



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



MİKROAKIŞKAN SİSTEM İLE PROTEİN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Ayşenur BEZELYA

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN**

**ANKARA
2024**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROAKIŞKAN SİSTEM İLE PROTEİN YÜKLÜ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Ayşenur BEZELYA

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN

**Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2023-2894 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Mikroakışkan Sistem ile Protein Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar kendime aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşenur BEZELYA

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında

Ayşenur BEZELYA tarafından hazırlanan

“Mikroakışkan Sistem ile Protein Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

23/07/2024

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Ankara Üniversitesi

(Jüri Başkanı)

Doç. Dr. Özgür EŞİM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN

Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Mikroakışkan Sistem ile Protein Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında mikroakışkan çip kullanılarak polimerik nanopartikül sistemlerinin üretimi, peptit/protein terapötik maddelerinin optimize edilen nanopartiküllere enkapsülasyonu ve *in vitro* değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. Nanopartiküllere yüklenmesi için örnek protein olarak BSA, lizozim ve aprotinin seçilmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve insanda kullanımı için FDA tarafından onay almış polimerlerden poli(laktik asit-ko-glirikolik asit) (PLGA) kullanılmıştır. Formülasyon bileşenleri ve yönteme ait parametreler geliştirilerek üretilen nanopartiküler sistem optimize edilmiştir.

Günümüzde, peptit/protein yapılar içeren biyofarmasötik ürünler, klinik tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, protein yapısı hassastır ve işlevleri dış koşullardan etkilenebilir. Peptit/protein yapıları moleküllerin verilmesi için birçok strateji üzerinde çalışılmıştır ve en umut verici stratejilerden biri nanopartiküler sistemlerin kullanımıdır.

Nanopartiküller (NP'ler), peptit protein maddeleri dış ortamlardan korumanın yanı sıra kapsamlı ilaç modifikasyonuna da izin verir. Geleneksel NP sentez yöntemlerinde partikül boyutunun optimizasyonu, polidispersite indeksi (PDI) değerleri, partikül morfolojisi ve enkapsülasyon etkinliği ile ilgili bazı sınırlamalar olduğu görülmektedir. Mikroakışkan sistemler, NP özelliklerini geliştirirken aynı zamanda sentez için tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem sağlayarak bu sorunların üstesinden gelmeye yardımcı olabilir. Mikroakışkan sistemlerde akış hızı, sıcaklık ve çip tasarımı dahil olmak üzere çeşitli özellikler, her işlem için optimize edilebilir. Böylelikle kontrol edilebilir özelliklerde ve tekdüze NP hazırlanması için kullanılabilirler.

Bu tez çalışması kapsamında polimerik nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesinde mikroakışkan çip kullanılmış ve akış hızı oranları (FRR), polimer, protein ve yüzey aktif madde konsantrasyonları düzenlenerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartikül formülasyonları partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği analizleri ile karakterize edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda seçilen formülasyonlar üzerinde *in vitro* salım deneyi, DSC ve TEM analizleri yapılmıştır. Formülasyon ve protein stabilitelerinin değerlendirilmesi için seçilen formülasyonlarda SDS-PAGE analizi ve farklı saklama koşulları altında stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Protein yüklü nanopartiküllerin mikroakışkan sistem kullanılarak hazırlanması, formülasyon bileşimi ve mikroakışkan sisteme bağlı değişkenler analiz edilerek yüksek protein enkapsülasyonuna ve küçük partikül boyutuna sahip formülasyona ulaşılması tez çalışmasının temel hedefini oluşturmuştur.

Anahtar Sözcükler: Mikroakışkan, Nanopartikül, Protein, PLGA, Lizozim

SUMMARY

Production and Characterization of Protein Loaded Polymeric Nanoparticles by Microfluidic System

The thesis study aimed to produce polymeric nanoparticle systems using a microfluidic chip, encapsulation of peptide/protein therapeutic substances into optimized nanoparticles, and evaluation of *in vitro* studies. BSA, lysozyme, and aprotinin were selected as model proteins for nanoparticle loading. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), a biocompatible, biodegradable, and FDA-approved polymer for human use, was used to prepare nanoparticles. The nanoparticulate system was optimized by changing the formulation components and method parameters.

Nowadays, biopharmaceutical products containing peptide/protein structures are widely used in clinical therapy. However, protein structures are delicate and their functions can be affected by external conditions. Many strategies for the delivery of peptide/protein structured molecules have been studied and one of the most promising strategies is the use of nanoparticulate systems.

Nanoparticles (NPs) allow extensive drug modification as well as protecting peptide protein substances from external environments. Conventional NP synthesis methods have some limitations regarding the optimization of particle size, polydispersity index (PDI) values, particle morphology, and encapsulation efficiency. Microfluidic systems can help overcome these problems by providing a reproducible and reliable method for synthesis while improving NP properties. Microfluidic systems can optimize various properties such as flow rate, temperature, and chip design for each process. Thus, they can be used for uniform NP preparation with controllable properties.

Within the scope of this thesis, a microfluidic chip was used in the development of polymeric nanoparticle formulations and optimization studies were carried out by adjusting the flow rate ratios (FRR), polymer, protein, and surfactant concentrations. The synthesized nanoparticle formulations were characterized by particle size and distribution, polydispersity index, zeta potential, and encapsulation efficiency analyses. As a result of the evaluations, *in vitro* release experiments, DSC and TEM analyses were performed on the selected formulations. For the evaluation of formulation and protein stabilities, SDS-PAGE analysis and stability studies under different storage conditions were performed on the selected formulations.

The main objective of this thesis was to prepare protein-loaded nanoparticles using a microfluidic system and to reach a formulation with high protein encapsulation and small particle size by analyzing the variables related to formulation composition and microfluidic system.

