaviler, kolinesteraz inhibitörleri (donepezil, rivastigmin vb.) veya NMDA reseptör antagonistleri (memantin) gibi

ajanlarla sadece semptomları geçici olarak hafifletebilmektedir; hiçbir mevcut ilaç, nöron ölümünü durdurup hastalığın ilerleyişini kalıcı olarak engelleyememektedir. Örneğin, asetilkolinesteraz inhibitörleri kognitif belirtileri bir süreliğine iyileştirebilir, ancak hastalığın patolojisini değiştiremezler (Ntondini vd., 2025a; Tutubala vd., 2025a). Son yıllarda onay alan monoklonal antikorlar (aducanumab, lecanemab gibi) bile farklı görüşlere konu olmuş, beklenen faydayı sınırlı ölçüde sağlayabilmiştir (Tutubala vd., 2025a). AH'nin çok faktörlü etiyojisi, beyinde A β plak birikimi, Tau proteini hiperfosforilasyonu, nöroenflamasyon, oksidatif stres gibi bir dizi karmaşık süreci içerir ve bu süreçler birbirini tetikleyerek hastalığın ilerlemesine neden olur. Bu karmaşık patogeneze ve kan-beyin bariyeri (KBB) gibi engeller, ilaç geliştirme başarı oranını son derece düşürmüştür. 2002–2012 döneminde AH için ilaç geliştirme girişimlerinin %99'dan fazlası başarısız olmuştur (Oxford vd., 2020). Dolayısıyla, yeni ve yenilikçi tedavi stratejilerine acil ihtiyaç bulunmaktadır.

Nanoteknolojik yaklaşımlar Alzheimer hastalığında yenilikçi tedavi yöntemleri sunmaktadır. Son çalışmalar, nanoteknolojinin tıp uygulamalarında avantajlı olduğunu ve AH tedavisinde yüksek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Nanopartikül tabanlı sistemler, taşıdıkları ilacı kontrollü salım ve hedefe yönelik dağıtım imkânıyla sunarak ilaçların hücre içi etkinliğini artırmakta, böylece farmakolojik etkinliği optimize etmektedir. Bu mekanizma sayesinde gereken dozlar azalırken sistemik yan etki riski düşmektedir (Cao & Zhang, 2022).

Nanoteknoloji, bu bağlamda modern tıpta umut vadeden çözümlerden biri olarak ortaya çıkmıştır. Nano boyutlu malzemeler ve taşıyıcı sistemler gerek tanı gerekse tedavi alanında çığır açan yaklaşımlar sunmaktadır. Özellikle son yıllarda nanotıp alanındaki gelişmeler, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda hedefe yönelik ilaç taşıma ve beyin ilaç iletiminde yeni ufuklar açmıştır (Tutubala vd., 2025a). Nanoteknolojik taşıyıcı sistemler, düşük biyoyararlanım ve KBB engeli gibi klasik ilaç teslimi problemlerini aşmaya yardımcı olabilecek şekilde tasarlanmaktadır. Nitekim nanopartikül tabanlı ilaç taşıyıcılar (NDDS), etkin molekülleri kapsüle ederek veya yüzeylerine bağlayarak stabil bir formda hedef dokuya ulaştırma kabiliyetine sahiptir. Bu nano-taşıyıcılar, yüksek biyoyumluluk, ayarlanabilir boyut/yüzey özellikleri ve çok işlevli yüzey modifikasyonları sayesinde konvansiyonel formülasyonlara kıyasla önemli avantajlar gösterir (A. Li vd., 2021). Örneğin, nanopartiküller çözünürlüğü düşük veya kolay bozulan ilaçları koruyarak kan dolaşımında yarı ömrünü uzatabilir, istenmeyen

bölgelerdeki dağılımını kısıtlayıp istenen bölgeye (ör. beyin) ilacın geçişini kolaylaştırabilir. KBB'yi aşma konusunda nanotaşıyıcılar çeşitli mekanizmalardan faydalanır; adsorptif ya da reseptör aracılı transsitoz gibi yollarla nanopartiküller hem küçük moleküllu ilaçların hem de peptit/protein ya da nükleik asit gibi büyük biyolojik ajanların beyne geçişini mümkün kılarak beyin dokusunda terapötik konsantrasyonlara ulaşılmasını sağlayabilir (A. Li vd., 2021; Ntondini vd., 2025a). Ayrıca uygun yüzey modifikasyonları ile nanopartiküller, hedef hücre veya reseptörlere yönlendirilebilir. Nanopartiküllerin yüzeyine pH, enzim veya reaktif oksijen türleri (ROS) gibi patolojik ortamlara duyarlı polimerler eklenerek, ilacın sadece hastalıklı bölgede salınması ve böylece sistemik toksisitenin azaltılması mümkün hale getirilebilir. Nitekim son çalışmalar, pH veya ROS-duyarlı akıllı nanotaşıyıcılarla kontrollü salım stratejilerinin, sağlıklı dokulara yan etkiyi en aza indirirken hedef dokuda ilacın etkinliğini artırdığını göstermektedir (Gao vd., 2025).

Nanoteknolojik yaklaşımların Alzheimer hastalığındaki terapötik kullanımına ilişkin literatürde hızlı bir ilerleme gözlenmektedir. Farklı yapıda ve özellikte birçok nanotaşıyıcı sistemi AH için araştırılmıştır: polimerik nanopartiküller, lipozomlar, katı lipid nanopartikülleri (SLN), dendrimerler, inorganik nanopartiküller (örn. altın veya manyetik demir oksit nano parçacıklar) ve biyomimetik nanopartiküller (örn. hücre membranı kaplı sistemler) bu alanda öne çıkan örneklerdir. Her bir nanotaşıyıcı türü, farklı avantajlar ve kullanım alanları sunar. Örneğin, polimerik nanopartiküller (PEG-PLGA gibi) biyobozunur yapıları sayesinde ilaçları kontrollü salım ile verebilir ve vücutta zamanla zararsız ürünlere ayrışır; bu esnada ilacı hedef bölgeye taşırken stabil ve etkin kalmasını sağlarlar (Hu vd., 2023b; Ntondini vd., 2025a). Lipozomlar ise çift tabakalı fosfolipit zarıyla hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçları eşzamanlı taşıyabilen, yüksek biyoyumluluğa sahip veziküllerdir; ilk klinik onay alan nanofarmasötiklerin çoğu lipozom temellidir ve beyin hastalıklarında da dopamin, kurkumin gibi molekülleri hedefli iletim için yaygın şekilde incelenmiştir. İnorganik nanopartiküller (ör. altın, silika, manyetik demir oksit) ise optik veya manyetik özellikleriyle hem tedavi (ör. Aβ birikiminin engellenmesi) hem de görüntüleme amaçlı kullanılabilir; bu parçacıklar geniş yüzey alanları ile çoklu ilaç yükleme veya yüzey fonksiyonelleştirme imkânı sunar (Gao vd., 2025; A. Li vd., 2021; Oxford vd., 2020).

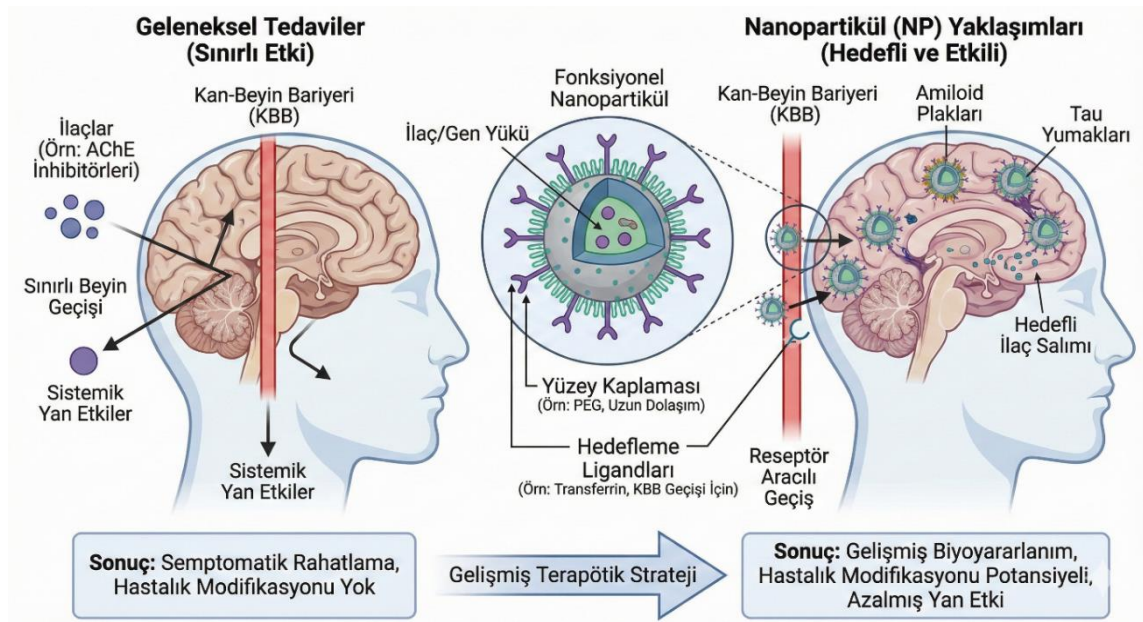
Güncel literatürde polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) ve polietilen glikol (PEG) bazlı polimerik nanopartiküller, karbon nanotüpler ve hücre kaynaklı eksozom benzeri

veziküller gibi çeşitli nanotaşıyıcı sistemlerine odaklanılmıştır (Lin vd., 2022; L. Zhu vd., 2025). Örneğin PEG-kaplı nanopartiküller Alzheimer fare modellerinde hafıza performansını iyileştirip A β birikimini azaltmıştır. Biyobozunur PLGA nanopartikülleri ise kontrollü salım özellikleri ve yüzey modifikasyonlarıyla hedeflenen bölgedeki ilacın etkinliğini artırabilir. Karbon nanotüpler yüksek yüzey alanı ve mekanik dayanıklılığıyla ilaç yüklemeye uygundur ve uygun fonksiyonelleştirmeye beyin içinde spesifik hedeflere yönlendirilebilir (Fan vd., 2018; Lin vd., 2022). Eksozom benzeri veziküller ise doğal lipid kabukları ve protein içeriği sayesinde düşük immünojenite ile biyolojik taşıyıcılar olarak kullanılmaktadır (Ordóñez-Gutiérrez & Wandosell, 2020).

AH'de nanoteknoloji temelli tedavi yaklaşımlarının gelişimi üzerine yapılan araştırmalar, oldukça umut verici bulgular ortaya koymuştur. Birçok çalışma, nanotaşıyıcıların hastalığın temel patolojik unsurlarını hedef alarak bunları azaltabildiğini göstermektedir. Örneğin, polimerik PLGA nanopartiküller kullanılarak hem A β plak oluşumunu engelleyici bir inhibitör hem de anti-inflamatuvar/antioksidan etkili kurkumin birlikte beyne taşınmış; ayrıca nanopartikül yüzeyine eklenen beyin hedefleyici peptit sayesinde KBB'yi aşma yeteneği kazandırılmıştır. Bu çoklu ilaç taşıyan nano-sistem, Alzheimer modeli farelerde bellek fonksiyonlarını belirgin şekilde iyileştirmiş, A β plak yükünü ve nöroinflamasyonu azaltmıştır (Gao vd., 2025; Hu vd., 2023b). Benzer şekilde, nanopartikül aracılı gen tedavileri üzerinde de çalışılmaktadır. Örneğin mikroglia'daki yaşlanmış hücreleri hedef almak üzere siRNA taşıyan PEG-PLGA nanopartikülleri geliştirilmiş ve bunlar Alzheimer transgenik farelerinde mikrogliaların A β temizleme fonksiyonunu yeniden kazandırarak plak birikimini azaltmış ve kognitif defisitleri hafifletmiştir (Gao vd., 2025; Saraswathi vd., 2025). Bu tür sonuçlar, nanoteknolojinin multi-hedefli tedavi stratejilerine olanak sağladığını ve hatta bağışıklık sistemini hastalık lehine yeniden programlama potansiyeli taşıdığını ortaya koymaktadır. Ayrıca lipid bazlı nanotaşıyıcılar ile yapılan çalışmalarda, kurkumin yüklü katı lipid nanopartiküllerinin AH fare modellerinde nöroinflamasyonu ve oksidatif hasarı azalttığı, mitokondri fonksiyonlarını ve bilişsel performansı iyileştirdiği gösterilmiştir (Ntondini vd., 2025a). Metal nanopartiküller bağlamında da örneğin altın nanopartiküllerin A β peptit agregasyonunu %75'in üzerinde engellediği ve hem mikroakışkan "BBB-on-a-chip" modelinde hem de hayvan deneylerinde beyin bariyerini geçerek beyinde biriken A β yükünü azaltıp kognitif fonksiyonları iyileştirdiği rapor edilmiştir (Gao vd., 2025). Bu bulgular, nanoteknoloji tabanlı tedavilerin amiloid plaklar, tau düğümleri, nöroinflamasyon ve oksidatif stres gibi AH'nin temel patolojilerine doğrudan etki

edebildiğini göstermektedir. Nitekim kapsamlı derlemeler, nanopartiküllerin A β agregasyonunu inhibe etme ve mevcut fibrilleri parçalama, nöroinflamasyonu ve A β ₁₋₄₂ kaynaklı nöronal hasarı önleme, oksidatif stresi azaltma gibi çok yönlü terapötik etkiler sağlayabildiğini vurgulamaktadır. Özellikle çok işlevli (multifonksiyonel) nanotaşıyıcılar, bu patolojik süreçlerin birkaçını birden hedef alarak kombine bir tedavi stratejisi sunmakta ve preklinik modellerde etkili sonuçlar elde etmektedir.

Nanoteknolojik tedavilerin AH'deki avantajları yalnızca etkinlik artışı ile sınırlı değildir. Hedeflenmiş taşıma sayesinde, geleneksel tedavilerin sınırlayıcı faktörleri olan sistemik yan etkiler ve doku dışı toksisiteler de azalabilir. Örneğin, donepezil veya memantin gibi mevcut ilaçların nanoformülasyonları, ilacın doğrudan beyne iletimini sağlayarak daha düşük dozlarda aynı terapötik etkiyi elde etmeyi mümkün kılabilir ve periferik yan etkileri azaltabilir (Mir Najib Ullah vd., 2023). Nitekim intranazal uygulanan memantin-yüklü nanoemülsiyonların, KBB'yi geçerek beyne ulaştığı ve bilişsel fonksiyonlarda standart oral formülasyona kıyasla belirgin iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Nanotaşıyıcı sistemlerin ilaç farmakokinetiğini iyileştirerek hem etkinliği artırabileceğini hem de tolerabiliteyi yükseltebileceğini ortaya koymaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. AH tedavisinde nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemleri ve hedefleme stratejileri.

Bununla birlikte, nanoteknoloji kullanımının bazı zorlukları ve dezavantajları da vardır. Her ne kadar nanopartiküler sistemler toksisiteyi minimize edecek şekilde tasarlanabilse

de uzun vadeli güvenlik hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Farklı nanomalzemelerin vücutta birikimi, metabolize edilme şekilleri ve olası immunolojik reaksiyonları kapsamlı şekilde değerlendirilmelidir (Mir Najib Ullah vd., 2023; Ntondini vd., 2025a). Polimerik nanopartiküller yüksek ilaç taşıma kapasitesi ve kararlı salım sağlama avantajlarına karşın, bazı durumlarda yavaş parçalanma veya inflamatuvar reaksiyon yaratma riskine sahiptir; ayrıca yüzey modifikasyonu olmadan KBB'yi geçiş verimleri kısıtlı kalabilir. Lipid bazlı nanopartiküller ise hidrofobik ilaçları iyi taşısa da hidrofilik moleküllerin enkapsülasyonunda zorluk yaşayabilir ve dolaşımda kararlılık sorunları olabilir. Lipozomlar *in vivo* stabilite açısından geliştirmeye açıktır; vücutta uzun süre dolaşırken içerdikleri ilacı sızdırmamaları veya hızla temizlenmemeleri için yüzeylerinin PEG ile kaplanması gibi yöntemler uygulanmaktadır. Nanoemülsiyonlar ve benzeri sistemler, depolama sırasında faz ayrılması veya aktif maddenin kristalizasyonu gibi sorunlar gösterebilir (Mir Najib Ullah vd., 2023). Tüm bu teknik zorluklar, nanoteknolojik tedavilerin formülasyon geliştirme, ölçeklendirme ve düzenleyici onay süreçlerini karmaşıktırabilir. Nitekim nanopartiküllerin kimyasal/fiziksel karakterizasyonu ve kalite kontrolü, klasik ilaç moleküllerine kıyasla daha sofistike yöntemler gerektirmektedir. Bu nedenle, klinik uygulanabilirliğe geçiş yolunda daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Güncel durumda, AH tedavisi için nanoteknoloji tabanlı bir ürün henüz rutin klinik kullanıma girmemiştir. Akademik literatürde çok sayıda başarılı preklinik çalışma bulunmakla birlikte, bunların yalnızca küçük bir bölümü klinik deneme aşamasına geçebilmiştir (Ntondini vd., 2025a; Tutubala vd., 2025a). Örneğin, A β aşıları veya nanopartikül taşıyıcılı ilaç kombinasyonları gibi bazı yaklaşımlar klinik çalışmalarla değerlendirilmeye başlanmışsa da henüz onaylanmış bir nanofarmasötik tedavi mevcut değildir. Bu durumun nedenleri arasında yukarıda değinilen güvenlik ve üretim zorluklarının yanı sıra, klinik deney tasarımlarının karmaşıklığı ve regülatör belirsizlikler de yer alır (Puranik vd., 2023). Yine de nanoteknoloji alanındaki hızlı ilerlemeler ve önceki on yıllarda kanserde kazanılan başarılı nanofarmasötik deneyimi, Alzheimer hastalığında da benzer atılımların yakın gelecekte mümkün olabileceğine işaret etmektedir. Özellikle hedefe yönelik ilaç salımı ve çoklu etki mekanizmalarını tek platformda birleştirebilme potansiyeli, nanoteknolojik sistemleri AH tedavisinde cazip kılmaktadır.

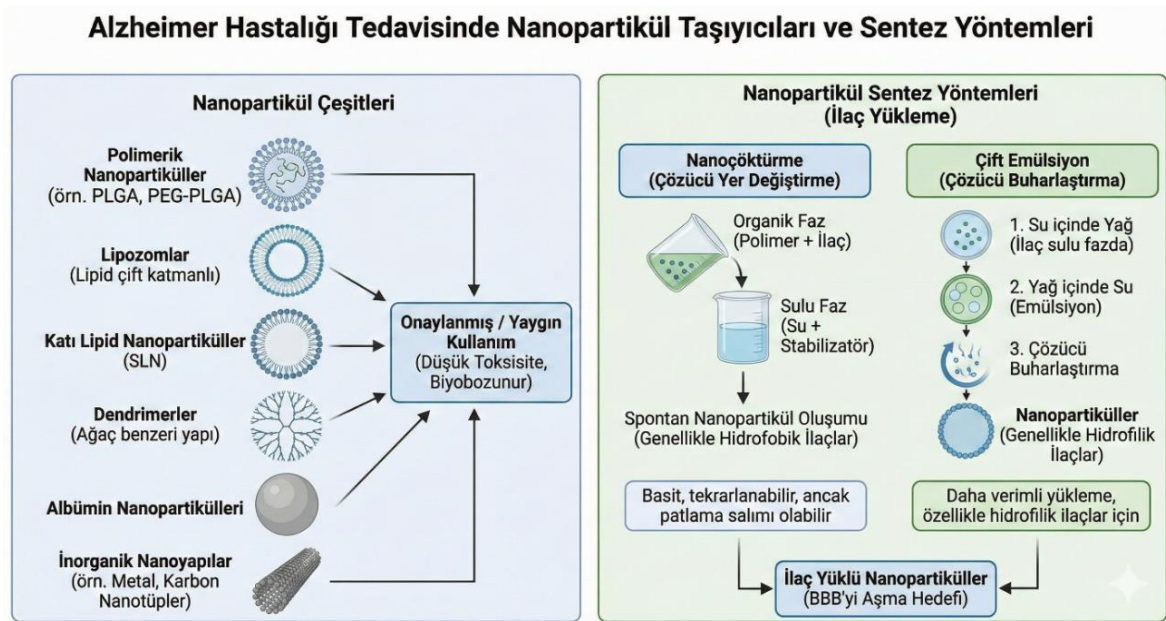
1.7.1. Nanopartikül çeşitleri ve sentez yöntemleri

Alzheimer tedavisinde ilaçları beyne ulaştırmak için çeşitli nanotaşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu nanomedikal taşıyıcılar arasında polimerik nanopartiküller, lipozomlar, katı lipid nanopartiküller (SLN), dendimerler, albümin nanopartikülleri ve inorganik nanoyapılar (ör. metal nanopartiküller, karbon nanotüpler) sayılabilir (Hu vd., 2023a). İnorganik nanomalzemelerin biyolojik olarak zor parçalanması toksisite riski getirebildiğinden, günümüze kadar onaylanmış nanoteknolojik ilaç taşıyıcıların çoğu polimerik nanopartikül veya lipozom tabanlı sistemlerdir (Hu vd., 2023b; Jagaran & Singh, 2021). Nanotaşıyıcılar, KBB'yi aşmak ve ilacı hedef bölgeye ulaştırmak için maskeleme, enkapsülasyon veya yüzeyde ligand taşıma gibi stratejiler kullanarak etki gösterir (Jagaran & Singh, 2021). Bu sayede biyoyararlanımın artırılması, hedeflenmiş dağılım ve kontrollü salım gibi avantajlar elde edilebilir (Hu vd., 2023b; Ntondini vd., 2025a).

Polimerik nanopartiküller içinde en yaygın kullanılan malzemelerden biri polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)'dir. PLGA, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinden oluşan, FDA ve EMA onaylı biyobozunur bir polimer olup hem hidrofobik hem de hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonuna imkan tanır (Danhier vd., 2012; Kömür vd., 2025). PLGA'nın farklı monomer oranlarına sahip türleri, günler veya aylar süren kontrollü salım profilleri sağlayabilir (Kömür vd., 2025). Polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş PLGA türevleri özellikle dikkat çekicidir. PEG ile PEG-PLGA gibi blok kopolimerler oluşturmak, ilacın salım kinetiğini iyileştirerek daha kontrollü bir salım profili sağlar (Cheng vd., 2007; Y. Zhu vd., 2025). PEG, hidrofobik PLGA yüzeyini kaplayarak nanopartikülü daha hidrofilik hale getirir; bu da karaciğer ve mononükleer fagositik sistem tarafından yakalanmayı azaltarak dolaşım süresini uzatır. Bu PEGilasyon stratejisi sayesinde nanotaşıyıcılar kanda gizlenip (stealth özelliği) bağışıklık sisteminden kaçabilir ve hedef dokuya daha etkin ulaşabilir. Ancak, yüksek molekül ağırlıklı PEG'in parçalanamaması ve olası bağışıklık reaksiyonları gibi sınırlamalar da not edilmelidir (Y. Zhu vd., 2025).

Nanopartikül sentez yöntemleri arasında, kullanılacak ilacın özelliklerine göre farklı yaklaşımlar benimsenir. En yaygın yöntemlerden ikisi çift emülsiyon (çözücü buharlaştırma) tekniği ve nanoçöktürme (çözücü yer değiştirme) tekniğidir (Kömür vd., 2025). Genellikle hidrofobik ilaçlar için organik polimerin bir çözücü içerisinde çözündürülüp suya eklenmesiyle gerçekleştirilen nanoçöktürme yöntemi tercih edilirken,

hidrofilik ilaçlar çift emülsiyon-yöntemiyle daha verimli yüklenecektir (Alshetali vd., 2021; Kömür vd., 2025). Nanoçöktürme, 1989 yılında Fessi ve arkadaşları tarafından tanımlanan basit bir yöntemdir (Fessi vd., 1989). Bu yöntemde polimer (örn. PLGA) ve ilaç, uçucu bir organik çözücü içinde çözünür hale getirilir ve bu çözelti, polimerin çözünmediği ancak organik çözücüyle tam karışabilen ikinci bir faza (genellikle su) hızlıca eklenir. Organik çözücünün bu yeni faz içinde seyrelip uçmasıyla, polimer çözeltiden nanopartikül boyutunda tanecikler halinde çöker; böylece ilaç-yüklü nanopartiküller spontan olarak oluşur. Bu solvent yer değiştirme prosesi ekstra ısı işlem veya karmaşık ekipman gerektirmediğinden avantajlıdır ve tipik olarak ~50–200 nm boyutunda, dar dağılımlı polimerik nanopartiküller elde edilebilir (Hamdallah vd., 2024; Xu vd., 2017). Öte yandan, nanoçöktürme ile üretilen partiküllerde ilacın kapsülleme verimi görece düşük kalabilir ve ilacın önemli bir kısmı yüzeyde kaldığı için başlangıçta patlama salımı (burst release) gözlemlenebilir (Xu vd., 2017). Bu dezavantajlara rağmen, yöntemin basitliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle PLGA gibi polimerlerin nano-taşıyıcı formülasyonlarında yaygın biçimde kullanılmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. AH tedavisinde kan-beyin bariyerini aşarak ilaç taşınımını hedefleyen başlıca nanotaşıyıcı sistemlerin çeşitleri ve sentez yöntemlerinin şematik gösterimi.

PEG-PLGA nanopartikül sistemleri, Alzheimer hastalığında pek çok deneysel tedavi stratejisinde öne çıkmaktadır. Bu sistemler, ilaçların kan-beyin bariyerini aşmasını ve beyinde hedef bölgelere ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Örneğin, PEG-PLGA

nanoküreler içine yüklenen deksibuprofen, Alzheimer transgenik modelinde KBB'yi geçerek beyindeki amiloid plaklarını azalttığı ve sinaptik fonksiyon belirteci olan p-CREB seviyesini artırdığı gözlemlenmiştir (Sánchez-López vd., 2017; Y. Zhu vd., 2025). Bu etkinin, hem deksibuprofenin anti-inflamatuar etkisinden hem de PEG kaplamanın nanopartiküllerin endositoz yoluyla beyin endotelinden geçişini kolaylaştırmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Benzer şekilde, memantin-yüklü PEG-PLGA nanopartiküller, serbest memantine kıyasla Alzheimer modelindeki amiloid plak yükünü daha fazla azaltmış ve bilişsel işlevleri daha etkin iyileştirmiştir (Sánchez-López vd., 2017). Bu çalışma, PEG-PLGA taşıyıcıların ilacı yavaş salarak beyinde daha yüksek birikim sağladığını ve sonuç olarak terapötik etkinliği artırdığını göstermiştir (Y. Zhu vd., 2025). Bir başka örnekte, beyin hedefli B6 peptidi ile yüzeylendirilmiş PEG-PLA nanopartiküllere yüklenen kurkumin, APP/PS1 transgenik Alzheimer farelerinde serbest kurkumine göre daha fazla A β birikimini ve tau fosforilasyonunu azalatarak öğrenme ve hafıza performansını anlamlı düzeyde iyileştirmiştir (Fan vd., 2018; Y. Zhu vd., 2025). Bu örnekler, PEG-PLGA tabanlı nanotaşıyıcıların AH geleneksel ilaç formlarına göre önemli avantajlar sunabileceğini ortaya koymaktadır.

Nanopartiküllerin fonksiyonellendirme özellikleri kullanılarak hedef spesifik bir yapı kazandırılabilir. Alzheimer hastalığı gibi merkezi sinir sistemini etkileyen hastalıkların en önemli handikabı terapötik maddenin kan-beyin bariyerinden geçmesidir. Moleküller beyne pasif difüzyon, taşıyıcı aracılı geçiş, reseptör aracılı transitoz, adsorptif aracılı transitoz ve paraselüler yol ile sağlanır. B6 peptidi, KBB hedeflemesinde en sık kullanılan hedefleme ligantıdır. B6 peptidi transferrin reseptörü üzerinden reseptör aracılı transitoz ile KBB geçişine olanak tanır. Peptid endotel yüzey üzerindeki transferrin reseptörlerine bağlanarak internalizasyon yaparak transitoz ile beyin parankimine geçişi sağlar (La Barbera vd., 2022; Mansour vd., 2025).

İkincil fonksiyonellendirme ise AH'na özgü patolojilerden biri olan amiloid plakların hedeflenmesi için QSH peptidi kullanılarak sağlanmıştır. Peptid A β peptitleri, erken dönem plakları hedefler. Ayrıca QSH kullanımının amiloid ilişkili toksisite de azalma ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. B6 ile KBB'ni geçen nanopartikül beyinde amiloid zengin bölgelerde yoğunlaşmasını sağlar. AH araştırmalarında bu şekilde ikili hedefleme metodlarının kullanıldığı görülmektedir; QSH ve CRT peptitlerinin birlikte kullanılması gibi (Ruan vd., 2022; Chaparro vd., 2023; Jökar vd., 2020).

B6 ve QSH peptidlerinin kolay elde edilebilirliği, stabil yapıları ve PEG-PLGA gibi polimerik yapılara fonksiyonellik kazandırma kolaylığından dolayı tercih edilebilir hedefleme peptidleridir.

2. TEZİN AMACI VE HİPOTEZİ

Alzheimer Hastalığı'nda tanı yöntemlerinin yetersizliği ve etkin bir tedavi yönteminin halen bulunmaması, dünya genelinde hasta sayısının giderek artmasına neden olmakta; bu durum hem bireysel hem de toplumsal düzeyde ciddi psikolojik ve ekonomik sorunları beraberinde getirmektedir. Hastalık patolojisinde rol oynayan mekanizmaların çok faktörlü yapıda olması ve bu mekanizmaların hâlâ tam olarak aydınlatılamamış olması, tedavi geliştirme sürecini zorlaştırmakta; günümüzde hastalara yalnızca semptomatik tedaviler sunulabilmektedir. Mevcut onaylı tedavi seçenekleri ise asetilkolinesteraz inhibitörleri ve NMDA antagonistleri ile sınırlı kalmakta ve bu tedavilerin hastalığın seyrini değiştirmede yetersiz olduğu bilinmektedir.

Yapılmış ve devam etmekte olan klinik çalışmalarda, tek bir terapötik ajanın çoğu zaman yetersiz kaldığı ve istenen klinik başarıyı sağlayamadığı gösterilmiştir. Bu nedenle yalnızca tek bir moleküler hedefe yönelik tedavi stratejileri, Alzheimer gibi kompleks hastalıklarda sınırlı etki göstermektedir. Tek bir ajanla birden fazla terapötik etki elde etmek mümkün olmadığından, çok yönlü etki gösterebilecek birden fazla ajanın birlikte kullanılması, daha etkili bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, mevcut tedavilerin sadece semptomatik olması ve hastalığın ilerleyişini durdurmada yetersiz kalması, yeni stratejilere olan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

Alzheimer Hastalığı'nda anormal protein birikiminin oluşturduğu hücrel toksisiteye karşı anti-oksidan ve anti-enflamatuar etkiler gösteren ajanların kullanılması, terapötik etkinliğin artırılmasına katkı sağlayabilir. Bu doğrultuda, bu tez kapsamında anti-amiloid, anti-oksidan ve anti-enflamatuar etkileri bir araya getiren yeni bir kombinasyon terapisi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla EPPS ile birlikte, peptidlerle kan beyin bariyeri ve amiloidlere hedeflendirilmiş NAC-yüklü nanopartiküllerinin birlikte kullanımının in vitro amiloid beta toksisitesi oluşturulmuş hücre modelinde etkilerinin belirlenmesi planlanmıştır.

EPPS, amiloid oligomer ve fibril yapılarını monomerlerine ayırabilen küçük moleküllü bir bileşik olup, kan-beyin bariyerini geçebilen, biyoyararlanımı yüksek bir anti-amiloid ajan olarak tanımlanmaktadır. NAC ise hücre içi güçlü antioksidanlardan olan

glutasyonun öncül molekülüdür ve anti-oksidan ile anti-enflamatuar etkilere sahiptir. EPPS'nin oral yolla *in vivo* etkinliği gösterilmiş olmasına rağmen, NAC'nin hızlı metabolize olması nedeniyle biyoyararlanımı düşüktür. Bu nedenle, NAC molekülü nanopartikül formuna dönüştürülerek ve peptidlerle fonksiyon kazandırılarak hedefli bir etki göstermesi planlanmıştır.

Bu çalışmada, ilk olarak NAC yüklü nanopartiküllerin sentezlenmesi, karakterizasyonu ve kan-beyin bariyerinden geçiş kapasitesinin *in vivo* ortamda değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Ardından, EPPS ile kombine edilen NAC-NP uygulamasının *in vitro* ortamda anti-oksidan ve anti-enflamatuar etkileri incelenecektir. Bu kombinasyonun, Aβ birikimlerini farklı moleküler yollar üzerinden azaltarak amiloid kaynaklı toksisiteye karşı hücresel düzeyde terapötik etki göstermesi beklenmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilecek olan EPPS ve nanopartikül formundaki NAC uygulaması kombinasyonunun, Alzheimer Hastalığı *in vitro* modelinde birden fazla patolojik hedefe aynı anda etki ederek yeni bir tedavi stratejisi oluşturmasının hedeflenmesi, çalışmanın literatürdeki özgünlüğünü ve bilimsel katkısını oluşturmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan başlıca etken madde ve reaktifler arasında NAC (Sigma-Aldrich, A7250) yer almaktadır. Organik çözücü olarak HPLC saflığında asetonitril (Merck; CAS: 64-17-5) kullanılmıştır. Polimer sentezi ve formülasyon aşamalarında mPEG 2000 (Sigma-Aldrich) ile polietilen glikol metil eter temin edilmiştir. Ayrıca, reaksiyon çözücüsü ve ortam bileşeni olarak toluen (Merck) ve katalizör olarak dibütilkalay dilaurat kullanılmıştır. Ayırıştırma ve çözündürme basamaklarında diklorometan (Merck) tercih edilmiştir. Polimer modifikasyonu için gerekli olan maleik anhidrit (Sigma-Aldrich) ve başlatıcı ajan olarak benzoil peroksit (Merck) kullanılmıştır. Bağlayıcı ve çapraz bağlayıcı işlemlerde heksdiamin (Merck), çözeltinin hazırlanmasında ise tetrahidrofuran (Merck) kullanılmıştır. Saflaştırma amaçlı olarak >%99 saflıkta asetonu (Isolab) ve 12–14 kDa selüloz asetat diyaliz membranı uygulanmıştır. Konjugasyon reaksiyonları için EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür; Sigma Aldrich)

kullanılmıştır. Elektron mikroskopisi hazırlığında ise 200 mesh karbon kaplı bakır gridler (Agar Scientific) tercih edilmiştir.

Nanopartikül üretimi ve yüzey modifikasyonunda kullanılan polimerler arasında PLGA (Resomer RG-502, Sigma-Merck 719889) bulunmaktadır. Hedefleme stratejilerinde B6 peptidi (CGHKAKGPRK; Elabscience) ve QSH peptidi (QSHYRHISPAQV; Elabscience) uygulanmıştır. Ayrıca, amiloid beta agregasyon modellerinde A β 1–42 peptidi (HFIP form; R peptide, A-1163) kullanılmıştır.

Amiloid oligomerizasyonunun yapısal doğrulanması için ayrıca Bis-ANS floresan bağlanma analizi uygulanmıştır. Bu amaçla kullanılan Bis-ANS boyası (Cayman, 21820), hidrofobik bölgelerdeki konformasyonel değişikliklere duyarlılığı sayesinde oligomerik agregatların oluşumunu değerlendirmede kullanılmıştır.

Oligomer oluşumunun doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analizlerinde, jel hazırlığı için %30 Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi (Bio-Rad #1610156), tampon sisteminde Tris (Chem Cruz sc-3715A) ve pH ayarlaması için HCl (Sigma Aldrich 7102) kullanılmıştır. Numune denatürasyonu ve jel elektroforezinin sağlanması amacıyla %10 SDS (Sigma 71736), polimerizasyonu başlatmak için %10 APS (CAS: 7727-54-0) ve katalizör olarak TEMED (Big Shop TEM001.50) eklenmiştir. Protein bantlarının moleküler ağırlıklarına göre değerlendirilmesinde BioLegend Prime Step Prestained Broad Range Protein Ladder kullanılmıştır. Elektroforez sonrası proteinlerin görünür hâle getirilmesi için jel, Coomassie Brilliant Blue (PanReac Applichem, C.I. 42660) ile boyanmış ve amiloid-beta oligomerlerinin bant paternleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Hücre çoğaltımı ve pasajlamada %0.25 Trypsin/EDTA (PAN; Kat. No: P10-019100) kullanılmış; kültür ortamı olarak DMEM (PAN; Kat. No: P04-03590) ve Fetal Bovine Serum (FBS) (PAN; Kat. No: P30-3306) tercih edilmiştir. Yıkama ve tamponlama işlemlerinde PBS (PAN; Kat. No: P04-36500) kullanılırken, çözücü olarak DMSO (Isolab, Almanya; CAS: 67-68-5) görev almıştır. Hücre canlılık ölçümlerinde CVDK-8 (Cell Viability Detection Kit-8; EcoTech Biotechnology, Kat. No: CVDK-8) uygulanmıştır.

Mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesinde JC-10 boyası (Abcam; Kat. No: ab112134) kullanılmıştır. Oksidatif stres belirteçlerinin analizi için TOS Kiti (Elabscience; E-BC-K802-M), süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesinde T-SOD

Aktivite Kiti (Elabscience; E-BC-K020-M) ve total glutatyon seviyelerinin ölçümü için T-GSH Kiti (Elabscience; E-BC-K097-M) kullanılmıştır.

Sitokin düzeylerinin tespitinde ELISA kitleri uygulanmıştır: Human IL-1 β (BT LAB; E0143Hu), IL-6 (BT LAB; E0090Hu) ve TNF- α (BT LAB; E0082Hu).

Kromatografi ve Spektroskopi Sistemleri için kullanılan analitik cihazlar arasında, kantitatif ve kalitatif bileşen analizlerinde yararlanılan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi (Shimadzu Prominence-i LC-2030C) ve buna uyumlu C18 kolon (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) bulunmaktadır. Fonksiyonel grupların tanımlanması ve kimyasal yapı doğrulamalarında Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) cihazı (Agilent Cary 630) kullanılmıştır. Moleküler yapı analizlerinde proton nükleer manyetik rezonans (^1H NMR) spektrometresi (Agilent Unity Inova 500 MHz) tercih edilmiştir. Polimerlerin moleküler ağırlık dağılımlarını belirlemek amacıyla jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri yapılmış ve bu analizlerde TSK-Gel GMHHR-M kolonu (Tosoh Bioscience) kullanılmıştır.

Fiziksel Karakterizasyon Ekipmanlarında nanopartiküllerin boyut dağılımı ve yüzey yükü tayinlerinde Zetasizer Nano ZS (Malvern) cihazından yararlanılmıştır. Morfolojik incelemeler ve yapı görüntülemeleri taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) (Quattro S, Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. Numune hazırlama ve partikül izolasyon aşamalarında ultrasantrifüj (Beckman Coulter) ve masaüstü santrifüj (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Formülasyonların kurutularak stabil hâle getirilmesi sürecinde liyofilizatör sistemi (Lyovac GT2, Almanya) uygulanmıştır.

Hücre bazlı testlerde absorbans ölçümleri için mikroparka okuyucu (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific), floresan tabanlı analizlerde ise floresan mikroparka okuyucu (BioTek Instruments) kullanılmıştır. Hücre popülasyonlarının kantitatif değerlendirilmesi ve belirteç analizleri akım sitometrisi sistemi (NovoCyte, Agilent) ile gerçekleştirilmiştir. Hücresel lokalizasyon ve görüntüleme çalışmalarında konfokal mikroskopi platformu (Zeiss PRIMOVERT; Model: MCO-18AC) kullanılmıştır.

Laboratuvar rutini içerisinde ayrıca mini spin santrifüj (Ohaus), vorteks karıştırıcı (Ohaus), mikro santrifüj cihazları (Thermo Fisher Scientific ve Eppendorf), orbital sallamalı inkübatör (Infors HT, Ecotron) ve thermomixer (Eppendorf, Thermomixer C) gibi yardımcı ekipmanlar da kullanılmıştır.

3.2. Metot

Bu tez çalışması, TÜBİTAK ARDEB-1001 programı kapsamında, 122S028 nolu proje kapsamında yapılan çalışmaların verileri üzerine inşa edilmiştir. Söz konusu proje dahilinde iki ayrı doktora tezi desteklenmiştir. Bu proje desteğiyle tamamlanmış olan 970640 numaralı doktora tezinde B6 peptidi ile hedeflendirilmiş NAC yüklü mPEG-PLGA nanopartikülleri ile çalışmalar yapılmıştır. Bu tez çalışmasında ise, B6 peptidinin yanı sıra QSH peptidi de nanopartikül sistemine dahil edilerek çift hedefli QSH-B6-NAC-NP hazırlanmıştır. Bu yönüyle tez çalışması, proje kapsamında yürütülen diğer tezden hedeflendirme yaklaşımı ve tasarlanan nanopartikül sistemi açısından ayrılmaktadır. NAC'ın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu, polimer sentezi, bazı karakterizasyon analizleri ile enkapsülasyon verimliliğine ait belirli veriler her iki tezde ortak altyapı çalışmaları olarak yer almaktadır. Bu analizler, proje dahilinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Analitik metot geliştirme, polimer sentezi ve nanopartikül hazırlama

Bu çalışma kapsamında Alzheimer hastalığına yönelik geliştirilecek olan yeni nesil bir tedavi yaklaşımının temelini oluşturmak amacıyla, antioksidan ve anti-enflamatuar özelliklere sahip NAC'ın farklı yapısal özellikteki biyoyumlu polimerler ile taşıyıcı sistemlere entegre edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda ilk aşamada aktif bileşik olan NAC'ın miktar tayini yapılmış, analitik yöntemin validasyon parametreleri değerlendirilerek doğruluğu ve güvenilirliği sağlanmıştır.

