



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**N-Asetil Sistein (NAC) Yüklü mPEG-PLGA
Nanopartiküllerinin Sentezi ve Amiloid Beta
Toksisitesine Etkisinin Araştırılması**

Doktora Tezi

Derya Akyüz Şengün

Temmuz 2025



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**N-Asetil Sistein (NAC) Yüklü mPEG-PLGA
Nanopartiküllerinin Sentezi ve Amiloid Beta
Toksisitesine Etkisinin Araştırılması**

Doktora Tezi

Derya Akyüz Şengün

Danışman

Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı

Temmuz 2025

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Derya Akyüz Şengün tarafından hazırlanan " N-Asetil Sistein (NAC) Yüklü mPEG-PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi ve Amiloid Beta Toksisitesine 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:

Prof. Dr. Murat Kazancı
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç. Dr. Yeşim Neğiş
Bahçeşehir Üniversitesi

Doç. Dr. Ayşe Özdemir
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Melike Güney Akkurt
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 30/ 07 / 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 İlkelerine Sadakat Beyanı

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

İmza

Derya Akyüz Şengün

ÖZET

N-Asetil Sistein (NAC) Yüklü mPEG-PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi ve Amiloid Beta Toksisitesine Etkisinin Araştırılması

Akyüz Şengün, Derya

Doktora, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı

Temmuz 2025

Alzheimer Hastalığı (AH), bilişsel işlevlerde ilerleyici kayıplarla seyreden ve patogeneğinde oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve nöroinflamasyonun belirleyici rol oynadığı nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu tez çalışmasında, antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip N-asetil sistein'in (NAC) terapötik etkinliğini artırmak amacıyla, B6 peptidi ile yüzey modifiye edilmiş mPEG-PLGA temelli polimerik nanopartiküller geliştirilmiştir. Transferrin reseptörüne özgünlüğü sayesinde B6 peptidi, nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini (KBB) geçmesini kolaylaştırmaktadır. mPEG-PLGA kopolimeri maleatlama reaksiyonuyla fonksiyonelleştirilmiş, heksadiaminle amin uç grubu kazandırılarak B6 peptidi konjugasyonuna uygun hale getirilmiştir. Polimerin karakterizasyonu FT-IR, NMR ve GPC yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül formülasyonları nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmış; karakterizasyon çalışmaları boyut ve morfolojik analizler, ilaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon veriminin belirlenmesi ve *in vitro* salım testleri ile yapılmıştır. Elde edilen NAC yüklü B6-mPEG-PLGA nanopartikülleri; 149.1 nm ortalama çap, 0.096 PDI, -35.5 mV zeta potansiyeli, %74.7 enkapsülasyon verimi ve küresel morfolojisiyle başarılı şekilde formüle edilmiş ve 48 saatlik kontrollü bir salım profili sergilemiştir.

NAC yüklü nanopartikül formülasyonunun anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkileri SH-SY5Y hücrelerinde amiloid beta ($A\beta_{1-42}$) oligomerleri ile oluşturulan toksite modeliyle değerlendirilmiştir. B6 peptidinin nanopartiküllerin hücre içine alımı arttırdığı flow sitometri yöntemi ile gösterilmiştir. *In vitro* analizlerde

hücre canlılığı, oksidatif stres parametreleri, mitokondriyal membran potansiyeli ve proinflamatuvar sitokin düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen veriler, B6-mPEG-PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilen NAC'ın oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ile inflamatuvar yanıtları anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. AH'nin *in vivo* modellerinden biri olan 5XFAD farelerine i.p. yoldan verilen NAC-FITC-B6-mPEG-PLGA nanopartiküllerinin KBB'yi geçtiği de ispatlanmıştır. Bu sonuçlar, AH patofizyolojisine yönelik hedefe özgü tedavi stratejileri geliştirilmesinde NAC yüklü B6-mPEG-PLGA nanopartiküllerinin umut vadeden bir yaklaşım sunduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: N-asetil sistein, polimerik nanopartikül, B6 peptidi, Alzheimer Hastalığı, oksidatif stres

ABSTRACT

Synthesis of N-Acetyl Cysteine (NAC)-Loaded mPEG-PLGA Nanoparticles and Investigation of Their Effects on Amyloid Beta Toxicity

Akyüz Şengün, Derya

Ph. D., Department of Nanoscience and Nanoengineering

Supervisor: Assoc. Prof.Dr. Nagehan Ersoy Tunalı

July 2025

Alzheimer's Disease (AD) is characterized by progressive loss of cognitive functions, where oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neuroinflammation play a determining role in its pathogenesis. In this thesis, PEG-PLGA-based polymeric nanoparticles, surface-modified with B6 peptide, were developed to enhance the efficacy of N-acetylcysteine (NAC). The B6 peptide facilitates the passage of nanoparticles across the blood-brain barrier (BBB). The mPEG-PLGA copolymer was functionalized by a maleation reaction for B6 peptide conjugation by introducing an amine terminal group. Characterization of the polymer was performed using FT-IR, NMR, and GPC. Nanoparticles were prepared by using the nanoprecipitation method; characterization through size and morphological analyses, determination of drug loading capacity and encapsulation efficiency, and *in vitro* release was completed. NAC-loaded nanoparticles were successfully formulated with an average diameter of 149.1nm, a PDI of 0.096, a zeta potential of -35.5mV, an encapsulation efficiency of 74.7%, and with spherical morphology, which exhibit controlled release over 48 hours.

The antioxidant and anti-inflammatory effects of the NAC-loaded nanoparticle formulation were evaluated using a A β 1-42 oligomer toxicity model in SH-SY5Y cells. The increased cellular uptake of the nanoparticles mediated by the B6 peptide was demonstrated by flow cytometry. *In vitro* analyses included assessments of cell viability, oxidative stress parameters, mitochondrial membrane potential, and cytokine levels. The results showed that NAC-B6-

mPEG-PLGA nanoparticles significantly reduced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammatory responses. Besides, NAC-FITC-B6-mPEG-PLGA was able to cross the BBB in 5XFAD mice. These results indicate that the use of NAC-loaded-B6-mPEG-PLGA nanoparticles offer a promising approach for developing targeted therapeutic strategies.

Keywords: N-acetyl cysteine, polymeric nanoparticle, B6 peptide, Alzheimer's Disease, oxidative stress

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında bilgi, tecrübe ve desteğiyle yanımda olan, bilimsel rehberliği ve katkılarıyla bana yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Nanopartikül formülasyonunun hazırlanması ve karakterizasyonu sürecinde laboratuvar imkanlarını ve bilimsel tecrübesini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Erdal CEVHER'e, konfokal mikroskopi analizlerinin titizlikle gerçekleştirilmesinde sağladığı değerli katkılar için Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Stefan H. FUSS'a; polimer sentezi metodunun geliştirilmesi için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. M. Koray GÖK'e; tez sürecinde değerli yorumları ve yönlendirmeleriyle katkı sağlayan Dr. Öğr. Ü. Melike GÜNEY AKKURT'a; formülasyonların optimizasyon süreçlerindeki emekleri için İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümü Arş. Gör. Dr. Emine SALDAMLI'ya; Alzheimer fare modelinin takibi ve uygulamaları, *in vivo* deneylerin organizasyonu için NET Lab'tan Zeynep Dilhan ÜN'e teşekkür ederim.

Doktora sürecinin tüm zorluklarını birlikte göğüslediğimiz sevgili Ezgi KESKE ve Pınar AYDINDAĞ TEMEL'e; ayrıca Dr. Gülşen GÜNEL'e ve NET Lab'dan Ceyda Nur ZAİM ve Ecem Zehra SAPMAZ'a teşekkür ederim.

BİLTAM üyelerine ve teknik personeline sağladıkları destek ve yardımsever yaklaşımları için teşekkür ederim.

Hayatımın en kıymetli varlığı olan oğlum Yusuf'a, varlığıyla her zaman motivasyon ve güç kaynağım olduğu için minnettarım. Tez sürecinin zorlu dönemlerinde beni sabırla destekleyen, her daim yanımda olan sevgili eşim Emre'ye ve koşulsuz sevgileriyle bana güç veren aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu yolculukta emeği geçen, katkı sağlayan ve yanımda olan herkese gönülden teşekkür ederim.

Bu tez alıőması, TÜBİTAK (Proje No: 122S028) ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi BAP (Proje No: 1652) destekleriyle yürütölmüőtür.

Ayrıca, “YÖK 100/2000-Öncelikli alan” burs programı kapsamında sağlanan destek için Yükseköğretim Kurulu’na teşekkür ederim.

Derya Akyüz şengün

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	x
SEMBOL LİSTESİ	xiv
KISALTMA LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
TABLO LİSTESİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. ALZHEİMER HASTALIĞI	5
1.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın etiyoloji ve patofizyoloji	5
1.1.2. Alzheimer Hastalığı'nda oksidatif stres ve inflamasyon	9
1.2. N-ASETİL SİSTEİN	13
1.2.1. NAC'ın antioksidan etkileri	14
1.2.2. NAC'ın anti-inflamatuar etkileri	17
1.3. NANOMALZEMELER	20
1.3.1. Nanomalzemelerin üretimi	22
1.3.2. Nanomalzemelerin sınıflandırılması	22
1.3.3. Nanopartiküller	23
1.3.3.1. Nanopartiküllerin karakterizasyonları	24
1.3.3.2. Nanopartiküllerin gruplandırılması	27
1.3.3.3. Polimerik nanopartiküller	32
1.3.3.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri	36
1.4. ALZHEİMER HASTALIĞINDA GÜNCEL TEDAVİ YÖNTEMLERİ ve YENİ İLAÇ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	38
1.5. ALZHEİMER HASTALIĞI'NDA NANOTIBBIN ROLÜ ve GEREKLİLİĞİ	41
2. TEZİN AMACI ve HİPOTEZİ	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. GEREÇLER	47
3.1.1. Sarf Malzemeler	47
3.1.2. Cihazlar	48
3.2. YÖNTEMLER	49
3.2.1. NAC'ın analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu	49
3.2.2. Analitik yöntem koşulları	49

3.2.3.	Sistem uygunluk	49
3.2.4.	Doğrusallık.....	50
3.2.5.	Doğruluk	50
3.2.6.	Kesinlik	50
3.2.7.	Özgünlük ve seçicilik.....	51
3.2.8.	Teşhis sınırı ve miktar tayini.....	51
3.3.	Polimerlerin sentezlenmesi ve karakterizasyon çalışmaları.....	51
3.3.1.	Polimerlerin sentezlenmesi	51
3.3.1.1.	mPEG-PLGA polimerinin sentezlenmesi.....	51
3.3.1.2.	mPEG-PLGA-MA polimerinin sentezlenmesi.....	52
3.3.1.3.	mPEG-PLGA-MA-NH ₂ polimerinin sentezlenmesi	53
3.3.2.	Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları.....	53
3.3.2.1.	Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	53
3.3.2.2.	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.....	54
3.3.2.3.	Jel Geçirgenlik Kromatografisi / Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi	54
3.4.	Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyon analizleri ..	54
3.4.1.	Nanopartiküllerin boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleri	55
3.4.2.	Enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi analizleri.....	56
3.4.3.	Nanopartiküllerin morfolojik analizi	57
3.4.4.	Nanopartiküllerin ilaç salım profil analizi.....	57
3.4.5.	Serum ortamında stabilite analizi.....	57
3.4.6.	Nanopartiküllerin sterilizasyonu	58
3.5.	<i>In vitro</i> Çalışmalar.....	58
3.5.1.	Hücre kültürünün gerçekleştirilmesi	58
3.5.2.	NAC ve nanopartiküllerin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi	59
3.5.3.	Nanopartiküllerin hücre içine alımı	59
3.5.4.	A β ₄₂ oligomer toksisitesinin modellenmesi.....	60
3.5.5.	NAC ve NAC-B6-NP'nin A β ₄₂ toksisitesi oluşturulmuş hücrelerde hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi	61
3.5.6.	Oksidatif stresin belirlenmesi.....	61
3.5.7.	Superoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	62
3.5.8.	Mitokondriyal disfonksiyon analizi	63
3.5.9.	Total glutatyon seviyesinin belirlenmesi	63
3.5.10.	Sitokin seviyelerinin belirlenmesi	64
3.5.11.	Nanopartiküllerin <i>in vivo</i> kan-beyin bariyeri geçişi.....	65

3.5.12. Verilerin Analizi	66
4. BULGULAR	68
4.1. NAC'ın analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyon bulguları.....	68
4.1.1. Sistem uygunluk çalışması.....	68
4.1.2. Doğrusallık (Lineerlik) çalışması.....	69
4.1.3. Doğruluk çalışması.....	70
4.1.4. Kesinlik çalışması.....	71
4.1.5. Özgünlük ve seçicilik çalışması	74
4.1.6. Teşhis Sınırı ve Miktar Tayini Limiti.....	75
4.2. Sentezlenen polimerlerin yapısal karakterizasyon bulguları.....	75
4.2.1. Fourier Dönüştürme Kızılötesi Spektroskopisi.....	77
4.2.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi	84
4.2.3. Jel Geçirgenlik Kromatografisi / Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi 87	
4.3. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması, optimizasyonu ve karakterizasyonuna ait bulgular	90
4.3.1. NAC yüklü nanopartikül formülasyonunun hazırlanması ve optimizasyonu 90	
4.3.2. Nanopartiküllerin boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi91	
4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi analizleri.....	95
4.3.4. Nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu.....	96
4.3.5. Nanopartiküllerin <i>in vitro</i> ilaç salım profil analizi	97
4.3.6. Serumda stabilite analizi	98
4.3.7. Nanopartiküllerin sterilizasyonu	100
4.3.8. FITC için kalibrasyon eğrisi analizi	101
4.4. <i>In vitro</i> Çalışmalar.....	102
4.4.1. Hücre kültürünün gerçekleştirilmesi	102
4.4.2. Nanopartiküllerin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi.....	103
4.4.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınması.....	107
4.4.4. A β ₄₂ oligomer toksisitesinin oluşturulması	108
4.4.5. NAC ve NAC-B6-NP'nin A β ₄₂ toksisitesi oluşturulmuş hücrelerde hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi	111
4.4.6. Oksidatif stres tayini.....	114
4.4.7. Total süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi.....	115
4.4.8. Mitokondriyal disfonksiyon analizi	116
4.4.9. Total glutatyon seviyesinin belirlenmesi	117

4.4.10.	Sitokin seviyelerinin belirlenmesi	118
4.4.11.	Nanopartiküllerin <i>in vivo</i> kan-beyin bariyeri geçişi.....	120
5.	TARTIŞMA	123
6.	SONUÇ.....	136
7.	ETİK ONAM	138
8.	KAYNAKLAR	139

SEMBOL LİSTESİ

%: Yüzde

° C: derece santigrat

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

µm: Mikrometre

Da: Dalton

H₂O₂: Hidrojen peroksit

kDa: Kilodalton

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

nm: Nanometre

-NO: Nitrik oksit

-NO₂: Nitrojen dioksit

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
Aβo:	A β oligomer
BACE1:	β Amiloid Prekürsör Protein Kesme Enzimi 1
BSS:	Bağıl Standart Sapma
CAT:	Katalaz
CNT:	Karbon Nanotüp
Cys:	Sistein
Cys-Cys:	Sistin
DLS:	Dinamik Işık Saçılımı
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EC₅₀:	Yarı maksimum etkili konsantrasyon
EE:	Enkapsülasyon Verimliliği
EMA:	Avrupa İlaç Ajansı
FBS:	Fetal Sığır Serum
FDA:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FITC:	Floresein 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
IC₅₀:	Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyon
ICH:	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IKKβ:	κ B Kinaz İnhibitörü
IL-1β:	İnterlökin 1 β
IL-6:	İnterlökin 6
I-κB:	NF- κ B inhibitör proteini

KBB: Kan Beyin Bariyeri
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
MA: Maleik Anhidrit
mPEG: Metoksi (Polietilen Glikol)
MWNT: Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler
NAC: N-asetil sistein
NFY: Nörofibriler Yumak
NF-κB: Nükleer Faktör Kappa-Hafif-Zincir-Aktive B
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
PSEN2: Presenilin 2
QD: Kuantum Noktaları
RNS: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SEM: Taramalı Elektron Mikroskopisi
SOD: Süperoksit Dismutaz
SS: Standart Sapma
STEM: Taramalı Ve Geçirimli Elektron Mikroskopisi
SWNT: Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler
TEM: Geçirimli Elektron Mikroskopisi
TfR1: Transferrin Reseptörü 1
TNF-α: Tümör Nükleer Faktör A
TOS: Total Oksidan Seviyesi
YK: Yükleme Kapasitesi
ZP: Zeta Potansiyeli

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. MSS hücreleri ve KBB geçiş mekanizmaları.	4
Şekil 2. APP proteininin işleme yolları ve farklı A β yapıları.	9
Şekil 3. AH'nin nöropatofizyolojik mekanizması.	12
Şekil 4. NAC'ın yapısı ve hücre içi antioksidan sistemle ilişkili biyokimyasal mekanizması.	17
Şekil 5. NAC'ın NF- κ B sinyal yolağındaki anti-inflamatuar etkisi.	19
Şekil 6. Organik ve inorganik nanopartikül çeşitleri.	28
Şekil 7. Polimerik nanopartikül çeşitleri.	33
Şekil 8. NAC'ın HPLC analizi	69
Şekil 9. NAC'a ait kalibrasyon eğri grafiği	69
Şekil 10. Boş nanopartikül formülasyonu ve NAC standart çözeltisinin HPLC ile elde edilen karşılaştırmalı kromatogramları.	74
Şekil 11. mPEG-PLGA-MA-NH ₂ kopolimerinin B6 peptidi ile konjugasyonuna yönelik sentez reaksiyon basamakları (A) ve B6 peptidinin kimyasal yapısı (B).	77
Şekil 12. Sentezlenen polimer ara ürünlerine ait FT-IR spektrumları.	79
Şekil 13. Sentezlenen polimer yapılarının ¹ H-NMR spektrumları.	87
Şekil 14. Sentezlenen polimerlere ait GPC kromatogramları.	89
Şekil 15. Farklı formülasyonlara ait nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımlarının örnek DLS analiz sonuçları.	95
Şekil 16. NAC-B6-NP formülasyonlarına ait STEM görüntüsü.	97
Şekil 17. Serbest NAC ve NAC-B6-NP formülasyonlarının <i>in vitro</i> ilaç salım profilleri.	98
Şekil 18. Farklı ortamlarda inkübe edilen NAC-B6-NP'lerin partikül büyüklüklerinin zamana bağlı değişim grafiği.	100
Şekil 19. FITC'ye ait UV-Vis spektrofotometre kalibrasyon eğrisi.	101
Şekil 20. SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki morfolojik görüntüleri.	102
Şekil 21. Serbest NAC uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi.	104
Şekil 22. Boş B6-NP'nin hücre canlılığına etkisi.	105
Şekil 23. NAC- B6-NP uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi	106
Şekil 24. Nanopartiküllerin hücresel alım sonuçları.	108

Şekil 25. $A\beta_{420}$ 'nın farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının ardından hücrelerde gözlenen morfolojik değişimlerin invert mikroskopta görüntülenmesi (10X).....	109
Şekil 26. $A\beta_{420}$ uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi	110
Şekil 27. $A\beta_{420}$ 'ya ait STEM görüntüleri.	111
Şekil 28. $A\beta_{420}$ ile oluşturulan hücre toksisitesine karşı serbest NAC uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	113
Şekil 29. $A\beta_{420}$ ile oluşturulan hücre toksisitesine karşı NAC-B6-NP uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	114
Şekil 30. $A\beta_{420}$ ile muamele edilen hücrelerde TOS karşılaştırılması.	115
Şekil 31. $A\beta_{420}$, serbest NAC ve NAC-B6-NP ile muamele edilen hücrelerde SOD aktivitelerinin karşılaştırılması.	116
Şekil 32. $A\beta_{420}$, serbest NAC ve NAC-B6-NP ile muamele edilen hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi.....	117
Şekil 33. $A\beta_{420}$, serbest NAC ve NAC-B6-NP ile muamele edilen hücrelerde T-GSH düzeylerinin karşılaştırılması.....	118
Şekil 34. $A\beta_{420}$ toksisitesi oluşturulan hücrelerde IL-1 β , TNF- α ve IL-6 sitokin seviyelerinin ELISA yöntemiyle tayini.	119
Şekil 35. NAC-B6-FITC-NP formülasyonunun 5XFAD fare ön beyin bölgesindeki anatomik dağılımının konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi.	121
Şekil 36. NAC-B6-FITC-NP formülasyonunun 5XFAD fare arka beyin bölgesindeki anatomik dağılımının konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi.	121
Şekil 37. NAC-FITC-B6-NP formülasyonunun 5XFAD fare beyinlerinde dağılımının floresan mikroskopi ile değerlendirilmesi.	122

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kimyasal kompozisyonlarına göre nanopartiküllerin sınıflandırılması	29
Tablo 2. NAC için sistem uygunluk testine ait kromatografik parametreler.....	68
Tablo 3. NAC'ın üç farklı konsantrasyon seviyesinde ölçülen konsantrasyon ve % geri kazanım değerleri	70
Tablo 4. NAC'a (50 ppm) ait tekrar edilebilirlik çalışmasına ilişkin ölçüm sonuçları. .	72
Tablo 5. NAC'a (100 ppm) ait tekrar elde edilebilirlik çalışmasına ilişkin iki farklı analist tarafından yapılan ölçüm sonuçları.	73
Tablo 6. Sentezlenen polimerlerin FT-IR spektrumlarında gözlenen karakteristik piklerin karşılaştırılması.....	80
Tablo 7. Polimerlere ait GPC analiz sonuçları	88
Tablo 8. Farklı mPEG-PLGA-MA-NH ₂ :NAC oranlarında hazırlanan nanopartiküllerin evaporasyon ve santrifüj sonrası DLS analizleri.	92
Tablo 9. Soğuk ortamda hazırlanan mPEG-PLGA-MA-NH ₂ nanopartiküllerinin pH'a bağlı DLS analizleri.....	93
Tablo 10. FITC ve NAC yüklü farklı nanopartikül formülasyonlarının DLS analizleri	94
Tablo 11. Farklı polimer: ilaç oranlarında hazırlanan NAC yüklü nanopartiküllerin ve B6 peptidi ile konjuge edilmiş formülasyonun %EE ve %YK değerleri.....	96
Tablo 12. NAC-B6-NP'lerin PBS, DMEM ve %50 FBS içeren DMEM ortamlarında belirli zaman noktalarında ölçülen DLS analiz sonuçları.....	99
Tablo 13. NAC-B6-NP'lerinin UV sterilizasyon çalışmasına ait karakterizasyon verileri.	100

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, düşünme, hafıza ve motor beceriler gibi bilişsel ve fiziksel işlevlerde kademeli kayıplarla karakterize edilen, ilerleyici süreçlerdir. Bu hastalıklar büyük ölçüde merkezi sinir sistemini (MSS) etkiler ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi, terapötik ajanların kan-beyin bariyerini (KBB) etkin şekilde aşabilmesine bağlıdır (Ramanathan vd., 2018). KBB, oldukça seçici ve yarı geçirgen yapısıyla, beyin homeostazının korunmasında kritik bir rol oynar. Beyne temel besin maddelerinin taşınması ve hormonlar, su ile metabolitlerin sabit düzeylerde tutulmasını sağlayarak, nörolojik işlevlerin sürekliliğine katkıda bulunur (Hanumanthappa vd., 2024). Ayrıca, iyonların, moleküllerin ve hücrelerin kan ile MSS arasındaki geçişini sıkı biçimde düzenleyerek, nöronal işlevler için gerekli olan homeostatik ortamın hassas biçimde sürdürülebilmesini sağlar (Blanchette & Daneman, 2015; Alkhalifa vd., 2023).

KBB'nin bu yüksek seçicilik özelliği, beyin endotel hücreleri tarafından oluşturulan sıkı bağlantılar sayesinde mümkün olur. Bu hücreler, MSS'yi toksinler, inflamasyon ve enfeksiyonlara karşı korurken; ilaçların MSS'ye ulaşmasında en büyük engeli oluşturur. Bu nedenle, terapötik etkinliğin artırılması amacıyla KBB'yi aşmaya veya modüle etmeye yönelik yeni taşıyıcı sistemler ve yaklaşımlar geliştirilmeye devam etmektedir. KBB bütünlüğünde meydana gelen bozulmalar, sinyal iletiminde düzensizlik, iyon homeostazında bozulma, istenmeyen moleküllerin MSS'ye geçişi ve nihayetinde nöronal dejenerasyon ile hücre ölümüne neden olabilir (Daneman & Prat, 2015).

MSS; endotel hücreler, astrositler, mikroglialar, perisitler ve nöronlardan oluşur ve bu yapılar nörovasküler ünite olarak adlandırılır (Şekil 1A,B). Beyin endotel hücreleri, kan damarlarının duvarlarını oluşturarak lümen meydana getirir. Bu hücreler, yaklaşık 0,1 µm kalınlığında duvarlar oluşturur ve aralarındaki paraselüler geçişi engellemek amacıyla sıkı bağlantılarla bağlanır. Kolajen, fibronektin, heparan sülfat ve diğer hücre dışı matris proteinlerinden oluşan, yaklaşık 30–40 nm kalınlığındaki vasküler bazal membranı salgılayarak kan ve beyin parankimi arasındaki ilk fiziksel bariyeri oluştururlar. Ayrıca, çok sayıda taşıyıcı ve reseptör ekspresyonu aracılığıyla kan-parankim değişimini düzenlerler. KBB ortamının ve işlevinin en önemli bileşenini oluştururlar. Perisitler, endotel hücrelerini kısmen saran ve serebral kılcal damarlar boyunca sıralanan hücrelerdir. Endotel hücrelerinin gelişimini, davranışlarını ve kan akışını düzenleyen

sinyalleri sağlarlar. Bu hücreler, bazal lamina ve astrosit uç ayaklarıyla çevrilidir. KBB'nin oluşumu ve transsitoz aktivitesinin aşağı regülasyonu açısından önemlidirler; eksiklikleri durumunda KBB geçirgenliği artar. Ayrıca anjiyogeneze görev alır, hücre dışı matris bileşenlerinin birikimini sağlar ve bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu düzenlerler. Astrositlerin uç ayakları, endotel hücre yüzeyinin yaklaşık %99'unu sararak bariyer özelliklerinin korunmasında ve nöronlara hücrelerel bağlantı sağlamada görev alır. Hedgehog sinyal yolları aracılığıyla KBB bütünlüğünü desteklemenin yanı sıra, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini düzenleme, elektrokimyasal sinyalleri izleme, atıkları temizleme ve parankimdeki su ile metabolit dengesini sağlama gibi roller üstlenirler. Nöronlar ise vazoaktif nörotransmitterler ve peptitler salarak lokal serebral kan akışını ve damar çapını kontrol ederler. Bu maddelerin endotel hücreleriyle etkileşimi, KBB geçirgenliğinin düzenlenmesine katkı sağlarlar. Aynı zamanda tek başlarına beyin kullandığı enerjinin %80'ine kadarını tüketebilme potansiyelleri vardır. Mikroglialar, MSS'nin bağışıklık hücreleri olarak görev yapar; nöronal hasarı algılar ve savunma yanıtlarını başlatarak patolojik durumlara karşı ilk tepkiyi verirler. Hücre dışı sinyallerine katılarak sinir hücrelerine yardımcı olurlar (Abbott vd., 2010; Zenaro vd., 2017; Wong vd., 2019; Alahmari, 2021; Stamp vd., 2023; Wu vd., 2023a; Rust vd., 2025). (Şekil 1)

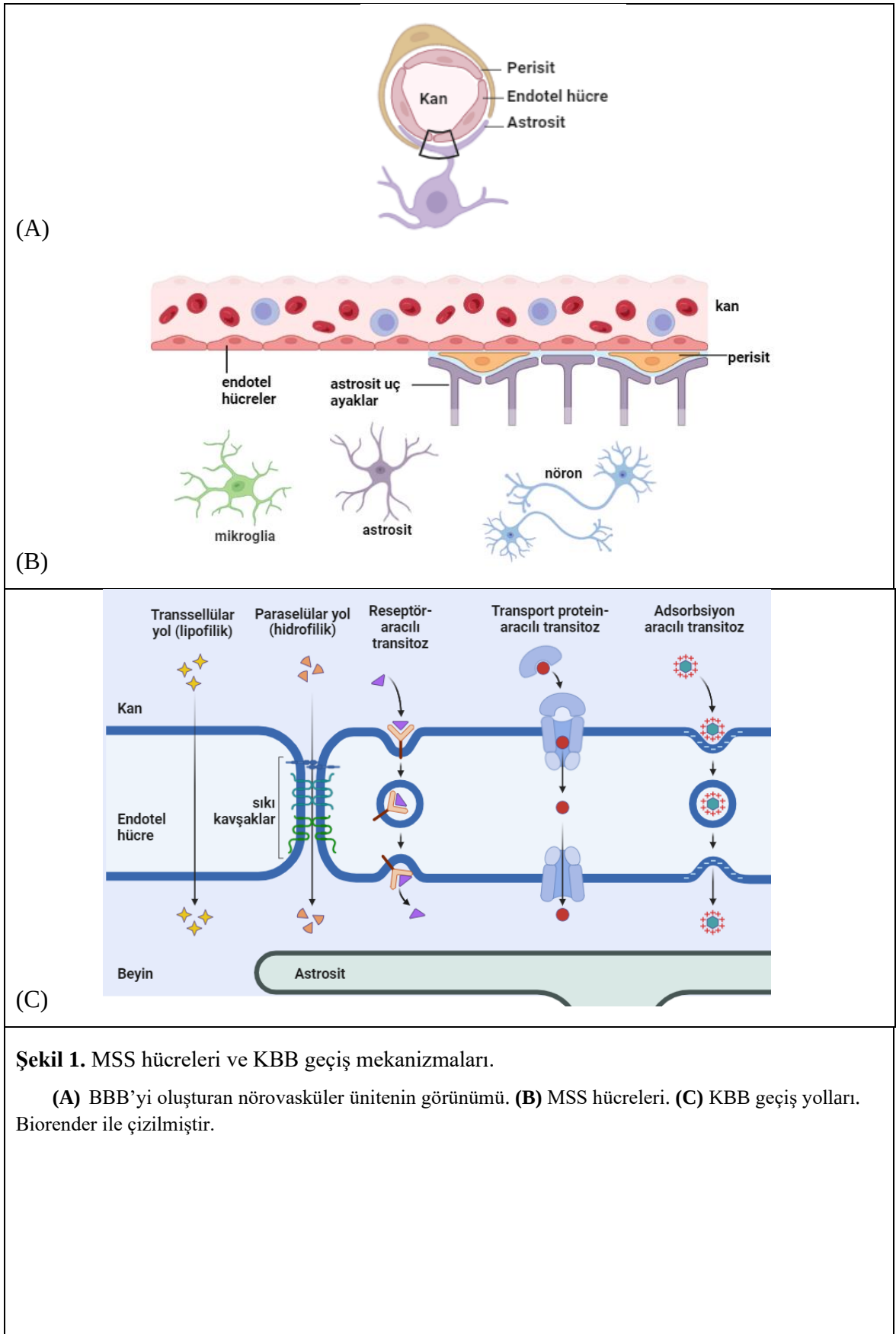
KBB geçiş sistemleri

Endotel hücreleri arasındaki boşlukların son derece dar olması nedeniyle moleküller için hücreler arası geçiş imkanı oldukça sınırlıdır. Bu sebeple, beyne geçmesi gereken temel besin ve maddeler, KBB'yi farklı hücre içi yollarla geçebilir (Mc Carthy vd., 2015; Furtado vd., 2018; Wong vd., 2019; Alahmari, 2021; Wu vd., 2023a; Rust vd., 2025). (Şekil 1C)

- **Paraselüler yol (hidrofilik maddeler):** Sükroz gibi suyla çözünebilen küçük moleküller, sıkı bağlantıların izin verdiği ölçüde endotel hücreleri arasından geçebilir. Ancak bu yol sınırlı geçirgenliğe sahiptir. Enflamasyon gibi durumlar, sıkı bağlantıların bozulmasına neden olarak bu yolla geçişi artırabilir.
- **Transselüler yol (lipofilik maddeler):** Çözünen maddelerin endotel hücresi boyunca hareketine dayanır. Bu yol pasif difüzyonla işler ve enerji gerektirmez. Pasif difüzyon, birçok molekülün ve terapötik bileşiğin kan dolaşımından beyne girmesinin birincil

yoludur. Bir lipit çift tabaksından oluşan KBB'yi geçecek maddelerin veya taşıyıcı sistemlerin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri (lipofilite, moleküler ağırlık, molekül yükü ve hidrojen bağlama kapasitesi gibi) pasif taşınmayı etkiler. Lipofilik yapıya sahip ve 500 Dalton'un (Da) altında moleküler ağırlığı olan küçük moleküller (alkol, kafein, oksijen, CO₂ gibi), endotel hücrelerinin lipit çift tabakasını doğrudan geçebilir. Sıkı bağlantılar, hücreler arası taşınımı engellediği için bu tür maddelerin beyne geçişi büyük ölçüde transselüler yolla gerçekleşir.

- **Taşıyıcı protein aracılı transitoz:** Glikoz, amino asitler, yağ asitleri, vitaminler gibi moleküller, spesifik taşıyıcı proteinler aracılığıyla membranlardan geçerek MSS'ye alınır. Bu geçiş, taşıyıcının konformasyon değişimiyle sağlanır ve genellikle konsantrasyon gradyanı yönünde membrandan geçebilir. Geçiş çift yönlü olabilir.
- **Adsorpsiyon aracılı transitoz:** Pozitif yüklü (katyonik) makromoleküller, endotel hücrelerinin negatif yüklü (anyonik) membranlarıyla elektrostatik etkileşime girerek endositozla içeri alınır. Bu mekanizma reseptör bağımlı olmadığı için daha yüksek kapasiteye ancak daha düşük afiniteye sahiptir.
- **Aktif dışarı akış (efflux) taşıyıcıları:** Beyni, lipitte çözünebilir ve damar duvarlarından pasif olarak geçebilen potansiyel olarak zararlı bileşiklerden korumak amacıyla ek bariyer sistemleri vardır. Bu sistemler arasında, moleküllere bağlanarak onları beyin dokusundan kan dolaşımına taşıyan dışarı akış pompaları yer alır. Özellikle P-glikoprotein (P-gp) gibi aktif taşıyıcılar, beyin kapiller endotel hücrelerinin lümenal yüzeyinde yoğun şekilde bulunur. İlaçlar, ksenobiyotikler ile endojen metabolitlerin beyinde birikmesini önlemek için bu bileşenleri aktif olarak dış ortama taşır.
- **Reseptör aracılı transitoz:** İnsülin, transferrin, leptin gibi spesifik reseptörlere bağlanan ligandlar, veziküller aracılığıyla hücre içine alınır ve KBB boyunca taşınır. Protein, hormon, büyüme faktörü ve enzim gibi birçok molekülün geçişi veziküler taşıma mekanizması ile sağlanabilir. Vesikül içine hapsolan reseptör-ligand kompleksi endotel bariyer boyunca taşındıktan sonra kompleks ayrışır ve ligandlar beyne salınır. Bu taşıma sistemi, hedeflenmiş ilaç sistemleri için özel bir yol sağlar ve ilaçların aktif pompalarla hücre dışına atılmasını önleyebilir. Bu nedenle, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut vadeden bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.



1.1. ALZHEİMER HASTALIĞI

1.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın etiyoloji ve patofizyoloji

Alzheimer Hastalığı (AH), demansın en yaygın formunu temsil eden ve çoğunlukla yaşlı bireyleri etkileyen progresif bir nörodejeneratif bir hastalıktır. Küresel yaşlı nüfusun artışıyla birlikte, 2050 yılına kadar dünya genelinde 100 milyondan fazla bireyin AH'den etkileneceği öngörülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), AH'yi halk sağlığı açısından öncelikli bir sorun olarak tanımlamaktadır (Monteiro vd., 2023). Ülkemizde ise yaklaşık 600 bin kişi bu hastalıktan etkilenmektedir. Toplumdaki yaşlı nüfusun artmasıyla birlikte, demans ve AH vakalarının da artış göstermesi beklenmektedir. Türkiye'de sağlık altyapısının gelişimi açısından kritik bir veri kaynağı olan "Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2023" duyurusuna göre 65 yaş üstü bireylerde görülen sağlık sorunlarının %5.5'i AH kaynaklıdır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2023). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2024 verilerine göre yaşlı bireylerde görülen ölümlerin %3.2'si AH ile ilişkilendirilmiştir (TÜİK, 2025).

Klinik olarak AH; hafıza kaybı, bilişsel işlevlerde bozulma ve kişilik değişiklikleriyle karakterizedir. Hastalığın ilk evresinde en sık görülen belirti seçici hafıza kaybıdır. Mevcut tedaviler yalnızca semptomların şiddetini azaltmayı hedeflemekte olup, hastalığı durdurabilecek ya da geri çevirebilecek kesin bir tedavi henüz bulunmamaktadır (Fan vd., 2020; Singh vd., 2024). Bu semptomlar, beyinde özellikle hipokampal bölgeden başlayarak belirli protein ve protein fragmentlerinin yıllar içinde anormal birikimi sonucunda gelişen nöronal disfonksiyon, inflamasyon ve nöron kaybıyla ilişkilidir (Anand vd., 2014; Kumar vd., 2015). Bu süreç ilerledikçe bireylerde hafıza ve bilişsel becerilerde belirgin kayıplar meydana gelir (Sehar vd., 2022). AH, bireylerin yaşam kalitesini ve bağımsızlığını kısıtlamakla kalmaz; aynı zamanda aile bireyleri ve toplum üzerinde önemli psikososyal ve ekonomik yük de oluşturur. Hastalık, yıllardır nörodejeneratif hastalıklar arasında en çok araştırmalara konu olmuşken, etkin bir tedavi yöntemi henüz geliştirilememiştir.

Hastalığın klinik seyri genellikle üç evrede incelenir: erken, orta ve ileri dönem. Erken evrede hafıza kaybı ve dikkat bozuklukları gibi belirtiler yavaş yavaş başlar. Orta evrede hasta, yakın döneme ait olayları hatırlamakta zorlanır ve günlük işlevlerde bozulmalar yaşanır. İleri evrede ise yaygın serebral atrofi ile birlikte belirgin bilişsel kayıplar,

davranış değişiklikleri ve fiziksel bağımlılık gözlenir (Keleş vd., 2018; Koychev cd., 2020).

AH; erken başlangıçlı (ailesel) ve geç başlangıçlı (sporadik) olmak üzere iki ana formda sınıflandırılır. Erken başlangıçlı AH genellikle, Amiloid öncül proteini (APP), Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2) genlerinde görülen mutasyonlarla ilişkilidir ve 65 yaş öncesinde ortaya çıkar. Geç başlangıçlı AH ise daha sık görülür ve Apolipoprotein E (ApoE) geninin E4 aleli ile hastalığın ilerlemesinde güçlü bir ilişki vardır (Monteiro vd., 2023). Bilişsel gerilemenin hızlı bir şekilde ilerlediği erken başlangıçlı hastalara karşı geç başlangıçlı hastalarda hafızada daha fazla sorun gözlenir (Sehar vd., 2022). Ayrıca hastalıkta inflamatuvar süreçlerin aktivasyonu, reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen türlerinin (RNS) birikimi, mitokondriyal disfonksiyon ve metal iyonlarının homeostazındaki bozulmalar AH'de önemli patofizyolojik mekanizmalar olarak tanımlanmıştır (Tiwari vd., 2019; Scheltens vd., 2021).

AH'nin iki temel histopatolojik özelliği, amiloid- β ($A\beta$) plaklarının hücre dışında, hiperfosforile tau proteinine bağlı nörofibriler yumakların (NFY) ise hücre içinde birikmesidir (Fan vd., 2020; Monteiro vd., 2023). Bu patolojik proteinlerin birbirini tetiklediği, pozitif geri besleme döngüsüyle hastalık progresyonuna katkı sunduğu düşünülmektedir (Savelieff vd., 2019).

Tau proteini, normalde mikrotübül stabilizasyonunda görev alan ve özellikle nöronların aksonal bölgelerinde yüksek oranda bulunan bir mikrotübül ilişkili proteindir. Aksonal taşıma, sinaptik plastisite ve genomik stabilite gibi birçok hücresel süreçte rol alır (Michalicova vd., 2020). AH'de, Tau proteininde hiperfosforilasyon meydana gelir ve bu durum Tau'nun mikrotübüllere bağlanma kapasitesini azaltarak çözünürlüğünü bozar. Sonuç olarak, hücre içinde biriken hiperfosforile Tau, toksik agregat NFY'ye dönüşür. Bu agregatlar, mikrotübül iskeletinde bozulmaya, aksonal iletimde aksaklıklara ve nihayetinde hücre ölümüne neden olur (Panza vd., 2019). Yapılan araştırmalar, $A\beta$ birikiminin tau patolojisini tetikleyebileceğini ve bu iki patolojik sürecin sinerjik şekilde ilerleyerek hastalığın nörodejeneratif tablosunu ağırlaştırdığını ortaya koymuştur (Sies vd., 2017; Araki, 2022).

$A\beta$ birikimi, beynin korteks ve hipokampusunda başlar. Amiloid kaskad hipotezine göre (Şekil 2A), $A\beta$ peptidi bir transmembran glikoprotein olan APP'nin proteolitik kesilmesiyle üretilir (van der Kant & Lawrence, 2015). APP; sinyalizasyon, nöronal

gelişim ve hücre içi taşıma gibi nöronal homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynayan bir glikoproteindir (Sehar vd., 2022). APP'nin α - ve γ -sekretazlarla amiloidojenik olmayan kesimi daha baskındır ve agregre olmayan farklı A β fragmanları oluşturur; bu A β fragmanları sinyal iletim sürecinin bir parçası olarak beyinde yer alır (Muresan & Ladescu Muresan, 2015). Nöronal elektrofizyoloji, sinaptik plastisite, uzun vadeli güçlenme, nöronal iletim, öğrenme, hafıza, nörogenez ve nöronal hayatta kalma gibi hayati fonksiyonları düzenler (Panza vd., 2019).

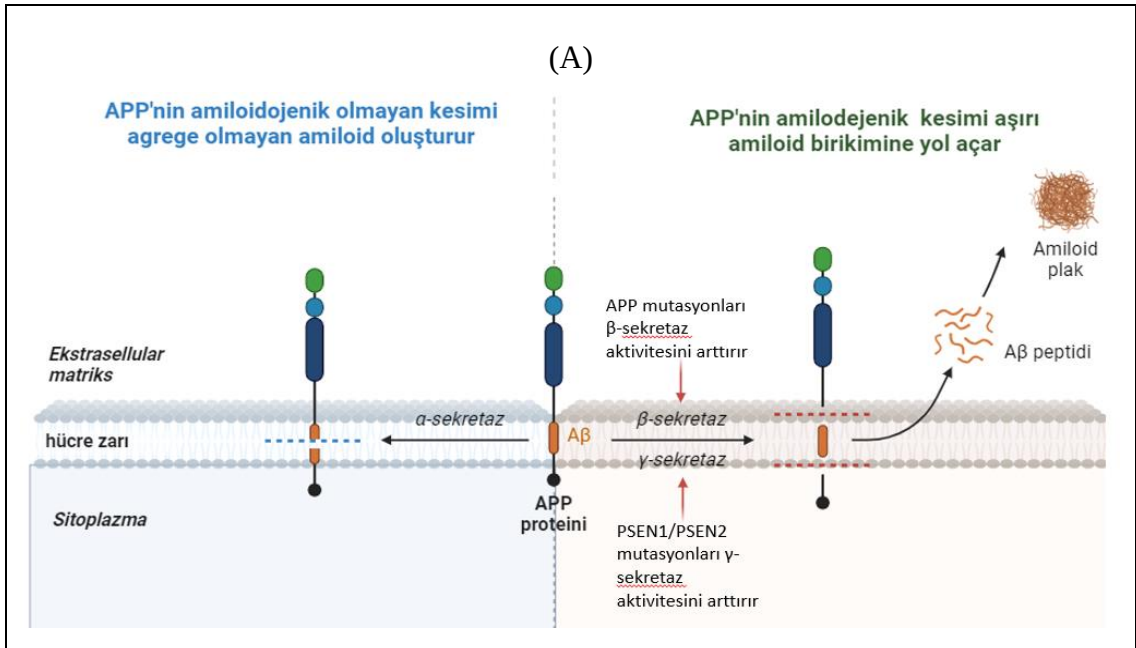
Amiloidojenik yolda genetik yatkınlık, mutasyonlar ve/veya çevresel faktörlerin etkisiyle APP'nin, β amiloid prekürsör protein kesme enzimi 1 (BACE1) β -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından proteolitik olarak parçalanması sonucunda, 37 ila 43 amino asit uzunluğunda çeşitli toksik A β fragmentleri oluşur (Hardy & Selkoe, 2002; Xu vd., 2021). Bu fragmentler, genellikle hücre dışı boşluğa veya salgı yolu organellerinin lümenine salınır. Üretim sıklığı açısından değerlendirildiğinde, A β_{40} en baskın izoform olup, A β_{38} ve A β_{42} 'ye kıyasla daha yüksek oranda sentezlenir. Buna ek olarak, daha düşük miktarlarda A β_{37} ve A β_{43} türleri de oluşur. A β_{42} , daha yüksek hidrofobik yapısı nedeniyle A β_{40} 'a göre agregat oluşturma eğilimi çok daha fazla olan, nörotoksik etkisi yüksek ve plak oluşumunda başlıca rol oynayan izoformdur. A β_{42} 'nin bu patolojik özelliği, APP geninde ya da γ -sekretaz kompleksinin katalitik alt birimi olan PSEN proteinlerinde meydana gelen mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Söz konusu mutasyonlar, γ -sekretaz aktivitesini değiştirerek A β_{42} üretimini A β_{40} 'a kıyasla anlamlı düzeyde artırmaktadır. A β_{42} 'nin patolojik rolünün, APP'de ve γ -sekretazın katalitik alt birimi olan presenilindeki mutasyonlardan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu mutasyonların γ -sekretazın bölünmesini etkilemesinden kaynaklı patojenik A β_{42} , A β_{40} 'a göre daha fazla üretilir (Steiner vd., 2018).

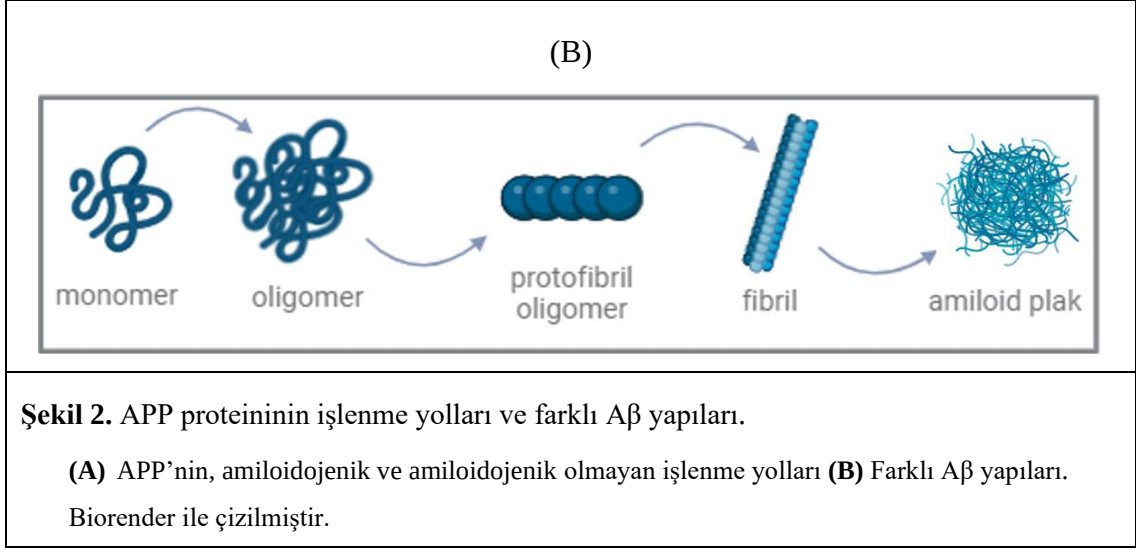
Sağlıklı bireylerde A β ; proteolitik degradasyon, perivasküler drenaj, glial fagositoz veya KBB yoluyla elimine edilir. Ancak AH'de A β üretimi ve temizliği arasındaki dengesizlikten nedeniyle birikimi artar (Tarasoff-Conway vd., 2015).

A β_{42} peptidi sırasıyla monomer, oligomer, fibril ve plak şeklinde organize olur (Şekil 2B) (Chen vd., 2017). A β monomerleri korteks ve hipokampüste üretilir, farklı moleküler ağırlıkta oligomerler oluşturmak üzere birleşir ve daha sonra çözünmeyen A β fibrilleri halinde kümelenerek plakları oluşturur (Canter vd., 2016). Bu süreçte oluşan suda çözünür A β oligomerleri (A β_o), hem sinaptik disfonksiyona hem de hücre içi kalsiyum

dengeşizliğine, oksidatif strese, membran hasarına ve inflamatuvar yanıtın aktivasyonuna yol açarak ciddi nörotoksisiteye neden olur (Carrillo-Mora vd., 2014; Brothers vd., 2018). A β o'lar, bilişsel bozulma ile en yakından ilişkili toksik form olarak kabul edilir ve günümüzde tedavi hedeflerinin merkezindedir (An vd., 2024). A β o'nun toksisitesini azaltmaya yönelik stratejiler arasında; immünoterapiler ile oligomerlerin temizlenmesi, A β oluşumunu önleyici ajanların kullanımı ve antioksidan temelli küçük moleküllerle toksisitenin azaltılması gibi yaklaşımlar yer alır. Özellikle hastalığın erken döneminde müdahale edilmesi, tedavi başarısı açısından kritik öneme sahiptir (Araki, 2022; Araki & Kametani, 2021).

AH'de biriken A β o, yalnızca yapısal değişikliklere yol açmakla kalmaz; aynı zamanda hücresel düzeyde kritik biyokimyasal stres yanıtlarını da tetikler. Bu süreçlerin başında ise oksidatif stres yer alır ve ROS dengeşizliği nöronal hasarın ilerlemesinde belirleyici rol oynar. Artan oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve nöronal membran bozulması gibi zincirleme etkilerle hastalığın seyri ağırlaşır. Aşağıda detaylandırılacağı üzere, oksidatif stres AH patogeneğinde hem sebep hem de sonuç olarak çift yönlü bir role sahiptir.





1.1.2. Alzheimer Hastalığı'nda oksidatif stres ve inflamasyon

AH'de Aβ birikimi hem yapısal bozukluklara hem de hücresel düzeyde ciddi biyokimyasal yanıtların tetiklenmesine yol açar. Bu süreçlerin merkezinde oksidatif stres ve inflamatuvar mekanizmalar yer alırken, nöronların fonksiyonel bütünlüğünü bozarak hastalığın ilerleyici doğasına da katkıda bulunurlar.

Oksidatif stres, hücresel antioksidan savunma sistemlerinin oksidan türleriyle başa çıkamadığı durumlarda ortaya çıkar. Prooksidanlar, yani serbest radikaller, elektron transferi sırasında açığa çıkan ve reaktif bileşikler olarak tanımlanan moleküllerdir. ROS ve RNS en yaygın oksidanlardır ve hem metabolik reaksiyonlar sırasında doğal olarak oluşabilir hem de patojenik uyarılarla indüklenebilirler. Bu türler, yüksek reaktiviteye sahip oldukları için diğer moleküllerle etkileşime girerek zincirleme serbest radikal üretimini başlatabilirler (Ashok vd., 2022; Jomova vd., 2023). Hidroksil radikali (-OH), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (-NO) ve nitrojen dioksit ($-NO_2$) bu gruba örnek olarak verilebilir. En kararsız olan -OH radikali H_2O_2 'den üretilir, birçok biyolojik moleküle hızlı ve spesifik olmayan bir şekilde reaksiyona girerek zarar verir (Collin, 2019). Düşük-orta düzey ROS ve RNS, önemli fizyolojik fonksiyonlarda, redoks homeostazı ve temel transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde gereklidir. Öte yandan aşırı üretimleri, redoks homeostazını bozarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur. (Jomova vd., 2023).

Beyin, vücuttaki toplam oksijenin yaklaşık %20'sini tüketmesine rağmen, antioksidan savunma kapasitesi sınırlıdır. Ayrıca hücre zarlarında yüksek oranda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, ROS'lara karşı oldukça hassastır. Bu yağ asitleri, yapılarındaki çoklu çift bağlar nedeniyle oksidasyona uğramaya eğilimlidir. Buna ek olarak, beyinde bulunan redoks-aktif geçiş metalleri (örneğin demir ve bakır), ROS üretimini kolaylaştırarak oksidatif hasarın oluşumunu artırır. Tüm bu faktörler, beyin oksidatif stres kaynaklı hasara karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olur (Bayliak vd., 2023). Mitokondri, endoplazmik retikulum ve fagositik hücreler gibi organeller ROS üretiminin başlıca kaynaklarıdır (Ashok vd., 2022). ROS ve RNS, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, DNA hasarı ve protein modifikasyonları yoluyla nöronal hücre yapısını bozar ve apoptozu tetikler (Twarowski & Herbet, 2023).

Nöronal DNA, özellikle mitokondriyal DNA, ROS tarafından hedef alınarak oksidatif mutasyonlara uğrar (Cassidy vd., 2020). Bu hasara karşı hücreler; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi enzimatik savunma sistemleriyle ve glutatyon, koenzim Q10 gibi enzimatik olmayan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlarla yanıt verir. Endojen ve eksojen (vitamin, polifenol, karotenoid vs.) kaynaklı antioksidanlar birlikte çalışarak ROS ve RNS'yi nötralize eder (Jomova vd., 2023; Pisoschi vd., 2021).

Aβ'nin, demir, bakır ve çinko gibi geçiş metalleriyle etkileşime girerek serbest radikal oluşumunu artırır. Aβ'nin bu metallere yüksek afinitesi, agregat oluşumunu kolaylaştırıp oksidatif yükü artırır (Jomova vd., 2023). Aβ plaklarının bulunduğu beyin bölgelerinde bu metallere ilişkin seviyelerin anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir (Rajendran vd., 2009). Aβo'ların neden olduğu nörotoksisite, sinaptotoksisite ve nöroinflamasyon (Şekil 3); oksidatif stres, Aβo'ların hücre yüzeyi reseptörlerine (NMDA; N-metil-D-aspartat) aşırı bağlanması, kalsiyum homeostazının bozulması, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz yoluyla ilerler (Viola & Klein, 2015). Aβo'lara çok fazla maruziyetin, mitokondrideki kalsiyum homeostazının bozulmasına ve kalsiyum seviyesinin indüklenmesine, bunların sonucunda ise ROS üretiminin artmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Araki, 2022).

Oksidatif stresin erken evre AH patogeneğinde rol oynadığı, lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve DNA oksidasyonuna ilişkin biyobelirteçlerle gösterilmiştir (Arslan vd., 2020). Bu süreç, enerji metabolizmasında görevli enzimlerin fonksiyonunu bozarak

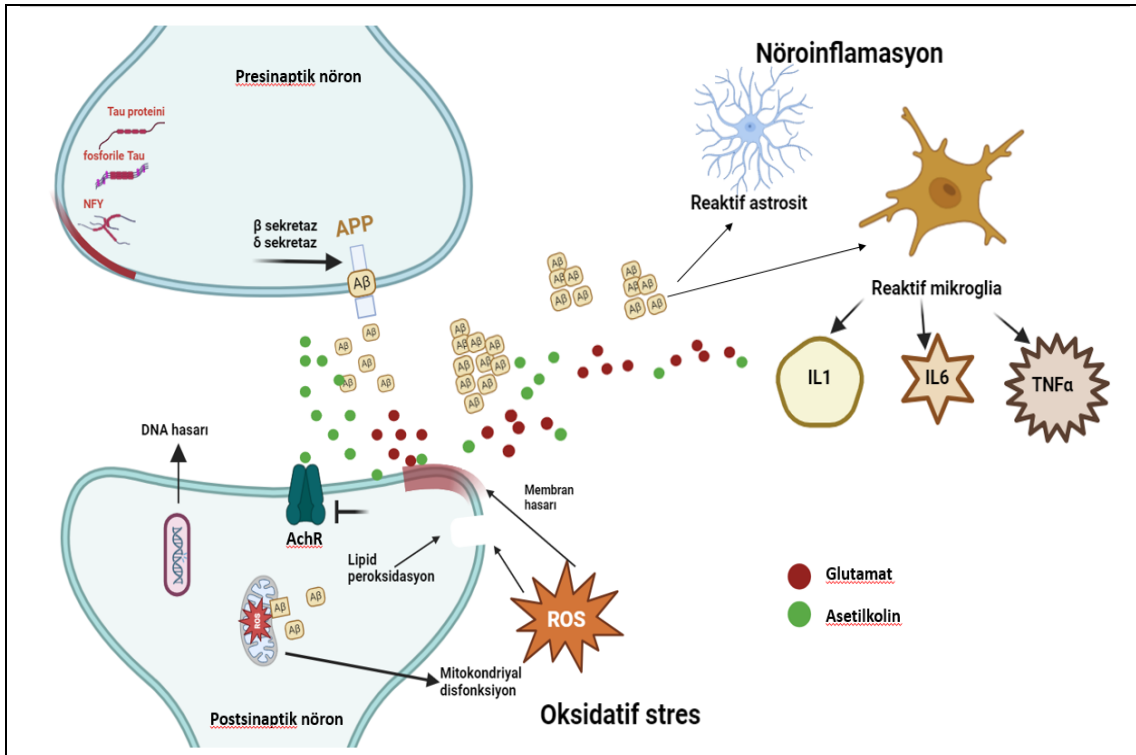
Adenozin trifosfat (ATP) sentezinin azalmasına yol açar (Araki & Kametani, 2021). Sonuç olarak, iyon dengesi bozulur, nörotransmisyon olumsuz etkilenir ve kalsiyum birikimi artar (Bezprozvanny & Mattson, 2018).

