

Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküller Beta-Amiloid Alzheimer Hastalığı Sıçan Modelinde Öğrenme ve Hafızayı Geliştirir

Donepezil-loaded PLGA-b-PEG Nanoparticles Enhance the Learning and Memory Function of Beta-Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease

Elif ÇINAR^{1,2}, Sevgi Uğur MUTLUAY², İpek BAYSAL³, Merve GÜLTEKİNOĞLU⁴, Kezban ULUBAYRAM⁴, Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ³, Banu Cahide TEL², Gülberk UÇAR³

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Zonguldak, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Donepezil-yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli (etilen glikol) nanopartikül formülasyonu hazırlanarak, donepezili direkt amiloid beta (A β) fibrillerine hedefleyip, periferik yan etkileri azaltmak, etkililiği artırmak ve Alzheimer hastalığı (AH) fibril modelinde davranış etkilerini değerlendirmektir.

Yöntem: Önceden inkübe edilmiş A β 25–35 fibrilleri intraserebroventriküler olarak beyine injekte edilerek AH modeli oluşturuldu. Sıçanlara, naif kontroller hariç, intravenöz (iv) olarak çözücü, donepezil yüklü nanopartikül (NP) (15 μ g/kg) veya serbest donepezil (1 mg/kg) bir hafta boyunca üç defa iv olarak enjekte edildi. Tedavinin anksiyete, motor fonksiyon ve bilişsel fonksiyon üzerindeki etkileri sırasıyla yükseltilmiş artı labirenti, lokomotor aktivite, yeni nesne tanıma ve Morris su labirenti testleri ile değerlendirildi. Davranış deneyleri sonrasında beyin homojenatında asetilkolinesteraz aktivitesi tayin edildi.

Bulgular: Beyin kesitlerinde A β 25–35 fibril birikimi teyit edildi. A β Alzheimer ve serbest donepezil tedavi gruplarında anksiyete benzeri davranış gözlenirken, donepezil NP tedavi grubunda düşük anksiyete

benzeri davranış gözlemlendi. Kısa-dönem bellek bozukluğunda donepezil NP tedavisi, serbest donepezil tedavisine göre daha çok başarı gösterdi. Morris su labirentinde, gizli platformu hem donepezil NP hem de serbest donepezil grupları, A β Alzheimer grubuna göre daha kısa sürede buldular. Locomotor aktivite testinde, hem donepezil NP hem de serbest donepezil grupları, A β Alzheimer ve kontrollere göre daha az hareket ettiler. Davranış deneylerinden sonra, asetilkolinesteraz aktivitesi beyin homojenatında tayin edildiğinde A β Alzheimer grubunda kontrollere göre artış tespit edildi. Donepezil yüklü NP tedavisinin, serbest donepezil tedavisine göre asetilkolinesteraz aktivitesini daha güçlü inhibe ettiği saptandı.

Sonuç: Donepezil yüklü NP ile beyine hedefleme etki süresini uzatarak ve amiloid fibrilleri stabilize edici etkililiği artırarak, asetilkolinesteraz aktivitesini daha güçlü inhibe etmeye yardımcı olmakta, bilişsel fonksiyonların düzelmesine daha fazla katkı sağlamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer hastalığı, beyin hedefleme, davranış testleri, donepezil, hayvan modelleri, nanopartikül

ABSTRACT

Introduction: Our aim is to reduce the side effects and increase the efficiency of donepezil by formulating donepezil-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)-block-poly(ethylene glycol) nanoparticles (NPs) directly targeting amyloid beta (A β) fibrils in the brain and evaluate behavioral changes in this fibril model of AD.

Methods: AD model was developed by intracerebroventricular injection of pre-aggregated β 25–35 fibrils. Rats were intravenously administered either solvent, donepezil-loaded NPs (15 μ g/kg) or free donepezil (1mg/kg) 3 times for a week except for naïve controls. The effect of treatments on anxiety, motor functions, and cognitive functions was tested by elevated plus maze, locomotor activity, novel object recognition, and Morris's water maze tests, respectively.

Results: Accumulation of A β 25–35 fibrils in brain sections was confirmed. Anxiety-like behavior was observed in the A β Alzheimer and free donepezil treatment groups while donepezil-loaded NP treatment showed hypo-anxiety-like behavior. Donepezil-loaded NPs were

successful in treatment of short-term memory deficit better than free donepezil injection. In Morris's water maze, both donepezil-loaded NPs and free donepezil groups found the platform in shorter time compared to A β Alzheimer group. In locomotor activity test, both donepezil treated groups moved less than the A β Alzheimer group and naïve controls. After the pharmacological experiments, acetylcholinesterase activity was determined and showed an increase in A β Alzheimer group compared to controls. Donepezil-loaded NPs inhibited the acetylcholinesterase activity more efficiently than the free donepezil group.

Conclusion: Targeting with donepezil-loaded PLGA-b-PEG-NPs increases efficiency, helps to inhibit acetylcholinesterase activity more substantially, improves cognitive decline due to its longer duration of action and destabilizing effect on amyloid fibrils.

Keywords: Alzheimer's disease, animal model, behavioral test, brain targeting, donepezil, nanoparticle

Cite this article as: Çınar E, Mutluay SU, Baysal İ, Gültekinöğlü M, Ulubayram K, Yabanoğlu Çiftçi S ve ark. Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküller Beta-Amiloid Sıçan Alzheimer Hastalığı Modelinde Öğrenme ve Hafızayı Geliştirir. Arch Neuropsychiatry 2022; 59:281–289.

Öne Çıkan Noktalar

- Donepezil-yüklü PLGA-b-PEG NP'ler beyinde başarı ile A β fibrillerine hedeflendirildi.
- Donepezil-yüklü PLGA-b-PEG NP'ler kısa-dönem bellek bozukluğunda düzeltme gösterdi.
- Donepezil-yüklü PLGA-b-PEG NP'ler uzaysal öğrenme ve hafıza da iyilik sağladı.
- Donepezil-yüklü PLGA-b-PEG NP'ler asetilkolinesterazı daha başarı ile inhibe etti.

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), hipokampus ve kortekste nöronal kayıp ile seyreden ilerleyici ve geri dönüşsüz nörodejeneratif bir hastalıktır (1). Her ne kadar altında yatan patoloji bilinmiyor olsa da neokorteksin ekstraselüler sinapslarında amiloid β (A β) proteinlerinin birikiminin hastalığın ilerleyişinde önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür (1,2). AH'de frontal ve parietal kortekste, temporal lobda ve Meynert bazal çekirdeğinde kolin asetiltransferaz (ChAT) aktivitesinde bir azalma vardır (2).

Amiloid kaskad ve kolinerjik hipotez, AH patolojisinin moleküler mekanizmalarında rol oynayabileceği öne sürülen iki temel hipotezdir. Amiloid kaskad hipotezine göre; A β fibrilleri veya fosforile tau birikerek nöronlara toksik olan ve sonuçta sinaptik kayıp ve hücre ölümüne neden olan senil plaklar ve nörofibriller yumaklar oluşturmaktadırlar (2-4). Diğer taraftan, hayvan modeli çalışmaları veya AH hastalarının beyin örnekleri hafıza bozuklukları ve davranışsal değişiklikler gibi bilişsel semptomlara neden olan kolinerjik iletimde ciddi bir azalma göstermiştir (3-5).

AH, oksidatif stresten vasküler disfonksiyona kadar çok faktörlü, kompleks nörodejeneratif bir hastalıktır. Dolayısıyla, hastalığın patolojisini ve davranışsal değişikliklerini taklit edebilecek bir hayvan modeli oluşturulmasına ihtiyaç vardır. A β birikiminin temel bir faktör olduğunu gösteren kanıtlar doğrultusunda, pek çok hayvan modeli bu histopatolojik değişikliği hedeflemek üzerine tasarlanmıştır (3,6). Intraserbral A β enjeksiyonu, AH'yi ve onun bilişsel ve davranışsal değişikliklerini taklit etmek için iyi çalışılmış, karakterize edilmiş, başarılı ve kullanışlı bir metottur (6,7). Yapı-aktivite çalışmalarına göre A β 'nin 25-35 bölgesi stabil agregat oluşumundan sorumludur ve stereotaksik olarak sıçan beynine enjeksiyonu sonuçta nöron ölümüne neden olmaktadır (7).