Keywords: Microfluidics, Nanoparticles, Protein, PLGA, Lysozyme

İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
Kabul ve onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikroakışkan Teknolojisinin Tarihi ve Gelişimi	4
1.2. Mikroakışkan Çipler	7
1.2.1. Materyaller	8
1.2.1.1. Polimerler ve PDMS	10
1.2.2. Mikrofabrikasyon Yöntemleri	12
1.2.2.1. Yumuşak Litografi	14
1.2.3. Sistem Bileşenleri	17
1.2.4. Mikroakışkanların Avantajları ve Dezavantajları	20
1.3. Polimerik Nanopartiküler Sistemler	23
1.3.1. PLGA	25
1.3.2. Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	26
1.4. Model Proteinler	27
1.4.1. BSA	28
1.4.2. Lizozim	29
1.4.3. Aprotinin	30
1.5. Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127	31
2. GEREÇ ve YÖNTEM	33
2.1. Gereçler	33
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	34
2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar	35
2.2. Yöntemler	36
2.2.1 BSA, Lizozimin ve Aprotinin Bikinkoninik Asit Yöntemi (BCA) ile Kalibrasyonu	36
2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmaları	37
2.2.2.1. Protein İçermeyen Nanopartiküllerin Hazırlanması	38
2.2.2.2. BSA Yüklü Nanopartikül Hazırlanması	38
2.2.2.3. Lizozim Yüklü Nanopartikül Hazırlanması	38
2.2.2.4. Aprotinin Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması	39
2.3. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller	39
2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması	39
2.3.2. Zeta Potansiyeli Analizi	39
2.3.3. Hazırlanan Formülasyonlarda Madde Miktar Tayini	39

2.3.4. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması	40
2.3.5. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	40
2.3.6. SDS-PAGE Analizi	41
2.3.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	44
2.3.8. Nanopartikül Formülasyonunun Görüntülenmesi	44
2.3.9. Stabilite Çalışmaları	44
2.3.10. Hücre Canlılığı Testi	44
3. BULGULAR	46
3.1. Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular	46
3.1.1. BSA Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular	46
3.1.2. Lizozim Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular	48
3.1.3. Aprotinin Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular	50
3.2 Protein İçermeyen Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	51
3.3 BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	54
3.3.1. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	58
3.3.2. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının SDS-PAGE Analizi Sonuçları	59
3.4. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	60
3.4.1. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	65
3.4.2. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının SDS-PAGE Analizi Sonuçları	67
3.4.3. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları	68
3.4.4. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Stabilite Çalışmaları	69
3.4.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi Sonuçları	70
3.5. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	70
3.5.1. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	73
3.5.2. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının SDS-PAGE Analizi Sonuçları	74
3.5.3. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları	75
3.6. Hücre Canlılığı Çalışmaları Sonuçları	77
4. TARTIŞMA	78
4.1. Çalışmalarda Kullanılan Peptit ve Proteinlerin Seçimi	78
4.2. Seçilen Peptit ve Proteinlerin Kalibrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	79
4.3. Mikroakışkan Çip Kanallarında Mikropartiküllerin Oluşumu	79
4.4. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarında Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının, Polidispersite İndeksinin ve Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi	82
4.4.1. Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	82
4.4.2. Polidispersite İndeksi	84
4.4.3. Zeta Potansiyeli	85
4.5. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarında Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	85
4.6. <i>İn vitro</i> Salım Profillerinin ve Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi	86
4.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizlerinin Değerlendirilmesi	88
4.8. SDS-PAGE Analizlerinin Değerlendirilmesi	88
4.9. Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	88
4.10. TEM Görüntülerinin Değerlendirilmesi	89
4.11. Hücre Canlılığı Çalışmalarının Değerlendirilmesi	89

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	104



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması kapsamında protein yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının yenilikçi bir sistem olan mikroakışkan çipler kullanılarak üretilmesi ve in vitro karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tezimin her aşamasında emeği ve desteği olan, bana her zaman büyük bir sabır ve anlayışla rehberlik eden, karakterine ve çalışma ahlakına hayranlık duyduğum danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Berrin Küçüktürkmen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin ilgi ve desteği sayesinde birçok zorluğun üstesinden gelerek bu çalışmayı tamamlayabildim. Değerli zamanını benden hiçbir zaman esirgemediği ve her daim yol gösterici olduğu için minnettarım.

Tez çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimimde ziyadesiyle ilgi ve emeği bulunan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü'nün saygıdeğer öğretim üyelerine teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Eğitimim süresince bana verdikleri destek ve anlayış için İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU'na, İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Emine ŞALVA'ya ve iş hayatındaki tutumunu kendime örnek aldığım, bir araştırma görevlisinin karşılaşabileceği en mükemmel kıdemlisi olan İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Naile ÖZTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimime 'BİDEB 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı' ile katkıda bulunan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (AÜ, BAP, Proje Kodu: TYL-2023-2894) teşekkürlerimi sunarım.

Bana benden çok inanan ve beni her zaman destekleyen canım aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi iletiyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ζ	Zeta Potansiyeli
%EE	% Enkapsülasyon Etkinliği
°C	Santigrat Derece
μTASs	Mikro Toplam Analiz Sistemleri
2D	2 Boyutlu
3D	3 Boyutlu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
BCA	Bikinkoninik Asit
BPTI	Sığır Pankreatik Trypsin İnhibitörü
BSA	Sığır Serum Albümini
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
CE	Kapiller Elektrophorez
COCs	Siklo-olefin Kopolimer
COPs	Siklo-Olefin Polimerler
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
Da	Dalton
dk	Dakika
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FRR	Akış Hızı Oranı
GA	Glikolik Asit
GI	Gastrointestinal
GC	Gaz Kromatografisi
HCl	Hidroklorik Asit
HFF	Hidrodinamik Akış Odaklama
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HLB	Hidrofilik-Lipofilik Denge
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
İ.m.	İntramüsküler
İ.v.	İntravenöz
kDA	Kilodalton

LA	Laktik Asit
LoC	Çip Üzerinde Laboratuvar
MEMS	Mikro Elektromekanik Sistemler
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MWCO	Moleküler Ağırlık Sınırı
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
NEMS	Nano Elektromekanik Sistemler
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PACA	Poli(alkil siyanoakrilat)
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCL	Poli-Kaprolakton
PDI	Polidispersite İndeksi
PDMS	Polidimetilsiloksan
PEG	Polietilen Glikol
PEO	Poli(etilen oksit)
PGA	Poli(glikolik asit)
pH	Hidrojen Gücü
pI	İzoelektrik Nokta
PLA	poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PLL	poli(L-lizin)
PMMA	Polimetilmetakrilat
PPO	Polipropilen Oksit
PTFE	Politetrafloroetilen
R ²	Determinasyon Katsayısı
RES	Retiküloendotelyal Sistem
rpm	Dakika Başına Rotasyon
S.c.	Sübkütan
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Si	Silisyum

TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TEMED	N, N, N, N'- Tetrametiletilediamin
TES	Tiyol-ene polimerler
TFR	Toplam Akış Miktarı
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Mikroakışkan cihaz üretimi için malzemelere genel bakış	8
Şekil 1.2. Yumuşak litografi ile PDMS tabanlı mikroakışkan kanal yapılarının oluşturulması	15
Şekil 1.3. PDMS yapıştırma teknikleri	16
Şekil 1.4. Mikroakışkanlarda sıklıkla kullanılan kanal geometrileri	17
Şekil 1.5. Harici pompa türleri	18
Şekil 1.6. Farklı tasarımlara sahip mikro mikser türleri	19
Şekil 1.7. Mikroakışkan sistemlerin avantajları	21
Şekil 1.8. Nano kapsül ve nano küre yapısının şematik gösterimi	24
Şekil 1.9. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı	26
Şekil 1.10. BSA yapısının gösterimi	28
Şekil 1.11. Lizoziminin yapısı	30
Şekil 1.12. Aprotinin yapısı	30
Şekil 1.13. Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127 Kimyasal Yapısı	32
Şekil 2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının üretiminde kullanılan PDMS mikroakışkan çipin görseli.	37
Şekil 3.1. BSA'nın PBS pH 7,4 ile kalibrasyon grafiği	46
Şekil 3.2. BSA'nın %1 Pluronic® F68 ile kalibrasyon grafiği	46
Şekil 3.3. BSA'nın %2 Pluronic® F68 ile kalibrasyon grafiği	47
Şekil 3.4. BSA'nın %1 Pluronic® F127 ile kalibrasyon grafiği	47
Şekil 3.5. BSA'nın %2 Pluronic® F127 ile kalibrasyon grafiği	47
Şekil 3.6. Lizozim pH 7,4 PBS tamponu ile kalibrasyon grafiği	48
Şekil 3.7. Lizozim pH 5,5 Asetat tamponu ile kalibrasyon grafiği	48
Şekil 3.8. Lizozim %0,1 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği	49
Şekil 3.9. Lizozim %0,5 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği	49
Şekil 3.10. Lizozim %1 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği	49
Şekil 3.11. Lizozim %2 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği	50
Şekil 3.12. Aprotinin pH 7,4 PBS tamponu ile kalibrasyon grafiği	50
Şekil 3.13. Aprotinin pH 5,5 Asetat tamponu ile kalibrasyon grafiği	51
Şekil 3.14. Aprotinin %2 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği	51
Şekil 3.15. BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülasyonlarının <i>in vitro</i> salın profili	58

Şekil 3.16. BSA ile üretilen nanopartikül ve saf BSA'ya ait SDS-PAGE jeli	60
Şekil 3.17. LZNP-13 kodlu formüle ait partikül boyutu ve dağılımı grafiği	65
Şekil 3.18. LZNP-13 kodlu formülasyonun pH 7,4 PBS tamponunda ve pH 4,5 asetat tamponunda gerçekleştirilen <i>in vitro</i> salım profilleri	65
Şekil 3.19. Lizozim ile üretilen nanopartikül ve saf lizozime ait SDS-PAGE jeli	67
Şekil 3.20. LZNP-13 nanopartikül formülasyonu ve formülasyonda bulunan maddelere ait DSC termogramları	68
Şekil 3.21. LZNP-13 kodlu formülastona ait TEM görüntüsü	70
Şekil 3.22. APRONP-4 kodlu formüle ait partikül boyutu ve dağılımı grafiği	73
Şekil 3.23. APRONP-4 kodlu formülasyonun pH 7,4 PBS tamponunda ve pH 4,5 asetat tamponunda gerçekleştirilen <i>in vitro</i> salım profilleri	73
Şekil 3.24. Aprotinin ile üretilen nanopartiküle ait SDS-PAGE jeli	75
Şekil 3.25. APRONP-4 kodlu nanopartikül formülasyonunun DSC termogramı.	76
Şekil 3.26. Nanopartikül hücre canlılığı sonuçları	77

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Mikroakışkan üretim tekniklerinin sınıflandırılması	13
Çizelge 1.2. Polimerik nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesine yönelik temel teknikler	27
Çizelge 1.3. Aprotinin, lizozim ve BSA'nın molekül ağırlığı, pI değerleri ve yükleri	31
Çizelge 2.1. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler	42
Çizelge 3.1. Protein İçermeyen Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları	52
Çizelge 3.2. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları	56
Çizelge 3.3. BSA yüklü nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım kinetikleri	59
Çizelge 3.4. Lizozim Yüklü Nanopartiküllerin Formülasyon Değerleri ve Bulguları	63
Çizelge 3.5. Lizozim yüklü nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım kinetikleri	66
Çizelge 3.6. LZNP-13 Kodlu Formülasyonun Oda Koşulları ve Buzdolabı Stabilitate Bulgularının Sonuçları	69
Çizelge 3.7. Aprotinin Nanopartikül Deneme Formülasyonları	71
Çizelge 3.8. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları	72
Çizelge 3.9. Aprotinin yüklü nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım kinetikleri	74