İkinci aşamada, nanopartikül sentezinde kullanılacak olan mPEG-PLGA bazlı polimer türevleri adım adım sentezlenmiş; elde edilen mPEG-PLGA, mPEG-PLGA-MA ve mPEG-PLGA-MA-NH₂ yapılarının FTIR, NMR ve GPC metotlarıyla karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Fonksiyonel gruplarla zenginleştirilmiş bu polimer yapıları, yüzey modifikasyonları ve hedefleme stratejilerinin uygulanmasına olanak sağlamıştır.

Üçüncü aşamada sentezlenen polimerlerle, NAC yüklü mPLGA-PEG-NH₂ nanopartikülleri ve B6-QSH peptidi ile fonksiyonlandırılmış mPLGA-PEG-NH₂-B6-

QSH nanopartikülleri hazırlanmıştır. Bu nanopartiküller, fizikokimyasal açıdan detaylı şekilde karakterize edilerek partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli gibi temel parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca, NAC'ın nanopartikül matrisine enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi değerlendirilmiş; *in vitro* ilaç salım profili ile kontrollü salım potansiyeli analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin serum ortamındaki stabilitesi test edilmiş, farmasötik uygulamalara uygunluk açısından liyofilizasyon ve sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. NAC'ın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

NAC'ın kantitatif olarak belirlenebilmesi için kullanılan analitik yöntem, güvenilirlik ve doğruluk açısından validasyona tabi tutulmuştur. Analitik validasyon, bir yöntemin belirli sınırlar içinde doğru, kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermek amacıyla gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada NAC analizine yönelik geliştirilen HPLC yöntemi, Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi'nin (ICH) analitik yöntem validasyonuna ilişkin Q2 (R1) kılavuzu doğrultusunda değerlendirilmiştir (ICH, 2023). Validasyon çalışmaları; sistem uygunluğu, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, teşhis limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) parametreleri altında incelenmiştir (Bose, 2014; Prakasha Gowda vd., 2020).

3.2.1.1.1. Analitik metot validasyonu

NAC analizleri, HPLC sistemi (Prominence-I LC-2030C, Shimadzu) ve C18 kolonu (150 × 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NAC, distile suda çözündürülerek 500 µg/mL (ppm) derişiminde stok çözelti hazırlanmıştır. Hareketli faz, %10 asetronitril ve %90 oranında 1 mM KH₂PO₄ tamponunun (pH 3) karışımından oluşturulmuş ve analizler izokratik koşullarda yürütülmüştür. Kolon sıcaklığı 25 °C, akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak sabit tutulmuştur. NAC'ın maksimum absorbands verdiği dalga boyu 213 nm olarak belirlenmiş ve tüm analizler bu dalga boyunda yapılmıştır.

3.2.1.1.2. Sistem Uygunluğu

Bir analitik yöntemin performansının ölçülebilir olması için sistem uygunluğu testleri gereklidir. Sistem uygunluk parametreleri; alıkonma süresi, pik alanı, teorik tabaka sayısı, asimetri faktörü ve seçicilik faktörü gibi kromatografik ölçütleri kapsamaktadır. Bu

çalışmada sistem uygunluğu, alıkonma süresi ve pik alanının $n = 5$ tekrar ölçümü ile değerlendirilmiştir.

3.2.1.1.3. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, ölçülen sinyalin madde konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir. NAC stok çözeltisinden 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 ve 500 ppm derişimlerinde sekiz farklı standart çözelti hazırlanmış ($n=3$), kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş; doğrusal regresyon denkleminde determinasyon katsayısı (R^2), standart sapma (SS) ve bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplanmıştır.

3.2.1.1.4. Doğruluk

Yöntemin doğruluğu, bilinen konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin analiz edilmesiyle hesaplanan geri kazanım yüzdesi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada 50, 200 ve 500 ppm NAC çözeltileri hazırlanmış ve her bir konsantrasyon düzeyi $n = 4$ tekrar analiz edilmiştir. Elde edilen değerler üzerinden % geri kazanım, SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır.

3.2.1.1.5. Kesinlik

Kesinlik, analitik yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik açısından gösterdiği performansı ifade eder. Bu çalışmada kesinlik iki aşamada değerlendirilmiştir:

Aynı koşullarda, kısa zaman aralıklarıyla hazırlanan 50 ppm NAC örneklerinin ($n = 5$) ardışık olarak analiz edilmesiyle tekrarlanabilir olması ve 100 ppm'lik çözeltiler iki farklı analist tarafından bağımsız şekilde hazırlanarak peş peşe ölçülmesiyle ($n = 5$) tekrar elde edilebilir olmasıdır. SS ve %BSS değerleri hesaplanmıştır.

3.2.1.1.5. Özgünlük ve Seçicilik

Özgünlük ve seçicilik, yöntemin formülasyonda yer alan diğer bileşenlerden etkilenmeden NAC'ı doğru şekilde ölçebilme kabiliyetini ifade eder. Bu amaçla; formülasyon bileşenlerinin çözeltileri ile NAC içermeyen boş nanopartikül formülasyonları analiz edilmiştir.

3.2.1.1.6. Teşhis ve Tayin Limiti

Yöntemin duyarlılığı teşhis limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri ile belirlenmiştir. Hesaplamalar aşağıdaki formüller kullanılarak yapılmıştır:

$$LOD=3,3 \times \sigma/S$$

$$LOQ=10 \times \sigma/S$$

σ , kalibrasyon eğrisinin y-kesişim değerlerinin standart sapması

S, kalibrasyon eğrisinin eğimi.

3.2.1.2. Polimerlerin sentezi

Nanopartikül formülasyonlarında kullanılmak üzere kopolimerlerin sentezi üç basamakta gerçekleştirilmiştir. Polimer sentezi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü'nde Doç. Dr. Mehmet Koray Gök'ün yardımları ile sentezlenmiştir.

3.2.1.2.1. mPEG-PLGA sentezi

Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA; RG502, 50:50; Mw= 7-17 kDa) ve polietilen glikol metil eter (PEG-2000, PEG-OCH₃), 1:1 mmol oranında tartılarak 15 mL tolüen içerisinde çözülmüştür. Elde edilen homojen çözelti, karıştırıcı, geri soğutucu ve gaz giriş hattı ile donatılmış 500 mL hacimli beş boyunlu cam reaktöre aktarılmıştır. Reaksiyonun katalizi için 2 mg dibutylkalay dilaurat eklenmiştir.

Reaksiyon, azot atmosferi altında, 114 °C sıcaklıkta ve 250 rpm karıştırma hızıyla 8 saat boyunca sürdürülmüştür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ortamda bulunan tolüen, rotary evaporatör kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından, viskoz hâlde elde edilen polimer 20 mL diklormetan (DCM) içerisinde çözülmüş ve çözelti 60 °C'de sürekli karıştırılan suya ince bir akış halinde damlatılarak çöktürülmüştür. DCM'nin tamamen uzaklaşması sonrasında oluşan emülsiyon 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve mPEG-PLGA pellet olarak elde edilmiştir. Ürün liyofilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.2.2. MPEG-PLGA-MA Sentezi

mPEG-PLGA'nın maleik anhidrit (MA) ile fonksiyonlandırılması amacıyla MPEG-PLGA:MA:Benzoil Peroksit (BPO) 1:10:0.2 mmol oranlarında tartılmış ve 10–15 mL DCM içerisinde çözülmüştür. Çözelti homojen hâle getirildikten sonra, vakum altında oda sıcaklığında tutulmuş ve DCM tamamen uzaklaştırılmıştır.

Solvent uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen karışım, azot atmosferi altında 100 ± 1 °C’de, 16 saat boyunca reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon süresi sonunda sistem oda sıcaklığına soğutulmuş ve ürün içerisinde 50 °C sıcak su geçirilerek olası yan ürünler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen mPEG-PLGA-MA ürünü kurutularak, sonraki modifikasyon aşamalarında kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2.3. mPEG-PLGA-MA-NH₂ Sentezi

Polimere primer amin fonksiyonelliği kazandırmak amacıyla, MPEG-PLGA-MA ve heksametilendiamin (HMDA) ayrı ayrı tetrahidrofuran (THF) içerisinde çözülmüştür. HMDA miktarı, polimere göre ağırlıkça %3 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hazırlanan HMDA çözeltisi, karıştırılmakta olan MPEG-PLGA-MA çözeltisine sıcaklık 20 °C’nin altında olacak şekilde yavaşça, damla damla eklenmiştir. Karışım düşük sıcaklıkta 10 dakika, ardından oda sıcaklığında 30 dakika reaksiyona bırakılmıştır.

Reaksiyon sonunda ürün, aşırı soğuk distile suya damlatılarak çöktürülmüş ve 5000 rpm hızda santrifüjlenerek katı faz ayrılmıştır. Elde edilen çökelti birkaç kez distile su ile yıkanmış, ardından vakum altında dondurularak kurutulmuştur. Son ürün olan MPEG-PLGA-MA-NH₂, sonraki nanopartikül hazırlama ve peptid konjugasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.3. NAC yüklü B6-QSH nanopartiküllerinin hazırlanması

Nanopartikül İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Prof. Dr. Erdal Cevher ve Dr. Emine Saldamlı’nın yardımları ile hazırlanmıştır.

Nanopartiküller, sentezi gerçekleştirilen mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimeri kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Polimer ve NAC, mPEG-PLGA-MA-NH₂: NAC oranları 50:20, 40:20 ve 25:20 (a/a) olacak şekilde tartılmış ve 15 mL aseton (Merck, Emsure®, Almanya) içerisinde çözülmüştür. Organik faz, 300 rpm hızla karıştırılan 10 mL distile suya damla damla ilave edilmiş ve bu işlem sonucunda kolloidal nanopartikül dispersiyonları oluşmuştur. Oluşan dispersiyonlar 30 dakika karıştırıldıktan sonra, çözücünün uzaklaştırılması amacıyla düşük basınç altında vakum evaporasyon uygulanmıştır.

Elde edilen nanopartikül süspansiyonları, partiküllerin ayrıştırılması için 45.000 rpm’de, 4 °C’de, 1 saat süreyle ultrasantrifüj (Beckman Coulter, İngiltere) edilmiştir. Santrifüj

sonunda oluşan pellet distile suda yeniden disperse edilerek karakterizasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. Ancak ilk formülasyonlarda hedeflenen partikül boyutlarının elde edilememesi üzerine tüm hazırlama adımları soğuk buz banyosunda tekrarlanmıştır. Hazırlama sürecinde her aşamada pH değerleri ölçülmüş, santrifüj sonrası yeniden dağıtılan nanopartiküllerin pH'sının başlangıçtaki 3.0–3.5 aralığından 4.6 seviyesine yükseldiği belirlenmiştir. Bu pH değişiminin partikül özellikleri üzerinde etkili olabileceği değerlendirilerek polimer:NAC oranı yeniden düzenlenmiş ve 25:20 oranında yeni formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların pH değerleri 4.6 civarında ölçülmüş ve enkapsülasyon verileri ile birlikte değerlendirilmiştir. Ek olarak FITC yükleme işlemi de aynı metotla uygulanmıştır. Nanopartiküllere yüklenen FITC miktarının tayininde ise süpernatanttan alınan rnekler UV–Vis spektrofotometri ile değerlendirilmiştir.

NAC yüklü nanopartiküllerin başlangıç pH değerinin 4.6 olması, peptitlerin stabilitesi açısından uygun bulunmamış; bu nedenle pH değeri 0.1 M NaOH ile kademeli olarak 6.8'e yükseltilmiştir. pH'daki her bir artış basamağında nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlendirilmiş; pH 6.8 değerinde ise % enkapsülasyon verimi tekrar llmştir.

Elde edilen mPEG-PLGA-MA-NH₂ nanopartikülleri B6, B6-FITC ve QSH peptitlerinin kovalent bağlanması amacıyla karbodiimid kimyası kullanılmıştır. Bu doğrultuda nanopartiküller soğuk ortamda hazırlandıktan sonra, peptit konjugasyonu için EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür) (1 mg/mL) ultra saf su içerisinde zndrlmş ve nanopartikül dispersiyonuna eklenerek 45 dakika boyunca aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Aktivasyon sonrası peptit çözeltileri (B6, B6-FITC, QSH) molce B6:QSH 1:0.5 oranında sırasıyla B6/B6-FITC, ardından QSH nanopartikül dispersiyonuna ilave edilmiştir. Peptit ilavesi sonrası karışımlar buz banyosu koşullarında 2.5 saat süreyle karıştırılarak konjugasyon tamamlanmıştır.

Hazırlanan nihai nanopartiküllerin FTIR, NMR, GPC teknikleriyle yapılan karakterizasyon analizleri 3.2.1.4.'te belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.1.4. Polimer ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

Sentetik olarak elde edilen MPEG-PLGA, MPEG-PLGA-MA ve MPEG-PLGA-MA-NH₂ polimerlerinin yapısal ve fiziksel özellikleri, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H-NMR) ve Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC/SEC) ile değerlendirilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonları için ek olarak DLS, STEM ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) teknikleri de kullanılmıştır.

3.2.1.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Polimerlerde fonksiyonel grup değişimlerinin doğrulanması amacıyla FTIR analizleri, Agilent Cary 630 model FTIR spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde örnekler, potasyum bromür (KBr) ile 1:200 oranında seyreltilerek tablet hâlinde hazırlanmış ve spektrumlar 400–4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında kaydedilmiştir. Her sentez basamağında elde edilen ürünlere ait karakteristik pik değişimleri karşılaştırılarak yapısal dönüşümler değerlendirilmiştir.

3.2.1.4.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi

Polimer zincirindeki kimyasal yapı, monomer oranları ve uç grup modifikasyonlarının doğrulanması için ¹H-NMR analizleri, UNITY INOVA 500 MHz (Varian, Kanada) spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, Chloroform-d (CDCl₃) içerisinde, 25 °C’de ve 500 MHz (¹H) koşullarında alınmıştır. Elde edilen spektrumlar MPEG, PLGA, MA ve NH₂ modifikasyonlarına ait karakteristik proton sinyalleri üzerinden değerlendirilmiştir.

3.2.1.4.3. Jel geçirgenlik kromatografisi / boyutlarına göre ayırma

Polimerlerin moleküler ağırlık dağılımlarının ve polidispersite indekslerinin belirlenmesi için GPC/SEC analizleri uygulanmıştır. Analizler, TSK-gel GMHHR-M kolonu (Tosoh Bioscience, Japonya) kullanılarak, THF mobil fazı altında ve 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Spesifik kırılma indeksi artışı (dn/dc = 0.045 mL/g) diferansiyel kırılma indeksi (dRI) detektörü ile ölçülmüş; mutlak moleküler ağırlık ve moleküler ağırlık dağılımları ise mini-DAWN çok açılı ışık saçılımı (MALS) detektörü (Wyatt, ABD) ile hesaplanmıştır. Örnekler analiz öncesinde gece boyunca 5 mg/mL derişimde kloroform içerisinde çözündürülmüş, ardından 0.22 µm membran filtreden süzülerek viallere aktarılmıştır.

3.2.1.4.4. Diferansiyel taramalı kalorimetri

Polimerlerin termal özelliklerinin incelenmesi amacıyla DSC analizleri, elektrikli soğutma ünitesine sahip ısı akış tipi bir DSC cihazı (SII Nanotechnology, ExStar 6200, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın sıcaklık ve entalpi kalibrasyonları indiyum (In), kalay (Sn) ve çinko (Zn) standartları ile yapılmıştır. Yaklaşık 4–6 mg polimer örneği alüminyum kroze yerleştirilmiş ve 20–300 °C sıcaklık aralığında, 10 °C/dk ısıtma hızıyla ve 100 mL/dk nitrojen akışı altında analiz edilmiştir. Elde edilen termogramlar üzerinden polimerlerin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g), erime davranışları ve sentez basamaklarına bağlı olası yapısal değişimleri değerlendirilmiştir.

3.2.1.4.5. Nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinin belirlenmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ortalama partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri Malvern Zetasizer serisi cihazlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boyut ve PDI analizlerinde, nanopartikül süspansiyonları distile su ile uygun oranda seyreltilerek ölçümler 25 °C sıcaklıkta ve en az üç tekrar şeklinde yapılmıştır. Zeta potansiyeli ölçümleri için numuneler distile su ile 1:50 oranında seyreltilmiş ve özel zeta kuvvetlerine aktarılmıştır. Ölçümler 25 °C'de ve 90° saçılma açısı altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, nanopartiküllerin dağılım homojenliği, stabilite potansiyeli ve yüzey yükü özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.2.1.4.6. Nanopartiküllerin morfolojik analizi

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini ve yapısal özelliklerini değerlendirmek amacıyla taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) analizi uygulanmıştır. Analizler, Türk-Alman Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında bulunan Thermo Scientific Quattro S model elektron mikroskobunda, STEM modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesinde nanopartikül süspansiyonları 1/100 oranında seyreltilmiş, ardından her bir numune 200 mesh karbon kaplı bakır gridler üzerine dikkatlice damlatılmıştır. Gridler oda sıcaklığında tamamen kuruyana kadar bekletilmiştir. Kurutma işleminin ardından numuneler yüksek vakum koşullarında taranarak değerlendirilmiş ve elde edilen STEM görüntüleri nanopartiküllerin şekilsel bütünlüğü ve yüzey morfolojisi hakkında nitel bilgi sağlamıştır.

3.2.1.5. Enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi analizi

mPEG-PLGA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimliliği ile ilaç yükleme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, nanopartiküller önceki bölümlerde açıklanan yöntem doğrultusunda hazırlanmıştır. Elde edilen nanopartikül dispersiyonları, serbest NAC'ın ayrıştırılması için 45.000 rpm'de, 4 °C'de, 1 saat süreyle ultrasantrifüj (Beckman Coulter, İngiltere) edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında oluşan süpernatanttan 1 mL alınmış ve serbest NAC miktarının belirlenmesi amacıyla valide edilmiş HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir (Li et al., 2012). Nanopartiküllerin enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi, aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$EE (\%) = \frac{\text{toplam NAC} - \text{serbest NAC}}{\text{toplam NAC}} \times 100$$

$$YK(\%) = \frac{\text{enkapsüle edilen NAC}}{\text{toplam NP ağırlığı}} \times 100$$

3.2.1.6. *In vitro* ilaç salım profili analizi

NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartikül formülasyonları ve serbest NAC çözeltisinin *in vitro* salım profili, diyaliz membran difüzyon tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir (Muthu & Singh, 2009). Bu amaçla, her bir formülasyondan 1 mL nanopartikül dispersiyonu, 12–14 kDa moleküler ağırlık kesim değerine sahip selüloz asetat diyaliz membranlarına yüklenmiştir. Salım çalışmaları, fizyolojik koşulları taklit etmek amacıyla 50 mL fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde, 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman noktalarında ortamdan 2 mL örnek alınmış, sink koşullarının korunması için alınan hacim kadar taze fosfat tamponu (pH 7.4) ortama geri eklenmiştir. Zaman serisinde alınan tüm örneklerde NAC miktarı valide edilmiş HPLC yöntemi ile analiz edilmiş, elde edilen konsantrasyon verileri kullanılarak zamana bağlı kümülatif salım yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.2.1.7. Nanopartiküllerin *in vitro* stabilite analizi

NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartikül formülasyonlarının fizyolojik koşullar altındaki kararlılığını değerlendirmek amacıyla, salım ortamını temsil eden fosfat tamponu (pH 7.4) (Huang et al., 2009) ile hücresel ortamı taklit eden %50 fetal sıgır serumu (FBS) içeren ve içermeyen DMEM çözeltilerinde stabilite çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller bu ortamlarda 37 °C ve 100 rpm karıştırma hızı altında inkübasyona bırakılmıştır. Stabilité değerlendirmesi 24 saat boyunca yapılmış olup 0.5, 1, 2, 4 ve 24. saat zaman noktalarında ortamdan örnek alınarak partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Tüm analizler, yöntemin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla üç bağımsız tekrar şeklinde yürütülmüştür.

3.2.1.8. Nanopartiküllerin liyofilizasyonu

Nanopartiküllerin uzun süreli saklamaya uygun hale getirilmesi amacıyla, kriyoprotektan olarak %15 ve %20 trehaloz içeren nanopartikül dispersiyonları liyofilizasyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla, örnekler önce -20 °C’de 12 saat süreyle dondurulmuş, ardından -65 °C’de, 0.005 mbar vakum altında çalışan liyofilizatörde 24 saat boyunca kurutulmuştur. Liyofilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen kuru nanopartikül tozları distile suda yeniden disperse edilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler yöntemin güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla üç bağımsız tekrar şeklinde yapılmıştır.

3.2.1.9. Nanopartikül formülasyonlarının sterilizasyonu

Nanopartikül formülasyonlarının mikrobiyolojik açıdan güvenli hale getirilmesi amacıyla tüm dispers haldeki nanopartiküller için UV sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu kapsamda, nanopartikül süspansiyonları belirli bir mesafede UV ışığına maruz bırakılarak 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra nanopartiküllerin fiziksel bütünlüğünün korunup korunmadığını değerlendirmek amacıyla partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Tapia-Guerrero et al., 2020). Sterilizasyonun mikrobiyolojik etkinliğini değerlendirmek amacıyla seçilen nanopartikül formülasyonları uygun agar besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyerleri gözlemlenmiş ve sterilizasyon işleminin etkinliği mikrobiyolojik kontaminasyon açısından değerlendirilmiştir.

3.2.2. *In vitro* çalışmalar

Alzheimer hastalığına ait *in vitro* modelde, insan dopaminerjik nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) kullanılmıştır. Aβ42 peptidleri ile hücrelere toksisite uygulanmış; serbest NAC ve NAC yüklü nanopartikül (NAC-B6-QSH-NP) formülasyonlarının toksisiteye etkileri detaylı şekilde incelenmiştir. Toksisite öncesi ve

sonrasında, oksidatif stres, inflamasyon, mitokondriyal fonksiyon, gibi biyolojik parametreler değerlendirilmiştir. Tüm deneyler en az üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Hücre kültürünün gerçekleştirilmesi

Hücreler %10 FBS, %1 NEAA ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM ortamında, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Dondurulmuş stok hücreler su banyosunda çözündürülmüş, santrifüjlenip (1200 rpm, 5 dk) üst fazı atıldıktan sonra yeni kültür ortamına aktarılmıştır. Hücreler %70-80 konfluensiye ulaşınca kadar büyütülmüş, her 3 günde bir ortam yenilenmiştir. Pasajlama için 1X PBS ile yıkama ve tripsin/EDTA ile hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlanmış, daha sonra santrifüjlenerek yeni ortamda çözülmüşlerdir. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler mikroskop altında gözlemlenmiştir.

3.2.2.2. Hücre kültüründe A β 42 oligomerlerinin oluşturulması

A β 42 peptidi, hücrelerde önce monomer formda bulunmakta, ardından oligomer, fibril ve son olarak plak yapılarını oluşturmaktadır. Literatürde en toksik formun oligomer olduğu belirtilmiş (Benilova vd., 2012) ve bu nedenle deneylerde A β 42 oligomer (A β 42o) formu kullanılmıştır. HFIP ile muamele edilmiş rekombinant A β 42 peptidi, sonikasyon ile NH₄OH içinde çözülmüş ve fenol kırmızısı içermeyen medyunda farklı konsantrasyonlarda (5–100 μ M) 4°C'de 24 saat inkübe edilerek oligomer formuna dönüştürülmüştür. Oluşan oligomerler SDS-PAGE ve ayrıca Bis-ANS boyası kullanılarak spektrofotometrik olarak doğrulanmıştır.

3.2.2.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınması

Nanopartiküllerin hücrelere giriş düzeyini analiz edebilmek için, NAC-B6-QSH nanopartiküllerinin hazırlanması kısmında tanımlanan FITC ile işaretlenmiş nanopartikül formülasyonları (FITC-NP ve NAC-B6-FITC-NP) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri, 12 kuyucuklu kültür plakalarına 1 $\times$ 10⁵ hücre/mL yoğunlukta dağıtılmış ve hücrelerin tutunmasını sağlamak üzere 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücrelere, 25 μ g/mL derişimde hazırlanan ilgili nanopartikül örnekleri uygulanmış ve bu muamele 24 saat sürdürülmüştür. Süre sonunda hücreler tripsin ile ayrılarak toplanmış, PBS ile yıkandıktan sonra +4 °C koşullarında analiz için hazır hâlde tutulmuştur (Zhang ve ark., 2014). Hücre içi nanopartikül internalizasyonu, FITC işaretinin oluşturduğu floresan

yoğunluğunun akım sitometrisi (BeckmanCounter) ile ölçülmesi yoluyla nicel olarak değerlendirilmiştir. Böylece farklı nanopartikül gruplarının hücre içine alınma verimliliği karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

3.2.2.4. NAC, EPPS ve nanopartikülün hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

NAC, EPPS ve NP'lerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi, CVDK-8 testi kullanılarak belirlenmiştir. SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilmiş, üzerlerine %10 oranında CVDK-8 reaktifi eklenmiş ve 4 saat inkübasyon uygulanmıştır. Mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından tetrazolyum tuzunun redüksiyonu sonucu oluşan formazan miktarı mikroparka okuyucuda 480 nm'de ölçülmüştür.

3.2.2.5. A β 42o toksisitesi oluşturulan hücrelerde EPPS ve NAC-NP'nin hücresel canlılığa etkisinin belirlenmesi

EPPS, NAC ve NAC-B6-QSH-NP'lerin A β 42o kaynaklı toksisite üzerindeki hücresel canlılık etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hücreler, 96 kuyucuklu kültür plakalarına 10.000 hücre/kuyu yoğunluğunda ekilmiş ve 24 saat inkübasyonla hücre tutunması sağlanmıştır.

Belirlenen konsantrasyonda A β 42o uygulanarak hücrelerde 24 saat toksisite indüklenmiştir. Toksisite oluşturulmasını takiben, belirlenen aralıklardaki konsantrasyonlarda NAC, EPPS, B6-QSH-NAC-NP uygulamaları gerçekleştirilmiştir. A β 42o uygulanmamış bir hücre grubu negatif kontrol olarak deney düzenine dahil edilmiştir. Tüm deneysel koşullar 3 bağımsız tekrarla yürütülmüştür (Tablo 2).

Hücresel canlılık, uygulamalar sonrasında CVDK-8 kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuğa CVDK-8 reaktifi eklenmiş ve plakalar üretici firmanın önerilerine uygun şekilde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından absorbans ölçümleri mikroparka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans verileri normalize edilerek canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

Tüm istatistiksel analizler yine GraphPad Prism 10 üzerinden gerçekleştirilmiş ve elde edilen parametreler gruplar arası karşılaştırmalar için değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Tez çalışmasında planlanan deney grupları.

	EPPS	NAC	NAC-NP
Grup 0	-	-	-
Grup 1	-	+	-
Grup 2	+	-	-
Grup 3	+	+	-
Grup 4	-	-	+
Grup 5	+	-	+

3.2.2.5.1. Sinerjistik etki

A β (1-42) oligomerlerinin farklı moleküler ağırlık formları ile EPPS ve QSH peptidinin etkileşimleri, *in silico* olarak derin öğrenme tabanlı Boltz-2 programı kullanılarak modellenmiş (Passaro vd., 2025) ve PyMOL yazılımı ile görselleştirilerek analiz edilmiştir (DeLano, 2002). A β oligomerleri için Protein Data Bank (PDB) üzerinden 6RHY kodlu model kullanılmıştır. Farklı oligomerik durumları temsil eden modeller 6RHY modelinin tekrarlanması (4,5–45 kDa) analiz edilmiştir. Oluşturulan simülasyonlar oligomer-ligand-peptit stokiyometrisinin etkileşimlerini değerlendirmek için farklı kombinasyonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boltz-2 tarafından üretilen skorlar, bağlanma olasılığı ve etkileşim kararlılığına ilişkin göreceli bir ölçüt olarak değerlendirilmiştir; skorun artması (1'e yaklaşması) daha güçlü ve stabil bir etkileşimi temsil etmektedir. Boltz-2 sonuçlarından 4:4:4, 5:5:5, 6:6:6, 8:8:8, 10:5:5, 10:8:8 ve 10:10:0 stokiyometrik oranlarında A β :EPPS:QSH içeren modeller arasından önerilen en yüksek skorlu (en olası) olanları seçilerek yapıların detayları ve etkileşimleri analiz edilmiştir.

Hücre canlılığına yönelik elde edilen veriler, kombinasyon tedavisinin sinerjistik etkisini değerlendirmek amacıyla SynergyFinder web tabanlı analiz aracı kullanılarak analiz edilmiştir (Nguyen vd., 2024). EPPS ve NAC'nın birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi, Bliss bağımsızlık modeli ve Zipp additivite modeli temelinde değerlendirilmiş; kombinasyon etkisinin sinerjistik, antagonistik ya da aditif olup olmadığı bu modeller doğrultusunda belirlenmiştir. Veriler, doz-doz matris formatına dönüştürülerek sisteme yüklenmiş ve 3D yüzey haritaları ile görselleştirilmiştir.

3.2.2.6. *In vivo*'da nanopartiküllerin kan-beyin bariyerinden geçişi

Karakterizasyonları tamamlanan NAC-B6-QSH-NP'lerin beyne geçişlerinin ve amiloidleri hedeflediğinin gösterilmesi amacıyla *in vivo* uygulama yapılarak farelerden beyin kesitleri alınmış ve immünohistokimya analizi yapılmıştır. Bunun için Alzheimer ilişkili 5 mutasyona sahip (APP'deki İsveç (K670N/M671L), Florida (I716V) ve Londra (V717I) mutasyonları ve PSEN1'deki M146L ve L286V mutasyonları) 5XFAD transgenik fare modeli kullanılmıştır. Transgenik fareler The Jackson Laboratory (ABD)'den temin edilmiş ve Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'ne transfer edilmiştir ve deneyler burada gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneylerine ilişkin tüm uygulamalar, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.12.2021 tarih ve 2021/3-1 sayılı etik onayı dahilinde gerçekleştirilmiştir.

6 aylık farelere NAC yüklü B6-FITC/QSH nanopartikülü intraperitoneal (i.p) yöntemle 42 mg/kg olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Hayvanlar uygulama yapıldıktan 1 saat sonra sakrifiye edilmiş ve beyin dokuları çıkarılmıştır. Çıkarılan dokular önce kuru buz üzerinde dondurulmuş sonra -80°C'de saklanmıştır. Daha sonra bu dokulardan kriyotom kullanılarak koronal kesitler (40 µm) lam üzerine alınmıştır. -20°C'de saklanmıştır.

İmmünohistokimya uygulaması için -20°C'de saklanan kesitler çıkarılmış ve PBS (1X) ile yıkanmıştır. %4 paraformaldehit çözeltisi içerisinde, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek örnekler fikse edilmiştir. 15 dakikanın sonunda PBS (1X) ile yıkanmış ve %0,3 Triton X-100 çözeltisi içerisine alınarak oda sıcaklığında 15 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çalkalayıcıdan alınan örnekler %5 keçi serumu içeren blok çözelti içerisinde oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat bekletilmiştir. Sonra örnekler anti-amiloid oligomer antikoru (Abcam, ab126892) ile +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün örnekler %0.1 Triton X-100 çözeltisiyle yıkandıktan sonra keçi-anti-tavşan Alexa 647 (Elabscience) sekonder antikor ile karanlıkta, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İkincil anikor inkübasyonu sonrası PBS (1X) ile üç kez yıkanmıştır. Son aşamada Fluoroshield solüsyonu lam üzerine uygulanmış, lamel ile kapatılarak örnekler floresan mikroskop ile incelemeye hazır hale getirilmiştir; FITC (yeşil) ve Kırmızı 647 nm (kırmızı) filtreleri kullanılmıştır.

3.2.2.7. Oksidatif stres tayini

A β 42o toksisitesine maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan aktivite (TAS), RelAssay Diagnostics kitleri (Gaziantep, Türkiye) kullanılarak kolorimetrik yöntemle değerlendirilmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 2×10⁵ hücre/mL yoğunlukta ekilmiş ve 24 saat boyunca 10 μ M A β 42o ile inkübe edilerek toksisite indüklenmiştir. Ardından, 24 saat süreyle 10 mM serbest NAC, 0,01 mM EPPS ve 25 μ g/mL NAC-B6-QSH-NP uygulanmıştır.

İnkübasyonun ardından hücre medyumunu uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkayıp kazınarak toplanmıştır. Hücreler freeze-thaw yöntemi ile lizis edilip 2000 g'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantlar alınmıştır. TAS analizi, 660 nm dalga boyunda ABTS radikal solüsyonunun dekolorizasyonu prensibine dayanmıştır. Numunelere Reagent 1 ve Reagent 2 sırasıyla eklenmiş; A1 ve A2 absorbans değerleri ölçülmüştür. TAS kapasitesi, kit protokolüne göre aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{TAS (mmol Trolox Equiv./L)} = ((\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Örnek}) / (\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Standart}))$$

3.2.2.8. SOD aktivitesinin belirlenmesi

A β 42o ile oluşturulan amiloid toksisitesi sonucunda oksidatif stresin ortaya çıkışı ile artması beklenen süperoksit radikal seviyelerine karşı savunma mekanizması olan SOD enziminin aktivitesi değerlendirilmiştir. Deneysel analizlerde Elabscience SOD kolorimetrik aktivite kiti kullanılmıştır.

SH-SY5Y hücreleri 6 kuyucuklu mikropalakalara 2×10⁵ hücre/mL yoğunlukta ekilerek kültürlenmiş, 24 saat süreyle A β 42o uygulaması yapılarak toksisite modeli oluşturulmuştur. Ardından, serbest NAC, EPPS ve NAC-B6-QSH-NP ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Süre sonunda hücre medyumunu atılarak hücreler PBS içerisinde kazınarak toplanmış, dondur-çöz yöntemiyle lizise uğratılmıştır. Santrifüjleme (2000 g, 20 dk) sonrası süpernatantlar alınarak analizlerde kullanılmıştır.

Toplanan hücre süpernatantlarının protein içerikleri Bradford yöntemi ile belirlenmiş ve SOD aktivitesi protein miktarına normalize edilerek U/mgprotein birimiyle ifade edilmiştir. Kit protokolü doğrultusunda hazırlanan reaksiyon karışımları 37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edilmiş, inhibisyon oranı ve SOD aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.2.9. Sitokin seviyeleri tayini

Alzheimer hastalığı *in vitro* modelinde, inflamatuvar yanıtın değerlendirilmesi amacıyla SH-SY5Y hücrelerinde IL-1 β , IL-6 ve TNF- α sitokin düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler, 6 kuyucuklu plaklara 2 $\times$ 10⁵ hücre/mL yoğunlukta ekildikten sonra 24 saat boyunca 10 μ M A β 42o ile muamele edilerek amiloid oligomer toksisitesi oluşturulmuştur. Bunu takiben, serbest NAC (10 mM), NAC-B6-QSH-NP (25 μ g/mL), EPPS (0,01 mM) ve bu ajanların kombinasyonları uygulanarak hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda süpernatantlar toplanmış ve ELISA kitlerinin sağladığı protokole uygun şekilde 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa örnek veya standart solüsyon eklendikten sonra, antikor kokteyli ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Beş kez yıkama işleminden sonra, renk geliştirme çözeltileri eklenmiş ve plakalar karanlık ortamda 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon durdurma solüsyonu ile sonlandırılmış ve 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Ölçüm değerleri standart eğriye göre ng/L cinsinden hesaplanmış ve sonuçlar üçlü tekrarlar elde edilmiştir.

3.2.2.10. Mitokondriyal disfonksiyon analizi

A β 42o ile toksisite oluşturulmuş hücrelerde, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu değerlendirmek amacıyla JC-10 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Kiti (Abcam) kullanılmıştır. Bu amaçla SH-SY5Y hücreleri, siyah 96 kuyucuklu mikrolakalara 4 $\times$ 10⁵ hücre/mL yoğunluğunda ekilmiş ve 24 saat boyunca 10 μ M A β 42o ile muamele edilmiştir. Ardından, hücrelere EPPS, serbest NAC ve NAC-B6-QSH-NP tekli ve kombinasyonlar halinde uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamı uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır.

JC-10 boyası, kit protokolüne uygun olarak hazırlanmış (100X JC-10 ve Assay Buffer A karışımı ile 10X JC-10 solüsyonu elde edilmiştir) ve her kuyucuğa 50 μ L eklenerek %5 CO₂ ortamında 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kuyulara 50 μ L Assay Buffer B (Komponent C) ilave edilerek ölçüm öncesi protokol tamamlanmıştır. Florimetrik ölçümler multiplaka okuyucu (Biotek Cytation 5) kullanılarak iki farklı emisyon dalga boyunda (490/525 nm ve 540/590 nm) alınmıştır. 525 nm değerleri toksik

hücreleri, 590 nm değerleri ise sağlıklı hücreleri temsil etmektedir. Bu iki dalga boyuna ait ΔOD değerleri kullanılarak mitokondriyal disfonksiyon Formül 2 ile hesaplanmıştır:

$$\text{Mitokondriyal Disfonksiyon (\%)} = (\Delta OD_{490/525} / \Delta OD_{540/590}) \times 100$$

3.2.2.11. İstatistiksel analiz

Tüm deneysel verilerin istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism 10.4.2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ELISA, oksidatif stres belirteçleri, antioksidan aktivite ve hücre canlılığına ilişkin kantitatif ölçümlerde gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde One-way ANOVA testi uygulanmış, çoklu karşılaştırmalar Tukey post-hoc analizi ile yapılmıştır. EPPS ve NAC'ın sinerjik etkileşimleri SynergyFinder+ ile analiz edilmiştir.

Doz-cevap eğrilerinden EC_{50} değerlerinin hesaplanmasında ise dört parametrelili (4PL) non-lineer regresyon modeli kullanılmıştır. ELISA analizlerinde sitokin konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla oluşturulan standart eğriler yine 4PL modele göre fit edilerek, bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları bu eğriler üzerinden interpolasyon yöntemiyle hesaplanmıştır.

Tüm deneysel bulgular ortalama $\pm$ standart sapma (SS) şeklinde sunulmuş olup, $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir. Kullanılan istatistiksel testler ve anlamlılık düzeyleri, ilgili şekil açıklamalarında ayrıca belirtilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Analitik metot geliştirme, polimer sentezi ve nanopartikül hazırlama

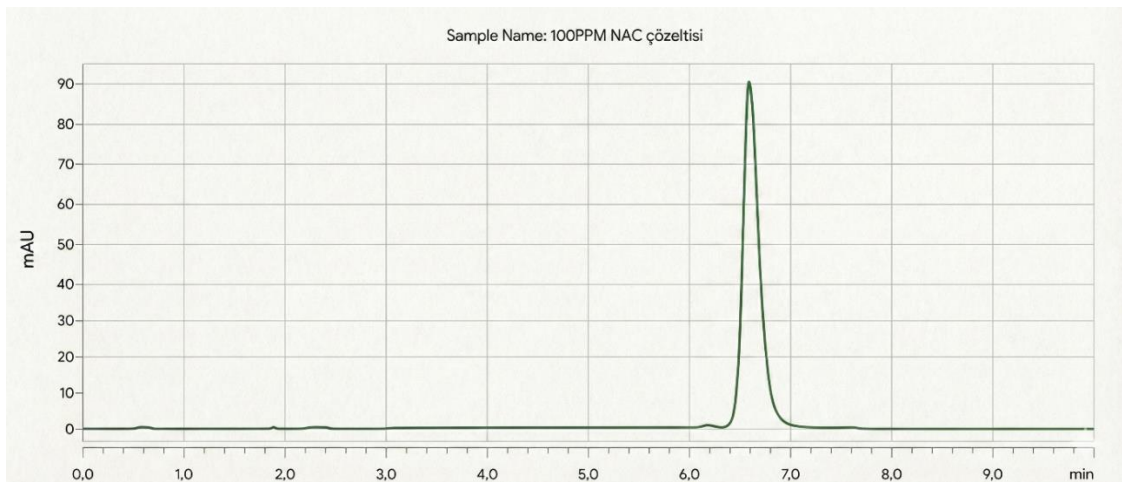
Bu bölümde, NAC'ın nicel analizine yönelik analitik yöntemin geliştirilmesi ve validasyonuna, sentezlenen polimerlere ve NAC yüklü nanopartikül sistemlerinin hazırlanması ile karakterizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Analitik yöntemin geçerliliği ortaya konulduktan sonra, sentezlenen polimerlerin yapısal özellikleri ve nanopartikül formülasyonlarının fizikokimyasal karakteristikleri değerlendirilmiştir.

4.1.1. NAC'ın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

NAC'ın tayinine yönelik geliştirilen Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemi, uluslararası validasyon kılavuzları doğrultusunda değerlendirilmiştir. Bu kapsamda sistem uygunluğu, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, özgünlük ve seçicilik ile algılama ve tayin sınırlarına ait bulgular incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemin NAC analizinde kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

4.1.1.1. Sistem uygunluk bulguları

NAC'ın HPLC yöntemine ait sistem uygunluğu değerlendirmesi, 500 ppm konsantrasyonundaki standart çözeltinin ardışık beş enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. 213nm'de yapılan ölçümden edilen kromatografik profil Şekil 9'da verilmiştir. NAC piki, tüm tekrar ölçümlerinde yaklaşık 6,9 dakikada tek ve belirgin bir pik olarak gözlenmiştir. Ayrıca alıkonma süresi ve pik alanı değerleri Tablo 3'te sunulmuştur.