Belirli bir organ ya da dokuya ilaç hedeflendirme, etki süresini uzatmak, kan beyin bariyerini (KBB) geçebilmek, ilacın lokalizasyonunu sağlamak ve ilacın yan etkilerini azaltan nanosistemleri geliştirilmek gibi ilaç uygulanması ile ilgili önemli problemleri çözmek için yıllardır çalışılmaktadır (8). Hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar, proteinler, aşılarda, biyolojik veya makromoleküller kaplanabilir ve etkili bir şekilde nanosistemlerle taşınabilir (9,10). Böylece, ilaçlar beyin de dâhil pek çok dokuya hedeflenebilir ve yeterli konsantrasyonda istenilen süre boyunca dolaşımında kalabilirler (10).

AH'nin henüz radikal bir tedavisi yoktur, fakat donepezil gibi kolinesteraz inhibitörleri yaygın olarak semptomatik tedavi için kullanılır. Donepezil, uzun etkili kolinesteraz enzim inhibitörüdür ve A β fibril oluşumunu inhibe edebilir ve nöroinflamasyona karşı koruyucu olma yeteneğine sahiptir (11). Ancak, donepezilin esas problemi oral olarak uygulandığında bulantı, kusma, diyare gibi gastrointestinal yan tesirlere neden olmasıdır. Kısa yarılanma ömrü ve hızlı metabolizasyonu sık tekrarlı uygulama gerektirir ve bu demans problemi olan hastalarda uyuncu problemine neden olur. Dolayısıyla, donepezili beyine hedeflendirmek yan etkileri azaltabilir, etki süresini uzatabilir ve uyuncu problemi olan hastalara fayda sağlayabilir.

Çalışmamızın amacı, donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerin (NP) intraserebroventriküler (icv) A β ₂₅₋₃₅ peptid enjeksiyonu ile oluşturulan AH hayvan modelinde davranış ve bilişsel fonksiyonlar üzerindeki tedavi edici etkinliğini değerlendirmektir.

YÖNTEM

Donepezil Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerin Hazırlanması

Donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri su içinde yağ içinde su (W/O/W) çift emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlandı (12). Kısaca, sulu donepezil çözeltisinin PLGA-b-PEG-COOH polimer çözeltisi içinde 1500 rpm'de 1 dakika homojenize edilmesiyle primer emülsiyon oluşturuldu. Primer çözelti, ağırlıkça %2 Pluronic F68 içeren sekonder bir sulu faza damla damla hemen ilave edildi ve 1 dakika süreyle 15.000 rpm'de homojenize edildi. Bu ikinci emülsiyon, manyetik bir karıştırıcı üzerinde karıştırılırken ağırlıkça %0,5 Pluronic F68 çözeltisine damla damla ilave edildi. Elde edilen emülsiyon, kalıntı çözücüyü atmak için 4°C'de gece boyunca karıştırıldı. Oluşan nanopartiküller, 20 dakika boyunca 20.000x g'de santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldıktan sonra nanopartiküller, 20.000x g'de üç kez santrifüjlenerek yıkandı. Atıldıktan sonra kalan süpernatant nanopartiküller, 20.000x g'de 3 kez santrifüjlenerek yıkandı. Donepezil yüklü PLGA-b-PEG NP'in kontrollü salım şeklinde A β fibril oluşumu üzerindeki stabilize edici etkisi ve KBB'yi geçebilme yetenekleri, in vitro model kullanılarak gösterildi (12).

Hayvanlar

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden 260-280 g ağırlığındaki yetişkin Sprague-Dawley (SD) erkek sıçanlar alındı. Hayvanlar, yiyecek ve suya ad libitum erişim ile 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü altında tutuldu. Tüm deneysel prosedürler Hacettepe Yerel Hayvan Etik Kurulu (izin numarası: 2012/13-10) tarafından onaylanmış ve ulusal ve yerel hayvan bakım ve kullanım kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Amiloid β Peptit

Amiloid β Protein 25-35 parçası (Sigma, Almanya) distile suda çözündürüldü (1 μ g/1 μ l) ve 4 gün boyunca 37°C'de in vitro inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, A β fibrilleri daha önceki çalışmaya göre icv olarak enjekte edildi (7). Amiloid β proteininin yüksek hidrofobik 25-35 alanı, stabil agregatlar oluşturabilme yeteneğine sahiptir ve nöronal ölüme neden olabilmektedir (13). Bu nedenle A β ₂₅₋₃₅ peptidin sıçan beynine enjeksiyonu zamana bağlı patolojik değişikliklere neden olabilmektedir (7).

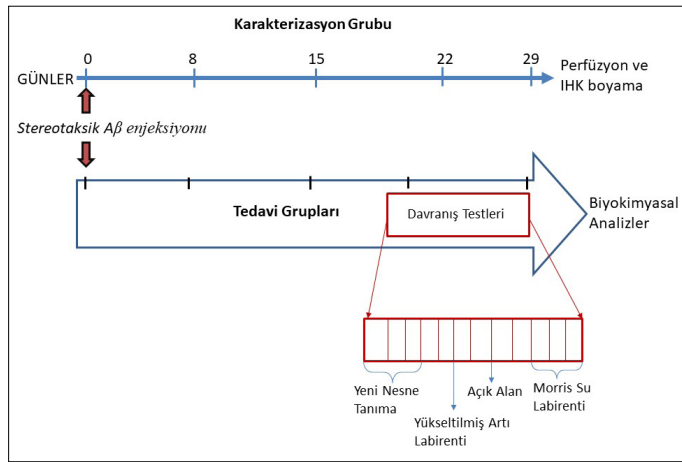
Cerrahi ve İlaç Tedavisi

Cerrahi işlemler 80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin karışımı kullanılan anestezi altında gerçekleştirildi. Hayvanlar, diş çubuğu -2,3 mm'ye ayarlanmış olan stereotaksik bir çerçeveye (Kopf Instruments, ABD) yerleştirildi; icv enjeksiyonu için koordinatlar: anteroposterior (AP)=-1 mm ve mediolateral (ML)= \pm 1,5 mm olarak bregmadan, dorsoventralden (DV)= -3,5 mm olarak Paxinos ve Watson sıçan beyin atlasına göre dural yüzeyden hesaplandı (14). 10 μ l A β ₂₅₋₃₅ fibrilleri veya serum fizyolojik (SF-sham kontrol olarak) 0,4 μ l/dakika hızında enjekte edildi. Proteinin metale yapışmasını önlemek için Hamilton enjektörlerin ucuna kapiller cam takıldı.

Deney Grupları

Deneyler iki bölüme ayrıldı

- 1) Öncelikle Alzheimer hastalığının modellenmesi; A β ₂₅₋₃₅ fibrilleri veya SF, sıçan beyinlerine (n=8/n=1 sırasıyla) icv olarak enjekte edildi. Hayvanlar 23. günde terminal doz ketamin/ksilazin anestezi altında heparin ve ardından %4 paraformaldehit (PFA) ile transkardiyal olarak perfüze edildi. Beyinlerin, bir mikrotom (Leica SM2000 R Kayar mikrotomu) aracılığıyla 35 μ m kalınlığında koronal kesitleri alındı. Patolojiyi karakterize etmek için immünohistokimyasal olarak A β boyaması yapıldı.



Şekil 1. Deneysel prosedürün şematik açıklaması. Hayvanlar iki gruba ayrıldı; ilk grup Aβ Alz n=8; SF n=1; Naif kontrol n=3, immünohistokimyasal boyama için hayvanlar %4 PFA ile transkardiyak olarak perfüze edildi. İkinci grup; Aβ Alz n=6; donepezil PLGA-b-PEG NP n=6; Naif kontrol n=6, davranışsal değişiklikler için test edildi ve biyokimyasal analizler için perfüze edilmeden beyinleri diseke edildi.

