

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**FARKLI FABRİKASYON TEKNİKLERİ
KULLANILARAK ANTİKANSER AKTİVİTEYE
SAHİP NANOPARTİKÜLLERİN İLAÇ
SALIM SİSTEMİ OLARAK TASARLANMASI**

Esra İLHAN AYIŞIĞI

Danışman : Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Doktora Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Farklı fabrikasyon teknikleri kullanılarak antikanser aktiviteye sahip nanopartiküllerin ilaç salım sistemi olarak tasarlanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03 / 08 / 2021

İmzası

Esra İLHAN AYIŞIĞI

ÖZET**FARKLI FABRİKASYON TEKNİKLERİ KULLANILARAK
ANTİKANSER AKTİVİTEYE SAHİP NANOPARTİKÜLLERİN
İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK TASARLANMASI**

İLHAN AYIŞIĞI, Esra

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Ağustos 2021, 91 sayfa

İlaç taşıyıcı nanopartiküller, lipidler, peptitler, polimerler veya inorganik metaller gibi pek çok farklı malzeme türlerinden farklı tekniklerle sentezlenebilmektedirler. Geleneksel kesikli yöntemlerle karşılaştırıldığında, mikroakışkan platformlar sentezlenen ilaç yüklü nanopartiküllerin, farklı morfolojilerde ve dar bir boyut dağılım aralığında, daha kısa sürede ve minimum reaktant tüketimi ile üretilebilmelerine olanak sağlamaktadır. Böylece tümör dokularının vasküler düzensizlik ve zayıf lenfatik ağ gibi özgün fizyolojileri sayesinde tümör bölgesine pasif olarak difüzelebilecek ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilebilmektedir. Bu tez kapsamında, farklı fabrikasyon teknikleri ile geliştirilen üç farklı antikanser etkili ilaç taşıyıcı sistemden ilki, pasif hedeflenmiş timokinon-yüklü kübozom/hekzozomlar iken, EGF ile fonksiyonelleştirilerek EGFR reseptörlerine aktif olarak hedeflenmiş karboplatin yüklü polimer-dendrimer hibrit nanopartikülleri incelenen ikinci ilaç taşıyıcı sistemdir. Son olarak, ultrason altında hem görüntü kontrastını arttırıcı ajan olarak görev görebilecek hem de ultrason-duyarlı olarak taşıdığı ilacı uygulama bölgesine spesifik olarak salması beklenen karboplatin yüklü polimer kaplı teranostik mikrokabarcıkların, seri bağlı mikroakışkan platformlar ile sentezlenmişlerdir.

Anahtar sözcükler: nanopartiküller, mikroakışkan platform, kübozom, hekzozom, aljinat dendrimer hibridizasyonu, ultrason-duyarlı teranostik sistemler



ABSTRACT**DESIGNING OF NANOPARTICLES WHICH HAVE AN
ANTICANCER ACTIVITY, AS A DRUG DELIVERY SYSTEM
BY USING DIFFERENT FABRICATION TECHNIQUES**

ILHAN AYISIGI, Esra

Ph.D. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem YESIL CELIKTAS

August 2021, 91 pages

Drug carrier nanoparticles can be synthesized by different techniques from many different types of materials such as lipids, peptides, polymers or inorganic metals. Compared to traditional batch methods, microfluidic platforms allow the production of synthesized drug-loaded nanoparticles with different morphologies and a narrow size distribution range, in a shorter time and with minimum reactant consumption. Thus, drug delivery systems that can passively diffuse into the tumor area can be developed thanks to the unique physiology of tumor tissues such as vascular disorganization and poor lymphatic network. In this thesis, while the first of the among three different anticancer effective drug delivery systems developed with different fabrication techniques is passively targeted thymoquinone-loaded cubosome/hexosomes, the carboplatin-loaded polymer-dendrimer hybrid nanoparticles actively EGFR targeted via the functionalization with EGF was the second investigated drug delivery system. Finally, carboplatin-loaded polymer-coated theranostic microbubbles, which are both expected to serve as an image contrast-enhancing agent and to release the drug it carries in an ultrasound-sensitive manner to the application site, were synthesized by serially connected microfluidic platforms.

Keywords: nanoparticles, microfluidic platform, cubosome, hexosome, alginate dendrimer hybridization, ultrasound-sensitive theranostic systems

ÖNSÖZ

Geçtiğimiz yaklaşık elli yılda, “nanoterapötik” konseptinin gündeme gelmesiyle hedeflendirilmiş veya kontrollü ilaç salım sistemlerinin ilgi çekmeye başladığı nanoskopik bir çağ başlamıştır. Nanoboyuttaki ilaç taşıyıcılarının ligand konjugasyonu ile özel hücrelere hedeflendirilebilmeleri, biyolojik veya fizikokimyasal bariyerleri aşabilecek şekilde geliştirilmeleri ile de bugün birçok ilaç taşıyıcı nanosistemin klinikte kullanımı onaylanmış durumdadır. Bu tez çalışması kapsamında daha kontrollü bir mikroçevre sunarak kontrol edilebilen ortalama partikül çapı ve benzeri avantajları sunan mikroakışkan platformlar yardımıyla antikanser etkili üç farklı ilaç taşıyıcı formülasyon üzerinde çalışılmıştır.

Malzeme ve biyoloji bilimlerindeki evrensel bilgi düzeyi ilerledikçe, şüphesiz ki daha karmaşık ve çok-işlevli ilaç taşıyıcı nanoyapılar tasarlayabilme yeteneği de artacak ve yenilikçi kanser tedavilerinin umut verici bir geleceği olacaktır.

İZMİR

03/08/2021

Esra İLHAN AYIŞIĞI



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ	xix
SİMGELER DİZİNİ	xx
KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller	4
2.2. Antikanser Etkili İlaç Taşıyıcı Nanopartiküller	4
2.3. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Sentezinde Mikroakışkan Platformlar ..	5
2.4. Liyotropik Sıvı Kristalin Nanopartiküller.....	7
2.5. EGFR-Hedefli Aktif Hedeflendirilmiş Nanopartiküller	10
2.6. Teranostik Sistemler Olarak Ultrason-Duyarlı Mikrokabarcıklar	11
3. MATERYAL VE METOD	17

İÇİNDEKİLER (devam)

3.1. Timokinon Yüklü Kübik ve Hegzagonal Liyotropik Sıvı Kristalin Nanopartiküller.....	17
3.1.1. Materyal	17
3.1.2. Sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin düşük enerji girdili kesikli üretimi.....	17
3.1.3. Sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin mikroakışkan çipte sürekli üretimi.....	18
3.1.4. Nanopartikül izleme analizi (NTA).....	20
3.1.5. Sinkrotron küçük açılı X-ışını saçılımı (SAXS)	20
3.2. EGFR-Hedefli Karboplatin Yüklü Aljinat-PAMAM Hibrit Nanopartiküller.....	21
3.2.1. Materyal	21
3.2.2. Karboplatin yüklü Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) mikroakışkan platformda sentezi.....	21
3.2.3. Karboplatin yüklü Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) EGF ile konjugasyonu	23
3.2.4. <i>In vitro</i> sitotoksik etkinin incelenmesi	24
3.3. Ultrason-Kontrast Ajan Olarak Karboplatin Yüklü Mikro-kabarcıklar	25
3.3.1. Materyal	25

İÇİNDEKİLER (devam)

3.3.2.	Lipit-polimer karışımının hazırlanması	26
3.3.3.	Mikroakışkan sistemin kurulumu	26
3.3.4.	Aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların (Al-Mk) mikroakışkan sistemde sentezi	27
3.3.5.	Mikrokabarcıklardaki aljinat tabakasının çapraz bağlanması için CaCl ₂ çözeltisi ile karıştırılması	28
3.3.6.	Mikrokabarcıkların boyut dağılımları	30
3.3.7.	Mikrokabarcıkların sitotoksik aktiviteleri	30
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1.	Timokinon Yüklü Kübik ve Hegzagonal Liyotropik Sıvı Kristalin Nanopartiküller	33
4.1.1.	TQ- içermeyen ve TQ-yüklü sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların boyut karakteristikleri.....	33
4.1.2.	TQ yüklemesi ve EtOH konsantrasyonunun kesikli emülsifikasyon yöntemiyle üretilen sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllere etkisi	40
4.1.3.	Mikroakışkan platformda sürekli üretilen sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin yapısal karakteristikleri.....	44
4.2.	EGFR-Hedefli Karboplatin Yüklü Aljinat-PAMAM Hibrit Nanopartiküller	48

İÇİNDEKİLER (devam)

4.2.1. Karboplatin yüklü aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) mikroakışkan platformda sentezi	48
4.2.2. Karboplatin yüklü Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) EGF ile konjugasyonu	54
4.2.3. EGF konjuge aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin sitotoksik etkileri.....	56
4.3. Ultrason-Kontrast Ajan Olarak Karboplatin Yüklü Mikrokabarcıklar	57
4.3.1. Aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların mikroakışkan sistemde sentezleri CaCl ₂ çözeltisi ile karıştırılmaları	58
4.3.2. Mikrokabarcıkların boyut dağılım özellikleri	60
4.3.3. <i>In Vitro</i> Sitotoksikite testleri ve canlı/ölü hücre boyaması.....	62
5. SONUÇ	67
KAYNAKLAR DİZİNİ	69
TEŞEKKÜR	86
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Mikrokabarcıklarla eş zamanlı olarak ilaç enjeksiyonu sonrasında ultrason uygulaması (A) ve ilaç taşıyan mikrokabarcıkların ultrason altında osilasyonu sırasında ilaç salımının (B) şematik gösterimleri	14
Şekil 3.1. Kullanılan ticari polikarbonat mikroakışkan çipin şematik bir görünümü. Mikro kanalların derinliği 100 µm ve çekirdek giriş kanalı genişliği 100 µm, yanıl giriş kanalları genişlikleri 200 µm, karıştırıcı kanal genişliği 200 µm ve çıkış kanalı genişliği 200 µm'dir.....	19
Şekil 3.2. Karbodiimid reaksiyonu ile aljinat-Pamam hibridizasyonu.....	22
Şekil 3.3. Mikroakışkan çipte sentezlenen aljinat-Pamam hibrit nanopartikülerin EGF ligandı ile konjugasyonu.....	24
Şekil 3.4. MSC cihazının dış görünüşü (solda) ve cihaz içerisindeki akış odaklamalı mikroçipin tasarımı (sağda).	27
Şekil 3.5. MSC çıkışından gelen henüz-sentezlenmiş Al-Mk ve K-Al-Mk'ların CaCl ₂ ile karıştırılmaları için kullanılan T-bağlantı kanalı.....	28
Şekil 3.6. MSC çıkışından gelen henüz-sentezlenmiş Al-Mk ve K-Al-Mk'ların CaCl ₂ ile karıştırılmaları için kullanılan "teardrop" mikrokarıştırıcı	29
Şekil 3.7. Mikrokabarcıkların monolayer hücreler ile doğrudan temas etmesini sağlayabilmek için tasarlanan kültür sistemi	31
Şekil 4.1. Mikroakışkan platformda 50 veya 100 µL/dak TFR koşullarında sentezlenen TQ içermeyen (A) ve TQ yüklü (B) sitrem/SFK nanopartiküller ile kesikli emülsifikasyon ile sentezlenen sitrem/SFK nanopartiküllerin (C) boyut dağılımlarını gösteren 2B NTA grafikleri	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.2. 25°C'de farklı TQ ve etanol konsantrasyonlarının düşük enerjili emülsifikasyon kesikli yöntemi kullanılarak hazırlanan sitrem/SFK nanodispersiyonlarının yapısal özellikleri üzerindeki etkileri. A) 1-10 mg/mL aralığındaki TQ konsantrasyonlarında (sırasıyla ağırlıkça % 1.09 EtOH ve %8.0 lipid) konsantrasyonlarında hazırlanan numunelerin SAXS modelleri B) 2.5 mg/mL sabit TQ konsantrasyonunda hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda EtOH (%0-5.45 aralığında) içeren sitrem/SFK nanodispersiyonlarının SAXS desenleri.....	41
Şekil 4.3. Mikroakışkan çip kullanılarak sürekli üretilen TQ içermeyen ve TQ yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonlarının (A1-A8) 25°C (A) ve 37°C'de (B) incelenen SAXS desenleri.....	46
Şekil 4.4. Farklı pamam (G4) konsantrasyonlarında sentezlenen karboplatin yüklü ve yüksüz hibrit nanopartiküllerin boyut dağılımları (±SD).....	49
Şekil 4.5. Farklı pamam (G4) konsantrasyonlarında sentezlenen karboplatin yüklü ve yüksüz hibrit nanopartiküllerin DLS grafikleri (boyut dağılımları)...	50
Şekil 4.6. Mikroakışkan platformda sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküller (sol) ve karboplatin yüklü Al-Pa hibrit nanopartiküller (sağ)	52
Şekil 4.7. Aljinat polimer (a) ve sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerin (b) FTIR karakterizasyonları.....	53
Şekil 4.8. Aljinat polimer ve sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerin DSC karakterizasyonları	54
Şekil 4.9. EGF-konjuge edilen nanopartiküllerin boyut dağılımları (DLS)	55
Şekil 4.10. EGF-konjuge edilen boş (sol) ve karboplatin yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri (sağ)	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.11. EGF-konjuge Al-Pa nanopartiküllerin 2B <i>in vitro</i> MTT analizi....	56
Şekil 4.12. Mikroskop altında (A) ve cam vial içerisinde (B) aljinat-lipit Mk'ların görünümü	59
Şekil 4.13. MSC cihazı ile sentezlenen ve T-bağlantısı (üst panel) veya mikromikser aracılığıyla farklı CaCl ₂ çözeltileri ile karıştırılan Al-Mk'ların boyut dağılım diyagramları.....	61
Şekil 4.14. MSC ile sentezlenen ve T-bağlantı veya mikromikser aracılığıyla farklı konsantrasyonda CaCl ₂ çözeltileri ile karıştırılan Al-Mk'ların PDI değerleri (A) ve ortalama boyutları (µm) (B).	61
Şekil 4.15. A) MTT ve canlı/ölü hücre sayımı analizlerine göre %hücre canlılığı sonuçları (ns; $p > 0.05$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0,001$). B) Mk'lar (a), Al-Mk'lar (b), K-Al-Mk'lar (c), serbest karboplatin (d), besin ortamı (e) ve DMSO (f) ile muamele edilmiş A549 hücrelerinin canlı/ölü görüntüleri (200 µm ölçek, 20X objektif, Zeiss Axio, Vert.A1). C) Mk'lar (a), Al-Mk'lar (b), K-Al-Mk'lar (c), serbest karboplatin (d), besin ortamı (e) ve DMSO (f) ile muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinin canlı/ölü görüntüleri (200 µm ölçek, 20X objektif, Zeiss Axio, Vert.A1).....	65

TABLolar DİZİNİTabloSayfa

Tablo 4.1. Ters bikontinyus kübik $Pn3m$ fazı ile birlikte tanımlanan bifazik özellikteki lamelar (L_a) fazların nanopartikül boyutu analizi ve latis parametreleri.....35

Tablo 4.2. Farklı EtOH ve TQ konsantrasyonları kullanılarak düşük enerjili toplu emülsifikasyon yöntemi kullanılarak üretilen sitrem/SFK nano-kendinden montajlı yapıların yapısal özellikleri.....43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
dak	dakika
M	molar
μ L	mikrolitre
μ m	mikrometre

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
Al-Mk	aljinat-kaplı fosfolipit mikrokabarcık
Al-Pa	aljinat-pamam hibrit nanopartikül
A549	insan epitelyal akciğer adenokarsinomu
BEAS-2B	insan bronşiyal epitel hücre hattı
DMSO	dimetil sülfoksit
DSC	dinamik ışık saçılımı
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
EthD-1	Etidyum homodimer-1
EGF	epidermal büyüme faktörü
EGFR	epidermal büyüme faktörü reseptörü
FRR	mikrokanal akış oranı
FTIR	fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HPLC	yüksek performanslı sıvı kromatografisi
K-Al-Mk	karboplatin yüklü aljinat-kaplı fosfolipit mikrokabarcık
K-Al-Pa	karboplatin yüklü aljinat-pamam hibrit nanopartikül
KHDAK	küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Mk	mikrokabacık

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

MRI	manyetik rezonans görüntüleme
MSC	MicroSphere Creator cihazı
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol -2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimide sodium salt
NTA	nanopartikül izleme analizi
SAXS	küçük açılı X-ışını saçılımı
SD	standart sapma
SEM	taramalı elektron mikroskopisi
SFK	soya fosfatidilkolin
TQ	timokinon
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi

1. GİRİŞ

Nanotıp terimi, Avrupa Bilim Vakfı ve Avrupa Nanotıp Teknoloji Platformu tarafından “nanoteknolojinin tıbbi uygulaması” olarak tanımlanmaktadır. Nano ölçekli yapıların sunduğu daha küçük boyut, yüksek yüzey-hacim oranı, ayarlanabilir yüzey kimyası ve ilaç yükleme kapasitesi gibi olumlu karakteristik özellikleri nanotıp uygulamalarını olumlu yönde etkilemekte ve kontrollü ilaç dağıtımından hastalıkların önlenmesi ve teşhisine kadar farklı alanlarda çalışılmaktadırlar (Liu et al., 2018). Nanopartiküller halinde ilaç dağıtım sistemlerinin tedavi amaçlı uygulamaları, Ehrlich'in “sihirli kurşun” fikrinin ortaya çıkmasından bu yana geniş çapta araştırılmışlardır (Couvreur, 2013). Lipit bazlı sistemler (lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, lamelar olmayan lyotropik sıvı kristalin nanopartiküller), polimerik bazlı sistemler (nanoküreler, nanokapsüller, polimer-ilâç konjugatları ve dendrimerler), inorganik nanopartiküller, karbon nanotüpler ve fulerenler gibi pek çok farklı kategoride geliştirilen ilaç taşıyıcı nanoyapılar, yukarıda bahsedilen olumlu karakteristiklerinden dolayı hastalık tedavilerinde oldukça geniş uygulama alanları bulmuşlardır (Markman et al., 2013).

Lipidler, uygun bir sulu çözelti içerisinde kendiliğinden-düzenlenerek kısaca düzlemsel lipid çift katmanları olan lamelar fazlar ile hegzagonal veya bikontinyüs kübik fazlar gibi özgün interior tasarımlara sahip lamelar olmayan fazları oluşturabilmektedirler (Yaghmur, 2019). Bikontinyüs kübik faza sahip nanopartiküller diğer deyişle kübozomlar, 25 yıldan fazla süredir üretilebilmelerine rağmen halen FDA tarafından onaylanmış bir formülasyonları bulunmamaktadır (Barriga et al., 2019). Antikanser etki de dahil olmak üzere oldukça geniş bir terapötik potansiyele sahip olan timokinon (TQ) molekülü taşıyıcı nanosistemler olarak, sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin bir hidrodinamik akış odaklama mikroakışkan platformu kullanılarak sürekli modda üretimini bu tez çalışması kapsamında incelenen antikanser etkili ilk formülasyondur.

En yüksek ölüm vakası frekansına sahip olan bir kanser türü olan akciğer kanserlerinin çoğunluğunu (yaklaşık% 75) küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) vakaları oluşturmakta ve akciğer kanseri kemoterapisinde en sık faydalanılan ajanlardan birisi olan karboplatinin düşük tümör alımı ve etkinliği

sebebiyle, yeni ilaç taşıyıcı sistemler halinde formüle edilmelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Nanopartiküllere enkapsüle edilerek tümör dokularına extravaze olmaları sağlanabilen ilaçların farklı fizyolojik ve kimyasal engeller nedeniyle hücreye alımları kısıtlanabilmektedir. Dolayısıyla nanopartiküllerde taşınan ilacın sağlıklı dokular yerine spesifik olarak tümör hücrelerinde internalizasyonunun artırılabilmesi için EGF ligandı ile fonksiyonelleştirilen mikroakışkan platformda sentezlenmiş karboplatin yüklü aljinat-Pamam hibrit nanopartikülleri bu tez çalışması kapsamında sentezlenen ikinci formülasyondur. EGF-konjuge karbopatin yüklü aljinat-Pamam hibrit nanopartiküllerinin sitotoksik etkileri, 2B *in vitro* hücre kültürünün yanı sıra A549 ve BEAS-2B hücrelerinden ultra düşük tutunmalı plaka tekniği ile geliştirilen 3B sferoidler üzerinde de izlenmiştir. *In vivo* doku fizyolojisi, anatomisi ve yapısına daha uygun şartlar sağlayan, kanserli dokudaki ekstraselüler matriksi ve dolayısıyla doku mikroçevresini daha iyi taklit eden 3B sferoid kültür tekniği, deney hayvanı kullanımının azaltılabilmesinde umut vadetmektedir.

İntraoperatif ve noninvaziv bir görüntüleme yöntemi olan ultrason, gerçek zamanlı görüntüleme, ekipman taşınabilirliği, güvenlik ve düşük maliyet gibi benzersiz avantajlara sahip olmakla birlikte, ultrason-duyarlı ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesine de olanak sağlayan bir teknolojidir (Lindseth et al., 2013). Vasküler sitemde hareket eden mikrokabarcıklar (Mk), fosfolipidler veya polimerlerden oluşan bir kabuk tarafından stabilize edilmiş yüksek derecede hidrofobik gaz çekirdeklerine (örneğin, C₄F₁₀, C₃F₈ veya SF₆) sahip olan 10 µm'den daha küçük boyutlu ultrason kontrast ajanlardır (Boissenot et al., 2016). Ultrason dalgalarının stabilize gaz kabarcıkları ile etkileşimi yankılar yaratarak görüntülerin oluşturulmasını sağlamaktadır. Ses dalgaları ayrıca Mk'lara enkapsüle edilen ilaçları serbest bırakabilmekte, ekstraselüler ve transmembran ilaç taşınımını artırabilmekteledir. Bu antikanser ilaç yüklü mikrokabarcıklar, aynı anda hem teşhis (görüntüleme) ve tedavi edici ajanlar olarak hizmet edebilmektedirler. İlacın Mk'lara yüklemesi genellikle yüzey alanları ile sınırlı olduğundan, mikro kabarcık yüzeyine nanopartiküllerin veya lipozomların eklenmesiyle taşınan ilaç miktarı 34 kata kadar arttırılabilmektedir (Ferrara et al., 2009; Zhao et al., 2013; Chowdhury et al., 2017). Bu bilgiler ışığında yüksek hidrofobik yapıdaki fosfolipit mikrokabarcıkların ek bir hidrofilik aljinat polimer tabakası ile kaplandıklarında, hidrofilik karboplatin ilacının da bu aljinat tabakasında

enkapsüle edilebileceği düşüncesinden hareketle, bu tez çalışması kapsamında 3. bir formülasyon olarak karboplatin yüklü aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkları (C-AI-Mk) mikroakışkan bir platform aracılığıyla sentezlenmiş ve insan epitelyal akciğer adenokarsinomu (A549) ile insan bronşiyal epitel hücre hatları (BEAS-2B) üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri yeni tasarlanmış bir ters kültür tekniği kullanılarak analiz edilmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller

Biyolojik olarak yeni aktif moleküller sürekli olarak keşfedilmekte olsalar da, bunlardan bazılarının terapötik potansiyelleri; hızlı eliminasyon, fizyolojik pH'da zayıf çözünürlük ve biyolojik dağılım nedeniyle ilaç ve etki bölgesi arasındaki etkileşimin tehlikeye girmesi gibi nedenlerle sınırlanmaktadır (Coelho et al., 2010). Hem tasarım hem de mühendislik prensipleri kullanılarak geliştirilen ilaç salım sistemleri, ilaç etkinliğinin optimize edilmesi ve yan etkilerinin azaltılması yoluyla bu engellerin üstesinden gelmenin çok etkili bir yoludurlar.

Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler, lipidler, peptitler ile doğal veya sentetik polimerler gibi farklı malzeme türleri kullanılarak farklı tekniklerle sentezlenebilmektedirler (Yun et al., 2015). Sentez teknikleri geleneksel kesikli üretim veya mikroakışkan platformlar aracılığıyla, emülsiyon polimerizasyonu, çözücü buharlaşması, iyonik jelleşme, kendiliğinden-düzenlenme (self-assembly), nanopresipitasyon ve süper kritik akışkan teknolojisi gibi stratejileri içermektedir (Yesil-Celiktas et al., 2012; Ilhan-Ayisigi et al., 2018, 2020 a, 2021).

Nanopartikül temelli ilaç salım sistemleri, öncelikle aşılarda ve kanser kemoterapi ajanlarının taşıyıcıları olarak geliştirilmişlerse (Jong et al., 2008) de AIDS (Coester et al., 2000), diyabet (Dangé et al., 2007), sıtma (Date et al., 2007), tüberküloz (Ahmad et al., 2006) gibi pekçok farklı hastalıkların tedavisi için önemli bir potansiyele sahip oldukları kanıtlanmıştır.

2.2. Antikanser Etkili İlaç Taşıyıcı Nanopartiküller

Son 20-30 yılda, kanserli hücrelere ilaçların ve görüntüleme ajanlarının nanopartikül aracılı dağıtımı konusunda önemli araştırmalar yapılmıştır. Bunların arkasındaki itici güç, Maeda ve ark. (1986) tarafından ilk kez bildirilen “gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma” (enhanced permeability and retention; EPR) mekanizmasının tespit edilmesidir (Matsumura et al., 1986; Maeda, 2001). EPR etkisine göre, makromoleküler taşıyıcılar (örn., polimerler) ile modifiye edilmiş veya nanopartiküllere enkapsüle edilmiş ilaçlar, renal

klerense direnebilmekte, plazma yarı ömürleri artmakta, tümör dokusunun bozulmuş lenfatik drenaj ile vasküler yapıları sayesinde pasif olarak tümör dokusuna sızabilmekte ve tümör dokusunda tutulmaktadır (Kamaly et al., 2016). Tutulan nanopartiküller daha sonra ilaç rezervuarı olarak işlev görerek, zamanla bileşimlerine ve yüklerine bağlı olarak membran-aracılı pasif süreçler yoluyla tümör hücreleri içinde internalize edilmektedirler. EPR mekanizması ile pasif hedefleme stratejisinin kullanıldığı en önemli iki antitümör nanoformülasyonu olan Doxil® (lipozomlarda formüle edilmiş doksorubisin) ve Abraxane® (albümin nanopartiküllere formüle edilmiş paklitaksel) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından sırasıyla 1995 ve 2006 yıllarında onaylanmışlardır (Master et al., 2012). Son 30-40 yılda öne çıkan preklirik düzeydeki "hedeflenmiş" ilaç salım sistemlerinin çok büyük bir kısmı tümör-hedefleme kapsamındadır ve şüphesiz ki tümör dokularının bahsedilen özgün fizyolojileri bunun en temel sebeplerindedir (Yun et al., 2015). Ancak, EPR mekanizması tümör dokusu içinde terapötik yükün birikmesini kolaylaştırır da, yükün tümör hücresine internalizasyonu her zaman sağlanamayabilmektedir. Bu durumda zamanla tümör stroması içinde nanopartikül birikimi artmakta ve bu da nanopartikül geçişinin ters gradyanına neden olmaktadır (Master et al., 2012).

Dolayısıyla, tümör hücresine özgü internalizasyonu kolaylaştırmak için nanopartiküller sistemlerin yüzeyine ligand bağlayarak reseptör aracılı endositozu uyarma gibi ek stratejiler geliştirilmiştir (Bareford et al., 2007). Tümör hücrelerinin yüzeylerinde çeşitli reseptörleri aşırı miktarda ekspres ettiği bilinmektedir ve ligandların bu reseptörlere bağlanması, tümör büyümesine ve çoğalmasına, anjiyogeneze, farklı oksijen seviyelerinde ve pH koşullarında hayatta kalmasına, apoptoz direncine ve metastaza yardımcı olan çok sayıda sinyal kaskadında rol oynamaktadır (Cavallaro et al., 2004). Bu reseptörlerin çoğu "internalizasyon" reseptörleridir, dolayısıyla da nanopartikül yüzeyindeki ligandın hücre reseptörüne bağlanmasını takiben ligand-reseptör kompleksi aktif olarak endositoza uğratılmaktadır.

2.3. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Sentezinde Mikroakışkan Platformlar

Özellikle son otuz yılda, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, inorganik nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller ve lamellar olmayan sıvı kristalin gibi çeşitli nanopartiküllerin ilaç salımı ve biyogörüntüleme amacıyla

geliştirilebilmesine dair artan bir ilgi vardır (Bor et al., 2019). İlaç taşıyıcı nanopartiküller, suda az çözünen ilaçların biyoyararlanımlarını iyileştirme, hücre içi penetrasyonlarını geliştirme, kanda sirkülasyon süresini uzatma ve olası yan etkilerini en aza indirme gibi potansiyelleri nedeniyle ilgi çekicidirler (Steichen et al., 2013; Garcia-Pinel et al., 2019).

İlaç taşıyıcı nanopartiküllerin geleneksel yöntemlerle (kesikli üretim) sentezlenmesi çoğunlukla yeterince kontrol edilemeyen çevresel koşullarla ilişkilidir, bu da nanopartikül boyutunda önemli bir değişkenliğe neden olarak polidispersitesi yüksek ürünlerin elde edilmesine yol açmaktadır (Jahn et al., 2004; Capretto et al., 2013; Carugo et al., 2016). Ayrıca bu geleneksel yöntemler kesikli üretim prensibindeki doğalarından kaynaklanan partiden-partiye farklılıklar göstermekte ve pek çoğu sentez öncesi veya sonrası çok adımlı prosedürler gerektirmektedirler (Lombardi et al., 2010; Ghazal et al., 2017). Kontrol edilebilir boyutlarda nanopartiküllerin yüksek standartta ve sürekli modda üretilmeleri için mikroakışkan kanallara enjekte edilen akışkanların, geometrik olarak sınırlanmış mikroçevrelerde akış ve karıştırma koşullarının kontrolünün sağlandığı basit ve güçlü mikroakışkan sentez yöntemleri geliştirilmiştir (Jahn et al., 2004, 2007). Geleneksel kesikli yöntemlerle karşılaştırıldığında, bu mikroakışkan platformlardaki akış ve karıştırma koşullarının çok iyi derecede kontrol edilebilmesi, istenen morfoloji, yüzey yükü, ilaç yükleme ve ilaç salım kinetiğine sahip üniform monodispers nanopartiküllerin, daha kısa sürede ve minimum reaktant tüketimi ile üretilmelerine olanak sağlamaktadır (Khan et al., 2015; Ahn et al., 2018; Ilhan-Ayisigi et al., 2020 b, 2021). Ek olarak nispeten uygun maliyette ve hafif ham maddelerden üretilmelerini ve taşınabilirlikleri de mikroakışkan platformların dikkate alınması gereken diğer önemli avantajlarıdır (Lombardi et al., 2010; Trantidou et al., 2018).

Geçtiğimiz on yıl boyunca, lipid ve polimer yapıdaki nanopartiküllerin sürekli ve verimli sentezleri için, çeşitli kanal geometrilerinin ve hidrodinamik akış odaklama, damlacık-temelli yöntemler ve kontrollü mikro-girdaplar gibi farklı tasarımların ortaya çıktığı mikrofabrikasyon tekniklerindeki gelişmeler izlenmiştir (Ilhan-Ayisigi et al., 2021). Nanopartikül boyut karakteristikleri, bu ilaç nanotaşıyıcı sistemlerin terapötik akıbetlerini ve kliniğe aktarım süreçlerini etkilediğinden, mikroakışkanlar, kontrol edilebilen boyuttaki nanopartiküllerin sürekli modda üretim platformları olarak esas önem kazanmışlardır (Valencia

et al., 2012). Örneğin, boyutları yaklaşık 100 nm olan monodispers lipozomların, arttırılmış hücre alım ve iyileştirilmiş terapötik sonuçlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Feng et al., 2016). Uygulama (ilaç veriliş) yoluna bağlı olarak, nanopartiküllerin ortalama boyutlarının, boyut dağılımlarının, yüzey özelliklerinin ve şekillerinin terapötik etkinliklerini ve biyolojik performanslarını modüle ettiği unutulmamalıdır. Örneğin, nanopartiküllerin tümör dokusunda birikimi konusunda ortalama partikül boyutu üstün bir rol oynamaktadır. 200 nm'den küçük nanopartiküller kanda daha uzun sirkülasyon süresine ve endotelyumdan sızarak ekstrasözöz oluştuktan sonra EPR etkisi yoluyla tümör dokusunda pasif birikime uğrarken; daha büyük nanopartiküller retikuloendotelyal sistem (RES) ile hızlı tanınabilir ve kan dolaşımından daha kısa sürede elimine edilebilirler (Li et al., 2008; Danaei et al., 2018).