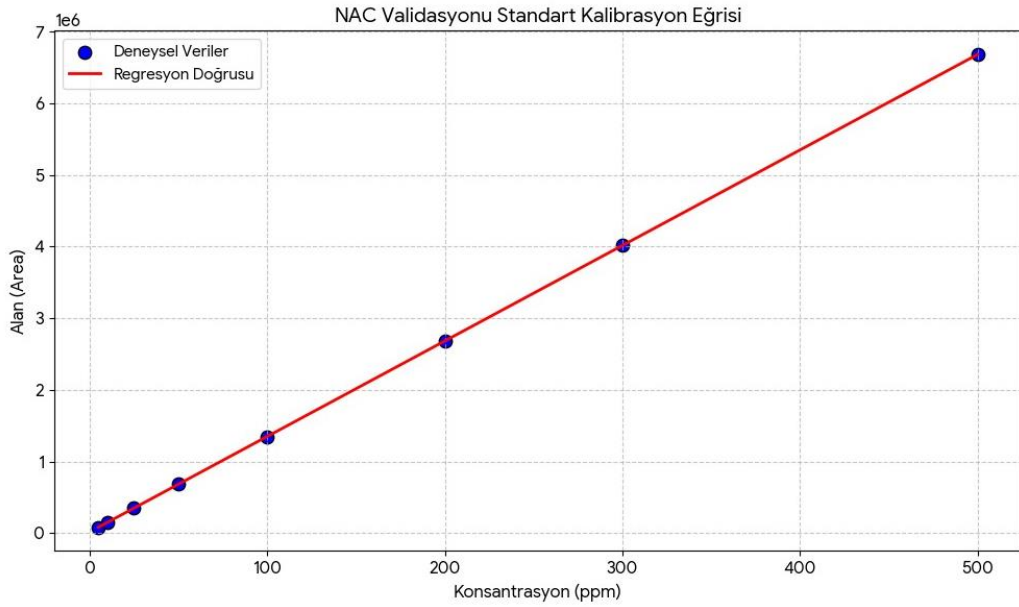
Şekil 9. NAC'a ait HPLC kromatogram görüntüsü.

Tablo 3. NAC'ın sistem uygunluk sonuçları.

Örnek Sayısı	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan
Ortalama	6,916	6627406
SS	0,122	15926,184
BSS (%)	1,759	0,240

4.1.1.2. NAC'ın doğrusallık bulguları

NAC'ın analitik yönteme ait doğrusallık değerlendirmesi, 5–500 ppm aralığındaki standart çözeltilerin üçer tekrarlı ölçümü ile yapılmıştır. Belirlenen konsantrasyon aralığında elde edilen pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve doğrusal regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait regresyon denklemi $y = 13327x + 16077$ olarak hesaplanmıştır. Doğrusallığın gücünü gösteren determinasyon katsayısı (R^2) 0,9999 bulunmuş olup, doğrusal ilişki Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. NAC'a ait kalibrasyon eğri grafiği.

4.1.1.3. NAC'ın doğruluk bulguları

NAC analiz yönteminin doğruluğu, 50, 200 ve 500 ppm derişimlerinde hazırlanan standart çözeltilerin dört tekrar ölçümü ile değerlendirilmiştir. Her bir konsantrasyon seviyesi için ölçülen ortalama konsantrasyon değerleri ve hesaplanan geri kazanım yüzdeleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. NAC'ın doğruluk parametresine ait bulgular.

Örnek Sayısı	Ölçülen Konsantrasyon			%Geri kazanım		
	50 ppm	200 ppm	500 ppm	50 ppm	200 ppm	500 ppm
Ortalama	50,463	198,860	492,867	100,926	99,430	98,574
SS	0,185	0,307	2,810	0,370	0,153	0,562
% BSS	0,366	0,154	0,570	0,366	0,154	0,570

4.1.1.4. NAC'ın kesinlik bulguları

Kesinlik değerlendirmesi, yöntem tekrarlanabilirliği ve tekrar elde edilebilirliği olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir (Tablo 5-6). Aynı gün içerisinde hazırlanan tekrarlanabilirlik dataları, 50 ppm NAC çözeltilerinin altı ardışık enjeksiyonuna ait çözeltilerle iki ayrı günde yapılan analizlerle değerlendirilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. NAC'a ait tekrar edilebilirlik çalışmasına ait bulgular.

Örnek Sayısı	1.Gün	2.Gün
	50 ppm	50 ppm
Ortalama	50,473	50,188
SS	0,189	0,317
% BSS	0,374	0,632

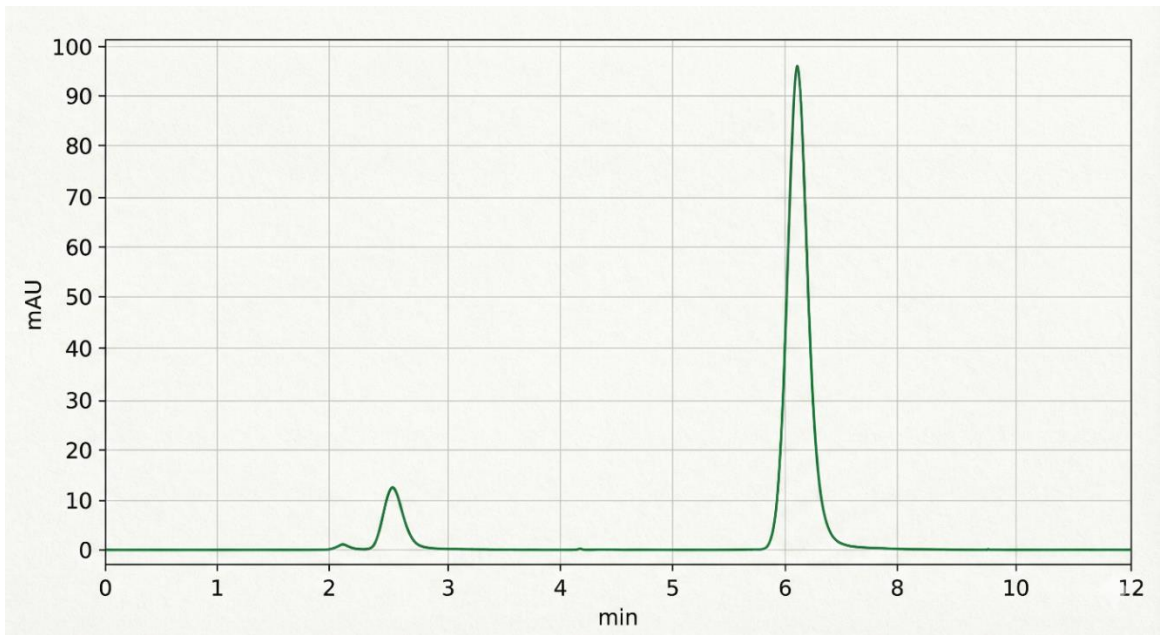
Yöntemin analistler arası kesinliği, iki farklı analist tarafından bağımsız şekilde hazırlanan ve analiz edilen 100 ppm NAC çözeltileriyle değerlendirilmiştir (Tablo 6). Deney altı tekrarlı çalışılmıştır.

Tablo 6. NAC’a ait tekrar elde edilebilirlik çalışmasına ait bulgular.

	1.Analist	2.Analist
Örnek Sayısı	100 ppm	100 ppm
Ortalama	102,012	102,009
SS	0,118	0,117
% BSS	0,116	0,115

4.1.1.5. NAC’ın Özgünlük ve seçicilik bulguları

Yöntemin özgünlük ve seçiciliği, NAC içermeyen boş nanopartikül formülasyonlarının ve NAC çözeltisinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Boş nanopartikül örneklerine ait kromatogramlarda NAC’ın karakteristik alıkonma süresi olan yaklaşık 6,7 dakika civarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. NAC stok çözeltisi ile boş nanopartikülün kromatografik profillerinin karşılaştırmalı gösterimi Şekil 11’de sunulmuştur.



Şekil 11. Boş nanopartikül ve NAC stok çözeltisinin 213 nm’de ölçülen kromatogram görüntüsü.

4.1.1.6. LOD ve LOQ bulguları

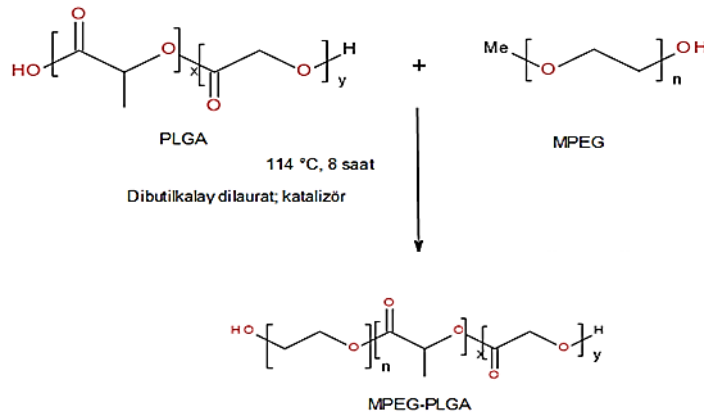
NAC analiz yönteminin duyarlılığı, 3.2.1.1.6’da belirtildiği denklemlerle hesaplanmış ve yöntem için LOD değeri 0,015 µg/mL, LOQ değeri ise 0,046 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Bu değerler, yöntemin düşük derişimlerde NAC tayinini gerçekleştirmeye uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

4.1.2. Sentezlenen polimerlere ait bulgular

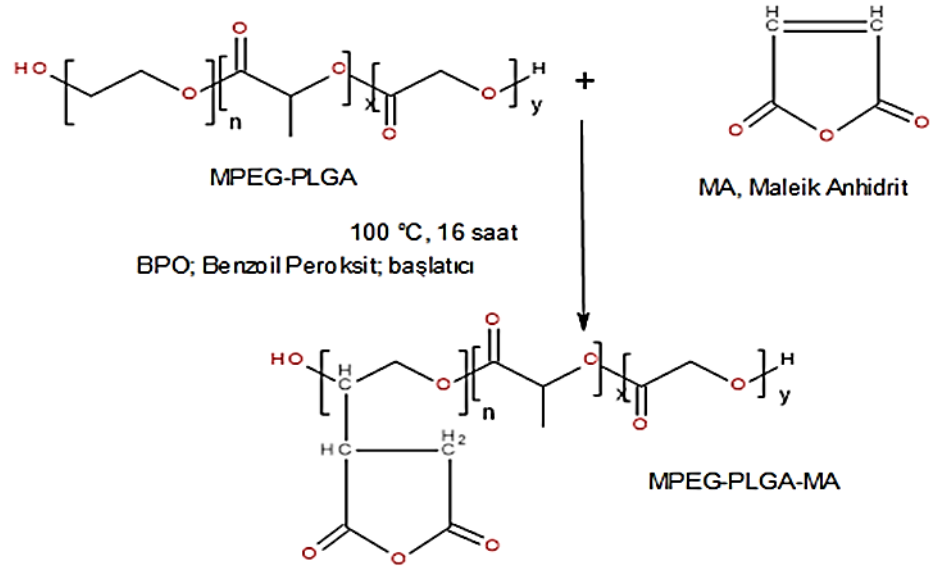
Bu çalışmada, nanopartikül üretimi ve peptid konjugasyonuna uygun fonksiyonel yapıda polimer elde etmek amacıyla mPEG-PLGA diblok kopolimeri, yüzey fonksiyonlandırma amacıyla mPEG-PLGA-MA ve amin fonksiyonelli konjugasyon ara ürünü olarak mPEG-PLGA-MA-NH₂ olmak üzere üç basamaklı bir modifikasyon gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak PLGA (RG502) ve mPEG-2000'in dibutylkalay dilaurat katalizi altında yürütülen reaksiyonu sonucunda mPEG-PLGA diblok kopolimeri elde edilmiştir. Reaksiyon sonrası tolüenin uzaklaştırılması ve polimerin DCM içinde çözündürülerek sulu faza ince akışla damlatılması ile polimer çöktürülmüş; santrifüj ve liyofilizasyon işlemleri sonunda ürün kuru pellet formunda izole edilmiştir. Elde edilen mPEG-PLGA polimeri, çalışmada nanopartikül çekirdeğinin temel yapısal bileşeni olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır (Şekil 12).



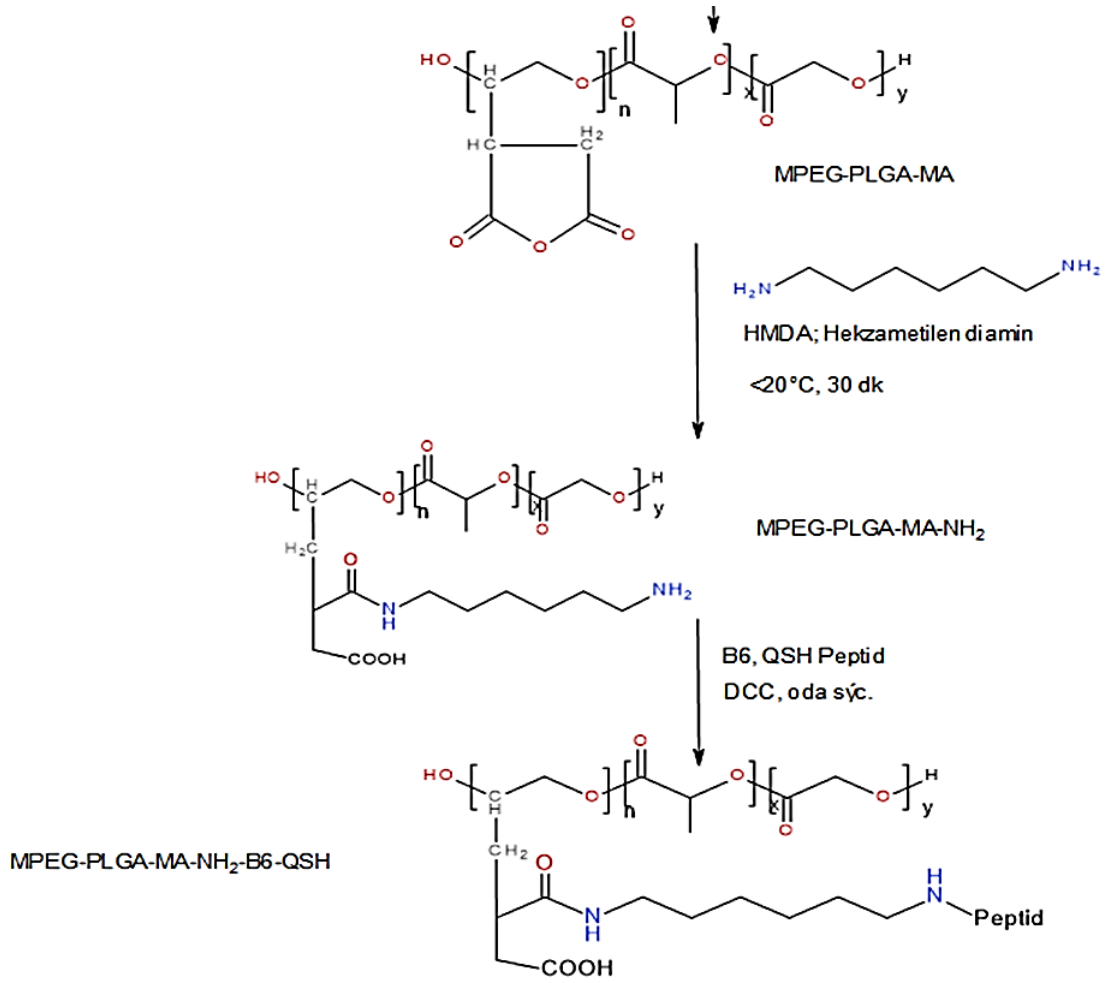
Şekil 12. mPEG-PLGA diblok kopolimerinin sentez şeması.

İkinci aşamada mPEG-PLGA'nın maleik anhidrit ile modifikasyonu sonucunda mPEG-PLGA-MA ürünü elde edilmiştir. DCM uzaklaştırıldıktan sonra azot atmosferi altında gerçekleştirilen 16 saatlik reaksiyonun ardından ürün sıcak su ile saflaştırılmış ve katı formda izole edilmiştir. Bu polimer türü, yüzeyine reaktif çift bağ içeren maleik anhidrit grubu kazandırılmış olup, amin içeren moleküllerin polimere bağlanabilmesi için gerekli ara ürün olarak kullanılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. mPEG-PLGA-MA polimerinin sentez şeması.

Son aşamada, mPEG-PLGA-MA polimerinin hekzametilendiamin (HMDA) ile reaksiyonu sonucunda primer amin fonksiyonelli mPEG-PLGA-MA-NH₂ elde edilmiştir. THF ortamında düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen reaksiyonun ardından ürün aşırı soğuk distile suda çöktürülmüş, santrifüj ile katı faz ayrılmış ve kurutularak nihai polimer toz formunda elde edilmiştir. Bu amin-fonksiyonlu polimer, çalışmada B6 veya QSH gibi hedefleme peptitlerinin EDAC aracılı konjugasyonu için gerekli reaktif uç gruplarını sağlaması amacıyla sentezlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimerinin sentez ve peptid bağlanma şeması.

4.1.3. NAC yüklü B6-QSH nanopartiküllerinin hazırlanması partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinin belirlenmesi

3.2.1.3'te belirtildiği üzere hazırlanan mPEG-PLGA-MA-NH₂ temelli nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri DLS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Farklı polimer:NAC oranlarında hazırlanan formülasyonlar, sıcak ve soğuk ortam koşullarının etkileri, pH düzenlemeleri ve peptit konjugasyonunun partikül özellikleri üzerindeki değişimleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sırayla sunulmuştur.

İlk aşamada 50:20 ve 40:20 polimer:NAC oranları kullanılarak hazırlanan nanopartiküller değerlendirilmiştir. Evaporasyon sonrası elde edilen nanopartiküllerin boyutları yüksek ölçülmüş ve her iki formülasyonun santrifüj sonrası yeniden disperse olmadığı

gözlenmiştir (Tablo 7). Bu nedenle ilk sentez denemeleri nanopartikül stabilitesi açısından uygun bulunmamış ve yeni bir optimizasyon adımına geçilmiştir.

Tablo 7. Farklı mPEG-PLGA-MA-NH₂:NAC nanopartiküllerine ait DLS verileri.

Evaporasyon sonrası (50:20)			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
mPEG-PLGA-MA-NH ₂	439,4 ± 20,30	0,180 ± 0,101	-22,0 ± 0,289
Santrifüj sonrası (50:20)			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
mPEG-PLGA-MA-NH ₂	REDİSPERSE OLMADI		
Evaporasyon sonrası (40:20)			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
mPEG-PLGA-MA-NH ₂	498,2 ± 42,04	0,349 ± 0,152	-22,0 ± 1,95
Santrifüj sonrası (40:20)			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
mPEG-PLGA-MA-NH ₂	REDİSPERSE OLMADI		

Kan beyin bariyerinden geçiş için ideal nanopartikül boyutunun <200 nm altında olması gerekliliği ve oda sıcaklığında hazırlanan nanopartikül boyutlarının yüksek çıkması sebebiyle formülasyonlar buz üzerinde soğuk ortamda hazırlanmıştır. Bu şartlarda hazırlanan nanopartiküllerin fiziksel özelliklerinde belirgin iyileşme görülmüştür (Tablo 8). Bu sonuçlara göre en düşük partikül boyutu ve en kararlı dispersiyonun 25:20 oranında elde edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle sonraki optimizasyonlar ve konjugasyon çalışmaları 25:20 oranındaki formülasyon üzerinden yürütülmüştür.

Tablo 8. mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimeri ile soğuk ortamda hazırlanan nanopartiküllerine ait veriler.

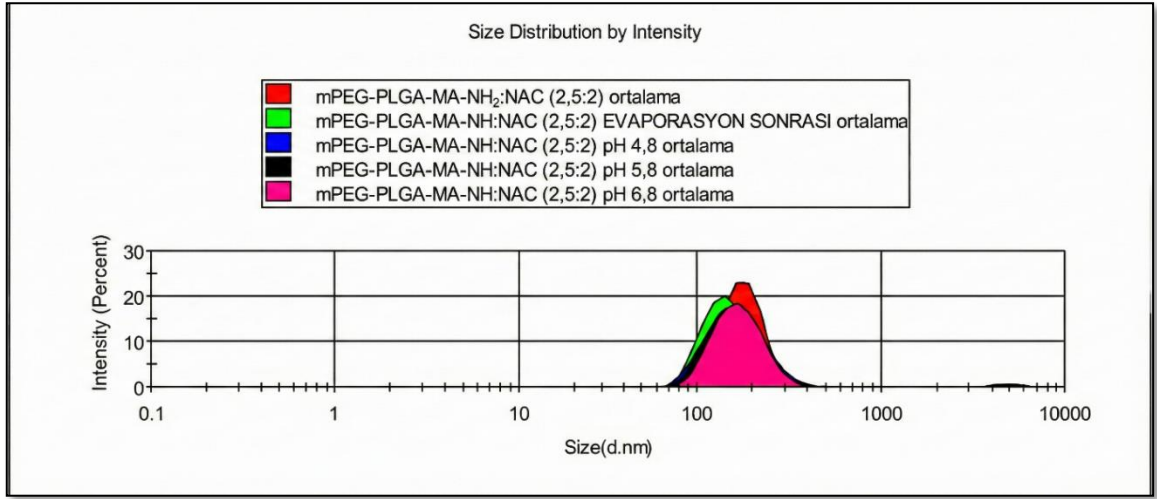
mPEG-PLGA-MA-NH₂ Soğuk Ortam			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
50:20	242,6 ± 21,47	0,589 ± 0,356	-32,4 ± 1,44
Boş NP	184,6 ± 1,253	0,316 ± 0,385	-38,4 ± 1,25

Form.	PS (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
40:20	572,7 $\pm$ 83,03	0,330 $\pm$ 0,163	-20,2 $\pm$ 0,889
Boş NP	173,6 $\pm$ 2,517	0,119 $\pm$ 0,074	-44,5 $\pm$ 1,59
Form.	PS (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
25:20	158,7 $\pm$ 3,066	0,143 $\pm$ 0,049	-34,8 $\pm$ 1,50
Boş NP	72,89 $\pm$ 0,1778	0,154 $\pm$ 0,004	-30,2 $\pm$ 1,37

Seçilen 25:20 formülasyonunun üzerinde pH düzenlemesinin partikül özellikleri incelenmiş ve sonuçlar Tablo 9'da sunulmuştur. Başlangıç pH'sı 3,0–3,5 aralığından santrifüj sonrası 4,6 seviyesine yükselmiştir. Bu bulgular pH artışının yüzey yükünü belirgin şekilde etkilediğini, ancak partikül boyutunda büyük bir değişim oluşturmadığını göstermektedir. NAC yüklü nanopartiküller için son çalışma pH'ı 6,8 olarak belirlenmiştir. pH etkisini gösteren DLS dağılım eğrileri Şekil 15'de verilmiştir.

Tablo 9. mPEG-PLGA-MA-NH₂ Nanopartiküllerine ait karakterizasyon verileri.

25 mg mPEG-PLGA-NH ₂ :20 mg NAC			
Form.	PS (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
Başlangıç	168,8 $\pm$ 4,637	0,085 $\pm$ 0,060	-15,1 $\pm$ 0,252
Evaporasyon sonrası	140,2 $\pm$ 2,042	0,092 $\pm$ 0,068	-15,0 $\pm$ 0,557
pH 4,8	155,8 $\pm$ 3,139	0,168 $\pm$ 0,022	-28,4 $\pm$ 0,379
pH 5,8	154,1 $\pm$ 3,694	0,128 $\pm$ 0,041	-33,5 $\pm$ 0,896
pH 6,8	157,9 $\pm$ 2,761	0,088 $\pm$ 0,041	-36,7 $\pm$ 0,819



Şekil 15. mPEG-PLGA-MA-NH₂ NAC yüklü nanopartiküllerin pH'a bağlı olarak partikül boyutu görüntüsü.

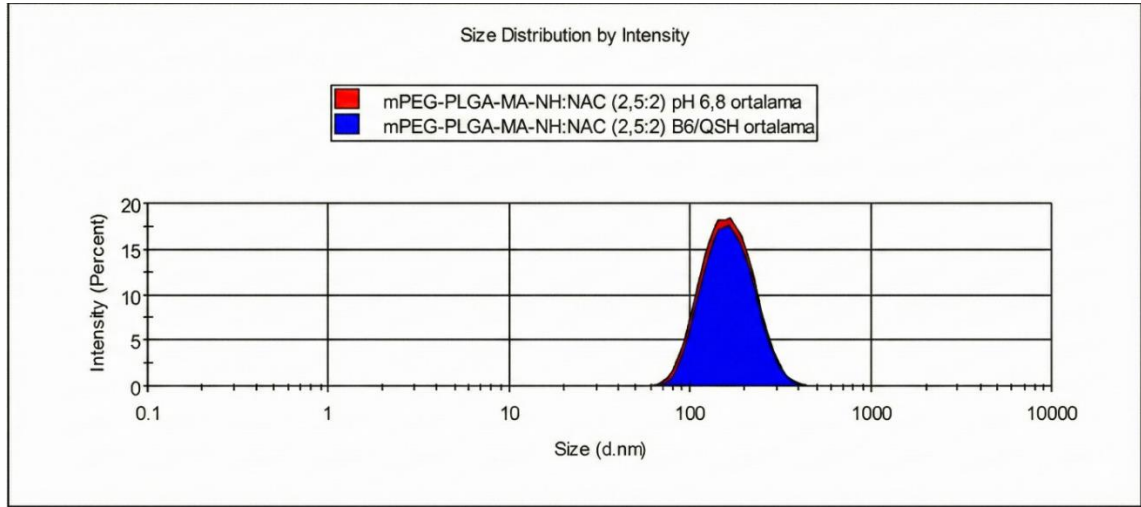
mPEG-PLGA-MA-NH₂ nanopartiküllerine B6, B6-FITC ve QSH peptitlerinin bağlanması sonrası partikül özellikleri değerlendirilmiştir (Tablo 10). Bu veriler, peptit konjugasyonunun nanopartiküllerin partikül boyutunda büyük bir artışa yol açmadığını, tüm formülasyonlarda boyutun kabul edilebilir aralıkta kaldığını göstermektedir. Konjugasyon sonrası zeta potansiyelinde hafif bir düşüş gözlenmiş olup bu durum yüzeydeki amin fonksiyonel gruplarının kısmi tüketimi ile uyumludur. Peptit konjugasyonu sonrası DLS dağılım grafikleri Şekil 16'da sunulmuştur.

Ayrıca; DLS analizlerinde partikül boyutu ve yüzey özellikleri bakımından en uygun profili sergileyen formülasyonların yükleme performanslarını değerlendirmek amacıyla enkapsülasyon etkinliği çalışmalarının bulguları Bölüm 4.1.4.6'da sunulmuştur.

Tablo 10. Peptit bağlı mPEG-PLGA-MA-NH₂ Nanopartiküllerine ait karakterizasyon verileri.

B6 /QSH Bağlı Nanopartiküller			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
Başlangıç boş	72,89 ± 0,1778	0,154 ± 0,004	-30,2 ± 1,37
B6/QSH	94,20 ± 2,163	0,245 ± 0,015	-28,9 ± 2,32
B6 /QSH Bağlı Nanopartiküller			
Form.	PS (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS

Başlangıç NAC (pH 6,8)	$157,9 \pm 2,761$	$0,088 \pm 0,041$	$-36,7 \pm 0,819$
B6/QSH	$154,9 \pm 2,425$	$0,127 \pm 0,016$	$-33,1 \pm 0,954$



Şekil 16. mPEG-PLGA-MA-NH₂ NAC yüklü nanopartikülerine B6 ve QSH peptitlerinin bağlanmasından sonra partikül boyutu görüntüsü.

Nanopartiküllerin hücre sel alım çalışmalarında izlenebilmesi amacıyla FITC yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. FITC ölçümleri UV-Vis spektrofotometrisi ile gerçekleştirilmiş olup, konsantrasyon hesaplamaları 0–200 ppm aralığında hazırlanan FITC standart çözeltilerinden oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi doğrusal bir ilişki göstermiş, regresyon denklemi $y = 0,0008x + 0,0022$ ve determinasyon katsayısı $R^2 = 0,9995$ olarak hesaplanmıştır. Bu doğrusal ilişki, FITC yükleme miktarının güvenilir bir şekilde hesaplanmasına olanak sağlamıştır.

4.1.4. Polimer ve nanopartiküllerin karakterizasyonlarına ait bulgular

4.1.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Sentezlenen polimer yapıların FT-IR spektrumları incelendiğinde, fonksiyonel gruplardaki değişimleri doğrulayan belirgin pik kaymaları ve yeni bant oluşumları gözlenmiştir (Şekil 17-20; Tablo 11). Ham PLGA spektrumunda 3518 cm⁻¹'de O-H gerilmesine, 2999 ve 2956 cm⁻¹'de CH₂/CH₃ gerilme titreşimlerine ve 1759 cm⁻¹'de karakteristik ester karbonil bandına rastlanmıştır. Ayrıca 1454, 1425 ve 1394 cm⁻¹'de C-H bükülmeleri ile 1172–1091 cm⁻¹ aralığında C-O gerilme titreşimleri, 960–869 cm⁻¹ arasında ise PLGA'ya özgü bantlar görülmüştür (Şekil 17). mPEG-PLGA diblok

kopolimerine geçişle birlikte 3444 cm^{-1} 'de geniş OH bandı ortaya ıkmiş, 2921 ve 2852 cm^{-1} 'de mPEG zincirine özgü metilen gerilme titreşimleri belirginleşmiş ve 1129–1093 cm^{-1} aralığında mPEG'e özgü eter bağlarının intensitesinde artış gözlenmiştir. Bunun yanında 954, 891, 868 ve 849 cm^{-1} 'de PEG kristal yapısına ait yeni deformasyon titreşimleri belirterek mPEG'in PLGA yapısına başarıyla bağlandığını göstermiştir (şekil 18).

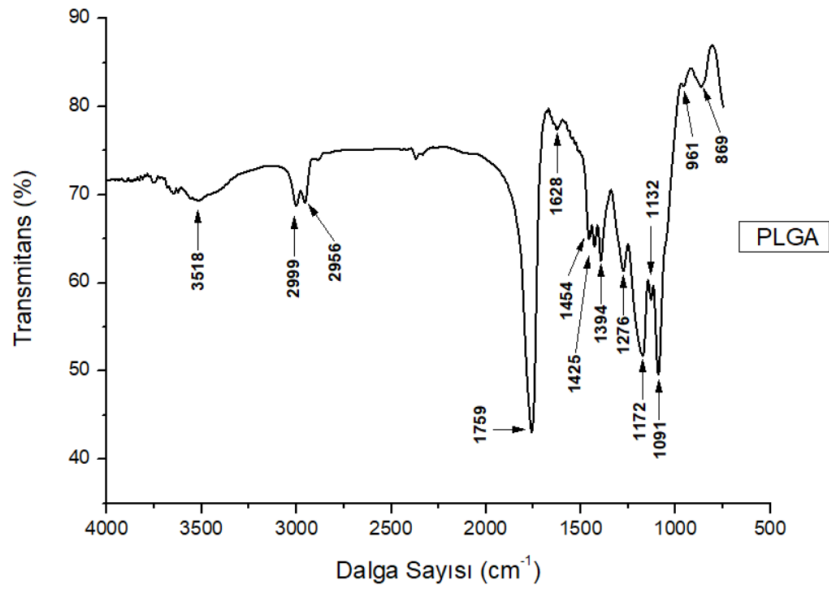
Maleik anhidrit ile modifiye edilen mPEG-PLGA-MA spektrumunda 3440 cm^{-1} civarında O–H bandının daraldığı, 2998–2929–2855 cm^{-1} aralığındaki C–H gerilme titreşimlerinin konumlarını koruduğu ve 1759 cm^{-1} 'de ester karbonil bandının şiddetinin arttığı grlmştir. MA'nın varlığını destekleyen 1629 cm^{-1} bandı anhidrit halkasına özgü titreşimlere işaret ederken; 1454–1425–1390 cm^{-1} 'deki C–H bükülme titreşimleri ile 1183–1094 cm^{-1} aralığındaki ester/eter bantları mPEG-PLGA yapısıyla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca 954, 885, 868 ve 843 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar MPEG kristal yapısının korunduğunu göstermektedir.

Aminasyon basamağıyla elde edilen mPEG-PLGA-MA-NH₂ spektrumunda 3448 cm^{-1} 'de primer amin gruplarına özgü keskin N–H gerilme bandı belirirken, 2997–2923–2853 cm^{-1} 'deki C–H bantlarının korunması polimer omurgasının devam ettiğini göstermiştir. Bu aşamada 1673 cm^{-1} ile 1588, 1539 ve 1520 cm^{-1} 'de ortaya çıkan bantlar, MA halkasının açılarak amin gruplarının polimere bağlandığını destekleyen amid bölgesine (zellikle Amide II) karşılık gelmiştir. Bunun yanında 1454–1424–1387 cm^{-1} 'de C–H bükülmeleri ve 1182–1129–1094 cm^{-1} 'de C–O gerilme titreşimleri korunmuş; 898 ve 830 cm^{-1} 'de gözlenen N–H düzlem dışı titreşimleri aminasyonun gerçekleştiğini desteklemiştir (şekil 19).

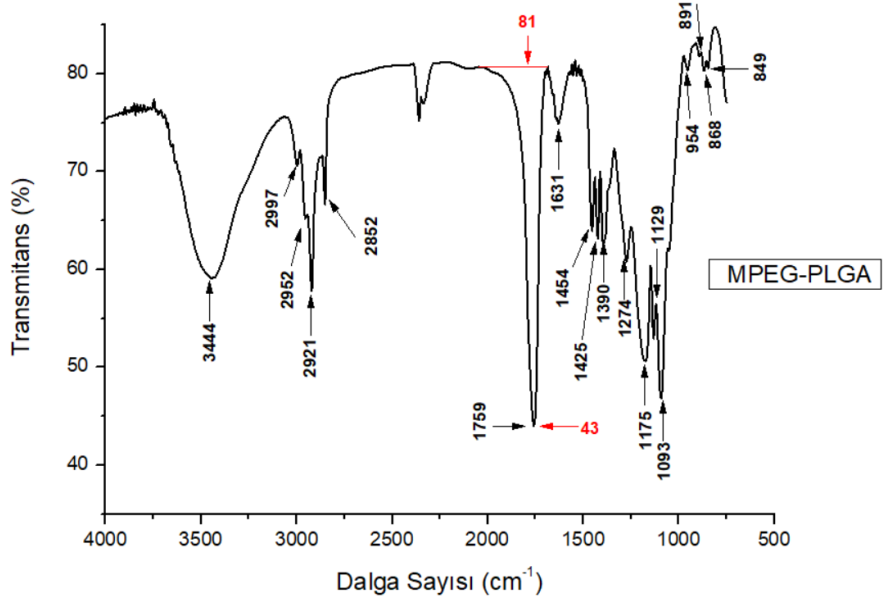
Hazırlanan nanopartiküllere eklenen peptitlerin konjugasyonu sonrası elde edilen mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH spektrumunda ise polimere özgü bantlara ek olarak peptit yapısından kaynaklanan yeni ve karakteristik sinyaller gözlenmiştir. 3730 cm^{-1} 'de peptitlerdeki NH/OH gruplarına ait gerilme titreşimleri belirirken, 3430 cm^{-1} 'deki bant peptitlerin COOH grupları ile polimerin NH₂ fonksiyonlarının reaksiyonu sonucunda bant genişliğinde daralma meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca 3004 cm^{-1} 'de Lisin NH₃⁺ gruplarına ait asimetric gerilme titreşimi ilk kez görülmüş; 2884–2858–2952 cm^{-1} bantları Histidin ve Prolin yan zincirlerindeki CH₂ titreşimleri ile ilişkili olarak intensite kazanmıştır. Amide II bölgesinde 1569, 1550, 1535 ve 1517 cm^{-1} bantları belirgin şekilde

artmış ve genişlemiştir. Peptit varlığını doğrulayan 950–916 cm^{-1} 'de karboksilik asit OH deformasyon pikleri, 812 cm^{-1} 'de Histidine özgül aromatik deformasyon bandı ile 861–793–775 cm^{-1} 'de sistein kaynaklı C–S gerilme titreşimleri yalnızca konjugeli yapıda gözlenmiştir. Bu yeni bantlar, peptitlerin polimere kovalent olarak bağlandığını güçlü şekilde desteklemektedir (Şekil 20).

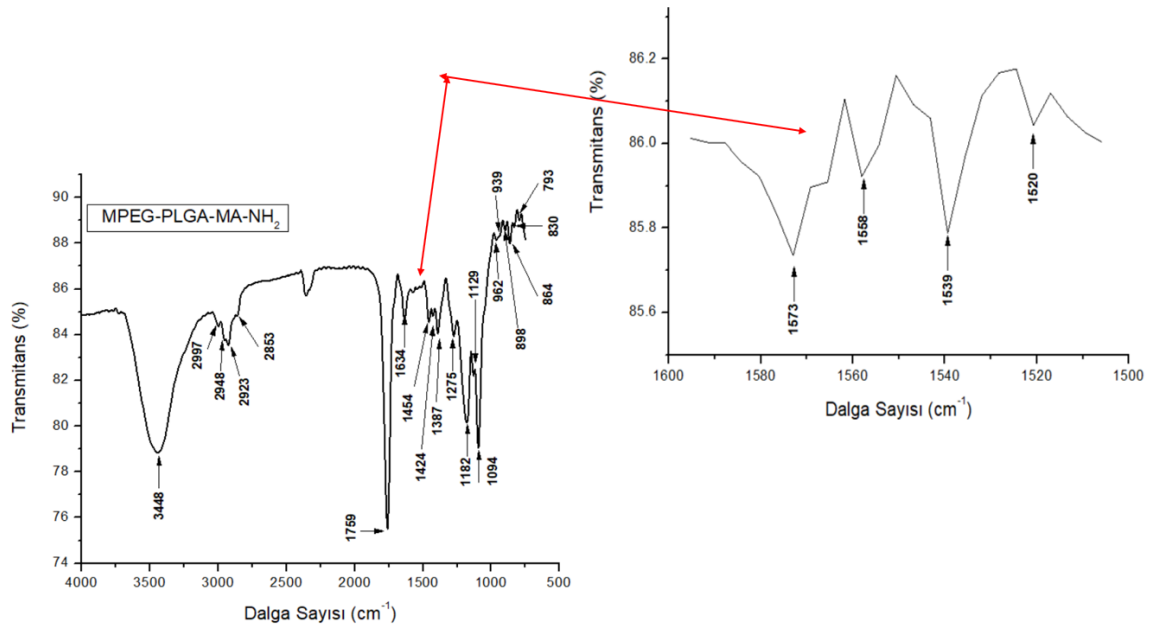
Genel olarak FT-IR analizi, sentezlenen tüm polimer yapılarında PLGA temel omurgasının korunduğunu, mPEG bağlanmasının PEG'e özgül eter ve metilen bantlarıyla doğrulandığını, MA modifikasyonunun anhidrit ve C=C bantlarıyla teyit edildiğini, aminasyonun Amide II bantlarıyla ortaya çıktığını ve peptit konjugasyonunun yalnızca peptit yapılarında görülen karakteristik NH, OH, aromatik halka ve C–S bantlarının belirginleşmesiyle başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. Bu bulgular sentezin her basamağının FT-IR düzeyinde doğrulandığını ortaya koymaktadır.



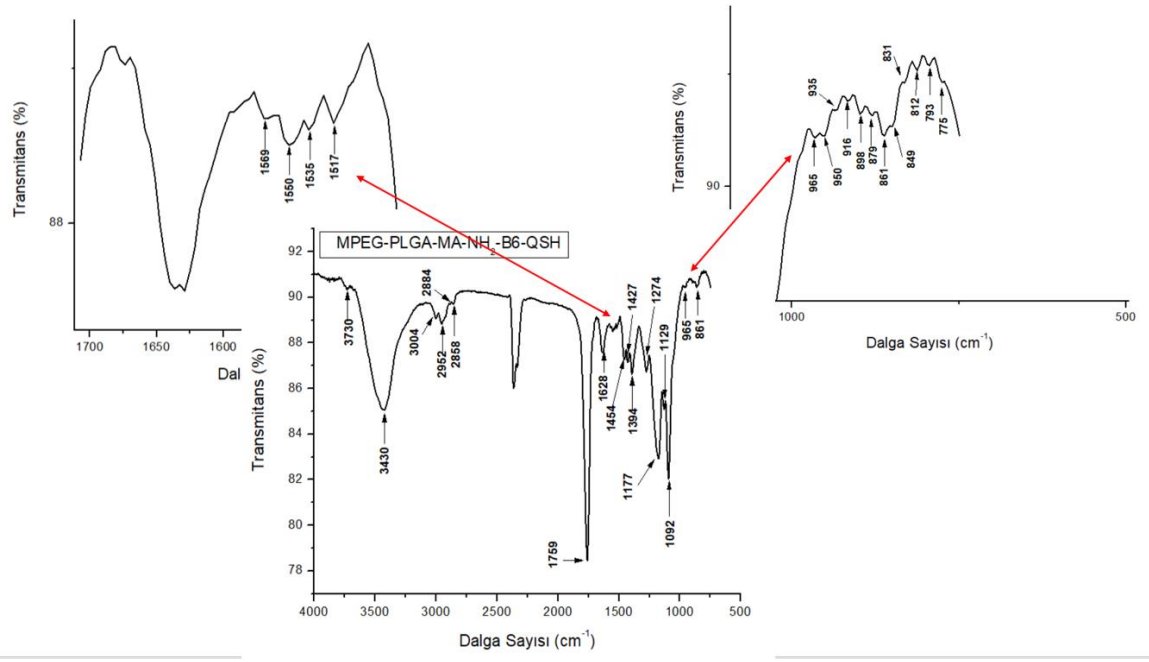
Şekil 17. PLGA ürününe ait FTIR grafiği.



Şekil 18. MPEG-PLGA ürününe ait FTIR grafiği.



Şekil 19. MPEG-PLGA-MA-NH₂ ürününe ait FTIR grafiği.



Şekil 20. MPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH ürününe ait FTIR grafiği.

Tablo 11. Sentezlenen polimer yapıların FT-IR bantları ve ilgili fonksiyonel grup değişimleri.

