

**5-FLOROURASİL YÜKLÜ PLGA
NANOPARTİKÜLLERİNİN TOROİDAL
MİKROAKIŞKAN SİSTEMLER İLE ÜRETİMİ VE
PROSES DEĞİŞKENLERİNİN DENEY TASARIMI İLE
OPTİMİZASYONU**

**PRODUCTION OF 5-FLUOROURACIL LOADED PLGA
NANOPARTICLES WITH TOROIDAL MICROFLUIDIC
SYSTEM AND OPTIMIZATION OF PROCESS
VARIABLES BY DESIGN OF EXPERIMENTS**

ŞEYMA NUR TÜRKMEN KOÇ

PROF. DR. KEZBAN ULUBAYRAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024



Türk Bilim Kadınlarına...

ÖZET

5-FLOROURASİL YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN TOROİDAL MİKROAKIŞKAN SİSTEMLER İLE ÜRETİMİ VE PROSES DEĞİŞKENLERİNİN DENEY TASARIMI İLE OPTİMİZASYONU

Şeyma Nur TÜRKMEN KOÇ

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Ağustos 2024, 122 sayfa

On yılı aşkın süredir, mikroakışkan teknolojisi nanopartikül (NP) üretimi için yeni fırsatlar sunmuştur. Bununla birlikte, laboratuvar ölçeğinde NP üreten mikroakışkan sistemlerin, farmasötik endüstri için daha büyük hacimlerde üretim yapabilmesi amacıyla daha gelişmiş teknolojilere ihtiyaç vardır. Çözüm yollarından biri mikroakışkan cihazların paralelleştirilmesidir. Ancak bu yöntem karmaşık sıvı akış dağılımını ve her sıvı girişi için ayrı pompa veya basınç kontrol sistemini gerektirir. Bu yaklaşım hem karmaşık ve pahalı, hem de güvenilirliği düşüktür. Diğer taraftan daha yüksek hacimde orta/büyük ölçekte çalışabilen mikromikserlerin, küçük ölçekli laboratuvar araştırmaları için minyatürizasyonu, mikroakışkanların seri üretimde kullanılan geleneksel enjeksiyon kalıplama yöntemiyle fabrikasyonu mümkün değildir. Yeni toroidal mikromikserler, hem araştırma hem de ilaç endüstrisinin gereksinimlerini karşılayan akış hızlarında (2-10 mL/dk) çalışabilmektedir. Ayrıca, bu yeni mikromikserlerin üretimleri ekonomiktir. Tüm bu avantajlara rağmen, toroidal mikromikser kullanılarak 5-Fluorourasil (5FU) yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) NP'lerin üretimi ve kritik proses parametrelerinin NP özellikleri üzerindeki etkisi henüz araştırılmamıştır.

Bu tez kapsamında, kanser tedavisi için yenilikçi bir toroidal mikroakışkan sistem kullanılarak, tekrarlanabilir ve stabil 5FU yüklü PLGA (5FU-PLGA) NP'lerin üretilmesi

ve sistem parametrelerinin optimizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla yeni toroidal mikroakışkan cihazın kritik proses parametreleri olan akış hızı oranları (FRR), yani organik:sulu (O:S) faz oranları ve toplam akış hızı (TFR) değiştirilerek; proses parametrelerinin hem PLGA NP'lerin hem de 5FU-PLGA NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca, kritik proses parametrelerini belirlemek ve optimum proses parametrelerini tahmin etmek için Deney Tasarımı (DoE) yaklaşımı kullanılmıştır.

Formülasyon ön denemelerinde sabit proses parametreleri kullanılarak farklı çözücüler (aseton ve asetonitril), stabilizatörler (Tris tamponu ve %1 PVA), PLGA konsantrasyonları (%0.5, %1 ve %2) test edilmiştir. Organik faz olarak %1 PLGA/aseton ve sulu faz olarak Tris tamponun kullanıldığı formülasyon en düşük boyut ve PDI değerine sahip olması nedeniyle çalışmalarda bu formülasyon seçilmiş ve PLGA NP'lere %1(w/w) oranında 5FU yüklenmiştir. Bu formülasyon üzerinde TFR 5-15 mL/dk ve FRR ise 1:3-1:7 aralığında proses parametrelerinin PLGA NP'ler ve 5FU-PLGA NP'ler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin 100-150 nm arasında monodispers ve küresel yapıda olduğu belirlenmiştir. Hem ilaç yüklü hem de ilaç yüklü olmayan NP'lerin PDI değerleri ise 0.2'den küçük bulunmuş ve zeta potansiyeli ise yaklaşık -65 ila -45 mV arasında değiştiği izlenmiştir. NP'lerin ilaç enkapsülasyon etkinliği (~%52) ve konsantrasyonunun ($\sim 9.50 \times 10^{11}$ NP/mL) bu proses parametrelerinden etkilenmediği görülmüştür.

PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin üretiminde kritik proses değişkenlerinin sistematik bir değerlendirmesi Deney Tasarımı (DoE) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tam faktöriyel tasarıma göre TFR, FRR ve TFRx FRR ile enkapsülasyon verimliliği ve PDI arasında belirgin bir korelasyon olmadığı görülmüştür. Yanıt yüzey tasarımına göre, hem PLGA NP'lerin hem de 5FU-PLGA NP'lerin boyut ve zeta potansiyel değerleri, TFR'den doğrudan etkilenirken, FRR'den etkilenmemiştir. Ayrıca, PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin boyut ve zeta potansiyel değerleri, birbirinden farklı olarak, bağımsız değişkenlerin farklı etkileşimlerinden (TFRxTFR, FRRx FRR, TFRx FRR) etkilenmiştir. Sonuç olarak TFR'nin, NP özelliklerine etki eden en önemli parametre olduğu tespit edilmiş olup, bunun da toroidal mikromikser tasarımına bağlı olduğu bilinmektedir.

PLGA NP'ler ve 5FU-PLGA NP'leri saflaştırmak amacıyla yapılan santrifüj işlemi sonucuna göre; genel olarak boyut, PDI ve zeta potansiyeli değerlerini korudukları

görülmüştür. Elde edilen ilaç yüklü formülasyonların raf ömürlerini belirlemek için NP'ler 3 ay boyunca +4°C'de tutulmuş ve stabil oldukları tespit edilmiştir. Sıcaklığın NP üzerindeki etkisini değerlendirmek için NP'ler 21 gün 25°C ve 37°C'de bekletildiğinde ise sıcaklık artışıyla NP'lerin stabilitelerinin olumsuz etkilendiği izlenmiştir.

PLGA NP'lere farklı oranlarda 5FU yüklendiğinde (%1, %5, %10, %15, %20 (w/w)) NP boyutunun ve enkapsülasyon etkinliğinin (~%50) değişmediği görülmüştür. Tüm formülasyonların saflaştırma işleminden sonra monodispers ve oldukça kararlı oldukları tespit edilmiştir.

5FU yüklü (%1 ve %20 (w/w)) PLGA NP'lerin salım profili incelendiğinde ise ilk 8 saatte ani bir salımın arkasından 5FU, 5 gün boyunca kontrollü bir salım sergilemiş ve bu salım modelinin Higuchi kinetik modeline uyduğu görülmüştür. 5FU-PLGA NP'lerin sitotoksikite sonuçları değerlendirildiğinde ise % 20 ilaç yükleme kapasitesine sahip 5FU-PLGA NP'lerin IC50 değerine ulaşarak insan skuamöz karsinom hücreleri (A-431) üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak toroidal mikroakışkan sistemle, hem laboratuvar hem de ilaç endüstrisi için tek bir kanalda ölçek büyötmeye gerek kalmaksızın, 5-FU yüklü stabil PLGA NP'lerin üretimi başarıyla sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Toroidal (Bifurcating) mikroakışkan sistem, PLGA NP, 5-florourasil (5-FU), proses optimizasyonu, deney tasarımı (DoE).

ABSTRACT

PRODUCTION OF 5-FLUOROURACIL LOADED PLGA NANOPARTICLES WITH TOROIDAL MICROFLUIDIC SYSTEM AND OPTIMIZATION OF PROCESS VARIABLES BY DESIGN OF EXPERIMENTS

Şeyma Nur TÜRKMEN KOÇ

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

August 2024, 122 pages

In recent decades, microfluidics has presented new opportunities for the production of nanoparticles (NPs). However, microfluidic devices that produce NPs at laboratory scale require more advanced technologies to enable larger scale production for the pharmaceutical industry. One solution is the parallelization of microfluidic devices. However, scale-up of microfluidic devices through parallelization requires complex fluid flow distribution and the use of a separate set of pumps or pressure controllers for each fluid inlet. This approach is more complex, expensive, and less reliable. On the other hand, high-flow micromixers, such as staggered herringbone mixers, are difficult to manufacture using traditional methods when miniaturisation is required for lab-scale research. The new toroidal (bifurcating) micromixer, which operates at high flow rates of 2-10 mL/min, is well suited for production of NPs for both research and the pharmaceutical industry. Additionally, it can be fabricated more cost-effectively compared to other micromixers. Despite all these advantages, the production of 5 Fluorouracil (5FU) loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) NPs using a toroidal micromixer and the effect of critical process parameters on NP properties have not yet been investigated.

The aim of this study was to produce of reproducible and stable 5FU loaded PLGA (5FU-PLGA) NPs using an innovative toroidal microfluidic system for cancer therapy. To achieve this, the critical process parameters of the new toroidal microfluidic device, the flow rate ratios (FRR, the organic to aqueous phases) and the total flow rate (TFR) were evaluated. The effects of these process parameters on the physicochemical properties of both PLGA nanoparticles (NPs) and 5FU-PLGA NPs were analyzed. Furthermore, a Design of Experiments (DoE) approach was used to identify critical process parameters and predict optimal process conditions.

For the preliminary formulation trials, different solvents (acetone and acetonitrile), stabilizers (Tris buffer and 1% PVA), and PLGA concentrations (0.5%, 1%, and 2%) were tested at constant process parameters. The formulation using 1% PLGA/acetone as the organic phase and Tris buffer as the aqueous phase was selected from the preliminary studies due to its smallest size and lowest PDI values. Subsequently, 1% 5FU (w/w) was loaded onto the PLGA NPs. In this formulation, the effects of process parameters with TFR between 5 and 15 mL/min and FRR between 1:3 and 1:7 on PLGA NPs and 5FU-PLGA NPs were investigated. The resulting PLGA and 5FU-PLGA NPs were found to be monodisperse and spherical with sizes between 100-150 nm. The PDI values of both drug-loaded and drug-free NPs were less than 0.2, and the zeta potential ranged from approximately -65 to -45 mV. The drug encapsulation efficiency (~52%) and concentration ($\sim 9.50 \times 10^{11}$ NPs/ml) of the NPs were not affected by variations in these process parameters.

A systematic assessment of critical process variables for the production of PLGA and 5FU-PLGA NPs was conducted using Design of Experiment (DoE). According to the response surface design, the size and zeta potential values of both PLGA and 5FU-PLGA NP were directly influenced by TFR but not by FRR. In addition, the size and zeta potential values of PLGA and 5FU-PLGA NPs were affected differently by different interactions of the independent variables (TFR $\times$ TFR, FRR $\times$ FRR, TFR $\times$ FRR). Furthermore, based on the full factorial design, there was no significant correlation between encapsulation efficiency or PDI and the three parameters (TFR, FRR, and TFR $\times$ FRR). As a result, TFR had been identified as the most significant parameter influencing NP properties, and this finding is known to be closely related to the design of the micromixer.

After PLGA NPs and 5FU-PLGA NPs were purified by centrifugation, they retained their overall size, PDI and zeta potential values. In order to determine the shelf life of the drug loaded formulations, the NPs were stored at +4°C for 3 months and remained stable. To assess the effect of temperature on the NPs, they were stored at 25°C and 37°C for 21 days. It was found that the stability of the NPs was negatively affected by the increase in temperature.

It was observed that NP size and encapsulation efficiency (~50%) did not change when different ratios of 5FU (1%, 5%, 10%, 15%, 20% (w/w)) were loaded onto PLGA NPs. All formulations were found to be monodisperse and highly stable even after the purification process.

When the release profile of 5FU-loaded (%1 and %20 (w/w)) PLGA NPs was examined, after an initial burst release within the first 8 hours, 5FU exhibited a controlled release over 5 days. This release pattern was found to be consistent with the Higuchi kinetic model. When evaluating the cytotoxicity results of 5FU-PLGA NPs, it was determined that the 5FU-PLGA NPs with a drug loading capacity of 20% achieved an IC₅₀ value, indicating a toxic effect on human squamous carcinoma cells (A-431).

In conclusion, the toroidal microfluidic system with single microchannel successfully enabled the production of stable 5FU-loaded PLGA NPs for laboratory and pharmaceutical industry applications without the need for scaleup.

Keywords: Toroidal (bifurcating) microfluidic system, PLGA NPs, 5-fluorouracil (5-FU), process optimization, design of experiment (DoE).

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora tezim boyunca ufuk ve vizyonuyla ilham veren, her türlü araştırma imkanına olanak tanıyan kıymetli danışmanım Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Tez izleme komitesinde yer alan, çalışmalarımı takip eden ve değerli yorumlarını esirgemeyen Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve Doç. Dr. Cem Bayram'a,

Bilgi ve tecrübesiyle daima destek olan Prof. Dr. İpek Eroğlu'na, Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Öztürk'e ve Dr. Öğr. Üyesi Gözdem Dural'a,

Doktora yolunu ve yolculuğunu arkadaşlıklarıyla güzelleştiren Arş. Gör. Elif Cönger, Arş. Gör. Hümeysra Battal, Dr. Halime Serinçay, Dilek Güngör, Hadiye Keskin, Soghrat Salamati, Başak Erdoğan, Melike Akman ve Tuğba Çağlayan'a,

Tez çalışmalarım süresince kullanmış olduğum mikroakışkan çipleri tasarlayıp, üreten ve tedarik eden Nehir Biyoteknoloji Şirketi'ne,

“2211/A Yurtiçi Genel Doktora Burs Programı” kapsamında almış olduğum finansman için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve “100/2000 YÖK Doktora Bursu” için Yükseköğretim Kurulu'na,

Doktora sürecimin başlangıcından sonuna kadar beni sabırla destekleyen, cesaretlendiren değerli eşim Çağrı'ya ve kalbime her daim huzur veren sevgili oğlum Göktürk'e,

Bu süreçte hiçbir yardımı esirgemeyen güzel yürekli, sevgi dolu geniş ailemin her bir ferdine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tezin Amacı	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Mikroakışkan Sistemler.....	4
2.2. Başlıca Mikroakışkan Tasarımları	5
2.2.1. Pasif Mikroakışkan Sistemler.....	5
2.2.2. Aktif Mikroakışkan Sistemler.....	10
2.3. Mikroakışkanların Üretiminde Kullanılan Yöntemler	12
2.3.1. Kalıplama.....	13
2.3.2. 3B Baskı	14
2.4. Mikroakışkanların Üretiminde Kullanılan Malzemeler.....	15
2.5. Mikroakışkanlarda Akış Dinamikleri	18
2.6. Nanopartikül Üretiminde Mikroakışkan Sistemler ve Geleneksel Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	20
2.7. Mikroakışkanlarda Farmasötik Nanopartiküllerin Oluşum Mekanizması	21
2.7.1. Karışma	21
2.7.2. Süper Doygunluk.....	22
2.7.3. Çekirdeklenme	23
2.7.4. Büyüme.....	24
2.8. Nanopartikül Oluşumunu Etkileyen Parametreler	25

2.8.1. Solvent ve Antisolventin Karışabilirliği	26
2.8.2. Solvent-Antisolvent Hacim Oranı	26
2.8.3. Çözücü ve Antisolventin Akış Hızı	26
2.8.4. Antisolvent Sıcaklığı	26
2.8.5. Çözücü Fazdaki İlaç Konsantrasyonu	27
2.8.6. Stabilizatör Seçimi	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2. 5-FU'nun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
3.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)	30
3.2.2. UV/Vis Spektrumu	30
3.3. 5FU'nun Miktar Tayini	30
3.4. Nanopartiküllerin Üretiminde Kullanılan Toroidal Mikromikserin Özellikleri	
31	
3.5. Ön Formülasyon Çalışmaları	32
3.6. PLGA NP'lerin Toroidal Mikromikser ile Üretimi.....	32
3.7. 5FU-PLGA NP'lerin Toroidal Mikromikser ile Üretilmesi.....	32
3.8 PLGA NP'lerin ve 5FU-PLGA NP'lerin Karakterizasyonu.....	33
3.8.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)	33
3.8.2. Nanopartikül İzleme Analizi (NTA).....	33
3.8.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	34
3.8.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	34
3.9. 5FU-PLGA NP'lerin Enkapsülasyon Etkinliği	34
3.10. Deney Tasarımı.....	35
3.10.1. İki-Seviye Tam Faktöriyel Tasarım (FFD).....	35
3.10.2. Yanıt Yüzey Metodu (RSD).....	36
3.11. 5FU-PLGA NP'lerin Stabilitate Çalışmaları	37
3.12. 5FU Yükleme Kapasitesinin 5FU-PLGA NP'lerin Fizikokimyasal	
Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi	37
3.13. <i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	37
3.14. Kinetik Çalışmalar	38
3.15. 5FU-PLGA NP'lerinin Toksisitesi	38

3.17. İstatistiksel analiz	39
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	41
4.1. 5FU'nun FT-IR ve UV Spektrumları	41
4.2. 5FU'nun HPLC ile Tayini	42
4.3. Ön Formülasyon Çalışmaları.....	43
4.4. Toroidal Mikromikser Proses Parametrelerinin PLGA NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisi	45
4.5. Toroidal Mikromikser Proses Parametrelerinin 5FU-PLGA NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisi	49
4.6. Saflaştırma İşleminin PLGA NP'ler ve 5FU-PLGA NP Özellikleri Üzerine Etkisi	54
4.7. Toroidal Mikromikser Proses Parametrelerinin NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisinin Deney Tasarımı ile Değerlendirilmesi	58
4.7.1. FFD	58
4.7.1. RSD	74
4.8. 5FU-PLGA NP'lerin Stabilitesi	81
4.9. 5FU Yükleme Kapasitesinin NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisi	89
4.10. 5FU-PLGA NP'lerin <i>In vitro</i> Salım Profilleri ve Kinetik Değerlendirmeleri.....	91
4.11. 5FU-PLGA NP'lerin Hücresel Toksisitesi	94
5. YORUM	98
6. KAYNAKLAR.....	100
EKLER.....	119
EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar	119
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	120
ÖZGEÇMİŞ	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Presipitasyon sürecinin aşamaları: Karışma, süperdoygunluk, çekirdeklenme ve büyüme.....	21
Şekil 2.2. NP oluşumunu, monomer konsantrasyonunu zamanın bir fonksiyonu olarak tanımlayan LaMer mekanizması.....	23
Şekil 2.3. Çekirdeklenme için serbest enerji diyagramı.	24
Şekil 3.1. Toroidal mikroakışkan sistemin fotoğrafı (a), ve Toroidal mikroakışkan sistemin şematik gösterimi: Sulu ve organik fazlar için iki giriş, akışkanların birbiriyle karıştığı karışma kanalı ve NP'lerin elde edildiği bir çıkış (b).....	31
Şekil 4.1. 5FU'nun FT-IR spektrumu.....	41
Şekil 4.2. 5FU'nun UV spektrumu boyu ($\lambda_{max}=266\text{ nm}$).....	41
Şekil 4.3. 5-FU'ya ait HPLC piki.....	42
Şekil 4.4. HPLC yöntemiyle elde edilen 5-FU'nun konsantrasyon standart doğrusu ($n=3$).	42
Şekil 4.5. TFR'nin PLGA NP'lerin özellikleri üzerine etkisi: partikül boyutu, PDI (a) ve zeta potansiyeli (b). Ölçümler DLS ile yapılmıştır. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p<0.05$ 'i temsil etmektedir.	46
Şekil 4.6. PLGA NP'lerin NTA dağılım grafiği (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).	47
Şekil 4.7. Farklı TFR'de (5 mL/dk, 10 mL/dk ve 15 mL/dk) üretilen PLGA NP'lerin SEM görüntüleri (FRR = 1:3).	48
Şekil 4.8. 5FU-PLGA NP'lerin TEM görüntüsü (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).	48
Şekil 4.9. TFR'nin 5FU-PLGA NP özellikleri üzerine etkisi: partikül boyutu, PDI (a) ve zeta potansiyeli (b). Ölçümler DLS ile yapılmıştır. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p<0.05$ 'i temsil etmektedir.	51
Şekil 4.10. Farklı TFR'de (5 mL/dk, 10 mL/dk ve 15 mL/dk) üretilen 5FU-PLGA NP'lerin SEM görüntüleri (FRR=1:3).....	52
Şekil 4.11. 5FU-PLGA NP'lerin NTA dağılım grafiği (TFR= 15 mL/dk ve FRR=1:3).53	
Şekil 4.12. PLGA NP'lerin farklı TFR ve FRR'de santrifüj öncesi ve sonrası boyut (a), boyut dağılımı (b) ve zeta potansiyel değerleri (c). Tüm ölçümler DLS ile	

gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p < 0.05$ i temsil etmektedir.	56
Şekil 4.13. 5FU-PLGA NP'lerin farklı TFR ve FRR'de santrifüj öncesi ve sonrası boyut (a), boyut dağılımı (b) ve zeta potansiyel değerleri (c). Tüm ölçümler DLS ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.	57
Şekil 4.14. PLGA NP'lerin ortalama çapı için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.	59
Şekil 4.15. PLGA NP'lerin ortalama çapı için ana etki grafiği.	59
Şekil 4.16. PLGA NP'lerin ortalama çapı için etkileşim grafiği.	60
Şekil 4.17. PLGA NP'ler için ortalama çapın FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.	60
Şekil 4.18. 5FU-PLGA NP'lerin ortalama çapı için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.	62
Şekil 4.19. 5FU-PLGA NP'lerin ortalama çapı için ana etki grafiği.	62
Şekil 4.20. 5FU-PLGA NP'lerin ortalama çapı için etkileşim grafiği.	63
Şekil 4.21. 5FU-PLGA NP'ler için ortalama çapın FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.	63
Şekil 4.22. PLGA NP'lerin PDI değeri için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.	64
Şekil 4.23. PLGA NP'lerin PDI değeri için ana etki grafiği.	64
Şekil 4.24. PLGA NP'lerin PDI değeri için etkileşim grafiği.	65
Şekil 4.25. PLGA NP'ler için PDI değerinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.	65
Şekil 4.26. 5FU-PLGA NP'lerin PDI değeri için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.	66
Şekil 4.27. 5FU-PLGA NP'lerin PDI değeri için ana etki grafiği.	66
Şekil 4.28. 5FU-PLGA NP'lerin PDI değeri için etkileşim grafiği.	67
Şekil 4.29. 5FU-PLGA NP'ler için PDI değerinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.	67
Şekil 4.30. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.	68
Şekil 4.31. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için ana etki grafiği.	68
Şekil 4.32. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için etkileşim grafiği.	69
Şekil 4.33. PLGA NP'ler için zeta potansiyeli değerinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.	69

Şekil 4.34. 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.....	70
Şekil 4.35. 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için ana etki grafiği.	70
Şekil 4.36. 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için etkileşim grafiği.	71
Şekil 4.37. 5FU-PLGA NP'ler için zeta potansiyelinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.....	71
Şekil 4.38. 5FU-PLGA NP'lerin %EE için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği. .	72
Şekil 4.39. 5FU-PLGA NP'lerin %EE için ana etki grafiği.	72
Şekil 4.40. 5FU-PLGA NP'lerin %EE için etkileşim grafiği.	73
Şekil 4.41. 5FU-PLGA NP'ler için %EE'nin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.	73
Şekil 4.42. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın kontur grafiği.	77
Şekil 4.43. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın yüzey grafiği.....	77
Şekil 4.44. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın kontur grafiği.	78
Şekil 4.45. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın yüzey grafiği.	78
Şekil 4.46. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin kontur grafiği. .	79
Şekil 4.47. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin yüzey grafiği. ..	79
Şekil 4.48. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin kontur grafiği.	80
Şekil 4.49. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin yüzey grafiği.	80
Şekil 4.50. Farklı proses parametreleri (TFR= 5, 10, 15 mL/dk; FRR=1:3, 1:5, 1:7) ile üretilen 5FU-PLGA NP'lerin 4°C'de ve 21 gün sonunda boyut (a), PDI (b) ve zeta potansiyeli (c) ölçümleri. İlk ölçüm verileri sembollerle gösterilirken; 21 gün sonraki ölçümler çubukla gösterilmiştir. (*) $p<0.05$ 'i temsil etmektedir. .	82
Şekil 4.51. Farklı proses parametreleri (TFR=5, 10, 15 mL/dk; FRR=1:3, 1:5, 1:7) ile üretilen 5FU-PLGA NP'lerin 25°C'de ve 21 gün sonunda boyut (a), PDI (b) ve zeta potansiyeli (c) ölçümleri. İlk ölçüm verileri sembollerle gösterilirken; 21 gün sonraki ölçümler çubukla gösterilmiştir. (*) $p<0.05$ 'i temsil etmektedir. .	83
Şekil 4.52. Farklı proses parametreleri (TFR=5, 10, 15 mL/dk; FRR=1:3, 1:5, 1:7) ile üretilen 5FU-PLGA NP'lerin 37 °C'de ve 21 gün sonunda boyut (a), PDI (b) ve	

zeta potansiyeli (c) ölçümleri. İlk ölçüm verileri sembollerle gösterilirken; 21 gün sonraki ölçümler çubukla gösterilmiştir. (*) $p<0.05$ 'i temsil etmektedir...	84
Şekil 4.53. %1 5FU yüklü PLGA NP'lerden kümülatif 5FU salım profili (TFR=15 mL/dk, FRR=1:3 FRR).	92
Şekil 4.54. %20 5FU yüklü PLGA NP'lerden kümülatif 5FU salım profili (TFR=15 mL/dk, FRR=1:3 FRR).	94
Şekil 4.55. Serbest 5-FU (a) ve %1 5FU yüklü PLGA NP'lerin (b) 72 saat sonra A-431 hücrelerine karşı doza bağlı hücresel toksisitesi. Her grup için veriler sembollerle temsil edilmiş ve (*) $p<0.05$ 'i temsil etmektedir.....	96
Şekil 4.56. Serbest 5FU'nun (a) ve %20 5FU yüklü PLGA-NP'lerin (b), 72 saat sonra A-431 hücrelerine karşı doza bağlı hücresel toksisitesi. Her grup için veriler sembollerle temsil edilmiş ve ns $p>0.05$ 'i temsil etmektedir.....	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. NP üretmek için kullanılan çeşitli sürekli akış tabanlı mikroakışkan türlerinin mekanizması, avantajları, dezavantajları [9].	7
Çizelge 2.2. Akustik, elektrik, manyetik, optik ve termal alanların partikül ayırma amacıyla uygulamaları, avantaj ve dezavantajları [67].....	11
Çizelge 2.3. Mikroakışkan yapımında kullanılan malzemelerin karşılaştırılması [83]. .	16
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddelerin listesi.	29
Çizelge 3.2. Mikroakışkan akış ayarları için seçilen girdiler ve bunların FFD için karşılık gelen seviyeleri.	36
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyon çözücü ve stabilizatör kullanılarak elde edilen NP'lerin özellikleri (TFR=5 mL/dk ve FRR=1:3).	43
Çizelge 4.2. TFR ve FRR'nin partikül boyutu, konsantrasyon ve PLGA NP'lerin verimi üzerindeki etkisi.	49
Çizelge 4.3 TFR ve FRR'nin 5FU-PLGA NP'lerin boyutu, konsantrasyon ve verimi üzerindeki etkisi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak rapor edilmiştir.	54
Çizelge 4.4. TFR, FRR ve TFRxFRR'nin PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerinin özellikleri (boyut, PDI, zeta potansiyeli, %EE) üzerindeki etkisi FFD ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.	61
Çizelge 4.5. FFD ile TFR, FRR ve TFRxFRR'nin bir fonksiyonu olarak PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin (boyut, PDI, zeta potansiyeli, %EE) tahmini için elde edilen matematiksel model.	74
Çizelge 4.6. Değişkenler arasındaki ilişkiyi tanımlamak üzere hem PLGA hem de 5FU-PLGA NP'lerin boyut ve zeta potansiyeli için tahmin edilen matematiksel denklem.	75
Çizelge 4.7. TFR, FRR ve TFRxFRR'nin PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin fizikokimyasal özellikleri (boyut, PDI, zeta potansiyeli, %EE) üzerindeki etkisi RSD ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.	76

Çizelge 4.8. 4°C, 25°C ve 37°C'de 21 gün boyunca saklanan 5-FU yüklü PLGA NP'lerin boyut sonuçlarını karşılaştırmak için istatistiksel bir analiz yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.....	86
Çizelge 4.9. 4°C, 25°C ve 37°C'de 21 gün boyunca saklanan 5-FU yüklü PLGA NP'lerin PDI sonuçlarını karşılaştırmak için istatistiksel bir analiz yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. ..	87
Çizelge 4.10. 4°C, 25°C ve 37°C'de 21 gün boyunca saklanan 5-FU yüklü PLGA NP'lerin zeta potansiyeli sonuçlarını karşılaştırmak için istatistiksel bir analiz yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.....	88
Çizelge 4.11. 4°C'de 3 ay boyunca saklanan 5FU-PLGA NP'lerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.	89
Çizelge 4.12. Farklı ilaç yükleme miktarının NP özellikleri üzerindeki etkisi (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).	90
Çizelge 4.13. Santrifüj işleminin farklı ilaç yükleme dozlarıyla elde edilen NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).	91
Çizelge 4.14. %1 ve %20 ilaç yüklü 5FU-PLGA NP'ler için salım kinetiğinin salım hızı (k) ve determinasyon katsayısı (r^2) değerleri (TFR=5 mL/dk ve FRR=1:3).	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Re	Reynolds sayısı
ρ	Akışkanın yoğunluğu
ϑ	Ortalama akışkan hızı
D_h	Mikroakışkan kanalın hidrolik çapı
μ	Dinamik viskozite
L	Difüzyon mesafesi
D	Sıvının difüzyon katsayısı
ΔG	Gibbs serbest enerjisi
ΔG_{hacim}	Yığın kristalin hacim serbest enerjisi
$\Delta G_{\text{yüzey}}$	Yüzey serbest enerjisi
r	Boyut
r_{kritik}	Kritik boyut
C_{min}	Süper doygunluk bölgesinde minimum solvent konsantrasyonu
C_{max}	Süper doygunluk bölgesinde maksimum solvent konsantrasyonu
$C_{\text{çözünürlük}}$	Ostwald olgunlaşması süreci için kritik konsantrasyon
$t_{\text{karışma}}$	Karışma zamanı
$t_{\text{presipitasyon}}$	Presipitasyon zamanı
$t_{\text{yoğunlaşma}}$	Yoğunlaşma zamanı
$t_{\text{koagülasyon}}$	Koagülasyon zamanı

Kısaltmalar

NP	Nanopartikül
PDMS	Polidimetilsiloksan
PMMA	Polimetilmetakrilat
COP/COC	Floropolimerler/siklo-olefin polimerler ve kopolimerler
TE	Tiyol-ene polimerler
SHM	Kademeli Balıksırtı Mikrokarıştırıcı
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
5-FU	5-Florourasil
5FU-PLGA NP	5-Florourasil yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) nanopartikül
DoE	Deney tasarımı
EE	Enkapsülasyon etkinliği
DL	İlaç yükleme kapasitesi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
TFR	Toplam akış hızı
FRR	Akış hızı oranı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
PVA	Poli (vinil alkol)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
FBS	Fetal bovin serum
MTT	3-4,5 Dimetil-tiyazolil-2-5-Difeniltetrazolyum bromür
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
UV-Vis	Ultraviyole-görünür ışık
MD	Ortalama çap

ZP	Zeta potansiyeli
MEMS	Mikroelektromekanik sistemler
FFD	Tam faktöriyel tasarım
DLS	Dinamik ışık saçılımı
NTA	Nanopartikül izleme analizi
RSD	Yanıt yüzey metodu



1. GİRİŞ

GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünya çapında 19 milyon yeni kanser teşhisi konulmuştur ve yaklaşık olarak 10.0 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmiştir [1]. Günümüzde önemli bir sağlık sorunu olan kanser, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemleriyle iyileştirilmektedir. Ancak bu tedavi yöntemleri, pek çok kanser türünün iyileştirilmesinde daima etkili olamamaktadır [2]. Ayrıca, bahsi geçen geleneksel tedaviler ciddi akut ve kronik yan etkilere neden olabilir ve hastaların yaşam kalitelerini azaltabilir [3]. Kanseri daha iyi tedavi etmek ve iyileştirmek için yeni yöntemler geliştirilmiştir.

Son 10 yılda, nanopartikül (NP) ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tanı ve tedavisindeki gelişimi hız kazanmıştır [4, 5]. Sürekli/kontrollü ilaç salımı, kanda uzamış dolaşım süresi, yüksek hücresel alım ve düşük toksisite gibi avantajları nedeniyle NP ilaç taşıyıcı sistemlerin klinik uygulamaları önemli bir potansiyel taşımaktadır [6]. Terapötik amaçlar için çeşitli liposomlar, polimerik ve inorganik bazlı NP'ler ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Hem Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) hem de Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), biyouyumluluğu, düşük sitotoksitesi ve biyobozunabilirliği nedeniyle ilaç taşıyıcısı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca PLGA NP'ler ilacın hedeflenen bölgede daha uzun süre kalabilmesini sağlarken; ilacın bozulmaya karşı stabilitesini de artırır. Dahası, hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçlar için sürekli/kontrollü salımı kolaylaştırır [7]. Bu nedenle tüm NP'lerde olduğu gibi, kararlı PLGA NP'lerin tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir üretimini sağlamak; ilaç araştırmaları ve endüstrisi için kritik bir öneme sahiptir.

PLGA NP'lerin geleneksel yığın (bulk) üretimi çözücü bazlı yöntemlere (örneğin presipitasyon, tek/çift emülsiyon vb.) dayanır. Bu üretim teknikleri verimsiz karışma ve yavaş kütle transferi ile karakterizedir. Bu nedenle her parti (batch) üretimi sırasında NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişkenlikler görülür [6, 8]. Ayrıca sert çözücülerin kullanıldığı bu yöntemler çok adımlı ve zaman alıcı süreçlerdir. Bahsi geçen bu kısıtlamalar, ilaç taşıyıcı sistemlerin laboratuvar araştırmalarından klinik uygulamalara geçişini engeller. Mikroakışkan sistemler, NP'lerin üretimi için alternatif bir yöntem sunar. Bu cihazların mikron boyutlu kanallarında, akışkanların pikolitreden nanolitreye kadar değişen hacimleri manipüle edilerek NP'ler elde edilir. Geleneksel

yığın yöntemlerden birkaç kat daha hızlı ısı ve kütle transferi gerçekleşir. Böylece reaktiflerin, enerjinin ve zamanın daha az tüketilmesiyle süreç daha ekonomik hale gelir [9, 10].

Genellikle laboratuvar ölçeğinde NP üretimine olanak tanıyan mikroakışkan cihazların, farmasötik endüstrisi için, üretim hacimlerinin önemli ölçüde artırılması gerekmektedir. Bu amaçla saatte mililitre seviyesinden litre seviyesine yükseltecek teknolojilere ihtiyaç vardır [11]. Mikroakışkan sistemle daha yüksek hacimde üretim gerçekleştirebilmek için temelde iki yaklaşım vardır. Bunlardan ilki cihazın paralelleştirilmesidir. Paralelleştirme işlemi, tek çipte mikroakışkan cihazın tekrarlı olarak paralelde yerleştirilmesiyle elde edilir [11, 12]. Çeşitli mikroakışkan tasarımlar bu işleme uygundur [11, 13]. Ancak, mikroakışkan cihazların bu şekilde ölçeklendirilmesi, karmaşık akış dağıtımı ve her sıvı girişi için ayrı bir pompa veya basınç kontrol seti kullanılmasını gerektirir [11, 14]. Ayrıca cihazın paralelleştirilmesi hem karmaşık ve pahalıdır hem de pek güvenilir değildir [11, 15]. Daha büyük hacimde üretim yapmanın bir diğer yöntemi, milimetre boyutundaki kanal tasarımına sahip tek bir karışma elemanı kullanmaktır. Bu yaklaşımda, kanal hacmi artsa bile, mikroakışkan sistemlerle düşük boyutlu ve dar boyut dağılımına sahip NP'lerin üretimini engellemez. Bu mikroakışkan cihazlarda akışkanlar laminar akışta ancak nispeten daha yüksek Reynolds sayılarında hareket eder. Akışkanlar kanal içinde yutma, deformasyon ve interdiffüzyon ile karışırlar [11]. Farmasötik araştırma ve geliştirme sektöründe bu yaklaşımı kullanan ve 10-12 mL/dk akış hızına ulaşabilen mikroakışkan mikserler önemli kabul görmektedir. Bununla birlikte, bu mikserlerin üretimleri zordur ve belirli performans sınırlamalarına sahiptir. Ayrıca laboratuvar ölçeğinde NP üretmek istendiğinde, mikromikserin yüksek akış hızları nedeniyle kayıp hacmin fazla olması, küçük hacimlerde (yaklaşık 100 μ L civarında) çalışmayı sınırlar. Bu nedenle laboratuvar ölçeğinde çalışılan durumlar için halen mikromikser ihtiyacı vardır. SHM gibi mikromikserlerin daha küçük boyutlarda üretiminin bir çözüm olabileceği düşünülmesine rağmen; bu cihazların 50 μ m'den küçük kanal boyutu gereksinimleri nedeniyle, geleneksel mikroakışkan cihazların seri üretiminde kullanılan enjeksiyon kalıplama yöntemleriyle üretimleri oldukça zordur. Bu zorluklar dikkate alındığında hem yüksek hem de düşük hacimde NP üretimi yapabilecek daha ucuz yeni mikromikser tasarımlarına ihtiyaç duyulmuştur [16].

Yeni toroidal mikromikser, 2-10 mL/dk akış hızlarında çalışarak hem araştırma hem de farmasötik endüstri için NP üretimine uygundur. Bu tasarımda, merkezkaç ve yüksek hız kuvvetleri sıvıları kanalın merkezinden dışarı doğru iter, bu da Dean vorteksi oluşturur [16]. NP'lerin sentezinde Dean vorteksi ve asimetrik kanal tasarımı karıştırmayı artırarak, yüksek tekrarlanabilirlik oranıyla birlikte fizikokimyasal özelliklerin hassas kontrolünü sağlar [14]. Ayrıca bu mikser enjeksiyon kalıplama yöntemiyle daha ucuz ve verimli üretilir [16].

1.1. Tezin Amacı

Toroidal mikromikser kullanarak kanser tedavisine yönelik PLGA NP'lerin üretimi ve sistem parametrelerinin etkisini araştırmaya yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, farmasötik uygulamalar için toroidal bir mikromikser kullanarak, 5-fluorourasil (5FU, hidrofobik bir kemoterapötik model ilaç olarak) yüklü, tekrarlanabilir ve stabil PLGA NP'leri yüksek verimle üretmektir. Bu amaçla farklı çözücüler, PLGA konsantrasyonları ve stabilizatörler denenmiştir. Bu deneyler sonucunda en küçük boyut ve en dar boyut dağılımı gösteren formülasyon seçilerek toroidal mikroakışkan cihazın kritik proses parametreleri olan toplam akış hızı (TFR) ve akış hızı oranları (FRR, organik faz:sulu faz, O:S) değiştirilmiş ve proses parametrelerinin PLGA NP'leri ve 5FU yüklü PLGA (5FU-PLGA) NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca, kritik proses parametrelerini belirlemek ve optimum proses parametrelerini tahmin etmek için Deney Tasarımı (DoE) yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşımın, toroidal mikromikser kullanılarak farklı ilaç türlerinin istenilen fizikokimyasal özellikte PLGA NP'lerin elde etmeyi amaçlayan gelecek çalışmalar için üretim süreçlerinin optimizasyonunda faydalı olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroakışkan Sistemler

Mikroakışkanlar, küçük miktarlardaki (10^{-9} - 10^{-18} litre) sıvıları, mikrometre boyutlarındaki kanallar kullanarak bir veya daha fazla biyokimyasal ya da kimyasal süreci, küçük bir çip üzerinde gerçekleştirebilen sistemlerdir [17]. Mikroakışkanlar, kimya, fizik, biyoloji, malzeme bilimi, akışkanlar dinamiği ve mikroelektronik gibi farklı disiplinlerin bir araya gelmesiyle geliştirilmiştir [18]. Az miktarda numune ve reaktif kullanımı maliyetleri düşürmekte, analiz sürelerini kısaltmakta ve daha az yer kaplayan taşınabilir cihazların üretimine olanak tanımaktadır [17].

Mikrokanallar ilk olarak 1980'lerde kimyasal analiz uygulamaları için geliştirilmiş ve gaz fazı kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez gibi yöntemlerde kullanılmıştır. Bu uygulamalar, küçük kanal hacimlerinde akışkanların hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağladığından, mikroakışkan sistemlerin öncüleri olarak kabul edilmiştir. Mikroakışkan teknolojilerin gelişiminde 1980'lerde moleküler biyolojiye yönelik mikroanaliz alanında ve genom bilimindeki ilerlemelerle birlikte; yüksek verimlilik, hassasiyet ve çözünürlük gerektiren analitik yöntemlere ihtiyaç duyulması mikroakışkan teknolojilerin gelişmesini teşvik etmiştir. Bu cihazların hızlı büyümesi, 1990'larda kimyasal ve biyolojik silahların tehditlerini tespit etmek amacıyla ABD Savunma Bakanlığı İleri Araştırma Projeleri Ajansı tarafından, taşınabilir mikroakışkan sistemlerin geliştirilmesi için çeşitli programların desteklenmesiyle olmuştur [17].

Hızlı gelişim gösteren ve büyük bir potansiyele sahip olan bu güçlü cihazlar; reaksiyonlar, ayrıştırma veya çeşitli bileşenlerin tespiti gibi işlemleri gerçekleştirmek için faydalı enstrümanlardır [18, 19]. Uygulama alanlarına ve işlevsel özelliklerine bağlı olarak, mikroakışkan cihazlar literatürde mikroyerleştiriciler, çip-üstü-laboratuvarlar (lab-on-a-chip) veya çip-üstü-organlar (organ-on-a-chip) olarak da adlandırılmaktadır [20-22]. En fazla biyomedikal ve biyoteknoloji alanlarında uygulamaları vardır. Kişiselleştirilmiş tıp, hastalık teşhisi, kimyasal tarama, hücre kültürü, hücre ayırma, hücre tedavisi, ilaç taraması, ilaç taşıyıcı sistemler ve DNA dizileme gibi alanlarda büyük bir potansiyel göstermektedir [23-26]. Şu anda hali hazırda piyasada bulunan mikroakışkan cihazlarla

evde hamilelik testi, HIV, COVID-19, Herpes Simplex ve Hepatit A, B, C gibi virüsler için hızlı testler, ve kan şekeri takibi yapılabilir [27, 28].