2.4. Liyotropik Sıvı Kristalin Nanopartiküller

Kübozomlar ve heksozomlar, yarım asır önce keşfedilmelerinden bu yana nanoilaç olarak oldukça yaygın olarak kullanılan lipozomlara benzemekle birlikte, sırasıyla üç boyutlu (3B) ve iki boyutlu (2B) kendiliğinden düzenlenmiş içyapılar (self assembled interiors) halinde katlandıkları için lipozomlardan farklı yapısal özelliklere sahiptirler (Zhai et al., 2019; Murgia et al., 2020). İlaç taşınımı ve biyo-görüntüleme uygulamaları için nanotaşıyıcıların geliştirilmesinde, bu ters liyotropik sıvı kristalin lipit nanopartiküllerin ve misel kübozomlar ile emülsifiye mikroemülsiyonlar (EME'ler) gibi ilgili kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların cazibeleri, farklı fizikokimyasal/kimyasal özelliklere sahip ilaçları veya görüntüleme ajanlarını yükleme yetenekleriyle bağlantılıdır (Bor et al., 2019; Yaghmur et al., 2020). Bu nanopartiküllerin iç kısımlarında çözündürülen terapötik ve görüntüleme ajanlarının lokalizasyonu, yüklenen bu konuk moleküllerin lipit bileşenleri ile su arasında gerçekleşecek bir dizi karmaşık etkileşim tarafından yönetilmektedir (Yaghmur et al., 2009; Gontsarik et al., 2019; Prajapati et al., 2019 a). Dolayısıyla, suda çözünen ve az çözünen ilaçlar ya da görüntüleme ajanları, kendiliğinden düzenlenen içyapıların sırasıyla hidrofilik ve hidrofobik alanlarına yerleştirilme eğilimindeyken, amfifilik ilaçlar ise lipit-su arayüzlerinde lokalize olma eğilimindedirler (Lancelot et al., 2014; Angelova et al., 2017; Bor et al., 2019; Prajapati et al., 2019 b).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (Azmi et al., 2016), soya fosfatidilkolin (SFK) ve sitremden oluşan ikili lipit karışımları temelinde, yapısal olarak ayarlanabilir ve immünolojik olarak güvenli bir kolloidal olarak kararlı lamelar veya lamelar olmayan sıvı kristalin nanopartikül kütüphanesi tanıtılmıştır. Sitrem, tipik olarak emülsiyonları ve lamelar veya lamelar olmayan sıvı kristalin nanopartikülleri elektrostatik stabilizasyon mekanizması ile stabilize etmek için kullanılan FDA onaylı gıda sınıfı bir anyonik emülgatördür (Azmi et al., 2016; Wibroe et al., 2016). Belirtildiği gibi sitrem/SFK nanopartikülleri kompleman aktivasyonu ve daha sonraki hemolitik etkilerden yoksun olması nedeniyle hemo-uyumludurlar (Gontsarik et al., 2016; Angelova et al., 2018) ve bu nedenle, ilaç taşıyıcı nanosistemlerin geliştirilmesinde umut vadetmektedirler. Fazla miktarda suda, sitremin SFK-su arayüzey alanına yerleşmesi, konsantrasyona-bağlı olarak lamellar-lamellar olmayan yapısal geçişlerle ilişkilidir ve bu da düşük enerji (vorteksleme) veya yüksek enerji girdili (prob sonikasyonu) kesikli emülsifikasyon yöntemleri kullanılarak lamelar veziküllerin, kübozomların ve hekzozomların üretimine olanak sağlamaktadır (Khaliqi et al., 2017; Prajapati et al., 2018, 2019 b). Doymamış monogliserid içerikli çok araştırılan kübozomlar ve hekzozomlarla kıyaslandığında (Helvig et al., 2021), fazla miktarda suda lamelar (L_{α}) sıvı kristalin faz oluşturma eğilimiyle bilinen SFK fosfolipidi kullanılarak immün-güvenli lamelar olmayan sıvı kristalin nanopartiküllerin üretilmesi için sitremden yararlanmak oldukça ilgi çekici bir yaklaşımdır (Azmi et al., 2016). Bununla birlikte, bu sitrem-SFK nano-kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların mikroakışkan platformlar kullanılarak sürekli üretimleri hakkında literatürde bilinen bir yayın yoktur.

Lipozomlardan (Jahn et al., 2004, 2010; Sedighi et al., 2019) ve diğer lipit nanopartiküllerinden (Koh et al., 2009, 2010; Lo et al., 2010) farklı olarak, kübozomların, hekzozomların ve diğer ilgili kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküller yapılarının mikroakışkan platformda sürekli sentezi nadiren incelenmektedir (Kim et al., 2018; Yaghmur et al., 2019). Farklı mikroakışkan karıştırıcılar arasında, hidrodinamik akış odaklama (HAO) mikroakışkan platformları, nanopartiküllerin sürekli üretimi için en çok kullanılan platformlardır (Sharifi et al., 2020). Bu platformlar, hızlı bir karıştırma ve paternleme sağlamak için, enjekte edilen sıvılar arasında iyi tanımlanmış ve öngörülebilir bir arayüz bölgesi oluşturmaları ve merkez ile yan akımların mikrometre altı boyutlara hidrodinamik olarak odaklanması yoluyla ortalama

nanopartikül boyutunu ve boyut dağılımını kontrol etme kabiliyetleri sayesinde oldukça fazla ilgi toplamaktadırlar (Jahn et al., 2004; Yaghmur et al., 2019). Lipit bazlı nanotaşıyıcıların mikroakışkan platformlarda sentezinde lipitlerin çözünmesi için etanol (EtOH) gibi organik çözücüler gerekmektedir ve Lasic'in (1988) teorisine göre organik bir çözücü içinde çözünen lipitler, çift tabakalı fosfolipid yapılı ara ürün parçalarına dönüşmektedirler (Lasic, 1988). Mikroakışkan platformun hidrodinamik akış odaklama kanalındaki çözücü (alkol) ve sulu çözücü olmayan fazlar arasındaki sıvı arayüzeyinde, farklı moleküler türlerin sürekli difüzyonu, alkol konsantrasyonu lipitlerin çözünürlük sınırının altında kritik bir seviyeye düşene kadar lipidin çözünürlük koşullarını azaltır. Bu durum, çift tabakalı fosfolipid fragmanlarının kenarlarında termodinamik kararsızlığa neden olarak kendi üzerine bükülmeye, kapanmaya ve veziküllerin oluşumunu tetikler ve bu mekanizma "**kendi kendine düzenlenme**" olarak tanımlanmaktadır (Jahn et al., 2008; Carugo et al., 2016). Mikroakışkan hidrodinamik akış odaklama yaklaşımının, klinik uygulama potansiyeline sahip olan lipit bazlı nano-veziküler sistemleri üretmek için tek geçerli mikroakışkan yöntemi temsil ettiği bildirilmiştir (Carugo et al., 2016).

Bu tez çalışması kapsamında incelenen **üç formülasyondan ilki**, akış odaklama prensibindeki bir mikroakışkan platform kullanılarak herhangi bir yüksek enerji girdisi veya sekonder emülsifiye edici olmadan sürekli üretim prensibiyle sentezlenen timokinon (TQ) yüklü sitrem/SFK nanopartikülleridir. Timokinon, *Nigella sativa* bitkisi uçucu yağının ana terapötik bileşiğidir (%30-48) (Khader et al., 2014; Yaghmur et al., 2020) ve antioksidan (Bordoni et al., 2019), antienflamatuar (Shaterzadeh-Yazdi et al., 2018; Bordoni et al., 2019), antihistaminik (Kanter et al., 2006), antimikrobiyal (Chaieb et al., 2011; Mohammed et al., 2019), nöroprotektif (Farkhondeh et al., 2018; Elibol et al., 2019) ve immünomodülatör (Shaterzadeh-Yazdi et al., 2018) aktiviteleri ile birlikte antikanser (Khan et al., 2017 a) etki de dahil olmak üzere oldukça geniş bir terapötik potansiyele sahiptir. Ancak bu terapötik potansiyel, TQ'nun düşük suda çözünürlüğü, zayıf biyoyararlanımı ve membran penetrasyon kabiliyeti, ısıya ve ışığa duyarlı yapısına bağlı stabilite sorunları gibi nedenlerle sınırlıdır (Kazan et al., 2019; Yaghmur et al., 2020). Literatürde, lipozomlar (Odeh et al., 2012), misel kübozomlar (Yaghmur et al., 2020), niozomlar (Rajput et al., 2015) ve albümin (Kazan et al., 2019) nanopartiküller gibi çeşitli

nanopartiküller, TQ'nun bu sınırlamalarının üstesinden gelen TQ taşıyıcı nanosistemler olarak incelenmişlerdir.

Kendiliğinden–düzenlenen-nanoyapılardaki ilaç yerleşiminin (Prajapati et al., 2018) veya EtOH konsantrasyonunun (Yagmur et al., 2019) yapısal dönüşümleri tetikleyebileceği bilindiğinden, etanol konsantrasyonunun ve lipid kompozisyonunun TQ-yüklü sitrem/SFK nanopartiküllerin, yapısal ve boyut karakteristikleri üzerine etkileri sinkrotron küçük açılı X-ışını saçılımı (Synchrotron Small Angle X-Ray Scattering: SAXS) ve nanopartikül izleme analizi (Nanoparticle Tracking Analysis: NTA) kullanılarak incelenmiştir. Mikroakışkan platformun verimliliğini değerlendirmek için, aynı etanol konsantrasyonlarında ve lipid bileşimlerinde mikroakışkan çip kullanılarak sürekli üretilen seçilen iki grup sitrem/SFK nanopartiküllerinin ortalama nanopartikül boyutları ve boyut dağılımları, ikili sitrem/SPK karışımlarının fazla su içinde vortekslenmesine dayanan bir kesikli emülsifikasyon yöntemi kullanılarak üretilenlerle karşılaştırılmıştır.

2.5. EGFR-Hedefli Aktif Hedeflendirilmiş Nanopartiküller

Tümör stroması içindeki spesifik nanopartikül birikimi, tümörün sızdıran abnormal vasküler sistemi sayesinde sağlanırken (pasif hedeflendirme), hücrel internalizasyon ise nanopartikül yüzeyinde reseptöre özgü ligand dekorasyonu kullanılarak reseptör aracılı aktif endositotik mekanizmalardan yararlanılarak teşvik edilmekte, böylelikle ilacın rastgele dokularda internalizasyonu ve zararlı yan etkileri en aza indirilmektedir (Akhtar et al., 2014). İlaç yüklü nanopartiküllerin bu aktif mekanizmalar yoluyla endozomal veya lizozomal internalizasyonu genellikle, taşıyıcı matrisin hücre içi parçalanması veya bozunması ve ilaçların salınmasını takip etmektedir (Master et al., 2012). Bu "aktif hedefleme" mekanizması kapsamında, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), çeşitli kanser türlerini hedeflemek için en umut verici reseptörlerden biri olarak bilinmektedir.

Bir reseptör tirozin kinaz olan EGFR, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) sıklıkla aşırı eksprese edilmektedir (Silva et al., 2016). Akciğer kanserlerinin çoğunluğunu (yaklaşık% 75) oluşturan KHDAK vakalarında ise halen iyi anlaşılmamış patolojik mekanizmalar nedeniyle tedavi oldukça zordur. EGFR hedefli nanopartiküller ile ilgili mevcut araştırmaların

çoğu, FDA onaylı antikor immünoterapileri olmaları sebebiyle cetuximab ve trastuzumab gibi antikorları, antikor fragmanlarını veya aptamerleri içermektedir (Xu et al., 2005). Antikor aracılı EGFR hedeflemesine paralel olarak, EGFR'nün doğal ligandı olan EGF'nün kullanılması üzerine de artan bir ilgi söz konusudur. EGF, 53 amino asit rezidüsünden yapılmış 6-kDa boyutunda bir proteindir. Antikorlara ve diğer EGFR spesifik ligandlara kıyasla bu kadar küçük boyutta olmasının yanı sıra taşıdığı üç disülfit (SS) bağı ve triptofan-tirozin rezidüleri onu nanopartiküler sistemler için çekici bir hedefleme ligandı haline getirmiştir (Master et al., 2012). Ayrıca EGF'den farklı olarak antikorlar, sitotoksositeye yol açan ciddi immün yanıt tetikleyebilmektedirler. Bu amaçla, bu tez çalışması kapsamında incelenen ikinci formülasyon olarak, mikroakışkan platformda sentezlenmiş karboplatin yüklü aljinat-Pamam hibrit nanopartikülleri EGF ligandı ile konjuge edilmiş ve sitotoksik etkileri, 2B *in vitro* hücre kültürünün yanı sıra A549 ve BEAS-2B hücrelerinden ultra düşük tutunmalı plaka tekniği ile geliştirilen 3B sferoidler üzerinde de izlenmiştir. Aljinat, ardışık 1-4 bağı α -L-gluronik ve β -D-mannuronik asit bloklarından oluşan düz zincirli bir polisakkarittir ve bu biyopolimerin jelleşme ve çapraz bağlanma reaksiyonları gluronik asitteki sodyum iyonlarının, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi divalen katyonlar ile yer değiştirmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Istenič et al., 2015). pH-duyarlılıkları, biyoyumlulukları, biyoadhezyon ve ılımlı jelleşme koşulları, aljinatı kontrollü ilaç salım sistemleri için uygun hale getirmektedir (Akay et al., 2017). Ancak, yalnızca Ca^{+2} iyonları ile çapraz bağı aljinat nanojeller stabil değildirler ve fosfat salin tampon (PBS) gibi tamponlarda Ca^{+2} iyonlarının diğer katyonlarla hızlı bir şekilde değişimi nedeniyle bozulmaya uğramaktadırlar (Matai et al., 2016). Ca^{+2} -çapraz bağlantılı aljinat nanojelinin bu anormal davranışı, nanoilaç olarak kullanılabilme potansiyellerini sınırlamaktadır. Bu nedenle, ilaç salım uygulamaları için aljinatla etkileşime girerek ve fizyolojik koşullar altında yapısal stabilitesini geliştirecek ikinci bir bileşen olarak pamam dendrimer (G4) seçilmiştir.

2.6. Teranostik Sistemler Olarak Ultrason-Duyarlı Mikrokabarcıklar

Terapötik amaçların yanı sıra, tek bir formülasyon içerisinde he bir ilaç hem de bir görüntüleme ajanı içeren ve dolayısıyla terapötik işlevselliği görüntüleme ile birleştiren “teranostikler”, bir hastalığın tedavisinin seçiminde ve planlanmasında, objektif yanıtın ve takip tedavi planının izlenmesinde

faydalı olabilmektedirler (Lammers et al., 2011; Sharma et al., 2017). Diğer diagnostik yöntemlerle karşılaştırıldığında, çözünürlüğü manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile kıyaslanamasa da ultrasonun güvenli, basit, non-invazif ve uygun maliyetli bir görüntüleme tekniği olduğu kanıtlanmıştır (Cai et al., 2012). Kontrast ajan olarak mikrokabarcıkların kullanıldığı kontrastı artırılmış bir ultrason görüntülemesinde daha iyi bir çözünürlük elde edebilmekte ve uzun yıllardır klinikte bir dizi hastalığın teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrokabarcıklar (Mk'lar) özellikle geçtiğimiz son on yılda, ultrason kontrast maddeleri, ilaç dağıtım sistemleri ve nükleik asit transfeksiyon araçları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Sirsi et al., 2009; Chowdhury et al., 2017; Upadhyay et al., 2019).

Mikrokabarcıklar, bir lipit veya polimer ile enkapsüle edilen ve gazdan oluşan kaviteye sahiptirler ve boyutları genellikle vasküler yapıda hareket edebilmek adına 1 ila 10 µm arasında olmalıdır. Ultrason görüntüleme ve hedefli ilaç salımı gibi biyomedikal uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaktadırlar. Lipit yapıda mikrokabarcık (Mk) kabuk, mikrokabarcıkların ultrasonik ses dalgaları altında deforme olmasına ve düşük basınçta osilasyonuna izin verirken, polimer yapılı Mk kabukları ise serttir ve gaz kabarcığı, genellikle kapsüllerin kırılmasından sonra osilasyon yapabilmektedir (Appold et al., 2017). Mk'lar ağır gazlardan yapıldığında, daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip olmakta, aynı zamanda ağır gazların çözünürlüklerinin daha düşük olması da gazın partikül membranından sızma süresini uzatmaktadır. Ağır gazlar arasında kükürt hekzaflorür (SF₆), oktafloropropan veya dekaflorobütan kontrast ajanlar olarak veya organ koruma uygulamalarında halihazırda kullanılmaktadır ve sıklıkla Mk'lerin sentezi için de tercih edilmektedirler (Boissenot et al., 2016). Mikrokabarcıklar tercihen düşük bir akustik basınçta kaviteye neden olduklarından, tümör endotelyumunun yakınındaki kabarcık osilasyonları da por oluşturma (sonoporasyon), endositoz aktivasyonu veya hücre bağlantılarının geçirgenliğini artırma gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla ilacın bu bölgedeki penetrasyonunu arttırmaktadır. Dolayısıyla antikanser aktivitedeki bir ilacın, ultrason kontrast ajanları ile birlikte (co-administration) veya doğrudan bu ajanlara yüklenerek enjekte edilmesi son yıllarda ilgi çekmekte olan bir yaklaşımdır. Mk'ların uygulanmalarını takiben uygulanan ultrason sonrasında hücre zarının geçirgenliği artırılabilirdiğinden, kan-beyin bariyeri hastalıklarının

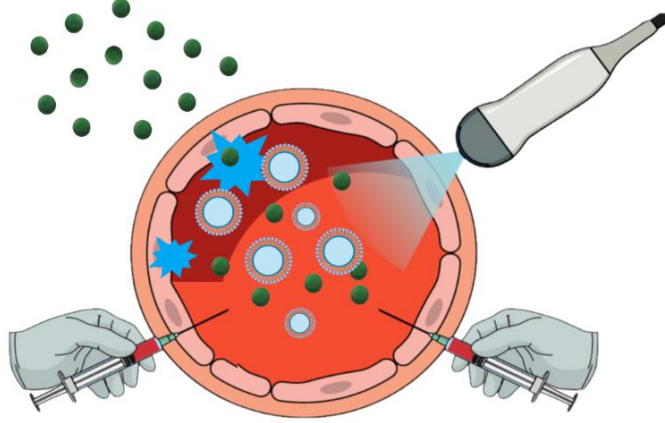
tedavisi için oldukça fazla araştırılan sistemlerdir (Lindseth et al., 2013; Boissenot et al., 2016).

Stratejik olarak, ilaç Mk'larla eş zamanlı olarak enjekte edilerek, uygulanacak ultrason dalgaları ile hem görüntüleme hem de bu görüntüleme sırasında Mk'ların osilasyonu ile yukarıda bahsedilen mekanizma ile ilacın bölgesel olarak alımının artırılması sağlanabilmektedir (**Şekil 2.1.A**). 2013 yılında rapor edilen ultrason mikrokabarcıkları ile kemoterapi tedavisinin kombine edildiği bir klinik çalışmada, gemsitabin ile birlikte ticari ultrason kontrast ajan SonoVue®'nun eş anlı enjeksiyonu ile ultrason uygulanan pankreas kanseri hastalarında sadece gemsitabin ile tedavi edilen hastalara kıyasla sağkalımın önemli ölçüde artırılabilirdiği ifade edilmiştir (Kotopoulos et al., 2013). Ayrıca, ilaçlar Mk'lara yüklenerek teranostik taşıyıcı sistemler olarak da enjekte edilebilirler (**Şekil 2.1.B**). Mk'lara ilaç yüklenmesi yaklaşımları bazı temel farklılıklar göstermekte, bazı çalışmalar ilaç yüklü nanopartikülleri Mk'ların yüzeyine tutundurma prensibini benimserken (Burke et al., 2011) bazılarında ise ilaç yüklü nanopartiküllerin Mk'ların gaz çekirdeğinde hapsedilmesi (Wang et al., 2016) sözkonusu olabilmektedir. Burke et al. (2011) balb/C fareleri ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, albümin kabuklu mikrokabarcıklara poli(laktik-ko-glikolik asit) nanopartiküllerinin kovalent olarak bağlandığı kompleks ajan formülasyonunun enjeksiyonunda, bu mikrokabarcıklar ile nanopartiküllerin kompleksleşmeden eş zamanlı olarak enjeksiyonuna kıyasla ultrason uygulaması sonrası ≈ 2 kat fazla nanopartikülün iskelet kasına salındığını belirtmişlerdir. Bahsedilen çalışmadaki kovalent bağlama stratejisinin yanı sıra, Mk'lar yüzeyinde nanopartiküllerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle de ilaç yüklü nanopartiküller ile ilişkilendirilebilmektedirler.

A

● ilaç yüklü nanopartiküller

● ultrason-kontrast ajan olarak mikrokabarcıklar

**B**

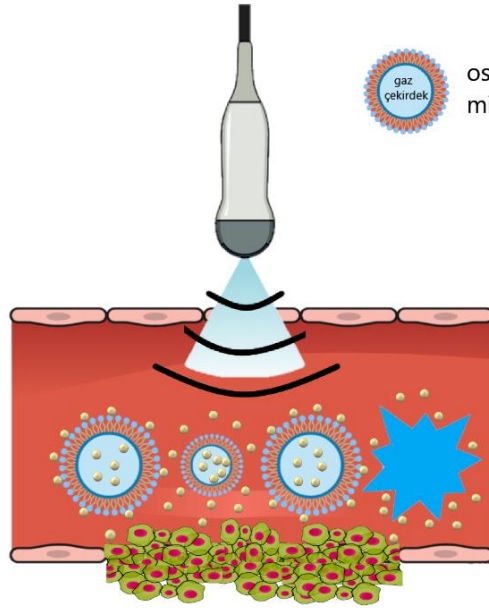
Tümör dokusu



Enkapsüle edilmiş ilaç molekülleri



osilasyon halindeki mikrokabarcıklar



Şekil 2.1. Mikrokabarcıklarla eş zamanlı olarak ilaç enjeksiyonu sonrasında ultrason uygulaması (A) ve ilaç taşıyan mikrokabarcıkların ultrason altında osilasyonu sırasında ilaç salımının (B) şematik gösterimleri

Tek-aşamada hem poli(bütül siyanoakrilat) nanopartiküllerin sentezlendiği hem de sentezlenen bu nanopartiküllerin mikrokabarcıkları stabilize eden kabuk tabakasını oluşturdukları bir çalışmada, bu nanopartikülle-stabilize edilmiş Mk konjugatının, serbest nanopartiküllere kıyasla hedef dokuda lokal olarak birikiminin arttığı, ayrıca bu nanopartiküllerin Fe@Fe₃O₄ ile yüklenmesi ile de hem ultrason görüntüleme hem de MRI rehberli olarak nanopartikül salımının sağlanabildiği rapor edilmiştir (Morch et al., 2015). Nanopartiküllerin Mk yüzeyine konjugasyonunun, Mk kabuğunun stabilitesini olumsuz etkileyebilmesi veya kan gibi biyolojik sıvılarda Mk ile nanopartikülü birbirine bağlayan konjugasyon ajanının degrede olabilmesi risklerine karşın, Wang ve ark.'nın (2016) geliştirdikleri kurkumin yüklü albümin nanopartikül (CcmANP) mikrokabarcık çekirdeğindeki gaz kompartmanına hapsedilmesi (CcmANP-MB) ile ilaç yükleme etkinliğinin arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca tümör-oluşturulmuş farelerin kuyruk damarından enjekte edilen CcmANP-MB'lerde serbest CcmANP ya da nanopartikül enkapsüle edilmemiş mikrokabarcık enjekte edilen gruplara kıyasla ultrason uygulaması sonrasında tümör inhibisyon yüzdesi neredeyse iki kat yüksek olarak tespit edilmiştir.

Literatürde, ultrasona maruz kalma ile, Mk'ların taşıdıkları ilaç yükünün hücrenel alımının ve sitotoksik etkilerinin arttırılabildiği yaygın olarak bildirilmektedir. Ancak, Mk'ların biyomedikal uygulamalarda kullanımı hem mikrokabarcık boyutu özellikleri ile sınırlıdır hem de Mk'ların biyoyumlulukları ve stabiliteyi dikkate alınması gereken diğer önemli faktörlerdir. Mk'ların stabiliteyi, raf ömürleri (depolama sıcaklığına, basıncına vb. bağlı olarak) ve *in vivo* / *in vitro* stabiliteyi ile karakterize edilmektedir (Upadhyay et al., 2019). *In vivo* stabilite kavramı, mikrokabarcıklar vücuda uygulandığında değişen pH, çözünmüş gazlar içeren sulu ortam, arteriyel basınçlar ve immünojenik yanıt gibi koşulları deneyimleyerek stabil kalabilmelerini ifade etmektedir. Öte yandan, mevcut bir literatür çalışmasında, protein yapıda mikrokabarcıkların sıcaklık ve basınca karşı stabiliteyi test edilmiş ve daha yüksek depolama sıcaklıklarında, protein mikrokabarcıklarının sayısının parçalanma (rupturing) yoluyla daha hızlı azaldığı gösterilmiştir (Rovers et al., 2016). Öte yandan, sıcaklık-bağımlı Mk'ların tepkilerinin incelendiği bir çalışmada da ortam sıcaklığı (27 °C) vücut sıcaklığının biraz üstü bir sıcaklığa (38 °C) aniden ısıtıldığında kabarcık yarıçapında ani bir artış ve kabuk esnekliğinde bir azalma görülmüştür (Lum et al., 2018). Bu mikrokabarcık büyümesinin muhtemelen hem gaz çekirdeğinin termal

genleşmesi hem de çevre sıvı ortamındaki çözünmüş gazların mikrokabarcık içerisine doğru akması sonucu meydana geldiği düşünülmüştür. Mk'larla ilgili bu tür *in vitro* sonuçların, *in vivo* uygulamalar için mikrokabarcık dinamiklerinin anlaşılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında incelenen 3. formülasyon olarak, SF₆ gazı içeren fosfolipit mikrokabarcıklar, MicroSphere Creator (MSC) (Tide Microfluidics, The Netherlands) cihazı tarafından üretilmiş ve farklı mikroakışkan karıştırma sistemleri kullanılarak karboplatin taşıyan hidrofilik sodyum aljinat polimerik tabakası ile kaplanmışlardır. MSC cihazının sahip olduğu bu mikroakışkan hidrodinamik akış odaklama temelli yöntem, yüksek kontrol edilebilirlik düzeyi ve dar örnek boyut dağılımı ile mikrokabarcık sentezini mümkün kılmaktadır. Çalışmada kullanılan model ilaç olan karboplatin, platin bazlı bir sisplatin analogudur ve mesane, yumurtalık, baş/boyun ve özellikle küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanserleri (KHDAK) için etkili bir antineoplastik ilaçtır (Wang et al., 2017). Karboplatin, önemli ölçüde daha düşük sistemik toksisite gösteren ve KHDAK için en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olmasına rağmen, çoklu ilaç direncinin indüksiyonu ve hayatta kalma sinyal yolağının aktivasyonu gibi nedenlerle sınırlı terapötik etkinliğe sahiptir (Kang et al., 2015). Akciğer kanseri ile ilgili yoğun çalışmalara rağmen kullanılan kemoterapötiklerin taşıdıkları ciddi yan etkiler ve hastaların geliştirebildiği ilaç direnci nedeniyle bu hastalığın tedavisi için yeni ilaç salım sistemleri gibi terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Cao et al., 2020). Karboplatin taşıyan polimerik kabuk tabakası, hidrofilisite, pH duyarlılığı, biyouyumluluk, biyo-adhezyon ve ılıman jelleşme gibi özelliklerinden dolayı kontrollü ilaç salım sistemleri için sıklıkla tercih edilen doğal bir polimer olan sodyum aljinatın (Akay et al., 2017), fosfolipitle stabilize edilmiş SF₆ mikrokabarcıklarında bir ek dış katman olarak kalsiyum aracılı olarak jelleştirilmesiyle elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Timokinon Yüklü Kübik ve Hegzagonal Liyotropik Sıvı Kristalin Nanopartiküller

3.1.1. Materyal

Soya fosfatidilkolin (SFK, %97.6 saflık) Lipoid GMBH'den (Ludwigshafen, Almanya) satın alınmıştır. Ayçiçek yağından yapılan mono- ve di-gliseritlerin sitrik asit esterlerinin bir kombinasyonu olan Grinsted® sitrem LR10, Danisco A/S'den (Kopenhag, Danimarka) hediye olarak alınmıştır. Sitrem LR10, ayçiçek yağından sentezlenmekte ve eser miktarda triaçilgliserid ile serbest yağ asitlerine ek olarak %64 oranda mono- ve di-gliserid, %36 oranda ise gliserol sitrat yağ asidi esterleri içermektedir (Amara et al., 2014). Timokinon (>% 98 saflıkta) ve fosfat tampon (PBS, 7.4 pH'ta) tabletleri Sigma-Aldrich'ten (Poole, Birleşik Krallık) satın alınmıştır. %96 saflıktaki etanol (EtOH) Merck Millipore'dan (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. PH 7.4'te 0.01 M PBS tamponunu hazırlamak için Milli-Q ultrasaf su kullanılmıştır (Millipore Direct-Q3 UV sistemi, Billerica, MA, ABD).

3.1.2. Sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin düşük enerji girdili kesikli üretimi

TQ içermeyen nanodispersiyonları hazırlamak için, kısaca uygun miktarlarda sitrem ve SFK tartılmış ve EtOH içinde çözülmüştür. Bu stok çözeltiler, ağırlıkça %40 lipit (ağırlıkça 2:3 oranında hazırlanmış sitrem/SFK ikili lipit karışımı) ve %60 etanol içermektedirler. Bu etanolik lipit çözeltileri daha sonra, 5 dakika boyunca 0.01 M PBS (pH 7.4) hafifçe vorteksenerek homojen ve kararlı sütsü görünümde çözeltiler elde edilmiştir. Bu yöntemle hazırlanan tüm nanodispersiyonlar sabit 2:3 sitrem/SFK ağırlık oranında hazırlanmıştır.

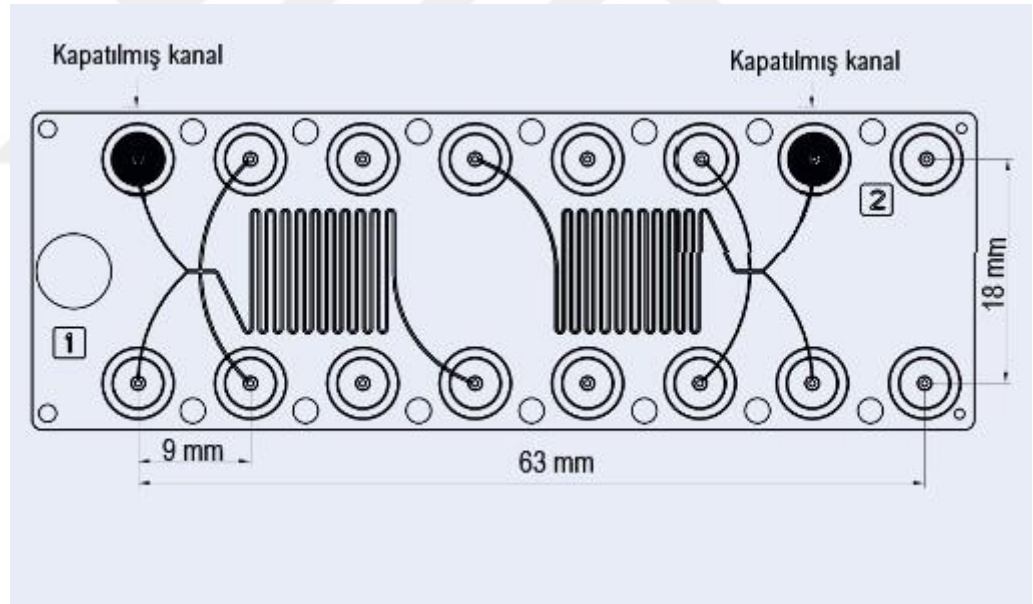
TQ yüklü nanodispersiyonları hazırlamak için ise, 1-10 mg/mL arasında değişen farklı konsantrasyonlardaki TQ önceden hazırlanmış bu etanolik sitrem/SFK solüsyonlarında çözüldürülmüş ve daha sonra numuneler yine yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen bu nanodispersiyonların son konsantrasyonları, ağırlıkça %1.09 EtOH ve ağırlıkça

%8 toplam lipit (sitrem/SFK karışımı) olarak sabit tutulmuştur (bu numuneler B1-4 olarak kodlanmıştır). Etanol konsantrasyonunun üretilen nanopartiküllerin yapısal özellikleri üzerindeki etkisi hakkında daha fazla bilgi edinmek için, 2.5 mg/mL'lik sabit TQ konsantrasyonunda ve farklı EtOH içeriklerinde (ağırlıkça %0 ile %5.45 aralığında) ek nanodispersiyonlar da hazırlanmıştır (bu numuneler de B5 ve B6 olarak kodlanmışlardır).