Oksidatif stres kaynaklı hasarın, A β 'nin yoğun olduğu beyin bölgelerinde daha fazla olduğu, protein karbonilleri (Hensley vd., 1995), lipid peroksidasyon ürünü 4-hidroksinonenal (HNE) (Halliwell, 2006) ve DNA oksidasyon ürünü 8-OH-deoksiguanozin (Abolhassani vd., 2017) gibi göstergelerle ortaya konmuştur. 3 aylık erkek farelerde yapılan bir çalışmada likopenin mikrogliya aktivasyonunu önleyerek inflamatuvar mediatörlerin aşırı salınımını baskıladığı, antioksidan enzim içeriğini artırarak lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan amiloidogenez ve hafıza kaybını hafiflettiği gösterilmiştir (Wang vd., 2018). Bir sıçan modeli çalışmasında fukoksantin, antioksidan (GSH, SOD ve CAT seviyelerinde artış), anti-inflamatuvar (sitokin seviyelerinde azalış), nöroprotektif mekanizmalar yoluyla bilişsel işlevleri iyileştirme, nörotransmitter geri kazandırma, A β ₄₂ birikimi ve tau proteininin inhibisyonunu sağladığı raporlanmıştır (Dhami vd., 2021). Polifenolik özellikteki kurkuminin LPS ile indüklenen oksidatif stresi ve malondialdehit (MDA) seviyelerini azaltarak nöroinflamasyona karşı koruma sağladığı, hafıza bozukluğunu belirgin şekilde iyileştirerek nöroprotektif etki sağladığı *in vitro* ve *in vivo* deneylerle sunulmuştur (Khan vd., 2019a). Bu nedenlerle, oksidatif hasarı azaltmak ve/veya endojen antioksidan savunmalarını iyileştirmeye yönelik tedavilerin uygulanması, nörodejeneratif hastalık süreçlerini önleyebilir, geciktirebilir veya iyileştirebilir (Delanty & Dichter, 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, inflamasyonun da AH patogenezinde belirgin bir rol oynadığını göstermektedir. A β , mikrogliya ve astrositleri aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin ((Interlökin 1 β (IL-1 β), Interlökin 18 (IL-18), Interlökin 6 (IL-6), Tümör nükleer faktör α (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ)) salınımını artırır (Fakhoury, 2020). Aktive mikrogliaların amiloidi fagositte ettikten sonra yetersiz parçalanması sebebiyle daha fazla sitokin salgıladığı ve inflamasyonu kronikleştirdiği bildirilmiştir (Sinyor vd., 2020). Bu sitokinler ayrıca APP ekspresyonunu uyararak A β üretimini artırır. IL-1 β , AH'nin erken döneminde mikrogliya tarafından salgılanan başlıca sitokindir. Post-mortem çalışmalarda immünokimyasal yöntemlerle tespit edilebilir ve A β plaklarının bulunduğu beyin dokusunda yoğun olarak bulunur. APP sentezini düzenleyerek A β üretimini dolaylı olarak artırır. IL-1 β 'nin artışı, astrosit aktivasyonuna ve ikincil proinflamatuvar maddelerin salınımına neden olur (Twarowski & Herbet, 2023).

Nöronlar inflamatuvar sinyal moleküllerini sentezleyerek bu sürece katkı sağlar. Bu nedenle nöronların kendi çevrelerindeki inflamatuvar reaksiyonları şiddetlendirmesi ve kendi yıkım döngülerine sebep olabilirler. İnflamasyon baskılayıcı düzenleyici moleküllerin eksikliği, A β ile ilişkili kronik nöroinflamasyonun sürmesine neden olur (Li vd., 2020). APP/PS1 transgenik fare modellerinde, artan A β düzeylerinin oksidatif stres ve inflamasyonu artırdığı, bu durumun tau fosforilasyonunu tetikleyerek sinaptik işlev kaybı ve nöron ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Tautou vd., 2023).

Oksidatif stres ve inflamasyon, AH etiopatogenezinde birbirini tetikleyen süreçler olarak kritik öneme sahiptir. Oksidan-antioksidan dengesinin bozulması, mitokondriyal hasar, nöronal apoptoz ve nöroinflamasyonu tetikler. Bu nedenle, oksidatif stresin baskılanması ve antioksidan savunmaların güçlendirilmesi, AH ilerlemesini yavaşlatabilecek potansiyel tedavi yaklaşımları arasında değerlendirilmektedir (Delanty & Dichter, 2000; Sinyor vd., 2020).



Şekil 3. AH'nin nöropatofizyolojik mekanizması.

Biorender ile çizilmiştir.

1.2. N-ASETİL SİSTEİN

AH'de oksidatif stresin ve inflamasyonun kritik rolü göz önüne alındığında, bu patolojik süreçleri hedef alabilecek farmakolojik ajanların değerlendirilmesi önem kazanmıştır. Bu bağlamda, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle dikkat çeken N-asetil sistein (NAC), nörodejeneratif hastalıkların yönetiminde umut vadeden bir molekül olarak öne çıkar.

NAC, L-sistein amino asitinin N-asetillenmiş bir türevi olan tiyol grubu içeren bir bileşiktir. Moleküler ağırlığı 163.2 g/mol olan NAC, küçük moleküler yapısı sayesinde farmakokinetik açıdan çeşitli avantajlar sunar. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ve DSÖ'nün temel ilaç listesinde yer alan NAC, güçlü, güvenli, ucuz ve kolay erişilebilir bir antioksidan olarak sağlık sisteminde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Tenório vd., 2021).

Yapısal olarak sisteine çok benzer olmakla birlikte, asetil grubu ($-\text{CH}_3\text{CO}$) taşıması NAC'ı sisteinden ayırır. Bu grup NAC'ın suda çözünürlüğünü ve stabilitesini artırır; oksidatif ve metabolik olaylara karşı daha dirençli hale getirir ve sistemik uygulamalarda düşük toksisite profili sergilemesini sağlar ve KBB'den geçebilir (Lomelí Martínez vd., 2025). Tiyol bileşikler reaktif sülfidril ($-\text{SH}$) grupları sayesinde disülfid bağları (iki sistein kalıntısı arasında, $-\text{SH}$ gruplarının hidrojen ($-\text{H}$) kaybetmeleri sonucu oluşan S-S bağları) oluşturarak oksidanlarla reaksiyona girer ve hücresel düzeyde antioksidan aktivite gösterir (de Andrade vd., 2015). NAC'ın biyolojik etkisi tiyol grubuna bağlanırken, asetil grubu hem çözünürlüğü artırır hem de sülfhidril grubunun reaktivitesini azaltarak sisteine göre daha az toksik ve oksidasyona karşı daha dirençli hale gelmesini sağlar (Lomelí Martínez vd., 2025). Tiyol-disülfür metabolizması, bağışıklık sistemi ve hücresel redoks dengesi açısından kritik öneme sahiptir (Zinatullina vd., 2021).

İlk olarak 1960 yılında keşfedilen NAC, 1968 yılında klinik olarak parasetamol doz aşımı tedavisi ve mukolitik ajan olarak onaylanmıştır (Amini vd., 2016). 1980'li yıllardan itibaren ise mukolitik etkisinin ötesinde, endojen glutatyon (GSH) seviyelerindeki azalma ile karakterize oksidatif stres durumlarında terapötik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Zinatullina vd., 2021). Ayrıca NAC, aktif taşımaya ihtiyaç duymadan hücre

zarından kolaylıkla geçebilme özelliği sayesinde günümüzde aktif olarak kullanılır (Ghafari-zadeh vd., 2021).

NAC oral veya intravenöz yolla uygulanabilir. Oral uygulamada pik plazma konsantrasyonuna 1–2 saat içinde ulaşır ve terminal yarı ömrü yaklaşık 6,25 saattir. Düşük biyoyararlanım (%6–10) ile karakterizedir, çünkü hızla metabolize olur ve uygulamadan kısa süre sonra kendi formu değil, yalnızca düşük seviyelerde oksitlenmiş formu saptanabilir (Borgström vd., 1986; Cotgreave & Moldeus, 1987; Holdiness, 1991; Chakraborty vd., 2025). Bununla birlikte intravenöz uygulamalarda NAC'ın insan beyinde GSH düzeylerini artırabildiği gösterilmiştir. Ancak, plazmada hızla disülfidler oluşturur ve bu da ilacın plazmadaki varlığını yaklaşık 6 saat ile sınırlar (Sarker vd., 1999; Harada vd., 2004; Yahia vd., 2024). NAC'ın düşük biyoyararlanımı, oksidatif stresle ilişkili hastalıklar üzerindeki etkilerini en üst düzeye çıkarmanın ana sınırlamalarından biridir.

NAC'ın birçok sistemik hastalıkta klinik olarak kullanıldığı ve bu kapsamda oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve mitokondriyal disfonksiyon gibi patolojik süreçleri hedef alan çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmada yer aldığı bilinmektedir (Yahia vd., 2024; Lomelí Martínez vd., 2025). Ayrıca pulmoner ve kardiyovasküler hastalıklar, psikiyatrik bozukluklar, romatoid artrit, SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok klinik tabloda da değerlendirilmektedir (Ooi vd., 2018; Dlodla vd., 2019; Shi & Puyo, 2020; Schwalfenberg 2021; Zinatullina vd., 2021., Guerini vd., 2022).

1.2.1. NAC'ın antioksidan etkileri

Artan oksidatif stres, nöronal hasarın merkezinde yer alır. Bu süreçte, terapötik antioksidan yaklaşımlar ön plana çıkar. Bu yaklaşımların başında gelen NAC, hem doğrudan hem de dolaylı yollarla oksidatif stresi azaltma potansiyeli sayesinde dikkat çeker.

Sağlıklı bir hücre ortamda, çeşitli enzimatik (SOD, CAT, GPX gibi) ve enzimatik olmayan antioksidanları içeren endojen savunma sistemleri, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek redoks dengesini korur. Ancak bu denge, genetik mutasyon, inflamasyon veya travmatik hasar gibi patolojik durumlarda bozulabilir (Ashok vd., 2022). Beyin,

yüksek oksijen tüketimi ve düşük antioksidan rezervi nedeniyle bu dengesizliğe karşı savunmasız kalır. ROS, hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna, protein inaktivasyonuna ve DNA hasarına neden olurken; mitokondriyi de hedef alarak enerji üretimini bozar. Bu durum, sinaptik fonksiyonların aksamasına ve apoptoza yol açar. Antioksidanlar, bu zincir reaksiyonları keserek hücre bütünlüğünü korumada kritik rol oynar (Smaga vd., 2021).

GSH, en yaygın endojen antioksidanlardan biri olup; sistein, glutamat ve glisin aminoasitlerinden sentezlenir. ROS'un zararlı etkilerini baskılar, proteinlerdeki disülfür bağlarını düzenler ve redoks aktif metallerle etkileşerek detoksifikasyonu sağlar. Oksidatif stres koşullarında, sistein (Cys) oksitlenerek sistin (Cys-Cys) yapılarına dönüşerek sistin-glutamat antiport sistemiyle hücre içine alınır. Hücre içinde tekrar sisteine indirgenerek GSH sentezinde kullanılır (Atkuri vd., 2007; Smaga vd., 2021).

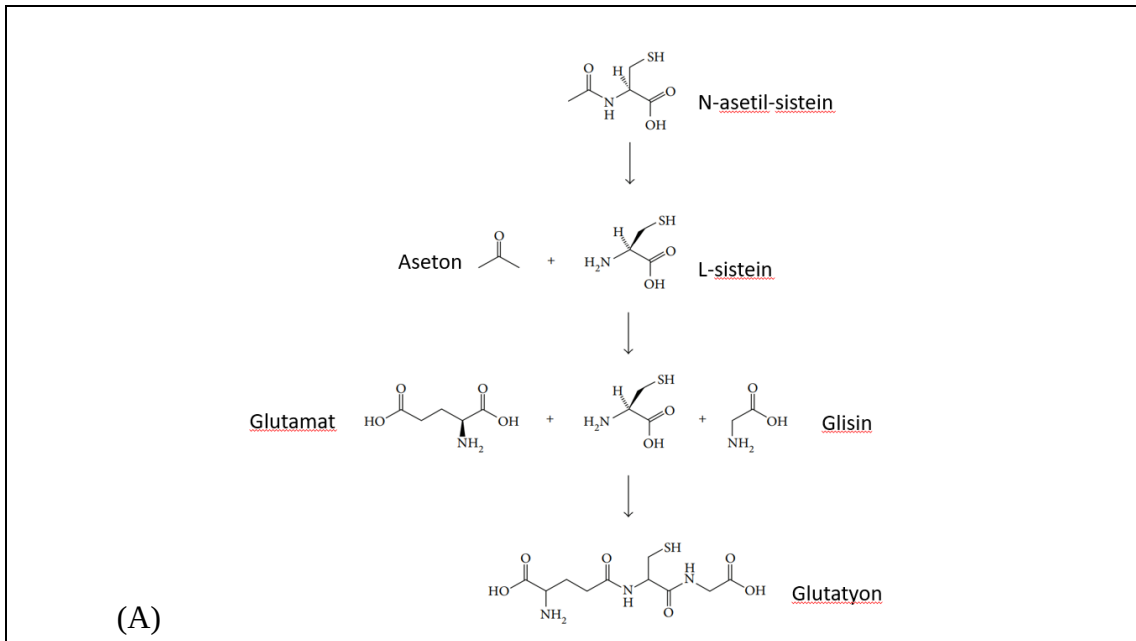
Oksidatif stres koşullarında antioksidan kapasite kaybı, GSH ve/veya onun öncüsü sisteindeki azalmayla ilişkilidir. Sistein daha yüksek asiditeye sahip olduğundan GSH sentezi için çok tercih edilmez; sisteinin pKa'sı 8.30 iken NAC'ın pKa'sı 9.52'dir. Serbest sistein, yüksek konsantrasyonlardaki toksisitesi nedeniyle metabolizmaya ve hızlı oksidasyona duyarlı olması ve inaktif disülfid sistin oluşturması nedeniyle bir GSH öncüsü olarak kullanılamaz. GSH oluşumu için gerekli bir sistein donörü NAC ise oksidatif stres homeostazında önemli bir rol oynayarak dolaylı yoldan antioksidant özellik gösterir (Şekil 4A). Hücreye girdikten sonra hızla hidroliz olarak sisteine dönüşür ve GSH sentezine katkı sağlar (Şekil 4B). Ayrıca sahip olduğu serbest tiyol grubu (-SH) sayesinde serbest radikallerin elektrofilik gruplarıyla etkileşime girerek direkt antioksidan özellik gösterir (Salamon vd., 2019; Sztolsztener vd., 2023).

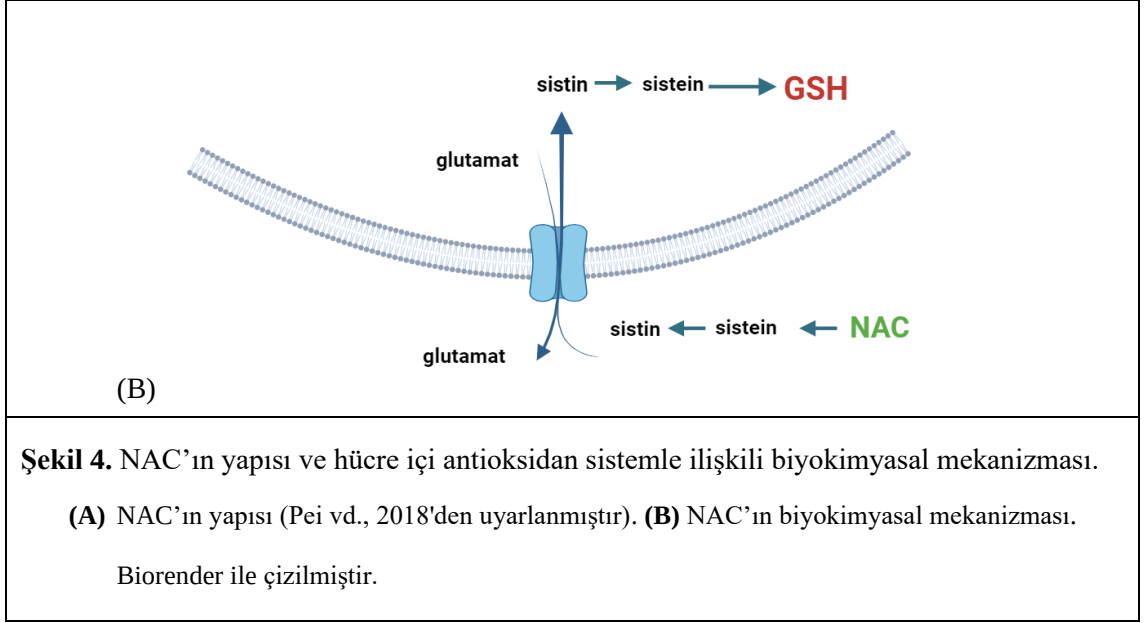
Preklinik çalışmalarda NAC'ın nöroprotektif etkileri birçok kez gösterilmiştir. Mari vd, (2020), GSH'ın AH'de lipid peroksidasyon ürünlerinin (HNE ve akrolein) temizlenmesinde ve redoks metallerinin şelatlanmasında görev aldığını bildirmiştir. Allen vd., (2012) mitokondri içi GSH azalmasının, Aβ kaynaklı oksidatif stresin ve mitokondriyal disfonksiyonun artmasına neden olduğunu göstermiştir. More vd, (2018), NAC tedavisinin AH modelinde hem mekânsal bellek kaybını hem de RyR2 kanal proteininin redoksa duyarlı azalışını önlediğini raporlamıştır. Andrade vd. (2020), NAC'ın kateşin türevleriyle birlikte sinerjik etkiler göstererek multi-hedefli bir tedavi adayı olabileceğini göstermiştir. Rind vd. (2021), NAC ve türevlerinin güvenliği ve

moleküler etkileşimleri üzerine yaptıkları çalışmada, AH gibi oksidatif strese duyarlı hastalıklarda etkili olabileceğini belirtmiştir. Alkandari vd. (2023), NAC'ın amid türevinin Aβ uygulanan sıçan modelinde oksidatif hasarı ve amiloid yükünü azalttığını, sinaptik protein ekspresyonlarını koruduğunu vurgulamıştır. Chakraborty vd. (2025) ise NAC'ın glutamat dengesini sağlamadaki rolü, sinaptik plastisite üzerindeki etkisi ve AH dahil pek çok nörodejeneratif hastalıkta klinik potansiyelini ele almıştır.

Ek olarak; NAC'ın, ROS üretiminin kontrolü, lipid peroksidasyonu, disülfid bağlarının azaltılması gibi şiddetli ve uzun süreli oksidatif stres koşullarında yer alarak (Salamon vd., 2019) HIV, kanser, kalp, diğer nörolojik bozukluklar gibi oksidatif stresle ilişkili olan hastalıklarda belirgin terapötik etkilere sahip olduğu raporlanmıştır. (Zinatullina vd., 2021; Guerini vd., 2022). Terapötik yaklaşımlar GSH ile ilgili enzimlerin etkilerini göz önünde bulundurarak antioksidan savunma sistemlerinin iyileştirilmesini amaçlar.

Bu veriler ışığında, NAC'ın AH'de artmış oksidatif stres ortamını dengeleyerek, mitokondri fonksiyonlarını koruduğunu ve nöronal yıkımı yavaşlatabileceğini ve azaltabileceğini göstermektedir. Böylece NAC, hem doğrudan antioksidan etkisi hem de GSH aracılığıyla dolaylı koruyuculuğu sayesinde AH tedavisinde gelecek vadeden ajanlardan biri olarak değerlendirilmektedir.





1.2.2. NAC'ın anti-inflamatuar etkileri

Nöroinflamasyonun en belirgin özelliklerinden biri, mikroglia aktivasyonu sonucu ROS ve RNS ile birlikte proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, TNF- α vb.) artışıdır. AH'de, inflamatuvar süreç genellikle amiloid plaklarının çevresinde yoğunlaşır ve aktive edilen mikroglia tarafından salınan sitokinler ile karakterizedir. Mikroglia ve nöronlar, hücre içi redoks homeostazını sağlamak için GSH'ı astrositlerden temin ederler. Ancak kronik inflamasyon koşullarında astrositlerden salınan ROS, mikrogliaları daha da aktive ederek oksidatif hasarı artırır (Heneka, 2015).

NAC, nükleer faktör kappa-hafif-zincir-aktive B (NF- κ B) yollarının inhibisyonu, proinflamatuvar sitokin sentezinin baskılanması ve GSH düzeylerinin artırılması yoluyla anti-inflamatuar etki gösterir (Pei vd., 2018). NF- κ B, bağışıklık, inflamasyon, hücre çoğalması ve apoptozda görev alan, ROS ile uyarılan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Jomova vd., 2023). Normal şartlarda, NF- κ B, inhibitörü I- κ B ile sitoplazmada inaktif şekilde bulunur (Şekil 5). Ancak oksidatif stres altında I- κ B aracılığıyla fosforillenerek I- κ B'den ayrılır ve çekirdeğe taşınarak inflamatuvar gen ekspresyonunu başlatır. NAC ise bu süreci ROS'un uzaklaştırılması, I- κ B'nin ubiquitinasyon ve yıkımının engellenmesi, IKK β aktivitesinin inhibisyonu ile dolaylı olarak ve aynı zamanda doğrudan NF- κ B'nin baskılanması gibi seviyelerde düzenleyebilir (Samuni vd., 2013; Pei vd., 2018; Jomova vd., 2023). Bu mekanizmalar aracılığıyla IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar

sitokinlerin ekspresyonu ve sekresyonu azaltılırken, anti-inflamatuar IL-10'un artışı sağlanabilir (Palacio vd., 2011).

Düzensiz NF- κ B aktivasyonu nörodejeneratif bozukluklar, kanser, inflammatuar hastalıklar ve artrit ile ilişkilidir (Jomova vd., 2023). Birçok prelinik ve klinik çalışmada, NAC'ın inflammatuar sitokin seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynadığını belgelenmiştir. NAC, *in vitro* ve *in vivo* inflammatuar koşullarda sitokinlerin mRNA ekspresyonunu ve protein sekresyonunu düzenleyerek antiinflammatuar özellikler göstermiştir (Palacio vd., 2011; Deepmala vd., 2015; Zheng vd., 2019). Ayrıca, hemodiyaliz, septik şok ve serebral iskemik modellerde de TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı rapor edilmiştir (Khan vd., 2004).

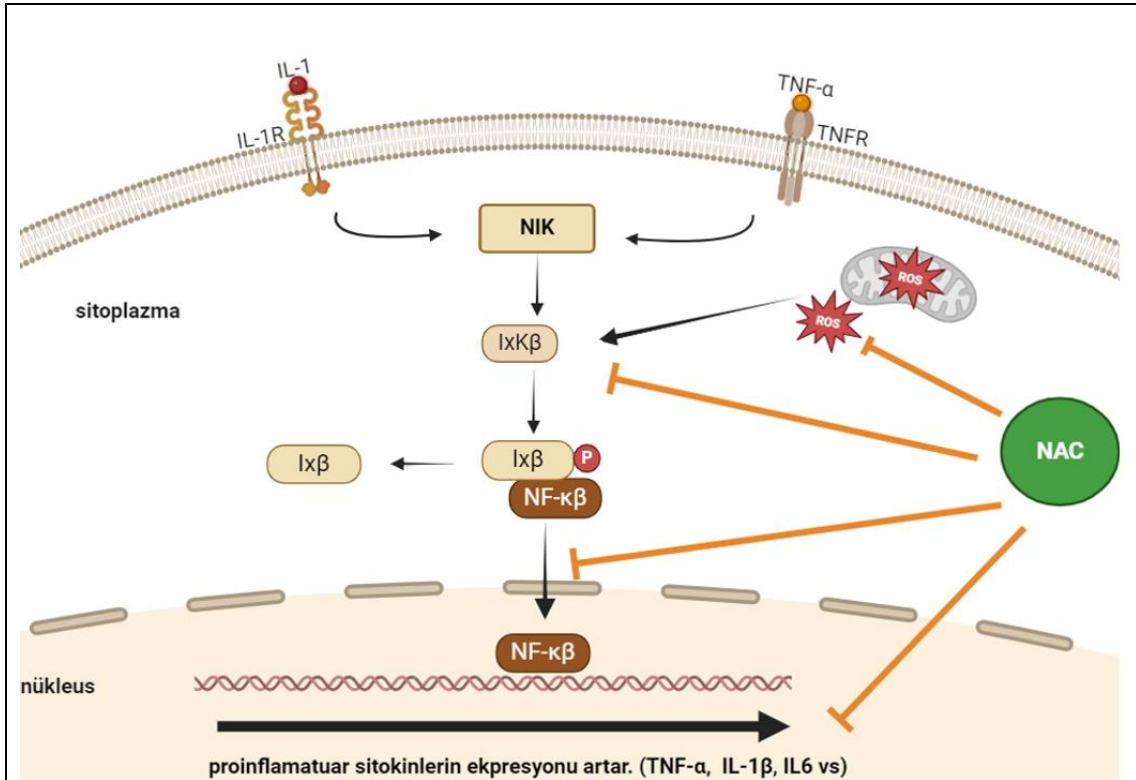
NAC ayrıca glutamat/sistin değişim sistemi (xc-) üzerinden de inflamasyonla ilişkili redoks dengesini etkileyebilir. Zhang vd. (2016), sistem xc-'nin modülasyonunun A β kaynaklı LTP inhibisyonunu tersine çevirdiğini ve bunun dolaylı olarak NAC'ın nörokoruyucu etkilerine katkı sağladığını ileri sürmüşlerdir. Erickson vd. (2012), NAC'ın, inflamasyonun KBB üzerindeki yıkıcı etkilerine karşı koruyucu olduğunu, LRP1 transport sisteminin bozulmasını engellediğini bildirmiştir. Ayrıca Hamel (2015), inflamasyonun beyin damar dolaşımı üzerindeki yıkıcı etkilerini açıklamış; NAC gibi antioksidanların, vasküler inflamasyonla ilişkili AH ilerlemesini yavaşlatabileceğini vurgulamıştır.

Sonuç olarak, NAC'ın anti-inflamatuar etkisi, hem NF- κ B inhibisyonu, hem de GSH aracılı redoks denge düzenlenmesi ile ilişkilidir (Butterfield & Halliwell, 2019). AH özelinde ise bu mekanizmaların sinaptik kayıp, mitokondriyal disfonksiyon ve nöronal ölüm süreçlerine karşı potansiyel koruyucu etkiler sunduğu, hem deneysel hem klinik düzeyde gösterilmiştir (More vd., 2018; Andrade vd., 2020; Rind vd., 2021; Chakraborty vd., 2025).

Öte yandan, NAC'ın terapötik etkinliği birtakım farmakokinetik kısıtlamalar nedeniyle sınırlı kalır. Düşük oral biyoyararlanımı (%6–10), plazmada hızlı oksidasyona uğraması ve serbest tiyol formlarının disüflitlere dönüşerek inaktive olması gibi özellikler, hedef dokularda yeterli konsantrasyona ulaşmasında büyük engel oluştururlar (Borgström vd., 1986; Cotgreave & Moldeus, 1987; Holdiness, 1991). Ayrıca hızlı hidroliz olması ve kısa yarı ömrü, ilacın etkisinin sürdürülebilirliğini azaltırken, terapötik etkinlik için yüksek doz uygulamalarını zorunlu hale getirir. Ancak yüksek doz NAC uygulamaları,

gastrointestinal rahatsızlıklar, baş ağrısı, hipotansiyon ve nadiren de olsa pro-oksidan etkiler gibi olumsuz sistemik etkilerle ilişkilendirilmektedir (Shahripour vd., 2014; Rind vd., 2021).

Lomelí Martínez vd. (2025)'nin belirttiği üzere, bu sınırlamalar özellikle nörodejeneratif hastalıklarda, NAC'ın beyin parenkimine yeterli düzeyde ulaşmasını güçleştirir. Ayrıca serbest NAC'ın KBB geçişi sınırlı kalır, taşıyıcı sistemler olmaksızın nöroinflamasyon bölgelerinde yeterli birikim sağlayamaması klinik etkinliğini azaltır. Bu bağlamda, son yıllarda nanopartikül temelli ilaç taşıyıcı sistemler, NAC'ın biyoyararlanımını artırmak, hedef dokuya spesifik dağılım sağlamak ve sistemik toksisiteyi azaltmak amacıyla umut vadeden stratejiler olarak değerlendirilir (Vargas-Barona vd., 2024; Chakraborty vd., 2025). Böylece, geleneksel NAC uygulamasının kısıtlarını aşmak ve AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda etkin bir tedavi yaklaşımı geliştirmek mümkün hale gelmektedir.



Şekil 5. NAC'ın NF-κB sinyal yolağındaki anti-inflamatuar etkisi.

Biorender ile çizilmiştir.

1.3. NANOMALZEMELER

Nanobilim ve nanoteknolojinin tanımı

Nanobilim, 1–100 nm arasında değişen ölçekteki materyallerin özelliklerini inceleyen, özellikle katı hâl malzemelerin boyuta bağlı kuantum ve yüzey etkilerine odaklanan bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji ise ilk kez Richard Feynman tarafından 1959 yılında "There's Plenty of Room at the Bottom" başlıklı konuşmasında öngörülmüştür, atomik ve moleküler düzeyde maddeyi kontrol ederek yeni yapıların ve fonksiyonların geliştirilmesini hedefleyen disiplinler arası bir yaklaşımdır (Feynman, 1960; Singh & Lillard, 2009; Khan vd., 2019b; Joudeh & Linke, 2022).

Nanomalzemelerin Boyut Etkisi ve Yüzey Özellikleri

Nanomalzemelerin önemi, bir maddenin boyutunun o maddenin fizikokimyasal özelliklerini etkileyebileceği keşfedildiğinde anlaşılmıştır. Bu malzemelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, yığın (bulk) malzemelere kıyasla belirgin şekilde farklılık gösterir. (Khan vd., 2019b). Bu farklılıklar, iki ana faktörden kaynaklanır; yüksek yüzey-hacim oranı ve kuantum etkileri. Malzeme boyutu azaldıkça, özellikle yarıçap, eksiton Bohr yarıçapına (elektron ve elektron boşluğu arasındaki mesafe) yaklaştığında kuantum sınırlama etkisi ortaya çıkar ve bu durum malzemeye yeni optik, manyetik, mekanik, termal, katalitik ve elektriksel özellikler kazandırır (Ikhmayies, 2014; Joudeh & Linke, 2022).

Nanomalzemelerin geniş yüzey alanına ve daha büyük yüzey-hacim oranlarına sahip olması (daha büyük reaksiyon yüzeyi oluşur ve malzemenin reaktivitesini artar); yüzeydeki atom sayısının artmış olması (katalitik özellik artar); yüzeyde bulunan atomların daha az direkt ilişkili olduğu komşu atomunun olması (atom başına bağlanma enerjisinin düşmesine sebep olur ve erime sıcaklığı düşer) onları yığın malzemeye göre farklı özellikler göstermelerine sebep olur (Roduner, 2006; Buzea vd., 2007). Örneğin altın; kararmayan, yüzey merkezli kübik yapıya sahip, manyetik olmayan ve 1064 °C'de eriyen, parlak, sarı renkli bir metaldir. Küçüldükçe farklı optik, fiziksel ve manyetik özellikler kazanmaya başlar. 10 nm çapa sahip altın nanopartikülleri yeşil ışığı absorbe ederek kırmızı renkli gözükür. Boyut küçüldükçe erime sıcaklığı da azalan altın artık asil

olmaktan çıkar; manyetik özellikler gösteren katalizör haline gelir. Bu boyutta hala metaliktir fakat boyutu daha da küçüldüğünde yalıtkan hale gelir (Roduner, 2006). Ayrıca nanoboyuta indikçe platin (sarı-gri), gümüş (siyah), paladyum (koyu siyah) da renk ve manyetik özellikler bakımında farklı davranış sergilerler (Khan vd., 2019b; Mekuye & Abera, 2023). Nanoölçekte manyetik özellikler de boyuta bağlı değişir. Ferromanyetik malzemeler küçüldükçe koersivite (manyetik bir malzemenin mıknatıslanmadaki değişikliklere karşı direnci) ve doygunluk mıknatıslanması artar; kritik boyutun altına düştüğünde süperparamanyetik özellikler kazanılır. Bu tür manyetik nanomalzemeler veri depolama, elektronik devreleme, transformatör ve güç jeneratörlerinde, biyomedikal uygulamalarda (ilaç dağıtımı, manyetik rezonans görüntüleme ve manyetik sıvı hipertermisi gibi) kullanılır (Kolahalam vd., 2018). Elektriksel özelliklerde ise nanoölçekte elektron hareketleri sınırlanır ve kuantum etkiler baskın hale gelir. Bu, metalik iletkenlerde direnç artışı, seramiklerde ise iletkenliğin artması şeklinde gözlenebilir. Yığın malzemelerde elektronlar her yöne serbestçe hareket ederek delokalize olur. Nanoölçekte ise kuantum etkisi devreye girererek elektron delokalizasyonu nanomalzeme eksenine etrafında gerçekleşir (Mekuye & Abera, 2023).

Güncel Yaklaşımlar ve Klinik Uygulamalardaki Önemi

Nanomalzemelerin biyomedikal uygulamalarda giderek artan kullanımı, onların biyouyumluluk, hedeflenebilirlik ve fonksiyonel yüzey modifikasyonlarına uygunlukları ile ilişkilidir. MMP-yanıtlı nanomalzemeler (Son vd., 2023), lipit-polimer hibrit sistemler (Vargas-Barona vd., 2024), doku mühendisliğinde karbon nanotüp, grafen ve nanoselüloz bazlı iskelet yapılar (Kandhola vd., 2023) gibi çok çeşitli tasarımlar, farmasötik ve rejeneratif tıpta yaygınlaşmaya başlamıştır. Nanomalzemelerin biyokorona oluşumu gibi çevresel ve biyolojik sistemlerdeki davranışlarını da anlamak oldukça önemlidir. Bu tür analizler, nanomalzemelerin güvenliği ve etkililiği açısından belirleyicidir (Zhang vd., 2024a). Ayrıca nanoteknolojinin sinir sistemine yönelik uzaktan düzenleme uygulamaları (Zou vd., 2022), ekstrasellüler vezikül tespiti (Ye vd., 2023) ve analitik nanobilim yaklaşımları (López-Sánchez vd., 2024) ile birleşimi, ileri düzey tanı ve tedavi olanaklarını mümkün kılar.

1.3.1. Nanomalzemelerin üretimi

Nanomalzemelerin sentezinde temel olarak yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) olmak üzere iki ana yaklaşım benimsenmiştir. Bu yöntemler kalite, üretim hızı, morfolojik kontrol ve maliyet gibi parametrelerde farklı avantajlar sunar.

Yukarıdan aşağıya yaklaşım, büyük ölçekli yığın malzemelerin mekanik, fiziksel veya kimyasal işlemlerle nano boyutlara indirgenmesini içerir. Bu yıkıcı yöntemle elde edilen partiküller çoğunlukla düzensiz morfolojide olur. Litografi, lazer ablasyonu, püskürtme ve termal ayrıştırma gibi teknikler örnek olarak verilebilir. Lazer ablasyonu yönteminde, hedef malzeme yüksek enerjili bir lazer ışını aracılığıyla buharlaştırılarak nano boyutlu yapılar elde edilirken; püskürtme yönteminde, iyon bombardımanı ile yüzeyden koparılan parçacıklar nanoyapı oluşumunda kullanılır. Litografi ise yüzeylerin ışık, iyon veya elektron ile desenlendirilerek istenilen yapının oluşturulmasına dayanır (Mekuye & Abera, 2023).

Aşağıdan yukarıya yaklaşım, atom veya moleküllerin kontrollü biçimde birleşerek nano ölçekte yapıların oluşumuna dayanır. Bu yöntem, kimyasal sentez, hidrotermal reaksiyonlar veya kendi kendine birikim ("self-assembly"; atom veya moleküllerin aralarındaki kimyasal-fiziksel etkileşimlerle kendilerini düzenli nanoyapılar halinde oluşturmaları) gibi teknikleri kapsar (Bayda vd., 2019). Bu yaklaşım düzenli, monodispers nanoyapıların elde edilmesine olanak sağlar ve malzeme, imalat, sağlık, enerji ve biyoteknoloji uygulamalarında tercih edilir. Ancak yüksek teknik uzmanlık ve işletim maliyeti gereksinimi nedeniyle üretim ölçeği sınırlı kalabilmektedir (Ahlawat vd., 2018).

1.3.2. Nanomalzemelerin sınıflandırılması

Nanomalzemeler, en az bir boyutu 100 nm'den küçük olan ve kuantum etkiler ile yüksek yüzey-hacim oranı gibi özelliklere sahip yapılardır. Yapısal özelliklerine göre genel olarak dört temel kategoriye ayrılırlar (Kolahalı vd., 2018; Kumari vd., 2023):

- **0-Boyutlu (0D):** Tüm boyutları nano ölçekte olan yapılardır. Kuantum noktaları, fullerenler, nanopartiküller.
- **1-Boyutlu (1D):** Sadece bir boyutu nano ölçekte olan yapılardır. Nanotüpler, nanoçubuklar, nanotel yapıları.
- **2-Boyutlu (2D):** İki boyutu nano ölçekte olan ve geniş yüzey alanı sunan yapılardır. Nanokatmanlar, nanofilmler.
- **3-Boyutlu (3D):** Tüm boyutları nano ölçeğin dışında olan yapılardır. 100 nm'den büyük çapta oldukları anlamına gelir. Nano yapıların bir araya gelmesiyle oluşan kompozit sistemlerdir. İki veya daha fazla parçacığın etkileşimi sonucu fiziksel özellikleri değişir. Nanokompozitler, nanopartikül demetleri, nanopartikül dispersiyonları, çoklu nano katmanlar, nanotüp demetleri.

Bu sınıflandırma sadece morfolojik farklılıkları yansıtmakla kalmaz, aynı zamanda nanomalzemelerin uygulama alanlarını da belirler.

1.3.3. Nanopartiküller

Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından nanopartiküller (NP), tüm dış boyutları nano aralıkta (1–100 nm) olan ve eksenel simetrisi belirgin şekilde bozulmamış parçacıklar olarak tanımlanır. Nanopartiküller; küresel, silindirik, tübüler, içi boş, amorf, kristal, spiral veya çekirdek-kabuk yapılar gibi farklı morfolojilerde olabilir (Joudeh & Linke, 2022). Sentez koşulları, nanopartikül özelliklerini büyük ölçüde etkiler. Yüksek pH değerleri daha küçük partikül oluşumunu desteklerken, düşük pH daha büyük yapıların oluşmasına neden olabilir. Sıcaklık, reaksiyonun hızını, parçacıkların büyüklüğünü ve şeklini etkileyen önemli bir parametredir. Reaktan konsantrasyonu ve süre, partikül yoğunluğu, kristal yapı ve morfoloji üzerinde belirleyicidir (Kumari vd., 2023). Bu faktörler dikkate alınarak nanopartikül sentezi, istenen uygulamaya özel olarak optimize edilebilir.

1.3.3.1. Nanopartiküllerin karakterizasyonları

Nanopartikül sistemlerinin yapısal, fiziksel ve kimyasal özellikleri; uygulama alanlarını doğrudan etkileyen faktörlerdir. Bu nedenle, sentez sonrası karakterizasyon, nanopartikül platformlarının fonksiyonel yeterliliğini belirlemek için kritik bir adımdır. Karakterizasyon, özellikle boyut, boyut dağılımı, şekil, yüzey morfolojisi, yüzey yükü, fonksiyonel gruplar, kimyasal yapı, kristallik ve ilaç yükleme kapasitesi gibi temel parametrelerin belirlenmesini içerir (Mourdikoudis vd., 2018; Kolahalam vd., 2018; Khan vd., 2019b; Rezaei vd., 2024).

Kristal Yapı ve Elementel Kompozisyon

X-Işını Kırınımı (XRD) tekniği; kristal yapı, kristal tane boyutu ve derecesi hakkında bilgi sağlar. Sadece keskin pikler analiz için uygundur. Parçacıkların bileşimi, piklerin konumu ve yoğunluğu, Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi (ICDD) veri tabanında bulunan referans modellerle karşılaştırılarak belirlenir. Çok küçük ve kristal olmayan amorf yapıdaki nanopartiküllerin XRD pikleri genişlediği için boyut belirlenmesinde kullanımı elverişli değildir (Gabbasov vd., 2015; Mourdikoudis vd., 2018).

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) tekniği; yüzeye duyarlı bir teknik olup, malzemenin genel kompozisyonu ve kompozisyonun derinlikle değişimini anlamak için kullanılır. 10 nm derinliğe inerek elementel bileşim, oksidasyon durumları ve ligand etkileşimlerini analiz eder. Ultra vakum koşullarında çalışır ve numunelerin kuru olması gerekir (Mourdikoudis vd., 2018; Khan vd., 2019b).

Morfoloji ve Boyut Analizi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) tekniği, kolloidal süspansiyonlardaki hidrodinamik çapı belirler. Bu çözelti içinde dağılmış (dipsers) nanopartiküller sürekli Brown hareketi halindedir. DLS, ışık saçılımını zamanın bir fonksiyonu olarak ölçer ve Stokes-Einstein varsayımı ile birleştirildiğinde çözeltideki nanopartikül hidrodinamik çapını (nanopartikülün ve kolloid ile aynı hızda difüze olan çözücü moleküllerinin çapı) belirlemek için kullanılır. Çoklu saçılma etkisinden kaçınmak için düşük bir

nanopartikül konsantrasyonunun kullanılması daha uygundur (Kato., 2009). DLS'nin büyük partiküllere karşı hassasiyeti, agregasyonun tespiti için önemli bir noktadır. Şekil ve kaplama ajanları gibi faktörler de analiz sonuçlarını etkiler (Lim vd., 2013). Genellikle küresel şekilli partikülleri varsayar. Monodispers, homojen nanopartikül süspansiyonları için hızlı, kolay, hassas ve tekrar edilebilirdir. Ancak partiküllerin süspansiyon halinde olmaları, Brownian hareketine maruz kalmaları, büyük partiküllerin çok daha fazla ışık saçmaları sebebiyle (az sayıdaki büyük partiküller bile daha küçük partiküllerin katkısını gizleyebilir) polidispers, heterojen süspansiyonlar için çözünürlüğü düşüktür (Mourdikoudis vd., 2018).

Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM), yüksek çözünürlükte görüntüleme sağlayarak partikül boyutu, şekli, homojenliği, kristal yapısı ve kristal düzlemler arası mesafelerin analizinde kullanılır. Elektron demeti numuneye ulaştığında, elektronların bir kısmı iletilir, kalanı elastik veya elastik olmayan şekilde saçılır. Etkileşimin büyüklüğü boyut, numune yoğunluğu ve element bileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Nihai görüntü, iletilen elektronlardan elde edilen bilgilerle oluşturulur (Kolahalam vd., 2018). TEM, özellikle polidispers sistemlerde DLS ile tamamlayıcı rol oynar (Coleman vd., 2011).

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) nanoparçacıkların yüzey topografisi ve morfolojik özelliklerini değerlendirirken, Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM), yüzey pürüzlülüğü ve nano yapı formunu üç boyutlu olarak görselleştirir. Her iki teknik de yalnızca iletken ve kuru örnekler için uygundur (Kolahalam vd., 2018; Rezaei vd., 2024).

Yüzey Yükü ve Stabilité

Zeta potansiyeli (ZP) değeri; yüzey yükü ve kolloidal stabilitesi hakkında bilgi sağlar. Yüksek pozitif veya negatif yüklü partiküller birbirlerini itme eğiliminde oldukları için, küçük çökme eğilimi gösteren kararlı kolloidal çözeltiler oluştururlar. Bu tür yüksek yüklü parçacıklar, ZP'nin sıfır olduğu pH değerini ifade eden bir çözeltinin 'izoelektrik noktası' olarak adlandırılan noktadan uzakta olan pH değerleriyle ilişkilidir. Düşük ZP değeri, kolloidlerin agregasyonuna neden olur ve sistemin izoelektrik noktasına daha yakın değerlerine karşılık gelir. $\pm 20-30$ mV aralığında yüksek ZP değerine sahip çözeltiler kararlı kabul edilir. Bu özellik yüzey kimyasının modifikasyonu ile düzenlenebilir. ZP, süspansiyon konsantrasyonundan, çözücü ve diğer katkı maddelerinin bileşiminden

etkilenir. Ayrıca, agregasyon eğilimi hakkında bilgi verdiği için, ZP ölçümleri ile DLS verileri birleştirilebilir (Baldassarre vd., 2015).

Yüzey Kimyası ve Fonksiyonel Gruplar

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, sıfırdan farklı spin kuantum sayısına sahip çekirdeklerin güçlü bir manyetik alan içerisine yerleştirildiğinde üstlendikleri yukarı (“spin up”) ve aşağı (“spin down”) durumları arasındaki küçük enerji farklarını ölçmeye dayanır. Bu enerji düzeyleri arasındaki geçişler, radyo dalgaları frekansındaki elektromanyetik radyasyon aracılığıyla incelenir. Bu teknik, nanopartikül öncüllerinin kimyasal dönüşüm süreçlerini hem çözelti hem de katı fazda, yüksek uzamsal ve kimyasal çözünürlükle izlemeye olanak tanır. Farklı reaksiyon koşulları ve çeşitli metal türleri altında yapılan analizler, nanopartikül sentezine ilişkin reaksiyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlar (Marbella & Millstone, 2015). Ancak, bu yöntem manyetik özellik taşıyan malzemelerin karakterizasyonu için uygun değildir; çünkü bu tür materyaller, lokal manyetik alanlarda sinyal frekansında kaymalar ve gevşeme süreçlerinde ani düşüslere yol açar. Bu durum, spektral tepe noktalarında ciddi genişlemelere neden olarak analizlerin yorumlanmasını zorlaştırır. NMR, karmaşık nanosistemlerde boyut, şekil, moleküler dinamikler, kimyasal yapı, moleküller arası etkileşimler, bağlanma davranışı ve yapısal değişim süreçleri gibi çok sayıda parametre hakkında kapsamlı bilgi sunar (Coelho vd., 2015).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, orta kızılötesi bölgedeki (IR) (4000–400 cm⁻¹) dalga boylarına sahip elektromanyetik radyasyonun emilimini ölçen bir tekniktir. Bir molekülün emilim ardından dipol momentı değişir ve IR aktif hale gelir. Kaydedilen spektrum, spesifik fonksiyonel grupların (örn; -OH, -NH₂, -COOH) varlığını ve bağ yapılarını tespit eder; böylece moleküler yapı ve etkileşimler hakkında bilgi sağlanır. Peptit, polimer ve ilaç gibi moleküllerin nanopartikül yüzeyine bağlanmasını doğrulamada yaygın kullanılır (Blanco-Andujar, 2014).

Ayırma ve Moleküler Ağırlık Analizi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniği, bir sıvı içinde çözülebilen herhangi bir numunede bulunan bileşikleri ayırmak, tanımlamak ve miktarını belirlemek amacıyla kullanılır. Ürünlerin kalitatif analizinin yanı sıra kantitatif analizinin de

yapılabildiği, ayrıca ürün stabilitesini belirlemek için de kullanılan analitik bir yöntemdir. Yüksek performans; yüksek ayrımı ifade eder. Hassas ölçüm, uygulama kolaylığı ve basit kullanım sunar. nanopartikül sistemlerinde ilaç salım kinetiği, enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi gibi parametrelerin kantitatif analizi için kullanılır. Ayrıca formülasyon bileşenlerinin saflığı ve stabilitesi de analiz edilebilir (Ali, 2022).

Jel Permeasyon Kromatografisi (GPC), çözeltideki sentetik ve doğal makromoleküllerin, polisakkaritlerin, polimerlerin ve proteinlerin hidrodinamik hacimlerine ve boyutlarına göre ayırma tekniğidir. Moleküler ağırlık dağılımı, ortalama moleküler kütle ve dallanma derecesi (Mohammad & Reineke, 2012; Held & Kilz, 2021), formülasyon bileşenlerinin polimerizasyon süreci üzerindeki etkisi, ilaç ile polimer arasındaki kimyasal reaksiyonların oluşumu ve polimerin bozunması hakkında bilgi verir (Doncom vd., 2017).

Optik Analizler

UV-Visible (UV-Vis) Spektrofotometri, nanopartiküllerin optik özelliklerini, aglomerasyon eğilimlerini, çözünürlüklerini ve konsantrasyonlarını değerlendirir. Kullanımı kolay ve maliyeti düşüktür. Özellikle metalik veya ışıkla etkileşen sistemlerde kullanılır (Mourdikoudis vd., 2018).

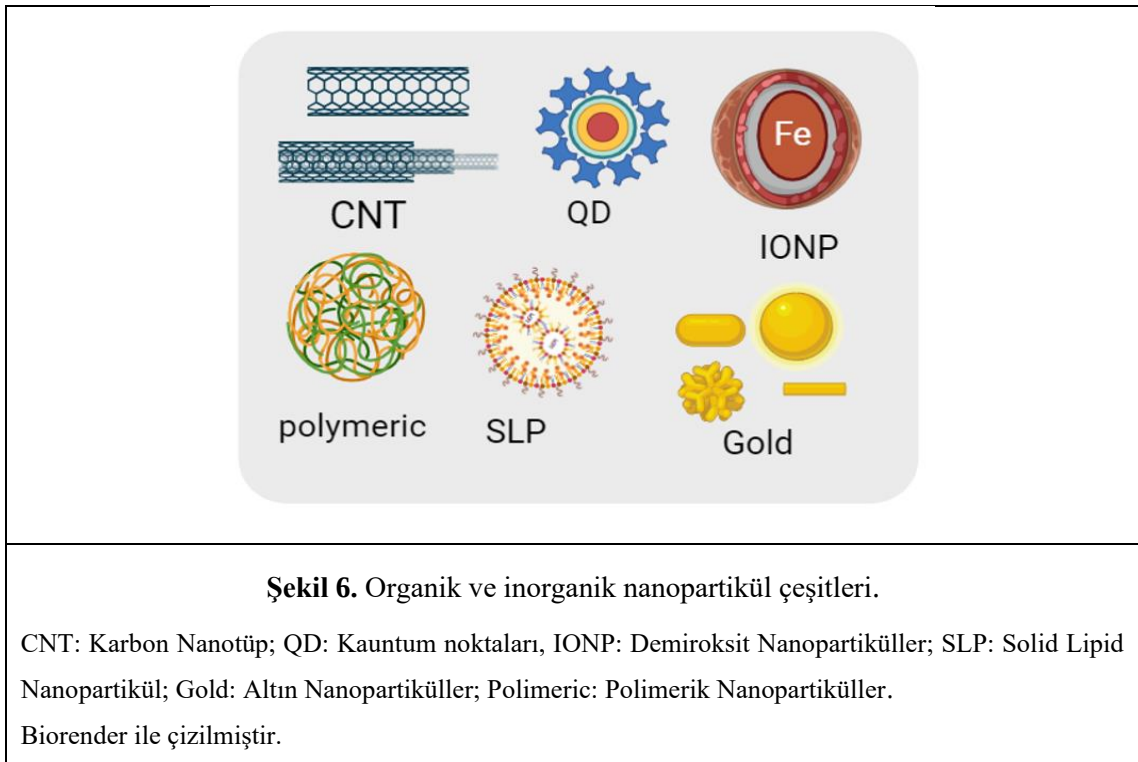
1.3.3.2. Nanopartiküllerin gruplandırılması

Nanopartiküller, kimyasal bileşimlerine göre genel olarak organik ve inorganik olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır (Tablo 1; Şekil 6). Bu temel ayrım, taşıma kapasiteleri, biyouyumlulukları, bozunabilirlikleri ve hedefleme potansiyelleri gibi birçok biyomedikal özelliğin belirlenmesinde kritik rol oynar.

Organik nanopartiküller, çoğunlukla polimerik veya lipid bazlı sistemlerden oluşur ve genellikle biyobozunur yapılarıyla ön plana çıkar. Bu gruba dahil olan nanopartiküller; doğal veya sentetik polimerlerden sentezlenen polimerik nanopartiküller, dendrimerler, lipozomlar ve katı lipid nanopartiküller (SLN) gibi alt tiplere ayrılır. İnorganik nanopartiküller ise genellikle metal veya metal oksit kökenli yapı taşlarından oluşur ve

yüksek yapısal stabiliteleri, manyetik/optik özellikleri nedeniyle tanı ve görüntüleme sistemlerinde yaygın kullanım alanı bulurlar. Bu grupta yer alan başlıca nanopartikül çeşitleri; altın (AuNP), gümüş (AgNP), silika (SiNP), demir oksit nanopartiküller, karbon nanotüpler (CNT) ve kuantum noktaları (QD) gibi yapılardır (Rezaei et al., 2024; Joudeh & Linke, 2022).

Nanopartikül çeşitlerinin bu şekilde sınıflandırılması, hedefe yönelik ilaç taşıma, kontrollü salım, biyolojik ortam stabilitesi ve tanı-tedavi entegrasyonunun sağlanması açısından büyük önem taşır. Tablo 1’de, nanopartiküller kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış ve her bir alt grubun özellikleri ile uygulama potansiyelleri özetlenmiştir. Bu sınıflandırma, tez kapsamında kullanılan polimer bazlı nanopartikül sistemlerinin diğer yapılarla karşılaştırılması açısından da temel bir referans sunar.



Tablo 1. Kimyasal kompozisyonlarına göre nanopartiküllerin sınıflandırılması

	Çeşitleri	Örnek	Özellikleri	Kaynak
Organik nanopartiküller	Lipit bazlı NP	Katı lipid	- Katı hidrofobik lipid çekirdeği vardır. - Hidrofilik ve lipofilik ilaç taşınmasına uygundur. - KBB'yi kolay geçebilirler. - Düşük üretim maliyeti, biyouyumluluk, yüksek stabiliteye sahiptir. - Kontrollü ve uzun salım ilaç salınımı, minimum bağışıklık tepkisi gibi avantajları vardır.	Satapathy vd., 2021
		Lipozomlar	- Çift lipit tabakalı, içi sulu, çekirdekli, toksik olmayan veziküllerdir. - Çift tabakalı yapısında yer alan kolesterol; akışkanlığı ve geçirgenliği azaltarak içinde çözünen moleküllerin dışarı çıkışını engeller. - Yarı ömürleri kısadır, biyouyumludur ve amfifilik yapıdadır. - Dolaşım süresini arttırmak ve opsonizasyondan kaçmak için yüzey modifikasyonları kolayca yapılabilir. - Hücre zarından endositoz süreciyle iletilir.	Vural ve Özer, 2015 Ahlawat vd., 2018
	Polimer bazlı NP	Sentetik ve doğal polimerler	- Sentetik polimerler; PEG, PLA, PLGA, polyester, polianhidrit, polidioksanon - Doğal polimerler; kitosan, albümin, dekstran, jelatin, heparin - İlaçlar polimer içine eklenebilir veya yüzeyine bağlanabilir. - Biyogüvenli, biyobozunur, esnek sentez yöntemleri mevcuttur.	Nicolas vd., 2013
		Dendrimerler	- PAMAM, PPI - Farklı sayıda düzenli ve dallanmış monomere sahip sentetik polimer bazlı makromoleküldür.	Ahmad vd., 2017 Ahlawat vd., 2018

		• Monodispers ve çok küçük olabilir (<20 nm), suda çözünür. • İstenilen şekilde fonksiyonel grularla işlevselleştirilebilir. • Terminal dalları üzerindeki çoklu bağlanma bölgeleri ilaç taşımada kolaylık sağlar.	
Metalik NP	IONP	• Manyetit veya hematit yapıları. • <20 nm olunca süperparamanyetik özellik gösterir. • Manyetik rezonans görüntüleme prob olarak kullanılabilir. • Isı ile aktif hale gelirler.	Xie vd., 2010
	Altın NP	• Yoğun ışık absorpsiyonu ve saçılması, yüksek fototermal dönüşüm oranı, biyouyumluluk, stabilite, biyogüvenlik ve farklı moleküller (nükleik asit, protein, ilaç, vb.) ile yüzey işlevselleştirmesi ve sentez kolaylıkları gibi kimyasal ve fiziksel özellikler sunar. • Optik görüntüleme, bilgisayarlı tomografi, fototermal terapi uygulanabilir. • Yüksek üretim maliyeti kullanımını sınırlar.	Carvalho vd., 2018 Xie vd., 2010
(QD)	CdSe, CdTe	• Metalik çekirdek ve yarı iletken kabuktan oluşur. • Yarı iletkenidir. • Yüksek kuantum verimi, parlaklık, uzun floresan ömrü, kararlılık, geniş absorpsiyon ve dar emisyon spektrum avantajları vardır. • Birden fazla QD aynı alanda uyarılabilir. • Optik görüntüleme yapılır. • Yüksek toksisite sebebiyle kullanımı sınırlıdır.	Shen vd., 2017
Karbon bazlı NP	Fulloren	• sp² hibridizasyonu ile birbirine bağlanmış 28 ila 1500 C atomundan oluşan karbon küre molekülleridir. • Kimyasal sembol (C₆₀)'dır.	Al-Harbi ve Abd-Elrahman, 2024

	• Tek katmanlıların boyutu 8.2 nm, çok katmanlıların boyutu 4-36 nm arasındadır. • Yüksek elektriksel iletkenliği sahiptir. Elektronik cihazlarda önem arz eder.	
CNT;	• Grafen tabakasından oluşur.	Carvalho vd., 2018
SWNT	• Çözünmesi zordur.	Ahlawat vd., 2018
MWNT	• MWNT daha kararlıdır; agregasyon eğilimi azdır. • Floresan ve fotoakustik görüntüleme ve NIR ile lokal ısıtma yapılabilir. • Diğer np'ler CNT üzerine bağlanabilir. • Geniş yüzey alanına sahiptir. • Hücrel dağıtım kullanımları için yüzey modifikasyonu şarttır. • Biyobozunurluk ve biyoyumlulukları azdır; akut toksisitesi yüksektir. • Biyosensör, ilaç dağıtım ve teşhis aracı olarak kullanılmalarına rağmen, tüm çözücülerdeki çözünmezlikleri sağlık sorunlarına neden olur.	

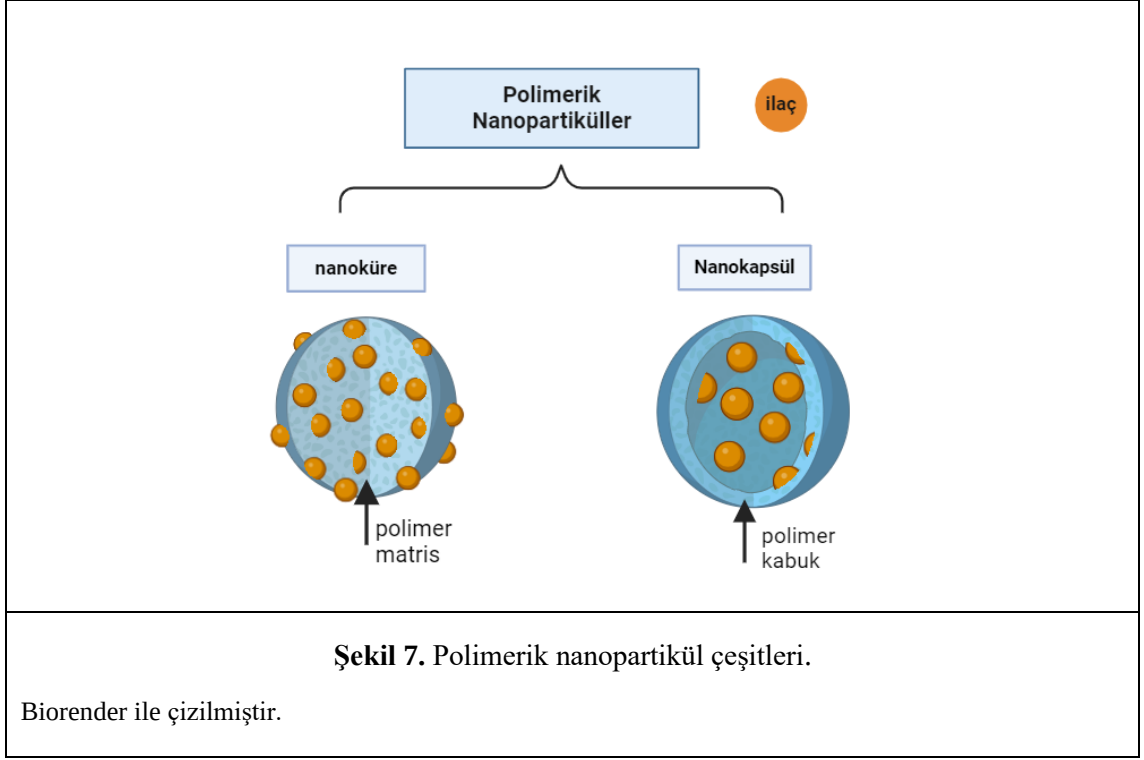
SWNT: Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler; MWNT: Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler; PAMAM: Poliamidoamin, PPI: Polipropilen; PEG: Polietilen glikol; PLGA: Poli laktik glikolik asit; PLA: Poli laktik asit; CdSe: Kadmiyum selenit, CdTe: Kadmiyum tellürid; IONP: Demiroksit Nanopartikül

1.3.3.3. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, küçük moleküllerin moleküller arası kuvvetlerle kendiliğinden bir araya gelerek oluşturduğu yapılar olup, ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerdir. Bu sistemler, ilaçların biyolojik bariyerleri geçmesini ve hedef hücrelere veya hücre içi kompartmanlara ulaşmasını sağlamak amacıyla polimerik yapıların kimyasal kompozisyonu ve yüzey özelliklerinin modifiye edilmesiyle tasarlanır (Solaro vd., 2010; Gulyaev vd., 2025).