2) İkinci olarak ilaç tedavi grupları ve davranışlarının değerlendirilmesi;

Deney Grupları

- 1) Üç gün süreyle 0,2 ml PBS (iv) enjekte edildi (n=6, Aβ Alz grubu),
- 2) Üç gün süreyle 0,2 ml PBS içinde çözülmüş donepezil (1 mg/kg) (iv) enjekte edildi (n=6, serbest donepezil grubu),
- 3) Üç gün süreyle 0,2 ml PBS içinde donepezil yüklü PLGA-b-PEG NP (15 µg/kg) süspansiyonu (iv) enjekte edildi (n=6, donepezil NP grubu)
- 4) Naif kontroller (n=6, kontrol grubu)

Stereotaksik Aβ enjeksiyonlarından sonra; PBS, serbest donepezil veya donepezil NP tedavileri 17. günden başlayarak 23. güne kadar haftada üç kez uygulandı. Davranışsal deneyler, 20. günden 29. güne kadar, iv enjeksiyonlar devam edilirken uygulandı. Tüm davranış testleri tamamlandıktan sonra, biyokimyasal analizler için beyinleri çıkarıldı (Şekil 1).

Davranış Testleri

Hayvanlar motor ve bilişsel fonksiyonlar için test edildi. Varyasyonu önlemek için tüm testler her gün aynı saatte tekrarlandı. Davranış testlerine başlamadan önce hayvanlar, alışmaları için deney odasında bir saat tutuldu ve kaygı düzeylerini azaltmak için art arda dört gün aynı kişi tarafından elle tutuldu. Davranış testlerinin sırası ve yapıldığı saatler, bu testlerin neden olduğu stresi en aza indirecek şekilde düzenlendi (Şekil 1).

Yeni Nesne Tanıma Testi

Yeni nesne tanıma (YNT), sıçan ve fareler için bir bilişsel fonksiyon testidir. Deneyde, 40'40'40 cm kare kutu ve video takip sistemi (VideoMot2, Almanya) kullanıldı. Hayvanların etkileşimleri ve nesnelere geçirdikleri süre sistem tarafından kayıt altına alındı. Alıştırma için ilk iki gün hayvanlar 10 dakika boyunca boş kutulara konuldu. Üçüncü gün, kutuların içine iki özdeş nesne (oyun blokları) yerleştirildi. Hayvanlar, 10 dakika boyunca nesnelere aşına hale getirildi. Kısa dönem bellek için alışma aşamasından bir saat sonra, nesnelere biri yeni bir nesneyle değiştirildi ve hayvanların, yeni ve tanıdık nesnelere harcadıkları süreleri tespit etmek için 5 dakika boyunca izlendi. Uzun dönem bellek için alıştırma aşamasından 24 saat sonra yeni nesne tamamen farklı bir nesneyle değiştirildi (15). Hayvanlar 5 dakika boyunca tekrar izlendi. Olfaktör uyarı ortadan kaldırmak için kutular ve nesnelere her seanstan sonra %70 alkol ile temizlendi. Sonuçlar, her bir hayvan için (yeni nesneyle harcanan zaman)/(yeni+tanıdık nesneyle harcanan zaman) oranı ile tanıma indeksi olarak ifade edildi. Daha sonra karşılaştırma için her grup için oranların ortalaması hesaplandı (16).

Yükseltilmiş Artı Labirent (YAL)

Hayvanlar, YAL ile kaygı benzeri davranışlar için test edildi. Düzenekte, karşılıklı iki kol açık (açık kol) ve diğer iki zıt kol 45 cm yüksekliğinde duvarlara (kapalı kol) sahiptir. Oda deney süresince loş tutuldu ve sadece masa lambasıyla aydınlatıldı. Protokol daha önceki çalışmamızda açıklandığı şekilde uygulandı (17). Kısaca, hayvanlar kapalı kola bakacak şekilde merkeze konuldu, video takip sistemi (EthoVision XT, Hollanda) tarafından 5 dakika boyunca kaydedildi. Her bir hayvan için (açık kolda geçirilen süre)/(açık kolda geçirilen süre + kapalı kolda geçirilen süre) x 100 hesaplandı. Daha sonra her deney grubu için bu puanların ortalaması alındı (17).

Açık Alan Lokomotor Aktivite Testi

Hayvanlar açık alan testi ile motor fonksiyon açısından test edildi. 50x50x30 cm'lik kutular içine yerleştirilen hayvanlar video takip sistemi (VideoMot2, Almanya) kullanılarak izlendi. Bir saat boyunca toplam kat edilen mesafe ve yatay aktivite kaydedildi ve grup ortalamaları arasındaki farklar analiz edildi (15).

Morris Su Labirenti (MSL) Testi

Hayvanlar, daha önce tarif edildiği gibi MSL ile uzaysal öğrenme ve hafıza için test edildi (17). Dairesel, siyah boyalı bir tank ve gizli bir platform kullanıldı. Tank, gizli platformu kaplayana kadar 25°C musluk suyu ile dolduruldu. Hayvanların platformun yerini öğrenebilmeleri için ipucu olarak odanın duvarlarına farklı resimler yapıştırıldı. Hayvanlar arka arkaya 4 gün boyunca tankın çeperine bakacak şekilde tanka yerleştirildi ve video takip sistemi (VideoMot2, Almanya) ile izlenerek, aktiviteleri 2 dakika kaydedildi. Dört gün boyunca her gün hayvanlar farklı yönlerden dört kez tanka konuldu ve platformu bulmak için harcanan zaman kaydedildi. Öğrenme eğrileri oluşturmak için her grubun gizli platformu bulmak için geçirdikleri zaman ölçüldü ve gruplar arasındaki farklar analiz edildi (16).

İmmünohistokimyasal Boyama

Davranış testlerinden sonra, hayvanlar yüksek dozlarda ketamin/ksilazin anestezisi altında heparin ve ardından %4 PFA ile transkardiyal olarak perfüze edildi. Beyinler daha sonra %4 PFA ile postfiksasyona bırakıldı ve ardından %30 sükröz aktarıldı. Beyinlerin, mikrotom ile 35 µm kalınlığında koronal kesitleri alındı. Serbest yüzer kesitlerde immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kısaca, kesitler ilk önce üç kez Tris tampon solüsyonu (TBS) ile yıkandı. Daha sonra bloklama solüsyonu ile bir saat ön inkübasyon yapıldı. Kesitler, gece boyunca primer anti-anti-amiloid beta (1:500, Abcam, UK) ile oda sıcaklığında inkübe edildi. TBS ile üç kez çalkalamayı takiben 60 dakika biyotinlenmiş sekonder anti-anti-amiloid beta (1:500, Abcam, UK) ile inkübasyon yapıldı, üç kez tekrar yıkandı ve Biotin Streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 10 dakika inkübe edildi. Kesitler, bir kromojen olan 3,3-diaminobenzidin (Abcam, UK) ile muamele edildi. Poli-l-lizin kaplı lameller üzerine sabitlenen kesitler, kademeli olarak artan etanol konsantrasyonuyla dehidrate, ksilen ile yeniden hidrate edildi ve DPX ile kaplanarak lam ile kapatıldı. Dilimler, "NIS-Elements" görüntüleme yazılımı (NIS-Elements Basic Research) eklenmiş ışık mikroskobu (Leica DM4000B) altında incelendi.

Kongo kırmızısı boyama için; kesitler poli-l-lizin kaplı lameller üzerine yerleştirildi ve kurutuldu, ardından 90 dakika Kongo kırmızısı ile inkübe edildi. Distile su ile birkaç kez yıkandı. Modifiye Mayer solüsyonu ile 3 dakika inkübasyonu takiben, yıkanan kesitler, 1–2 dakika etil alkol solüsyonları kademeli olarak dehidre edildikten sonra ksilen ile 5 dakika rehidrate edildi ve DPX ile kapatıldı. Kesitler, "NIS-Elements" görüntüleme yazılımı (NIS-Elements Basic Research) takılı ışık mikroskobu (Leica DM4000B) ile incelendi.