3.1.3. Sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin mikroakışkan çipte sürekli üretimi

TQ'suz ve TQ yüklü nanodispersiyonların mikroakışkan çipte sürekli sentezi, *microfluidic ChipShop* şirketinden (Jena, Almanya) satın alınan Fluidic 186 kodlu ticari bir hidrodinamik akış odaklama (HAO) çipi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu difüzyon mikrokariştiricilerinde, iki bağımsız HFF polikarbonat (PC) çip segmenti aynı mikroakışkan platform üzerine yerleştirilmiş haldedir (Şekil 3.1) ve her çipin iki yanal ve iki çekirdek giriş kanalı vardır. Bununla birlikte, bu çekirdek akış girişlerinden birisi, ikisi yanal ve birisi çekirdek olmak üzere toplam üç girişli bir hidrodinamik akış odaklamalı mikroakışkan çip yaratabilmek için tutkalla doldurularak bloke edilmiştir. Oluşturulan bu çipte TQ içermeyen nanopartiküllerin sürekli üretimi, yanal girişlerden iki PBS çözeltisinin enjekte edilmesi ve çekirdek girişinden ise sitrem/SFK etanol çözeltisinin enjekte edilerek hidrodinamik olarak odaklanması yoluyla sağlanmıştır. Bu yöntemde, ağırlıkça %40 lipit (2:3 oranda sitrem ve SFK ile hazırlanan ikili karışım) ve ağırlıkça %60 etanol içeren önceden hazırlanmış stok etanol çözeltisi, 1 mL enjektöre (B.Braun Injects -F Solo şırınga, Melsungen, Almanya) yüklenirken, PBS çözeltileri ise iki adet 5 ml hacimli BD (BD Luer-Lok™, New Jersey, ABD) enjektörlere yüklenmiştir. Enjektörler, tübingler ve kör uçlu iğnelerle (Terumo mixing needle without bevel, 18 G x1,5 ", 1.2 x 40 mm) mikroakışkan cihaza bağlandıktan sonra şırınga pompalarına (KR Analytical Ltd, Birleşik Krallık) monte edilmişlerdir. Bu sistemde, kullanılan **toplam akış hızı (TFR)**, merkezi ve yan akışların akış hızlarının toplamı iken, **FRR (akış hızı oranı)** ise yan akışların akış hızlarının merkezi çekirdek akışına oranıdır. Bu prosedürde, nanopartiküllerin sürekli üretimi, iki farklı TFR'de (50 ve 100 µL/dakika) ve sabit 20 FRR ile gerçekleştirilmiştir.

TQ yüklü nanodispersiyonların sürekli üretimi için ise üç farklı konsantrasyonda TQ (1.0, 2.5 ve 5.0 mg/mL), ağırlıkça %40 lipid (2:3 oranda sitrem ve SFK ile hazırlanan ikili karışım) ve ağırlıkça %60 etanol içeren önceden hazırlanmış stok etanol çözeltisine eklenerek, aynı şekilde mikrosisteme eklenmiştir. Sürekli üretilen kendiliğinden-düzenlenen nanoyapılar ağırlıkça sırasıyla %2.86 etanol ve %1.9 lipid (toplam sitrem ile SFK) sabit konsantrasyonlarında üretilmiştir. Ticari mikroakışkan çip kullanılarak, TQ'suz ve TQ-yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonlar, iki farklı TFR'de (50 ve 100 μ L/dak) ve sabit bir FRR'de (20) üretilmişlerdir. Sabit sitrem/SFK oranında (2:3) üretilen bu nanoyapıların ortalama nanopartikül boyutları ve boyut dağılımları, düşük enerjili emülsifikasyon parti yöntemi kullanılarak hazırlananlarla karşılaştırılmıştır. TQ içermeyen ve TQ-yüklü tüm nanodispersiyonlar, karakterizasyon işlemlerine kadar oda sıcaklığında (25°C) saklanmıştır.



Şekil 3.1. Kullanılan ticari polikarbonat mikroakışkan çipin şematik bir görünümü. Mikro kanalların derinliği 100 μ m ve çekirdek giriş kanalı genişliği 100 μ m, yanar giriş kanalları genişlikleri 200 μ m, karıştırıcı kanal genişliği 200 μ m ve çıkış kanalı genişliği 200 μ m'dir.

3.1.4. Nanopartikül izleme analizi (NTA)

Hem ticari HAO çipi kullanılarak üretilen TQ içermeyen ve TQ yüklü nanopartiküllerin ve hem de bunların kesikli emülsifikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan karşılıklarının boyut karakterizasyonları, bir lazer (405 nm) ve bir mikroskop (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, İngiltere) ile donatılmış NanoSight NS300 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerden önce, 10^8 - 10^9 nanopartikül/mL konsantrasyon aralığına ayarlayabilmek için üzere ultra saf su (18.2 MΩ cm) ile hazırlanarak filtreden, (0.2 µm) geçirilmiş PBS (pH 7.4) kullanılarak nanopartikül numuneleri 10^4 kat seyreltilmiştir. Ölçümler, numunenin farklı konumlarından çekilen 5 ila 9 arasında video ile nanopartiküllerin ayrı ayrı izlenmesine dayanmaktadır. Malvern yazılımı (NTA 3.2 Dev Build 3.2.16) sayesinde kaydedilen videolar analiz edilmektedir. Aynı enstrümantal ayarlarda kontrol olarak PBS (pH 7.4) kullanılmıştır.

3.1.5. Sinkrotron küçük açılı X-ışını saçılımı (SAXS)

İçin SAXS incelemeleri, Avusturya SAXS ışın hattında (Elettra sinkrotron tesisi, Trieste, İtalya) gerçekleştirilmiştir. Numuneden dedektöre 1314 mm mesafesinden 0.18 ile 5.00 nm^{-1} q aralığını ($q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, λ =dalga boyu ve 2θ =saçılma açısı olmak üzere) kapsayacak şekilde 1.54 Å (8 keV) dalga boyuna sahip bir X-ışını ışını kullanılmıştır. Ölçülen intensitenin açısal ölçeğini kalibre etmek için standart olarak ise 58.38 Å d -aralık değerine sahip gümüş behenat (CH_3 -(CH_2)₂₀-COOAg) kullanılmıştır. Bu incelemelerde, 1 mm çapında kuvars kılcal borular (numune tutucular) kullanılmış ve numunelerin sıcaklıkları bir su banyosu (sıcaklık kararlılığı $\pm 0.1^\circ\text{C}$, Unistat CC, Huber, Offenburg, Almanya) ile kontrol edilmiştir. SAXS ölçümleri, 25 veya 37°C 'de, görüntü başına 20 saniye maruziyet süresi ve her 5 görüntü arasında 3 saniyelik gecikmeyle gerçekleştirilmiştir. 2B SAXS paternleri, tek boyutlu (1-B) saçılma fonksiyonuna $I(q)$ entegre bir Pilatus3 1 M dedektörü (Dectris Ltd., Baden, İsviçre; $172 \times 172 \text{ µm}^2$ piksel boyutunda $169 \times 179 \text{ mm}^2$ aktif alan) kullanılarak Avusturya SAXS ışın hattında bulunan veri azaltma hattı olan SAXSdog ile elde edilmiş (Burian et al., 2020) ve ardından IGOR pro (Wavemetrics, Inc., Lake Oswego, ABD) yazılımı ile analiz edilmiştir. Ham veriler, detektör verimliliği ve arka plan saçılması adına düzeltildikten sonra, elde edilen beş görüntünün ortalama saçılma paternleri, intensitenin bir fonksiyonu olarak

çizilmiş (q 'ya karşı $I(q)$) ve tüm Bragg pikleri Lorentzian dağılımları ile denkleştirilmiştir. Saptanan sıvı kristalin nanoyapılar olan lamelar (L_a) ve lamelar olmayan sıvı kristal fazların latis parametreleri (a), tespit edilen her Bragg piki için karakteristik mesafenin ($d = 2\pi/q$) hesaplanması ile elde edilmiştir. Tespit edilen lamelar-olmayan sıvı kristalin fazlar, $Pn3m$ simetrisinde ters bikontünyus kübik (Q_2) fazı ve ters hegzagonal (H_2) fazdır.

3.2. EGFR-Hedefli Karboplatin Yüklü Aljinat-PAMAM Hibrit Nanopartiküller

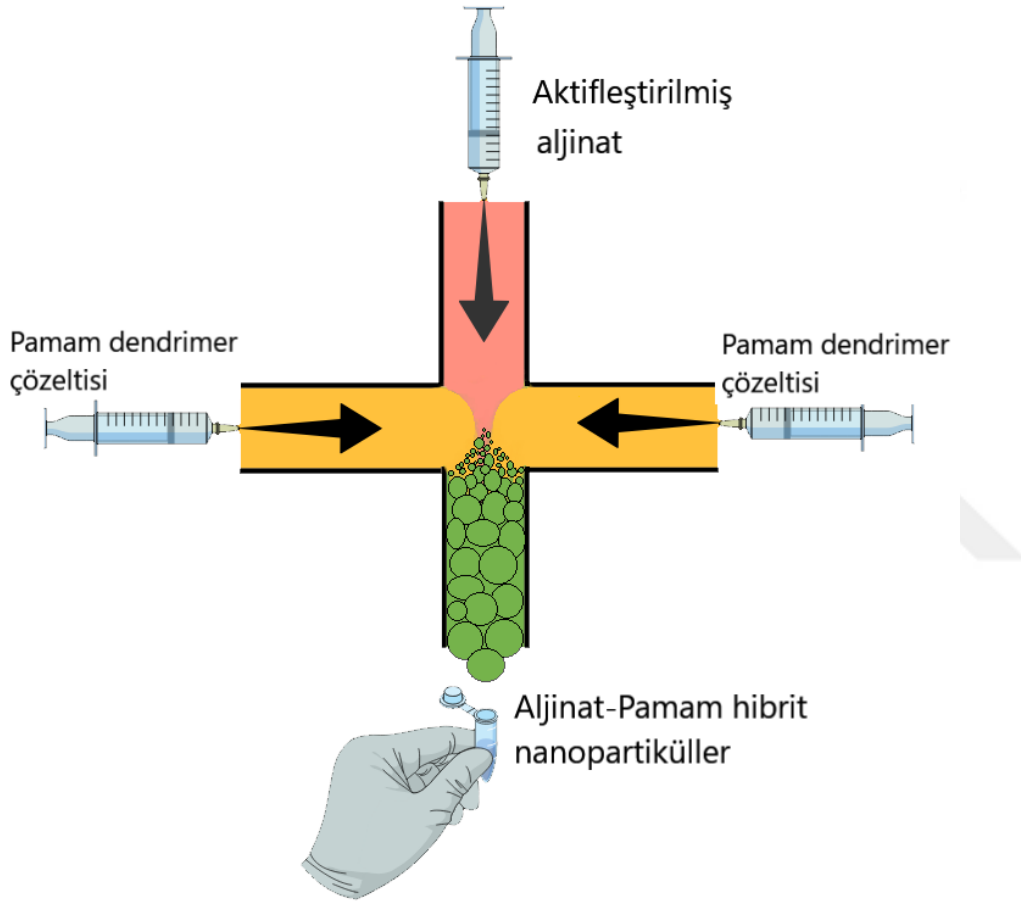
3.2.1. Materyal

EGF (Recombinant Human Epidermal Growth Factor, Gibco™) ve ELISA™ Kiti (EGF Human Instant ELISA™ Kit, Invitrogen) ThermoFisher-Scientific'den satın alınırken, aljinat, Pamam (G4) ve diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Karboplatin ise (150 mg/15 mL flakon) Koçak Farma, Türkiye'den temin edilmiştir. Tüm hücre kültürü reaktifleri, Tripan mavi boyası, MTT ve dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich'ten (ABD), canlı/ölü hücre boyama kiti ise Molecular Probes, Invitrogen'den (ABD) satın alınmıştır.

3.2.2. Karboplatin yüklü Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) mikroakışkan platformda sentezi

Aljinat-PAMAM hibrit nanopartikül sentezi için, aljinatın karboksil gruplarının aktifleştirilerek Pamam (4.jenerasyon: G4) dendrimerlerinin yüzeyinde bulunan $-NH_2$ amino gruplarına kovalent bağlanabilir hale getirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle aljinat (20 mg/mL) içerisine, EDC (N -(3-Dimethylaminopropyl)- N' -ethylcarbodiimide hydrochloride, 0.1 mmol) ve NHS (N -Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, 0.05 mmol) reaktifleri eklenerek toplam iki saat süresince karanlıkta karıştırılarak aktifleştirilme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aktifleştirilen aljinat ilgili miktarda karboplatin eklemesi sonrası Şekil 3.2.'de şematize edilen 200 μm çapa sahip üç adet mikrokanalın akış odaklamalı birleştiği bir mikroakışkan platforma, 10 μL /dak hızla pompalanırken, yan kanallardan ise farklı konsantrasyonlarda Pamam sulu çözeltileri 200, 300 ve 400 μL /dak olarak farklı akış hızlarında gönderilmiştir. Böylece akış oranları (flow rate ratio, FRR) sırasıyla 40, 60 ve

80 olarak denenmiştir. Pamam G4 konsantrasyonları 0.04mM ve 0.08 mM olarak denenerak dendrimer konsantrasyonunun sentezlenen nanopartikül boyut dağılımları üzerine etkileri incelenmiştir. Karboplatin yüklenmeyen boş (plasebo) aljinat-Pamam Hibrit nanopartiküller (Al-Pa) ise karboplatin içermeyen PAMAM sulu çözeltileri kullanılarak aynı yöntemle sentezlenmişlerdir.



Şekil 3.2. Karbodiimid reaksiyonu ile aljinat-Pamam hibridizasyonu

Mikroakışkan çipin çıkış akımından alınan nanopartiküller 8750 g (9000 rpm) hızda Eppendorf MiniSpin® plus marka cihaz ile santrifüjlenerek pellet halinde toplanmış ve ardından 2 kez ultra saf su ile yıkandıktan sonra liyofilize edilmişlerdir. Ayrılan süpernatant ise enkapsüle olmamış karboplatin konsantrasyonunun belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu LC-20A PDA) ile analiz edilmiştir. 0.45 µm'lik filtresi ile filtre edilen numuneler, ACE C18 kolonuna (250 mm x 4.6 mm x boyutu 5 µm) gönderilmişlerdir. Mobil faz, sulu faz olarak 20 mM PBS tamponu (%75)

ve organik faz olarak asetonitril (%25) şeklinde hazırlanmıştır. Mobil fazın akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanarak, numuneler sisteme 20 µL enjeksiyon hacmi ile enjekte edilmiştir. 10 dakika enjeksiyon süresi (35°C) ve dedeksiyon dalga boyu 227 nm olan HPLC sonuçlarına göre, enkapsülasyon verimliliği (% EE) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

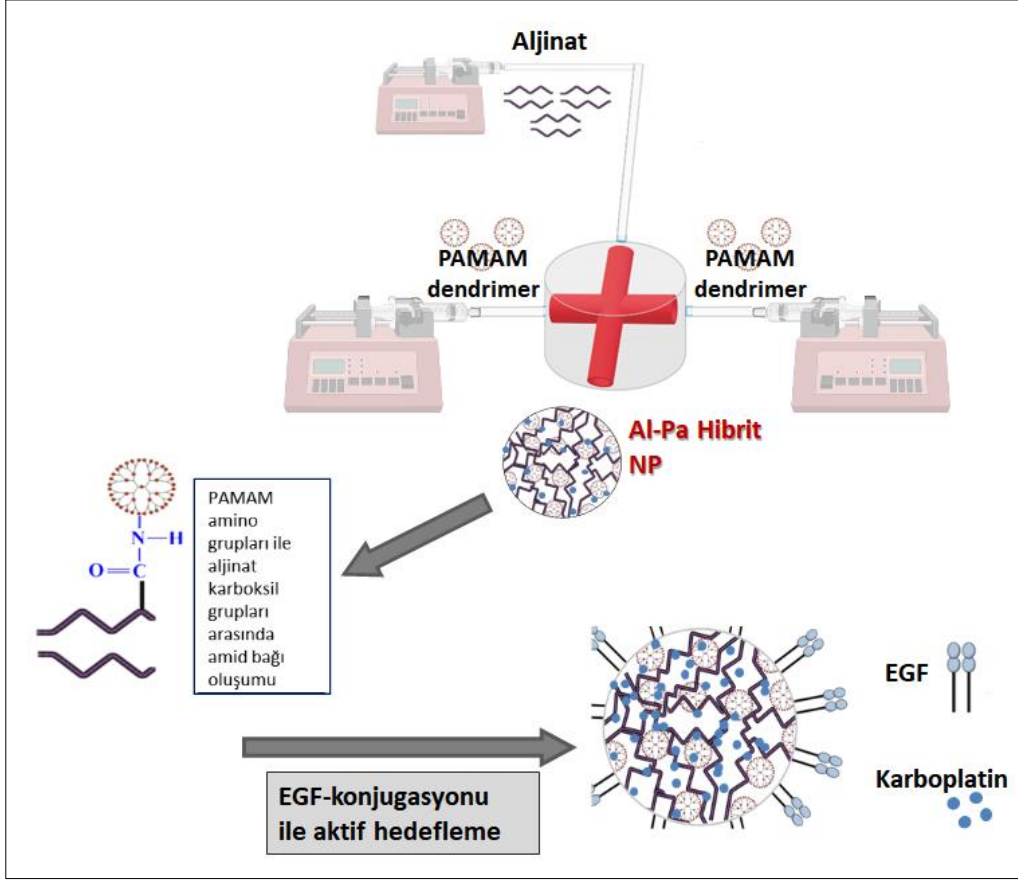
$$\%EE = \frac{\text{Eklenen karboplatin miktarı} - \text{süpernatantta kalan karboplatin miktarı}}{\text{Eklenen karboplatin miktarı}} * 100$$

Sentezlenecek nanopartiküllerin boyut dağılımları ve polidispersite indeksleri Malvern Zetasizer cihazı (Nano-ZS) ile ölçülmüştür. Karbodiimid reaksiyonu aracılığı ile gerçekleşecek hibridizasyon reaksiyonu ise FTIR (fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) ve XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) analizleri ile izlenmiştir. Yüzey morfolojisini incelemek için SEM (taramalı elektron mikroskopisi) analizi, termal karakterizasyonları için ise DSC (diferansiyel tarama kalorimetresi) analizi ile yapılmıştır.

3.2.3. Karboplatin yüklü Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) EGF ile konjugasyonu

Sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerin ve dolayısıyla karboplatin ilacının sağlıklı dokular yerine spesifik olarak tümör dokularında birikiminin, adhesyonunun ve hücrel alımının artırılabilmesi için EGF ligandı ile konjugasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bir protein olan EGF hem karboksilik asitleri hem de primer aminleri (C- ve N-termini ve ayrıca EGF'lerin yan zincirlerinde bulunan amino asitleri) içermektedir. Dolayısıyla, EDC ve NHS kullanılarak karbodiimid kimyası ile yüzeydeki aljinata ait karboksilik grupları ile EGF'e ait amin grupları arasında karbodiimid kimyası ile amid bağı oluşturulması hedeflenmiştir. PBS içerisinde dispers edilmiş nanopartikül çözeltisi üzerine EDC, NHS ve EGF eklenerek manyetik karıştırıcı ile karanlıkta iki saat süresince karıştırılmışlardır. Süre sonunda nanopartiküller santrifüjlenerek pellet haline getirilmiş ve reaktif kalıntıları ile bağlanmamış EGF'lerin uzaklaştırılabilmeleri amacıyla ultra saf su ile yıkanmış ve ardından -20°C'de dondurularak liyofilize edilmiştir. EGF konsantrasyonları 1, 2 ve 3 µg/mL olarak denenmiş, farklı EGF konsantrasyonlarının konjugasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, EGF konjuge edilmiş aljinat-Pamam Hibrit nanopartiküller (EGF-Al-

Pa), PBS tamponunda dispers edilmiş ve taşıdıkları konjuge EGF miktarı EGF ELISA kiti ile analiz edilmiştir. Ayrıca SEM ile de morfolojik incelemeleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Mikroakışkan çipte sentezlenen aljinate-Pamam hibrit nanopartikülerin EGF ligandı ile konjugasyonu

3.2.4. *In vitro* sitotoksik etkinin incelenmesi

Hücre Kültürü Materyalleri ve Reaktifleri: A549 (insan epitelyal akciğer adenokarsinomu, KRAS mutanı olduğu bilinen bir KHDAK hücre hattı) hücre hattı ve BEAS-2B (insan bronşiyal sağlıklı epitelyumu) hücre hatları, Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC Mannassas, VA) temin edilmiştir. Hücreler, %10 fetal buzağı serumu (FCS), %1 L-glutamin (200 mM) ve %0.1 gentamisin (10 mg/mL) ile takviye edilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium besin ortamında kültüre edilmişlerdir. Tüm hücreler, filtre edilmiş havalandırma kapaklarına (Corning, ABD) sahip T-flasklar kullanılarak

37°C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde monolayer (%80 konfluent-sıkışıklık) kültüre edilmiş ve sonra %0.25 tripsin-EDTA ile hasat edilmiştir.

Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi: Serbest karboplatinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile ölçülerek IC₅₀ değeri hesaplandıktan sonra, mikroakışkan platformda sentezlenen karboplatin yüklü veya boş EGF-A1-Pa nanopartiküllerinin MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için yeterli sayıda üretilen ve süspansiyon edilmiş hücreler her bir nanopartikül konsantrasyonu ve karboplatin için üçer tekrar olacak şekilde 96-gözlü plakanın kuyucuklarına (1x10⁴ hücre/kuyucuk) ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübasyona (37°C, %5 CO₂) bırakılmışlardır. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki ortam çekilerek, besin ortamı ile seyreltilmiş farklı konsantrasyonlardaki nanopartikül numunelerinden 100'er µL ekleme yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece besin ortamında bulunan işlem görmemiş hücreler, negatif kontrol olarak ise DMSO'da bekletilmiş hücreler analiz edilmişlerdir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona (37°C, %5 CO₂) bırakıldıktan sonra üzerlerine, %10 MTT solüsyonu (5 mg/mL) içeren serumsuz besin ortamlarından 100'er µL eklenmiştir. 3 saatlik 37°C'deki inkübasyonun ardından, MTT dökülerek DMSO solüsyonundan 100 µL kadar eklenmiş ve ardından mikropilaya okuyucusu kullanılarak 570 nm/ 690 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür. Hücre canlılığı şu formülden hesaplanmıştır; “örnek ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansı/pozitif kontrol hücrelerinin absorbansı x 100”.

3.3. Ultrason-Kontrast Ajan Olarak Karboplatin Yüklü Mikro-kabarcıklar

3.3.1. Materyal

Mk'ları stabilize eden fosfolipit tabakasının bileşenleri olan 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfatik asit (DPPA), 1,2-dipalmitoil sn-3-fosfokolin (DPPC) ve N-(Karbonilmetoksipolietilenglikol 5000)-1,2-dipalmitoil-sn glisero-3 -fosfoetanolamin (DPPE-mPEG5000) Avanti Polar Lipids, Inc'den satın alınırken, diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Karboplatin ise (150 mg/15 mL flakon) Koçak Farma, Türkiye'den temin edilmiştir. Tüm hücre kültürü reaktifleri, Tripan mavi boyası, MTT ve dimetil

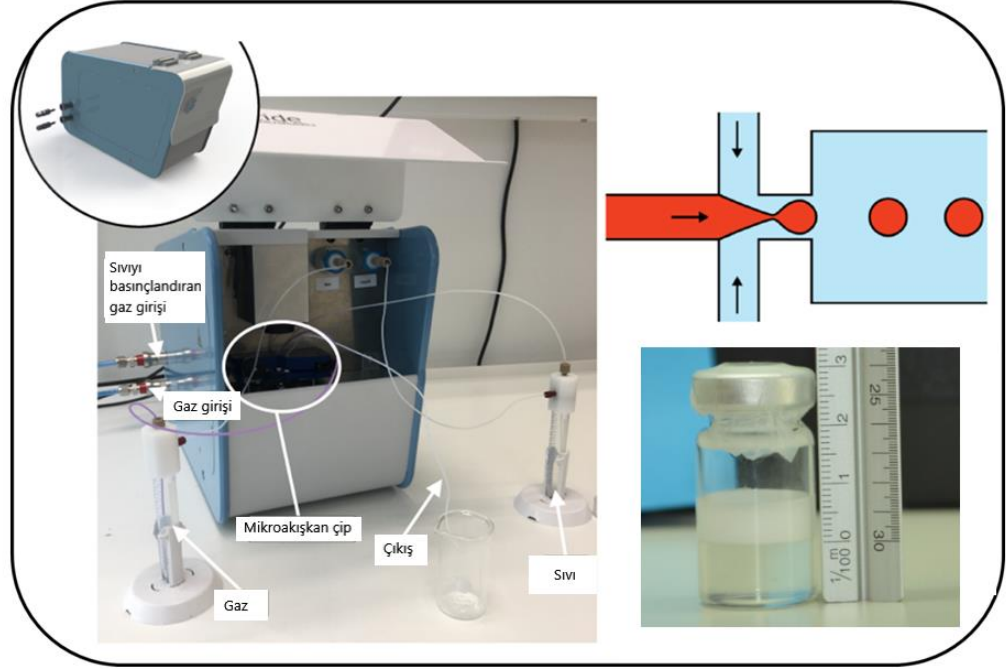
sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich'ten (ABD), canlı/ölü hücre boyama kiti ise Molecular Probes, Invitrogen'den (ABD) satın alınmıştır.

3.3.2. Lipit-polimer karışımının hazırlanması

Mikrokabarcıklar üretmek için kullanılan lipit çözeltisi, bir miktar GPW içerisinde 0.82/0.1/0.08 mol oranında üç farklı lipit DPPC, DPPA ve DPPE-mPEG5000 kullanılarak hazırlanmıştır. GPW olarak isimlendirilen çözücü ise 10/10/80 hacim oranında (% v/v) gliserol, propilen glikol ve fosfat tamponlu salin (PBS) içermektedir. Bu üç fosfolipit, önceden ısıtılmış propilen glikol (72°C) içinde birer birer ilave edilerek tamamen çözünmeleri sağlanmıştır. Ardından, çözücü karışımın geri kalan bileşenleri olan gliserol ve PBS de yavaşça ilave edilerek, 72°C'de 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Son olarak, henüz 30°C civarında olan lipit çözeltisi, 0.2 µm por çapında bir selüloz asetat şırınga filtreden geçirilmiştir. Daha sonra, %0.5 (ağırlıkça) aljinat konsantrasyonuna sahip lipit polimer karışımını elde etmek için, süzülen hacme bağlı olarak doğrudan sodyum aljinat ilave edilmiştir. Bu son karışıma, 0.2 µm'lik bir selüloz asetat şırınga filtresinden ikinci bir filtrasyon gerçekleştirilmeden önce birkaç saat karıştırılmıştır. Elde edilen 10 mg/mL lipit ve %0.5 aljinat içeren süspansiyon, Mk sentezi için kullanılabilece kadar birkaç gün +4 ° C'de saklanmıştır.

3.3.3. Mikroakışkan sistemin kurulumu

Tide Microfluidics B.V. (Enschede, Hollanda) tarafından geliştirilen MSC isimli cihaz, kullanıcının homojen mikrokabarcıklar üretmesine olanak tanıyan kompakt bir üretim sistemidir. Asimetrik bir akış odaklama sistemini kullanmakta olan MSC cihazında, basınç oranına bağlı olarak ayarlanabilir boyutta mikrokabarcıklar üretilmektedir (Şekil 3.4.). Bu platforma orta kanaldan giren gaz, çıkış kanalında uzar ve sonunda iki yan kanaldan gelen sıvıların kayma kuvveti ve ortaya çıkan basınç gradyanı altında kabarcıklara bölünür. Gazın ve sıvının giriş basınçları, varyasyon katsayısının (variation coefficient; CV) ve üretim hızının gerçek zamanlı ölçümüne de izin veren bir yazılım tarafından kontrol edilirler. Kabarcıklar, cihaza entegre bir optik sistem kullanılarak algılanır. Üretilen kabarcıklar çıkış kanalından geçer ve bir cam vialde saklanırlar.



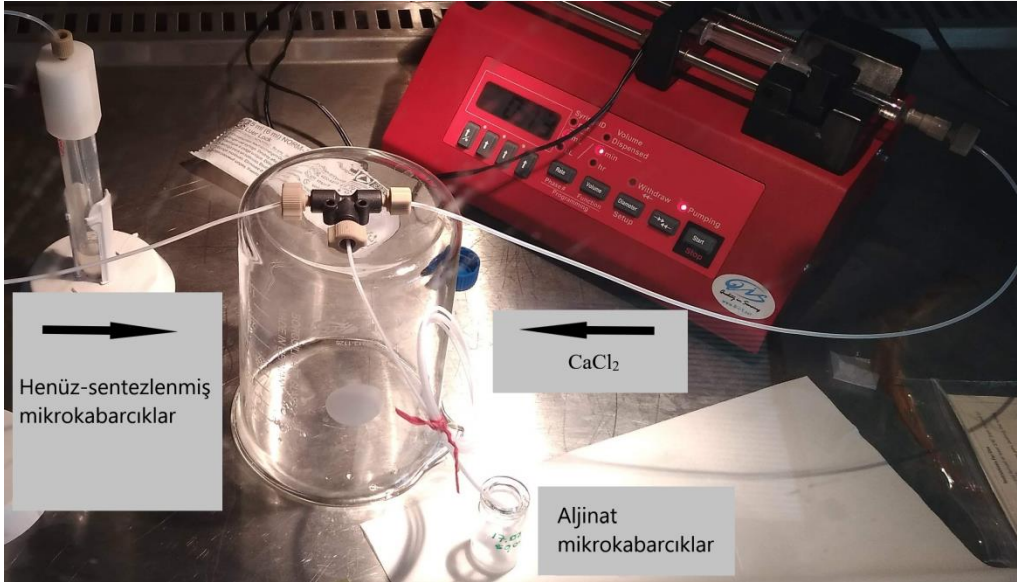
Şekil 3.4. MSC cihazının dış görünüşü (solda) ve cihaz içerisindeki akış odaklamalı mikroçipin tasarımı (sağda).

3.3.4. Aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların (Al-Mk) mikroakışkan sistemde sentezi

MSC konteynerlerinden birisi aljinat-lipit solüsyonu ile doldurulurken diğeri SF_6 gazı ile doldurulmak üzere boş bırakılmıştır. Gaz ve sıvı solüsyon, bu basınçlı konteynerlerden, kabarcıkların oluşturulduğu mikroakışkan çipin içine gönderilirler. Sistem stabil duruma geldikten sonra, henüz-üretilmiş Al-Mk'lar 15 dakikalık sürekli üretim süresince toplanmıştır. Henüz-üretilmiş Al-Mk'ların yüzeyindeki aljinat polimer zincirleri ve Ca^{2+} kanyonları arasında çapraz bağlanma reaksiyonunu sağlamak için farklı konsantrasyonlarda (% 0.01, 0.05 ve 0.10 w/v) CaCl_2 çözeltisi ile karıştırılmışlardır. Çapraz bağlanma reaksiyonuna ilişkin teknik ayrıntılar bir sonraki bölümde tartışılacaktır. Karboplatin yüklü aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların (K-Al-Mk) sentezi ise aljinat-lipit solüsyonunun 2 mg/mL karboplatin nihai konsantrasyonunu içerecek şekilde hazırlanması ile elde edilmiştir. Deneysel MSC parametreleri, yaklaşık 136 kHz'lik bir üretim hızı, $\approx 3\%$ CV, 6300 mbar sıvı basıncı ve 5140 mbar gaz basıncı olarak ayarlanmıştır.

3.3.5. Mikrokabarcıklardaki aljinat tabakasının çapraz bağlanması için CaCl_2 çözeltisi ile karıştırılması

Henüz-üretilmiş mikrokabarcıkların (Al-Mk'lar, K-Al-Mk'lar) CaCl_2 çözeltileri ile karıştırılmaları için biri T-bağlantılı mikrokanal (0.5 mm çap ve PEEK materyali) diğeri ise “teardrop” pasif mikrokarıştırıcı (Micronit FC_TD26_PACK) olmak üzere iki farklı mikroakışkan platform, MSC cihazının çıkış kanalı ile seri şekilde bağlanarak çapraz bağlanma reaksiyonunu teşvik etmek için mikroreaktör olarak kullanılmışlardır. . T-bağlantısının çıkış hattı 80 cm uzunluğunda kesilmiş ve bir ilmek oluşturacak şekilde kendi üzerinde sarılmıştır (Şekil 3.5.). Micronit marka “teardrop” mikrokarıştırıcısı ve uyumlu çip tutucusu ise Şekil 3.6.'da görülebilmektedir. MSC cihazı çıkış hattındaki henüz-sentezlenmiş Al-Mk ve K-Al-Mk'lar, doğrudan pasif mikrokarıştırıcının girişlerinden birine veya T-bağlantı kanalına bağlanarak diğeri giriş kanalından gelen CaCl_2 çözeltisi ile karıştırılmaları sağlanmıştır. CaCl_2 solüsyonu veya kontrol grubu olarak kullanılan deiyonize su, şırınga pompası yardımı ile için 0.13 mL/dak akış hızında pompalanmıştır.



Şekil 3.5. MSC çıkışından gelen henüz-sentezlenmiş Al-Mk ve K-Al-Mk'ların CaCl_2 ile karıştırılmaları için kullanılan T-bağlantı kanalı

Kabuk kısmındaki aljinat polimerinin çapraz bağlanması sağlanan Al-Mk'lar ve K-Al-Mk'lar seri bağlı mikroakışkan sistemlerin nihai çıkışında 1 mL'lik şırıngalara toplanarak santrifüjleme yöntemi ile yıkanmışlardır (Feshitan et al., 2009). Mk'ların toplandığı şırıngalar, şırınga kapaklarıyla

kapatıldıktan sonra 300 RCF'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiş (Eppendorf 5810 R, Hamburg, Almanya) ve ardından şırınga pistonu ile süspansiyon arasında bir kek tabakası halinde toplanmışlardır.