Polimerik nanopartiküller; kolay üretim, kontrollü ilaç salımı, yüzey fonksiyonlandırmaya uygunluk ve biyolojik uyum gibi avantajlarıyla dikkat çeker (Sarcan vd., 2018; Begines vd., 2020). Bu partiküller, doğal, sentetik ya da yarı sentetik polimerlerden üretilir (Pugazhendhi vd., 2018). Doğal kökenli olanlar genellikle biyobozunur ve düşük immünojenik özellik gösterirken, sentetik polimerler daha kontrollü yapılandırma ve hedefleme stratejilerine olanak tanır (Ramkumar vd., 2017). Biyolojik olarak parçalanamayan polimerler yüksek toksisite ve immün yanıt riski taşıırken, parçalanabilir polimerler bu etkileri minimize eder (Wen vd., 2019; Dey vd., 2016).

Terapötik ajanların ve biyomakromoleküllerin (protein, nükleik asit vb.) biyolojik bariyerler boyunca geçirgenliğini artırmak için kimyasal bileşimleri, boyutları, alım özellikleri, plazma yarı ömrü ve immünogenite açısından optimize edilebilirler (Monge vd., 2020). Bu partiküller sayesinde ilaçlar bir matris içine gömülebilir, yüzeyde biriktirilebilir veya partikülün tamamı kontrol edilebilir bir şekilde vücudun belirli bölgelerine hedeflenebilir. Bu sebeple iki şekilde hazırlanırlar (Şekil 7). Nanokapsüller, yağlı bir çekirdeğin etrafına yerleştirilmiş (ilaç çözünerek çekirdek içine kapsülendir) polimerik bir kabuğa (ilacın çekirdekten salım profili kontrol edilir) sahiptir. Nanoküreler ise, çekirdeğin ve dış yüzeyin polimerik malzemeden oluştuğu, ilacın ise polimerik matris içinde tutulması veya yüzeyine adsorbe edilmesi ile hazırlanan, bileşiminde yağ bulunmayan yapılardır (Ahlawat vd., 2018; Castro vd., 2020; Zielińska vd., 2020; Sahoo vd., 2021; Al-Harbi ve Abd-Elrahman, 2025). Dış yüzey, biyolojik ortamda kararlılığını artırarak antikor, enzim gibi bozucu etmenlerden koruma sağlar (Sarcan vd., 2018; Austria & Akhavan, 2025).



Hazırlanan polimerik nanopartiküller, seçilen terapötik ajanın kapsüllenmesi açısından uygun kütle ve kompozisyon özelliklerine sahip olmalı; aynı zamanda *in vivo* ortamda etkinlik sağlayacak şekilde yüzey özellikleri modifiye edilebilmelidir (Solaro vd., 2010). Bu amaçla, nanopartikül sistemlerinin üretiminde hem doğal hem de sentetik polimerler yaygın olarak tercih edilir. Yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler arasında polilaktit asit (PLA), polietilen glikol (PEG), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polidioksanon, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), polianhidrit, poli(akrilik asit), poli-N-(2-hidroksipropil) metakrilamid ve çeşitli blok kopolimerler (örneğin, PLA-PEG, PLGA-PEG) yer alır. Buna karşılık doğal polimerler arasında heparin, albumin, kitosan, dekstran, hyaluronik asit ve jelatin sıklıkla kullanılır (Begines vd., 2020). Bu polimerler arasından PGA, PLA ve PLGA hem FDA hem de Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından insan kullanımı için onaylanmıştır, ayrıca biyobozunur ve biyouyumlu özellikleri sayesinde kontrollü salım ve hedefli taşıma sistemlerinde ön plana çıkarlar (Ahlawat vd., 2018; Castro vd., 2020; Chenthamara vd., 2019). Ek olarak, sentetik polimerler; kimyasal yapıların kontrol edilebilirliği ve fonksiyonel gruplarla kolayca modifiye edilebilme özellikleri sayesinde, istenen ilaç salım profiline ve hedefleme stratejilerine uyarlanabilirler (Gulyaev vd., 2025; Austria & Akhavan, 2025). Polimerizasyon

sürecindeki bu esneklik, malzemenin hastalığın patolojisine ve bireysel tedavi ihtiyaçlarına göre özelleştirilebilmesini mümkün kılar. Ayrıca, yeni polimerizasyon tekniklerinin geliştirilmesi, biyomedikal uygulamalara yönelik farklı özelliklere sahip sentetik polimerlerin tasarlanmasını her geçen gün daha erişilebilir hale getirmektedir (Castro vd., 2020).

PGA, sentetik polimerler arasında ilk konjugat oluşturmada kullanılan örneklerden biridir ve bu özelliği ile nanotaşıyıcı sistemlerde temel yapı taşı olarak yerini almıştır. Bu polimerlerin sahip olduğu doğrulanmış biyouyumluluk, düşük immünojenite ve minimal toksisite gibi güvenlik profilleri, biyolojik sistemlerle uyumlu bir ilaç taşıma süreci sağlar (Ahlawat vd., 2018; Castro vd., 2020).

PLGA, laktik ve glikolik asitten oluşan sentetik bir kopolimerdir. PLGA sentezi genellikle laktid ve glikolidin halka açma polimerizasyon reaksiyonları (yüksek moleküler ağırlıklı PLGA sentezi) veya laktik ve glikolik asidin polikondensasyon reaksiyonları yoluyla (düşük moleküler ağırlıklı PLGA sentezi) PLA ve PGA blok polimerleri oluşturmak suretiyle elde edilir. Homo izomerik PLA'lar, polimer zincirlerinin daha sıkı paketlenmesine yol açan tek tip uzamsal düzenleme nedeniyle kristal yapıda, metil yan grupları sayesinde hidrofobik yapıdadır. Glikolik asitin asimetrik karbonunun olmaması, PGA'nın sadece yüksek kristalli bir formda olmasını sağlar. Bu sayede laktik/glikolit asit oranı PLGA'nın hidrofobikliği ve kristallliği hakkında bilgi verir. PLGA'nın mekanik mukavemet, hidrasyon hızı, hidroliz hızı ve camsı geçiş sıcaklığı (T_g) gibi fizikokimyasal özellikleri, kristallik ve hidrofobiklikten etkilenir. Yüksek kristallik derecesine sahip PLGA, yüksek T_g ve mekanik mukavemetin yanı sıra düşük hidrasyon ve hidroliz oranına sahip olur (Zhi vd., 2021; Hernández-Giottonini vd., 2020). Ayrıca, ortam pH'ı ve kimyasal katkı maddeleri gibi dış faktörler hidrolitik bozunmayı etkileyebilir (Makadia ve Siegel, 2011).

Hedefe yönelik nanotıp yaklaşımında polimerik nanopartiküllerin sistemik intravenöz kullanımı için en önemli parametrelerden biri kan dolaşımında uzun süre kalabilmesidir. Bunun için çoğunlukla PEG, Pluronik F68, Polioksazolin, Poli-Vinil Alkol (PVA), Poligliserol, Poli-N-Vinil-2-Pirolidinon, Poli-N-Metakrilamid, Poli-Amino Asit gibi yüzey kaplama ajanları ile yüzey modifikasyonları gerçekleştirilir (Solaro vd., 2010). PVA, toksik olmayan, suda çözünür, biyouyumlu, biyobozunur ve mükemmel mekanik özelliklere sahip ucuz, yaygın olarak kullanılan sentetik bir polimerdir (Surudzic

vd., 2013). Bir diğerk yaygın kullanıma sahip olan yüzey ajanı PEG, iyonik olmayan hidrofilik bir polyesterdir. İyonik olmadığı için yüklü moleküllerle temas ettiğinde herhangi bir sorun oluşturmaz ve hidrofilik özelliğı ile çözünürlüğü artırır (Andima vd., 2018). PEG'in nanopartikül üzerine eklenmesi/kaplanması (PEGilasyon), kan bileşenleri ile etkileşime girerek bağışıklık sisteminin makrofajları tarafından yabancı madde olarak tanınma olasılığını azaltır ve bu sayede ortamdaki stabkararlılığı artır (Solaro vd., 2010).

Hücre zarının biyolojik bariyer olarak davranması sebebiyle ilaçların çoğunlukla ve mecburen hücre dışı etkiye sahip olması, geleneksel tedavilerin temel sorunudur. Ayrıca, ilacın geleneksel formdaki etkisi uzun süreli değildir ve yüksek konsantrasyonlarda günlük uygulama gerektirir. Nanotaşıyıcıların hücreden daha küçük boyutta olması ve geleneksel farmasötik formülasyonlara kıyasla onların erişemediğı bölgelere kolay ulaşım sağlaması yüksek verimliliğı beraberinde getiririr. Böylece, hücre içinde yüksek etkiye ulaşılır. Nanopartiküllerin ortamdaki aktivitesi yüzeyi ile çevrelerindeki biyolojik bileşenler arasındaki etkileşimlere bağlıdır. İdeal bir ilaç iletim sistemi, ortamı asidik olan fagositik hücrelere kolayca nüfuz ederek ilacın aktivitesinde kayıp veya bozulma olmadan yüksek etki sağlamalıdır (Castro vd., 2020).

Nanopartiküllerin yükü de nanopartikül stabilitesini etkiler; pozitif yüklü nanopartiküller serum proteinleri ile agregasyon gösterirken, nötr yüklü nanopartiküller daha az agregasyon göstererek kan dolaşım süresini artırır (Nagati vd., 2021). Ayrıca polimerik nanopartiküller, aşırı pH ve sıcaklık koşullarına sahip bölgelerde uyarana duyarlı aktivite sergileyecek şekilde tasarlanabilir. Bu nedenle hedeflenen/istenen ilaç salım özellikleri sergilemesi için, yüzey özellikleri, çap, polidispersite, stabilite ve morfoloji gibi birçok parametrenin incelenmesi önemlidir; çünkü bu parametreler polimer seçimi ve sentez yöntemiyle yakından ilişkilidir (Castro vd., 2020).

Son yıllarda geliştirilen yeni nesil polimerizasyon stratejileri sayesinde, hastalığa özgü biyofiziksel ortamlara uyumlu, farklı fonksiyonel gruplarla zenginleştirilmiş polimer yapıları sentezlenebilir hale gelmiştir. Bu gelişmeler, polimerik sistemlerin hedefe duyarlı, uyarana yanıt veren veya çok işlevli taşıyıcılar olarak kullanılabilmesini mümkün kılar (Austria & Akhavan, 2025).

Bu bağlamda, sentetik polimerlerin sentez esnekliğı, yüzey fonksiyonlandırmaya uygunluğu ve özelleştirilebilir biyofiziksel parametreleri sayesinde, doğal polimerlere ve diğerk nanomalzeme türlerine kıyasla daha üstün sistemler sunduğı kabul edilir. Bu

avantajlar, polimerik nanopartikülleri hem ilaç taşıma sistemlerinde hem de tanı ve tedavide geniş uygulama alanlarına sahip çok yönlü araçlar haline getirmiştir (Castro vd., 2020; Gulyaev vd., 2025).

1.3.3.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri

Polimerik nanopartiküller; kişiselleştirilmiş ilaç uygulamalarını mümkün kılmak, tek dozla kontrollü ilaç salımı sağlamak, hücre içi alımı artırmak, ilacın biyoyararlanımını ve stabilitesini iyileştirmek ve biyolojik hedefe ulaşana dek korunmasını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Nanopartikül boyutu, sistemik dolaşıma katılım, biyolojik dağılım ve fagositik hücrelerden kaçış açısından kritik önem taşır. Bu nedenle, nanopartiküller hedef dokuya ulaşana dek fagositik eliminasyondan kaçacak kadar küçük, ancak damar dışına kontrolsüz geçişi önleyecek kadar büyük olacak şekilde tasarlanmalıdır (Hernández-Giottonini vd., 2020; Castro vd., 2020; Austria & Akhavan, 2025).

Hazırlama yöntemi; partikül boyutunu, polidispersite indeksini, yüzey yükünü, ilaç yükleme kapasitesini ve salım profilini doğrudan etkileyerek terapötik sistemin başarısını belirler. Bu nedenle her aktif bileşik için uygun yöntem dikkatle seçilmeli, ayrıca yöntemler ölçeklenebilirlik ve tekrarlanabilirlik açısından da değerlendirilmelidir (Wilar vd., 2024; Sharma & Walia, 2021). Polimerik nanopartiküller en yaygın olarak aşağıdaki tekniklerle hazırlanır:

Çözücü buharlaştırma yöntemi: Polimer, uçucu ve organik bir çözücüde (diklorometan, kloroform, etil asetat) çözülerek organik faz oluşturulur. Etkin madde çözeltiye çözünerek veya süspanse edilerek eklenir. Bu organik faz, yüzey aktif madde (örneğin, PVA) içeren sulu bir faza emülsifiye edilir. Ardından çözücü ortamdan buharlaştırılır ve nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Oluşan partiküller santrifüjle toplanarak yıkanır ve liyofilize edilerek stabilize edilir. Karıştırma hızı, çözücü/su oranı, sıcaklık ve dispersiyon ortamının viskozitesi partikül boyutunu doğrudan etkiler (Tyagi & Pandey, 2016; Sharma & Walia, 2021; Zielińska vd., 2020). Bu yöntem, hem tek emülsiyon (yağ/su, y/s) hem de çift emülsiyon (su/yağ/su, s/y/s) stratejileriyle uygulanabilir. Çift emülsiyon yöntemi özellikle hidrofilik ilaçların enkapsülasyonu için

tercih edilir. Bu yöntemde yüzey aktif madde konsantrasyonu, polimer miktarı ve sulu faz hacmi, kapsülleme verimliliği ve partikül karakteristikleri üzerinde belirleyici rol oynar (Hernández-Giottonini et al., 2020; Regmi, 2023).

Emülsifikasyon-difüzyon yöntemi: Bu yöntemde polimer ve etken madde, kısmen suyla karışabilen bir çözücüde (etil asetat, benzil alkol) çözülerek doyunlaştırılır. Hazırlanan çözeltinin, yüzey aktif madde içeren bir sulu faza emülsifiye edilmesinin ardından, ortam fazla miktarda su ile seyreltilerek çözücünün difüzyonu sağlanır. Polimerin su fazına geçerken çökmesi ile nanoküreler oluşur. Yağ içeriği artırılarak nanokapsül formülasyonları da elde edilebilir. Çözücü, buharlaştırma veya filtrasyonla ortamdaki uzaklaştırılır. Bu yöntem, yüksek kapsülleme verimliliği, tekrarlanabilirlik, ölçek büyütme uygunluk ve düşük toksisite gibi avantajlar sunar. Ancak hidrofilik ilaçların difüzyon eğilimi sebebiyle kapsülleme verimliliği azalabilir (Tyagi & Pandey, 2016; Zielińska vd., 2020; Sharma & Walia, 2021).

Nanoçöktürme (nanopresipitasyon)/çözücü yer değiştirme: Basit, hızlı ve düşük enerji gerektiren bu teknikte, polimer orta polariteli ve suyla karışabilir bir organik çözücüde (örneğin aseton, asetonitril, etanol, hekzan, tetrahidrofuran) çözülür. Bu çözelti, sürekli karıştırma eşliğinde sulu faza damla damla eklenir. Organik çözücü sulu faza hızla difüze olurken, polimer sudan kaçarak çöker ve nanopartiküller oluşur. Yüzey aktif madde kullanımı partikül stabilitesi açısından destekleyici olabilir, ancak zorunlu değildir. Polimerik nanopartiküllerin (hem nanoküre hem de nanokapsül) hazırlanması için sık tercih edilen bir yöntemdir. Nanoküreler, polimerik çözelti içinde çözündüğünde veya dağıldığında elde edilirken; nanokapsüller için önce ilaç bir yağda çözülür, organik polimer çözeltisi içinde emülsiyon haline getirilerek iç faz oluşturulur ve dış fazda dağılması ile elde edilir (Tyagi & Pandey, 2016; Hernández-Giottonini vd., 2020; Zielińska vd., 2020; Sharma & Walia, 2021; Austria & Akhavan, 2025). Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan sistemlerde, polimer konsantrasyonu partikül boyutu ve zeta potansiyelini (stabilitesini); çalkalama hızı partikül boyutunu; ortam pH'ı ise salım hızını etkiler (Sarcan vd., 2018; Hernández-Giottonini vd., 2020). Literatürde, pH düştükçe salım hızının arttığı (Betancourt vd., 2007), yüzey ajanı konsantrasyonunun artmasıyla

enkapsülasyon veriminin azaldığı (Şahin vd., 2017) ve kriyoprotektanların boyut stabilitesini koruduğu bildirilmiştir (Sarcen vd., 2018).

Sonuç olarak, polimerik nanopartikül sistemleri; biyolojik engelleri aşma, kontrollü ilaç salımı sağlama ve hedeflenmiş tedavi potansiyeli sunma gibi özellikleri sayesinde modern ilaç taşıma stratejilerinde önemli bir yer edinmiştir. Özellikle nörodejeneratif hastalıklarda, klasik ilaçların KBB'yi geçmekte yetersiz kalması ve sistemik toksisite risklerinin yüksek olması, bu taşıyıcı sistemlere olan ilgiyi artırmıştır. Bu bağlamda, AH gibi karmaşık etyopatogenezi nörolojik hastalıkların tedavisinde polimerik nanopartiküllerle geliştirilen yaklaşımlar, önemli bir araştırma alanı hâline gelmiştir. Bir sonraki bölümde, AH'de kullanılan mevcut tedavi yaklaşımları incelenerek, geleneksel yöntemlerin sınırlılıkları ışığında, nanotıp temelli yeni stratejiler değerlendirilmiştir.

1.4. ALZHEİMER HASTALIĞINDA GÜNCEL TEDAVİ YÖNTEMLERİ ve YENİ İLAÇ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

AH için şimdiye kadar FDA tarafından onaylı ve klinik kullanımda olan ilaçlar, kolinesteraz inhibitörleri ve NMDA reseptör antagonisti ilaçlar olup yalnızca semptomları azaltıcı ve/veya yok edici ilaçlardır. Klinik ve klinik öncesi verilerle, bu ilaçların hastalarda kısa vadede bilişsel işlevlerde iyileşme sağladığı raporlanmıştır (Zhang vd., 2024b; Singh vd., 2024). Ancak bu ilaçlar hastalığın ilerleyişini durdurmadığı gibi yalnızca semptomatik fayda sağlarlar. Son yıllarda ise hastalığın patofizyolojisini hedefleyen ve monoklonal antikor temelli tedavilere yönelen çalışmalarla birlikte, FDA tarafından hızlandırılmış onay süreçleri artmıştır (Boxer & Sperling, 2023; Singh vd., 2024; Söderberg vd., 2023).

Klasik tedaviler: kolinesteraz inhibitörleri ve NMDA antagonisti

Rivastigmin (Exelon), 1997 yılında FDA tarafından onaylanan, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzimlerini inhibe ederek beyindeki asetilkolin düzeyini artıran bir kolinesteraz inhibitörüdür. Ayrıca A β üretimini ve toksisitesini azaltıcı etkiler gösterir.

Hafif, orta ve şiddetli AH evrelerinde etkilidir. Yaygın yan etkileri arasında bulantı, kusma, ishal ve iştah kaybı yer alır (NIA, 2023). En yaygın kullanılan ilaçlardan birisidir. EMA tarafından 1998 yılında kullanımı onaylanmıştır (EMA, 2024).

Donepezil (Aricept) ve Galantamin (Razadyne) de aynı gruba ait olup, Donepezil ileri evrelerde de etkili iken Galantamin daha çok hafif ve orta düzeydeki vakalarda önerilir. Her ikisi de asetilkolin yıkımını engelleyerek sinaptik asetilkolin düzeyini artırır. Yan etkileri arasında gastrointestinal şikayetler ve halsizlik öne çıkar (NIA, 2024). Donepezil 1996 yılında, Galantamin ise 2001 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Singh vd., 2024).

Memantin (Namenda) ise glutamaterjik sistem üzerinde etkilidir. NMDA reseptör antagonisti olarak görev yapar ve A β ilişkili nöronal toksisiteyi sınırlarken tau hiperfosforilasyonunu ve mikrogliya aracılı inflamasyonu azaltır. Orta-ileri düzey hastalarda kullanılır. Baş dönmesi, baş ağrısı, ishal, kabızlık, bilinç bulanıklığı gibi yan etkileri vardır (NIA, 2024).

Yeni nesil tedaviler: monoklonal antikörler ve patofizyolojik hedefleme

Son yıllarda, AH'nin altında yatan biyolojik mekanizmaları doğrudan hedef alan antikör temelli ilaçlar ön plana çıkmıştır (Zhang vd., 2023a; Wu vd., 2023b).

Donanemab (Kisunla), 2024'te FDA onayı almış, erken evre AH hastalarında amiloid plak yükünü azaltmada etkili olduğu gösterilmiş bir ilaçtır. 76 haftalık çalışmalarda, kognitif gerileme oranında plasebo grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yavaşlama sağlanmıştır. ARIA, baş dönmesi ve nöbetler gibi yan etkiler mevcuttur (FDA, 2024).

Lecanemab (Leqembi), A β 'yi hedefleyen ve 2023'te tam FDA onayı alan bir diğer monoklonal antikördür. 79 hafta süren klinik çalışmalarda A β yükünde anlamlı azalma ve kognitif gerilemede sınırlı yavaşlama gözlenmiştir (Wu vd., 2023b). Beyin şişmesi ve kanaması, baş ağrısı, öksürük, ishal, mide bulantısı, ateş, titreme, kusma, vücut ağrıları, yorgunluk, yüksek tansiyon, düşük tansiyon ve düşük oksijen gibi yan etkileri vardır (FDA, 2023). EMA, başlangıçta pazarlama iznini reddetmişse de 2025 yılında yeniden değerlendirerek Avrupa pazarında satışını onaylamıştır (Söderberg vd., 2023; EMA, 2025).

Aducanumab (Aduhelm), hastalığı temel patofizyolojisi olan Aβ plaklarını hedefleyen ilk monoklonal antikorlardan biridir ve 2021'de hızlandırılmış FDA onayı almıştır. Plasebo kontrollü çalışmalarda PET ile doğrulanan Aβ temizliğinde belirgin azalma göstermiştir. Ancak klinik faydanın sınırlı olduğu ve baş ağrısı, bilinç bulanıklığı, baş dönmesi, düşme, ishal, görme değişiklikleri, mide bulantısı gibi yan etkiler haricinde Amiloidle ilişkili görüntüleme anormallikleri (ARIA; geçici şişlik, beynin içinde veya yüzeyinde küçük kanamalar) gibi ciddi yan etkilerin bulunduğu gerekçesiyle 2022 yılında EMA, 2024 yılında ise FDA onayı iptal edilmiştir (FDA, 2025; EMA, 2022).

Davranışsal Belirtiler İçin Onaylanan Tedaviler

2023 yılında FDA onayı alan Brexpirazol (Rexulti), AH'ye bağlı ajitasyon semptomlarının yönetimi için onaylanan ilk antipsikotiktir. Etki mekanizması dopamin ve serotonin reseptörleri üzerinedir. En sık bildirilen yan etkiler idrar yolu enfeksiyonları, baş ağrısı ve uykusuzluktur (FDA, 2023; EMA, 2025).

Genel Değerlendirme ve Klinik Araştırmalar

Güncel literatür, monoklonal antikor temelli ajanların Aβ birikimini belirgin şekilde azaltabildiğini ancak klinik faydalarının sınırlı ve yan etkilerinin önemli olduğunu göstermiştir (Söderberg vd., 2023; Wu vd., 2023b). Ayrıca, AH için etiopatogenezi çok yönlü hedefleyen yeni stratejilerin (inflamasyon modülasyonu, mitokondriyal stabilizasyon, metal homeostazı vb.) geliştirilmeye çalışıldığı, bu alanlarda devam eden çok sayıda klinik çalışmanın olduğu raporlanmıştır (Lei vd., 2021; Zhang vd., 2024b).

Haziran 2025 itibarıyla dünya genelinde, AH'ye yönelik yürütülen aktif klinik çalışma sayısı ClinicalTrials.gov verilerine göre 152 iken (ClinicalTrials.gov, 2025), NIA tarafından desteklenen Alzheimer ve ilişkili demanslara yönelik aktif çalışma sayısı 495 olarak bildirilmiştir (NIA, t.y.). Bu tablo, hastalığın tedavisinde geleneksel semptomatik ajanlardan hedefe yönelik, moleküler düzeyde müdahale eden stratejilere doğru bir geçişin hızlandığını ortaya koymaktadır.

Bu kapsamda, geleneksel tedavi yöntemleri kısmen semptomatik iyileşmeler sağlasa da, hastalığın progresif doğası ve moleküler heterojenliği göz önüne alındığında, mevcut farmakolojik ajanlar hem etkinlik hem de güvenlik açısından sınırlı kalmaya devam eder.

Günümüzde yürütülen çok merkezli klinik çalışmalara rağmen, monoklonal antikorlar dahil olmak üzere pek çok yeni nesil ajanın nöroprotektif etkinliği, uzun dönemli klinik fayda ve farmakoekonomik sürdürülebilirlik açısından hala tartışmalıdır. Bu nedenlerle, hastalığın multifaktöriyel yapısına yönelik hedefli ve çok düzeyli müdahale gerekliliği ön plana çıkar. Son yıllarda hızla gelişen nanotabanlı uygulama teknolojileri, özellikle beyin hedefli ilaç taşıma sistemleri aracılığıyla AH’de hastalık modifiye edici yaklaşımlara kapı aralamıştır. Bu sistemler, hem KBB’yi aşabilme hem de hücre içi patolojik süreçlere müdahale edebilme potansiyeliyle klasik tedavilerin önüne geçebilecek yenilikçi bir çözüm olarak değerlendirilebilirler. Bu nedenle, bir sonraki bölümde AH’ye yönelik nanoteknoloji temelli stratejilerin rolü detaylı şekilde ele alınmıştır.

1.5. ALZHEİMER HASTALIĞI’NDA NANOTIBBIN ROLÜ ve GEREKLİLİĞİ

Nanoteknoloji, maddeyi atomik, moleküler ve supramoleküler düzeyde manipüle etme kabiliyeti sayesinde, biyotıp alanında çığır açıcı uygulamalara olanak tanımıştır. Bu doğrultuda gelişen **nanotıp**; teşhis, tedavi ve izleme gibi tıbbi uygulamalarda nanomalzemelerin kullanımıyla hastalıkların daha etkili ve hedefe yönelik yönetimini amaçlayan multidisipliner bir yaklaşımdır. Terim olarak ilk kez 1990’ların başında kullanılmaya başlanan nanotıp, günümüzde özellikle nörodejeneratif hastalıklar, onkoloji ve enfeksiyon hastalıkları gibi klasik tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı alanlarda umut vadeden stratejiler sunar (Drexler vd., 1991; Qu vd., 2024).

Nanotıpta kullanılan nanopartiküller; yüksek yüzey alanı/hacim oranı, modifiye edilebilir yüzey yapısı, hücre içi hedefleme kabiliyeti ve biyoyumlu ilaç taşıma potansiyeli ile öne çıkar. Bu sayede geleneksel tedavilerde karşılaşılan farmakokinetik engellerin aşılmasına yardımcı olurlar. Nanopartiküller ayrıca belirli fizikokimyasal özellikler kazandıran yüzey etkileri, kuantum boyut etkileri ve büyük miktarlarda ilaç yükleme kapasitesi ile enzimatik bozulmalara karşı koruma gibi avantajlar sunar (Xu vd., 2021). Küçük boyutları sayesinde hem yüksek hücresel alıma sahiptirler hem de hedef dokuya kolaylıkla ulaşabilirler (Ramanathan vd., 2018). Yüzey modifikasyonları yoluyla sağlıklı hücrelerde değil, hastalıklı dokularda birikmeleri sağlanarak hedef dışı tutulumlar azaltılabilir (Saenz del Burgo vd., 2014). Ayrıca bu sistemler; düşük dozda uygulama, azalmış toksisite, iyileştirilmiş farmakokinetik profil, geliştirilmiş biyoyararlanım ve

terapötik ajanların stabilitesinin artırılması gibi çok sayıda avantaj sunar (Ahlawat vd., 2018).

Etkili bir nanosistem; biyouyumlu, küçük boyutlu, yüksek ilaç yükleme ve enkapsülasyon verimine sahip olmalı, ilacın işlevselliğini koruyacak şekilde tasarlanmalıdır. Formülasyon aşamasında ilacın matrise etkin şekilde entegre edilmesi ya da sonradan yüklenmesi mümkündür. Literatürde, izoelektrik noktaya yakın pH'da yapılan enkapsülasyonların daha yüksek verim sağladığı gösterilmiştir (Castro vd., 2020). Ayrıca nanosistemlerin toksik olmaması, biyobozunur olması, kanda stabil kalması, fagositik sistem tarafından elimine edilmemesi, beyin hedeflemesi, kontrol edilebilir ilaç salımı olmalı, ekonomik ve verimli üretim süreci gibi özellikleri taşıması beklenir (Solaro vd., 2010; Zhang vd., 2016).

İlaçların %98'inden fazlası KBB'yi geçemez. Bu nedenle KBB'yi aşamayan ilaçlar için geliştirilen nanopartikül sistemleri, MSS hastalıklarında tedavi başarısını artırmak için stratejik bir yaklaşım sunar (Wu vd., 2023a; Israel vd., 2022). AH özelinde değerlendirildiğinde, mevcut tedavilerin yalnızca semptomatik fayda sağlaması ve hastalık progresyonunu durduramaması, hedefe yönelik alternatif sistemlerin gerekliliğini ortaya koyar. Gopalan vd. (2020), yüzey mühendisliği ile geliştirilen, reseptör hedeflemeli ve uyarana duyarlı nanopartikül sistemlerinin AH tedavisinde etkinliği artırabileceğini belirtmiştir.

Bu bağlamda, beyne spesifik iletimi mümkün kılan reseptör hedefleme stratejileri ön plana çıkar. Özellikle reseptör aracılı transitoz (RMT) mekanizmasıyla beyin endotel hücrelerinde bulunan transferrin reseptörü 1 (TfR1) hedeflenmesi, bu alandaki en yaygın yöntemlerden biridir. TfR1, demir homeostazında rol alan bir transmembran glikoprotein olup, başta beyin mikrovasküler endotel hücreleri olmak üzere nöronlarda da yüksek düzeyde eksprese edilir; bu durum, sistemik dolaşımdan beyne demir taşınımı açısından hayati bir rol üstlenmesine bağlanır (Moos & Morgan, 2000; Thangudu vd., 2020). Nöronlar da, yüksek enerji ihtiyacı ve demire olan bağımlılıkları nedeniyle TfR bakımından zengindir. Özellikle hipokampus ve korteks bölgelerindeki nöronlarda TfR ekspresyonunun belirgin olduğu bildirilmiştir (Roskams & Connor, 1992; Moos, 1996; Moos & Morgan, 2000). Bu nedenle TfR1 hedeflemesi hem KBB'yi aşmak hem de nöronlara seçici iletim sağlamak açısından ideal bir stratejidir.

Son yıllarda çeşitli ilaç taşıma sistemleri transferrin ile konjuge edilerek beyin hedefli çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak TfR1, dolaşımdaki endojen transferrin tarafından doyurulduğundan, transferrin bağlanması kandaki endojen transferrin konsantrasyonları ile sınırlı kalabilir. Ayrıca, TfR'yi bağlamak için transferrin kullanılması demirin beyin tarafından hücrel alımını etkileyebilir (Wong vd., 2019). Bu nedenle, TfR1'e özgü sentetik peptitlerin kullanımı ön plana çıkmıştır. Bu amaçla geliştirilen B6 (CGHKAKGPRK), TGN (TGNYKALHPHNG), CGN (CGNHPHLAKYNGT), CRT (CRTIGPSVC) gibi peptitlerin nanopartikül yüzeyine bağlanmasıyla KBB geçişi ve hedefleme etkinliği artırılmıştır. Örneğin, Liu vd. (2013), B6 peptidi ile modifiye edilen PEG-PLA nanopartiküllerinin beyin hedefli taşıma kabiliyetini artırdığını göstermiştir. Yin vd. (2015), AH tedavisinde B6 ile işlevselleştirilmiş selenyum nanopartiküllerinin yüksek KBB geçirgenliği sağladığını bildirmiştir. Fan vd. (2018), PEG-PLGA sistemine B6 konjugasyonu ile AH fare modelinde beyin hedeflemenin başarıyla gerçekleştiğini rapor etmiştir. Mojarad-Jabali vd. (2022), farklı TfR1 mimetik peptitlerin vincristine liposomlarının KBB geçişine etkisini karşılaştırmalı olarak analiz etmiştir. McQuaid vd. (2025), altın nanoparçacıkların B6, CRT ve T7 gibi peptitlerle TfR1 hedeflemesi sonucu KBB geçişinin sağlandığını göstermiştir. Du vd. (2021) ise CRT peptidi ile modifiye edilen nanosistemlerin beyin iletiminde etkili olduğunu bildirmiştir.

Bu sistemler aynı zamanda, NAC gibi antioksidan ve antiinflamatuvar ajanların etkin bir şekilde taşınmasını da mümkün kılar. Bu bağlamda, nanopartikül sistemleri yalnızca hedefe iletim değil, aynı zamanda moleküler etkinin güçlendirilmesini de sağlar. NAC yüklü PEG-PLGA sistemlerinin AH patolojisinde nöroinflamasyonu baskıladığı (Vargas-Barona vd., 2024), NAC'ın lipid-polimer hibrit nanoparçacıklarla sunulmasının etkinliği artırdığı görülmüştür. Nayak vd. (2023), fitokimyasallarla yüklenmiş nanopartiküllerin otofajiyi indüklediği ve nöroinflamasyonu azalttığını belirtmiştir. Rivastigmin ile birlikte elektrospay yöntemiyle kaplanan NAC yüklü mikroiğneler AH tedavisi için alternatif bir yaklaşım olarak önerilmiştir (Monou vd., 2024). Ayrıca, farklı hastalık modellerinde (tüberküloz, osteogenez, ototoksisite, disostoz) NAC'ın nanopartikül formda uygulanması ile ilaç stabilitesinin, hücrel alımın ve terapötik etkinliğin arttığı gösterilmiştir (Chiesa vd., 2017; Puri vd., 2022; Hong vd., 2023; Zhu vd., 2019). Ayrıca donepezil (Çınar vd., 2022), memantin (Sánchez-López vd., 2018) ve kurkumin (Fan vd., 2018) gibi ajanların PLGA-PEG bazlı sistemlerle kombine edilerek beyin hedefleme etkinlikleri artırılmıştır. Ek olarak kuersetin (Pinheiro vd., 2020), kurkumin (Huang vd.,

2017) ve kafeik asit (Andrade vd., 2023) gibi antioksidan bileşiklerin de TfR hedefli farklı nanosistemlerle beyne etkin şekilde taşınabildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, beyin dokusuna özgü, biyouyumlu ve hedefli ilaç salımına imkân tanıyan nanotabanlı taşıyıcı sistemlerin, AH'nin erken evrelerinden itibaren uygulanması, hastalık progresyonunun yavaşlatılması ve bilişsel işlevlerin korunmasında yeni bir çıkır açabilir. Bu bağlamda, KBB geçişini mümkün kılan, özellikle TfR1 gibi reseptörlere yönelen peptit temelli akıllı nanoparçacık sistemlerinin geliştirilmesi, AH tedavisinde nanomedikal yaklaşımın gerekliliğini açıkça ortaya koyar.

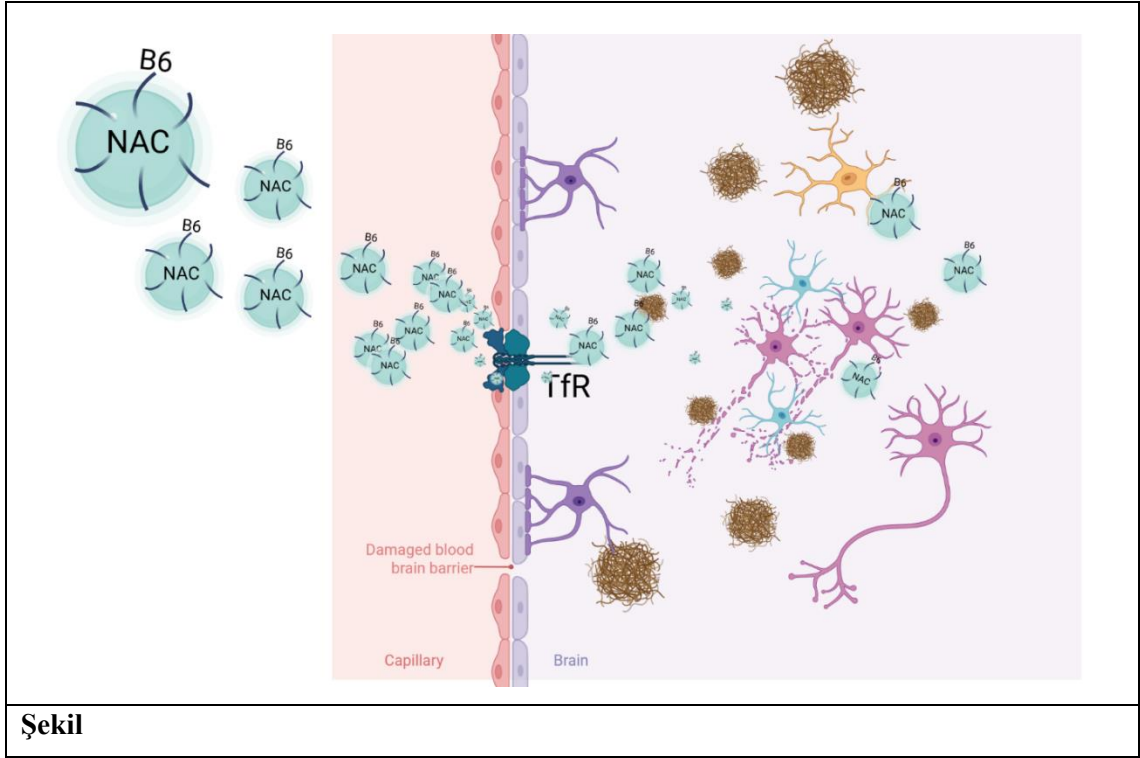
2. TEZİN AMACI ve HİPOTEZİ

AH, A β peptidlerinin özellikle oligomerik formlarının neden olduğu nöronal toksisite, oksidatif stres ve nöroinflamasyonla karakterize edilen, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır ve halen kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Bu süreçte artan ROS ve azalan antioksidan savunma mekanizmaları, nöronal hasarı şiddetlendirerek hastalığın patogeneğinde kritik rol oynar.

NAC, glutatyon biyosentezini artıran, oksidatif stresi baskılayan ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak nöroinflamatuvar yanıtları modüle eden güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuvar ajandır. Ancak, serbest formda uygulandığında sınırlı biyoyararlanımı ve KBB'yi geçememesi, terapötik etkinliğini kısıtlar. Bu nedenle, NAC'ın biyobozunur ve biyouyumlu mPEG-PLGA polimerik nanopartiküller içinde enkapsülasyonu, hem farmakokinetik profilini iyileştirme hem de kontrollü ve hedefe yönelik salım sağlama açısından avantaj sunar. Ayrıca, nanopartikül yüzeyine TfR1 hedefleyen B6 peptidinin konjugasyonu, KBB'yi daha etkin geçiş ve nöronlara özgül dağılım potansiyeli sunarak sistemin hedefleme kapasitesini artırabilir.

Bu bağlamda, mPEG-PLGA bazlı nanopartiküller içinde enkapsüle edilen NAC, serbest formuna kıyasla daha yüksek biyoyararlanım ve stabilizeye sahip olup; B6 peptidi ile yüzey modifikasyonu sonrası KBB'yi daha etkin geçebilir ve A β ₄₂ oligomerlerinin neden olduğu hücrel toksisite, oksidatif stres ve nöroinflamasyonu anlamlı şekilde azaltabilir.

Belirtilen hipotez doğrultusunda, bu tez çalışmasında NAC'ın yukarıda belirtilen terapötik özelliklerinin mPEG-PLGA temelli ve beyne hedeflendirilmiş nanopartikül taşıyıcı sistemi aracılığıyla *in vitro* amiloid beta toksisitesi modelinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen sistemin fizikokimyasal karakterizasyonu yoluyla optimizasyonu, salım profili analizi, KBB geçiş potansiyeli ile anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkilerinin kapsamlı şekilde analiz edilmesi hedeflenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Sarf Malzemeler

Etken madde, kimyasallar ve sarf malzemeler: N-asetil sistein (Sigma-Aldrich, A7250); Asetonitril (HPLC grade; Merck; Cas: 64-17-5); mPEG 2000 (Sigma-Aldrich); Polietilen glikol metil eter; Toluen (Merck); Dibütilkalay dilaurat; Diklorometan (Merck); Maleik anhidrit (Sigma Aldrich); Benzoil peroksit (Merck); Hekzadiamin (Merck); Tetrahidrofuran (Merck); Aseton (>% 99 saflıkta; Isolab); 12–14 kDa selüloz asetat diyaliz membranı; EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür; Sigma Aldrich); 200 mesh karbon kaplı bakır grid (Agar Scientific).

Polimerler ve peptidler: PLGA (Resomer RG-502, Sigma-Merck719889); B6 peptidi (CGHKAKGPRK, Elabscience); A β ₁₋₄₂ peptidi (HFIP form, Bachem -7442).

Hücre kültürü malzemeleri ve kitler: %0.25 Trypsin/EDTA (Diagnovum; Kat. No: D705); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Diagnovum; Kat no: D011); Fetal Bovine Serum (FBS; Diagnovum; Kat no: D154); Fosfat tamponlu salin (PBS; Diagnovum; Kat no: D402); Dimetilsülfoksit (DMSO; Isolab, Almanya; Cas no: 67-685); CVDK-8 (Cell Viability Detection Kit-8; EcoTech Biotechnology; Kat no: CVDK-8); JC-10 boyası (Abcam; Kat no: ab112134); Total Oxidant Status (TOS) Kiti (Elabscience; Kat no: E-BC-K802-M); Total Superoxide Dismutase (T-SOD) Aktivite Kiti (Elabscience; Kat no: E-BC-K020-M); Total Glutathione (T-GSH) Kiti (Elabscience; Kat no: E-BC-K097-M); ELISA Kitleri-Human IL-1 β (BT LAB; Kat no: E0143Hu), IL-6 (BT LAB; Kat no: E0090 Hu) ve TNF- α (BT LAB; Kat no: E0082Hu); Keçi serum çözültisi (Jackson ImmunoResearch #005-000-001); NeuN primer antikoru (Medchem Express Rabbit #YA272, HY-P80241); sekonder antikor (Elabscience Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Elab Fluor® 647 konjugat (#E-AB-1075)); Fluoroshield with DAPI (GeneTex GTX30920).

3.1.2. Cihazlar

Kromatografi ve spektroskopi: Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı (Shimadzu Prominence-i LC-2030C) ve C18 kolon (150 mm × 4.6 mm, 5 µm); Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) cihazı (Agilent Cary 630); Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H NMR) (Agilent Unity Inova 500 MHz); Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) için TSK-Gel GMHHR-M kolonu (Tosoh Bioscience).

Fiziksel karakterizasyon cihazları: Zetasizer Nano ZS (Malvern); Taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) (Quattro S, Thermo Scientific); Ultracentrifuge (Beckman Coulter); Masaüstü santrifüj (Thermo Fisher Scientific).

Hücresel analiz cihazları: Mikroplaka okuyucu (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific); Floresan mikroplaka okuyucu (BioTek Instruments); Akım sitometrisi sistemi (NovoCyte, Agilent); Konfokal mikroskopi sistemi (Zeiss, PRIMOVERT; Model: MCO-18AC).

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. NAC'ın analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

NAC miktar tayini, formülasyonlardaki doğruluk ve güvenilirliğin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir. Analiz yönteminin doğru ve kesin olması durumunda bu doğrulama işlemine analitik validasyon denir. Bu çalışmada geliştirilen analitik yöntem, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) Q2 (R1) yönergeleri çerçevesinde valide edilmiştir (ICH, 2023). Yöntem validasyonu kapsamında sistem uygunluk, doğrusalılık, teşhis ve tayin sınırı, doğruluk, kesinlik, tekrar üretilebilirlik ve seçicilik parametreleri değerlendirilmiştir.

3.2.2. Analitik yöntem koşulları

NAC tayininde Shimadzu Prominence-I LC-2030C model HPLC cihazı ve C18 kolonu (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. NAC, distile suda 500 µg/mL (ppm) konsantrasyonunda çözündürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hareketli faz olarak %10 asetonitril ve %90 1 mM KH₂PO₄ (pH=3.0) çözeltisi izokratik koşullarda kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 20 µL olarak belirlenmiştir. NAC için analiz dalga boyu maksimum absorbans gösterdiği 213 nm olarak seçilmiştir.

3.2.3. Sistem uygunluk

Kromatografik analizlerde yöntemin istenilen kesinlik ve doğrulukta değerlendirilmesi için incelenir. Sistem uygunluk, analizi yapılan maddenin pik yüksekliği, alıkonma süresi yada pik alanına bağlı standart sapma, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü, asimetri faktörü, seçicilik faktörü gibi parametrelerinin test edilmesidir. Sıralanan parametrelerden en az iki tanesi değerlendirilmelidir (Bose, 2014). Çalışmada sistem uygunluk parametrelerinden alıkonma süresi ve pik alanı 6 tekrar olacak şekilde incelenmiştir.

3.2.4. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, deneysel çalışmalarda elde edilen bulguların doğrudan ya da dolaylı olarak madde konsantrasyonu ile orantılı olması durumudur (ICH, 2023). Analitik yöntemin konsantrasyonla (5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 ve 500 ppm) orantılı sinyal verdiğini göstermek amacıyla, 5–500 ppm aralığında sekiz farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanarak üçer tekrar analiz edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır.

3.2.5. Doğruluk

Yöntemin doğruluğu, NAC'ın farklı konsantrasyonlarıyla (50, 200, 500 ppm) hazırlanan örneklerin % geri kazanım değerleriyle belirlenmiştir (ICH, 2023). Her bir konsantrasyon için 5 tekrar yapılmış, % geri kazanım oranları ile birlikte SS ve %BSS değerleri hesaplanmıştır.

3.2.6. Kesinlik

Geliştirilen analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade eder. Kesinlik; yöntemin tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik özelliklerini kapsamaktadır (ICH, 2023). Bu çalışmada NAC analizine yönelik yöntemin kesinliğini değerlendirmek amacıyla, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik analizleri gerçekleştirilmiştir. Tekrar elde edilebilirlik analizinde, 100 ppm konsantrasyondaki örnekler iki farklı analist tarafından bağımsız olarak hazırlanmış ve ölçümler arka arkaya gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik analizinde ise, farklı zamanlarda hazırlanan 50 ppm konsantrasyonundaki örnekler ardışık şekilde analiz edilmiştir. Her iki analizde de 6 tekrarlı olacak şekilde örnekler hazırlanmış, elde edilen veriler üzerinden SS ve %BSS değerleri hesaplanmıştır.

3.2.7. Özgünlük ve seçicilik

Analiz edilen numunenin formülasyondaki bileşenlerle uygunluğunun belirlenmesidir (ICH, 2023). Yöntemin seçiciliği, NAC içermeyen boş nanopartikül formülasyonlarının ve taşıyıcı bileşenlerin ayrı ayrı analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak NAC ile yapabileceği girişim değerlendirilmiştir.

3.2.8. Teşhis sınırı ve miktar tayini

Yöntemin duyarlılığı, teşhis sınırı (LOD) ve miktar tayini (LOQ) için kullanılan değerleri ile belirlenmiştir. LOD, analit sinyalinin arka plan gürültüsüne kıyasla yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu en düşük tespit seviyesidir. LOQ ise, analitin kantitatif olarak güvenilir şekilde belirlenebildiği ve sinyalin gürültüye yaklaşık 10 kat oranla üstün olduğu en düşük konsantrasyon düzeyidir (ICH, 2023). Burada σ , kalibrasyon eğrisinin y-kesişim noktasının standart sapması; S ise eğrinin eğimi olarak alınmıştır.

$$\text{LOD} = 3,3 \times (\sigma / S) \quad \text{LOQ} = 10 \times (\sigma / S)$$

3.3. Polimerlerin sentezlenmesi ve karakterizasyon çalışmaları

3.3.1. Polimerlerin sentezlenmesi

3.3.1.1. mPEG-PLGA polimerinin sentezlenmesi

Bu çalışmada nanopartikül formülasyonu için kullanılan polimer, RG-502 ticari adıyla temin edilen, PLGA kopolimeridir. Bu polimer, laktik asit ve glikolik asidin 50:50 mol oranında rastgele kopolimerizasyonu ile elde edilir. Ortalama moleküler ağırlığı yaklaşık 7.000–17.000 Da (düşük molekül ağırlıklı) olan bu form, yüksek çözünürlüğü ve iyi biyolojik uyumluluğu sayesinde, ilaç taşıyıcı nanopartikül sistemlerinin üretiminde yaygın olarak tercih edilir (Park vd., 2020a). PLGA 50:50, hidrojen iyonu varlığında ve fizyolojik koşullarda ester bağlarının hidrolizi ile su ve CO₂'ye ayrışarak biyobozunur bir

yapı sergiler. Ayrıca bu oran, kontrollü ilaç salım sistemlerinde verimli salım profili sağlamasıyla öne çıkar. Düşük molekül ağırlıklı yapısı sayesinde daha hızlı degradasyona uğrar ve bu da terapötik uygulamalarda avantaj sağlar (Martín-Banderas vd.,2012; Sun vd., 2022).

Bu amaçla PLGA polimeri, metoksi uç grubu içeren PEG (mPEG 2000) ile dibütilkalay dilaurat katalizörlüğünde blok kopolimer olarak sentezlenmiştir. Bu işlem sırasında, PLGA'nın karboksil uç grubu ile PEG'in hidroksil grubu arasında ester bağları oluşturulmuştur. Reaksiyon için PLGA ve polietilenglikol metil eter (PEG-OCH₃) 1:1 mol oranında tartılmış ve 15 mL toluen içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen çözelti; karıştırıcı, soğutucu ve inert gaz geçişi sağlayan 500 mL'lik 5 boyunlu cam reaktör sistemine aktarılmıştır. Reaksiyon ortamına 2 mg dibütilkalay dilaurat eklenmiş ve işlem 114 °C'de, 250 rpm'de, azot atmosferi altında 8 saat sürdürülmüştür. Reaksiyon sonrası toluen rotary evaporatör ile uzaklaştırılmış; kalıntı 20 mL diklormetan (DCM) içinde çözülerek 60 °C'de karıştırılan distile suya eklenmiştir. DCM'nin emülsiyondan buharlaşma yöntemiyle uçurulmasının ardından, süspansiyon 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen mPEG-PLGA ürünü liyofilize edilerek -20 °C'de saklanmıştır (Li vd., 2001; Park vd., 2020b).

3.3.1.2. mPEG-PLGA-MA polimerinin sentezlenmesi

Elde edilen mPEG-PLGA kopolimeri, iki ayrı bağ içeren fonksiyonel bir grup kazandırmak amacıyla maleik asit ile modifiye edilmiştir. Bu modifikasyon, polimer zincirine reaktif bir alken grubu ekleyerek sonraki konjugasyon reaksiyonlarına uygun bir ortam sağlamıştır. Maleik anhidrit (MA) ile modifikasyon (maleatlama) işlemi için mPEG-PLGA, MA ve benzoil peroksit (BPO), sırasıyla 1:10:0.2 mmol oranında yaklaşık 10-15 mL DCM içerisinde çözülmüştür. Homojen karışım elde edildikten sonra DCM, vakum altında uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan karışım, azot atmosferi altında 100±1 °C'de 16–17 saat reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda sistem oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve içerisinde 50°C'de sıcak su geçirilerek temizlenmiştir. Elde edilen mPEG-PLGA-MA ürünü kurutularak -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.1.3. mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimerinin sentezlenmesi

Peptid bağlanmasına olanak tanıyacak amin gruplarının polimerin yüzeyine kazandırılması için hekzadiamin (HMDA) ile nükleofilik ekleme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece mPEG-PLGA-MA yapısı, uçta serbest bir amin grubu içerecek şekilde fonksiyonelleştirilmiş ve peptid konjugasyonu için aktif hale getirilmiştir. Bu amaçla mPEG-PLGA-MA ve HMDA, ağırlıkça %3 olacak şekilde ayrı ayrı tetrahidrofuran (THF) içerisinde hazırlanmıştır. HMDA çözeltisi, karıştırılmakta olan mPEG-PLGA-MA çözeltisine 20 °C'nin altında damla damla eklenmiş, ardından karışım 10 dakika bu sıcaklıkta, daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Oluşan ürün soğuk distile su içerisinde çöktürülmüş ve 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Ürün birkaç kez distile suyla yıkandıktan sonra vakum altında dondurularak kurutulmuş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Bu çok basamaklı sentez yaklaşımı, hem hidrofilik-hidrofobik dengeyi sağlayarak nanopartikül oluşumunu kolaylaştırmakta hem de yüzey fonksiyonelleştirmesi ile hedeflenmiş ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

3.3.2. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları

3.3.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Fonksiyonel grupların tayini amacıyla FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir. Örnekler, 1/200 oranında potasyum bromür (KBr) ile seyreltilerek tablet formunda hazırlanmış ve spektral ölçümler 4000–400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında alınmıştır (Li vd., 2001).

3.3.2.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

Polimer zincirlerinin yapısal doğrulaması için ^1H -NMR analizi yapılmıştır. Örnekler, kloroform-d (CDCl_3) çözeltisi içerisinde çözülerek $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de analiz edilmiştir (Li vd., 2001; Wei vd., 2014).

3.3.2.3. Jel Geçirgenlik Kromatografisi / Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi

Polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları (M_w), sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n) ve polidispersite indeksi ($\text{PDI} = M_w/M_n$) değerlerinin belirlenmesi amacıyla GPC-SEC analizi yapılmıştır. Ölçümler, 1 mL/dk akış hızında ve taşıyıcı faz olarak THF ortamında gerçekleştirilmiştir. Diferansiyel kırılma indeksi (dRI) detektörü yardımıyla spesifik dn/dc değeri (0.045 mL/g) belirlenmiş, mutlak molar kütle ve dağılımı ise mini-DAWN çok açılı ışık saçılımı (MALS) detektörü ile ölçülmüştür. Analiz öncesinde ürünler, gece boyunca 5 mg/mL derişimde kloroform içinde çözülmüş, ardından $0,22\text{ }\mu\text{m}$ membran filtreden süzülerek ölçüme hazır hale getirilmiştir.

3.4. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyon analizleri

Bu çalışmada geliştirilen NP formülasyonları aşağıda belirtilmiştir.

- **mPLGA-PEG-NH₂** (NP)
- **FITC yüklü mPLGA-PEG-NH₂** (FITC-NP)
- **NAC yüklü B6-FITC peptidi ile konjuge mPLGA-PEG-NH₂** (FITC-B6-NP)
- **NAC yüklü B6 peptidi ile konjuge mPLGA-PEG-NH₂** (NAC-B6-NP)

Nanopartikül formülasyonları, nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır (Akay vd., 2020). Öncelikle, mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimeri ve NAC, 15 mL aseton içerisinde sırasıyla 50:20, 40:20 ve 25:20 (a/a) oranlarında çözülmüştür. Elde edilen organik faz,

manyetik karıştırıcıda 300 rpm hızla dönen 10 mL distile suya damla damla ilave edilmiştir. Karışım 30 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, çözücü düşük basınç altında vakumla uzaklaştırılmıştır. Oluşan nanopartikül dispersiyonu, 45.000 rpm'de ve 4 °C'de 1 saat süreyle ultrasantrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, distile su içinde disperse edilerek karakterizasyon analizlerine tabi tutulmuştur.

İlk üretim koşullarında elde edilen partikül boyutları hedef aralıkta olmadığından, sonraki denemeler buzlu ortamda gerçekleştirilmiş ve bu şekilde daha uygun fiziksel özelliklere sahip formülasyonlar elde edilmiştir.

En uygun sonuç veren 25 mg polimer: 20 mg ilaç oranına sahip formülasyona, B6 peptidi konjuge edilmiştir. Öncelikle konjugasyon işlemi için, NAC yüklü mPEG-PLGA-NH₂ nanopartikülleri buzlu ortamda hazırlanmıştır. Aynı ultra saf suda çözünen EDAC ve B6 peptidi (her biri 1 mg/mL) nanopartikül dispersiyonuna sırasıyla eklenmiştir. EDAC ile aktivasyon işlemi buzlu ortamda 45 dakika boyunca sürdürülmüş; ardından formülasyona göre B6 ve B6-FITC peptidi ilave edilerek karışım 2,5 saat daha buzlu ortamda karıştırılmıştır.

Formülasyonlar hazırlandıktan sonra, her basamakta ortamın pH değeri ölçülmüş ve pH artışının partikül boyutu (PB), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Son pH değeri 6.8'in altında elde edilen nanopartiküllerde enkapsülasyon verimi de ayrıca analiz edilmiştir.

Hücre sel alım ve KBB geçişi deneylerinde kullanılmak üzere FITC yükleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. FITC, yukarıda tanımlanan yöntem ile mPEG-PLGA-NH₂ nanopartiküllerine yüklenmiş ve elde edilen dispersiyon 45.000 rpm'de, 4 °C'de 1 saat boyunca ultrasantrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, distile suda disperse edilerek karakterizasyon analizine tabi tutulmuştur. Yüklenen FITC miktarının belirlenmesinde, süpernatanttan alınan örnekler UV-Vis spektrofotometre ile analiz edilmiştir.

3.4.1. Nanopartiküllerin boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleri

Bu ölçümler, nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini değerlendirmek ve formülasyon parametrelerinin partikül özelliklerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. PDI

değerinin <0.2 olması, monodispers bir dağılımın göstergesi olarak kabul edilmiştir (Danaei vd., 2018).

Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik çapı (partikül büyüklüğü, PB) ve PDI, yeniden distile suda disperse edilen pelletlerin DLS yöntemiyle analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Ölçümler, 25 °C sıcaklıkta Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ZP değerleri de aynı cihazla, özel ölçüm kuvvetlerinde ve 90° saçılma açısında ölçülmüştür (Koopaei vd., 2014). Bu ölçümler, nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini değerlendirmek ve formülasyon parametrelerinin partikül özelliklerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. PDI değerinin <0.2 olması, monodispers bir dağılımın göstergesi olarak kabul edilmiştir (Danaei vd., 2018).

3.4.2. Enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi analizleri

NAC-B6-NP formülasyonlarının enkapsülasyon verimliliği (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%YK) analizleri için, nanopartiküller Bölüm 3.3'te tanımlanan prosedüre göre hazırlanmıştır. Elde edilen dispersiyon 45.000 rpm'de, 4 °C'de 1 saat süreyle ultrasantrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 1 mL örnek alınarak, kapsülleme dışı kalan NAC miktarı indirekt olarak HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir (Li vd., 2012). Bu analizler, ilaç taşıma sisteminin etkinliğini belirlemede temel parametreler olarak değerlendirilmiştir. Aşağıda verilen formüller kullanılarak EE ve YK hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Enkapsülasyon Etkinliği} = \frac{\text{Toplam NAC miktarı} - \text{Serbest NAC miktarı}}{\text{Toplam NAC miktarı}} \times 100$$

$$\% \text{ Yükleme Etkinliği} = \frac{\text{Enkapsüle NAC Miktarı}}{\text{Toplam Ağırlık (NAC ve Polimer)}} \times 100$$

3.4.3. Nanopartiküllerin morfolojik analizi

NAC-B6-NP'lerin yüzey morfolojilerinin değerlendirilmesi amacıyla taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM) analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Türk-Alman Üniversitesi-Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında, Thermo Scientific Quattro S model taramalı elektron mikroskobu kullanılarak, STEM modu altında gerçekleştirilmiştir.

Analiz öncesinde, nanopartikül süspansiyonları 1/100 oranında seyreltilmiş ve ardından örneklerden 5 µL kadar hacim alınarak 200 mesh karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılmıştır. Gridler oda sıcaklığında kurutulmuş, herhangi bir kaplama işlemi (örneğin altın veya karbon spattering) uygulanmamıştır. Kurutma işleminin ardından numuneler yüksek vakum koşullarında STEM modunda incelenmiştir. Bu analiz, partiküllerin şekli ve homojenliği hakkında nitel bilgi sağlamaktadır.

3.4.4. Nanopartiküllerin ilaç salım profil analizi

NAC-B6-NP dispersiyonlarının ve serbest NAC süspansiyonunun *in vitro* ilaç salım profili, diyaliz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Muthu & Singh, 2009). Her bir formülasyon için 1 mL örnek, 12–14 kDa moleküler ağırlık kesim değerine sahip selüloz asetat diyaliz torbalarına yüklenmiştir. Membranlar, deney öncesi bir gece boyunca PBS içinde bekletilerek temizlenmiştir. Deneyler pH =7.4'te fosfat tamponu (PBS) içeren 50 mL ortamda, 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 24. saatlerde 2 mL örnek alınmış ve alınan hacim kadar taze PBS eklenerek sink koşulu sağlanmıştır. Örneklerdeki NAC miktarı, validasyonu yapılmış HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.4.5. Serum ortamında stabilite analizi

NAC-B6-NP formülasyonlarının biyolojik ortamlardaki stabilitesi 3 farklı ortamda değerlendirilmiştir: (i) PBS (pH= 7.4), (ii) %50 fetal bovine serum (FBS) içeren DMEM ve (iii) FBS içermeyen DMEM. Deneyler, 37 °C sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma hızında

0.5, 1, 2, 4 ve 24. saat zaman noktalarında yürütülmüştür (Huang vd., 2009). Her zaman noktasında alınan örneklerde PB, PDI ve ZP değerleri DLS yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu çalışma, sistemin serum proteinleriyle etkileşimi ve fiziksel kararlılığı hakkında ön bilgi sağlamaktadır.

3.4.6. Nanopartiküllerin sterilizasyonu

Nanopartikül formülasyonlarının sterilizasyonu, ultraviyole (UV) ışığı altında 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. UV uygulaması sonrası PB, PDI ve ZP değerleri karşılaştırmalı olarak ölçülerek, sterilizasyon işleminin nanopartikül karakteristikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (Tapia-Guerrero vd., 2020). Bu işlem, nanopartikül yapısının UV ışığına karşı fiziksel stabilitesini ortaya koymak açısından önemlidir.

3.5. *In vitro* Çalışmalar

AH'de görülen A β kaynaklı nörotoksiteyi modellemek amacıyla, insan nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) kullanılmıştır. Bu hücrelere ticari olarak temin edilen A β ₄₂ peptidi oligomer formunda uygulanmış; oksidatif stres ve inflamasyon gibi nöropatolojik süreçlerin *in vitro* taklidi sağlanmıştır. Ardından, serbest NAC ve NAC yüklü B6-peptit konjuge nanopartiküller (NAC-B6-NP) hücrelere uygulanarak anti-oksidan ve anti-inflamatuar potansiyelleri değerlendirilmiştir. Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrarla gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Hücre kültürünün gerçekleştirilmesi

SH-SY5Y hücreleri, %15 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde, 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültürlenmiştir. Hücreler %70–80 konfluansa ulaştığında %0.25 tripsin/EDTA ile ayrıştırılmış ve kültür ortamında

inhibe edilerek santrifüj sonrası yeniden ekim için hazırlanmıştır. Ekim işlemleri T-25 flasklar ve 6, 12, 96 kuyucuklu plaklara uygun hücre yoğunluğunda gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. NAC ve nanopartiküllerin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

Nanopartikül uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, CVDK-8 (Ecotech Biotech) hücre canlılık analiz kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu test, tetrazolyum tuzlarının canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından redüklenmesiyle suda çözünür mor renkli formazan türevlerine dönüşmesini esas alır. Oluşan formazanın miktarı, hücre sayısı ile doğru orantılı olup, mikrolaka okuyucuda 450 nm’de ölçülür (Şanlı vd., 2020).

96 kuyucuklu kültür tabaklarında büyütülen hücrelere, farklı konsantrasyonlardaki boş NP (kontrol) ve NAC-B6-NP 24 saat süreyle uygulanmıştır. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa CVDK-8 reaktifi eklenmiş ve 3 saatlik inkübasyonun sonunda absorbans değerleri mikrolaka okuyucu kullanılarak kaydedilmiştir. Aynı zamanda serbest formdaki NAC da farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanarak sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve optimum doz belirlenmiştir.

3.5.3. Nanopartiküllerin hücre içine alımı

Nanopartiküllerin hücre içi alım etkinliğini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.4.’te belirtilen FITC nanopartikül formülasyon grupları veya FITC-NP ve NAC-B6-FITC-NP kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri 12 kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre/mL yoğunluğunda ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler 25 µg/mL konsantrasyonda nanopartiküllerle 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tripsinizasyonla toplanarak PBS ile yıkanmış ve +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Zhang vd., 2014). Hücre içi nanopartikül alımı, FITC floresan sinyali üzerinden akım sitometrisi (NovoCyte) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem ile uygulanan nanopartiküllerin hücre içine alım düzeyi kantitatif olarak belirlenmiştir.

3.5.4. A β ₄₂ oligomer toksisitesinin modellenmesi

AH'nin temel patofizyolojik bileşeni olan A β ₄₂ peptidi, monomer formdan oligomer, protofibril ve fibril formlarına dönüşür. Literatürde, bu agregasyon sürecindeki A β ₄₂O, en toksik form olarak tanımlanır ve nörotoksiste modellerinde özellikle tercih edilir (Hardy & Selkoe, 2002).

Bu çalışmada, hexafluoroisopropanol (HFIP) ile işlenmiş liyofilize A β ₁₋₄₂ peptidi, dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde 1 mM stok çözelti olarak hazırlanmış ve oligomerizasyon amacıyla, fenol kırmızısı içermeyen DMEM ortamında 5, 10, 20, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda +4 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. HFIP işlemi, β -tabaka oluşumunu engelleyerek A β ₄₂ monomerlerinin çözünür halde kalmasını sağlar ve oligomerizasyonun kontrollü biçimde başlatılmasına olanak tanır (Stine vd., 2003). Uygulanan bu oligomerizasyon yöntemi, literatürde etkinliği kanıtlanmış ve verimli olduğu gösterilmiş bir protokol olup, bu yöntemle oluşturulan A β ₄₂O'ların hücre kültürü ortamında en az bir hafta boyunca oligomerik formda kararlılığını koruduğu bildirilmiştir (Stine vd., 2003; Stine vd., 2011; Gibbs vd., 2019).

Elde edilen A β ₄₂O hücrelere uygulanarak toksik etki değerlendirilmiş ve 24 saat sonra hücre canlılığı ölçülerek doz-yanıt eğrileri oluşturulmuştur. IC₅₀ değeri, logaritmik konsantrasyonlara karşı hücre canlılığı yüzdeleri kullanılarak çizilen eğri üzerinden, dört parametrelili lojistik (4PL) non-lineer regresyon modeli ile hesaplanmıştır.

A β ₄₂O formlarının morfolojik olarak değerlendirilmesi amacıyla STEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan 10 μ M A β oligomer çözeltisi, 1/1000 oranında seyreltilmiş, ardından 200 mesh karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılarak kurutulmuş ve analiz için uygun hâle getirilmiştir. Numunelere herhangi bir kaplama işlemi uygulanmamış; görüntüleme işlemleri, yüksek vakum koşulları altında yürütülmüştür. Analiz farklı büyütme seviyelerinde gerçekleştirilmiş olup, A β oligomerlerinin morfolojik özellikleri ve agregasyon düzeyleri nitel olarak değerlendirilmiştir.

3.5.5. NAC ve NAC-B6-NP'nin A β ₄₂ toksisitesi oluşturulmuş hücrelerde hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

Toksisite modeli oluşturulduktan sonra, A β ₄₂ ile muamele edilen hücre gruplarına, Bölüm 3.4.2'de belirlenen doz aralıklarında serbest NAC ve NAC-B6-NP'ler 24 saat süreyle uygulanmış ve hücre canlılığına etkileri analiz edilmiştir. NAC'ın toksisiteyi azaltma potansiyelini değerlendirmek amacıyla, EC₅₀ değeri 4PL non-lineer regresyon yöntemiyle belirlenmiştir. Bu analiz, formülasyonun nöroprotektif etkinliğini ortaya koymada kritik rol oynamaktadır.

3.5.6. Oksidatif stresin belirlenmesi

AH'de A β ₄₂ birikimi ROS üretimini artırarak hücre içi oksidatif stresin artmasına yol açar. Bu artış, nöronal dejenerasyonu hızlandırarak hastalığın patofizyolojisine katkı sağlar (Sultana vd., 2013). Oksidatif stres, özellikle A β ₄₂ birikiminin olduğu bölgelerde belirgin şekilde artış gösterir ve tedaviye yönelik yaklaşımlarda önemli bir hedef olarak değerlendirilir. Total oksidan seviyesinin (TOS) tayini, Erel (2005) tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde örneklerdeki oksidan moleküller (Fe⁺²), ferrik iyonlarla (Fe⁺³) reaksiyona girerek mavi-mor bir kompleks üretmek için ksilenol turuncusuyla yüksek oranda bağlanır ve bu kompleksin absorbansı 590 nm dalga boyunda ölçülür.

Bu çalışmada, A β ₄₂ ile indüklenen oksidatif stresin azaltılmasında serbest NAC ve NAC-B6-NP etkilerini belirlemek amacıyla TOS analizi yapılmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu kültür plakalarına 2×10⁵ hücre/mL yoğunluğunda ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler, 10 µM A β ₄₂ ile 24 saat süreyle muamele edilerek toksisite indüklenmiştir. Bu işlemi takiben, hücrelere 10 mM serbest NAC ve 25 µg/mL NAC-B6-NP uygulanmış ve hücreler 24 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda kültür medyumunu uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkanmış ve hücre kazıyıcı yardımıyla toplanmıştır. Hücreler dondurulup (-80 °C) çözülerek (37 °C) lizis edilmiş, ardından 2000 g'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantlar analiz için ayrılmıştır.

Öncelikle standart çözeltiler hazırlanmış ve örneklerle birlikte mikrolaka kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa kromojenik reaktif eklenerek ilk absorbens değeri (A1) kaydedilmiş, ardından substrat ilave edilerek plakalar 37 °C’de 5 dakika inkübe edilmiş ve ikinci absorbens değeri (A2) ölçülmüştür. Kit protokolüne uygun şekilde TOS değeri hesaplanmıştır. Elde edilen oksidan seviye sonuçları, her örnek için Bradford protein tayin yöntemiyle belirlenen toplam protein miktarına normalize edilmiştir. Böylece hücre başına düşen oksidatif yük karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.5.7. Superoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

SOD, hücresel düzeyde oluşan süperoksit anyonlarının (O_2^-) detoksifikasyonunu sağlayan başlıca antioksidan enzimlerden biridir. Bu enzim, süperoksit radikallerini H_2O_2 ve O_2 ’ye dönüştürerek hücre içi oksidatif stres düzeylerini azaltır ve redoks dengesinin korunmasına katkı sağlar (Halliwell & Gutteridge, 2015). AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda, SOD aktivitesinin azalması veya etkisiz hale gelmesi oksidatif hasarın artmasına neden olmaktadır.

Bu çalışmada, $A\beta_{420}$ ile toksisite oluşturulan hücrelerde, serbest NAC ve NAC-B6-NP uygulamaları sonrasında SOD aktivitesindeki değişimleri değerlendirilmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/mL yoğunluğunda ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından 10 μ M $A\beta_{420}$ ile 24 saat süresince muamele edilerek toksisite modeli oluşturulmuştur. Bu işlemi takiben, hücreler 24 saat boyunca 10 mM serbest NAC ve 25 μ g/mL NAC-B6-NP ile tedavi edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkanmış, hücre kazıyıcı kullanılarak toplanmış ve dondur-çöz yöntemi ile lizise uğratılmıştır. Elde edilen hücre lizatı 2000 g’de 20 dakika santrifüjlenmiş, süpernatantlar analiz için ayrılmıştır.

Kit içeriğine uygun olarak substrat ve enzim çözeltileri hazırlanmış, örnekler 96 kuyucuklu mikrolakalara aktarılmış ve 37 °C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda absorbens değerleri 450 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu cihaz ile ölçülmüştür. Toplam protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiş ve SOD aktivitesi üretici protokolüne uygun şekilde değerlendirilmiştir. Bu analiz, NAC ve NAC-B6-NP uygulamalarının nöronal antioksidan savunma üzerindeki etkilerini nicel olarak değerlendirme açısından önemli bir parametre olarak kullanılmıştır.

3.5.8. Mitokondriyal disfonksiyon analizi

AH patogenezinde A β birikiminin mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına neden olduğu ve bunun sonucunda enerji üretiminin bozulduğu, ROS biriktiği ve hücrel ölüm süreçlerinin aktive olduğu bilinir (Li vd., 2018).

Bu çalışmada, A β ₄₂ ile oluşturulan toksisite modeli sonrasında mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri değerlendirmek amacıyla JC-10 floresan boyası kullanılmıştır. JC-10, sağlıklı mitokondrilerde agregat formda birikerek kırmızı (emiyon=590 nm) floresans yayarken, membran potansiyeli bozulduğunda monomerik forma dönüşerek yeşil (emiyon=525 nm) floresans yayar. Bu özellik sayesinde, mitokondriyal disfonksiyon düzeyi kırmızı/yeşil floresans oranı ile kantitatif olarak değerlendirilir (Younes vd., 2021).

Hücreler 96 kuyucuklu, şeffaf tabanlı siyah mikrolakalara 4×10⁴ hücre/kuyu yoğunluğunda ekilmiş ve 24 saat boyunca 10 μ M A β ₄₂ uygulanarak mitokondriyal toksisite indüklenmiştir. Ardından, 10 mM serbest NAC ve 25 μ g/mL NAC-B6-NP ile 24 saat boyunca tedavi uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, kit protokolüne uygun olarak JC-10 boyası ile hücreler muamele edilmiştir. 37 °C’de 30 dakika inkübasyonun ardından, floresans emisyonları mikrolaka okuyucu cihazda ex/em=490/525 nm ve 540/590 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Elde edilen verilerle kırmızı/yeşil floresans oranları hesaplanmış ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılarak mitokondriyal disfonksiyon düzeyi değerlendirilmiştir.

3.5.9. Total glutatyon seviyesinin belirlenmesi

GSH, hücre içi redoks dengesinin korunmasında ve oksidatif stresin baskılanmasında temel rol oynayan tripeptid yapısında bir antioksidandır. AH modellemelerinde, A β ₄₂’nin hücrelere verdiği oksidatif hasar sonucunda GSH seviyelerinde düşüş gözlemlenir ve bu durum hücrel savunma mekanizmalarının zayıflamasına yol açar (Sultana vd., 2013).

Bu çalışmada, A β ₄₂ toksisitesi oluşturulan hücrelerde serbest NAC ve NAC-B6-NP uygulamalarının GSH düzeylerine etkisi kolorimetrik yöntemle değerlendirilmiştir. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalara 2×10⁵ hücre/mL yoğunluğunda ekilmiş; 24 saat boyunca 10 µM A β ₄₂ ile inkübe edilerek toksisite oluşturulmuştur. Ardından 24 saat boyunca 10 mM serbest NAC ve 25 µg/mL NAC-B6-NP uygulanmıştır.

İnkübasyon sonrasında kültür medyumu uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkanarak kazıyıcı yardımıyla toplanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant atılmış ve hücre pelletleri kitin önerdiği tampon solüsyonda dondur-çöz yöntemi ile parçalanmıştır. Homojenat, 14000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüjlenmiş süpernatant analizi için kullanılmıştır. Total GSH (T-GSH) tayini kolorimetrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde GSH, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin miktarı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (Rahman vd., 2006). Ölçüm öncesinde farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmış ve 96 kuyucuklu mikropiplaklarda örneklerle birlikte reaktiflerle karıştırılarak inkübasyona alınmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden standart eğri oluşturulmuş ve örneklerin GSH miktarları bu eğriye göre hesaplanmıştır. Bu analiz, hücre içi redoks dengesinin korunmasına katkı sağlayan GSH seviyelerini ölçerek, NAC ve NAC-B6-NP'nin antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması açısından değerlendirilmiştir.

3.5.10. Sitokin seviyelerinin belirlenmesi

AH, sadece A β birikimi ve oksidatif stres ile değil, aynı zamanda nöronal inflamasyonun artışıyla da karakterizedir. IL-1 β , merkezi sinir sisteminde inflamatuvar sürecin önemli mediatörlerinden biridir ve A β ₄₂ birikimi sonrasında mikrogliyal aktivasyonla birlikte ekspresyon düzeyi artar. Bu artış, nöronal hasarı hızlandırarak hastalığın ilerleyişine katkı sağlar (King vd., 2019; Sapan vd., 2017). Benzer şekilde, IL-6 ve TNF- α da AH'de yükselen pro-inflamatuvar sitokinler arasında yer alır. IL-6, astrosit ve mikrogliyal aktivasyonun bir göstergesi olarak kabul edilirken, TNF- α ise apoptotik süreçlerin tetiklenmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle, IL-1 β ile birlikte IL-6 ve TNF- α düzeylerinin belirlenmesi, A β ₄₂ kaynaklı nöroinflamasyonun kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanır (Heneka vd., 2015).

Bu amaçla, A β ₄₂ toksisitesi ile indüklenen hücrelere 10 mM serbest NAC ve 25 µg/mL NAC-B6-NP uygulanmış, 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre kültürü medyumları toplanmıştır. Toplanan medyumlar 2000 g'de 20 dakika santrifüjlenerek süpernatantları analiz için ayrılmıştır. İnflamatuar yanıtın değerlendirilmesi için IL-1 β , IL-6 ve TNF- α sitokin düzeyleri, ticari olarak temin edilen ELISA kitleri kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir. Her bir sitokin için ayrı ayrı ELISA plakaları hazırlanarak örnekler ve kitin sağladığı standart çözeltiler, antikor kokteyli ile birlikte 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plakalar yıkama tamponları ile beş kez yıkanmış ve substrat solüsyonları eklenmiştir. 37°C'de 10 dakika karanlık inkübasyon sonrası reaksiyon durdurulmuş ve absorbans değerleri mikroparka okuyucuda 450 nm'de ölçülmüştür. Standart eğriler, her sitokin için bilinen konsantrasyonlara karşılık gelen OD değerleri üzerinden 4PL regresyon modeli ile oluşturulmuş ve örneklerdeki sitokin düzeyleri bu eğriler aracılığıyla hesaplanmıştır.

3.5.11. Nanopartiküllerin *in vivo* kan-beyin bariyeri geçişi

Geliştirilen nanopartikül sistemlerinin beyin hedefleme kapasitelerini değerlendirmek amacıyla, AH çalışmalarında yaygın olarak kullanılan 5XFAD transgenik fare modeli kullanılmıştır. The Jackson Laboratory (ABD)'den temin edilen bu fareler, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde uygun çevresel koşullar altında barındırılmıştır. Bu fare modeli, erken evrede A β birikimi, nöronal hasar ve bilişsel bozulma gibi AH patofizyolojisini taklit eden özellikleri nedeniyle seçilmiştir (Oakley vd., 2006; Oblak vd., 2020). Deneyler, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.12.2021 tarihli ve 2021/3-1 numaralı etik onayı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Deney kapsamında, intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yoluyla NAC-FITC-B6-NP formülasyonu 42 mg/kg olacak şekilde farelere uygulanmıştır. Uygulamadan 1 saat sonra hayvanlar kurban edilmiş, beyin dokuları çıkarılarak kuru buz üzerinde dondurulmuş ve -80 °C'de saklanmıştır. Dondurulmuş beyin dokularından kriyotom ile 40 µm kalınlığında koronal kesitler hazırlanarak lam üzerine alınmış, çalışma yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır. Nanopartikül dağılımının belirlenmesi amacıyla immünohistokimyasal boyama protokolü uygulanmıştır.

İmmünohistokimyasal analizler için kesitler dondurucudan çıkarıldıktan sonra 1X PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon işlemi, PBS içinde %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi ile 15 dakika süreyle oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve ardından kesitler, 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücre membranlarının geçirgenliğini sağlamak amacıyla kesitler, %0.3 Triton X-100 içeren PBS çözeltisi ile toplamda 15 dakika oda sıcaklığında shaker üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra, non-spesifik antikor bağlanmalarını engellemek amacıyla %5 keçi serumu içeren bloklama çözeltisi ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında, karanlık ve nemli ortamda bloklama işlemi uygulanmıştır. Bloklama sonrası, kesitler tavşan NeuN primer antikoruna ile +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kesitler %0.1 Triton X-100 içeren PBS ile yıkanmış ve keçi-anti-tavşan Alexa 647 sekonder antikor inkübasyonuna geçilmiştir. Bu işlem oda sıcaklığında, karanlık ortamda 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Sekonder antikor inkübasyonu takiben kesitler yeniden PBS ile üç kez yıkanmıştır.

Dokunun kapatılması amacıyla Fluoroshield-DAPI solüsyonu lam üzerine uygulanmış, lamel ile kapatılarak örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan kesitler floresan mikroskop ve konfokal mikroskopta değerlendirilmiştir. Görüntülemeler FITC (yeşil), DAPI (mavi) ve Cy5/647 nm (kırmızı) filtreleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve FITC işaretli nanopartiküllerin nöroanatomik dağılımı değerlendirilmiştir.

3.5.12. Verilerin Analizi

Tüm deneysel veriler GraphPad Prism 10.4.2 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. ELISA, oksidatif stres, antioksidan aktivite ve hücre canlılığı gibi kantitatif sonuçlarda gruplar arası farkların belirlenmesinde One-way ANOVA-Tukey yaklaşımı kullanılmıştır.

Doz-yanıt eğrilerinden IC₅₀ ve EC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında, 4PL non-lineer regresyon modeli uygulanmıştır. ELISA analizinde ise sitokin konsantrasyonlarının tayini için standart eğriler yine 4PL modeli ile oluşturulmuş, bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları bu eğriler üzerinden interpolasyon yöntemi ile hesaplanmıştır.

Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SS) şeklinde ifade edilmiş olup, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizlerde kullanılan istatistiksel test türü ve anlamlılık seviyeleri ilgili şekil açıklamalarında ayrıca belirtilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. NAC'ın analitik yönteminin geliştirilmesi ve validasyon bulguları

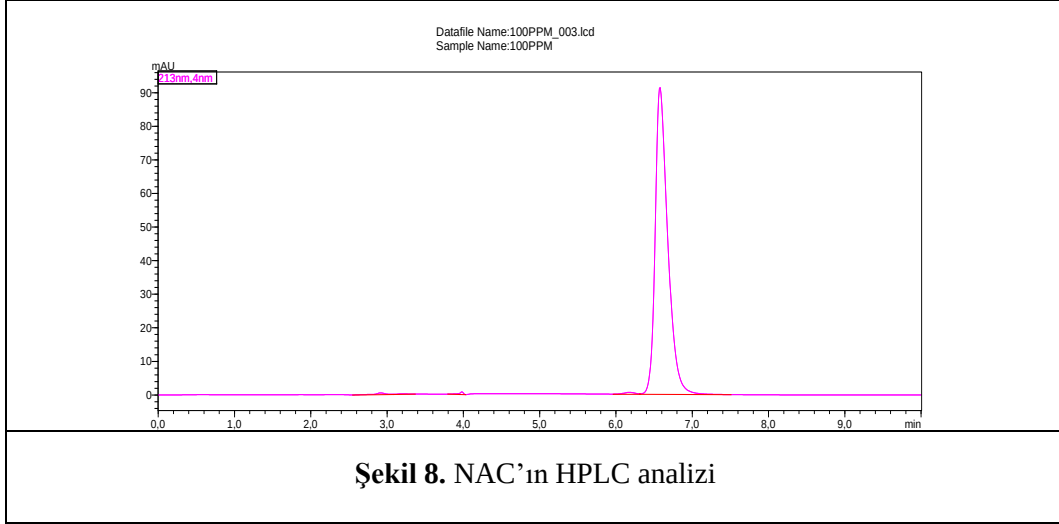
Bu çalışma kapsamında, NAC içeriğinin kantitatif olarak belirlenebilmesi için HPLC yöntemi optimize edilmiş ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Sistem uygunluk çalışması

Analitik yöntemin güvenilirliğini ve sistem performansını değerlendirmek amacıyla sistem uygunluk testi gerçekleştirilmiştir. Bu testte, 500 ppm konsantrasyona sahip NAC standart çözeltisi kullanılmıştır. Alıkonma süresi ve pik alanına ilişkin ölçümler 6 tekrar üzerinden yapılmış, ortalama değerler ile standart sapma (SS) ve bağıl standart sapma (%BSS) hesaplanmış (Tablo 2) ve kromatografik görüntüsü sunulmuştur (Şekil 8).

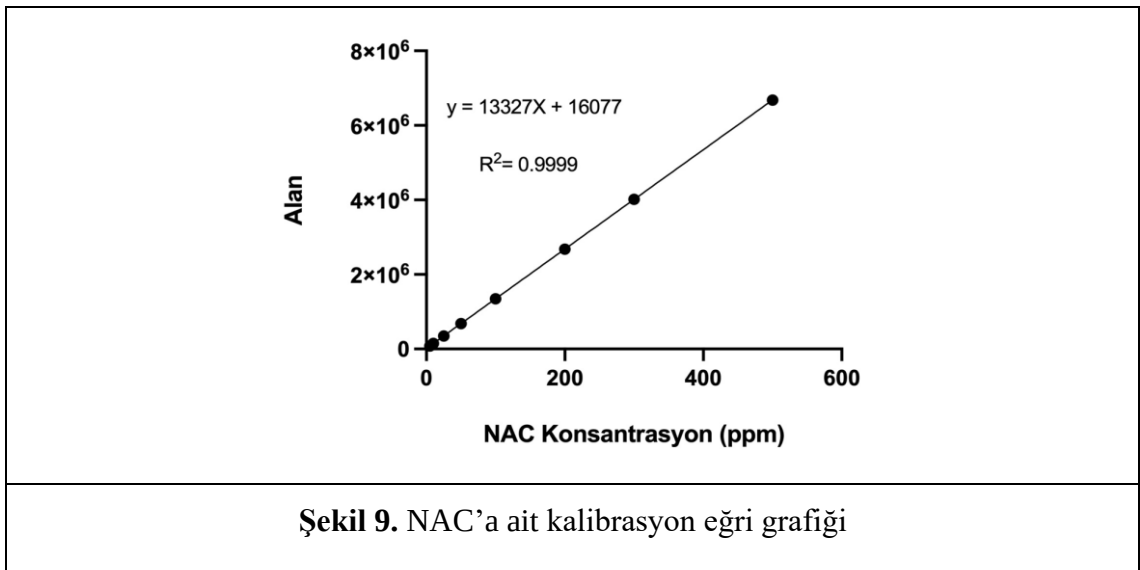
Tablo 2. NAC için sistem uygunluk testine ait kromatografik parametreler

Örnek Sayısı	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan
1	6,698	6639974
2	6,971	6620793
3	6,971	6626764
4	6,969	6644729
5	6,969	6604770
6	6,971	6639051
Ortalama	6,925	6629346,833
SS	0,111	15017,180
BSS (%)	1,605	0,227



4.1.2. Doğrusallık (Lineerlik) çalışması

NAC'a ait kantitatif analiz yöntemi için doğrusal aralık çalışması, 3.2.4'te açıklanan yöntem doğrultusunda belirli konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir. Belirlenen standart konsantrasyonlar ile oluşturulan kalibrasyon eğrisine ait grafik, doğrusal denklem parametreleri, korelasyon katsayı (R^2) değerleri Şekil 9'da sunulmuştur. Yüksek R^2 değeri, yöntemin doğrusal çalıştığını göstermektedir.



4.1.3. Doğruluk çalışması

NAC'a ait analitik yöntemin doğruluğu, üç farklı konsantrasyonda (50, 200 ve 500 ppm) % geri kazanım oranı üzerinden değerlendirilmiştir. Her bir konsantrasyon düzeyi için beş tekrar ölçüm yapılmış, ölçülen değerler ile teorik konsantrasyonlar karşılaştırılarak % geri kazanım hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda NAC için ortalama geri kazanım oranlarının %97,9 ile %101,3 arasında değiştiği görülmüş ve yöntemin doğruluk kriterlerini karşıladığı belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. NAC'ın üç farklı konsantrasyon seviyesinde ölçülen konsantrasyon ve % geri kazanım değerleri

Örnek Sayısı	Ölçülen Konsantrasyon			% Geri kazanım		
	50 ppm	200 ppm	500 ppm	50 ppm	200 ppm	500 ppm
1	50,373	198,830	495,016	100,746	99,415	99,003
2	50,625	199,167	491,414	101,250	99,583	98,283
3	50,663	200,403	491,807	101,327	100,202	98,361
4	50,246	198,448	495,410	100,492	99,224	99,082
5	50,608	198,994	489,628	101,216	99,497	97,926
Ortalama	50,503	199,168	492,655	101,006	99,584	98,531
SS	0,184	0,740	2,479	0,367	0,370	0,496
% BSS	0,363	0,371	0,503	0,363	0,371	0,503

4.1.4. Kesinlik çalışması

NAC için geliştirilen HPLC yönteminin kesinliği, tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik analizleri ile değerlendirilmiştir.

Tekrar Edilebilirlik:

Aynı gün içinde 50 ppm konsantrasyonunda yapılan 10 tekrar ölçüm sonucunda elde edilen veriler Tablo 4'te sunulmuştur. Ortalama ölçülen konsantrasyon değeri 50,48 ppm olarak belirlenmiş, SS değeri 0,147 ve %BSS ise 0,29 olarak hesaplanmıştır. Bu düşük varyasyon değerleri, yöntemin kısa süreli ölçüm tekrarı açısından oldukça güvenilir olduğunu göstermektedir.

Tekrar Elde Edilebilirlik:

Farklı analistler tarafından aynı yöntemle, 100 ppm konsantrasyon düzeyinde yapılan ölçümler Tablo 5'te gösterilmiştir. Her iki analistin yaptığı 10'ar tekrar sonucunda ortalama ölçüm değerleri sırasıyla 101,967 ppm ve 102,074 ppm olarak hesaplanmıştır. SS değerleri sırasıyla 0,106 ve 0,142; %BSS ise %0,104 ve %0,139'dur. Bu bulgular, yöntemin farklı günlerde ve farklı kullanıcılar tarafından tekrarlandığında da güvenilir sonuçlar verdiğini ve yüksek kesinlik sağladığını ortaya koymaktadır.

Tablo 4. NAC'a (50 ppm) ait tekrar edilebilirlik çalışmasına ilişkin ölçüm sonuçları.

	1.Gün	2.Gün
Örnek Sayısı	50 ppm	50 ppm
1	50,570	50,550
2	50,208	49,846
3	50,472	50,193
4	50,729	50,207
5	50,551	50,520
6	50,308	49,809
7	50,402	50,186
8	50,482	50,174
9	50,483	50,518
10	50,571	49,835
Ortalama	50,478	50,550
SS	0,147	0,550
% BSS	0,290	0,274

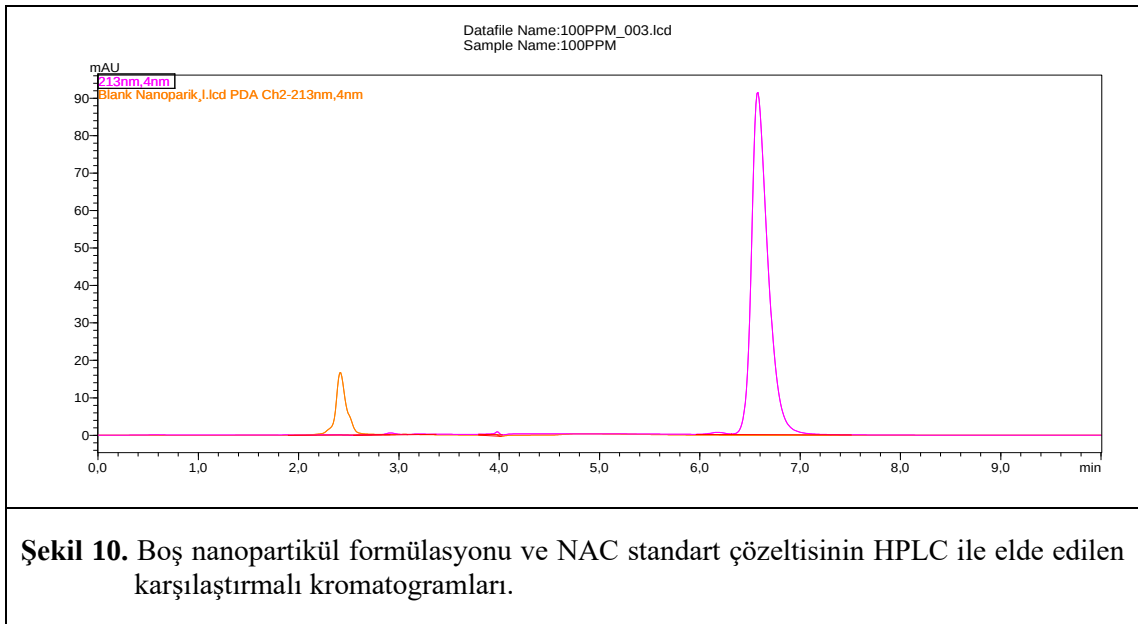
Tablo 5. NAC’a (100 ppm) ait tekrar elde edilebilirlik çalışmasına ilişkin iki farklı analist tarafından yapılan ölçüm sonuçları.

	1.Analist	2.Analist
Örnek Sayısı	100 ppm	100 ppm
1	101,960	102,034
2	101,967	102,125
3	101,973	102,035
4	102,224	102,086
5	101,885	101,791
6	102,061	101,983
7	101,897	102,030
8	101,873	102,125
9	101,909	102,328
10	101,915	102,208
Ortalama	101,967	102,074
SS	0,106	0,142
% BSS	0,104	0,139

4.1.5. Özgünlük ve seçicilik çalışması

Analitik yöntemin özgünlük ve seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, NAC içermeyen boş nanopartikül formülasyonları Bölüm 3.2.7’de açıklanan protokol doğrultusunda analiz edilmiştir. Bu analizde boş nanopartikül örneklerinin kromatografik profilleri ile NAC standart çözeltisine ait kromatogram karşılaştırılmış ve NAC piki ile herhangi bir girişim (interferans) olup olmadığı incelenmiştir.

Analiz sonucunda, boş nanopartikül formülasyonunun NAC’a ait alıkonma süresine (yaklaşık 6.9 dakika) karşılık gelen bölgede herhangi bir pik üretmediği gözlenmiştir. Bu durum, yöntemin spesifik olduğunu ve NAC analizi sırasında formülasyondaki diğer bileşenlerin girişim oluşturmadığını göstermektedir. Karşılaştırmalı kromatografik görüntü Şekil 10’da sunulmuştur.



4.1.6. Teşhis Sınırı ve Miktar Tayini Limiti

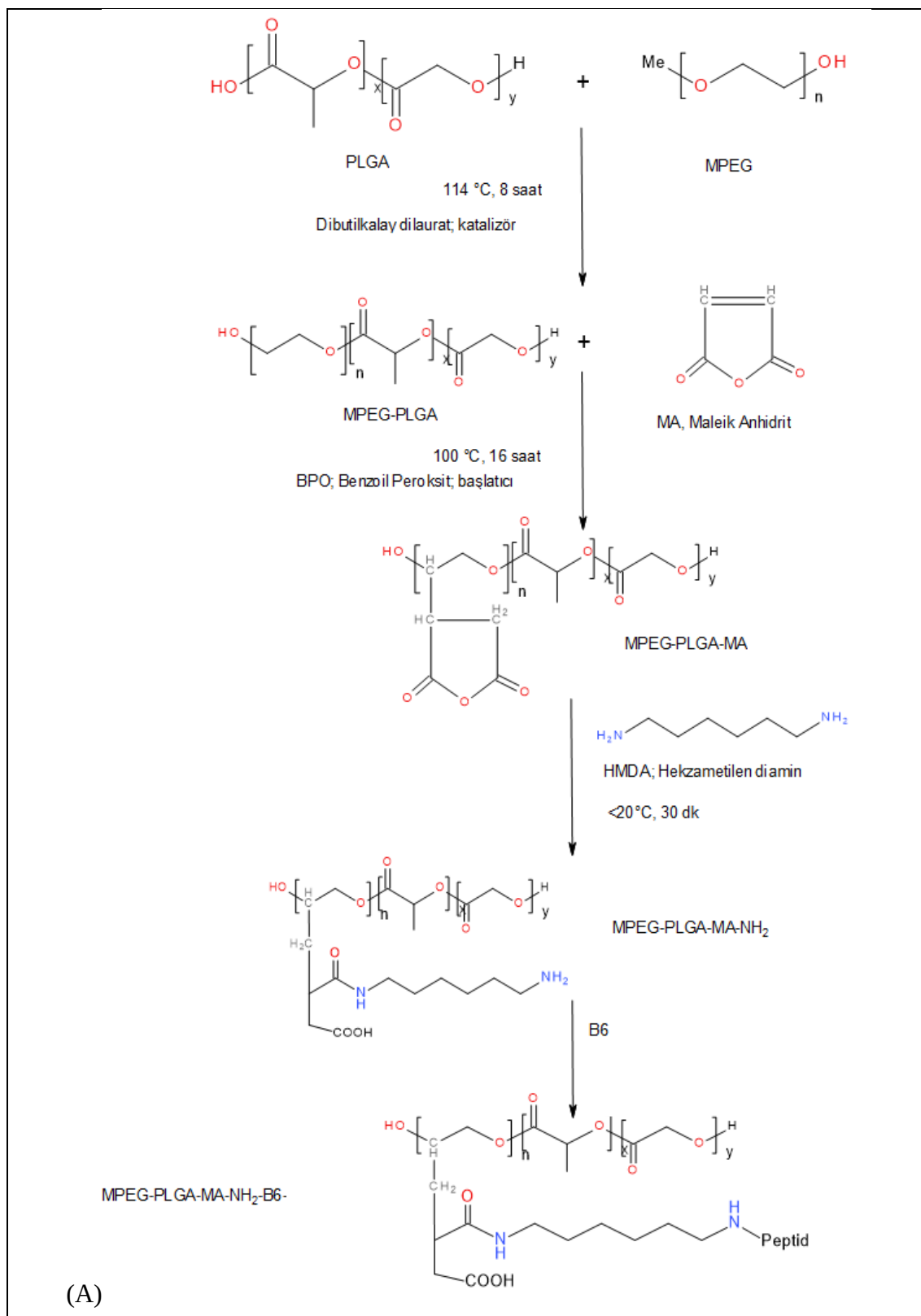
Analitik yöntemin duyarlılığını değerlendirmek amacıyla, teşhis sınırı (LOD) ve miktar tayini limiti (LOQ) hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar, Bölüm 3.2.8'de açıklanan yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; LOD=0,015 µg/mL, LOQ=0,046 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

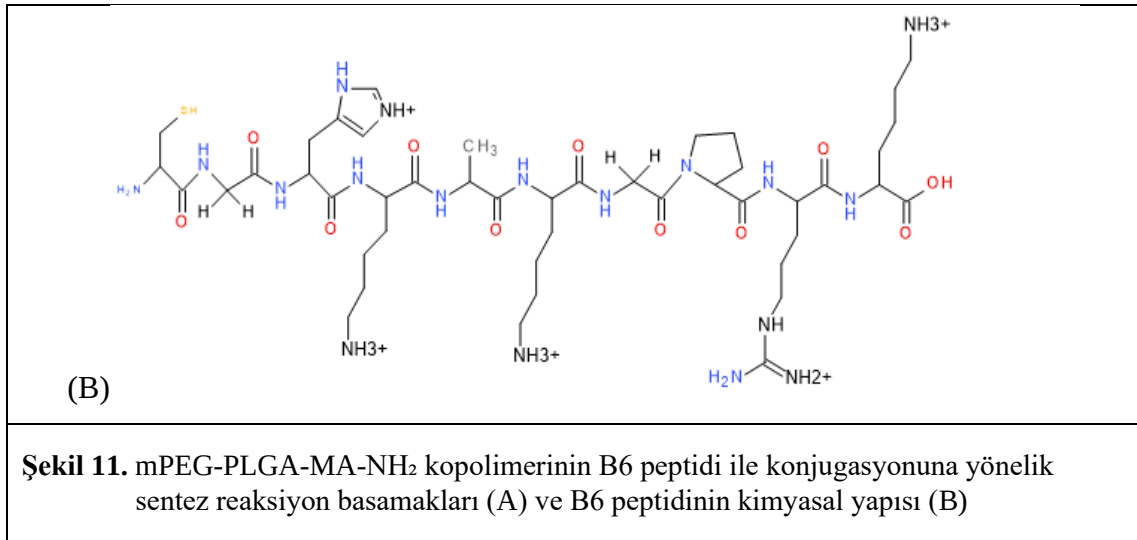
Bu değerler, geliştirilen HPLC yönteminin oldukça düşük konsantrasyonlarda bile NAC'ı güvenilir şekilde saptayabildiğini ve kantitatif analiz için yeterli duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

4.2. Sentezlenen polimerlerin yapısal karakterizasyon bulguları

Bu çalışmada, ilaç taşıma sisteminin kontrollü salım özelliklerini artırmak amacıyla PLGA (50:50) polimeri tercih edilmiştir. Polimerin biyoyumluluğunu ve dolaşım süresini artırmak amacıyla, hidrofilik özellik kazandıran metoksi uçlu polietilen glikol (mPEG 2000) ile modifikasyon gerçekleştirilmiştir. Sentez işlemleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde yürütülmüştür.

İlk aşamada mPEG-PLGA kopolimeri sentezlenmiş, ardından peptid konjugasyonuna olanak sağlamak amacıyla, polimerin amin gruplarını (NH₂) hedefleyen bir maleatlama reaksiyonu uygulanmıştır. Bu işlemde, biyoyumlu ve yüksek reaktiviteye sahip maleik anhidrit (MA) ile modifikasyon yapılmış ve mPEG-PLGA-MA ara ürünü elde edilmiştir. Bu tür modifikasyonlar, mPEG-PLGA yapısına reaktif iki ayrı bağ kazandırarak peptit, ilaç ya da floresan etiket gibi ajanların konjugasyonuna imkan tanır. Daha sonra heksateliendiamin (HMDA) ile reaksiyona sokularak terminal amin gruplarının oluşturulması sağlanmış, böylece peptid bağlanması için uygun hale getirilmiş mPEG-PLGA-MA-NH₂ yapısı elde edilmiştir. Tüm ürünler vakum altında dondurularak liyofilize edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır. Reaksiyon süreci (Şekil 11A), B6 peptidiyle (Şekil 11B) konjugasyon mekanizması ve sentez adımları gösterilmiştir.





Polimerlerin yapısal karakterizasyonu için FT-IR, ¹H-NMR ve GPC/SEC yöntemleri kullanılmıştır.

4.2.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi

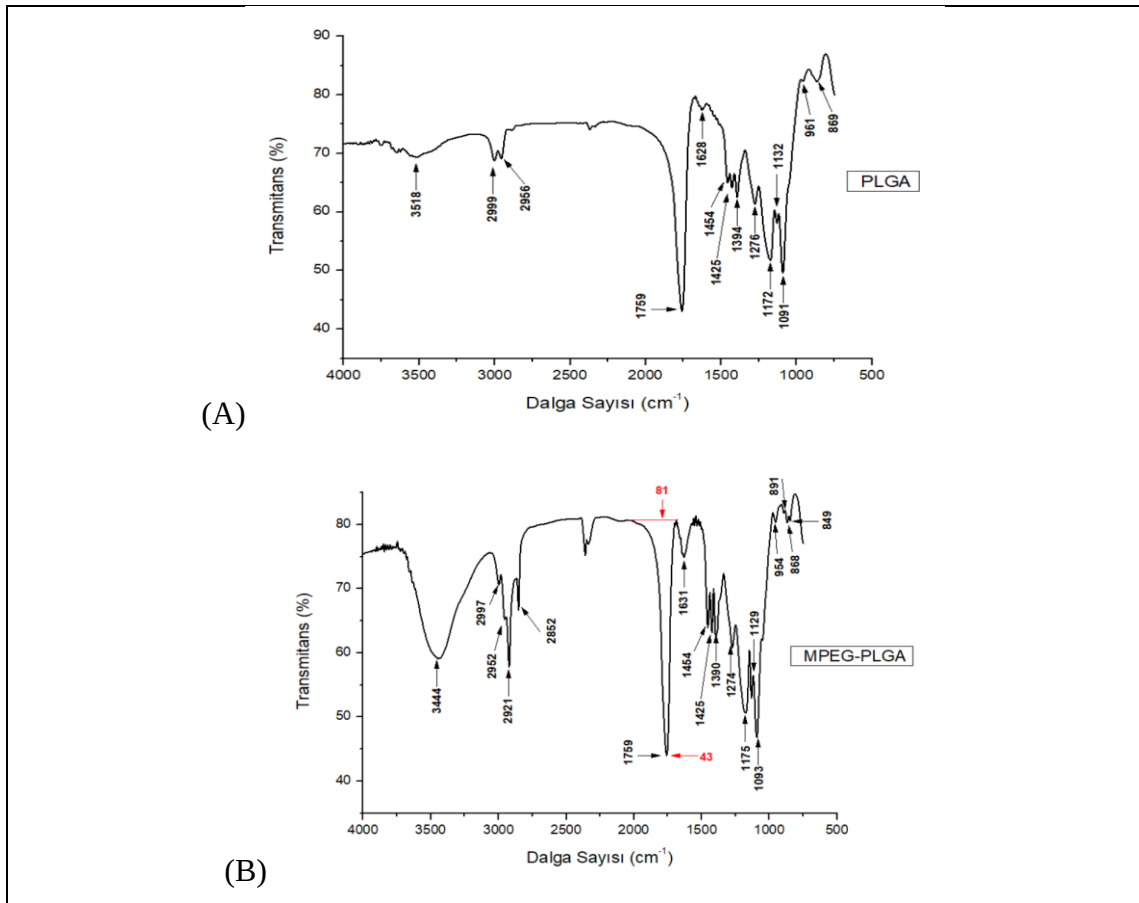
FT-IR analizi sonuçları (Şekil 12, Tablo 6) sentezlenen polimerlerin her bir modifikasyon aşamasında yapısal farklılıkları doğrulayacak karakteristik piklerin gözlemlendiğini ortaya koymuştur. PLGA yapısına ait temel karakteristik piklerden biri olan 1759 cm⁻¹ ester karbonil (C=O) gerilme titreşimine karşılık gelmiş ve yapının korunmuş olduğunu göstermiştir. Ayrıca 2999–2956 cm⁻¹ aralığında gözlenen CH, CH₂ ve CH₃ gruplarına ait metil/metilen titreşimleri PLGA zincir yapısını desteklemiştir (Şekil 12A).

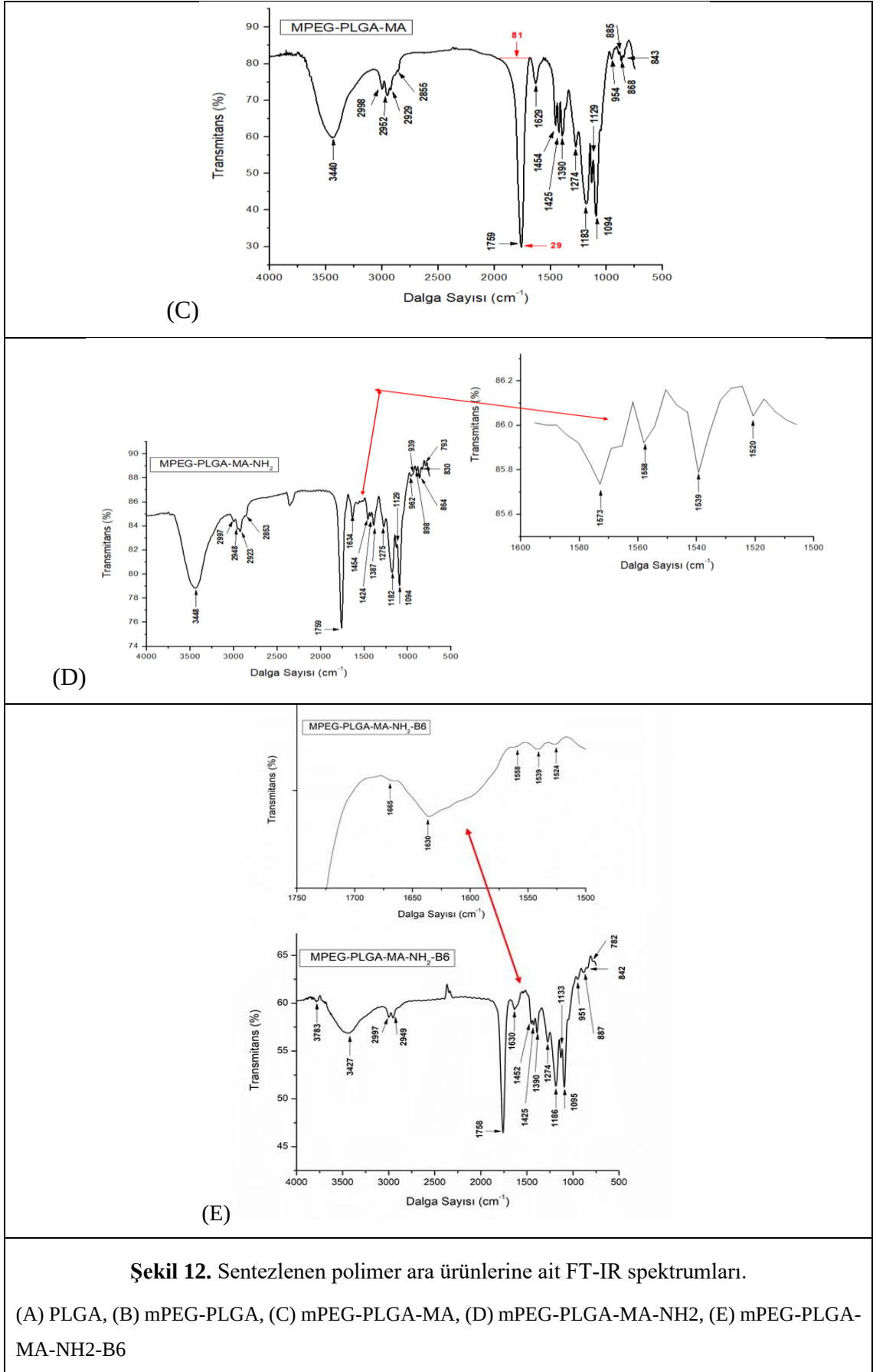
mPEG modifikasyonu sonrası, 3440–3450 cm⁻¹ civarında serbest –OH gruplarına ait daha belirgin bir pik ortaya çıkmış; bununla birlikte PEG yapısına ait CH₂–O–CH₂ bağlarının karakteristik sinyalleri 1190–1060 cm⁻¹ aralığında gözlemlenmiştir (Şekil 12B). Maleik anhidrit ile modifikasyon sonucunda 2929–2855 cm⁻¹ aralığında CH₂ gerilme titreşimlerinin genişlediği, ayrıca 1628 cm⁻¹ civarında yeni karbonil piklerinin oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 12C). Bu bulgular, başarılı maleatlama reaksiyonuna işaret etmektedir.

NH₂ gruplarının yapıya dahil edilmesi ile birlikte, 3448 cm⁻¹ civarında daha keskin bir OH/NH₂ sinyali ve 1570–1515 cm⁻¹ aralığında N–H deformasyonları ve C–N gerilme

titreşimlerinden oluşan Amid II bandı ortaya çıkmıştır (Şekil 12D). Bu değişimler, terminal amin gruplarının senteze başarıyla entegre edildiğini göstermektedir. Elde edilen fonksiyonel yapı, B6 peptidinin kovalent olarak bağlanmasına uygun bir yüzey sunmuştur.

Son olarak B6 peptidinin polimere konjugasyonu sonrasında, yapıya özgü olarak 3783 cm^{-1} , 2997 cm^{-1} ve 951 cm^{-1} gibi bölgelerde yeni titreşimlerin ortaya çıkması, peptid içindeki aminoasitlerin (örn. Lisin, Histidin, Sistein) yapıya dahil olduğunu göstermiştir. Özellikle 1558 cm^{-1} 'de gözlenen geniş ve güçlü Amide II bandı, peptid içindeki amid bağlarının başarılı şekilde polimerle kovalent bağ oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 12E). Bu bulgular, sentezlenen yapıların her bir basamağının FT-IR ile etkin biçimde izlenebildiğini ve karakterizasyonun başarıyla tamamlandığını kanıtlamaktadır.





Tablo 6. Sentezlenen polimerlerin FT-IR spektrumlarında gözlenen karakteristik piklerin karşılaştırılması

Dalga sayısı cm⁻¹	Açıklama	PLGA	MPEG-PLGA	MPEG-PLGA-MA	MPEG-PLGA-MA-NH₂	MPEG-PLGA-MA-NH₂-B6
3783	Peptid yapısındaki aminoasitlere ait -NH ve -OH gruplarının gerilmeleri	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	3783
3600-3200	Serbest veya bağlı (moleküller arası) OH gruplarının gerilme titreşimleri	Maks 3518	Maks 3444	Maks 3440 Daha geniş bir pik olarak görülür.	Max 3448 Yapıya katılan NH ₂ gruplarının simetrik ve asimetrik titreşimleri dolayısıyla daha keskin pik olarak görülür.	Maks 3427 PLGA-PEG-MA-NH ₂ yapısında yer alan primer gruplarının Peptid yapısında yer alan COOH grupları ile reaksiyonu neticesinde pik boyunda kısılma ve daralma görülür.
2997	Peptid yapısında yer alan Lizin aminoasitindeki yapısında bulunan NH ₃ ⁺ gruplarına ait asimetrik gerilme titreşimi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	2997
3000 – 2800	CH, CH ₃ ve CH ₂ gruplarının gerilme titreşimleri	Maks 2999 Maks 2956	Maks 2997 Maks 2952	Maks 2998 Maks 2952	Maks 2997 Maks 2948	Maks 2949 Peptit yapısında bulunan Histidin, prolin amino asitlerinde yer alan

						aromatik halka yapılarda yer alan -CH ₂ gruplarına ait gerilme titreşimleri ile girişimli olarak bulunur.
3000 – 2800	Metoksi gruplarında yer alan CH ₃ ve MPEG yapısında yer alan CH ₂ fonksiyonel gruplardan ileri gelen gerilme titreşimi	Gözlenmedi	Maks 2921 Maks 2852	Maks 2929 Maks 2855	Maks 2923 Maks 2853	
1759	Ester karbonil (C=O) gruplarına ait gerilme titreşimi	Var	Var	Var MA üzerindeki C=O bağlarından ileri gelen piklerin katkısı ile oluşan daha keskin ve daha geniş pik alanı oluşur.	Var	Var
1570-1515	N-H deformasyonu ve C-N gerilme titreşimlerinin birleşimi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Maks 1573 Maks 1558 Maks 1539 Maks 1520	Maks 1558 Maks 1539 Maks 1524 Peptid yapısında bulunan Amide II bandına ait NH gruplarından ileri gelen

						1558 cm-1 deki pik geniş şeklinde ortaya çıkar.
1500-1350	CO bağının bükülme titreşimleri	Maks 1454 Maks 1425 Maks 1394	Maks 1454 Maks 1425 Maks 1390 Daha keskin pikler oluşur	Maks 1454 Maks 1425 Maks 1390	Maks 1454 Maks 1424 Maks 1387	Maks 1452 Maks 1425 Maks 1390
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 1183 Maks 1129 Maks 1094	Maks 1182 Maks 1129 Maks 1094	Maks 1186 Maks 1095
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 954 Maks 885 Maks 868 Maks 843	Maks 962 Maks 898 Maks 830	Gözlenmedi

950-900	Peptid yapısına ait karboksilik asid OH- gruplarının düzlem dışı asimetrik deformasyon titreşimi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Maks 951
950-700	NH düzlem dışı bükülme titreşimi, CH ₂ bükülme titreşimi (CH ₂ ≥ 6 düzlem içi bükülme titreşimi)	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Maks 940 Maks 830	Maks 887
860-750	Sistein aminoasitindeki C-S gerilme titreşimleri	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Gözlenmedi	Maks 782

4.2.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

^1H -NMR analizleri, her bir modifikasyon adımının yapısal doğrulamasını desteklemiş ve sentezlenen polimerlerin kimyasal yapılarındaki değişiklikleri net biçimde ortaya koymuştur (Şekil 13).

PLGA: $\delta = 1.59$ (tt, $-\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{O}$), $\delta = 4.83$ (s, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$), $\delta = 5.21$ (m, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{O}$)

mPEG-PLGA: $\delta = 1.58$ (dp, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{O}$), $\delta = 3.65$ (s, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$), $\delta = 4.71$ (dd, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), $\delta = 4.81$ (m, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), $\delta = 5.17$ (d, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$), $\delta = 5.23$ (dq, $\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$)

PLGA için 5.21 ppm'de (m) CH protonuna, 4.83 ppm'de (s) $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ ve 1.59 ppm'de (tt) $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{O}$ protonlarına ait karakteristik sinyaller gözlenmiştir (Şekil 13A). mPEG modifikasyonu ile birlikte spektruma 3.65 ppm'de (s) $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ sinyali ve 4.71–5.23 ppm aralığında çoklu CH_2-O ve $\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3$ sinyalleri eklenmiştir (Şekil 13B). Bu bölgelerdeki yeni sinyaller PEG segmentlerinin polimer yapısına başarıyla dahil edildiğini göstermektedir.