2.2. Başlıca Mikroakışkan Tasarımları

Farklı mikroakışkan cihaz türleri benzer biyomedikal görevleri yerine getirebilmesine rağmen; genellikle pasif mikroakışkan sistemler partikül manipülasyonu ve sıvı karıştırma için kullanılırken, aktif mikroakışkan sistemler partikül yakalama ve algılama işlemlerinde kullanılır.

2.2.1. Pasif Mikroakışkan Sistemler

Pasif mikroakışkan sistemlerde dışardan herhangi bir enerjiye gerek kalmadan, sıvı pompasıyla yaratılan basınca bağlı olarak, akışkanlar hareket eder. Farklı kanal geometrileri, uzunlukları ve konfigürasyonları sayesinde, akışkanların birbirleriyle yüksek temasları karışma verimliliğini artırır [29, 30].

2.2.1.1. Damlacık Tabanlı Mikroakışkanlar

Damlacık tabanlı mikroakışkan sistemlerde, damla oluşumu, birbiriyle karışmayan akışkanların düzenli aralıklara bölünmüş ara yüzey elde edilmesine dayanır [31]. Akışkanların miktarına bağlı olarak, damlaların oluşumuna neden olan faz “sürekli faz” ve oluşan damla “dağılmış faz” olarak nitelendirilir [32]. Damlacık tabanlı mikroakışkanların özellikle ilaç taşıyıcı sistemler için en önemli avantajı monodispers yapıda ve genellikle mikro ölçekte partiküllerin üretimidir [33, 34]. İstenilen boyutta damlacıklar, farklı mikroakışkan cihaz tasarımı ve akışkanların özellikleri (viskozite ve yüzey gerilimi) ve proses parametrelerinin (akış oranı, basınç vs.) değiştirilmesi yoluyla elde edilebilir [35, 36].

Tek ve çoklu emülsiyon bazlı damlacık üretiminde T-bağlantı (çapraz akış), akış odaklama ve eş eksenli odaklama gibi farklı tasarımda mikroakışkan cihazlar kullanılır. T-bağlantılı cihazda, dağılmış faz sürekli faza dik olarak sisteme verilir ve bağlantı noktasında damlacık oluşur. Eş eksenli odaklanma tasarımına sahip cihaz, sürekli faz kanalı içinde aynı eksenli dağılmış faz kanalının bulunduğu bir yapıdadır. Dağılmış fazın

sürekli fazı kesmesiyle elde edilen damlacığın özellikleri akışkanların hızlarının değiştirilmesiyle kontrol edilir. Akış odaklamadaysa ikisi sürekli faz, biri dağılmış faza ait, üç girişin bulunduğu ve bu girişlerin kesişim noktasında damlacığın oluştuğu yapıdır [31, 37].

Damlacık tabanlı mikroakışkan sistemlerde damla üretimi bazı problemleri barındırır. Cihaz üretimi ve enstrümantasyonun standartlaştırılmasında önemli zorluklar bulunur. Ayrıca karmaşık akışları kontrol edebilmek için teknik uzmanlığa sahip personele ihtiyaç vardır [38, 39]. Öte yandan, birbiriyle karışabilen akışkanların kademeli karışımına dayanan sürekli akış mikroakışkanları, daha basit üretim ve akış kontrolü imkanı sunar [40].

2.2.1.2. Sürekli Akış Tabanlı Mikroakışkanlar

Sürekli akış mikroakışkanlar, laminar akışta kanal boyunca kademeli olarak sıvıların birbirleriyle karışmasına dayanır. Bu sistemde NP oluşumu nanopresipitasyonla gerçekleşir [10, 41]. İlaç taşıyıcı sistemleri üretmek için en yaygın kullanılan sürekli akış mikroakışkanlardan biri hidrodinamik akış odaklamadır [42]. Ancak daha küçük boyutlu NP elde etmek için kanal boyutunu küçültmek ve akış oranını arttırmakla mümkün olmasına rağmen; bu işlem zaman alıcıdır ve elde edilen NP konsantrasyonu azaldığı için verim kayıpları yaşanır [43]. Akışkanların temas yüzey alanını artırmak ve mikroakışkan kanalın uzunluğunu azaltılmak amacıyla, mikrokanallar yenilikçi geometriler (spiral, serpantin şeklinde vb.) veya topolojilerle (balıksırtı deseni, engeller vb.) tasarlanmıştır [9]. Her tasarım, kanal genişliği boyunca etkili ve hızlı bir şekilde akışkanların karışması ve NP'in daha yüksek üretim hacimlerinde elde edilmesi için geliştirilmiştir [44, 45]. Çizelge 2.1'de farklı mikroakışkan türlerinin tasarım özellikleri, avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 2.1. NP üretmek için kullanılan çeşitli sürekli akış tabanlı mikroakışkan türlerinin mekanizması, avantajları, dezavantajları [9].

MF tasarım	Mekanizma	Avantaj	Dezavantaj	NP Türü
Hidrodinamik Akış Odaklama	Kılıf akımları, örnek akımları dar bir bölgede odaklar, karışma mesafesini kısaltır.	-Mevcut mikroakışkan cihazlara kolay entegrasyonu	-Düşük partikül konsantrasyonu -Partikül agregasyonu	Lipid NP, polimerik NP
Kademeli Balıksırtı Mikrokariştirici (SHM)	Kanal zemininde balıksırtı desenler kullanarak, kaotik adveksiyonu ve mikro vorteks ile karışımı artırır.	-Verimli ve hızlı karışım	-Karmaşık imalat -Tıkanma sorunları -Cihaz malzemelerinin kısıtlı solvent uyumluluğu	Lipid NP, polimerik NP
Tesla Mikseri	Kanatçık şeklindeki kanallardan akımlar ikiye ayrılır ve sonra tekrar birleşir. Kaotik adveksiyon karışım performansını artırır.	-Hızlı ve verimli karışım -Düşük örnek tüketimi	-Düşük partikül konsantrasyonu -Düşük Reynolds sayısı akımları için uygun değil	Lipid NP, polimerik NP
Toroidal/Baffle Mikromikser	Akışkan akımlarını bölmek ve yeniden birleştirmek için dallanan kanal yapısı kullanılır.	-Hızlı ve verimli karışım -Düşük örnek tüketimi -Partikül boyutunun ayarlanması	Yeniden birleşme noktasında akışların potansiyel düzensiz dağılımı	Lipid NP, polimerik NP

2.2.1.3. Sıralama, Ayırma ve İzolasyon Amacıyla Kullanılan Mikroakışkanlar

Uygulamaya bağlı olarak, hedef hücre türlerinin ana örnek içinde orta veya düşük yoğunlukta bulunduğu belirli hücre türlerinin biyolojik veya fiziksel özelliklerine bağlı olarak saflaştırma, ayırma ve izolasyon yoluyla analiz edilmesi gereken durumlarda çip-üstü-laboratuvar platformları kullanılabilir. Bu amaçla mikrofiltrasyon deterministik yanal yer değiştirme ve pinch akış fraksiyonlama gibi farklı mekanizmalara kullanılmaktadır [46-48].

a) Mikrofiltrasyon

Mikrofiltrasyon, örnek içindeki bileşenlerin boyut farklılıklarını kullanarak, partiküllerin özel olarak tasarlanmış sınırlayıcı elemanlarda yakalanmasına dayanan bir tekniktir. Filtrasyonda ayırtmak istenen bileşenlerin türüne bağlı olarak, membranlar, sütunlar ve diğer akış engellerini içerecek şekilde mikroakışkan tasarımı yapılır [49-51].

b) Atalet mikroakışkanları

Atalet mikroakışkanlar, yüksek akış hızları nedeniyle partiküllerin odaklanması ve ayrılması işlemlerinde büyük ilgi görmüştür. Dikdörtgen kesitli düz ve kavisli mikroakışkan kanallarda, partiküllerin akış çizgisi boyunca atalet hareketi, ayırma işlemleri için kullanılmıştır. Kanallardaki partiküllerin atalet göçü, akışkan mekaniği alanında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Mikroakışkan cihazda kanal duvarı ile merkez hattı arasında bir denge pozisyonu oluşturan iki atalet kaldırma kuvveti bileşeni vardır: duvardan uzaklaşıp kanalın merkez hattına doğru hareketi sağlayan duvar etkisi kaldırma kuvveti ve akışın kesme hızı gradyanı yönünde (kesme hızının azaldığı yöne) hareketini sağlayan kesme gradyanı kaldırma kuvveti. Kesme hızı gradyanı, Poiseuille akışında (parabolik hız profili) doğal olarak mevcuttur. Düz dikdörtgen bir mikrokanalda partiküller, kesme kuvvetiyle oluşan kaldırma kuvvetleri ile duvardan kaynaklanan kuvvetler arasındaki denge yoluyla göç eder. Atalet kaldırma kuvvetleri ile partikül boyutu arasındaki ilişki nedeniyle, atalet mikroakışkanlar daha büyük partikülleri odaklamak ve ayırmak için kullanılmıştır. Kanal uzunluğunu azaltmak ve daha küçük partikülleri odaklamak için kavisli bir kanallar da kullanılmaktadır. Kavisli kanallarda radyal yöndeki basınç farkı nedeniyle kanalın simetri düzleminin üstünde ve altında karşıt

yönlü dönen vortekslerden (Dean vorteksleri) oluşan ikincil bir akış oluşur. Baskın olan atalet kaldırma kuvvetleri ve Dean sürüklenme kuvveti, partiküllerin göç etmesine ve denge noktalarını bulmasına neden olur. Mikrokanallarda hareket eden partiküller akış hızına, partikülün boyutuna ve çip geometrisine bağlı olarak kanalın belirli bir noktasına doğru odaklanır [52, 53].

c) Deterministik yanal yer değiştirme

Deterministik yanal yer değiştirme mikroakışkan cihazlar, düşük Reynolds sayılarında, laminar akış koşulları altında partikül ayırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu tür cihazların tasarımında belirli bir desende mikro-direnç dizileri kullanılır. Bu sayede kritik bir değerden küçük olan partiküller akış çizgisini takip ederken; daha büyük partiküller akış çizgisine belirli açıda olacak şekilde yanal olarak hareket ederler. Bu sayede, partiküllerin boyutları ya da şekillerine göre ayırmak mümkün hale gelir. Ancak bu sistem tıkanma eğilimi göstermektedir [46, 54].

d) Pinch akış fraksiyonlama

İlk kez Yamada ve arkadaşları, laminar akışta askıda bulunan farklı boyuttaki partiküllerin pinch akış fraksiyonlama yöntemiyle ayrılmasını önermiştir. Bu yöntemde, askıda partiküller içeren bir akışkan ile bir kılıf akışkan, Y şekilli bir yapı ile sisteme beslenirler. Her iki akışkan dar bir kesişim noktasında birleşirler ve daha geniş bir kanala akarlar. Burada önemli olan nokta kılıf akışkanının yüksek hızı sayesinde partikül içeren akışkanın kanal duvarına itilmesidir. Bu sayede, partiküller boyutlarına göre farklı akış çizgilerine yönlendirilir. Ayrıca, optimum bir tasarım elde etmek için TFR, FRR, dar segmentin kanal genişliği, sınır açıları ve çıkış konfigürasyonu gibi parametreler dikkate alınmalıdır. Bu bağlamda, partikülleri ayırmak için simetrik veya asimetrik kanalların yanı sıra mikro-valflerle donatılmış kanallar ve diğer drenaj yöntemleri gibi çeşitli çıkış konfigürasyonları araştırılmıştır [55].

2.2.2. Aktif Mikroakışkan Sistemler

2.2.2.1. Dinamik Mikromikserler

Aktif mikroakışkan karışmada, cihaz akustik, termal, optik, elektrik ve manyetik gibi fiziksel alanlarla entegre edilerek, akışkanların karışma performansı artırılır. Böylece, karmaşık ve monodispers yapıda NP elde edilebilir. Termal alan kullanılarak ısı transferinin daha etkili şekilde gerçekleşmesiyle çeşitli NP'ler elde edilebilirler [56, 57]. Örneğin bu amaçla lazer kullanılarak optotermal etkiyle yüksek sıcaklıklara ulaşılabilir [58]. Mikroakışkanda kullanılan başka bir önemli alan olan optik alan sayesinde, fotokimyasal etkiyle NP sentezi gerçekleştirilebilir [59, 60]. Bir diğer kullanılan enerji alanı manyetik alandır. NP'lerin mekan ve zamana bağlı hassas manüpülasyonu sayesinde, istenilen özellikte manyetik NP'ler üretilebilir [61]. Bunlara ek olarak, NP yüzeylerinin elektroporasyonla biyolojik membran ile kaplanmasına olanak tanıyan elektrik alan da kullanılan önemli bir diğer fiziksel alandır [62, 63]. Mekanik etki yaratan piezoelektrik transdüserler ya da akustik rezonatörlerse, NP'lerin deforme olması, parçalanması ya da tekrar bir araya gelmesi gibi işlemlerin gerçekleşmesine olanak tanır [64-66]. Ancak pasif mikroakışkan karıştırmaya kıyasla daha iyi bir karışım verimliliği ve çok yönlülük sağlanmasına rağmen kompleks, pahalı olmaları gibi çeşitli dezavantajları vardır [9, 29]. Ayrıca örneklerin sıcaklık artışı nedeniyle biyolojik aktivitenin farmasötik ve biyolojik için kullanımlarını sınırlar.

2.2.2.2. Partikül Ayırma

Aktif ayırma, mikroakışkan kanallar içindeki partikülleri ayırmak için akustik, elektrik, manyetik, optik ve termal alanlar gibi dış kuvvet alanlarına dayanır. Çoğu dış kuvvet, hedef partiküllere doğrudan uygulanabilir, bu da akışkan akışını etkileyerek onları dolaylı olarak kontrol etmek yerine doğrudan partikülleri kontrol etme imkanı sağlar. Bu nedenle, aktif ayırma teknikleri oldukça esnektir ve partikülleri ihtiyaç duyulduğu şekilde hassas bir şekilde kontrol edebilir. Farklı enerji kaynakları kullanılarak yapılan ayırma işlemlerinin uygulama alanları, her bir tekniğin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.2'de verilmiştir [67].

Çizelge 2.2. Akustik, elektrik, manyetik, optik ve termal alanların partikül ayırma amacıyla uygulamaları, avantaj ve dezavantajları [67].

Teknik	Biyopartikül tipi	Avantaj	Dezavantaj
Akustik Ayırma	Eksozomlar, bakteriler (mikron altı partiküller)	Temassız, çok yönlü, biyouyumlu	Düşük verim, düşük çıktı
Elektrik Ayırma	Eksozomlar, hücreler, bakteriler, virüsler, makromoleküller	Yüksek kontrol edilebilirlik, yüksek verimlilik	Joule ısıtması, elektrokimyasal reaksiyon, aktivite bozulması
Manyetik Ayırma	Eksozomlar, hücreler, bakteriler	Yüksek çıktı, yüksek verimlilik, temassız	Genellikle manyetik boncuklar gereklidir, numune hazırlama karmaşıktır
Optik Ayırma	Hücreler (mikron boyutlular)	Yüksek kontrol edilebilirlik, tek tür partikül ayırma için uygundur	Düşük çözünürlük, düşük verim
Termal Ayırma	Eksozomlar, hücreler	Basit sistem	Düşük verimlilik, düşük çözünürlük, düşük kontrol edilebilirlik

2.2.2.3. Odaklanma, Sıralama ve Zenginleştirme için Kullanılan Mikroakışkanlar

Aktif mikroakışkan uygulamalarında partiküllerin odaklanması yoluyla yapılan sıralama, parçacıkların harici kuvvetlerin etkisi altında bir noktada veya düz bir çizgide toplanmasını sağlar. Odaklanmış akustik basınç noktası sayesinde, partiküllerin boyutlarına göre maruz kaldıkları kuvvetlerin değişmesiyle, ayırma işlemi gerçekleşir [68]. Bu amaçla mikrokanalın iki yanına dikey olarak yerleştirilmiş bir çift elektrot yerleştirilir [69]. İki zıt yönden yayılan akustik dalgalar, birbirleriyle etkileşime girerek, mikrokanal içinde dalga boyuna bağlı olarak belirli noktalarda basınç noktaları oluşturan duran dalgalar meydana getirir [70]. Akustik tabanlı mikroakışkanlara ek olarak,

mikrokanal içinde gradyanlar elektrik, manyetik, optik alan kullanarak oluşturulabilir. Bu sayede, partikülleri belirli bir noktada odaklamak, sıralamak ve yoğunluklarını artırarak saflaştırmak mümkündür [71-73].

2.2.2.4. Partikül Yakalama

Bu yöntemde akustik alan, elektrik alan, manyetik alan, optik alan veya termal alan gibi çeşitli kuvvetlerle partiküller yakalanır. Bir ultrasonik dalga sabit basınç gradyanları üretir ve partiküller üzerinde kuvvet uygular. Akustik yakalamaya yönelik en yaygın kullanılan yaklaşım, tipik olarak bir bağlantı katmanı, bir akışkan katmanı, bir yansıtıcı katman ve bir dönüştürücüden oluşan çok katmanlı rezonans yapısıdır. Bu yapılandırma, duran dalga akışkan sisteminin yerel bir bölgesiyle sınırlıdır ve akustik dalga akışkan akışına diktir, böylece yakalama için yanal kuvvetleri kullanır. Ultrasonik yakalamanın önemli bir uygulama alanı, perfüzyon sistemlerinde yapışmayan hücre kültürlerinin incelenmesidir. Bu, hücre mikroçevresi üzerinde dinamik kontrol sağlar ve hücre veya mikroorganizma davranışı ve çoğalmasının *in vitro* çalışmaları için model sistemleri oluşturmak için büyük olanak sunar [74].

Optik yakalamadaysa, partikülleri ve hücreleri çok yüksek hassasiyetle yakalamak ve manipüle etmek için odaklanmış bir lazer ışını kullanılır. Lazer ışını, ışın nesneye çarptığında partiküle veya hücreye aktarılan bir momentum taşır. Lazer ışınının Gauss profili, partikül ışının merkezine çekilmesine neden olur [75].

Manyetik yakalama tekniğinde, farklı tür ve boyutlarda manyetik alanlar ve manyetik partiküller kullanılır. Tipik manyetik partiküller, manyetik bir çekirdeğe ve belirli bir partiküle bağlanacak şekilde tasarlanan, manyetik olmayan bir kaplamaya sahiptir. 5 nm'den birkaç μm 'ye kadar olan partiküller bu yöntemle yakalanabilir [76].

2.3. Mikroakışkanların Üretiminde Kullanılan Yöntemler

Başlangıçta mikroakışkan cihazların ilk üretimleri silikon ve cam malzemelerin, mikroeletromekanik sistemlere (MEMS) dayalı fotolitografi, ıslak/kuru aşındırma, elektron ışını litografisi gibi ilişkili teknolojilerin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir [17]. Temiz oda gereksinimi duyulan ve yüksek yatırım maliyeti gerektiren bu teknolojiyle

istenen mikro desenler elde edilmektedir. Ancak geleneksel MEMS'e dayalı teknikler kullanılarak mikroakışkanların üretimlerinin pahalı olması nedeniyle, daha ucuz ve basit üretim tekniklerinin geliştirilmesine neden olmuştur [77]. Günümüzde biyomedikal uygulamalar için çoğunlukla kalıplama ve 3B baskı olmak üzere 2 ana teknik kullanılarak mikroakışkan cihaz üretilmektedir.

2.3.1. Kalıplama

2.3.1.1. Yumuşak Litografi

Yumuşak litografi, polimerik malzemelerle biyomedikal mikroakışkan cihazların üretiminde en sık kullanılan yöntemlerden biridir. İlk adımda foto direnç (photoresist) istenen kalınlığa göre bir döndürerek kaplama (spin coating) cihazı ile silikon alttaşı üzerine kaplanır. Ardından, önceden tasarlanmış maske kullanılarak Mask Aligner UV-Litografi cihazı ile silikon alttaşı UV ışığına maruz bırakılır. Daha sonra, ışığa maruz kalmamış alanı temizlemek için bir çözücüye daldırılır ve desen oluşturulur. Böylece kalıp hazır hale gelmiş olur. Kalıp üzerine polidimetilsiloksan (PDMS) dökülür ve gazdan arındırılır. Kürleme işleminden sonra, PDMS kalıptan soyulur. Mikrocihazı oluşturmak için mikroskop cam lamelleri ile PDMS oksijen plazma yoluyla bağlanır [78, 79].

2.3.1.2. Enjeksiyon Kalıplama

Enjeksiyon kalıplama, yüksek verimliliği, maliyet etkinliği ve yüksek hassasiyeti nedeniyle mikroakışkan cihazların üretimi için oldukça caziptir. Ticari olarak popüler olan bu yöntem, geniş bir termoplastik yelpazesıyla uyumludur ve az sayıda adım gerektirir. İlk olarak, kullanılan termoplastik bir sıkıştırılabilir haznede eritilir ve kalıbın iki tarafı, kalıp oluşturmak için sıkıştırılır. Kalıp soğuduktan sonra döküm parça çıkarılır. Genel olarak mikro enjeksiyon kalıplamanın başlıca dezavantajları, termoplastiklerle ilgili malzeme kısıtlamaları, kalıbın pahalı imalatı ve sınırlı çözünürlüktür [78].

2.3.1.3. Sıcak Kabartma

Sıcak kabartmada, yüksek sıcaklık ve basınç altında kalıp şekli termoplastiklere aktarılır. Termoplastik film, iki kalıp arasına yerleştirilir ve ardından hem film hem de kalıplar

vakum altında ısıtılır. Kalıpların yumuşamış polimere bastırılmasıyla kalıp şekli aktarılır. Son olarak, kalıp soğutulur ve işlenmiş polimer çıkarılır. Sıcak kabartmada, termoplastik daha kısa bir mesafede aktığı için enjeksiyon kalıplamaya göre malzemede daha az gerilim oluşur. Ancak, kullanılan malzemelerdeki sınırlamalar ve karmaşık yapıların üretimindeki zorluklar bu yöntemin dezavantajlarıdır [78, 80].

2.3.2. 3B Baskı

Nispeten daha yeni bir teknik olan 3B baskıyla çeşitli mikroakışkan cihazlar, birbirini takip eden malzeme katmanlarıyla üretilerek elde edilir. Bu teknoloji sayesinde, düşük maliyetle tek bir üretim sürecinde farklı mekanik ve fiziksel özelliklere sahip birkaç malzeme kullanımına olanak tanır [80]. Ancak düşük z ekseni çözünürlüğü, pürüzsüz yüzey oluşturmaktaki yetersizlikler ve optik geçirgen malzemenin sınırlı sayıda olması gibi sınırlamaları vardır [81].

2.3.2.1. Eriyik Birikim Modelleme

Eriyik birikim modelleme, ekstrüzyon tabanlı basit bir üç boyutlu baskı yöntemidir. Bu teknolojiye termoplastik bir filaman eritilir ve bir nozul vasıtasıyla ekstrüde edilip soğuyarak katılaştırılır [82]. Çeşitli malzemelerle uyumlu bir teknoloji olmasına rağmen, katmanlar arasında yeterli kaynaşma olmadığı için basınca karşı hassastır [83].

2.3.2.2. Vat Polimerizasyon Yöntemi

Bu yöntemde, mikroakışkan sistemleri elde etmek için kullanılan reçine UV ışık ile sertleştirilir. Sistem ışık kaynağı, ışığa duyarlı öncül malzemeler (fotoinitiyatörler) ve reaksiyon kabı olarak kullanılan bir baskı platformu olmak üzere üç ana bileşenden oluşur [80].

2.3.2.3. Çoklu Püskürtme Yöntemi

Ticari olarak Polyjet olarak bilinen bu teknikle yüksek hassasiyette mikroakışkan cihazlar çeşitli malzemelerle üretilir. Fotosensitif reçine, bir mürekkep püskürtme başlığından

damla damla püskürtülür ve ardından mürekkep püskürtme başlığına bağlı bir ışık kaynağı tarafından sertleştirilir [78].

2.3.2.4. İki-foton Polimerizasyonu

Yüksek çözünürlüklü bu teknoloji, karmaşık ve nano ölçekli yapılar oluşturma yeteneğine sahiptir. Sıvı reçine odaklanmış bir lazere maruz bırakılarak bölgesel olarak sertleştirilir. Ardından reçinenin arta kalan sıvı kısmı uzaklaştırılır [80].

2.4. Mikroakışkanların Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Mikroakışkan sistemlerin geliştirilmesinin ilk aşaması, kanal malzemesinin seçimidir. Kanal malzemesi seçiminde ve imalatında göz önünde bulundurulması gereken çeşitli faktörler vardır. Bunlardan ilki, kanal duvarlarının hidrofobik özelliğidir. Sıvıların hidrofobik duvarlara sahip kanallarda örnek yükleme ve hazırlama işlemleri hidrofilik olanlara göre daha zordur. Bununla birlikte, sıvılar hidrofilik kanallarda kapiler kuvvetin etkisiyle kolayca hareket eder. Bir diğer önemli faktör biyouyumluluk ve kimyasal dayanıklılıktır. Kanal duvarının akışkanlara ve partiküllere karşı inert olması beklenir. Ayrıca hücre uygulamaları için akışkanın belirli ölçüde kanal duvarlarının geçirgenliği istenirken, bu durum fazla olduğunda paralelde çoklu kanallar için kontaminasyona neden olabilmektedir. Kullanılan çip malzemesinin optik geçirgen olması istenen diğer önemli özelliktir. Son olarak, prototip oluşturmada ve üretim sırasında basit ve ucuz kanal malzemesi seçimi maliyetleri düşürdüğü için dikkat edilen unsurlar arasında yer almaktadır [84]. Her malzemenin kendine özgü avantajları ve dezavantajları olduğu için cihaz için seçilen malzeme belirli gereksinimlere ve uygulama alanına bağlı olarak belirlenir. Çizelge 2.3’de mikroakışkan cihazların üretiminde kullanılan malzemelerin özellikleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Mikroakışkan yapımında kullanılan malzemelerin karşılaştırılması [83].

	Silikon / Cam	Seramik	Elastomer	Termoplastik	Hidrojel	Kağıt
Düşük maliyet	Negatif	Pozitif	Orta	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Üretim kolaylığı	Negatif	Pozitif	Pozitif	Orta	Orta	Pozitif
İyi mekanik öz.	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Orta	Negatif
Esneklik	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
Oksijen geçirgenliği	Negatif	Pozitif	Pozitif	Değişken	Pozitif	Pozitif
Biyouyumluluk	Pozitif	Orta	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Kimyasal modifikasyon olasılığı	Orta	Orta	Orta	Orta	Pozitif	Orta
Optik geçirgenlik	Negatif/ Pozitif	Negatif	Orta	Pozitif	Pozitif	Negatif
Kanal boyutu	<1 µm	>1 µm	<1 µm	<100 nm	>1 µm	>1 µm
Düşük absorpsiyon	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Orta	Orta
Hızlı prototipleme	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Orta	Orta
Hücre büyüme potansiyeli	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif

Seramik, solventlere ve yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olmaları nedeniyle mikroakışkan üretiminde kullanılan bir malzemedir [85, 86]. Ancak kanal boyutundaki düşük çözünürlük, gözeneklilik ve kırılgenlik açısından bazı sınırlamaları vardır. Bu da kullanımlarını kısıtlamaktadır [85]. Cam optik geçirgenlikleri, kimyasallara karşı inert olmaları, yüksek termal iletkenlikleri ve stabil elektro-osmotik hareketlilikleri nedeniyle kapiler cihazlar oluşturmak için idealdirler. Benzer şekilde kimyasallarla etkileşime girmeyen silikon, termostabilite, tasarım esnekliği ve yarı iletkenlik özelliklerine sahip olması nedeniyle yüksek sıcaklıklara ve basınçlara dayanabilir. Ancak, opak ve kırılgen olmaları kullanımlarını kısıtlar [87]. Bu kısıtlamalar nedeniyle son zamanlarda daha ucuz ve kolay işlenebilen polimerik malzemelere ilgi artmıştır. Mikroakışkan üretiminde en yaygın kullanılan polimerler arasında PDMS, polimetilmetakrilat (PMMA), floropolimerler, siklo-olefin polimerler ve kopolimerler (COP'lar/COC'lar) ve tiyol-ene polimerler (TE'ler) bulunur. Özellikle bir elastomer olan PDMS düşük maliyet, yüksek optik geçirgenlik, mükemmel biyouyumluluk ve yüksek elastikiyet özellikleri nedeniyle mikroakışkan üretiminde en çok kullanılan malzemelerden biridir. Bu avantajlara rağmen, PDMS organik çözücülerle kolayca deforme olabilir, aşınabilir yada şişebilir [87]. PDMS mikroakışkan cihazlar, uzun vadeli hücre kültürü, hücre tarama ve biyokimyasal analizler gibi biyolojik araştırmalar için sıklıkla kullanılır [24, 88].

Mikroçip üretimi için yaygın olarak kullanılan bir diğer malzeme PMMA'dır [89]. Bir termoplastik olan PMMA, PDMS'e göre biraz daha iyi çözücü uyumluluğuna sahiptir [88]. Ayrıca PMMA, optik geçirgen ve mekanik olarak dayanıklıdır. Küçük ölçekli üretimde prototipleme imkanı sunmaktadır. Özellikle çip-üstü-organ cihazlarında kullanılır [86, 89, 90].

PDMS'e alternatif olarak kullanılan diğer bir polimerik malzeme perflorlu polimerlerdir (örneğin, perfloroalkoksi alkan, florlanmış etilen-propilen ve politetrafloroetilen). Bu polimerlerin optik geçirgen olması, ısıl işlem kolaylığı, kimyasal olarak inert olması, ısıya dayanıklılığı ve kirlenmeme özellikleri nedeniyle tercih edilirler. Kirlenmeme ve kanal tıkanmasına karşı dirençleri nedeniyle mikro vana ve pompa üretimi gibi uygulamalarda kullanılabilirler. Ayrıca hücre kültürü, yüksek hassasiyetli analizlere uygun bir malzemedir [20, 88, 91, 92]. Ancak, floropolimer mikroakışkanların prototip oluşturulmasındaki zorluk ve yeterince esnek olmaması nedeniyle kullanımları sınırlıdır [91]. Son zamanlarda COP'lar/COC'lar, optik şeffaflık, gelişmiş kimyasal direnç, düşük

su emilimi, iyi elektriksel yalıtım özellikleri ve yüzey işlemlerinde uzun vadeli stabilite gibi özellikleri nedeniyle mikroakışkanlarda malzemesi seçiminde ilgi odağı olmuştur [85, 90, 93]. Bu termoplastikler asitler, bazlar ve polar çözücülere karşı dayanıklıdır. Bu nedenle, NP üretimi için tasarlanan cihazların kullanımında yer alır [93]. Hidrojeller, mikroakışkan cihaz olarak kullanılan bir diğer alternatif polimerdir. Yüksek biyouyumlulukları, düşük sitotoksitesisi, hidrofilik doğası ve yüksek geçirgenlikleri nedeniyle; hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasını destekledikleri için doku mühendisliği araştırmalarında kullanılan mikroakışkan cihazların üretiminde kullanılmaktadırlar [88, 92]. Ancak, hidrojellerin cihaz bütünlüğünü korumak zor olduğundan uzun süreli kullanımları sınırlıdır. Bu nedenle, hidrojeller birincil üretim malzemesi olarak kullanılmaz. Onun yerine mikroakışkan cihazlarda yarı geçirgen bariyerler ya da akıllı valfler olarak kullanılırlar [86, 90].

Mikroakışkan uygulamaları için ucuz malzemelerden biri de kağıttır [24, 94]. Kağıt bazlı sistemlerin basit, hafif, kolay erişilebilir olması, yüksek gözeneklilik ve fiziksel emilim özellikleri, biyouyumlulukları, kolay manipülasyon ve sterilizasyonları, kimyasal veya biyolojik modifikasyon potansiyelleri ve destekleyici ekipman olmadan çalışma yetenekleri nedeniyle oldukça cazip bir materyaldir [90, 94-97]. Kağıt bazlı mikroakışkan cihazlar, genellikle hızlı yerinde tanı testleri ve tıbbi tarama için hedef biyomoleküllerin tespitinde kolorimetrik veya elektrokimyasal çıktının elde edildiği sistemlerdir [24, 94, 97, 98]. Ancak kağıt bazlı sistemlerin kullanımı, ıslak durumda mekanik dayanıklılıkları zayıf olması ve şeffaflığı sağlamak için gereken kalınlık gereksinimleri nedeniyle sınırlıdır [90].

2.5. Mikroakışkanlarda Akış Dinamikleri

Mikroakışkan sistemlerde kanalların genellikle mikron boyutunda olması nedeniyle akışkanların laminar rejimde akma eğilimindedir. Laminar akışta, sıvı paralel katmanlar halinde akar ve herhangi bir konumdaki sıvının hızı sabittir. Bu kararlı akış dinamiği sayesinde akışkanların difüzyon ve adveksiyon tarafından kontrol edilerek hassas bir şekilde yönlendirilebilirler. Mikroakışkan sistemde akış kontrolü Reynolds sayısına (Re) ve Péclet sayısına (Pe) bağlıdır. Reynolds sayısı (Re), akış rejimini gösteren önemli bir

boyutsuz sayıdır ve sıvının atalet ve viskoz kuvvetlerinin oranıdır. Aşağıdaki denklemle hesaplanabilir [29]:

$$Re = \frac{\rho \vartheta D_h}{\mu}$$

Burada, ρ sıvı yoğunluğunu, ϑ ortalama sıvı hızını, μ dinamik viskozitesini ve D_h mikroakışkan kanalın hidrolik çapını temsil eder. Ancak, Re sayısı 2000'ün üzerinde olduğunda, rastgele akış çizgileriyle türbülanslı bir akış gerçekleşir. Buna karşılık, Re sayısı 1800'in altında olduğunda, akışkanın yönüne paralel düzenli akım çizgileriyle laminar akış meydana gelir [42]. NP elde etmek için ya düşük Reynolds sayılarında laminar akış, ya nispeten daha yüksek Reynolds sayılarında laminar akış ya da türbülanslı akış kullanılır [18].

Mikroakışkan sistemlerde bir diğer önemli boyutsuz sayı Peclet (Pe), adveksiyon ile difüzyon hızlarının göreceli büyüklüğünün ifadesidir. Pe aşağıdaki denklemle hesaplanabilir [99]:

$$Pe = \frac{\vartheta L}{D}$$

Burada ϑ sıvı hızını, L ise difüzyon mesafesini ve D sıvının difüzyon katsayısını temsil eder. Denklem (2)'de gösterildiği gibi, Pe akışkanının hızı ve difüzyon mesafesi ile doğru orantılı olarak değişir. Pe sayısı yüksek olduğunda adveksiyon baskındır [99]. Üst değeri genellikle Reynolds sayısı tarafından sınırlanan Peclet sayısı, 250 ile 2500 arasında değişmektedir [100]. Moleküler difüzyon mikroakışkan kanal içinde karışmayan akışkanlarda, sıvı-sıvı/sıvı-gaz arayüzleri olduğu için zordur. Ancak karışabilen akışkanlar kullanıldığında arayüz oluşabilir bununla birlikte moleküler difüzyon yatay veya dikey olarak gerçekleşebilir. Moleküllerin bir sıvıdan diğerine transferinin en aza inmesi, ilaç enkapsülasyon etkinliğini arttırabilir [101].

2.6. Nanopartikül Üretiminde Mikroakışkan Sistemler ve Geleneksel Yöntemlerin Karşılaştırılması

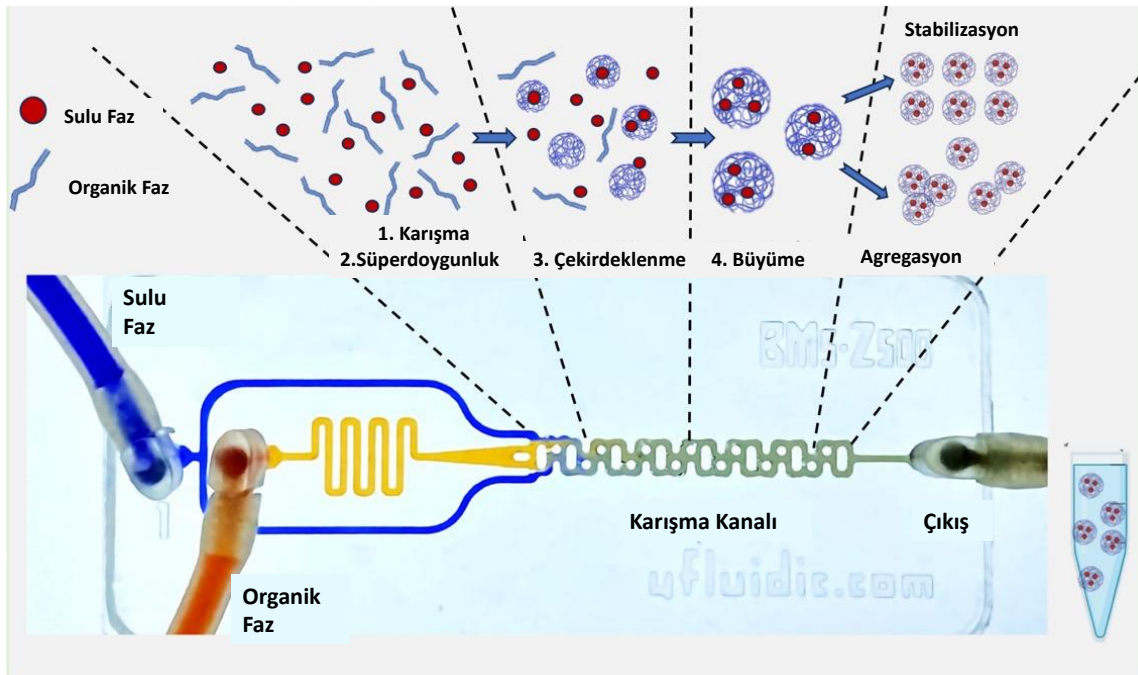
İlaç taşıyıcı sistemlerin üretiminde, nanopresipitasyon ve solvent evaporasyonu gibi geleneksel yığın yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır [102-104]. Ancak, bu tekniklerin verimsiz karışma ve yavaş kütle transferi ile karakterize olmaları nedeniyle, dar bir partikül boyutu dağılımına sahip NP'lerin elde edilmesi oldukça güçtür. Bu nedenle, NP'lerin partiden partiye (batch to batch) üretimleri sırasında fizikokimyasal özelliklerin değişmesi NP'lerin farklı biyodağılım göstermelerine yol açmakta; kliniğe geçişlerini zorlaştırmaktadır [6, 8]. Mikroakışkan cihazlar, NP sentezini hassas bir şekilde kontrol edebilmeleri; daha küçük ve uniform (eşit boyutlarda) partiküller üretebilmeleri nedeniyle umut vaat edici bir yaklaşım olmuştur [105, 106].

Mikroakışkan cihazlarda pikolitrelerden nanolitreler kadar değişen hacimlerin manipülasyonu, hızlı ısı ve kütle transferine neden olmaktadır. Bu süreç geleneksel yığın karışımlardan birkaç kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu durum, daha az reaktif, enerji ve zaman kullanımıyla sürecin daha ekonomik hale gelmesine neden olur [9, 10]. Geleneksel yöntemlerde NP'lerin boyut ve yapı gibi özelliklerinde kontrol mümkün olmamasına rağmen; mikroakışkan sistemlerde karışımın kinetik kontrolü sayesinde daha monodispers, istenilen boyut, şekil, yüzey özelliklerine ve kontrol edilebilir salım profiline sahip NP'ler üretilebilir [10, 107, 108]. Karnik ve arkadaşları (2008), mikroakışkan sistem ve geleneksel yöntem kullanarak elde edilen PEG-PLGA NP'lerin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Mikroakışkan yöntemle üretilen NP'lerin daha küçük boyutlu ve dar boyut dağılımına sahip olduğu gözlenmiştir [41]. Başka bir çalışmada, mikroakışkan platform kullanılarak hazırlanan Paklitaksel içeren NP'ler, geleneksel yöntemle hazırlananlara kıyasla daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi (~%6) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) (~%90) göstermiştir [109].

Bu yöntem, yalnızca birçok verimsizliğin üstesinden gelmekle kalmayıp aynı zamanda ölçeklenebilir ve parti değişkenliğinin kontrolü ile ilgili zorlukları da başarıyla aşmıştır [109]. Son yıllarda, Pfizer'ın mRNA aşısının başarılı bir şekilde üretimiyle birlikte mikroakışkan tekniklerin daha verimli ve güvenilir bir alternatif sunduğu kanıtlanmıştır [43, 110].

2.7. Mikroakışkanlarda Farmasötik Nanopartiküllerin Oluşum Mekanizması

Farmasötik uygulamalar için mikroakışkan sistem kullanılarak NP'lerin sentezi presipitasyon ile gerçekleşir. Organik maddenin uygun bir çözücünde çözündüğü solvent faz ile solventle karışabilen antisolvent fazın birbiriyle karışması sağlanarak kontrollü presipitasyon işlemi gerçekleşir. Presipitasyon süreci Şekil 2.1'de gösterildiği gibi temel olarak 4 ana basamakta gerçekleşir: karışma, süper doygunluk, çekirdeklenme ve büyüme [18].



Şekil 2.1. Presipitasyon sürecinin aşamaları: Karışma, süperdoygunluk, çekirdeklenme ve büyüme.

2.7.1. Karışma

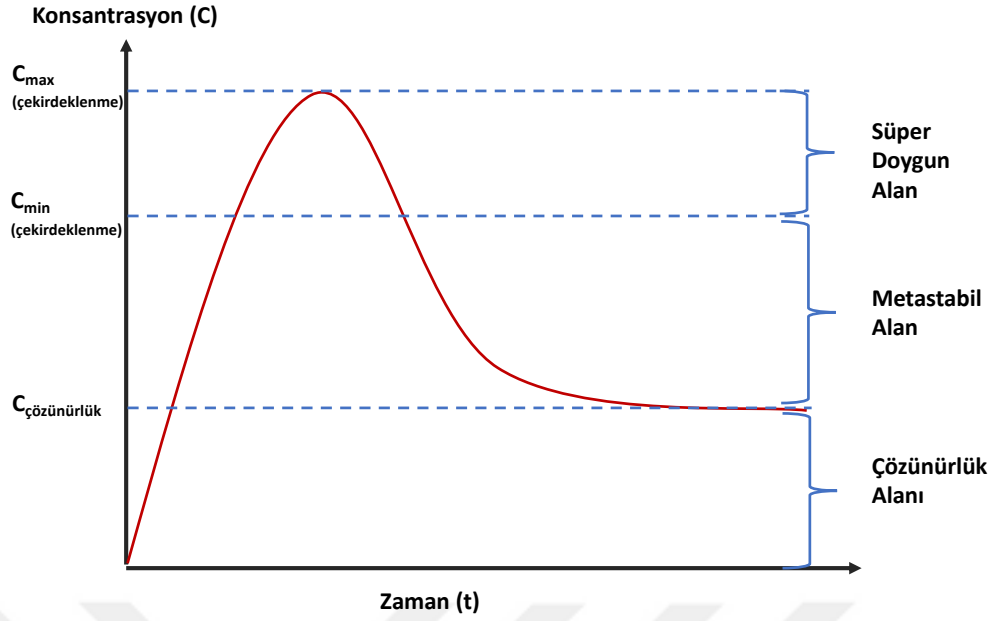
Karışma, presipitasyon sürecini kontrol eden en önemli faktörlerden biridir. Küçük boyutlu ve dar dağılımlı NP'leri elde etmek amacıyla homojen bir doygunluk sağlamanın ön şartı, solvent ve antisolventin homojen bir şekilde karışmasıdır [111]. Temel olarak karışma işlemi makro-karışma, mezo-karışma ve mikro-karışma olmak üzere üç seviyeden oluşur [112, 113]. Makro-karışma ve mezo-karışma beraber değerlendirilir ve karışma konvektif türbülanslı taşınım, kayma, kaotik akış ve burgaç (girdap) hareketi ile

gerçekleşir. Mikro-karışma da ise moleküler difüzyon ile akışkanlar birbiriyle karışırlar. Homojen karışımın elde edilmesi en uygun mikro-karışma ile sağlanır. Mikro-karışma karışım türleri arasında istenen ve özellikle tasarlanan bir seviyedir [114, 115]. Bu nedenle konvansiyonel üretimlere kıyasla, mikroakışkan sistemlerde sıvıların mikro ölçekte karışma olanağı sunması nedeniyle; mikroakışkan sistemler istenilen fizikokimyasal özellikli, monodispers yapılı NP'lerin üretiminde oldukça ön plana çıkmıştır [43].