Şekil 3.6. MSC çıkışından gelen henüz-sentezlenmiş Al-Mk ve K-Al-Mk'ların CaCl_2 ile karıştırılmaları için kullanılan "teardrop" mikrokariştirici

Lipit ve polimer kalıntılarını içeren geri kalan süspansiyon (infranatant), enkapsüle olmamış karboplatin içeriğinin belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu Prominence) ile analiz edilmiştir. $0.45 \mu\text{m}$ 'lik filtresi ile filtre edilen numuneler, Hypersil C18 ODS kolonuna (250 mm x 4.6 mm, partikül boyutu $5 \mu\text{m}$) gönderilmişlerdir. Mobil faz, sulu faz olarak sülfürik asit 0.001N ve sodyum sülfat 0.02 M (pH 3.5) içeren sulu faz ve organik faz olarak metanolün 95:5 oranlarında bir karışımı

olarak hazırlanmıştır. Mobil fazın akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanarak, numuneler sisteme 20 µL enjeksiyon hacmi ile enjekte edilmiştir. Toplam çalışma süresi 20 dakika (25°C) ve dedeksiyon dalga boyu 229 nm olan HPLC sonuçlarına göre, K-Al-Mk'ların enkapsülasyon verimliliği (% EE) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%EE = \frac{\text{Eklenen karboplatin miktarı} - \text{İnfranatanttaki karboplatin miktarı}}{\text{Eklenen karboplatin miktarı}} * 100$$

3.3.6. Mikrokabarcıkların boyut dağılımları

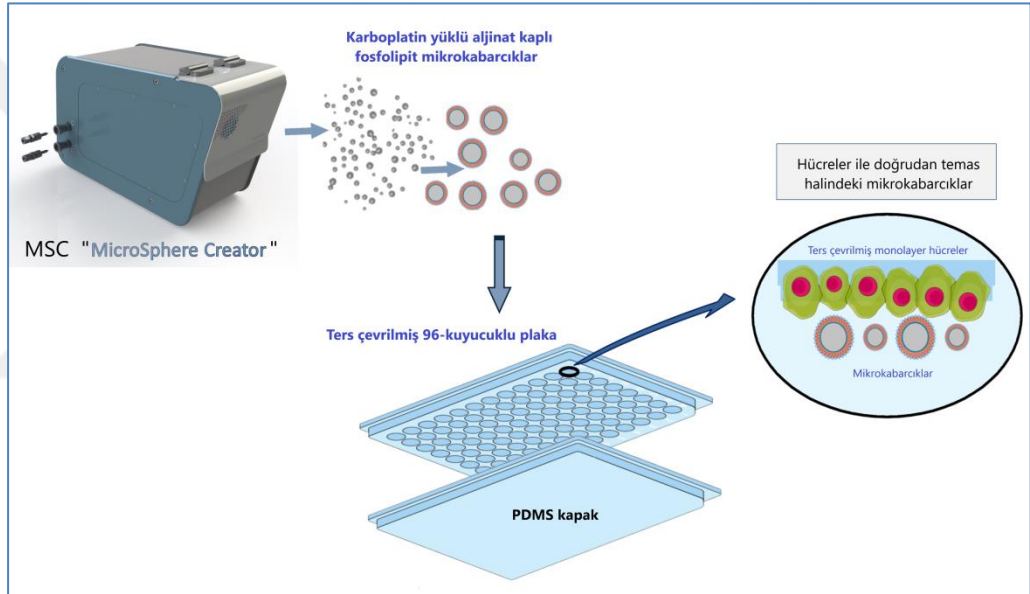
Sentezlenen fosfolipit mikrokabarcıkların (Mk), aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların (Al-Mk) ve karboplatin yüklü-aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların (K-Al-Mk) boyut dağılımları, bir ışık mikroskobu (Nikon objektif CFI Achrom 10XMRP00102 (10x / 0.25 WD7)) kullanılarak değerlendirilmiştir. 30 µL hacimde farklı mikrokabarcık numuneleri tek kullanımlık petri kaplarına pipetlendikten sonra üzerleri lamelle kapatılmıştır. Mk'ların petri ile lamel arasında sıkışarak patlamalarını önlemek için, petri ve lamel arasında küçük bir boşluk yaratabilmek adına petrideki Mk numunesinin kenarlarına bant parçaları yerleştirilmiştir. Mikroskop altında her bir numuneden 20 fotoğraf çekilerek MATLAB yazılımı ile numunelerin ortalama çapı, PDI ve kabarcık konsantrasyonu analiz edilmiştir.

3.3.7. Mikrokabarcıkların sitotoksik aktiviteleri

Hücre Kültürü Materyalleri ve Reaktifleri: A549 ve BEAS-2B hücre hatları başlık 3.2.4.'de bahsedildiği şekilde muhafaza edilmiştir.

Mk, Al-Mk ve K-Al-Mk'ların Karşılaştırmalı Sitotoksik Aktiviteleri: Mk, Al-Mk ve K-Al-Mk'ların A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri MTT testi ile belirlenmiştir. İlk olarak, logaritmik büyüme fazındaki hücreler, ters ışık mikroskobunda (Axio Vert. A1, Carl Zeiss, Almanya) tripan mavisi boyası kullanılarak sayılmış ve kuyucuk başına 1×10^4 adet hücre olacak şekilde, 37°C'de 96 kuyucuklu plakalarda %5'lik CO₂ ile nemlendirilen bir inkübatörde yaklaşık 16 saat süresince kültüre

alınmışlardır. Kültür ortamı uzaklaştırdıktan sonra, her kuyucuktaki hücelere toplam 360 μL hacimde karboplatin (100 $\mu\text{g/mL}$) veya bu konsantrasyonda karboplatine denk miktarda karboplatin taşıyan K-Al-Mk numunesi uygulanmıştır. Ayrıca, uygulanan K-Al-Mk konsantrasyonunda hücelerin maruz kaldığı mikrobaloncuk hacmi hesaplanarak denk gelen miktarda fosfolipit mikrokabarcık (Mk) ve aljinat kaplı mikrokabarcık (Al-Mk) numunesi uygulanmıştır. Mikrokabarcıklar gaz çekirdekleri sebebiyle düşük özgül ağırlığa sahip olduklarından sıvı yüzeyine doğru hareket etme eğiliminde olduklarından, mikrokabarcıkların hücelere doğrudan temas etmesini sağlayabilmek için Şekil 3.7.'de görülen kültür sistemi tasarlanmıştır.



Şekil 3.7. Mikrokabarcıkların monolayer hücelere ile doğrudan temas etmesini sağlayabilmek için tasarlanan kültür sistemi

Bu sistemde 96 kuyucuklu plaka ile kapağı arasında bir PDMS (polidimetilsiloksan) katmanı yerleştirilerek sızdırmazlık sağlandıktan sonra, plaka kapatılmış ve ardından kısıkaçlarla sabitlenmiştir. Daha sonra kuyucukları tamamen sıvı ile doldurulmuş ve ağız kapatılmış olan kültür plakaları ters çevrilerek, 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ sağlanan inkübatörde dört tekrarlı olarak 72 saat süresince inkübe edilmişlerdir. Bu teknikte kültür süresince üstte pozisyon almış olan hücelerin hemen altlarındaki mikrokabarcıklarla temas etmeleri sağlanmıştır. Kültür sırasında, sıcaklık veya ultrason gibi dış etmenler nedeniyle mikrokabarcıkların patlayacağı ve karboplatinin salınacağı hipotezi öne sürülmüştür. Böylece hücelere hem patlamadan hem de ilaç aktivitesinden

kaynaklanan sitotoksik bir etkiye maruz kalacaklardır. Bu tez kapsamında sentezlenen mikrokabarcıkların, ultrason dalgalarına maruz kalmaksızın sağlıklı ve tümörojenik insan akciğer hücreleri üzerinde gösterecekleri sitotoksik etkiler özel olarak tasarlanmış kültür sistemi aracılığıyla incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak besin ortamı kullanılırken (herhangi bir mikrokabarcık olmaksızın) ve negatif kontrol olarak ise hücreler DMSO ile test edilmişlerdir. 72 saatlik kültür süresinin sonunda, hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her kuyuya 5 mg/mL stok çözeltinin taze besin ortamında seyreltilmesi ile elde edilen % 10'luk MTT çözeltisi eklenmiş ve 37°C 3 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda, MTT ortamı uzaklaştırılmış ve canlılık ile doğru orantılı olarak ortaya çıkan formazan kristallerini çözmek için DMSO ilave edilmiştir. Bir mikropilaka okuyucusu (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ABD) ile 570 nm'de absorbans ölçülerek hücre canlılığı yüzdesine göre sitotoksikite cevabı belirlenmiştir. Veriler, her deney için dört kuyucuk kullanılarak üç bağımsız deneyden elde edilmiştir. GraphPad Prism 5.0 kullanılarak, “örnek ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansı/pozitif kontrol hücrelerinin absorbansı x 100” formülüne göre belirlenen %hücre canlılıkları, canlılığı %100 olarak kabul edilen pozitif kontrole göre karşılaştırılmıştır (Gülçe Iz et al., 2010).

Canlı/ölü hücre boyama testleri, hücre canlılığının iki renkli bir floresans parametrelerini ölçerek canlı ve ölü hücrelerin eşzamanlı olarak belirlenmesine dayanan bir hücre canlılığı sonucu sağlarlar. Polianyonik bir boya olan Kalsein AM, canlı hücreler içinde iyi şekilde tutularak homojen yeşil bir floresan üretir. Etdiyum homodimer-1 (EthD-1) ise zarları hasar görmüş hücrelere girerek nükleik asitlere bağlanır ve böylece ölü hücrelerde parlak kırmızı bir floresan üretir. Canlı/ölü hücre boyama testleri için A549 ve BEAS-2B hücreleri, 72 saat boyunca Mk, Al-Mk ve K-Al-Mk'lar ile muamele edildikten sonra, üreticinin talimatlarında açıklandığı gibi canlı / ölü boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre önce hücre ortamı uzaklaştırılmış, ardından 2 µM kalsein AM ve 4 µM EthD-1, PBS çözeltisi içinde karıştırılarak boya solüsyonu hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde uygulanmış ve ardından oda sıcaklığında karanlıkta 30-45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler PBS solüsyonu ile yıkanmış ve boyanan hücreler floresan mikroskopu (Zeiss, Axial 2.0, Almanya) altında incelenmiştir. Yeşil floresan boya, canlı hücreleri temsil ederken kırmızı floresan boya ise ölü hücreleri temsil etmektedir. Hem canlı hem de ölü hücre görüntüleri ayrı ayrı alınarak

birleştirilmiştir (Sharifi et al., 2019). Hücreler ImageJ programı ile sayılmış ve GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak hücre canlılığı yüzdesi grafikleri oluşturulmuştur (Yildiz-Ozturk et al., 2017). Sonuçlar, Bonferroni posttestleri ile $\pm\%95$ güven aralığında ($p < 0.05$) iki yönlü varyans analizi (iki yönlü ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında sentezlenen üç farklı antikanser etkili ilaç taşıyıcı formülasyona ait bulgular aşağıda üç ayrı başlık halinde sunulmuştur. Başlık 4.1’de pasif hedefli TQ-yüklü sitrem/SFK kübozomları ve hekzozomlarına dair elde edilen bulgular tartışılacak ve ardından başlık 4.2’de ise akciğer kanseri hücrelerinde aşırı düzeyde ifade edildiği bilinen epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) aktif olarak hedeflenmiş karboplatin yüklü EGF-konjuge aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin sentezleri incelenecektir. Son olarak, başlık 4.3’de ise uyaran (ultrason) duyarlı bir formülasyon olarak karboplatin yüklü aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların sentezlerine dair bulgular tartışılacaktır. Bahsedilen bu üç farklı antikanser etkili formülasyonun hepsinin sentezleri için farklı tasarımlarda mikroakışkan platformlar kullanılmış ve daha önce de anlatıldığı üzere pasif, aktif ve uyaran duyarlı olmak üzere gruplanabilen farklı hedefleme stratejileri ele alınmıştır.

4.1. Timokinon Yüklü Kübik ve Hegzagonal Liyotropik Sıvı Kristalin Nanopartiküller

4.1.1. TQ- içermeyen ve TQ-yüklü sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların boyut karakteristikleri

Ağırlıkça 2:3 sitrem/SFK oranında mikroakışkan çip kullanılarak üretilen TQ'suz ve TQ yüklü kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin boyut karakteristiklerine ilişkin fikir edinmek için, sabit FRR (20) ve iki farklı TFR (50 ve 100 uL/dak) üretilen nanodispersiyonlar üzerinde bir dizi NTA ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu nanodispersiyonlar, sabit etanol (ağırlıkça %2.86) ve lipit (ağırlıkça %1.9, sitrem ile SFK karışımı) konsantrasyonlarında hazırlanmışlardır. 100 ve 50 $\mu\text{L}/\text{dak}$ TFR'de üretilen TQ içermeyen numunelerin (A1 ve A2), ortalama nanopartikül boyutları (çapları) ve modları sırasıyla $115,5 \pm 42$ nm ortalama ve $134,8 \pm 3,6$ nm mod ile $119,7 \pm 42$ nm mean

ve 114.4 ± 3.8 nm mod arasında değişmektedir (**Tablo 4.1**). Bu ortalama boyutlar ve modlar, farklı kesikli üretim yöntemleri olan düşük enerjili emülsifikasyon (vorteksleme) ve yüksek enerjili emülsifikasyon (ultrasonikasyona) ile aynı sitrem/SFK lipid kompozisyonunda hazırlanan etanolsüz sitrem/SFK nanodispersiyonları ile benzer bulunmuştur (Azmi et al., 2016; Prajapati et al., 2018).

Etanolün boyut özellikleri üzerindeki olası etkilerine ek olarak, yakın tarihli bir makalede tartışıldığı gibi, sitrem ticari bir lipid olduğundan bileşiminin partiden partiye değişkenlik gösterebileceği ve dolayısıyla sitrem/SFK nanopartikül ailesi üyelerinin boyutsal ve yapısal özelliklerinde küçük değişikliklere neden olabileceğini hesaba katmak önemlidir (Prajapati et al., 2018). 1-5 mg/mL konsantrasyon aralığındaki TQ yüklemelerinde (A3-A8 numuneleri, Tablo 4.1), ortalama nanopartikül boyutları ve modları sırasıyla 124.3 ± 38 nm ortalama ve 126 ± 5.5 nm mod ile 164 ± 54 nm ortalama ve 150.5 ± 7.0 nm mod arasında değişmiştir. Dolayısıyla, TQ'nun sitrem/SFK nanodispersiyonlarına yüklenmesinin ortalama nanopartikül boyutları ve modlarında artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, gliserol monooleat/vitamin E ikili karışımı temelli lamelar olmayan sıvı kristalin nanopartiküllere (Yagmur et al., 2020) ve polimerik nanopartiküllere (Kazan et al., 2019) TQ enkapsülasyonunun incelendiği önceki çalışmaların sonuçları ile tutarlıdır. TQ konsantrasyona bağlı olarak, plasebo nanopartiküllerin boyut özelliklerinde meydana gelen değişiklikler TQ-aracılı yapısal geçişlere dayandırılmıştır (Yagmur et al., 2020). Ortalama nanopartikül boyutlarında artış durumunun, suda çözünürlüğü düşük diğer ilaçların (2-hidroksiöleik asit ve indometasin) sitrem/SFK nanopartiküllerine ve başka lamelar-olmayan sıvı kristalin kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllere yüklenmesinde ortaya çıktığı literatür çalışmalarında bilinmektedir (Esposito et al., 2005; Prajapati et al., 2019 a).

Tablo 4.1. Ters bikontinyus kübik $Pn3m$ fazı ile birlikte tanımlanan bifazik özellikteki lamelar (L_α) fazların nanopartikül boyutu analizi ve latis parametreleri

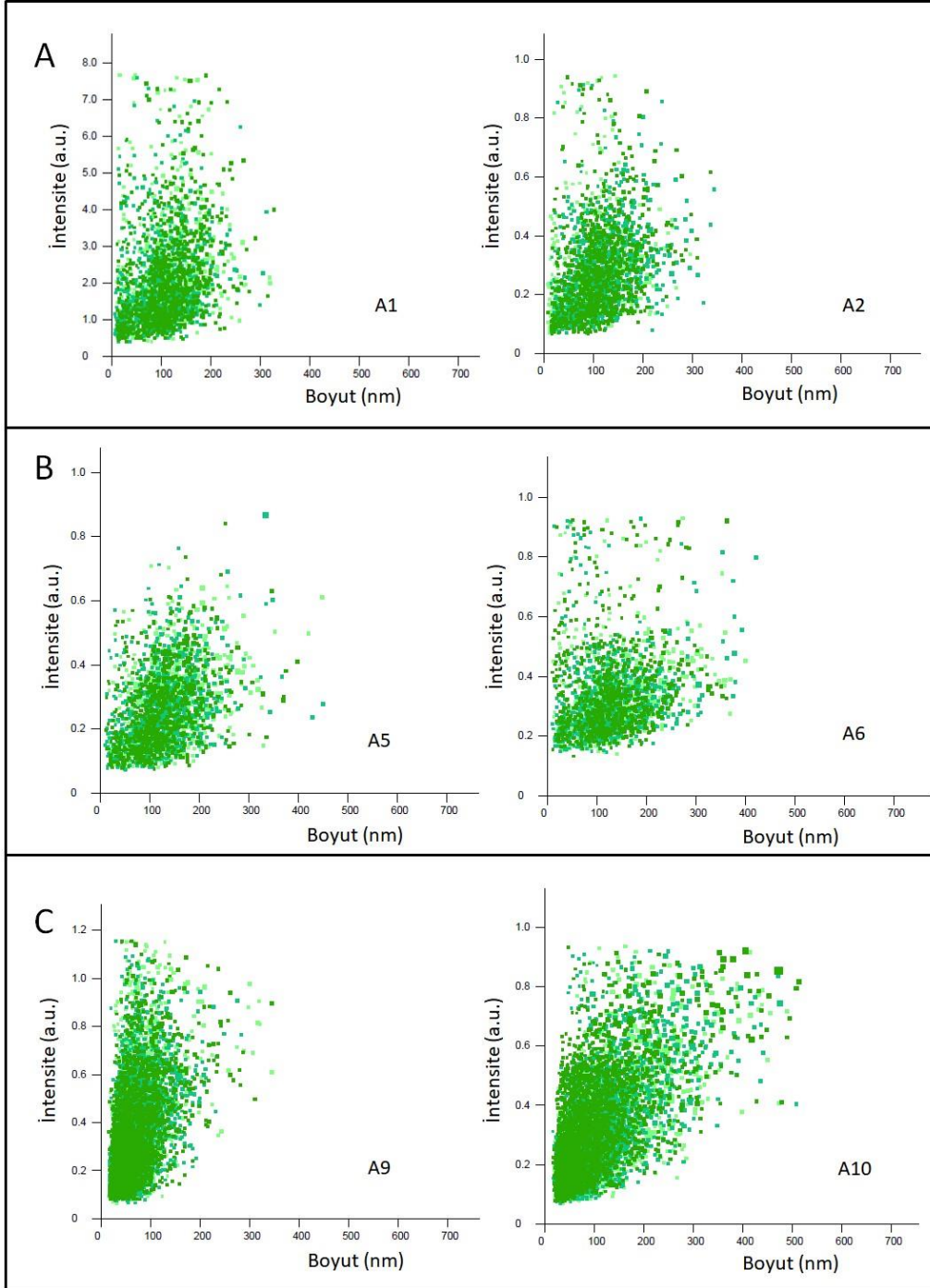
Kod ^a	TQ mg/mL	TFR $\mu\text{L/dak}$	Uzay grubu	Latis parametresi (nm)		Boyut (nm) ^c	
				25 °C	37 °C	Ortalama	Mode
A1	0	100	L_α	9.63	9.48	115.5 ± 42	134.8 ± 3.6
			$Pn3m$	20.18±0.03	19.70± 0.05		
A2	0	50	L_α	9.51	9.39	119.7 ± 42	114.4 ± 3.8
			$Pn3m$	20.18±0.03	19.70± 0.05		
A3	1	100	L_α	9.42	9.43	124.3 ± 38	126 ± 5.5
			$Pn3m$	19.62±0.02	19.36± 0.02		
A4	1	50	L_α	9.56	9.43	139.8 ± 48	136.7 ± 3.2
			$Pn3m$	20.18±0.03	19.70± 0.05		
A5	2.5	100	L_α	9.52	9.36	141.2 ± 49	145.5 ± 6.0
			$Pn3m$	19.26±0.04	19.27± 0.03		
A6	2.5	50	L_α	9.46	9.33	150.1 ± 61	140.3 ± 2.7
			$Pn3m$	19.87±0.02	19.74± 0.02		
A7	5	100	L_α	9.46	9.44	147.7 ± 45	150.5 ± 7.0
			$Pn3m$	19.6±0.02	19.18± 0.01		
A8	5	50	L_α	9.48	9.41	164 ± 54	144.6 ± 8.1
			$Pn3m$	19.71±0.04	19.62± 0.06		
A9	0	Kesikli	N.I.	N.I. ^b		116.8 ± 45	102.3 ±14.1
A10	2.5	Kesikli	N.I.	N.I. ^b		141.2 ± 44	135.1 ± 3.7

^aTüm nanodispersiyonlar, ağırlıkça sırasıyla %2.86 etanol ve %1.9 lipit (sitrem ile SFK) sabit konsantrasyonlarında üretilmiştir. ^bNumuneler A9 ve A10 için SAXS paternleri incelenmemiştir (N.I.). ^cNTA cihazında her ölçüm için numunenin farklı pozisyonlarından alınan 5 ila 9 arasında video analiz edildiğinde, yazılım tarafından ortalama ve mod nanopartikül boyutları sırasıyla \pm standart sapmalar ve \pm standart hatalarla sunulmuştur. Ticari mikroakışkan çip kullanılarak, TQ'suz ve TQ-yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonlar, iki farklı TFR'de (50 ve 100 $\mu\text{L/dak}$) ve sabit bir FRR'de (20) üretilmişlerdir. Üretilen bu kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların yapısal özelliklerini belirleyebilmek için SAXS deneyleri 25°C ve 37°C olarak iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

İlaç yüklemesinin ortalama nanopartikül boyutları üzerindeki etkisine ek olarak, kesikli emülsifikasyon yönteminin etkisine de ışık tutabilmek adına, Tablo 4.1'deki boyut dağılımları mikroakışkan yöntem ve kesikli emülsifikasyonla üretilen aynı kompozisyondaki nanodispersiyonların NTA bulguları karşılaştırılmıştır. Mikroakışkan sistemle tarafından hazırlanan TQ içermeyen ve TQ yüklü sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların ortalama boyutlarının (sırasıyla A1 ve A5, Tablo 4.1), kesikli emülsifikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan muadilleriyle (sırasıyla A9 ve A10, Tablo 4.1) oldukça benzer oldukları tespit edilmiştir. Örneğin, mikroakışkan yöntemle üretilen TQ içermeyen ve 2.5 mg/mL TQ yüklü nanopartikül boyutları sırasıyla ortalama 115.5 ± 42 nm (134.8 ± 3.6 nm moduyla örnek A1) ve 141.2 ± 49 nm (145.5 ± 6.0 nm moduyla örnek A5) iken, bunların düşük enerji girdili kesikli emülsifikasyon yöntemi ile üretilen muadilleri ise TQ içermeyen nanoformülasyonda (A9) ortalama 116.8 ± 45 (102.3 ± 14.1 nm mod) ve 2.5 mg/mL TQ yüklü nanoformülasyonda ortalama 141.2 ± 44 nm (135.1 ± 3.7 nm mod) olarak ölçülmüştür. Bu nanopartiküllerin mikroakışkan platformda sürekli üretimi oldukça ilgi çekici bir yaklaşım olmasına rağmen, elde edilen bulgular ortalama nanopartikül boyutlarının kontrol edilebilmesi için yeterince etkin olmadığını ortaya koymaktadır. Mikroakışkan platformlarda sentezlenen nanoformülasyonların boyut dağılımlarını kontrol altına tutabilme konusunda benzer etkisizliğin rapor edildiği başka çalışmalar da literatürde mevcuttur (Yu et al., 2011; Yaghmur et al., 2019). Düşük dispersif enerjiyi kullanan yöntemler olan mikroakışkan platformlar, genel olarak daha dar boyut dağılımına sahip lipid nanopartiküllerinin geliştirilmesi için çekici platformlar olsalar da (Ilhan-Ayisigi et al., 2021), göreceli olarak daha küçük boyutlarda lipid nanopartiküllerin üretilmesi için nadiren etkili olmadıkları da bildirilmiştir. Dokosaheksaenoik asit monogliserit (MAG-DHA) temelli hekzozomların sürekli üretimi için kullanılan hidrodinamik akış odaklama prensibinde poliimidden yapılmış mikroakışkan cihazın kullanıldığı bir çalışmada (Yaghmur et al., 2019), kullanılan mikroakışkan cihaz, vortekslemeye dayalı basit bir kesikli yöntemle karşılaştırıldığında MAG-DHA nanopartiküllerinin boyutunu küçültmek ve boyut dağılımını daraltabilmek adına etkili bulunmamıştır. Bununla birlikte, bu cihazın göz ardı edilemeyecek faydası, sürekli modda üretim sürecine olanak sağlamasının yanında üretilen bu nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin (örneğin SAXS ile entegre edilerek (Khaliqi et al., 2017)) gerçek zamanlı bir şekilde izlenebilmeleri fırsatı sağlamasıdır. Bir başka çalışmada (Yu et al., 2011) ise antisens

oligodeoksiribonükleotit (AS-ODN) veya küçük interferans RNA (siRNA) içerecek lipid nanopartiküller (LNP'ler) 3 girişli bir mikroakışkan cihaz kullanılarak sentezlenmiş ve kesikli yöntem ile sentezlenen muadilleriyle kıyaslanmışlardır. Sonuçlar, mikroakışkan platform ile hazırlanan siRNA yüklü LNP'lerin sadece daha büyük partikül boyutuna sahip olmadıkları aynı zamanda kesikli yöntemle üretilenlere kıyasla daha fazla polidispersite gösterdiğini ortaya koymuştur. Aynı durum, AS-ODN yüklü LNP'lerde meydana gelmediği için taşınan kargo molekülünün (çift sarmallı siRNA'ya karşın tek sarmallı AS-ODN) nanopartikül sentez yöntemi (mikroakışkan ve kesikli karıştırma) üzerinde oldukça derin bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, NTA bulgularımız doğrultusunda kullanılan mikroakışkan çipin sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların boyut dağılımlarını kontrol edebilmede etkili olmadığı anlaşıldığından, TQ yüklü sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların sürekli üretimi için daha verimli mikroakışkan platformların geliştirilmesi ve daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bu perspektifte, mikroakışkan platformda sürekli üretilen TQ içermeyen ve TQ-yüklü nanopartiküllerin boyut özellikleri hakkında daha fazla bilgi edinmek için, ilgili nanopartiküllerin boyut dağılımlarına göre nispi ışık saçılma yoğunluklarına karşılık gelen 2-boyutlu (2B) NTA grafikleri incelenmiştir (Şekil 4.1). Bu bakımdan, TQ içermeyen (A1 ve A2, Şekil 4.1.A) ve 2.5 mg/mL TQ konsantrasyonunda hazırlanan TQ-yüklü numunelerin (A5 ve A6, Şekil 4.1.B) 100 ve 50 μ L/dak olarak iki farklı TFR'de boyut dağılımlarındaki değişimler karşılaştırılmıştır. Düşük enerjili kesikli emülsifikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan TQ içermeyen muadil nanopartiküllerin boyut dağılımları (A9, Şekil 4.1.C) ile karşılaştırıldığında, mikroakışkan çip kullanılarak üretilenlerin 2B NTA grafikleri benzerlik göstermektedir. Ancak, kesikli emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerde (A10), mikroçip ile üretilen TQ-yüklü nanopartiküllerin (A6) boyutlarına kıyasla 300 nm'nin üzerindeki nanopartikül sub-popülasyonlarında bir artış ortaya çıktığı Şekil 4.1'de görülebilmektedir. (Şekil 4.1.'deki bütün nanodispersiyonlar 2:3 sitrem/SFK oranında ve %2.86 sabit EtOH ve %1.9 lipit (sitrem+SFK) konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. TQ içeren formülasyonlarda TQ konsantrasyonu 2.5 mg/mL'dir.)



Şekil 4.1. Mikroakışkan platformda 50 veya 100 $\mu\text{L}/\text{dak}$ TFR koşullarında sentezlenen TQ içermeyen (A) ve TQ yüklü (B) sitrem/SFK nanopartiküller ile kesikli emülsifikasyon ile sentezlenen sitrem/SFK nanopartiküllerin (C) boyut dağılımlarını gösteren 2B NTA grafikleri

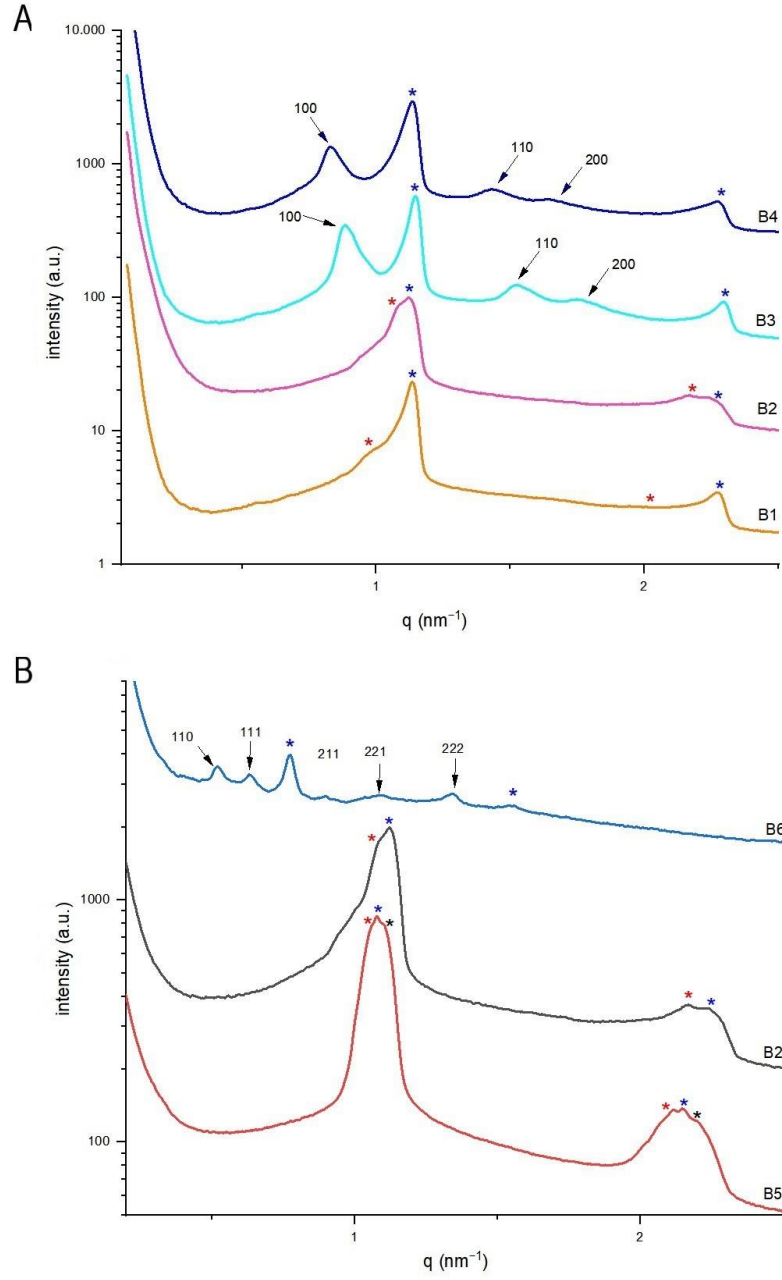
Mikroakışkan çipte 100 ve 50 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olarak farklı TFR'lerde gerçekleştirilen sentez sonrası kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin

boyutları önceki literatür çalışmaları (Ghazal et al., 2017; Yaghmur et al., 2019) ile de tutarlı olarak, TQ içerikleri farketmeksizin anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte, TFR'nin 50 µL/dak'dan 100 µL/dak'ya çıkarıldığı durumda, TQ içermeyen kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin ortalama boyutlarında 4.2 nm büyüklüğünde bir azalma meydana gelirken, TQ yüklü olanlarda ise yaklaşık olarak 8.9 ile 16.3 nm büyüklüğünde azalmalar tespit edilmiştir. hafif bir azalma gözlemlenmiştir. Bu, mevcut literatür çalışmaları (Ghazal et al., 2016, 2017; Yaghmur et al., 2019; Roces et al., 2020 a; Fathordoobady et al., 2021) ile tutarlı olan bu sonuç, 100 µL/dak TFR'de nispeten daha yüksek kayma gerilimi olmasına ve dolayısıyla da merkez ve yan mikroakışkan kanalların kesiştiği noktada hidrodinamik olarak odaklanan akışdaki sitrem ve SFK moleküllerinin kendiliğinden düzenlenmeleri için daha kısa süre tanınmasına dayandırılmaktadır. Başka bir deyişle, TFR arttığında odaklanan akıştaki EtOH'ün difüze olması ve bitişikteki sulu tamponlarla karışması için daha kısa bir zaman sağlanmaktadır (Ghazal et al., 2017; Yaghmur et al., 2019; Roces et al., 2020 a).