MPEG-PLGA-MA-NH₂: $\delta = 1.21$ (t, $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), $\delta = 1.27$ (d, $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}$), $\delta = 1.58$ (dp, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{O}$, $\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}$, $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}$), $\delta = 3.49$ (q, $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$; $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}$; $\text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}$), $\delta = 3.65$ (s, $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{HN}$), $\delta = 4.74$ (m, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH}$), $\delta = 4.84$ (m, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH}$; $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{OH}$; $\text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}$), $\delta = 5.22$ (dddt, $\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3$; $\text{H}_2\text{C}-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$)

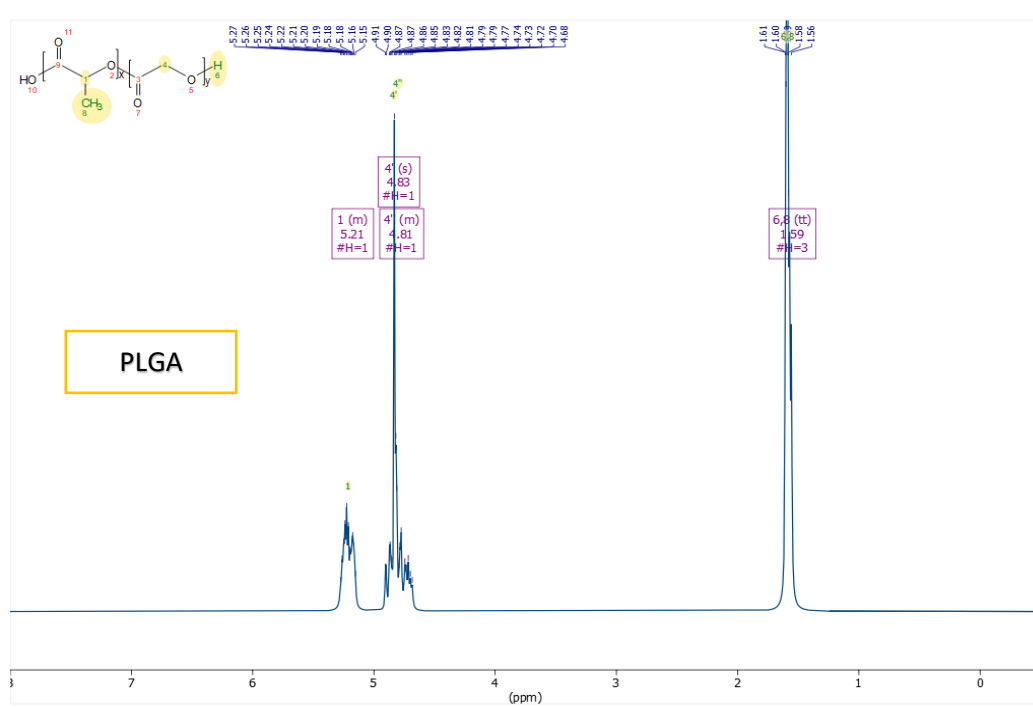
MA ile yapılan modifikasyonun ardından, 3.49 ppm (q), 3.65 ppm (s) ve 4.74–5.22 ppm (m) aralığında HMDA'dan kaynaklanan CH_2-NH_2 ve $\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2$ protonları gözlenmiş; ayrıca 1.21–1.58 ppm aralığında MA'nın alifatik zincir yapısından ileri gelen sinyaller belirginleşmiştir (Şekil 13C).

MPEG-PLGA-MA-NH₂-B6: $\delta = 0.85$ (s, H₃C-CH₂-CH₂), $\delta = 1.27$ (d, H₂C-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂; H₃C-CH₂-CH₂), $\delta = 1.51$ (dd, H₂C-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₃), $\delta = 1.59$ (ddd, H₂C-CH₂-CH₂-NH; H₂C-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂; O-NH-CH₂-CH₂; H₂C-CH-CH₂-CH₂; H₃C-CH-C=O; HS-CH₂-CH-NH₂; H₂C-CH₂-CH-C=O; N-CH₂-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH-C=O; H₂C-CH₂-CH₂-CH; H₃C-CH₂-CH₂-CH₂; HC-CH₂-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂-C; H₂C-CH₂-CH₂-C-NH₂; H₂C-CH-C=NH; HC-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂-CH₃; H₃C-CH-C=O; HC-CH₂-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂; H₂C-CH₂-CH₂-CH₃), $\delta = 3.49$ (q, H₂C-CH-C=O; HO-C-CH₂-CH; H₂C-CH₂-NH-C=O; HO-CH-CH₂-O; O=C-NH-CH-C=O; H₂N-CH-CH₂-SH; O=C-N-CH₂-CH₂; O=C-NH-CH-C=O), $\delta = 3.65$ (s, H₂C-CH₂-NH; HO-CH-CH₂-O; HN-CH-C=O), $\delta = 3.75$ (d, HN-C-CH₂-CH), $\delta = 4.82$ (m, HO-CH-C=O; O-CH-C=O; HO-CH₂-C=O; O=C-NH-CH₂; O=C-NH-CH₂; O=C-NH-CH-CH₂; H₃C-CH-C=O; H₂C-C=O), $\delta = 4.90$ (d, O=C-NH-CH₂), $\delta = 5.22$ (ddt, H₂N-NH-C=O; O=C-O-NH-CH₂; H₂N-CH-CH₂-SH; O=C-NH-CH₂; O=C-NH-CH; O=C-NH-CH; O=C-NH-CH; O=C-NH-CH₂; O=C-NH-CH; O=C-NH-CH; H₂N-C-CH₂; HN=C-CH₂)

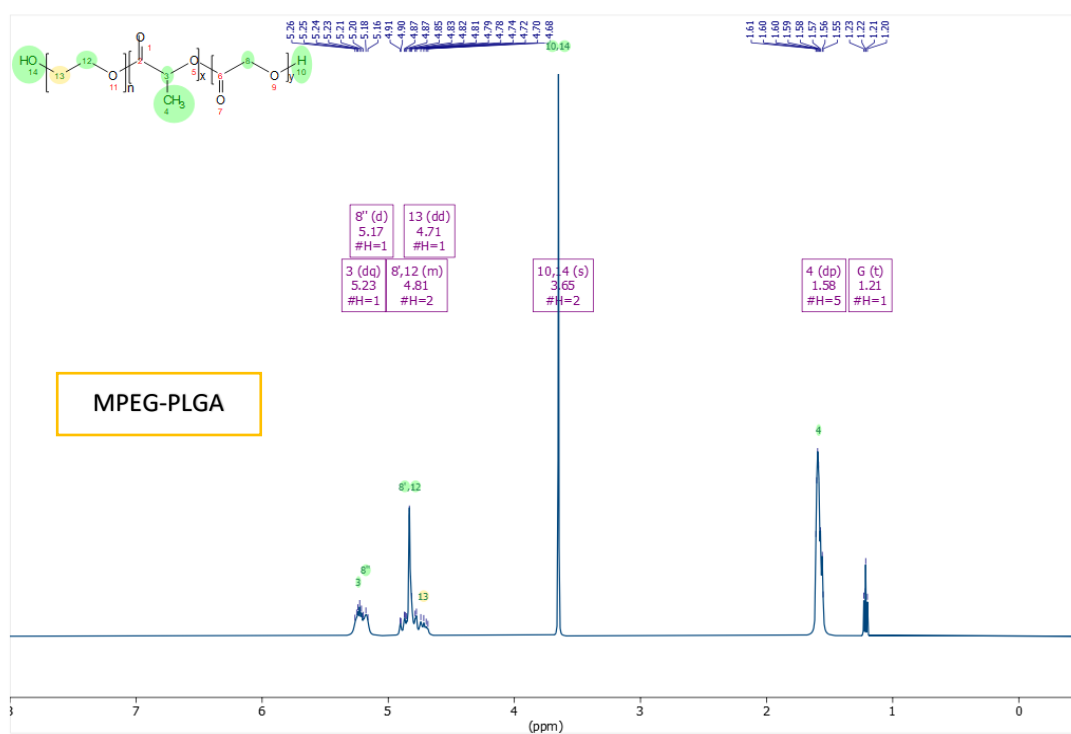
B6 peptidinin polimere konjugasyonu sonrası, $\delta = 0.85, 1.27, 1.59, 3.49, 3.65, 3.75, 4.82, 4.90$ ve 5.22 ppm bölgelerinde peptid yapısındaki aminoasitlere (ör. Lisin, Histidin, Sistein) ait çok sayıda alifatik ve amid proton sinyali tespit edilmiştir (Şekil 13D). Özellikle $4.82\text{--}5.22$ ppm aralığında gözlenen çoklu sinyaller, amid bağlarının ve peptid omurgasının polimerle başarılı şekilde konjuge olduğunu desteklemektedir.

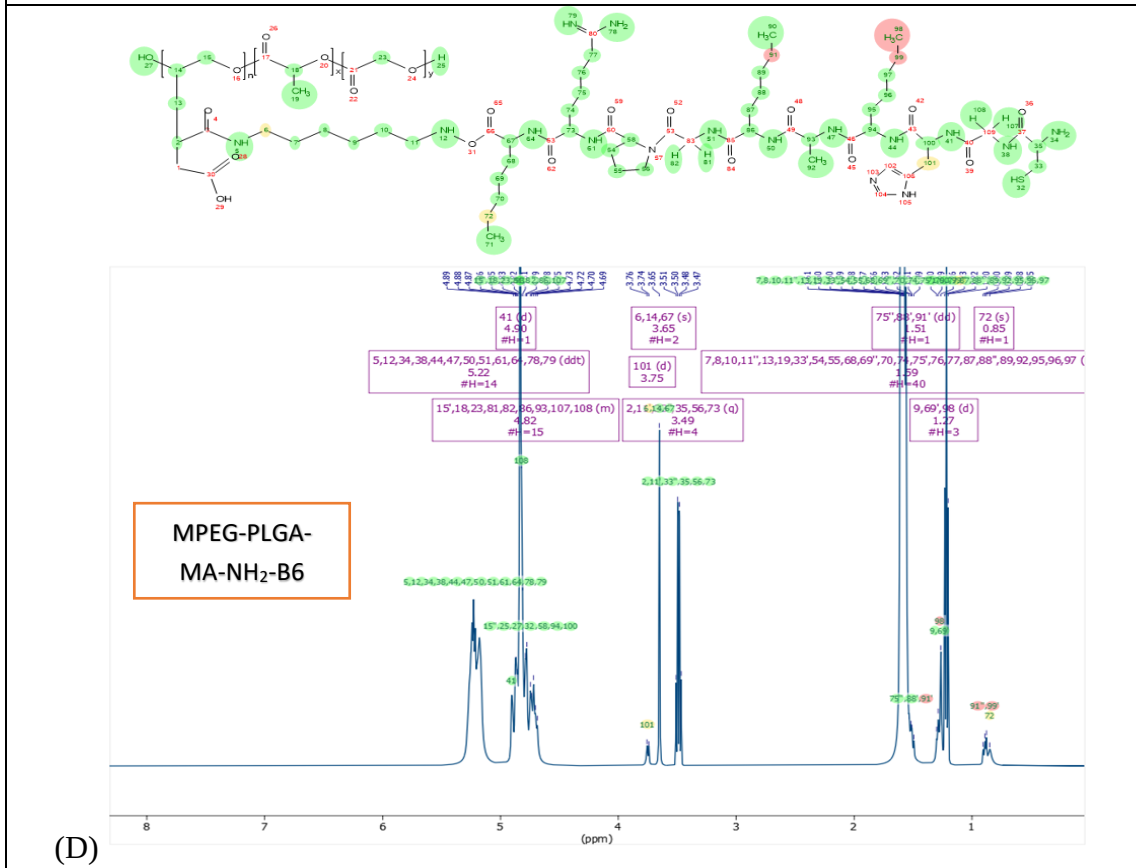
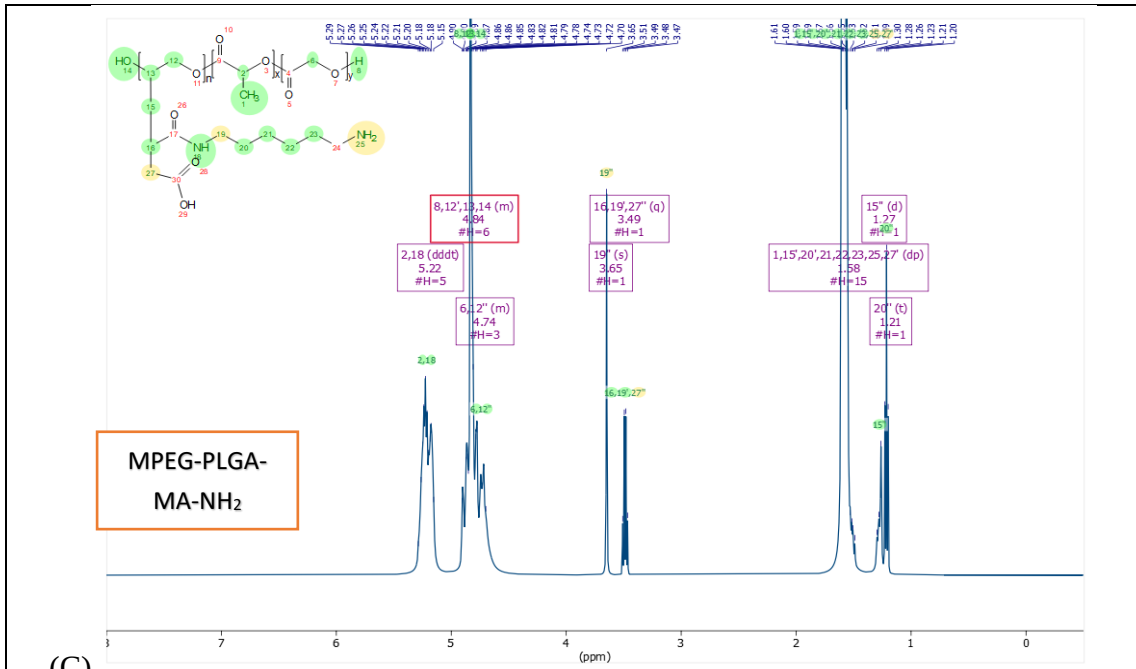
Bu spektral veriler, her bir yapının sentez aşamasının tamamlandığını ve hedeflenen fonksiyonel grupların yapıya başarıyla dahil edildiğini göstermektedir.

(A)



(B)





Şekil 13. Sentezlenen polimer yapılarının ¹H-NMR spektrumları.

(A) PLGA, (B) mPEG-PLGA, (C)) mPEG-PLGA-MA-NH₂, (D) mPEG-PLGA- MA-NH₂-B6

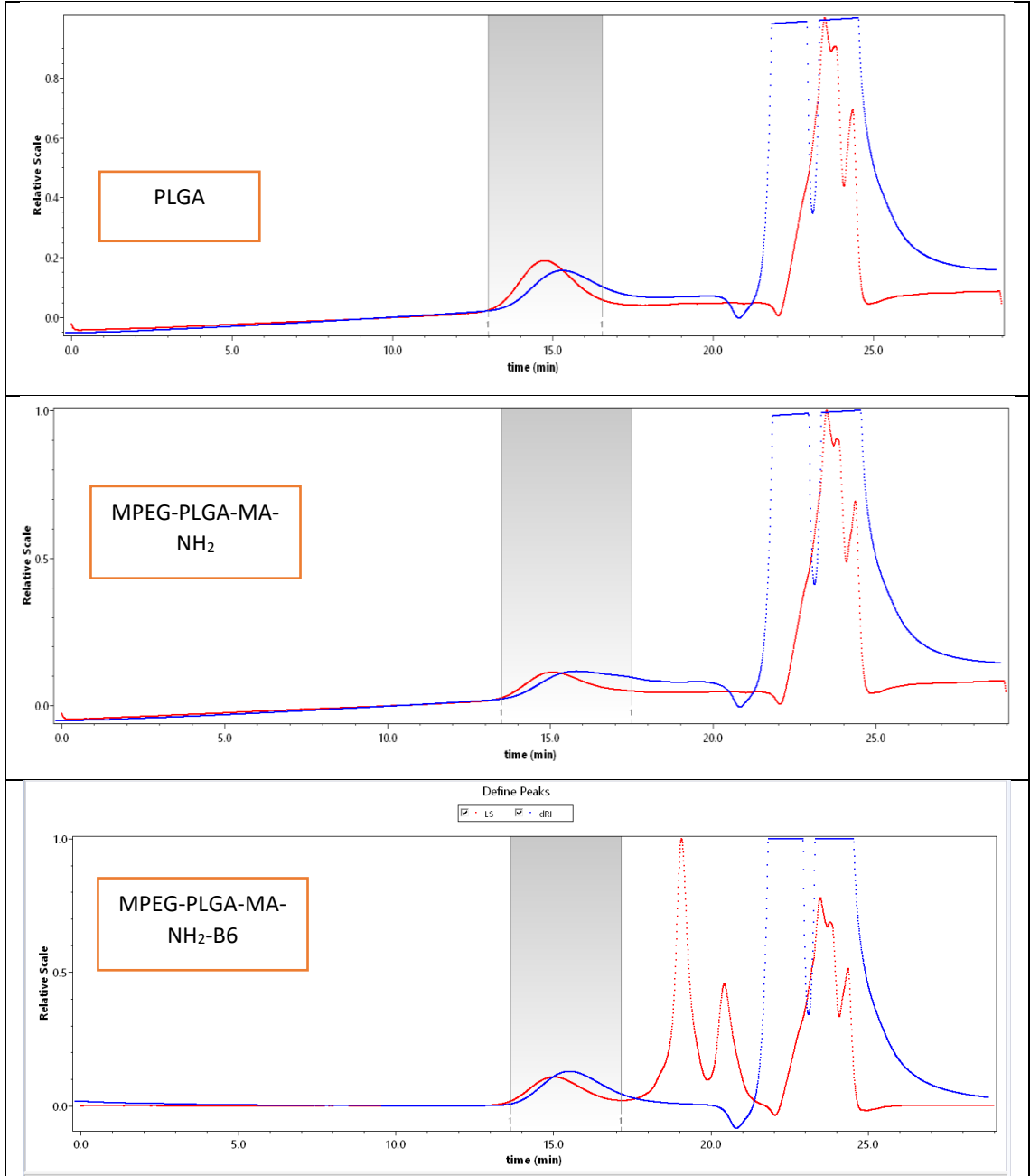
4.2.3. Jel Geçirgenlik Kromatografisi / Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi

Polimerlerin moleküler ağırlık dağılımları GPC yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 14, Tablo 7). PLGA'nın Mn ve Mw değerleri sırasıyla 8.9 kDa ve 10.6 kDa olarak belirlenmiş, 1.18'lik polidispersite indeksi, dar ancak doğal bir dağılıma sahip olduğunu göstermiştir. mPEG ve MA modifikasyonu ile elde edilen mPEG-PLGA-MA-NH₂ yapısında Mn değeri 8.2 kDa'ya düşmüş, Mw ise 8.4 kDa olarak ölçülmüş; bu durumda polidispersite indeksi 1.021 ile oldukça düşük ve tekdüze bir dağılım göstermiştir.

B6 peptidi ile konjugasyon sonrasında ise Mn 8.47 kDa, Mw 10.39 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu durum, polimer zincirine eklenen B6 yapısının moleküler ağırlığı artırdığını ve 1.227'lik PDI değeri ile polimer yapısında hafif bir genişleme olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, polimer modifikasyonlarının kontrollü şekilde gerçekleştiğini ve istenilen moleküler özelliklerin elde edildiğini göstermektedir.

Tablo 7. Polimerlere ait GPC analiz sonuçları

	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Polydispersity (Mw/Mn)
PLGA	8.9	10.6	1.18
mPEG-PLGA-MA-NH₂	8.2	8.4	1.021
mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6	8.469	10.39	1.227



Şekil 14. Sentezlenen polimerlere ait GPC kromatogramları.

(A) PLGA, (B) mPEG-PLGA, (C) mPEG-PLGA-MA, (D) mPEG-PLGA-MA-NH₂, (E) mPEG-PLGA-MA-NH₂-B6

Polimerlerin moleküler ağırlık dağılımları GPC/SEC sistemi ile analiz edilmiş; kırmızı ve mavi çizgiler, örneklerin farklı dedektör sinyallerine (RI/UV) karşılık gelen elüsyon profillerini temsil etmektedir.

4.3. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması, optimizasyonu ve karakterizasyonuna ait bulgular

Çalışmada elde edilen nanopartikül sistemlerinin hazırlık aşamaları ve bu sistemlerin karakterizasyonuna yönelik yapılan ölçümler, aşağıdaki alt başlıklarda detaylı olarak açıklanmıştır.

4.3.1. NAC yüklü nanopartikül formülasyonunun hazırlanması ve optimizasyonu

Nanopartikül formülasyonları, Bölüm 3.4'te belirtildiği üzere nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Nihai nanopartikül formülasyonunun elde edilmesi amacıyla, mPEG-PLGA-MA-NH₂ polimeri ile NAC farklı oranlarda birleştirilerek nanoçöktürme tekniğiyle çeşitli ön formülasyonlar hazırlanmıştır. Kullanılan polimer:ilaç oranları sırasıyla 50:20, 40:20 ve 25:20 (a/a) şeklindedir. Hazırlanan formülasyonlar santrifüj edilerek pelletler elde edilmiş ve distile su içinde disperse edilmiştir. Ancak, ideal partikül boyutu kriteri olan <200 nm değerine ulaşamamıştır. Bu nedenle, formülasyon süreci buz üzerinde, soğuk ortam koşullarında yeniden optimize edilmiştir. Her formülasyon adımı pH ölçümleri yapılmış ve başlangıçta pH=3 olan ortamın formülasyona bağlı olarak pH=4.6'ya kadar yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda en uygun formülasyon oranı mPEG-PLGA-MA-NH₂:NAC = 25:20 olarak belirlenmiştir.

Seçilen bu optimum orana sahip nanopartiküller, daha sonra B6 peptidi ile konjuge edilmiştir. Ancak bu konjugasyon aşamasında, nanopartikül süspansiyonunun pH değeri 4.8 olarak ölçülmüş ve bu pH düzeyinin peptid stabilitesi açısından elverişli olmadığı değerlendirilmiştir. Bu nedenle, ortam pH'ı 0.1 M NaOH çözeltisi ile kontrollü şekilde yükseltilmiş ve kademeli olarak pH 6.8 seviyesine ayarlanmıştır.

Her pH artış basamağında, PB, PDI ve ZP ölçülerek formülasyonun fiziksel stabilitesi değerlendirilmiştir. Son olarak, pH 6.8'de nihai formülasyonun % enkapsülasyon verimi hesaplanmış ve detaylı sonuçlar aşağıdaki alt başlıklarda sunulmuştur.

4.3.2. Nanopartiküllerin boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi

Nanopartiküllerin fiziksel karakterizasyonu, PB, PDI ve ZP ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, nanopartikül pelletlerinin distile suda redispersi sonrasında, DLS yöntemiyle Zetasizer (Malvern) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

İlk aşamada, farklı mPEG-PLGA-MA-NH₂:NAC oranlarında (50:20, 40:20 ve 25:20) formülasyonlar hazırlanarak karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Bu oranlarla hazırlanan örneklerden organik çözücünün uzaklaştırılması (evaporasyon) ve santrifüj sonrası DLS ölçüm sonuçları Tablo 8'de sunulmuştur. Ancak, özellikle evaporasyon sonrası partikül boyutlarının istenen sınırın (200 nm) üzerinde olması ve santrifüj sonrası pelletlerin yeniden dağılmaması nedeniyle, nanopartikül formülasyonlarının soğuk ortam koşullarında hazırlanmasına karar verilmiştir. Soğuk ortamda hazırlanan formülasyonlar arasında en uygun boyut, dağılım ve yüzey yükü değerlerine sahip olan 25:20 polimer:NAC oranı seçilmiştir. Bu formülasyona ait ilk pH değeri 4.8 olarak belirlenmiş ve peptid konjugasyonunun sağlıklı gerçekleşebilmesi için ortam pH'ı 0.1 M NaOH çözeltisi ile kademeli olarak pH=6.8'e ayarlanmıştır. Her bir pH seviyesinde yapılan DLS ölçümleri sonucunda boyut, PDI ve ZP değerleri Tablo 9'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 8. Farklı mPEG-PLGA-MA-NH₂:NAC oranlarında hazırlanan nanopartiküllerin evaporasyon ve santrifüj sonrası DLS analizleri.

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

Tablo 9. Soğuk ortamda hazırlanan mPEG-PLGA-MA-NH₂ nanopartiküllerinin pH'a bağlı DLS analizleri

mPEG-PLGA-MA-NH ₂ 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 ± 1,39
40:20	572,7 ± 83,03	0,330 ± 0,163	-20,2 ± 0,889
Boş NP	173,6 ± 2,517	0,119 ± 0,074	-44,5 ± 1,59
25:20	158,7 ± 3,066	0,143 ± 0,049	-34,8 ± 1,50
Boş NP	72,89 ± 0,178	0,154 ± 0,004	-30,2 ± 1,37
mPEG-PLGA-NH ₂ :NAC (25:20)			
Form.	PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
Başlangıç	168,8 ± 4,637	0,085 ± 0,060	-15,1 ± 0,252
Evaporasyon sonrası	140,2 ± 2,042	0,092 ± 0,068	-15,0 ± 0,557
pH 4,8	155,8 ± 3,139	0,168 ± 0,022	-28,4 ± 0,379
pH 5,8	154,1 ± 3,694	0,128 ± 0,041	-33,5 ± 0,896
pH 6,8	157,9 ± 2,761	0,088 ± 0,041	-36,7 ± 0,819

*NP: mPEG-PLGA-MA-NH₂

Belirlenen optimum formülasyon (25:20) ile yaklaşık %50 enkapsülasyon verimi elde edilmiş olup, bu durum 20 mg NAC'tan 10 mg'ının yüklenmesi anlamına gelmektedir. Bu nedenle, bu noktadan itibaren polimer:ilaç oranı 25:10 olarak kabul edilmiştir. Bu esnada, nanopartiküllere B6 peptidi bağlanmış ve nihai NAC-B6-NP formülasyonu oluşturulmuştur. Bu son formülasyon, hem fizikokimyasal karakterizasyon hem de *in vitro* uygulamalarda kullanılmıştır.

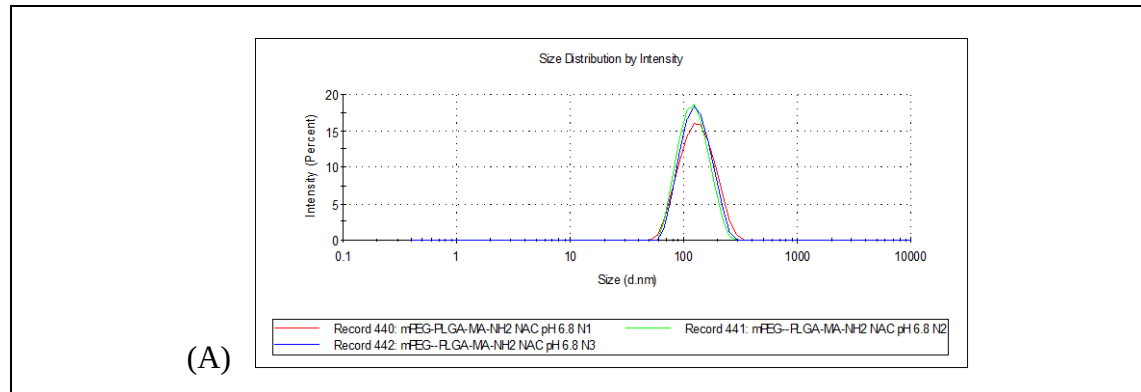
Ayrıca, KBB geçişi ve hücrel alım deneylerinde kullanılmak üzere FITC yüklü ve konjuge nanopartikül formülasyonları da aynı prosedüre göre hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.

Tüm DLS verileri Tablo 10'da grafikleri de Şekil 15'te sunulmuştur.

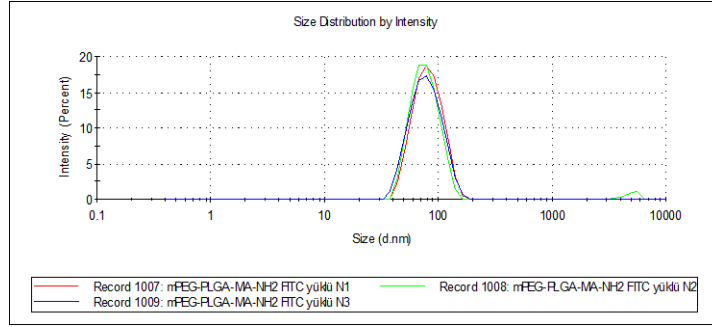
Tablo 10. FITC ve NAC yüklü farklı nanopartikül formülasyonlarının DLS analizleri

Form.	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
NAC-NP	157,9 $\pm$ 2,761	0,088 $\pm$ 0,041	-36,7 $\pm$ 0,819
FITC-NP	91,97 $\pm$ 5,102	0,133 $\pm$ 0,064	-23,9 $\pm$ 5,39
NAC-FITC-B6-NP	159,1 $\pm$ 2,905	0,134 $\pm$ 0,018	-34,9 $\pm$ 1,19
NAC B6-NP	149,1 $\pm$ 0,6429	0,096 $\pm$ 0,068	-35,5 $\pm$ 0,462

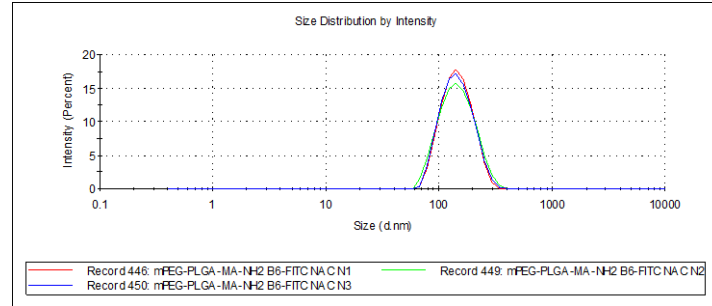
NP: mPEG-PLGA-NH₂



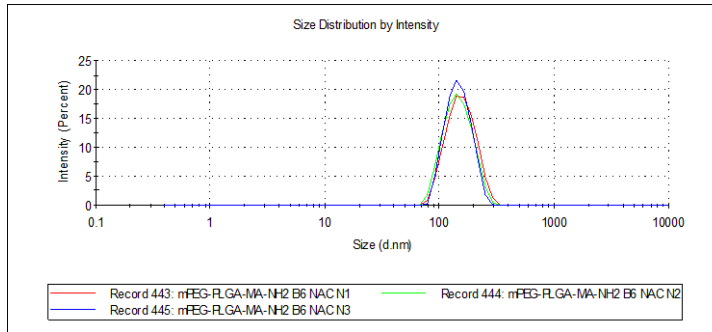
(B)



(C)



(D)



Şekil 15. Farklı formülasyonlara ait nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımlarının örnek DLS analiz sonuçları.

(A) NAC-NP (B) FITC-NP (C) NAC-FITC-B6-NP (D) NAC-B6-NP

4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi analizleri

Farklı polimer:ilaç oranlarında hazırlanan NAC yüklü nanopartiküller ile gerçekleştirilen enkapsülasyon analizlerinde, %EE ve %YK değerleri optimize edilmiştir. En yüksek %EE değeri %99.89 ile 25:10 oranında elde edilmiştir. Bu formülasyonun pH 6.8'e ayarlanmasıyla %EE değeri %90.98 olarak bulunmuştur. B6 peptidinin konjugasyonu sonrası %EE %74.76'ya, %YK ise 16.61 µg/mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 11). FITC yüklü nanopartiküllerde ise EE değeri %40 belirlenmiştir. Bu oranlar, UV-Vis

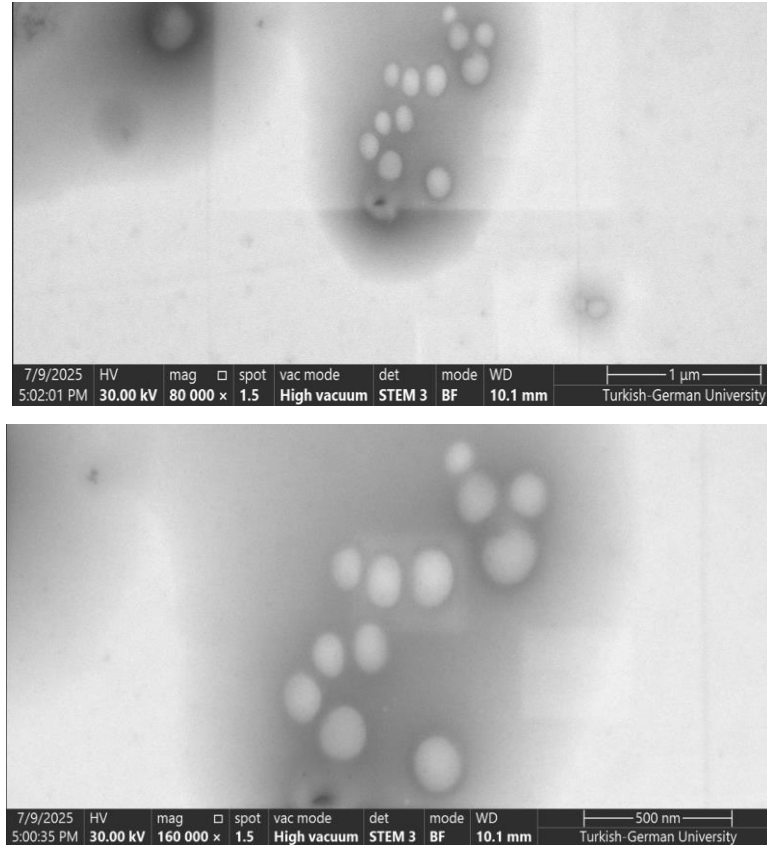
spektrofotometresi ile belirlenen FITC kalibrasyon eğrisi temelinde hesaplanmıştır (Bölüm 4.3.8).

Tablo 11. Farklı polimer: ilaç oranlarında hazırlanan NAC yüklü nanopartiküllerin ve B6 peptidi ile konjuge edilmiş formülasyonun %EE ve %YK değerleri

Formülasyon	% EE	% YK
NAC-NP (50:20)	40,698 ± 0,051	11,628 ± 0,014
NAC-NP (40:20)	38,875 ± 0,016	12,959 ± 0,005
NAC-NP (25:20)	49,472 ± 0,288	21,987 ± 0,128
NAC-NP (25:10)	99,891 ± 0,024	28,550 ± 0,005
NAC-NP (25:10) pH 6,8	90,982 ± 0,412	25,995 ± 0,118
NAC-B6-NP (25:10)	74,763 ± 1,066	16,614 ± 0,237

4.3.4. Nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu

NAC-B6-NP formülasyonlarının morfolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen STEM analizleri sonucunda, partiküllerin küresel yapıda ve homojen dağılım gösteren morfolojide olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 16). Farklı büyütme seviyelerinde (X80.000 ve X160.000) elde edilen görüntülerde, partiküller arası belirgin bir aglomerasyon izlenmemiştir. Görüntülerdeki partiküller, yüzey bakımından düzgün ve pürüzsüz bir yapı sergilemiş, bu da sistemin kontrollü üretildiğini ve stabilite açısından uygun olduğunu düşündürmüştür.



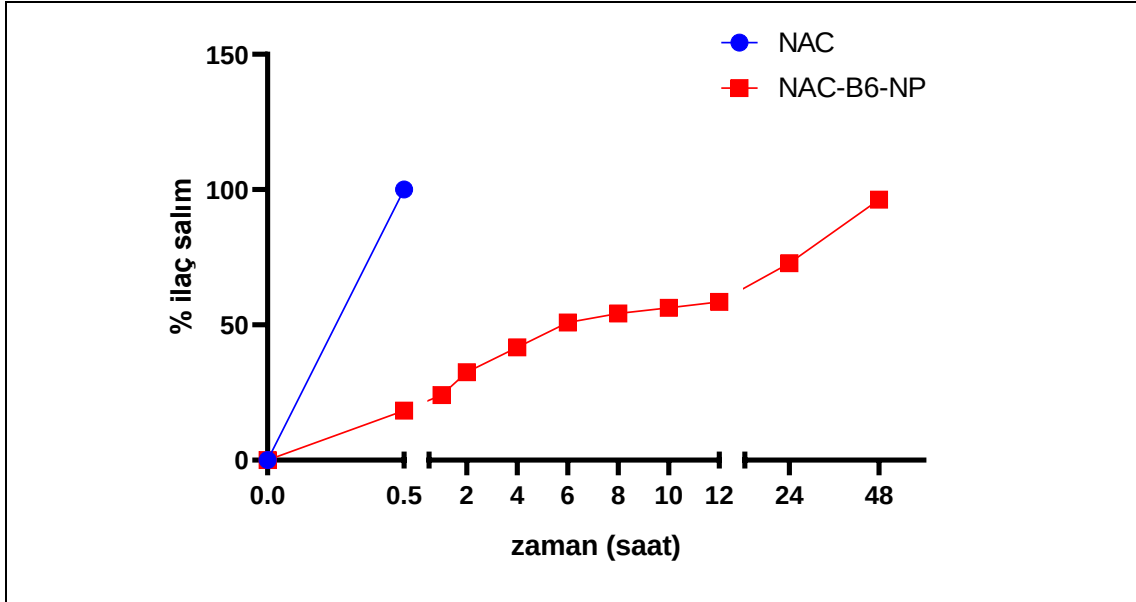
Şekil 16. NAC-B6-NP formülasyonlarına ait STEM görüntüsü.

4.3.5. Nanopartiküllerin *in vitro* ilaç salım profil analizi

NAC-B6-NP formülasyonlarının ilaç salım kinetiğini değerlendirmek amacıyla, NAC-B6-NP dispersiyonu ve serbest NAC çözeltisinin *in vitro* salım analizleri diyaliz membran difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Vücut koşullarını taklit edecek şekilde analizler 37 °C’de yürütülmüş, farklı zaman noktalarında (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 ve 48 saat) alınan örneklerdeki salınan NAC miktarları HPLC yöntemi ile belirlenmiştir.

Elde edilen veriler, NAC çözeltisinin yaklaşık 30 dakika içinde %100 salım gerçekleştirdiğini; buna karşın NAC-B6-NP sisteminde NAC’ın kontrollü ve uzamış bir şekilde salındığını göstermiştir. NAC-B6-NP formülasyonunda kademeli artış gösteren

salım profili sonucunda, %100 salıma yaklaşık 48 saat sonunda ulaşılmıştır. Bu bulgular, geliştirilen nanopartikül sisteminin NAC için kontrollü salım sağladığını göstermektedir. İlgili salım profilleri Şekil 17’de sunulmuştur.



Şekil 17. Serbest NAC ve NAC-B6-NP formülasyonlarının *in vitro* ilaç salım profilleri.

Serbest NAC 30 dakika içinde tamamlanmış salım gösterirken, NAC-B6-NP formülasyonu 48 saatlik periyotta kontrollü salım sağlamıştır.

4.3.6. Serumda stabilite analizi

NAC-B6-NP formülasyonunun biyolojik ortamlardaki kararlılığını değerlendirmek amacıyla, nanopartiküller 37 °C'de farklı ortamlarda (PBS, pH=7.4; DMEM ve %50 FBS içeren DMEM) inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman noktalarında (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 ve 24 saat) partikül süspansiyonlarından örnekler alınarak DLS yöntemi ile partikül PB, PDI ve ZP analiz edilmiştir (Şekil 18, Tablo 12).

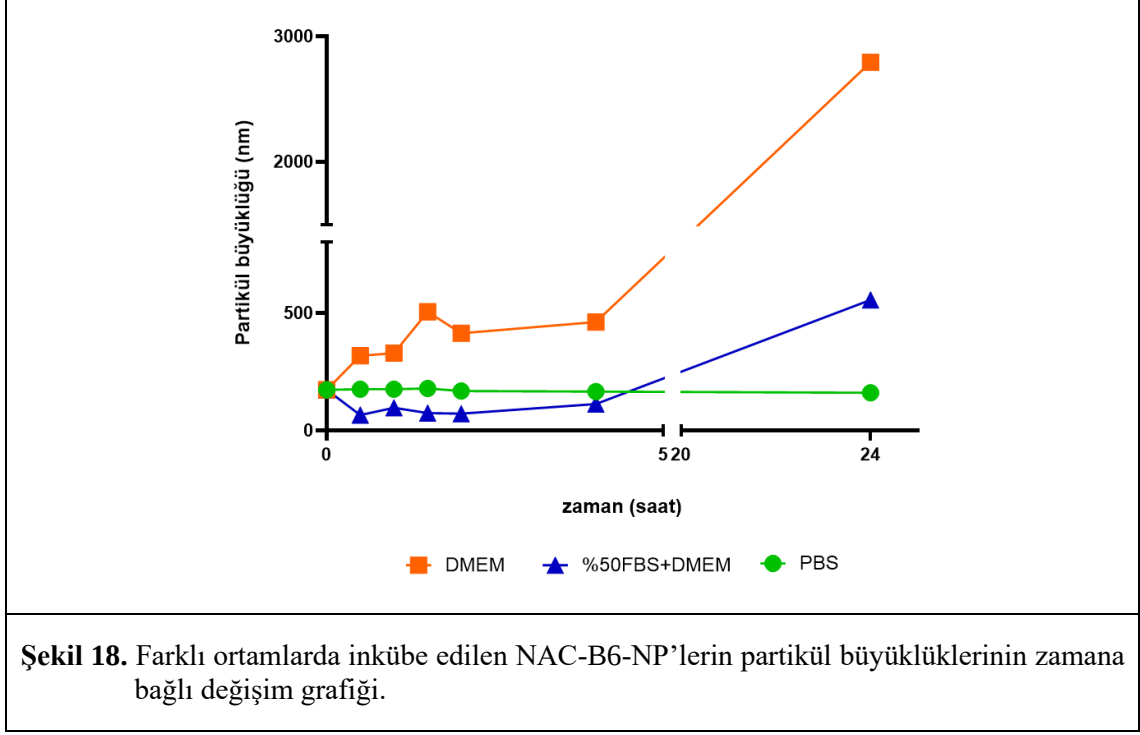
PBS, kimyasal stabilitenin temel değerlendirmesi için kullanılırken; DMEM, hücre kültürü koşullarını taklit eden bir ortam sağlar. %50 FBS+DMEM ise, serum proteinleri ve enzimleri içermesi nedeniyle biyolojik açıdan daha gerçekçi bir ortam sunar ve taşıyıcı sistemin proteinlerle etkileşimi ve enzimatik degradasyona karşı dayanıklılığını ortaya koyar. Elde edilen veriler, PBS ortamında NAC-B6-NP'lerin 24 saat boyunca partikül boyutu ve yüzey yükünde anlamlı bir değişiklik olmadığını ve sistemin fiziksel stabilitesini koruduğunu gösterir. Buna karşılık, DMEM ortamında inkübasyonun 1.5

saatten sonra belirgin bir boyut artışı gözlenmiştir; bu durum, nanopartiküllerin zamanla agregasyon eğilimi gösterdiğine işaret eder. %50 FBS içeren DMEM ortamında ise 4 saat boyunca radikal bir değişiklik gözlenmemiştir. İlerleyen saatlerde boyut artışı başlamıştır.

Tablo 12. NAC-B6-NP'lerin PBS, DMEM ve %50 FBS içeren DMEM ortamlarında belirli zaman noktalarında ölçülen DLS analiz sonuçları.

Ortam	Süre (Saat)	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
PBS	0	173,0 $\pm$ 6,326	0,130 $\pm$ 0,036	-38,2 $\pm$ 0,361
	0,5	175,9 $\pm$ 6,235	0,148 $\pm$ 0,050	-13,4 $\pm$ 1,42
	1	175,3 $\pm$ 3,700	0,055 $\pm$ 0,041	-11,4 $\pm$ 0,954
	1,5	179,1 $\pm$ 6,545	0,169 $\pm$ 0,108	-12,4 $\pm$ 1,80
	2	167,9 $\pm$ 2,888	0,165 $\pm$ 0,014	-12,6 $\pm$ 1,20
	4	165,2 $\pm$ 7,790	0,188 $\pm$ 0,049	-10,7 $\pm$ 1,05
	24	160,5 $\pm$ 3,270	0,198 $\pm$ 0,034	-11,6 $\pm$ 1,47
DMEM	Süre (Saat)	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
	0	173,0 $\pm$ 6,326	0,130 $\pm$ 0,036	-38,2 $\pm$ 0,361
	0,5	317,6 $\pm$ 11,65	0,628 $\pm$ 0,317	-19,8 $\pm$ 1,57
	1	328,5 $\pm$ 21,05	0,868 $\pm$ 0,084	-18,0 $\pm$ 0,693
	1,5	504,9 $\pm$ 73,04	0,849 $\pm$ 0,234	-18,4 $\pm$ 0,551
	2	413,1 $\pm$ 14,24	0,654 $\pm$ 0,220	-19,1 $\pm$ 0,306
	4	461,4 $\pm$ 36,57	0,974 $\pm$ 0,045	-18,5 $\pm$ 0,551
	24	2793 $\pm$ 294,6	0,361 $\pm$ 0,160	-19,3 $\pm$ 1,71
%50 FBS + DMEM	Süre (Saat)	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
	0	173,0 $\pm$ 6,326	0,130 $\pm$ 0,036	-38,2 $\pm$ 0,361
	0,5	66,01 $\pm$ 12,49	0,864 $\pm$ 0,172	-15,8 $\pm$ 0,751
	1	96,91 $\pm$ 31,76	0,512 $\pm$ 0,272	-15,8 $\pm$ 1,95
	1,5	74,54 $\pm$ 12,25	0,834 $\pm$ 0,207	-13,4 $\pm$ 1,22

2	$71,77 \pm 13,36$	$0,767 \pm 0,202$	$-13,9 \pm 0,586$
4	$112,6 \pm 5,839$	$0,649 \pm 0,079$	$-13,4 \pm 1,71$
24	$555,3 \pm 44,72$	$0,422 \pm 0,314$	$-15,1 \pm 0,058$



4.3.7. Nanopartiküllerin sterilizasyonu

NAC-B6-NP formülasyonu, UV ışığı altında 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizasyon öncesi ve sonrası PB, PDI ZP değerleri DLS analizleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 13'te sunulmuştur. UV ışığı sonrası ölçümler, partikül boyutunda hafif bir artış ve zeta potansiyelinde düşüş olduğunu göstermektedir. Ancak bu değişim, genel sistem stabilitesini bozacak düzeyde olmamıştır.

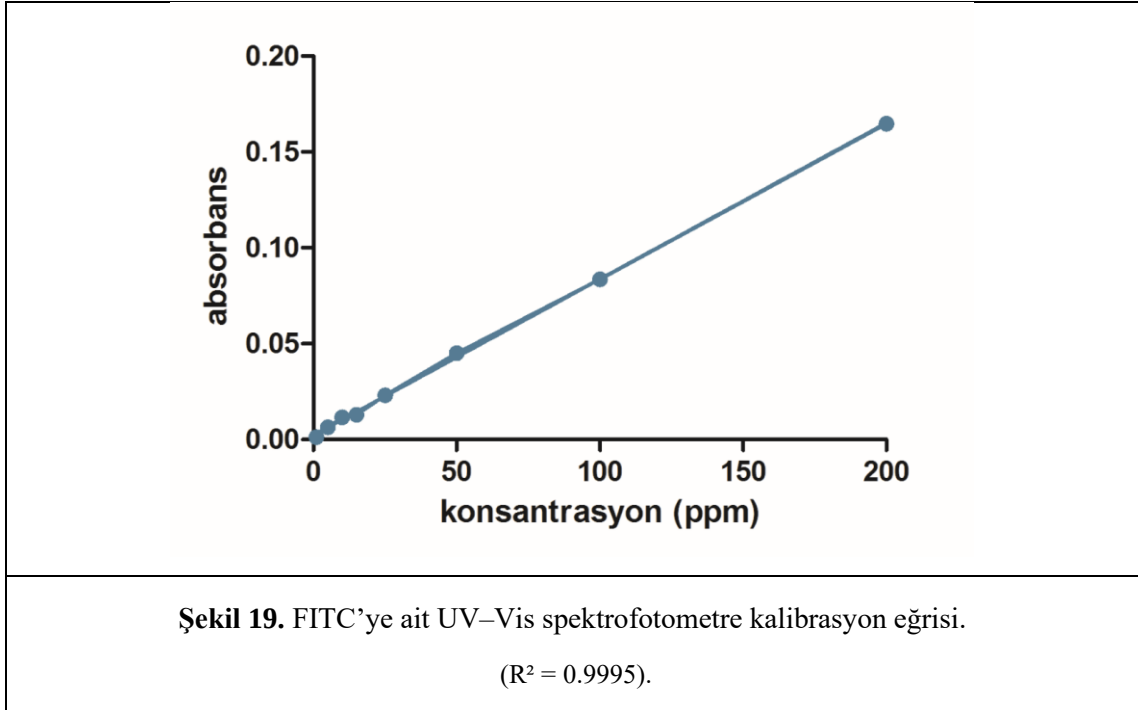
Tablo 13. NAC-B6-NP'lerinin UV sterilizasyon çalışmasına ait karakterizasyon verileri.

	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
NAC-B6-NP (önce)	$149,1 \pm 0,6429$	$0,096 \pm 0,068$	$-35,5 \pm 0,462$
NAC-B6-NP (sonra)	$163,9 \pm 3,612$	$0,169 \pm 0,007$	$-29,7 \pm 0,404$

4.3.8. FITC için kalibrasyon eğrisi analizi

Optimum formülasyonun belirlenmesinin ardından, *in vitro* hücresel alım ve *in vivo* KBB geçişi deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan FITC ile yüklü nanopartikül formülasyonlardaki FITC miktarının tayini için, süpernatanttan alınan örneklerde UV–Vis spektrofotometrik analiz gerçekleştirilmiştir (Bölüm 4.3.3). Bu amaçla, FITC’ye ait bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. 1, 5, 10, 15, 25, 50, 100 ve 200 ppm ($\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonlarında hazırlanan standart çözeltiler spektrofotometrik olarak analiz edilmiş ve elde edilen verilere göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 19).

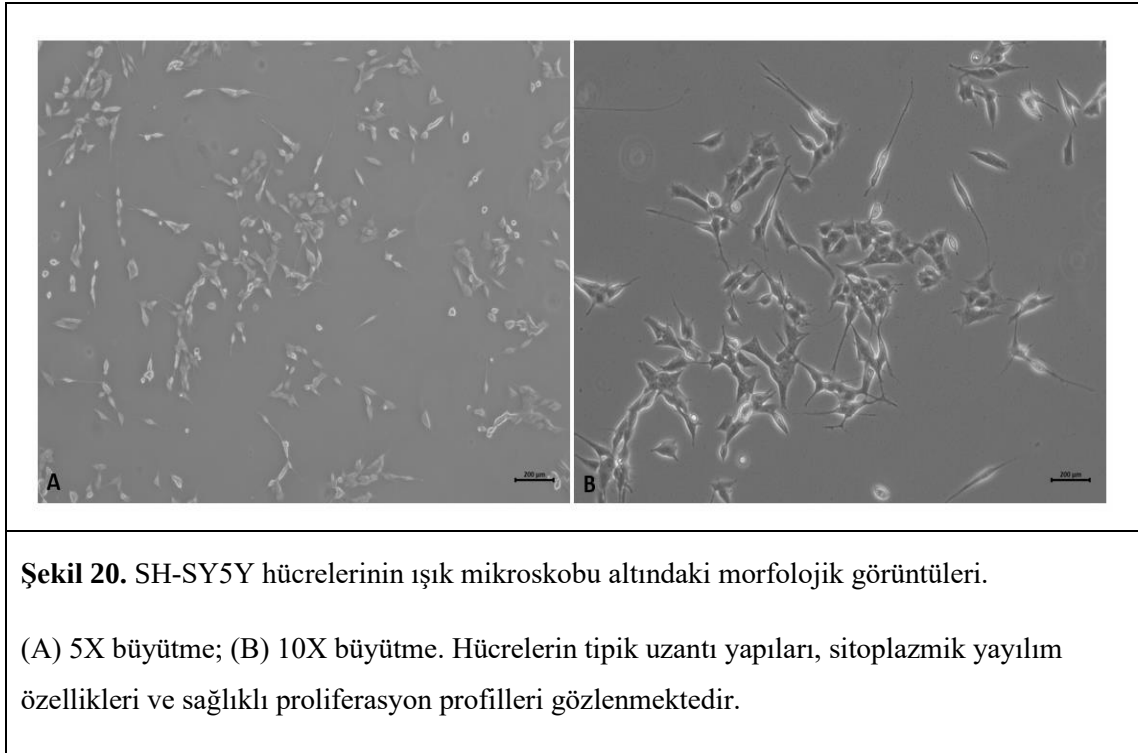
Doğrusal regresyon analizi sonucunda kalibrasyon denklemine ait formül $y = 0.0008x + 0.0022$ olarak bulunmuş, doğruluk katsayısı (R^2) 0.9995 olarak hesaplanmıştır. Bu denklem, FITC yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında kullanılmıştır.



4.4. *In vitro* Çalışmalar

4.4.1. Hücre kültürünün gerçekleştirilmesi

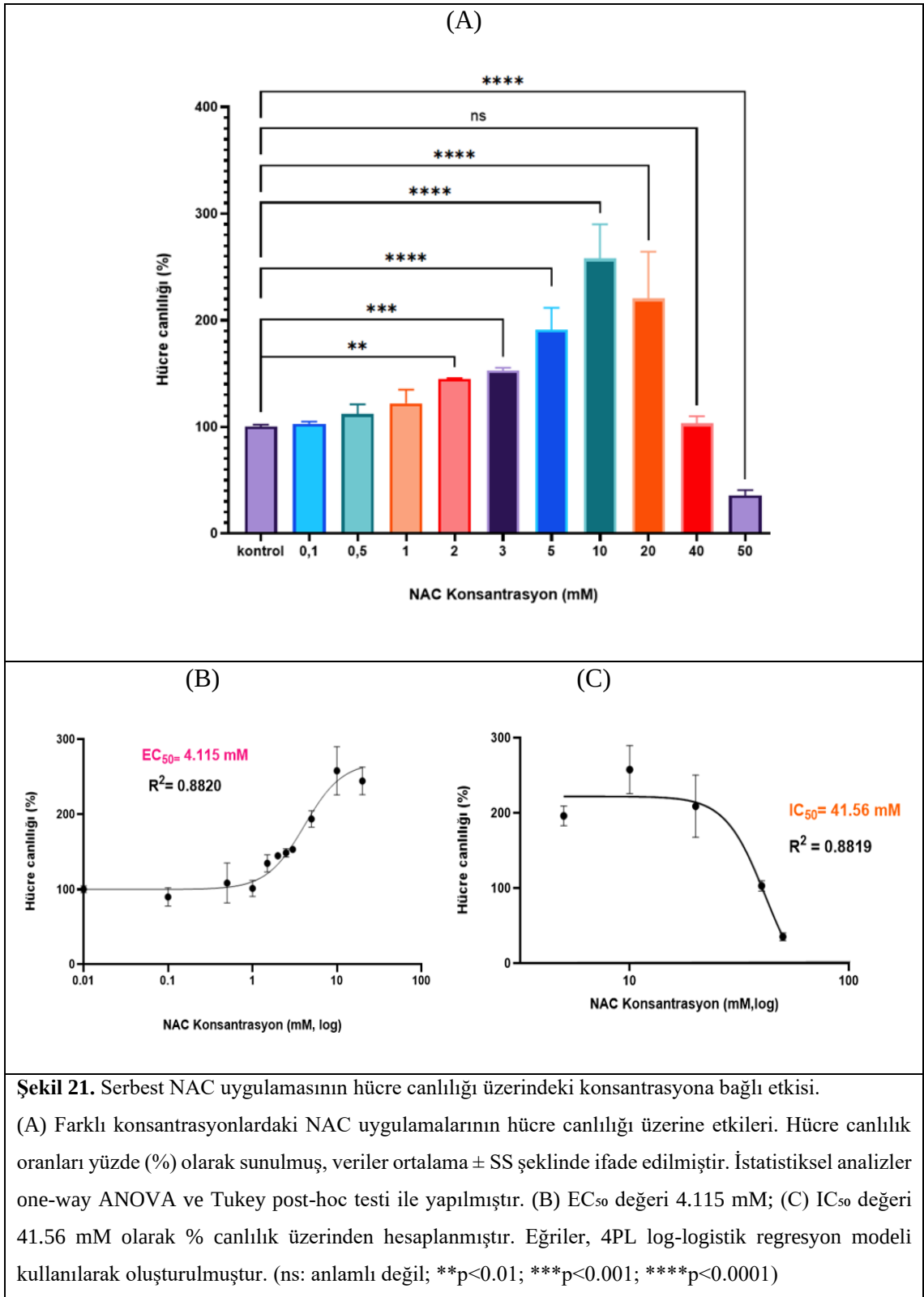
İnsan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücrelerinin kültürü ve pasajlama koşulları, Bölüm 3.4’te detaylandırıldığı şekilde optimize edilmiştir. Hücreler, deneysel gereksinimlere uygun olacak şekilde farklı tabakalara (6-kuyucuk, 12-kuyucuk ve 96-kuyucuk kültür plakları) ekilmiş ve büyütülmüştür. Kültür süreci boyunca hücrelerin karakteristik morfolojik yapılarının korunduğu ve ardışık pasajlar boyunca sağlıklı proliferasyon gösterdikleri mikroskobik olarak doğrulanmıştır. Şekil 20’de SH-SY5Y hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki 5X ve 10X büyütme ile elde edilen görüntüleri sunulmuş olup, hücrelerin yayılım şekilleri ve tipik uzantıları açıkça izlenebilmektedir.