2.7.2. Süper Doygunluk

LaMer teorisi, NP oluşumunu, zamanın bir fonksiyonu olarak monomer konsantrasyonundaki değişimin kendiliğinden ve rastgele olarak homojen çekirdeklenmeye bağlı olarak açıklanmaktadır (Şekil 2.2) [116]. Doygunluk derecesi, bir çözeltideki çözünmüş madde konsantrasyonunun, bu çözeltideki maksimum çözünürlük kapasitesine oranıdır. Yüksek çekirdeklenme ile düşük büyüme oranında, yani daha küçük boyutta NP'ler elde etmek için, yüksek doyma derecesi ile birlikte iyi bir karışma gerekir. Öte yandan düşük doyma derecelerinde yavaş karıştırma ile birlikte elde edilen çekirdek sayısı daha azdır ve çekirdeklerin metastabil bölgede daha uzun zaman harcamasıyla çekirdek büyümesi ve daha büyük boyutta NP'ler gelişir. Bununla birlikte yüksek doyma derecesinin kütle transferini artırması, partikül büyümesini hızlandırabilir [111, 117]. Ancak teorik olarak hesaplanan doyma derecesine olağanca yaklaşabilmek için, çekirdek oluşum aşamasından önce mümkün mertebe solvent ve antisolventin hızlı ve homojen karışımı sağlanmalıdır [118]. Böylece monodispers özellikteki NP'ler sayesinde, Ostwald olgunlaşma etkisini minimize ederek stabilite arttırılmış olunur [119].

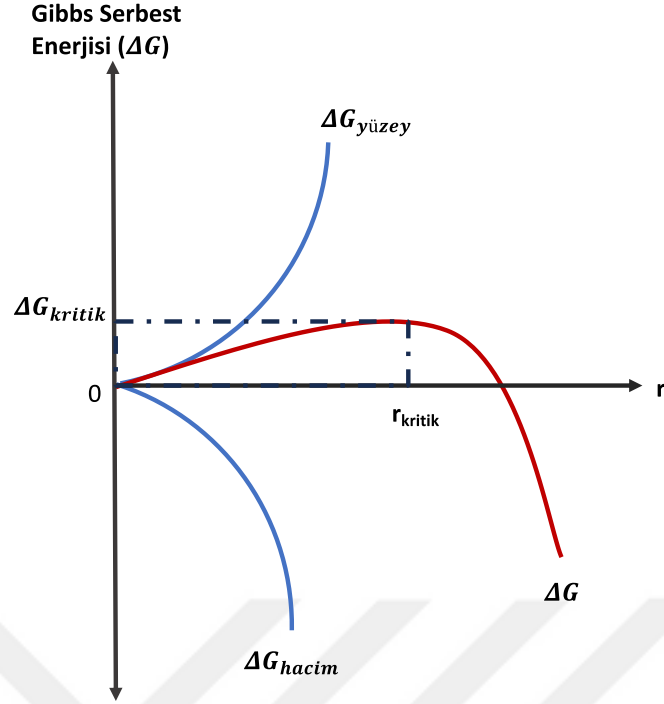
Doygunluk derecesi ve buna bağlı olarak elde edilen NP'nin fizikokimyasal özellikleri çeşitli parametrelerin değiştirilmesiyle değiştirilebilir. Bu değişkenlerin NP üzerindeki etkisi Bölüm 2.8'de detaylı olarak tartışılmıştır.



Şekil 2.2. NP oluşumunu, monomer konsantrasyonunu zamanın bir fonksiyonu olarak tanımlayan LaMer mekanizması.

2.7.3. Çekirdeklenme

NP oluşumunda çekirdeklenme için sistem dengesinde süper doygunculuk yaratılarak katı fazın oluşum süreci tetiklenir [116]. Süper doygunculuk durumunda sistemin Gibbs serbest enerjisi (ΔG) yüksektir ve bu enerji, moleküler veya atomik kümelerin oluşumuyla azalır [120]. Ani çekirdeklenme ile süper doygunculuk seviyesindeki düşüş çekirdeklenmenin durmasına neden olur [121]. Bu kümelerden bazıları birbirleri ile birleşerek çekirdekler oluşturur ve ortaya çıkan enerjiyle çekirdeklerin yüzeyi stabil hale gelir. Şekil 2.3’de gösterildiği gibi bu eklenmeler ve toplam Gibbs serbest enerji değişimi partikülün büyüme aşamasına geçmesi için gereken minimum boyut olan kritik çekirdek boyutuna ulaşana kadar devam eder [122]. Bundan sonra net serbest enerji, çekirdek boyutundaki herhangi bir artış için kademeli olarak azalır. Son aşamada heterojen çekirdeklenme yani difüzyon kontrollü büyüme aşaması başlar [121].



Şekil 2.3. Çekirdeklenme için serbest enerji diyagramı.

Çekirdeklenme hızı elde edilen NP'lerin fizikokimyasal özelliklerini belirleyen önemli bir faktördür. Çekirdeklenme hızını en fazla süper doymuluk seviyesi etkilemektedir. Doymuluk seviyesindeki ani azalma ile çekirdeklenme süreci sonlanarak, çekirdeğin büyüme süreci başlar. Bu sayede NP'lerin hemen hepsi aynı boyutta elde edilir. Fakat doymuluk seviyesinin daha uzun sürede düşmesi, çekirdeklenme sürecinin uzamasına neden olarak daha polidispers yapıda NP'lerin oluşumuna yol açar [123, 124].

2.7.4. Büyüme

Çekirdek büyümesi birkaç aşamayı içerir. Öncelikle büyümeye katılan türler oluşur ve bunların büyüme yüzeyine yani çekirdeklere difüzyonu gerçekleşir. Bu türlerin çekirdeğe adsorpsiyonundan sonra tersinmez katılımıyla birlikte çekirdek boyutunda artış meydana gelir. Çekirdek büyümesi, farklı boyut dağılımlarına neden olabilen difüzyon ya da yüzey mekanizmaları ile gerçekleşebilir [125, 126]. Büyüme türleri olan monomerlerin çekirdek yüzeyine difüzyonu ile partikül büyümesi sürecine girmesi durumunda monodispers yapıya sahip NP elde edilir. Difüzyon kontrollü büyümeyi tetikleyebilmek amacıyla

sistemin viskozitesini arttıran yada sisteme NP yüzeyini sararak monomer difüzyonunu engelleyici özellikte bir katman eklenebilir. Öte yandan yüzey kontrollü büyümede sistemdeki ve çekirdek yüzeyindeki konsantrasyon aynıdır. Tek çekirdekli (mononuclear) büyüme ve çok çekirdekli (polynuclear) büyüme olmak üzere iki farklı şekilde yüzey büyümesi gerçekleşir. Katman katman büyüme gerçekleşen tek çekirdekli büyümede geniş partikül boyutu dağılımlı NP elde edilirken; çok çekirdekli büyümede reaktanın yüzey konsantrasyonu çok yüksek olduğu için tüm katmanlar aynı andan ilerler ve elde edilen NP monodispers yapıdadır [18, 125].

Nanosüspansiyonlar termodinamik olarak kararsız sistemler oldukları için Ostwald olgunlaşması ve agregasyon kaçınılmazdır [127, 128]. Agregasyon hazırlama sürecinde oluşabileceği gibi saklama süresinde de gerçekleşebilir [129, 130]. Bu nedenle sistemi stabil tutmak önemlidir. NP'lerin sistemdeki çözünürlüğünün düşük olması ve dar dağılımlı olması agregasyonu ve Ostwald olgunlaşmasını azaltır [131]. Ayrıca uygun bir stabilizatör seçimi ve konsantrasyonu, sistemin daha stabil olmasına katkıda bulunmaktadır [130, 132, 133].

2.8. Nanopartikül Oluşumunu Etkileyen Parametreler

İstenilen fizikokimyasal özellikte NP elde etmek için, mikroakışkan cihazda presipitasyon sürecinin nasıl manipüle edileceğini bilmek önemli bir anahtardır. Bu süreçte NP oluşumunu etkileyen çeşitli faktörlere ilişkin alt başlıklar aşağıda tartışılmıştır.

Presipitasyona bağlı NP'lerin oluşumunda karışma zamanı ($t_{\text{karışma}}$) ve presipitasyon zamanı ($t_{\text{presipitasyon}}$) olmak üzere iki zaman ölçeği öne çıkar. $t_{\text{karışma}}$ kanal genişliğine ve solvent ve antisolventin akış hızı oranına bağlıdır [124, 134]. Presipitasyon zamanıysa ($t_{\text{presipitasyon}}$), yoğunlaşma zamanı ($t_{\text{yoğunlaşma}}$) ve koagülasyon zamanı ($t_{\text{koagülasyon}}$) olmak üzere kendi içinde ayrılır. Karıştırma zamanı ($t_{\text{karışma}}$) ile presipitasyon zamanının ($t_{\text{presipitasyon}}$) oranı boyutsuz Damkohler sayısını (Da) verir. Da sayısı 1'den küçük olması durumunda daha küçük ve dar boyut dağılımına sahip NP elde edilebilir [124, 135]. Bu amaçla, t_{mix} 'i düşürmek için daha iyi bir karışımın oluşturulacağı veya sıcaklığın düşürülmesi viskozitenin arttırılması gibi $t_{\text{presipitasyon}}$ 'u artıran koşulların ayarlanması

gerekmektedir. Ayrıca koagülasyonu engelleyen stabilizatörlerin sisteme eklenmesinin de $t_{\text{presipitasyon}}$ 'u arttırdığı görülmüştür [136, 137].

2.8.1. Solvent ve Antisolventin Karışabilirliği

Nanopresipitasyon süreci solvent (organik) faz ile antisolvent (sulu) fazın karışmasıyla gerçekleşir. Bu iki fazın birbiriyle karışabilirliği tüm sistemin difüzyona bağlı presipitasyonunu etkiler. Solventin su ile karışabilirliği ne kadar yüksekse, küçük boyutlu ve dar boyut dağılımına sahip partiküllerin elde edilme ihtimali o kadar artmaktadır [138]. Ayrıca elde edilen NP'lerin daha kararlı yapıda oldukları da bildirilmiştir [124].

2.8.2. Solvent-Antisolvent Hacim Oranı

Antisolvent/solvent (AS/S) hacim oranı, presipitasyon sürecinin etkileyen aşamalarından biridir. Antisolvent/solvent oranı belirli bir limite kadar arttırıldığında, doygunluk derecesi artacağı için çekirdeklenme oranında artış görülürken, partikül boyutunda giderek azalma meydana gelir [124, 139-141]. Ancak kritik limitin üstündeki değerlerde çekirdeklenme ve büyüme dengelendiğinden partikül boyutu artık daha fazla küçülemez ve neredeyse sabit bir boyutta kalır [124, 142]. Öte yandan AS/S oranı azaltıldığında da yüksek çözücü içeriği nedeniyle, presipitasyondan sonra Ostwald olgunlaşmasıyla partikül büyümesi gerçekleşir [143, 144].

2.8.3. Çözücü ve Antisolventin Akış Hızı

Çözücü ve antisolventin akış hızları kademeli olarak artırıldığında, partikül boyutunda bir azalma gözlemlenmiştir; ancak bu azalma belirli bir seviyeye ulaştıktan sonra önemsiz hale gelmektedir [139, 145]. Akış hızının artışıyla karışma süresindeki azalış, daha hızlı ve homojen süper doygunluk seviyelerine ve daha fazla çekirdeklenmeye neden olur [18].

2.8.4. Antisolvent Sıcaklığı

Antisolvent sıcaklığının azaltılması genellikle partikül boyutunu küçültür ve boyut dağılımını daraltır [127, 146-149]. Sıcaklığın düşürülmesi solventteki maddenin

çözünürlüğünü azalttığı için, doygunluk derecesini arttırarak çekirdeklenme oranının yükselmesine ve Ostwald olgunlaşmasının azalmasına neden olur. Buna bağlı olarak sistem viskozitesindeki artış, partikül hareketliliğinde azalmaya ve stabilizatörlerin partikül yüzeylerine eşit şekilde dağılması için yeterli süre sağlar. Böylece partikül agregasyonu engellenir [139, 146].

2.8.5. Çözücü Fazdaki İlaç Konsantrasyonu

Süper doygunluk derecesini kontrol etmek için solvent fazdaki çözelti (ilaç veya polimer olabilen) konsantrasyonunu kullanılmak bir diğer yöntemdir. Çözelti konsantrasyonu arttırmak, süper doygunluğu artırarak hızlı ve homojen çekirdeklenmeye neden olur. Böylece daha küçük NP'ler üretilir. Ancak, optimum konsantrasyon aşıldığıdaysa, artan çekirdek sayısı ile birlikte akışkanın viskozitesindeki artış fazlar arası difüzyonu azaltır. Hem çekirdek sayısındaki artış hem de difüzyon hızındaki azalış nedeniyle, çarpışma oranı artar. Bunun sonucu olarak, NP'lerin boyutu artar. Fakat, optimum seviyenin altında bir konsantrasyon kullanılırsa çekirdeklenme hızı azalarak, partikül boyutunun artmasına neden olur [139, 143, 145, 148-150].

2.8.6. Stabilizatör Seçimi

Nanosüspansiyon özellikteki formülasyonların Ostwald olgunlaşmasına bağlı agregasyonunu ve aglomerasyonunu önlemek amacıyla, sistemin arayüzey gerilimini ve serbest enerjisini düşüren stabilizatörlerin kullanımı önemlidir [124, 129]. Partiküllerin yüzeyine absorbe olma ilgisine bağlı olarak seçilen ve polimerik, iyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerini kapsayan farklı türde stabilizatörler NP formülasyon aşamasında kullanılmaktadır [151]. İyonik yüzey aktif maddeler elektrostatik itmeyle (yüklerden kaynaklı), polimerler ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerse sterik itmeyle (polimer zincirlerinden kaynaklı) NP'lerin büyümesini ve agregasyonunu engellerler [144, 152]. Etkili bir sterik veya elektrostatik stabilizasyonda eklenen stabilizatörlerin hidrofobik uçları NP'ün yüzeyine absorbe oluk; hidrofilik uçları suya doğru yönelmektedir [153]. İyi bir stabilizasyon ve küçük boyutlu NP'lerin üretimi için güçlü ve hızlı adsorpsiyona karşın yavaş desorpsiyon süresi istenmektedir [154]. Daha düşük

moleküler ağırlıklı ve daha büyük zincir uzunluğuna sahip polimerik stabilizatörlerin partikül yüzeyine adsorpsiyonları daha iyidir [155].

Stabilizatör seçimi kadar stabilizatörlerin optimum konsantrasyonda kullanımları da bir o kadar önemlidir. Yüzey aktif maddenin konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunu aştığı takdirde, misel oluşumunu tetiklendiği için daha az yüzey aktif maddenin partikül yüzeyinde adsorpsiyonuna neden olur. Bu durum olası agregasyon riskini arttırır. Öte yandan optimum seviyenin altındaki konsantrasyonda, yeterli sterik itme gerçekleşmediği için, sistem termodinamik olarak kararsız halde kalır ve partiküllerin agregasyonuna neden olur [119, 156, 157]. Benzer şekilde, kullanılan polimerik stabilizatör konsantrasyonun kritik flokülasyon konsantrasyonunu aşması durumunda, polimer zincirlerinin birbirine dolanması nedeniyle Ostwald olgunlaşması indüklenir ve NP büyümesi gerçekleşir [119].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tezde kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddelerin listesi.

Kimyasal Madde	Marka ve Menşei
PLGA (Resomer RG 502H, 50:50, Mw: 7.000–17.000 Da)	Evonik Industries AG (Darmstadt, Almanya).
Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris, Mw: 121.14 g/mol)	Biomatik (ABD/ Kanada)
Aseton (AC)	Honeywell, Riedel-De-Haën (Seelze, Almanya).
Asetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich (ABD)
Poli(vinil alkol) (PVA, Mw: 30.000-70.000 Da)	Sigma-Aldrich (ABD)
5-FU	Sigma-Aldrich (ABD)
Ultrasaf Su	MES, MP Minipure (Türkiye)
İnsan skuamöz hücreli karsinom hücreleri (A-431)	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)
Dulbecco'nun MEM	Cegrogen Biotech (Almanya)
Fetal bovin serumu (FBS)	Sigma-Aldrich (ABD)
L-glutamin	Cegrogen Biotech (Almanya)
Penisilin-Streptomisin	Cegrogen Biotech (Almanya)
Tripsin-EDTA	Cegrogen Biotech (Almanya)

MTT çözeltisi	Sigma-Aldrich (ABD)
PBS çözeltisi	Cegrogen Biotech (Almanya)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Almanya)

3.2. 5-FU'nun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Aktif madde olarak 5-Fluorouracil (5FU) kullanılmış; 5-FU'nun FTIR ve UV spektrumları belirlenmiştir.

3.2.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

5FU'nun FT-IR analizi, Thermo Scientific/Nicolet iS50 cihazıyla, IR bölgesinin 500-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ölçülmüştür.

3.2.2. UV/Vis Spektrumu

Tris tamponunda (10 mM, pH = 7.4) hazırlanan aktif maddenin UV spektrumu Shimadzu UV-1280 UV-Vis spektrofotometresi ile elde edilmiştir.

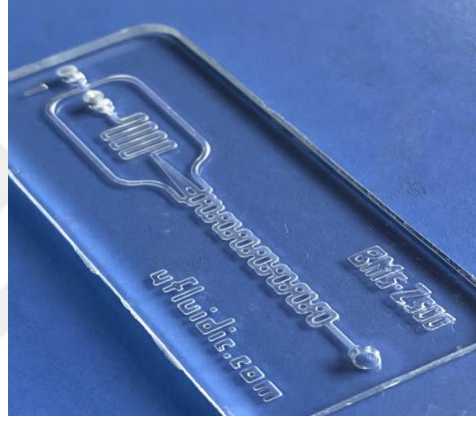
3.3. 5FU'nun Miktar Tayini

5-FU içeriği, HPLC (Dionex-Ultimate 3000, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler, mobil faz olarak 50 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak, 0.8 mL/dk akış hızında ve 25°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Analiz için C18 kolon (ODS-Hypersil, 5 µm, 150 x 4 mm) kullanılmıştır. Analizler 20 µL enjeksiyon hacmiyle, λ = 265 nm'de gerçekleştirilmiştir. 5-FU, ~5. dk'da tespit edilmiştir. 5-FU stok çözeltisinden, seri dilüsyon yoluyla 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µg/mL olmak üzere 7 farklı standart konsantrasyonda hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, otomatik numune alıcı, pompa ve fotodiyot dizisi dedektörü ile donatılmış HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

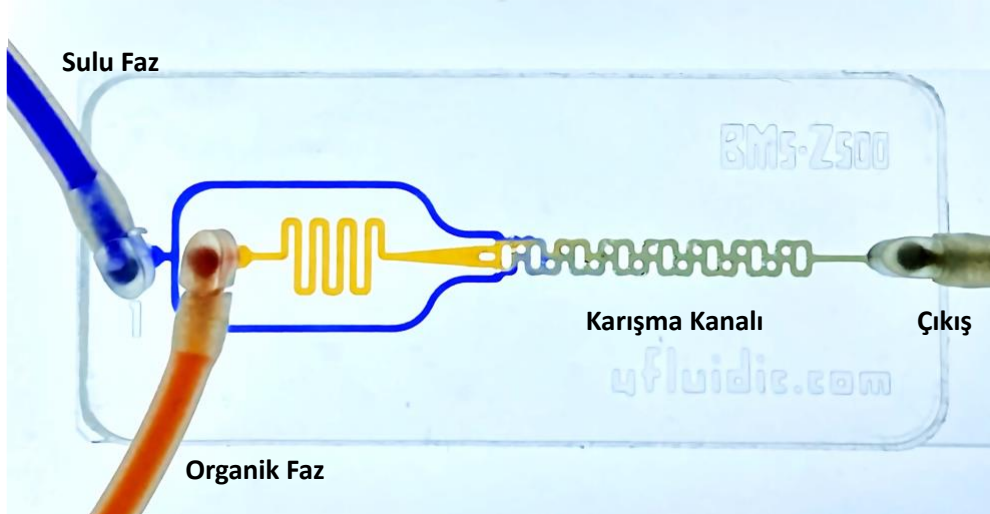
3.4. Nanopartiküllerin Üretiminde Kullanılan Toroidal Mikromikserin Özellikleri

Özgün tasarımı toroidal yapıdaki mikroakışkan çipler Nehir Biyoteknoloji'den (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir [158]. Mikroakışkan çipin kanal genişlikleri ve yükseklikleri 500 μm olup, PDMS yapı cam tabana oksijen plazma işlemi ile yapıştırılmıştır. Değişen uzunluklarda kavisli kanallara sahip olan cihaz, saatte 1-2 L NP üretimi yapabilecek kapasiteye sahiptir. Mikroakışkan cihazda sıvı girişi için iki giriş ve sentezlenen NP'ler için bir çıkış bulunmaktadır (Şekil 3.1). Sulu ve organik fazları içeren akışkanlar bir şırınga pompası (Inovenso Inc., IPS-14RS) yardımıyla cihaza pompalanmaktadır. Mikroakışkan çipte PLGA NP'ler, sulu fazın ve organik fazın mikron boyutlu karışma kanallarında hızlı bir şekilde karışmasıyla oluşmaktadır.

a)



b)



Şekil 3.1. Toroidal mikroakışkan sistemin fotoğrafı (a), ve Toroidal mikroakışkan sistemin şematik gösterimi: Sulu ve organik fazlar için iki giriş, akışkanların birbiriyle karıştığı karışma kanalı ve NP'lerin elde edildiği bir çıkış (b).

3.5. Ön Formülasyon Çalışmaları

Bu tez kapsamında mikroakışkan proses parametrelerinin NP üzerindeki etkilerini incelemekten önce, ön formülasyon deneyleri yürütülmüştür. Sabit proses koşullarında (TFR: 5 mL/dk, FRR: 1:3) deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu ön deneylerde farklı PLGA konsantrasyonlarının (%0.5, %1 ve %2), çözücülerin (AC ve ACN) ve stabilizatörlerin (Tris tampon ve PVA) PLGA NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Formülasyonlar arasında daha küçük, daha homojen ve daha stabil özelliklere sahip NP'ler seçilmiş; bir sonraki adımda bu formülasyonla sistem parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır.

3.6. PLGA NP'lerin Toroidal Mikromikser ile Üretimi

Mikroakışkanlar cihazla PLGA NP'ler elde etmek için, 10 mg/mL (1% w/v) konsantrasyonda PLGA, asetonda çözülmüştür. Sulu faz olarak, Tris tampon (10 mM, pH 7.4) hazırlanmış ve filtrelenmiştir. Organik ve sulu fazlar ayrı ayrı şırıngalara yüklenmiştir. NP'leri toplamadan önce, belirli bir süre akışın stabil olması beklenmiştir. FRR ve TFR değişiminin PLGA NP'lerinin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için, farklı TFR değerleri (5, 10, 15 mL/dk) ve FRR oranları (1:3, 1:5, 1:7) test edilmiştir. Daha sonra çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla elde edilen PLGA NP'ler, 4°C'de ve 14.000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjle çöktürülen NP'ler Tris tamponunda yeniden süspanse edilmiş ve sonraki analizler için 4°C'de saklanmıştır.

3.7. 5FU-PLGA NP'lerin Toroidal Mikromikser ile Üretilmesi

Farklı proses parametrelerinde ilaç yüklü NP'lerin fizikokimyasal özelliklerini değerlendirmek amacıyla, DMSO'da çözülmüş 20 µL 5-FU (% 0.5, w:v), seçilen FRR'ye bağlı olarak 3 mL ila 7 mL arasında değişen hacimde 10 mM Tris tamponuna (pH 7,4) damla damla eklenmiştir. Organik ve sulu fazların, farklı FRR (1:3, 1:5, 1:7) ve TFR (5, 10, 15 mL/dk) ile karışması sağlanarak, 5-FU yüklü PLGA NP'ler üretilmiştir. NP'ler daha önce belirtildiği gibi santrifüjleme yoluyla saflaştırılmıştır.

3.8 PLGA NP'lerin ve 5FU-PLGA NP'lerin Karakterizasyonu

3.8.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

NP'lerin boyut dağılımı, PDI ve yüzey yükü DLS yöntemiyle Malvern Instruments Ltd. (Malvern, İngiltere) tarafından üretilen Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak belirlenmiştir. NP'ler Tris tamponu ile 1:10 oranında seyreltilmiş şekilde katyonik kapiler zeta hücresine yüklenmiş ve ortam sıcaklığında NP'lerin ölçümleri yapılmıştır. Santrifüj etkisini değerlendirmek için, NP'ler hem santrifüj öncesinde hem de sonrasında ölçülmüştür. Her bir örneğin (PLGA NP'ler ve 5-FU yüklü PLGA NP'ler) boyut (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) değeri en az üç ölçümün ortalamasına dayanarak raporlanmıştır. Ortalamalar grafiksel olarak temsil edilmiştir ve hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

3.8.2. Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)

NTA yöntemi kullanılarak NP'lerin konsantrasyonu (partikül/mL) ve ortalama çapı (nm) Malvern Panalytical NanoSight NS300 cihazı ile belirlenmiştir. Analiz yapabilmek için NP'ler uygun konsantrasyona (x2000) seyreltilmiştir. Santrifüjden önce NP'lerin analizleri, her biri 30 saniye olacak şekilde 3 farklı video kaydı alınarak gerçekleştirilmiştir. PLGA NP'lerin ve 5-FU yüklü PLGA NP'lerin mL'deki partikül sayısı ve ortalama çapları rapor edilmiştir.

Pratik verim yüzdesinin hesaplanması, yöntemin etkinliğini değerlendirmek ve optimum üretim yönteminin seçimi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Verimi belirlemek için, ultra saf su içinde yeniden süspanse edilmiş NP'ler dondurularak kurutulmuş ve kurutulmuş NP'lerin ağırlıkları ölçülmüştür. Her bir örnek için verim hesabı, geri kazanılan NP'lerin ağırlığının başlangıçta koyulan toplam kimyasal madde miktarına oranıyla belirlenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

$$Verim (\%) = \frac{\text{Sentezlenen NP'lerin ağırlığı}}{\text{Başlangıçta koyulan PLGA ve ilacın ağırlığı}} \times 100$$

3.8.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Santrifüj edilmiş PLGA NP'lerin morfolojileri, TEM kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla, örneğin 3-5 µL'si karbon kaplı bir ızgara üzerine damlatılmıştır. PLGA NP'ler negatif bir boya (1% uranil asetat) ile boyanmış ve ardından kurutulmuştur. Görüntüleme, FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Santrifüj edilmiş ve ultra saf su ile homojenize edilmiş PLGA NP'lerin morfolojileri SEM ile incelenmiştir. 10 µL hacimde partikül süspansiyonu temiz bir alüminyum folyoya damlatılmış ve kurutulmuştur. Ardından, NP'ler altın film ile kaplanarak 10 kV'da GAIA3+Oxford XMax 150 EDS kullanılarak görüntülenmiştir.

3.9. 5FU-PLGA NP'lerin Enkapsülasyon Etkinliği

5-FU'nun enkapsülasyon etkinliği (%EE) dolaylı bir yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. Santrifüjlenmiş numunelerin süpernatantındaki serbest 5-FU miktarını belirlemeden önce, süpernatant 0,45 µm naylon şırınga filtresiyle filtrelenmiştir. Daha sonra süpernatantlar Tris tamponu ile seyreltilmiş ve doğrulanmış HPLC metodu ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Ölçümler $\lambda = 265$ nm dalga boyunda üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kapsülleme etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$EE (\%) = \frac{\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100$$

$$DL (\%) = \frac{\text{PLGA NP'lerdeki ilacın ağırlığı}}{\text{PLGA NP'lerin ağırlığı}} \times 100$$

3.10. Deney Tasarımı

DoE, “Tasarım Yoluyla Kalite, QbD” konsepti içinde yer alan, araştırma ve üretim alanında kullanılan önemli bir araçtır [159]. DoE, deneyleri planlamak, uygulamak, değerlendirmek ve sonuçlandırmak için kullanılan bir istatistiksel yöntemdir [160]. Bu teknikler sayesinde, bağımsız değişkenlerin (parametreler) değiştirilmesiyle bağımlı değişkenler (çıkıtı) üzerindeki etkileri, daha az sayıda laboratuvar veya bilgisayar deneyi ile çok daha fazla bilgi elde edilebilir. Böylece zaman ve maliyet minimize edilmiş olur [161]. Varyans analizi, önemli faktörlerin belirlenmesi amacıyla kullanılır. Ayrıca bağımsız değişkenlerden elde edilen matematiksel modeller sayesinde bağımlı değişkenlerin yanıtları öngörülebilir [162].

3.10.1. İki-Seviye Tam Faktöriyel Tasarım (FFD)

FFD, farklı bağımsız faktörler ve onların farklı sayıda seviyeler kullanılarak optimum süreçlerin geliştirmesi için kullanılan yöntemdir. Farklı faktörlerin ve birbirleriyle etkileşimlerinin ürün üzerinde etkisinin olup olmadığı ve etkisi varsa ürünün kalitesi üzerinde nasıl etkisi olduğu belirlenebilir.

İki-seviye tam faktöriyel tasarım, ürün kalitesini etkileyen tüm kombinasyonları ve etkileşim faktörlerini içerir. Ürün kalitesini etkileyen çeşitli faktörlerin içinden önceden gerçekleştirilen deneyler doğrultusunda önemli olanlar tespit edilir. Bu faktörlerin ve seviyelerin optimize edilmesi, en iyi kalitede ürün elde etmek için önemlidir. İki-seviye faktöriyel tasarımlar, düşük (-1) ve yüksek (+1) olmak üzere iki seviyeye sahip faktörlere dayanmaktadır. İki-seviye tam faktöriyel tasarım, 2^K formülü temelinde gerçekleştirilir. 2, seviyeyi gösterirken; K faktörlerin sayısıdır [163].

Bu tez kapsamında PLGA NP'lerin ve 5-FU yüklü PLGA NP'lerin boyut, PDI ve zeta potansiyeli değerlerini etkileyen kritik proses ve formülasyon parametreleri, Minitab ile DoE kullanılarak formülasyon tarama çalışmaları yoluyla belirlenmiştir. Ayrıca DoE, proses parametrelerinin 5FU-PLGA NP'lerin enkapsülasyon verimliliklerine etkisini araştırmak için kullanılmıştır.

Yanıt (çıkıtı) üzerinde önemli bir etkiye sahip olan süreç değişkenlerini (girdi) belirlemek için tam faktöriyel tasarım (2^2) kullanılmıştır. Her bir girdiye bir minimum seviye (-1) ve

bir maksimum seviye (+1) atanmıştır. Çalışmada TFR ve FRR faktörleri kullanılmıştır. Seçilen tarama tasarımı, her biri üç tekrarlı 84 deneysel çalıştırma (run) yürütülmüştür. Deneyler rastgele düzenlenmiştir. TFR için minimum ve maksimum seviyeler sırasıyla 5 ve 15, FRR için ise 1:7 ve 1:3'tür.

3.10.2. Yanıt Yüzey Metodu (RSD)

Nihai ürün özelliklerini etkileyen kritik süreç faktörlerinin belirlenmesi faktöriyel yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu faktörler arasındaki etkileşimlerin ürün kalitesi ile ilişkileri yanıt yüzey metodu ile tespit edilmektedir. Üründe istenilen özelliklerin maksimum (örneğin yüksek ilaç yükleme) ya da minimum yanıt (örneğin düşük partikül boyutu) elde etme ihtiyacına göre optimum seviye ayarlanır. Böylece yanıt yüzey metodu minimum hatayla yüksek kaliteli ürün geliştirmede kullanılmış olunur. Deneylerin yanıtları, üç boyutlu yanıt yüzey grafiğiyle ve iki boyutlu düzlemde kontur grafiğiyle gösterilir [164, 165]. Genellikle birinci dereceden, ikinci dereceden ve kuadratik polinomal model elde edilir [166].

Çizelge 3.2. Mikroakışkan akış ayarları için seçilen girdiler ve bunların FFD için karşılık gelen seviyeleri.

DoE Girdileri	Seviyeler		
	-1	0	+1
TFR (mL/dk)	5	10	15
FRR (v/v)	1:7 (0.125)	1:5 (0.167)	1:3 (0.25)

Bu tez kapsamında ikinci dereceden bir model elde etmek için deneyler geliştirilmiştir. Yüzey yanıt tasarımı (3^2) kullanılarak, TFR ve FRR değişkenlerinin partikül boyutu ve zeta potansiyeli üzerindeki etkilerini araştırmak için denemeler yapılmıştır. İkinci dereceden bir cevap yüzey modeli geliştirmek için, değişken parametrelerini tahmin etmek üzere üç seviyede deneyler yürütülmüştür (Çizelge 3.2). Her bir kombinasyon üç

paralel tekrar ile test edilmiştir. Deneyisel sonuçlar, ANOVA analizi yoluyla modelin doğrulanması için kullanılmış ve modelin tahminsel doğruluğu için kanıt oluşturmuştur.

3.11. 5FU-PLGA NP'lerin Stabilite Çalışmaları

5-FU yüklü PLGA NP'ler, 5-15 mL/dk'da ve 1:3-1:7 FRR'de üretilmiş ve daha önceden tanımlanan karakterizasyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. İlk değerlendirmelerin ardından, bu süspansiyonların kararlılıkları ışıktan korunarak 4 °C, 25 °C ve 37 °C 'de 21 günlük süre boyunca gözlemlenmiştir. Ayrıca 3 aylık bir süre boyunca NP'lerin 4°C'de stabilitesini değerlendirmek için bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. 21 günlük ve 3 aylık sürenin ardından NP'lerin kararlılıkları DLS ile NP'lerin boyutu, PDI ve zeta potansiyelleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.12. 5FU Yükleme Kapasitesinin 5FU-PLGA NP'lerin Fizikokimyasal Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

%5, %10, %15 ve %20 (5FU:PLGA, w:w) olmak üzere farklı ilaç yükleme dozu kullanılarak elde edilen NP'lerin fizikokimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, DMSO'da çözünmüş 5-FU (%5, w:v), %5, %10, %15 ve %20 ilaç yükleme dozu hazırlamak için sırasıyla 10 µL, 20 µL, 30 µL ve 40 µL olmak üzere 3 mL hacimdeki 10 mM Tris tamponuna (pH 7,4) damla damla eklenmiştir. Sabit FRR (1:3) ve TFR (15 mL/dk) ile mikroakışkan cihazda ilaç yüklü PLGA NP'ler üretilmiştir. NP'ler daha önce belirtildiği gibi santrifüjleme yoluyla saflaştırılmıştır. Zetasizer cihazı ile NP'lerin hem santrifüj öncesi hem de santrifüj sonrası fizikokimyasal özellikleri analiz edilmiştir.

3.13. *In vitro* Salım Çalışmaları

Seçilen bir NP grubu üzerinde *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 5FU-PLGA NP'lerden ilaç salım profilinin izlenmesi amacıyla dializ membran yöntemi kullanılmıştır. Sink koşullar gözetilerek salım çalışmaları hazırlanmıştır. Donör faz olarak, taze hazırlanan 5FU-PLGA NP'ler, 14 kDa (Sigma-Aldrich) moleküler ağırlık sınırına sahip önceden ıslatılmış bir dializ torbasına konulmuştur. Reseptör faz olarak, PBS (pH=7.4, 10 mL) kullanılmıştır. Ardından donör faz, reseptör faz içine yerleştirilmiş;

fizyolojik koşulları taklit etmek için 37 °C'de su banyosunda ve 130 rpm karışma hızında inkübe edilmiştir. 5 gün boyunca, örnekler (1 mL) belirli zaman aralıklarında (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48, 72, 96, 120 saat) reseptör fazdan toplamış ve 5-FU salım konsantrasyonu HPLC ile 265 nm'de üç kez ölçülmüştür. Her örnek alındıktan sonra, reseptör faza eşit hacimde taze PBS eklenmiştir.

3.14. Kinetik Çalışmalar

In vitro salım profillerinin kinetiği, sıfıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell (küp kök) ve Higuchi (zamanın karekökü) modelleri kullanılarak araştırılmıştır. Veriler, aşağıda listelenen denklemler kullanarak belirtilen profillere uygun hale getirilmiştir:

Sıfıncı derece kinetik model:

$$m = 100 - k_0 t \quad \text{Eq. (1)}$$

Birinci derece kinetik model:

$$\ln(100 - W) = \ln 100 - k_f t \quad \text{Eq. (2)}$$

Hixson ve Crowell küp-kök modeli:

$$(100 - W)^{1/3} = 100^{1/3} - k_{HC} t \quad \text{Eq. (3)}$$

Higuchi zamanın karekökü modeli:

$$W = k_H t^{1/2} \quad \text{Eq. (4)}$$

Burada W, t zamanında yüzde ilaç salım oranıdır ve k_0 , k_f , k_{HC} ve k_H salım hızı sabitleridir.

3.15. 5FU-PLGA NP'lerinin Toksisitesi

5-FU yüklü PLGA NP'lerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi için insan skuamöz karsinom hücreleri (A-431) kullanılmıştır. A-431 hücreleri American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiş ve %10 fetal sıgır serumu (FBS, Sigma-Aldrich,

ABD), 2 mM L-glutamin (Cegrogen Biotech, Almanya) ve 100 U/mL penisilin-streptomisin (Cegrogen Biotech, Almanya) ile zenginleştirilmiş Dulbecco'nun MEM (Cegrogen Biotech, Almanya) ortamında 37°C, %5 CO₂ koşullarında kültüre edilmiştir. Ortam her iki günde bir yenilenmiş ve hücreler kültür kabı yüzeyinin %90'ını kapladığında hücrelerin pasajlanması için tripsin-EDTA (PBS'de %0.25, Cegrogen Biotech, Almanya) çözeltisi kullanılmıştır.

Çoğaltılan A-431 hücreleri, 5FU ve 5FU-PLGA NP'lerin toksisitesini değerlendirmek için 96 kuyucuklu hücre kültürü kabında 24 saat kültüre edilmiştir (1x10⁴ hücre/kuyucuk). Daha sonra 5FU'nun hücre canlılığı üzerindeki doz bağımlı yanıtları belirlemek amacıyla, %1 ilaç yükleme dozu için 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 µM ve %20 ilaç yükleme dozu için 5.53, 11.06, 22.125, 44.25, 88.5, 177, 354, 708, 1416, 2832 µM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda 5-FU ve 5FU-PLGA NP'ler eklenmiştir. Test edilen konsantrasyonlar, PLGA NP'lerdeki 5FU miktarı temel alınarak hazırlanmıştır. Bunun için, aynı hacimdeki PLGA ve 5FU-PLGA NP'ler 14000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant daha sonra uzaklaştırılmış ve pelletlenmiş partiküller 30 dakika boyunca UV ışığı altında sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından, NP'ler hücre kültürü büyüme ortamında homojenize edilmiş ve önceden belirlenen konsantrasyonda (n=8) A-431 hücrelerine 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren DMEM ve NP içermeyen DMEM, sırasıyla pozitif ve negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 72 saat sonra, ortam uzaklaştırılmış ve hücreler iki kez önceden ısıtılmış PBS çözeltisi (Cegrogen Biotech, Almanya) ile yıkanmış ve ardından 4 saat boyunca 100 µL 5 mg/mL MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich, ABD) ile inkübe edilmiştir. Daha sonra, MTT çözeltisi yerine formazan kristallerini çözmek için 100 µL DMSO eklenmiş ve formazanın absorbansı 570 nm'de bir ELISA mikropłaka okuyucu (VERSAmax, Molecular Devices, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Hücre canlılığı, negatif kontrol grubundan elde edilen veriler kullanılarak belirlenmiştir.

3.17. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism yazılımı (Sürüm 8, San Diego, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bulgular en az üç bağımsız gruba dayanarak ortalama ± standart

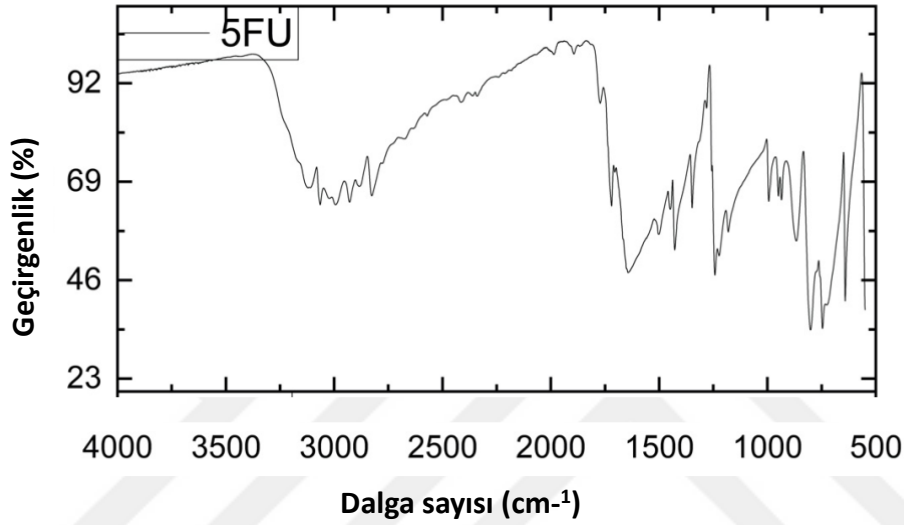
sapma olarak ifade edilmiştir. Verileri değerlendirmek için eşleştirilmemiş t-testi kullanılmış olup, anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

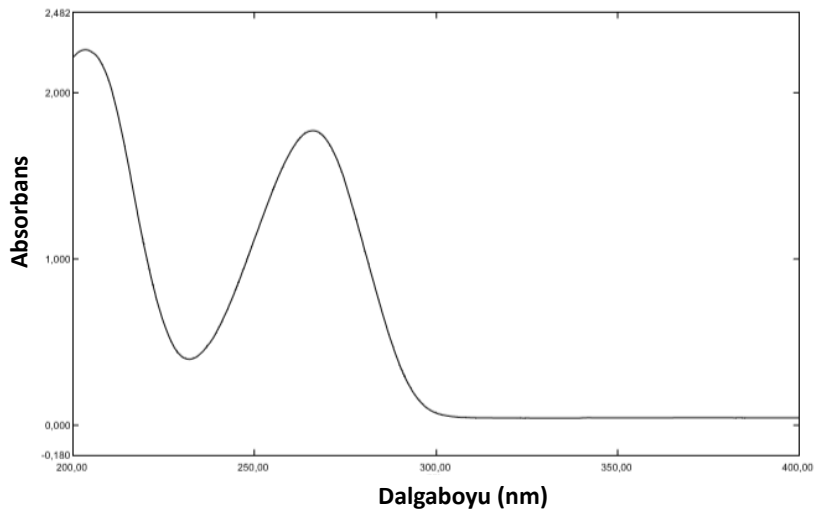
4.1. 5FU'nun FT-IR ve UV Spektrumları

5FU'nun FT-IR spektrumu Şekil 4.1'de sunulmuştur. 5FU'nun kimyasal yapısında bulunan C=O grubuna ait 1643 cm^{-1} , C-H grubuna ait 3150 cm^{-1} ve C-F grubuna ait 1241 cm^{-1} 'de karakteristik bantlar tespit edilmiştir. FT-IR spektrumunda görülen 5FU'ya ait karakteristik pikler maddenin saf olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. 5FU'nun FT-IR spektrumu.