Kongo kırmızısı boyama yönteminde olduğu gibi, lamele aktarılmış kesitlere Tiyoflavin S uygulandı. Distile su içinde %1 tiyoflavin S solüsyonu hazırlandı ve filtre edildi. Kesitler ksilen ile dehidrate, sonra etil alkol

solüsyonlarında 1-2 dakika kademeli olarak hidrate edildi. Kesitler birkaç kez suya daldırıldı ve 30 dakika Tiyo flavin S ile boyandı. Daha sonra tekrar 1-2 dakika kademeli artan etil alkol solüsyonlarında dehidrate edildikten sonra ksilen ile 5 dakika rehidrate edildi ve DNA'yı boyayan Hoechst (Thermo Scientific) ile kapatıldı. Kesitler, "NIS-Elements" görüntüleme yazılımı (NIS-Elements Basic Research) ile iliştilmiş floresan mikroskobu altında incelendi.

Beyin Homojenatlarında Asetilkolinesteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Beyin homojenatlarının süpernatantlarındaki toplam protein konsantrasyonu, BCA protein tayin kitinin (Intron Biotechnology) talimatları izlenerek ölçüldü.

Asetilkolinesteraz aktivite ölçümleri, substrat olarak 0,125 mM ditiyobisnitrobenzoik asit ve 5 mM asetiltiyokolin (ATC) içeren 500 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,4) içinde 25°C'de gerçekleştirildi (18). Reaksiyonlar enzim eklenerek başlatıldı ve 412 nm'de spektrofotometre kullanılarak izlendi. Hesaplamalarda $\epsilon=14, \beta \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değeri ve beyin homojenatlarının toplam protein miktarı kullanıldı. Asetilkolinesteraz aktivitesi nmol/dak/mg olarak gösterildi.

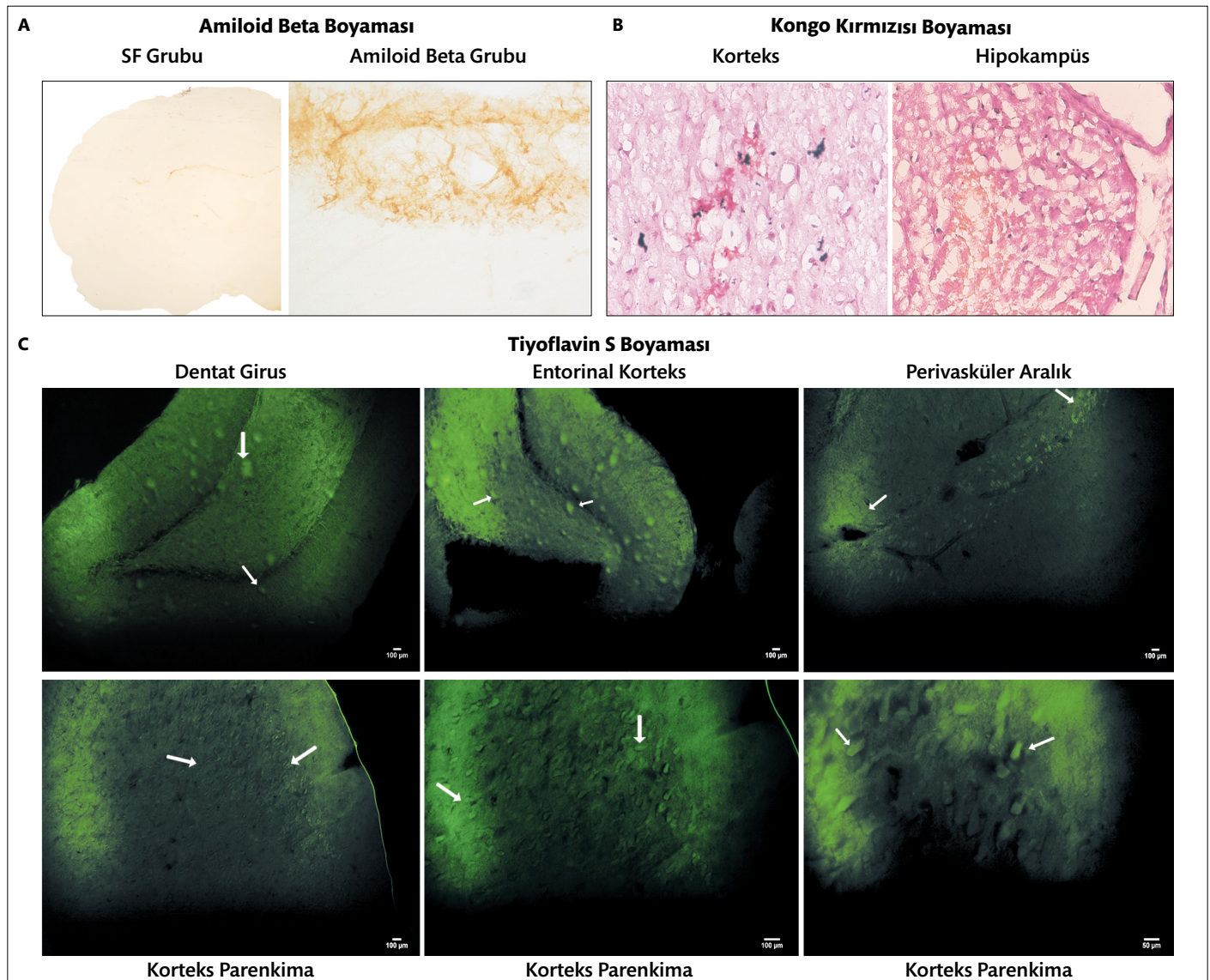
İstatistiksel Analizler

DeneySEL veriler, ortalama \pm standart hata (SH) olarak gösterildi. GraphPad prism 7 kullanılarak analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ardından Dunnett post hoc analizi kullanıldı, Kruskal-Wallis ve ardından Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ise sadece MWM analizi için uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $P<0,05$ olarak belirlendi.