Bu tez çalışması kapsamında düşük enerji girdili kesikli emülsifikasyon (vorteksleme) ve sürekli (mikroakışkan) yöntemler kullanılarak hazırlanan tüm TQ içermeyen ve TQ yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonların (Tablo 4.1 ve 4.2) stabiliteleri görsel olarak izlenmiş ve hazırlama sonrası en az bir ay boyunca 25°C'de kolloidal olarak stabil oldukları tespit edilmiştir. Sitremle stabilize edilmiş lamelar ve lamelar olmayan nanodispersiyonlarla ilgili önceki çalışmalar incelendiğinde stabilite süresinin benzer olduğu görülmüş ve bu nanopartiküllerin elektrostatik stabilizasyon mekanizması yoluyla sulu tamponda stabilize edildikleri düşünülmüştür (Nilsson et al., 2012; Hedegaard et al., 2013; Wibroe et al., 2015; Azmi et al., 2016). Bu elektrostatik stabilizasyon mekanizması, negatif yüklü sitrem moleküllerinin dispers haldeki kolloidal nanoyapıların dış yüzeyleri üzerine adsorpsiyonu nedeniyle nanoyapılar arasında elektrostatik itmelerin meydana gelmesine dayanmaktadır.

4.1.2. TQ yüklemesi ve EtOH konsantrasyonunun kesikli emülsifikasyon yöntemiyle üretilen sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllere etkisi

Sitrem/SFK nanopartiküllerin bileşimlerdeki ve ilaç konsantrasyonundaki değişikliklere karşı oldukça duyarlı doğaları dikkate alındığında (Azmi et al., 2016; Prajapati et al., 2018, 2019 b), sinkrotron SAXS analizi ile TQ ve etanol konsantrasyonlarına bağlı ortaya çıkabilecek yapısal değişikliklerin incelenmesi önem taşımaktadır. TQ içermeyen ve TQ yüklü nanodispersiyonlar, sitrem/SFK kompozisyonu 2:3 oranında sabit tutularak ve geleneksel düşük enerji girdili kesikli emülsifikasyon yöntemi kullanılarak ağırlıkça %8.0 lipit (sitrem ve SFK) ve %1.09 EtOH konsantrasyonlarında hazırlanmışlardır. Bu formülasyonlarda TQ konsantrasyonu ise 0, 2.5, 7.5 ve 10.0 mg/mL olarak denenmiştir. SAXS desenleri incelendiğinde (Şekil 4.2), TQ içermeyen formülasyonlarda (B1), ikili sitrem/SFK lipid karışımının fazla sulu tampon ortamında çok katmanlı veziküller (multilamellar vesicles; MLV) oluşturma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Yaklaşık **5.55 nm** d -düzlemler arası mesafe değerine sahip ilk L_α fazının ($L_{\alpha(1)}$) iki karakteristik pikine ait q değerleri yaklaşık 1.13 ve 2.26 nm^{-1} olarak ölçülmüştür (Şekil 4.2, q -değerleri kırmızı yıldızlarla işaretlenmiştir). Bu sonuç, aynı lipit konsantrasyonlarında fakat EtOH kullanmadan hazırlanan 5.71 nm d -aralığına sahip L_α fazına sahip MLV'lerin sentezlendiği başka bir çalışma ile uyumlu bulunmuştur (Azmi et al., 2016). Ayrıca, yaklaşık 0.84 ve 1.68 nm^{-1} q -değerlerinde çok zayıf tepe noktalarının saptanması, eşlikçi (coexisting) bir L_α fazının (7.22 nm d -aralığına sahip $L_{\alpha(2)}$) göstergesidir (Şekil 4.2., q -değerleri mavi yıldızlarla işaretlenmiştir). Bu daha yüksek d -aralığına sahip ikinci L_α fazının (şişmiş $L_{\alpha(2)}$ fazı) oluşumu, nanopartiküllerin iç kısımlarına etanol alınımına bağlı ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.2. 25°C'de farklı TQ ve etanol konsantrasyonlarının düşük enerjili emülsifikasyon kesikli yöntemi kullanılarak hazırlanan sitrem/SFK nanodispersiyonlarının yapısal özellikleri üzerindeki etkileri. A) 1-10 mg/mL aralığındaki TQ konsantrasyonlarında (sırasıyla ağırlıkça % 1.09 EtOH ve %8.0 lipid) konsantrasyonlarında hazırlanan numunelerin SAXS modelleri B) 2.5 mg/mL sabit TQ konsantrasyonunda hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda EtOH (%0-5.45 aralığında) içeren sitrem/SFK nanodispersiyonlarının SAXS desenleri

TQ konsantrasyonu 2.5 mg/mL olduğunda (B2), MLV oluşumu devam etmiş ve yine $L_{\alpha(1)}$ - $L_{\alpha(2)}$ bifazik özelliği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 2.5 mg/mL'lik TQ konsantrasyonunda $L_{\alpha(2)}$ fazının d -aralığında 7.22'den 5.72 nm'ye önemli bir düşüş ortaya çıkmıştır (Tablo 4.2). Bu azalmanın, TQ'nun $L_{\alpha(2)}$ fazının hidrofobik bölgelerine penetrasyonu ve olası bir etanol molekülünün salımına bağlanabileceği düşünülmüştür. TQ konsantrasyonu 7.5 mg/mL'ye (B3) ve 10 mg/mL'ye (B4) arttırıldığında ise eşlikçi $L_{\alpha(2)}$ fazı kaybolmuş ve eşlikçi hekzozomların oluştuğu belirlenmiştir. Hekzozomlar için, (100), (110) ve (200) düzlemlerindeki sırasıyla $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$ aralık oranıyla karakterize ilk üç Bragg piki tespit edilmiş ve internal ters altıgen (H_2) fazı tanımlanmıştır (açık ve koyu mavi SAXS desenleri, Şekil 4.2). İncelenen tüm TQ konsantrasyon aralığında (0-10 mg/mL), eşlikçi $L_{\alpha(1)}$ fazının d -aralıklarının hemen hemen aynı kalması ilgi çekici bir bulgu olmakla birlikte, TQ'nun şişmiş eşlikçi ve etanolce daha zengin olan $L_{\alpha(2)}$ fazında TQ alımında olası bir artış nedeniyle TQ'un öncelikli olarak lokalize olduğunu da göstermektedir. TQ konsantrasyonunun 7.5'ten 10.0 mg/mL'ye yükseltilmesiyle birlikte bifazik $L_{\alpha(1)}/L_{\alpha(2)}$ karakterinden, eşlikçi H_2 fazı ile birlikte var olan $L_{\alpha(1)}$ fazının bifazik karakterine faz geçişinin gerçekleşmesinin, büyük olasılıkla TQ'nun nanopartiküllerin kendiliğinden-düzenlenen iç yapılarının hidrofobik bölgelerinde lokalize olma eğiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu faz geçişi sonrası artan TQ konsantrasyonuna bağlı olarak, eşlikçi H_2 fazının latis parametresi α 'nın 8.13 nm'den 8.68 nm'ye bir artış göstermesi (Tablo 4.2) önceki literatür bulgularına göre beklenmeyen bir sonuçtur.

TQ gibi suda çözünürlüğü düşük ilaçların lamelar ve lamelar olmayan sıvı kristalin kendiliğinden düzenlenen nanoyapılara yüklenmeleri, bu moleküllerin nanopartiküllerin kendiliğinden-düzenlenen iç yapılarının hidrofobik bölgelerine yerleşimlerinin konsantrasyona bağlı bir şekilde latis parametresinde düşüş gibi yapısal değişikliklere ve daha negatif kendiliğinden bükülmelere sahip fazlara yapısal geçişlerin uyarılmasına yol açmaları ile bağdaştırılmaktadır (Azmi et al., 2016; Prajapati et al., 2018, 2019 b; Yagmur et al., 2020). Bu durum, sürfaktan benzeri lipitlerin hidrofilik baş gruplarının dehidrasyonunun ve hidrofobik kuyruklarının genişlemesinin eşzamanlı etkileri nedeniyle oluşmaktadır (Qiu et al., 2000; Yagmur et al., 2012, 2020, 2021; Azmi et al., 2016; Prajapati et al., 2018, 2019 b). Örneğin, monoolein ve E vitamini ikili lipit karışımı (ağırlıkça %70:30) temelli TPGS-PEG2000 ile stabilize edilmiş nanodispersiyonlara 2.5 mg/mL konsantrasyonda TQ

yüklendiğinde bifazik kübik $Fd3m/H_2$ karakterinden düzgün bir kübik $Fd3m$ karakterine yapısal geçiş olması yakın zamanda rapor edilmiştir (Yaghmur et al., 2020).

Tablo 4.2. Farklı EtOH ve TQ konsantrasyonları kullanılarak düşük enerjili toplu emülsifikasyon yöntemi kullanılarak üretilen sitrem/SFK nano-kendinden montajlı yapıların yapısal özellikleri

Kod ^a	EtOH %	Lipit %	TQ (mg/mL)	Uzay grubu	Latis parametresi (nm)
B1	1.09	8.0	0	$L_{\alpha(1)}$	5.55 ± 0.06
				$L_{\alpha(2)}$	7.22 ± 2.63
B2	1.09	8.0	2.5	$L_{\alpha(1)}$	5.61 ± 0.05
				$L_{\alpha(2)}$	5.72 ± 0.24
B3	1.09	8.0	7.5	L_{α}	5.50 ± 0.06
				H_2	8.13 ± 0.24
B4	1.09	8.0	10.0	L_{α}	5.56 ± 0.02
				H_2	8.68 ± 0.27
B5	0	9.09	2.5	$L_{\alpha(1)}$	5.93 ± 0.006
				$L_{\alpha(2)}$	5.83 ± 0.06
				$L_{\alpha(3)}$	5.75 ± 0.13
B6	5.45	3.64	2.5	L_{α}	8.14 ± 0.02
				$Pn3m$	17.07 ± 0.01

^aTüm nanodispersiyonların EtOH ve lipit (SFK ve sitrem) içerikleri toplamı ağırlıkça %9.09 olacak şekilde sabit tutulmuştur. Sinkrotron SAXS deneyleri 25°C'de gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, artan TQ konsantrasyonlarında eşlikçi H_2 fazının latis parametresinde artış meydana gelmesi, büyük olasılıkla TQ'nun sitrem ve SFK ile etkileşimlerine ve dolayısıyla da belirli bir miktarda TQ'nun lipid-su arayüzey alanında katılmasına dayandırılabilir. Dolayısıyla, elde edilen SAXS sonuçları, çözülmüş TQ'nun sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanoyapıların muhtemelen şu iki bölgesine yerleştiğini göstermektedir: i)hidrofobik bölgeler, ii) arayüzey filmi. Benzer lamelar ve lamelar olmayan faz geçişleri ve lamellar olmayan sıvı kristal fazların (H_2 fazı dahil) latis parametresinde artış, yakın zamanda sitrem/SFK nanopartiküllere lokal anestejik bir ajan olan bupivakainin yüklenmesinde de tespit edilmiştir (Prajapati et al., 2019 b). Latis parametrelerindeki böyle bir artışın, pozitif

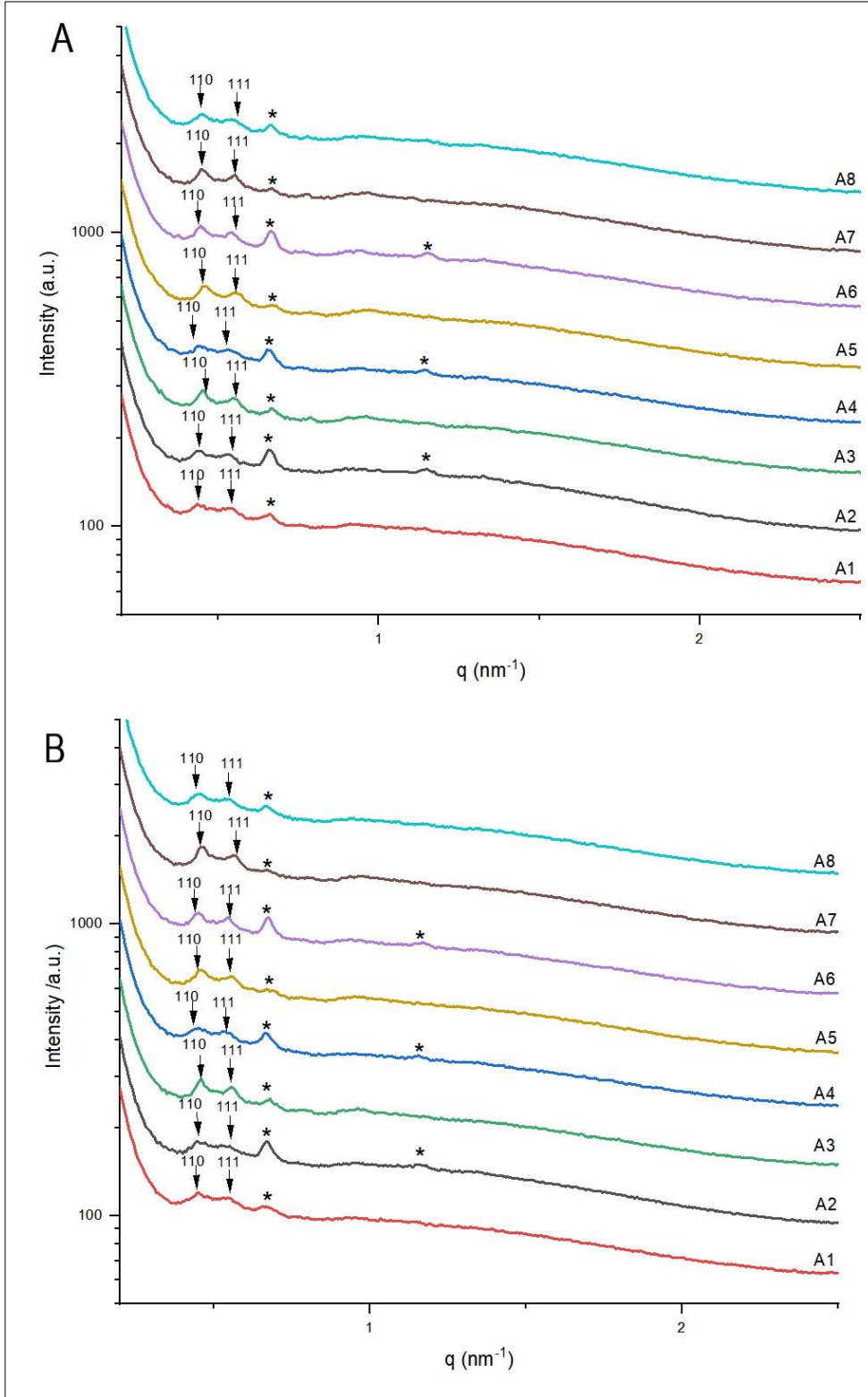
yüklü moleküller ile lipid-su arayüzey alanına gömülü negatif yüklü sitrem molekülleri arasında elektrostatik etkileşimlerinden ileri gelen bupivakainin kısmi iyonizasyonuna bağlandığı ifade edilmiştir.

Etanol konsantrasyonunun kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin yapıları üzerindeki etkisi hakkında fikir edinmek için, 2.5 mg/mL TQ konsantrasyonunda hazırlanan B2 nanodispersiyonunun yapısal özellikleri, aynı lipit bileşiminde (sitrem:SFK oranı 2:3) ve TQ konsantrasyonunda fakat farklı EtOH yüzdelerinde hazırlanan (B5 ve B6, Tablo 4.2) nanodispersiyonlar ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.2 incelendiğinde, etanol konsantrasyonunun 0'dan (B5) ağırlıkça % 1.09'a (B2) çıkarıldığı durumda, $L_{\alpha(1)}$ ve $L_{\alpha(2)}$ fazlarının d -aralığında küçük bir değişiklik olduğu ancak üçüncü bir ek eşlikçi lamelar fazın ($L_{\alpha(3)}$) B5) ortaya çıktığı görülmektedir. Etanol konsantrasyonu ağırlıkça %5.45'e (B6) arttırıldığında ise önemli bir yapısal geçiş elde edilmiştir. Bifazik $L_{\alpha(1)}/L_{\alpha(2)}$ karakterinden (B2), 17.07 nm latis parametresiyle eşlikçi bir kübik $Pn3m$ fazı ile birlikte bulunan, nispeten yüksek oranda şişmiş (d -aralığı 8.14 nm) lamelar L_{α} fazına dönüşüm şeklinde gerçekleşen bu yapısal geçişin etanol-aracılı gerçekleştiği anlaşılmaktadır (B6, Tablo 4.2 ve Şekil 4.2). Bu eşlikçi kübik $Pn3m$ fazı, (110), (111), (211), (221) ve (222) düzlemlerinde tespit edilen karakteristik Bragg piklerine dayanarak tanımlanmıştır. Sitrem'in konsantrasyona bağlı bir şekilde, sitrem/SFK nanodispersiyonlarında lamelar-lamelar olmayan faz geçişini indüklemeye eğilimi dikkate alındığında (Azmi et al., 2016; Khaliqi et al., 2017; Prajapati et al., 2018, 2019 b), artan EtOH konsantrasyonu SFK ve sitrem moleküllerinin yeniden-dağılımını sağlayarak, sitrem-açısından zengin kübik $Pn3m$ fazı şeklinde katlanmış eşlikçi nanopartiküllerle birlikte bulunan SFK-açısından zengin şişmiş L_{α} fazına geçişine yol açmıştır.

4.1.3. Mikroakışkan platformda sürekli üretilen sitrem/SFK kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin yapısal karakteristikleri

Mikroakışkan platform kullanılarak üretilen sitrem/SFK nanodispersiyonların yapısal özellikleri hakkında fikir edinmek için 25°C ve 37°C'de bir dizi SAXS deneyi gerçekleştirilmiştir. Mikroakışkan çip kullanılarak üretilen tüm nanodispersiyonlar için FRR 20 olarak sabit tutulurken, TFR ise 50 ve 100 µL/dak olarak iki farklı oranda denenmiştir. Etanol ve lipit konsantrasyonları (sitrem ve SFK toplamı) da sırasıyla ağırlıkça

%2.86 ve %1.9 olarak sabit tutulmuştur (Tablo 4.1). Tez kapsamında sentezlenen tüm kendiliğinden-düzenlenen nanodispersiyonlarda olduğu gibi sitrem:SFK oranı ağırlıkça 2:3 olarak hazırlanmış ve TQ konsantrasyonları ise 0-5 mg/mL aralığında incelenmişlerdir. Ters bikontinyüs kübik $Pn3m$ fazı için tespit edilen Bragg pikleri ve bu piklere karşılık gelen Miller indisleri Şekil 4.3.'de oklar ile işaretlenerek gösterilmişlerdir. Eşlikçi şişmiş L_α fazlarının tespit edilen ikişer karakteristik pikleri ise şekil üzerinde siyah yıldızlarla işaretlenmiştir. Söz konusu deneme setinde tüm nanodispersiyonlar, 2:3 sabit sitrem:SFK ağırlık oranında ve ağırlıkça %2.86 EtOH ile %1.9 toplam lipit (SFK ve sitrem toplamı) konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 25°C (Şekil 4.3.A) ve 37°C'de (Şekil 4.3.B) karşılaştırmalı olarak incelenen SAXS desenlerinde, artan TQ konsantrasyonu, değişen TFR ve/veya artan SAXS deney sıcaklığının bifazik kübik $Pn3m$ /şişmiş L_α nanodispersiyonların yalnızca latis parametreleri ve d -aralıklarında küçük değişikliklere yol açtığı görülmektedir. Örneğin 25°C gerçekleştirilen SAXS denemelerinde, farklı TFR ve TQ konsantrasyonlarında sentezlenen nanodispersiyonlardaki $Pn3m$ fazı latis parametreleri 19.26 - 20.18 nm ve eşlikçi L_α fazı d -aralıkları 9.42-9.63 nm arasında iken, 37°C'de gerçekleştirilen SAXS denemelerinde ise bu parametreler sırasıyla 19.18-19.74 nm ve 9.33 - 9.48 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Mikroakışkan çip kullanılarak sürekli üretilen TQ içermeyen ve TQ yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonlarının (A1-A8) 25°C (A) ve 37°C'de (B) incelenen SAXS desenleri

Bu sonuçlar, bir önceki başlıkta atıfta bulunulan ve etanol konsantrasyonuna bağlı olarak her iki lipitin SFK-açısından zengin L_{α} fazı ve sitrem-açısından zengin $Pn3m$ fazları şeklinde kendiliğinden-düzenlenmesinin açıklandığı literatür çalışmaları ile uyumludur (Azmi et al., 2016; Prajapati et al., 2018). Söz konusu literatür çalışmasında, etanol içermeyen ve SFK ile birlikte sitrem kullanılmadan ya da çok az bir miktarda kullanılarak hazırlanan veziküllerin d -aralığı 6.28 nm olarak tespit edilmişken, mevcut çalışmamızda hazırlanan formülasyonların hepsinde (Tablo 4.1) d -aralıklarının daha yüksek ölçülmesinin (9.3 nm'den büyük) muhtemel sebebinin, her iki TFR'de de SFK-açısından zengin eşlikçi L_{α} fazları tarafından etanol alımının gerçekleşmesi olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, uygun boyut dağılımları dolayısıyla pasif hedeflendirme stratejisi kapsamında ele alınan TQ yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonları, konsantrasyon bağımlı bir şekilde kübozom ve heksozom yapılarında mikroakışkan platformda sürekli modda üretilebilmişlerdir. Sitrem ve SFK ana bileşenlerinden oluşan bu formülasyonların kompleman aktivasyonu ve hemolize sebep olmadıkları yani hemouyumlu oldukları önceki çalışmalarla (Azmi et al., 2016; Gontsarik et al., 2016; Angelova et al., 2018) detaylı bir biçimde ortaya konduğundan, bu tez çalışması kapsamında incelenen ilk formülasyon olan pasif hedefli TQ yüklü sitrem/SFK nanodispersiyonlarının antikanser etkili nanopartiküller olarak yenilikçi ve umut veren yapılar oldukları düşünülmektedir.

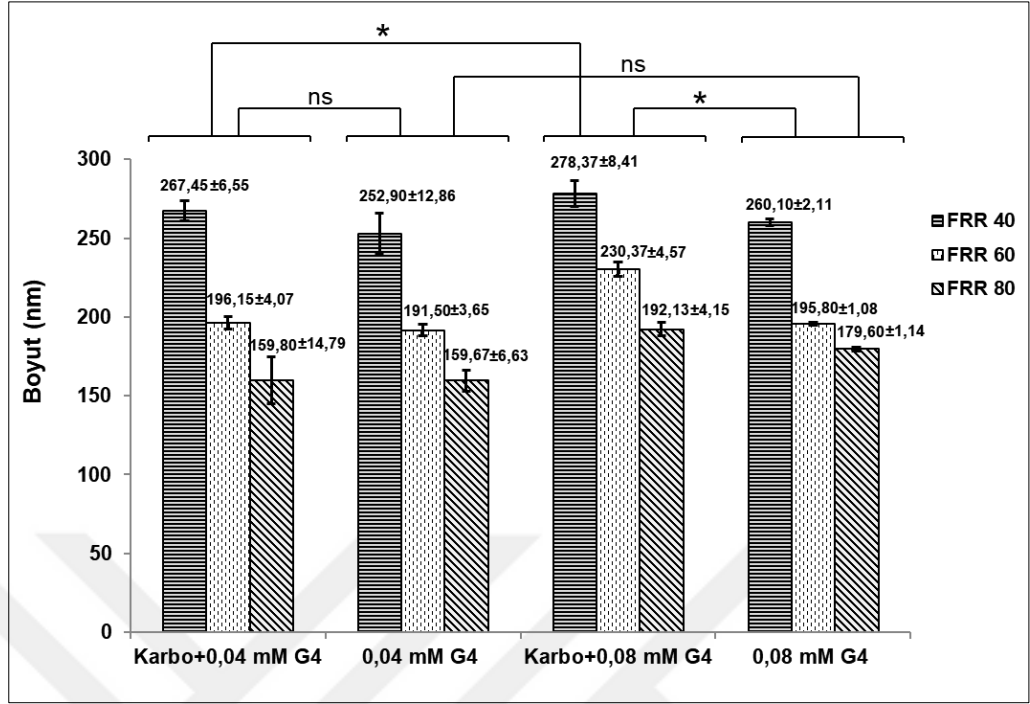
Devam eden başlıkta bu tez çalışması kapsamında incelenen ikinci formülasyon olan aktif hedefli karboplatin yüklü aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllere ait bulgular tartışılacaktır.

4.2. EGFR-Hedefli Karboplatin Yüklü Aljinat-PAMAM Hibrit Nanopartiküller

4.2.1. Karboplatin yüklü aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-AI-Pa) mikroakışkan platformda sentezi

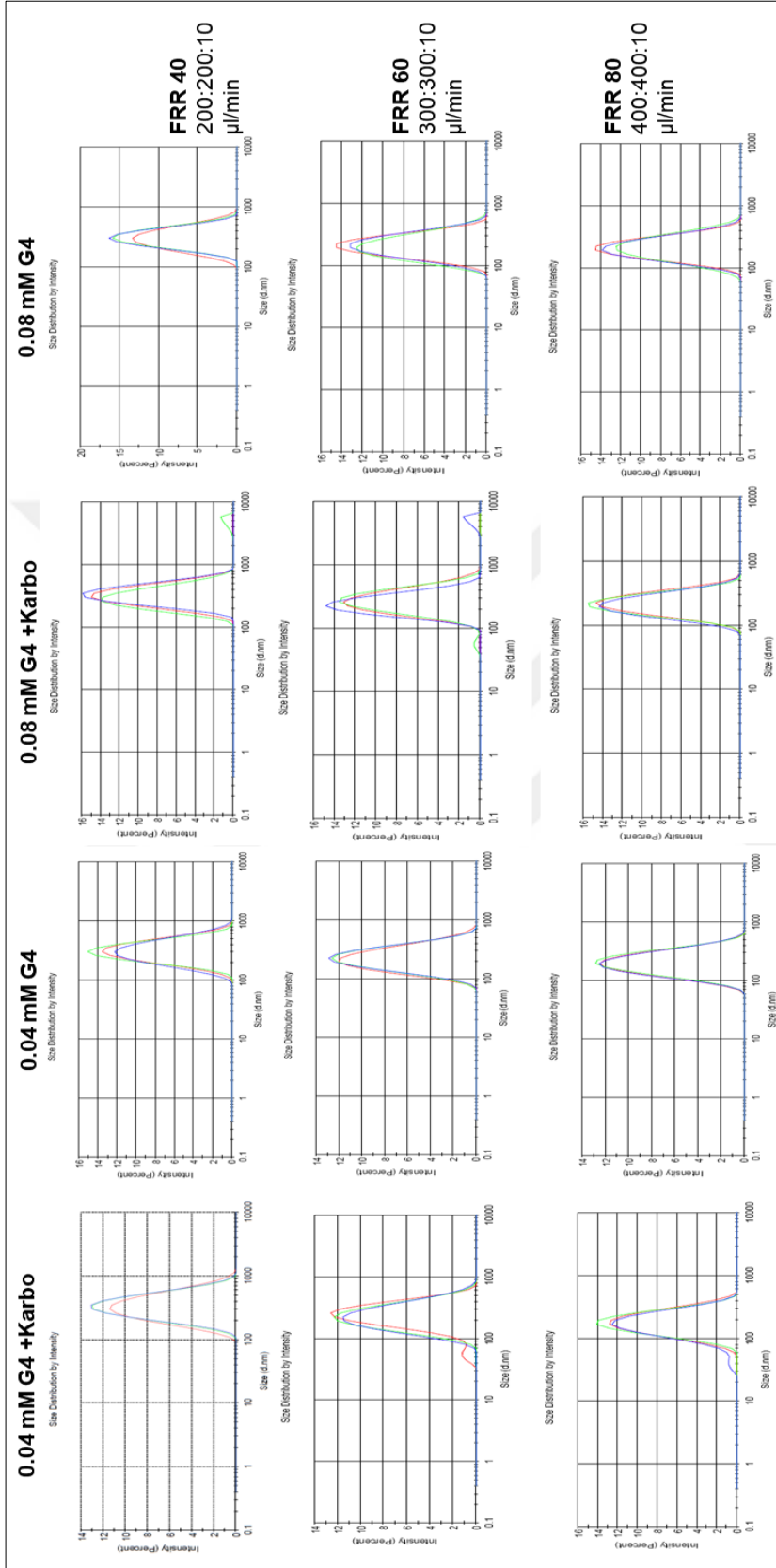
Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin mikroakışkan platformda sentezi için, EDC ve NHS reaktifleri ile aktifleştirilmiş aljinat mikroakışkan platformun merkez kanalından 10 µL/dak hızla pompalanırken, yan kanallardan ise 0.04mM ve 0.08 mM konsantrasyonlarda Pamam sulu çözeltileri 200, 300 ve 400 µl/dak olarak farklı akış hızlarında gönderilmiştir. Böylece farklı akış oranları (FRR 40, FRR 60 ve FRR 80) ve ilaç yüklemesinin sentezlenen hibrit nanopartiküllerin boyut dağılımları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Şekil 4.4.'de görüldüğü üzere pamam (G4) konsantrasyonundaki artış ve karboplatin yüklemesi sonrasında hibrit nanopartiküllerin ortalama boyutlarında hafif bir artış ortaya çıkmıştır. *Student's t test* istatistiksel analizine göre ilaç taşımayan boş hibrit nanopartiküllerdeki boyut artışı anlamlı değilken, karboplatin yüklenen hibrit nanopartiküllerdeki artan G4 konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama boyutunda anlamlı bir artış söz konusudur. Bir literatür çalışmasında, inorganik prekürsör/dendrimer (G4) oranının silika/pamam hibrit nanopartikül sentezi için çok önemli olduğunu ve Pamam en yüksek dilüsyon oranında (5000 kat) yani en düşük konsantrasyonda kullanıldığında daha küçük boyutlu silika/pamam hibrit nanopartiküller elde edilebildiğini rapor etmiştir (Yesil-Celiktas et al., 2017).

Benzer şekilde, 0.04 mM düşük G4 konsantrasyonunki formülasyonlarda karboplatin yüklemesi sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmazken, 0.08 mM konsantrasyonda G4 kullanıldığında karboplatin içeren hibrit nanopartiküllerin içermeyen muadillerine göre ortalama partikül boyutlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ortaya çıkmıştır. Ancak sentezlenen en büyük nanopartiküller dahi (278.37 ± 8.41 nm) 400 nm'den küçük boyutta olduklarından, EPR etkisi ile tümör dokularına ekstravaze olabilecek potansiyelindedirler (Zhang et al., 2020). Tüm parametrelerde sentezlenen nanopartiküllerin oldukça dar bir aralıkta (0.19-0.25 PDI değerleri) ve ünimodal bir gauss eğrisi şeklinde boyut dağılımına sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Farklı pamam (G4) konsantrasyonlarında sentezlenen karboplatin yüklü ve yüksüz hibrit nanopartiküllerin boyut dağılımları (\pm SD)

Akış odaklama prensibine dayanan mikroakışkan platformda, yan kanallardaki akış hızı arttıkça FRR artmakta ve elde edilen nanopartikül boyutları da küçülmektedir. Örneğin en küçük partiküllerin sentezlendiği seri olan 0.04 mM konsantrasyonda G4 kullanılan ve karboplatin içermeyen formülasyonlarda artan FRR koşullarında sırasıyla 252.90 ± 12.86 nm, 191.50 ± 3.65 nm ve 159.67 ± 6.63 nm ortalama boyutlarında nanopartiküller elde edilmiştir. Muhtemelen odaklanma bölgesindeki nispeten yüksek yanıl G4 dendrimer akışları (yüksek FRR) ile merkez kanaldaki aljinat arasında kimyasal bağlanmalar ve elektrostatik etkileşimler ile oluşan nanopartikül matrisinin büyümesi için daha kısa süre tanınması sebebiyle bu durumun ortaya çıktığı düşünülmektedir (Yagmur et al., 2019; Roces et al., 2020 b; Ilhan-Ayisigi et al., 2021).