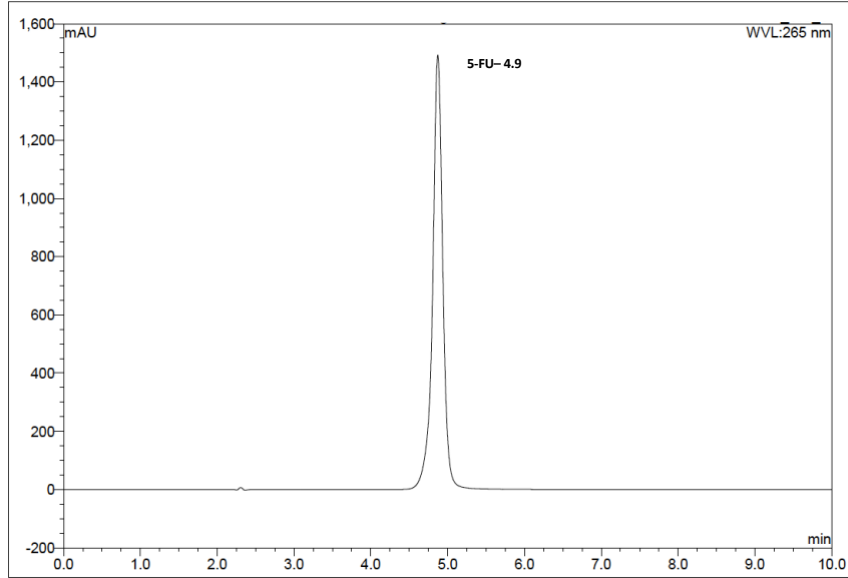
UV spektrofotometresi ile yapılan analizlerde 5FU'ya ait λ_{max} 266 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



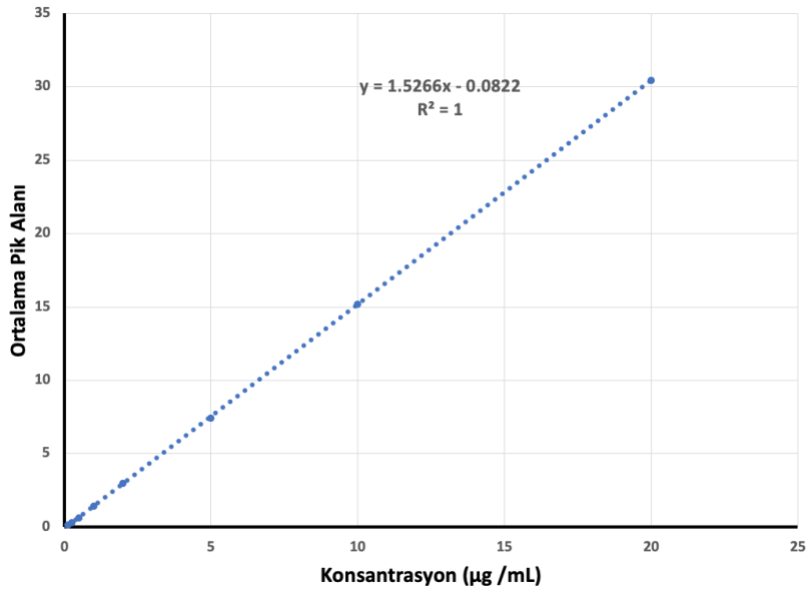
Şekil 4.2. 5FU'nun UV spektrumu boyu (λ_{max} =266 nm).

4.2. 5FU'nun HPLC ile Tayini

Şekil 4.3'de gösterildiği gibi belirlenen kromatografik koşullar altında, yaklaşık 5. dakikada görülen 5-FU piki ile çakışan herhangi bir pik tespit edilmemiştir. 5-FU'nun kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu eğrinin denklemi $y=1.5266x-0.0822$ ve korelasyon katsayısı $r^2=1$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. 5-FU'ya ait HPLC piki.



Şekil 4.4. HPLC yöntemiyle elde edilen 5-FU'nun konsantrasyon standart doğrusu (n=3).

4.3. Ön Formülasyon Çalışmaları

Formülasyon ön deneme çalışmaları kapsamında farklı polimer konsantrasyonları, stabilizatörler ve solvent türleri denenmiştir (Çizelge 4.1). Düşük miktarda kimyasal kullanımı ve ölü hacmin minimize edilmesi amacıyla en düşük akış hızı olan 5 mL/dk'da deneyler gerçekleştirilmiştir. Organik ve sulu fazların akış hızı oranları 1:3 (O:S) sabit tutulmuştur. Öncelikle ACN ve AC olmak üzere iki farklı çözücü tipinin NP üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu sonuçlara göre %2 PLGA çözeltisi kullanılarak elde edilen NP'ler arasında, AC ile elde edilen NP'ler, ACN ile elde edilene göre daha küçük boyutta ve daha monodispers yapıda oldukları bulunmuştur; bununla birlikte zeta potansiyelinin nispeten daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, literatürde mikroakışkan sistemle yapılmış olan başka bir çalışmayla benzerlik göstermektedir [167]. Bilindiği gibi solvent tipinin değişmesi süper doygunluğu etkilemekte; elde edilen NP'lerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmektedir. Yüksek oranda suyla karışabilen çözücülerin, daha küçük NP oluşumuna yol açtığı bilinmektedir [138, 168]. AC ile daha iyi fizikokimyasal özelliklere sahip NP'ler elde edilmesi nedeniyle, çalışmalara bu solvent ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyon çözücü ve stabilizatör kullanılarak elde edilen NP'lerin özellikleri (TFR=5 mL/dk ve FRR=1:3).

Organik Faz (o)	Sulu Faz (s)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
%2 PLGA/ACN	Tris Tamponu	229.5±4.3	0.329±0.014	-64.2±2.93
%0.5 PLGA/ AC	Tris Tamponu	135.7±1.6	0.154±0.015	-67.9±0.9
%1 PLGA/ AC	Tris Tamponu	136.9±1.8	0.137±0.009	-69.1±2.8
%2 PLGA/ AC	Tris Tamponu	192.9±0.5	0.217±0.217	-69.1±2.0
%1 PLGA/ AC	Tris Tamponu + %1 PVA	333.3±4.3	0.299±0.020	-0.68±0.5

Bir sonraki adımda farklı PLGA konsantrasyonları (%0.5, %1, %2 (w/v)) kullanılmıştır. %0.5 ve %1 PLGA çözeltisiyle hazırlanan NP'lerin benzer özellikte olduğu görülmüştür. Diğer taraftan %2 PLGA çözeltisi kullanılarak elde edilen NP'lerin diğer konsantrasyonlara göre hem boyut (~193 nm) hem de PDI (0.217) açısından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, tüm konsantrasyonlarda zeta potansiyeli yaklaşık -60 ile -70 mV arasında izlenmiştir. Literatürde konsantrasyonun artırılmasıyla, NP boyutunda ve PDI değerinde benzer şekilde artış tespit edilmiştir [167, 169]. Behnke ve diğerlerinin yaptığı araştırmada, bu çalışmada olduğu gibi zeta potansiyeli değerleri birbirine yakın bulunmuştur [167]. Bilindiği gibi optimum seviyenin üstündeki polimer konsantrasyonu arttığında, genellikle akışkanların viskozitesi arttığı için iki faz arasındaki difüzyon hızı azalır ve ayrıca çekirdek sayısında artış görülür. Bu nedenle, çarpışmalar artar ve NP boyutu büyür. Optimum konsantrasyonun altında ise çekirdeklenme hızı yavaşladığı için, nanopresipitasyonun büyüme sürecini geliştirir. Dolayısıyla, elde edilen NP'lerin boyutunda artış meydana gelir [18]. Bu çalışmada, %1 PLGA içeren organik fazın, %2 PLGA ile hazırlanan NP'lere göre daha küçük boyut ve PDI değerine sahip olması ve %0.5 PLGA ile hazırlanan NP'lere göre daha yüksek üretim miktarda üretim yapılması nedeniyle çalışmalara %1 PLGA konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

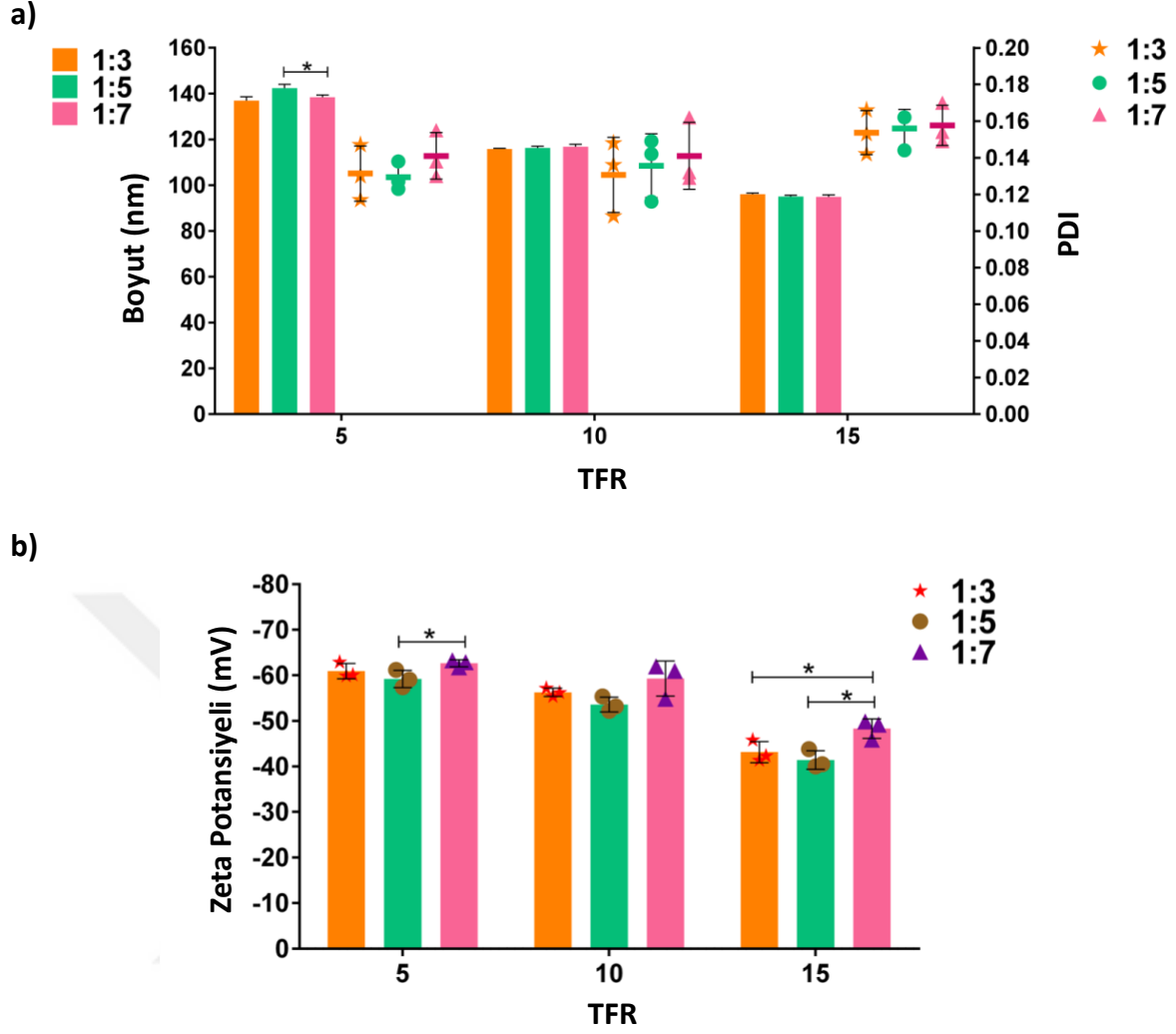
Son olarak, stabilizatörün NP oluşumu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Tris tamponu mikromikserlerde sıklıkla tercih edilen bir stabilizatördür. Literatürdeki bazı makalelerde sulu faz olarak Tris tamponu ile iyonik olmayan PVA'nın farklı konsantrasyonları birlikte kullanılmıştır. Bu çalışmada, %1 PVA oranı denenmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, sadece Tris tamponu kullanımına göre PVA eklemek hem boyut ve PDI değerini oldukça arttırmış, zeta potansiyelini ise dramatik bir şekilde düşürmüştür. Roces ve arkadaşları, partikül oluşumunu etkileyip etkilemediği ve/veya stabiliteyi artırıp artırmadığını değerlendirmek için, SHM tasarımı mikrokışkan sistemin sulu fazına (Tris tamponu pH 7.4, 10 mM) farklı oranlarda PVA eklemiştir [170]. Bu çalışmada yer alan bulgulara olduğu gibi, PVA'nın dahil edilmesinin daha büyük partikül boyutlarına neden olduğu gözlenmiştir. Chiesa ve diğerleri ise, PVA'nın mikrokışkan sistemlere dahil edilmesiyle artan viskozitenin karışma hızını düşürerek daha büyük partikül oluşumuna neden olduğu hipotezinde bulunmuştur. Ancak, PDI (<0.2) değerleri önemli ölçüde etkilenmemiştir. Yine bu çalışmadaki bulgularla benzer şekilde, sisteme

PVA eklenmesiyle PLGA NP'lerin zeta potansiyelleri anyonik değerden nötre doğru değişmiştir. Bununla birlikte PVA içeren (%0.5 PVA, %1 PVA ve %2 PVA) ve içermeyen tüm formülasyonlarda çalışma süresi boyunca NP'lerin stabil olduğu gözlenmiştir [171, 172]. Su/yağ/su (w/o/w) emülsiyonunun aksine, mikroakışkanlar sistemlerde nanopresipitasyon ile PLGA NP zaten kendiliğinden hızlıca oluştuğu için sürfaktan eklemeye gerek olmadığı bildirilmiştir [173], [174]. Elde edilen bulgular doğrultusunda, bu çalışmada NP üretimi için mikroakışkan sistemin sulu faza PVA eklenmemiştir. Gerçekleştirilen bu denemeler doğrultusunda, organik faz olarak %1 PLGA/AC ve sulu faz olarak Tris tamponu (10 mM, pH 7.4) seçilmiştir.

4.4. Toroidal Mikromikser Proses Parametrelerinin PLGA NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisi

Farklı TFR (5-15 mL/dk) ve FRR'nun (1:1, 1:3, 1:5, 1:7) optimize edilmiş NP özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Ancak tüm TFR'de FRR 1:1 değerinde PLGA NP'ler, santrifüj sonrasında koagüle olmuşlardır. Bu nedenle 1:1 FRR oranıyla çalışmalara devam edilmemiştir.

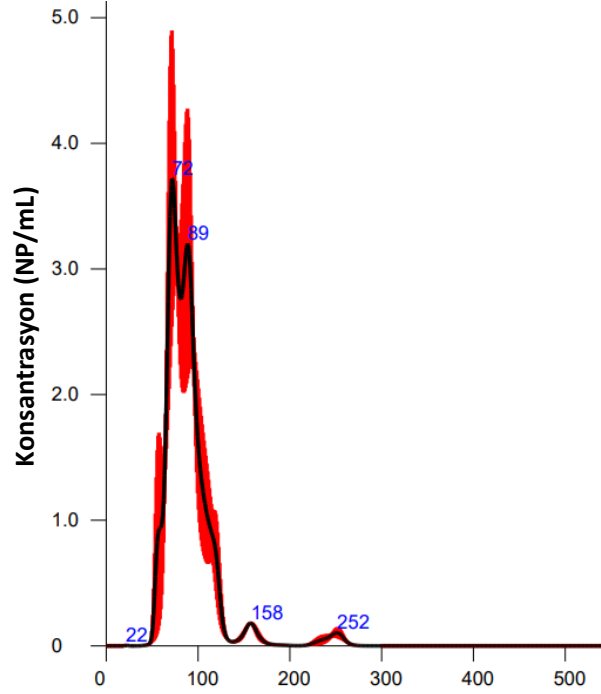
Farklı akış parametrelerinin (FRR ve TFR), NP fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi DLS ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm PLGA NP'lerin boyutu 150 nm'nin altındadır (Şekil 4.5a). TFR, 5 mL/dk'dan 15 mL/dk'a artırıldığında NP boyutu yaklaşık 140 nm'den 95 nm'ye düşmüştür. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak, TFR'in artışı daha küçük NP üretimine neden olmuştur. TFR'deki bu artış, karışma süresini kısaltmakta ve partikül agregasyonunu engellemektedir [175, 176]. Genel olarak FRR'yi (1:3-1:7) düşürmenin NP boyutu üzerinde istatistiksel olarak etkisi gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 5 mL/dk'da 1:5 ile 1:7 gruplarında sentezlenen NP'ler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Tüm PLGA NP'ler 0.129 ila 0.158 arasında değişen PDI değerleriyle homojen boyut dağılımlarına sahiptir ($p > 0.05$, Şekil 4.5a). TFR'nin artmasıyla, NP'lerin zeta potansiyel değerlerinin giderek azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5b). TFR, 5 mL/dk'dan 15 mL/dk'ya çıktıkça, zeta potansiyel değerleri yaklaşık olarak -60 mV'den -45 mV'ye düşmüştür. 5 mL/dk'da FRR 1:5 ile 1:7 ve 15 mL/dk'da FRR 1:3-1:5 ile 1:7 grupları arasında zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. TFR'nin PLGA NP'lerin özellikleri üzerine etkisi: partikül boyutu, PDI (a) ve zeta potansiyeli (b). Ölçümler DLS ile yapılmıştır. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.

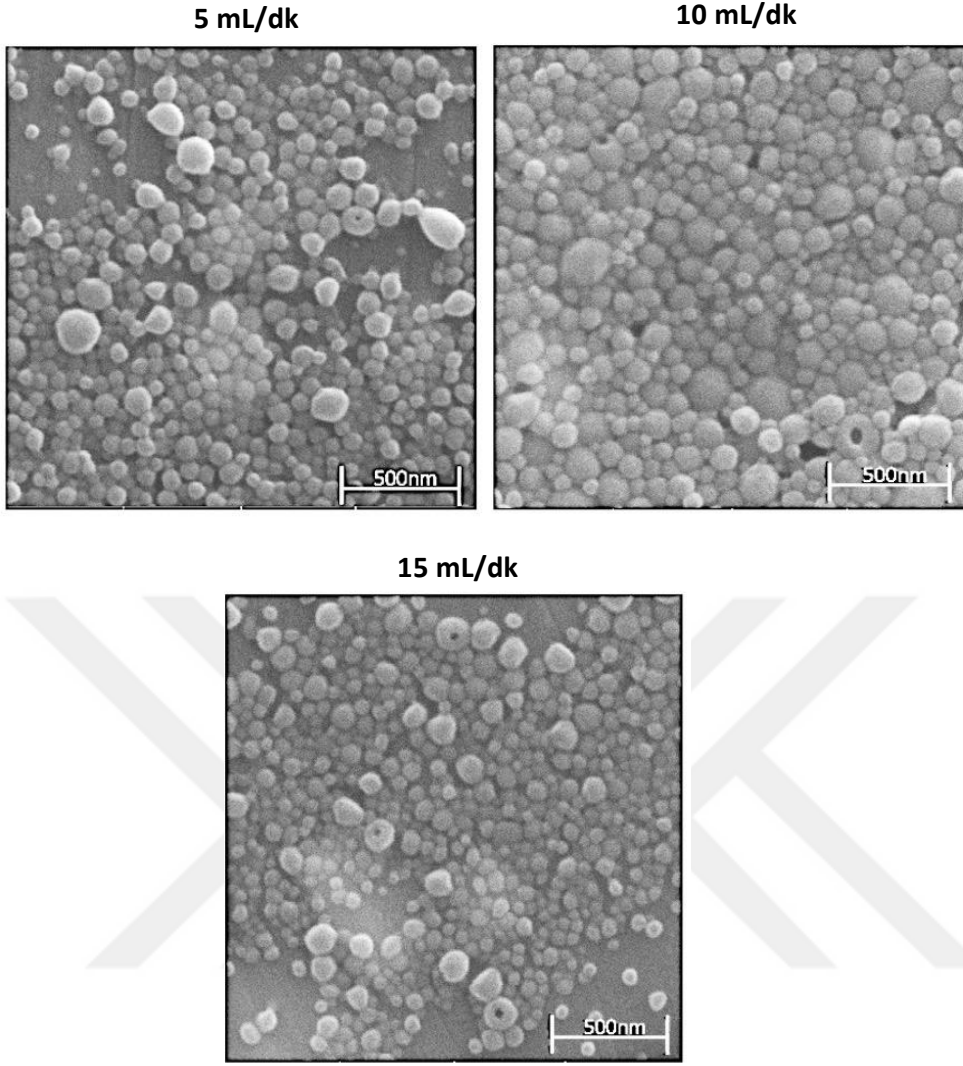
Çizelge 4.2, farklı proses parametreleri altında sentezlenen PLGA NP'lerin boyutunu, konsantrasyonunu ve verimini listelemektedir. NTA ile ölçülen PLGA NP'lerin boyutu, DLS sonuçları ile uyumludur. NP'lerin 22 ila 252 nm arasında değişen boyutlarda ve ortalama 89.9 ± 1.4 nm olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.6, 15 mL/dk hızda ve FRR 1:3'te sentezlenen partiküllerin NTA ile ölçülen boyut ve konsantrasyon dağılım grafiğini göstermektedir. Ayrıca mL başına partikül sayısı, $16.6 \times 10^{11} \pm 3.65 \times 10^{10}$ ila $5.89 \times 10^{11} \pm 1.83 \times 10^{10}$ arasında bulunmuştur. En düşük PLGA NP konsantrasyonu, 5 mL/dk, 1:7'de tespit edilmiştir. Ayrıca, en yüksek verim 5 mL/dk TFR ve 1:5 FRR'de

üretileen NP'lerde %98 olarak elde edilmiştir. En düşük verim ise 15 mL/dk TFR ve 1:7 FRR'de üretileen NP'lerde %76 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2).

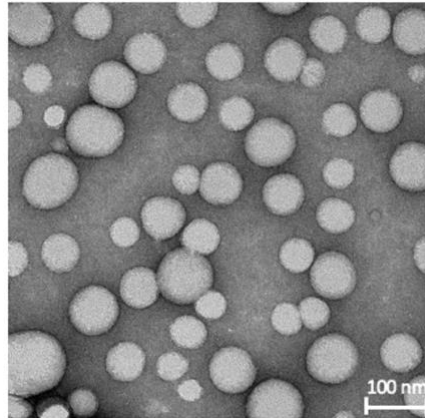


Şekil 4.6. PLGA NP'lerin NTA dağılım grafiğı (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).

Şekil 4.7 tüm NP'lerin gözlemlenebilir bir agregasyon olmadan, küresel simetri, tekdüze boyut dağılımı ve pürüzsüz morfoloji sergilediğini göstermektedir. 5 mL/dk'da FRR 1:3'de elde edilen PLGA NP'lerin TEM görüntüsü (Şekil 4.8), SEM görüntüsünü destekler niteliktedir.



Şekil 4.7. Farklı TFR’de (5 mL/dk, 10 mL/dk ve 15 mL/dk) üretilen PLGA NP’lerin SEM görüntüleri (FRR = 1:3).



Şekil 4.8. 5FU-PLGA NP’lerin TEM görüntüsü (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).

Çizelge 4.2. TFR ve FRR'nin partikül boyutu, konsantrasyon ve PLGA NP'lerin verimi üzerindeki etkisi.

FRR (O:S)	*MD (nm)	*PLGA NP /mL	Verim (%)
5 mL/dk			
1:3	131.0±0.8	16.6×10 ¹¹ ± 3.65×10 ¹⁰	86±14
1:5	128.3±2.7	10.7×10 ¹¹ ± 1.18×10 ¹¹	98±2
1:7	136.6±5.5	5.89×10 ¹¹ ± 1.83×10 ¹⁰	76±12
10 mL/dk			
1:3	98.6±1.5	15.7×10 ¹¹ ± 1.48×10 ¹⁰	86±13
1:5	98.8±4.9	14.7×10 ¹¹ ± 8.28×10 ¹⁰	97±2
1:7	95.9±2.1	11.5×10 ¹¹ ± 1.23×10 ¹¹	88±8
15 mL/dk			
1:3	89.9±1.4	14.5×10 ¹¹ ± 9.92×10 ¹⁰	94±2
1:5	91.6±0.9	13.4×10 ¹¹ ± 3.61×10 ¹⁰	87±9
1:7	93.2±2.1	10.2×10 ¹¹ ± 3.95×10 ¹⁰	76±20

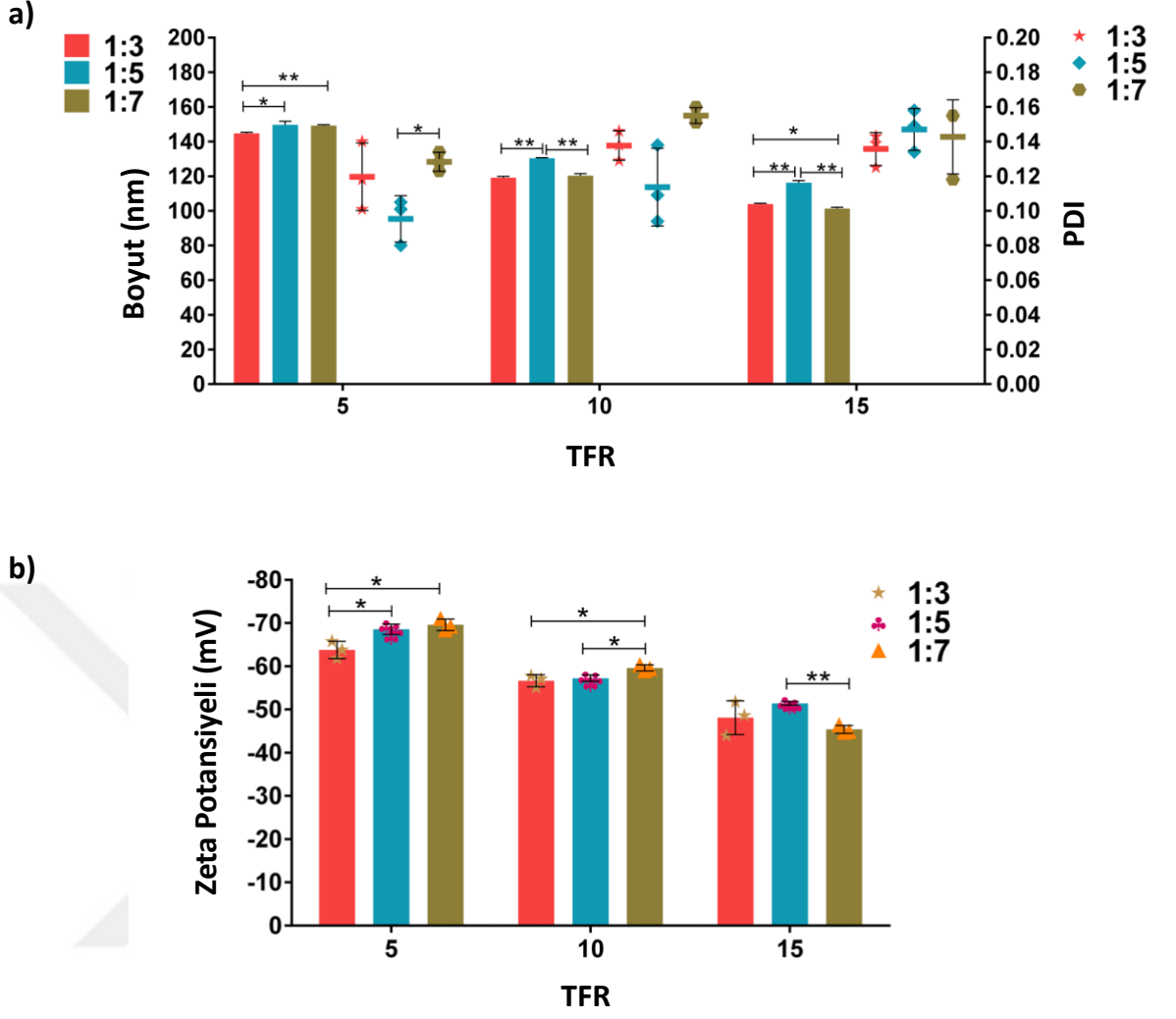
* NTA ile analiz edilmiştir.

4.5. Toroidal Mikromikser Proses Parametrelerinin 5FU-PLGA NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisi

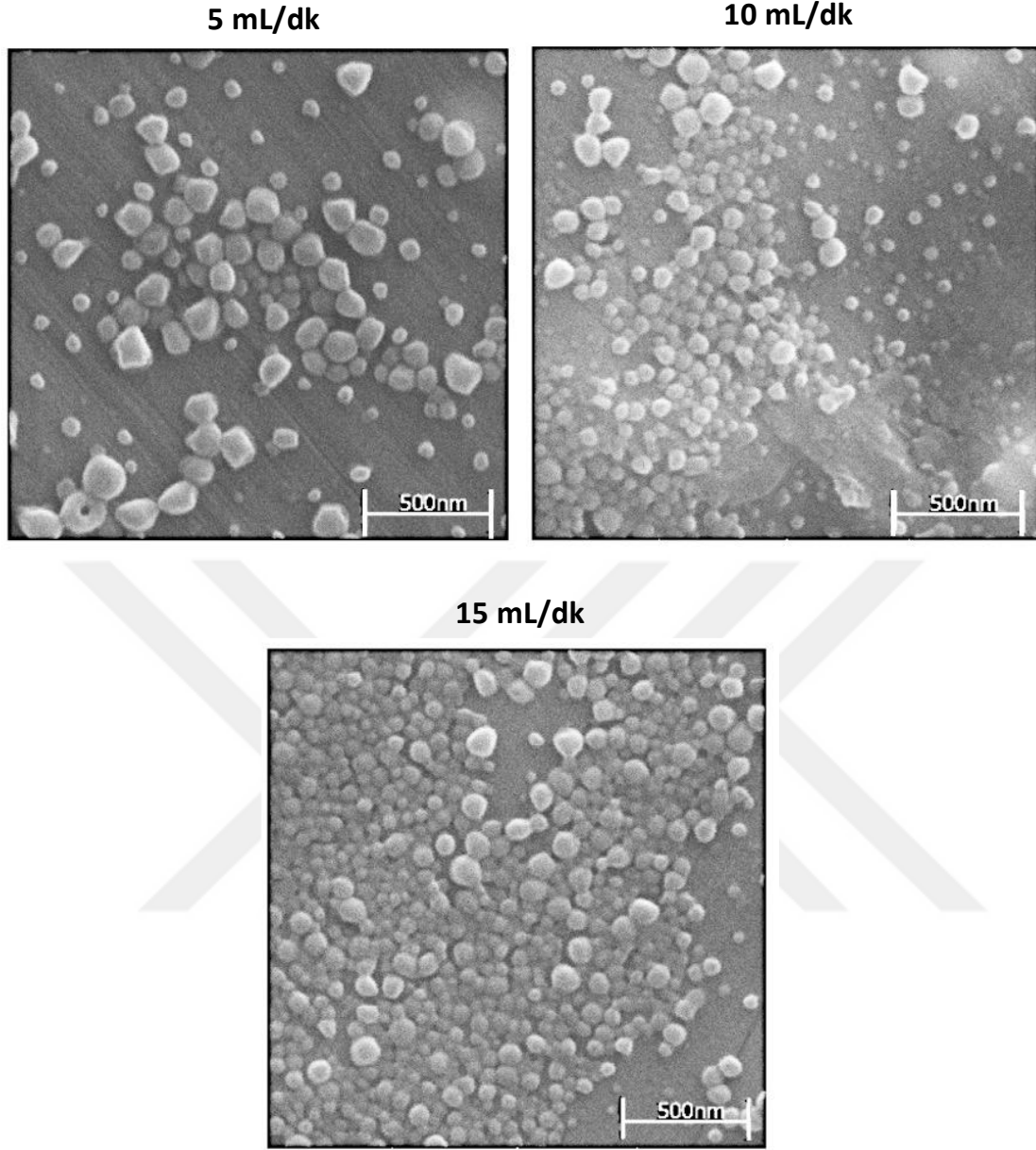
Farklı FRR ve TFR değerlerinin 5-FU yüklü PLGA NP'lerinin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. 5FU-PLGA NP'lerin başarıyla üretildiği ve ilacın sulu faza eklenmesinin NP'lerin üretim mekanizmasını etkilemediği gözlenmiştir. Şekil 4.9a'da gösterildiği gibi, 5FU-PLGA NP'lerin boyutları, ilaç içermeyenlere kıyasla FRR'nin bir fonksiyonu olarak değişiklik göstermiştir. Literatürde belirtildiği gibi FRR, çözücü ve çözücü olmayan moleküllerin karışma süresini etkileyen önemli bir faktördür

[43, 177]. Karnik ve Gu, FRR ile karışma süresi arasında bir korelasyon kurmuşlardır [41]. 5FU-PLGA NP'lerin boyutları, 5 mL/dk için FRR değiştikçe 145 nm ile 150 nm arasındayken; TFR 10 mL/dk'ya yükseltildiğinde NP'lerin ortalama boyutu yaklaşık olarak 120-130 nm aralığında ölçülmüştür. TFR'nin 15 mL/dk'ya çıkarılmasıyla ve değişen FRR'de, NP'lerin boyutunda bir azalma (100-116 nm) gözlenmiştir. 5 mL/dk'da FRR 1:5 ve 1:7'de elde edilen NP'ler ile 10 ve 15 mL/dk'da FRR 1:5 ve 1:7'de üretilen NP'ler arasında boyut açısından önemli farklılıklar görülmüştür ($p < 0.05$). 5FU-PLGA NP'ler düşük boyut dağılımı göstermiş ve TFR arttıkça PDI kademeli olarak 0.095'ten 0.147'ye hafifçe artmıştır (Şekil 4.9a). 15 mL/dk'da test edilen tüm FRR'lerde üretilen partiküller yaklaşık -48 mV zeta potansiyeline sahip partiküllerle sonuçlanırken; en anyonik partiküller 5 mL/dk'da yaklaşık -67 mV zeta potansiyeline sahiptir (Şekil 4.9b). NP'lerin zeta potansiyel değerleri 5 mL/dk'da FRR 1:7 ile 1:3 ve 1:5 arasında; 10 ve 15 mL/dk'da FRR 1:5 ile 1:7 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). 5-FU yüklü PLGA NP'lerin morfolojisini incelemek için SEM kullanılmıştır. Şekil 4.10'de gösterildiği gibi, tüm NP'ler küresel simetri ve pürüzsüz morfoloji sergilemektedir. Herhangi bir agregasyon varlığı görülmemiş olup NP'ler monodispers yapıdadır.

Çizelge 4.3'te sunulan sonuçlar, test edilen proses parametrelerinin 5FU-PLGA NP'lerin hem verimi hem de fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini göstermektedir. Çeşitli TFR (5-15 mL/dk) ve FRR (1:3-1:7) ile üretilen ve NTA ile ölçülen 5FU-PLGA NP'lerin boyut değerleri 137.1 ± 6.3 ile 105.1 ± 2.1 nm arasında değişmektedir. 15 mL/dk ve 1:3'te elde edilen 5FU-PLGA NP'lerin boyut ve konsantrasyon dağılım grafiği Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Farklı TFR (5-15 mL/dk) ve FRR (1:3-1:7) ile sentezlenen NP'lerin mL başına partikül sayısı $12.0 \times 10^{11} \pm 4.17 \times 10^{10}$ ile $7.12 \times 10^{11} \pm 4.45 \times 10^{10}$ arasında değişirken; en yüksek konsantrasyon TFR 15 mL/dk ve FRR 1:3 ile üretilen NP'lerden elde edilmiştir. 5, 10, 15 mL/dk'da elde edilen 5FU-PLGA NP'ler santrifüj sonrasında, sırasıyla %74-96, %84-86, %64-84 oranlarında geri kazanılmıştır (Çizelge 4.3).



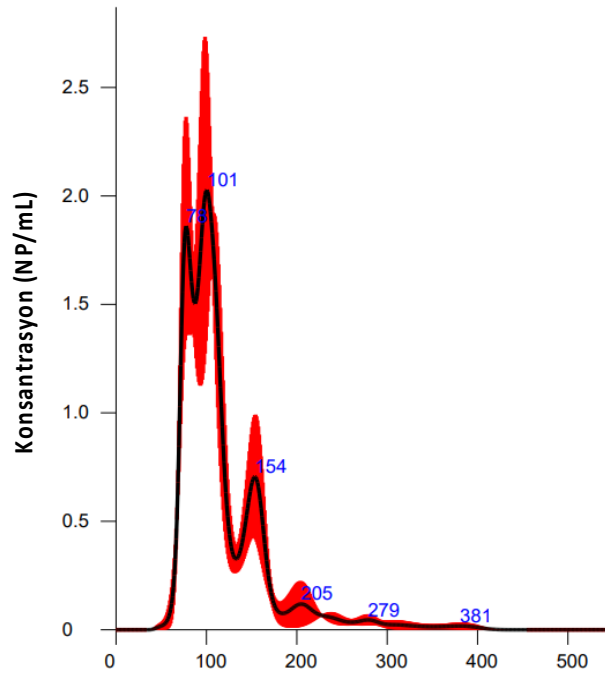
Şekil 4.9. TFR'nin 5FU-PLGA NP özellikleri üzerine etkisi: partikül boyutu, PDI (a) ve zeta potansiyeli (b). Ölçümler DLS ile yapılmıştır. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.



Şekil 4.10. Farklı TFR’de (5 mL/dk, 10 mL/dk ve 15 mL/dk) üretilen 5FU-PLGA NP’lerin SEM görüntüleri (FRR=1:3).

Proses parametrelerinin 5FU-PLGA NP’lerin %EE üzerindeki etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.3). Test edilen gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. %EE, TFR ve FRR’ye bağlı olarak değişmemiştir ($p>0.05$). 5FU-PLGA NP’lerinin enkapsülasyon verimlilikleri 5 mL/dk’da %52.3-53.6, 10 mL/dk’da %52.5-53.6 ve 15 mL/dk’da %51.2-53.1 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.3). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) simülasyonları, ilacın ve polimerin presipitasyon sürelerinin

enkapsülasyon verimliliğini etkileyen kritik faktörler olduğunu ortaya koymuştur [178]. Toroidal mikromikserin tasarımı, hızlı ve homojen karışım sağlayarak tüm çekirdeklerin eşzamanlı ve eşit şekilde oluşmasını garanti etmektedir. Bu üstün özellik, farklı proses parametreleri arasındaki presipitasyon sürelerindeki değişiklikleri azaltarak enkapsülasyon sürecini iyileştirebilir. İlacın ve polimerin çökelme sürelerinin, proses parametrelerinin değişmesine rağmen aynı kaldığını söyleyebiliriz. Bu koşullar altında, %EE veya konsantrasyonu düşürmeden partikül boyutunda değişim sağlamak mümkün olmuştur.



Şekil 4.11. 5FU-PLGA NP'lerin NTA dağılım grafiği (TFR= 15 mL/dk ve FRR=1:3).

Çizelge 4.3 TFR ve FRR'nin 5FU-PLGA NP'lerin boyutu, konsantrasyon ve verimi üzerindeki etkisi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak rapor edilmiştir.