1. GİRİŞ

Peptit/protein yapılı farmasötikler, tıp alanında uygulanma potansiyelleri nedeniyle araştırmacıların ilgisini çeken bir alandır. Biyoteknolojinin hızlı gelişimi çok sayıda biyoaktif protein ve peptitin keşfedilmesine yol açmış ve birçok bileşiğin seri üretimine olanak tanıyarak bunların tıbbi tedavilere yaygın şekilde entegrasyonunu kolaylaştırmıştır (Keservani, Sharma, ve Jarouliya, 2015). Bütün protein yapıları, değiştirilmemiş peptitler, peptit mimetikleri, protein-protein, peptit-peptit ve peptit-protein konjugasyonları, lipopeptitler, kimyasal modifikasyonlu peptitler, polietilen glikol (PEG) gibi çeşitli polimerlerle konjuge edilen peptitler, venom kaynaklı peptitler, doğal kaynaklardan elde edilen peptitler, rekombinant peptitler, peptit yapılı hormon, sitokin ve toksinler gibi protein/peptit yapısındaki birçok bileşik, terapötik amaçlar elde etmek için araştırılmıştır. Geleneksel küçük moleküllu ilaçlarla karşılaştırıldıklarında, protein/peptit yapılı farmasötikler hedeflerine sıkıca bağlanmaları nedeniyle yüksek özgüllüğe ve düşük toksisiteye sahip olmaları; diyabet, kanser, osteoporoz, multipl skleroz, HIV enfeksiyonu ve kronik ağrı gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde görülen yüksek klinik başarı oranları; neredeyse tüm reseptör yanıtlarını düzenlemek için kullanılabilmesi ve doğal amino asitlerin yan zincir varyasyonları nedeniyle modifikasyonlara elverişli geniş bir kimyasal alana sahip olmaları gibi bir çok avantaja sahiptir. Bununla birlikte, protein ve peptit yapılarının ilaç olarak kullanılmasıyla ilgili çeşitli zorluklar da vardır. Enzimatik bozulmaya karşı hassas olmaları ve düşük membran geçirgenliği, proteinlerin ve peptitlerin ilaç olarak etkinliğine yönelik bir zorluk teşkil eder ve bunların hastalık bölgelerine etkili bir şekilde iletilmesini zorlaştırır. Proteinler ve peptitler tipik olarak kısa dolaşım yarı ömürlerine sahiptir, bu da kan dolaşımından hızlı bir şekilde temizlenmelerine yol açar, terapötik etkinliklerini azaltabilir ve sık uygulanmalarını gerektirebilir. Özellikle proteinler, biyoaktivitelerini tehlikeye atabilen ve ilaç olarak kullanımlarını kısıtlayabilen karmaşık yapıları nedeniyle fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararsızlığa karşı hassastır. Sahip oldukları karmaşık yapı, sentezlerini ve saflaştırılmalarını küçük moleküllu ilaçlara kıyasla daha zor ve pahalı hale getirebilir. Birçok protein ve peptit, gastrointestinal sistemde (GI kanal) parçalandığından oral biyoyararlanımları oldukça düşüktür. Proteinlerin ve peptitlerin terapötik ajanlar olarak potansiyelinden tam anlamıyla faydalanmak için bu zorlukların ele alınması gerekmektedir. Sentetik peptit analoglarının geliştirilmesi, rekombinant teknolojinin kullanılması ve yenilikçi ilaç dağıtım sistemlerinin uygulanması gibi yaklaşımlarla bu engellerin aşılması için önemli çabalar sarf edilmiştir (Muttenthaler vd., 2021; Otvos Jr ve Wade, 2014). Nanoteknolojide görülen gelişmeler ve

nano ilaç taşıma teknolojilerinin protein/peptit yapılı ilaçlarda kullanılması protein/peptit yapılarının hedefe taşınmasında önemli gelişmeler sağlamıştır.

Son yıllarda önemli bir gelişme kaydeden nanoteknoloji veya moleküler düzeyde sistem/cihaz üretimi, disiplinler arası bir bilim alanı olarak ortaya çıkmıştır. Yenilikçi tıbbi tedavilerin keşfi, nanoteknolojinin en önemli başarılarından biri olarak öne çıkmaktadır (Emerich ve Thanos, 2003). Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından nano tıp olarak adlandırılan bu çığır açan teknolojik gelişmeler bir dizi alt alanı kapsamaktadır. Bunlar arasında nano ilaç taşıma sistemleri, gen tedavileri, aşı çalışmaları, doku mühendisliği, yapay reseptörlerin oluşturulması ve tıbbi görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesi yer almaktadır (Moghimi, Hunter, ve Murray, 2005). Nano farmasötikler nano boyutlu toz ilaçları, ilaç taşıyıcı sistemleri ve araçları kapsamaktadır. Nano tıp ve nano farmasötikler alanlarında görülen gelişmeler, ilaç etkin maddesi olarak kullanılmaları zor olan aktif maddelerin (tek moleküllü ilaçlar, proteinler, peptitler, nükleik asitler vb. gibi) tedavide kullanımını sağlamıştır. Geçmişte geleneksel ilaç formülasyonlarıyla uyumsuz olan terapötik ajanlar, belirli biyolojik bölgeleri tam olarak hedefleyecek şekilde “nano-formüle edilebilir” hale gelmiştir. Halihazırda, “ilaç hedefleme” ya da “nano ilaç taşıma sistemleri” gibi isimlerle anılan bu yöntemler, etken maddeyi hedef doku ve hücrelere yönlendirerek toksisiteyi azaltma ve ilacın amaçlanan etki alanındaki konsantrasyonunu artırma, böylece etkinliğini ve hasta uyuncunu artırma potansiyellerine sahiptir (Bawa, 2010; Couvreur, 2013).

Peptit ve proteinlerin taşınması için nanopartikül sistemlerinin kullanılması, geleneksel yöntemlerde karşılaşılan birçok zorluğun üstesinden gelmek için umut verici bir çözüm sunmaktadır. Nanopartikül sistemleri, kan dolaşımındaki yarılanma ömürlerini artırmak için PEG gibi biyoyumlu ve hidrofilik polimerlerle kaplanabilir. Bu kaplama, protein/peptit yüklü nanopartiküllerin retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından uzaklaştırılmasını engeller ve kan dolaşımında daha uzun süre dolaşmalarını sağlar. Ayrıca, peptit ve proteinlerin emilimini ve biyoyararlanımını artırarak terapötik etkinliklerini artırabilirler. Nanopartiküller (NP’ler), enkapsüle edilmiş peptit ve proteinlere koruma sağlayarak dokudaki hücreler ve enzimlerle teması önler. Bu koruma, uygulama sırasında proteinlerin biyoaktivitesinin ve stabilitesinin korunmasına yardımcı olur. Nanopartikül sistemleri, biyomoleküllerin salımı üzerinde gelişmiş kontrol sağlayan çift ve çok bileşenli malzemeler olarak tasarlanabilir. Lipozomlar ve hidrojeller gibi çeşitli malzemeleri harmanlayarak veya nanolipojeller gibi hibrit sistemler kullanarak, her bir malzemenin farklı avantajları, sürekli salım elde etmek ve enkapsüle edilmiş proteinlerin stabilitesini artırmak

için bir araya getirilebilir. Nanopartiküller, hedef dışı etkileri en aza indirerek peptit ve proteinleri istenen etki bölgesine spesifik olarak iletmek için işlevselleştirilebilir. Nanopartiküller hidrofobik peptit ve proteinlerin çözünürlüğünü artırarak uygulanmalarını kolaylaştırabilir. Nanopartiküller, peptit ve proteinlerin immünojenisitesini azaltmaya yardımcı olarak bağışıklık hücreleriyle etkileşimlerini en aza indirebilir. Nanopartiküllere birden fazla ilaç veya terapötik ajan yüklenebilir, bu da kombinasyon terapisine ve sinerjik etkilere olanak sağlar (McClements, 2018; Ye ve Venkatraman, 2019).