Dalga sayısı cm^{-1}	Açıklama	PLGA	MPEG-PLGA	MPEG-PLGA-MA-NH ₂	MPEG-PLGA-MA-NH ₂ -B6-QSH
3730	Peptid yapısında yer alan aminoasitlere ait -NH ve OH gruplarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır	Yok	Yok	Yok	Var
3600-3200	Yapıdaki serbest veya bağlı (moleküllerarası) OH gruplarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır.	Maks 3518	Maks 3444	Max 3448 Yapıya katılan NH ₂ gruplarının simetrik ve asimetrik titreşimleri dolayısıyla daha keskin pik olarak görülmektedir	Maks 3430 PLGA-PEG-MA-NH ₂ yapısında yer alan primer gruplarının Peptid yapısında yer alan COOH grupları ile reaksiyonu neticesinde pik boyunda kısalma ve daralma bulunmaktadır
3004	Peptid yapısında yer alan Lisin aminoasit yapısında bulunan NH ₃ ⁺ gruplarına ait asimetrik gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır	Yok	Yok	Yok	Var
3000 – 2800	CH, CH ₃ ve CH ₂ fonksiyonel grup gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır.	Maks 2999 Maks 2956	Maks 2997 Maks 2952	Maks 2997 Maks 2948	Yok
3000 – 2800	Metoksi gruplarında yer alan CH ₃ ve MPEG yapısında yer alan CH ₂ fonksiyonel gruplardan ileri gelen gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır	Yok	Maks 2921 Maks 2852	Maks 2923 Maks 2853 Maks 2997 Maks 2948	Maks 2884 Maks 2858 Maks 2952 Peptid yapısında bulunan Histidin, prolin amino asitlerinde yer alan aromatik halka yapılarında yer alan -CH ₂ gruplarına ait gerilme titreşimleri ile girişimli olarak bulunmaktadır
1759	C=O bağlarının gerilme titreşiminden ileri gelen	Var	Var	Var	Var
1570-1515	N-H deformasyonu ve C-N gerilme titreşimlerinin kombinasyonundan ileri gelen	Yok	Yok	Var Maks 1573 Maks 1558 Maks 1539 Maks 1520	Var Maks 1569 Maks 1550 Maks 1535

					Maks 1517 Özellikle peptid yapısından ileri gelen Amide II bandına ait NH gruplarından ileri gelen 1550 cm ⁻¹ deki pikin geniş bir pik şeklinde ortaya çıktığı görülmektedir.
1500-1350	CO bağının bükülme titreşiminden ileri gelen;	Maks 1454 Maks 1425 Maks 1394	Maks 1454 Maks 1425 Maks 1390 Daha keskin pikler oluşmuştur	Maks 1454 Maks 1424 Maks 1387	Maks 1454 Maks 1427 Maks 1394
1190-1060	MPEG yapısındaki CH ₂ -O-CH ₂ gruplarında yer alan CO bağının gerilme titreşimine ait pikleri ile PLGA üzerinde yer alan CO bağlarından ileri gelen gerilme titreşimleri ile girişimli olarak bulunması	Maks 1172 Maks 1132 Maks 1091	Maks 1175 Maks 1129 Maks 1093	Maks 1182 Maks 1129 Maks 1094	Maks 1177 Maks 1129 Maks 1092
960-840	MPEG in kristal yapısından ileri gelen gerilme titreşimlerinin yeni geniş, küçük Absorpsiyon piklerinin varlığı PLGA yapısında yer alan CH bağlarından ileri gelen gerilme titreşimleri	Maks 961 Maks 869	Maks 954 Maks 891 Maks 868 Maks 849	Maks 962 Maks 898 Maks 830	Maks 965 Maks 898 Maks 831
950-700	NH düzlem dışı bükülme titreşimi, CH ₂ bükülme titreşimi (CH ₂ ≥ 6 düzlem içi bükülme titreşimi)	Yok	Yok	Var Maks 940 Maks 830	Maks 935 Maks 831
950-900	Peptid yapılarından ileri gelen karboksilik asid gruplarında yer alan OH ⁻ gruplarına ait düzlem dışı asimetrik deformasyon titreşimi	Yok	Yok	Yok	Var Maks 950 Maks 916
850-800	Düzlem dışı aromatik =C-H gruplarına ait deformasyon titreşimi	Yok	Yok	Yok	Var Maks 812 Histidin yapısına ait
860-750	Sistein molekülünde yer alan C-S gruplarına ait gerilme titreşiminden ileri gelen	Yok	Yok	Yok	Var Maks 861 Maks 793 Maks 775

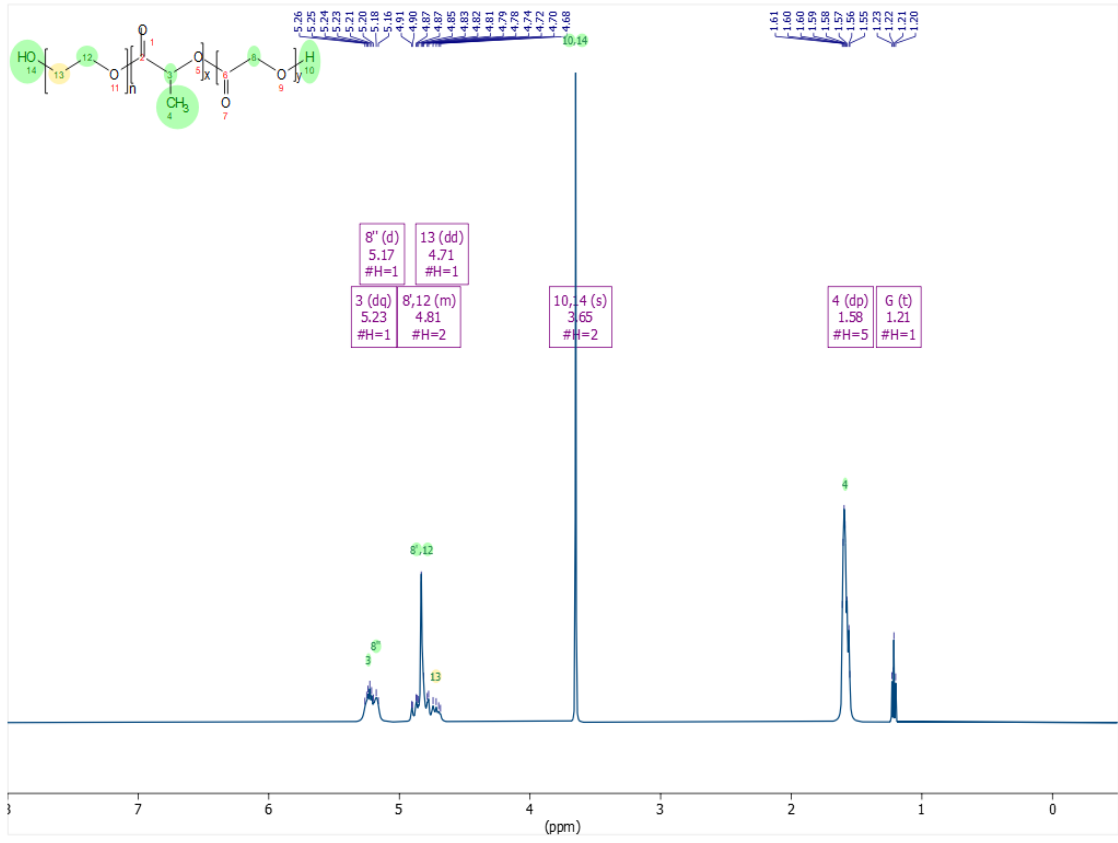
4.1.4.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi

Sentez adımlarının her birinin doğrulanması amacıyla mPEG-PLGA ve mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH nanopartikülüne ait ¹H-NMR spektrumları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, polimerin her modifikasyon basamağında beklenen kimyasal kaymaların ortaya çıktığını ve yapı değişimlerinin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 21-22).

mPEG eklenmiş mPEG-PLGA yapısında ise PEG zincirine ait karakteristik –CH₂–CH₂–O– gruplarının yoğun sinyali 3.5–3.7 ppm bölgesinde belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. PLGA polimerine ait spektrumda, tipik olarak –CH (metin) protonu 5.17 ppm civarında, –CH₂ (metilen) grubu 4.81 ppm ve –CH₃ grubu 1.58 ppm civarında gözlenmiştir. Bu sinyaller PLGA yapısının temel omurgasını doğrulamaktadır. PEG'e özgü 3.63 ppm civarındaki geniş pik, blok kopolimer oluşumunu göstermektedir. PEG zincirinin varlığı, spektrumda baskın bir sinyal alanı oluşturarak PLGA protonlarının şiddetlerini nispeten azaltmıştır (Şekil 21).

Son aşama olan peptit konjugasyonunda elde edilen mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH yapısına ait NMR spektrumunda polimer ve peptit kaynaklı sinyallerin üst üste binmesi nedeniyle spektrum daha kompleks hale gelmiştir. Spektrumda PEG-PLGA omurgasına ait karakteristik sinyaller korunmuştur: 5.23 ppm civarındaki pik PLGA'nın laktid birimine ait –CH protonu ile uyumlu bulunurken, 4.84–4.83–4.80–4.77–4.70 ppm aralığındaki sinyaller PLGA'nın oksijen komşuluğundaki protonlarına (özellikle glikolid –CH₂/ester çevresi protonları) karşılık gelmektedir. Ayrıca 3.65 ppm civarında görülen pik PEG zincirlerinin –CH₂– protonlarının tipik sinyali olup, 3.75 ve 3.43 ppm civarındaki sinyaller de PEG/ester çevresi proton katkılarıyla uyumludur.

Peptit konjugasyonuna işaret eden yeni katkılar özellikle 0.85–0.89 ppm ve 1.22–1.26 ppm civarında belirginleşen alifatik sinyallerle desteklenmiştir. Bu bölgelerdeki sinyaller, B6 ve QSH dizilerinde bulunan alifatik aminoasit yan zincirlerine karşılık gelebilecek niteliktedir. Ek olarak 1.86 ppm civarındaki sinyal, peptit/bağlayıcı kaynaklı alifatik proton katkılarının artmasıyla ilişkilendirilebilir (Şekil 22).



Şekil 21. MPEG-PLGA ürününe ait HNMR grafiği ve değerlendirmesi.

4.1.4.3. Jel geçirgenlik kromatografisi / boyutlarına göre ayırma

GPC analizleri polimer zincir uzunluğundaki değişimleri ortaya koymuştur (Tablo 12). Saf PLGA'nın Mn ve Mw değerleri sırasıyla 8.9 ve 10.6 kDa olup PDI değeri 1.18 olarak ölçülmüştür. mPEG-PLGA-MA-NH₂ yapısında Mn'nin 8.2 kDa, Mw'nin 8.4 kDa olarak hafifçe azalması MA ve aminasyon reaksiyonlarının kontrollü şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Peptit konjugasyonu sonrası Mn ve Mw değerleri sırasıyla 8.9 ve 9.8 kDa'ya yükselmiş; PDI'nin 1.112 olması zincir yapısının düzenli kaldığını, reaksiyonun aşırı dallanma veya çapraz bağlanmaya yol açmadığını göstermiştir. Üç yapıya ait kromatogramların aynı bölgede elüsyon göstermesi, ancak pik simetrisi ve genişliğinin peptit bağlanmasıyla değişmesi, konjugasyonun moleküler ağırlığı artıran kontrollü bir modifikasyon olduğunu desteklemektedir.

Tablo 12. PLGA, MPEG-PLGA-MA-NH₂ ve MPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH ürünlerine ait karşılaştırmalı GPC molekül ağırlığı tayini.

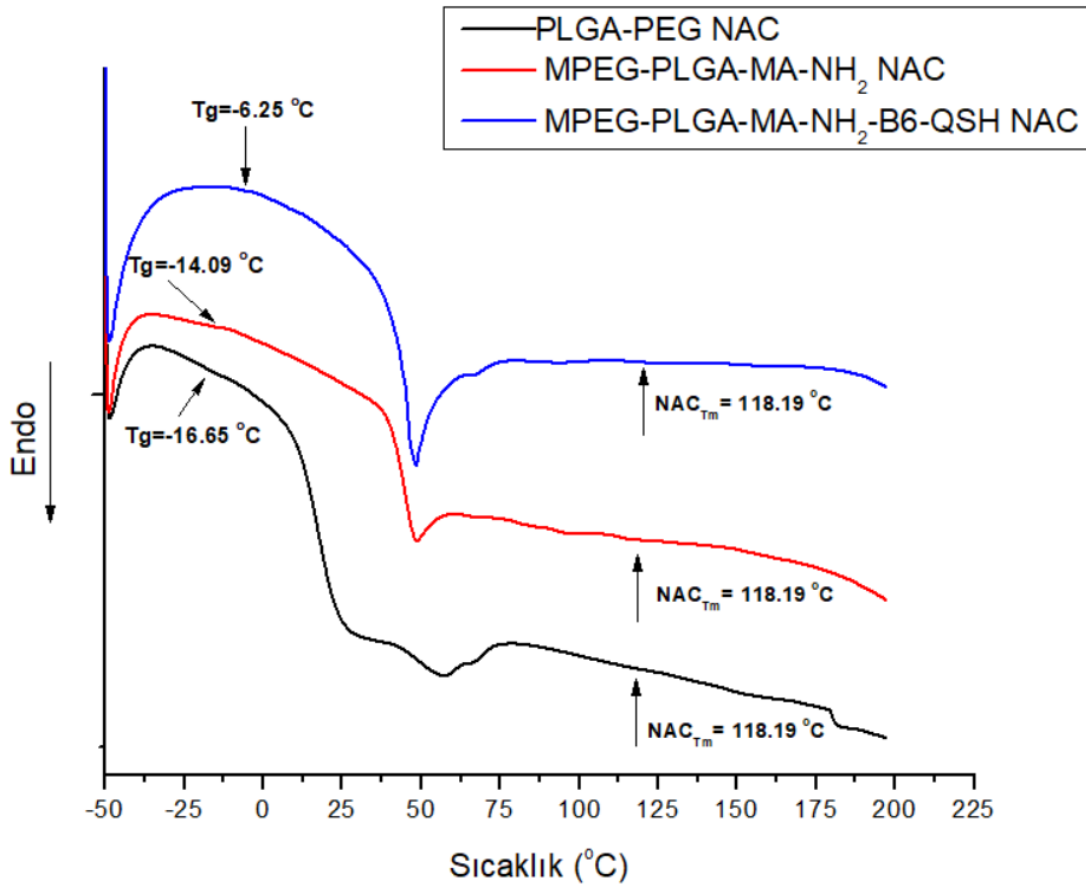
	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PDI (Mw/Mn)
MPEG-PLGA-MA-NH₂	8.2	8.4	1.021
MPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH	8.9	9.8	1.112

4.1.4.4. Diferansiyel taramalı kalorimetri

Farklı polimerik yapıların termal özelliklerini incelemek amacıyla gerçekleştirilen DSC analizlerinde, her üç nanoformülasyona ait cam geçiş sıcaklıklarının (T_g) belirgin şekilde farklılaştığı görülmüştür (Şekil 23). PLGA-PEG/NAC formülasyonunda T_g değeri –16.65 °C olarak ölçülürken, MA ile fonksiyonlandırılmış MPEG-PLGA-MA-NH₂/NAC yapısında T_g değeri –14.09 °C'ye yükselmiştir. En yüksek T_g değeri ise peptit konjugasyonu sonrasında elde edilen MPEG-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH/NAC formülasyonunda –6.25 °C olarak belirlenmiştir. Bu artış, polimer zincirindeki fonksiyonel grupların ve peptit yapılarının hareketliliği kısıtlaması sonucu zincir segmental mobilitesinin azalmasıyla ilişkilendirilmektedir. Böylece polimer yapısındaki her bir kimyasal modifikasyonun termal davranışı doğrudan etkilediği görülmektedir.

Tüm DSC eğrilerinde NAC'a özgü kristal erime endodermik pikinin ($T_m \approx 118.19^\circ\text{C}$) gözlenmemesi, aktif maddenin nanoformülasyon içerisine tamamen amorf formda dağıldığını ve kristal yapısının polimer matris içinde kaybolduğunu göstermektedir. Bu bulgu, NAC'ın polimer matrisi içerisinde homojen şekilde enkapsüle edildiğini, serbest kristal NAC partiküllerinin ise bulunmadığını güçlü biçimde desteklemektedir. Ayrıca NAC erime piki gözlenmemesi, polimer–ilaç etkileşimlerinin güçlü olduğunu ve yükleme sırasında moleküler düzeyde dağılımın sağlandığını göstermesi açısından önemlidir.

Polimer yapısındaki fonksiyonlandırma ve peptit konjugasyonunun termal geçiş davranışını değiştirdiği, NAC'ın ise tüm formülasyonlarda başarılı şekilde yüklenip matrise entegre olduğu doğrulanmıştır.

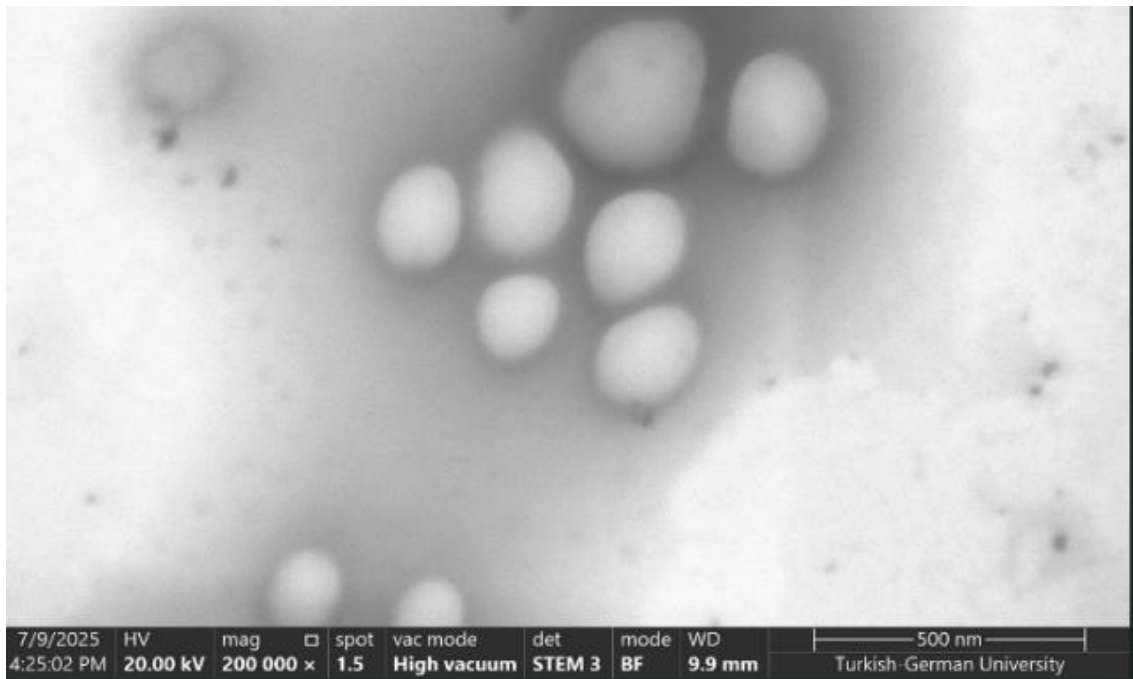


Şekil 23. PLGA-PEG NAC, MPEG-PLGA-MA-NH₂ NAC ve MPGE-PLGA-MA-NH₂-B6-QSH NAC ürünlerine ait DSC grafikleri.

4.1.4.5. Nanopartiküllerin morfolojik analizi

Hazırlanan NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri STEM analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 24). STEM görüntüleri, formülasyonların 2 boyut açısından dairesel geometrili bir morfoloji ve görüntüleme alanlar içerisinde agregasyon eğilimi göstermeyen partiküllerin oluştuğunu ortaya koymuştur. Partiküllerin genel dağılımının homojen olduğu ve nanoçöktürme tekniğinin tekrarlanabilir şekilde stabil morfoloji ürettiği gözlenmiştir.

STEM görüntülerinde ölçülen partikül çaplarının genel olarak 140–175 nm aralığında değiştiği belirlenmiştir. Bu değerler, DLS analizinden elde edilen hidrodinamik boyutlarla uyumluluk göstermekte olup, nanopartiküllerin istenen nano-boyut bölgesinde başarıyla üretildiğini doğrulamaktadır. Ayrıca partiküllerin konturlarının net ve keskin olması, formülasyonun çözeltide stabil kaldığını ve kurutma/ölçüm sırasında yapısal deformasyon oluşmadığını göstermektedir. NAC ve peptit yükleme işlemlerinin partikül 2 boyutlu dairesel morfolojisi üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığını göstermektedir.



Şekil 24. NAC yüklü nanopartiküllerin STEM görüntüleri.

4.1.4.6. Enkapsülasyon verimliliği ve yükleme kapasitesi analizi

Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan peptit konjuge edilen ve edilmeyen nanopartiküllerin NAC enkapsülasyon performansı değerlendirilmiştir. Peptit bağlama aşamasında, B6 ve QSH peptitleri EDAC aracılı aktivasyon sonrasında sırasıyla nanopartikül yüzeyine konjuge edilmiş (bu aşamada 25:10 olarak kabul edilmiştir) ve konjugasyon sonrası serbest NAC miktarı yeniden ölçülerek yükleme stabilitesi değerlendirilmiştir (Tablo 13). Bu analizler sonucunda, peptit modifikasyonu sonrası formülasyonlarda %80–90 aralığında yüksek enkapsülasyonun korunduğu, yani peptit bağlanmasının NAC yükünü anlamlı şekilde azaltmadığı görülmüştür. Nihai olarak, peptit konjuge edilmiş nanopartiküllerin yükleme kapasitesi de benzer şekilde yüksek kalmış ve başlangıç formülasyonu ile uyumlu değerler elde edilmiştir. Bu bulgular, hem polimerik çekirdeğin NAC'ı yüksek oranda tutabildiğini hem de peptit konjugasyonunun yük stabilitesini bozmadığını göstermektedir.

Tablo 13. Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi.

Formülasyon	% EE	% YK
mPEG-PLGA-MA-NH ₂ (25:20)	49,472 ± 0,288	21,987 ± 0,128
mPEG-PLGA-MA-NH ₂ (25:10)	99,891 ± 0,024	28,550 ± 0,005
mPEG-PLGA-MA-NH ₂ (25:10) pH 6,8	90,982 ± 0,412	25,995 ± 0,118
mPEG-PLGA-MA-NH ₂ -B6/QSH (25:10) pH 6,8	83,380 ± 0,328	23,823 ± 0,094

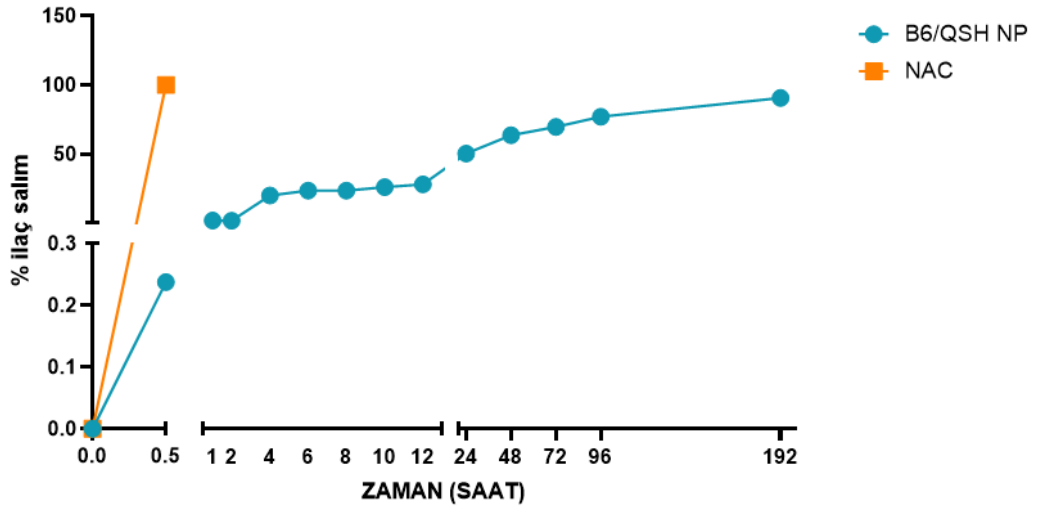
4.1.4.7. *In vitro* ilaç salım profili analizi

NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinin *in vitro* salım profili, serbest NAC çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, serbest NAC'ın salım ortamına son derece hızlı bir şekilde difüze olduğunu ve ilk 30 dakika içinde yüklenen NAC miktarının yaklaşık %100'ünün ortama geçtiğini göstermiştir. Serbest NAC'ın bu hızlı salım davranışı, molekülün küçük boyutu ve yüksek suda çözünürlüğü ile uyumludur (Şekil 25).

Buna karşılık, B6/QSH peptit konjuge polimerik nanopartiküller kontrollü ve uzatılmış bir salım profili sergilemiştir. Nanopartiküllerden NAC salımı ilk 1 saat içerisinde yalnızca %10–15 seviyesine ulaşmış, ardından zamana bağlı olarak kademeli bir artış

göstermiştir. Salım eğrisi 24 saat sonrasında belirgin şekilde yükselmeye devam etmiş ve yaklaşık 96–120. saatlerde %90–95 seviyelerine ulaşarak plato davranışı göstermiştir. Toplam 192 saatlik (8 gün) ölçüm sonunda salımın tamamlandığı ve NAC'ın nanopartikül matrisinden difüzyon-kontrollü olarak sürekli şekilde salındığı belirlenmiştir.

Bu veriler, B6/QSH konjugasyonunun ve polimerik taşıyıcı yapısının NAC üzerindeki kontrollü salım etkisini açıkça ortaya koymakta; nanopartiküllerin serbest NAC'a kıyasla ani salımı engelleyerek uzun süreli ve yavaş salım sağlayan bir sistem oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 25. Serbest NAC ve mPEG-PLGA-MA-NH₂ B6/QSH nanopartiküllerinin *in vitro* kümülatif ilaç salım profili.

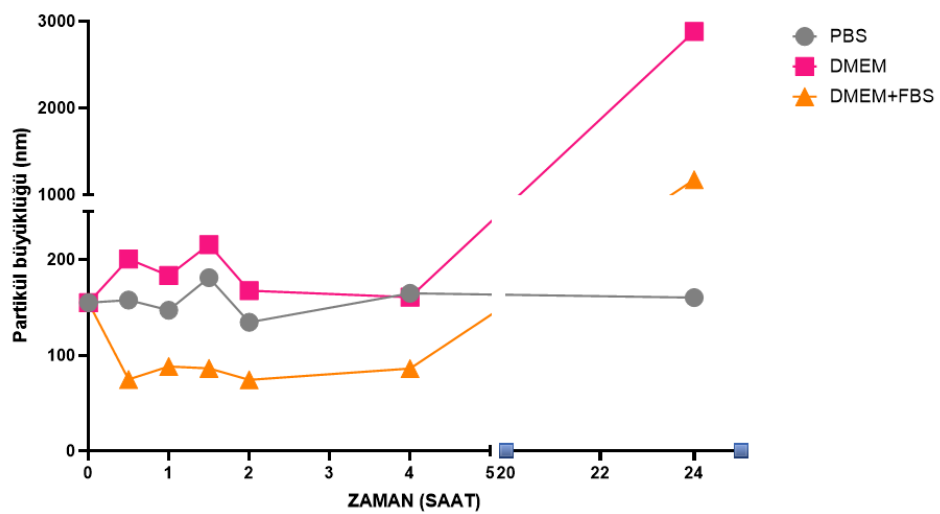
4.1.4.8. Nanopartiküllerin *in vitro* stabilite analizi

NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinin fizyolojik ve hücresel koşullar altındaki kararlılığı PBS, DMEM ve %50 FBS içeren DMEM ortamlarında 24 saat boyunca değerlendirilmiştir (Tablo 14, Şekil 26). Stabilite analizleri; boyut, PDI ve zeta potansiyelindeki zamana bağlı değişimleri inceleyerek gerçekleştirilmiştir.

PBS ortamında, nanopartiküllerin oldukça kararlı bir profil sergilediği görülmüştür. Bu durum, fizyolojik tuz tamponunda nanopartiküllerin yapısal bütünlüğünü sürdürebildiğini göstermektedir.

DMEM ortamında, iyonik içerik ve aminoasit/protein kalıntıları gibi komponentlerin etkisiyle partikül boyutunda zaman zaman dalgalanmalar gözlenmiştir. Bu değişimler özellikle uzun inkübasyon sürelerinde belirginleşmiş olsa da ilk 4 saatlik süreçte partikül boyutunun başlangıç aralığında kalması, hücresel ortama geçiş senaryosu açısından olumlu bulunmuştur.

%50 FBS içeren DMEM ortamında, zamanla artan bir partikül boyutu gözlenmiş ve bu değişimin özellikle 24. saatte belirginleştiği tespit edilmiştir. FBS, albümin başta olmak üzere çok sayıda serum proteini içerdiğinden, nanopartikül yüzeyinde protein tabak oluşumu beklenen doğal bir süreçtir. Bu etkileşim, partiküllerin biyolojik ortam tarafından tanınmasında ve hücrelere alınımında rol oynayan fizyolojik bir mekanizmadır. Dolayısıyla gözlenen boyut artışı, nanopartiküllerin serum proteinleriyle etkileşime girdiğini ve biyolojik ortamda beklenen şekilde davranış sergilediğini göstermektedir. Ayrıca ilk 1–2 saat içerisinde partikül boyutunun nispeten stabil kalması, uygulama sonrası erken süreçte formülasyonun kararlılığını koruduğuna işaret etmektedir.



Şekil 26. NAC yüklü nanopartiküllerinin farklı fizyolojik ortamlardaki zamana bağlı partikül boyut değişimleri.

Tablo 14. PBS, DMEM ve %50 FBS ortamında NAC yüklü nanopartiküllerin stabilite analizleri.

Formülasyon	Süre (Saat)	PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
PBS Ortamı	0	154.9±2.425	0.127±0.016	-33.1±0.954
	0,5	157.7±5.46	0.306±0.040	-10.4±1.17
	1	147.1±2.540	0.326±0.051	-10.6±1.34
	1,5	181.1±15.72	0.476±0.028	-11.2±0.709
	2	134.6±1.249	0.402±0.015	-10.0±0.741
	4	164.8±11.84	0.529±0.011	-10.7±0.96
	24	160.2±7.151	0.430±0.027	-12.5±0.70
Formülasyon	Süre (Saat)	PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
DMEM Ortamı	0	154.9±2.425	0.127±0.016	-33.1±0.954
	0,5	200.5±12.52	0.435±0.099	-10.8±0.651
	1	183.2±2.718	0.479±0.105	-12.0±0.265
	1,5	215.8±21.21	0.512±0.094	-10.7±0.208
	2	167.6±33.22	0.625±0.144	-11.4±0.503
	4	160.6±21.41	0.675±0.105	-12.2±0.57
	24	2884.0±419.7	1.00±0.00	-11.0±1.03
Formülasyon	Süre (Saat)	PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
%50 FBS Ortamı	0	154.9±2.425	0.127±0.016	-33.1±0.954
	0,5	74.76±8.325	0.808±0.176	-11.0±0.586
	1	88.42±2.588	0.640±0.006	-10.4±0.141
	1,5	86.43±5.55	0.699±0.095	-11.2±1.06
	2	74.35±6.628	1.00±0.00	-10.7±1.32
	4	86.21±12.60	0.782±0.190	-10.4±0.40
	24	1174.0±162.6	0.969±0.031	-11.7±0.781

4.1.4.9. Nanopartiküllerin liyofilizasyonu

NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinin liyofilizasyon sonrası redispersiditesi farklı trehaloz konsantrasyonları (%5, %10, %15 ve %20 a/h) kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, kriyoprotektan miktarının partikül stabilitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 15).

%5 trehaloz kullanılan nanopartiküllerde, redispersiyon sonrasında partikül boyutu ve PDI aşırı yükselerek belirgin aglomerasyon eğilimini işaret etmiştir. Zeta potansiyeli değerlerindeki dalgalanma da yüzey stabilitesinin düşük olduğunu desteklemiştir.

%10 trehaloz içeren grupta partikül boyutundaki bozulma çok daha belirgin olup, dramatik artışlar gözlenmiştir. PDI değerlerinin 1.000 olarak ölçülmesi, ciddi agregasyon ve homojenite kaybını göstermiştir. Bu bulgular, %10 trehalozun nanopartikülleri korumak için yetersiz olduğunu ortaya koymaktadır.

Buna karşın %15 trehaloz kullanılan nanopartiküllerde re-dispersiyon sonrası partikül boyutunun 150 nm civarında korunduğu, PDI değerlerinin düşük seviyelerde kaldığı (0.13–0.18) ve zeta potansiyeli değerlerinde minimal değişim olduğu görülmüştür. Bu grup hem partikül boyutu hem de dağılım homojenliği açısından en kararlı profil göstermiştir.

%20 trehaloz grubunda ise başlangıçta hafif bir stabil görünüm olsa da 1 dakikadan sonra partikül boyutunun yükseldiği ve PDI değerlerinin arttığı gözlenmiştir. %20 trehaloz, %15'e kıyasla daha fazla partikül boyutunun büyümesine ve yapısal bozulmaya neden olmuştur.

Genel olarak, trehaloz konsantrasyonu arttıkça çözünürlük ortamında viskozitenin arttığı ve bu durumun re-dispersiyon davranışını olumsuz etkileyerek agregasyon eğilimini güçlendirdiği değerlendirilmektedir. Dört grup karşılaştırıldığında %15 trehaloz, partikül boyutunu koruyabilen, düşük PDI değerleri sağlayan ve yüzey yükünde (ZP) minimal değişiklik gösteren en uygun kriyoprotektan konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, sonraki tüm çalışmalar ve nihai ürünün uzun süreli saklanabilir formunun hazırlanmasında %15 trehaloz tercih edilmiştir.

Tablo 15. Liyofilizasyon sonrası nanopartikül re-dispersiyonunun partikül boyutu, PDI ve Zeta potansiyeli üzerindeki etkileri.

Formülasyon	Süre	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
%5 TH	Başlangıç	147,3 $\pm$ 5,129	0,090 $\pm$ 0,088	-22,3 $\pm$ 0,551
	15 saniye	428,9 $\pm$ 35,19	0,273 $\pm$ 0,061	-37,7 $\pm$ 5,30
	30 saniye	499,0 $\pm$ 85,42	0,649 $\pm$ 0,118	-34,8 $\pm$ 3,00
	1 dakika	457,0 $\pm$ 58,34	0,640 $\pm$ 0,055	-33,0 $\pm$ 1,93
	5 dakika	383,4 $\pm$ 91,56	0,677 $\pm$ 0,286	-36,9 $\pm$ 0,153
Formülasyon	Süre	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
%10 TH	Başlangıç	147,3 $\pm$ 5,129	0,090 $\pm$ 0,088	-22,3 $\pm$ 0,551
	15 saniye	1576 $\pm$ 311,2	1,000 $\pm$ 0,00	-27,8 $\pm$ 0,208
	30 saniye	2559 $\pm$ 1095	1,000 $\pm$ 0,00	-31,4 $\pm$ 1,46
	1 dakika	1346 $\pm$ 181,9	1,000 $\pm$ 00	-33,9 $\pm$ 0,361
	5 dakika	1538 $\pm$ 432,4	0,973 $\pm$ 0,047	-32,9 $\pm$ 1,11
Formülasyon	Süre	PB $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP $\pm$ SS
%15 TH	Başlangıç	147,3 $\pm$ 5,129	0,090 $\pm$ 0,088	-22,3 $\pm$ 0,551
	30 saniye	150,8 $\pm$ 1,721	0,166 $\pm$ 0,037	-27,8 $\pm$ 0,208
	1 dakika	143,9 $\pm$ 6,201	0,121 $\pm$ 0,074	-24,4 $\pm$ 0,100
	1,5 dakika	142,5 $\pm$ 5,00	0,135 $\pm$ 0,082	-23,6 $\pm$ 2,76
	2 dakika	150,3 $\pm$ 4,600	0,186 $\pm$ 0,091	-24,9 $\pm$ 0,751
Formülasyon	Süre	PB $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP $\pm$ SS
%20 TH	Başlangıç	147,3 $\pm$ 5,129	0,090 $\pm$ 0,088	-22,3 $\pm$ 0,551
	30 saniye	163,7 $\pm$ 4,225	0,174 $\pm$ 0,028	-21,0 $\pm$ 1,85
	1 dakika	176,5 $\pm$ 7,912	0,221 $\pm$ 0,053	-19,1 $\pm$ 0,289
	1,5 dakika	170,5 $\pm$ 1,155	0,178 $\pm$ 0,031	-20,4 $\pm$ 0,929
	2 dakika	169,2 $\pm$ 1,908	0,174 $\pm$ 0,020	-19,3 $\pm$ 0,551

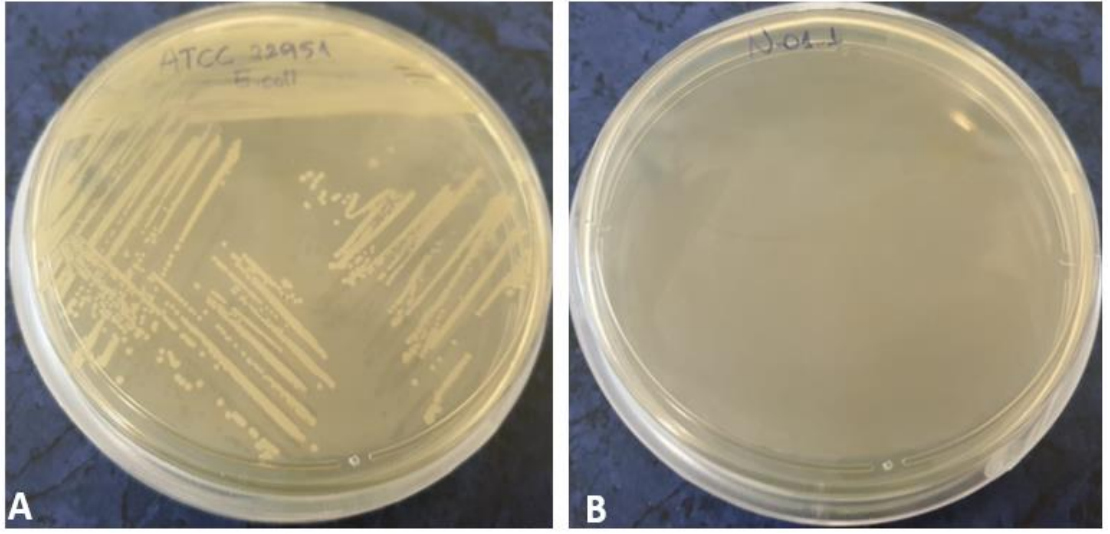
4.1.4.10. Nanopartikül formülasyonlarının sterilizasyonu

Redispers haldeki NAC yüklü mPEG-PLGA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerine uygulanan 15 dakikalık UV sterilizasyon işlemi sonrasında, formülasyonların fizikokimyasal özelliklerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Sterilizasyon sonrası yapılan DLS analizlerinde partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerinin işlem öncesine benzer aralıklarda kaldığı belirlenmiştir. Buna göre, UV ışınlamanın partikül bütünlüğü, yüzey yükü veya dağılım homojenliği üzerinde bozucu bir etki oluşturmadığını gösterilmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. UV sterilizasyonu uygulanan nanopartiküllere ait karakterizasyon verileri.

Formülasyon	PB (nm) ±SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
FITC yüklü mPEG-PLGA-NH ₂ B6/QSH	156,5 ± 2,627	0,126 ± 0,021	-31,4 ± 0,950
NAC yüklü mPEG-PLGA-NH ₂ B6/QSH	160,6 ± 1,778	0,178 ± 0,024	-31,3 ± 1,42

Sterilizasyonun mikrobiyolojik etkinliğini belirlemek amacıyla nanopartikül dispersiyonları agar besiyerine inoküle edilerek 37 °C’de inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* ATCC 22951 suşunda ilk 24 saat içinde yoğun bakteri üremesi gözlenirken, UV işlemine tabi tutulan nanopartikül formülasyonlarında 1 günlük inkübasyon boyunca hiçbir mikrobiyal koloni oluşumu tespit edilmemiştir. Bu bulgu, uygulanan UV protokolünün nanopartikülleri kontaminasyondan arındırmada etkin olduğunu ve sterilizasyon sırasında formülasyonun fiziksel stabilitesinin korunduğunu doğrulamaktadır (Şekil 27).



Şekil 27. Nanopartikülün sterilizasyon etkinliğinin agar besiyerinde gösterimi. (A) Pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* ATCC 22951 suşunun agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası görünümü. (B) UV sterilizasyonu uygulanmış nanopartikül formülasyonuna ait agar plaklarındaki görünümü.

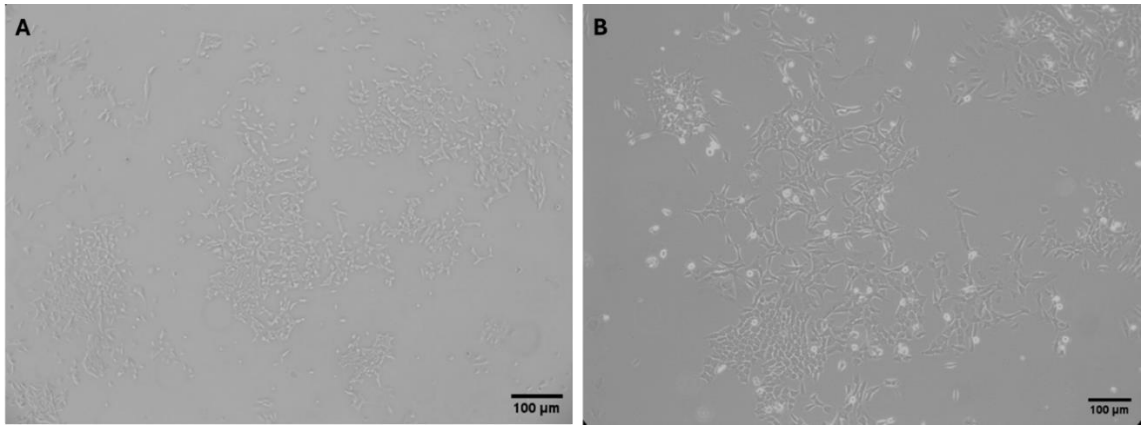
4.2. *In vitro* çalışmalar

4.2.1. Hücre Kültürünün Gerçekleştirilmesi

SH-SY5Y hücre hattı ile yürütülen kültür çalışmalarında hücrelerin büyüme karakteristiklerinin genel olarak stabil bir seyir izlediği belirlenmiştir. %15 FBS ve penisilin/streptomisin içeren DMEM ortamında gerçekleştirilen kültürlerde hücreler, her pasaj döngüsünde benzer proliferasyon hızları göstermiş ve 5–7 günlük periyotlarda düzenli olarak %70–80 konfluensiye ulaşmıştır. Kültür medyumunun üç günde bir yenilenmesi, hücrelerin metabolik aktivitelerini sürdürmelerine ve morfolojik bütünlüklerinin korunmasına katkı sağlamıştır.