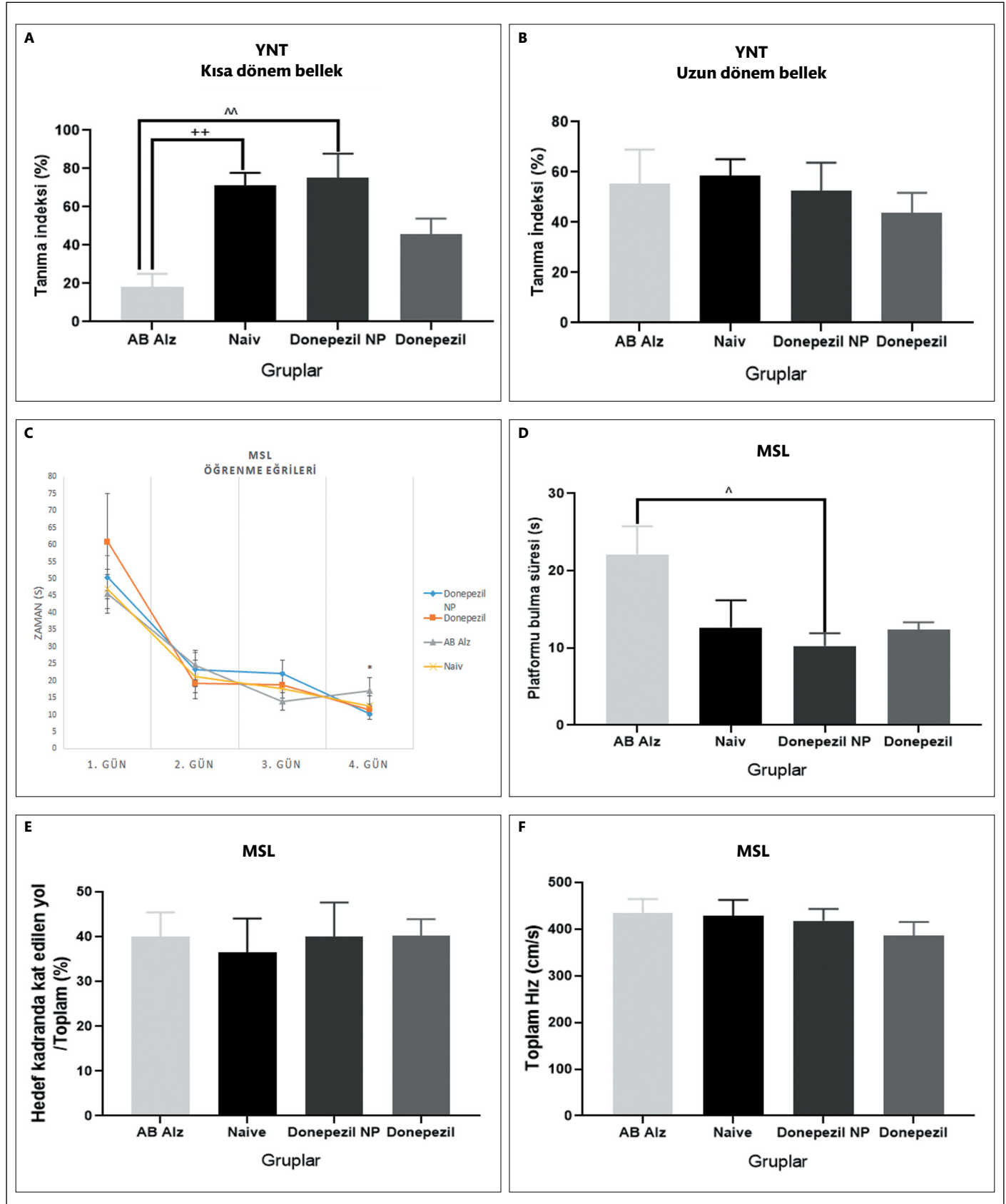
BULGULAR

Lateral Ventriküle Amiloid β Enjeksiyonu Hipokampüste Morfolojik Değişikliklere Yol Açmaktadır

A β_{25-35} peptidin icv sıçan beynine enjeksiyonu (A β Alz, n=6) sonucu oluşan patolojiyi doğrulamak için A β immünohistokimyasal boyaması gerçekleştirildi. A β fibrili, kongo kırmızısı ve tiyo flavin S boyamaları özellikle damarlar ve ventrikül etrafında, hipokampüsün dentat girusu, entorinal korteks, korteksin perivasküler ve parankimal dokusu çevresinde görüldü (Şekil 2a-c). Ek olarak, tiyo flavin S boyamasından sonra korteks parankiminde nörofibriler yumak benzeri birikimler gözlemlendi (Şekil 2c). Ancak SF enjekte edilen grupta herhangi bir boyanma gözlenmedi (Şekil 2a).



Şekil 2. a-c. Amiloid β enjeksiyonuna bağlı histopatolojik değişiklikler. SF ve A β enjekte edilmiş Alzheimer grubunda Amiloid β fibril boyamasından örnek kesitler (a). Kongo kırmızı ile boyanmış hipokampüs ve korteks kesitlerinden örnekler (b). Dentat girus entorinal korteks ve perivasküler aralıkta tiyo flavin S boyamasından örnek kesitler 10x büyütme (ilk sıra); korteks parankimisi 10x, 20x, 40x büyütme (ikinci sıra) (ölçek: 100 μm ilk sıra; 100 μm , 100 μm ve 50 μm ikinci sıra) (c).



Şekil 3. a-f. Lateral ventriküle Amiloid β enjeksiyonu öğrenme ve hafızada yetersizliğe neden olurken donepezil PLGA-b-PEG NP tedavisi tersine çevirdi. Kısa dönem bellek yetersizliğine işaret eden 1 saat sonraki YNT tanıma indeksi (%) A β Alz grubunda naif kontrollere göre anlamlı düzeyde azaldı ve donepezil NP tedavisi hafıza bozukluğunu düzeltti (a) (+P<0,05 A β Alz vs Naif, \wedge p<0,05 A β Alz vs Donepezil NP; tek-yön ANOVA ardından post hoc Dunnett analizi). YNT testinde 24 saat sonrasında gruplar arasında fark gözlenmedi (b). MSL testi grupların öğrenme eğrileri; dört günlük öğrenme fazında naif kontroller ve tedavi grupları gizli platformu A β Alz grubundan önce buldu (c). Denemelerin son gününde gizli platform bulma süresi A β Alz grubunda diğerlerine kıyasla anlamlı daha uzundu (d) (\wedge p<0,05 A β Alz vs Donepezil NP, Kruskal-Wallis ardından post hoc Dunn'in çoklu karşılaştırma testi). Hedef kadranda kat edilen mesafenin tüm kadrnlara oranı (e) ve yüzde hızları gruplar arasında benzerdi (f) (n=6 A β Alz, n=6 Donepezil, n=6 Donepezil PLGA-b-PEG NP, n=6 Naif kontrol. Değerler ortalama \pm SH olarak gösterilmiştir. MSL: Morris Su labirenti; YNT: yeni nesne tanıma).

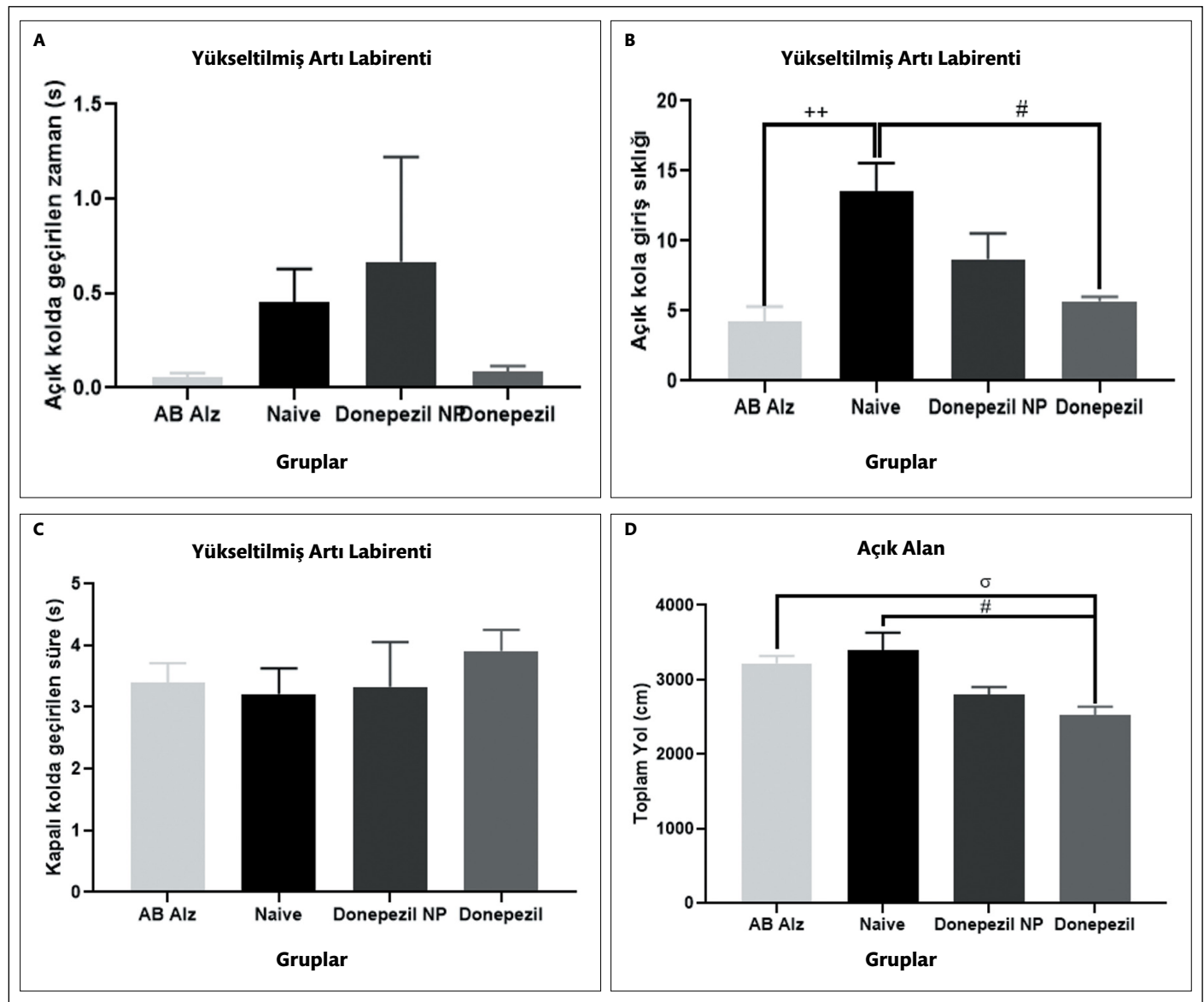
Lateral Ventriküle Amiloid β Enjeksiyonu Davranış Değişikliklerine Yol Açmaktadır