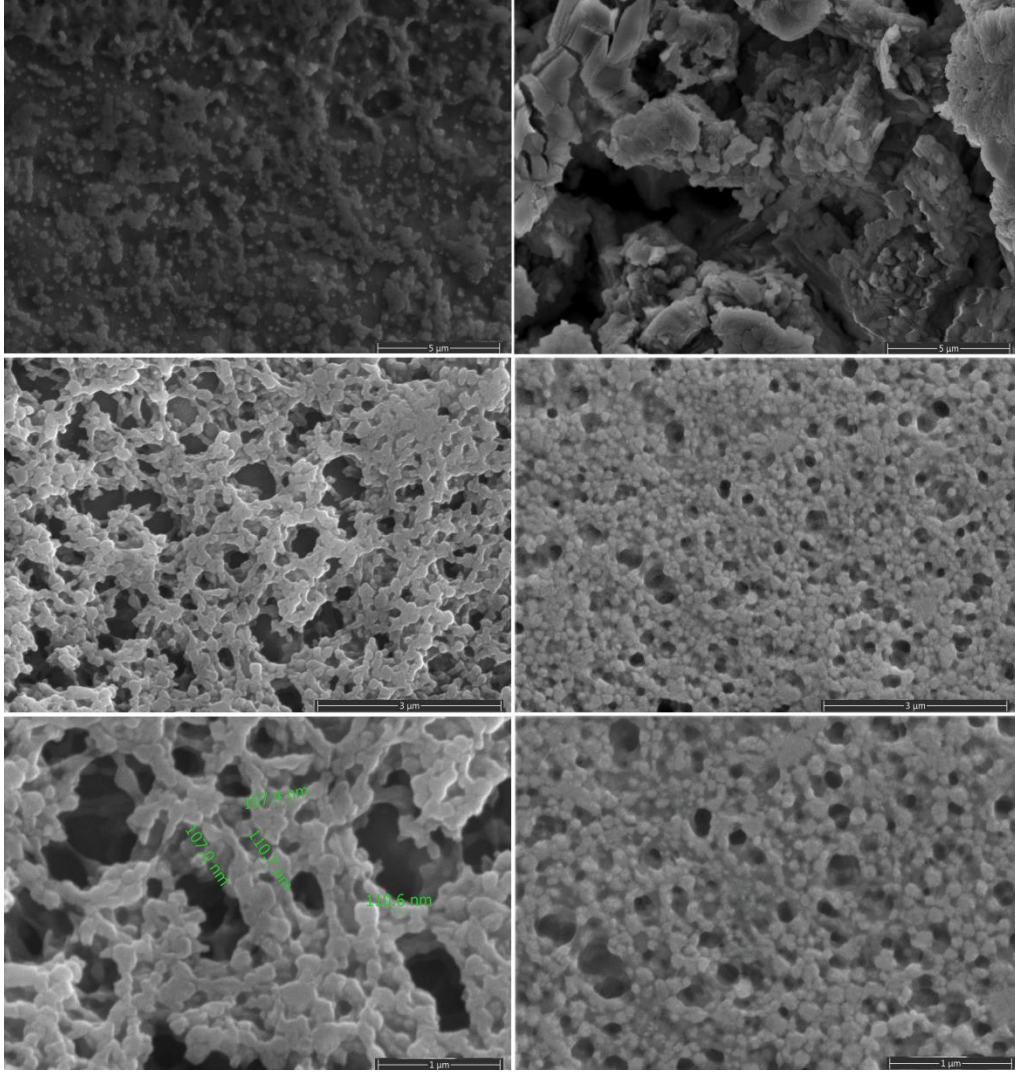


Şekil 4.5. Farklı pamam (G4) konsantrasyonlarında sentezlenen karboplatin yüklü ve yüksüz hibrit nanopartiküllerin DLS grafikleri (boyut dağılımları)

Bilindiği üzere, aljinat negatif yüklü polimer iken amin uç grupları taşıyan PAMAM dendrimerleri ise pozitif yüklüdür. Sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerinin PBS içerisinde dispers edilerek zeta potansiyelleri ölçüldüğünde, karboplatin içermeyen boş nanopartiküllerin artan FRR koşullarında sırasıyla -24.1 mV, -22.7 mV ve -17.1 mV potansiyele sahip oldukları ve karboplatin yüklü Al-Pa hibrit nanopartiküllerde ise bu potansiyellerin sırasıyla -27.6 mV, -25.4 mV ve -23.8 mV oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar PBS ile seyreltiklerinde aljinat polimerinin -55.7 mV ve pamam dendrimerinin +36.7 mV olarak ölçülen zeta potansiyelleri ile birlikte değerlendirildiklerinde, sentezlenen hibrit nanopartiküllerin yüzeylerinde aljinat kaynaklı negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) çoğunlukta olduğu, fakat dendrimer kaynaklı pozitif yüklü amin gruplarının da (-NH₂) kısmen yüzeyde buldukları fikrini ortaya çıkarmaktadır.

Sentezlenen nanopartiküllerin süpernatantlarındaki karboplatin miktarının HPLC ile analizi sonrasında hesaplanan enkapsülasyon verimi FRR40, FRR60 ve FRR80 koşulları için sırasıyla %28.04±1.6, %32.03±0.33 ve %40.45±1.5 olarak bulunmuştur. Artan FRR koşullarında ilacın daha yüksek oranda enkapsüle edilebiliyor olması muhtemelen azalan nanopartikül ortalama boyutları ile ilişkilidir. Daha önce de bahsedildiği gibi yüksek FRR koşulunda aljinat ve pamam bileşenlerinin bağlanarak partikülün büyümesine çok daha kısa süre tanınması (hızlı topaklanma) hipotezi, aynı zamanda polimer fazındaki ilacın yan kanallardan gelen fazlaca miktardaki sulu faza difüze olabileceği sürenin de daha kısa olması anlamına geldiğinden daha fazla miktarda ilacın enkapsüle olmasını mümkün kılmaktadır. Nanopartiküllerin boyutunun küçülmesi ile birlikte daha yüksek oranda ilaç enkapsüle edebilmeleri, literatürdeki TQ ve L-askorbik asit yüklü kitosan nanopartiküllerinin geliştirildiği benzer bir çalışma ile de uyumludur (Othman et al., 2018).

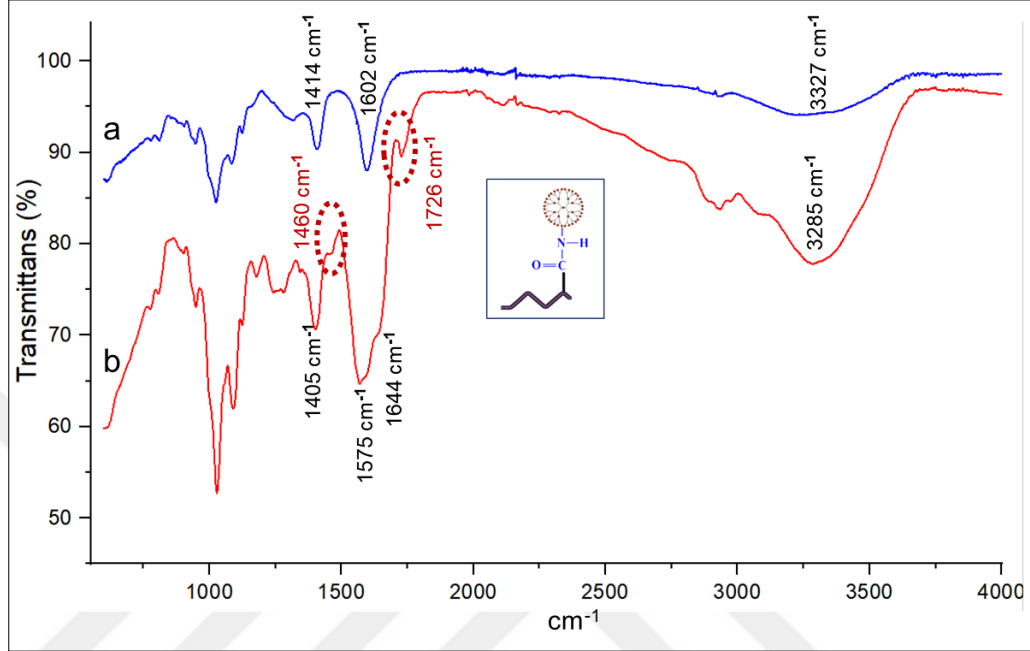
Sentezlenen aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin yüzey morfolojileri SEM mikroskopunda görüntülenerek incelenmiştir. İlaç yüklü ve boş nanopartiküllerin her ikisinde de yüzey morfolojilerinin küre şeklinde ve pürüzsüz oldukları Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. Mikroakışkan platformda sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküller (sol) ve karboplatin yüklü Al-Pa hibrit nanopartiküller (sağ)

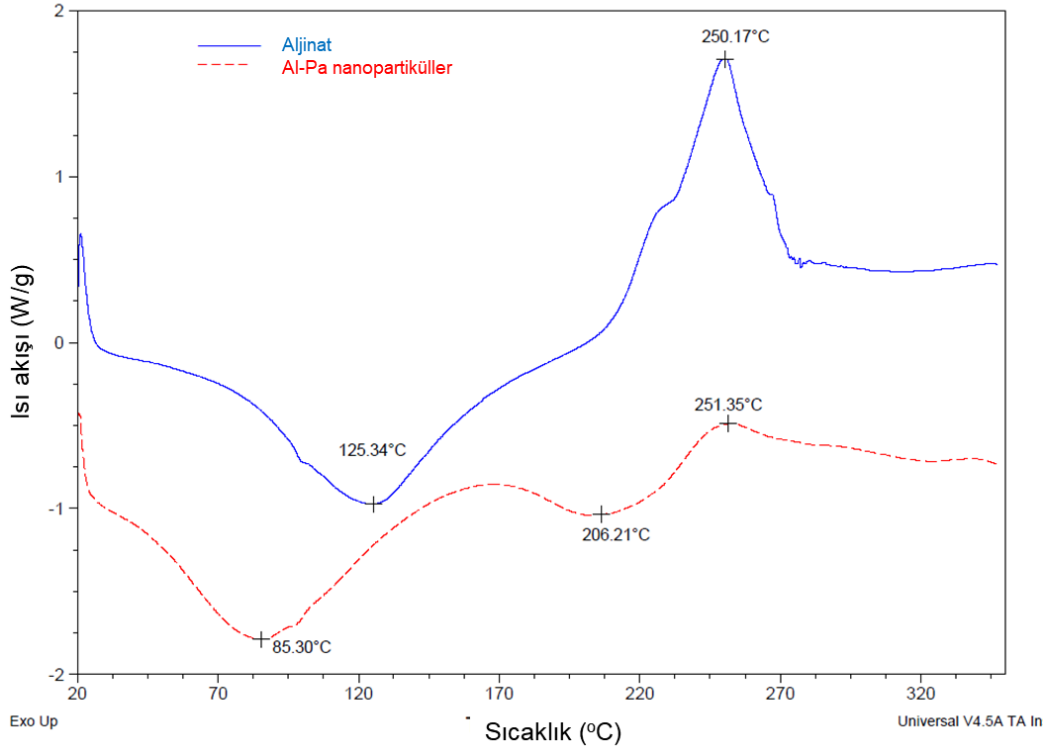
Sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerinin moleküler karakterizasyonları FTIR spektrumları incelenerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Sentez için kullanılan polimerik aljinat örneğinin FTIR spektrumunda, 3327 cm^{-1} 'deki tepe noktası -OH germe titreşimine karşılık gelirken, 1602 ve 1414 cm^{-1} 'deki bantlar karboksilat tuz gruplarının asimetric ve simetric COO- germe titreşimlerine ve 1110 cm^{-1} deki pik (C-O-C germe) aljinatın sakkarit yapısına bağlanabilmektedir. Aljinat ve pamam dendrimer ile sentezlenen hibrit nanopartiküllere ait FTIR spektrumunda ise 1405 cm^{-1} 'deki bant muhtemelen aljinatın karboksilat grubundan, 1644 cm^{-1} ve 1575 cm^{-1} 'deki bantlar ise pamama ait amid I ve II'den (-CO-NH-) kaynaklanmaktadır (Zhang et al., 2016). FTIR karakterizasyonu ile elde edilen en önemlisi, aljinat-COOH

ve dendrimer-NH₂ grupları arasında karbodiimid kimyası ile oluşan amid II (band N-H bükülmesi) bağının oluşumunu gösteren 1460 cm⁻¹'de ve karbonil grubundan (C = O) 1726 cm⁻¹'de ortaya çıkan yeni bantların görülmesidir.



Şekil 4.7. Aljinat polimer (a) ve sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerin (b) FTIR karakterizasyonları

Sentezlenen hibrit nanopartiküllerin termal karakterizasyonları ise DSC analizi ile gerçekleştirilmiş (Şekil 4.8) ve sentez reaksiyonunda kullanılan aljinatın termogramı, literatüre uygun olarak 125°C'de bir endotermik zirvenin ve 250 santigratta bir ekzotermik zirvenin olduğunu göstermiştir (Praveen et al., 2015). Ancak Al-Pa hibrit nanopartikülleri için, iki endotermik tepe noktası tespit edilmiş ve dahası hem nanopartiküllerdeki nem kalıntılarından hem de aljinatın sakkarit yapısının dehidrasyonundan kaynaklanan daha yüksek su kaybı ile ilişkili olabilen daha geniş endoterm görülmüştür. Hem hibrit nanopartiküllerde hem de polimer formundaki aljinatta, yaklaşık 250°C'de çok benzer olan ekzotermik bölgeler, polimer zincirinin depolimerizasyonu ve dekarboksilasyonuna karşılık gelmektedirler.

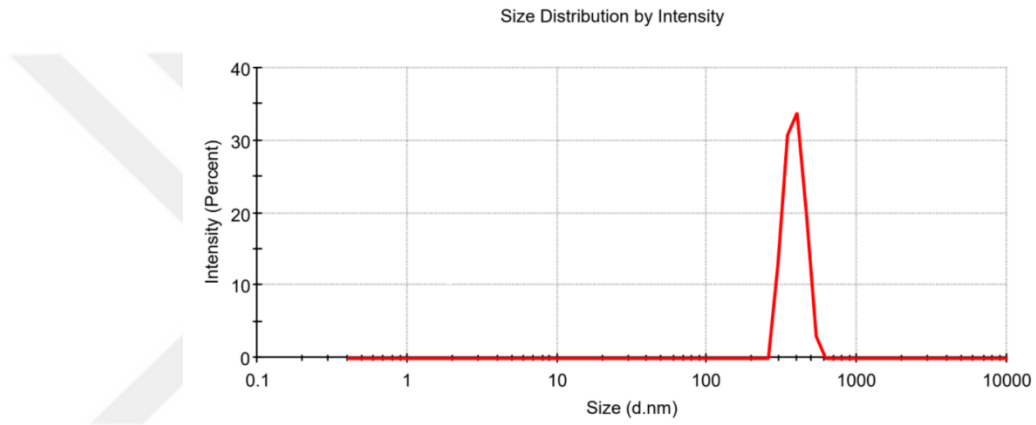


Şekil 4.8. Aljinat polimer ve sentezlenen Al-Pa hibrit nanopartiküllerin DSC karakterizasyonları

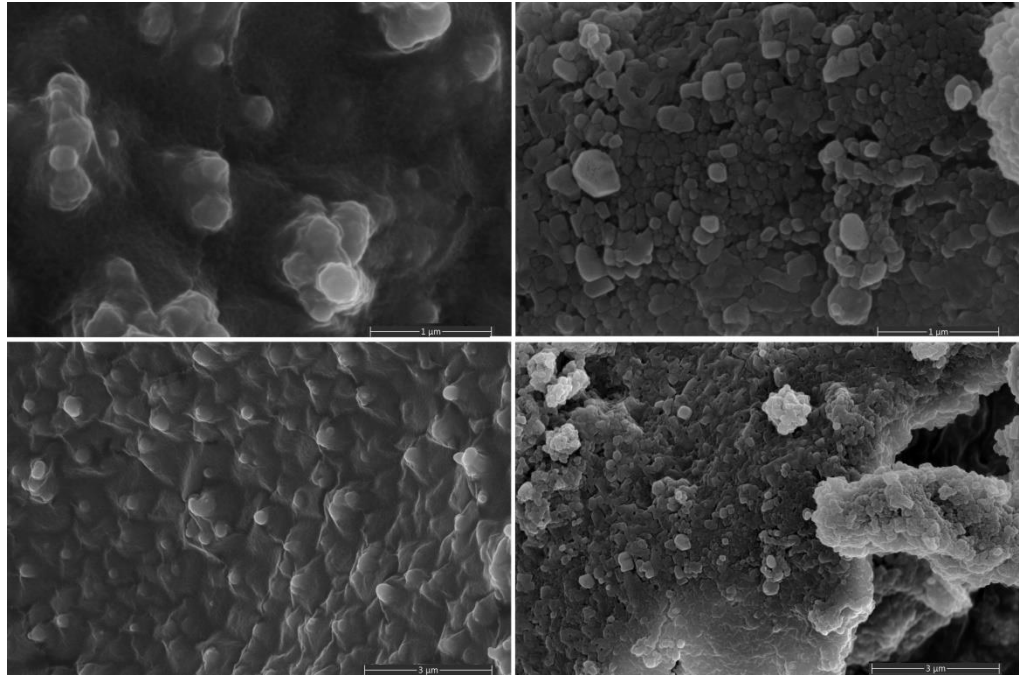
4.2.2. Karboplatin yüklü Aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin (K-Al-Pa) EGF ile konjugasyonu

Mikroakışkan platformda sentezlenen karboplatin yüklü Al-Pa hibrit nanopartiküllerin ve dolayısıyla karboplatin ilacının sağlıklı dokular yerine spesifik olarak tümör dokularında internalizasyonunun artırılabilmesi için EGF ligandı ile konjuge edilmişlerdir. EDC ve NHS reaktifleri kullanılarak karbodiimid kimyası ile yüzeydeki aljinata ait karboksilik grupları ile EGF'e ait amin grupları arasında amid bağı oluşturulması hedeflenmiştir. EGF konsantrasyonları 1, 2 ve 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak denenmiş ve EGF konjuge edilmiş Al-Pa hibrit nanopartiküllerin (EGF-Al-Pa) taşıdıkları konjuge EGF miktarı EGF ELISA kiti ile analiz edildiğinde, g hibrit nanopartikül kütlesi başına partikül üzerinde konjuge edilen EGF miktarları sırasıyla 0.108 μg , 0.386 μg ve 0.462 μg olarak belirlenmiştir.

EGF-konjuge edilen nanopartiküllerin boyut dağılımları ve polidispersite indeksleri Malvern Zetasizer cihazı (Nano-ZS) ile analiz edildiğinde (Şekil 4.9), ortalama boyutun konjugasyon sonrası artarak 230.37 ± 4.57 'den 395.216 ± 83 nm'ye çıktığı belirlenmiş ve bununla birlikte muhtemelen mikroakışkan koşullar yerine manyetik karıştırıcı kullanımından kaynaklanan bir PDI (0.333) artışı sözkonusu olmuştur. Ayrıca, EGF-konjuge edilen nanopartiküllerin SEM görüntülemesi ile yüzey morfolojileri incelendiğinde (Şekil 4.10) konjugasyon sonrası küresel morfolojinin korunduğu görülmektedir.



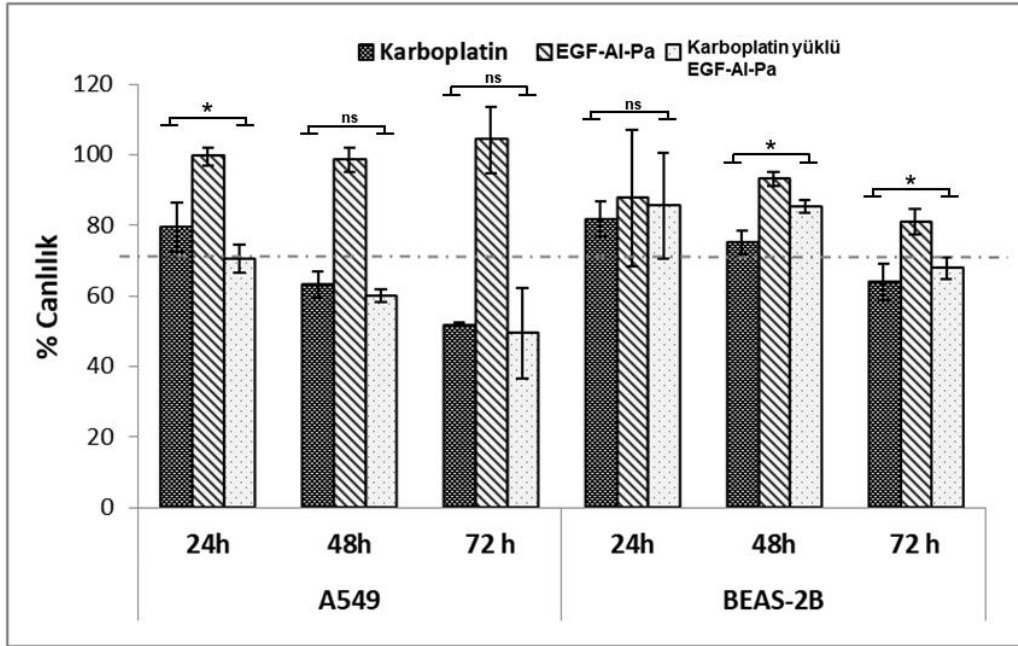
Şekil 4.9. EGF-konjuge edilen nanopartiküllerin boyut dağılımları (DLS)



Şekil 4.10. EGF-konjuge edilen boş (sol) ve karboplatin yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüleri (sağ)

4.2.3. EGF konjuge aljinat-PAMAM hibrit nanopartiküllerin sitotoksik etkileri

Serbest karboplatinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi pozitif kontrol olarak besin ortamı, negatif kontrol olarak ise DMSO kullanılan MTT analizi ile ölçüldüğünde, IC₅₀ değeri 72. saat için A549 hücrelerinde 41.64±10.81 µg/mL ve BEAS-2B hücrelerinde 87.81±1.94 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Daha sonra, mikroakışkan platformda sentezlenen karboplatin yüklü EGF-Al-Pa hibrit nanopartikülleri hem A549 hem de BEAS-2B hücrelerinde 41.64 µg/mL konsantrasyonda karboplatin içerecek şekilde uygulanmış ve ilaç içermeyen boş Al-Pa hibrit nanopartikülleri ise bu denemede kullanılan deneye denk gelen nanopartikül matrisi miktarınca uygulanmışlardır. MTT analizleri ile elde edilen %canlılık verileri Şekil 4.11. 'de özetlenmiştir.



Şekil 4.11. EGF-konjuge Al-Pa nanopartiküllerin 2B *in vitro* MTT analizi

Şekil 4.11.'de görüldüğü üzere ilk 24 saatlik muamele sonucu serbest karboplatin dahil tüm numunelerde her iki hücre grubunda da canlılık %70'in üzerinde olduğundan bir sitotoksik etki görülmemiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrası ise A549 hücrelerinde serbest karboplatin ve karboplatin yüklü EGF-konjuge Al-Pa nanopartiküllerde canlılık %70'in altına düşerken, BEAS-2B sağlıklı hücrelerinde ise halen %70'in üzerinde canlılık ortaya çıkmıştır. 72 saatlik muamele sonunda dahi plasebo grup olan karboplatin içermeyen EGF-

konjuge boş Al-Pa nanopartiküller, A549 ve BEAS-2B hücrelerinde sırasıyla %104.31±9.39 ve %81.06±3.74 canlılıkla sonuçlandıklarından aljinat-pamam hibrit partiküllerin kendi başlarına bir sitotoksik etkilerinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Öte yandan, EGF-konjuge karboplatin yüklü Al-Pa nanopartiküllerle muamele edilen ve yüzeyinde EGF reseptörünü yüksek düzeyde ifade ettiği bilinen A549 hücrelerinin canlılığı %49.37±12.73'e düşerken (serbest karboplatinden daha yüksek toksisite göstermiştir), sağlıklı BEAS-2B hücrelerinde ise %67.76±5.25 canlılıkla daha düşük bir sitotoksik etki ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak, EGFR'nin doğal ligandı olan EGF'in kemoterapötik ajan yüklü nanopartiküllerin yüzeyine konjuge edilmesi ile bu partiküllerin akciğer kanseri hücrelerine hedeflenmeleri gerçekleştirilmiştir. EGFR spesifik antikolar ya da diğer EGFR spesifik ligandlara kıyasla EGF'in seçilmesinin sebebi sitotoksositeye yol açabilecek olası bir immün yanıtın önüne geçilebilmesidir. Bu tez çalışması kapsamında incelenen ikinci formülasyon olan EGF-konjuge karboplatin yüklü Al-Pa nanopartiküllerinin, EGFR hedefli diğer nanopartiküller sistemlerden en önemli farkı, taşıdıkları karboplatinin mevcut klinik uygulamalarında karşılaşılan nefrotoksosite ve düşük hücre alımı gibi sorunlara yönelik olarak yenilikçi bir alternatif sunmasıdır.

Devam eden başlıkta bu tez çalışması kapsamında incelenen üçüncü formülasyon olan karboplatin yüklü mikrokabarcıklara ait bulgular tartışılacaktır.

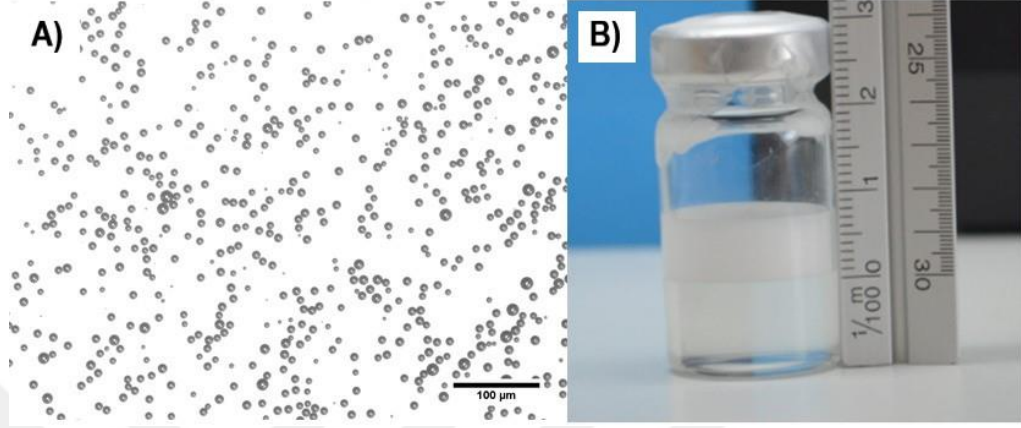
4.3. Ultrason-Kontrast Ajan Olarak Karboplatin Yüklü Mikrokabarcıklar

Bu tez kapsamında mikroakışkan platformlar üzerinden sentezlenen bir diğer formülasyon, ultrason-duyarlılığı sayesinde hem görüntüleme hem de tedaviyi aynı anda mümkün kılan karboplatin yüklü aljinat kaplı teranostik mikrokabarcıklardır. Esasen fosfolipit kabukla stabilize edilen mikrokabarcıkların (Mk) ilaç yükleme kapasitesini arttırmak için aljinat polimer tabakası ile kaplanarak (Al-Mk) karboplatin ile yüklenmiştir (K-Al-Mk). Sentezlenen Mk, Al-Mk ve K-Al-Mk'ların A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında sitotoksik aktiviteleri MTT testi ve canlı/ölü floresan boyama denemeleri ile incelenmiştir.

4.3.1. Aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıkların mikroakışkan sistemde sentezleri CaCl₂ çözeltisi ile karıştırılmaları

Bu çalışmada lipit dissolüsyonunun hazırlığında uygulanan fosfolipitlerin sırayla propilen glikolde çözündürüldükten sonra PBS tampon ile seyreltilmesi yönteminde organik çözücü kullanımının olmaması önemli bir noktadır. Lipit formülasyonlarının hazırlanmasında en çok kullanılan teknik olan ve “Bangham metodu” olarak da bilinen “ince-film hidrasyonu yöntemi”, katı fosfolipit karışımlarının kloroform veya metanol gibi organik çözücüler içinde çözündürülmesini gerektirmektedir (Bangham et al., 1964, 1965). Çözünmüş bu fosfolipitler, daha sonra düşük basınç altında organik çözücülerin buharlaştırılması ve sulu bir tamponla hidratlanmaları ile ince bir film şeklinde elde edilmektedirler. Ancak, bahsedilen bu yöntemin üründe toksik organik çözücü kalıntıları bırakması başta olmak üzere üretim kapasitesinin düşük olması ve homojenizasyon kısıtları gibi nedenlerle ticari ölçeğe uygulanabilirliği sınırlıdır. Dolayısıyla, katı lipit karışımlarının işleme sürecini geliştirmeye yönelik olarak, kolayca büyük ölçeğe aktarılabilen, tamamen biyo-uyumlu ve en önemlisi filtrelenebilen üniform fosfolipit süspansiyonlarının oluşturulabilmesine karşı bir ihtiyaç ortaya çıkmaktadır (Hui et al., 2017). Bu çalışmada kullanılan metodoloji ilk önce biyoyumlu propilen glikol ve gliserol yardımcı kosolventleri içerisinde fosfolipitlerin tamamen çözünmesini ve ardından istenen lipit dispersiyonunu hazırlamak için su bazlı ortamın (PBS) eklenmesini içermektedir. Özellikle enjekte edilebilir olarak kullanılması amaçlanan formülasyonlar için, lipit süspansiyonlarının genellikle 0.2 µm'lik bir gözenek boyutundan filtre edilebilir olması dikkate alınması gereken bir diğer önemli husustur ve Bangham metodu kullanılarak bu şekilde filtrelenebilen bir lipit süspansiyonunun hazırlanması oldukça zordur. Kullanılan metodolojide ise 10 mg/mL konsantrasyonda lipit solüsyonu filtrelenebilirken, 10 mg/mL konsantrasyonda lipit ile birlikte ağırlıkça %0.5 aljinat içeren solüsyon ise 0.2 µm'lik şırınga filtre ile filtrelenebilecek üzellikte değildi. Bu duruma yönelik olarak, toplam lipit konsantrasyonunun azaltılması denense de sonuç değişmemiş, çözüm olarak öncelikle lipit solüsyonunun hazırlanarak filtrelenmesini, sonra elde edilen bu filtrata doğru miktarda aljinat eklenmesi ile istenen nihai konsantrasyonda filtrelenebilen lipit+polimer karışımı hazırlanabilmiştir. Karboplatin yüklü K-Al-Mk'ların sentezi için kullanılacak lipit+polimer karışımı aynı şekilde hazırlanırken son aşamada belli bir miktar karboplatin eklenmiştir. Fosfolipit karışımı ile mikrokabarcık

üretimi yapabilen MSC cihazında kullanılan bu lipid solüsyonunun aljinat ile modifikasyonu sonrası Mk oluşumu üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı Şekil 4.12.'de görülmektedir.



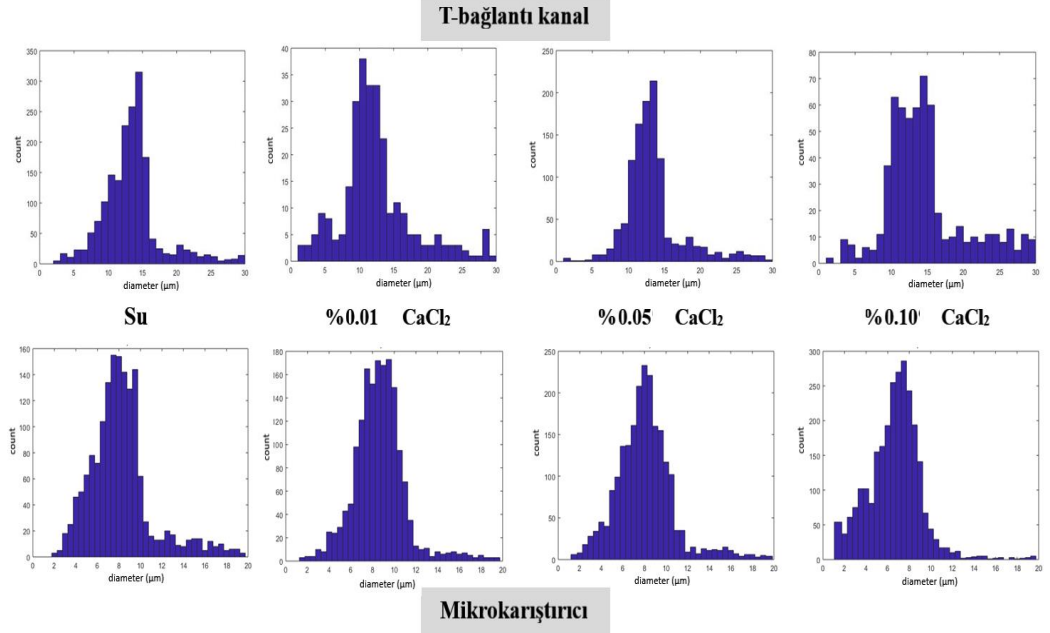
Şekil 4.12. Mikroskop altında (A) ve cam vial içerisinde (B) aljinat-lipit Mk'ların görünümü

MSC cihazında henüz-sentezlenmiş fosfolipit mikrokabarcıkların üzerindeki aljinat tabakasının Ca^{+2} 'un aracılığıyla çapraz bağlanmasını teşvik etmek için, mikrokabarcıkların $CaCl_2$ çözeltileri ile karıştırılması gerekmektedir. Literatürde, Na-aljinat nanoemülsiyon karışımının bir $CaCl_2$ çözeltisine damlatılması ile nanoemülsiyondaki aljinatın başarılı bir şekilde jelleştirilebildiği rapor edilmişse de (Huang et al., 2006), bu çalışma konusu olan mikrokabarcıklar içerdikleri gaz çekirdekleri nedeniyle yüzeye çıkma eğiliminde olduklarından $CaCl_2$ çözeltisinde alıkonma sürelerini uzatmak için manyetik karıştırma da uygulanmıştır. Ancak bahsedilen şekilde MSC cihazı çıkış hattının manyetik karıştırıcı ile karıştırılmakta olan $CaCl_2$ çözeltisine daldırılması yoluyla sentezlenen aljinat kaplı fosfolipit mikrokabarcıklarda, yüksek kayma gerilimine bağlı olarak büyük ve daha geniş ortalama kabarcık boyut dağılımı tespit edilmiş ve kabarcıkların kısa sürede çoğunlukla patlayarak kayboldukları tespit edilmiştir. Dolayısıyla, MSC çıkış hattından gelen henüz-sentezlenmiş mikrokabarcıkların aljinat ile kaplanması için bu çıkış hattı bir T-bağlantı mikrokanal veya pasif mikrokarıştırıcıya seri bağlanarak, farklı konsantrasyonlarda (ağırlıkça %0.01, %0.05 ve %0.10) $CaCl_2$ çözeltileri veya deiyonize su ile karıştırılmıştır.