Pasajlama süreçlerinde 1X PBS ile yıkama ve %0.25 Tripsin/EDTA uygulaması sonrasında hücrelerin yüzeyden kontrollü şekilde ayrıldığı gözlenmiş; tripsin aktivitesinin medyum eklenerek inhibe edilmesiyle hücre kaybı veya aşırı deforme görünüm oluşmamıştır. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletlerinin yeni kültür ortamında hızlı bir şekilde çözülmesi ve ilgili deney düzeneklerine (T25 flask, 6-well, 12-well, 24-well, 96-well) eşit şekilde dağıtılabildiği tespit edilmiştir.

Deney süresi boyunca hücre morfolojileri düzenli olarak mikroskop altında takip edilmiş, SH-SY5Y hücrelerine özgü uzantılı ve nöroblastik yapıların korunduğu görülmüştür. Pasajlama döngüleri boyunca herhangi bir kontaminasyon bulgusuna rastlanmamış; hücrelerin hem yapısal bütünlüklerini hem de proliferatif kapasitelerini koruduğu doğrulanmıştır. Tüm bu bulgular, kültür ve pasajlama koşullarının deneysel uygulamalar için yeterli derecede optimize edildiğini ve hücrelerin sonraki prosedürlere uygun şekilde hazırlandığını göstermektedir (Şekil 28).



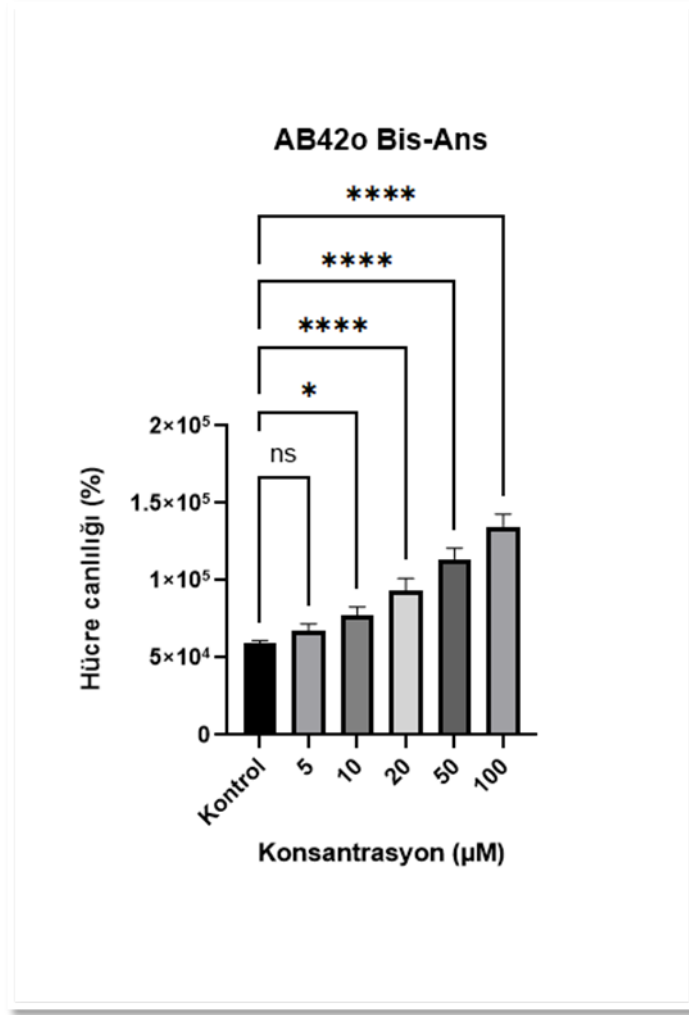
Şekil 28. SH-SY5Y hücrelerinin 5X (A) ve 10X (B) büyütme ile ışık mikroskobu görüntüleri.

4.2.2. Hücre kültüründe A β 42 oligomerlerinin oluşturulması

HFIP ile ön işleminden geçirilmiş A β 42 peptidinin NH₄OH'te çözülerek hazırlanan stok çözeltileri, literatürde belirtildiği gibi monomerik formda kararlı kalmış ve oligomerleşme sürecine uygun bir başlangıç materyali sağlamıştır (Stine vd., 2003). Stok çözelti fenol kırmızısı içermeyen medyumda 5–100 μ M aralığında 24 saat boyunca 4°C'de inkübe edildiğinde A β 42 oligomerlerinin başarıyla oluştuğu hem floresan analizleri hem de jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

Bis-ANS boyası kullanılarak yapılan floresan ölçümleri, tüm konsantrasyonlarda oligomer oluşumunun gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 29). Kontrol grubu ile 5 μ M arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fakat 10, 20, 50 ve 100 μ M'de absorbans değerleri kontrol grubuna göre konsantrasyonla orantılı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p < 0.0001$). Bu artış, Bis-ANS'in hidrofobik yüzeylere bağlanma prensibine uygun olarak oligomer miktarının ve hidrofobikliğinin

konsantrasyonla birlikte arttığını göstermektedir. Özellikle 50 ve 100 μM 'de oligomerleşmenin plato seviyesine ulaştığı, dolayısıyla yüksek konsantrasyonlarda yoğun bir oligomer yükü olduğu anlaşılmaktadır. Bu veriler, kullanılan protokolün farklı doz aralıklarında güvenilir biçimde A β 42 oligomerleri oluşturduğunu doğrulamaktadır.



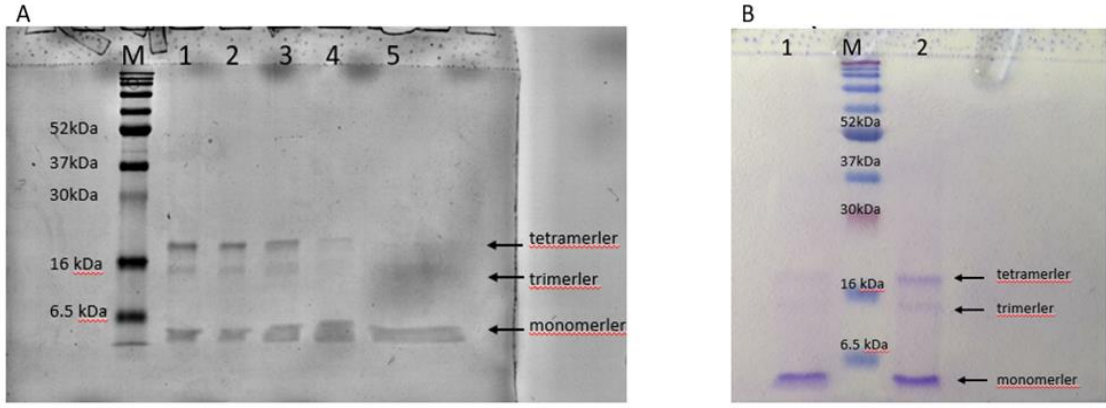
Şekil 29. A β 42 oligomer oluşumunun Bis-ANS yöntemi ile analizi.

SDS-PAGE jel sistemi, %4'lük yükleme ve %12'lik ayırma jeli olacak şekilde Tablo 17'de gösterilen içerikle hazırlanmıştır. A β 42o örnekleri 3X örnek tamponu (187,5mM Tris-HCl, %7,5 SDS, %0,006 Bromofenol mavisi, %30 Gliserol ile karıştırılarak 80 °C'de 5 dk boyunca örneklerin denatürasyonu sağlanmış ve hemen ardından jele yüklenmiştir. SDS-PAGE jeli 120V'ta 1,5 saat yürütüldükten sonra Coomassie mavisi boyama solüsyonu ile (%0,2 CBB R-250, %45 MeOH, %10 asetik asit) 30 dk boyanmış ve

boyanın jelden çıkması için de-stain solüsyonunda (%40 MeOH, %10 asetik asit) gece boyu bırakılarak görüntüleme cihazında (Azure Biosystems) görüntüleri alınmıştır. A β 42o oluşumu SDS-PAGE jelinde de net şekilde gözlenmiştir (Şekil 30). Jelde, ~6.5 kDa düzeyindeki bantlar monomer, ~13–14 kDa düzeyindeki bantlar trimer, ~16–18 kDa düzeyindeki bantlar ise tetramer yapılarla uyumlu bulunmuştur. Bant yoğunlukları incelendiğinde, tetramer bantlarının trimer bantlarına kıyasla daha yüksek yoğunlukta olduğu, monomer miktarının çok düşük olduğu, konsantrasyon arttıkça oligomer bant yoğunluklarının belirgin şekilde yükseldiği tespit edilmiştir.

Tablo 17. SDS-PAGE jel hazırlanması için kullanılan malzemeler.

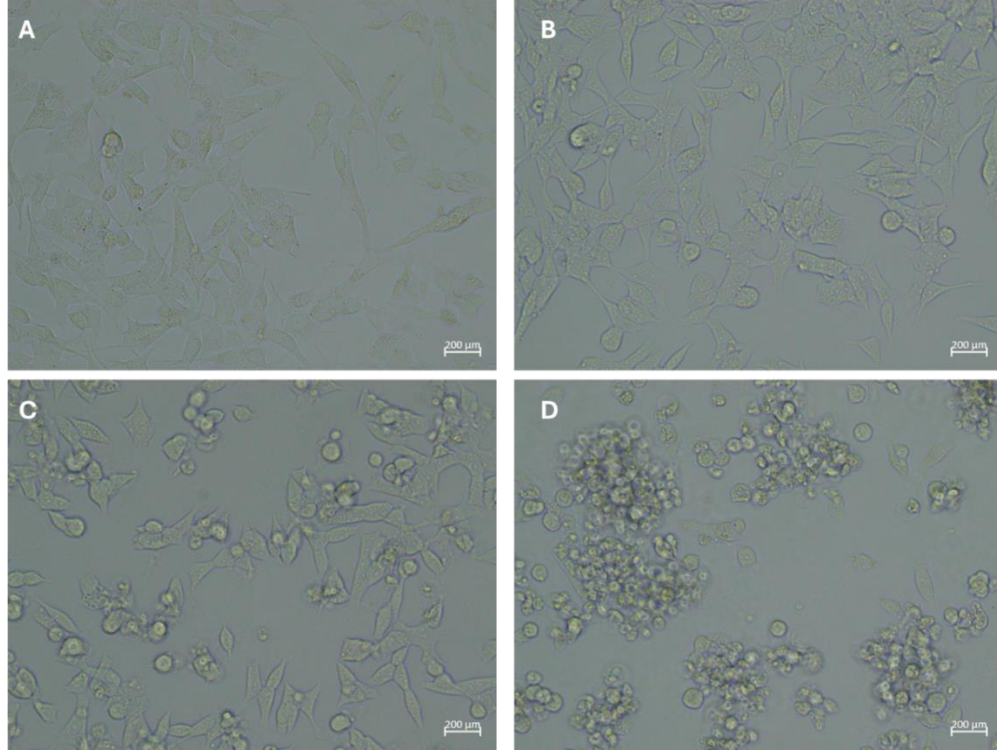
%12 ayırma jeli (2 jel için)		%4 yükleme jeli (2 jel için)
2,6 mL	dH₂O	3 mL
3,2 mL	Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	0,67 mL
2 mL	1,5M Tris-HCl (pH=8.8)	-
-	0,5M Tris-HCl (pH=6.8)	1,25 mL
80 μ L	10% SDS	50 μ L
80 μ L	10% APS	50 μ L
8 μ L	TEMED	5 μ L



Şekil 30. Aβ42o örneklerinin SDS-PAGE elektroforezi görüntüleri. A) %12'lik SDS-PAGE jelinin Coomassie solüsyonu ile boyanmasının ardından görüntüleme cihazı ile kaydedilen negatif görüntüsü (M: Biolegend Prime Step Prestained Broad Range Protein Ladder; 1-5: sırasıyla 100, 50, 20, 10, 5 μM Aβ42o örnekleri). B) %12'lik SDS-PAGE jelinin Coomassie boyaması fotoğrafı (M: Biolegend Prime Step Prestained Broad Range Protein Ladder; 1: 10 μM Aβ42o, 2: 50 μM Aβ42o örneği).

Bu dağılım, literatürde Alzheimer toksisitesinde en kritik türler olarak tanımlanan düşük moleküler ağırlıklı oligomer profilinin elde edildiğini göstermektedir (Cizas vd., 2010; Ono & Yamada, 2011). Jel sonuçları, Bis-ANS verileriyle tutarlı biçimde başarılı bir oligomerizasyon gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

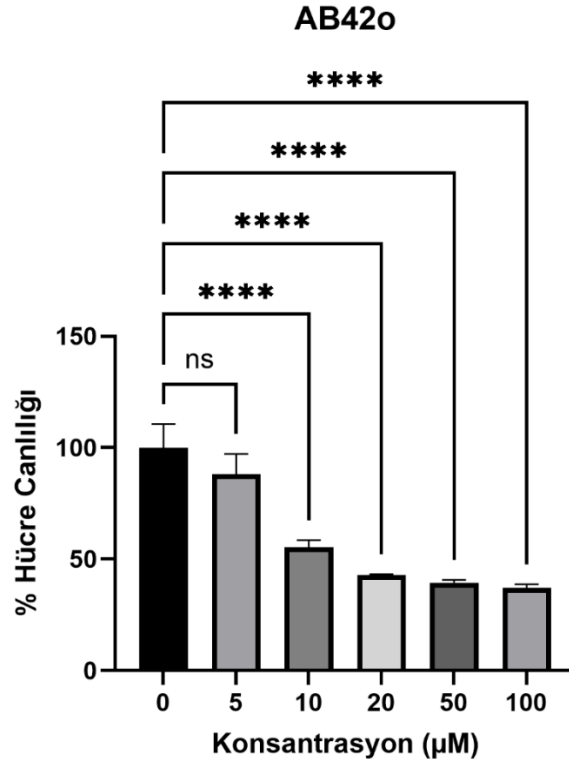
Oligomer uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri, doz artışıyla uyumlu şekilde hücre yoğunluğunun azaldığını, nöronal uzantıların kısaldığını ve hücre membran bütünlüğünün bozulduğunu göstermiştir (Şekil 31). Bu bulgular, Aβ42 oligomerlerinin *in vitro* nörotoksik özelliklerini doğrular niteliktedir.



Şekil 31. SH-SY5Y hücrelerinde amiloid oligomerlerinin hücre canlılığına etkisinin ışık mikroskopunda faz-kontrast görüntüleri. (A) A β 42o uygulanmamış, (B) 5 μ M A β 42o, (C) 10 μ M A β 42o hücreler, (D) 20 μ M A β 42o uygulanmış hücreler.

Canlılık analizi (% hücre canlılığı) CVDK-8 testi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar doz-yanıt eğrisi ile uyumlu bir azalma göstermiştir (Şekil 32). 5 μ M konsantrasyonda canlılık ~%90 iken, 10 μ M’da canlılık ~%55, 20–100 μ M’da canlılık %40–50 aralığı olarak tespit edilmiştir.

Doz-yanıt grafiği üzerinden hesaplanan IC₅₀ değeri 5.458 μ M olup, SH-SY5Y hücrelerinde toksisite modeli oluşturmak üzere düşük-orta düzey oligomer konsantrasyonlarının yeterli olduğunu göstermektedir. Özellikle 10 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda belirgin canlılık kaybı meydana gelmesi, hücre içi stresin ve A β 42-indüklü toksik yolların aktive olduğunu işaret etmektedir.



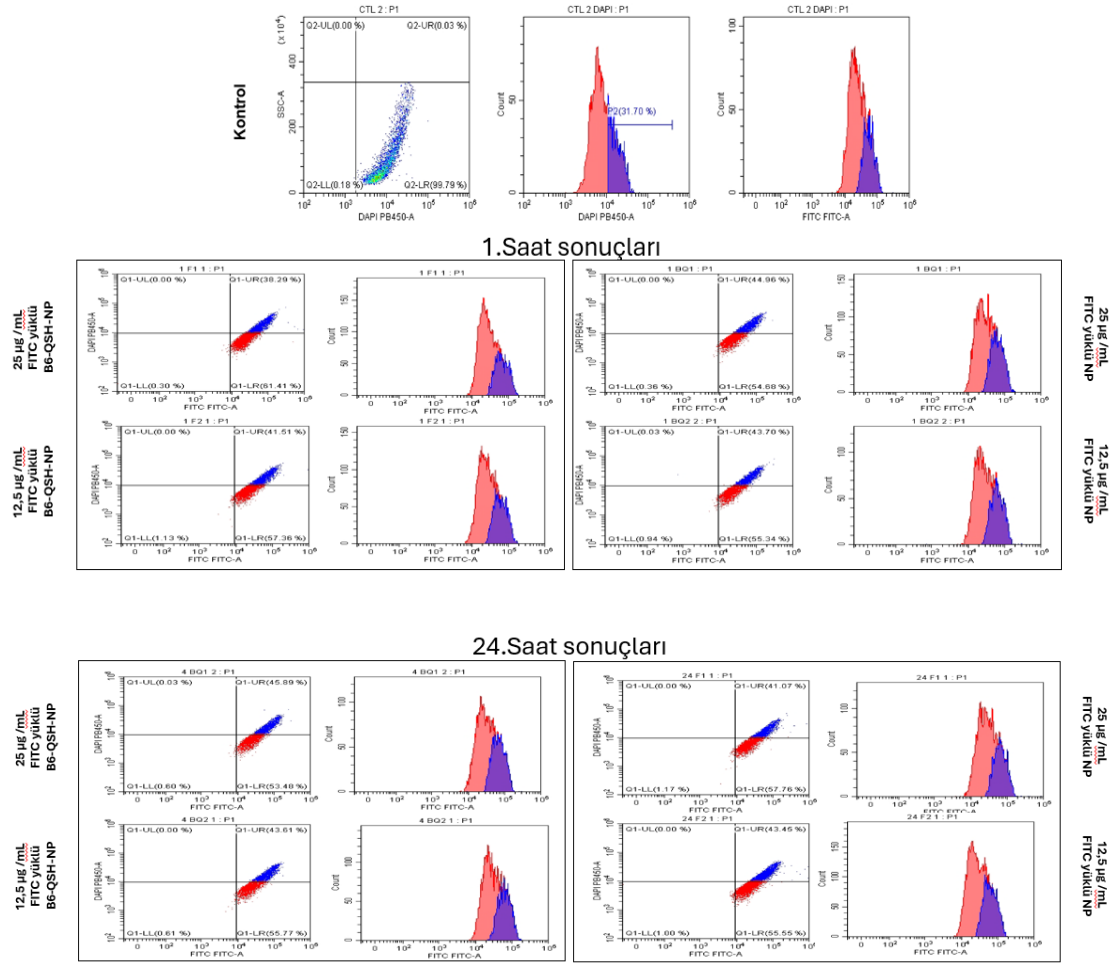
Şekil 32. Aβ42o oligomerlerinin hücre canlılığına etkisi.

Bu bulgular, hazırlanan oligomerlerin hem yapısal olarak hem de biyolojik etkileri bakımından literatürde tanımlanan toksik Aβ42o formuna uygun olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu oligomerler sonraki tedavi değerlendirme deneylerinde güvenilir bir Alzheimer hastalığı için *in vitro* hücre modeli oluşturmuştur.

4.2.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınması

Flow sitometri analizi ile NP'nin hücre içine alınması incelenmiştir. Flow sitometri cihaz kullanımı ve analizleri için Elips firmasından destek alınmıştır. SH-SY5Y hücreleri 12-kuyulu plakalara kuyu başına 1x10⁵ hücre miktarında ekilmiş ve %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında hedeflendirilmiş nanopartikül olan mPEG-PLGA-NH₂ B6/QSH ve hedeflendirilmemiş mPEG-PLGA-NH₂ formülasyonları FITC ile yüklü halde ve triplike olarak 25 ve 12,5 μg/mL konsantrasyonunda muamele edilerek 1. ve 24. saatlerde

tripsinizasyon ile toplanarak 2 kez 1X PBS ile yıkanmış, çekirdek boyaması DAPI ile yapılarak akan hücre ölçer cihazında (Beckman Coulter) ölçüm alınmıştır (Şekil 33).



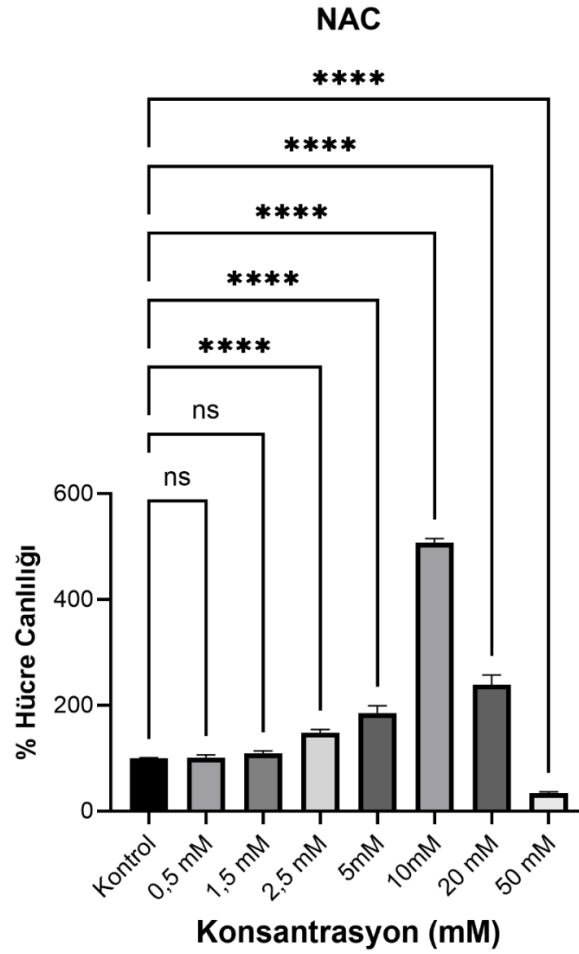
Şekil 33. Uygulama yapılmayan kontrol hücreleri, NP uygulandıktan 1 ve 24 saat sonra toplanan hücrelerden alınan Flow sitometri ham verileri.

4.2.4. NAC, EPPS ve nanopartikülün hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

4.2.4.1. Serbest formda uygulanan NAC doz-cevap ilişkisi

SH-SY5Y hücrelerinde NAC'ın serbest formda uygulanmasıyla oluşturulan doz-cevap eğrisi, NAC'ın konsantrasyon bağımlı çift yönlü (hormetik) bir etki profiline sahip olduğunu göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarda (0.5–5 mM) hücre canlılığı kontrol ile benzer düzeyde seyretmiş ve anlamlı toksisite görülmemiştir. Grafik incelendiğinde özellikle 10 mM NAC uygulamasında hücre canlılığının belirgin şekilde arttığı (yaklaşık

%500–550 canlılık; $p < 0.0001$) ve maksimum proliferatif yanıtın bu konsantrasyonda elde edildiği görülmektedir (Şekil 34).

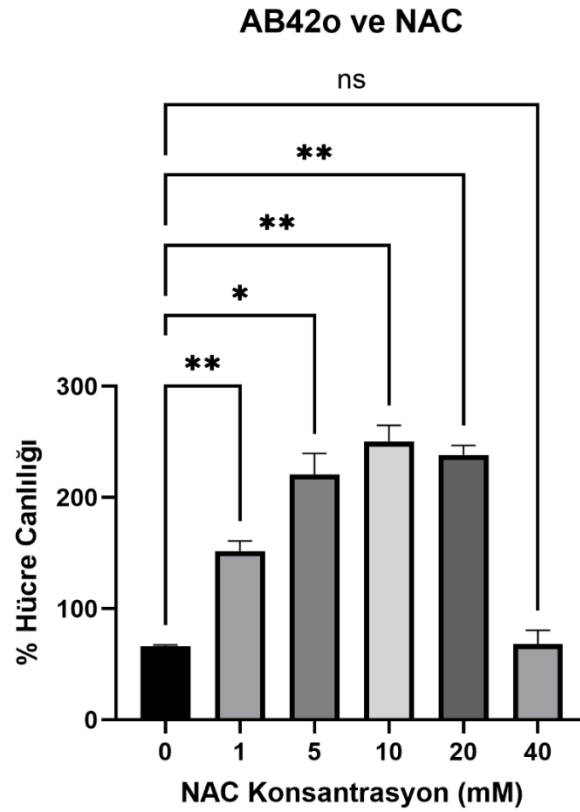


Şekil 34. Serbest formda uygulanan NAC'ın farklı konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinin canlılığına etkisi.

Bununla birlikte, 20 mM ve özellikle 50 mM NAC konsantrasyonlarında hücre canlılığında belirgin bir düşüş oluşmuş; 50 mM'de yaşam oranı yaklaşık %10–15 düzeyine inmiştir. Bu durum NAC'ın aşırı yüksek dozlarda oksidatif yük oluşturabileceğini ve sitotoksik etki gösterebileceğini doğrulamaktadır.

Doz-yanıt eğrisi üzerinden hesaplanan EC_{50} değeri 5.012 mM olup, NAC'ın proliferatif etki gösterdiği aralığın 5–10 mM arasında yoğunlaştığı görülmüştür. Bu sonuçlar, *in vitro* deneylerde NAC dozlarının hormetik eğri göz önüne alınarak optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

A β 42o ile 24 saat muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde canlılık oranı yaklaşık %41 olarak belirlenmiştir. NAC uygulamasını takiben canlılık oranı anlamlı derecede artmış; en düşük NAC konsantrasyonu olan 1 mM’de bile hücre canlılığı %98’e yükselmiştir (p < 0.05). 1 mM NAC ~%150 canlılık, 5–10 mM NAC %200–250 canlılık, 20 mM NAC %220 civarı, 40 mM NAC proliferasyon azalması (~%80 canlılık) gibi belirgin bir patern görülmektedir (Şekil 35).

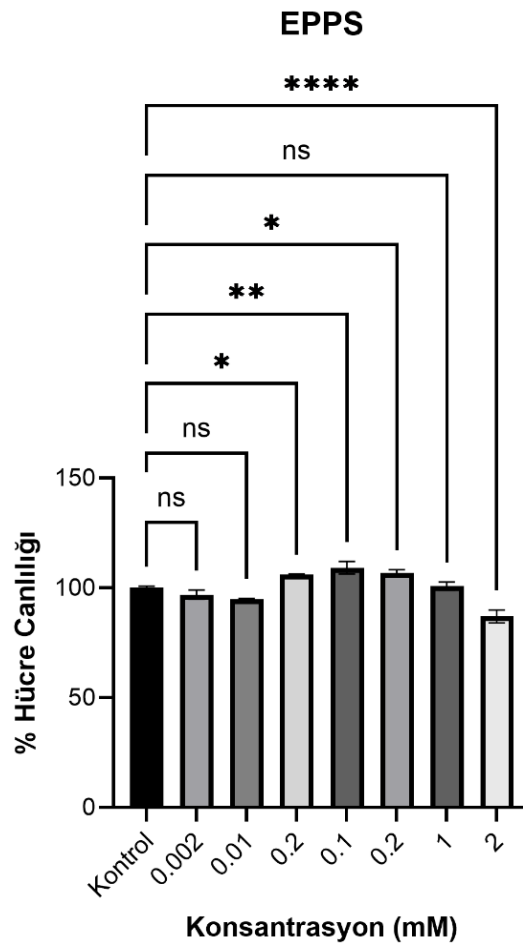


Şekil 35. 10 μ M A β 42o ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde NAC’ın hücre canlılığına etkisi.

Bu bulgular, A β 42o kaynaklı oksidatif stresin NAC tarafından doza bağlı şekilde baskılandığını göstermektedir. 10 mM NAC’ın hem toksisiteyi ortadan kaldırdığı hem de proliferasyonu maksimum düzeye ulaştırdığı belirlenmiştir.

4.2.4.2. EPPS toksisite analizi

EPPS'nin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, uygulanan doz aralığında belirgin bir sitotoksosite gözlenmediği ve hücrelerin fizyolojik proliferasyon kapasitesini koruduğu görülmüştür. Düşük ve orta konsantrasyonlarda (0.002–0.2 mM) canlılık oranları kontrol grubu ile benzerlik göstermiş; özellikle 0.1–0.2 mM aralığında hücre canlılığında hafif fakat istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (1–2 mM) canlılıkta sınırlı bir azalma oluşsa da bu düşüş EPPS'in yüksek toksik potansiyele sahip bir molekül olmadığını göstermektedir (Şekil 36).



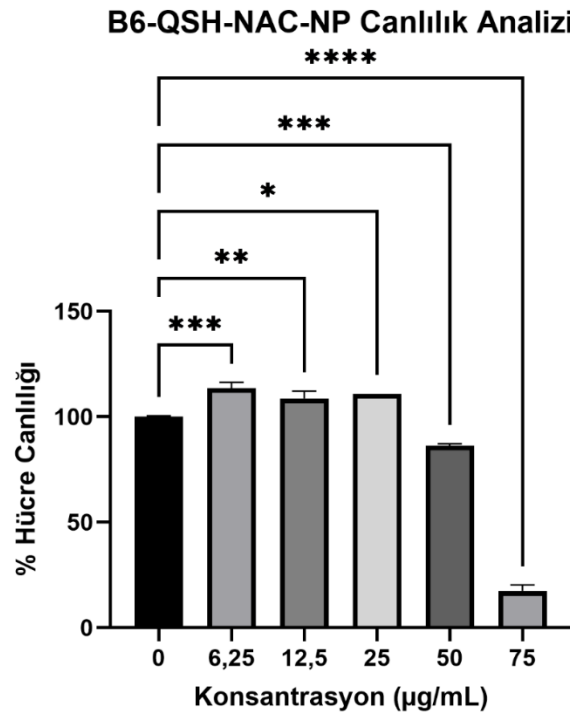
Şekil 36. EPPS'nin farklı konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki etkisine ait doz-cevap eğrisi.

Doz-yanıt eğrisi üzerinden hesaplanan EC₅₀ değerinin 1.12 mM olması, EPPS'in geniş bir güvenlik aralığında çalışılabileceğini ve hücresel sistemin fizyolojik toleransını bozmadığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar EPPS'nin nörotoksik bir ajan olmadığını ve hücreler üzerinde ek bir stres oluşturmadağını doğrulamaktadır.

4.2.4.3. NAC-NP'nin amiloid toksisitesi altında hücre canlılığına etkisi

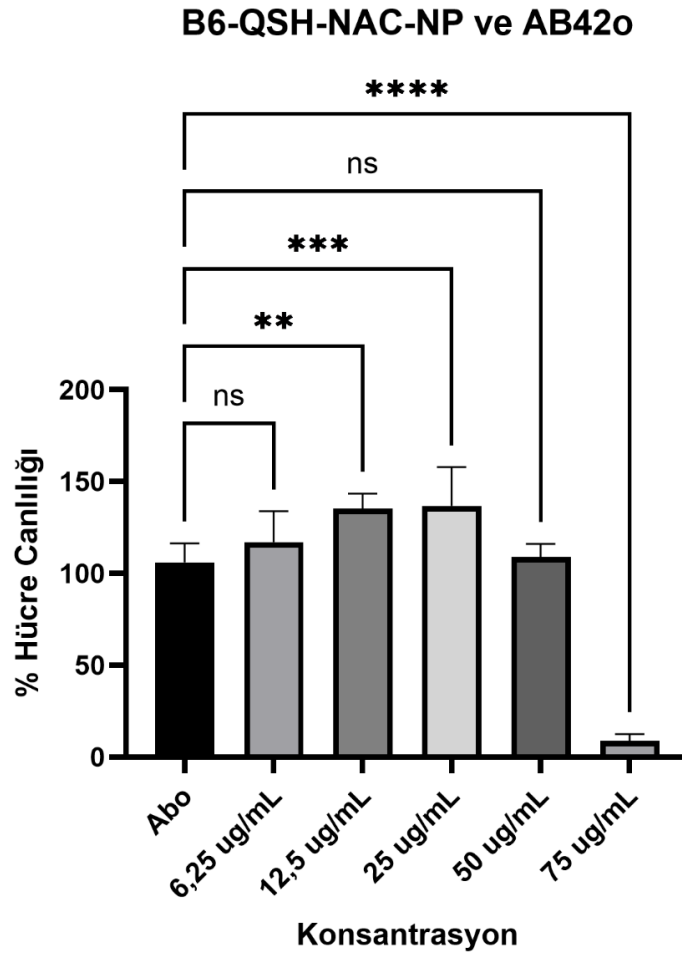
NAC yüklü nanopartiküller (B6-QSH-NAC-NP), hem kontrol hücrelerde hem de A β 42o toksisitesi oluşturulan hücrelerde değerlendirilmiş ve serbest NAC'a kıyasla daha kontrollü, konsantrasyon bağımlı ve geniş bir terapötik pencerede etki sergilediği görülmüştür.

Kontrol SH-SY5Y hücrelerinde düşük ve orta konsantrasyonlardaki uygulamalarda (6.25–25 μ g/mL) hücre canlılığı kontrol düzeyinin üzerinde seyretmiş; hücrelerin tedaviye fizyolojik bir yanıt verdiği anlaşılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda ise (75 μ g/mL) nanopartikül yoğunluğuna bağlı olarak belirgin şekilde azalan canlılık değerleri gözlenmiştir (Şekil 37).



Şekil 37. B6-QSH-NAC-NP formülasyonunun hücre canlılığına etkisi.

A β 42o toksisitesi altında yapılan uygulamalarda ise B6-QSH-NAC-NP'nin belirgin bir koruyucu etki sağladığı görülmüştür. A β 42o ile muamele edilen hücrelerde canlılık yaklaşık %40 seviyesine düşmüşken, nanopartikül uygulaması sonrası bu değer konsantrasyon artışına bağlı olarak anlamlı şekilde yükselmiştir. Özellikle 12.5–25 μ g/mL aralığında hücre canlılığının %130–150 düzeyine ulaştığı görülmüş; bu artış NAC'ın kontrollü salım mekanizması sayesinde hücre içi redoks dengesinin yeniden kurulabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte en yüksek nanopartikül konsantrasyonunda (75 μ g/mL) canlılığın belirgin şekilde azalması, optimum etkinlik aralığının alt ve orta dozlarda olduğunu işaret etmektedir (Şekil 38).



Şekil 38. A β 42o toksisitesi oluşturulan hücrelerde B6-QSH-NAC-nanopartiküllerinin hücre canlılığına etkisi.

Bu bulgular doğrultusunda EPPS'in tek başına uygulanmasının hücre canlılığını olumsuz etkilemediği ve model sistemde güvenle kullanılabileceği, B6-QSH-NAC-NP'nin ise hem normal hem de A β 42o toksisitesi oluşturulmuş hücrelerde terapötik potansiyel taşıyan bir profil sergilediği sonucuna varılmıştır. Özellikle A β 42o altında gözlenen canlılık artışı, nanopartikül sisteminin NAC'ın biyoyararlanımını artırdığını ve oksidatif stresin giderilmesinde etkili olduğunu göstermektedir.

4.2.4.4. Sinerjistik etki

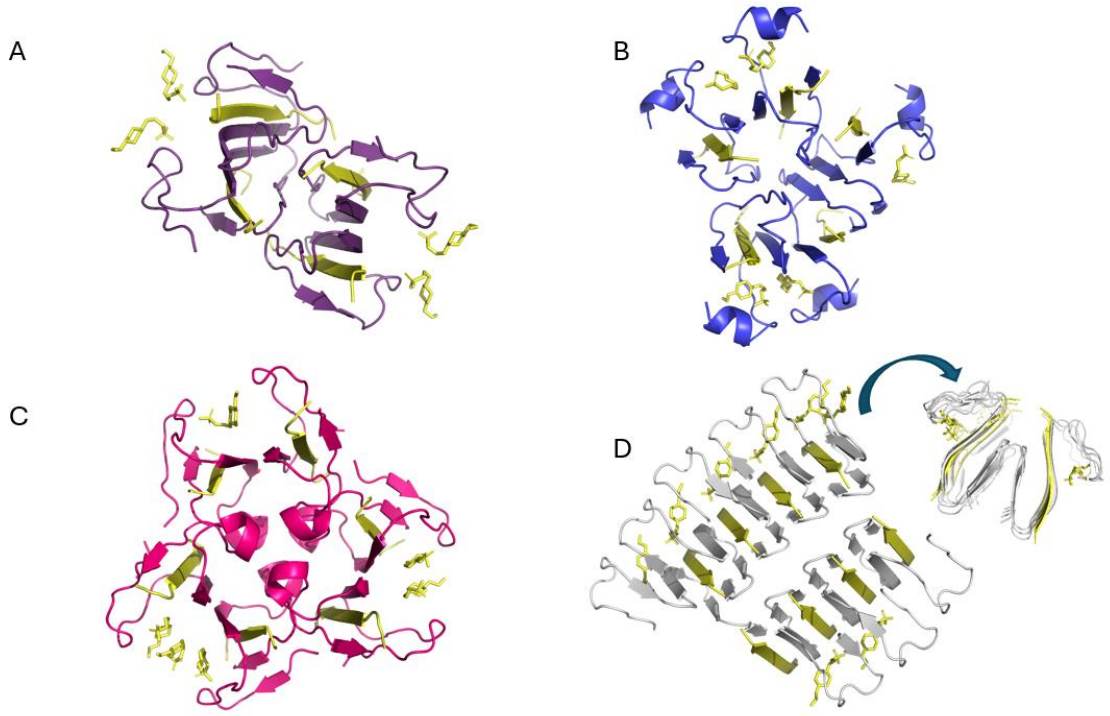
EPPS'nin tek başına A β oligomerleri ile etkileşiminde, düşük moleküler ağırlıklı oligomerlerde (4,5–18 kDa) Boltz-2 skorlarının daha yüksek olduğu (0,49–0,55) gözlenmiştir (Tablo 18). Moleküler ağırlık arttıkça skorların kademeli olarak azaldığı ve 90 kDa ve üzeri oligomerlerde 0,27 civarına gerilediği belirlenmiştir. Bu durum, EPPS'nin özellikle erken oligomerik formlarla daha etkin etkileşim kurduğunu göstermektedir.

Tablo 18. Boltz-2 kullanılarak A β (6RHY) oligomerlerinin EPPS ve QSH ile farklı stokiometrik oranlarda gerçekleştirilen *in silico* simülasyonlarından elde edilen bağlanma skorları.

PDB Kimliği	Moleküler ağırlık (kDa)	Peptid 2	Ligand	Model	Boltz-2 Skoru
6RHY (1)	4,5	-	EPPS	Boltz-2	0,55
6RHY (3)	13,5	-	EPPS	Boltz-2	0,52
6RHY (4)	18	-	EPPS	Boltz-2	0,495
6RHY (5)	22,5	-	EPPS	Boltz-2	0,364
6RHY (10)	45	-	EPPS	Boltz-2	0,333
6RHY (20)	90	-	EPPS	Boltz-2	0,271
6RHY (25)	112,5	-	EPPS	Boltz-2	0,27
6RHY (1)	4,5	QSH	EPPS	Boltz-2	0,604
6RHY (3)	13,5	QSH	EPPS	Boltz-2	0,534
6RHY (4)	18	QSH	EPPS	Boltz-2	0,504
6RHY (5)	22,5	QSH	EPPS	Boltz-2	0,415
6RHY (10)	45	QSH	EPPS	Boltz-2	0,355
6RHY (20)	90	QSH	EPPS	Boltz-2	0,275
6RHY (10)	45	-	EPPS (10)	Boltz-2	0,284
6RHY (10)	45	QSH (5)	EPPS (5)	Boltz-2	0,304
6RHY (6)	45	QSH (6)	EPPS (6)	Boltz-2	0,367
6RHY (8)	45	QSH (8)	EPPS (8)	Boltz-2	0,337
6RHY (10)	45	QSH (6)	EPPS (6)	Boltz-2	0,281
6RHY (10)	45	QSH (8)	EPPS (8)	Boltz-2	0,273

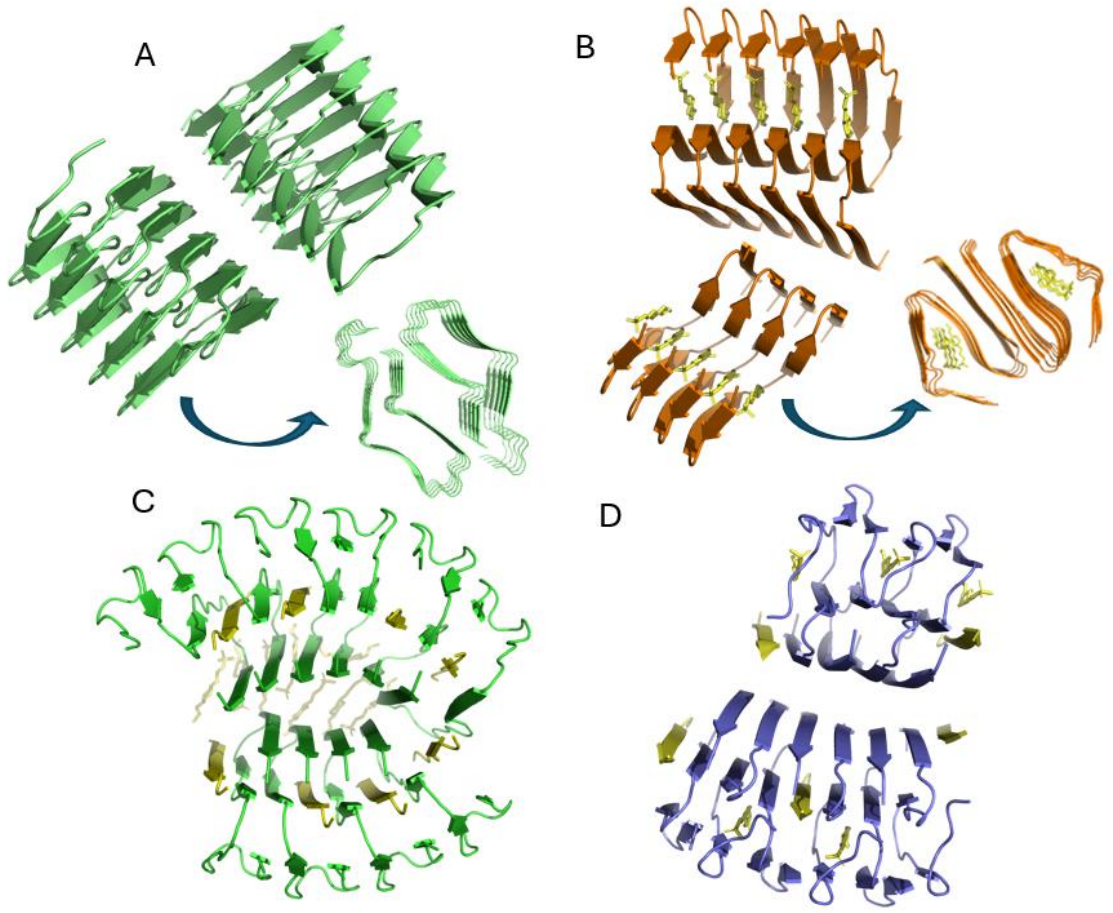
QSH peptidinin EPPS ile birlikte modele dahil edilmesi, tüm oligomerik formlarda Boltz-2 skorlarında belirgin bir artışa yol açmıştır. Özellikle 4,5 kDa ve 13,5 kDa oligomerlerde skorların sırasıyla 0,604 ve 0,534'e yükselmiştir. Bu durum peptidin dahil olduğu durumlarda modelin bağlanma etkileşim stabilitesini artırdığını düşündürmüştür. Farklı simülasyon tekrar sayıları ile yapılan analizlerde skorların benzer aralıklarda kalması, elde edilen sonuçların model tekrarlanabilirliği açısından tutarlı olduğunu göstermiştir.