FRR (O:S)	*MD (nm)	* 5FU-PLGA NP /mL	Verim (%)	EE (%)
5 mL/dk				
1:3	137.1 $\pm$ 6.3	9.50 $\times 10^{11} \pm 3.96 \times 10^{10}$	96 $\pm$ 3.0	53.6 $\pm$ 7.0
1:5	116.0 $\pm$ 2.3	7.65 $\times 10^{11} \pm 2.85 \times 10^{10}$	74.9 $\pm$ 9.0	52.4 $\pm$ 4.8
1:7	120.2 $\pm$ 4.3	7.12 $\times 10^{11} \pm 4.45 \times 10^{10}$	92.0 $\pm$ 4.0	52.3 $\pm$ 4.7
10 mL/dk				
1:3	125.6 $\pm$ 4.2	11.9 $\times 10^{11} \pm 1.26 \times 10^{11}$	84 $\pm$ 7.0	52.5 $\pm$ 8.21
1:5	113.4 $\pm$ 2.7	8.98 $\times 10^{11} \pm 6.11 \times 10^{10}$	86 $\pm$ 14	53.6 $\pm$ 6.77
1:7	113.5 $\pm$ 6.0	9.94 $\times 10^{11} \pm 3.95 \times 10^{10}$	84 $\pm$ 4	52.7 $\pm$ 5.36
15 mL/dk				
1:3	117.2 $\pm$ 6.3	12.0 $\times 10^{11} \pm 4.17 \times 10^{10}$	84 $\pm$ 5	52.2 $\pm$ 7.09
1:5	114.7 $\pm$ 12.3	11.5 $\times 10^{11} \pm 1.01 \times 10^{11}$	72 $\pm$ 12	51.2 $\pm$ 3.98
1:7	105.1 $\pm$ 2.1	7.27 $\times 10^{11} \pm 7.85 \times 10^9$	64 $\pm$ 8	53.1 $\pm$ 4.97

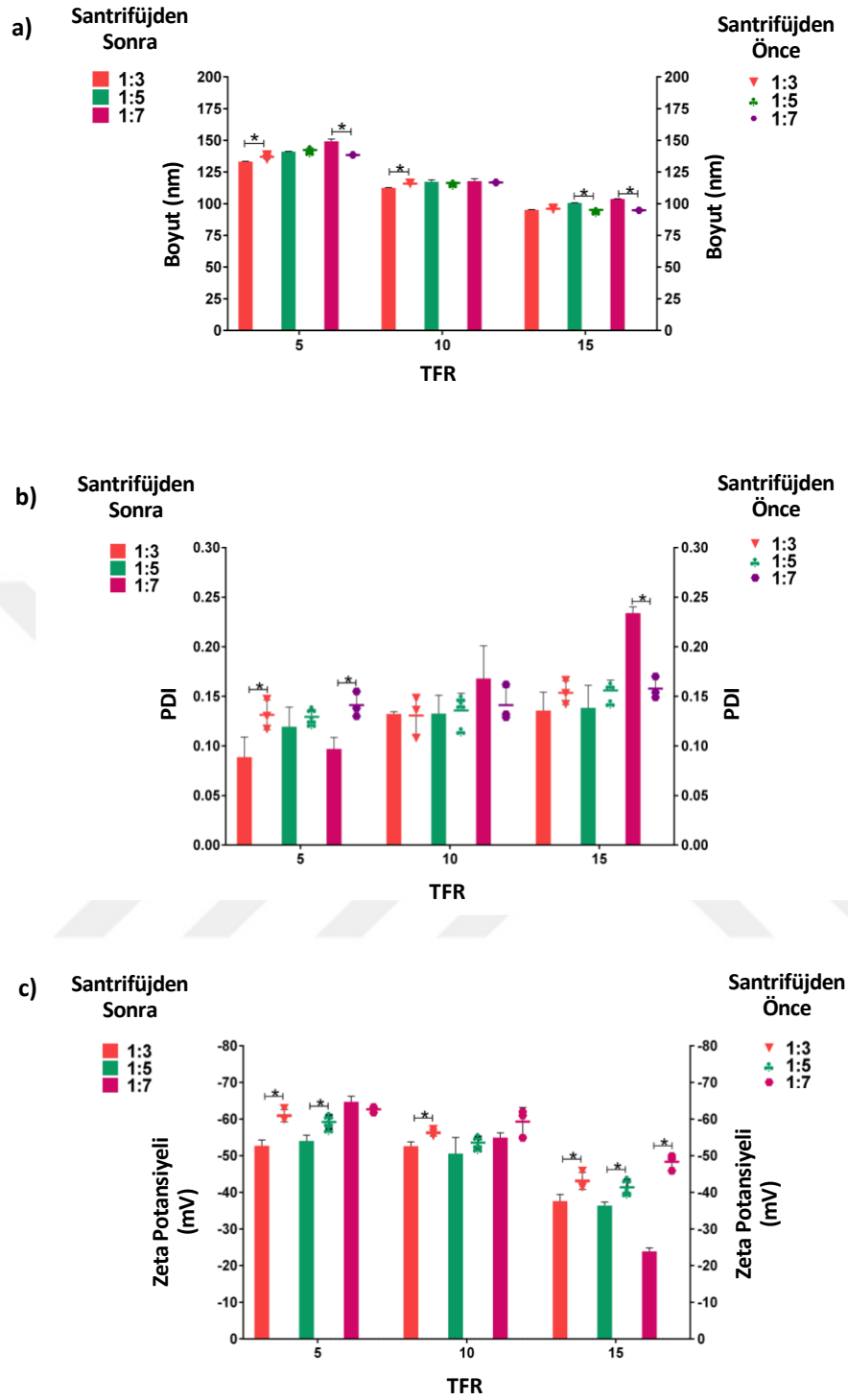
* NTA ile analiz edilmiştir.

4.6. Saflaştırma İşleminin PLGA NP'ler ve 5FU-PLGA NP Özellikleri Üzerine Etkisi

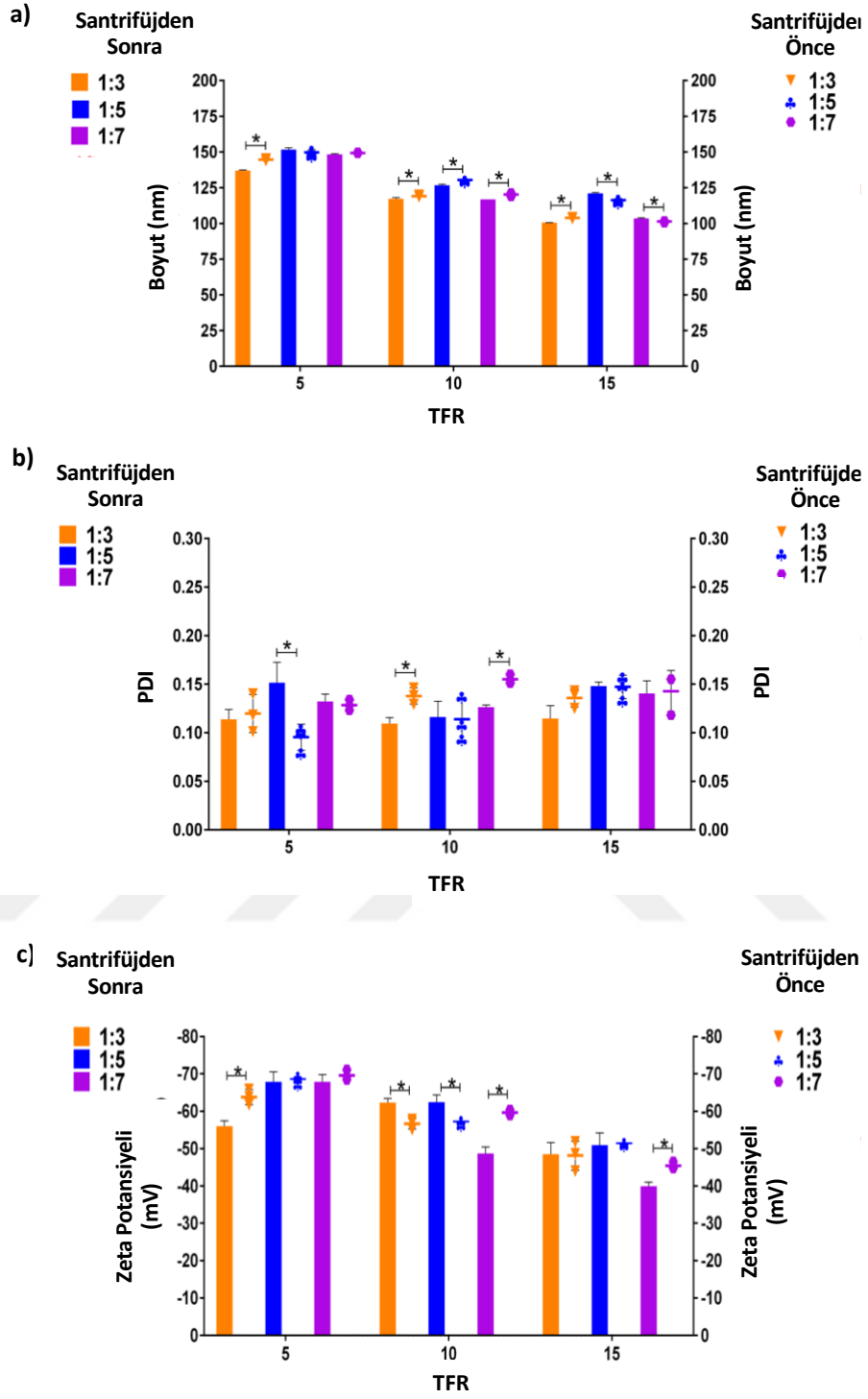
NP'lerin saflaştırılması için diyaliz, santrifüj veya filtrasyon, laboratuvar ortamlarında çözücü ve kapsüllenmemiş ilacın uzaklaştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Saflaştırma sürecindeki geri kazanım ve yıkama adımları sırasında NP'lerin kararlı olması, agrege olmaması biyolojik uygulamalardaki dalgalanmaları azaltmak ve NP'lerin kalitesini korumak açısından önemlidir [179]. Bu nedenle, NP'lerin karakterizasyonu hem santrifüjlemeden önce hem de sonra yapılmıştır. Şekil 4.12a'da gösterildiği gibi

santrifüj sonrasında genel olarak gruplar arasında boyut açısından önemli bir fark gözlenmemiştir. Literatürde yapılan araştırmalarda toroidal sistem tarafından farklı TFR ve FRR ile üretilen neredeyse tüm NP gruplarının boyutlarında, saflaştırma işleminden sonra, önemli bir artış olduğu bildirilmiştir [14, 180, 181]. Test edilen tüm TFR ve FRR'de PLGA NP'lerin PDI'si 0.089 ile 0.234 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.12b). Özellikle, TFR 15 mL/dk ile FRR 1:7'de elde edilen NP'lerin santrifüj işleminden sonra PDI'si 0.158'den 0.234'e arttığı görülmüştür ($p < 0.05$). 15 mL/dk ve 1:7 haricindeki gruplarda üretilen partiküllerin PDI değerleri, santrifüj işleminden sonra 0.2'den küçük olduğu görülmüştür. Bu durum, genel olarak NP'lerdeki homojenitenin korunduğunu ve NP'lerin stabil olduklarını göstermektedir. Saflaştırma işleminden sonra, 5 mL/dk'da FRR 1:7 ve 10 mL/dk ile FRR 1:5 ve 1:7 dışında sentezlenen tüm PLGA NP gruplarının yüzey yükü azalmış ($p < 0.05$) ancak stabilitelerini hala korudukları görülmüştür (Şekil 4.12c). Minimum zeta potansiyeli -23.9 ± 0.9 mV ile 15 mL/dk ve 1:7 FRR'de elde edilen NP'lerde gözlenmiştir. Sonuç olarak, santrifüj sonrası fizikokimyasal özellikler göz önüne alındığında; 15 mL/dk, FRR 1:7'de üretilen NP'ler hariç diğer tüm NP'ler yüksek monodispers dağılım göstermişler ve stabilitelerini korumuşlardır.

5FU-PLGA NP'lerin boyutlarının, santrifüjlenmemiş olanlarla benzer yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 4.13a). Santrifüjlemeden sonra, 5FU-PLGA NP'lerin PDI'si 5 mL/dk'da 1:5 ve 10 mL/dk'da 1:3 ve 1:7'de elde edilen NP grupları hariç ($p < 0.05$) santrifüjlemeden önceki değerle aynı kalarak, dar bir partikül boyutu dağılımı sergilemiştir (Şekil 4.13b). 5 mL/dk, 1:3 ve 10-15 mL/dk, 1:7'den elde edilen NP'lerin zeta potansiyel değerlerinde bir düşüş görülürken ($p < 0.05$), 10 mL/dk ve 1:3-1:5'den elde edilen NP'lerin yüzey yükü değerleri istatistiksel olarak artmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.13c). Diğer 5FU-PLGA NP gruplarının zeta potansiyel değerleri santrifüjlenmemiş NP'lerinkiyle benzerlik göstermiştir ($p > 0.05$). 5FU-PLGA NP'lerin santrifüj sonrası genel olarak kararlı yapıda oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. PLGA NP'lerin farklı TFR ve FRR'de santrifüj öncesi ve sonrası boyut (a), boyut dağılımı (b) ve zeta potansiyel değerleri (c). Tüm ölçümler DLS ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p < 0.05$ i temsil etmektedir.



Şekil 4.13. 5FU-PLGA NP'lerin farklı TFR ve FRR'de santrifüj öncesi ve sonrası boyut (a), boyut dağılımı (b) ve zeta potansiyel değerleri (c). Tüm ölçümler DLS ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümün ortalama $\pm$ standart sapmasını temsil etmektedir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.

Bulgulara göre, hem ilaç yüklü hem de ilaç yüklenmemiş NP'lerin, saflaştırma sürecinin geri kazanım ve yıkama aşamaları boyunca, agregre olmadan kalitelerini korunduğu tespit edilmiştir.

4.7. Toroidal Mikromikser Proses Parametrelerinin NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisinin Deney Tasarımı ile Değerlendirilmesi

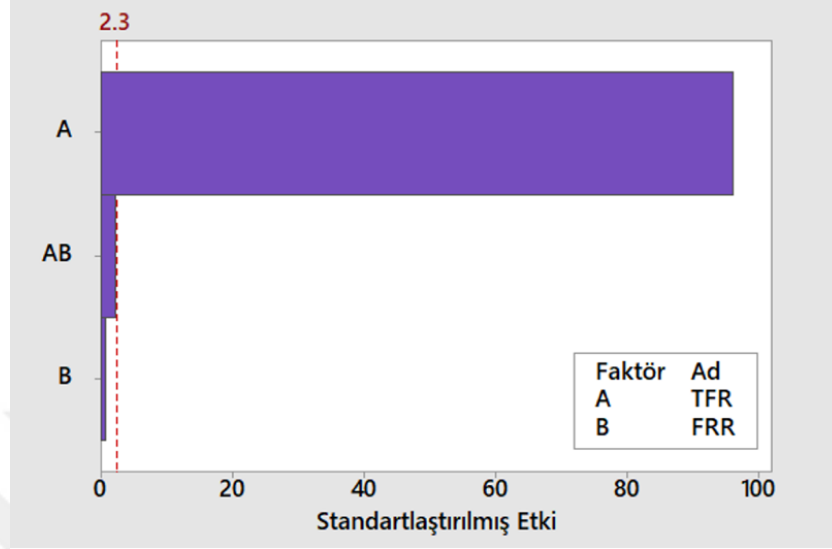
4.7.1. FFD

Toroidal mikroakışkan sistemin uygulanabilirliğini metodik olarak değerlendirmek için 2^2 konfigürasyonlu rastgele tam faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Bu tasarım, çeşitli proses parametrelerinin ve formülasyon değişkenlerinin NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. İncelenen parametreler arasında 5 ila 15 mL/dk arasında değişen TFR ve 1:3 ila 1:7 arasında değişen FRR yer almıştır. Üç tekrar halinde gerçekleştirilen ve toplam 84 deneysel çalıştırma içeren DoE çalışması ile faktörlerin birincil etkilerinin ve faktörler arası etkileşimlerin hem PLGA NP'ler, hem de 5-FU yüklü PLGA NP'ler üzerindeki etkileri analiz edilmiştir.

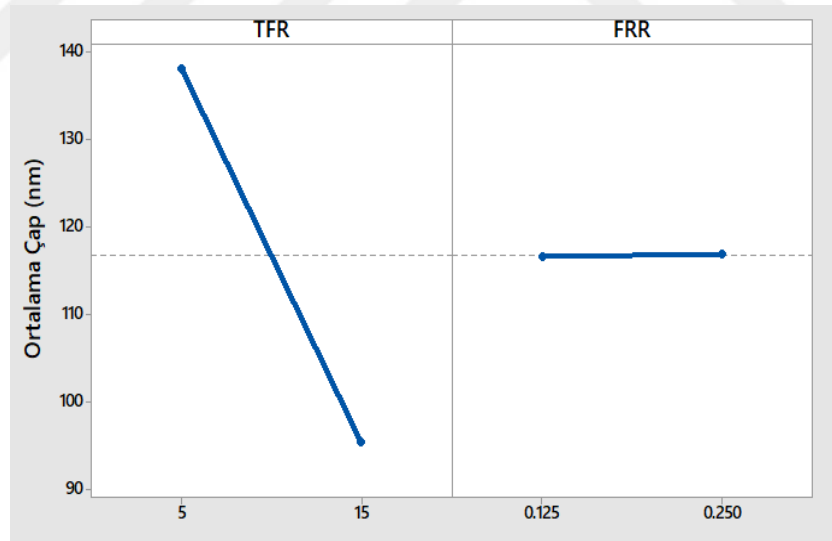
Modellerin validasyonu, yazılım tarafından oluşturulan bir diagnostik tablo kullanılarak değerlendirilmiştir. Modellerin R^2 değerleri, verilerin modele ne kadar uyumlu olduğu göstermektedir. Pareto grafiği, her bir parametrenin mutlak değerlerine dayalı olarak, en büyük etkiden en küçük etkiye doğru azalan sırada standartlaştırılmış etkileri sunmaktadır. Ana etki grafiği her bir faktörün deney sonucuna olan ortalama etkisini ve bu grafikte eğimin derecesi faktörün etkisinin büyüklüğünü gösterir. Etkileşim grafiği, iki veya daha fazla faktörün birlikte nasıl etkileştiğini gösterir.

Ortalama çap için TFR ve FRR'ye bağlı elde edilen matematiksel modelin R^2 değerleri, PLGA NP'ler ve 5-FU yüklü PLGA NP'ler için sırasıyla %99.91 ve %99.94 göstermektedir. Pareto grafiği, PLGA NP'lerin ortalama çapının TFR ile önemli bir şekilde değiştiğini; ancak ne FRR ne de TFR ve FRR arasındaki etkileşimin boyutu etkilemediğini ifade etmektedir (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Çizelge 4.4). Öte yandan, 5-FU yüklü PLGA NP'ler için TFR, FRR ve bunların etkileşimi (TFRxFRR) istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Çizelge 4.4). Şekil 4.17, düşük TFR seviyesinin (5 mL/dk) düşük FRR seviyesi (0.125) ile birleştiğinde PLGA NP'lerin en büyük boyuta ulaştığını göstermektedir. 5-FU yüklü PLGA NP'lerin en

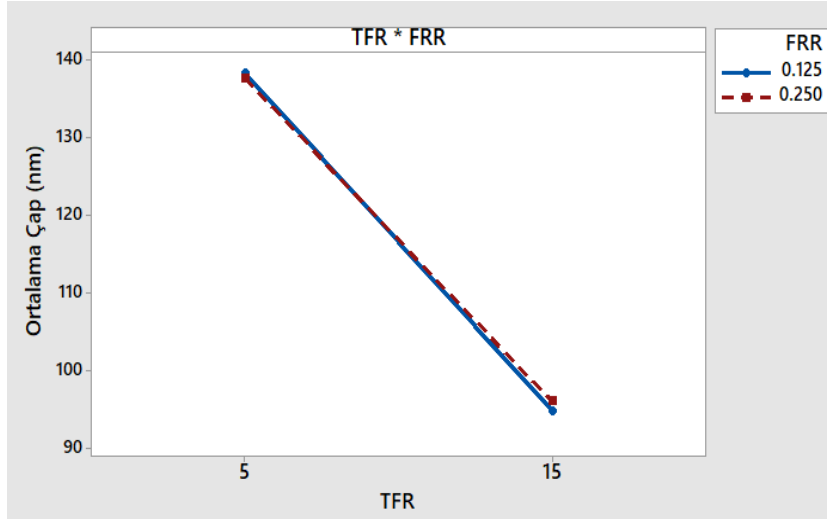
küçük boyut değeri yüksek TFR (15 mL/dk) ve düşük FRR'de (0.125) elde edilmiştir (Şekil 4.21).



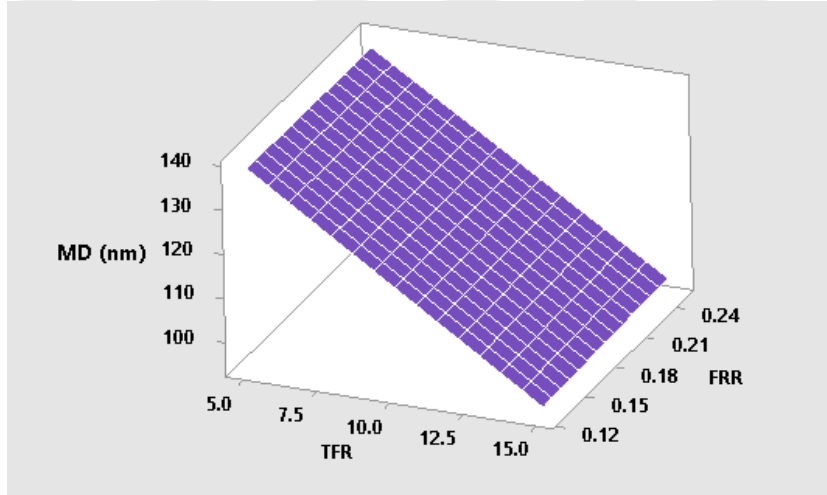
Şekil 4.14. PLGA NP'lerin ortalama çapı için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



Şekil 4.15. PLGA NP'lerin ortalama çapı için ana etki grafiği.



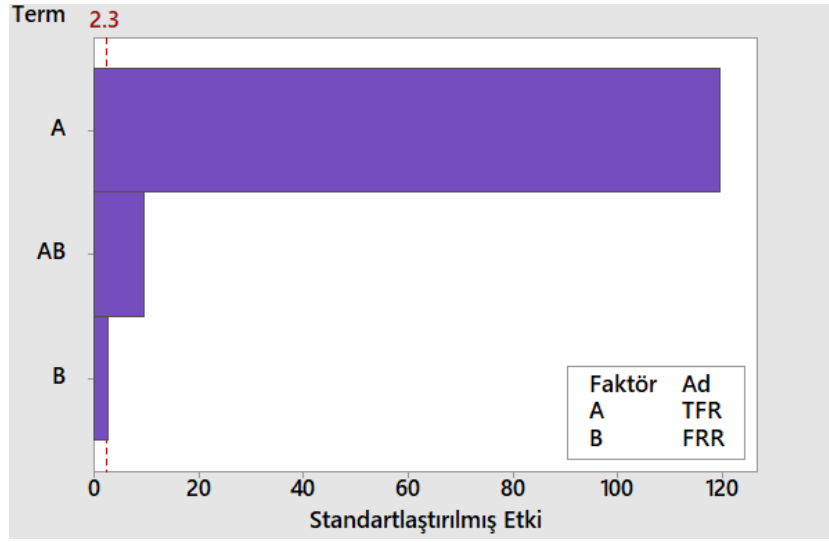
Şekil 4.16. PLGA NP'lerin ortalama çapı için etkileşim grafiği.



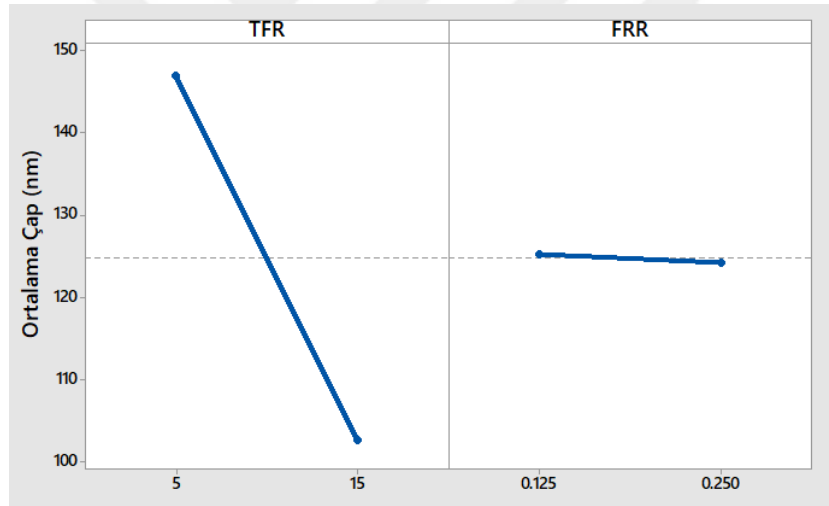
Şekil 4.17. PLGA NP'ler için ortalama çapın FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.

Çizelge 4.4. TFR, FRR ve TFRxFRR'nin PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerinin özellikleri (boyut, PDI, zeta potansiyeli, %EE) üzerindeki etkisi FFD ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

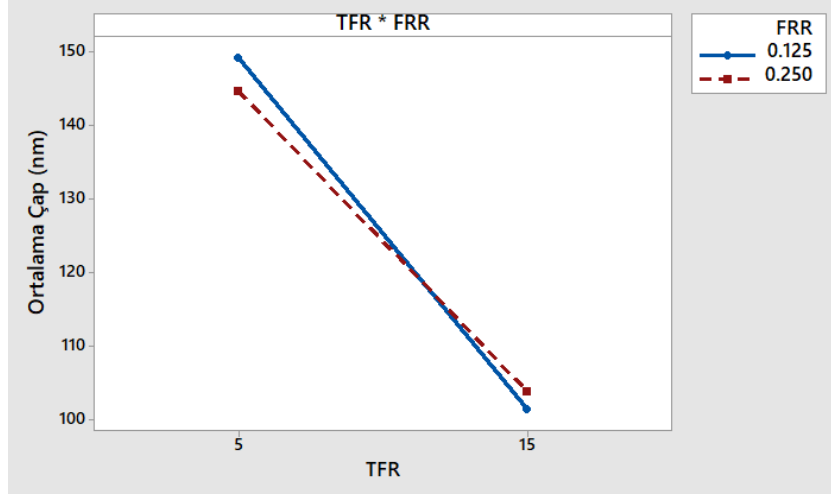
	PLGA NP	5FU-PLGA NP
Boyut		
TFR	0.000	0.000
FRR	0.571	0.027
TFRxFRR	0.069	0.000
PDI		
TFR	0.030	0.128
FRR	0.382	0.406
TFRxFRR	0.711	0.928
Zeta Potansiyeli		
TFR	0.000	0.000
FRR	0.012	0.281
TFRxFRR	0.139	0.014
%EE		
TFR	-	0.734
FRR	-	0.279
TFRxFRR	-	0.591



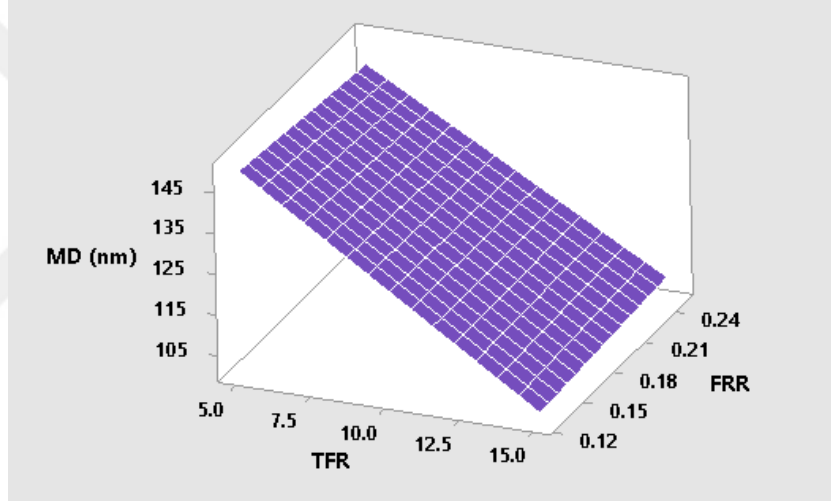
Şekil 4.18. 5FU-PLGA NP'lerin ortalama çapı için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



Şekil 4.19. 5FU-PLGA NP'lerin ortalama çapı için ana etki grafiği.



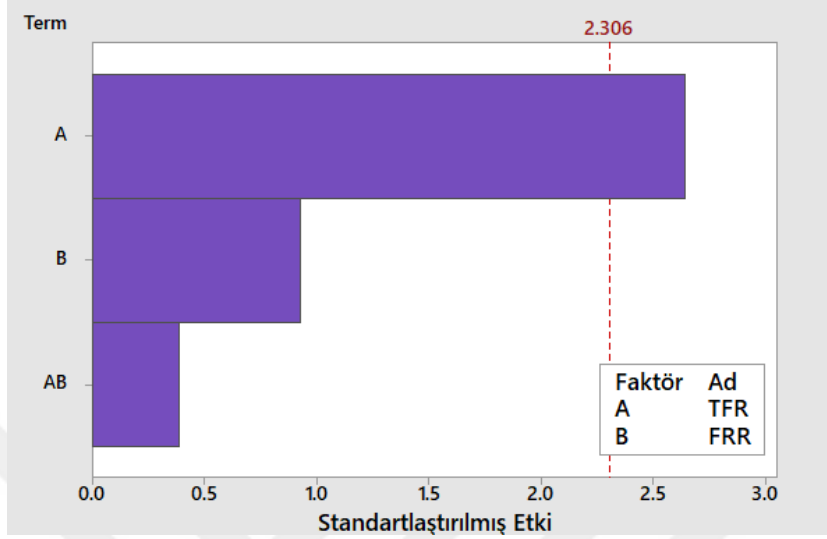
Şekil 4.20. 5FU-PLGA NP'lerin ortalama çapı için etkileşim grafiği.



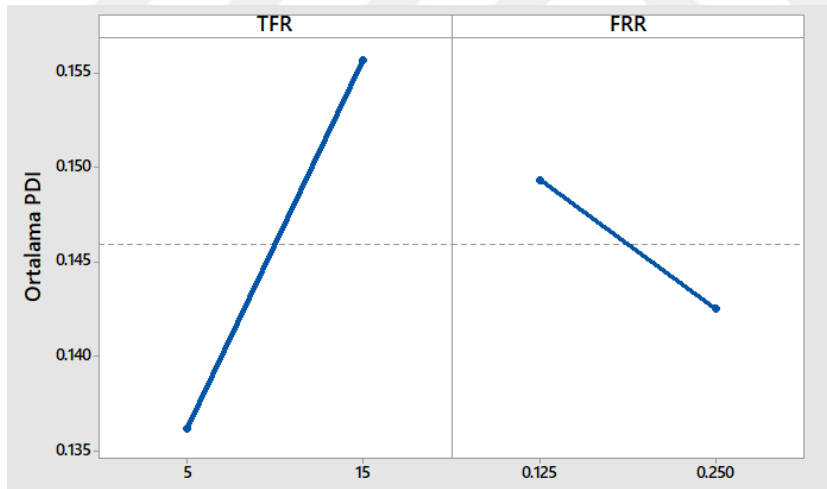
Şekil 4.21. 5FU-PLGA NP'ler için ortalama çapın FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.

Matematiksel model denklemleri, PDI için TFR ve FRR değişkenleri ve bunlar arasındaki ilişkilerden türetilmiştir. R^2 değerleri sırasıyla PLGA NP'ler için %49.94 ve 5-FU yüklü PLGA NP'ler için %31.37'dir. Düşük R^2 değerleri nedeniyle, literatürde daha önceden yürütülen çalışma sonuçlarının aksine bu modeller verilere iyi uyum sağlamamıştır [182]. Bu çalışmada PLGA NP'ler için TFR, PDI üzerinde etkiliyken (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Çizelge 4.4); 5FU-PLGA NP'ler için hiçbir parametre etkili olmamıştır (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Çizelge 4.4). PLGA NP'ler ve 5FU-PLGA NP'ler için

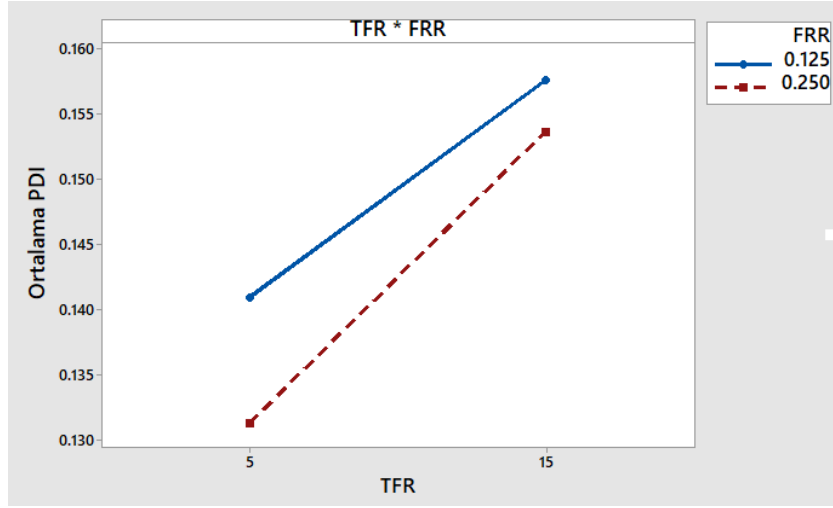
PDI'nın FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği sırasıyla Şekil 4.25 ve Şekil 4.29'de verilmiştir.



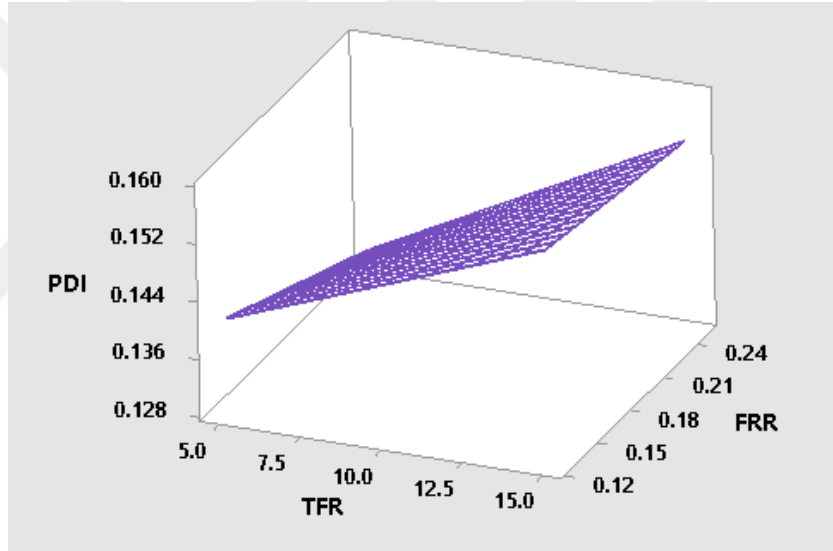
Şekil 4.22. PLGA NP'lerin PDI değeri için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



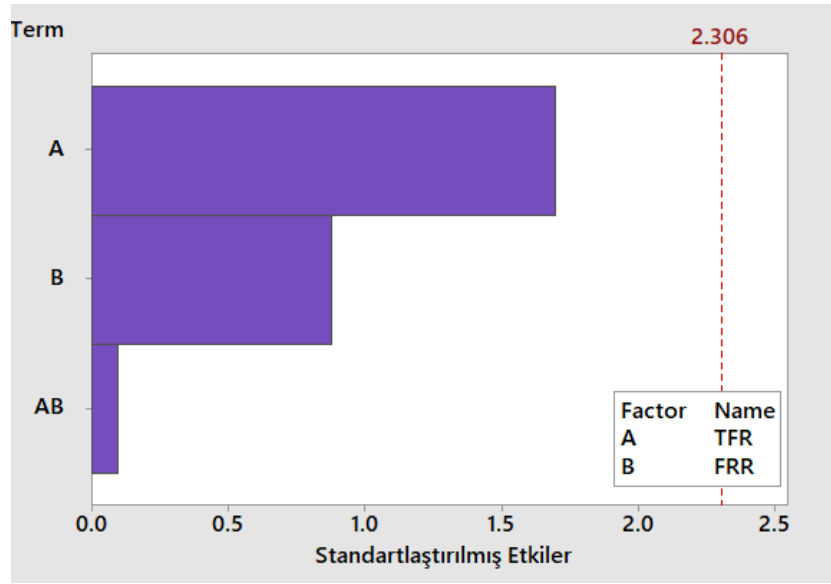
Şekil 4.23. PLGA NP'lerin PDI değeri için ana etki grafiği.



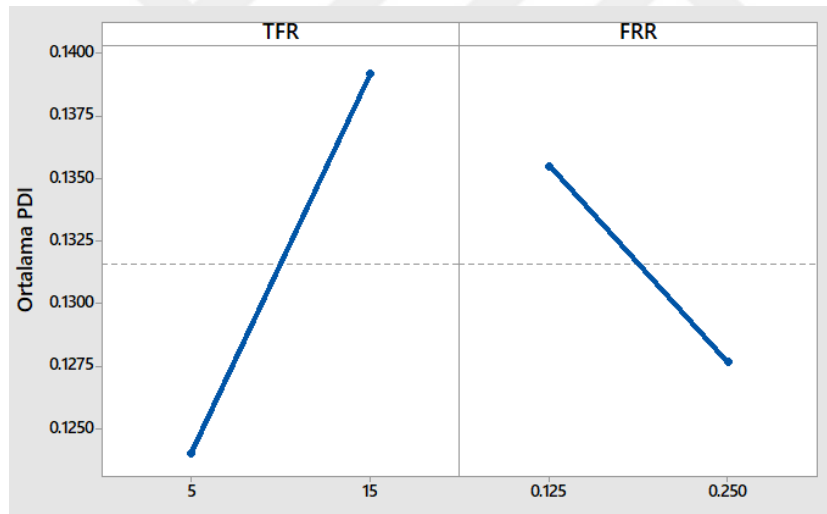
Şekil 4.24. PLGA NP'lerin PDI değeri için etkileşim grafiği.



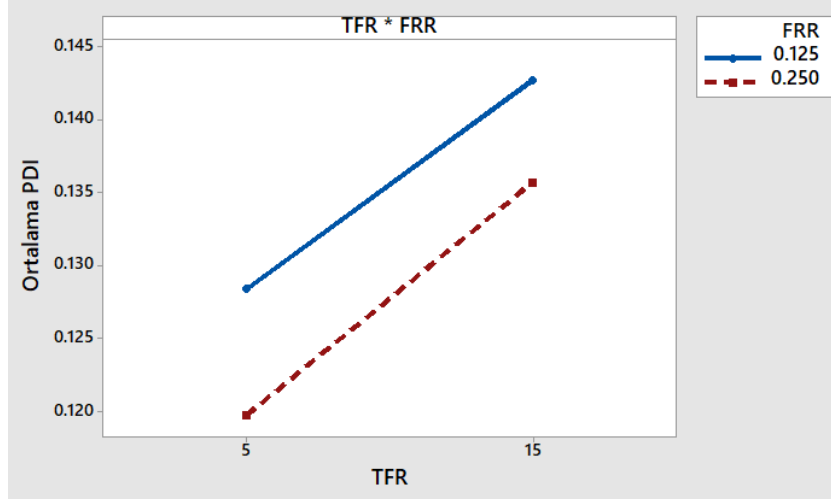
Şekil 4.25. PLGA NP'ler için PDI değerinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.



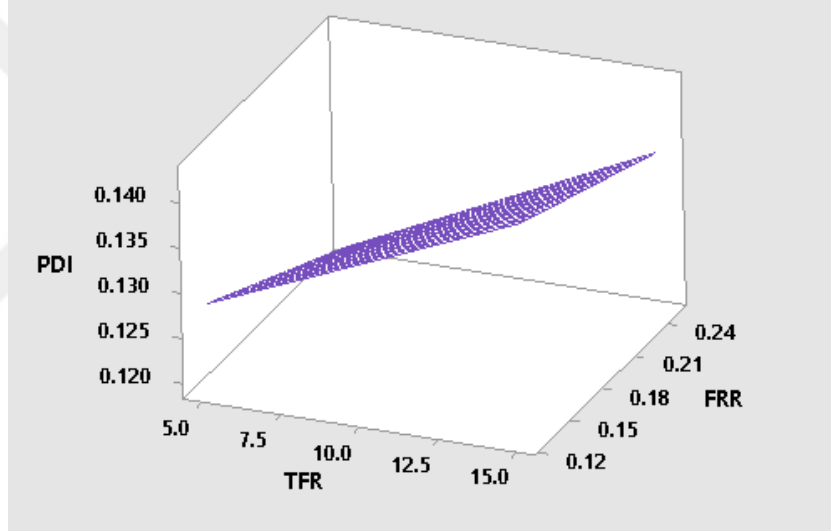
Şekil 4.26. 5FU-PLGA NP'lerin PDI değeri için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



Şekil 4.27. 5FU-PLGA NP'lerin PDI değeri için ana etki grafiği.

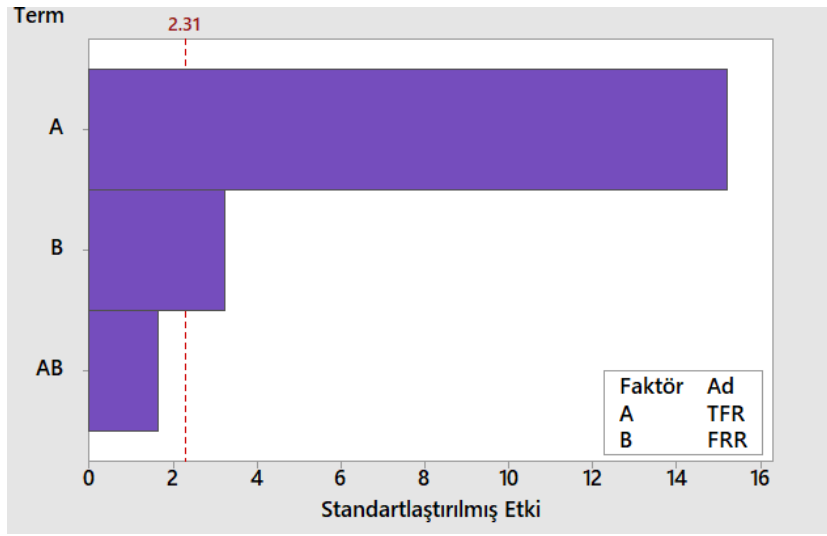


Şekil 4.28. 5FU-PLGA NP'lerin PDI değeri için etkileşim grafiği.

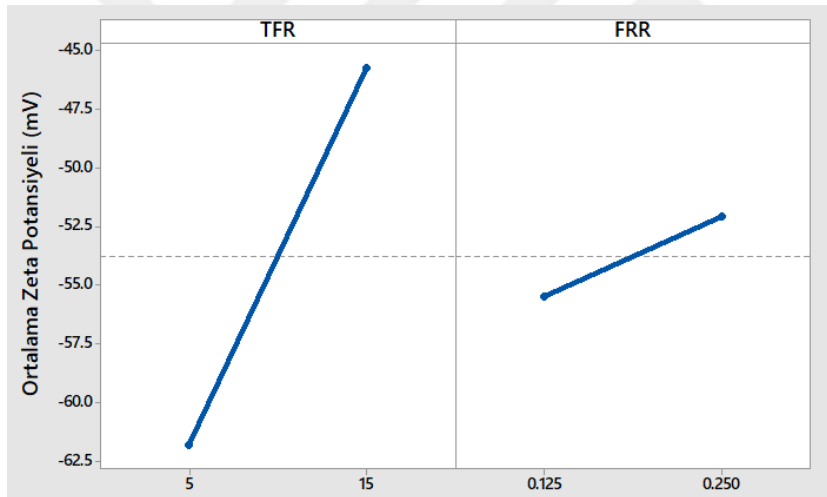


Şekil 4.29. 5FU-PLGA NP'ler için PDI değerinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.