Nanopartiküllerin kullanımı, geleneksel tedaviler kullanılarak etkili bir şekilde tedavi edilmesi zor olan hastalıklar için dikkate değer bir potansiyel sunmaktadır. Ancak bu önemli potansiyele sahip sistemlerin tam olarak hayata geçirilmesi titiz bir yaklaşım gerektirmektedir: hassas tasarım, üretim ve uygun modellerde detaylı testler şarttır (Gimondi vd., 2023; Oroojalian vd., 2020). Hedeflenen amaç için NP'lerin boyutları, şekilleri, bileşimleri, yüzey yükleri ve kimyaları gibi özelliklerinin tam kontrolü ile amaçlarına uyacak şekilde özel olarak tasarlanmalıdır (Pondman, Le Gac, ve Kishore, 2023). Geleneksel nanopartikül üretim yöntemleri genellikle nanomalzemelerin boyutunu, boyut dağılımını ve kalitesini bir partiden diğerine tutarlı bir şekilde kopyalamakta zorlanır, sentez koşullarının hızlı taranması ve optimizasyonunun uygulanması zordur. Ayrıca üretim prosedürlerini ürün geliştirme ve optimizasyon için gerekli miktarlara ölçeklendirmek de ayrı bir zorluklar yaratmaktadır (Marre ve Jensen, 2010). Bu geleneksel yöntemlerin doğasında bulunan eksiklikler göz önüne alındığında, nanopartiküllerin üretimi için yeni alternatifler arayışı ortaya çıkmıştır. Üstün bir yaklaşım arayışı, araştırmacıları performansı artırma ve önceki yöntemlerde gözlemlenen dezavantajları aşma umudu sunan mikroakışkan teknolojilerini kullanarak NP üretmeye yönlendirmiştir.

Mikroakışkan teknolojisi, boyutları onlarca ila yüzlerce mikron arasında değişen kanallar aracılığıyla, 10^{-9} ila 10^{-18} litre arasında değişen küçük sıvı hacimlerinin manipülasyonunu ve işlenmesini içerir (Whitesides, 2006). Mikroakışkan teknolojisi, geleneksel üretim yöntemlerinde bulunmayan farklı akış özellikleriyle; sürekli akış modeli içinde partikül oluşturma ortamının titizlikle yönetilmesini ve minimum reaktif kullanılmasını sağlar (Illath vd., 2022). Mikro kanal mimarilerinin, akış ve karıştırma hızlarının, arayüzey viskozitesinin, ısı ve kütle aktarım süreçlerinin üzerinde ustaca kontrol sağlayan mikroakışkanların gücü sayesinde ayırt edici özelliklere sahip çeşitli mikro/nanopartiküllerin sentezi kolaylaşır (Zhao vd., 2022). Mikroakışkan teknolojilerinin hızlı numune işleme ve analizlerdeki sıvıların hassas kontrolü gibi belirli özellikleri, onları geleneksel nanopartikül

üretim yöntemlerinin yerini almak için cazip adaylar haline getirmiştir. İyi tasarlanmış mikroakışkan cihazlarda sentezlenen mikro ve nanopartiküller, boyut, şekil ve boyut dağılımını kontrol etmede özellikle umut vaat etmektedir. Dahası, mikroakışkanların kullanımı sentez alanını (örneğin sıcaklık, basınç, reaktifler) geleneksel prosedürler ile kolayca erişilemeyen koşullara genişletir ve böylece karmaşık mühendislik nanoyapılarının ve yeni malzeme sistemlerinin gerçekleştirilmesi için yeni yöntemler sunar (Marre ve Jensen, 2010).

1.1. Mikroakışkan Teknolojisinin Tarihi ve Gelişimi

Mikroakışkanların tarihi, bağımsız bir bilim dalı olarak ortaya çıkmadan önce gelişimine katkıda bulunan çeşitli alanlara ve teknolojilere dayanmaktadır. Mikroakışkan kavramından yüzyıllar önce araştırmacıların vücut sıvılarını incelediği ve özelliklerini analiz ettiği bilinmektedir. Hipokrat, Galen ve Theophilus gibi önemli isimler idrar örneklerini incelemiş ve özelliklerini farklı hastalıklarla ilişkilendirmiştir. 18. ve 19. yüzyıllarda James Jurin, Jean Le'onard Maric Poiseuille ve Gotthilf Heinrich Ludwig Hagen gibi araştırmacılar akışkan davranışı üzerine çalışmalar yürütmüş ve silindirik tüplerdeki akışkan hareketini tanımlayan Hagen-Poiseuille denkleminin formüle edilmesine yol açmıştır. George Stokes daha sonra bu denklem için teorik gerekçeler sunmuş, böylelikle akışkanların küçültülmüş ölçeklerdeki davranışlarını açıklayan teoremin temeli oluşturulmuştur (Castillo-León, 2014; Hagen, 1839; Jurin, 1718; Poiseuille, 1838; Poiseuille, 1844; Stokes, 2007; Sutura ve Skalak, 1993). 1879 yılında Lord Rayleigh damlacık oluşumu fiziğine dair gözlemlerini yayınlamıştır (Rayleigh, 1879). Rayleigh, bir delikten çıkan sıvının hidrodinamik olarak kararsız olduğunu ve toplu olarak daha küçük bir yüzey alanına ve daha düşük bir yüzey gerilimine sahip olan damlacıklar oluşturduğunu keşfetmiştir.

Mikroakışkanlar teknolojisinin oluşumuna yol açan olaylar, kullanılan malzeme ve malzeme işleme teknolojilerinin gelişmesiyle devam etmiştir. 1861 yılında John Walter Osborne, baskı için ışığa duyarlı malzemeler kullanan fotolitografi sürecinin patentini almıştır (Osborne, 1861). Optik litografi olarak da bilinen bu yöntem, daha sonraki gelişmeler için zemin hazırlamıştır. Daha sonra alan, elastomerik damgaların, kalıpların ve uyumlu fotoğraf maskelerinin kullanımını içeren yumuşak litografinin kullanılmaya başlanmasıyla önemli ölçüde ilerleme kaydetmiştir (Kumar ve Whitesides, 1993; Rogers ve Nuzzo, 2005). 1901 yılında Frederic Kipping tarafından silikon kavramı üretilmiştir (Kipping ve Lloyd, 1901). Silikon, uzun bir süre boyunca mikroakışkan cihazları imal etmek için kullanılan birincil malzeme olmuştur. Silikonun mikroelettronik sistemler üretilmesinde son derece başarılı olan