PyMOL'de modellerin görselleştirme analizleri, EPPS ve QSH moleküllerinin A β oligomerleri etrafında ve arasında belirgin şekilde β -yaprak açısından zengin bölgelerde konumlandığını göstermiştir (Şekil 39-40). 4:4:4 oranında oluşturulan sistemde, peptidlerin oligomerlerin arasına girmesine rağmen ligandların oligomer yüzeyine sınırlı sayıda temas noktası oluşturduğu ve etkileşimlerin daha çok yüzeysel kaldığı gözlenmiştir (Şekil 39A). Buna karşın 5:5:5 ve 6:6:6 oranlarında, EPPS ve QSH moleküllerinin oligomerik yapı boyunca daha homojen dağıldığı ve β -yaprak bölgeleri arasında köprü görevi gören etkileşimler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 39B-C). 8:8:8 modelini incelediğimizde öncelerde kompakt olan yapının fibrilleşmeye başladığı, ligand ve peptidlerin yine fibriller içinde homojen dağıldığı görülmüştür (Şekil 39D). Sonuç olarak, A β oligomerlerinin 8 monomerden itibaren globüler yapıdan fibril yapıya ulaştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 39. Eşit stokiyometrik oranlarda A β :EPPS:QSH modelleri. A) 4:4:4 B) 5:5:5 C) 6:6:6 D) 8:8:8. Sarı renkli beta iplikler QSH peptidini, küçük moleküller ise EPPS'i göstermektedir.

Etkileşimlerin stokiyometriye bağımlılığını göstermek için, A β oligomerlerinin düzgün fibril yapı gösterdiği 10 monomerlik yapı ile (Şekil 40A) farklı oranlarda EPPS ve QSH peptit kompleks yapıları modellenmiştir (Şekil 40B-D). Özellikle 10:5:5 ve 10:8:8 kombinasyonlarının oluşturduğu modelde, QSH'nin varlığıyla EPPS'nin oligomer yüzeyinde daha kararlı ve düzenli konumlandığı, ligandların β -yaprak düzlemleri arasına yerleşerek fibril yapısını bozabilecek bir yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 40B-C). Fakat peptit olmayan ve 10 adet A β ile 10 adet EPPS içeren modelde, etkileşimlerin daha bölgesel olduğu ve fibril yapının daha çok korunduğu görülmüştür (Şekil 40D).

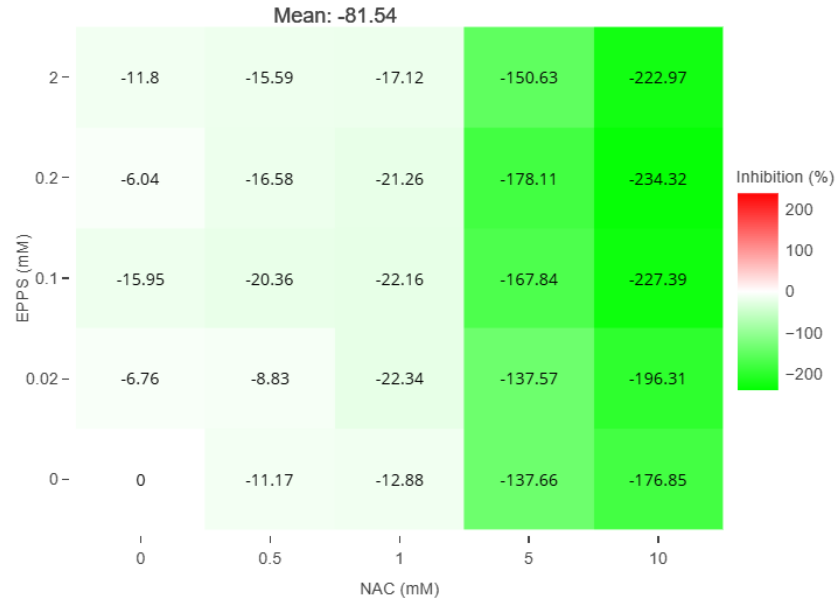


Şekil 40. 10 monomerlik fibril A β yapılarının farklı stokiyometrik oranlarda EPPS ve QSH ile modelleri A) 10:0:0 B)10:10:0 C) 10:8:8 D) 10:5:5. Sarı renkli beta iplikler QSH peptidini, küçük moleküller ise EPPS'i göstermektedir.

Kombinasyonun etkileşim profilini daha nicel değerlendirmek amacıyla SynergyFinder+ yazılımı kullanılarak dört farklı modelle sinerji analizi yapılmıştır. Yapılan çalışma göz önüne alındığında değerlendirmeye en uygun modellerin ZIP ve Bliss modelleri olduğuna karar verilmiştir. Sinerji analizinde elde edilen ortalama skorlar sırasıyla ZIP: +5.62 ($p = 0.436$) ve Bliss: -0.36 ($p = 0.927$) olarak bulunmuştur. ZIP modelindeki pozitif skor kombinasyonun additif düzeye yakın bir etki gösterdiğini, Bliss modelindeki nötr skor ise kombinasyonun bağımsız etki varsayımıyla uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

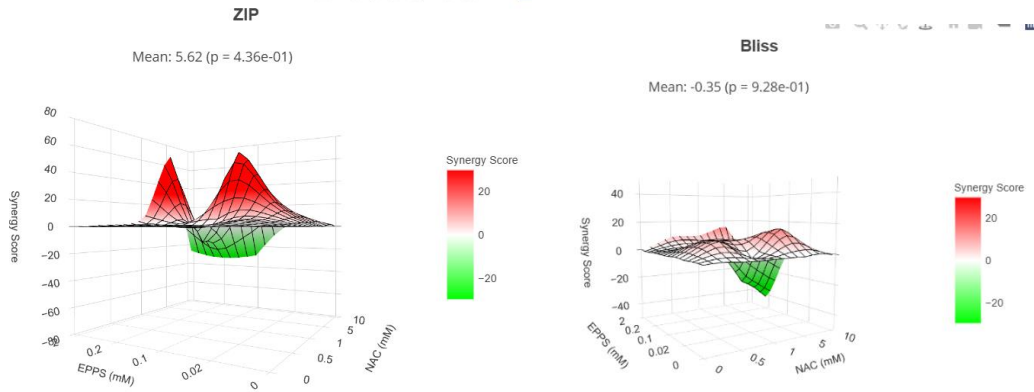
Farklı NAC (0–10 mM) ve EPPS (0–2 mM) konsantrasyonlarına ait inhibisyon değerleri, kombinasyona bağlı etkileşimlerin görsel olarak değerlendirilmesi amacıyla iki boyutlu ısı haritası şeklinde sunulmuştur. Negatif inhibisyon değerleri (yeşil tonları), kombinasyonların A β 42 agregasyonunu artırma eğilimi veya tek ajanlara kıyasla daha düşük inhibisyon potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Özellikle yüksek NAC

konsantrasyonlarının (5 ve 10 mM), EPPS ile birlikte uygulandığında belirgin negatif inhibisyon değerlerine yol açması, NAC'ın yüksek dozlarda EPPS'nin amiloid çözündürme etkinliğini baskılayabileceğini veya hücre yanıtını ters yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ortalama inhibisyon değerinin -81.54 olması da kombinasyonun genel olarak antagonistik bir profile sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 39).



Şekil 41. NAC ve EPPS kombinasyonlarının Aβ42 oligomerlerine karşı gösterdiği inhibisyon yüzdelelerini gösteren ısı haritası.

Üç boyutlu sinerji yüzeyleri, NAC ve EPPS kombinasyonlarının doz bağımlı etkileşimlerini modellemek amacıyla değerlendirilmiştir. ZIP modeline göre elde edilen ortalama skor 5.62 olup doz matrisinde lokal pozitif sinerjik bölgeler görülmekle birlikte genel etkinin istatistiksel olarak anlamlı sinerji oluşturmadığı belirlenmiştir. Bliss modelinde ise ortalama skor -0.35 olup kombinasyonun çoğunlukla additif veya hafif antagonistik bir profil sergilediği görülmüştür. Sinerji skorlarında kırmızı tonlar pozitif değerleri ($\geq +10$) ve sinerjiyi, yeşil tonlar ise negatif değerleri (≤ -10) ve antagonistik etkileşimi temsil etmektedir. Her iki model de NAC-EPPS kombinasyonunda konsantrasyon bağımlı lokal sinerjik tepelerin bulunmasına rağmen genel etkinin sistematik bir sinerji göstermediğini ortaya koymaktadır (Şekil 40).



Şekil 42. NAC ve EPPS kombinasyonlarının A β 42 oligomerlerine karşı gösterdiği etkileşimin ZIP ve Bliss sinerji modelleri ile değerlendirilmesi.

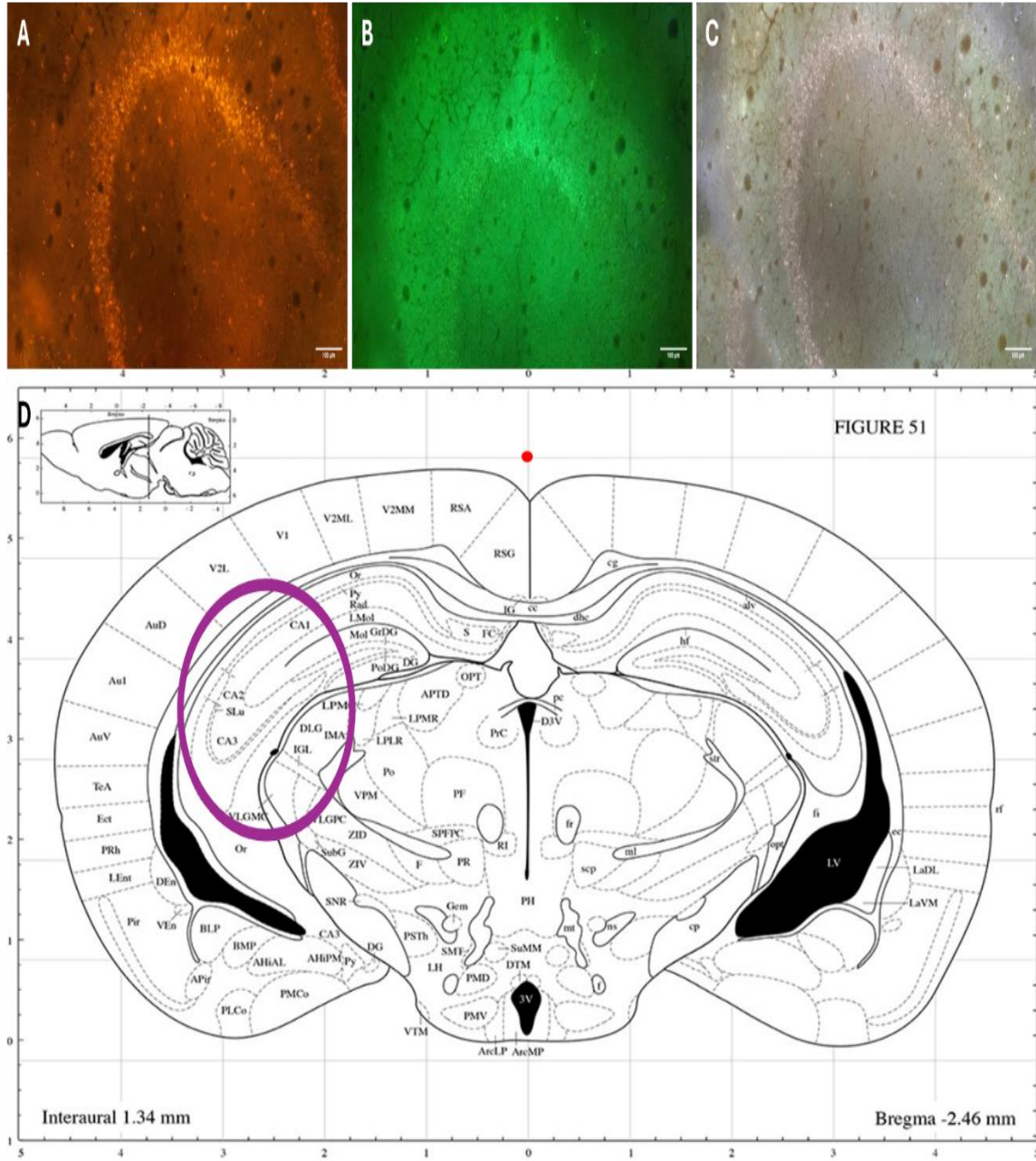
Inhibitörlük yüzdesine dayalı ısı haritasında yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında artış gözlenmesi, teknik olarak SynergyFinder tarafından negatif inhibisyon şeklinde yorumlanmaktadır. Burada yeşil tonlar artan inhibisyonu (% canlılık azalması), kırmızı tonlar ise düşük inhibisyonu veya proliferasyonu temsil ederken; tüm değerlerin negatif olması kombinasyonların hücrelere zarar vermediğini, aksine proliferasyonu teşvik ettiğini göstermektedir. Ortalama profil NAC–EPPS kombinasyonunun sinerji açısından anlamlı bir avantaj sunmadığını, ancak bazı konsantrasyon kombinasyonlarında hücre canlılığının arttığını işaret etmektedir.

Bu bulgular doğrultusunda EPPS ve NAC kombinasyonunun güçlü bir sinerjik etki göstermediği, ancak yüksek dozlarda proliferatif yanıtları artırabileceği değerlendirilmektedir. Sonuçların daha kesin yorumlanabilmesi için ileri analizlerde hücre canlılığı veya normalize proliferasyon skorları üzerinden modelleme yapılması önerilmektedir.

4.2.5. *In vivo*'da nanopartiküllerin kan-beyin bariyerinden geçişi

Nanopartiküllerin KBB'den geçişini ve amiloidleri hedeflediğini *in vivo* göstermek için NAC-B6/FITC-QSH-nanopartikülü transgenik farelere i.p uygulanarak 1 saat sonra sakrifiye edilmiş ve beyin dokuları toplanmıştır. Toplanan dokular oligomer spesifik antikor ile immünoboyama yapılarak floresan mikroskopta incelenmiştir. Nanopartiküllerin beyne geçtikleri ve amiloid hedeflemeyi gerçekleştirdikleri

gösterilmiştir (Şekil 41). Görüntüler değerlendirilirken Paxinos ve Franklin fare beyin atlası kullanılmıştır (Paxinos & Franklin, 2019).



Şekil 43. Fare beyin dokusunda hipokampal bölgenin (CA1–CA3) immünohistokimyasal analizi. (A) Amiloid oligomerleri (Kırmızı). (B) Nanopartikül (Yeşil). (C) Amiloid oligomerleri ve nanopartikül sinyallerinin birlikte gösterimi. (D) Bregma -2,46mm koronal kesit anatomisi.

Nanopartiküllerden kaynaklanan yeşil sinyal, hipokampal bölgeyi içeren beyin kesitinin genelinde gözlenmekle birlikte, hipokampüsün üst kesimlerinde amiloidin görece daha yoğun olduğu kırmızı sinyal alanlarında belirgin şekilde yoğunlaştığı kırmızı ve yeşil renk kanalları ile alınan görüntünün çakıştırılmasıyla görülmüştür.

4.2.6. EPPS ve NAC-NP uygulaması

Bu çalışma kapsamında seçilen deney grupları, EPPS ve NAC'ın hem tek başına hem de nanopartikül formunda A β 42o kaynaklı toksisite üzerindeki etkilerini ayrıştırarak değerlendirmek amacıyla oluşturulmuştur. EPPS'nin monomerizasyon ve agregasyon çözündürme kapasitesi ile NAC'ın antioksidan ve hücre koruyucu özelliklerinin birbirinden bağımsız ve birlikte nasıl sonuç verdiğini incelemek için kombinasyon stratejisi uygulanmıştır. Ayrıca NAC'ın nanopartikül formunda daha kontrollü salınım ve hücre içi alım avantajı sağlayabileceği öngörülerek, EPPS ile eşleştirildiğinde olası sinerjik veya tamamlayıcı etkilerin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu düzen, hem her bir ajanı tek başına değerlendirmeye hem de EPPS ile NAC veya NAC-NP arasındaki karşılaştırmalı etkinlik farklarını belirlemeye olanak tanımış; böylece kombinasyonların terapötik potansiyellerinin mekanistik düzeyde anlaşılması için gerekli karşılaştırma altyapısını sağlamıştır.

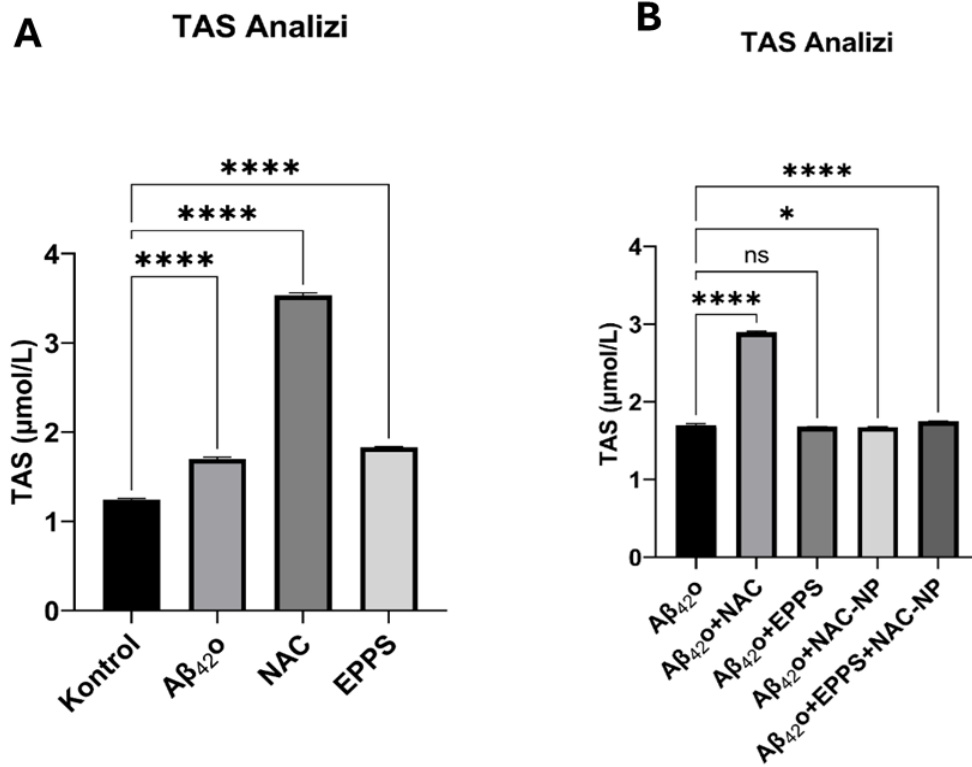
4.2.7. Oksidatif stres tayini

A β 42o toksisitesine maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan kapasitedeki değişimi değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen TAS analizinde, A β 42o uygulamasının hücresel antioksidan seviyelerini belirgin şekilde azalttığı görülmüştür (Şekil 42). Kontrol grubunda TAS düzeyi yaklaşık 1.25 μ mol/L iken, A β 42o uygulanmış hücrelerde bu değer 1.7 μ mol/L civarında ölçülmüş ve oksidatif stres artışına paralel olarak hücresel antioksidan yanıtın baskılandığı anlaşılmıştır ($p < 0.0001$).

NAC (10 mM) uygulamasında TAS düzeyi yaklaşık 3.5–3.6 μ mol/L seviyesine ulaşmış ve bu artışın A β 42o ile oluşturulan oksidatif stres anlamlı biçimde tersine çevirdiği belirlenmiştir ($p < 0.0001$). EPPS uygulaması da kontrol grubuna göre daha yüksek bir

antioksidan kapasiteye yol açmış; TAS düzeyi 1.8 $\mu\text{mol/L}$ civarında seyretmiş, ancak serbest NAC kadar güçlü bir yanıt oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 42A).

A β 42o ve NAC kombinasyonunda TAS düzeyinin 2.8–2.9 $\mu\text{mol/L}$ bandına yükselmesi, NAC’ın oksidatif stres altında da etkinliğini koruduğunu göstermektedir. A β 42o ve EPPS grubunda ise antioksidan kapasitedeki artışın sınırlı düzeyde kaldığı ve EPPS’nin monoterapi olarak oksidatif stresi hafifletme kapasitesinin daha düşük olduğu görülmüştür. NAC-B6-QSH-NP formülasyonunun A β 42o ile birlikte uygulanması durumunda TAS seviyeleri yine 1.7 $\mu\text{mol/L}$ civarında olup serbest NAC’a kıyasla daha düşük bir antioksidan yanıt ortaya koymuştur (Şekil 42B).

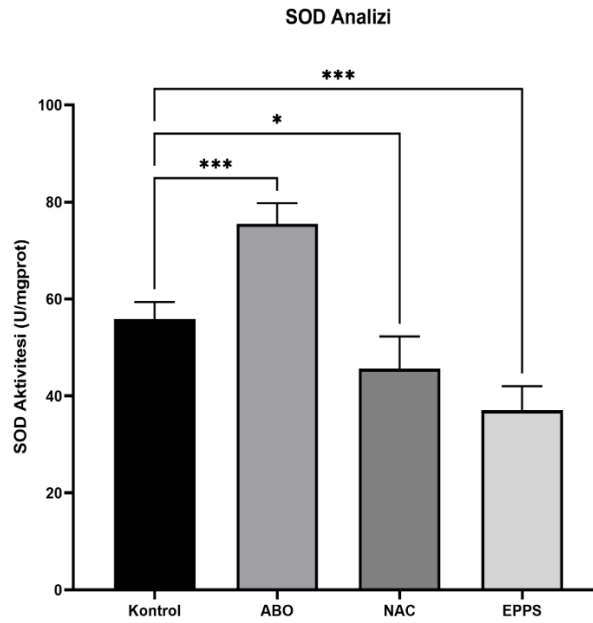


Şekil 44. (A) SH-SY5Y hücrelerinde uygulama yapılmamış hücreler ile uygulama gruplarının TAS düzeylerinin kıyaslanması. (B) SH-SY5Y hücrelerinde A β 42o toksisitesi ve farklı tedavi gruplarının TAS düzeylerine etkisi.

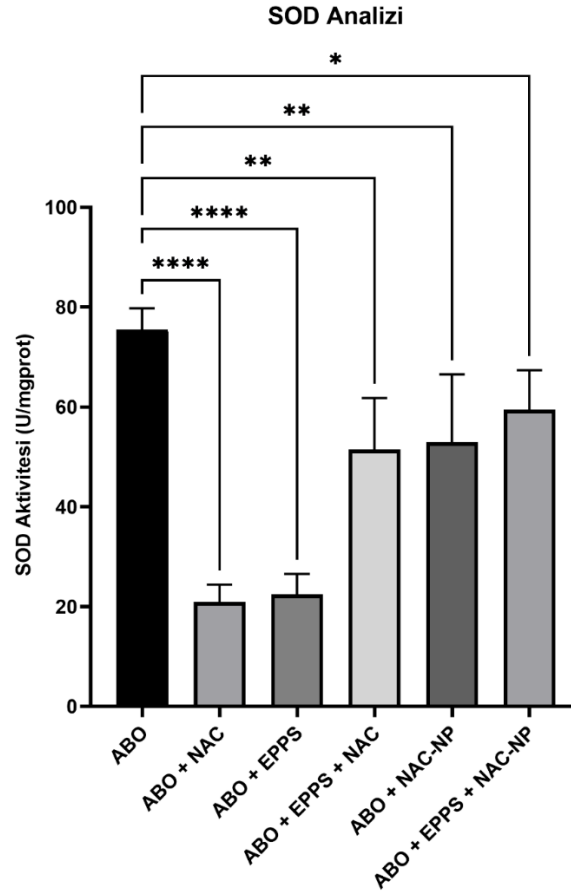
4.2.8. SOD aktivitesinin belirlenmesi

A β 42o ile oluşturulan amiloid toksisitesi sonrasında SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres düzeyinin artmasına paralel olarak SOD aktivitesinin belirgin şekilde yükseldiği gözlenmiştir. Serbest NAC uygulamasının bazal hücrelerde SOD aktivitesini artırmadığı görülmüştür. Benzer şekilde EPPS uygulamasında da SOD aktivitesinin kontrol değerine kıyasla altında kaldığı belirlenmiştir (Şekil 43).

A β 42o toksisitesi altında tedavi gruplarını içeren grupların SOD aktivitesinin düşük kaldığı görülmektedir. NAC'ın oksidatif stres koşullarında süperoksit üretimini azaltarak SOD'un indüklenme ihtiyacını azalttığı değerlendirilmiştir. A β 42o toksisitesi altında EPPS uygulanmış grupta ise SOD aktivitesi oldukça düşük seviyelerde (~15–20 U/mg) seyretmiş; EPPS'nin oksidatif yanıtı baskıladığı ancak bu etkinin NAC kadar güçlü bir azalma oluşturmadığı görülmüştür. A β 42o + EPPS + NAC kombinasyonunda SOD aktivitesinin ~55–60 U/mg düzeyine yükselmesi ise EPPS ve serbest NAC'ın birlikte oksidatif savunmayı yeniden dengelediğini göstermektedir ($p < 0.01$) (ŞEKİL 44).



Şekil 45. A β 42o, NAC ve EPPS'nin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki SOD aktivitesinin gösterimi.



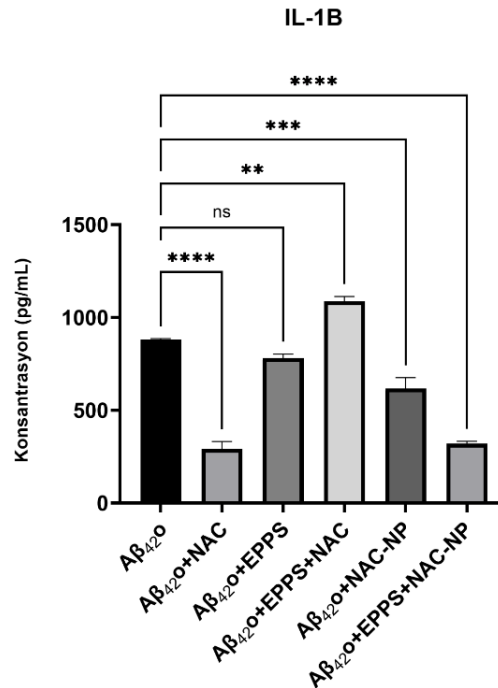
Şekil 46. A β 42o ile indüklenen oksidatif stres altında SH-SY5Y hücrelerinde SOD aktivitesinin, serbest NAC, EPPS ve NAC-B6-QSH nanopartikülleriyle yapılan tedavilere bağlı olarak nasıl modüle olduğunu gösteren grafik.

Grafikler değerlendirildiğinde; A β 42o toksisitesi SOD aktivitesini iki kat artırmıştır. Serbest NAC, oksidatif yükü azaltarak SOD aktivitesini belirgin şekilde düşürmüştür. NAC-NP, serbest NAC'tan farklı bir profil sergilemiş ve A β 42o altında SOD aktivitesini yeniden yükseltmiştir. EPPS, tek başına veya kombinasyonda SOD aktivitesini düşürme eğilimindedir. Bu bulgular, farklı tedavi stratejilerinin oksidatif stres altındaki hücrelerde SOD yanıtını farklı yönlerde modüle ettiğini ve özellikle NAC'ın serbest ve nanopartikül formlarının birbirinden ayrılan biyolojik etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

4.2.9. Sitokin seviyesi tayini

A β 42o ile oluşturulan toksisite modelinde SH-SY5Y hücrelerinde inflamatuvar yanıtın belirgin şekilde arttığı görülmüştür. ELISA analizleri sonucunda, özellikle IL-1 β düzeylerinin A β 42o uygulamasıyla anlamlı ölçüde yükseldiği ve oligomer kaynaklı inflamasyonun hücresel seviyede güçlü bir şekilde indüklendiği doğrulanmıştır (ŞEKİL 45).

IL-1 β sitokini, A β 42o toksisitesine en güçlü yanıt veren markerlerden biri olmuştur. A β 42o uygulamasıyla IL-1 β düzeyleri kontrol grubuna kıyasla ciddi biçimde artmıştır (****p < 0.0001). Bu durum inflamatuvar kaskadın erken aktivasyonu ile uyumlu bulunmuştur. Serbest NAC, EPPS ve NAC-NP uygulamalarının her biri IL-1 β seviyelerini anlamlı şekilde azaltmış, ancak en düşük değerler NAC ve EPPS ile NAC-NP'nin birlikte uygulamasıyla elde edilmiştir. Toksisite altında tek başına uygulanan NAC-NP grubunda IL-1 β seviyesinin nispeten daha yüksek kalmıştır.



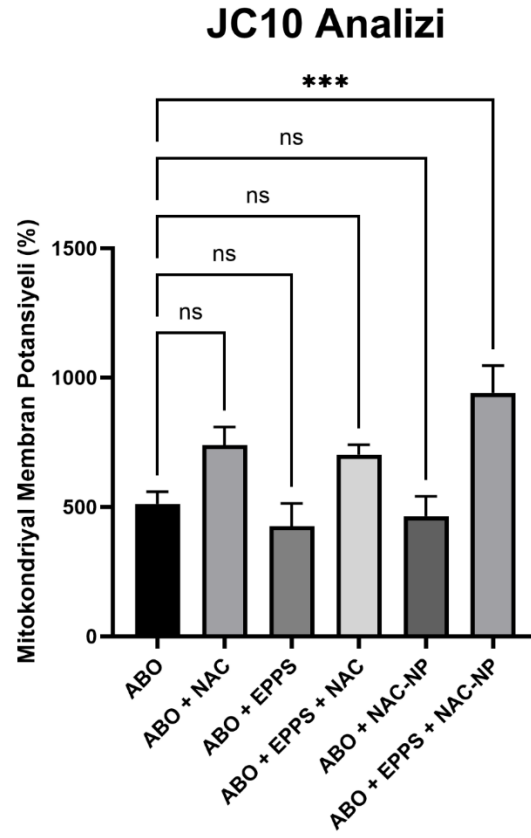
Şekil 47. A β 42o toksisitesi altında IL-1 β düzeylerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.

Amiloid uygulanmış gruplarda NAC, EPPS kendi başlarına değerlendirildiğinde bir düşüş paterni göstermişler. Aynı şekilde NAC-NP ve EPPS ile NAC-NP uygulamaları serbest NAC'a göre az olsada sitokin seviyesini düşürmüştür.

4.2.10. Mitokondriyal disfonksiyon analizi

A β 42o ile oluşturulan toksisite modeli toksisite oluşturmayan hücrelerle kıyaslandığında mitokondriyal membran potansiyelinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 46). Meydana gelen azalma oligomer kaynaklı mitokondriyal stresin etkilediğini göstermektedir. Serbest NAC uygulaması A β 42o'ya göre daha yüksek membran potansiyeli sağlamış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. EPPS uygulaması ise en düşük membran potansiyeli değerlerinden birine yol açmış, EPPS'nin tek başına mitokondriyal fonksiyon üzerinde sınırlı bir koruyucu etki oluşturduğu değerlendirilmiştir.

Amiloid toksisitesi altında NAC-B6-QSH-NP uygulaması, membran potansiyelinde azalma görülmüş ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. EPPS ile birlikte uygulandığında membran potansiyelindeki artış serbest NAC seviyesinin de üzerine çıkmış ve kombine terapinin iyileştirici etkisi mitokondriyal seviyede görülmüştür. Aynı şekilde, EPPS + NAC kombinasyonunda da membran potansiyelinde düzelme eğilimi mevcut olmakla birlikte sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı kabul edilmemiştir.



Şekil 48. A β 42o toksisitesi altında farklı tedavi gruplarında mitokondriyal membran potansiyelinin karşılaştırılması.

5.TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı dünyada yaşlı nüfüsü en çok etkileyen ve en sık görülen demens türüdür. Hastalık tanımlandığından beri patolojisi bilinmesine rağmen yapılan araştırmalar, bilinen bu patolojinin dışında hastalığın ilerlemesine neden olan ve hızlandıran birçok yolak olduğunu ortaya koymuştur (Chopra vd., 2022). Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte yeni tanı ve tedavi yöntemleri arayışı artmış ve araştırmalar monoterapileri geride bırakarak çoklu tedavi yöntemleri geliştirmek üzerine evrilmiştir (J. L. Cummings vd., 2024). Nanoteknoloji bu konuda araştırmacılara yeni bakış açıları katmış ve gerek tanı gerek tedavide yeni soluk getirmiştir. Bu tez çalışmasında Alzheimer hastalığı modellenen (amiloid oligomer toksisitesi oluşturularak) SH-SY5Y hücrelerinde çift terapötik ajanın etkisi araştırılması amaçlanmıştır. Nanoteknoloji sayesinde terapötik ajanlardan birinin (NAC) hastalık üzerindeki etkisinin artırılması; peptitlerle fonksiyonellendirilerek (B6 ve QSH peptitleri) hem beyni hem de hastalığa neden olan amiloid plakları hedeflemesi sağlanmıştır. İkinci terapötik ajan olan EPPS kullanılarak amiloid yükün hafifletilmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışmasında AH tedavisi için araştırılan ajanlardan biri olan NAC'ın analitik tayini HPLC ile sağlanmış ve valide edilmiştir. Daha sonra NAC yüklü B6-QSH nanopartikül hazırlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Analitik yöntem validasyonunda yöntemin uygunluk, doğruluk, kesinlik ve seçicilik kriterleri açısından uygun olduğunu ortaya koymuştur. Polimer sentezi ve nanopartikül karakterizasyonu sonuçları, nanopartikülün agramada olmadığını, stabil kalabildiğini, ilacın verimli bir şekilde enkapsüle edildiğini ve kontrollü bir şekilde salım sağladığını göstermiştir.

NAC'ın kantitatif tayini için ICH Q2(R1) ve güncel Q2(R2) kılavuzları dikkate alınarak sistem uygunluğu, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, özgünlük ve duyarlılık açısından biçimde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, yöntemin hem serbest NAC çözeltilerinde hem de polimerik nanopartikül formülasyonlarında NAC miktar tayini için amaca ve gerekliliklerle uygun olduğunu göstermektedir (ICH,2023).

Sistem uygunluğu değerlendirildiğinde, 500 ppm'lik standart NAC çözeltisinin ardışık altı enjeksiyonunda alıkonma süresinin yaklaşık 6,9 dakikada tek ve belirgin bir pik olarak elde edilmesi, kromatografik koşulların kararlı olduğunu göstermiştir. Alıkonma süresine

%BSS'nin %2'den düşük olması sistemin stabil olduğunu ve tekrarlanabilir olduğunu gösterirken ve pik alanına ait %BSS'nin %1'in altında olması enjeksiyon ve dedeksiyonun iyi olduğunu göstermiştir. Özellikle pik alanı açısından ICH ve güncel uygulamalarda kantitatif yöntemler için önerilen <%2 değişkenlik sınırlarını rahatlıkla karşıladığını ortaya koymaktadır (Bhujbal vd., 2024). Literatürde NAC için geliştirilen diğer HPLC yöntemlerinde de sistem uygunluğu için benzer düzeyde düşük değişkenlikler rapor edilmiş olup, bu çalışmadaki sonuçlar söz konusu çalışmalarla uyumludur (Gowda vd., 2020; Özen & Nemutlu, 2024).

Doğrusallık, 5–500 ppm konsantrasyon aralığında elde edilen pik alanlarının değerlendirilmesiyle gösterilmiş ve kalibrasyon doğrusuna ait regresyon denklemi $y = 13327x + 16077$, determinasyon katsayısı ise $r^2 = 0,9999$ olarak bulunmuştur. Bu değer yakın dönemde yayımlanan HPLC validasyon çalışmalarında kantitatif analizler için kabul gören $r^2 \geq 0,99$ kriterini karşılayarak belirlenen konsantrasyonlarda doğrusal ilişki sağlandığını göstermektedir (Bhujbal vd., 2024; Özen & Nemutlu, 2024). Ayrıca, çalışma aralığının 5–500 ppm olarak belirlenmesi, NAC'ın hem düşük hem de yüksek derişimli çözeltilerinin aynı yöntemle güvenilir biçimde izlenmesine olanak verir (Gowda vd., 2020; Özen & Nemutlu, 2024).

Doğruluk değerlendirmesi, 50, 200 ve 500 ppm hazırlanan standart çözeltilerin geri kazanımının incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Tüm seviyelerde geri kazanım yüzdelерinin %98–100 arasında değişmesi ve %BSS değerlerinin %0,570'in altında kalması, yöntemin farklı konsantrasyonlarda doğru sonuçlar verdiğini göstermiştir. Küçük moleküllerin kantitatif tayininde genellikle %98–102 aralığında geri kazanım ve %2'nin altında bağıl standart sapma kabul edilebilir sınırlar olarak belirtilmektedir (Bhujbal vd., 2024). Doğruluk bulguları mevcut literatürle uyumluluk göstermektedir. (Gowda vd., 2020; Özen & Nemutlu, 2024; Primas vd., 2023).

Kesinlik bulguları, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, farklı günler ve araştırmacılarla yapıldığında, oldukça yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmacılar arası kesinlik çalışmalarında 100 ppm çözeltiler için hesaplanan %BSS değerlerinin her iki analistte de %0,2'nin altında olması, yöntemin rutin uygulamalarda güvenilir olduğunu göstermiştir. NAC gibi küçük moleküllere ait validasyon çalışmalarında, tekrarlanabilirlik ve %BSS

değerlerinin çoğunlukla <%2 şekilde rapor edildiği göz önüne alındığında sonuçlar iyi bir analitik performansgöstermektedir (Bhujbal vd., 2024; Özen & Nemutlu, 2024).

Yöntemin özgünlük ve seçiciliği, NAC içermeyen boş nanopartikül formülasyonlarının ile NAC stok çözeltisinin karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Boş nanopartikül örneklerinde, NAC'ın karakteristik alıkonma süresi olan yaklaşık 6,7–6,9 dakika civarında herhangi başka bir pik gözlenmemesi ve boş nanopartikül ile piklerin farklı yerlerde gözlenmesi yöntemin özgünlüğünü göstermektedir. (Gowda vd., 2020).

Duyarlılık açısından, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,015 ve 0,046 µg/mL olarak hesaplanması, yöntemin düşük konsantrasyondaki NAC tayini için uygun olduğunu göstermiştir. NAC ve ilişkili bileşiklere yönelik son HPLC çalışmalarında LOD değerlerinin çoğunlukla 0,02–0,1 µg/mL aralığında bildirildiği göz önüne alındığında, bu çalışmadaki LOD/LOQ değerleri sistemin yüksek duyarlılığa sahip olduğunu anlatmaktadır (Gowda vd., 2020; Özen & Nemutlu, 2024). Bu durum NAC yüklü nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi, *in vitro* salım profili ve hücre kültürü ortamlarındaki kalan serbest ilaç miktarlarının izlenmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Serbest NAC uygulamasının merkezi sinir sistemi hastalıkları için düşük biyoyararlanım gibi sınırlamaları vardır. Tez çalışmasında bu farmakokinetik engelleri aşmak amacıyla NAC polimer yapı (mPEG-PLGA) ile enkapsüle edilmiş ve B6/QSH peptitleri ile hedeflendirilmiştir. Bunun için öncelikle 3 basamaklı polimer sentezi, sonrasında peptidlerle fonksiyonelleştirme gerçekleştirilmiştir.

mPEG modifikasyonu ile immun sistemten kaçarak dolaşımında daha uzun süre kaldığı bildirilmiştir. PLGA ise biyoyumlu ve biyobozunur özellikte bir polimerdir (Zhi vd., 2021). Literatürde PEG-PLGA temelli sistemlerin biyoyumlu ve kolay fonksiyonellendirilebilir olmasının araştırmacılar için sık tercih edilen bir sistem olduğu görülmüştür (Riccardi vd., 2021; Makadia & Siegel, 2011). mPEG-PLGA diblok kopolimerinin hazırlanması hem hidrofobik PLGA hem de hidrofilik PEG zinciri içeren, kan dolaşımında uzun süre stabil kalabilen bir nanopartikül iskeleti oluşturmuştur. Son yıllarda PEG-PLGA veya PLGA-PEG nanopartiküllerinin Alzheimer dahil nörodejeneratif hastalıklarda beyin hedefli ilaç iletiminde sıkça kullanıldığı

görülmektedir. Bu polimerlerin A β agregasyonunu, oksidatif stres ve nöroinflamasyonu azaltmada yarar sağladığı bilinmektedir (Elmahboub & Elkordy, 2024; L. Jin vd., 2025a; Yang vd., 2021a). PEG, protein kılıf oluşumunu ve bağışıklık sistemi tarafından hızlı temizlenmeyi sınırlarken; PLGA hidrofobik ilaç ve peptidlerin kontrollü salımına olanak tanımaktadır (El-Hammadi & Arias, 2022; Omidian vd., 2025).