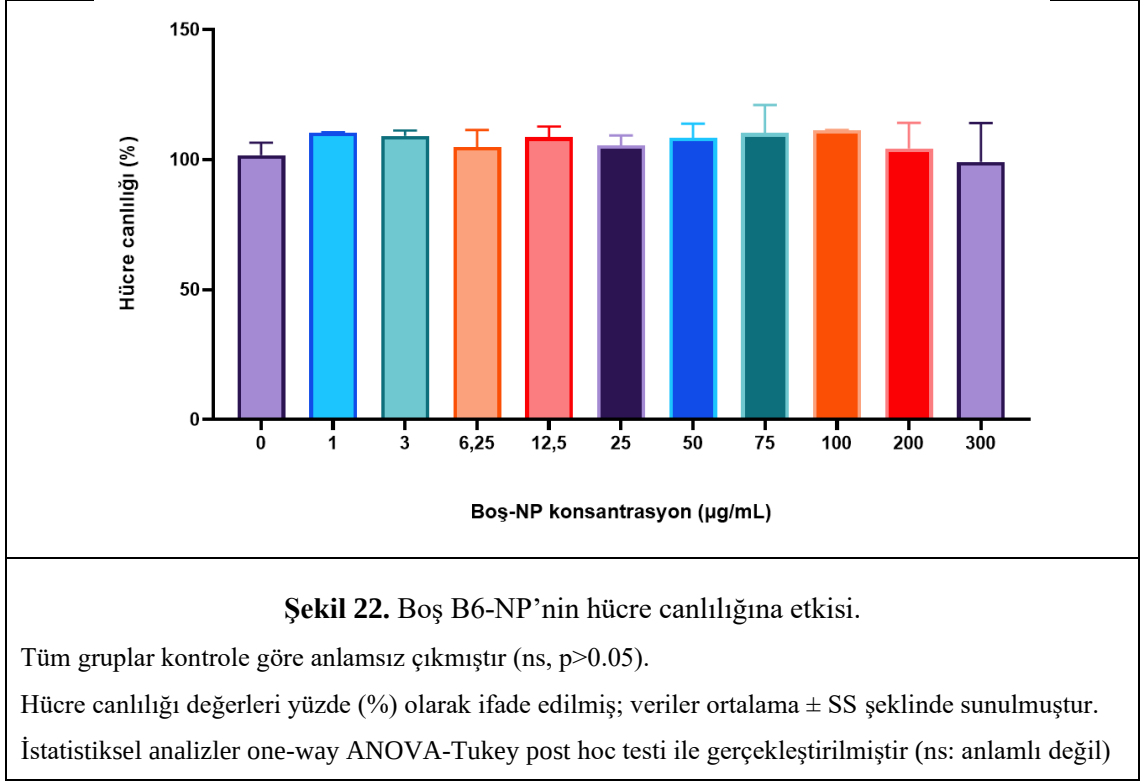


4.4.2. Nanopartiküllerin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

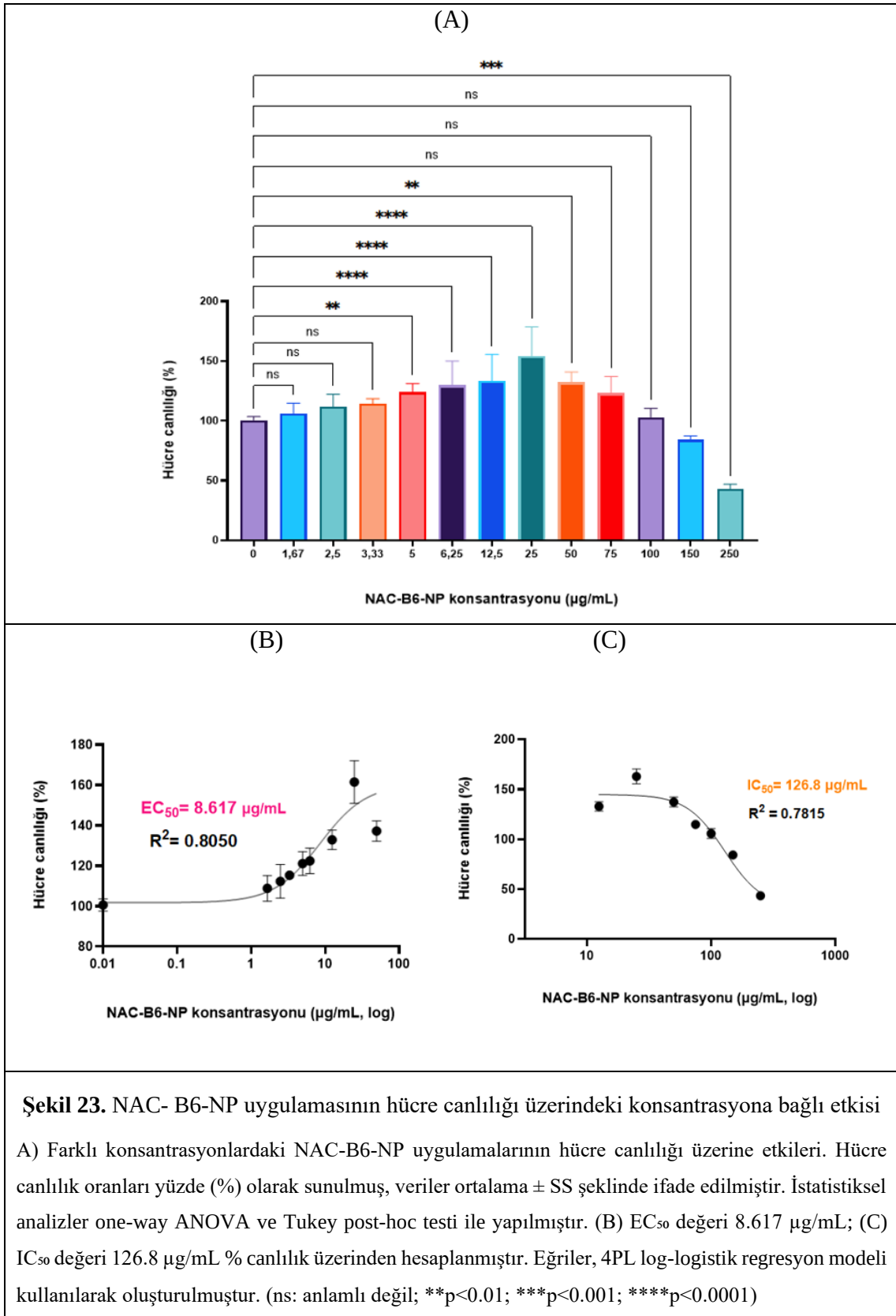
Farklı konsantrasyonlarda (0.1–50 mM) uygulanan serbest NAC'ın SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 21A'da gösterilmiştir. 0.1–1 mM aralığındaki uygulamalar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır ($p>0.05$). Buna karşılık, 3,5 ve 10 mM konsantrasyonlarda hücre canlılığı anlamlı düzeyde artmış (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.0001$), en yüksek canlılık ise 10 mM NAC uygulamasında gözlenmiştir. 20 mM ve 40 mM uygulama gruplarında canlılık azalmaya başlamış, 50 mM'de ise kontrol düzeyinin altına inmiştir. Logaritmik ölçekte çizilen doz-cevap eğrisi sigmoid bir yanıt göstermiş, yapılan uygunluk analizi sonucunda EC_{50} değeri 4.115 mM olarak belirlenmiştir ($R^2=0.8820$) (Şekil 21B). Ayrıca, 10 mM üzerindeki NAC dozlarının inhibe edici etkisi değerlendirilmiş ve IC_{50} değeri 41.56 mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 21C). Bu bulgular, 10 mM NAC dozunun etkili ve toksik olmayan güvenli bir aralıkta yer aldığını göstermektedir.

Boş B6-NP formülasyonu 1–300 $\mu\text{g/mL}$ aralığında hücrelere uygulanmış ve bu konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna benzer düzeyde seyretmiştir ($p>0.05$) (Şekil 22).





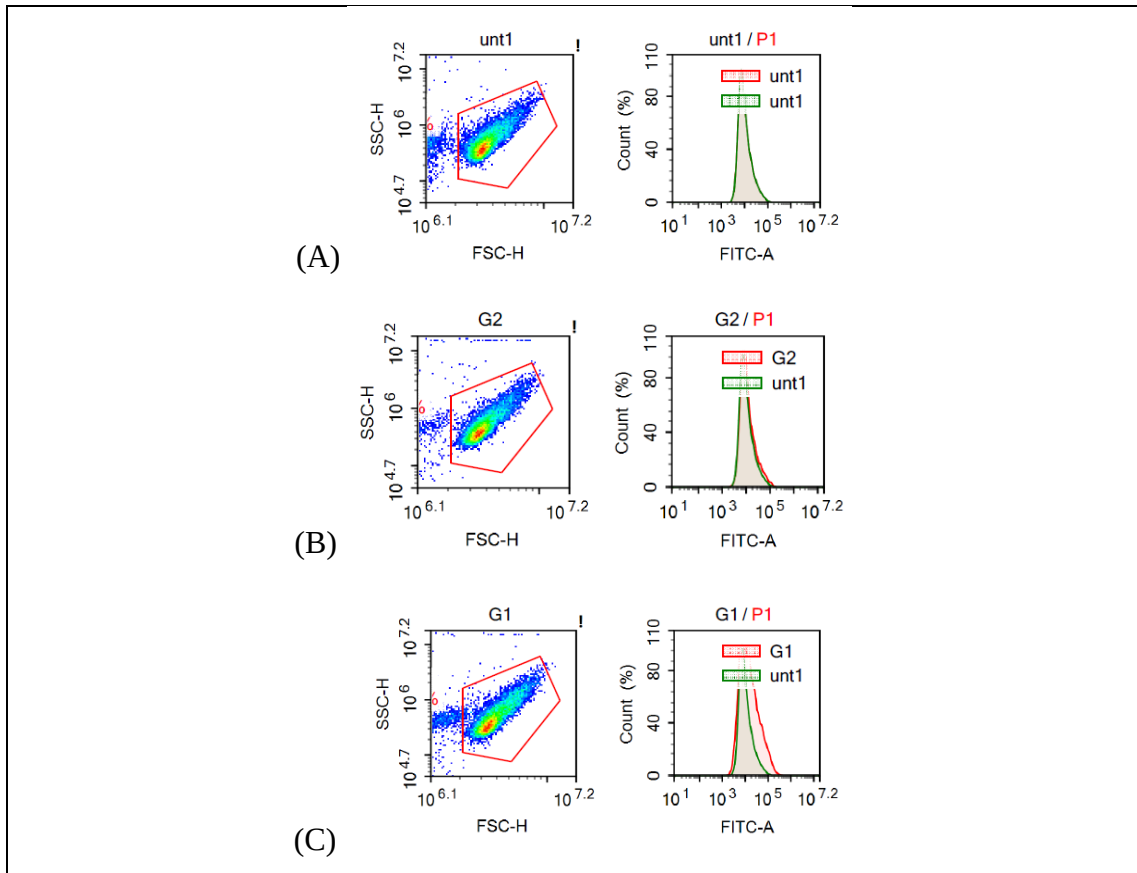
NAC-B6-NP sisteminin hücre canlılığı üzerindeki etkisi doz bağımlı olarak incelenmiştir. 1.67–250 $\mu\text{g/mL}$ aralığında yapılan uygulamalarda, 6.25–25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında hücre canlılığı anlamlı düzeyde artmış; en yüksek değer 25 $\mu\text{g/mL}$ 'de elde edilmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 23A). Ancak, 100 $\mu\text{g/mL}$ 'den itibaren canlılıkta düşüş gözlenmiş, 250 $\mu\text{g/mL}$ uygulamasında bu azalma belirgin hale gelmiştir ($p<0.001$). Doz-cevap analizleri sonucunda $EC_{50}=8.617 \mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.8850$) (Şekil 23B), $IC_{50}=126.8 \mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.7815$) (Şekil 23C) olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, NAC-B6-NP sisteminin düşük dozlarda sitoprotektif, yüksek dozlarda ise sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

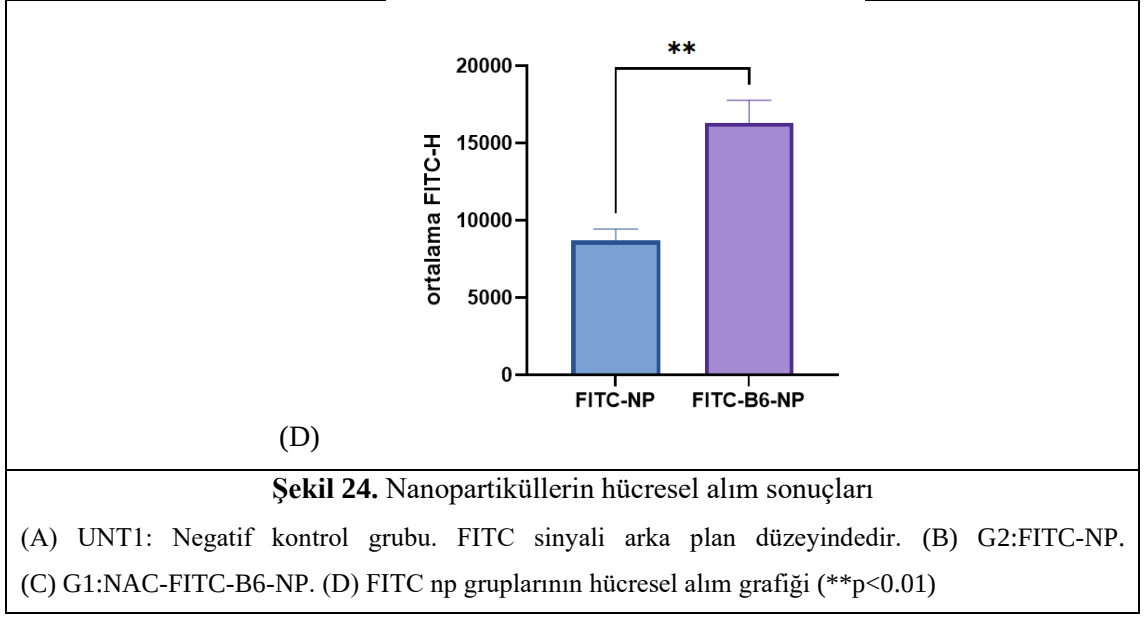


4.4.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınması

Nanopartiküllerin hücre içine alım verimliliği, FITC-NP ve NAC-B6-FITC-NP formülasyonları kullanılarak SH-SY5Y hücre hattında değerlendirilmiştir.

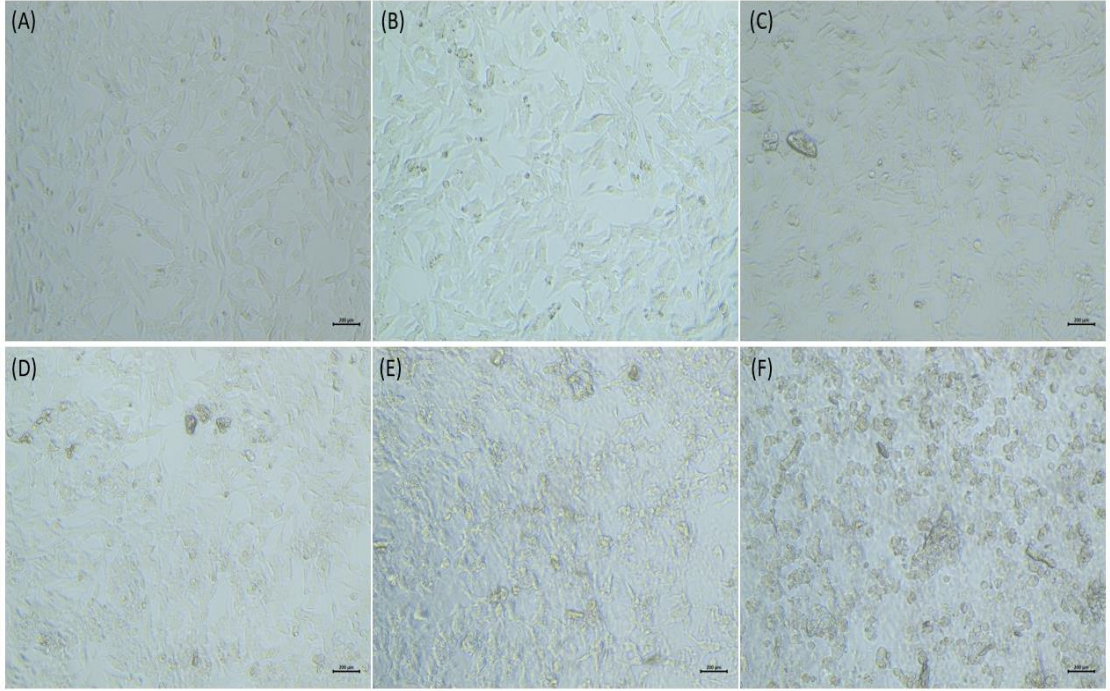
Akım sitometri ile yapılan analiz sonuçlarına göre, kontrol grubundaki ortalama FITC-H floresan yoğunluğu 7037 olarak ölçülmüştür (Şekil 24A). FITC-NP (Şekil 24B) grubunda ortalama FITC-H yoğunluğu 9554 olarak bulunmuştur. NAC-FITC-B6-NP (Şekil 24C) grubunda ise ortalama FITC-H yoğunluğu 14653 hesaplanmış olup, hücre popülasyonunun genelinde daha homojen ve güçlü bir alımı olduğunu işaret eder. Elde edilen veriler doğrultusunda, hücresel alım düzeyi NAC-B6-FITC-NP grubunda, FITC-NP grubuna kıyasla yaklaşık 1.88 kat artış göstermiştir. Bu fark, Şekil 24D’de gösterildiği üzere istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).





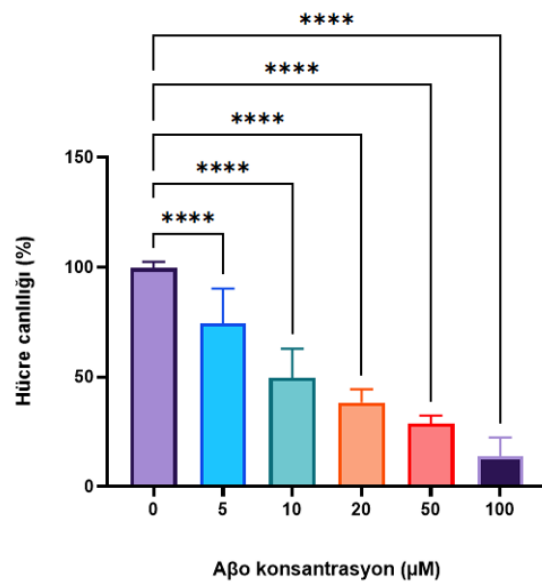
4.4.4. A β ₄₂ oligomer toksisitesinin oluşturulması

A β ₄₂ peptidinin SH-SY5Y hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 50 ve 100 μ M) 24 saat süreyle uygulanmasının ardından, doza bağlı olarak hücre morfolojisinde bozulmalar ve hücre yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir (Şekil 25). Hücrelerin canlılık düzeyleri değerlendirilmiş (Şekil 26A) ve elde edilen veriler logaritmik konsantrasyonlara karşı çizilen doz-yanıt eğrileriyle analiz edilmiştir. 4PL regresyon modeli ile yapılan analiz sonucunda, IC₅₀ değeri 10 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 26B). Bu bulgular, A β ₄₂’nin hücre canlılığı üzerinde konsantrasyona bağlı toksik etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

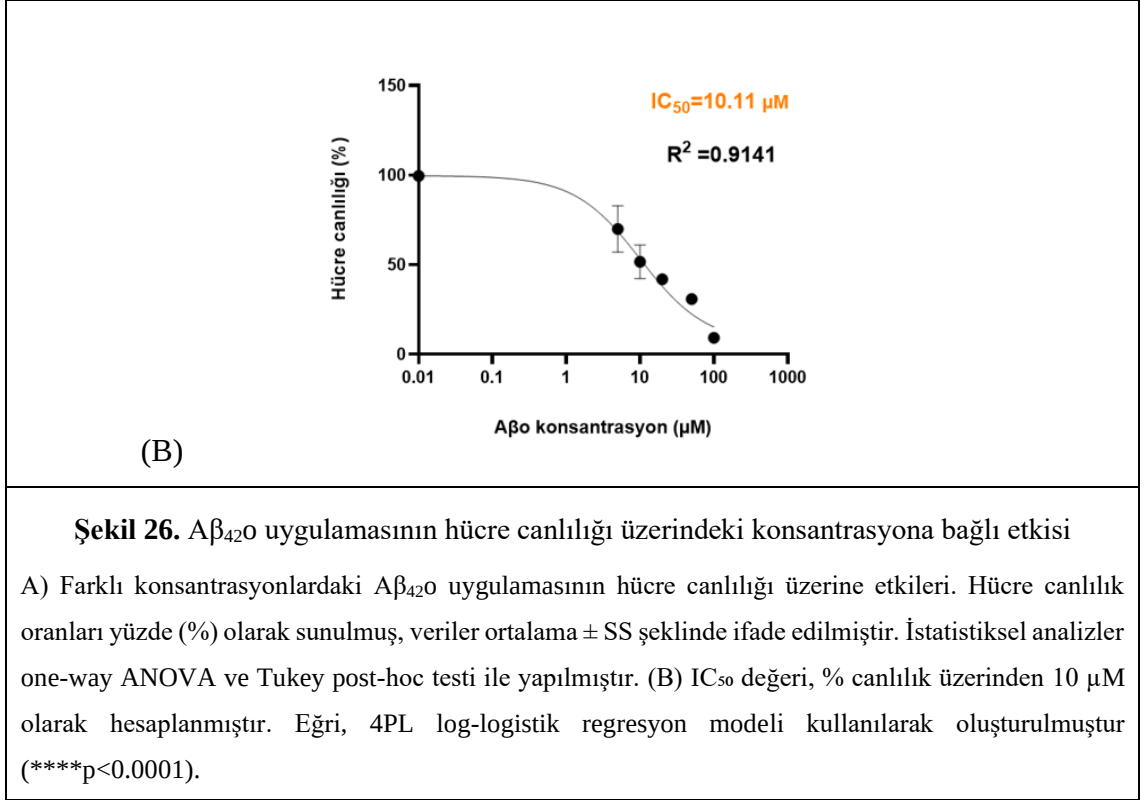


Şekil 25. A β_{42} ’nin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının ardından hücrelerde gözlenen morfolojik değişimlerin invert mikroskopta görüntülenmesi (10X)

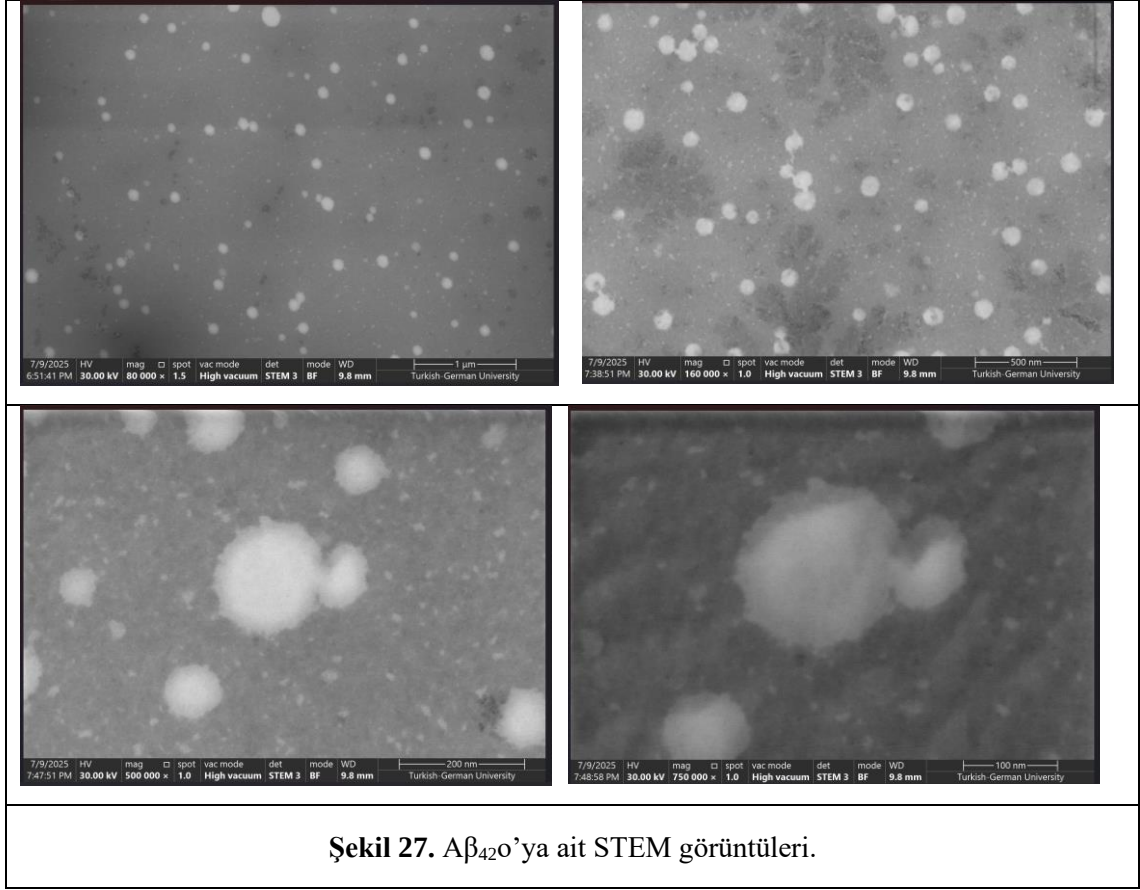
(A) A β_{42} uygulanmamış, (B) 5 μ M, (C) 10 μ M, (D) 20 μ M, (E) 50 μ M, (F) 100 μ M A β_{42} uygulanmış hücreler.



(A)



Aβ₄₂O'nun morfolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen STEM analizleri, oligomerlerin yapısal bütünlüğünü, dağılım özelliklerini ve agregasyon eğilimlerini niteliksel olarak ortaya koymuştur. Görüntülemeler farklı büyütme düzeylerinde alınmış olup, oligomer formlarının küresel ve homojen yoğunlukta bir morfoloji sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil 27). Özellikle daha düşük büyütmelerde (80.000x, 160.000x), monomerik ve oligomerik yapılar bir arada gözlenirken, daha yüksek büyütmeler (500.000x, 750.000x) oligomer kümelerinin çaplarının detaylı biçimde incelenmesine olanak sağlamıştır. Örneklerde rastlanan kümelenmeler, oligomerlerin zamanla büyüme ve birleşme eğilimi gösterdiğini düşündürmektedir.



Şekil 27. A β_{42} O'ya ait STEM görüntüleri.

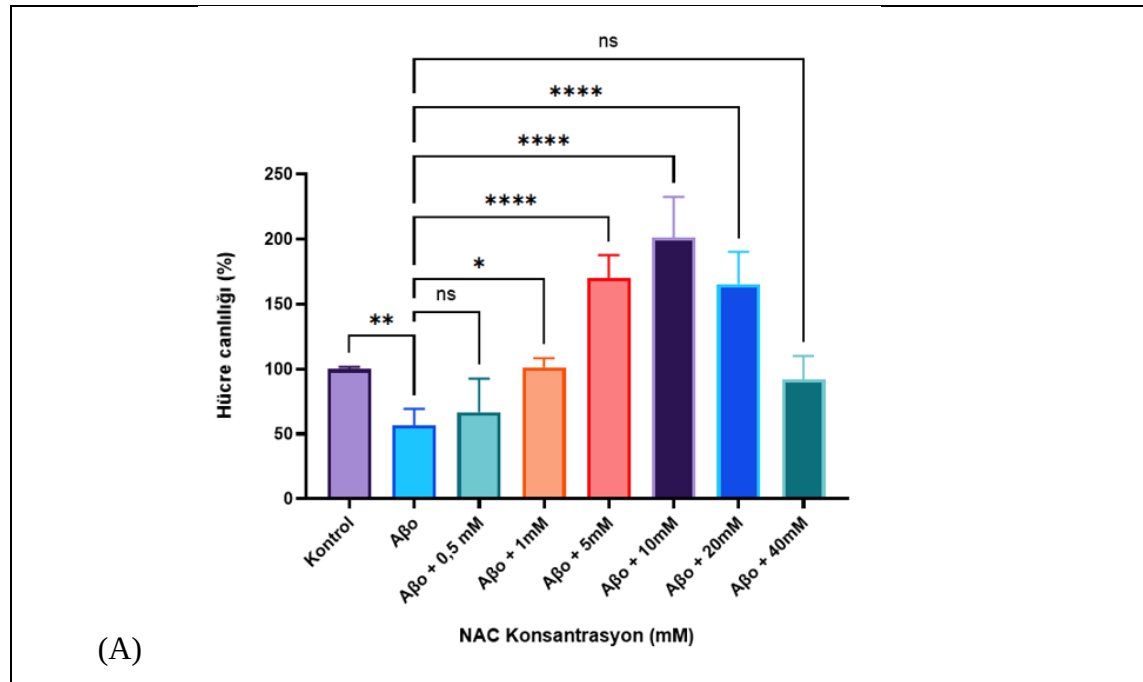
4.4.5. NAC ve NAC-B6-NP'nin A β_{42} toksisitesi oluşturulmuş hücrelerde hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

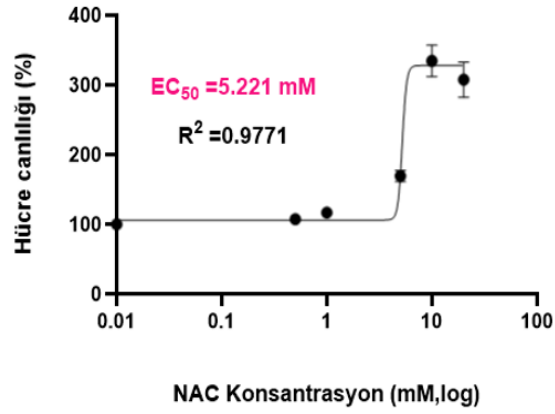
A β_{42} O ile oluşturulan toksisiteye karşı serbest NAC ve NAC-B6-NP uygulamalarının hücre koruyucu etkileri doz bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Serbest NAC grubunda A β_{42} O ile muamele edilen hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı anlamlı düzeyde azalmış ve bu durum A β_{42} O'nun sitotoksik etkisini doğrulamıştır ($p < 0.01$). Bu toksisiteye karşı serbest NAC uygulamasının etkileri farklı konsantrasyonlar üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 28A). 0.5 mM NAC uygulamasında canlılıkta artış gözlenirse de, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ancak 1 mM NAC ile anlamlı düzeyde iyileşme başlamış ($p < 0.01$), 5 mM ve 10 mM uygulamalarında ise canlılık oranı belirgin şekilde artmıştır ($p < 0.0001$). En yüksek koruyucu etki 10 mM NAC grubunda gözlenmiştir. Buna karşılık, 20 mM ve özellikle 40 mM dozlarında canlılık yeniden azalmış; bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, yüksek dozların hücre

üzerinde olumsuz etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Logaritmik ölçekte çizilen doz-cevap eğrisine göre, NAC'ın EC₅₀ değeri 5.221 mM olarak hesaplanmıştır ($R^2 = 0.9771$) (Şekil 28B). Hücre canlılığında anlamlı artış 5–10 mM aralığında elde edilirken, bu aralığın dışındaki konsantrasyonlarda etki sınırlı kalmıştır. Dolayısıyla, 10 mM NAC dozu, A β o kaynaklı toksisiteye karşı hem etkili hem de güvenli bir seçenek olarak öne çıkmıştır.

Benzer şekilde, NAC-B6-NP'nin A β ₄₂o ile indüklenen toksisiteye karşı sitoprotektif etkisi farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir (Şekil 29A). A β ₄₂o uygulaması canlılığı anlamlı düzeyde azaltırken ($p < 0.0001$), NAC-B6-NP tedavisi doza bağımlı olarak bu etkiyi tersine çevirmiştir. Özellikle 12.5 μ g/mL ve 25 μ g/mL dozlarında canlılık düzeyleri A β o grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.0001$) ve en yüksek canlılık 25 μ g/mL'de elde edilmiştir. Doz-cevap analizine göre EC₅₀ = 13.26 μ g/mL ($R^2 = 0.6410$) olarak hesaplanmıştır (Şekil 29B). Bu bulgular, NAC-B6-NP sisteminin, A β ₄₂o kaynaklı hücre ölümünü azaltmada etkili bir doz aralığı sunduğunu göstermektedir.

Ek olarak, serbest formda 10 mM konsantrasyonla uygulanan NAC, hücre başına yaklaşık 163 μ g NAC sağlamaktadır. Buna karşılık, NAC-B6-NP formülasyonunun (bkz. 4.4.2) 25 μ g'lık dozu yaklaşık 4.15 μ g NAC içermektedir. Bu önemli doz farkına rağmen, nanopartikül grubunda anlamlı düzeyde hücre koruyucu etki gözlenmiş olması, sistemin taşıyıcı etkinliğini ve hedeflenmiş biyoyararlanımını ortaya koymaktadır.

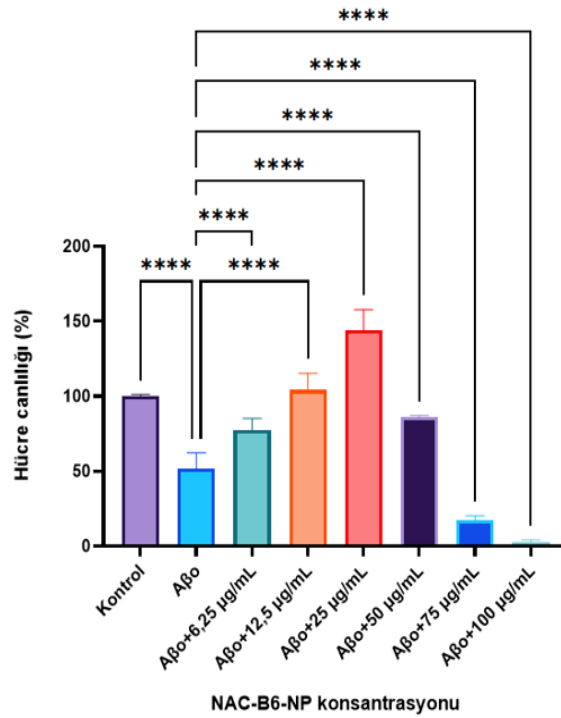




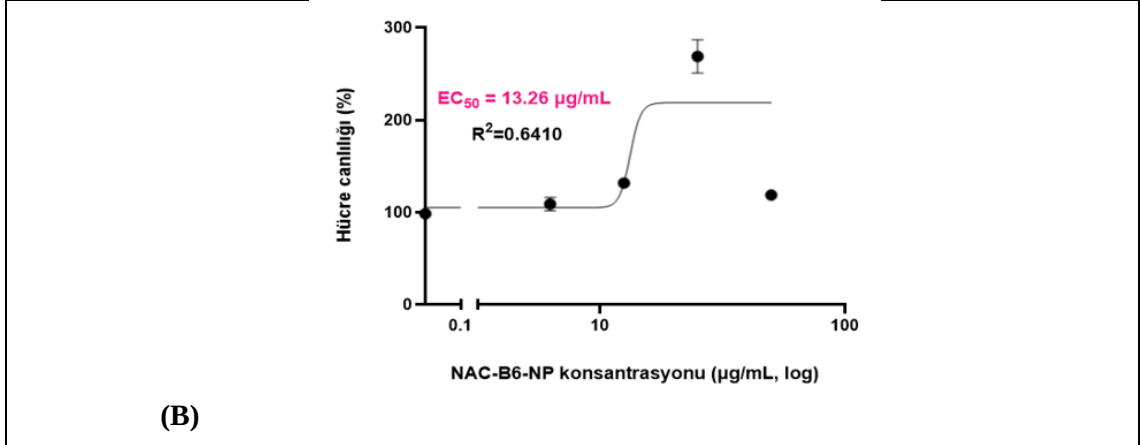
(B)

Şekil 28. A β ₄₂ ile oluşturulan hücre toksisitesine karşı serbest NAC uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.

(A) Farklı konsantrasyonlardaki serbest NAC uygulamasının A β ₄₂ toksisitesine etkisi. Hücre canlılık oranları yüzde (%) olarak sunulmuş, veriler ortalama $\pm$ SS şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler one-way ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile yapılmıştır. (B) EC_{50} değeri, % canlılık üzerinden 5.221 mM olarak hesaplanmıştır. Eğri, 4PL log-logistik regresyon modeli kullanılarak oluşturulmuştur (ns: anlamlı değil; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).



(A)

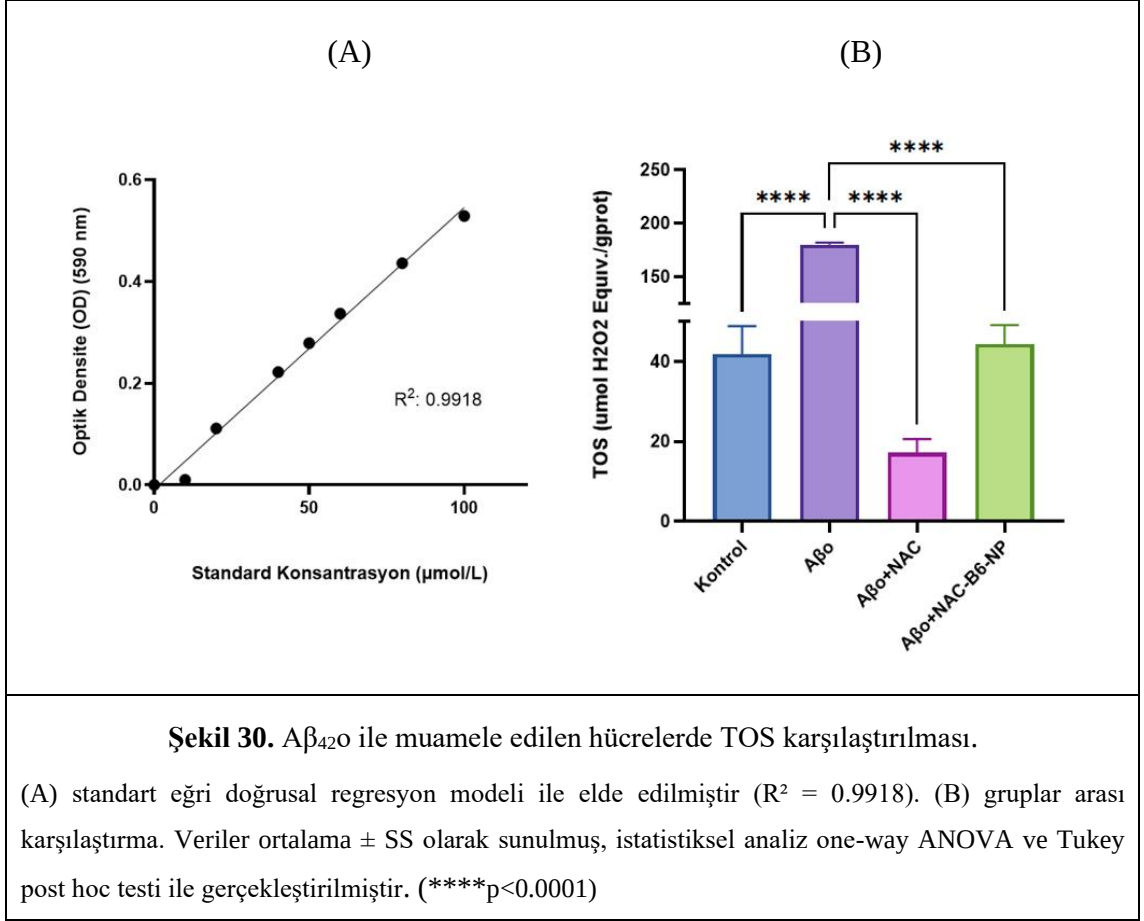


Şekil 29. A β_{42} ile oluşturulan hücre toksisitesine karşı NAC-B6-NP uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.

(A) Farklı konsantrasyonlardaki NAC-B6-NP uygulamasının A β_{42} toksisitesine etkisi. Hücre canlılık oranları yüzde (%) olarak sunulmuş, veriler ortalama $\pm$ SS şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler one-way ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile yapılmıştır. (B) EC₅₀ değeri, % canlılık üzerinden 13.26 μ g/mL olarak hesaplanmıştır. Eğri, 4PL log-logistik regresyon modeli kullanılarak oluşturulmuştur (ns: anlamlı değil; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

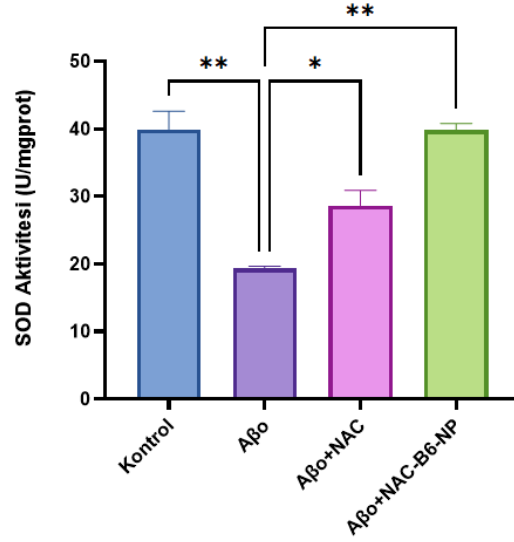
4.4.6. Oksidatif stres tayini

24 saatlik A β_{42} uygulamasının ardından, öncelikle standard eğri grafiği oluşturulmuş (Şekil 30A) ve yapılan analizde kontrol grubuna kıyasla hücrelerde toplam oksidan seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). Bu sonuç, A β_0 'nun hücre içi oksidatif stres oluşturduğunu ve redoks dengesini bozduğunu ortaya koymaktadır. A β_{42} uygulamasını takiben serbest NAC ve NAC-B6-NP ile muamele edilen gruplarda ise toplam oksidan seviyelerinde anlamlı düzeyde bir azalma saptanmıştır ($p < 0.0001$) (Şekil 30B). Bu bulgular, hem serbest NAC'ın hem de nanopartikül formülasyonunun A β_{42} kaynaklı oksidatif strese karşı baskılayıcı etki gösterdiğini ve redoks homeostazını kısmen geri kazandırabildiğini göstermektedir.



4.4.7. Total süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Aβ₄₂O ile 24 saatlik uygulamanın ardından, kontrol grubuna kıyasla total SOD aktivitesinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 31). Bu sonuç, Aβ₄₂O'nun hücre içi oksidatif stres oluşturduğunu ve endojen antioksidan savunma sistemlerini baskılayabildiğini göstermektedir. Aβ₄₂O uygulamasını takiben serbest NAC ile muamele edilen hücrelerde SOD aktivitesi belirgin şekilde artmış ($p < 0.05$), NAC-B6-NP uygulamasında ise bu artış daha anlamlı düzeye ulaşmıştır ($p < 0.01$). Bu bulgular, NAC'ın antioksidan potansiyelini doğrularken, nanopartikül formülasyonunun kontrollü salım ve hücre içi etkinlik bakımından daha güçlü bir etki sağladığını ortaya koymaktadır.

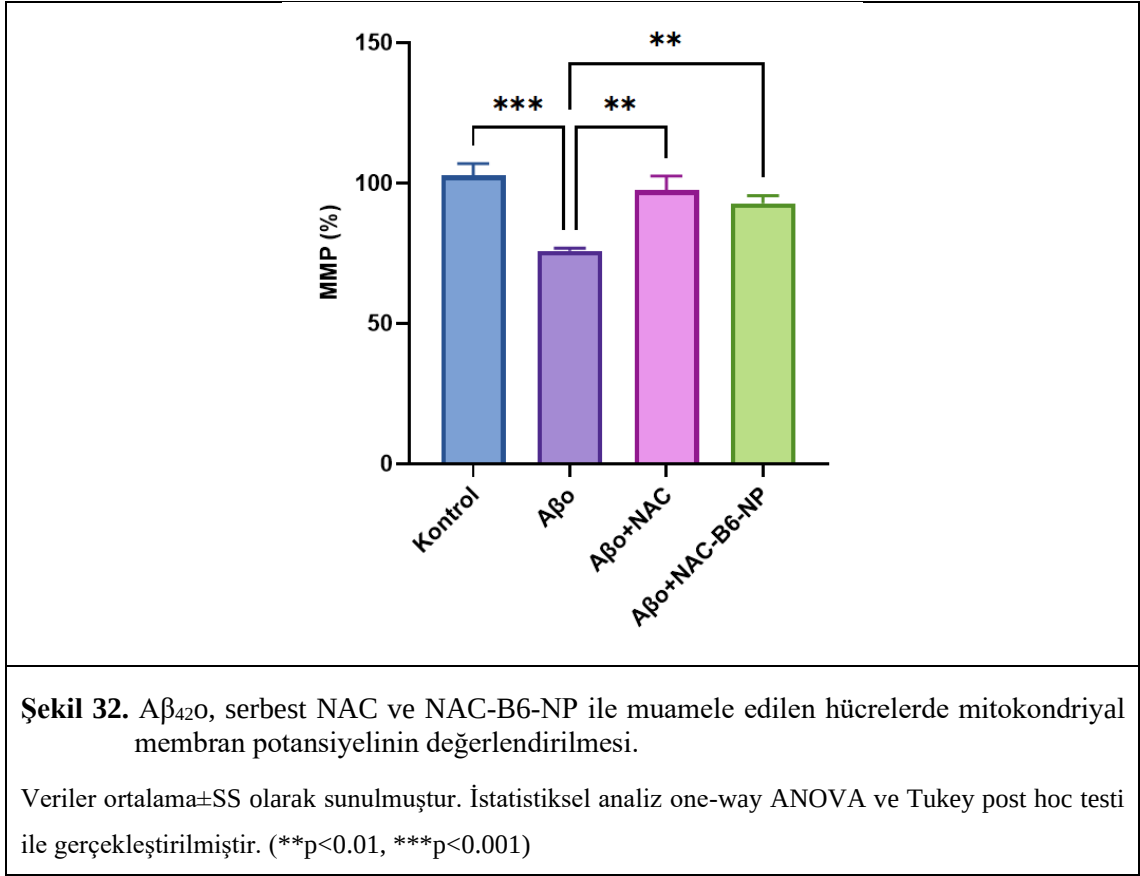


Şekil 31. Aβ₄₂O, serbest NAC ve NAC-B6-NP ile muamele edilen hücrelerde SOD aktivitelerinin karşılaştırılması.

Veriler ortalama ± SS olarak sunulmuş, istatistiksel analiz one-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir. (*p<0.05, **p<0.01)

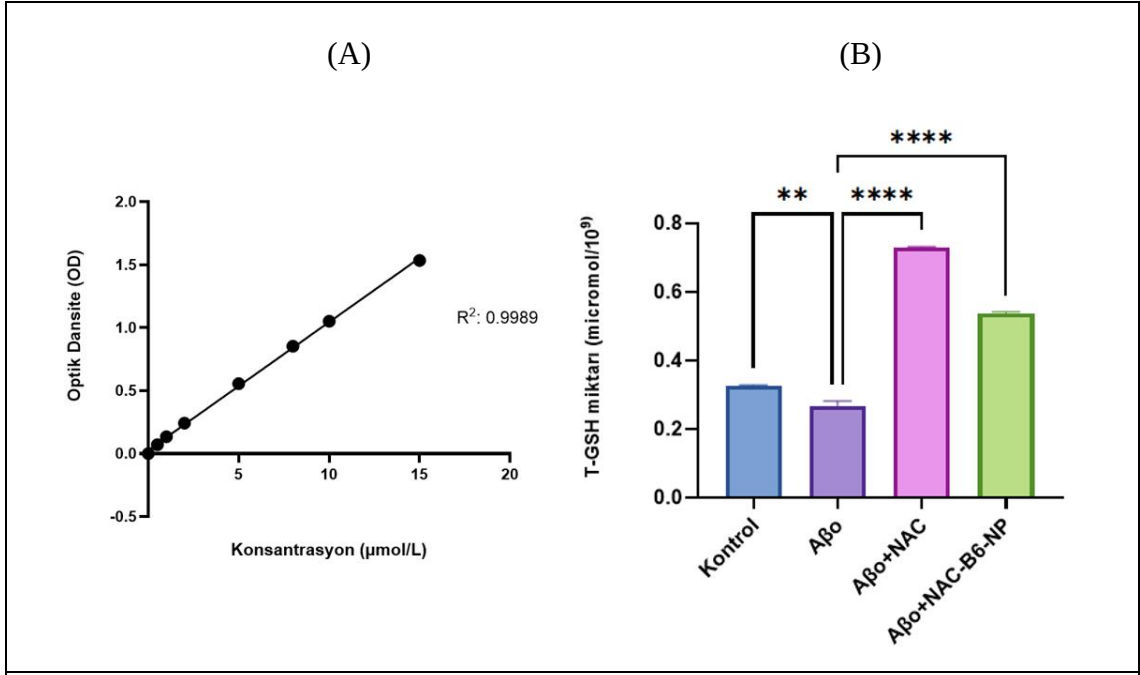
4.4.8. Mitokondriyal disfonksiyon analizi

Aβ₄₂O'nun 24 saatlik inkübasyonunun ardından hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinde (MMP) anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (p<0.001) (Şekil 32). JC-10 boyası ile yapılan ölçümler sonucunda elde edilen kırmızı/yeşil floresans oranları kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve mitokondriyal fonksiyonel bütünlük kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Aβo uygulaması üzerine serbest NAC uygulaması bu düşüşü anlamlı düzeyde toparlamıştır (p<0.01). NAC-B6-NP grubunda da membran potansiyelinde anlamlı bir artış saptanmış olup (p<0.01), serbest NAC'a benzer düzeyde mitokondriyal koruma sağlamıştır. Bu bulgular, hem serbest hem de nanopartikül formülasyonlarının Aβ₄₂O kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonu azaltıcı etkilerini ortaya koymaktadır.



4.4.9. Total glutatyon seviyesinin belirlenmesi

Aβ₄₂₀'nun 24 saatlik uygulanmasının ardından, öncelikle standar eğri grafiği oluşturulmuş (Şekil 33A) ve yapılan analizde kontrol grubuna kıyasla T-GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (p<0.01). Bu durum, Aβ₄₂₀'nun hücre içi antioksidan sistem üzerinde baskılayıcı etki oluşturduğunu göstermektedir. Aβ₄₂₀ uygulaması sonrasında serbest NAC verilen grupta T-GSH seviyeleri anlamlı düzeyde artış göstermiştir (p<0.0001). Benzer şekilde, NAC-B6-NP uygulanan grupta da T-GSH düzeyleri anlamlı olarak yükselmiştir (p<0.0001) (Şekil 33B). Bu bulgular, her iki NAC formülasyonunun da hücrel antioksidan kapasiteyi etkin biçimde artırdığını ortaya koymaktadır.

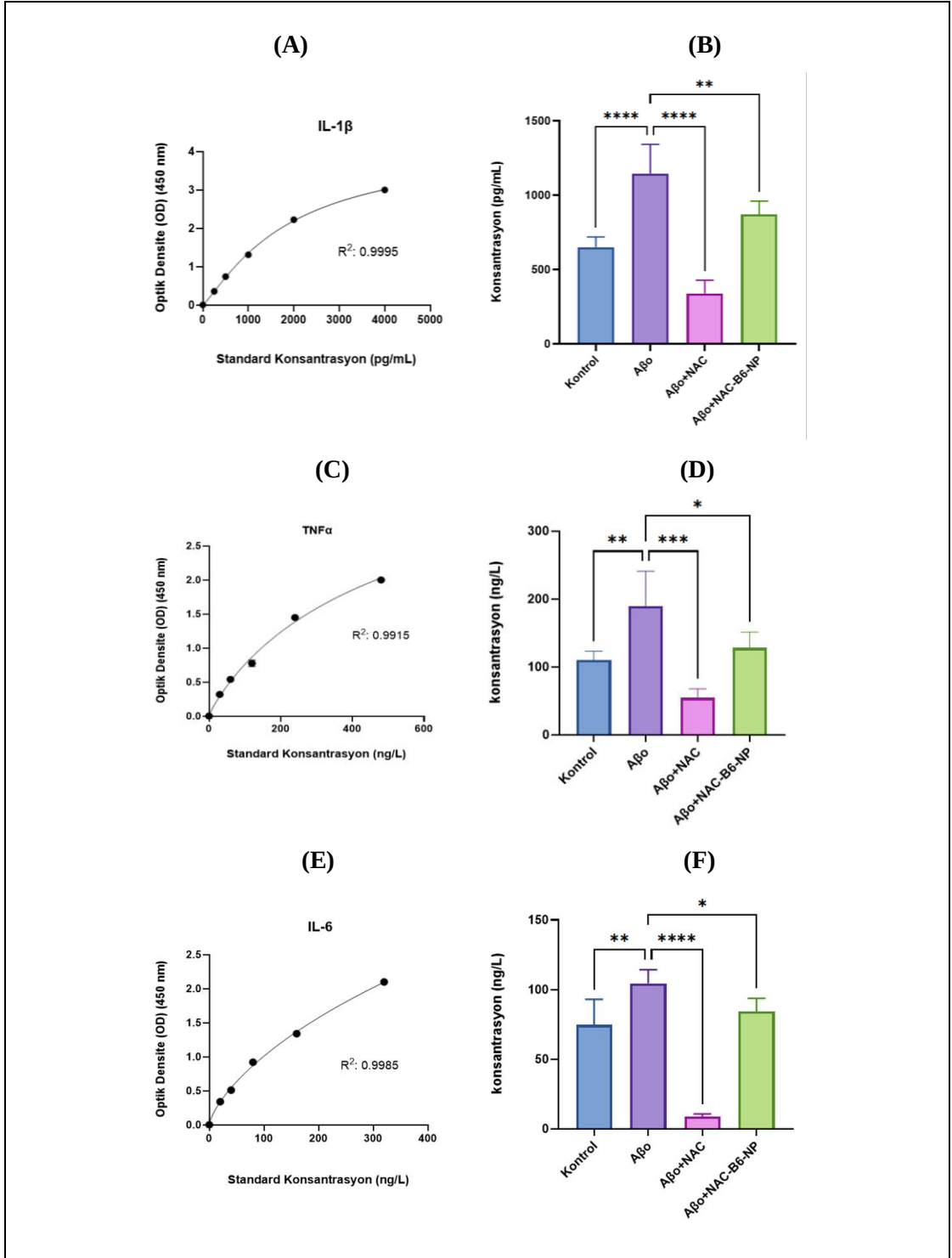


Şekil 33. A β ₄₂₀, serbest NAC ve NAC-B6-NP ile muamele edilen hücrelerde T-GSH düzeylerinin karşılaştırılması.

(A) standart eğri doğrusal regresyon modeli ile elde edilmiştir ($R^2 = 0.9989$). (B) gruplar arası karşılaştırma. Veriler ortalama $\pm$ SS olarak sunulmuş, istatistiksel analiz one-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir. (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$)

4.4.10. Sitokin seviyelerinin belirlenmesi

A β ₄₂₀ ile 24 saat süreyle muamele edilen hücrelerde, proinflatuar yanıtı değerlendirmek amacıyla IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. A β ₄₂₀ uygulaması, tüm sitokinlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artışa neden olmuştur (sırasıyla $p < 0.0001$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). Bu sonuçlar, A β ₄₂₀'nun hücrelerde inflammatuar yanıt oluşturduğunu ve nöroinflamasyonu tetiklediğini göstermektedir. Serbest NAC uygulaması, özellikle IL-1 β ve IL-6 düzeylerinde belirgin bir azalma sağlamış ($p < 0.0001$), TNF- α düzeyinde ise anlamlı bir baskılayıcı etki göstermiştir ($p < 0.001$). NAC-B6-NP grubu ile A β ₄₂₀ grubu arasında IL-1 β ($p < 0.01$), IL-6 ve TNF- α ($p < 0.05$) açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. NAC-B6-NP uygulaması da tüm sitokinlerde düşüş sağlamış, ancak serbest NAC'a kıyasla bu azalma daha ılımlı düzeyde kalmıştır. Standart eğriler (Şekil 34A-C-E) kullanılarak tüm gruplara ait kantitatif değerler (Şekil 34B-D-F) hesaplanmış ve sunulmuştur.



Şekil 34. A β_{420} toksisitesi oluşturulan hücrelerde IL-1 β , TNF- α ve IL-6 sitokin seviyelerinin ELISA yöntemiyle tayini.

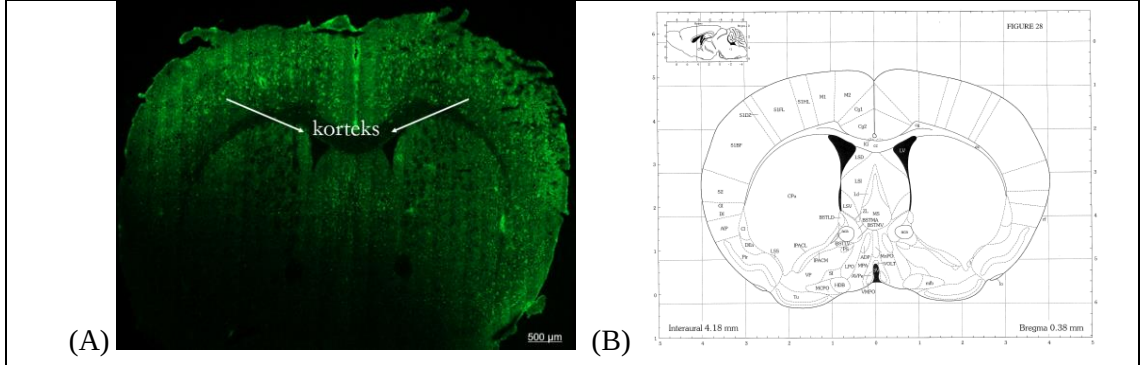
(A-C-E) her bir sitokin için oluşturulan standart eğriler. (B-D-F) gruplar arası karşılaştırma. Veriler ortalama $\pm$ SS olarak sunulmuş, istatistiksel analiz one-way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile gerçekleştirilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4.4.11. Nanopartiküllerin *in vivo* kan-beyin bariyeri geçişi

Nanopartiküllerin *in vivo* KBB geçişini ve beyin içindeki dağılımlarını göstermek amacıyla, NAC-FITC-B6-NP formülasyonu 5XFAD transgenik farelere i.p. yoldan uygulanmış ve 1 saat sonrasında alınan beyin dokularındaki nanopartikül dağılımı konfokal mikroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 35). Ayrıca, farklı beyin bölgesine ait kesitlerde ise, nöron-spesifik NeuN immünboyaması ile birlikte çekirdek işaretleyici DAPI kullanılarak yapılan immünohistokimyasal analizlerin konfokal mikroskopi görüntüleri Şekil 36'da; floresan mikroskopi ile elde edilen görüntüleri Şekil 37'de sunulmuştur. Konfokal mikroskopisi ile elde edilen koronal beyin kesitlerde, FITC sinyalinin beyin parankiminde geniş bir alana yayıldığı ve geçişin başarıyla sağladığı gösterilmiştir (Şekil 35, 36).