Hayvanlar, bilişsel fonksiyonlar için YNT ve MSL testleri ile değerlendirildi. Testte; A β Alz grubu, eğitim seansından bir saat sonra yeni nesneyi keşfetmek için naif grubuna kıyasla daha az zaman harcadı ($F=9,28$; $P=0,0069$ A β Alz vs Naif; Şekil 3a), bu durum kısa dönem bellek yetersizliğini göstermektedir. Eğitim seansından bir saat sonra donepezil yüklü PLGA-b-PEG nanopartikül (Donepezil NP) grubu, yeni nesne ile daha fazla zaman harcarken, serbest donepezil (Donepezil) grubu daha az ilgilendi ($F=9,28$; $P=0,0018$ A β Alz vs Donepezil NP; Şekil 3a). Bu sonuçlar, A β_{25-35} enjeksiyonundan sonra kısa dönem bellek bozukluğunun donepezil NP tedavisi ile iyileştiğini göstermektedir. Uzun dönem belleği analiz etmek için, eğitim seansından 24 saat sonra yeni nesne farklı bir nesneyle değiştirilerek aynı protokol tekrarlandı ancak gruplar arasında fark gözlenmedi (Şekil 3b).

Uzaysal öğrenme ve hafızayı analiz etmek için MSL testi uygulandı. Arka arkaya dört gün, hayvanlar gizli platformu bulmak için eğitildi ve platformu bulma zamanı kaydedildi (Şekil 3c). A β Alz grubu hariç tüm

gruplar süreç içerisinde gizli platformu bulmada ilerleme gösterdi (4. gün ortalama A β Alz süresi=16,92; Donepezil NP=10,25; Donepezil=11,45; Naif kontroller=12,625, Şekil 3c). 4. günde A β Alz grubu platformu bulmak için diğer gruplardan daha fazla zaman harcadı, ancak artış sadece donepezil NP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F=4,264$; $P=0,0238$, A β Alz vs Donepezil NP, Şekil 3d). Hem donepezil NP hem de serbest donepezil grupları, platformu bulmak için A β Alz grubuna kıyasla daha az zaman harcadı. Hedeflenen kadar ile tüm kadranlarda harcanan zaman, tüm gruplar arasında neredeyse eşit olmakla birlikte donepezil NP grubunda hafif bir artış gözlemlendi (Şekil 3e). Hızın da tüm gruplar arasında benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 3f), ki bu durum davranışlarda gözlenen farkın motor bozukluğundan kaynaklanmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar, A β_{25-35} enjeksiyonuna bağlı gelişen uzaysal hafıza bozukluğunun donepezil NP ile iyileştirildiğine işaret etmektedir.

Hayvanlar, YAL kullanılarak anksiyete benzeri davranışlar için test edildi. A β Alz grubu, naif kontrollere göre açık kolda daha az zaman harcadı ($F=9,65$; $P=0,0312$ A β Alz vs Naif; Şekil 4a). Serbest donepezil grubu da, istatistiksel



Şekil 4. a-d. Lateral ventriküle Amiloid β enjeksiyonu anksiyete benzeri davranışa neden olurken donepezil PLGA-b-PEG NP tedavisi tersine çevirdi. YAL testinde açık kolda geçirilen zaman A β Alz grubunda en kısa ve donepezil NP grubunda en uzundur (a). A β Alz grubu ve serbest donepezil grubu naif kontrollere göre açık kola daha az sıklıkla girdi (b) ($+P<0,05$ A β Alz vs Naif; $\#P<0,05$ Donepezil vs Naif; tek-yön ANOVA ardından post hoc Dunnett analizi), fakat kapalı kolda geçirilen zaman için gruplar arasında fark saptanmamıştır (c). Açık alan lokomotor aktivite testinde; toplam yol A β Alz ve naif kontrol gruplarına göre serbest donepezil grubunda anlamlı oranda azalmıştır (d) ($\sigma P<0,05$ Donepezil vs A β Alz; $\#P<0,05$ Donepezil vs Naif kontrol; tek-yönlü ANOVA ardından post hoc Dunnett analizi; $n=6$ A β Alz, $n=6$ Donepezil, $n=6$ Donepezil PLGA-b-PEG NP, $n=6$ Naif kontrol. Değerler ortalama \pm SH olarak gösterilmiştir; YAL: yükseltilmiş artı labirenti).

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının asetilkolinesteraz aktivite düzeyleri

Çalışma grupları	Asetilkolinesteraz aktivitesi (nmol/dk/mg)
Aβ Alz**	74,460±13,653
Naif	50,452±5,538
Donepezil NP ^{ΨΨ}	53,114±8,778
Donepezil (Serbest)	57,798±11,224

** P<0,01 Aβ Alz vs. Naif.

ΨΨ P<0,01 Donepezil NP vs. Aβ Alz.

Aβ Alz: Alzheimer grup; NP: Nanopartiküller.

olarak anlamlı olmaksızın Aβ Alz gibi açık kolda daha az zaman harcadı (Şekil 4a). Donepezil NP grubu ise açık kolda daha fazla zaman geçirdi ancak bu eğilim istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (Şekil 4a). Hem Aβ Alz hem de serbest donepezil grupları, donepezil NP tedavi grubundan farklı olarak, açık kola naif kontrollerden daha az girdi (F=7,95; P=0,0033 Aβ Alz vs Naif, P=0,0239 Donepezil vs Naif, Şekil 4b). Aβ Alz ve serbest donepezil grupları, istatistiksel anlamlılık olmaksızın kapalı kollarda daha fazla zaman harcadı (Şekil 4c). Bu sonuçlar, Aβ₂₅₋₃₅ enjeksiyonunun anksiyeteye yol açtığını ve donepezil NP tedavilerinin anksiyeteye karşı serbest donepezil tedavisine göre daha etkili olduğunu göstermektedir.

Motor fonksiyonu incelemek için lokomotor aktivite testi uygulandı. Aβ Alz grubu ile naif kontrol grubunun kat edilen mesafeleri benzerdi (Şekil 4d). Hem serbest donepezil hem de donepezil NP tedavileri hareketi azalttı. Ancak Aβ Alz ve naif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında yalnızca serbest donepezil grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=5,798; P=0,04 Aβ Alz vs Donepezil, P=0,0085 Donepezil vs Naif; Şekil 4d). Donepezil NP tedavisi, istatistiksel anlamlılık olmaksızın serbest donepezil tedavisine kıyasla hareketi bir miktar iyileştirdi (Şekil 4d). Bu sonuçlar Aβ₂₅₋₃₅ enjeksiyonunun motor hareketi etkilemediğini ancak serbest donepezilin hareket mesafesini azalttığını göstermektedir.

Donepezil Yüklü Nanopartikül Tedavisi, Asetilkolinesteraz Aktivitesini İnhibe Etmek için Daha Güçlü Bir Etkiye Sahiptir

Asetilkolinesteraz aktivite düzeyleri (nmol/dak/mg) Tablo 1'de verilmiştir. Deney grupları değerlendirildiğinde, Aβ birikiminden dolayı asetilkolinesteraz aktivitesinde artış gözlemlendi (Aβ Alz vs Naif, P<0,01, Tablo 1). Enzim aktivitesindeki bu artış, serbest donepezil ve donepezil NP tedavilerinin uygulanmasıyla normal seviyelere döndü. Ayrıca donepezil NP'nin, serbest donepezilden daha etkili olduğu bulundu (P<0,01, Tablo 1). Bu durum, ilacın NP'lerle kontrollü salım profilinden kaynaklanmaktadır.

TARTIŞMA

AH, hipokampus ve kortekste geri dönüşümsüz nöron kaybı ile seyreden en yaygın demans tipi, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (1). AH'nin henüz kesin bir tedavisi yoktur ve yan etkileri ve uyunc problemlerine rağmen donepezil gibi ilaçlar sadece semptomatik tedavi için kullanılabilir.