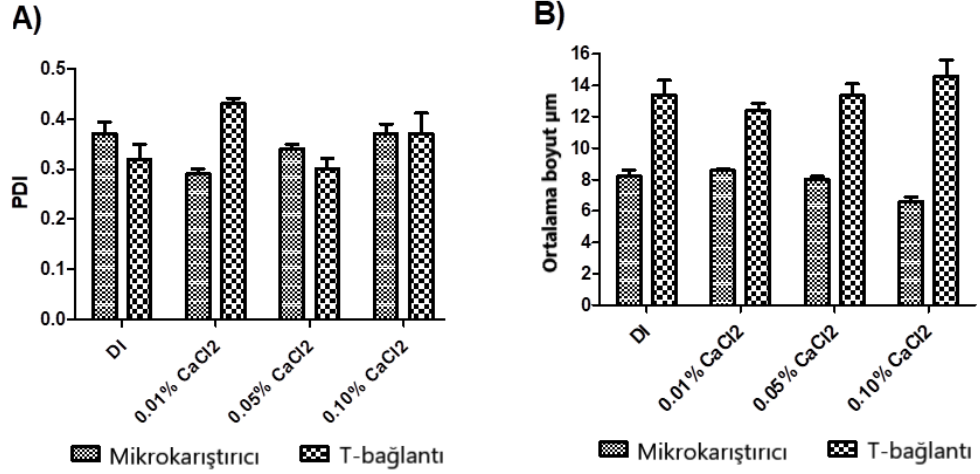
4.3.2. Mikrokabarcıkların boyut dağılım özellikleri

Sentezlenen aljinat kaplı mikrokabarcıkların (Al-Mk) mikroskop görüntülerinin MATLAB programında analiz edilmesi ile elde edilen boyut dağılım verileri incelendiğinde tüm Gauss eğrilerinin tek tepeli olduğu görülmektedir (Şekil 4.13). Polidispersite indeksi (PDI) değerleri ise T-bağlantı mikrokanal kullanılarak sentezlenenlerde 0.30 ile 0.43 arasındayken, pasif mikrokariştirici kullanılarak sentezlenenlerde 0.29 ve 0.37 arasında oldukça dar aralıklardadırlar (Şekil 4.14.A). T-bağlantı mikrokanal kullanılarak sentezlenen Al-Mk'ların ortalama boyut değerleri, deiyonize su, %0.01, %0.05 ve %0.10 CaCl₂ ve kullanılan denemeler için sırasıyla 13.4 ±0.7, 12.4 ±0.4, 13.4 ±0.5 ve 14.6 ±0.7 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.14.B). Mikrokariştirici kullanılarak sentezlenen Al-Mk'ların ortalama boyut değerlerinin ise deiyonize su, %0.01, %0.05 ve %0.10 CaCl₂ kullanılan denemeler için sırasıyla 8.2 ±0.3, 8.6 ±0.1, 8.0 ±0.2 ve 6.6 ±0.2 µm olduğu görülmektedir (Şekil 4.14.B).

Sonuç olarak, farklı CaCl₂ konsantrasyonlarının, deiyonize suya kıyasla Al-Mk'ların boyut dağılımı üzerinde önemli bir ayırt edici etkisi olmamıştır. Ancak, pasif mikrokariştirici düzeneğinden daha küçük Al-Mk'lar elde edilmesi, mikrokariştiricinin daha kontrollü ve etkin bir türbülanslı mikroçevreye sahip olması nedeniyle, aljinatın CaCl₂ ile karıştırılması sırasında Al-Mk'ların genişlemesini sınırlandırmasına dayandırılmıştır. Ancak mikrokariştirici ile karıştırılarak aljinatın çapraz bağlanması sağlanan Al-Mk'larda muhtemelen çekirdekdeki gazın daha hızlı bir sızıntıya uğraması nedeniyle kısa sürede ortadan kayboldukları, bir günden fazla stabil kalmadıkları bilinmelidir. Bu nedenle, karboplatin yüklü mikrokabarcıklar sentezi için sadece T-bağlantılı mikrokanal kullanılmış (%0.05 CaCl₂) ve 12.2±0.21 µm ortalama boyutta K-Al-Mk'lar elde edilmiştir.



Şekil 4.13. MSC cihazı ile sentezlenen ve T-bağlantısı (üst panel) veya mikromikser aracılığıyla farklı CaCl_2 çözeltileri ile karıştırılan Al-Mk'ların boyut dağılım diyagramları



Şekil 4.14. MSC ile sentezlenen ve T-bağlantı veya mikromikser aracılığıyla farklı konsantrasyonda CaCl_2 çözeltileri ile karıştırılan Al-Mk'ların PDI değerleri (A) ve ortalama boyutları (μm) (B).

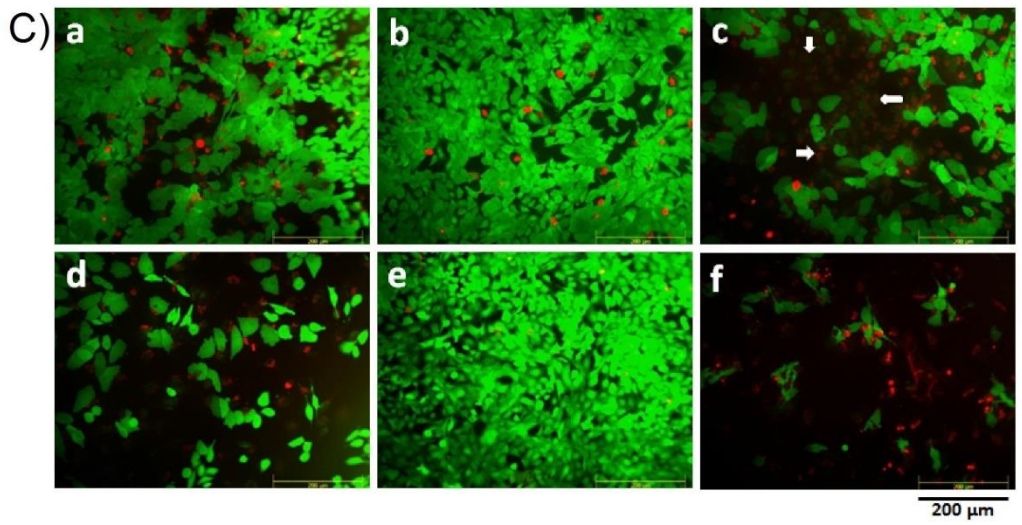
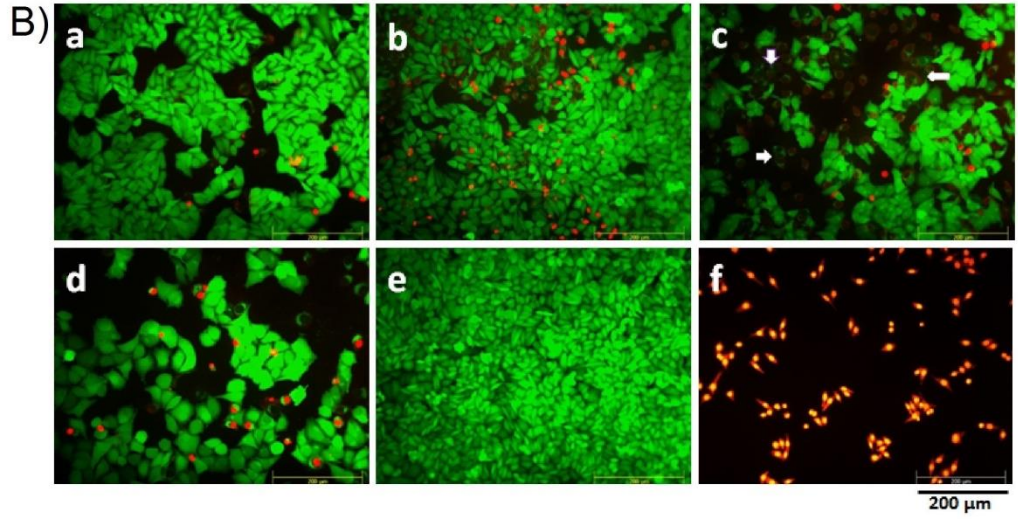
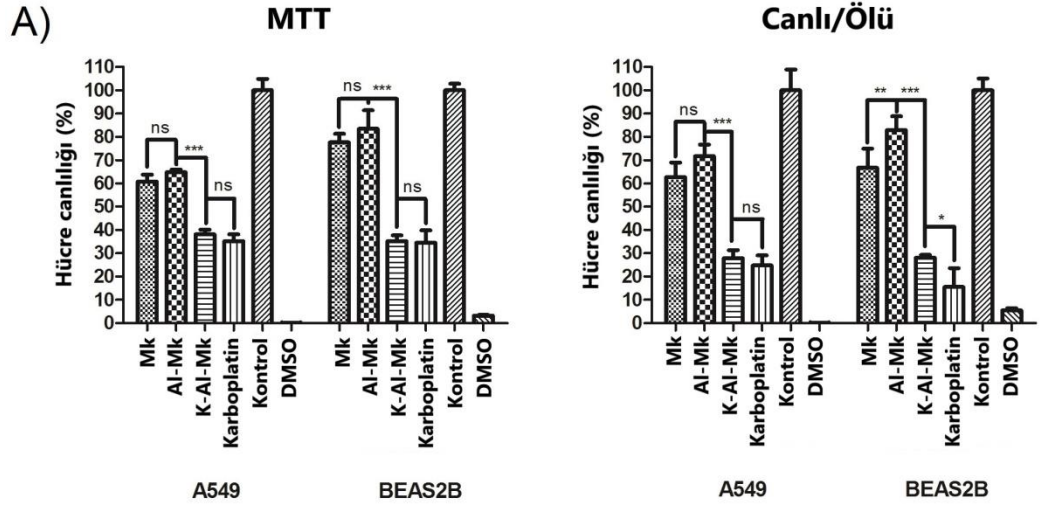
Bir mikrokabarcığın çapı, vücuttaki tüm mikrodamarlar ve kılcal damarlarda alyuvarlara benzer reoloji sergilemelerini mümkün kılacak şekilde tıpkı bir alyuvarın boyutu gibi yaklaşık olarak 10 µm civarında olmalıdır (Sirsi et al., 2009). Bununla birlikte, tümör damarları tipik olarak 1 µm'den çok daha düşük partiküller için geçirgendirler ve dahası mikrokabarcıklar mikron ölçekteki boyutları nedeniyle zaten pasif olarak damar dışına çıkamazlar. Ancak dalak ve karaciğer tarafından elimine edilinceye kadar ya da kendinden çözülene kadar oldukça kısa sürede dolaşımında kalırlar (Zullino et al., 2018). Oldukça düşük bir akustik basınç uygulanan mikrokabarcıklar kavitasyona neden olduklarından, sonoporasyon, endositoz aktivasyonu veya hücre bağlantılarının geçirgenliği gibi farklı mekanizmalar yoluyla ilaç penetrasyonunu artıracak şekilde tümör endotelyumuna yakın konumda osilasyona uğrayarak etki etmektedirler (Boissenot et al., 2016). Karboplatinin enkapsülasyon verimliliğine bakıldığında, aljinat tabakasına enkapsüle edilen ilaç yüzdesi, mikrokabarcık santrifüjlenmesi ile ayrılmalarından sonra kalan infranatanntaki enkapsüle olmamış ilacın ölçülmesi ile dolaylı olarak hesaplanmıştır. Bu bağlamda, karboplatin yüklü mikrokabarcıklar %65 oranında bir enkapsülasyon verimliliği ile elde edilmişlerdir. Elde edilen bu yüksek enkapsülasyon verimliliği, geliştirilen yöntem ile mikrokabarcıkların çevresinde aljinat polimerinin çapraz bağlanmasının teşvik edildiğini ve en yaygın kullanılan polimer bazlı ilaç salım sistemlerine kıyasla taşıma kapasitelerinde önemli bir gelişme sağladığını göstermiştir (Jose et al., 2016; Khan et al., 2017 b).

4.3.3. *In Vitro* Sitotoksikite testleri ve canlı/ölü hücre boyaması

Bu çalışma kapsamında sentezlenen Mk, Al-Mk ve K-Al-Mk'ların sitotoksik etkileri, insan epitelyal akciğer adenokarsinomu (A549) ve insan bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerinde, MTT ve canlı/ölü hücre boyaması testleri ile incelenmiştir. Bu testler öncesi hücreler ile farklı mikrokabarcıkların doğrudan temasını sağlayan özel tasarlanmış bir ters kültür tekniği kullanılarak 72 saat süresince muamele edilmişlerdir. Bugüne kadar mikrokabarcıkların monolayer hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin incelenmesi için, uygulanacak sonoporasyon deneylerindeki ultrason düzeneğine de bağlı olarak ticari özel kültür kapları olan OptiCell™ (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Almanya) veya CLINicell® (MABIO, Tourcoing, Fransa) gibi kültür kasetleri kullanılmıştır. Bu tasarımlar genellikle

mikrokabarcıkların hücrelere doğru yükselmesine izin verecek şekilde yerleştirildikleri için, çalışma kapsamında geliştirilen ters plaka kültür tekniğinin, sonoporasyon veya akustik uygulamalar olmaksızın mikrokabarcık-monolayer hücre etkileşimlerine izin vererek etkili ve kolay erişilebilir bir sitotoksitesinin incelemeye olanak sağladığı düşünülmektedir (Taylor et al., 2007; Lajoinie et al., 2016). Mk, Al-Mk, K-Al-Mk ve serbest karboplatin ile muamele edilmiş A549 ve BEAS-2B hücrelerinin kontrol grubuna göre hücre canlılık yüzdeleri, hem MTT testi hem de canlı/ölü hücre boyaması sonrası ImageJ programında sayım ile belirlenmiş ve sonuçlar iki yönlü ANOVA Bonferroni posttest ile istatistiksel olarak analiz edilerek Şekil 4.15.A'da gösterilmiştir. MTT sonuçlarına göre K-Al-Mk'lar, Mk ve Al-Mk'lara kıyasla her iki hücre üzerinde de anlamlı ölçüde daha yüksek bir sitotoksik etki ($p < 0.001$) göstermiş, ancak serbest formda karboplatine göre anlamlı olmayan bir sitotoksik etkiye ($p > 0.05$) sebep olmuşlardır. Hem Mk'lar hem de Al-Mk'larda, karboplatin yüklemesi olmadığı halde, hücre canlılığı % 70'in altına düşmüştür. Bu durum, 72 saat boyunca mikrokabarcıkların sıcaklığa bağlı patlamaları ve hücre zarlarında bir tür perforasyona neden olabildiklerini düşündürmektedir. Bu fikir, Lentacker ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen, DOX-yüklü lipozom taşıyan mikrokabarcıkların kalıntıları ile muamele edilen melanoma hücrelerindeki sitotoksitesinin DOX-yüklü lipozomları taşıyan mikrokabarcıklarla birlikte ultrason ile muamele edilen gruba göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu gösteren çalışmalarıyla örtüşmektedir (Lentacker et al., 2010). Ek olarak, Al-Mk'larda aljinat varlığı, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, Mk'lar, K-Al-Mk'lar ve serbest karboplatin gruplarına kıyasla hücrelerin proliferasyonunu pozitif yönde etkilemiştir ($p > 0.05$). Bunun sebebinin, hidrofilik ve negatif yükte bir polimer olan aljinatla kaplı mikrokabarcıkların, yine negatif yüklü olan hücre zarları tarafından bir elektrostatik itme uygulanması nedeniyle hücre zarı ile etkileşiminin sınırlanması olabileceği düşünülmektedir (Nandhakumar et al., 2017). Ayrıca aljinat kaplanan fosfolipit mikrokabarcıkların, yalnızca fosfolipitlerle stabilize edilenlere göre daha yüksek hidrofilik özellikte olabileceği de ihmal edilmemesi gereken bir diğer unsurdur. Literatürde, altın nanopartiküllerin yüzeylerine bağlanan ligandların hidrofobikliğine bağlı olarak hidrofobisiteyi arttırıldığında, bu partiküllerin sitotoksitesilerinin de arttırdığı bilinmektedir (Chompoosor et al., 2010).

Canlı/ölü floresan boyama testlerinden elde edilen canlı (yeşil) ve ölü (kırmızı) hücrelerin görüntüleri Şekil 4.15.B ve Şekil 4.15.C’de gösterilmektedir. Bu görüntüler, K-Al-Mk ile muamele edilen her iki hücre tipinde de, 37°C kültür sıcaklığında patlayan mikrokabarcıklar ve ortama salınan karboplatinden ileri gelen, serbest karboplatin ve negatif kontrol gruplarından farklı bir morfolojide (yanmış gibi) beyaz oklarla işaretlenmiş hücre ölümlerinin meydana geldiğini açığa çıkarmıştır (Şekil 4.15.B-c ve Şekil 4.15.C-c). Karboplatin, K-Al-Mk'lar 37 °C’de zamanla patladığında salınmakta ve patlamanın mekanik etkisi de hücreler üzerinde ayrıca bir sitotoksik etkiyi tetiklemektedir. K-Al-Mk grubunun serbest karboplatinden anlamlı olarak daha yüksek toksisite göstermesi için daha uzun bir süre gerektiği düşünülmektedir. Serbest karboplatinin, kanser hücreleri üzerinde seçici bir etki göstermediği de yine bu çalışma kapsamındaki sitotoksisite çalışmaları sonucunda belirlenmiştir. Pek çok literatür çalışması da, bu sonuçla uyumlu olarak, akciğer kanseri tedavisinde klinikte yaygın olarak kullanılan sisplatin ve karboplatin gibi platin bazlı antineoplastik kemoterapötik ajanların, sağlıklı akciğer hücrelerinde akciğer kanseri hücrelerine göre daha yüksek ilaç toksisitesi yaratabildiği ve seçici bir etki göstermediği belirtilmiştir (Yildiz-Ozer et al., 2018; Davou et al., 2019).



Şekil 4.15. A) MTT ve canlı/ölü hücre sayımı analizlerine göre %hücre canlılığı sonuçları (ns; $p > 0.05$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0,001$). B) Mk'lar (a), Al-Mk'lar (b), K-Al-Mk'lar (c), serbest karboplatin (d), besin

ortamı (e) ve DMSO (f) ile muamele edilmiş A549 hücrelerinin canlı/ölü görüntüleri (200 μm ölçek, 20X objektif, Zeiss Axio, Vert.A1). C) Mk'lar (a), Al-Mk'lar (b), K-Al-Mk'lar (c), serbest karboplatin (d), besin ortamı (e) ve DMSO (f) ile muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinin canlı/ölü görüntüleri (200 μm ölçek, 20X objektif, Zeiss Axio, Vert.A1).



5. SONUÇ

Bu tez kapsamında, farklı fabrikasyon teknikleri ile geliştirilen üç farklı antikanser etkili ilaç taşıyıcı sistemden ilki, pasif hedeflenmiş timokinon-yüklü kübozom/hekzozomlar iken, EGF ile fonksiyonelleştirilerek EGFR reseptörlerine aktif olarak hedeflenmiş karboplatin yüklü polimer-dendrimer hibrit nanopartikülleri incelenen ikinci ilaç taşıyıcı sistemdir. Son olarak, ultrason altında hem görüntü kontrastını arttırıcı ajan olarak görev görebilecek hem de ultrason-duyarlı olarak taşıdığı ilacı uygulama bölgesine spesifik olarak salması beklenen karboplatin yüklü polimer kaplı teranostik mikrokabarcıkların, seri bağlı mikroakışkan platformlar ile sentezlenmişlerdir.

Sentezlenen TQ-yüklü kübozom/hekzozomlar için; kullanılan lipit kompozisyonu, ilaç konsantrasyonu ve etanol içeriği parametrelerinin kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin hem yapısal hem de boyut karakteristikleri üzerinde etkili oldukları, ayrıca lamelar lipozomal formülasyonlar ile lamelar olmayan kübik/hekzagonal formülasyonlar arasında faz geçişlerini tetikleyebildikleri belirlenmiştir. Geleneksel yöntem ile kıyaslandığında mikroakışkan platformda üretilen TQ-yüklü kendiliğinden-düzenlenen nanopartiküllerin boyut dağılımlarında belirgin bir farklılığa sebep olmasa da bu nanopartiküllerin partiden-partiye varyasyondan uzak ve sürekli-üretim modunda sentezlenebildikleri ortaya konmuştur.

Özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan karboplatin ilacının düşük tümör alımı ve sağlıklı hücrelerdeki seçici olmayan sitotoksik etkileri nedeniyle, karboplatin aljinat-pamam dendrimer hibrit nanopartiküllerine yüklenmiş ve ayrıca EGF ligandı ile konjuge edilerek hücresel internalizasyonunun artırımı hedeflenmiştir. Mikroakışkan sistemde uygulanan akış oranları ve dendrimer konsantrasyonunun partikül boyutları üzerinde oldukça etkili olduğu, EGF fonksiyonelizasyonunda ise ligand konsantrasyonuna bağlı olarak konjugasyon oranının arttığı görülmüştür.

Ultrason altında kontrastı arttırılmış ve yüksek çözünürlükte görüntü elde edebilmek amacıyla klinikte uzun yıllardır kontrast ajan olarak kullanılmakta olan mikrokabarcıkların, karboplatin yüklü aljinat polimeri ile kaplanarak aynı anda hem görüntüleme hem de ilaç salımı gerçekleştirmesi bu tez kapsamında

çalışılan son formülasyondur. Oldukça biyouyumlu oldukları *in vitro* sitotoksisite testleri ile ortaya konulmuş olan karboplatin yüklü aljinat kaplı bu ultrason kontrast ajanların sentezlenmeleri için farklı mikroakışkan sistemler kombine halde kullanılmışlardır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S. and Khuller, G.K.**, 2006, Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential, *The Indian journal of chest diseases & allied sciences*, 48(3):171–176pp.
- Ahn, J., Ko, J., Lee, S., Yu, J., Kim, Y. and Li, N.**, 2018, Microfluidics in nanoparticle drug delivery; From synthesis to pre-clinical screening, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128:29–53pp.
- Akay, S., Heils, R., Khiem, H., Smirnova, I. and Yesil-celiktas, O.**, 2017, An injectable alginate-based hydrogel for microfluidic applications, *Carbohydrate Polymers*, 161:228–234pp.
- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Alhadlaq, H.A., Alrokayan, S.A. and Kumar, S.**, 2014, Targeted anticancer therapy: Overexpressed receptors and nanotechnology, *Clinica Chimica Acta*, 436:78–92pp.
- Amara, S., Patin, A., Giuffrida, F., Wooster, T.J., Thakkar, S.K., Bénarouche, A., Poncin, I., Robert, S., Point, V., Molinari, S., Gaussier, H., Diomande, S., Destailats, F., Cruz-Hernandez, C. and Carrière, F.**, 2014, In vitro digestion of citric acid esters of mono- and diglycerides (CITREM) and CITREM-containing infant formula/emulsions, *Food and Function*, 5:1409–1421pp.
- Angelova, A., Garamus, V.M., Angelov, B., Tian, Z., Li, Y. and Zou, A.**, 2017, Advances in structural design of lipid-based nanoparticle carriers for delivery of macromolecular drugs, phytochemicals and anti-tumor agents, *Advances in Colloid and Interface Science*, 249:331–345pp.
- Angelova, A., Drechsler, M., Garamus, V.M. and Angelov, B.**, 2018, Liquid crystalline nanostructures as PEGylated reservoirs of omega-3 polyunsaturated fatty acids: structural insights toward delivery formulations against neurodegenerative disorders, *ACS Omega*, 3:3235–3247pp.
- Appold, L., Shi, Y., Rütten, S., Kühne, A., Pich, A., Kiessling, F. and Lammers, T.**, 2017, Physicochemical Characterization of the Shell Composition of PBCA-Based Polymeric Microbubbles, *Macromolecular*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bioscience, 17(10):1700002pp.

- Azmi, I.D.M., Wibroe, P.P., Wu, L.P., Kazem, A.I., Amenitsch, H., Moghimi, S.M. and Yaghmur, A.**, 2016, A structurally diverse library of safe-by-design citrem-phospholipid lamellar and non-lamellar liquid crystalline nano-assemblies, *Journal of Controlled Release*, 239:1–9pp.
- Bangham, A.D. and Horne, R.W.**, 1964, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *Journal of Molecular Biology*, 8(5):660–668pp.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C.**, 1965, Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids, *Journal of Molecular Biology*, 13(1):238–252pp.
- Bareford, L.M. and Swaan, P.W.**, 2007, Endocytic mechanisms for targeted drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 59(8):748–758pp.
- Barriga, H.M.G., Holme, M.N. and Stevens, M.M.**, 2019, Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles?, *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(10):2958–2978pp.
- Boissenot, T., Bordat, A., Fattal, E. and Tsapis, N.**, 2016, Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications, *Journal of Controlled Release*, 241:144–163pp.
- Bor, G., Azmi, I.D.M. and Yaghmur, A.**, 2019, Nanomedicines for cancer therapy: current status, challenges and future prospects, *Ther. Deliv*, 10(2):113–132pp.
- Bordoni, L., Fedeli, D., Nasuti, C., Maggi, F., Papa, F., Wabitsch, M., De Caterina, R. and Gabbianelli, R.**, 2019, Antioxidant and anti-inflammatory properties of nigella sativa oil in human pre-adipocytes, *Antioxidants*, 8:51pp.
- Burian, M., Meisenbichler, C., Naumenko, D. and Amenitsch, H.**, 2020, SAXSDOG: open software for real-time azimuthal integration of 2D scattering images, *arXiv preprint*, arXiv:2007.02022pp.
- Burke, C.W., Hsiang, Y.H.J., Alexander IV, E., Kilbanov, A.L. and Price,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- R.J.**, 2011, Covalently linking poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles to microbubbles before intravenous injection improves their ultrasound-targeted delivery to skeletal muscle, *Small*, 7(9):1227–1235pp.
- Cai, X., Yang, F. and Gu, N.**, 2012, Applications of Magnetic Microbubbles for Theranostics, *Theranostics*, 2(1):103–112pp.
- Cao, X.T., Patil, M.P., Phan, Q.T., Le, C.M.Q., Ahn, B.H., Kim, G. Do and Lim, K.T.**, 2020, Green and direct functionalization of poly (ethylene glycol) grafted polymers onto single walled carbon nanotubes: Effective nanocarrier for doxorubicin delivery, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 83:173–180pp.
- Capretto, L., Carugo, D., Mazzitelli, S., Nastruzzi, C. and Zhang, X.**, 2013, Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(11–12):1496–1532pp.
- Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E. and Nastruzzi, C.**, 2016, Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors, *Scientific Reports*, 6:25876pp.
- Cavallaro, U. and Christofori, G.**, 2004, Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014:58–66pp.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A.**, 2011, Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:29pp.
- Chompoosor, A., Saha, K., Ghosh, P.S., Macarthy, D.J., Miranda, O.R., Zhu, Z. jiang, Arcaro, K.F. and Rotello, V.M.**, 2010, The Role of Surface Functionality on Acute Cytotoxicity , ROS Generation and DNA Damage by Cationic Gold Nanoparticles, *Small* ., 6(20):2246–2249pp.
- Chowdhury, S.M., Lee, T. and Willmann, J.K.**, 2017, Ultrasound-guided drug delivery in cancer, *Ultrasonography*, 36(3):171–184pp.
- Coelho, J.F., Ferreira, P.C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A.C., Góis,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- J.R. and Gil, M.H.**, 2010, Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments, *EPMA Journal*, 1(1):164–209pp.
- Coester, C., Kreuter, J., von Briesen, H. and Langer, K.**, 2000, Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA)., *International journal of pharmaceuticals*, 196(2):147–149pp.
- Couvreur, P.**, 2013, Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1):21–23pp.
- Damgé, C., Maincent, P. and Ubrich, N.**, 2007, Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats., *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 117(2):163–170pp.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. and Mozafari, M.R.**, 2018, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics*, 10(2):1–17pp.
- Date, A.A., Joshi, M.D. and Patravale, V.B.**, 2007, Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles., *Advanced drug delivery reviews*, 59(6):505–521pp.
- Davou, G.I., Chuwang, N.J., Essien, U.C., Choji, T.P.P., Echeonwu, B.C. and Lugos, M.D.**, 2019, Cytotoxicity analysis of etoposide and cisplatin on cell lines from human lung cancer and normal human lung, *International Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 7(2):40–47pp.
- Elibol, B., Terzioglu-Usak, S., Beker, M. and Sahbaz, C.**, 2019, Thymoquinone (TQ) demonstrates its neuroprotective effect via an anti-inflammatory action on the A β (1–42)-infused rat model of Alzheimer's disease, *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 29(4):379–386pp.
- Esposito, E., Cortesi, R., Drechsler, M., Paccamiccio, L., Mariani, P.**,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Contado, C., Stellin, E., Menegatti, E., Bonina, F. and Puglia, C.,** 2005, Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin, *Pharmaceutical Research*, 22(12):2163–2173pp.
- Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Shahri, A.M.P. and Samini, F.,** 2018, The neuroprotective effects of thymoquinone: A review, *Dose-Response*, 16(2):1559325818761455pp.
- Fathordoobady, F., Sannikova, N., Guo, Y., Singh, A., Kitts, D.D. and Pratap-Singh, A.,** 2021, Comparing microfluidics and ultrasonication as formulation methods for developing hempseed oil nanoemulsions for oral delivery applications, *Scientific Reports*, 11:72pp.
- Feng, Q., Sun, J. and Jiang, X.,** 2016, Microfluidics-mediated assembly of functional nanoparticles for cancer-related pharmaceutical applications, *Nanoscale*, 8(25):12430–12443pp.
- Ferrara, K.W., Borden, M.A. and Zhang, H.,** 2009, Lipid-Shelled Vehicles: Engineering for Ultrasound Molecular Imaging and Drug Delivery, *Accounts of Chemical Research*, 42(7):881–892pp.
- Feshitan, J.A., Chen, C.C., Kwan, J.J. and Borden, M.A.,** 2009, Journal of Colloid and Interface Science Microbubble size isolation by differential centrifugation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 329(2):316–324pp.
- Garcia-Pinel, B., Porrás-Alcalá, C., Ortega-Rodríguez, A., Sarabia, F., Prados, J., Melguizo, C. and Lopez-Romero, J.M.,** 2019, Lipid-Based Nanoparticles: Application and Recent Advances in Cancer Treatment, *Nanomaterials*, 9(4):638pp.
- Ghazal, A., Gontsarik, M., Kutter, J.P., Lafleur, J.P., Labrador, A., Mortensen, K. and Yaghmur, A.,** 2016, Direct monitoring of calcium-triggered phase transitions in cubosomes using small-angle X-ray scattering combined with microfluidics research papers, *Journal of Applied crystallography*, 49:2005–2014pp.
- Ghazal, A., Gontsarik, M., Kutter, J.P., Lafleur, J.P., Ahmadvand, D.,**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Labrador, A., Salentinig, S. and Yagmur, A.,** 2017, Microfluidic platform for the continuous production and characterization of multilamellar vesicles: a synchrotron small-angle x-ray scattering (SAXS) study, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 8(1):73–79pp.
- Gontsarik, M., Buhmann, M.T., Yagmur, A., Ren, Q., Maniura-Weber, K. and Salentinig, S.,** 2016, Antimicrobial peptide-driven colloidal transformations in liquid-crystalline nanocarriers., *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7:3482–3486pp.
- Gontsarik, M., Yagmur, A., Ren, Q., Maniura-Weber, K. and Salentinig, S.,** 2019, From structure to function: pH-switchable antimicrobial nano-self-assemblies, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(3):2821–2829pp.
- Gülçe İz, S., Deliloğlu Gürhan, S.I., Şen, B.H., Endoğan, T. and Hasirci, N.,** 2010, Comparison of in vitro cytotoxicity and genotoxicity of MMA-based polymeric materials and various metallic materials, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40(6):905–916pp.
- Hedegaard, S.F., Nilsson, C., Laurinmäki, P., Butcher, S., Urtti, A. and Yagmur, A.,** 2013, Nanostructured aqueous dispersions of citrem interacting with lipids and PEGylated lipids, *RSC Advances*, 3(46):24576–24585pp.
- Helvig, S.Y., Woythe, L., Pham, S., Bor, G., Andersen, H., Moghimi, S.M. and Yagmur, A.,** 2021, A structurally diverse library of glycerol monooleate/oleic acid non-lamellar liquid crystalline nanodispersions stabilized with nonionic methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG)-lipids showing variable complement activation properties, *Journal of Colloid and Interface Science*, 582:906–917pp.
- Huang, K.S., Lai, T.H. and Lin, Y.C.,** 2006, Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles, *Lab on a Chip*, 6(7):954–957pp.
- Hui, P.K., Bishop, J.E. and JR (Lantheus Medical Imaging Inc.), E.S.M.,** 2017, Preparation of a lipid blend and a phospholipid suspension containing the lipid blend, *US 20170312375A1*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ilhan-Ayisigi, E. and Yesil-Celiktas, O.**, 2018, Silica-based organic-inorganic hybrid nanoparticles and nanoconjugates for improved anticancer drug delivery, *Engineering in Life Sciences*, 18(12):882–892pp.
- Ilhan-Ayisigi, E., Ulucan, F., Saygili, E., Saglam-Metiner, P., Gulce-Iz, S. and Yesil-Celiktas, O.**, 2020a, Nano-vesicular formulation of propolis and cytotoxic effects in a 3D spheroid model of lung cancer, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(8):3525–3535pp.
- Ilhan-Ayisigi, E., Saglam-Metiner, P., Manzi, G., Giannasi, K., van Hoeve, W. and Yesil-Celiktas, O.**, 2020b, One-Step Microfluidic Coating of Phospholipid Microbubbles with Natural Alginate Polymer as a Delivery System for Human Epithelial Lung Adenocarcinoma, *Macromolecular Bioscience*, 20(6):2000084pp.
- Ilhan-Ayisigi, E., Yaldiz, B., Bor, G., Yaghmur, A. and Yesil-Celiktas, O.**, 2021, Advances in microfluidic synthesis and coupling with synchrotron SAXS for continuous production and real-time structural characterization of nano-self-assemblies, *Colloids and Surfaces B*, 201:111633pp.
- Istenič, K., Balanč, B.D., Djordjević, V.B., Bele, M., Nedović, V.A., Bugarski, B.M. and Ulih, N.P.**, 2015, Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles., *Journal of Food Engineering*, 167:196–203pp.
- Jahn, A., Vreeland, W.N., Gaitan, M. and Locascio, L.E.**, 2004, Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing, *Journal of the American Chemical Society*, 126:2674–2675pp.
- Jahn, A., Vreeland, W.N., Devoe, D.L., Locascio, L.E. and Gaitan, M.**, 2007, Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size, *Langmuir*, 23(11):6289–6293pp.
- Jahn, A., Reiner, J.E., Vreeland, W.N., DeVoe, D.L., Locascio, L.E. and Gaitan, M.**, 2008, Preparation of nanoparticles by continuous-flow microfluidics, *Journal of Nanoparticle Research*, 10:925–934pp.
- Jahn, A., Stavis, S.M., Hong, J.S., Vreeland, W.N., Devoe, D.L. and Gaitan, M.**, 2010, Microfluidic mixing and the formation of nanoscale