fotolitografi ve ilgili teknolojilerle uyumluluğu, mikroakışkanlar alanının ilerlemesinde önemli bir rol oynamıştır. Mikroakışkan sistem çalışmalarının ilk aşamalarında çoğunlukla kullanılan silikon ve cam, biyolojik numunelerin analizleri açısından çeşitli nedenlerle uygunsuz olduklarından dolayı yerlerini 2000'li yıllarda polimer malzemelere bırakmışlardır. Malzemeler ve uygulamalar geliştikçe, polidimetilsiloksan (PDMS) günümüzde araştırma laboratuvarlarında mikroakışkan cihazların/sistemlerin imalatı için en yaygın kullanılan malzeme olarak ortaya çıkmıştır. PDMS optik olarak şeffaf, yumuşak bir elastomerdir. Yeni konseptlerin PDMS'de test edilebilmesinin kolaylığı ve bazı çok kullanışlı bileşenleri (pnömotik valfler gibi) destekleme kabiliyeti, onu geliştirmenin ilk aşamalarında keşif araştırmaları ve araştırma mühendisliği için anahtar malzeme haline getirmiştir (Gerami vd., 2019; Lei, 2018).

Günümüzde kullanılan anlamıyla mikroakışkan biliminin gelişmesini en çok etkileyen faktörler 4 madde halinde özetlenebilir: mikroelettronik, moleküler analiz, biyosavunma ve moleküler biyoloji. Bu faktörlerin yol açtığı ilerlemeler, mikroakışkan teknolojisinde önemli bir sıçramayla sonuçlanmıştır. Mikroakışkan biliminin temeli özellikle mikroelettronik alanındaki gelişmelere dayandırılmaktadır. 1949 yılında John Bardeen ve arkadaşları tarafından transistör icat edilmiştir (Bardeen, 1952). 1955 yılında Jules Andrus ve Walter L. Bond, silikon üzerinde çok daha ince ve detaylı tasarımlar üretmek için mevcut fotolitografik tekniklerini uyarlamaya başlamıştır (Andrus ve Bond, 1958). 1959'da RP Feynman'ın konuşmasında mikro ve nano çalışmalara vurgu yapması, mikro teknolojilere olan ilgiyi artırmıştır (Feynman, 1959). 1964 yılında Jack Kilby, transistörler, dirençler ve kapasitörler gibi çok sayıda ayrı bileşenin bir osilatör devresi oluşturmak için tek bir silikon kristaline nasıl entegre edilebileceğini göstererek teknolojiyi ilerletmiştir (Kilby, 1964). Bütünleşmiş devre olarak bilinen bu yenilik, mikroelettronikte devrim yaratarak şirketlerin minyatür ve güvenli elektronikler geliştirmek için yarıştığı "silikon çağı"nı başlamıştır. 1965 yılında Richard Sweet, akış ilkeleri ve malzeme bilimindeki gelişmeleri birleştirerek mürekkep püskürtmeli baskı teknolojisinde kullanmıştır (Sweet ve Cumming, 1968). 1979 yılında, Terry ve arkadaşları tarafından "*A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer*" isimli bir makale yayınlanmıştır (Terry, Jerman, ve Angell, 1979). Bu cihaz günümüzde mikroakışkan cihaz alanının ilk örneği olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, bu makale, mikro akışkanların kendi başına bir alan olarak kabul gördüğü ilk yayın olarak kabul edilmektedir (Convery ve Gadegaard, 2019).

Mikroakışkanlar teknolojisinin geliştirilmesine yönelik analitik sistemler tarafından atılan ilk atılımlar, sistemlerin boyutunu ve karmaşıklığını azaltma yani minyatürleşme üzerine olmuştur (Whitesides, 2018). Geleneksel makroskobik cihazları mikroskobik cihazlara minyatürleştirmeyi hedefleyen minyatürleştirme bilimi, başlangıçta minyatür silikon tabanlı elektronik cihazların geliştirilmesi ile başlamış ve daha sonra mikro elektromekanik sistemler (MEMS) olarak bilinen mekanik cihazların imalatına kadar genişletilmiştir (Grimmer vd., 2020; Lei, 2018). Bu mikroskobik cihazlar mililitre altı sıvıları işlemek üzere tasarlandıklarında ise mikroakışkan cihazlar olarak adlandırılmışlardır. Mikroakışkanlar teknolojisini etkileyen en önemli analitik gelişmeler ise gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller elektroforez (CE) gibi mikro analitik yöntemlerdir. Bu yöntemler sayesinde, çok küçük miktarlarda numune kullanarak hızlı ve yüksek hassasiyette veriler elde etmek mümkün hale gelmiştir. 1957 yılında Golay'ın gaz kromatografisi (Golay, 1957), ve 1956 yılında Van Deemter'in sıvı kromatografisi (Van Deemter, Zuiderweg, ve Klinkenberg, 1956) üzerine yayınladıkları araştırmalar sonucunda yüksek bir performans seviyesini korumak için kolonun çapının azaltılması gerektiği anlaşıldı; böylece kolonlar mikrometre aralığında üretilmeye başlandı. 1993 yılında Andreas Manz ve arkadaşları, minyatürize edilmiş kapiller elektroforez tabanlı bir kimyasal analiz sisteminin üretimini açıklayan bir makale yayınladı (Harrison vd., 1993). Bu çalışmanın yayınlanmasından 1 yıl sonra, ilk Uluslararası Mikro-Toplam Analiz Sistemleri Konferansı Hollanda'da gerçekleşti (Castillo-León, 2014). Sonuç olarak, kapiller elektroforez çeşitli biyomoleküllerin ayrıştırılması için popüler hale geldi. Bu minyatürleşmenin faydalarını ortaya çıkararak yenilikçi bakış açısı sunan çalışmaların sonucunda, birçok araştırmacı sıvı taşıma, sıvı ölçme, sıvı karıştırma, sıvıların ayrılması gibi konular için mikroakışkan cihazlar geliştirmek üzere oldukça emek ve zaman harcamıştır (Hamblin ve Karimi, 2020).