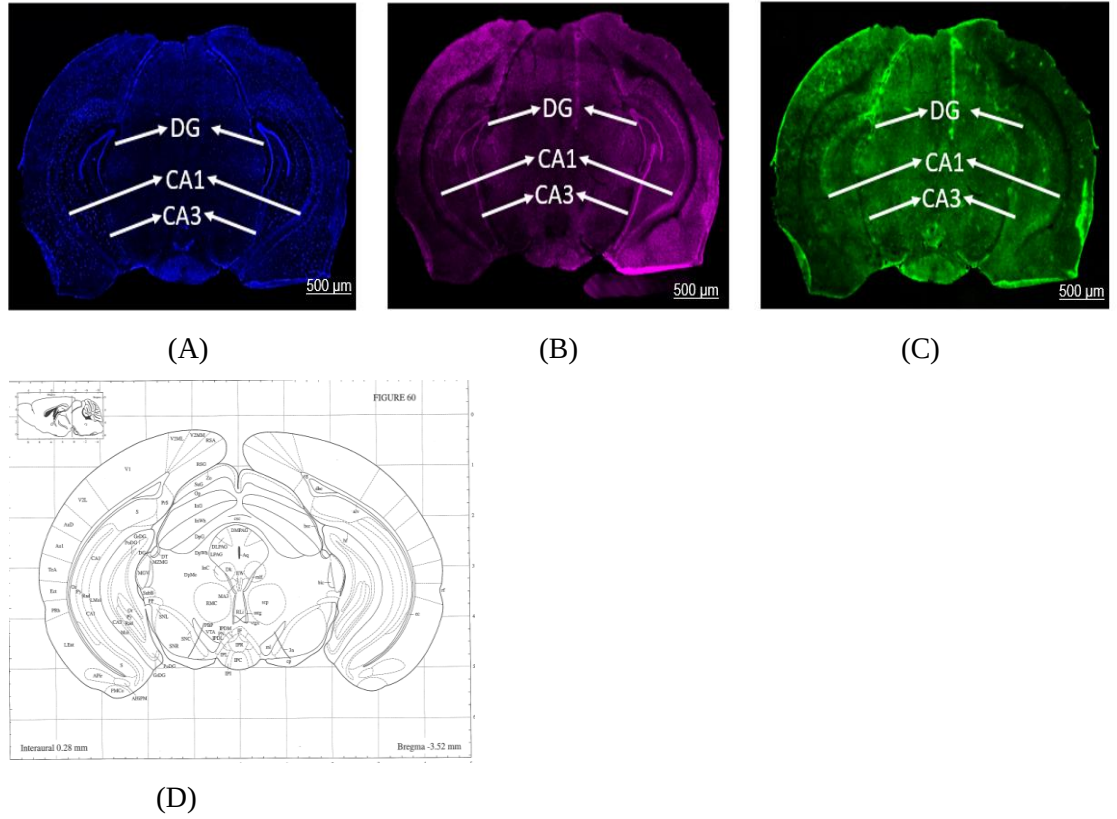
Beyin koronal kesitlerinden elde edilen yeşil floresan sinyal, nanopartiküllerin MSS boyunca başarılı bir şekilde dağıldığını, KBB'yi geçebildiğini (Şekil 35A) ve korteks bölgesinde daha belirgin şekilde biriktiğini ortaya koymuştur. Bu dağılım paternine ait anatomik doğrulama ise Paxinos ve Franklin (2004) fare beyin atlası referans alınarak değerlendirilmiştir (Şekil 35B).

Aynı nanopartiküllerin beyin içi bölgesel dağılımını daha ayrıntılı değerlendirmek amacıyla farklı kesitlerde immünohistokimyasal boyama sonucu yapılan konfokal görüntüleme analizleri, nükleer boyama (DAPI-mavi) (Şekil 36A), nöron boyaması (NeuN-magenta) (Şekil 36B) ve nanopartikül ışıması (FITC-yeşil) (Şekil 36C) olarak gösterilmiştir. Nanopartiküllerin hipokampusun alt bölümlerinde (CA1, CA3 ve dentat girus (DG)) anlamlı düzeyde birikim gösterdiği tespit edilmiştir. Üç ayrı kanaldan alınan görüntüler karşılaştırıldığında, FITC sinyal yoğunluğunun CA1 ve DG bölgelerinde arttığı görülmüştür. Görüntüler, Paxinos ve Franklin fare beyin atlası referans alınarak değerlendirilmiştir (Şekil 36D).



Şekil 35. NAC-B6-FITC-NP formülasyonunun 5XFAD fare ön beyin bölgesindeki anatomik dağılımının konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi.

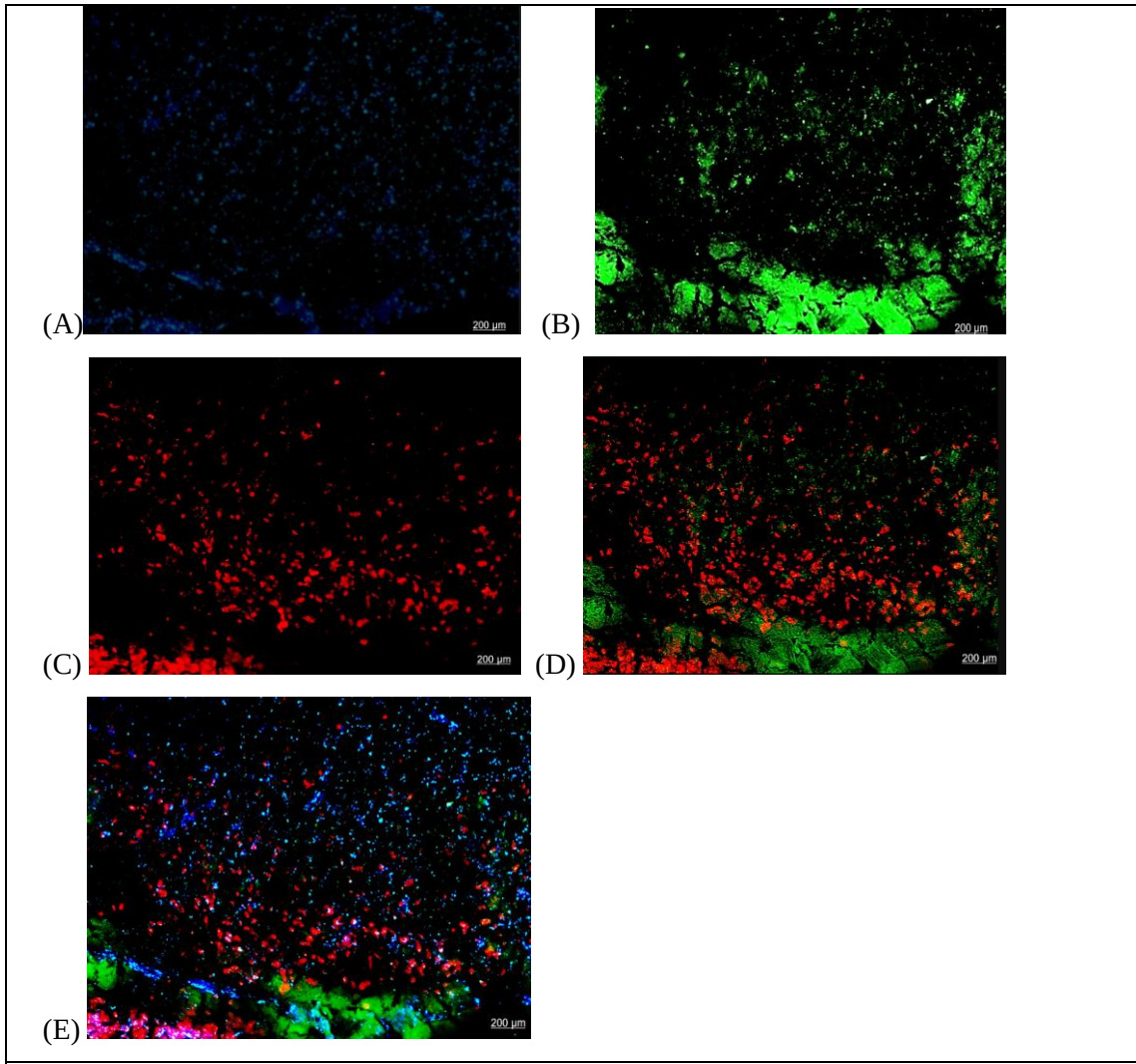
(A) NP'nin beyin içinde dağılımı (yeşil). (B) Fare beynine ait koronal kesitte anatomik yapıların stereotaksik koordinatlara göre gösterimi (Bregma: 0.38 mm) (Şekil Paxinos & Franklin, (2004) beyin atlası kitabından alınmıştır)



Şekil 36. NAC-B6-FITC-NP formülasyonunun 5XFAD fare arka beyin bölgesindeki anatomik dağılımının konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi.

(A) Çekirdeklerin DAPI ile görüntülenmesi (mavi). (B) Nöronların NeuN ile görüntülenmesi (magenta). (C) NP'nin beyin içinde dağılımı (yeşil). (D) Fare beynine ait koronal kesitte anatomik yapıların stereotaksik koordinatlara göre gösterimi (Bregma: -3.52 mm) (Şekil Paxinos & Franklin, (2004) beyin atlası kitabından alınmıştır)

Yine aynı formülasyonunun floresan mikroskopisi ile yapılan değerlendirmelerinde (Şekil 37A–E), özellikle (B), (D) ve (E) panelleri, B6 peptidi sayesinde nanopartiküllerin KBB’yi geçtiğini göstermiştir. Nükleer işaretleyici DAPI ile hücre çekirdeklerinin lokalizasyonu net şekilde saptanırken, NeuN ile yapılan boyamada kırmızı floresan sinyaliyle tanımlanan nöronlarda FITC ile örtüşen alanlar görülmektedir. Bu bulgular, B6 peptidinin TfR1 aracılığıyla gerçekleştirdiği hedefleme stratejisinin, sistemik uygulama sonrasında nanopartiküllerin KBB’yi aşmasını mümkün kıldığını ortaya koyar.



Şekil 37. NAC-FITC-B6-NP formülasyonunun 5XFAD fare beyinlerinde dağılımının floresan mikroskopi ile değerlendirilmesi.

(A) Çekirdeklerin DAPI ile görüntülenmesi (mavi). (B) NP beyin içinde dağılımı (yeşil). (C) Nöronların NeuN ile görüntülenmesi (kırmızı). (D) NP’nin nöronlarla birlikte görüntülenmesi. (E) NP, nöron ve çekirdeklerden gelen sinyallerin birlikte gösterimi.

5. TARTIŞMA

Nanobilim, yığın (bulk) malzemelerin moleküler ve atomik düzeyde yapılandırılmasını ve bu düzeyde ortaya çıkan kuantum etkilerini inceleyen bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji ise maddeyi nanometrik ölçekte gözlemleme, tasarlama, kontrol etme ve fonksiyonel yapılara dönüştürme becerisine odaklanır (Bayda vd., 2019). Bu alandaki gelişmeler, özellikle ilaç taşıma sistemlerinde önemli bir rol oynar. Nanotıp, nanoteknoloji ile tıbbın birleşimi olarak tanımlanır ve terapötik ajanların nano-boyutta formüle edilerek, hedef dokulara güvenli ve etkin şekilde taşınmasını amaçlayan bir yaklaşımdır (Jagaran & Singh, 2021).

AH, demans vakalarının %60–80’ini oluşturan, bilişsel işlevlerde ve hafıza yetilerinde kademeli kayıpla seyreden ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Jagaran & Singh, 2021). Hastalığın patofizyolojisinde A β peptidlerinin, özellikle de A β_{42} türünün oligomerik yapılar hâlinde birikimi merkezi bir rol oynar. Bu A β_{42} oligomerleri (A β_{42O}), hücre dışı plaklardan önce nöronal membranlarda birikerek, hücre içi kalsiyum dengesini bozar, mitokondriyal disfonksiyona neden olur ve proinflamatuvar yanıtları tetikleyerek nöronal hasarı başlatır (Zhang vd., 2023). Ayrıca, AH’de redoks dengesizliği, ROS üretiminde artış ve buna bağlı oksidatif stres ile birlikte ilerleyen nöroinflamatuvar süreçler, hastalığın ilerleyişinde belirleyici faktörler arasında yer alır (Viola & Klein, 2015; Heneka vd., 2015).

TfR1, demir taşınımında görevli bir membran proteini olup, özellikle KBB’deki endotel hücrelerde ve yüksek metabolik aktiviteye sahip nöronlarda yoğun şekilde eksprese edilir (Moos & Morgan, 2000; Thangudu vd., 2020). Bu özellikleriyle TfR1, hem KBB’yi geçmek hem de nöronları hedeflemek amacıyla tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemler için stratejik bir hedef haline gelir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında B6 peptidinin konjugasyonu ile geliştirilen nanopartikül formülasyonun, TfR1’i hedefleyerek hem KBB geçişi hemde nöronlara lokalizasyonunu sağlayacağı öngörülmüştür.

NAC, redoks-aktif bir ajan olarak GSH sentezini destekler ve ROS’u baskılayarak hücre içi savunma sistemlerini güçlendirir. Ancak kısa yarı ömrü, düşük biyoyararlanımı ve beyin dokusuna sınırlı geçişi nedeniyle sistemik kullanımda etkinliği kısıtlıdır (Tenório vd., 2021). Serbest sülfhidril gruplarının plazma proteinleriyle disülfid bağlar oluşturması, NAC’ın dolaşımında hızla inaktive olmasına ve daha yüksek, tekrarlanan doz ihtiyacına yol

açar (Harada vd., 2002; Lomelí Martínez vd., 2025). Bu sınırlamaları aşmak amacıyla, bu çalışmada NAC, hedeflenebilir ve kontrollü salım sağlayan bir nanopartikül sistemine entegre edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, serbest NAC uygulamasının farmakokinetik sınırlamalarını aşmak amacıyla, mPEG-PLGA bazlı, B6 peptidi ile yüzey modifiye edilmiş ve NAC yüklü bir nanopartikül sistemi (NAC-B6-NP) geliştirilmiştir. Sistem, hem oksidatif stres hem de inflamatuvar yanıtı hedef alan çok işlevli bir yapı sunarak AH'yi taklit eden A β ₄₂o bazlı *in vitro* modelde kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Özellikle mPEG modifikasyonu, sistemin dolaşım süresini artırarak fagositozdan kaçışı kolaylaştırırken, PLGA iskeleti biyobozunur yapısıyla kontrollü ilaç salımına olanak tanır. Yüzeyde yer alan B6 peptidi, TfR1 üzerinden hem KBB geçişini mümkün kılmak üzere seçilmiştir. Bu çok bileşenli yapı sayesinde, NAC'ın biyoyararlanımını ve terapötik süresini artırmak hedeflenmiş; aynı zamanda nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde gereksinim duyulan hücre içi hedefli etki potansiyeli sunulmuştur.

Geliştirilen sistemin temel bileşeni olan PLGA (RG502), düşük moleküler ağırlığı (7–17 kDa) sayesinde hızlı bozunabilen ve kontrollü ilaç salımı sağlayan biyobozunur bir polimerdir. mPEG segmenti, bu yapıya amfifilik özellik kazandırarak opsonizasyonu azaltır, dolaşım süresini uzatıp kolloidal stabiliteyi artırır (Makadia & Siegel, 2011; Danhier et al., 2012; Zhi vd., 2021). Literatürde PEG-PLGA sistemlerinin bu avantajları nedeniyle özellikle KBB hedefli ilaç taşıma çalışmalarında yaygın şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. (Riccardi vd., 2021; Pinto vd., 2022). Sistemin yüzeyine eklenen B6 peptidi, TfR1'e olan yüksek afinitesi sayesinde hem KBB geçişini kolaylaştırır hem de nöronal hedeflemeyi mümkün kılar (Liu vd., 2013; Yin vd., 2015; Fan vd., 2018; Zhang vd., 2022). Bu çalışmada, mPEG-PLGA yapısı özgün bir çift aşamalı modifikasyon süreciyle fonksiyonelleştirilmiştir: Maleik anhidrit aracılığıyla polimere iki ayrı bağ kazandırılmış, bu yapı HDMA ile amin uç gruplarına dönüştürülmüş ve sonrasında EDAC aracılığıyla amid bağı üzerinden B6 peptidi kovalent olarak bağlanmıştır. Literatürde B6 peptidi ile modifiye edilen nanopartikül sistemlerinin beyin hedeflemesi açısından etkinliği gösterilmiş olmakla birlikte (Liu vd., 2013; Fan vd., 2018; Zhang vd., 2022), bu çalışmanın farkı, redoks-aktif bir ajan olan NAC'ın bu sistem içinde yüksek stabiliteyle taşınabilmiş olmasıdır. Bu durum, hem yük taşıma kapasitesi hem de biyoyoumluluk açısından literatüre özgün bir katkı sunar.

Nanopartikül formülasyonundaki NAC miktarının doğru ve hassas biçimde belirlenebilmesi için, çalışmada geliştirilen HPLC yöntemi ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun şekilde valide edilmiştir. Yöntem; doğrusallık (lineerlik), kesinlik, tekrarlanabilirlik ve seçicilik gibi temel validasyon kriterlerini başarıyla karşılamıştır. Elde edilen geri kazanım oranlarının %98–102 aralığında olması ve %BSS değerlerinin <%2 olması, yöntemin güvenilirliğini ortaya koymuştur. Ayrıca, belirlenen LOD (0.015 µg/mL) ve LOQ (0.046 µg/mL) değerleri yöntemin yeterli duyarlılığa sahip olduğunu gösterir. Bu düzeyde hassasiyet, özellikle kontrollü salım sistemlerinde ilacın düşük konsantrasyonlarda bile kantitatif takibinin yapılabilmesi açısından önemlidir. Bu bağlamda, geliştirilen HPLC yöntemi yalnızca validasyon kriterlerini karşılamakla kalmamış, aynı zamanda NAC'ın salım kinetiği ve enkapsülasyon analizlerinde güvenilir ölçümler yapılmasına olanak tanımıştır (Bose, 2014; Prakasha Gowda vd., 2020).

Nanopartikül sisteminin yapısal doğrulaması, FT-IR, ¹H NMR ve GPC/SEC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. FT-IR spektrumlarında, peptid konjugasyonuna bağlı olarak oluşan amid bağlarının varlığını doğrulamıştır. Bu sinyaller, polimerin başarılı şekilde modifiye edildiğini ve peptid konjugasyonunun kimyasal olarak gerçekleştiğini gösterir. Ayrıca, ¹H NMR analizinde, B6 peptidine özgü proton kaymalarının belirli kimyasal kayma değerlerinde (ppm) gözlemlenmesi, konjugasyonun yapısal düzeyde de doğrulandığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, Fan vd. (2018) ve Liu vd. (2013) gibi çalışmalarda bildirilen peptid-konjugasyon doğrulama kriterleri ile uyumludur. Sistem homojenliğinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen GPC/SEC analizlerinde, <1.3 düzeyinde elde edilen PDI değerleri, polimer zincirlerinin dar moleküler ağırlık dağılımına sahip olduğunu ve kontrollü bir sentez sürecinin başarıyla yürütüldüğünü gösterir.

Fiziksel karakterizasyon analizleri, NAC-B6-NP sisteminin biyolojik hedefleme ve sistemik stabilite açısından uygun özellikler taşıdığını ortaya koymuştur. DLS analizlerinde, nanopartiküllerin ortalama boyutu <200 nm olarak ölçülmüş ve PDI değeri <0.2 bulunmuştur. Bu ölçümler, KBB'yi geçebilecek boyut aralığına işaret ederek, Beach vd., (2024), Saraiva vd., (2016) ile Kulkarni & Feng (2013) tarafından önerilen KBB geçirgenlik kriterleriyle uyumludur. Sistem yüzeyine ait ZP değerlerinin -30 mV altında olması, kolloidal stabilitenin yüksek olduğunu gösterir. Ayrıca, pH değişimine bağlı olarak artan negatif yük, yüzeydeki amin gruplarının iyonizasyonu ile açıklanır. Bu durum, sistemin çevresel pH değişikliklerine karşı kararlılığını artırır (Calvo vd., 1997). Bu bulgular, PEG-PLGA sistemlerinin beyin hedefleme çalışmalarında tercih edilme

nedenlerinden biri olan yüzey yük-kararlılık ilişkisiyle doğrudan örtüşür (Nafie vd., 2024). Sistemin sterilizasyon sonrası stabilitesi değerlendirilerek UV ışınlarına maruz bırakılan nanopartiküllerde, boyut ve PDI değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, yapısal bütünlüğün korunduğunu ve *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda steril koşullarda kullanılabilirliğin mümkün olduğunu gösterir (Tapia-Guerrero vd., 2020). Ayrıca, STEM görüntülemelerinde gözlenen düzgün küresel morfoloji, sistemin hem fiziksel hem de yapısal olarak homojen bir yapıya sahip olduğunu doğrulamıştır (Watcharadulyarat vd., 2023). Bu özellikler, hedefli ilaç taşıma sistemleri için kritik öneme sahiptir.

Geliştirilen NAC-B6-NP sisteminde, %74 oranında elde edilen yüksek enkapsülasyon verimi, NAC'ın hidrofilik doğası göz önünde bulundurulduğunda oldukça dikkat çekicidir. Bu sonuç, NAC moleküllerinin mPEG-PLGA matrisine etkin şekilde entegre edildiği ve sistemin yük taşıma kapasitesinin yüksek olduğu anlamına gelir (Puri vd., 2022). Literatürde, benzer sistemlerde genellikle yaklaşık en çok %60 kapsülleme verimliliği rapor edilmiştir (Ahmaditabar vd., 2017; Chiesa vd., 2017; Lancheros vd., 2018; Fan vd., 2018). Örneğin, Chiesa vd. (2017), NAC'ın PLGA nanopartiküller içinde %59 oranında enkapsüle edildiğini; Fan vd. (2018) ise B6 peptidi ile modifiye edilmiş kurkumin yüklü PEG-PLGA sisteminde sadece %15'lik verim elde edildiğini bildirmiştir. Öte yandan, Lancheros vd. (2018), hidrofilik bileşiklerin de nanopartiküller ile taşınabileceğini göstermek amacıyla NAC yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamış ve yalnızca %0.4'lük bir enkapsülasyon verimi elde etmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen yüksek verimin, PEG segmentinin sulu ortamlarla olan yüksek uyumu, EDAC aracılı amid bağı oluşturma etkinliği, ve yüzeydeki amin gruplarının yük dağılımını optimize etmesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çift aşamalı yüzey modifikasyonu, taşıyıcı-yük etkileşimini artırarak sistemin hem yükleme hem de salım verimliliğini desteklemiştir.

In vitro salım analizlerinde, NAC-B6-NP sisteminin 48 saat boyunca kademeli ve kontrollü bir salım sağladığı (96.2 ± 1.3) belirlenmiştir. Buna karşılık, serbest NAC'ın aynı koşullarda 30 dakika içinde tamamen salındığı gözlemlenmiştir. Bu durum, nanopartikül formülasyonunun NAC'ın kısa yarı ömrü ve sistemik kararsızlığı gibi farmakokinetik sınırlamalarını önemli ölçüde iyileştirdiğini ve terapötik etki süresini uzatma potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Literatürde PLGA temelli sistemlerin kontrollü ve uzun süreli salım sağlama kapasitesi daha önce çeşitli çalışmalarla

vurgulanmıştır (Danhier vd., 2012; Sánchez-López vd., 2018; Puri vd., 2022; Iqbal vd., 2024). Ancak bu çalışmada elde edilen salım süresi ve enkapsülasyon verimi birlikte değerlendirildiğinde, sistemin verimlilik açısından oldukça üstün olduğu görülür. Örneğin, Chiesa vd. (2017) NAC yüklü PLGA nanopartiküllerde, ilacın tamamının yalnızca 60 dakika içinde salındığını, Puri vd. (2022) ise yine NAC yüklü PLGA nanopartiküllerinin ilk 12 saatte %64'lük ani salım yaptığını rapor etmiştir. Fan vd. (2018) tarafından AH modeli için geliştirilen, B6 peptidi ile modifiye edilmiş kurkumin yüklü PEG-PLGA sisteminde ise 12 saatte %75 salım gerçekleşmiştir. Bu tez çalışmasında ise ilk saatlerden itibaren kademeli şekilde ilerleyen ve 12. saatte %58'e ulaşan salım profili, 48 saate kadar uzatılmış kontrollü salım sayesinde NAC'ın hedef dokuya uzun süreli ve dengeli bir şekilde iletimine olanak sağlamıştır. Kontrollü salım, yalnızca sistemik toksisiteyi azaltmakla kalmaz; aynı zamanda doz sıklığını düşürerek hasta uyumunu artırabilir (Danhier vd., 2012; Riccardi vd., 2021; Pinto vd., 2022). Bu özellikler, geliştirilen NAC-B6-NP sistemini özellikle kronik seyirli nörodejeneratif hastalıkların uzun vadeli tedavi stratejileri için etkili bir aday haline getirir.

Ek olarak, NAC'ın serbest formda sistemik dolaşıma uygulandığında hızlı plazma metabolizmasına uğraması ve düşük biyoyararlanıma sahip olması, klinik uygulamalarda terapötik etkinliğini sınırlandıran temel faktörler arasındadır. Plazmada bulunan proteinlerle serbest sülfhidril grubu üzerinden disülfid bağları oluşturan NAC, hızla inaktive olabilir; hedef dokulara etkin konsantrasyonda ulaşmadan elimine edilir (Lomelí Martínez vd., 2025). Bu çalışmada geliştirilen nanopartikül sistem, NAC'ı taşıyıcı matris içinde korunaklı bir yapıda tutarak, kontrollü salım yoluyla kademeli serbestlenmesini sağlamış ve böylece molekülün sistemik dolaşımında daha stabil bir formda kalmasına olanak tanımıştır. Bu özellik, yalnızca farmakokinetik avantaj sağlamaz; aynı zamanda hedef dokuya etkin dozda ulaşmayı ve terapötik etki süresinin uzatılmasını mümkün kılar. Benzer bir yaklaşımın daha önce dendrimer bazlı NAC taşıyıcı sistemlerde de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu sistemlerde NAC'ın hücre içi düzeyinin anlamlı şekilde arttığı raporlanmış (Navath vd., 2008; Wang vd., 2009) ve hatta klinik geliştirme aşamasına taşınan D-NAC formülasyonu ile mikrogial hedefleme sayesinde Faz 2a düzeyinde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Liyanage vd., 2024). Bu bağlamda, geliştirilen NAC-B6-NP sisteminin, serbest NAC formülasyonuna kıyasla metabolik bozulmaya karşı koruma sağlama ve hedef dokuya daha stabil iletim potansiyeli sunduğu görülür.

Yapılan serum stabilitesi analizleri, NAC-B6-NP sisteminin fizyolojik koşullarda ilk 4 saat boyunca partikül boyutunu <200 nm seviyesinde koruduğunu ve bu süre içinde yüksek kolloidal stabilite sergilediğini ortaya koymuştur. 24. saatin sonunda partikül boyutunda artış gözlemlenmiş olsa da, bu değişimin sistemin hedefe ulaşma kapasitesini olumsuz yönde etkilemediği düşünülmektedir. NAC-FITC-B6-NP formülasyonunun 5x5AD fare modelinde i.p. enjeksiyonu sonrasında, yalnızca 1. saatte alınan beyin kesitlerinde yoğun floresan sinyal gözlemlenmiş ve etkin beyin geçişi doğrulanmıştır (Bölüm 4.4.11). Bu bulgu, nanopartikül sisteminin KBB'yi erken fazda başarıyla geçebildiğini göstermiştir. Literatürde de benzer şekilde, PEG-PLGA bazlı nanopartiküllerin sistemik uygulama sonrası beyin dokusuna 0–6 saatlik zaman diliminde ulaştığı bildirilmiştir (Fan vd., 2018; Liu vd., 2013; Wu vd., 2023). Bu doğrultuda, formülasyonun hedefe zamanında ulaşması sağlandığından, ilerleyen saatlerdeki çap artışının klinik açıdan belirleyici bir dezavantaj oluşturmadığı sonucuna varılabilir.

Elde edilen karakterizasyon verileri değerlendirildiğinde, geliştirilen NAC-B6-NP sistemi hedefleme kapasitesi artırılmış, yapısal olarak doğrulanmış, fiziksel olarak stabil, yüksek enkapsülasyon verimine sahip ve kontrollü salım sağlayabilen çok işlevli bir ilaç taşıyıcı platform olarak öne çıkmaktadır. Sistemin temel avantajları; B6 peptidi aracılığıyla TfR1 üzerinden KBB hedefleme, PEG-PLGA polimerinin kolloidal stabilite ve biyobozunabilirlik özellikleri ve NAC'ın oksidatif strese karşı koyan redoks-aktif özellikleriyle birleşerek AH gibi nörodejeneratif durumlara yönelik çok yönlü terapötik bir yaklaşım sunmasıdır.

AH'de temel patolojik faktörlerden biri olan A β ₄₂ nöronal hücrelerde oluşturduğu toksik etki nedeniyle SH-SY5Y hücreleri kullanılarak sıkça *in vitro* modelleme amacıyla tercih edilir. A β ₄₂'nin, hücre zarındaki NMDA ve prion benzeri reseptörler üzerinden kalsiyum girişini artırdığı, mitokondriyel membran potansiyelini bozduğu, ROS üretimini tetiklediği ve inflamatuvar yanıtları aktive ettiği gösterilmiştir (Viola & Klein, 2015; Heneka vd., 2015; Butterfield & Halliwell, 2019; Mroczko vd., 2018; Atlante & Valenti, 2022). Bu mekanizmalar, AH patofizyolojisinde nöronal hasarın ve hücre ölümünün temel nedenleri arasında yer alır. Bu nedenle, kullanılan A β ₄₂ toksisite modeli, hem hücresel hasar mekanizmalarını anlamak hem de terapötik sistemleri değerlendirmek için oldukça uygun bir zemin sunar.

Bu bağlamda ilk olarak ilaç gruplarının sağlıklı hücrelerde canlılığa etkileri belirlenmiştir. Serbest NAC grubunda, en yüksek canlılık 10 mM konsantrasyonda elde edilmiş ve bu doz, belirlenen EC_{50} (4.115 mM) değerine yakın bulunmuştur. Ayrıca bu değer, toksisite eşiği olan IC_{50} (41.56 mM) seviyesinin altında kalarak güvenli sınırlar içinde yer almıştır. Literatür verileriyle karşılaştırıldığında, NAC'ın hücreleri 5–10 mM aralığında oksidatif strese karşı koruduğu benzer şekilde bildirilmiştir (Venkataramana vd., 2014; Chamorro vd., 2023; Thu Nguyen vd., 2024). Formülasyonun taşıyıcı yapısı olan mPEG-PLGA-B6 nanopartiküller, hücrelerde 300 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar toksik etki oluşturmamış ve biyoyumluluğunu doğrulamıştır. NAC-B6-NP grubunda ise 25 $\mu\text{g/mL}$ nanopartikül dozunda ($\sim 4.15 \mu\text{g/mL}$ NAC) en yüksek hücre canlılığı elde edilmiştir. Bu doz, belirlenen EC_{50} (8.617 $\mu\text{g/mL}$) ve IC_{50} (126.8 $\mu\text{g/mL}$) değerlerinin arasında kalarak, serbest NAC'a kıyasla yaklaşık 40 kat daha düşük bir NAC dozu ile benzer koruyucu etki sağlandığını gösterir. Bu çarpıcı sonuç, nanopartikül sisteminin biyoyararlanımı artırma ve hücre içi hedefli dağılım gibi avantajlarından kaynaklanır. Ayrıca, NAC'ın hücre içi redoks sistemine etkisi doza bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Düşük ve orta dozlarda glutasyon düzeyini artırarak hücre canlılığını desteklerken, yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan etki göstererek mitokondriyal disfonksiyona ve stres yanıtına neden olabileceği bildirilmiştir (Atkuri vd., 2007; Cheng vd., 2023).

Akım sitometrisi ile gerçekleştirilen analizlerde, mPEG-PLGA temelli nanopartikül formülasyonlarının hücre içi alım düzeylerinde anlamlı farklar saptanmıştır. FITC-NP kıyasla, NAC-FITC-B6-NP grubunda 1.88 kat daha yüksek hücre alım gözlenmiştir. Bu bulgular, mPEG-PLGA nanopartiküllerinin hücre zarını geçerek etkin biçimde hücre içine alındığını ve B6 peptidi ile yapılan yüzey modifikasyonunun bu alımı daha da artırdığını gösterir. Benzer şekilde, Fan vd. (2018) çalışmasında B6-PEG-PLGA nanopartikülleri, HT22 nöron hücrelerinde yaklaşık 1.5 kat daha yüksek alım sağlamıştır. Liu vd. (2013), bEnd.3 endotel hücrelerinde B6-PEG-PLA sistemleri ile 2.3 katlık bir artış raporlamış; De Capua vd. (2024) ise CRT peptidi ile modifiye edilen nanoemülsiyonlarda aynı hücre hattında 1.4 kat alım artışı gözlemlemiştir. Bu sonuçlara benzer şekilde, Mulik vd. (2012) tarafından SH-SY5Y hücrelerinde yapılan çalışmada, transferrin-konjuge solid lipid nanopartiküllerin hücre alımı kontrole kıyasla yaklaşık 3.5 kat artmış ve bu artışın transferrin ligandı aracılığıyla gerçekleşen aktif endositoza bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmaların büyük kısmında kullanılan hücre modelleri, SH-SY5Y gibi nöronal hücre hatlarından farklı olarak endotel kaynaklıdır.

TfR1, bu hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edildiğinden, transferrin ya da peptit temelli taşıyıcı sistemlerin alım verimliliği doğal olarak daha yüksek düzeydedir. Buna karşılık, bu çalışmada kullanılan SH-SY5Y nöronal hücre hattında, B6 peptidi ile modifiye edilen nanopartiküller yaklaşık 1.88 katlık bir alım artışı sağlamış ve bu düzey, transferrin benzeri ligandlarla elde edilen oranlara oldukça yakın bulunmuştur. Ayrıca, transferrin gibi büyük protein yapılı ligandlara kıyasla B6 peptidinin düşük moleküler ağırlığı, daha düşük immünojenisitesi, kararlı yapısı ve konjugasyon kolaylığı gibi farmasötik açıdan önemli avantajlar sunduğu göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen hücresel alım oranı dikkat çekici düzeydedir (Nie vd., 2011). Dolayısıyla, çalışmamızda elde edilen nicel veriler, B6 peptidinin hücresel alım açısından transferrin ve diğer alternatif peptitlerle karşılaştırılabilir düzeyde olduğunu ve nörodejeneratif hastalık modellerinde kullanılabilecek potansiyel bir hedefleme stratejisi sunduğunu göstermiştir.

A β ₄₂O'nun oluşturduğu *in vitro* AH modelinde gerçekleştirilen hücre canlılığı analizleri için, A β ₄₂O'nun 24 saatlik uygulaması sonucunda 4PL regresyon analizine göre IC₅₀ değeri 10.11 μ M olarak hesaplanmıştır. Bu değer, modelin sitotoksik etkisinin doz bağımlı olarak başarılı şekilde oluşturulduğunu ve sistemin terapötik testler için uygun olduğunu gösterir. STEM analizleri, A β ₄₂O'ların morfolojik olarak beklenen küresel yapıda oluştuğunu ortaya koymuştur. Elde edilen görüntüler, literatürde tanımlanan oligomer görselleri ile uyumlu olup, bu yapıların zamanla bir araya gelerek aglomere yapılara dönüşme eğiliminde olduğunu göstermektedir (Stine vd., 2003; Nath vd., 2012; Chunhui vd., 2018).

Oluşturulan toksisitenin ardından, serbest NAC uygulamasında, 10 mM (163.2 μ g) doz ile en yüksek hücre canlılığı elde edilmiş (%401.8), EC₅₀ değeri 5.2 mM olarak belirlenmiştir. NAC-B6-NP grubunda ise 25 μ g/mL (4.15 μ g NAC) ile %268.5 canlılık sağlanmış ve EC₅₀ değeri 13.26 μ g/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, nanopartikül sistemin çok daha düşük NAC miktarı ile anlamlı nöroprotektif etki gösterebildiğini ve A β ₄₂O kaynaklı sitotoksositeye karşı etkili koruma sağladığını ortaya koyar. Serbest NAC'ın düşük membran geçirgenliği, hızlı metabolizması ve kısa yarı ömrü gibi farmakokinetik sınırlamaları göz önüne alındığında, nanopartikül taşıma sisteminin hücre içi hedeflemeyi artırarak ve biyoyararlanımı iyileştirerek terapötik etkiyi anlamlı düzeyde yükselttiği değerlendirilebilir.

A β ₄₂0'nun hücre içi toksisite mekanizmasında, ROS üretimi ve antioksidan savunma sistemlerinin baskılanması temel bir yer tutar. Bu çalışmada, A β ₄₂0 uygulaması sonrası SH-SY5Y hücrelerinde TOS'un anlamlı şekilde arttığı ve redoks dengesinin bozulduğu gözlemlenmiştir. Serbest NAC ve NAC-B6-NP uygulamaları sonrası bu yükselişi anlamlı düzeyde baskılanmış; özellikle NAC-B6-NP grubunda kullanılan NAC miktarı serbest gruba kıyasla yaklaşık 40 kat daha düşük olmasına rağmen kontrol seviyesine inmiş ve oksidatif stres baskılanması elde edilmiştir. Bu bulgu, nanopartiküler sistemin redoks dengesini düzenlemede ne denli etkili olduğunu gösterir (Danhier vd., 2012; Yao vd., 2020).

Antioksidan savunmanın önemli bir bileşeni olan SOD aktivitesi, A β ₄₂0 uygulaması sonrası anlamlı şekilde azalmıştır. Bu, yalnızca oksidan yükün artmadığını, aynı zamanda endojen antioksidan sistemlerin inhibe edildiğini gösterir. Hem serbest NAC hem de NAC-B6-NP uygulamaları ise SOD aktivitesinde toparlanmaya yol açarken, nanopartikül formülasyonun daha düşük dozda daha belirgin etki oluşturması dikkat çekicidir. Bu durum, kontrollü salım ve hedefli alım mekanizmalarıyla NAC'ın süperoksit radikallerini detoksifiye etme kapasitesini geri kazandırdığını gösterir. Barreiro vd. (2005) A β 'nin mitokondriyal SOD aktivitesini inhibe ettiğini ve bu durumun hücrede mitokondriyal bozulmaları tetiklediğini göstermiştir. Nanopartikül formülasyonlarının ise antioksidan enzim aktivitelerini artırarak mitokondriyal fonksiyonları koruduğu belirtilmiştir (Chiang vd., 2020; Babylon vd., 2021).

Benzer şekilde GSH düzeylerinde A β ₄₂0'ya bağlı belirgin bir azalma, GSH sisteminin aşırı oksidan yük altında tüketildiğini ve yenilenemediğini gösterir. Serbest NAC uygulaması, GSH düzeylerini anlamlı düzeyde geri kazandırırken, NAC-B6-NP grubunda gözlenen daha ılımlı artış, kontrollü salımın yavaş ve sürdürülebilir etkisiyle açıklanabilir (Pinto vd., 2022; Beach vd., 2024). Ayrıca, nanopartikül formülasyonun düşük NAC içeriğine rağmen GSH düzeylerinde iyileşme sağlaması, doz-verimlilik açısından önemli bir avantaj sağlar. GSH düzeylerindeki bu toparlanma, NAC'ın sistin temin ederek GSH sentezini uyarıcı etkide bulunması, bu sonucu biyolojik olarak anlamlı kılar (Atkuri vd., 2007; Tenório vd., 2021; Zinatullina vd., 2021).

Nanopartikül formülasyonun bu etkileri, yalnızca NAC'ın hücre içine taşınmasını kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda hedefli, kontrollü ve dengeli salım yoluyla oksidatif stres yanıtlarını regüle edebildiğini gösterir. Bu çalışma daha düşük dozda

uygulanan nanopartikül sistemin benzer antioksidan etkiler sağlayabildiğini ortaya konmuştur.

Mitokondriyal disfonksiyon, AH erken dönemlerinde görülen önemli bir patolojik süreçtir. Literatürde, $A\beta_{42}$ 'nin elektron taşıma zinciri kompleks I ve IV aktivitelerini inhibe ettiği, mitokondri zar geçirgenliğini artırarak membran potansiyeli kaybına yol açtığı ve ATP üretimini azalttığı bir çok kez rapor edilmiştir (Atlante & Valenti, 2022; Viola & Klein, 2015). Bu çalışmada, $A\beta_{42}$ 'nin hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini anlamlı düzeyde azalttığı, dolayısıyla erken apoptotik süreçlerin aktive olduğu görülmüştür. Serbest NAC ve NAC-B6-NP uygulamaları, $A\beta_{42}$ kaynaklı potansiyel kaybını anlamlı düzeyde toparlamış ve mitokondriyal membran stabilitesini yeniden kazandırmıştır. Bu toparlayıcı etki, NAC'ın hücre içi GSH sentezini artırarak mitokondriyi oksidatif strese koruma mekanizmasıyla ilişkilendirilebilir (Atkuri et al., 2007; Zinatullina vd., 2021). NAC-B6-NP grubunda gözlemlenen güçlü toparlanma ise, mPEG-PLGA taşıyıcı sistemin kontrollü salım kapasitesi ve hedefli hücre alımı ile açıklanabilir. Nanopartikül formülasyonlarının, mitokondriyal disfonksiyonun tedavisinde umut verici bir yaklaşım olduğu literatürde de belirtilmiştir (Mukherjee vd., 2019; Chiang vd., 2020; Babylon vd., 2021; Buck vd., 2025). Örneğin, Buck vd. (2025), mitokondriye hedefli nanopartiküllerin ROS üretimini azalttığını, mitokondriyal membran potansiyelini koruduğunu ve mitokondriyal biyogenezi desteklediğini vurgular. Babylon vd. (2021) ise hesperetin nanokristallerinin, AH erken evresinde mitokondriyal disfonksiyonu hedef alarak hücresel enerji metabolizmasını iyileştirebileceğini göstermiştir. Sonuç olarak, bu bulgular NAC-B6-NP'nin yalnızca oksidatif stres değil, aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyonun iyileştirilmesinde de etkili olduğunu ortaya koyar; kontrollü salım, hedeflenmiş alım ve hücre içi dağılım özellikleri sayesinde klasik serbest NAC uygulamasına göre daha düşük dozda benzer veya üstün etki potansiyeli taşıdığını destekler.

AH'de nöronal hasar yalnızca oksidatif stresle sınırlı kalmaz, aynı zamanda inflamatuvar mekanizmalarla da derinleşir. $A\beta_{42}$ 'nin mikrogliya ve nöronal yüzey reseptörleriyle etkileşerek proinflamatuvar sitokinlerin salımını tetiklediği ve bu durumun sinaptik disfonksiyon, hücre içi stres ve nörodejenerasyon süreçlerini hızlandığı gösterilmiştir. Bu bağlamda, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler AH'nin erken dönemlerinde dahi artış gösterir ve nöronal ölümle ilişkilendirilir (Heneka vd., 2015; Wong vd., 2018; Mroczko vd., 2018). Bu çalışmada oluşturulan *in vitro* modelde, $A\beta_{42}$ uygulaması sonucunda söz

konusu üç sitokin düzeyinde anlamlı artış gözlemlenmiş ve bu durum modelin inflamatuvar geçerliliğini desteklemiştir. NAC ve NAC-B6-NP uygulamaları ile bu sitokinlerin her birinde farklı düzeylerde azalma sağlanmış; özellikle nanopartikül sistemin düşük dozda etkili olabilmesi, inflamasyon kontrolünde potansiyel avantaj sağlamıştır. IL-1 β , nöronal inflamasyonun başlatıcı mediatörlerinden biri olup, A β ₄₂₀ uygulaması sonrası *in vitro* modelde anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu artış, nörotoksik kaskadın erken aktivasyonunu ve inflamatuvar hücrel yanıtın başlangıcını temsil eder (Lomelí Martínez vd., 2025). Serbest NAC uygulaması, IL-1 β seviyelerinde çok anlamlı bir azalma sağlamış; ancak bu etki NAC-B6-NP grubunda da belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Yalnızca 4.15 μ g NAC içeren nanopartikül sistemin bu düzeyde inflamasyon baskılayıcı etki göstermesi, sistemin hücre içi hedefleme kapasitesi ve uzun süreli salım avantajı ile ilişkilendirilebilir. Literatürde de NAC'ın IL-1 β üretimini baskıladığı ve inflamasyon yanıtlarını azaltabildiği bildirilir (Palacio vd., 2011; Raghu vd., 2021); bu çalışmada ise nanopartikül formda bu etkinin daha düşük dozla sağlanabilmiş olması dikkat çekicidir. IL-6, A β ile tetiklenen nöroinflamasyon süreçlerinde önemli bir rol oynar; gliyal aktivasyonu ve nöronal fonksiyon kaybıyla ilişkilendirilir (Raghu vd., 2021). A β o uygulaması sonrasında IL-6 düzeylerinde gözlemlenen artış, modelin inflamatuvar yanıt oluşturma kapasitesini desteklemiştir. Serbest NAC uygulaması ile bu artış baskılanmış olsa da, NAC-B6-NP sisteminin daha düşük dozla azalma eğilimi göstermesi, sistemin daha hedefli ve sürdürülebilir inflamasyon kontrolü sağlayabildiğini gösterir. TNF- α , A β birikimiyle ilişkili nörotoksik olayların ve hücre ölümünün hızlandırılmasında önemli rol oynayan bir diğer sitokindir. Modelde, A β ₄₂₀ uygulamasını takiben TNF- α düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır (Shi vd., 2022). NAC uygulaması bu artışı azaltmış, ancak NAC-B6-NP grubunda bu baskılama kontrol seviyesine inmiştir. Bu bulgu, düşük dozda hedefli teslimatın proinflamatuvar sinyal yollarının daha etkin kontrolünü mümkün kılabileceğini gösterir. Literatürde, NAC'ın TNF- α düzeylerini baskılayıcı etkisi hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde gösterilmiş olup (Baysal vd., 2017; Huang vd., 2019; Shi vd., 2022), bu çalışmadaki nanopartikül formülasyon bu etkiyi daha düşük dozla tekrarlayabilmiştir.

İnflamatuvar parametrelerin yanı sıra, geliştirilen nanopartikül sisteminin *in vivo* hedefleme kapasitesi, 5XFAD farelerinde uygulamadan sonraki 1. saatte yapılan konfokal ve floresan mikroskopisi analizleriyle değerlendirilmiştir. Nanopartiküllerin hem kortikal bölgelerde hem de hipokampal alanlarda (CA1, CA3, DG) anlamlı düzeyde

biriktiği görülmüştür. Bu dağılım paterni, nanopartiküllerin KBB'yi başarıyla geçebildiğini ve nörodejeneratif hastalıklarda kritik öneme sahip beyin bölgelerine ulaşabildiğini göstermektedir (Talhada vd., 2019; Zhao & van Praag, 2020). Özellikle AH'de erken etkilenim gösteren hipokampus ve korteks bölgelerinde partikül birikiminin görülmüş olması, sistemin hedef hücrelere erken ve seçici dağılım sağladığını ortaya koymakta olup, B6 peptidinin hedefleme kapasitesini somut biçimde doğrular. Literatürde, PEG veya yüzey modifikasyonlu nanopartiküllerin benzer şekilde korteks ve hipokampus bölgelerine selektif dağıldığı da literatürde bildirilmiştir (Saraiva vd., 2016). Ayrıca, B6 peptidinin TfR1 üzerinden reseptör aracılı endositozu tetikleyerek KBB geçişini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Liu vd., 2013; Fan vd., 2018). TfR1 hedeflemesi amacıyla geleneksel olarak transferrin proteini ($\approx 76-80$ kDa) veya anti-TfR antikoru kullanılmıştır (Hu vd., 2021). Ancak bu yapıların yüksek moleküler ağırlıkları, artmış immünojenite riskleri ve karmaşık üretim süreçleri, farmasötik formülasyonlar açısından ciddi sınırlamalar doğurur. Bu nedenle, düşük moleküler ağırlıklı, biyouyumlu ve üretimi kolay peptitlerin tercih edilmesi giderek daha fazla önem kazanır. B6 peptidi (~ 1.24 kDa), faj gösterimi ("phage display") yöntemiyle seçilmiş özgün bir sekans olup hem insan hem fare TfR1'i ile yüksek afiniteyle etkileşim gösterebildiği raporlanmıştır (Nie vd., 2011; Oller-Salvia vd., 2016). Literatürde önerilen TGN (~ 1.38 kDa), CGN (~ 1.41 kDa) ve CRT (~ 1.00 kDa) gibi alternatif kısa peptit dizileri de KBB geçişini destekleyen hedefleme stratejileri olarak belirtilmiş ve çalışmıştır (Oller-Salvia vd., 2016). Guo vd. (2020) tarafından TGN peptidi ile modifiye edilen PLGA nanopartiküllerinin beyin parenkiminde konfokal mikroskopisi ile dağılımı gösterilmiş, Hu vd. (2021) ise CGN peptidiyle kortikal sinyal birikimi bildirmiştir. Ancak bu çalışmalar sadece beyin dokusu genelindeki dağılımı raporlamıştır. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında kortikal bölgelerde güçlü FITC birikiminin yanı sıra NeuN pozitif nöronlarla örtüşen sinyallerin gösterilmiş olması, sistemin yaygın parankim dağılımının yanı sıra nöronlarla kolokelize olduğunu da ortaya koyarak önemli bir özgünlük sunmaktadır. Farmasötik açıdan değerlendirildiğinde, B6 peptidi yalnızca hedefleme etkinliği ile değil, aynı zamanda düşük moleküler ağırlığı, daha az immünojenik profili, yüksek yapısal stabilitesi ve polimerik taşıyıcılara kolay konjugasyon özelliği ile de öne çıkar (Nie vd., 2011; Oller-Salvia vd., 2016). Transferrin ya da antikor bazlı sistemlerde, tekrarlayan uygulamalarda gelişebilecek immün yanıtlar taşıyıcı sistemin etkinliğini sınırlandırabilecekken; peptit bazlı sistemlerde bu risk minimal düzeydedir. Ayrıca B6'nın mPEG-PLGA gibi biyobozunur polimerlerle başarılı şekilde konjuge

edilebilmesi, üretim sürecini hem teknik hem ekonomik açıdan daha uygulanabilir kılar. Sonuç olarak, bu tezde geliştirilen B6 peptidi ile yüzey modifiye edilmiş mPEG-PLGA nanopartikül sisteminin, 1 saat gibi kısa bir sürede KBB'yi aşarak kortikal bölgelere etkin şekilde ulaştığı başarıyla gösterilmiştir. Bu bulgular, B6'nın transferrin ve diğer peptit temelli stratejilere kıyasla hem biyolojik etkinlik hem de farmasötik uygunluk açısından güçlü bir alternatif sunduğunu ve nörodejeneratif hastalıklarda hedefli taşıyıcı sistemler için rasyonel bir yapı olduğunu ortaya koymaktadır.

Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmada geliştirilen NAC-B6-NP sisteminin serbest NAC'a kıyasla çok daha düşük dozda benzer nöroprotektif, antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler sağladığı gösterilmiştir. B6 peptidi aracılığıyla sağlanan hedeflenebilirlik, sadece hücre içi biyoyararlanımı artırmakla kalmamış, aynı zamanda sistemin *in vivo* ortamda KBB'yi geçerek beyinde dağılım göstermesini de mümkün kılmıştır. Ayrıca, mPEG-PLGA temelli taşıyıcı sistemin sağladığı kontrollü salım, NAC'ın hücre içi biyoyararlanımını anlamlı düzeyde artırarak; oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar yanıtlar üzerinde güçlü bir düzenleyici etki oluşturmuştur. Elde edilen bulgular, KBB'yi geçebilen akıllı taşıyıcı sistemlerin, “daha az ilaçla daha yüksek biyolojik etki” prensibini nanopartikül temelli stratejilerle başarıyla hayata geçirebileceğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ

Bu tez kapsamında, AH çerçevesinde amiloid beta toksisitesinin hücresel etkilerini iyileştirmeye yönelik tasarlanan NAC yüklü B6-mPEG-PLGA nanopartikül sistemi başarıyla geliştirilmiş ve çok yönlü olarak değerlendirilmiştir.

Öncelikle, PLGA ile mPEG arasında esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilerek blok kopolimer sentezlenmiş; sonrasında maleik asit ile modifiye edilerek iki ayrı bağ içeren fonksiyonel gruplar kazandırılmış ve yüzeye B6 peptidi konjuge edilmiştir. Bu sentez süreci, polimerin karakteristik özelliklerini kontrol etme olanağı sağlamış ve taşıyıcı sistemin hedefleme için uygun hale getirilmesine olanak tanımıştır. FT-IR, ¹H NMR ve GPC analizleri ile yapı doğrulanmış ve sentezin başarıyla gerçekleştiği gösterilmiştir.

Nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmış ve elde edilen NAC-B6-mPEG-PLGA nanopartikülleri; yüksek enkapsülasyon verimi, kontrollü salım profili, uygun boyut dağılımı ve serum stabilitesi gibi özellikleriyle ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmiştir. Kontrollü salım davranışı, hem tedavi süresinin uzatılması hem de sistemik toksisitenin azaltılması açısından önemli avantajlar sunarak sistemin uygulama potansiyelini desteklemektedir.

Sistemin biyolojik etkinliği, A β ₄₂ oligomerleri ile oluşturulan SH-SY5Y hücre modeli kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen canlılık verileri, NAC-B6-NP formülasyonunun, serbest NAC'a kıyasla yaklaşık 40 kat daha düşük dozda benzer iyileştirici etki sağlayabildiğini göstermiştir. Bu sonuç, hedefli taşıma ve kontrollü salım mekanizmaları sayesinde hücre içi biyoyararlanımın anlamlı ölçüde arttığını ortaya koymaktadır. Akım sitometrisi ile yapılan analizlerde, B6 peptidi konjugasyonu ile hücre içi nanopartikül alımının arttığı gösterilmiş ve hedefli taşıyıcı sistemin etkinliği doğrudan kanıtlanmıştır.

Oksidatif stres parametreleri (GSH, SOD, TOS), mitokondriyal membran potansiyeli ve inflamatuvar sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) düzeyleri üzerinden eş zamanlı yapılan değerlendirmelerde, NAC-B6-NP grubunun serbest NAC'a kıyasla daha düşük dozla eşdeğer antioksidan ve anti-inflamatuvar etki sağladığı gözlemlenmiştir. Bu etki, mitokondriyal fonksiyonların korunması ve hücresel enerji dengesinin desteklenmesi açısından da anlamlı bulunmuştur. Ayrıca *in vivo* analizler, sistemin 1 saat içinde kan-KBB'yi geçerek kortikal bölgelerde yoğun birikim sağladığını ortaya koymuştur.

Böylece; B6'nın klinik uygulanabilirliği yüksek, immünojenisitesi düşük, üretimi kolay bir taşıyıcı modül olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, taşıyıcı sistemin *in vivo* etkinliğini ve hedeflenebilirliğini doğrudan desteklemektedir.

Bu kapsamlı değerlendirmeler ışığında, tez çalışmasında geliştirilen NAC yüklü mPEG-PLGA-B6 sistemi, Alzheimer Hastalığına yönelik test edilmiş, sistematik şekilde karakterize edilmiş ve beyin hedefleme yeteneğiyle birlikte ilaç salım kontrolü sağlayan özgün bir nanoterapötik platform olarak ilk kez sunulmuştur. Literatürde NAC'ın çeşitli taşıyıcı sistemlerle çalışıldığı örnekler bulunsa da, mPEG-PLGA temelli bir polimerin B6 peptidi ile konjugasyonu ve A β ₄₂ oligomer kaynaklı nörotoksisite modelinde bu şekilde bütüncül bir değerlendirme ile test edildiği bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu yönüyle, çalışma yalnızca farmasötik sistem tasarımı açısından değil, aynı zamanda hedefe yönelik nörodejeneratif hastalık tedavileri alanında literatüre önemli bir yenilik katmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile geliştirilen NAC yüklü B6-mPEG-PLGA nanopartikül sistemi, polimer sentezinden hücresel etkinliğe ve *in vivo* hedeflemeye kadar çok yönlü şekilde optimize edilmiş ve AH'ye yönelik özgün bir nanoterapötik platform olarak sunulmuştur. Sistem, yalnızca NAC'ın terapötik etkilerini maksimize etmekle kalmayıp, aynı zamanda KBB'yi geçebildiğini göstermiş, böylece çalışmanın başlangıcında öne sürülen hipotezi güçlü şekilde desteklemiştir. Bu tez, Alzheimer Hastalığı tedavisinde hedeflenebilir, düşük dozda yüksek etki sağlayan, translasyonel potansiyele sahip nanopartikül sistemlerine yönelik önemli bir bilimsel katkı sunmaktadır.

İleri çalışmalar kapsamında, bu formülasyonun başta Alzheimer hastalığı olmak üzere, nörodejeneratif hayvan modellerinde kognitif fonksiyonları iyileştirici etkisi ve histopatolojik bulgulara etkileri analiz edilerek terapötik etkinliği değerlendirilebilir ve klinik uygulanabilirliği araştırılabilir. Bu sayede, geliştirilen nanoterapötik platform translasyonel tıp açısından anlamlı bir aday olarak daha geniş kapsamda değerlendirilebilir.

7. ETİK ONAM



BEZMÎÂLEM
VAKIF ÜNİVERSİTESİ



T.C.
BEZMÎÂLEM 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

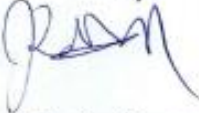
“N-asetil Sistein (NAC) Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Alzheimer Hastalığı'ndaki Terapötik Etkisinin İn Vitro ve İn Vivo Modellerde Araştırılması” başlıklı projenize ait başvurunuz 20.12.2021 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Çalışılacak Hayvanın	Türü Sayısı	Transgenik Fare	Fare
		48	176

Prof. Dr. Fahri AKBAS
Etik Kurul Başkanı


Doç. Dr. Birsen ELİBOL
Üye

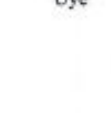

Doç. Dr. Özgün Yusuf ÖZYILMAZ
Üye


Doç. Dr. Remzi DOĞAN
Üye


Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER
Üye


Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI
Üye


Dr. Öğr. Üye. Özge PASİN
Üye


Vet. Hek. Mert ÇELİK TEN
Üye


Şerife ÇELİK TEN
Üye


Semih 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.