Maleik anhidrit ile modifikasyon sonucu elde edilen mPEG-PLGA-MA, polimer omurgasına reaktif anhidrit/çift bağ içeren fonksiyonel gruplar kazandırılmıştır. Maleik anhidrit, polimerlerin sonradan fonksiyonlandırılması ve ilaç/peptid konjugasyonu için sık kullanılan birimlerden olup gerek PEG türevlerinde gerek farklı kopolimerlerde anhidrit halkasının nükleofilik aminlerle halka açılması üzerinden çok sayıda ilaç aktif maddesinin yapıya bağlanabildiği gösterilmiştir (Cakiral & Sakar, 2023; Güngör Ertuğral & Alkan, 2020). Böylelikle polimer üzerinde birden fazla bağlanma noktası oluşturularak daha fazla hedefleme yapılabilmesine imkân verilmiştir. Bu nedenle PLGA gibi polimer yapılar fonksiyonlandırma çalışmalarında daha sık tercih edilmektedir (El-Hammadi & Arias, 2022).

mPEG-PLGA-MA'nın hekzametilendiamin ile reaksiyonu sonucunda mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimeri elde edilmiştir. Diaminlerin maleik anhidrit türevleriyle yaptığı halka açılma reaksiyonu, polimer yapısına kararlı amid bağları ve serbest amino grupları kazandırılmıştır (Cakiral & Sakar, 2023; El-Hammadi & Arias, 2022). Böylece hem B6 hem de QSH peptitlerinin aynı anda bağlanabileceği bir polimer iskeleti oluşturulmuştur.

DLS verileri incelendiğinde 50:20 ve 40:20 polimer:NAC oranında hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutlarının 440–570 nm düzeyinde olması ve santrifüj sonrası redispersiyonun sağlanamaması, agregasyon eğiliminin güçlü olduğunu göstermiştir. PLGA kullanılan partiküllerde polimer konsantrasyonu ve organik faz oranının artmasıyla partikül boyutunda belirgin artış görülmesi ve PDI yükselmesi literatürde karşımıza çıkmaktadır (Lopez-Mitjavila vd., 2025; Sun vd., 2023).

Nanopartikül soğuk ortamda hazırlanması ve polimer miktarının 25:20 oranına düşürülmesi partikül boyutunu ~159 nm'ye, PDI değerinin 0,15'e inmesi ve zeta potansiyelinin –30 ile –35 mV aralığında stabilize olması, seçilen koşulların optimum olduğunu göstermiştir. Kan-beyin bariyeri hedefli polimerik nanopartiküller için

bariyerden geçebilmesi için 100–200 nm aralığında, PDI’nın 0,2’den düşük olması ve zeta potansiyelinin de –20 ile –40 mV arasında olması hem dolaşımda stabilite hem de KBB’den geçmek adına avantaj sağladığı bilinmektedir (Guler & Cam, 2023; Lopez-Mitjavila vd., 2025; Silva-Abreu vd., 2018; Yang vd., 2021b).

pH optimizasyonu sonuçlarına bakıldığında pH 4,8–6,8 aralığında partikül boyutunda belirgin bir değişiklik görülmemiş ama zeta potansiyeli giderek daha negatif hale gelmiştir. PLGA kullanılan nanopartiküllerde pH yükseldikçe yüzey yükünün daha negatif değerlere kaydığı, ancak boyut ve PDI üzerinde çok değişiklik olmadığı bildirilmiştir. (El-Hammadi & Arias, 2022; Yan vd., 2023).

Peptit konjugasyonu sonrası elde edilen verilerde B6-QSH çiftli hedefleme peptitlerinin nanopartikülün DLS sonuçlarını çok fazla değiştirmedğini göstermiştir. Boş mPEG-PLGA-MA-NH₂ nanopartiküllerinde B6-QSH konjugasyonu sonrası partikül boyutunun ~73 nm’den ~94 nm’ye, NAC yüklü formülasyonda ise ~158 nm’den ~155 nm civarında olması, PDI değerlerinin 0,12–0,25 aralığında kalması ve zeta potansiyelinin yalnızca çok az değişmesi göstermiştir ki agra olmayan stabil bi nanopartikül oluşturulmuştur. Bu özelliklerin beyin endotel hücrelerine bağlanma ve transitoz yoluyla geçişi kolaylaştırdığı belirtilmektedir (Koga-Batko vd., 2025; Z. Liu vd., 2013; Qian vd., 2025).

B6 peptidi, transferrin benzeri KBB taşıyıcılarına veya klatri aracılı endositozla beyne geçişi sağlar. Alzheimer modellerinde PEG-PLA/PLGA nanopartiküllerinin beyin akümüasyonunu anlamlı düzeyde artırdığı gösterilmiştir (Hanumanthappa vd., 2024; Islam vd., 2020; Koga-Batko vd., 2025; Qian vd., 2025). QSH peptidi ise A β 42’ye yüksek afinite ile bağlanabilir. QSH içeren nanopartiküllerin amiloid birikimini azaltarak bilişsel iyileşme sağladığı ortaya konmuştur (Kamla vd., 2021; Mashal vd., 2022; Ntondini vd., 2025b; Tutubala vd., 2025b). Son yıllardaki çalışmalar, KBB geçişini hedefleyen ve ikincil bir hedefi olan peptitlerin daha yüksek beyin tutulumu ve daha güçlü anti-amiloid etkinlik sağladığını vurgulamaktadır (Elmahboub & Elkordy, 2024; Mashal vd., 2022; Qian vd., 2025).

FITC kalibrasyon eğrisinin ($R^2 = 0,9995$) yüksek doğrusal korelasyon göstermesi hem peptitlerin hem de nanopartiküllerin hücre alım ve doku dağılım çalışmalarında floresan sinyalin kantitatif olarak yorumlanmasına imkân tanımıştır. Peptit yüklü PLGA

nanopartiküllere ilişkin yakın tarihli çalışmalar da benzer şekilde floresan işaretleyicilerin kalibrasyonuna dayalı yarı kantitatif alım analizlerinin, farklı yüzey modifikasyonlarının biyolojik performansını karşılaştırmada kritik öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır (Hamdallah vd., 2024; Omidian vd., 2025).

Elde edilen polimer ve NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartikül karakterizasyonları FT-IR, NMR, GCP, DSC, DLS ve STEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. FT-IR sonuçları, çoklu sentez basamağındaki fonksiyonel grup dönüşümlerinin gerçekleştiğini net biçimde göstermiştir. PLGA'da 1759 cm⁻¹'deki ester C=O bandı, 1100–1170 cm⁻¹ civarındaki C–O gerilme titreşimleri ve 1450–1400 cm⁻¹ bölgesindeki C–H bükülme bantları literatürde tanımlanan PLGA spektrumuyla uyumludur (Guo vd., 2023). mPEG eklenmesiyle 2920–2850 cm⁻¹ metilen gerilme bantlarında ve 1129–1093 cm⁻¹ eter bağlarına ait bantlarda artış gözlenmesi, PEG blokunun PLGA omurgasına başarıyla bağlandığını göstermektedir; benzer bant yoğunluğu artışları PEG-PLGA kopolimerleri için daha önce bildirilmiştir (Guo vd., 2023; Y. Li vd., 2025).

Maleik anhidrit modifikasyonu sonrası ortaya çıkan 1629 cm⁻¹ civarındaki yeni bant, anhidrit halkasına ve C=C yapısına özgü titreşimlerle uyumludur ve mPEG-PLGA-MA oluşumunu desteklemektedir (Kassem vd., 2020). Aminasyon sonrasında 1673–1520 cm⁻¹ aralığında belirginleşen Amide II bantları ve 898–830 cm⁻¹ bölgesindeki NH düzlem dışı titreşimleri, halkası açılmış MA grubunun HMDA ile reaksiyonu sonucu amid bağları oluştuğunu doğrulamıştır. Peptit konjugasyonu sonrası mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH spektrumunda 3730 cm⁻¹'de peptitlerin NH/OH gerilmeleri, 3004 cm⁻¹'de lizine özgü NH₃⁺ titreşimi, 1569–1517 cm⁻¹'de genişleyen Amide II bantları ve 861–775 cm⁻¹'de sistein kaynaklı C–S gerilmeleri yalnızca konjuge yapıda gözlenmiştir. Bu, B6 ve QSH peptitlerinin polimere kovalent olarak bağlandığına dair güçlü spektral kanıt sağlamaktadır. Benzer şekilde, peptit-konjuge PEG-PLGA sistemlerinde aromatik halka ve C–S bantlarının ortaya çıkması peptit varlığının göstergesi olarak rapor edilmiştir (Qian vd., 2025). NMR sonuçları da FT-IR bulgularını desteklemektedir.

GPC analizlerinde PLGA, mPEG-PLGA-MA-NH₂ ve mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH yapıları arasında Mn ve Mw değerlerinin 8–10 kDa aralığında kalması ve PDI değerlerinin 1.02–1.18 gibi dar bir aralıkta bulunması, modifikasyon basamaklarının

polimer zincirinde belirgin bir degradasyon veya çapraz bağlanmaya yol açmadığını göstermiştir. PLGA nanopartiküllerinde, PDI'nin 1.2'nin altında olması iyi kontrol edilmiş bir polimerizasyon süreci olarak kabul edilmektedir (Garms vd., 2021; Guo vd., 2023).

DSC analizlerinde NAC yüklü tüm formülasyonlarda ilaç kristal erime pikinin ($T_m \approx 118$ °C) kaybolması, NAC'ın polimer matrisi içinde amorf ve moleküler düzeyde dağıldığını göstermiştir. PLGA ve PEG-PLGA taşıyıcılarına yüklenen NAC ve diğer küçük moleküller için benzer şekilde erime pikinin kaybolduğu ve bunun, polimer-ilac etkileşimlerinin güçlü olduğunu ve kontrollü salım potansiyelini artırdığını gösterdiği rapor edilmiştir (Costa vd., 2025; Pinto vd., 2021; Puri vd., 2022). Tg değerinin PLGA-PEG/NAC için -16.65 °C'den, mPEG-PLGA-MA-NH₂/NAC için -14.09 °C'ye ve çift peptitli mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH/NAC için -6.25 °C'ye yükselmesi, fonksiyonel grupların ve peptitlerin zincir hareketliliğini kısıtladı şeklinde yorumlanmıştır. Bu artış uzun süreli salımı destekleyen bir parametre olarak değerlendirilebilir. Benzer Tg kaymaları peptit veya fonksiyonel grup modifikasyonu yapılmış PLGA sistemlerinde de bildirilmiştir (Y. Li vd., 2025).

DLS ve STEM verileri birlikte değerlendirildiğinde, NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinin yaklaşık 150–160 nm çapta, düşük PDI ve ~ -33 mV düzeyinde negatif zeta potansiyelle karakterize olduğu gösterilmiştir. STEM görüntülerinde 2 boyutlu düzlemde küresel/dairesel morfoloji görülmesi ve incelenen alanlarda agregasyon eğiliminin olmaması, nanoçöktürme yönteminin optimize olduğunu ve homojen partiküller ürettildiğini göstermiştir. PEG-PLGA kullanılan ve peptid ile modifiye edilmiş beyin hedefleyici nanopartiküllerde 80–200 nm aralığındaki boyutların kan-beyin bariyeri (KBB) geçişi ve beyin dokusunda birikim için optimal olduğu, PEG zincirinin ise dolaşım süresini uzattığı bildirilmiştir (Abbas, 2021; Hanumanthappa vd., 2024; L. Liu vd., 2025b). B6/QSH eklenmesi sonrası partikül boyutunun ve PDI değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde kalması, çift peptitli yapıların yüzeyde fazladan agregasyona yol açmadığı şeklinde yorumlanmaktadır.

NAC gibi aşırı hidrofilik ve düşük molekül ağırlıklı bir antioksidanın, hidrofobik PLGA çekirdeğine yüksek oranda enkapsüle edilmesi literatürde genellikle güç olarak bildirilmişken, bu çalışmada 25:10 polimer:NAC oranında %90'ın üzerinde, B6/QSH

konjugasyonu sonrası da yaklaşık %83 enkapsülasyon verimi elde edilmesi önemli bir literatür katkısı olarak görülmektedir (Pinto vd., 2021; Puri vd., 2022).

Salım profili analizinde serbest NAC'ın ilk 30 dakikada neredeyse tamamen ortama geçmesi, NAC'ın yüksek hidrofilik yapısı ile uyumlu bir davranıştır. Buna karşılık, NAC yüklü mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6/QSH nanopartiküllerinde 8 güne uzanan kademeli ve kontrollü bir salım profili elde edilmiştir. Alzheimer tedavisi açısından bakıldığında, oksidatif stres ve nöroinflamasyonu hedefleyen NAC gibi moleküllerin beyin dokusuna kontrollü ve uzun süreli verilmesi, doz aralıklarının seyreltilmesi ve sistemik yan etkilerin azaltılması açısından avantaj sağlamaktadır (L. Liu vd., 2025b; Pinto vd., 2021). Tez kapsamında oluşturulan B6/QSH çift hedefleme yapısı, bu kontrollü salımı beyinde hem KBB geçişi hem de A β birikim bölgelerine yönlendirme potansiyeli ile birleştirerek klasik NAC uygulamalarına göre önemli bir üstünlük sunmaktadır.

Nanopartikülün kontrollü ve uzun salım yapmasının yanı sıra yapı stabilitesini korumada yüksek önem göstermektedir. PBS ortamında 24 saate kadar partikül boyutu ve zeta potansiyeli büyük ölçüde korunmuştur. Nanopartiküllerin koloidal olarak kararlı olduğunu göstermektedir. DMEM ve özellikle %50 FBS içeren DMEM ortamlarında zamanla gözlenen boyut ve PDI artışı ise, serum proteinlerinin nanopartikül yüzeyine adsorpsiyonuna bağlı protein taç oluşumu ile uyumlu görülmüştür. PLGA ve PEG-PLGA nanopartikülleri için FBS içeren ortamda boyut artışı ve zeta potansiyelinin mutlak değerinde azalma, proteinlerde taç oluşumunun tipik göstergeleri olarak tanımlanmıştır (Spinelli vd., 2025; Tekie vd., 2020). Bu durum bir yandan biyolojik gerçekliği yansıtırken diğer yandan B6/QSH yüzeyinin proteinlerle kaplanmasının hücre alım ve hedefleme verimliliğini değiştirebileceğini düşündürmektedir.

Liyofilizasyon sonrası redispersiyon verileri, trehaloz konsantrasyonunun kritik bir parametre olduğunu ortaya koymuştur. %5 ve %10 trehaloz kullanılan gruplarda belirgin agregasyon ve PDI artışı gözlenirken, %15 trehalozda partikül boyutunun yaklaşık 150 nm civarında korunması ve PDI'nin düşük kalması, bu konsantrasyonun optimum olduğunu göstermiştir. Trehalozun, hem protein hem de polimerik nanopartikül sistemlerinde cam oluşturan ve hidrojen bağları yoluyla yapısal suyu stabilize eden bir kriyoprotektan olarak en etkin şekerlerden biri olduğu, ancak optimum konsantrasyonun formülasyonun bileşimine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Gatto & Najahi-Missaoui,

2023; Umerska vd., 2018). %20 trehalozda gözlenen boyut artışı ve PDI yükselmesi, yüksek şeker konsantrasyonlarında artan viskozite ve partiküller arası etkileşimlerin agregasyonu kolaylaştırabileceğini düşündürmekte olup, Gatto ve ark.'nın nanoformülasyonlarda yüksek trehaloz derişimlerinin her zaman ek bir fayda sağlamadığına ilişkin bulgularıyla uyumludur (Gatto & Najahi-Missaoui, 2023).

UV ile 15 dakikalık sterilizasyon sonrasında B6/QSH içeren NAC yüklü nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyelinde anlamlı değişiklik gözlenmemesi ve agar kültürlerinde herhangi bir mikrobiyal üremeye rastlanmaması, uygulanan sterilizasyon yönteminin etkili olduğunu göstermiştir. PLGA ve PCL nanopartiküller üzerinde yapılan çalışmalar, uygun doz ve sürede uygulanan UV sterilizasyonunun partikül boyutu ve yüzey yükü üzerinde minimal etki yarattığını ve steriliteyi sağladığını bildirmektedir. Bununla birlikte, UV ışığının polimer zincirlerinde uzun süreli veya yüksek dozda maruziyette degradasyona yol açabileceği de bilinmektedir (Galicia-Gonzalez vd., 2021).

Sentezlenen nanopartiküllerin ve EPPS ile oluşturulan kombine terapinin *in vitro* ortamda etkilerine bakabilmek için; SH-SY5Y hücrelerinde Alzheimer'a yakın model oluşturmak adına amiloid oligomer toksisitesi oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan A β 1-42 HFIP peptidi stok solüsyonu NH₄OH ile hazırlanmış ve stok solüsyondan gerekli miktar kullanılarak 4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonucunda, ağırlıklı olarak düşük molekül ağırlıklı A β 42 oligomerlerinin üretildiği; Bis-ANS fluoresansındaki artışı ve SDS-PAGE'de monomer-trimer-tetramer bantları ile doğrulanmıştır. SH-SY5Y hücrelerinde 10 μ M ve üzerindeki dozlarda canlılığın %50'nin altına düşmesi ve nöronal uzantıların belirgin kısalması, yıldızimsı yapıların bozulması, oluşturulan modelin oligomer kaynaklı nörotoksisiteyi yansıttığını göstermektedir. Bu durum, Alzheimer patogeneğinde sinaptik disfonksiyon ve hücre ölümünden sorumlu düşük moleküler ağırlıklı oligomer popülasyonu ile uyumludur (Ashe, 2020). Dolayısıyla sonraki deney aşamalarında 10 μ M A β 42o'nun kullanılması hem ölçülebilir düzeyde toksisite oluşturması hem de klinik olarak erken / orta evreyi andıran bir stres yükü sağlaması açısından kullanılması uygun bulunmuştur.

Serbest NAC hücre canlılığı analizlerinde bir noktaya kadar artan canlılığın bir eşik değeri aşıldıktan sonra düşmeye başladığı görülmüştür. NAC'ın glutatyon sentezini

artırıp mitokondriyal ROS'u baskıladığı ve A β ile ilişkili oksidatif hasara karşı nöronları koruduğu daha önce farklı modellerde gösterilmiştir (Kam vd., 2020; J. Liu vd., 2025a). Yapılan deneylerde 10 μ M A β 42o'ya maruz kalan hücrelerde canlılığın ~%40'a indiğini, 1–10 mM NAC ile ise %150–250 aralığına yükselttiği görülmüştür. Bu durum için NAC'ın oligomer kaynaklı oksidatif stresi ortamını dağıttığı ve proliferasyonu hızlandığı şeklinde yorumlanmıştır. NAC'ın varlığı, doğru dozda, hücrede amiloid oligomer toksisitesinin yarattığı dengesizliği tekrar dengeye getirmiştir. 20 mM üzeri konsantrasyonlarda hücre dengesini tekrar bozarak sitotoksik bir özellik kazandığını literatür ile paralel bir şekilde görülmüştür (J. Liu vd., 2025b). Bu nedenle, oligomer toksisitesini baskılamak için optimum NAC doz olarak 10 mM tercih edilmiştir. EPPS ile yapılan hücre canlılığı analizinde, 0.002–0.2 mM aralığında hücre canlılığının kontrol düzeyinde seyrettiği görülmüştür. Bu durum EPPS'nin hücreler için bu doz aralıklarında güvenli olduğunu göstermiştir.

A β oligomerlerinin oluşturduğu fibrillerin Alzheimer hastalığındaki temel toksik türler olduğu ve özellikle düşük moleküler ağırlıklı oligomerlerin sinaptotoksinite açısından kritik rol oynadığı literatürde yaygın olarak bildirilmektedir (Haass & Selkoe, 2007; Benilova et al., 2012). Literatürde A β oligomerlerinin toksisitesinin büyük ölçüde β -yaprak stabilizasyonu ve oligomer–oligomer etkileşimlerine bağlı olduğu bildirilmektedir (Benilova et al., 2012; Haass & Selkoe, 2007). Çalışmanın bu kısmında EPPS'nin küçük oligomerik formlarla daha yüksek etkileşim skorları göstermesi, EPPS'nin A β agregasyon sürecinin erken basamaklarında etkili olabileceği hipotezini desteklemektedir. EPPS'nin A β fibrillerini ve oligomerlerini destabilize edebildiği daha önce in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (Kim et al., 2015).

Elde edilen yapısal veriler, EPPS'nin A β oligomerleri ile doğrudan etkileşime girebildiğini ancak bu etkileşimin QSH peptid destekli sistemlerde belirgin şekilde güçlendiğini ve peptidlerin EPPS'nin A β 'ya bağlanmasını kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir. QSH'nin varlığında EPPS'nin β -yaprak yüzeylerine daha düzenli ve çok noktalı bağlanması, bu peptidin EPPS için bir tür yapısal yönlendirici veya stabilizatör rolü üstlenebileceğini düşündürmektedir. 8:8:8 ve 10:8:8 oranlı modellerde, ligand ve peptidlerin oligomerik çekirdeği çevrelemesi, A β agregasyonunun ileri basamaklarını engelleyebilecek bir mekanizmaya işaret etmektedir. Böylece fibril

oluşumu erken aşamada daha globüler ve kararlı yapıların oluşumuyla engellenebilir ya da oluşmuş fibrillerin yapısı daha küçük yapılar oluşturmak üzere bozulabilir. Bu bulgular, EPPS–QSH kombinasyonunun tek başına EPPS’ye kıyasla daha etkili anti-agregasyon sağlayabileceğini göstermiştir.

SynergyFinder+ ile yapılan analizde, NAC–EPPS kombinasyonunun ZIP modeline göre ortalama 5.62, Bliss modeline göre –0.35 skor vermesi; kombinasyonun additif olduğunu, iki molekülün birlikte uygulanması proliferatif açıdan A β 42o toksini azalttığı ancak tek başlarına var olan etkinin üzerine çıkılamadığını işaret etmiştir. İnhibisyon yüzdelere dayalı ısı haritasında tüm değer negatif bölgede yer almaktadır. Bu durum EPPS-NAC kombinasyonlarının inhibisyon yerine hücre canlılığını artırdığını göstermiştir. Özellikle yüksek NAC dozlarında, EPPS ile birlikte uygulandığında en düşük inhibisyon ya da en yüksek canlılık değerlerinin elde edilmesi, moleküllerin birbirinden bağımsız işlevlerini gerçekleştirebildiklerini, birbirlerini negatif etkilemediklerini göstermiştir. Bununla birlikte, bazı noktalarında gözlenen negatif bölgeler, yüksek NAC dozlarının EPPS’nin amiloid çözündürme kapasitesiyle yarışabilecek redoks değişiklikleri veya hücre adaptasyon yanıtları oluşturabileceği ihtimali göz ardı etmemek gerektiğini düşündürmüştür (S. Zheng vd., 2022). Genel olarak, NAC–EPPS kombinasyonu güçlü bir sinerjistik pik göstermese de oligomer temelli toksisite modelinde hücre proliferasyonunu iyileştiren additif bir koruma sağlamıştır.

NAC nanopartikülünde B6 ve QSH peptitleriyle fonksiyonlandırılmış olması tezin önemli noktalarından biridir. B6 peptidi, kan-beyin bariyerinde transferrin reseptörü benzeri taşıyıcıları hedefleyerek beyin endotelini aşan nanopartiküller geliştirilmesinde sık kullanılan bir ligand olup, son yıllarda Alzheimer odaklı hedeflendirilmiş nanotaşıyıcı sistemlerinde sıkça göze çarpmaktadır. QSH ise A β ’ye özgü bağlanma kapasitesine sahip sekanslardan türetilmiş, özellikle oligomerik/toksik türlere afinitesi olan hedefleme peptitleri arasında yer almaktadır (L. Liu vd., 2025a). B6-QSH-NAC-NP formülasyonu hem KBB’yi hedefleyen hem de patolojik A β birikim bölgelerine yönlenebilen, aynı zamanda antioksidan NAC taşıyan çok işlevli bir platform sunmaktadır.

Oligomer uygulanmamış hücrelerde 6.25–25 μ g/mL aralığında hücre canlılığının kontrol grubunun üzerinde seyretmiş olması; A β 42o toksisitesi altında ise aynı doz aralığında canlılığın %130–150 seviyelerine çıkması, nanopartikül sisteminin oligomer kaynaklı

stres altında olumlu bir etki sağladığını göstermiştir. Bu sonuç, NAC'ın polimerik veya lipid bazlı nanotaşıyıcılarla enkapsüle edildiğinde oksidatif stres modellerinde koruyucu etkinliğinin arttığını gösteren çalışmaları desteklemektedir (L. Liu vd., 2025a).

Yüksek nanopartikül dozunda (75 µg/mL) canlılıktaki düşüş, partikül aşırı yüklenmesinin fiziksel stres ve olası endositoz aşırı yükü yoluyla toksisiteye yol açabileceğini düşündürmüştür. Bu durum, nanopartikül temelli sistemlerde sıklıkla vurgulanan U-şekilli canlılık şablonu ile uyumludur.

B6/FITC-QSH-NAC-NP'nin karakterizasyon ve canlılık analizleri sonrası B6 ve QSH peptidleri ile kan beyin bariyerini geçerek amiloid plakları hedeflediğinin gösterilmesi için 5XFAD farelere verilmiş ve verildikten 1 saat sonra saksifikasyon gerçekleştirilerek beyin dokuları toplanmıştır. Hipokampal bölgeden alınan koronal kesit immünohistokimya analizi için anti-oligomer anikoru ile boyanmış ve görüntüleme yapılmıştır. Kesitte görülen Hipokampal CA bölgesinde yeşil nanopartikül sinyali ve kırmızı oligomer sinyali görülmüştür. Bir saatlik uygulama sonrasında hipokampüste elde edilen güçlü nanopartikül sinyalleri, i.p uygulama sonrasında nanopartikülün kısa sürede dolaşıma katılarak beyne ulaştığı bilgisini de bize sunmuştur. Bu durum nanopartikülün KBB'den geçerek amiloidleri hedeflediğini net bir şekilde göstermiştir. Kesit incelendiğinde kırmızı amiloid oligomer sinyalleri hipokampal bölgede yoğun olacak şekilde kesitte bir yayılım göstermiştir. Benzer şekilde yeşil nanopartikül sinyallerinin de kesite dağılımı, oligomer sinyallerine yakın görülmüştür. Bu analiz B6/QSH peptidlerinin amaçlarını gerçekleştirdiğini, kan-beyin bariyerinden geçişin sağlandığını ve amiloid bölgelere yoğunluk sağladığını göstermiştir.

Aβ42 oligomer modelinin, Alzheimer hastalığında oksidatif stres, mitokondriyal hasar ve inflamatuvar yanıtı indüklediği; klinik bulgulardaki bilişsel kayıpla da daha güçlü korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (Fanlo-Ucar vd., 2024). Bu nedenle oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal fonksiyon üzerine elde edilen bulgular, özellikle düşük moleküler ağırlıklı Aβ42o türlerinin hücresel yanıtları nasıl şekillendirdiği açısından önem taşımaktadır.

TAS analizleri incelendiğinde Kontrol – Aβ42o – NAC – EPPS grafiğinde (Şekil 42) kontrole, uygulama yapılmayan sağlıklı hücrelere, kıyasla bütün gruplarda TAS

miktarında artış görülmüştür. A β 42o uygulanan hücrelerdeki artış; hücrelerin amiloid toksisitesine karşı öncü bir tepki gösterdiği (kompansatuvar etki) şeklinde yorumlanmıştır. Bu durum literatürde tanımlanan erken evre adaptif antioksidan yanıt ile uyumludur (Yu vd., 2022). Birçok çalışma A β oligomerlerinin ROS üretimini artırırken aynı zamanda Nrf2/hedef genleri ve endojen antioksidan sistemleri geçici olarak aktive edebildiğini bildirmektedir (Fanlo-Ucar vd., 2024).

Serbest NAC'ın amiloid oligomer toksisitesi altında TAS seviyesini ciddi bir şekilde arttırmış olması NAC'ın güçlü anti-oksidan özelliğini vurgulamış ve redoks düzenleyici profiliyle uyumlu bir sonuç vermiştir. NAC serbest radikaller üzerine doğrudan bir etki göstermesinin yanı sıra, substrat olarak ürettiği ürünlerle de hücre dengesini sağlamaya çalışmaktadır (Pocernich & Butterfield, 2012). Alzheimer modellerinde NAC'ın A β 'ye bağlı oksidatif hasarı azalttığı, nöronal canlılığı koruduğu ve bazı çalışmalarda A β üretimini dahi baskıladığı bildirilmiştir (Toshikawa vd., 2021). EPPS'nin tek başına TAS'ı arttırması, fakat bu artışın önemsenmeyecek ölçüde olması klasik bir antioksidan olmamasından kaynaklandığı ve temel etkisinin A β agregatlarını çözerek oligomer yükünü azaltma üzerinden dolaylı etki gerçekleştiği düşünülmüştür. Bu nedenle hücredeki antioksidan kapasitesine tek başına 24 saate yüksek bir etki göstermemiş olabileceği çıkarımında bulunulmuştur.

TAS seviyesi amiloid oligomer toksisitesi altında; (Şekil 42) serbest NAC varlığında anlamlı bir artış göstermiştir. Fakat EPPS ve NAC-B6-QSH-NP formülasyonunun TAS üzerindeki etkisi serbest NAC'a kıyasla daha ılımlı görülmüştür. Bu durum nanopartikülden kontrollü salım gerçekleştirmesi kaynaklı hücre içi NAC birikiminin zamana yayılması ile ilişkilendirilmiştir. NAC yüklü nanopartiküllerin, serbest formlara göre daha dengeli bir antioksidan artışı sağladığı, farklı nörodejeneratif modellerde bildirilmiştir (L. Jin vd., 2025b). Bu açıdan, *in vitro* ortamda gözlenen daha sınırlı TAS artışının, *in vivo* koşullarda antioksidan dağılım açısından avantaj oluşturabileceği düşünülmüştür.

SOD aktivitesi grafiği değerlendirildiğinde A β 42o uygulanan grubun, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Hücrelerin amiloid kaynaklı, kendi içlerinde artan süperoksit yükünü tamponlamak için SOD'un artışına neden olduğu durumlar bilinmektedir (Fanlo-Ucar vd., 2024). TAS analizinde olduğu gibi

kompanse edilebilir bir etki görülmüştür. Serbest NAC ve EPPS uygulamalarının, SOD aktivitesini düşürmesi; bu küçük moleküllerin, süperoksit oluşumunu azalttığı dolayısıyla enzim ihtiyacını ortadan kaldırdığı düşünülmüştür. NAC'ın Nrf2/ARE yolu üzerinden antioksidan enzim dengesini yeniden düzenlediği ve NF-κB aktivasyonunu baskılayarak ROS üretimini azalttığı farklı inflamatuvar modellerde gösterilmiştir (Jannatifar vd., 2020; Pei vd., 2018).

Amiloid toksisitesi altında NAC, EPPS ve B6-QSH-NAC-NP'nin SOD aktivitesi incelendiğinde (Şekil 44) tek başlarına NAC ve EPPS aynı şekilde enzim aktivitesini düşürürken EPPS ve B6-QSH-NAC-NP'nin kombine uygulanmasıyla birlikte yeniden yükseltmesinin farklı bir etki oluştuğunu ortaya koyduğunu göstermiştir. Nanopartikül formunda olan NAC'ın hücre içine zaman bağlı yavaş salınması, antioksidan kapasiteyi hemen yükseltmeyip, süperoksit üretiminin bir süre daha devam etmesini sağlamış olabileceğini göstermiştir. EPPS ve NAC-NP kombinasyonu sonucunda tekli uygulanan NAC ve EPPS'ye göre yüksek fakat oligomer uygulanmış hücrelere göre düşük aktivite görülmesi; EPPS'nin oligomerik yükü azaltmasıyla birlikte nanopartikül formunda yavaş salınan NAC'ın daha etkin bir şekilde redoks dengesini sağlayabildiğini düşündürmüştür.

IL-1β düzeyleri, düşük moleküler ağırlıklı Aβ oligomerlerinin yarattığı oksidatif stresin yanı sıra güçlü bir inflamatuvar yanıt da indüklediğini doğrulamıştır. Aβ oligomerlerinin nöronlar ve glial hücrelerde inflammatomunu aktive ettiği, bu yolla IL-1β salınımını artırdığı bilinmektedir. Aβ42o uygulamasını takiben IL-1β düzeylerinde gözlenen artış, oligomer kaynaklı inflamatuvar kaskadın erken aktivasyonu ile uyumlu görülmüştür.

Serbest NAC, EPPS ve NAC-NP'nin her birinin IL-1β seviyeleri anlamlı şekilde azaltması, inflamatuvar yanıtı farklı mekanizmalar üzerinden baskılayabildiğini göstermiştir. NAC'ın hem ROS temizleme hem de NF-κB sinyal yolunu baskılama yoluyla proinflamatuvar sitokin üretimini azalttığı; nöroinflamatuvar ve sistemik inflamatuvar modellerde IL-1β düzeylerini düşürdüğü çok sayıda çalışmada bildirilmektedir (Asani vd., 2025).

EPPS'nin IL-1β seviyesini düşürmesi toksik amiloid oligomerlerinin toksik olmayan formlara dönüştürerek amiloid yükü hafifletmesi kaynaklı olduğu düşünülmüştür (H. Y. Kim vd., 2015; Low vd., 2022). EPPS ile NAC kombinasyonunun IL-1β düzeyini

beklenmeyen bir şekilde arttırması, birlikte uygulanma durumunda NAC'ın EPPS ile beklenmeyen etkileşimi sonucu inflamatuvar yanıtı arttırmış olabileceği düşündürmüştür.

NAC-B6-QSH-NP'nin inflamasyon üzerindeki etkisi serbest NAC'a göre daha yüksek görünmesi inflamatuvar yanıt açısından nanopatikül oluşturulmasının bir avantaj sağladığını düşündürmektedir. Stres altında olan hücrede redoks dengesinin kurulamamış olması inflamatuvar yanıtın oluşmasına neden olabilir. Peptid ile hedeflendirilmiş polimerik nanopartiküllerin; hedefli bölgelerde daha yüksek lokal ilaç konsantrasyonu sağlayabileceği ve uzun vadede inflamasyonu etkin baskılayabileceği literatürde tartışılmaktadır (Abbas, 2021). Mevcut *in vitro* bulgular, EPPS ile NAC-NP kombinasyonunun, IL-1 β düzeylerinde belirgin azalma göstermesiyle bu yaklaşımı desteklemektedir.

A β oligomerlerinin mitokondriyal kalsiyum dengesini bozup, kompleks I/III fonksiyonlarını zayıflatarak mitokondriyal permeabilite geçiş gözeneklerini aktive ettiği iyi bilinmektedir (Fanlo-Ucar vd., 2024). NAC'ın ve çeşitli antioksidanların mitokondriyal membran potansiyelini koruyucu etkileri farklı modellerde gösterilmiş olsa da bu etkinin doz, süre ve uygulama zamanlamasına son derece duyarlı olduğu bildirilmiştir (L. Jin vd., 2025a). Mitokondriyel disfonksiyonun için membran potansiyeli analizi yapılmış ve oligomer toksisitesinin literatür ile uyumlu olarak membran potansiyelini düşürdüğü görülmüştür. Bu sonuç ayrıca amiloid toksisitesiyle oluşturulan modellemede bir diğer etken patogenizin, mitokondriyel disfonksiyonunda oluştuğunu göstermiştir. Amiloid toksisitesi altında uygulanan serbest NAC, bozulan redoks dengesini geri kazanmaya çalışmış; EPPS ise tek başına mitokondri fonksiyonunu iyileştirememiş ve hatta amiloid toksisitesine nazaran biraz daha membran potansiyelini düşürmüştür. Bu durumun EPPS'nin zwitteriyonik bir tampon olmasından ve ortamın iyonik dengesini değiştirmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bunların aksine EPPS ve NAC-B6-QSH-NP'nin birlikte uygulanması membran potansiyelinin geri kazandırılmasında, NAC'ın gösterdiği performansında üzerine çıkmıştır. EPPS'nin toksik yükü azaltması ve nanopartikülün ise uzaltılmış antioksidan salımı birbirini tamamlayıcı bir etki göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Mitokondriyel fonksiyonunun Alzheimer patolojisinde önemli bir rolü olduğu göz önüne alındığında bu durum umut vaad etmektedir.

A β 42 oligomerleri ile oluşturulan *in vitro* model; oksidatif stres, inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyonun Alzheimer patogenezindeki merkezi rolünü yeniden doğrulamıştır (Fanlo-Ucar vd., 2024). Serbest NAC, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile A β 42o kaynaklı oksidatif yükü ve sitokin yanıtını anlamlı ölçüde baskılamış; EPPS ise oligomer yükünü hedefleyerek bir iyileşme sağlamıştır. NAC-B6-QSH-NP formülasyonu, serbest NAC'a kıyasla daha kontrollü bir yanıt üretmiştir. Ayrıca B6 ve QSH peptidlerinin sağladığı hedefleme avantajları Alzheimer dahil nörodejeneratif hastalıklarda ve Alzheimer dışında meydana gelen amiloidozlarda umut vadeden bir aday olarak öne çıkmaktadır (Abbas, 2021).

EPPS ve NAC temelli yaklaşımların tekli uygulamalarda dahi düşük moleküler ağırlıklı A β 42o toksisitesine karşı anlamlı koruma sağlamaları; bu moleküllerin kombinasyonlarının oligomer yükünü azaltma, oksidatif stresi düzenleme ve inflamatuvar yanıtı baskılama açısından çok hedefli bir tedavi stratejisi sunduğunu göstermiştir.