Biyosavunmanın mikroakışkan teknolojisi üzerindeki etkisi, soğuk savaşın sona ermesinin ardından kimyasal ve biyolojik silahların büyük askeri ve terörist tehditler oluşturduğunun fark edilmesiyle başlamıştır. Olası tehditlere karşı koymak için ABD Savunma Bakanlığı'na bağlı İleri Savunma Araştırma Projeleri Ajansı (DARPA) 1990'larda kimyasal ve biyolojik tehditlere karşı dedektör olarak kullanılmak üzere tasarlanmış mikroakışkan sistemler geliştirmeyi amaçlayan programları desteklemiştir. Yapılan destekler, akademik olarak mikroakışkan biliminin araştırılması hızlandırmış ve bu teknolojinin büyümesi için büyük katkı sağlamıştır (Whitesides, 2006).

Moleküler biyoloji alanının katkısı özellikle 1980'lerde gerçekleşen genomik bilimindeki patlama ve ardından yüksek verimli DNA dizilimi gibi moleküler biyolojiyle ilgili diğer mikro analiz alanlarının ortaya çıkmasıyla ilgilidir. Bu gelişmeler biyolojide daha önce düşünülen çok daha fazla verim ve daha yüksek hassasiyet ve çözünürlüğe sahip analitik yöntemlerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Genomik nükleik asitlerin sıralanmasına yönelik ticari cihazlara ve küçük miktarlardaki sıvıların manipüle edilmesine yönelik yöntemlere duyulan ihtiyaç artmıştır. Mikroakışkanlar biliminin bu sorunların üstesinden gelmek üzere seçenekler sunması alana yapılan araştırmaları arttırmıştır (Whitesides, 2018; Whitesides, 2006).

Sonuç olarak, mikroakışkanların geliştirilmesi kimya, biyoloji, analitik biyokimya, biyoteknoloji, doku mühendisliği ve tıp bilimlerinde devrim yaratmış ve bir kanal ağında çok küçük miktarlarda sıvıların akışına ve manipülasyonuna olanak sağlamıştır. Bilim camiasında da çok fazla kullanım alanı bulmuştur. Mikroakışkan sistemler kimyagerler, fizikçiler, biyologlar ve çoğu mühendislik disiplini için ortak bir araçtır ve bu nedenle bilim ve mühendislikte multidisipliner bir platform haline gelmiştir. Mikroakışkan bilimi, ilaç keşfi, ilaç uygulamaları, biyomedikal araştırmalar ve diğer çip üzerinde laboratuvar (LoC) uygulamaları alanlarındaki gelişmelere katkı sağlamıştır. Mikroakışkanların tek bir çip üzerinde basit, esnek ve faydalı bir şekilde birleştirilebilmeleri nedeniyle, geleneksel laboratuvar tekniklerine kıyasla avantajlar sunabilmektedir. Elektronik ve mekanik cihazları veya kimyasal süreçleri tek bir çip boyutundaki alt tabakaya dahil eden birçok önemli makale yayınlamıştır. Aynı zamanda mikroakışkan cihazlar mükemmel morfoloji ve boyut dağılımına sahip mikro ve nanopartiküllerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Mikroakışkanlar çeşitli kimyasal reaksiyonları, geleneksel yöntemlerde olduğundan daha yüksek verimle ve daha zorlu koşullar altında gerçekleştirilebilir. Bu gibi nedenlerden dolayı mikroakışkanlar alanının uygulanması, kimya, fizik ve biyoloji gibi temel bilimlerden çoğu mühendislik disiplinlerine kadar çeşitli disiplinlerde artarak devam etmektedir.

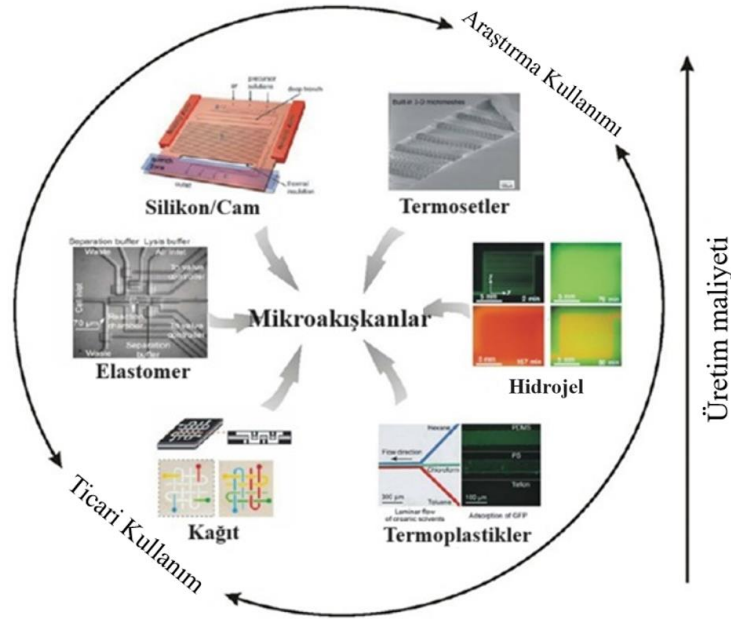
1.2. Mikroakışkan Çipler

Mikroakışkan ve çip üzerinde laboratuvar cihazları, biyolojik, biyomedikal ve analitik kimya çalışmalarında düşük kimyasal tüketimi, hızlı analiz, biyoyumumluluk, düşük maliyet ve otomasyon gibi doğal avantajları nedeniyle son yıllarda kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve geliştirilmiştir. Disiplinler arası bir alan olan mikroakışkanlar, çevresel algılama, DNA saflaştırma, tıbbi teşhis, mikro ölçekli genetik ve proteomik analiz, ilaç keşfi, ilaç

uygulamaları, yüksek verimli ilaç tarama platformları, hücre kültürü ve manipülasyon platformları, mikro ölçekli kimyasal üretim, sentez ve tahliller, gıda güvenliği algılama, biyosensörler ve patojen tespit sistemleri, yapay organlar ve mikro ölçekli enerji sistemleri dahil olmak üzere çok çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (Aryasomayajula vd., 2017; Yeo vd., 2011). Bir mikroakışkan çip, mikro ölçekte sıvı akışını manipüle etmek ve kontrol etmek için mikroakışkan teknolojisini kullanan minyatürleştirilmiş bir cihaz olarak tanımlanabilir. Mikroakışkan çipler, çeşitli mikrofabrikasyon teknolojileri ile üretilebilirler, farklı malzemeler (cam, silikon, PDMS veya PMMA gibi polimerler) üzerine kazınmış bir dizi oluk veya mikro kanallar içerirler. Çipin minyatür boyutu, yüzey alanının artmasına ve ilgili reaksiyonun hızlanmasına neden olur. Damlacık mikroakışkan platformları, çip üzerinde organ sistemleri ve 3D hücre kültürü çipleri dahil olmak üzere farklı mikroakışkan çip türleri geliştirilmiştir (Cui ve Wang, 2019; Pattanayak vd., 2021).