Öncelikle, donepezil yüklü PLGA-b-PEG NP sentezlendi, karakterize edildi, iv ve intraperitoneal uygulamaları için optimize edildi ve dokulara dağılımını azaltmak ve istenilen bölgede konsantrasyonunu artırmak için Aβ fibrillerine hedeflendirildi (12). Sonuçlar, donepezil yüklü NP'nin in vitro Aβ fibril oluşumunu stabilize edebildiğini ve KBB'i geçebildiğini ve ayrıca Aβ fibrillerine karşı nöroprotektif etkisi olduğunu göstermiştir (12). Aslına bakılırsa bu sonuçlar, PEGlenmiş NP'ler daha uzun etki süresine sahiptir, biyoyoumluluğu daha iyidir, in vivo Aβ'yi hedefleyerek tedavi artırdığını belirten literatür ile uyumludur (19).

Bu çalışmada, AH patolojisi oluşturmak için önceden agregre edilmiş Aβ₂₅₋₃₅ icv olarak enjekte edildi ve enjeksiyon hafif bilişsel gerileme ile sonuçlandı. Kortekste ya da hipokampüste nöronal bir kayıp olmasa da davranışsal değişiklikler gözlemlendi. Dolayısıyla, Aβ fibrillerinin nöronal kayıp yerine sinaptik disfonksiyon nedeniyle hafıza ve öğrenmede yetersizliğe neden olduğu söylenebilir (20). Bu nedenle; Aβ₂₅₋₃₅ fibril sıçan modelinin, hafif düzeyde AH modeli oluşturmada ve davranışsal değişiklikler gözlemlendiği için bilişsel fonksiyonları çalışmada faydalı olduğu söylenebilir.

Kısa dönem ve uzun dönem bellek YNT ile test edildi. Aβ Alz grubunda kısa dönem bellekte yetersizlik gözlenirken, donepezil yüklü NP tedavisi bunu tersine çevirdi. NP ile beyine hedeflendirilmiş donepezil, iv olarak uygulanan serbest donepezile göre çok daha düşük dozlarda kullanılmasına rağmen, kısa dönem belleği serbest donepezilden çok daha güçlü bir şekilde etkiledi. Bu durum, donepezilin direkt olarak beyine hedeflendirilmesinin tedavide önemli bir fırsat olduğunu göstermektedir (21,22). Ancak, uzun dönem bellek testinde Aβ Alz ve donepezil tedavi grupları arasında fark gözlemlenmedi. Bütün grupların her iki nesne ile de eşit zaman geçirdikleri gözlemlendi. Bu durum, 24 saat sonra bütün hayvanların hatırlamakta zorluk çektiklerini, bu nedenle her iki nesne ile de eşit şekilde ilgilendiklerini göstermektedir (23).

Uzaysal öğrenme ve hafıza MSL ile test edildi. Aβ Alz grubu gizli platformun yerini öğrenme güçlüğü gösterdi ve donepezil yüklü NP tedavisi uzaysal öğrenmeyi artırdı. Hem serbest donepezil hem de donepezil yüklü NP grupları naif kontrollere benzer sürelerde gizli platformu bulurlarken, sadece donepezil yüklü NP tedavisi, Aβ Alz grubuna göre platformu bulma süresinde anlamlı kısalma gösterdi. Bu durum, NP ile hedeflendirmenin daha başarılı olduğunu göstermektedir (21,22).

YAL testi sıçanlarda anksiyete-benzeri davranışı değerlendirmek için gerçekleştirildi. Aβ Alz grubunda anksiyete-benzeri davranış gözlenirken, serbest donepezil uygulanması bu davranışı değiştirmede. Aksine, donepezil yüklü NP tedavisi ise anksiyete benzeri davranışı azalttı. Anksiyetinin uyarılması donepezilin bilinen bir etkisidir (24,25). Ancak, donepezil yüklü NP grubunda diğer gruplara göre daha yüksek standart hata olsa da hipo-anksiyete benzeri etki gözlemlenmiştir. Açık kola giriş sıklıkları değerlendirildiğinde, her iki donepezil tedavi grubunun da naif kontrollerden daha az açık kola girdikleri ve kapalı kolda daha çok vakit geçirdikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle, donepezil yüklü NP'lerin açık kolda daha uzun süre vakit geçirmesinin sebebi donma refleksi olabilir. Ek olarak, eğer toplam kat edilen mesafe dikkate alınır, her iki tedavi grubu da toplamda daha az hareket etmiştir ki bu durum da donma refleksi ve anksiyete benzeri davranışa işaret etmektedir (24,26).

Lokomotor aktiviteyi araştırmak ve davranış testlerinde meydana gelen değişikliklerin motor yetersizlikten kaynaklanmadığını değerlendirmek için açık alan testi yapılmıştır. Çalışmamızda Aβ Alz grubu, naif kontroller kadar hareket etmiştir. Ancak, özellikle serbest donepezil

grubu olmak üzere her iki donepezil tedavi grubu da daha az hareket etmiştir. Donepezilin spontan lokomotor aktiviteyi azaltabildiği ve anksiyete benzeri davranışa neden olabildiği bilinmektedir (24,25). Eğer ki hayvanlarda anksiyete varsa, merkezden daha karanlık alanlarda kalma eğilimdedirler ve serbest donepezil grubu açık kola daha az girerek, zamanının büyük çoğunluğunu kapalı kolda geçirmiştir. Ek olarak, MSL testinde toplam hız ve toplam kat edilen mesafede de gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuçlar, harekette azalmanın sebebinin motor bozukluktan ziyade anksiyetenin olabileceğini düşündürmektedir.

Serbest donepezil ve donepezil yüklü NP etkililiğini karşılaştırmak için in vivo asetilkolinesteraz aktivite tayini yapılmıştır. Naif kontrol grubunda aktivite literatür ile uyumlu olarak 50,452 nmol/min/mg protein hesaplanmıştır. Aβ Alz grubunda aktivitenin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (27). Serbest donepezilin iv uygulanması aktiviteyi azaltırken, donepezil yüklü NP'lerin iv uygulanması aktiviteyi serbest donepezil uygulamasına göre de azaltmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, donepezil yüklü NP'lerin asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe etme gücünün serbest donepezilden daha güçlü olduğu söylenebilir. Bu durum donepezilin NP'den kontrollü salımının ve uzun etki süresinin sonucu olarak düşünülebilir. Aβ Alz grubunun asetilkolinesteraz aktivitesinin naif kontrollere göre arttığı bulunmuştur. AH'de kolinerjik terminal kaybindan dolayı asetilkolinesteraz aktivitesinin azalması beklenirken, Aβ ile ilişkili olarak asetilkolinesteraz aktivitesinin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (28,29). Aβ'nın icv olarak beyine enjeksiyonu sonrasında asetilkolinesterazın monomerik formunun arttığını gösteren bir çalışma değerlendirildiğinde asetilkolinesterazın farklı formları, asetilkolinesteraz aktivitesindeki artışın nedenlerinden biri olabilir (30). Ayrıca, kritik bölgelerde asetilkolinesterazın bulunuşu yeni oligomer ve fibril oluşumunu başlatarak Aβ toksitesinde rol oynuyor olabilir (28,29). Her ne kadar mekanizması açık olmasa da, bu bulgular Aβ Alz grubundaki asetilkolinesteraz aktivitesindeki artışı ve donepezilin nasıl bu artışta azalmaya sebep olduğunu açıklayabilir. Bütün bu sonuçlar, donepezil yüklü NP tedavisinin beyinde direkt hedefleme ve daha uzun etki süresi ile daha etkili ve umut vaat edici olduğunu işaret etmektedir.

Sonuç olarak, Aβ fibril AH modelinde, donepezil yüklü NP tedavisinin öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını arttırdığı ve asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, NP aracılı ilaç hedeflendirme tedavisi umut vaat edici bir tedavi fırsatı olabilir. Ancak, ileride donepezil yüklü NP tedavisinin uzun dönem kronik etkilerinin in vivo olarak çalışılması daha iyi bir bakış açısı sağlayacaktır.

Teşekkür: Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü ve Psikiyatri Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'nın tüm üyelerine laboratuvarındaki tüm ekipmanların kullanımında verdikleri destek ve yardımlardan dolayı teşekkür ederiz.