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- lipid vesicles, *ACS Nano*, 4:2077–2087pp.
- Jong, W.H. De and Borm, P.J.A.**, 2008, Drug delivery and nanoparticles : Applications and hazards, *International Journal of Nanomedicine*, 3(2):133–149pp.
- Jose, S., Juna, B.C., Cinu, T.A., Jyoti, H. and Aleykutty, N.A.**, 2016, Carboplatin loaded Surface modified PLGA nanoparticles : Optimization , characterization , and in vivo brain targeting studies, *Colloids and Surface B*, 142:307–314pp.
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J. and Farokhzad, O.C.**, 2016, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release, *Chemical Reviews*, 116(4):2602–2663pp.
- Kang, J.H., Kang, H.S., Kim, I.K., Lee, H.Y., Ha, J.H., Yeo, C.D. and Lee, S.H.**, 2015, Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin, *Experimental Biology and Medicine*, 240(11):1416–1425pp.
- Kanter, M., Coskun, O. and Uysal, H.**, 2006, The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage, *Archives of Toxicology*, 80:217–224pp.
- Kazan, A., Yesil-Celiktas, O. and Zhang, Y.S.**, 2019, Fabrication of thymoquinone-loaded albumin nanoparticles by microfluidic particle synthesis and their effect on planarian regeneration, *Macromolecular Bioscience*, 19(11):1900182pp.
- Khader, M. and Eckl, P.M.**, 2014, Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications, *Iran Journal of Basic Med Sci*, 17(12):950–957pp.
- Khalilqi, K., Ghazal, A., Azmi, I.D.M., Amenitsch, H., Mortensen, K., Salentinig, S. and Yagmur, A.**, 2017, Direct monitoring of lipid transfer on exposure of citrem nanoparticles to an ethanol solution containing soybean phospholipids by combining synchrotron SAXS with microfluidics, *Analyst*, 142(17):3118–3126pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khan, I.U., Serra, C.A., Anton, N. and Vandamme, F.T.**, 2015, Production of nanoparticle drug delivery systems with microfluidics tools, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(4):547–562pp.
- Khan, M.A., Tania, M., Fu, S. and Fu, J.**, 2017a, Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation, *Oncotarget*, 8(31):51907–51919pp.
- Khan, M.A., Zafaryab, M., Mehdi, S.H., Quadri, J. and Rizvi, M.M.A.**, 2017b, Characterization and carboplatin loaded chitosan nanoparticles for the chemotherapy against breast cancer in vitro studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, 97:115–122pp.
- Kim, H., Sung, J., Chang, Y., Alfeche, A. and Leal, C.**, 2018, Microfluidics Synthesis of Gene Silencing Cubosomes, *ACS Nano*, 12(9):9196–9205pp.
- Koh, C.G., Kang, X., Xie, Y., Fei, Z., Guan, J., Yu, B., Zhang, X. and Lee, L.J.**, 2009, Delivery of polyethylenimine/DNA complexes assembled in a microfluidics device, *Molecular Pharmaceutics*, 6(5):1333–1342pp.
- Koh, G.C., Zhang, X., Liu, S., Golan, S., Yu, B., Yang, X., Guan, J., Jin, Y., Talmon, Y., Muthusamy, N., Chan, K.K., Byrd, J.C., Lee, R.J., Marcucci, G. and Lee, L.J.**, 2010, Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotide lipopolyplex nanoparticles assembled by microfluidic hydrodynamic focusing, *Journal of Controlled Release*, 141:62–69pp.
- Kotopoulos, S., Dimcevski, G., Helge Gilja, O., Hoem, D. and Postema, M.**, 2013, Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: A clinical case study, *Medical Physics*, 40:072902pp.
- Lajoinie, G., Cock, I. De, Coussios, C.C., Lentacker, I., Gac, L., Stride, E. and Versluis, M.**, 2016, In vitro methods to study bubble-cell interactions : Fundamentals and therapeutic applications, *Biomicrofluidics*, 10:011501pp.
- Lammers, T., Aime, S., Hennink, W.E., Storm, G. and Kiessling, F.**, 2011,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Theranostic Nanomedicine, *Accounts of Chemical Research*, 44(10):1029–1038pp.
- Lancelot, A. and Sierra, T.**, 2014, Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(4):547–564pp.
- Lasic, D.D.**, 1988, The mechanism of vesicle formation, *Biochemical Journal*, 256(1):1–11pp.
- Lentacker, I., Geers, B., Demeester, J., De Smedt, S.C. and Sanders, N.N.**, 2010, Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: Cytotoxicity and mechanisms involved, *Molecular Therapy*, 18(1):101–108pp.
- Li, S.D. and Huang, L.**, 2008, Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 5(4):496–504pp.
- Lindseth, F., Langø, T., Selbekk, T., Hansen, R., Reinertsen, I., Askeland, C., Solheim, O., Unsgård, G., Mårvik, R. and Nagelhus Hernes, T.A.**, 2013, Ultrasound-based Guidance and Therapy, In: Eds: G.T.T. Gunarathne (ed.), *Advancements and Breakthroughs in Ultrasound Imaging*. IntechOpen, London; UK, p. Ch. 2.
- Liu, D., Zhang, H., Fontana, F., Hirvonen, J.T. and Santos, H.A.**, 2018, Current developments and applications of microfluidic technology toward clinical translation of nanomedicines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128:54–83pp.
- Lo, C.T., Jahn, A., Locascio, L.E. and Vreeland, W.N.**, 2010, Controlled self-assembly of monodisperse niosomes by microfluidic hydrodynamic focusing, *Langmuir*, 26(11):8559–8566pp.
- Lombardi, D. and Dittrich, P.S.**, 2010, Advances in microfluidics for drug discovery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(11):1081–1094pp.
- Lum, J.S., Stobbe, D.M., Borden, M.A. and Murray, T.W.**, 2018, Photoacoustic technique to measure temperature effects on microbubble viscoelastic properties, *Applied Physics Letters*, 112:111905pp.
- Maeda, H.**, 2001, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

targeting., *Advances in enzyme regulation*, 41:189–207pp.

- Markman, J.L., Rekechenetskiy, A., Holler, E. and Ljubimova, J.Y.**, 2013, Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14):1866–1879pp.
- Master, A.M. and Gupta, A. Sen**, 2012, EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment, *Nanomedicine (Lond)*, 7(12):1895–1906pp.
- Matai, I. and Gopinath, P.**, 2016, Chemically Cross-Linked Hybrid Nanogels of Alginate and PAMAM Dendrimers as Efficient Anticancer Drug Delivery Vehicles, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(2):213–223pp.
- Matsumura, Y. and Maeda, H.**, 1986, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Research*, 46(12):6387–6392pp.
- Mohammed, S.J., Amin, H.H.H., Aziz, S.B., Sha, A.M., Hassan, S., Aziz, J.M.A. and Rahman, H.S.**, 2019, Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and In Vitro Cytotoxicity Effect of Black Seed Oil, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019:6515671pp.
- Mørch, Ý., Hansen, R., Berg, S., Åslund, A.K.O., Glomm, W.R., Eggen, S., Schmid, R., Johnsen, H., Kubowicz, S., Snipstad, S., Sulheim, E., Hak, S., Singh, G., Mcdonagh, B.H., Blom, H., de Lange Davies, C. and Stenstad, P.M.**, 2015, Nanoparticle-stabilized microbubbles for multimodal imaging and drug delivery, *Contrast Media and Molecular Imaging*, 10(5):356–366pp.
- Murgia, S., Biffi, S. and Mezzenga, R.**, 2020, Recent advances of non-lamellar lyotropic liquid crystalline nanoparticles in nanomedicine, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 48:28–39pp.
- Nandhakumar, S., Dasaratha, M. and Devendran, V.**, 2017, Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- paclitaxel loaded poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles, *Bulletin of Faculty of Pharm. Cairo University*, 55(2):249–258pp.
- Nilsson, C., Edwards, K., Eriksson, J., Larsen, S.W., Østergaard, J., Larsen, C., Urtti, A. and Yaghmur, A.**, 2012, Characterization of oil-free and oil-loaded liquid-crystalline particles stabilized by negatively charged stabilizer citrem, *Langmuir*, 28:11755–11766pp.
- Odeh, F., Ismail, S.I., Abu-Dahab, R., Mahmoud, I.S. and Al Bawab, A.**, 2012, Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer., *Drug Deliv*, 19(8):371–377pp.
- Othman, N., Masarudin, M.J., Kuen, C.Y., Dasuan, N.A., Abdullah, L.C. and Jamil, S.N.A.M.**, 2018, Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles loaded with l-ascorbic acid and thymoquinone, *Nanomaterials*, 8:820pp.
- Prajapati, R., Salentinig, S. and Yaghmur, A.**, 2018, Temperature triggering of kinetically trapped self-assemblies in citrem-phospholipid nanoparticles, *Chemistry and Physics of Lipids*, 216:30–38pp.
- Prajapati, R., Gontsarik, M., Yaghmur, A. and Salentinig, S.**, 2019a, pH-responsive nano-self-assemblies of the anticancer drug 2-hydroxyoleic acid, *Langmuir*, 35(24):7954–7961pp.
- Prajapati, R., Larsen, S.W. and Yaghmur, A.**, 2019b, Citrem-phosphatidylcholine nano-self-assemblies: Solubilization of bupivacaine and its role in triggering a colloidal transition from vesicles to cubosomes and hexosomes, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21:15142–15150pp.
- Praveen, R., Verma, P.R.P., Singh, S.K. and George, J.K.**, 2015, Cross linked alginate gel beads as floating drug delivery system for cefdinir: optimization using Box–Behnken design, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 45(2):187–199pp.
- Qiu, H. and Caffrey, M.**, 2000, The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, *Biomaterials*, 21(3):223–234pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajput, S., Puvvada, N., Kumar, B.N.P., Sarkar, S., Konar, S., Bharti, R., Dey, G., Mazumdar, A., Pathak, A., Fisher, P.B. and Mandal, M.,** 2015, Overcoming Akt induced therapeutic resistance in breast cancer through siRNA and thymoquinone encapsulated multilamellar gold niosomes, *Molecular Pharmaceutics*, 12(12):4214–4225pp.
- Roces, C.B., Lou, G., Jain, N., Abraham, S., Thomas, A., Halbert, G.W. and Perrie, Y.,** 2020a, Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics, *Pharmaceutics*, 12:1095pp.
- Roces, C.B., Christensen, D. and Perrie, Y.,** 2020b, 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*, 10:582–593pp.
- Rovers, T.A.M., Sala, G., Linden, E. Van Der and Meinders, M.B.J.,** 2016, Effect of Temperature and Pressure on the Stability of Protein Microbubbles, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8:333–340pp.
- Sedighi, M., Sieber, S., Rahimi, F., Shahbazi, M.A., Rezayan, A.H., Huwyler, J. and Witzigmann, D.,** 2019, Rapid optimization of liposome characteristics using a combined microfluidics and design-of-experiment approach, *Drug Delivery and Translational Research*, 9(1):404–413pp.
- Sharifi, F., Htwe, S., Righi, M., Liu, H., Pietralunga, A., Yesil-Celiktas, O., Maharjan, S., Cha, B., Shin, S., Dokmeci, M., Vrana, N., Ghaemmaghami, A., Khademhosseini, A. and Zhang, Y.,** 2019, A Foreign Body Response-on-a-Chip Platform, *Advanced Healthcare Materials*, 8(4):e1801425pp.
- Sharifi, F., Yesil-Celiktas, O., Kazan, A., Maharjan, S., Saghazadeh, S., Firoozbakhsh, K., Firoozabadi, B. and Zhang, Y.S.,** 2020, A hepatocellular carcinoma–bone metastasis-on-a-chip model for studying thymoquinone-loaded anticancer nanoparticles, *Bio-Design and Manufacturing*, 3:189–202pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sharma, R., Mody, N., Agrawal, U. and Vyas, S.P.**, 2017, Theranostic Nanomedicine; A Next Generation Platform for Cancer Diagnosis and Therapy, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(18):1746–1757pp.
- Shaterzadeh-Yazdi, H., Noorbakhsh, M.F., Hayati, F., Samarghandian, S. and Farkhondeh, T.**, 2018, Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone., *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 18(1):52–60pp.
- Silva, C.O., Petersen, S.B., Reis, C.P., Rijo, P., Molpeceres, J., Fernandes, A.S., Gonçalves, O., Gomes, A.C., Correia, I., Vorum, H. and Neves-Petersen, M.T.**, 2016, EGF functionalized polymer-coated gold nanoparticles promote EGF photostability and EGFR internalization for photothermal therapy, *PLoS ONE*, 11(10):1–29pp.
- Sirsi, S. and Borden, M.**, 2009, Microbubble compositions, properties and biomedical applications, *Bubble Science Engineering Technology*, 1:3–17pp.
- Steichen, S.D., Caldorera-Moore, M. and Peppas, N.A.**, 2013, A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48:416–427pp.
- Taylor, S.L., Rahim, A.A., Bush, N.I., Bamber, J.C. and Porter, C.D.**, 2007, Targeted retroviral gene delivery using ultrasound, *The Journal of Gene Medicine*, 9(February):77–87pp.
- Trantidou, T., Friddin, M.S., Gan, K.B., Han, L., Bolognesi, G., Brooks, N.J. and Ces, O.**, 2018, Mask-free laser lithography for rapid and low-cost microfluidic device fabrication, *Analytical Chemistry*, 90(23):13915–13921pp.
- Upadhyay, A. and Dalvi, S. V**, 2019, Microbubble Formulations: Synthesis, Stability, Modeling and Biomedical Applications, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 45(2):301–343pp.
- Valencia, P.M., Farokhzad, O.C., Karnik, R. and Langer, R.**, 2012, Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

nanoparticles, *Nature Publishing Group*, 7(10):623–629pp.

- Wang, J., Li, P., Tian, R., Hu, W., Zhang, Y., Yuan, P., Tang, Y., Jia, Y. and Zhang, L.**, 2016, A novel microbubble capable of ultrasound-triggered release of drug-loaded nanoparticles, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 12(3):516–524pp.
- Wang, Y., L, W., Chen, G. and Gong, S.**, 2017, Carboplatin-Complexed and cRGD-Conjugated Unimolecular Nanoparticles for Targeted Ovarian Cancer Therapy, *Macromolecular Bioscience*, 17(5):1600292pp.
- Wibroe, P.P., Mat Azmi, I.D., Nilsson, C., Yaghmur, A. and Moghimi, S.M.**, 2015, Citrem modulates internal nanostructure of glyceryl monooleate dispersions and bypasses complement activation: Towards development of safe tunable intravenous lipid nanocarriers, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(8):1909–1914pp.
- Wibroe, P.P., Ahmadvand, D., Oghabian, M.A., Yaghmur, A. and Moghimi, S.M.**, 2016, An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome, *Journal of Controlled Release*, 221:1–8pp.
- Xu, H., Yu, Y., Marciniak, D., Rishi, A.K., Sarkar, F.H., Kucuk, O. and Majumdar, A.P.N.**, 2005, Epidermal growth factor receptor (EGFR)–related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(3):435–442pp.
- Yaghmur, A. and Glatter, O.**, 2009, Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 147–148:333–342pp.
- Yaghmur, A., Rappolt, M., Oøstergaard, J., Larsen, C. and Larsen, S.W.**, 2012, Characterization of bupivacaine-loaded formulations based on liquid crystalline phases and microemulsions: The effect of lipid composition, *Langmuir*, 28:2881–2889pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yaghmur, A.**, 2019, Nanoencapsulation of food ingredients by cubosomes and hexosomes, In: Jafari, S. (ed.), *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes* 1st edn. Academic Press Inc. (London) Ltd., pp. 483–522.
- Yaghmur, A., Ghazal, A., Ghazal, R., Dimaki, M. and Svendsen, W.E.**, 2019, A hydrodynamic flow focusing microfluidic device for the continuous production of hexosomes based on docosahexaenoic acid monoglyceride, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21:13005–13013pp.
- Yaghmur, A., Tran, B.V. and Moghimi, S.M.**, 2020, Non-lamellar liquid crystalline nanocarriers for thymoquinone encapsulation, *Molecules*, 25(1):16pp.
- Yaghmur, A., Rappolt, M., Jonassen, A.L.U., Schmitt, M. and Larsen, S.W.**, 2021, In situ monitoring of the formation of lipidic non-lamellar liquid crystalline depot formulations in synovial fluid, *Journal of Colloid and Interface Science*, 582:773–781pp.
- Yesil-Celiktas, O. and Cetin-Uyanikgil, E.O.**, 2012, In vitro release kinetics of polycaprolactone encapsulated plant extract fabricated by supercritical antisolvent process and solvent evaporation method., *Journal of Supercritical Fluids*, 62:219–225pp.
- Yesil-Celiktas, O., Pala, C., Cetin-Uyanikgil, E.O. and Sevimli-Gur, C.**, 2017, Synthesis of silica-PAMAM dendrimer nanoparticles as promising carriers in Neuro blastoma cells, *Analytical Biochemistry*, 519:1–7pp.
- Yildiz-Ozer, M., Oztopcu-Vatan, P. and Kus, G.**, 2018, The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro., *Cytotechnology*, 70(1):387–396pp.
- Yildiz-Ozturk, E., Gulce-Iz, S., Anil, M. and Yesil-Celiktas, O.**, 2017, Cytotoxic responses of carnosic acid and doxorubicin on breast cancer cells doped in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture systems., *Cytotechnology*, 69(2):337–347pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yu, B., Zhu, J., Xue, W., Wu, Y., Huang, X., Lee, L.J. and Lee, R.J.**, 2011, Microfluidic assembly of lipid-based oligonucleotide nanoparticles, *Anticancer Research*, 31(3):771–776pp.
- Yun, Y.H., Lee, B.K. and Park, K.**, 2015, Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation, *Journal of Controlled Release*, 219:2–7pp.
- Zhai, J., Fong, C., Tran, N. and Drummond, C.J.**, 2019, Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles for the Next Generation of Nanomedicine, *ACS Nano*, 13(6):6178–6206pp.
- Zhang, L., Chen, Q., Ma, Y. and Sun, J.**, 2020, Microfluidic Methods for Fabrication and Engineering of Nanoparticle Drug Delivery Systems, *ACS Applied Bio Materials*, 3(1):107–120pp.
- Zhang, Y., Liu, X., Li, L., Guo, Z., Xue, Z. and Lu, X.**, 2016, An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G4.0 PAMAM modified GCE, *Analytical Methods*, 8(10):2218–2225pp.
- Zhao, Y.Z., Du, L.N., Lu, C.T., Jin, Y.G. and Ge, S.P.**, 2013, Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems, *International Journal of Nanomedicine*, 8:1621–1633pp.
- Zullino, S., Argenziano, M., Stura, I., Guiot, C. and Cavalli, R.**, 2018, From Micro- to Nano-Multifunctional Theranostic Platform: Effective Ultrasound Imaging Is Not Just a Matter of Scale, *Molecular Imaging*, 17:1–18pp.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana rehberlik eden, değerli görüş ve önerilerini benden esirgemeyen, gerek yurtdışı gerek yurtiçi bilimsel işbirliklerine dâhil olmam ve tezim dışında da birçok bilimsel çalışmayı yürütebilmem konusunda her zaman desteğini arkamda hissettiğim, akademik serüvenime eşsiz bir dokunuş yapan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a,

Ultrason duyarlı formülasyon çalışmaları sırasında birlikte çalışma fırsatını bulduğum Tide Microfluidics B.V. şirketinin değerli kurucusu Dr. Wim van HOEVE ve sevgili proje müdürüm Dr. Katharine GIANNASI'ye,

Lyotropik sıvı kristalin nanopartikül formülasyonları için Uluslararası Network Programı kapsamında bana laboratuvarını açan ve Elettra Sincrotrone Trieste uluslararası araştırma merkezinde gerçekleştirilen SAXS analizlerine katılma fırsatı sunarak üzerimde çok büyük emeği olan Prof. Dr. Anan YAGHMUR'a, ayrıca finansal destekleri için Danimarka Bilim ve Yüksek Öğrenim Kurumu'na,

Lisans mezuniyetimden itibaren gerek akademik gerek özel hayatımda her ihtiyacım olduğunda yanımda olan Dr. Meltem BAYRAKTAR ve Dr. Arzu YILDIRIM'a, hücre kültürü çalışmalarında desteğini benden esirgemeyen Pelin SAĞLAM METİNER'e, tüm dostluk ve destekleri için Biyomimetik Mikrosistemler Araştırma Grubu üye ve mezunlarına,

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her ihtiyacım olduğunda yanımda olan canım aileme, karşılaştığım her zorluğun üstesinden gelmem için bana güç veren, yükseköğrenimim boyunca gösterdiği sonsuz tolerans ve destek için minnettar olduğum sevgili eşim Oktay AYIŞIĞI'na teşekkürü bir borç bilirim.

03/08/2021

Esra İLHAN AYIŞIĞI

ÖZGEÇMİŞ

Esra İLHAN AYIŞIĞI 2007 yılında girdiği Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden 2012 yılında mezun olmuştur. 2012-2015 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ABD'nda yüksek lisans öğrenimini tamamlamış ve ardından aynı ana bilim dalında doktora öğrenimine başlamıştır. Temmuz 2018-Kasım 2018 tarihleri arasında mikroakışkan sistemler ile ultrason kontrast ajanların üretimini yapan Tide Microfluidics B.V. şirketinde (Hollanda) ve Kasım 2019- Aralık 2019 tarihleri arasında Danimarka Bilim ve Yüksek Öğrenim Kurumu tarafından desteklenen Danimarka-Türkiye ikili işbirliği projesi kapsamında Kopenhag Üniversitesi Eczacılık Bölümü'nde araştırmacı olarak bulunmuştur.

Araştırma projeleri

2020-2022, Aljinat-PAMAM dendrimer hibrit nanopartiküllere enkapsüle edilen karboplatinin 3B in vitro hücre kültürü ve in vivo deneysel hayvan modelindeki etkinlik potansiyeli, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (FGA-2020-21665), Karabay Yavaşoğlu, N. Ü. (Yürütücü), İlhan Ayışığı E. (Araştırmacı)

2018-2020, Kıkırdak Doku Mühendisliği İçin Sentezlenen Yenilikçi Sert Bir Hidrojelin Mikrokakışkan Platformda Üretilen Nanopartikül İle Fonksiyonelleştirilmesi Ve In Vivo Denemeleri, TÜBİTAK Uluslararası İkili İşbirliği Projesi, Yeşil Çelikaş Ö. (Yürütücü), İlhan Ayışığı E. (bursiyer)

2016–2018, Naftokinon Türevi Bileşiklerin Sol-Jel Metodu İle Enkapsülasyonu Ve Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (16-MUH-052), YEŞİL ÇELİKTAŞ Ö. (Yürütücü) , İlhan Ayışığı E. (Araştırmacı)

2014–2016, Stevia rebaudiana Bertoni de in vitro koşullarda farklı elisitör uygulamalarının stevioside ve rebaudioside A üretimi üzerine etkilerinin araştırılması, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (PYO-MÜH.4001.14.006), Bayraktar M.(Yürütücü), İlhan E. (Araştırmacı)

2013–2014, Ters Lale *Fritillaria imperialis* L Bitkisinde In Vitro Koşullarda Organ Rejenerasyonlarının Sağlanması, Diğer Resmi Kurumlarca Desteklenen Proje (Aliye Üstel Vakfı) Gürel A. (Yürütücü) , İlhan E. (Proje personeli)

Yayınlar

İlhan-Ayisigi, E., Budak, G., Celiktaş, M.S., Sevimli-Gur, C., Yesil-Celiktaş, O., Anticancer activities of bioactive peptides derived from rice husk both in free and encapsulated form in chitosan. JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY, 2021, (Basımda) (SCI İndekslerine Giren Dergi) doi.org/10.1016/j.jiec.2021

İlhan-Ayisigi, E., Ghazal, A., Sartori, B., Dimaki, M., Svendsen, W.E., Yesil-Celiktaş, O., Yagmur, A. Continuous Microfluidic Production of Citrem-Phosphatidylcholine Nano-Self-Assemblies for Thymoquinone Delivery. NANOMATERIALS, 2021, 11, 1510, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Kececiler-Emir C., **İlhan-Ayisigi E.**, Celen-Erden C., Nalbantsoy A. , Yesil-Celiktaş, O., Synthesis of Resveratrol Loaded Hybrid Silica-PAMAM Dendrimer Nanoparticles With Emphases on Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytotoxicity, PLANT FOODS FOR HUMAN NUTRITION, 10.1007/s11130-021-00897-5, 2021, 76(2), 219-225, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

İlhan-Ayisigi, E.; Yaldiz, B.; Bor, G.; Yagmur, A.; Yesil-Celiktaş, O. Advances in microfluidic synthesis and coupling with synchrotron SAXS for continuous production and real-time structural characterization of nano-self-assemblies. COLLOIDS SURFACES B, 2021, 201, 111633. (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Saygılı E., Kaya E., **İlhan-Ayisigi E.** , Sağlam-Metiner P., Alarcin E., Kazan A., et al. An alginate-poly(acrylamide) hydrogel with TGF-beta 3 loaded nanoparticles for cartilage repair: Biodegradability, biocompatibility and protein adsorption, INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 2021, 172, 381-393, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Ilhan-Ayisigi E. , Ulucan F., Saygili E., Saglam-Metiner P., Gulce-Iz S. , Yesil-Celiktas O., Nano-vesicular formulation of propolis and cytotoxic effects in a 3D spheroid model of lung cancer, JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, 100(8), 3525-3535, 2020 (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Ilhan-Ayisigi E. , Saglam-Metiner P., Manzi G., Giannasi K., Van Hove W., Yesil-Celiktas O, One-Step Microfluidic Coating of Phospholipid Microbubbles with Natural Alginate Polymer as a Delivery System for Human Epithelial Lung Adenocarcinoma, MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, 2020, 20(6), 2000084, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Saygili E., Orakci B., Koprulu M., Demirhan A., **Ilhan-Ayisigi E.** , Kilic Y., et al., Quantitative determination of H₂O₂ for detection of alanine aminotransferase using thin film electrodes, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2020, 591, 113538, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Ilhan- Ayisigi E. , Yesil-Celiktas O., Silica-based organic-inorganic hybrid nanoparticles and nanoconjugates for improved anticancer drug delivery, ENGINEERING IN LIFE SCIENCES, 2018, 18, 882-892, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Yıldız-Ozturk E., **Ilhan-Ayisigi E.** , Togtema A., Gouveia J., Yesil-Celiktas O., Effects of hydrostatic pressure and supercritical carbon dioxide on the viability of Botryococcus braunii algae cells, BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2018, 256, 328-332, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Bayraktar M., NAZIRI E., AKGÜN İ. H. , KARABEY F., **Ilhan E.** , Akyol B. et al, Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated Stevia rebaudiana, PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE, 2016, 127, 2, 289-300, (SCI İndekslerine Giren Dergi)

Gürel A. , Bayraktar M., Ansız A., Akyol B., **İlhan E.** , Ekmekçigil M., et al. Plant in vitro art, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 2016, 18, 56-62, (Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

Gürel A. , Bayraktar M., Akyol B. , **İlhan E.** , Tanyolaç M. B. , Akdemir H., et al. Journey of naturally colored cottons from field to final products and their product ranges, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 2016, 18, 108-115, (Diğer Kurumların Hakemli Dergileri)

Kitap ve kitap bölümleri

Müdürrisoğlu C. ve **İlhan E.** “Tanı Amaçlı Mikrosistemler” (Mikroakışkan Teknolojilerin Temelleri ve Uygulamaları içerisinde), Yeşil-Çeliktas, O. (ed.), Ege Üniversitesi, 2016, Bölüm 8, 159-202s.

Uluslararası etkinliklerde sunulan sözlü ve poster bildirileri

İlhan-Ayışığı, E., Gürel, A. Providing of the *in vitro* Organogenesis from Different Leaf Explants of Crown Imperial (*Fritillaria imperialis* L.), IV.International ICONTECH Symposium On Innovative Surveys In Positive Sciences, Adana, Türkiye, 19-20 Temmuz 2021, ss.62-70.

İlhan Ayışığı E., Yeşil Çeliktas Ö. Preparation of Chitosan Nanoparticles Based on Varying Polymer:Crosslinker Ratios, European Conference on Science, Art Culture (ECSAC-19), Antalya, Türkiye, 18 - 21 Nisan 2019, ss.511-516

İlhan Ayışığı E., Yeşil Çeliktas Ö. Ultrasound-Responsive Particles for Anticancer Drug Delivery, European Conference on Science, Art Culture (ECSAC-19), Antalya, Türkiye, 18 - 21 Nisan 2019, ss.517-520

İlhan Ayışığı E., Yeşil Çeliktas Ö. Cytotoxicity of β,β -dimethylacryl alkannin against hepatocellularcarcinoma cells in a 3D hydrogel, International Congress on Engineering and Architecture (ENAR-2018), Alanya, Türkiye, 14 - 16 Kasım 2018, ss.1413-1417

İlhan Ayışığı E., Yeşil Çeliktas Ö. Surface functionalization of nanoparticles for targeted drug delivery, International Congress on Engineering and Architecture (ENAR-2018), Alanya, Türkiye, 14 - 16 Kasım 2018, ss.1418-1423

İlhan Ayışığı E., Saygılı E., Yeşil Çelikleş Ö. Silica-PAMAM dendrimer hybrid nanoparticles synthesized by traditional batch production and microfluidic platform, International Congress on Engineering and Architecture (ENAR-2018), Alanya, Türkiye, 14 - 16 Kasım 2018, ss.1408-1412

İlhan Ayışığı E. , Yeşil Çelikleş Ö., Silica-PAMAM dendrimer nanoparticles doped with β,β -dimethylacrylalkannin along with cytotoxic 151 activity on hepatocellular carcinoma, 4th International Seminar on Aerogels, Hamburg, Almanya, 24 Eylül 2018, ss.151

Budak G., **İlhan Ayışığı E.**, Betts Z., Gülçe İz S. , Yeşil-Çelikleş Ö., Sevimli-Gür C., Anticancer efficiency of rice husk protein extracts loaded chitosan nanoparticles: Promising for lung carcinoma, IV. International Congress of Applied Biological Sciences (ICABS 2018), Eskişehir, Türkiye, 03 Mayıs 2018, ss.32

İlhan E. , Gürel A., In Vitro Germination Responses of Seeds in *Cercis siliquastrum*, 2nd International Congress on Applied Biological Sciences, Saraybosna, Bosna-Hersek, 27 - 31 Mayıs 2016

Gürel A. , Bayraktar M., Ansız A., Akyol B., **İlhan E.** , Ekmekçigil M., Et Al. Plant *In Vitro* Art, VII. Bioengineering Congress, İzmir, Türkiye, 19 - 21 Kasım 2015, ss.71

Gürel A. , Bayraktar M., Akyol B., **İlhan E.** , Tanyolaç M. B. , Akdemir H., et al., Journey Of Naturally Colored Cottons From Field To Final Products And Their Product Ranges, VII. Bioengineering Congress, İzmir, Türkiye, 19 - 21 Kasım 2015, ss.72

Ferik F., **İlhan E.** , Gürel A. Development Of In Vitro Clonal Propagation Protocol in *Callistemon Citrinus*, VII. Bioengineering Congress, İzmir, Türkiye, 19 - 21 Kasım 2015, ss.130