8. KAYNAKLAR

Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>

Abolhassani, N., Leon, J., Sheng, Z., Oka, S., Hamasaki, H., Iwaki, T., & Nakabeppu, Y. (2017). Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mechanisms of ageing and development*, 161(Pt A), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.05.005>

Ahlawat, J., Henriquez, G., & Narayan, M. (2018). Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092157>

Ahmad, J., Akhter, S., Rizwanullah, M., Khan, M. A., Pigeon, L., Addo, R. T., Greig, N. H., Midoux, P., Pichon, C., & Kamal, M. A. (2017). Nanotechnology Based Theranostic Approaches in Alzheimer's Disease Management: Current Status and Future Perspective. *Current Alzheimer research*, 14(11), 1164–1181. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170508121031>

Ahmaditabar, P., Momtazi-Borojeni, A. A., Rezayan, A. H., Mahmoodi, M., Sahebkar, A., & Mellat, M. (2017). Enhanced Entrapment and Improved in Vitro Controlled Release of N-Acetyl Cysteine in Hybrid PLGA/Lecithin Nanoparticles Prepared Using a Nanoprecipitation/Self-Assembly Method. *Journal of cellular biochemistry*, 118(12), 4203–4209. <https://doi.org/10.1002/jcb.26070>

Akay, A. S., Arisan, V., Cevher, E., Sessevmez, M., & Cam, B. (2020). Oxytocin-loaded sustained-release hydrogel graft provides accelerated bone formation: An experimental rat study. *Journal of Orthopaedic Research*, 38(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1002/jor.24607>

Alahmari, A. (2021). Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plasticity*, 2021, 6564585. <https://doi.org/10.1155/2021/6564585>

Al-Harbi, N., & Abd-Elrahman, N. K. (2025). Physical methods for preparation of nanomaterials, their characterization and applications: A review. *Journal of Umm Al-*

Qura University for Applied Sciences, 11, 356–377. <https://doi.org/10.1007/s43994-024-00165-7>

Ali, A. H. (2022). High-performance liquid chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6, 10–20. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>

Alkandari, A. F., Madhyastha, S., & Rao, M. S. (2023). N-Acetylcysteine Amide against A β -Induced Alzheimer's-like Pathology in Rats. *International journal of molecular sciences*, 24(16), 12733. <https://doi.org/10.3390/ijms241612733>

Alkhalifa, A. E., Al-Ghraiyyah, N. F., Odum, J., Shunnarah, J. G., Austin, N., & Kaddoumi, A. (2023). Blood–Brain Barrier Breakdown in Alzheimer’s Disease: Mechanisms and Targeted Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22). <https://doi.org/10.3390/ijms242216288>

Allen, M., Zou, F., Chai, H. S., Younkin, C. S., Miles, R., Nair, A. A., Crook, J. E., Pankratz, V. S., Carrasquillo, M. M., Rowley, C. N., Nguyen, T., Ma, L., Malphrus, K. G., Bisceglia, G., Ortolaza, A. I., Palusak, R., Middha, S., Maharjan, S., Georgescu, C., Schultz, D., ... Ertekin-Taner, N. (2012). Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. *Molecular neurodegeneration*, 7, 13. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-13>

Amini, A., Masoumi-Moghaddam, S., & Morris, D. L. (2016). Utility of bromelain and N-acetylcysteine in treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal mucin-producing malignancies. *Springer* 36 (6) 3224-3225. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-28570-2>

An, J., Kim, K., Lim, H. J., Kim, H. Y., Shin, J., Park, I., Cho, I., Kim, H. Y., Kim, S., McLean, C., Choi, K. Y., Kim, Y., Lee, K. H., & Kim, J. S. (2024). Early onset diagnosis in Alzheimer's disease patients via amyloid- β oligomers-sensing probe in cerebrospinal fluid. *Nature communications*, 15(1), 1004. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44818-x>

Anand, R., Gill, K. D., & Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 27–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>

- Andima, M., Costabile, G., Isert, L., Ndakala, A. J., Derese, S., & Merkel, O. M. (2018). Evaluation of β -Sitosterol Loaded PLGA and PEG-PLA Nanoparticles for Effective Treatment of Breast Cancer: Preparation, Physicochemical Characterization, and Antitumor Activity. *Pharmaceutics*, 10(4), 232. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040232>
- Andrade, S., Pereira, M. C., & Loureiro, J. A. (2023). Caffeic acid loaded into engineered lipid nanoparticles for Alzheimer's disease therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 225, 113270. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113270>
- Andrade, V., Cortés, N., Pastor, G., Gonzalez, A., Ramos-Escobar, N., Pastene, E., Rojo, L. E., & Maccioni, R. B. (2020). N-Acetyl Cysteine and Catechin-Derived Polyphenols: A Path Toward Multi-Target Compounds Against Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 75(4), 1219–1227. <https://doi.org/10.3233/JAD-200067>
- Araki, W. (2022). A β Oligomer Toxicity-Reducing Therapy for the Prevention of Alzheimer's Disease: Importance of the Nrf2 and PPAR γ Pathways. *Cells*, 12(10), 1386. <https://doi.org/10.3390/cells12101386>
- Araki, W., & Kametani, F. (2021). Protection against Amyloid- β Oligomer Neurotoxicity by Small Molecules with Antioxidative Properties: Potential for the Prevention of Alzheimer's Disease Dementia. *Antioxidants*, 11(1), 132. <https://doi.org/10.3390/antiox11010132>
- Ashok, A., Andrabi, S. S., Mansoor, S., Kuang, Y., Kwon, B. K., & Labhasetwar, V. (2022). Antioxidant Therapy in Oxidative Stress-Induced Neurodegenerative Diseases: Role of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems in Clinical Translation. *Antioxidants*, 11(2), 408. <https://doi.org/10.3390/antiox11020408>
- Atkuri, K. R., Mantovani, J. J., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2007). N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology*, 7(4), 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.04.005>
- Atlante, A., & Valenti, D. (2022). Mitochondrial Complex I and β -Amyloid Peptide Interplay in Alzheimer's Disease: A Critical Review of New and Old Little Regarded Findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15951. <https://doi.org/10.3390/ijms242115951>

- Austria, E. S., Jr, & Akhavan, B. (2025). Polymeric nanoparticle synthesis for biomedical applications: advancing from wet chemistry methods to dry plasma technologies. *Nanoscale*, 17(21), 13020–13056. <https://doi.org/10.1039/d5nr00436e>
- Babylon, L., Grewal, R., Stahr, P. L., Eckert, R. W., Keck, C. M., & Eckert, G. P. (2021). Hesperetin Nanocrystals Improve Mitochondrial Function in a Cell Model of Early Alzheimer Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1003. <https://doi.org/10.3390/antiox10071003>
- Baldassarre, F., Cacciola, M., & Ciccarella, G. (2015). A predictive model of iron oxide nanoparticles flocculation tuning Z-potential in aqueous environment for biological application. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 377. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3163-6>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Bayliak, M. M., Gospodaryov, D. V., & Lushchak, V. I. (2023). Homeostasis of carbohydrates and reactive oxygen species is critically changed in the brain of middle-aged mice: Molecular mechanisms and functional reasons. *BBA advances*, 3, 100077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100077>
- Baysal, I., Ucar, G., Gultekinoglu, M., Ulubayram, K., & Yabanoglu-Ciftci, S. (2017). Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 124(1), 33–45. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1527-4>
- Beach, M. A., Nayanathara, U., Gao, Y., Zhang, C., Xiong, Y., Wang, Y., & Such, G. K. (2024). Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Chemical Reviews*, 124(9), 5505–5616. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00705>
- Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*, 10(7), 1403. <https://doi.org/10.3390/nano10071403>

- Betancourt, T., Brown, B., & Brannon-Peppas, L. (2007). Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine (London, England)*, 2(2), 219–232. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.2.219>
- Bezprozvanny, I., & Mattson, M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences*, 31(9), 454–463. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.005>
- Blanchette, M., & Daneman, R. (2015). Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of Development*, 138, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.07.007>
- Blanco Andujar, C; (2014) Sodium carbonate mediated synthesis of iron oxide nanoparticles to improve magnetic hyperthermia efficiency and induce apoptosis. Doctoral thesis , UCL (University College London). <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/1430360/>
- Borgström, L., Kågedal, B., & Paulsen, O. (1986). Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European journal of clinical pharmacology*, 31(2), 217–222. <https://doi.org/10.1007/BF00606662>
- Bose, A. (2014). HPLC calibration process parameters in terms of system suitability test. *Austin Chromatography*, 1(2), 1–4. <https://austinpublishinggroup.com/chromatography/fulltext/chromatography-v1-id1008.php>
- Boxer, A. L., & Sperling, R. (2023). Accelerating Alzheimer's therapeutic development: The past and future of clinical trials. *Cell*, 186(22), 4757–4772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.023>
- Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R. (2018). The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 118. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>
- Buck, A. C., Maarman, G. J., Dube, A., & Bardien, S. (2025). Mitochondria targeted nanoparticles for the treatment of mitochondrial dysfunction-associated brain disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13, 1563701. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1563701>

- Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 20(3), 148–160. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Canter, R. G., Penney, J., & Tsai, L. H. (2016). The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*, 539(7628), 187–196. <https://doi.org/10.1038/nature20412>
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., & Colín-Barenque, L. (2014). Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 795375. <https://doi.org/10.1155/2014/795375>
- Carvalho, A., Fernandes, A. R., & Baptista, P. V. (2018). Nanoparticles as Delivery Systems in Cancer Therapy: Focus on Gold Nanoparticles and Drugs. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, 257-295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814029-1.00010-7>
- Cassidy, L., Fernandez, F., Johnson, J. B., Naiker, M., Owoola, A. G., & Broszczak, D. A. (2020). Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary therapies in medicine*, 49, 102294. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102294>
- Castro, K. C. de, Costa, J. M., & Campos, M. G. N. (2020). Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>
- Chakraborty, S., Rao, S., & Tripathi, S. J. (2025). The neuroprotective effects of N-acetylcysteine in psychiatric and neurodegenerative disorders: From modulation of glutamatergic transmission to restoration of synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 110527. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2025.110527>

- Chamorro, B., Izquierdo-Bermejo, S., Serrano, J., Hadjipavlou-Litina, D., Chioua, M., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., Martínez-Murillo, R., & Oset-Gasque, M. J. (2023). Neuroprotective and antioxidant properties of new quinolylnitrones in in vitro and in vivo cerebral ischemia models. *Scientific Reports*, 13, 2865. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29929-7>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Cheng, G., Hardy, M., & Kalyanaraman, B. (2023). Antiproliferative effects of mitochondria-targeted N-acetylcysteine and analogs in cancer cells. *Scientific reports*, 13(1), 7254. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34266-w>
- Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S. G., Krishnaswamy, S., Essa, M. M., Lin, F. H., & Qoronfleh, M. W. (2019). Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomaterials research*, 23, 20. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0166-x>
- Chiang, M. C., Nicol, C. J. B., Cheng, Y. C., Yen, C., Lin, C. H., Chen, S. J., & Huang, R. N. (2020). Nanogold Neuroprotection in Human Neural Stem Cells Against Amyloid-beta-induced Mitochondrial Dysfunction. *Neuroscience*, 435, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.040>
- Chiesa, E., Monti, L., Paganini, C., Dorati, R., Conti, B., Modena, T., Rossi, A., & Genta, I. (2017). Polyethylene Glycol-Poly-Lactide-co-Glycolide Block Copolymer-Based Nanoparticles as a Potential Tool for Off-Label Use of N-Acetylcysteine in the Treatment of Diastrophic Dysplasia. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(12), 3631-3641. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.08.004>
- Chunhui, H., Dilin, X., Ke, Z., Jieyi, S., Sicheng, Y., Dapeng, W., Qinwen, W., & Wei, C. (2018). A11-positive β -amyloid Oligomer Preparation and Assessment Using Dot Blotting Analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (135), 57592. <https://doi.org/10.3791/57592>
- ClinicalTrials.gov. (15.06.2025). Search: Alzheimer Disease – Active studies. <https://clinicaltrials.gov/search?cond=Alzheimer%20Disease&viewType=Card&aggFilters=status:act> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

- Coelho, S. C., Rangel, M., Pereira, M. C., Coelho, M. A., & Ivanova, G. (2015). Structural characterization of functionalized gold nanoparticles for drug delivery in cancer therapy: a NMR based approach. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 17(29), 18971–18979. <https://doi.org/10.1039/c5cp02717a>
- Coleman, V. A., Jämting, Å. K., Catchpoole, H. J., Roy, M., & Herrmann, J. (2011). Nanoparticles and metrology: A comparison of methods for the determination of particle size distributions. *Proceedings of SPIE – Instrumentation, Metrology, and Standards for Nanomanufacturing, Optics, and Semiconductors V*, 8105, 810504. <https://doi.org/10.1117/12.894297>
- Collin F. (2019). Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2407. <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>
- Cotgreave, I. A., & Moldéus, P. (1987). Methodologies for the analysis of reduced and oxidized N-acetylcysteine in biological systems. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 8(4), 365–375. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510080407>
- Cristallini, C., Barbani, N., Ventrelli, L., Summa, C., Filippi, S., Capelôa, T., Vitale, E., Albera, C., Messori, B., & Giachino, C. (2019). Biodegradable microparticles designed to efficiently reach and act on cystic fibrosis mucus barrier. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 95, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.064>
- Çınar, E., Mutluay, S. U., Baysal, İ., Gültekinoğlu, M., Ulubayram, K., Çiftçi, S. Y., Tel, B. C., & Uçar, G. (2022). Donepezil-loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles Enhance the Learning and Memory Function of Beta-Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Noro psikiyatri arsivi*, 59(4), 281–289. <https://doi.org/10.29399/npa.28275>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>

- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr  at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- de Andrade, K. Q., Moura, F. A., dos Santos, J. M., de Ara  jo, O. R., de Farias Santos, J. C., & Goulart, M. O. (2015). Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 30269–30308. <https://doi.org/10.3390/ijms161226225>
- De Capua, A., Vecchione, R., Sgambato, C., Chino, M., Lagreca, E., Lombardi, A., & Netti, P. A. (2024). Peptide Functionalization of Emulsion-Based Nanocarrier to Improve Uptake across Blood–Brain Barrier. *Pharmaceutics*, 16(8), 1010. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081010>
- Deepmala, Slattery, J., Kumar, N., Delhey, L., Berk, M., Dean, O., Spielholz, C., & Frye, R. (2015). Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 55, 294–321. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.015>
- Delanty, N., & Dichter, M. A. (2000). Antioxidant therapy in neurologic disease. *Archives of neurology*, 57(9), 1265–1270. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.9.1265>
- Dey, A., Koli, U., Dandekar, P., & Jain, R. (2016). Investigating behaviour of polymers in nanoparticles of Chitosan Oligosaccharides coated with Hyaluronic Acid. *Polymer*, 93, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.04.027>
- Dhami, M., Raj, K., & Singh, S. (2021). Neuroprotective Effect of Fucoxanthin against Intracerebroventricular Streptozotocin (ICV-STZ) Induced Cognitive Impairment in Experimental Rats. *Current Alzheimer research*, 18(8), 623–637. <https://doi.org/10.2174/1567205018666211118144602>
- Dludla, P. V., Mazibuko-Mbeje, S. E., Nyambuya, T. M., Mxinwa, V., Tiano, L., Marcheggiani, F., Cirilli, I., Louw, J., & Nkambule, B. B. (2019). The beneficial effects of N-acetyl cysteine (NAC) against obesity associated complications: A systematic review of pre-clinical studies. *Pharmacological research*, 146, 104332. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104332>

Doncom, K. E. B., Blackman, L. D., Wright, D. B., Gibson, M. I., & O'Reilly, R. K. (2017). Dispersity effects in polymer self-assemblies: a matter of hierarchical control. *Chemical Society reviews*, 46(14), 4119–4134. <https://doi.org/10.1039/c6cs00818f>

Drexler, K. E., Peterson, C., & Pergamit, G. (1991). Chapter 10: Joining the revolution. In *Unbounding the future: The nanotechnology revolution*. HailieNene Foundation. <https://www.hailienene.com/resources/The%20Nanotechnology%20Revolution.pdf>

Du, Y., Gao, J., Zhang, H., Meng, X., Qiu, D., Gao, X., & Zheng, A. (2021). Brain-targeting delivery of MMB4 DMS using carrier-free nanomedicine CRT-MMB4@MDZ. *Drug delivery*, 28(1), 1822–1835. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1968977>

Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>

Erickson, M. A., Hansen, K., & Banks, W. A. (2012). Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: protection by the antioxidant N-acetylcysteine. *Brain, behavior, and immunity*, 26(7), 1085–1094. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.003>

European Medicines Agency. (01.08.2022). *Aduhelm: EPAR – Product information*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/aduhelm> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

European Medicines Agency. (04.04.2025). *Rxulti: EPAR – Medicine overview*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rxulti> Erişim tarihi: 13 Haziran 2025

European Medicines Agency. (05.05.2025). *Leqembi: EPAR – Product information*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/leqembi> Erişim tarihi: 13 Haziran 2025

European Medicines Agency. (11.04.2025). *Exelon: EPAR – Product information*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/exelon> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

- Fakhoury M. (2020). Inflammation in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, 17(11), 959–961. <https://doi.org/10.2174/156720501711210101110513>
- Fan, L., Mao, C., Hu, X., Zhang, S., Yang, Z., Hu, Z., Sun, H., Fan, Y., Dong, Y., Yang, J., Shi, C., & Xu, Y. (2020). New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in neurology*, 10, 1312. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01312>
- Fan, S., Zheng, Y., Liu, X., Fang, W., Chen, 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), 1091–1102. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1461955>
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, 22(5), 22–36 https://link.springer.com/article/10.1007/s12045-011-0109-x?utm_
- Furtado, D., Björnmalm, M., Ayton, S., Bush, A. I., Kempe, K., & Caruso, F. (2018). Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30(46), e1801362. <https://doi.org/10.1002/adma.201801362>
- Gabbasov, R., Polikarpov, M., Cherepanov, V., Chuev, M., Mischenko, I., Lomov, A., Wang, A., & Panchenko, V. (2015). Mössbauer, magnetization and X-ray diffraction characterization methods for iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.11.032>
- Ghafarizadeh, A., Malmir, M., Naderi Noreini, S., & Faraji, T. (2021). Antioxidant effects of N-acetylcysteine on the male reproductive system: A systematic review. *Andrologia*, 53(1), e13898. <https://doi.org/10.1111/and.13898>
- Gibbs, E., Silverman, J. M., Zhao, B., Peng, X., Wang, J., Wellington, C. L., Mackenzie, I. R., Plotkin, S. S., Kaplan, J. M., & Cashman, N. R. (2019). A Rationally Designed Humanized Antibody Selective for Amyloid Beta Oligomers in Alzheimer's Disease. *Scientific reports*, 9(1), 9870. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46306-5>
- Gopalan, D., Pandey, A., Udupa, N., & Mutalik, S. (2020). Receptor specific, stimuli responsive and subcellular targeted approaches for effective therapy of Alzheimer: Role of surface engineered nanocarriers. *Journal of Controlled Release*, 319, 183-200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.034>

- Gu, J., Yan, C., Yin, S., Wu, H., Liu, C., Xue, A., Lei, X., Zhang, N., & Geng, F. (2024). Erythrocyte membrane-coated nanocarriers modified by TGN for Alzheimer's disease. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 366, 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.12.030>
- Guerini, M., Condrò, G., Friuli, V., Maggi, L., & Perugini, P. (2022). N-acetylcysteine (NAC) and Its Role in Clinical Practice Management of Cystic Fibrosis (CF): A Review. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(2), 217. <https://doi.org/10.3390/ph15020217>
- Gulyaev, I. A., Sokol, M. B., Mollaeva, M. R., Klimenko, M. A., Yabbarov, N. G., Chirkina, M. V., & Nikolskaya, E. D. (2025). Polymeric Drug Delivery Systems in Biomedicine. *Biochemistry. Biokhimiia*, 90(Suppl 1), S233–S262. <https://doi.org/10.1134/S0006297924603976>
- Guo, Q., Xu, S., Yang, P., Wang, P., Lu, S., Sheng, D., Qian, K., Cao, J., Lu, W., & Zhang, Q. (2020). A dual-ligand fusion peptide improves the brain-neuron targeting of nanocarriers in Alzheimer's disease mice. *Journal of Controlled Release*, 320, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.039>
- Halliwell B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Hamel E. (2015). Cerebral circulation: function and dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 65(4), 317–324. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000177>
- 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>
- Harada, D., Anraku, M., Fukuda, H., Naito, S., Harada, K., Suenaga, A., & Otagiri, M. (2004). Kinetic studies of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and human serum albumin through a mixed-disulfide using an N-methylpyridinium polymer-based

column. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 19(4), 297–302.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.19.297>

Harada, D., Naito, S., & Otagiri, M. (2002). Kinetic analysis of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and albumin through the formation of mixed disulfides in human and rat serum in vitro. *Pharmaceutical research*, 19(11), 1648–1654.
<https://doi.org/10.1023/a:1020749211745>

Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>

Held, D. & Kilz, P. (2021). Size-exclusion chromatography as a useful tool for the assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties. *Chemistry Teacher International*, 3(2), 77-103. <https://doi.org/10.1515/cti-2020-0024>

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., . . . Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S. P., Wu, J. F., & Carney, J. M. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of neurochemistry*, 65(5), 2146–2156. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052146.x>

Hernández-Giottonini, K. Y., Rodríguez-Córdova, R. J., Gutiérrez-Valenzuela, C. A., Peñuñuri-Miranda, O., Zavala-Rivera, P., Guerrero-Germán, P., & Lucero-Acuña, A. (2020). PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. *RSC advances*, 10(8), 4218–4231. <https://doi.org/10.1039/c9ra10857b>

Holdiness M. R. (1991). Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clinical pharmacokinetics*, 20(2), 123–134. <https://doi.org/10.2165/00003088-199120020-00004>

- Hong, M. K., Echanique, K. A., Hoffman, L. F., & Kita, A. E. (2023). Designing a Prolonged Method of Therapeutic Delivery to Support Rehabilitation From Ototoxic Damage in a Schwann Cell Model. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 44(4), 373–381. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000003839>
- Hu, J., Tan, X., Wang, D., Li, Y., Liang, H., Peng, J., Li, F., Zhou, Q., Geng, P., Wang, S., Yu, Y., & Liu, J. (2021). A stepwise-targeting strategy for the treatment of cerebral ischemic stroke. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 371. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01118-6>
- Huang, N., Lu, S., Liu, X. G., Zhu, J., Wang, Y. J., & Liu, R. T. (2017). PLGA nanoparticles modified with a BBB-penetrating peptide co-delivering A β generation inhibitor and curcumin attenuate memory deficits and neuropathology in Alzheimer's disease mice. *Oncotarget*, 8(46), 81001–81013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20944>
- Huang, X., Du, Y. Z., Yuan, H., & Hu, F. Q. (2009). Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.025>
- Ikhmayies, S. J. (2014). *Characterization of nanomaterials*. JOM, 66(1), 28–29. <https://doi.org/10.1007/s11837-013-0826-6>
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2023). *ICH Q2(R2): Validation of analytical procedures* (Final version, March 2023). <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- Iqbal, I., Saqib, F., Mubarak, Z., Latif, M. F., Wahid, M., Nasir, B., Shahzad, H., Sharifi-Rad, J., & Mubarak, M. S. (2024). Alzheimer's disease and drug delivery across the blood–brain barrier: Approaches and challenges. *European Journal of Medical Research*, 29, 313. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01915-3>
- Israel, L. L., Galstyan, A., Cox, A., Shatalova, E. S., Sun, T., Rashid, M. H., Grodzinski, Z., Chiechi, A., Fuchs, D. T., Patil, R., Koronyo-Hamaoui, M., Black, K. L., Ljubimova, J. Y., & Holler, E. (2022). Signature Effects of Vector-Guided Systemic Nano Bioconjugate Delivery Across Blood-Brain Barrier of Normal, Alzheimer's, and Tumor

Mouse Models. *ACS nano*, 16(8), 11815–11832.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c10034>

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>

Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499-2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>

Kandhola, G., Park, S., Lim, J. W., Chivers, C., Song, Y. H., Chung, J. H., Kim, J., & Kim, J. W. (2023). Nanomaterial-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review on Graphene, Carbon Nanotubes and Nanocellulose. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 20(3), 411–433. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00530-3>

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>

Kato, H., Suzuki, M., Fujita, K., Horie, M., Endoh, S., Yoshida, Y., Iwahashi, H., Takahashi, K., Nakamura, A., & Kinugasa, S. (2009). Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 23(5), 927–934. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.006>

Keleş, E., & Özalevli, S. (2018). Alzheimer Hastalığı ve Tedavi Yaklaşımları. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 3(2), 39-42. https://dergipark.org.tr/tr/pub/ikcusbfd/issue/38566/380627#article_cite

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019b). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

- Khan, M. S., Muhammad, T., Ikram, M., & Kim, M. O. (2019a). Dietary Supplementation of the Antioxidant Curcumin Halts Systemic LPS-Induced Neuroinflammation-Associated Neurodegeneration and Memory/Synaptic Impairment via the JNK/NF- κ B/Akt Signaling Pathway in Adult Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 7860650. <https://doi.org/10.1155/2019/7860650>
- Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., Giri, S., Gilg, A. G., Sekhon, C., Singh, I., & Singh, A. K. (2004). Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *Journal of neuroscience research*, 76(4), 519–527. <https://doi.org/10.1002/jnr.20087>
- King, D., Glynn, M., Cindric, S., Kernan, D., O'Connell, T., Hakimjavadi, R., Kearney, S., Ackermann, T., Berbel, X. M., Llobera, A., Simonsen, U., Laursen, B. E., Redmond, E. M., Cahill, P. A., & Ducrée, J. (2019). Label-Free Multi Parameter Optical Interrogation of Endothelial Activation in Single Cells using a Lab on a Disc Platform. *Scientific reports*, 9(1), 4157. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40612-8>
- Kolahalam, L. A., Kasi Viswanath, I., Diwakar, B. S., Govindh, B., Reddy, V., & Murthy, Y. (2018). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Materials Today: Proceedings*, 18, 2182-2190. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.371>
- Koychev, I., Hofer, M., & Friedman, N. (2020). Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Staging with Amyloid and Tau Scintigraphic Imaging Biomarkers. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 61(10), 1413–1418. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.230458>
- Kulkarni, S. A., & Feng, S. S. (2013). Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceutical research*, 30(10), 2512–2522. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0958-3>
- Kumar, A., Singh, A., & Ekavali (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports : PR*, 67(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
- Kumari, S., Raturi, S., Kulshrestha, S., Chauhan, K., Dhingra, S., András, K., Thu, K., Khargotra, R., & Singh, T. (2023). A comprehensive review on various techniques used

for synthesizing nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology*, 27, 1739-1763. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.09.291>

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(1), 3620373. <https://doi.org/10.1155/2018/3620373>

Lei, P., Ayton, S., & Bush, A. I. (2021). The essential elements of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100105. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.008207>

Li, L., Wu, X. H., Zhao, X. J., Xu, L., Pan, C. L., & Zhang, Z. Y. (2020). Zerumbone ameliorates behavioral impairments and neuropathology in transgenic APP/PS1 mice by suppressing MAPK signaling. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01744-1>

Li, S., Pan, H., Tan, C., Sun, Y., Song, Y., Zhang, X., Yang, W., Wang, X., Li, D., Dai, Y., Ma, Q., Xu, C., Zhu, X., Kang, L., Fu, Y., Xu, X., Shu, J., Zhou, N., Han, F., Qin, D., ... Yan, Q. (2018). Mitochondrial Dysfunctions Contribute to Hypertrophic Cardiomyopathy in Patient iPSC-Derived Cardiomyocytes with MT-RNR2 Mutation. *Stem cell reports*, 10(3), 808–821. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.013>

Li, X., Chang, S., Du, G., Li, Y., Gong, J., Yang, M., & Wei, Z. (2012). Encapsulation of azithromycin into polymeric microspheres by reduced pressure-solvent evaporation method. *International journal of pharmaceutics*, 433(1-2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.081>

Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W., Zhou, J., Zhu, J., & Gao, X. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release*, 71(2), 203-211. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00218-8)

Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale research letters*, 8(1), 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>

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>

Liyanage, W., Kale, N., Kannan, S., & Kannan, R. M. (2024). Journey from lab to clinic: Design, preclinical, and clinical development of systemic, targeted dendrimer-N-acetylcysteine (D-NAC) nanomedicines. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 100, 119–155. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2024.05.003>

Lomelí Martínez, S. M., Pacheco Moisés, F. P., Kurt, O., C., D. L., Cortés Trujillo, I., Torres Jasso, J. H., & Dheni, E. (2025). Effect of N-Acetyl Cysteine as an Adjuvant Treatment in Alzheimer's Disease. *Brain Sciences*, 15(2), 164. <https://doi.org/10.3390/brainsci15020164>

López-Sánchez, C., de Andrés, F., & Ríos, Á. (2024). Implications of analytical nanoscience in pharmaceutical and biomedical fields: A critical view. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 243, 116118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116118>

Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>

Marbella, L. E., & Millstone, J. E. (2015). NMR techniques for noble metal nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 27(8), 2721–2739. <https://doi.org/10.1021/cm504809c>

Mari, M., de Gregorio, E., de Dios, C., Roca-Agujetas, V., Cucarull, B., Tutusaus, A., Morales, A., & Colell, A. (2020). Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 909. <https://doi.org/10.3390/antiox9100909>

Martín-Banderas, L., Álvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Prados, J., Melguizo, C., Fernández-Arévalo, M., & Holgado, M. Á. (2012). Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: Formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5793. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34633>

McCarthy, D. J., Malhotra, M., O'Mahony, A. M., Cryan, J. F., & O'Driscoll, C. M. (2015). Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models

towards therapeutic significance. *Pharmaceutical research*, 32(4), 1161–1185.
<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1545-6>

McQuaid, C., Halsey, A., Dubois, M., Romero, I., & Male, D. (2025). Comparison of polypeptides that bind the transferrin receptor for targeting gold nanocarriers. *PLOS ONE*, 16(6), e0252341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252341>

Mekuye, B., & Abera, B. (2023). Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select*, 4(8), 486-501.
<https://doi.org/10.1002/nano.202300038>

Michalicova, A., Majerova, P., & Kovac, A. (2020). Tau Protein and Its Role in Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 570045.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.570045>

Mohammad, A. K., & Reineke, J. (2012). Quantitative nanoparticle organ disposition by gel permeation chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 926, 361–367. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_23

Mojarad-Jabali, S., Farshbaf, M., Hemmati, S., Sarfraz, M., Motasadizadeh, H., Shahbazi Mojarad, J., Atyabi, F., Zakeri-Milani, P., & Valizadeh, H. (2022). Comparison of three synthetic transferrin mimetic small peptides to promote the blood–brain barrier penetration of vincristine liposomes for improved glioma targeted therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 613, 121395. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121395>

Monge, M., Fornaguera, C., Quero, C., Dols-Perez, A., Calderó, G., Grijalvo, S., García-Celma, M. J., Rodríguez-Abreu, C., & Solans, C. (2020). Functionalized PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating interact selectively with proteins involved in the transport through the blood-brain barrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 156, 155-164.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.003>

Monou, P. K., Andriotis, E., Tzetzis, D., Tzimtzimis, E., Panteris, E., Andreadis, D., Demiri, E., Vizirianakis, I. S., & Fatouros, D. G. (2024). Evaluation of 3D-Printed Solid Microneedles Coated with Electrosprayed Polymeric Nanoparticles for Simultaneous Delivery of Rivastigmine and N-Acetyl Cysteine. *ACS applied bio materials*, 7(5), 2710–2724. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00750>

Monteiro, A. R., Barbosa, D. J., Remião, F., & Silva, R. (2023). Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs. *Biochemical Pharmacology*, 211. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115522>

Moos T. (1996). Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 375(4), 675–692. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961125\)375:4<675::AID-CNE8>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961125)375:4<675::AID-CNE8>3.0.CO;2-Z)

Moos, T., & Morgan, E. H. (2000). Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cellular and molecular neurobiology*, 20(1), 77–95. <https://doi.org/10.1023/a:1006948027674>

More, J., Galusso, N., Veloso, P., Montecinos, L., Finkelstein, J. P., Sanchez, G., Bull, R., Valdés, J. L., Hidalgo, C., & Paula-Lima, A. (2018). N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 399. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00399>

Mourdikoudis, S., , Pallares, R. M., , & Thanh, N. T. K., (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>

Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., & Lewczuk, P. (2018). Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 125(2), 177–191. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1820-x>

Mukherjee, A., Sarkar, S., Jana, S., Swarnakar, S., & Das, N. (2019). Neuro-protective role of nanocapsulated curcumin against cerebral ischemia-reperfusion induced oxidative injury. *Brain research*, 1704, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.10.016>

Muresan, V., & Ladescu Muresan, Z. (2015). Amyloid- β precursor protein: Multiple fragments, numerous transport routes and mechanisms. *Experimental cell research*, 334(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.12.014>

Muthu, M., & Singh, S. (2009). Poly (D, L-Lactide) Nanosuspensions of Risperidone for Parenteral Delivery: Formulation and In-Vitro Evaluation. *Current Drug Delivery*, 6(1), 62–68. <https://doi.org/10.2174/156720109787048302>

Nafie, M., Sedky, N., Hassan, H., Fawzy, I., Abdelhady, M., Bakowsky, U. & Fahmy, S. (2024). PEG-PLGA core-shell nanoparticles for the controlled delivery of picoplatin-hydroxypropyl β -cyclodextrin inclusion complex in triple-negative breast cancer: *In vitro* and *in vivo* study. *Nanotechnology Reviews*, 13(1), 20240115. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2024-0115>

Nagati, V., Tenugu, S., & Pasupulati, A. K. (2021). Stability of therapeutic nano-drugs during storage and transportation as well as after ingestion in the human body. *Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems*, 83-102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88450-1.00020-X>

Nath, S., Agholme, L., Kurudenkandy, F. R., Granseth, B., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2012). Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -amyloid. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(26), 8767–8777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0615-12.2012>

National Institute on Aging. (13.09.2023). *How is Alzheimer's disease treated?* <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-treatment/how-alzheimers-disease-treated#caution> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

National Institute on Aging. (t.y.). *NIA-Funded Active Alzheimer's and Related Dementias Clinical Trials*. <https://www.nia.nih.gov/research/ongoing-AD-trials> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

Navath, R. S., Kurtoglu, Y. E., Wang, B., Kannan, S., Romero, R., & Kannan, R. M. (2008). Dendrimer-drug conjugates for tailored intracellular drug release based on glutathione levels. *Bioconjugate chemistry*, 19(12), 2446–2455. <https://doi.org/10.1021/bc800342d>

Nayak, V., Patra, S., Rout, S., Jena, A. B., Sharma, R., Pattanaik, K. P., Singh, J., Pandey, S. S., Singh, R. P., Majhi, S., Singh, K. R., & Kerry, R. G. (2023). Regulation of neuroinflammation in Alzheimer's disease via nanoparticle-loaded phytocompounds with anti-inflammatory and autophagy-inducing properties. *Phytomedicine*, 122, 155150. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155150>

- Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., & Couvreur, P. (2013). Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society reviews*, 42(3), 1147–1235. <https://doi.org/10.1039/c2cs35265f>
- Nie, Y., Schaffert, D., Rödl, W., Ogris, M., Wagner, E., & Günther, M. (2011). Dual-targeted polyplexes: one step towards a synthetic virus for cancer gene therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 152(1), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.028>
- Noori Koopaei, M., Khoshayand, M. R., Mostafavi, S. H., Amini, M., Khorramizadeh, M. R., Jeddi Tehrani, M., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2014). Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 13(3), 819–833.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Oblak, A. L., Forner, S., Territo, P. R., Sasner, M., Carter, G. W., Howell, G. R., Sukoff-Rizzo, S. J., Logsdon, B. A., Mangravite, L. M., Mortazavi, A., Baglietto-Vargas, D., Green, K. N., MacGregor, G. R., Wood, M. A., Tenner, A. J., LaFerla, F. M., Lamb, B. T., and The MODEL-AD, & Consortium (2020). Model organism development and evaluation for late-onset Alzheimer's disease: MODEL-AD. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 6(1), e12110. <https://doi.org/10.1002/trc2.12110>
- Oller-Salvia, B., Sánchez-Navarro, M., Giralt, E., & Teixidó, M. (2016). Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chemical Society reviews*, 45(17), 4690–4707. <https://doi.org/10.1039/c6cs00076b>
- Ooi, S. L., Green, R., & Pak, S. C. (2018). N-Acetylcysteine for the Treatment of Psychiatric Disorders: A Review of Current Evidence. *BioMed research international*, 2018, 2469486. <https://doi.org/10.1155/2018/2469486>

- Palacio, J. R., Markert, U. R., & Martínez, P. (2011). Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 60(7), 695–704. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0323-8>
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., & Imbimbo, B. P. (2019). A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*, 15(2), 73–88. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>
- Park, K., Otte, A., Sharifi, F., Garner, J., Skidmore, S., Park, H., Jhon, Y. K., Qin, B., & Wang, Y. (2020a). Formulation Composition, Manufacturing Process, and Characterization of Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 329, 1150. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.044>
- Park, S., Kang, J., Yoon, J., & Chung, I. (2020b). Synthesis and Characterization of Polyfumarateurethane Nanoparticles for Sustained Release of Bupivacaine. *Pharmaceutics*, 12(3), 281. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030281>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates (2nd ed., Compact 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, 2835787. <https://doi.org/10.1155/2018/2835787>
- Pinheiro, R., Granja, A., Loureiro, J., Pereira, M., Pinheiro, M., Neves, A., & Reis, S. (2020). Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 148, 105314. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314>
- Pinto, M., Silva, V., Barreiro, S., Silva, R., Remião, F., Borges, F., & Fernandes, C. (2022). Brain drug delivery and neurodegenerative diseases: Polymeric PLGA-based nanoparticles as a forefront platform. *Ageing research reviews*, 79, 101658. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101658>

- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European journal of medicinal chemistry*, 209, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
- Prakasha Gowda, A. S., 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-cystine in cell culture media. *Cell & Gene Therapy Insights*, 6(2), 303–323. <https://doi.org/10.18609/cgti.2020.041>
- Pugazhendhi, A., Prabakar, D., Jacob, J. M., Karuppusamy, I., & Saratale, R. G. (2018). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 114, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.013>
- 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>
- Qu, Z., Luo, J., Li, Z., Yang, R., Zhao, J., Chen, X., Yu, S., & Shu, H. (2024). Advancements in strategies for overcoming the blood–brain barrier to deliver brain-targeted drugs. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 16, 1353003. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1353003>
- Raghu, G., Berk, M., Campochiaro, P. A., Jaeschke, H., Marenzi, G., Richeldi, L., Wen, F. Q., Nicoletti, F., & Calverley, P. M. A. (2021). The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Current neuropharmacology*, 19(8), 1202–1224. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666201230144109>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Rajendran, R., Minqin, R., Ynsa, M. D., Casadesus, G., Smith, M. A., Perry, G., Halliwell, B., & Watt, F. (2009). A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits--insights into the pathology of Alzheimer's

disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(1), 91–95.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.136>

Ramanathan, S., Archunan, G., Sivakumar, M., Tamil Selvan, S., Fred, A. L., Kumar, S., Gulyás, B., & Padmanabhan, P. (2018). Theranostic applications of nanoparticles in neurodegenerative disorders. *International journal of nanomedicine*, 13, 5561–5576.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S149022>

Ramkumar, V. S., Pugazhendhi, A., Gopalakrishnan, K., Sivagurunathan, P., Saratale, G. D., Dung, T. N. B., & Kannapiran, E. (2017). Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 14, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.001>

Regmi, D. (2023). Nanoparticle: An overview of preparations, characterizations, evaluations, pharmaceutical aspects and applications. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 8(4), 327–335.
https://ijprajournal.com/issue_dcp/Nanoparticle%20An%20overview%20of%20preparations,%20Characterizations,%20Evaluations,%20pharmaceutical%20aspects%20and%20Applications.pdf

Rezaei, B., Yari, P., Sanders, S. M., Wang, H., Chugh, V. K., Liang, S., Mostufa, S., Xu, K., Wang, J. P., Gómez-Pastora, J., & Wu, K. (2024). Magnetic Nanoparticles: A Review on Synthesis, Characterization, Functionalization, and Biomedical Applications. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 20(5), e2304848.
<https://doi.org/10.1002/sml.202304848>

Riccardi, C., Napolitano, F., Montesarchio, D., Sampaolo, S., & Melone, M. A. B. (2021). Nanoparticle-Guided Brain Drug Delivery: Expanding the Therapeutic Approach to Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, 13(11), 1897.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111897>

Rind, L., Ahmad, M., Khan, M. I., Badruddeen, Akhtar, J., Ahmad, U., Yadav, C., & Owais, M. (2021). An insight on safety, efficacy, and molecular docking study reports of N-acetylcysteine and its compound formulations. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 33(3), 223–233. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0099>

- Roduner E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society reviews*, 35(7), 583–592. <https://doi.org/10.1039/b502142c>
- Roskams, A. J., & Connor, J. R. (1992). Transferrin receptor expression in myelin deficient (md) rats. *Journal of Neuroscience Research*, 31(3), 421–427. <https://doi.org/10.1002/jnr.490310304>
- Rust, R., Yin, H., Achón Buil, B., Sagare, A. P., & Kisler, K. (2025). The blood–brain barrier: A help and a hindrance. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awaf068>
- Saenz del Burgo, L., Hernández, R. M., Orive, G., & Pedraz, J. L. (2014). Nanotherapeutic approaches for brain cancer management. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 10(5), 905–919. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.001>
- Sahin, A., Spiroux, F., Guedon, I., Arslan, F. B., Sarcan, E. T., Ozkan, T., Colak, N., Yuksel, S., Ozdemir, S., Ozdemir, B., Akbas, S., Ultav, G., Aktas, Y., & Capan, Y. (2017). Using PVA and TPGS as combined emulsifier in nanoprecipitation method improves characteristics and anticancer activity of ibuprofen loaded PLGA nanoparticles. *Die Pharmazie*, 72(9), 525–528. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.7015>
- Sahoo, S., Gopalan, A., Ramesh, S., Nirmala, P., Ramkumar, G., Shifani, S. A., Subbiah, R., & Joshua Ramesh Lalvani, J. I. (2020). Preparation of Polymeric Nanomaterials Using Emulsion Polymerization. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2021(1), 1539230. <https://doi.org/10.1155/2021/1539230>
- Salamon, Š., Kramar, B., Marolt, T. P., Poljšak, B., & Milisav, I. (2019). Medical and Dietary Uses of N-Acetylcysteine. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(5), 111. <https://doi.org/10.3390/antiox8050111>
- Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., Kelly, P. M., Åberg, C., Mahon, E., & Dawson, K. A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 8(2), 137–143. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.237>
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., & Berk, M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(8), 4117–4129. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.016>

- Sánchez-López, E., Ettcheto, M., Egea, M. A., Espina, M., Cano, A., Calpena, A. C., Camins, A., Carmona, N., Silva, A. M., Souto, E. B., & García, M. L. (2018). Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer's disease: in vitro and in vivo characterization. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0356-z>
- Sapan, H. B., Paturusi, I., Islam, A. A., Yusuf, I., Patellongi, I., Massi, M. N., Pusponogoro, A. D., Arief, S. K., Labeda, I., Rendy, L., & Hatta, M. (2017). Interleukin-6 and interleukin-10 plasma levels and mRNA expression in polytrauma patients. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*, 20(6), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2017.05.003>
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 235, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Sarcan, E. T., Silindir-Gunay, M., & Ozer, A. Y. (2018). Theranostic polymeric nanoparticles for NIR imaging and photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 551(1-2), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.019>
- Sarker, K. P., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokioka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., & Maruyama, I. (1999). Inhibition of thrombin-induced neuronal cell death by recombinant thrombomodulin and E5510, a synthetic thrombin receptor signaling inhibitor. *Thrombosis and haemostasis*, 82(3), 1071–1077
- Satapathy, M. K., Yen, T. L., Jan, J. S., Tang, R. D., Wang, J. Y., Taliyan, R., & Yang, C. H. (2021). Solid Lipid Nanoparticles (SLNs): An Advanced Drug Delivery System Targeting Brain through BBB. *Pharmaceutics*, 13(8), 1183. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081183>
- Savelieff, M. G., Nam, G., Kang, J., Lee, H. J., Lee, M., & Lim, M. H. (2019). Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. *Chemical reviews*, 119(2), 1221–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00138>

Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Ch  telat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). *Alzheimer's disease. The Lancet*, 397(10284), 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)

Schwalfenberg G. K. (2021). N-Acetylcysteine: A Review of Clinical Usefulness (an Old Drug with New Tricks). *Journal of nutrition and metabolism*, 2021, 9949453. <https://doi.org/10.1155/2021/9949453>

Sehar, U., Rawat, P., Reddy, A. P., Kopel, J., & Reddy, P. H. (2022). Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 12924. <https://doi.org/10.3390/ijms232112924>

Shahripour, R. B., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior*, 4(2), 108–122. <https://doi.org/10.1002/brb3.208>

Sharma, R., & Walia, M. K. (2021). *Nanoparticles: An overview—preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 6(5), 368–372. https://ijprajournal.com/issue_dcp/Nanoparticles%20An%20Overview%20Preparation%20And%20Characterization.pdf

Shen, Y., Sun, Y., Yan, R., Chen, E., Wang, H., Ye, D., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2017). Rational engineering of semiconductor QDs enabling remarkable ¹O₂ production for tumor-targeted photodynamic therapy. *Biomaterials*, 148, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.026>

Shi, Y., Yuan, Y., Li, J., Shen, J., Ju, Q., Gao, S., & et al. (2022). N-Acetyl cysteine together with rutin combats oxidative toxicity by modulating Nrf2 pathway in inflammatory brain–liver axis in scopolamine-administered Alzheimer's disease model in rats. *Pharmacognosy Magazine*, 18(80), 1035–1044. <https://www.phcog.com/text.asp?2022/18/80/1035/361740>

Shi, Z., & Puyo, C. A. (2020). N-Acetylcysteine to Combat COVID-19: An Evidence Review. *Therapeutics and clinical risk management*, 16, 1047–1055. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S273700>

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

- Singh, B., Day, C. M., Abdella, S., & Garg, S. (2024). Alzheimer's disease current therapies, novel drug delivery systems and future directions for better disease management. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 367, 402–424. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.047>
- Singh, R., & Lillard, J. W., Jr (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>
- Sinyor, B., Mineo, J., & Ochner, C. (2020). Alzheimer's Disease, Inflammation, and the Role of Antioxidants. *Journal of Alzheimer's disease reports*, 4(1), 175–183. <https://doi.org/10.3233/ADR-200171>
- Smaga, I., Frankowska, M., & Filip, M. (2021). N-acetylcysteine as a new prominent approach for treating psychiatric disorders. *British journal of pharmacology*, 178(13), 2569–2594. <https://doi.org/10.1111/bph.15456>
- Solaro, R., Chiellini, F., & Battisti, A. (2010). Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers. *Materials*, 3(3), 1928-1980. <https://doi.org/10.3390/ma3031928>
- Son, J., Parveen, S., MacPherson, D., Marciano, Y., Huang, R. H., & Ulijn, R. V. (2023). MMP-responsive nanomaterials. *Biomaterials science*, 11(19), 6457–6479. <https://doi.org/10.1039/d3bm00840a>
- Söderberg, L., Johannesson, M., Nygren, P., Laudon, H., Eriksson, F., Osswald, G., Möller, C., & Lannfelt, L. (2023). Lecanemab, Aducanumab, and Gantenerumab - Binding Profiles to Different Forms of Amyloid-Beta Might Explain Efficacy and Side Effects in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 20(1), 195–206. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01308-6>
- Stamp, M. E. M., Halwes, M., Nisbet, D., & Collins, D. J. (2023). Breaking barriers: exploring mechanisms behind opening the blood-brain barrier. *Fluids and barriers of the CNS*, 20(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00489-2>
- Steiner, H., Fukumori, A., Tagami, S., & Okochi, M. (2018). Making the final cut: Pathogenic amyloid- β peptide generation by γ -secretase. *Cell Stress*, 2(11), 292-310. <https://doi.org/10.15698/cst2018.11.162>

- Stine, W. B., Jr, Dahlgren, K. N., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2003). In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278(13), 11612–11622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210207200>
- Stine, W. B., Jungbauer, L., Yu, C., & LaDu, M. J. (2011). Preparing synthetic A β in different aggregation states. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 670, 13–32. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-744-0_2
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2013). Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.027>
- Sun, J., Walker, J., Beck-Broichsitter, M., & Schwendeman, S. P. (2022). Characterization of commercial PLGAs by NMR spectroscopy. *Drug delivery and translational research*, 12(3), 720–729. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01023-3>
- Surudzic, R. D., Jovanović, Ž., Bibić, N. M., Nikolić, B. Ž., & Mišković-Stanković, V. B.. (2013). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles in poly(vinyl alcohol) solution. in *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(12), 2087-2098. <https://doi.org/10.2298/JSC131017124S>
- Sztolsztener, K., Bzdęga, W., Hodun, K., & Chabowski, A. (2023). N-Acetylcysteine Decreases Myocardial Content of Inflammatory Mediators Preventing the Development of Inflammation State and Oxidative Stress in Rats Subjected to a High-Fat Diet. *International journal of inflammation*, 2023, 5480199. <https://doi.org/10.1155/2023/5480199>
- Şanlı, F., Barlak, N., Kılınç, A., Çapık, Ö., Aytatlı, A., & Karataş, O. F. (2020). The AKT antagonist AZD5363 suppresses features associated with cancer progression in human larynx cancer cells. *The European Research Journal*, 6(5), 380–387. <https://doi.org/10.18621/eurj.624088>
- T.C. Sağlık Bakanlığı. (2023). *Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2023 yayımlandı* [Web sayfası]. <https://www.saglik.gov.tr/TR-107086/saglik-istatistikleri-yilligi-2023-yayinlanmistir.html> Erişim tarihi: 13 Haziran 2025

- Talhada, D., Gonçalves, I., Santos, C. R., & Ruscher, K. (2019). Transthyretin expression in the postischemic brain. *PLoS ONE*, 14(9), e0221555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221555>
- Tapia-Guerrero, Y. S., Del Prado-Audelo, M. L., Borbolla-Jiménez, F. V., Giraldo Gomez, D. M., García-Aguirre, I., Colín-Castro, C. A., Morales-González, J. A., Leyva-Gómez, G., & Magaña, J. J. (2020). Effect of UV and Gamma Irradiation Sterilization Processes in the Properties of Different Polymeric Nanoparticles for Biomedical Applications. *Materials*, 13(5), 1090. <https://doi.org/10.3390/ma13051090>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M. J. (2015). *Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease*. *Nature reviews. Neurology*, 11(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
- Tautou, M., Descamps, F., Larchanché, P. E., Buée, L., El Bakali, J., Melnyk, P., & Sergeant, N. (2023). A Polyaminobiaryl-Based β -secretase Modulator Alleviates Cognitive Impairments, Amyloid Load, Astrogliosis, and Neuroinflammation in APP^{Swe}/PSEN1 ^{Δ E9} Mice Model of Amyloid Pathology. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5285. <https://doi.org/10.3390/ijms24065285>
- Tenório, S., Graciliano, N. G., Moura, F. A., & Fonseca Goulart, M. O. (2021). N-Acetylcysteine (NAC): Impacts on Human Health. *Antioxidants*, 10(6), 967. <https://doi.org/10.3390/antiox10060967>
- Thangudu, S., Cheng, F., & Su, C. (2020). Advancements in the Blood–Brain Barrier Penetrating Nanoplatfroms for Brain Related Disease Diagnostics and Therapeutic Applications. *Polymers*, 12(12), 3055. <https://doi.org/10.3390/polym12123055>
- Thu Nguyen, H. A., Ho, T. P., Mangelings, D., Eeckhaut, A. V., Heyden, Y. V., & Tran, H. T. (2024). Antioxidant, neuroprotective, and neuroblastoma cells (SH-SY5Y) differentiation effects of melanins and arginine-modified melanins from *Daedaleopsis tricolor* and *Fomes fomentarius*. *BMC Biotechnology*, 24, 89. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00918-6>

Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5541–5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>

Türkiye İstatistik Kurumu. (06.02.2025). *İstatistiklerle Yaşlılar, 2024* [İstatistiksel bülten]. Data.TÜİK. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Istatistiklerle-Yaslilar-2024-54079>
Erişim tarihi: 15.06.2025

Twarowski, B., & Herbet, M. (2023). Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease—Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076518>

Tyagi, S., & Pandey, V. K. (2016, October 26). *Nanoparticles: An overview of preparation*. *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*, 4(Special Issue 2), <https://www.rroi.com/open-access/nanoparticles-an-overview-of-preparation-.php?aid=82205>

U.S. Food and Drug Administration. (02.07.2024). *FDA approves treatment for adults with Alzheimer's disease*. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-adults-alzheimers-disease> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

U.S. Food and Drug Administration. (06.06.2023). *FDA converts novel Alzheimer's disease treatment to traditional approval*. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-converts-novel-alzheimers-disease-treatment-traditional-approval>
Erişim tarihi: 13 Haziran 2025

U.S. Food and Drug Administration. (11.05.2023). *FDA approves first drug to treat agitation symptoms associated with dementia due to Alzheimer's disease*. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-treat-agitation-symptoms-associated-dementia-due-alzheimers-disease> Erişim tarihi: 13 Haziran 2025

U.S. Food and Drug Administration. (18.02.2025). *Withdrawn non-malignant hematological, neurological and other disorder indications from the accelerated approval program*. <https://www.fda.gov/drugs/accelerated-approval-program/withdrawn-non-malignant-hematological-neurological-and-other-disorder-indications-accelerated> Erişim tarihi: 15 Haziran 2025

- van der Kant, R., & Goldstein, L. S. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Developmental cell*, 32(4), 502–515. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>
- 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>
- Venkataaramana, M., Chandra Nayaka, S., Anand, T., Rajesh, R., Aiyaz, M., Divakara, S. T., Murali, H. S., Prakash, H. S., & Lakshmana Rao, P. V. (2014). Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 65, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.042>
- Viola, K. L., & Klein, W. L. (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta neuropathologica*, 129(2), 183–206. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1386-3>
- Vural, G.U., Özer, A.Y. (2015). Nükleer Tıpta İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Teranostik Kullanımları. *Nuclear Medicine Seminars*, 1(2), 109-119. doi:10.4274/nts.2015.018
- Wang, B., Navath, R. S., Romero, R., Kannan, S., & Kannan, R. (2009). Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer–N-acetyl cysteine conjugates in activated microglial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 377(1-2), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.050>
- Wang, J., Li, L., Wang, Z., Cui, Y., Tan, X., Yuan, T., Liu, Q., Liu, Z., & Liu, X. (2018). Supplementation of lycopene attenuates lipopolysaccharide-induced amyloidogenesis and cognitive impairments via mediating neuroinflammation and oxidative stress. *The Journal of nutritional biochemistry*, 56, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.01.009>
- Watcharadulyarat, N., Rattanatayarom, M., Ruangsawasdi, N., & Patikarnmonthon, N. (2023). PEG–PLGA nanoparticles for encapsulating ciprofloxacin. *Scientific Reports*, 13, 266. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27500-y>

- Wei, K., Peng, X., & Zou, F. (2014). Folate-decorated PEG–PLGA nanoparticles with silica shells for capecitabine controlled and targeted delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 464(1-2), 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.047>
- Wen, C. H., Hsu, S. C., Hsu, S. H., & Chang, S. W. (2018). Molecular Structures and Mechanisms of Waterborne Biodegradable Polyurethane Nanoparticles. *Computational and structural biotechnology journal*, 17, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.12.007>
- Wilar, G., Suhandi, C., Wathoni, N., Fukunaga, K., & Kawahata, I. (2024). Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems Enhance Treatment of Cognitive Defects. *International journal of nanomedicine*, 19, 11357–11378. <https://doi.org/10.2147/IJN.S484838>
- Wong, K. H., Riaz, M. K., Xie, Y., Zhang, X., Liu, Q., Chen, H., Bian, Z., Chen, X., Lu, A., & Yang, Z. (2019). Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 381. <https://doi.org/10.3390/ijms20020381>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023a). The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 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. (2023b). 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>
- Xie, J., Lee, S., & Chen, X. (2010). Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced drug delivery reviews*, 62(11), 1064–1079. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.009>
- Xu, Y., Zhao, M., Zhou, D., Zheng, T., & Zhang, H. (2021). The application of multifunctional nanomaterials in Alzheimer's disease: A potential theranostics strategy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 137, 111360. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111360>
- Yahia, Z., Yahia, A., & Abdelaziz, T. (2024). N-acetylcysteine Clinical Applications. *Cureus*, 16(10), e72252. <https://doi.org/10.7759/cureus.72252>

- Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., & Shao, A. (2020). Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 193. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00193>
- Ye, S., You, Q., Song, S., Wang, H., Wang, C., Zhu, L., & Yang, Y. (2023). Nanostructures and Nanotechnologies for the Detection of Extracellular Vesicle. *Advanced biology*, 7(2), e2200201. <https://doi.org/10.1002/adbi.202200201>
- Yin, T., Yang, L., Liu, Y., Zhou, X., Sun, J., & Liu, J. (2015). Sialic acid (SA)-modified selenium nanoparticles coated with a high blood-brain barrier permeability peptide-B6 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *Acta biomaterialia*, 25, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.035>
- Younes, N., Alsahan, B. S., Al-Mesaifri, A. J., Da'as, S. I., Pintus, G., Majdalawieh, A. F., & Nasrallah, G. K. (2021). JC-10 probe as a novel method for analyzing the mitochondrial membrane potential and cell stress in whole zebrafish embryos. *Toxicology research*, 11(1), 77–87. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfab114>
- Zenaro, E., Piacentino, G., & Constantin, G. (2017). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 107, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.007>
- Zhang, B., Zhao, Y., Guo, K., Tian, H., Wang, C., Wang, R., Chen, Y., Chen, X., Zheng, H., Gao, B., Shen, J., & Tian, W. (2022). Macromolecular nanoparticles to attenuate both reactive oxygen species and inflammatory damage for treating Alzheimer's disease. *Bioengineering & translational medicine*, 8(3), e10459. <https://doi.org/10.1002/btm2.10459>
- Zhang, C., Wan, X., Zheng, X., Shao, X., Liu, Q., Zhang, Q., & Qian, Y. (2014). Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. *Biomaterials*, 35(1), 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.063>
- Zhang, D., Jin, B., Ondrejcek, T., & Rowan, M. J. (2016). Opposite in vivo effects of agents that stimulate or inhibit the glutamate/cysteine exchanger system xc⁻ on the inhibition of hippocampal LTP by A β . *Hippocampus*, 26(12), 1655–1665. <https://doi.org/10.1002/hipo.22667>

- Zhang, H., Chin, K. L., Yan, Y., & Pare, R. (2023b). Antioxidant and antiapoptotic effects of Thymosin β 4 in A β -induced SH-SY5Y cells via the 5-HTR1A/ERK axis. *Plos One*, 18(10), e0287817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287817>
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., & Chen, L. (2024b). Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 211. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>
- Zhang, P., Cao, M., Chetwynd, A. J., Faserl, K., Abdolapur Monikh, F., Zhang, W., Ramautar, R., Ellis, L. A., Davoudi, H. H., Reilly, K., Cai, R., Wheeler, K. E., Martinez, D. S. T., Guo, Z., Chen, C., & Lynch, I. (2024a). Analysis of nanomaterial biocoronas in biological and environmental surroundings. *Nature protocols*, 19(10), 3000–3047. <https://doi.org/10.1038/s41596-024-01009-8>
- Zhang, T. T., Li, W., Meng, G., Wang, P., & Liao, W. (2016). Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomaterials science*, 4(2), 219–229. <https://doi.org/10.1039/c5bm00383k>
- Zhang, Y., Chen, H., Li, R., Sterling, K., & Song, W. (2023a). Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 248. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01484-7>
- Zhao, X., & van Praag, H. (2020). Steps towards standardized quantification of adult neurogenesis. *Nature communications*, 11(1), 4275. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18046-y>
- Zheng, R., Tan, Y., Gu, M., Kang, T., Zhang, H., & Guo, L. (2019). N-acetyl cysteine inhibits lipopolysaccharide-mediated synthesis of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human periodontal ligament fibroblast cells through nuclear factor-kappa B signaling. *Medicine*, 98(40), e17126. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017126>
- Zhi, K., Raji, B., Nookala, A. R., Khan, M. M., Nguyen, X. H., Sakshi, S., Pourmotabbed, T., Yallapu, M. M., Kochat, H., Tadrous, E., Pernell, S., & Kumar, S. (2021). PLGA Nanoparticle-Based Formulations to Cross the Blood–Brain Barrier for Drug Delivery: From R&D to cGMP. *Pharmaceutics*, 13(4), 500. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040500>

- Zhu, Y., Liu, C., & Pang, Z. (2019). Dendrimer-Based Drug Delivery Systems for Brain Targeting. *Biomolecules*, 9(12), 790. <https://doi.org/10.3390/biom9120790>
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
- Zinatullina, K. M., Orekhova, A. V., Kasaikina, O. T., Khrameeva, N. P., Berezin, M. P., & Rusina, I. F. (2021). *N*-Acetylcysteine is an effective analog of glutathione in reactions with reactive oxygen species. *Russian chemical bulletin = Izvestiia Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*, 70(10), 1934–1938. <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3299-8>
- Zou, L., Xu, K., Tian, H., & Fang, Y. (2022). Remote neural regulation mediated by nanomaterials. *Nanotechnology*, 33(27), 10.1088/1361-6528/ac62b1. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac62b1>