Teknik destekleri için Necati Şengönlü ve Erdoğan Aksay'a teşekkür ederiz.

Etik Komite Onayı: Tüm deneysel prosedürler Hacettepe Yerel Hayvan Etik Kurulu (izin numarası: 2012/13-10, 20.02.2012 değişiklik tarihi 03.02.2015) tarafından onaylanmış ve ulusal ve yerel hayvan bakım ve kullanım kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağısız.

Yazar Katkıları: Fikir- GU, SYÇ, BCT; Tasarım- EÇ, SUM, BCT; Denetleme- BCT, GU; Kaynaklar- GU, SYÇ, BCT; Malzemeler- EÇ, SUM, İB; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- EÇ, SUM, İB, MG, KU; Analiz ve/veya Yorum- EÇ, SUM, BCT, İB; Literatür Taraması- EÇ, BCT; Yazıyı Yazan- EÇ, BCT; Eleştirel İnceleme- BCT, GU.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir TÜBİTAK-ID: 112T490.

KAYNAKLAR

- Adlard PA, Tran BA, Finkelstein DI, Desmond PM, Johnston LA, Bush AI ve ark. A review of beta-amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2014;8:327. PubMed PMID: 25400539. Pubmed Central PMCID: PMC4215612. Epub 2014/11/18. [Crossref]
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9770):1019-1031. [Crossref]
- Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18. PubMed PMID: 26149638. Epub 2015/07/08. [Crossref]
- Checler F, Vincent B. Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci*. 2002;25(12):616-620. PubMed PMID: 12446128. Epub 2002/11/26. [Crossref]
- Hempel H, Mesulam M-M, Cuellar AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT ve ark. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917-1933. PubMed PMID: 29850777. Pubmed Central PMCID: PMC6022632. Epub 2018/06/01. [Crossref]
- Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*. 2000;88(2):93-113. PubMed PMID: 11150591. Epub 2001/01/11. [Crossref]
- Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G ve ark. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats. *Am J Pathol*. 2011;179(1):315-334. PubMed PMID: 21703413. Pubmed Central PMCID: PMC3123848. Epub 2011/06/28. [Crossref]
- Pottiez G, Duban-Deweer S, Deracinois B, Gosselet F, Camoin L, Hachani J ve ark. A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells. *J Proteomics*. 2011;75(2):628-641. PubMed PMID: 21982828. Epub 2011/10/11. [Crossref]
- Şimşek S, Eroğlu H, Kurum B, Ulubayram K. Brain targeting of Atorvastatin loaded amphiphilic PLGA-b-PEG nanoparticles. *J Microencapsul*. 2013;30(1):10-20. PubMed PMID: 22734433. Epub 2012/06/28. [Crossref]
- Yetişgin AA, Cetinel S, Zuvin M, Kosar A, Kutlu O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules*. 2020;25(9):2193. PubMed PMID: 32397080. Pubmed Central PMCID: PMC7248934. Epub 2020/05/14. [Crossref]
- Takada-Takatori Y, Nakagawa S, Kimata R, Nao Y, Mizukawa Y, Urushidani T ve ark. Donepezil modulates amyloid precursor protein endocytosis and reduction by up-regulation of SNX33 expression in primary cortical neurons. *Sci Rep*. 2019;9(1):11922. PubMed PMID: 31417133. Pubmed Central PMCID: PMC6695423. Epub 2019/08/17. [Crossref]
- Baysal I, Ucar G, Gultekinoglu M, Ulubayram K, Yabanoglu-Ciftci S. Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(1):33-45. PubMed PMID: 26911385. Epub 2016/02/26. [Crossref]
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem*. 1995;64(1):253-265. PubMed PMID: 7798921. Epub 1995/01/01. [Crossref]
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates -hard cover edition. 6th Ed. US: Elsevier, Academic Press; 2006.
- Uğur Mutluay S, Çınar E, Yalçın Çakmaklı G, Ulusoy A, Elibol B, Tel BC. Modelling Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease: AAV Mediated Overexpression of Alpha-synuclein in Rat Hippocampus and Basal Ganglia [Parkinson Hastalığında Motor Dışı Semptomların Modellenmesi: Siçan Hipokampusunda ve Bazal Gangliyonlarında Alfa-sinukleinin AAV Aracılı Aşırı İfadesi]. *Turk J Neurol*. 2020;26(4):322-329. [Crossref]
- Tel BC, Kazkayası İ, Telli G, Cinar E, Mutluay SU, Çakmaklı GY ve ark. Higher alpha-synuclein aggregate density does not lead to more severe dopaminergic cell loss in the AAV-mediated overexpression model of Parkinson's Disease: A timecourse study. *J Res Pharm (online)*. 2021;25(3):352-358. [Crossref]
- Cinar E, Yalçın-Çakmaklı G, Saka E, Ulusoy A, Yuruker S, Elibol B ve ark. Modelling cognitive deficits in Parkinson's disease: Is CA2 a gateway for hippocampal synucleinopathy? *Exp Neurol*. 2020;330:113357. PubMed PMID:32437708. Epub 2020/05/22. [Crossref]
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95. PubMed PMID:13726518. Epub 1961/07/01. [Crossref]

19. Shadab MD, Ali M, Baboota S, Sahni JK, Bhatnagar A, Ali J. Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(2):278–287. PubMed PMID:23369094. Epub 2013/02/02. [\[Crossref\]](#)
20. Tu S, Okamoto S, Lipton SA, Xu H. Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2014;9:48. PubMed PMID:25394486. Pubmed Central PMCID. PMC4237769. Epub 2014/11/15. [\[Crossref\]](#)
21. Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Volceanov A, Teleanu RI. Impact of Nanoparticles on Brain Health: An Up to Date Overview. *J Clin Med.* 2018;7(12):490. PubMed PMID:30486404. Pubmed Central PMCID. PMC6306759. Epub 2018/11/30. [\[Crossref\]](#)
22. Yoo JH, Valdovinos MG, Williams DC. Relevance of donepezil in enhancing learning and memory in special populations: a review of the literature. *J Autism Dev Disord.* 2007;37(10):1883–1901. PubMed PMID:17221321. Epub 2007/01/16. [\[Crossref\]](#)
23. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing.* 2012;13(2):93–110. PMID: 22160349 PMCID: PMC3332351. [\[Crossref\]](#)
24. Giacomini AC, Bueno BW, Marcon L, Scolari N, Genario R, Demin KA ve ark. An acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, increases anxiety and cortisol levels in adult zebrafish. *J Psychopharmacol.* 2020;34(12):1449–1456. PubMed PMID: 32854587. Epub 2020/08/29. [\[Crossref\]](#)
25. Pompeia S, Gouveia JR, Galduroz JC. Acute mood effect of donepezil in young, healthy volunteers. *Hum Psychopharmacol.* 2013;28(3):263–269. PubMed PMID: 23653426. Epub 2013/05/09. [\[Crossref\]](#)
26. Pavlova IV, Rysakova MP, Zaichenko MI, Broshevitskaya ND. Behavior of rats with high and low levels of freezing in defensive situations and on selection of food reinforcement. *Neurosci Behav Physiol.* 2020;50(1):126–136. [\[Crossref\]](#)
27. Tang J, Carr RL, Chambers JE. Changes in rat brain cholinesterase activity and muscarinic receptor density during and after repeated oral exposure to chlorpyrifos in early postnatal development. *Toxicol Sci.* 1999;51(2):265–272. PubMed PMID: 10543028. Epub 1999/10/30. [\[Crossref\]](#)
28. Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem.* 2004;11(1):43–49. PubMed PMID: 14747516. Epub 2004/01/30. [\[Crossref\]](#)
29. Carvajal FJ, Inestrosa NC. Interactions of AChE with Abeta Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:19. PubMed PMID: 21949501. Pubmed Central PMCID: PMC3172730. Epub 2011/09/29. [\[Crossref\]](#)
30. Saez-Valero J, de Ceballos ML, Small DH, de Felipe C. Changes in molecular isoform distribution of acetylcholinesterase in rat cortex and cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration of amyloid beta-peptide. *Neurosci Lett.* 2002;325(3):199–202. PubMed PMID: 12044655. Epub 2002/06/05. [\[Crossref\]](#)