6. ETİK KURUL



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2021/ 311
KONU: Sn. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI

20.12.2021

Sayın, Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI

“N-asetil Sistein (NAC) Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Alzheimer Hastalığı'ndaki Terapötik Etkisinin İn Vitro ve İn Vivo Modellerde Araştırılması” başlıklı projenize ait başvurunuz 20.12.2021 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Transgenik Fare	Fare
	Sayı	48	176

Prof. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Doç. Dr. Nispet ELİBOL
Üye

Doç. Dr. Özgün Yusuf ÖZYILMAZ
Üye

Doç. Dr. Remzi DOĞAN
Üye

Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER
Üye

KATILMAZ
Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI
Üye

Dr. Öğr. Üye. Özge PASİN
Üye

Vet. Hek. Mehmet ÇELİKTEKİN
Üye

Şerife ÇELİKTEKİN
Üye

Semra NİŞANCI
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

7.KAYNAKÇA

- Abbas, M. (2021). Potential Role of Nanoparticles in Treating the Accumulation of Amyloid-Beta Peptide in Alzheimer's Patients. *Polymers*, 13(7), 1051. <https://doi.org/10.3390/polym13071051>
- Alkhalifa, A. E., Alkhalifa, O., Durdanovic, I., Ibrahim, D. R., & Maragkou, S. (2025). Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: Insights into Pathophysiology and Treatment. *Journal of Dementia and Alzheimer's Disease*, 2(2), 17. <https://doi.org/10.3390/jdad2020017>
- Alshetaili, A., Almutairy, B. K., Alshehri, S. M., & Repka, M. A. (2021). Development and Characterization of Sustained-Released Donepezil Hydrochloride Solid Dispersions Using Hot Melt Extrusion Technology. *Pharmaceutics*, 13(2), 213. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020213>
- Asani, E., Hatami, H., Hamidian, G., & Hatami, S. (2025). Investigating the Effects of Niosome Curcumin on the Alteration of NF- κ B Gene Expression and Memory and Learning in the Prefrontal Cortex of Alzheimer's Rats. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-025-05148-1>
- Ashe, K. H. (2020). The biogenesis and biology of amyloid β oligomers in the brain. *Alzheimer's & Dementia*, 16(11), 1561-1567. <https://doi.org/10.1002/alz.12084>
- Ashleigh, T., Swerdlow, R. H., & Beal, M. F. (2023). The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Alzheimer's & Dementia*, 19(1), 333-342. <https://doi.org/10.1002/alz.12683>
- Atri, A., Frölich, L., Ballard, C., Tariot, P. N., Molinuevo, J. L., Boneva, N., Windfeld, K., Raket, L. L., & Cummings, J. L. (2018). Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA*, 319(2), 130. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.20373>
- Atri, A., Molinuevo, J. L., Lemming, O., Wirth, Y., Pulte, I., & Wilkinson, D. (2013). Memantine in patients with Alzheimer's disease receiving donepezil: New analyses of efficacy and safety for combination therapy. *Alzheimer's Research and Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/alzrt160>
- Batista, A. F., Khan, K. A., Papavergi, M.-T., & Lemere, C. A. (2024). The Importance of Complement-Mediated Immune Signaling in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 817. <https://doi.org/10.3390/ijms25020817>

- Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, 15(3), 349–357. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>
- Behl, C. (2024). In 2024, the amyloid-cascade-hypothesis still remains a working hypothesis, no less but certainly no more. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1459224>
- Bhujbal, S., Rupenthal, I. D., & Agarwal, P. (2024). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for assay of tonabersat in pharmaceutical formulations. *Methods*, 231, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2024.10.001>
- Bilski, R., Dąbkowski, S., Kozieł, I., Kozicki, M., Małachowska, A., Przygocki, M., & Tyska, O. (2025). Perspectives on Alzheimer's Disease Treatment Based on Counteracting Oxidative Stress. *Biomolecules*, 15(9), 1345. <https://doi.org/10.3390/biom15091345>
- Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Kokcu, Y., Bicak, B., Mutlu, H., & Ozel, A. E. (2018). Novel NAC-loaded poly(lactide-coglycolide acid) nanoparticles for cataract treatment: Preparation, characterization, evaluation of structure, cytotoxicity, and molecular docking studies. *PeerJ*, 2018(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.4270>
- Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., daSilva, L. L. P., Prabhu, Y., Hurley, J. H., & Bonifacino, J. S. (2010). Sorting of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein Mediated by the AP-4 Complex. *Developmental Cell*, 18(3), 425-436. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.015>
- Cakiral, K., & Sakar, D. (2023). Modification of poly(methyl vinyl ether – alt – maleic anhydride) with pregabalin drug active substance via ring opening polymerization of anhydride ring in/noncatalyst media. *Polymer Bulletin*, 80(7), 7687-7714. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04410-z>
- Cao, Y., & Zhang, R. (2022). The application of nanotechnology in treatment of Alzheimer's disease. İçinde *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (C. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1042986>
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. İçinde *Disease-a-Month* (C. 56, Sayı 9, ss. 484-546). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>
- Chaparro, C. I. P., Simões, B. T., Borges, J. P., Castanho, M. A. R. B., Soares, P. I. P., & Neves, V. (2023). A promising approach: Magnetic nanosystems for Alzheimer's disease theranostics. *Pharmaceutics*, 15(9), 2316. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092316>

- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. İçinde *Redox Biology* (C. 14, ss. 450-464). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chen, R., Chan, P.-T., Chu, H., Lin, Y.-C., Chang, P.-C., Chen, C.-Y., & Chou, K.-R. (2017). Treatment effects between monotherapy of donepezil versus combination with memantine for Alzheimer disease: A meta-analysis. *PLOS ONE*, 12(8), e0183586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183586>
- Chen, Y., Nan, Y., Xu, L., Dai, A., Orteg, R. M. M., Ma, M., Zeng, Y., & Li, J. (2025). Polystyrene nanoplastics exposure induces cognitive impairment in mice via induction of oxidative stress and ERK/MAPK-mediated neuronal cuproptosis. *Particle and Fibre Toxicology*, 22(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12989-025-00633-w>
- Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2007). Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28(5), 869-876. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.047>
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y.-S., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2001). Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits β -Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Neuron*, 30(3), 665-676. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00317-8)
- Chidambaram, S. B., Anand, N., Varma, S. R., Ramamurthy, S., Vichitra, C., Sharma, A., Mahalakshmi, A. M., & Essa, M. M. (2024). Superoxide dismutase and neurological disorders. İçinde *IBRO Neuroscience Reports* (C. 16, ss. 373-394). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.11.007>
- Choi, K.-E., Pae, A. N., & Cho, N.-C. (2025a). *Mechanistic Insights into the Disaggregation of Amyloid- β Fibrils by EPPS via Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7430721/v1>
- Choi, K.-E., Pae, A. N., & Cho, N.-C. (2025b). *Mechanistic Insights into the Disaggregation of Amyloid- β Fibrils by EPPS via Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7430721/v1>
- Chopra, H., Bibi, S., Singh, I., Kamal, M. A., Islam, F., Alhumaydhi, F. A., Emran, T. Bin, & Cavalu, S. (2022). Nanomedicines in the Management of Alzheimer's Disease: Current View and Future Prospects. İçinde *Frontiers in Aging*

- Neuroscience* (C. 14). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879114>
- Chowdhury, S., & Chowdhury, N. S. (2023). Novel anti-amyloid-beta (A β) monoclonal antibody lecanemab for Alzheimer's disease: A systematic review. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 37.
<https://doi.org/10.1177/03946320231209839>
- Chung, T. W., Wu, T. Y., Siah, Z. Y., & Liu, D. Z. (2022). Antioxidative NAC-Loaded Silk Nanoparticles with Opening Mucosal Tight Junctions for Nasal Drug Delivery: An In Vitro and In Vivo Study. *Pharmaceutics*, 14(6).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061288>
- Cinar, E., Mutluay, S. U., Baysal, I., Gultekinoglu, M., Ulubayram, K., Yabanoglu Ciftci, S., Tel, B. C., & Ucar, G. (2022). Donepezil-loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles Enhance the Learning and Memory Function of Beta-Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Archives of Neuropsychiatry*.
<https://doi.org/10.29399/npa.28275>
- Costa, M. P., Abdu, J. O. C., de Moura, M. F. C. S., Silva, A. C., Zacaron, T. M., de Paiva, M. R. B., Fabri, R. L., Pittella, F., Perrone, Í. T., & Tavares, G. D. (2025). Exploring the Potential of PLGA Nanoparticles for Enhancing Pulmonary Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 22(7), 3542-3562.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5c00118>
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), 37. <https://doi.org/10.1186/alzrt269>
- Cummings, J. L., Osse, A. M. L., Kinney, J. W., Cammann, D., & Chen, J. (2024). Alzheimer's Disease: Combination Therapies and Clinical Trials for Combination Therapy Development. *CNS Drugs*, 38(8), 613-624.
<https://doi.org/10.1007/s40263-024-01103-1>
- Cummings, J., Lee, G., Nahed, P., Kambar, M. E. Z. N., Zhong, K., Fonseca, J., & Taghva, K. (2022). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 8(1).
<https://doi.org/10.1002/trc2.12295>
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, 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>
- DeLano, W. L. (2002). *The PyMOL molecular graphics system*. San Carlos, CA: DeLano Scientific.

- De Mulder, W., & Kuiper, M. (2020). *A foundation for reference models for drug combinations with an application to Loewe's reference model*. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 460. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03771-4>
- Den Haan, J., Morrema, T. H. J., Verbraak, F. D., de Boer, J. F., Scheltens, P., Rozemuller, A. J., Bergen, A. A. B., Bouwman, F. H., & Hoozemans, J. J. (2018). Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas. *Acta neuropathologica communications*, 6(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0650-x>
- Dubois, B., von Arnim, C. A. F., Burnie, N., Bozeat, S., & Cummings, J. (2023). Biomarkers in Alzheimer's disease: role in early and differential diagnosis and recognition of atypical variants. *İçinde Alzheimer's Research and Therapy* (C. 15, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01314-6>
- El-Hammadi, M. M., & Arias, J. L. (2022). Recent Advances in the Surface Functionalization of PLGA-Based Nanomedicines. *Nanomaterials*, 12(3), 354. <https://doi.org/10.3390/nano12030354>
- Elmahboub, Y. S. M., & Elkordy, A. A. (2024). Polymeric nanoparticles: A promising strategy for treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 19(3), 549-565. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2024.04.004>
- European Medicines Agency. (2023). Guideline on quality of analytical procedures. <https://www.ema.europa.eu>
- Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chena, X., Liao, W., Jing, X., Lei, M., Tao, E., Ma, Q., Zhang, X., Guo, R., & Liu, J. (2018). Curcumin-loaded plga-peg nanoparticles conjugated with b6 peptide for potential use in alzheimer's disease. *Drug Delivery*, 25(1), 1044-1055. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1461955>
- Fanlo-Ucar, H., Picón-Pagès, P., Herrera-Fernández, V., ILL-Raga, G., & Muñoz, F. J. (2024). The Dual Role of Amyloid Beta-Peptide in Oxidative Stress and Inflammation: Unveiling Their Connections in Alzheimer's Disease Etiopathology. *Antioxidants*, 13(10), 1208. <https://doi.org/10.3390/antiox13101208>
- Fouquier, J., & Guedj, M. (2015). *Analysis of drug combinations: Current methodological landscape*. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(3), e00149. <https://doi.org/10.1002/prp2.149>
- Fedele, E. (2023). Anti-Amyloid Therapies for Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis. *İçinde International Journal of Molecular Sciences* (C. 24, Sayı 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241914499>

- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1-R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Firdous, S. M., Khan, S. A., & Maity, A. (2024). Oxidative stress-mediated neuroinflammation in Alzheimer's disease. İçinde *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03188-3>
- Galicia-Gonzalez, R. A., Ortega-Cerrilla, M. E., Nava-Cuellar, C., Miranda-Jiménez, L., Ramírez-Mella, M., & Ayala-Rodríguez, J. M. (2021). Nanoparticle sterilization methods for biomedical applications in animals. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i12.1844>
- Gao, L., Wang, J., & Bi, Y. (2025). Nanotechnology for Neurodegenerative Diseases: Recent Progress in Brain-Targeted Delivery, Stimuli-Responsive Platforms, and Organelle-Specific Therapeutics. *International Journal of Nanomedicine, Volume 20*, 11015-11044. <https://doi.org/10.2147/IJN.S549893>
- Garms, B. C., Poli, H., Baggley, D., Han, F. Y., Whittaker, A. K., A, A., & Grøndahl, L. (2021). Evaluating the effect of synthesis, isolation, and characterisation variables on reported particle size and dispersity of drug loaded PLGA nanoparticles. *Materials Advances*, 2(17), 5657-5671. <https://doi.org/10.1039/D1MA00410G>
- Gatto, M. S., & Najahi-Missaoui, W. (2023). Lyophilization of Nanoparticles, Does It Really Work? Overview of the Current Status and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14041. <https://doi.org/10.3390/ijms241814041>
- Gowda, A. P., Schaefer, A. D., & Schuck, T. K. (2020). A simple RP-HPLC method for the stability-indicating determination of N-acetyl-L-cysteine and N,N'-diacetyl-L-cysteine in cell culture media. *Cell and Gene Therapy Insights*, 6(2), 303-323. <https://doi.org/10.18609/cgti.2020.041>
- Guler, E., & Cam, M. E. (2023). The production of curcumin-loaded PLGA/PEG nanoparticle for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Research in Pharmacy*, 27(6)(27(6)), 2399-2404. <https://doi.org/10.29228/jrp.527>
- Guo, X., Zuo, X., Zhou, Z., Gu, Y., Zheng, H., Wang, X., Wang, G., Xu, C., & Wang, F. (2023). PLGA-Based Micro/Nanoparticles: An Overview of Their Applications in Respiratory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4333. <https://doi.org/10.3390/ijms24054333>

- Güngör Ertuğral, T., & Alkan, C. (2020). Synthesis and Characterization of Maleic Anhydride Modified Poly (Ethylene Glycol) as Polymeric Solid-Solid Phase Change Materials. *Sakarya University Journal of Science*, 24(5), 1023-1028. <https://doi.org/10.16984/sofenbilder.678545>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. İçinde *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (C. 8, Sayı 2, ss. 101-112). <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hamdallah, S. I., Zoqlam, R., Yang, B., Campbell, A., Booth, R., Booth, J., Belton, P., & Qi, S. (2024). Using a systematic and quantitative approach to generate new insights into drug loading of PLGA nanoparticles using nanoprecipitation. *Nanoscale Advances*, 6(12), 3188-3198. <https://doi.org/10.1039/D4NA00087K>
- Hanumanthappa, R., Parthasarathy, A., Heggannavar, G. B., PC, K., Nanjaiah, H., Kumbhar, R., & Devaraju, K. S. (2024). Recent advances in therapeutic strategies for Alzheimer's and Parkinson's disease using protein/peptide co-modified polymer nanoparticles. *Neuroprotection*, 2(4), 255-275. <https://doi.org/10.1002/nep3.60>
- Hardy, J. (2025). Alzheimer's Disease: Treatment Challenges for the Future. İçinde *Journal of Neurochemistry* (C. 169, Sayı 8). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.70176>
- Hu, L., Tao, Y., Jiang, Y., & Qin, F. (2023a). Recent progress of nanomedicine in the treatment of Alzheimer's disease. İçinde *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (C. 11). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1228679>
- Hu, L., Tao, Y., Jiang, Y., & Qin, F. (2023b). Recent progress of nanomedicine in the treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1228679>
- Ianevski, A., Giri, A. K., & Aittokallio, T. (2020). SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W488-W493. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa216>
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2023). *ICH Q2(R2) Guideline: Validation of Analytical Procedures*. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf
- Islam, Y., Leach, A. G., Smith, J., Pluchino, S., Coxonl, C. R., Sivakumaran, M., Downing, J., Fatokun, A. A., Teixidò, M., & Ehtezazi, T. (2020). Peptide based

- drug delivery systems to the brain. *Nano Express*, 1(1), 012002.
<https://doi.org/10.1088/2632-959X/ab9008>
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeblerlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., ... Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535-562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
- Jagaran, K., & Singh, M. (2021). Nanomedicine for Neurodegenerative Disorders: Focus on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9082. <https://doi.org/10.3390/ijms22169082>
- Jalouli, M., Rahman, M. A., Biswas, P., Rahman, H., Harrath, A. H., Lee, I.-S., Kang, S., Choi, J., Park, M. N., & Kim, B. (2025). Targeting natural antioxidant polyphenols to protect neuroinflammation and neurodegenerative diseases: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*, 16.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1492517>
- Jannatifar, R., Parivar, K., Hayati Roodbari, N., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). The Effect of N-Acetyl-Cysteine on NRF2 Antioxidant Gene Expression in Asthenoteratozoospermia Men: A Clinical Trial Study. *International journal of fertility & sterility*, 14(3), 171-175. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.44411>
- Jin, L., Nie, L., Deng, Y., Khana, G. J., & He, N. (2025a). The Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Carriers to Cells in Neurodegenerative Diseases. *Cell Proliferation*, 58(8). <https://doi.org/10.1111/cpr.13804>
- Jin, L., Nie, L., Deng, Y., Khana, G. J., & He, N. (2025b). The Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Carriers to Cells in Neurodegenerative Diseases. *Cell Proliferation*, 58(8). <https://doi.org/10.1111/cpr.13804>
- Jin, Y., Du, Q., Song, M., Kang, R., Zhou, J., Zhang, H., & Ding, Y. (2024). Amyloid- β -targeting immunotherapies for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 375, 346-365. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.09.012>
- Jokar, S., Khazaei, S., Esmailzadeh Gameshgoli, X., Khafaji, M., Yarani, B., Sharifzadeh, M., Beiki, D., & Bavi, O. (2020). Amyloid β -targeted inhibitory peptides for Alzheimer's disease: Current state and future perspectives. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's disease: Drug discovery* (Chap. 3). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch3>
- Kam, M. K., Lee, D. G., Kim, B., Huh, J.-W., Lee, H. J., Park, Y.-H., & Lee, D.-S. (2020). Amyloid-beta oligomers induce Parkin-mediated mitophagy by reducing

- Miro1. *Biochemical Journal*, 477(23), 4581-4597.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20200488>
- Kamla, P., Shashi Kiran, M., Amit, P., & Shiv, B. (2021). Nanocarriers for Alzheimer's disease: Research and patent update. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110301>
- Karimi Zarchi, A. A., Abbasi, S., Faramarzi, M. A., Gilani, K., Ghazi-Khansari, M., & Amani, A. (2015). Development and optimization of N-Acetylcysteine-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles by electrospray. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 764-770.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.004>
- Karimi Zarchi, A. A., Faramarzi, M. A., Gilani, K., Ghazi-Khansari, M., Ghamami, G., & Amani, A. (2017). N-acetylcysteine-loaded PLGA nanoparticles outperform conventional N-acetylcysteine in acute lung injuries in vivo. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(9), 443-454.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1236339>
- Kassem, L. M., Ibrahim, N. A., & Farhana, S. A. (2020). Nanoparticle Therapy Is a Promising Approach in the Management and Prevention of Many Diseases: Does It Help in Curing Alzheimer Disease? *Journal of Nanotechnology*, 2020, 1-8.
<https://doi.org/10.1155/2020/8147080>
- Kim, A. Y., Al Jerdi, S., MacDonald, R., & Triggle, C. R. (2024). Alzheimer's disease and its treatment—yesterday, today, and tomorrow. *Frontiers in Pharmacology*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1399121>
- Kim, H. Y., Kim, H. V., Jo, S., Lee, C. J., Choi, S. Y., Kim, D. J., & Kim, Y. (2015). EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid- β oligomers and plaques. *Nature Communications*, 6.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9997>
- Kim, H. Y., Kim, H. V., Lee, D. K., Yang, S. H., & Kim, Y. S. (2016). Rapid and sustained cognitive recovery in APP/PS1 transgenic mice by co-administration of EPPS and donepezil. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep34165>
- Kim, H. Y., & Kim, Y. (2024). Chemical-Driven Amyloid Clearance for Therapeutics and Diagnostics of Alzheimer's Disease. *Accounts of Chemical Research*, 57(22), 3266-3276. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.4c00458>
- Koga-Batko, J., Antosz-Popiołek, K., Nowakowska, H., Błażejewska, M., Kowalik, E. M., Beszlej, J. A., & Leszek, J. (2025). Nanoparticles as an Encouraging Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(16), 7725. <https://doi.org/10.3390/ijms26167725>

- Kömür, M., Kıyan, H. T., & Öztürk, A. A. (2025). Development of donepezil hydrochloride-loaded PLGA-based nanoparticles for Alzheimer's disease treatment. *Scientific Reports*, 15(1), 13184. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95792-3>
- Kwon, H. J., Cha, M. Y., Kim, D., Kim, D. K., Soh, M., Shin, K., Hyeon, T., & Mook-Jung, I. (2016). Mitochondria-Targeting Ceria Nanoparticles as Antioxidants for Alzheimer's Disease. *ACS Nano*, 10(2), 2860-2870. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08045>
- Lancheros, R., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2018). Improvement of N-Acetylcysteine Loaded in PLGA Nanoparticles by Nanoprecipitation Method. *Journal of Nanotechnology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3620373>
- LaRocca, T. J., Cavalier, A. N., Roberts, C. M., Lemieux, M. R., Ramesh, P., Garcia, M. A., & Link, C. D. (2021). Amyloid beta acts synergistically as a pro-inflammatory cytokine. *Neurobiology of Disease*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105493>
- La Barbera, L., Mauri, E., D'Amelio, M., & Gori, M. (2022). Functionalization strategies of polymeric nanoparticles for drug delivery in Alzheimer's disease: Current trends and future perspectives. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 939855. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.939855>
- Lee, E., & Chang, Y. (2025). Modulating Neuroinflammation as a Prospective Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Cells*, 14(3), 168. <https://doi.org/10.3390/cells14030168>
- Li, A., Tyson, J., Patel, S., Patel, M., Katakam, S., Mao, X., & He, W. (2021). Emerging Nanotechnology for Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.672594>
- Li, Y., Tao, T., Xiong, Y., Guo, W., & Liang, Y. (2025). Multifunctional PLGA nanosystems: enabling integrated diagnostic and therapeutic strategies. *Frontiers in Pharmacology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1670397>
- Lin, Y. W., Fang, C. H., Yang, C. Y., Liang, Y. J., & Lin, F. H. (2022). Investigating a Curcumin-Loaded PLGA-PEG-PLGA Thermo-Sensitive Hydrogel for the Prevention of Alzheimer's Disease. *Antioxidants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antiox11040727>
- Liu, J., Chen, L., Zhang, Z.-L., Wen, W., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, S. (2025a). Nano-Collision Electrochemistry for Real-Time Monitoring of Amyloid- β

- Oligomerization and Rapid Screening of Degrading Drugs. *Analytical Chemistry*, 97(9), 4898-4905. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c04598>
- Liu, J., Chen, L., Zhang, Z.-L., Wen, W., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, S. (2025b). Nano-Collision Electrochemistry for Real-Time Monitoring of Amyloid- β Oligomerization and Rapid Screening of Degrading Drugs. *Analytical Chemistry*, 97(9), 4898-4905. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c04598>
- Liu, L., He, H., Du, B., & He, Y. (2025a). Nanoscale drug formulations for the treatment of Alzheimer's disease progression. *RSC Advances*, 15(6), 4031-4078. <https://doi.org/10.1039/D4RA08128E>
- Liu, L., He, H., Du, B., & He, Y. (2025b). Nanoscale drug formulations for the treatment of Alzheimer's disease progression. *RSC Advances*, 15(6), 4031-4078. <https://doi.org/10.1039/D4RA08128E>
- Liu, S., Yan, J., & Dong, J. (2025). Neuroprotective synergy of curcumin and Glycyrrhiza glabra in an alzheimer's model: implications for inflammation and redox pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1661706>
- Liu, Z., Gao, X., Kang, T., Jiang, M., Miao, D., Gu, G., Hu, Q., Song, Q., Yao, L., Tu, Y., Chen, H., Jiang, X., & Chen, J. (2013). B6 Peptide-Modified PEG-PLA Nanoparticles for Enhanced Brain Delivery of Neuroprotective Peptide. *Bioconjugate Chemistry*, 24(6), 997-1007. <https://doi.org/10.1021/bc400055h>
- Lopez-Mitjavila, J. J., Palma-Florez, S., Lagunas, A., Mir, M., Samitier, J., Rodriguez-Abreu, C., & Grijalvo, S. (2025). PEGylated PLGA nanoparticles prepared from nano-emulsion templates as versatile platforms to cross blood-brain barrier models. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 110, 107057. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.107057>
- Low, K. J. Y., Venkatraman, A., Mehta, J. S., & Pervushin, K. (2022). Molecular mechanisms of amyloid disaggregation. *Journal of Advanced Research*, 36, 113-132. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.05.007>
- Lu, Z.-G., Shen, J., Yang, J., Wang, J.-W., Zhao, R.-C., Zhang, T.-L., Guo, J., & Zhang, X. (2023). Nucleic acid drug vectors for diagnosis and treatment of brain diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 39. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01298-z>
- Markoutsas, E., & Xu, P. (2017). Redox Potential-Sensitive N-Acetyl Cysteine-Prodrug Nanoparticles Inhibit the Activation of Microglia and Improve Neuronal Survival. *Molecular Pharmaceutics*, 14(5), 1591-1600. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01028>

- Mashal, Y., Abdelhady, H., & Iyer, A. K. (2022). Comparison of Tau and Amyloid- β Targeted Immunotherapy Nanoparticles for Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 12(7), 1001. <https://doi.org/10.3390/biom12071001>
- Melchiorri, D., Merlo, S., Micallef, B., Borg, J. J., & Dráfi, F. (2023). Alzheimer's disease and neuroinflammation: will new drugs in clinical trials pave the way to a multi-target therapy? İçinde *Frontiers in Pharmacology* (C. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1196413>
- Meng, X., Song, Q., Liu, Z., Liu, X., Wang, Y., & Liu, J. (2024a). Neurotoxic β -amyloid oligomers cause mitochondrial dysfunction—the trigger for PANoptosis in neurons. İçinde *Frontiers in Aging Neuroscience* (C. 16). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1400544>
- Meng, X., Song, Q., Liu, Z., Liu, X., Wang, Y., & Liu, J. (2024b). Neurotoxic β -amyloid oligomers cause mitochondrial dysfunction—the trigger for PANoptosis in neurons. İçinde *Frontiers in Aging Neuroscience* (C. 16). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1400544>
- Mintzer, J., Armstrong, D., Faison, W. E., & Johnson, R. H. (2002). Combination pharmacotherapy in Alzheimer's disease. İçinde *Dialogues in Clinical Neuroscience* (C. 4, Sayı 4). www.dialogues-cns.org
- Mir Najib Ullah, S. N., Afzal, O., Altamimi, A. S. A., Ather, H., Sultana, S., Almalki, W. H., Bharti, P., Sahoo, A., Dwivedi, K., Khan, G., Sultana, S., Alzahrani, A., & Rahman, M. (2023). Nanomedicine in the Management of Alzheimer's Disease: State-of-the-Art. *Biomedicines*, 11(6), 1752. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061752>
- Mansour, A., Eldin, M. H., & El-Sherbiny, I. M. (2025). Metallic nanomaterials in Parkinson's disease: A transformative approach for early detection and targeted therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 13, 3806–3830. <https://doi.org/10.1039/D4TB02428A>
- Naomi, R., Embong, H., Othman, F., Ghazi, H. F., Maruthey, N., & Bahari, H. (2021). Probiotics for Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Nutrients*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.3390/nu14010020>
- Ngoc Le, H. T., & Cho, S. (2021). Deciphering the disaggregation mechanism of amyloid beta aggregate by 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinepropanesulfonic acid using electrochemical impedance spectroscopy. *Sensors (Switzerland)*, 21(3), 1-12. <https://doi.org/10.3390/s21030788>
- Niu, Z., Gui, X., Feng, S., & Reif, B. (2024). Aggregation Mechanisms and Molecular Structures of Amyloid- β in Alzheimer's Disease. İçinde *Chemistry - A European*

- Journal* (C. 30, Sayı 48). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1002/chem.202400277>
- Novo, M., Freire, S., & Al-Soufi, W. (2018). Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1-42) oligomers. *Scientific Reports*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19961-3>
- Nowell, J., Blunt, E., & Edison, P. (2023). Incretin and insulin signaling as novel therapeutic targets for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Molecular Psychiatry*, 28(1), 217-229. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01792-4>
- Ntondini, T. L., Naki, T., & Alven, S. (2025a). The therapeutic efficacy of nanoparticles in the treatment of alzheimer's disease. *Acta Neurologica Belgica*.
<https://doi.org/10.1007/s13760-025-02905-w>
- Ntondini, T. L., Naki, T., & Alven, S. (2025b). The therapeutic efficacy of nanoparticles in the treatment of alzheimer's disease. *Acta Neurologica Belgica*.
<https://doi.org/10.1007/s13760-025-02905-w>
- Nguyen, H. D. T., Le, T. M., Lee, D., Cho, H. J., Lee, J., Sohn, S. K., Kim, J. G., Ham, J. Y., Moon, J. H., Han, H. S., Kim, J., & Baek, D. W. (2024). Synergistic effect of venetoclax and bendamustine in early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *In Vivo*, 38(4), 1740–1749. <https://doi.org/10.21873/invivo.13624>
- Omidian, H., Wilson, R. L., & Castejon, A. M. (2025). Recent Advances in Peptide-Loaded PLGA Nanocarriers for Drug Delivery and Regenerative Medicine. *Pharmaceuticals*, 18(1), 127. <https://doi.org/10.3390/ph18010127>
- Ontawong, A., Nehra, G., Maloney, B. J., Vaddhanaphuti, C. S., Bauer, B., & Hartz, A. M. S. (2025). N-Acetylcysteine Attenuates A β -Mediated Oxidative Stress, Blood–Brain Barrier Leakage, and Renal Dysfunction in 5xFAD Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/ijms26094352>
- Ordóñez-Gutiérrez, L., & Wandosell, F. (2020). Nanoliposomes as a Therapeutic Tool for Alzheimer's Disease. İçinde *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (C. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00020>
- Orobets, K. S., & Karamyshev, A. L. (2023). Amyloid Precursor Protein and Alzheimer's Disease. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 24, Sayı 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/ijms241914794>
- Oxford, A. E., Stewart, E. S., & Rohn, T. T. (2020). Clinical Trials in Alzheimer's Disease: A Hurdle in the Path of Remedy. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2020, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/5380346>

- Özen, G., & Nemutlu, E. (2024). Green HPLC method for simultaneous determination of N-acetylcysteine and L-ascorbic acid in co-formulated pharmaceutical products. *Journal of Research in Pharmacy*, 28(5)(28(5)), 1777-1790. <https://doi.org/10.29228/jrp.850>
- Pan, X., Su, Z., Huang, Z., Chen, Y., Li, X., & Zheng, X. (2025). N-acetylcysteine (NAC) ameliorates ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation, and cognitive dysfunction in APP/PS1 mouse model. *Translational Psychiatry*, 15(1), 435. <https://doi.org/10.1038/s41398-025-03496-z>
- Passaro, S., Corso, G., Wohlgend, J., Reveiz, M., Thaler, S., Somnath, V. R., Getz, N., Portnoi, T., Roy, J., Stark, H., Kwabi-Addo, D., Beaini, D., Jaakkola, T., & Barzilay, R. (2025). Boltz-2: Towards accurate and efficient binding affinity prediction.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates* (5th ed.). Academic Press.
- Pei, Y., Liu, H., Yang, Y., Yang, Y., Jiao, Y., Tay, F. R., & Chen, J. (2018). Biological Activities and Potential Oral Applications of N-Acetylcysteine: Progress and Prospects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1). <https://doi.org/10.1155/2018/2835787>
- Pinto, R. M., Monteiro, C., Costa Lima, S. A., Casal, S., Van Dijck, P., Martins, M. C. L., Nunes, C., & Reis, S. (2021). N-Acetyl-cysteine-Loaded Nanosystems as a Promising Therapeutic Approach Toward the Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(36), 42329-42343. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c05124>
- Pocernich, C. B., & Butterfield, D. A. (2012). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 625-630. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.003>
- Primas, N., Lano, G., Brun, D., Curti, C., Sallée, M., Sampol-Manos, E., Lamy, E., Bornet, C., Burtey, S., & Vanelle, P. (2023). Stability Study of Parenteral N-Acetylcysteine, and Chemical Inhibition of Its Dimerization. *Pharmaceuticals*, 16(1), 72. <https://doi.org/10.3390/ph16010072>
- Puranik, N., Yadav, D., & Song, M. (2023). Advancements in the Application of Nanomedicine in Alzheimer's Disease: A Therapeutic Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14044. <https://doi.org/10.3390/ijms241814044>
- Puri, V., Chaudhary, K. R., Singh, A., & Singh, C. (2022). Inhalation potential of N-Acetylcysteine loaded PLGA nanoparticles for the management of tuberculosis: In

- vitro lung deposition and efficacy studies. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 3, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100084>
- Qian, Y., Chang, X., Lv, C., Zang, J., Zhao, G., & Zhang, T. (2025). Peptide-based brain distribution improvement strategies for nano delivery systems in CNS diseases treatment. *Nano Research*, 18(11), 94907916. <https://doi.org/10.26599/NR.2025.94907916>
- Reisberg, B., Ferris, S. H., de Leon, M. J., & Crook, T. (1982). The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *The American journal of psychiatry*, 139(9), 1136-1139. <https://doi.org/10.1176/ajp.139.9.1136>
- Ruan, Y., Xiong, Y., Fang, W., Yu, Q., Mai, Y., Cao, Z., Wang, K., Lei, M., Xu, J., Liu, Y., Zhang, X., Liao, W., & Liu, J. (2022). Highly sensitive Curcumin-conjugated nanotheranostic platform for detecting amyloid-beta plaques by magnetic resonance imaging and reversing cognitive deficits of Alzheimer's disease via NLRP3-inhibition. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01524-4>
- Sánchez-López, E., Ettcheto, M., Egea, M. A., Espina, M., Calpena, A. C., Folch, J., Camins, A., & García, M. L. (2017). New potential strategies for Alzheimer's disease prevention: pegylated biodegradable dexibuprofen nanospheres administration to APPswe/PS1dE9. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(3), 1171-1182. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.12.003>
- Saraswathi, T. S., Mothilal, M., Bukke, S. P. N., Thalluri, C., & Chettupalli, A. K. (2025). Recent advances in potential drug nanocarriers for CNS disorders: a review. *Biomedical engineering online*, 24(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12938-025-01474-6>
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021a). Alzheimer's disease. İçinde *The Lancet* (C. 397, Sayı 10284, ss. 1577-1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021b). Alzheimer's disease. İçinde *The Lancet* (C. 397, Sayı 10284, ss. 1577-1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Schmitt, B., Bernhardt, T., Moeller, H.-J., Heuser, I., & Frölich, L. (2004). Combination Therapy in Alzheimer's Disease A Review of Current Evidence. İçinde *CNS Drugs* (C. 18, Sayı 13).

- Sciacca, M. F. M., Milardi, D., Messina, G. M. L., Marletta, G., Brender, J. R., Ramamoorthy, A., & La Rosa, C. (2013). Cations as switches of amyloid-mediated membrane disruption mechanisms: Calcium and IAPP. *Biophysical Journal*, 104(1), 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3811>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Shao, X., Yan, C., Wang, C., Wang, C., Cao, Y., Zhou, Y., Guan, P., Hu, X., Zhu, W., & Ding, S. (2022). Advanced nanomaterials for modulating Alzheimer's related amyloid aggregation. İçinde *Nanoscale Advances* (C. 5, Sayı 1, ss. 46-80). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d2na00625a>
- Silva-Abreu, M., Calpena, A. C., Andrés-Benito, P., Aso, E., Romero, I. A., Roig-Carles, D., Gromnicova, R., Espina, M., Ferrer, I., García, M. L., & Male, D. (2018). PPAR γ agonist-loaded PLGA-PEG nanocarriers as a potential treatment for Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 5577-5590. <https://doi.org/10.2147/IJN.S171490>
- Sinha, S., Du, Z., Maiti, P., Klärner, F.-G., Schrader, T., Wang, C., & Bitan, G. (2012). Comparison of three amyloid assembly inhibitors: The sugar scyllo-inositol, the polyphenol epigallocatechin gallate, and the molecular tweezer CLR01. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(6), 451–458. <https://doi.org/10.1021/cn200133x>
- Sirisi, S., Sánchez-Aced, É., Belbin, O., & Lleó, A. (2024). APP dyshomeostasis in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for current drug targets. İçinde *Alzheimer's Research and Therapy* (C. 16, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-024-01504-w>
- Song, T., Song, X., Zhu, C., Patrick, R., Skurla, M., Santangelo, I., Green, M., Harper, D., Ren, B., Forester, B. P., Öngür, D., & Du, F. (2021). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies. İçinde *Ageing Research Reviews* (C. 72). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101503>
- Spinelli, L., D'Anna, P., Morretta, E., Cassiano, C., Piccolo, V., De Rosa, M., Amico, R., De Cicco, P., Brancaccio, D., Conte, C., Zampella, A., Quaglia, F., & Monti, M. C. (2025). PEGylation-Driven Remodeling of the Protein Corona on PLGA Nanoparticles: Implications for Macrophage Recognition. *Biomacromolecules*, 26(12), 8522-8534. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5c01369>

- Stephen, B. J., Mishra, R., Sharma, M. M., & Singh, A. (2021). A comprehensive study to fabricate nac loaded plga nanoparticles for drug delivery. *Materials Today: Proceedings*, 43, 3268-3271. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.952>
- Sun, R., Liu, X., Zhang, Y., Li, Q., Zhu, Y., & Fan, C. (2023). Size-dependent cellular uptake and sustained drug release of PLGA particles. *Particuology*, 73, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2022.03.003>
- Suzuki, K. (2009). Anti-oxidants for therapeutic use: Why are only a few drugs in clinical use? İçinde *Advanced Drug Delivery Reviews* (C. 61, Sayı 4, ss. 287-289). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.002>
- Tardiolo, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. İçinde *Molecules* (C. 23, Sayı 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23123305>
- Tekie, F. S. M., Hajiramezanali, M., Geramifar, P., Raoufi, M., Dinarvand, R., Soleimani, M., & Atyabi, F. (2020). Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. *Scientific Reports*, 10(1), 9664. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66572-y>
- Teleanu, D. M., Niculescu, A. G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladăcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 23, Sayı 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>
- Tenório, M. C. D. S., Graciliano, N. G., Moura, F. A., de Oliveira, A. C. M., & Goulart, M. O. F. (2021). N-acetylcysteine (Nac): Impacts on human health. İçinde *Antioxidants* (C. 10, Sayı 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10060967>
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. İçinde *Journal of Biological Chemistry* (C. 283, Sayı 44, ss. 29615-29619). <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. İçinde *International Journal of Nanomedicine* (C. 14, ss. 5541-5554). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
- Toshikawa, H., Ikenaka, A., Li, L., Nishinaka-Arai, Y., Niwa, A., Ashida, A., Kazuki, Y., Nakahata, T., Tamai, H., Russell, D. W., & Saito, M. K. (2021). N-Acetylcysteine prevents amyloid- β secretion in neurons derived from human

- pluripotent stem cells with trisomy 21. *Scientific Reports*, 11(1), 17377. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96697-7>
- Trejo-Lopez, J. A., Yachnis, A. T., & Prokop, S. (2022). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 19(1), 173-185. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01146-y>
- Tutubala, T. E., Egunlusi, A. O., Fisher, D., Dube, A., & Joubert, J. (2025a). Nanomedicine Solutions for Alzheimer's Disease: A Critical Review of Therapeutic Nanoparticle Strategies. *ACS Omega*, 10(45), 53633-53657. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04887>
- Tutubala, T. E., Egunlusi, A. O., Fisher, D., Dube, A., & Joubert, J. (2025b). Nanomedicine Solutions for Alzheimer's Disease: A Critical Review of Therapeutic Nanoparticle Strategies. *ACS Omega*, 10(45), 53633-53657. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04887>
- Umerska, A., Paluch, K. J., Santos-Martinez, M. J., Corrigan, O. I., Medina, C., & Tajber, L. (2018). Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles: Effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1-2), 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.035>
- Upadhyay, A. (2024). Vesicular Transport and Amyloids: The Growing Relationship. *Içinde Biologics* (C. 4, Sayı 4, ss. 376-389). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biologics4040023>
- U.S. Food and Drug Administration. (2023). Q2(R2) *Validation of analytical procedures: Guidance for industry*. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r2-validation-analytical-procedures>
- Vargas-Barona, A., Bernáldez-Sarabia, J., & Castro-Ceseña, A. B. (2024). Lipid-polymer hybrid nanoparticles loaded with *N*-acetylcysteine for the modulation of neuroinflammatory biomarkers in human iPSC-derived PSEN2 (N141I) astrocytes as a model of Alzheimer's disease. *Journal of Materials Chemistry B*, 12(21), 5085-5097. <https://doi.org/10.1039/D4TB00521J>
- Vaz, M., Silva, V., Monteiro, C., & Silvestre, S. (2022). Role of Aducanumab in the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 17, 797-810. <https://doi.org/10.2147/CIA.S325026>
- Wang, Y., Chen, J., Gao, F., Hu, M., & Wang, X. (2023). Recent developments in the chemical biology of amyloid- β oligomer targeting. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 21(22), 4540-4552. <https://doi.org/10.1039/D3OB00509G>

- Wilson, B., Samanta, M. K., Santhi, K., Kumar, K. P. S., Paramakrishnan, N., & Suresh, B. (2008). Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1200, 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.039>
- World Health Organization (2024). *Dementia*. World Health Organization. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 217. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Wu, W., Ji, Y., Wang, Z., Wu, X., Li, J., Gu, F., Chen, Z., & Wang, Z. (2023). The FDA-approved anti-amyloid- β monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01512-w>
- Xiong, G., & Doraiswamy, P. M. (2005). Combination drug therapy for Alzheimer's disease: what is evidence-based, and what is not? *Geriatrics*, 60(6), 22-26.
- Xu, J., Zhang, S., Machado, A., Lecommandoux, S., Sandre, O., Gu, F., & Colin, A. (2017). Controllable Microfluidic Production of Drug-Loaded PLGA Nanoparticles Using Partially Water-Miscible Mixed Solvent Microdroplets as a Precursor. *Scientific Reports*, 7(1), 4794. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05184-5>
- Xu Lou, I., Ali, K., & Chen, Q. (2023). Effect of nutrition in Alzheimer's disease: A systematic review. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1147177>
- Yan, J., Huang, L., Feng, J., & Yang, X. (2023). The Recent Applications of PLGA-Based Nanostructures for Ischemic Stroke. *Pharmaceutics*, 15(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092322>
- Yang, M., Jin, L., Wu, Z., Xie, Y., Zhang, P., Wang, Q., Yan, S., Chen, B., Liang, H., Naman, C. B., Zhang, J., He, S., Yan, X., Zhao, L., & Cui, W. (2021a). PLGA-PEG Nanoparticles Facilitate In Vivo Anti-Alzheimer's Effects of Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Derived from Edible Brown Algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(34), 9764-9777. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00569>
- Yang, M., Jin, L., Wu, Z., Xie, Y., Zhang, P., Wang, Q., Yan, S., Chen, B., Liang, H., Naman, C. B., Zhang, J., He, S., Yan, X., Zhao, L., & Cui, W. (2021b). PLGA-PEG Nanoparticles Facilitate In Vivo Anti-Alzheimer's Effects of Fucoxanthin, a

- Marine Carotenoid Derived from Edible Brown Algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(34), 9764-9777. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00569>
- Yu, H., Yamashita, T., Hu, X., Bian, Z., Hu, X., Feng, T., Tadokoro, K., Morihara, R., & Abe, K. (2022). Protective and anti-oxidative effects of curcumin and resveratrol on A β -oligomer-induced damage in the SH-SY5Y cell line. *Journal of the Neurological Sciences*, 441, 120356. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120356>
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Review Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. İçinde *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* (C. 60).
- Zarrilli, B., Bonanni, R., Belfiore, M., Severino, M., Cariati, I., Fioravanti, R., Cappella, G., Sennato, S., Frank, C., Giordani, C., Tancredi, V., Bombelli, C., Diociaiuti, M., & D'Arcangelo, G. (2024a). Molecular mechanisms at the basis of the protective effect exerted by EPPS on neurodegeneration induced by prefibrillar amyloid oligomers. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77859-9>
- Zarrilli, B., Bonanni, R., Belfiore, M., Severino, M., Cariati, I., Fioravanti, R., Cappella, G., Sennato, S., Frank, C., Giordani, C., Tancredi, V., Bombelli, C., Diociaiuti, M., & D'Arcangelo, G. (2024b). Molecular mechanisms at the basis of the protective effect exerted by EPPS on neurodegeneration induced by prefibrillar amyloid oligomers. *Scientific Reports*, 14(1), 26533. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77859-9>
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., & Chen, L. (2024). Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. İçinde *Signal Transduction and Targeted Therapy* (C. 9, Sayı 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>
- Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., & Ye, K. (2024). Tau in neurodegenerative diseases: molecular mechanisms, biomarkers, and therapeutic strategies. İçinde *Translational Neurodegeneration* (C. 13, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-024-00429-6>
- Zheng, Q., & Wang, X. (2025). Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy. İçinde *Protein and Cell* (C. 16, Sayı 2, ss. 83-120). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/procel/pwae026>
- Zheng, S., Wang, W., Aldahdooh, J., Malyutina, A., Shadbahr, T., Tanoli, Z., Pessia, A., & Tang, J. (2022). SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 20(3), 587-596. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.01.004>
- Zhu, L., Zhou, T., Wu, L., Zhu, X., Chen, L., Zhang, M., Zhou, J., & Wang, F. (2025). Microglial exosome TREM2 ameliorates ferroptosis and neuroinflammation in

- alzheimer's disease by activating the Wnt/ β -catenin signaling. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-09563-1>
- Zhu, Y., Xu, H., Yu, C., Jiang, W., Hou, X., Ma, M., & Wu, J. (2025). Polymers for the treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1512941>
- Zimmer, J. A., Ardayfio, P., Wang, H., Khanna, R., Evans, C. D., Lu, M., Sparks, J., Andersen, S., Lauzon, S., Nery, E. S. M., Battioui, C., Engle, S. E., Biffi, A., Svaldi, D., Salloway, S., Greenberg, S. M., Sperling, R. A., Mintun, M., Brooks, D. A., & Sims, J. R. (2025). Amyloid-Related Imaging Abnormalities With Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 82(5), 461. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2025.0065>