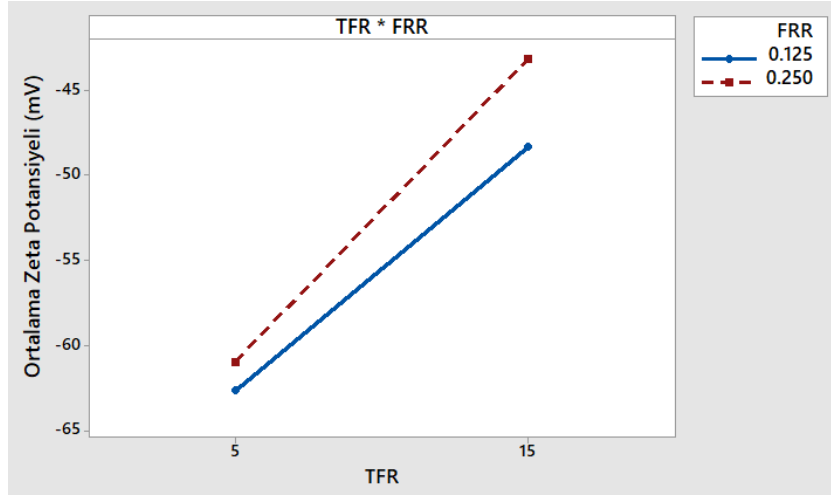
PLGA NP'lerin ve 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için öngörülen modelin R^2 değerleri sırasıyla %96.83 ve %96.61'dir. PLGA NP'ler için zeta potansiyeli TFR (A) ve FRR (B) ile değişmiş (Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Çizelge 4.4); 5-FU yüklü PLGA NP'lerin zeta potansiyeli değeri hem TFR hem de TFR'nin FRR ile etkileşimi tarafından önemli ölçüde etkilenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Çizelge 4.4). Şekil 4.33 ve Şekil 4.37'deki yüzey grafikleri, en düşük zeta potansiyeli değerinin hem PLGA NP hem de 5-FU yüklü PLGA NP için yüksek TFR'de (15 mL/dk) ve düşük FRR'de (0.25) olduğunu işaret etmektedir.



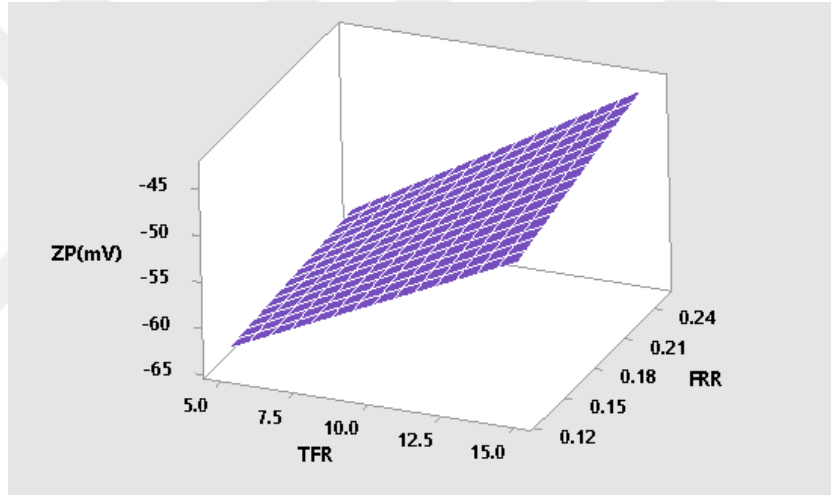
Şekil 4.30. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



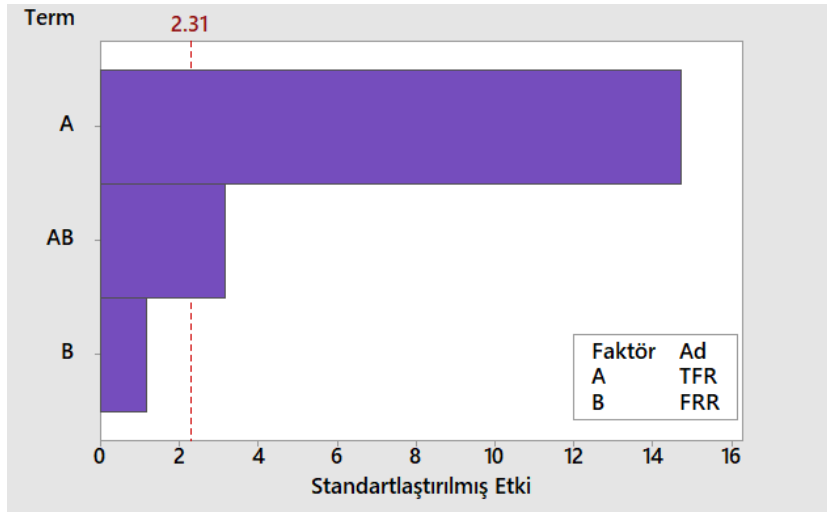
Şekil 4.31. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için ana etki grafiği.



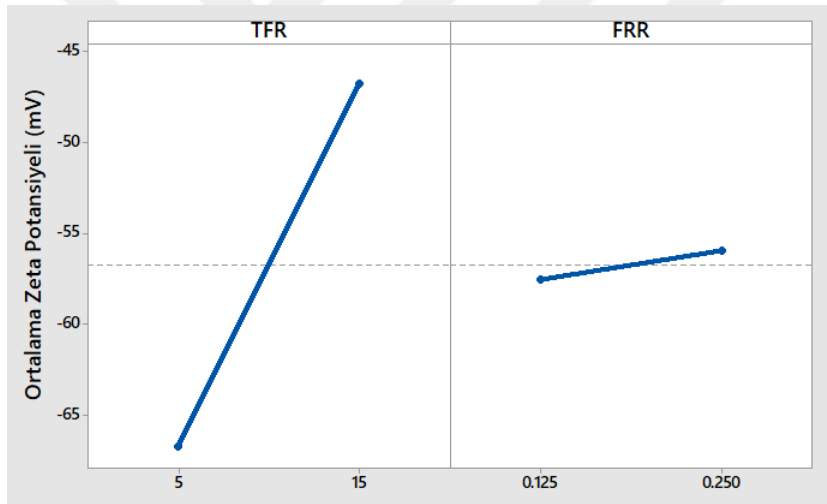
Şekil 4.32. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için etkileşim grafiği.



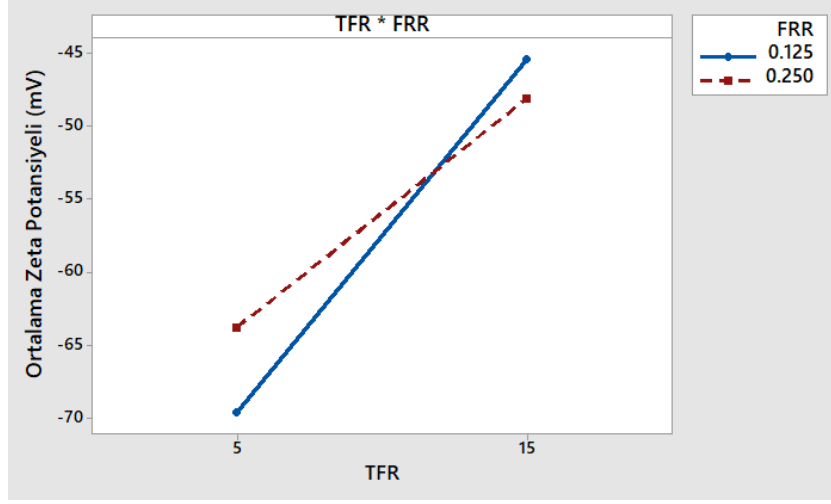
Şekil 4.33. PLGA NP'ler için zeta potansiyeli değerinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.



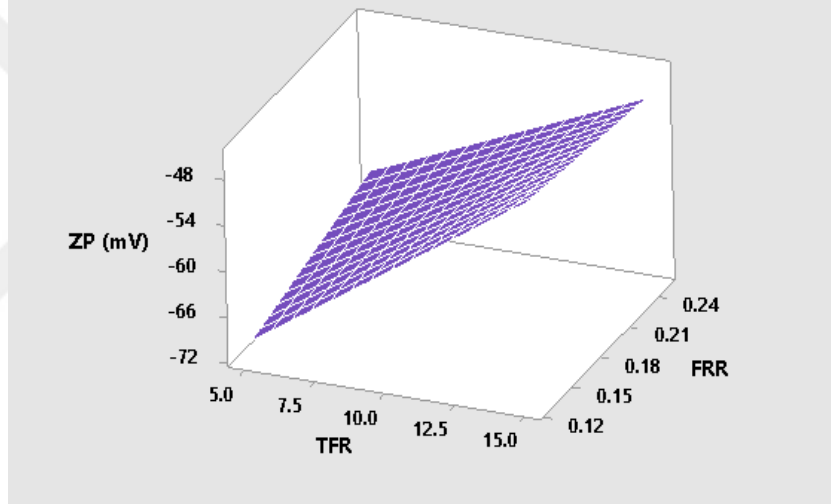
Şekil 4.34. 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



Şekil 4.35. 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için ana etki grafiği.

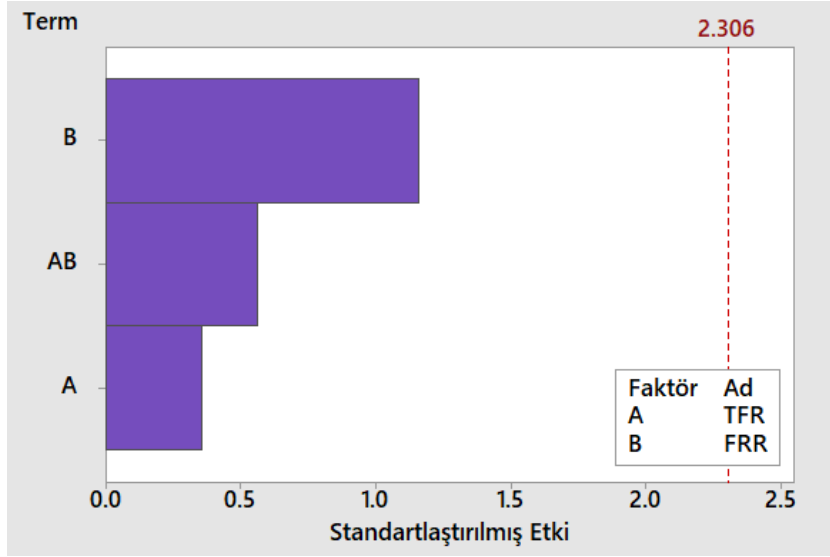


Şekil 4.36. 5FU-PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için etkileşim grafiği.

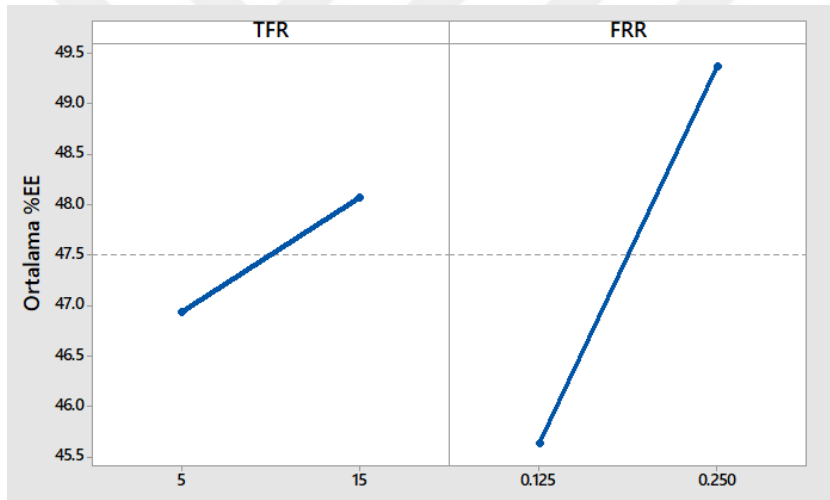


Şekil 4.37. 5FU-PLGA NP'ler için zeta potansiyelinin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.

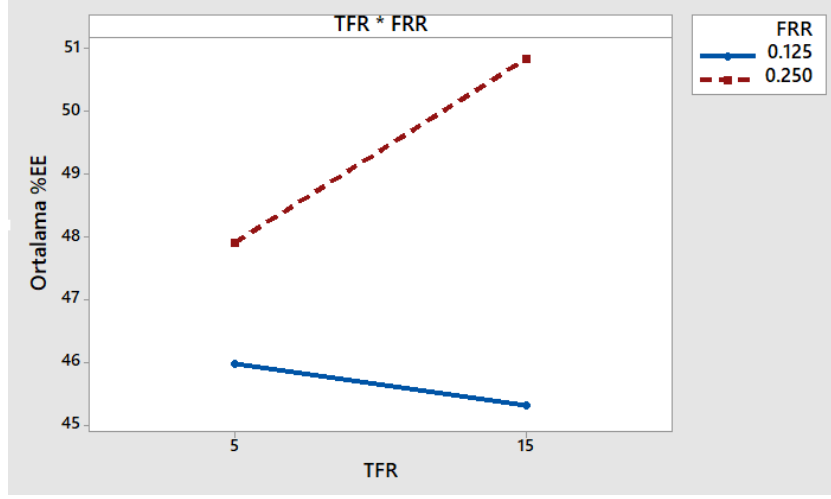
5FU yüklü PLGA NP'lerin %EE değerleri için tahmini modelin $R^2 = 0.366$ ile, %EE ile TFR, FRR ve $TFR \times FRR$ arasında bir korelasyon olmadığı (Şekil 4.38, Şekil 4.39, 4.40, Çizelge 4.4) ve dataların modele uymadığı tespit edilmiştir. 5FU-PLGA NP'ler için %EE'nin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği Şekil 4.41'de verilmiştir.



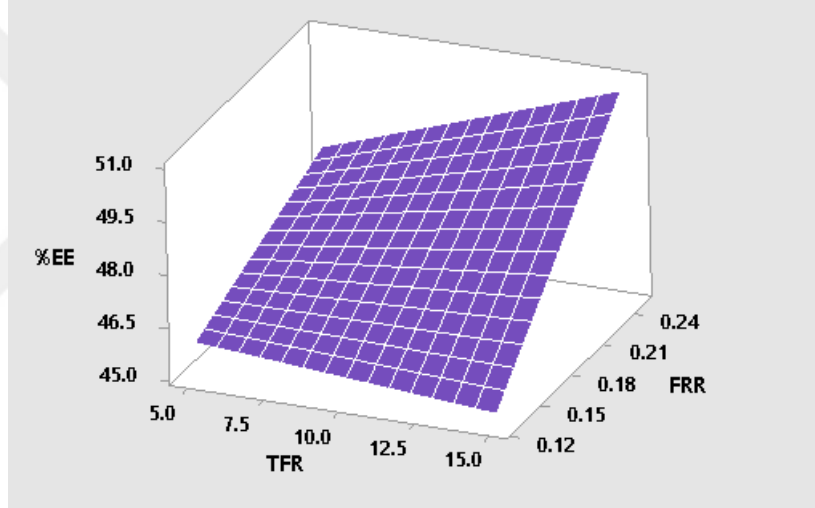
Şekil 4.38. 5FU-PLGA NP'lerin %EE için standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.



Şekil 4.39. 5FU-PLGA NP'lerin %EE için ana etki grafiği.



Şekil 4.40. 5FU-PLGA NP'lerin %EE için etkileşim grafiği.



Şekil 4.41. 5FU-PLGA NP'ler için %EE'nin FRR ve TFR'ye karşı yüzey grafiği.

Elde edilen PLGA NP'lerin ve 5FU-PLGA NP'lerin boyut, PDI, zeta potansiyeli ve %EE değerleri için elde edilen matematiksel modeller Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. FFD ile TFR, FRR ve TFRxTFR'nin bir fonksiyonu olarak PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin (boyut, PDI, zeta potansiyeli, %EE) tahmini için elde edilen matematiksel model.

Tahmin Edilen Parametre	Deney Grubu	Tahmin Edilen Model
Boyut (nm)	PLGA	$= 161.81 - 4.542 \times TFR + 1276 \times FRR + 1.485 \times TFR \times FRR$
	5FU-PLGA	$= 181.20 - 5.493 \times TFR - 64.53 \times FRR + 5.653 \times TFR \times FRR$
PDI	PLGA	$= 0.1452 + 0.00110 \times TFR - 0.100 \times FRR + 0.0045 \times FRR \times TFR$
	5FU-PLGA	$= -0.1307 - 0.076 \times TFR + 0.00127 \times FRR + 0.0013 \times TFR \times FRR$
Zeta Potansiyeli (mV)	PLGA	$= -69.80 - 0.3 \times FRR + 1.087 \times TFR + 2.77 \times FRR \times TFR$
	5FU-PLGA	$= -91.83 + 3.273 \times TFR + 80.8 \times FRR - 6.83 \times TFR \times FRR$

4.7.1. RSD

Bu çalışma, temel tasarım parametrelerini belirlemek için FFD ile başlangıç tarama deneyleriyle başlamıştır. FFD ile elde edilen bulgulara dayanarak, yanıtı artıran faktör ayarlarını belirlemek ve verilerdeki eğriliği yakalamak için DoE çalışmaları RSD ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.6.'te gösterildiği gibi, PLGA NP'lerin ve 5-FU yüklü PLGA NP'lerin hem ortalama çapları hem de zeta potansiyeli değerleri matematiksel model denklemi olarak yazılım paketi ile tahmin edilmiştir. Ortalama çap için oluşturulan modellerde, PLGA NP'ler için TFR ve FRRxTFR önemli faktörler olarak bulunmuş (Çizelge 4.7) ; R² değerleri %90.43 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, 5FU-PLGA NP'ler için TFR, TFRxTFR ve FRRxTFR anlamlı faktörlerdendir (Çizelge 4.7) ve R² değerleri %97.99'dur. Benzer şekilde TFR, FRR ve TFRxTFR'nin N-asetilsistein yüklü PLGA NP'ler için ortalama boyutu önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur [174]. PLGA NP'lerin zeta potansiyeli için öngörülen modelde (R² değerinin %91.67) TFR, FRRxTFR, TFRxTFR ve FRRxTFR

önemli faktörlerdendir (Çizelge 4.7). 5-FU yüklü PLGA NP'lerin model denklemleri için R^2 değeri %94.74'tür ve önemli faktörler arasında TFR ve TFRxFRR yer almaktadır (Çizelge 4.7).

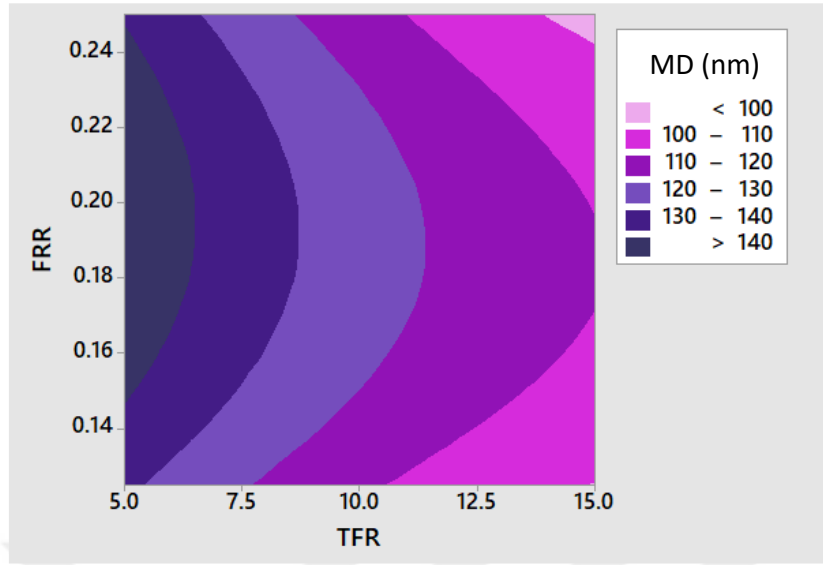
Çizelge 4.6. Değişkenler arasındaki ilişkiyi tanımlamak üzere hem PLGA hem de 5FU-PLGA NP'lerin boyut ve zeta potansiyeli için tahmin edilen matematiksel denklem.

Tahmin Edilen Parametre	Deney Grubu	Tahmin Edilen Model
Boyut (nm)	PLGA NP	$= 51.2 - 5.49 \times TFR + 1260 \times FRR + 0.1636 \times TFR \times TFR - 3099 \times FRR \times FRR - 7.89 \times TFR \times FRR$
	5FU-PLGA NP	$= 106.5 - 8.09 \times TFR - 908 \times FRR + 0.1682 \times TFR \times TFR - 2541 \times FRR \times FRR + 3.62 \times TFR \times FRR$
Zeta Potansiyeli (mV)	PLGA NP	$= -72.2 + 276 \times FRR - 3.167 \times TFR - 895 \times FRR \times FRR + 0.1767 \times TFR \times TFR + 6.36 \times FRR \times TFR$
	5FU-PLGA NP	$= -76.39 + 2.994 \times TFR + 89.2 \times FRR - 0.0007 \times TFR \times TFR + 445 \times FRR \times FRR - 6.12 \times TFR \times FRR$

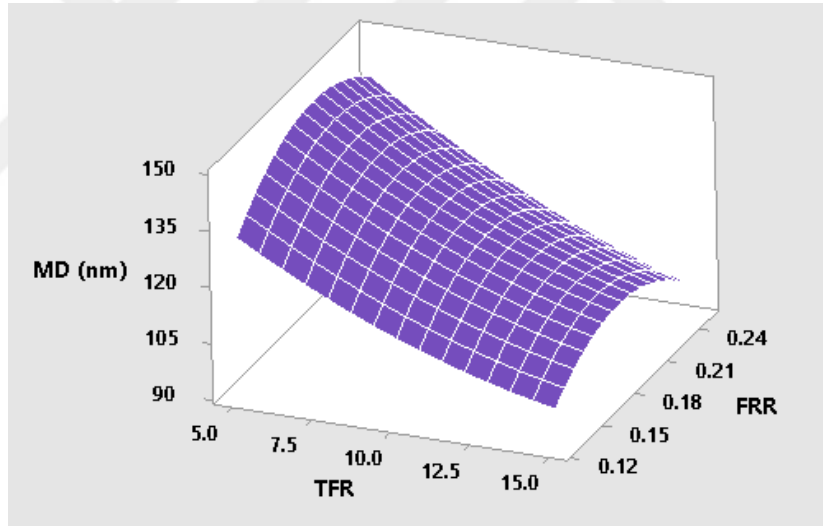
RSD çalışmasında, kontur grafikleri ve yanıt yüzeyi grafikleri, yanıt modeli eğriliklerindeki değişikliklerin proses parametreleriyle bağlantısını ifade etmektedir. PLGA NP'ler (Şekil 4.42, Şekil 4.43) ve 5FU-PLGA NP'ler (Şekil 4.44, Şekil 4.45) için, herhangi bir TFR değerinde en yüksek ortalama çap FRR 0.19'da görülmektedir.

Çizelge 4.7. TFR, FRR ve TFRxFRR'nin PLGA ve 5FU-PLGA NP'lerin fizikokimyasal özellikleri (boyut, PDI, zeta potansiyeli, %EE) üzerindeki etkisi RSD ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

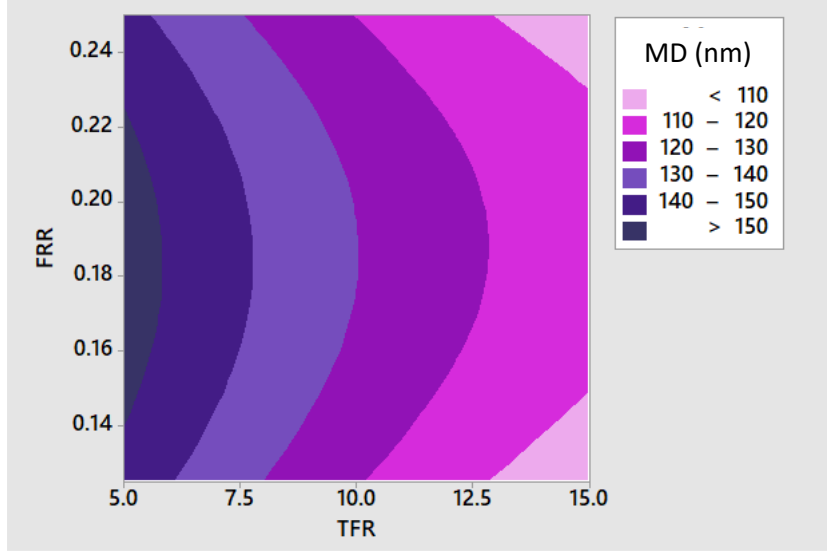
	PLGA NP	5FU-PLGA NP
	p	p
Boyut		
TFR	0.000	0.000
FRR	0.436	0.444
TFRxTFR	0.103	0.001
FRRxFRR	0.000	0.000
TFRxFRR	0.150	0.171
Zeta Potansiyeli		
TFR	0.000	0.000
FRR	0.632	0.056
TFRxTFR	0.000	0.985
FRRxFRR	0.004	0.094
TFRxFRR	0.007	0.005



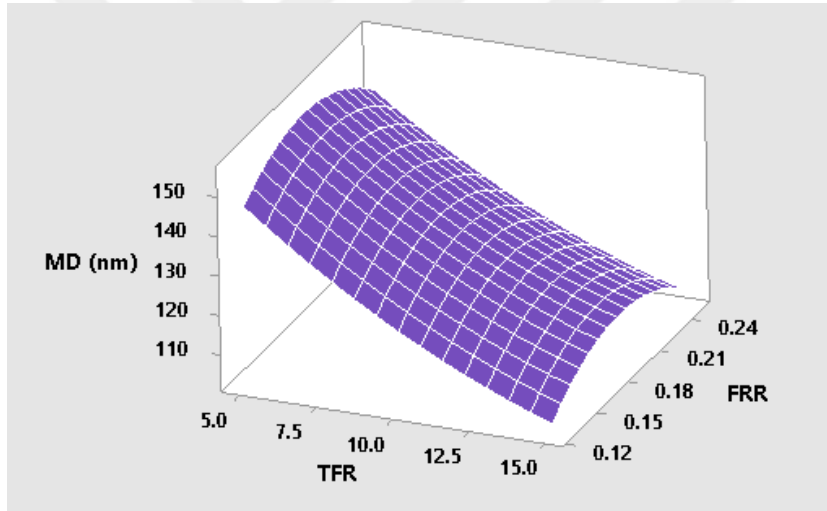
Şekil 4.42. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın kontur grafiği.



Şekil 4.43. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın yüzey grafiği.

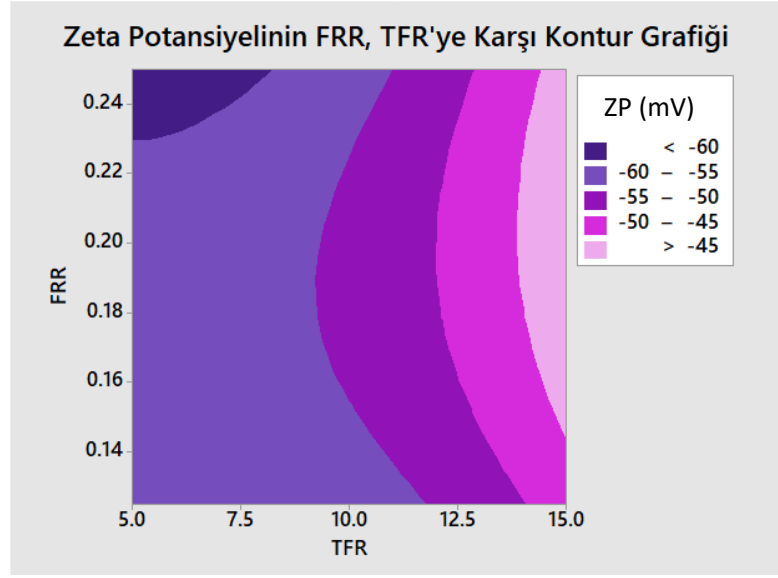


Şekil 4.44. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın kontur grafiği.

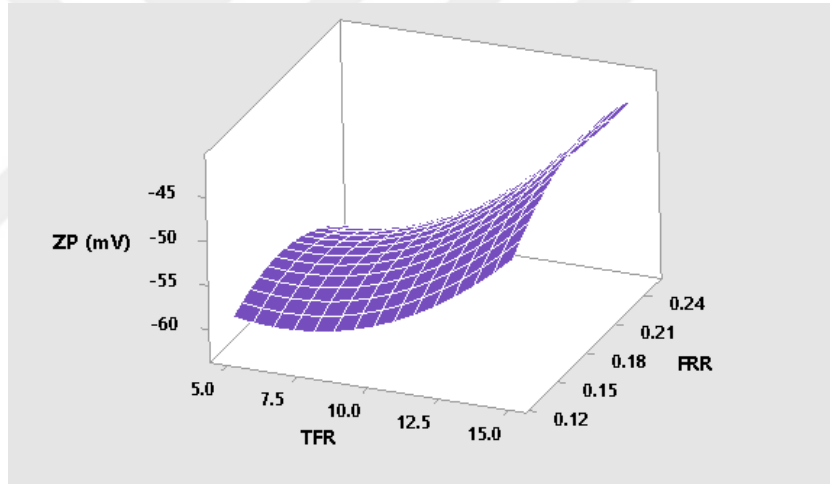


Şekil 4.45. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı ortalama çapın yüzey grafiği.

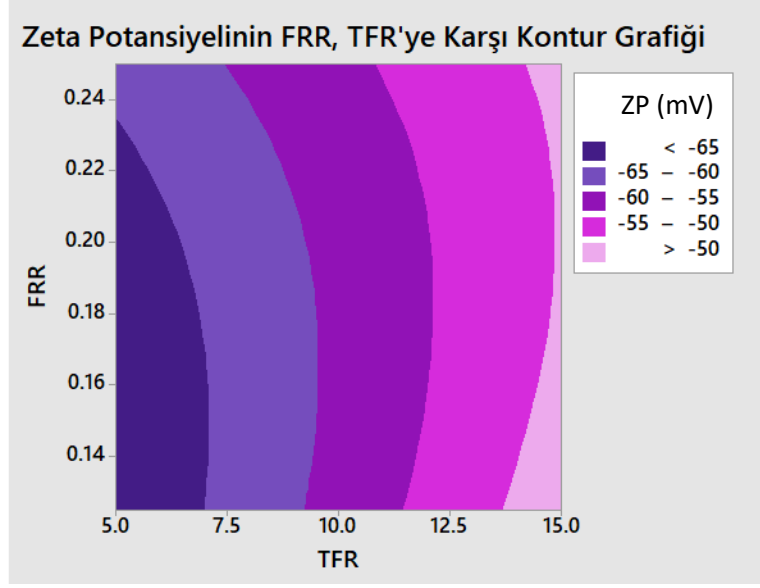
Optimizasyon sonuçlarına göre (Şekil 4.46 ve Şekil 4.47), PLGA NP'lerin zeta potansiyeli değerleri %70 oranında, -50 mV üstü değerlerde yoğunlaşmıştır. 5FU-PLGA NP'lerinin yaklaşık %5'i, > -50 mV zeta potansiyel değerlerinde, yaklaşık %15'i ise < -65 mV değerindedir (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49).



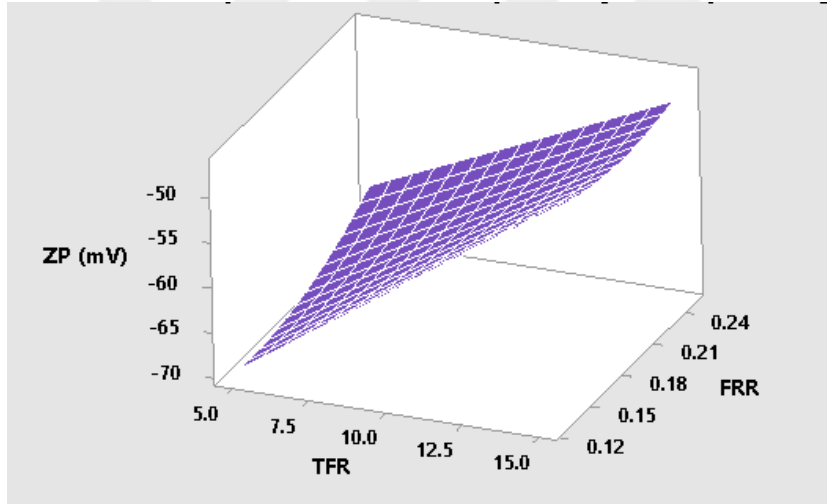
Şekil 4.46. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin kontur grafiği.



Şekil 4.47. PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin yüzey grafiği.



Şekil 4.48. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin kontur grafiği.



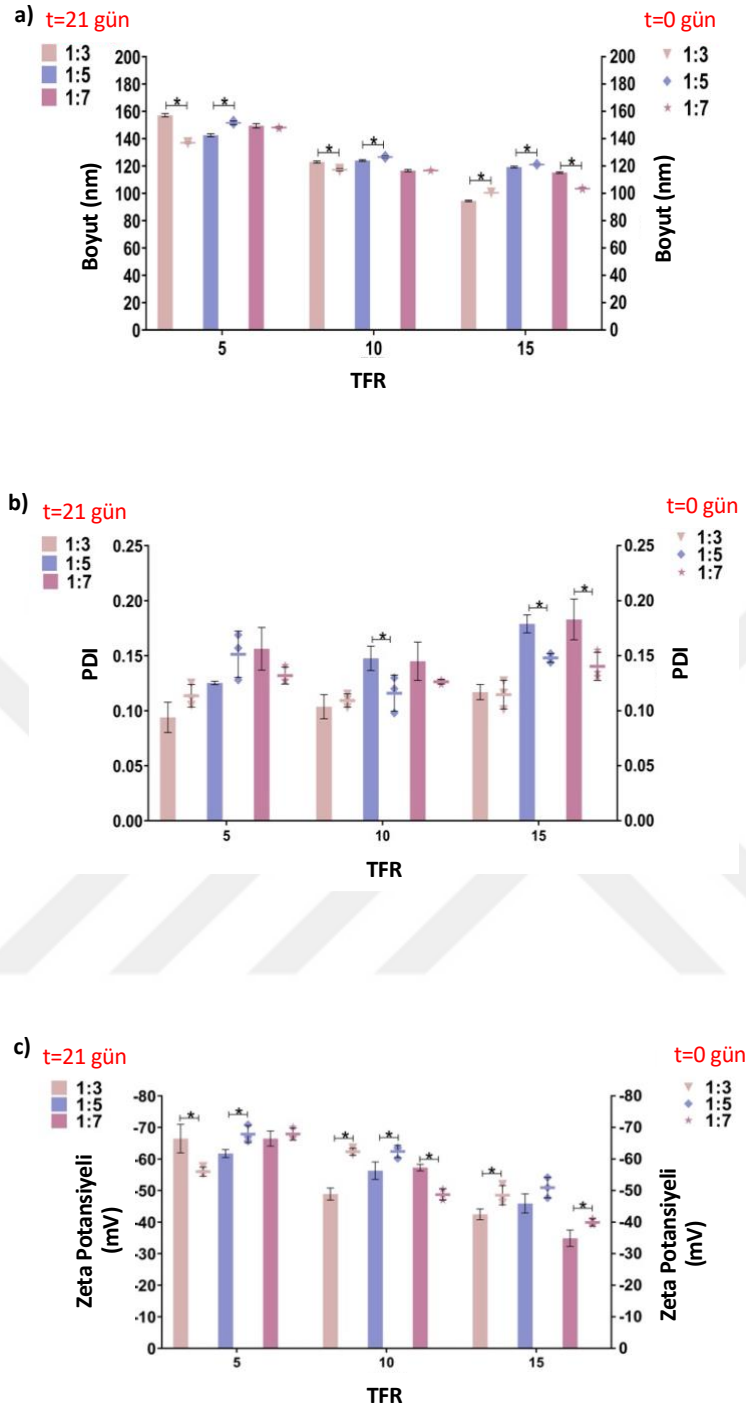
Şekil 4.49. 5FU-PLGA NP'ler için FRR ve TFR'ye karşı zeta potansiyelin yüzey grafiği.

RSD'ye göre, hem PLGA NP'lerin hem de 5FU-PLGA NP'lerin boyut ve zeta potansiyel değerleri TFR'den doğrudan etkilenirken; FRR'den etkilenmemiştir. Ayrıca, 5FU-PLGA NP'ler ile PLGA NP'lerin boyut ve zeta potansiyel değerleri, birbirinden farklı olarak bağımsız değişkenlerin farklı etkileşimlerinden etkilenmiştir. Ek olarak, tam faktöriyel tasarıma göre, üç parametre (TFR, FRR ve TFRxFRR) ile enkapsülasyon verimliliği veya PDI arasında belirgin bir korelasyon olmadığı görülmüştür. Bu bulgular, mikromikserin güçlü karıştırma mekanizmasının akışkanların hızlarına bağlı olduğunu doğrulamakta ve mikromikser tasarımının karıştırma verimliliğini etkileyen başlıca faktör olduğunu desteklemektedir [16].

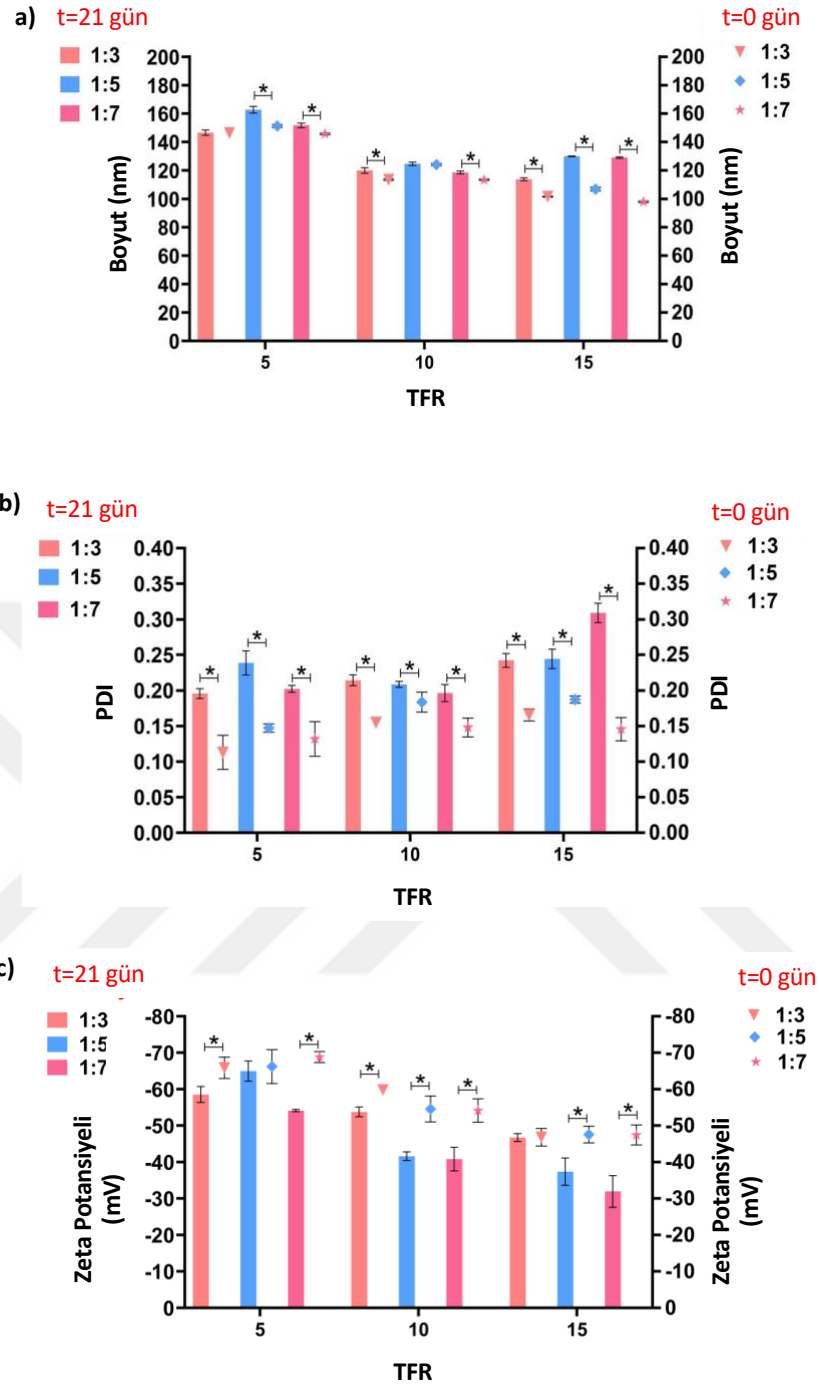
4.8. 5FU-PLGA NP'lerin Stabilitesi

Çoğu NP tabanlı ürün sıvı süspansiyon formundadır (33, 34). Nanosüspansiyonlar termodinamik olarak kararsız doğaları nedeniyle farmasötik uygulamalar için önemli bir sınırlama teşkil etmektedir. Bu nedenle, nano ölçekte ilaç taşıyıcı sistemler için NP'lerin stabilitesini araştırmak, raf ömrünü ve ürün kalitesini değerlendirmek açısından önemlidir.

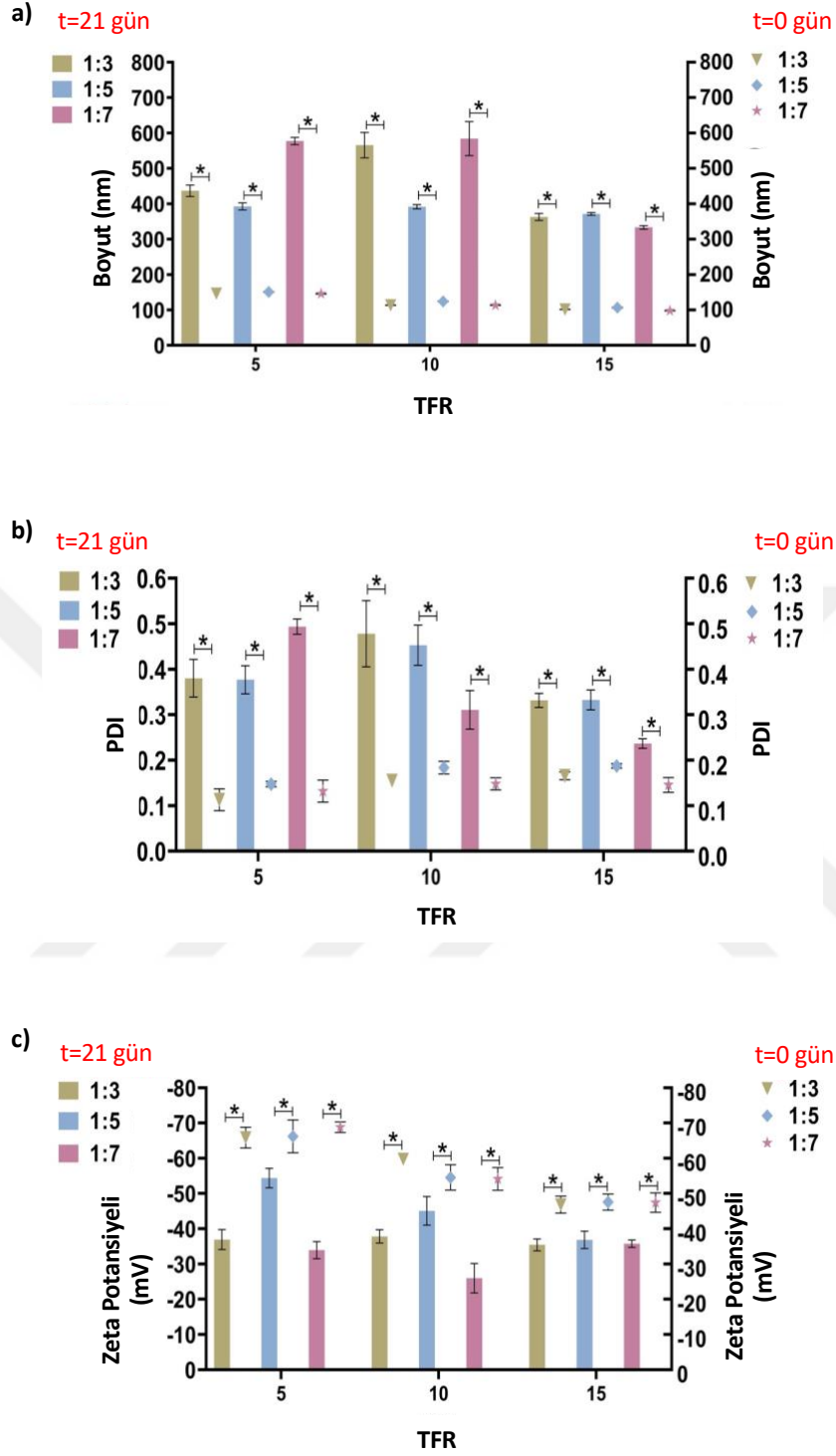
5FU-PLGA NP'lerin stabilitelerini test etmek amacıyla, NP'ler süspansiyon halinde 4°C, 25°C ve 37°C'de saklanmış ve 21 gün sonra DLS kullanılarak analiz edilmiştir. 4°C'de saklanan NP'ler için sonuçlar Şekil 4.50'de sunulmuştur. Genel olarak, 21 gün sonra tüm gruplar için boyutlar arasında 10 nm'lik bir fark bulunmuş ve PDI değerlerinin 0.2'den az olduğu tespit edilmiştir. Tüm gruplar için zeta potansiyel değerleri -30 mV'nin üzerinde bulunmuştur. 25°C'de saklanan 5FU-PLGA NP'leri için (Şekil 4.51), genel olarak tüm NP gruplarında boyut 10-15 nm artmış ve PDI değerleri 0.20 ile 0.25 arasında değişmiştir. 15 ml/dk TFR ve 1:3 FRR'de elde edilen NP'ün PDI değeri 0.3 olarak tespit edilmiştir. 5 ml/dk TFR ile FRR 1:5 ve 15 ml/dk TFR ile FRR 1:3 dışında elde edilen tüm NP grupları için zeta potansiyel değerlerinde küçük bir azalma meydana gelmiştir. Şekil 4.52'de gösterildiği gibi, 37°C'de 21 gün saklandıktan sonra, 5FU-PLGA NP'lerinin boyutu ve PDI'sı önemli ölçüde artmış, zeta potansiyel değerleri ise belirgin bir şekilde azalmıştır.



Şekil 4.50. Farklı proses parametreleri (TFR= 5, 10, 15 mL/dk; FRR=1:3, 1:5, 1:7) ile üretilen 5FU-PLGA NP'lerin 4°C'de ve 21 gün sonunda boyut (a), PDI (b) ve zeta potansiyeli (c) ölçümleri. İlk ölçüm verileri sembollerle gösterilirken; 21 gün sonraki ölçümler çubukla gösterilmiştir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.



Şekil 4.51. Farklı proses parametreleri (TFR=5, 10, 15 mL/dk; FRR=1:3, 1:5, 1:7) ile üretilen 5FU-PLGA NP'lerin 25°C'de ve 21 gün sonunda boyut (a), PDI (b) ve zeta potansiyeli (c) ölçümleri. İlk ölçüm verileri sembollerle gösterilirken; 21 gün sonraki ölçümler çubukla gösterilmiştir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.



Şekil 4.52. Farklı proses parametreleri (TFR=5, 10, 15 mL/dk; FRR=1:3, 1:5, 1:7) ile üretilen 5FU-PLGA NP'lerin 37 °C'de ve 21 gün sonunda boyut (a), PDI (b) ve zeta potansiyeli (c) ölçümleri. İlk ölçüm verileri sembollerle gösterilirken; 21 gün sonraki ölçümler çubukla gösterilmiştir. (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.

Sıcaklığın NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için ek istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10). Bu sonuçlara göre sıcaklığın 5 ile 15 ml/dk arasında TFR ve 1:3 ile 1:7 arasında FRR ile üretilen tüm NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. 25°C ve 37°C'de 21 günlük bir süre boyunca NP'lerin boyut ve PDI değerlerindeki değişim zaten beklenen bir sonuçtur. PLGA gibi polimerik malzemeler yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında, hızlı bir şekilde hidroliz yoluyla bozulduğu bilinmektedir [183]. Düşük moleküler ağırlığa sahip polimerlerin, 37°C'de kauçuk benzeri bir duruma dönüşüp; yüksek moleküler ağırlığa sahip olanlara kıyasla daha hızlı bozulduğu gözlenmiştir [184]. Bu nedenle, NP'lerin stabilitesini korumak için formülasyonlar düşük sıcaklıklarda, ideal olarak 4°C'de saklanmalıdır.

Tüm NP gruplarının 4°C'de 3 ay boyunca stabilitesi değerlendirilmiştir. Çizelge 4.11'de gösterildiği gibi, tüm NP'ler bu saklama koşulları altında stabil kalmıştır. Ostwald olgunlaşma etkisi ve Gibbs serbest enerjisini azaltma eğilimi nedeniyle oluşan agregasyonu önlemek ve stabil NP'ler elde etmek için, NP'leri homojen partikül dağılımında elde etmenin önemli olduğu bilinmektedir [132]. Nanopresipitasyon sırasında monodispers NP'lerin üretimi için, süperdoygunculuk seviyesindeki azalmanın tüm çekirdeklerin aynı anda ve homojen bir şekilde oluşturacak düzeyde hızlı olması gerekir. Daha önceden belirtildiği gibi stabilizatör seçimi, polimer konsantrasyonu, çözücü seçimi, işlem parametreleri gibi faktörler NP'lerin stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [18]. 4°C'de 3 aylık bir süre boyunca stabil NP'ler, toroidal mikroakışkan sistemin güçlü karıştırma özelliği, seçilen polimer konsantrasyonu, çözücü tipi ve stabilizatör gibi parametrelerin sinerjik etkisi sayesinde elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. 4°C, 25°C ve 37°C'de 21 gün boyunca saklanan 5-FU yüklü PLGA NP'lerin boyut sonuçlarını karşılaştırmak için istatistiksel bir analiz yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

FRR (o:s)	4°C vs. 25°C	4°C vs. 37°C	25°C vs. 37°C
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
5 mL/min			
1:3	0.0012	<0.0001	<0.0001
1:5	0.0002	<0.0001	0.0002
1:7	0.1683	<0.0001	<0.0001
10 mL/min			
1:3	0.0651	<0.0001	<0.0001
1:5	0.4688	<0.0001	<0.0001
1:7	0.0597	<0.0001	<0.0001
15 mL/min			
1:3	<0.0001	<0.0001	<0.0001
1:5	<0.0001	<0.0001	<0.0001
1:7	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Çizelge 4.9. 4°C, 25°C ve 37°C'de 21 gün boyunca saklanan 5-FU yüklü PLGA NP'lerin PDI sonuçlarını karşılaştırmak için istatistiksel bir analiz yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

FRR (O:S)	4°C vs. 25°C	4°C vs. 37°C	25°C vs. 37°C
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
5 mL/min			
1:3	0.0003	0.0003	0.0016
1:5	0.0003	0.0001	0.0024
1:7	0.0163	<0.0001	<0.0001
10 mL/min			
1:3	0.0001	0.0009	0.0034
1:5	0.0009	0.0003	0.0007
1:7	0.0136	0.0034	0.0110
15 mL/min			
1:3	<0.0001	<0.0001	0.0003
1:5	0.0021	0.0003	0.0040
1:7	0.0007	0.0122	0.0019

Çizelge 4.10. 4°C, 25°C ve 37°C'de 21 gün boyunca saklanan 5-FU yüklü PLGA NP'lerin zeta potansiyeli sonuçlarını karşılaştırmak için istatistiksel bir analiz yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

FRR (O:S)	4°C vs. 25°C	4°C vs. 37°C	25°C vs. 37°C
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
5 mL/min			
1:3	0.0479	0.0007	0.0005
1:5	0.0004	<0.0001	0.0001
1:7	0,2360	0.0152	0.0093
10 mL/min			
1:3	0.0224	0.0020	0.0003
1:5	0.0006	0.0118	0.2292
1:7	0.0014	0.0003	0.0084
15 mL/min			
1:3	0.0214	0.0105	0.0006
1:5	0.0157	0.0053	0.8559
1:7	0.3722	0.6065	0.2121

Çizelge 4.11. 4°C'de 3 ay boyunca saklanan 5FU-PLGA NP'lerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

FRR (o:w)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
5 mL/dk			
1:3	159.2±3.2	0.16±0.01	-56.4±2.2
1:5	161.6±0.6	0.23±0.02	-66.5±5.1
1:7	154.0±1.2	0.21±0.02	-60.7±2.9
10 mL/dk			
1:3	130.3±2.5	0.16±0.01	-45.8±1.4
1:5	128.3±1.0	0.24±0.01	-48.5±5.1
1:7	119.0±2.7	0.20±0.01	-44.3±4.2
15 mL/dk			
1:3	104.2±0.6	0.23±0.01	-32.5±2.2
1:5	122.1±1.7	0.21±0.01	-48.2±1.9
1:7	113.6±1.5	0.17±0.02	-34.4±1.3

4.9. 5FU Yükleme Kapasitesinin NP'lerin Özellikleri Üzerine Etkisi

PLGA NP'lere farklı oranlarda (%5, %10, %15 ve %20 (w/w)) 5FU yüklenerek NP'lerin boyut, PDI, zeta potansiyeli, enkapsülasyon verimliliği ve ilaç yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi hem santrifüj öncesi hem de santrifüj sonrası incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'de verilmiştir. Bu amaçla en iyi proses parametresi olarak seçilen 15 mL/dk akış hızında ve 1:3 FRR'de 5FU-PLGA NP'ler elde edilmiştir. Tüm NP'lerin boyutları 90-95 nm, PDI değerleri 0.125-0.140 aralığında bulunmuştur. NP'lerin zeta potansiyeli yaklaşık -50 mV değerinde ölçülmüştür. Sadece %5 FU içeren NP'lerin zeta potansiyeli -62 mV'dir.

Çizelge 4.12. Farklı ilaç yükleme miktarının NP özellikleri üzerindeki etkisi (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).

5FU:PLGA (w:w)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)	%EE	%DL
%5	91.50±3.0	0.137±0.010	-62.0±2.6	49.6±5.3	2.5±0.3
%10	95.24±0.7	0.126±0.005	-51.7±1.2	53.8±5.7	5.4±0.6
%15	96.69±1.2	0.132±0.009	-52.7±0.9	51.9±8.0	7.8±1.2
%20	93.24±0.4	0.138±0.011	-49.8±4.0	51.3±6.3	10.3±1.7

Santrifüj sonrası NP'lerin boyutlarıyla, santrifüjden önce ölçülenlerin arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca NP'lerin boyut dağılımları 0.15-0.30 değerleriyle, nispeten daha küçülmüştür. Tüm formülasyonların zeta potansiyelleri -50 ile -60 mV olarak bulunmuştur. Enkapsülasyon etkinliği tüm NP'ler için %50 civarındadır. Bununla birlikte ilaç yükleme dozu %5 iken, ilaç yükleme kapasitesi %2.5 ile en düşük seviyede; ilaç yükleme dozu %20'ye çıktığındaysa, ilaç yükleme kapasitesi %10 ile en yüksek değere ulaşmıştır.

Sonuç olarak ilaç yükleme miktarındaki değişimin sentezlenen NP'lerin karakteristik özelliklerini önemli ölçüde değiştirmediği görülmüştür. Tüm formülasyonların hem santrifüj öncesi hem de santrifüj sonrasında monodispers ve oldukça kararlı yapıda oldukları bulunmuştur. Santrifüjün NP fizikokimyasal özellikleri üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

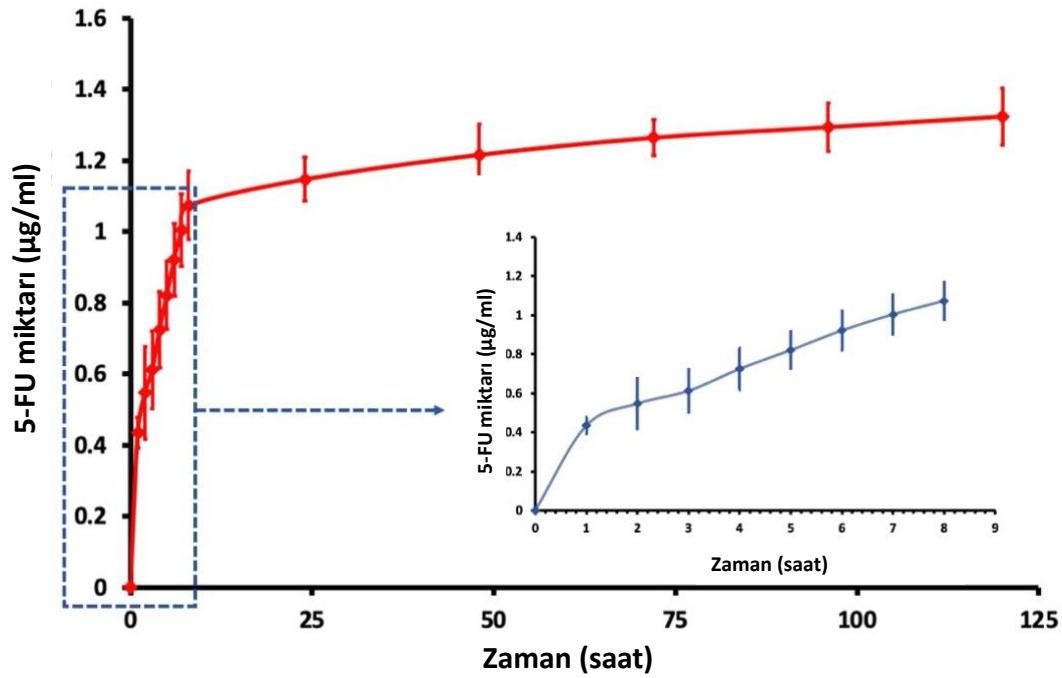
Çizelge 4.13. Santrifüj işleminin farklı ilaç yükleme dozlarıyla elde edilen NP'lerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi (TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3).

5FU:PLGA (w:w)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
%5	93.23±0.2	0.124±0.007	-49.5±1.9
%10	93.90±0.3	0.117±0.005	-53.3±3.7
%15	97.53±1.0	0.116±0.024	-57.1±0.8
%20	93.86±1.1	0.128±0.011	-51.1±0.6

4.10. 5FU-PLGA NP'lerin *In vitro* Salım Profilleri ve Kinetik Değerlendirmeleri

5FU, birçok kanserin tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik olmasına rağmen; tekrarlanan yüksek doz uygulamaları sağlıklı hücrelere toksisite ve ilaç direncinin gelişimi gibi komplikasyonlara yol açabilmektedir [185]. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için, 5FU genellikle nanotaşıyıcılar içinde enkapsüle edilir. Bu yöntem, ilacın daha düşük dozlarda uzatılmış veya kontrollü salımına olanak tanır. Diğer TFR'lere (5 ve 10 mL/dk) göre daha hızlı, daha yüksek çıktı kapasitesine sahip 15 mL/dk'da 1:3 FRR ile sentezlenen küçük boyutlu, monodispers, kararlı 5FU yüklü PLGA NP'ler, (5 mL/dk'dan 15 mL/dk'ya) diğer tüm gruplara kıyasla, en yüksek konsantrasyonda ($12.0 \times 10^{11} \pm 4.17 \times 10^{10}$) üretilmiştir. Bir yanıt yüzeyi tasarımı kullanarak kritik proses parametrelerinden elde edilen optimizasyon sonuçlarına göre diğer gruplar arasından 15 mL/dk TFR ve 1:3 FRR'de üretilen 5FU-PLGA NP'ler seçilmiştir. En düşük (%1) ve en yüksek (%20) ilaç yükleme dozu kullanılarak elde edilen NP'lerin 5FU salım profilleri 5 gün boyunca *in vitro* salım çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Her iki formülasyonda da ani bir ilaç salımından sonra kontrollü bir salım profili gözlenmiştir (Şekil 4.53 ve 4.54). %1 ilaç yüklenen NP'lerden ilk 8 saat içinde ani salımla yaklaşık olarak 1,07 µg/mL ilaç ortama salınmıştır. Sonrasında 5. güne kadar 5FU-PLGA NP'lerden kontrollü bir ilaç salımı gerçekleşmiştir. % 20 5FU yüklenen NP'lerde, Şekil 4.54'de görüldüğü üzere, ilk 8 saat içinde ani salımla yaklaşık 12 µg/mL ve sonrasında ise daha kontrollü bir salım profili izleyerek 5. güne kadar toplamda 16 µg/mL ilaç salımı gerçekleşmiştir. Bu sürekli

salım profili, %1 ilaç yükleme dozu ile elde edilen NP'lerin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.



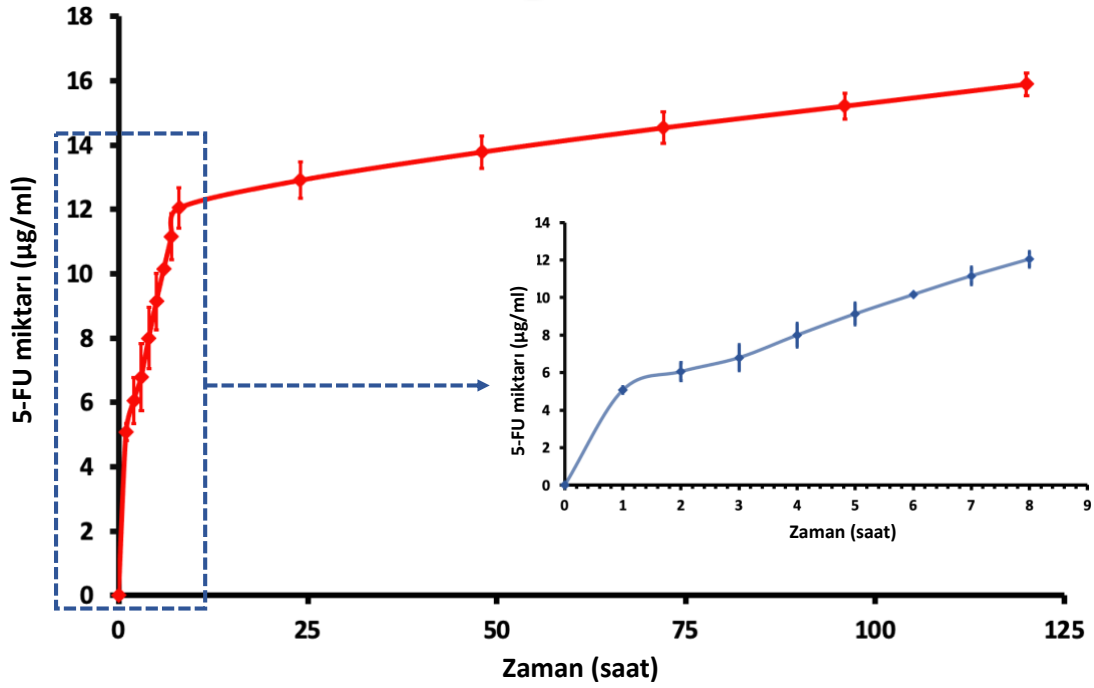
Şekil 4.53. %1 5FU yüklü PLGA NP'lerden kümülatif 5FU salım profili (TFR=15 mL/dk, FRR=1:3 FRR).

%1 ve %20 5FU yüklenen PLGA NP'lerin kinetik değerlendirmesi için sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell (küp-kök) ve Higuchi (zamanın karekökü) modelleri ayrı ayrı uygulanmış; ardından GraphPad yazılımı kullanılarak determinasyon katsayıları (r^2) ve salım hız sabiti değerleri (k) hesaplanmıştır (Çizelge 4.14). %1 ve %20 ilaç yüklenen 5FU-PLGA NP'lerin determinasyon katsayıları (r^2) sırasıyla 0.8109 ve 0.7775 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, 5FU-PLGA NP'lerden ilaç salımının difüzyonun baskın olduğu matematiksel model olan Higuchi salım modeline uyduğunu göstermiştir. Benzer şekilde literatürde mikroakışkanla 5FU yüklü PLGA NP'lerin üretildiği başka bir çalışmada da salım modelinin Higuchi kinetik modeline uyduğu bildirilmiştir [186]. Fick yasasına dayalı gerçekleşen bu difüzyon Higuchi modeli ile uyumlu bulunmuştur. Higuchi kinetik modeli, ilacın çözünmeyen bir matriksten zamana bağlı olarak serbest bırakılmasını açıklar ve ilaç salımı difüzyon kontrollü bir şekilde gerçekleşir.

Çizelge 4.14. %1 ve %20 ilaç yüklü 5FU-PLGA NP'ler için salım kinetiğinin salım hızı (k) ve determinasyon katsayısı (r^2) değerleri (TFR=5 mL/dk ve FRR=1:3).

		Zero order	First order	Hixon -Crowell	Higuchi
%1 5FU	k	14.3835	4.4487	0.2353	11.3739
	r^2	0.5754	0.6009	0.5924	0.8109
%20 5FU	k	7.4571	4.5275	0.1186	5.7899
	r^2	0.6440	0.6567	0.6525	0.7775

PLGA NP'lerden ilaç salımı genellikle; difüzyon, matriksin degradasyonu ve şişmesine bağlı olarak gerçekleşmekte olup bu mekanizmalar salım kinetiğini doğrudan etkilemektedir. Su emme/şişme, PLGA NP'lerden ilaç salım kinetiğinin belirlenmesinde kritik bir rol oynar [187]. Polimerik zincirler arasındaki çapraz bağlar ise polimerin çözünmesini engelleyerek polimer matriksinin sıvıyla dolu bir sünger gibi şişmesine yol açar. Bununla birlikte, matriksin stabilitesi çapraz bağların miktarına ve türüne bağlı olarak farklılık gösterir. Güçlü kovalent bağlar, tipik olarak kimyasal kovalent bağlar, zaman içinde kararlı bir ağ ile sonuçlanır. Buna karşılık, Coulombic, dipol-dipol, van der Waals, hidrofobik ve hidrojen bağı gibi daha zayıf etkileşimler ise daha fazla zincir esnekliğe izin verir ve degradasyona yol açar [188]. Bu nedenle, çözünme süreci sırasında PLGA matrikslerinin bozunması, sürekli salımda çok önemli bir rol oynar. PLGA NP'lerin birincil bozunma mekanizması, laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) kısımları arasındaki ester bağlarının hidrolitik bozunmasını içerir. PLGA hidrolize uğrar ve tamamen çözünene kadar difüzyon ve degradasyon kombinasyonu yoluyla ilacın salımına izin verir [189]. NP'lerden ilaç salım profilleri incelendiğinde (Şekil 4.53 ve Şekil 4.54), NP yüzeyine adsorbe olan ilacın çözünme hızına bağlı olarak, ilk 8 saatte reseptör fazına salınmasına bağlı ani bir salım profili göstermiştir. Daha sonra gözlenen kontrollü salım ise, ilacın PLGA NP'lerin daha iç kısımlarından difüze olarak ortama salınması sonucu daha yavaş bir salım profili göstermesine dayandırılmıştır.



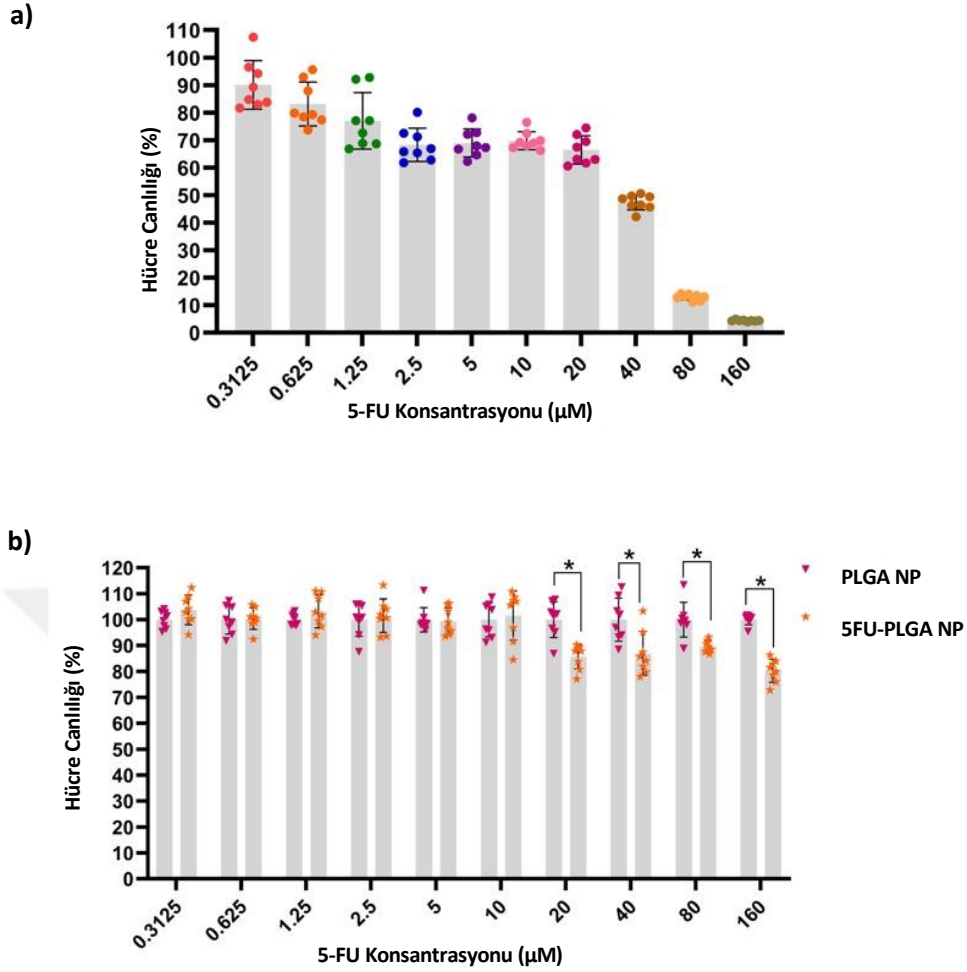
Şekil 4.54. %20 5FU yüklü PLGA NP'lerden kümülatif 5FU salım profili (TFR=15 mL/dk, FRR=1:3 FRR).

4.11. 5FU-PLGA NP'lerin Hücresel Toksisitesi

%1 5FU yüklü PLGA NP'lerin (TFR=15 mL/dk, FRR=1:3) A-431 hücrelerine karşı doza bağlı toksisitesini araştırmak için serbest 5-FU, PLGA NP ve 5FU-PLGA NP'ler A-431 hücrelerine uygulanmıştır. 72 saat sonra, hücre canlılığı MTT ile ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.55'de sunulmuştur. Hem serbest 5FU hem de 5FU-PLGA NP'ler doza bağlı hücresel toksisite göstermiştir. Serbest 5FU'nun 20 µM'den büyük konsantrasyonlarında A-431 hücre canlılığı dramatik olarak azalmış ve IC₅₀ değerine 40 µM'da ulaşılmıştır (Şekil 4.55). Öte yandan, 10 µM'den küçük konsantrasyonlarda 5FU-PLGA NP'lerin hücre canlılığını düşürmediği görülmüştür ($p > 0.05$). 5FU-PLGA NP'lerin daha yüksek konsantrasyonlarında hücre canlılığı önemli ölçüde azalmış; ≥ 20 µM konsantrasyonlarda %80 canlılık gözlenmiştir (Şekil 4.55b). Serbest 5-FU ve 5FU-PLGA NP'lerin aynı konsantrasyonlardaki hücre canlılıkları karşılaştırıldığında, özellikle 20 µM'den büyük konsantrasyonlarda, serbest 5FU'nun 5FU-PLGA NP'lere göre cilt kanseri hücreleri üzerinde daha toksik olduğu görülmüştür. Guimarães ve arkadaşları, 5FU yüklü sülfadiazin-dekore edilmiş PLGA NP'leri üretmişlerdir. Bu NP'leri kanser ve kanser

olmayan hücreler üzerinde uygulamışlardır. 5-FU yüklü PLGA NP'lerin hücre tipine ve doza bağlı toksisiteye sahip olduğunu ve Caco-2 hücrelerinin A-431 hücrelerinden daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Uygulanan 5FU yüklü PLGA NP'ler için 72 saat sonra 50, 25 ve 12.5 µg/mL 5FU'da A-431 hücrelerinin canlılığının yaklaşık %80 olduğu hesaplanmıştır. Serbest 5FU için aynı konsantrasyonlarda bu oranın %40'tan az olduğu görülmüştür [190]. Literatürdeki bu çalışmaya benzer şekilde, bu tez çalışmasında 5FU-PLGA NP'lerin 20 µM 'den büyük konsantrasyonları için hücre canlılığı %80 olarak hesaplanmış; 40 µM serbest 5FU içinse bu oranın yaklaşık %50 olduğu görülmüştür. Ayrıca, PLGA NP'lerden etken maddenin 2 saat sonra çeşitli kanser hücreleri tarafından hücre içine alımları yaklaşık %2 olduğu bulunmuştur [191]. Bu durumun, 5FU-PLGA NP'lerin daha düşük hücresel toksisite göstermelerinin nedeni olabileceği düşünülmektedir.

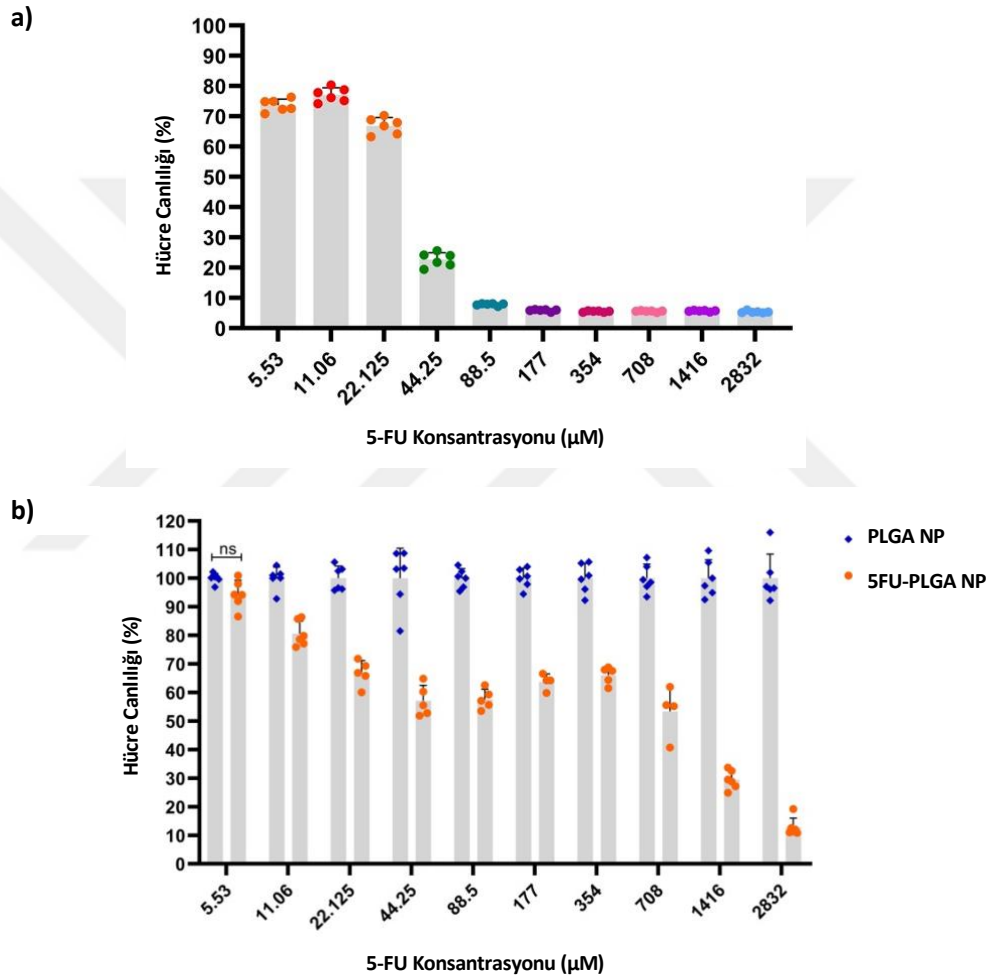
72 saat sonra test edilen konsantrasyonlarda 5FU-PLGA NP'lerin hücre canlılığı, 5FU'nun PLGA NP'lerinden uzun süreli salımı nedeniyle serbest 5FU'nunkinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Salım sonuçlarına göre (Şekil 4.53), PLGA NP'lerinden salınan 5FU'nun kümülatif miktarı 3 gün sonra yaklaşık olarak 1.26 µg/mL'dir. Bu değer serbest 5FU'nun aynı zaman aralığındaki cilt kanseri hücreleri için kullanımı için gereken IC50 konsantrasyonundan daha düşüktür. Klinik vakalarda, skuamöz hücreli karsinoma intralezyonel enjeksiyon için 50 mg/mL (384,6 mM) 5FU kullanılmaktadır. Bu çalışmada test edilen konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında, yukarıda bahsedilen klinik doz, hazırlanan 5FU yüklü PLGA NP'ler kullanılarak ulaşılamayacak kadar yüksek olduğu açıktır [192]. Bununla birlikte, daha önce de tartışıldığı gibi, geleneksel kemoterapide 5FU'nun klinik dozunun birçok yan etkisi vardır. Sonuç olarak %1 5FU yüklü PLGA NP'lerin düşük miktarda ilaç salımı nedeniyle IC50 değerine ulaşamamıştır. Ancak bu NP'ler fototermal tedavi gibi çeşitli kombine tedavileriyle birleştirilerek daha etkin bir tedavi için kullanılabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 4.55. Serbest 5-FU (a) ve %1 5FU yüklü PLGA NP'lerin (b) 72 saat sonra A-431 hücrelerine karşı doza bağlı hücresel toksisitesi. Her grup için veriler sembollerle temsil edilmiş ve (*) $p < 0.05$ 'i temsil etmektedir.

IC₅₀ değerine ulaşmak ve 5FU yükleme miktarının hücresel toksisite üzerine etkisini değerlendirmek için %20 5FU yüklü, TFR=15 mL/dk ve FRR=1:3 proses koşullarında üretilen PLGA NP'lerin ve serbest 5-FU'nun doza bağlı toksisite araştırmaları yürütülmüştür. NP'lerin ve serbest 5-FU'nun hücrelerle 72 saat inkübasyonun ardından, hücre canlılığı MTT ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.56a'da gösterildiği gibi, serbest 5FU'nun 44.25 μM ve üzeri değerlerinde IC₅₀ değerinin altında bir hücre canlılığı elde edilmiştir. Bu konsantrasyonun altındaki değerlerde hücre canlılığı %70-80 olarak bulunmuştur. Kontrol olarak kullanılan PLGA NP'lerin ise hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi görülmemiştir (Şekil 4.56b). 5FU-PLGA NP'lerin 5.5 μM'dan daha

yüksek konsantrasyonlarında, konsantrasyondaki artışa bağlı olarak hücre canlılığını kademeli olarak azalttığı görülmüştür ($p<0.05$). 5FU-PLGA NP'ler için IC₅₀ değeri 708 μ M olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.56b). Serbest 5FU ve 5FU-PLGA NP'lerin aynı konsantrasyonlardaki hücre canlılıkları karşılaştırıldığında, özellikle 20 μ M'den büyük konsantrasyonlarda, serbest 5-FU'nun 5FU-PLGA NP'lere göre cilt kanseri hücreleri üzerinde daha toksik etki yarattığı görülmüştür.



Şekil 4.56. Serbest 5FU'nun (a) ve %20 5FU yüklü PLGA-NP'lerin (b), 72 saat sonra A-431 hücrelerine karşı doza bağlı hücresel toksisitesi. Her grup için veriler sembollerle temsil edilmiş ve ns $p>0.05$ 'i temsil etmektedir.

5. YORUM

Farmasötik amaçla üretilen nanoterapötiklerin geleneksel yöntemlerle üretimi homojenizasyon, santrifüjleme, çözücü buharlaştırma ve sterilizasyon gibi zahmetli, zaman alıcı ve çok adımlı süreçleri içermektedir. Laboratuvar ölçeğinde bu süreçlerin yönetilmesi daha kolayken; NP'lerin büyük ölçekte düşük maliyetli, sağlam ve tekrarlanabilir üretimleri zordur. Ayrıca arzu edilen terapötik sonuçları alabilmek için istenilen boyut, şekil, yüzey özelliklerine sahip NP'lerin kontrollü üretimleri çoğu ilaç üretim tesisinde elverişli değildir. Bu tip üretimlerde her bir adım deneyimli personelce kontrol edilmektedir. Bu durum, nanoterapötiklerin laboratuvar ölçeğinden klinik uygulamalara geçişini sınırlamaktadır [193, 194].

Bir süre önce, ilaç üretiminin geliştirilmesi amacıyla FDA, parti (batch) bazlı üretimden sürekli (continuous) üretim sürecine geçişi teşvik etmiştir. Bu girişimin temel amacı, daha sağlam ve verimli sistemlerle yüksek kaliteli ilaç üretilmesidir. Sürekli üretim, entegre operasyon ve kontrol sağlayarak; güvenlik artışına, maliyetlerin azalmasına ve daha hızlı operasyona olanak tanır [194-196]. Bu bağlamda, mikroakışkan platformlar, üstün performansları ve kontrolleri, ölçeklenebilirlikleri ve sağlamlıkları nedeniyle ön plana çıkmaktadırlar [109, 194]. Birden fazla işlem adımın basitleştirilmesi, sistemin artan kontrol ve hatta in-line analiz yetenekleri sayesinde mikroakışkanlar sürekli üretim sürecinde önemli avantajlar sunar. NP oluşumu için belirli bir otomasyon seviyesi ve insan müdahalesinin azalması nedeniyle daha tekrarlanabilir bir üretim gerçekleştirilebilir. Ayrıca, sistem boyunca sürekli akış kullanımı, ürün kalitesinin verimli bir şekilde izlenmesini sağlayarak partiler arası değişkenliği ve parti bazlı üretimi tamamen ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir [194, 197, 198]. Toroidal mikromikser, kanalların paralelleştirilmesine gerek kalmadan tek bir çiple laboratuvarından kliniğe hızlı geçişini sağlayan bir üretim yolu olması sebebiyle sürekli üretim süreci için büyük umut vaat etmektedir. Ucuz fabrikasyonları, paralelleştirilmenin getirdiği ek ekipman gereksinimini minimize eden doğası ve yüksek üretim kapasiteleriyle Toroidal mikromikser sistemler, NP üretimi için cazip bir cihaz haline gelmiştir. Ayrıca Toroidal mikromikserin güçlü, esnek ve güvenilir karıştırma yetenekleri, optimize edilmiş işlem parametreleri ile istenilen boyutta, son derece monodispers yapıda ve sürekli salım profiline sahip stabil NP'lerin üretilmesine yol açar. Toroidal sistemin bu eşsiz yapısı nedeniyle gelecekte ilaç üretim tesislerinde kullanılabileceği ön görülmektedir.

Bu tez kapsamında, hem laboratuvar hem de büyük ölçekli üretimin, tek tip boyut dağılımına ($PDI < 0.15$) ve yaklaşık 100 ila 150 nm arasında değişen boyutlara sahip PLGA NP'lerin ve 5FU yüklü PLGA NP'lerin toroidal tasarımlı bir mikroakışkan çip ile üretilebileceği gösterilmiştir. Proses parametreleri (TFR ve FRR) ve birbirleri arasındaki etkileşimler (TFRxFRR, TFRxTFR, FRRxFRR), Deney Tasarımı (DoE) kullanılarak NP'lerin boyutu, zeta potansiyeli, PDI ve %EE üzerindeki etkileri açısından incelenmiş ve bunları tanımlamak için matematiksel modeller geliştirilmiştir. Buna göre, büyük ölçüde TFR'nin 5FU-PLGA NP'lerin ve PLGA NP'lerin fizikokimyasal özelliklerini etkilediği bulunmuştur. Özellikle, TFR 5 ila 15 mL/dk arasında arttıkça, NP'lerin ortalama çapı yaklaşık 150 ila 100 nm arasında azalmıştır. FRR orta değerdeyken, ortalama boyut en yüksek değerlere ulaşmıştır. Üretilen PLGA NP'lerin %50'sinin zeta potansiyeli -55 ila -60 mV arasında değişirken; 5FU-PLGA NP'lerin %50'sinin zeta potansiyeli -60 mV'den yüksek olduğu görülmüştür. Karıştırma hızı ve santrifüj kuvvetine bağlı olan güçlü karıştırma sayesinde toroidal mikroakışkan sistem, enkapsülasyon verimliliğini etkilemeden fizikokimyasal özelliklerin hassas bir şekilde kontrol edilmesi sağlamıştır. 5FU PLGA NP'lere başarılı bir şekilde enkapsüle edilerek, *in vitro* ortamda uzun süreli salımı gerçekleşmiştir. Kinetik sonuçlar, mikroakışkan tabanlı PLGA NP'lerden 5FU salımının Higuchi kinetik modeliyle uyumlu olduğunu göstermiştir. 5FU-PLGA NP'lerin sürekli salım profili, hücre kültürü sonuçlarına da yansımıştır. Üretilen bu formülasyonun serbest 5FU'nun toksik yan etkilerini aşmak ve antikanser ilaç tedavisini iyileştirmek için iyi bir aday olabileceği düşünülmektedir. NP'ler santrifüjlemenin ardından ve 3 aylık bir süreden sonra bile stabilitelerini korumaya devam etmişlerdir. Ayrıca, toroidal tasarımda mevcut mikromikserlere kıyasla büyük geometrileri nedeniyle, NP üretimi sırasında herhangi bir kanal tıkanması sorunuyla karşılaşılmamıştır.

Bu çalışmada model olarak hidrofilik bir ilaç olan 5FU'nun kullanılmasıyla elde edilen sonuçların, çeşitli hidrofilik ilaçların istenilen fizikokimyasal özelliklere sahip PLGA NP'lere enkapsülasyonuna ışık tutacağı düşünülmektedir. Stabil NP'lerden sürekli ilaç salımı, uzun vadeli kanser tedavisi için umut verici bir terapötik yaklaşım sunmaktadır ve geleneksel çoklu dozlama rejimlerle ilişkili zorlukları aşmaktadır. NP'lerden sürekli salım dozaj sıklığını azaltarak, hastaların yaşam kalitesini artırabilir; ilaç yaşam döngüsü yönetimini optimize edebilir ve dalgalanan ilaç seviyelerini en aza indirerek uzun süreli semptomların rahatlatılması sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71 (2021) 209-249.
- [2] L. Dal Maso, C. Panato, A. Tavilla, S. Guzzinati, D. Serraino, S. Mallone, L. Botta, O. Boussari, R. Capocaccia, M. Colonna, Cancer cure for 32 cancer types: results from the EUROCARE-5 study, *International Journal of Epidemiology*, 49 (2020) 1517-1525.
- [3] D. Albano, M. Benenati, A. Bruno, F. Bruno, M. Calandri, D. Caruso, D. Cozzi, R. De Robertis, F. Gentili, I. Grazzini, Imaging side effects and complications of chemotherapy and radiation therapy: a pictorial review from head to toe, *Insights into Imaging*, 12 (2021) 76.
- [4] H. Ragelle, F. Danhier, V. Préat, R. Langer, D.G. Anderson, Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures, *Expert Opin Drug Deliv*, 14 (2017) 851-864.
- [5] Y. Min, J.M. Caster, M.J. Eblan, A.Z. Wang, Clinical Translation of Nanomedicine, *Chem Rev*, 115 (2015) 11147-11190.
- [6] L. Zhang, Q. Chen, Y. Ma, J. Sun, Microfluidic Methods for Fabrication and Engineering of Nanoparticle Drug Delivery Systems, *ACS Applied Bio Materials*, 3 (2020) 107-120.
- [7] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161 (2012) 505-522.
- [8] A. Choi, K.D. Seo, D.W. Kim, B.C. Kim, D.S. Kim, Recent advances in engineering microparticles and their nascent utilization in biomedical delivery and diagnostic applications, *Lab on a Chip*, 17 (2017) 591-613.
- [9] Y. Huang, C. Liu, Q. Feng, J. Sun, Microfluidic synthesis of nanomaterials for biomedical applications, *Nanoscale Horizons*, (2023).

- [10] S. Gimondi, H. Ferreira, R.L. Reis, N.M. Neves, Microfluidic Devices: A Tool for Nanoparticle Synthesis and Performance Evaluation, *ACS Nano*, 17 (2023) 14205-14228.
- [11] A. Giorello, A. Nicastro, C.L.A. Berli, Microfluidic Platforms for the Production of Nanoparticles at Flow Rates Larger Than One Liter Per Hour, *Advanced Materials Technologies*, 7 (2022) 2101588.
- [12] S. Yadavali, D. Lee, D. Issadore, Robust Microfabrication of Highly Parallelized Three-Dimensional Microfluidics on Silicon, *Sci Rep*, 9 (2019) 12213.
- [13] D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, E. Stride, C. Nastruzzi, Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors, *Sci Rep*, 6 (2016) 25876.
- [14] C. Webb, N. Forbes, C.B. Roces, G. Anderluzzi, G. Lou, S. Abraham, L. Ingalls, K. Marshall, T.J. Leaver, J.A. Watts, J.W. Aylott, Y. Perrie, Using microfluidics for scalable manufacturing of nanomedicines from bench to GMP: A case study using protein-loaded liposomes, *International Journal of Pharmaceutics*, 582 (2020) 119266.
- [15] M. Ripoll, E. Martin, M. Enot, O. Robbe, C. Rapisarda, M.-C. Nicolai, A. Deliot, P. Tabeling, J.-R. Authelin, M. Nakach, P. Wils, Optimal self-assembly of lipid nanoparticles (LNP) in a ring micromixer, *Sci Rep*, 12 (2022) 9483.
- [16] A. Wild, T. Leaver, R.J. Taylor, Bifurcating mixers and methods of their use and manufacture, Google Patents, 2018.
- [17] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*, 442 (2006) 368-373.
- [18] S.I. Hamdallah, R. Zoqlam, P. Erfle, M. Blyth, A.M. Alkilany, A. Dietzel, S. Qi, Microfluidics for pharmaceutical nanoparticle fabrication: The truth and the myth, *International Journal of Pharmaceutics*, 584 (2020) 119408.
- [19] J. Hwang, Y.H. Cho, M.S. Park, B.H. Kim, Microchannel Fabrication on Glass Materials for Microfluidic Devices, *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 20 (2019) 479-495.
- [20] L.-J. Pan, J.-W. Tu, H.-T. Ma, Y.-J. Yang, Z.-Q. Tian, D.-W. Pang, Z.-L. Zhang, Controllable synthesis of nanocrystals in droplet reactors, *Lab on a Chip*, 18 (2018) 41-56.

- [21] H. Shi, K. Nie, B. Dong, M. Long, H. Xu, Z. Liu, Recent progress of microfluidic reactors for biomedical applications, *Chemical Engineering Journal*, 361 (2019) 635-650.
- [22] W. Sun, Z. Luo, J. Lee, H.-J. Kim, K. Lee, P. Tebon, Y. Feng, M.R. Dokmeci, S. Sengupta, A. Khademhosseini, Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling, *Advanced Healthcare Materials*, 8 (2019) 1801363.
- [23] P. Sengupta, K. Khanra, A.R. Chowdhury, P. Datta, 4 - Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications, in: K. Pal, H.-B. Kraatz, A. Khasnobish, S. Bag, I. Banerjee, U. Kuruganti (Eds.) *Bioelectronics and Medical Devices*, Woodhead Publishing 2019, pp. 47-95.
- [24] C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton, H. Lu, Microfluidics for medical diagnostics and biosensors, *Chemical Engineering Science*, 66 (2011) 1490-1507.
- [25] E.I. Mancera-Andrade, A. Parsaeimehr, A. Arevalo-Gallegos, G. Ascencio-Favela, R. Parra Saldivar, Microfluidics technology for drug delivery: A review, *Front Biosci (Elite Ed)*, 10 (2018) 74-91.
- [26] W. Voon-Loong, N. Chin-Ang Isaac, T. Lui-Ruen Irene, L. Ci-Wei, Microfluidic Synthesis of Functional Materials as Potential Sorbents for Water Remediation and Resource Recovery, in: R. Yong (Ed.) *Advances in Microfluidic Technologies for Energy and Environmental Applications*, IntechOpen, Rijeka, 2020, pp. Ch. 3.
- [27] C. Carrell, A. Kava, M. Nguyen, R. Menger, Z. Munshi, Z. Call, M. Nussbaum, C. Henry, Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics, *Microelectronic Engineering*, 206 (2019) 45-54.
- [28] S. Sachdeva, R.W. Davis, A.K. Saha, Microfluidic Point-of-Care Testing: Commercial Landscape and Future Directions, *Front Bioeng Biotechnol*, 8 (2020) 602659.
- [29] L. Capretto, D. Carugo, S. Mazzitelli, C. Nastruzzi, X. Zhang, Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 1496-1532.
- [30] M. Abdelkarim, N.H. Abd Ellah, M. Elsabahy, M. Abdelgawad, S.A. Abouelmagd, Microchannel geometry vs flow parameters for controlling nanoprecipitation of polymeric nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 611 (2021) 125774.

- [31] Y. Liu, L. Sun, H. Zhang, L. Shang, Y. Zhao, Microfluidics for Drug Development: From Synthesis to Evaluation, *Chemical Reviews*, 121 (2021) 7468-7529.
- [32] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, A.P. Lee, Droplet microfluidics, *Lab on a Chip*, 8 (2008) 198-220.
- [33] W.J. Duncanson, T. Lin, A.R. Abate, S. Seiffert, R.K. Shah, D.A. Weitz, Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release, *Lab on a Chip*, 12 (2012) 2135-2145.
- [34] C.-L. Mou, X.-J. Ju, L. Zhang, R. Xie, W. Wang, N.-N. Deng, J. Wei, Q. Chen, L.-Y. Chu, Monodisperse and Fast-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels with Open-Celled Porous Structure, *Langmuir*, 30 (2014) 1455-1464.
- [35] C.-X. Zhao, A.P. Middelberg, Two-phase microfluidic flows, *Chemical Engineering Science*, 66 (2011) 1394-1411.
- [36] C.-X. Zhao, Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 1420-1446.
- [37] S. Damiani, U.B. Kompella, S.A. Damiani, R. Kodzius, Microfluidic Devices for Drug Delivery Systems and Drug Screening, *Genes*, 9 (2018) 103.
- [38] K.S. Elvira, F. Gielen, S.S.H. Tsai, A.M. Nightingale, Materials and methods for droplet microfluidic device fabrication, *Lab on a Chip*, 22 (2022) 859-875.
- [39] T.N.D. Trinh, H.D.K. Do, N.N. Nam, T.T. Dan, K.T.L. Trinh, N.Y. Lee, Droplet-Based Microfluidics: Applications in Pharmaceuticals, *Pharmaceuticals*, 16 (2023) 937.
- [40] F. Tian, L. Cai, C. Liu, J. Sun, Microfluidic technologies for nanoparticle formation, *Lab on a Chip*, 22 (2022) 512-529.
- [41] R. Karnik, F. Gu, P. Basto, C. Cannizzaro, L. Dean, W. Kyei-Manu, R. Langer, O.C. Farokhzad, Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles, *Nano Letters*, 8 (2008) 2906-2912.
- [42] D. Liu, H. Zhang, F. Fontana, J.T. Hirvonen, H.A. Santos, Current developments and applications of microfluidic technology toward clinical

translation of nanomedicines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128 (2018) 54-83.

[43] Y. Liu, G. Yang, Y. Hui, S. Ranaweera, C.-X. Zhao, Microfluidic Nanoparticles for Drug Delivery, *Small*, 18 (2022) 2106580.

[44] A. Giorello, A. Nicastro, C.L.A. Berli, Microfluidic Platforms for the Production of Nanoparticles at Flow Rates Larger Than One Liter Per Hour, *Advanced Materials Technologies*, n/a (2022) 2101588.

[45] A.D. Stroock, S.K.W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezić, H.A. Stone, G.M. Whitesides, Chaotic Mixer for Microchannels, *Science*, 295 (2002) 647-651.

[46] A. Dalili, E. Samiei, M. Hoorfar, A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: microfluidic approaches, *Analyst*, 144 (2019) 87-113.

[47] M. Bayareh, An updated review on particle separation in passive microfluidic devices, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 153 (2020) 107984.

[48] R. Nasiri, A. Shamloo, S. Ahadian, L. Amirifar, J. Akbari, M.J. Goudie, K. Lee, N. Ashammakhi, M.R. Dokmeci, D. Di Carlo, A. Khademhosseini, Microfluidic-Based Approaches in Targeted Cell/Particle Separation Based on Physical Properties: Fundamentals and Applications, *Small*, 16 (2020) 2000171.

[49] T.A. Crowley, V. Pizziconi, Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications, *Lab Chip*, 5 (2005) 922-929.

[50] X. Chen, D.F. Cui, C.C. Liu, H. Li, Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130 (2008) 216-221.

[51] Y.-H. Nam, S.-K. Lee, J.-H. Kim, J.-H. Park, PDMS membrane filter with nano-slit array fabricated using three-dimensional silicon mold for the concentration of particles with bacterial size range, *Microelectronic Engineering*, 215 (2019) 111008.

[52] T. Kumar, H. Ramachandraiah, S.N. Iyengar, I. Banerjee, G. Mårtensson, A. Russom, High throughput viscoelastic particle focusing and separation in spiral microchannels, *Sci Rep*, 11 (2021) 8467.

[53] D. Di Carlo, Inertial microfluidics, *Lab on a Chip*, 9 (2009) 3038-3046.

- [54] L.R. Huang, E.C. Cox, R.H. Austin, J.C. Sturm, Continuous particle separation through deterministic lateral displacement, *Science*, 304 (2004) 987-990.
- [55] M. Yamada, M. Nakashima, M. Seki, Pinched Flow Fractionation: Continuous Size Separation of Particles Utilizing a Laminar Flow Profile in a Pinched Microchannel, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 5465-5471.
- [56] V. Sebastián, K.F. Jensen, Nanoengineering a library of metallic nanostructures using a single microfluidic reactor, *Nanoscale*, 8 (2016) 15288-15295.
- [57] F. Mahmud, K.F. Tamrin, S. Mohamaddan, N. Watanabe, Effect of Thermal Energy and Ultrasonication on Mixing Efficiency in Passive Micromixers, *Processes*, 9 (2021) 891.
- [58] L. Lin, J. Zhang, X. Peng, Z. Wu, A.C.H. Coughlan, Z. Mao, M.A. Bevan, Y. Zheng, Opto-thermophoretic assembly of colloidal matter, *Science Advances*, 3 (2017) e1700458.
- [59] D.-Y. Kim, S.H. Jin, S.-G. Jeong, B. Lee, K.-K. Kang, C.-S. Lee, Microfluidic preparation of monodisperse polymeric microspheres coated with silica nanoparticles, *Sci Rep*, 8 (2018) 8525.
- [60] K.O. Rojek, M. Ćwiklińska, J. Kuczak, J. Guzowski, Microfluidic Formulation of Topological Hydrogels for Microtissue Engineering, *Chemical Reviews*, 122 (2022) 16839-16909.
- [61] D. Ferraro, Y. Lin, B. Teste, D. Talbot, L. Malaquin, S. Descroix, A. Abou-Hassan, Continuous chemical operations and modifications on magnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles confined in nanoliter droplets for the assembly of fluorescent and magnetic SiO₂@ γ -Fe₂O₃, *Chemical Communications*, 51 (2015) 16904-16907.
- [62] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, D. Miklavčič, Membrane Electroporation and Electroporabilization: Mechanisms and Models, *Annu Rev Biophys*, 48 (2019) 63-91.
- [63] L. Rao, B. Cai, L.L. Bu, Q.Q. Liao, S.S. Guo, X.Z. Zhao, W.F. Dong, W. Liu, Microfluidic Electroporation-Facilitated Synthesis of Erythrocyte Membrane-Coated Magnetic Nanoparticles for Enhanced Imaging-Guided Cancer Therapy, *ACS Nano*, 11 (2017) 3496-3505.

- [64] I. Lentacker, I. De Cock, R. Deckers, S.C. De Smedt, C.T.W. Moonen, Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 72 (2014) 49-64.
- [65] J.N. Belling, L.K. Heidenreich, Z. Tian, A.M. Mendoza, T.-T. Chiou, Y. Gong, N.Y. Chen, T.D. Young, N. Wattanatorn, J.H. Park, L. Scarabelli, N. Chiang, J. Takahashi, S.G. Young, A.Z. Stieg, S. De Oliveira, T.J. Huang, P.S. Weiss, S.J. Jonas, Acoustofluidic sonoporation for gene delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (2020) 10976-10982.
- [66] C. Liu, W. Zhang, Y. Li, J. Chang, F. Tian, F. Zhao, Y. Ma, J. Sun, Microfluidic Sonication To Assemble Exosome Membrane-Coated Nanoparticles for Immune Evasion-Mediated Targeting, *Nano Letters*, 19 (2019) 7836-7844.
- [67] S. Wang, Q. Xu, Y. Cai, Q. Wang, Y. Liu, D. Wang, Biological particle separation techniques based on microfluidics, *Interdisciplinary Medicine*, 2 (2024) e20240003.
- [68] C. Yang, Z. Li, P. Li, W. Shao, P. Bai, Y. Cui, Acoustic particle sorting by integrated micromachined ultrasound transducers on polymer-based microchips, 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), 2017, pp. 1-4.
- [69] C. Devendran, D.J. Collins, A. Neild, The role of channel height and actuation method on particle manipulation in surface acoustic wave (SAW)-driven microfluidic devices, *Microfluidics and Nanofluidics*, 26 (2022) 9.
- [70] G. Simon, Y. Pailhas, M.A.B. Andrade, J. Reboud, J. Marques-Hueso, M.P.Y. Desmulliez, J.M. Cooper, M.O. Riehle, A.L. Bernassau, Particle separation in surface acoustic wave microfluidic devices using reprogrammable, pseudo-standing waves, *Applied Physics Letters*, 113 (2018).
- [71] A. Atajanov, A. Zhbanov, S. Yang, Sorting and manipulation of biological cells and the prospects for using optical forces, *Micro and Nano Systems Letters*, 6 (2018) 2.
- [72] Y.L. Chen, H.R. Jiang, Particle concentrating and sorting under a rotating electric field by direct optical-liquid heating in a microfluidics chip, *Biomicrofluidics*, 11 (2017) 034102.

- [73] Y.-C. Chung, C.-M. Wu, S.-H. Lin, Particles Sorting in Micro Channel Using Designed Micro Electromagnets of Magnetic Field Gradient, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 407 (2016) 209-217.
- [74] J. Nilsson, M. Evander, B. Hammarström, T. Laurell, Review of cell and particle trapping in microfluidic systems, *Analytica Chimica Acta*, 649 (2009) 141-157.
- [75] J.E. Molloy, M.J. Padgett, Lights, action: Optical tweezers, *Contemporary Physics*, 43 (2002) 241-258.
- [76] M.A.M. Gijs, Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications, *Microfluidics and Nanofluidics*, 1 (2004) 22-40.
- [77] V. Faustino, S.O. Catarino, R. Lima, G. Minas, Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review, *J Biomech*, 49 (2016) 2280-2292.
- [78] B.K. Gale, A.R. Jafek, C.J. Lambert, B.L. Goenner, H. Moghimifam, U.C. Nze, S.K. Kamarapu, A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects, *Inventions*, 3 (2018) 60.
- [79] I. Miranda, A. Souza, P. Sousa, J. Ribeiro, E.M.S. Castanheira, R. Lima, G. Minas, Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review, *Journal of Functional Biomaterials*, 13 (2022) 2.
- [80] S.M. Scott, Z. Ali, Fabrication Methods for Microfluidic Devices: An Overview, *Micromachines*, 12 (2021) 319.
- [81] Y. Alapan, M.N. Hasan, R. Shen, U.A. Gurkan, Three-Dimensional Printing Based Hybrid Manufacturing of Microfluidic Devices, *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 6 (2015).
- [82] F. Kotz, M. Mader, N. Dellen, P. Risch, A. Kick, D. Helmer, B.E. Rapp, Fused Deposition Modeling of Microfluidic Chips in Polymethylmethacrylate, *Micromachines (Basel)*, 11 (2020).
- [83] A.G. Niculescu, C. Chircov, A.C. Bîrcă, A.M. Grumezescu, Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review, *Int J Mol Sci*, 22 (2021).
- [84] C. Liu, *Foundations of MEMS*, Pearson Education Asia 2012.

- [85] A. SINGH, C.K. MALEK, S.K. KULKARNI, DEVELOPMENT IN MICROREACTOR TECHNOLOGY FOR NANOPARTICLE SYNTHESIS, *International Journal of Nanoscience*, 09 (2010) 93-112.
- [86] J.B. Nielsen, R.L. Hanson, H.M. Almughamsi, C. Pang, T.R. Fish, A.T. Woolley, *Microfluidics: Innovations in Materials and Their Fabrication and Functionalization*, *Anal Chem*, 92 (2020) 150-168.
- [87] H. Zhang, J. Yang, R. Sun, S. Han, Z. Yang, L. Teng, *Microfluidics for nano-drug delivery systems: From fundamentals to industrialization*, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13 (2023) 3277-3299.
- [88] K. Ren, J. Zhou, H. Wu, *Materials for microfluidic chip fabrication*, *Acc Chem Res*, 46 (2013) 2396-2406.
- [89] F. Kotz, M. Mader, N. Dellen, P. Risch, A. Kick, D. Helmer, B.E. Rapp, *Fused Deposition Modeling of Microfluidic Chips in Polymethylmethacrylate*, *Micromachines*, 11 (2020) 873.
- [90] S.B. Campbell, Q. Wu, J. Yazbeck, C. Liu, S. Okhovatian, M. Radisic, *Beyond Polydimethylsiloxane: Alternative Materials for Fabrication of Organ-on-a-Chip Devices and Microphysiological Systems*, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7 (2021) 2880-2899.
- [91] S. Liao, Y. He, Y. Chu, H. Liao, Y. Wang, *Solvent-resistant and fully recyclable perfluoropolyether-based elastomer for microfluidic chip fabrication*, *Journal of Materials Chemistry A*, 7 (2019) 16249-16256.
- [92] M.A. Mofazzal Jahromi, A. Abdoli, M. Rahmanian, H. Bardania, M. Bayandori, S.M. Moosavi Basri, A. Kalbasi, A.R. Aref, M. Karimi, M.R. Hamblin, *Microfluidic Brain-on-a-Chip: Perspectives for Mimicking Neural System Disorders*, *Mol Neurobiol*, 56 (2019) 8489-8512.
- [93] B. Bruijns, A. Veciana, R. Tiggelaar, H. Gardeniers, *Cyclic Olefin Copolymer Microfluidic Devices for Forensic Applications*, *Biosensors (Basel)*, 9 (2019).
- [94] E.B. Strong, S.A. Schultz, A.W. Martinez, N.W. Martinez, *Fabrication of Miniaturized Paper-Based Microfluidic Devices (MicroPADs)*, *Sci Rep*, 9 (2019) 7.
- [95] A. Shakeri, N.A. Jarad, A. Leung, L. Soleymani, T.F. Didar, *Biofunctionalization of Glass- and Paper-Based Microfluidic Devices: A Review*, *Advanced Materials Interfaces*, 6 (2019) 1900940.

- [96] Q. Liu, Y. Lin, J. Xiong, L. Wu, X. Hou, K. Xu, C. Zheng, Disposable Paper-Based Analytical Device for Visual Speciation Analysis of Ag(I) and Silver Nanoparticles (AgNPs), *Anal Chem*, 91 (2019) 3359-3366.
- [97] Y. Zhang, J. Liu, H. Wang, Y. Fan, Laser-induced selective wax reflow for paper-based microfluidics, *RSC Advances*, 9 (2019) 11460-11464.
- [98] V. Soum, S. Park, A.I. Brilian, O.-S. Kwon, K. Shin, Programmable Paper-Based Microfluidic Devices for Biomarker Detections, *Micromachines*, 10 (2019) 516.
- [99] J. Atencia, D.J. Beebe, Controlled microfluidic interfaces, *Nature*, 437 (2005) 648-655.
- [100] K.K. Fleming Glass, E.K. Longmire, A. Hubel, OPTIMIZATION OF A MICROFLUIDIC DEVICE FOR DIFFUSION-BASED EXTRACTION OF DMSO FROM A CELL SUSPENSION, *Int J Heat Mass Transf*, 51 (2008) 5749-5757.
- [101] Q. Ma, J. Cao, Y. Gao, S. Han, Y. Liang, T. Zhang, X. Wang, Y. Sun, Microfluidic-mediated nano-drug delivery systems: from fundamentals to fabrication for advanced therapeutic applications, *Nanoscale*, 12 (2020) 15512-15527.
- [102] I. Baysal, S. Yabanoglu-Ciftci, Y. Tunc-Sarisozen, K. Ulubayram, G. Ucar, Interaction of selegiline-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with beta-amyloid fibrils, *J Neural Transm (Vienna)*, 120 (2013) 903-910.
- [103] E. Sari, Y. Tunc-Sarisozen, H. Mutlu, R. Shahbazi, G. Ucar, K. Ulubayram, ICAM-1 targeted catalase encapsulated PLGA-b-PEG nanoparticles against vascular oxidative stress, *J Microencapsul*, 32 (2015) 687-698.
- [104] K.Y. Hernández-Giottonini, R.J. Rodríguez-Córdova, C.A. Gutiérrez-Valenzuela, O. Peñuñuri-Miranda, P. Zavala-Rivera, P. Guerrero-Germán, A. Lucero-Acuña, PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters, *RSC Advances*, 10 (2020) 4218-4231.
- [105] A. Perez, R. Hernández, D. Velasco, D. Voicu, C. Mijangos, Poly (lactic-co-glycolic acid) particles prepared by microfluidics and conventional methods. Modulated particle size and rheology, *Journal of Colloid and Interface Science*, 441 (2015) 90-97.

- [106] A.M. Faheem, D.H. Abdelkader, 1 - Novel drug delivery systems, in: A. Seyfoddin, S.M. Dezfooli, C.A. Greene (Eds.) Engineering Drug Delivery Systems, Woodhead Publishing 2020, pp. 1-16.
- [107] Y. Kim, R. Langer, Microfluidics in Nanomedicine, Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine, pp. 127-152.
- [108] E.I. Mancera-Andrade, A. Parsaeimehr, A. Arevalo-Gallegos, G. Ascencio-Favela, R. Parra-Saldivar, Microfluidics technology for drug delivery: A review, FBE, 10 (2018) 74-91.
- [109] D. Liu, S. Cito, Y. Zhang, C.-F. Wang, T.M. Sikanen, H.A. Santos, A Versatile and Robust Microfluidic Platform Toward High Throughput Synthesis of Homogeneous Nanoparticles with Tunable Properties, Advanced Materials, 27 (2015) 2298-2304.
- [110] A. Sealy, Manufacturing moonshot: How Pfizer makes its millions of Covid-19 vaccine doses, CNN, 2021.
- [111] A. Mersmann, Crystallization and precipitation, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 38 (1999) 345-353.
- [112] R.J. Santos, M.M. Dias, J.C.B. Lopes, Mixing through half a century of chemical engineering, R. Dias, R. Lima, AA Martins, TM Mata (Eds.), (2012) 79-112.
- [113] M. Barzegar-Jalali, Kinetic analysis of drug release from nanoparticles, Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 11 (2008) 167-177.
- [114] J. Villermaux, R. David, Recent advances in the understanding of micromixing phenomena in stirred reactors, Chemical Engineering Communications, 21 (1983) 105-122.
- [115] Z. Mao, C. Yang, Micro-mixing in chemical reactors: A perspective, Chinese Journal of Chemical Engineering, 25 (2017) 381-390.
- [116] V.K.L. Mer, Nucleation in Phase Transitions, Industrial & Engineering Chemistry, 44 (1952) 1270-1277.
- [117] D. Horn, J. Rieger, Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase-Theory, Experiment, and Use, Angew Chem Int Ed Engl, 40 (2001) 4330-4361.

- [118] H. Haberkorn, D. Franke, T. Frechen, W. Goesele, J. Rieger, Early stages of particle formation in precipitation reactions—quinacridone and boehmite as generic examples, *Journal of Colloid and Interface Science*, 259 (2003) 112-126.
- [119] A.A. Thorat, S.V. Dalvi, Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective, *Chemical Engineering Journal*, 181-182 (2012) 1-34.
- [120] D. Kashchiev, *Nucleation*, Elsevier 2000.
- [121] N.T.K. Thanh, N. Maclean, S. Mahiddine, Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 7610-7630.
- [122] R. Boistelle, J.P. Astier, Crystallization mechanisms in solution, *Journal of Crystal Growth*, 90 (1988) 14-30.
- [123] P.G. Vekilov, *Nucleation, Crystal Growth & Design*, 10 (2010) 5007-5019.
- [124] B. Sinha, R.H. Müller, J.P. Möschwitzer, Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size, *International Journal of Pharmaceutics*, 453 (2013) 126-141.
- [125] G. Cao, *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*, Imperial college press 2004.
- [126] T. Panagiotou, S.V. Mesite, R.J. Fisher, Production of Norfloxacin Nanosuspensions Using Microfluidics Reaction Technology through Solvent/Antisolvent Crystallization, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (2009) 1761-1771.
- [127] D. Xia, P. Quan, H. Piao, H. Piao, S. Sun, Y. Yin, F. Cui, Preparation of stable nitrendipine nanosuspensions using the precipitation–ultrasonication method for enhancement of dissolution and oral bioavailability, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40 (2010) 325-334.
- [128] H.S.M. Ali, P. York, N. Blagden, Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors, *International Journal of Pharmaceutics*, 375 (2009) 107-113.
- [129] V.B. Patravale, A.A. Date, R.M. Kulkarni, Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56 (2004) 827-840.

- [130] C. DETROJA, S. CHAVHAN, K. SAWANT, Enhanced Antihypertensive Activity of Candesartan Cilexetil Nanosuspension: Formulation, Characterization and Pharmacodynamic Study, *Scientia Pharmaceutica*, 79 (2011) 635-652.
- [131] J. Möschwitzer, G. Achleitner, H. Pomper, R.H. Müller, Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2004) 615-619.
- [132] Y. Wang, Y. Zheng, L. Zhang, Q. Wang, D. Zhang, Stability of nanosuspensions in drug delivery, *J Control Release*, 172 (2013) 1126-1141.
- [133] L. Lindfors, P. Skantze, U. Skantze, M. Rasmusson, A. Zackrisson, U. Olsson, Amorphous Drug Nanosuspensions. 1. Inhibition of Ostwald Ripening, *Langmuir*, 22 (2006) 906-910.
- [134] J. Ma, S.M.-Y. Lee, C. Yi, C.-W. Li, Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications – a review, *Lab on a Chip*, 17 (2017) 209-226.
- [135] J. Gradl, H.-C. Schwarzer, F. Schwertfirm, M. Manhart, W. Peukert, Precipitation of nanoparticles in a T-mixer: Coupling the particle population dynamics with hydrodynamics through direct numerical simulation, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 45 (2006) 908-916.
- [136] M.E. Matteucci, M.A. Hotze, K.P. Johnston, R.O. Williams, Drug Nanoparticles by Antisolvent Precipitation: Mixing Energy versus Surfactant Stabilization, *Langmuir*, 22 (2006) 8951-8959.
- [137] K. Chari, B. Antalek, J. Kowalczyk, R.S. Eachus, T. Chen, Polymer–Surfactant Interaction and Stability of Amorphous Colloidal Particles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 103 (1999) 9867-9872.
- [138] J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F.X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A.F. Radovic-Moreno, R. Langer, O.C. Farokhzad, Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery, *Biomaterials*, 28 (2007) 869-876.
- [139] S.V. Dalvi, R.N. Dave, Controlling Particle Size of a Poorly Water-Soluble Drug Using Ultrasound and Stabilizers in Antisolvent Precipitation, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (2009) 7581-7593.

- [140] Z. Wang, J.-F. Chen, Y. Le, Z.-G. Shen, J. Yun, Preparation of Ultrafine Beclomethasone Dipropionate Drug Powder by Antisolvent Precipitation, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46 (2007) 4839-4845.
- [141] M.M. Hasani-Sadrabadi, E. Dashtimoghadam, G. Bahlakeh, F.S. Majedi, H. Keshvari, J.J. Van Dersarl, A. Bertsch, A. Panahifar, P. Renaud, L. Tayebi, M. Mahmoudi, K.I. Jacob, On-chip synthesis of fine-tuned bone-seeking hybrid nanoparticles, *Nanomedicine (Lond)*, 10 (2015) 3431-3449.
- [142] H. Zhao, J. Wang, H. Zhang, Z. Shen, J. Yun, J. Chen, Facile Preparation of Danazol Nanoparticles by High-Gravity Anti-solvent Precipitation (HGAP) Method, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17 (2009) 318-323.
- [143] B.Y. Gajera, D.A. Shah, R.H. Dave, Development of an amorphous nanosuspension by sonoprecipitation-formulation and process optimization using design of experiment methodology, *International Journal of Pharmaceutics*, 559 (2019) 348-359.
- [144] S. Verma, S. Kumar, R. Gokhale, D.J. Burgess, Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening, *International Journal of Pharmaceutics*, 406 (2011) 145-152.
- [145] X. Zhang, Q. Xia, N. Gu, Preparation of All-Trans Retinoic Acid Nanosuspensions Using a Modified Precipitation Method, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32 (2006) 857-863.
- [146] Z.-B. Zhang, Z.-G. Shen, J.-X. Wang, H. Zhao, J.-F. Chen, J. Yun, Nanonization of Megestrol Acetate by Liquid Precipitation, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (2009) 8493-8499.
- [147] H. Zhao, J.-X. Wang, Q.-A. Wang, J.-F. Chen, J. Yun, Controlled Liquid Antisolvent Precipitation of Hydrophobic Pharmaceutical Nanoparticles in a Microchannel Reactor, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46 (2007) 8229-8235.
- [148] X. Chen, T.J. Young, M. Sarkari, R.O. Williams, K.P. Johnston, Preparation of cyclosporine A nanoparticles by evaporative precipitation into aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (2002) 3-14.
- [149] J.Y. Zhang, Z.G. Shen, J. Zhong, T.T. Hu, J.F. Chen, Z.Q. Ma, J. Yun, Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants, *Int J Pharm*, 323 (2006) 153-160.

- [150] H.X. Zhang, J.X. Wang, Z.B. Zhang, Y. Le, Z.G. Shen, J.F. Chen, Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process, *Int J Pharm*, 374 (2009) 106-113.
- [151] B. Van Eerdenbrugh, J. Vermant, J.A. Martens, L. Froyen, J. Van Humbeeck, P. Augustijns, G. Van den Mooter, A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals, *J Pharm Sci*, 98 (2009) 2091-2103.
- [152] S. Verma, B.D. Huey, D.J. Burgess, Scanning Probe Microscopy Method for Nanosuspension Stabilizer Selection, *Langmuir*, 25 (2009) 12481-12487.
- [153] J. Lee, S.-J. Lee, J.-Y. Choi, J.Y. Yoo, C.-H. Ahn, Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24 (2005) 441-449.
- [154] J.-Y. Choi, J.Y. Yoo, H.-S. Kwak, B. Uk Nam, J. Lee, Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions, *Current Applied Physics*, 5 (2005) 472-474.
- [155] I. Ghosh, S. Bose, R. Vippagunta, F. Harmon, Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth, *International Journal of Pharmaceutics*, 409 (2011) 260-268.
- [156] C.-L. Lo, S.-J. Lin, H.-C. Tsai, W.-H. Chan, C.-H. Tsai, C.-H.D. Cheng, G.-H. Hsiue, Mixed micelle systems formed from critical micelle concentration and temperature-sensitive diblock copolymers for doxorubicin delivery, *Biomaterials*, 30 (2009) 3961-3970.
- [157] H. Wang, Q. Pan, G.L. Rempel, Micellar nucleation differential microemulsion polymerization, *European Polymer Journal*, 47 (2011) 973-980.
- [158] NehirBT, USER MANUAL of U-uF-BM# Bifurcating Mixing Microfluidic Chips V.2, 2022.
- [159] D.C. Montgomery, Design and analysis of experiments, John Wiley & sons 2017.
- [160] E.R. Pike, B. McNally, Theory and design of photon correlation and light-scattering experiments, *Appl. Opt.*, 36 (1997) 7531-7538.
- [161] G.S. dos Reis, M. Wilhelm, T.C. de Almeida Silva, K. Rezwan, C.H. Sampaio, E.C. Lima, S.M.G.U. de Souza, The use of design of experiments for

the evaluation of the production of surface rich activated carbon from sewage sludge via microwave and conventional pyrolysis, *Applied Thermal Engineering*, 93 (2016) 590-597.

[162] M.V. Ratnam, C. Karthikeyan, K.N. Rao, V. Meena, Magnesium oxide nanoparticles for effective photocatalytic degradation of methyl red dye in aqueous solutions: optimization studies using response surface methodology, *Materials Today: Proceedings*, 26 (2020) 2308-2313.

[163] T. Golshani, E. Jorjani, S.C. Chelgani, S. Shafaei, Y.H. Nafechi, Modeling and process optimization for microbial desulfurization of coal by using a two-level full factorial design, *International Journal of Mining Science and Technology*, 23 (2013) 261-265.

[164] R.G. Maheshwari, S. Thakur, S. Singhal, R.P. Patel, M. Tekade, R.K. Tekade, Chitosan encrusted nonionic surfactant based vesicular formulation for topical administration of ofloxacin, *Science of Advanced Materials*, 7 (2015) 1163-1176.

[165] R.G. Maheshwari, R.K. Tekade, P.A. Sharma, G. Darwhekar, A. Tyagi, R.P. Patel, D.K. Jain, Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: a comparative assessment, *Saudi pharmaceutical journal*, 20 (2012) 161-170.

[166] M.J. Ahmed, S.K. Theydan, Optimization of microwave preparation conditions for activated carbon from Albizia lebbeck seed pods for methylene blue dye adsorption, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 105 (2014) 199-208.

[167] M. Behnke, A. Vollrath, L. Klepsch, B. Beringer-Siemers, S. Stumpf, J. A. Czaplewska, S. Hoeppener, O. Werz, U. S. Schubert, Optimized Encapsulation of the FLAP/PGES-1 Inhibitor BRP-187 in PVA-Stabilized PLGA Nanoparticles Using Microfluidics, *Polymers*, 12 (2020) 2751.

[168] J.G.J.L. Lebouille, R. Stepanyan, J.J.M. Slot, M.A. Cohen Stuart, R. Tuinier, Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460 (2014) 225-235.

[169] M.C. Operti, Y. Dölen, J. Keulen, E.A.W. van Dinther, C.G. Figdor, O. Tagit, Microfluidics-Assisted Size Tuning and Biological Evaluation of PLGA Particles, *Pharmaceutics*, 11 (2019).

[170] C.B. Roces, D. Christensen, Y. Perrie, Translating the fabrication of protein-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles from bench to scale-

independent production using microfluidics, *Drug Deliv Transl Res*, 10 (2020) 582-593.

[171] C.B. Roces, D. Christensen, Y. Perrie, Translating the fabrication of protein-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles from bench to scale-independent production using microfluidics, *Drug Delivery and Translational Research*, 10 (2020) 582-593.

[172] E. Chiesa, R. Dorati, T. Modena, B. Conti, I. Genta, Multivariate analysis for the optimization of microfluidics-assisted nanoprecipitation method intended for the loading of small hydrophilic drugs into PLGA nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 536 (2018) 165-177.

[173] J. Vandervoort, A. Ludwig, Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study, *Int J Pharm*, 238 (2002) 77-92.

[174] E. Chiesa, R. Dorati, T. Modena, B. Conti, I. Genta, Multivariate analysis for the optimization of microfluidics-assisted nanoprecipitation method intended for the loading of small hydrophilic drugs into PLGA nanoparticles, *Int J Pharm*, 536 (2018) 165-177.

[175] D. Desai, Y.A. Guerrero, V. Balachandran, A. Morton, L. Lyon, B. Larkin, D.E. Solomon, Towards a microfluidics platform for the continuous manufacture of organic and inorganic nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 35 (2021) 102402.

[176] M.C. Operti, D. Fecher, E.A.W. van Dinther, S. Grimm, R. Jaber, C.G. Figdor, O. Tagit, A comparative assessment of continuous production techniques to generate sub-micron size PLGA particles, *Int J Pharm*, 550 (2018) 140-148.

[177] A. Jahn, S.M. Stavis, J.S. Hong, W.N. Vreeland, D.L. DeVoe, M. Gaitan, Microfluidic Mixing and the Formation of Nanoscale Lipid Vesicles, *ACS Nano*, 4 (2010) 2077-2087.

[178] W. Li, Q. Chen, T. Baby, S. Jin, Y. Liu, G. Yang, C.-X. Zhao, Insight into drug encapsulation in polymeric nanoparticles using microfluidic nanoprecipitation, *Chemical Engineering Science*, 235 (2021) 116468.

[179] J.D. Robertson, L. Rizzello, M. Avila-Olias, J. Gaitzsch, C. Contini, M.S. Magoń, S.A. Renshaw, G. Battaglia, Purification of Nanoparticles by Size and Shape, *Scientific Reports*, 6 (2016) 27494.

- [180] M. Varani, G. Campagna, V. Bentivoglio, M. Serafinelli, M.L. Martini, F. Galli, A. Signore, Synthesis and biodistribution of ^{99m}Tc-labeled PLGA nanoparticles by microfluidic technique, *Pharmaceutics*, 13 (2021) 1769.
- [181] D. Santhanes, A. Wilkins, H. Zhang, R. John Aitken, M. Liang, Microfluidic formulation of lipid/polymer hybrid nanoparticles for plasmid DNA (pDNA) delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 627 (2022) 122223.
- [182] R. Rebollo, F. Oyouun, Y. Corvis, M.M. El-Hammadi, B. Saubamea, K. Andrieux, N. Mignet, K. Alhareth, Microfluidic Manufacturing of Liposomes: Development and Optimization by Design of Experiment and Machine Learning, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14 (2022) 39736-39745.
- [183] W. Huang, C. Zhang, Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation, *Biotechnology Journal*, 13 (2018) 1700203.
- [184] T.G. Park, Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition, *Biomaterials*, 16 (1995) 1123-1130.
- [185] A.A. Valencia-Lazcano, D. Hassan, M. Pourmadadi, A. shamsabadipour, R. Behzadmehr, A. Rahdar, D.I. Medina, A.M. Díez-Pascual, 5-Fluorouracil nano-delivery systems as a cutting-edge for cancer therapy, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 246 (2023) 114995.
- [186] M. Ghasemi Toudeshkchouei, P. Zahedi, A. Shavandi, Microfluidic-Assisted Preparation of 5-Fluorouracil-Loaded PLGA Nanoparticles as a Potential System for Colorectal Cancer Therapy, *Materials (Basel)*, 13 (2020).
- [187] C.E. Rapier, K.J. Shea, A.P. Lee, Investigating PLGA microparticle swelling behavior reveals an interplay of expansive intermolecular forces, *Scientific Reports*, 11 (2021) 14512.
- [188] M. Grassi, G. Grassi, Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems, *Curr Drug Deliv*, 2 (2005) 97-116.
- [189] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers (Basel)*, 3 (2011) 1377-1397.
- [190] P.P.G. Guimarães, S.R. Oliveira, G. De Castro Rodrigues, S.M.L. Gontijo, I.S. Lula, M.E. Cortés, Â.M.L. Denadai, R.D. Sinisterra, Development of

Sulfadiazine-Decorated PLGA Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil and Cell Viability, *Molecules*, 20 (2015) 879-899.

[191] S. Parveen, S.K. Sahoo, Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery, *European Journal of Pharmacology*, 670 (2011) 372-383.

[192] S. Kim, Y.R. Woo, S.H. Cho, J.D. Lee, H.S. Kim, Clinical Efficacy of 5-Fluorouracil and Bleomycin in Dermatology, *Journal of Clinical Medicine*, 13 (2024) 335.

[193] I.U. Khan, C.A. Serra, N. Anton, T.F. Vandamme, Production of nanoparticle drug delivery systems with microfluidics tools, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12 (2015) 547-562.

[194] A. Bohr, S. Colombo, H. Jensen, Chapter 15 - Future of microfluidics in research and in the market, in: H.A. Santos, D. Liu, H. Zhang (Eds.) *Microfluidics for Pharmaceutical Applications*, William Andrew Publishing 2019, pp. 425-465.

[195] C. Badman, B.L. Trout, Achieving Continuous Manufacturing May 20–21 2014 Continuous Manufacturing Symposium, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (2015) 779-780.

[196] S. Lee, T.F. O'Connor, X. Yang, C.N. Cruz, S. Chatterjee, R.D. Madurawe, C.M.V. Moore, L.X. Yu, J. Woodcock, Modernizing Pharmaceutical Manufacturing: from Batch to Continuous Production, *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 10 (2015) 191-199.

[197] L. Zhang, G. Niu, N. Lu, J. Wang, L. Tong, L. Wang, M.J. Kim, Y. Xia, Continuous and Scalable Production of Well-Controlled Noble-Metal Nanocrystals in Milliliter-Sized Droplet Reactors, *Nano Letters*, 14 (2014) 6626-6631.

[198] S. Mascia, P.L. Heider, H. Zhang, R. Lakerveld, B. Benyahia, P.I. Barton, R.D. Braatz, C.L. Cooney, J.M.B. Evans, T.F. Jamison, K.F. Jensen, A.S. Myerson, B.L. Trout, End-to-End Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals: Integrated Synthesis, Purification, and Final Dosage Formation, *Angewandte Chemie International Edition*, 52 (2013) 12359-12363.

EKLER

EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

S. N. Turkmen Koc, E. Conger, S. Ozturk., I. Eroglu, K. Ulubayram, Production of 5-fluorouracil-loaded PLGA nanoparticles with toroidal microfluidic system and optimization of process variables by design of experiments. International Journal of Pharmaceutics, 662 (2024), 1234501.