1.2.1. Materyaller

Mikroakışkan cihazların imalatı (mikrofabrikasyon) için çeşitli materyaller denenmiştir. Mikro cihazların üretiminde, seçilen tekniğe bağlı olarak çok sayıda malzeme kullanılmış, cihazlar çeşitli substratlar üzerinde imal edilmiştir (Şekil 1.1). Silikon, cam, polimerler, hidrojel, kağıt ve çeşitli inorganik malzemeler mikroakışkan sistem imal etmek için yaygın olarak kullanılan malzemelerdendir (Mumtaz vd., 2023).



Şekil 1.1. Mikroakışkan cihaz üretimi için malzemelere genel bakış (Ren, Zhou, ve Wu, 2013).

Mikroakışkan uygulamalarındaki temel adımlardan biri, cihaz üretimine ve gerçekleştirilecek işleme yönelik en uygun malzemenin seçilmesidir. Kullanılacak mikroakışkan sistem için malzeme türünü seçmek için yüzey işlevselleştirme potansiyeli, işlenebilirlik, üretim kolaylığı, yüzey yükü, moleküler adsorpsiyon, spesifik olmayan adsorpsiyon, elektrik iletkenliği, hücresel uyumluluk, biyouyumluluk, elektro ozmotik akış hareketliliği, optik özellikler ve şeffaflık, hava geçirgenliği, esneklik, malzemenin fiyatı (özellikle kontaminasyon riski olan işlemlerde tek kullanımlık cihaz üretimi söz konusuysa), kullanılan çözücülerle kimyasal uyumluluğa karşı direnç (kimyasal stabilite), sıcaklık değişimlerine ve yüksek sıcaklıklara karşı direnç (termal stabilite), basınç ve diğer fiziksel kuvvetlere karşı direnç (mekanik stabilite) gibi bir çok özellik dikkate alınmalıdır. Bu özelliklerin işleme konulacak reaksiyonun özellikleriyle uyumlu olacak şekilde seçilmesi gerekir. Her malzemenin kullanım amacına bağlı olarak hem avantajları hem de dezavantajları vardır. Kullanılan malzemelerin yapılan işlem üzerinde etkilerinin olabileceği unutulmamalıdır. Mikroakışkan tekniğinin temelini oluşturan kanalların minyatürleştirilmesi, cihazı oluşturan malzemelere özel bir dikkat gösterilmesini gerekli kılmaktadır. Mikroakışkan sistemlerde söz konusu olan daha kısa temas süreleri, laminar akış, gelişmiş ısı ve kütle transferi ve büyük yüzey-hacim oranları nedeniyle makro ölçekli sistemlerde olmayan olgular ortaya çıkar. Makro örneklerle karşılaştırıldığında, mikro ölçekli ortamda gerçekleşen reaksiyonlarda, cihazın malzemesinin ıslanabilirliği ve sıvı faz ile mikro kanal arasında oluşan temas açısı da dahil olmak üzere üretim sürecini etkileyebilecek tüm değişkenleri göz önünde bulundurmak gerekir (Niculescu vd., 2021; Sommonte, Denora, ve Lamprou, 2023). Malzemelerin çeşitliliği ve kalitesi gelişen teknoloji ve yapılan araştırmalar neticesinde sürekli olarak artmaktadır. Aynı zamanda söz konusu malzemeler, avantajlarından sinerjik bir şekilde faydalanmak için hibrit cihazlarda birleştirilebilir. Bununla birlikte, mikroakışkan cihazlar teknolojisinin ilerlemesi ve üretimleri sadece kullanılan malzemelere bağlı olmayıp, daha derin bir değerlendirme ve daha fazla deneysel çalışma gerektirmektedir. Mikroakışkanlar, MEMS/NEMS ve μ TAS gibi ilgili mikrosistem ailelerini içeren LoC sistemleri hakkında, gelişmiş işlevselliğin yanı sıra entegrasyon, standardizasyon, ticarileştirme ekonomisi ve hedeflenen sistemlerin uygulanabilirliği gibi konulardaki zorluklara daha fazla odaklanılmalıdır.

1.2.1.1. Polimerler ve PDMS

Önceleri, sırasıyla yüksek termal iletkenlikleri ve sıcaklık gradyanlarına dayanma yetenekleri nedeniyle mikroakışkan cihazları imal etmek için esas olarak silikon ve cam malzemeler kullanılıyordu. Ancak, silikonun gösterdiği görünür ve ultraviyole ışığı zayıf iletmesi, biyolojik moleküllerin yüzeylerde adsorbe olma eğilimi, nispeten yüksek maliyet ve kırılgenlik; camın gösterdiği çipler üzerinde mikro pompalar veya valfler oluşturmada zorluklar, gazlara karşı geçirimsizlik, işleme sırasında temiz oda tesisleri gereksinimleri, zaman alıcı ve pahalı üretim süreçleri gibi çeşitli dezavantajları nedeniyle, bunların yerini zamanla polimerler almıştır (Hamblin ve Karimi, 2020). Polimerlerin çok yönlülüğü, araştırmacıların oldukça ilgisini çekmiştir. Bu durum çalışmaların silikon ve cam çiplerden uzaklaşmasına ve mikroakışkan cihaz üretiminde polimer kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Polimerlerin en büyük avantajlarından biri ucuz olmalarıdır. Mikroakışkan cihazlar, diğer MEMS cihazlarına kıyasla nispeten büyüktür. Bu nedenle, alt tabaka malzeme fiyatı birincil maliyetlerden biridir. İnorganik malzemelere kıyasla polimerler oldukça ucuzdur ve daha kolay ve düşük maliyetli üretim tekniklerinden faydalanırlar. Diğer avantaj, farklı yüzey kimyasına sahip birçok farklı polimer bulunması ve bunların istenen uygulama için gereken özelliklere göre optimize edilebilmeleridir (Panigrahi, 2016). Polimerlerin şeffaf veya yarı şeffaf çeşitleri bulunur. Polimerin bileşimine bağlı olarak, optik görünürlüğün gerekli olduğu tüm işlemlere uygulanabilen şeffaf veya yarı şeffaf cihazlar elde edilebilir. Ayrıca, bu cihazların verimliliğini artırmak için kolay üretim teknikleri ve çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri mevcuttur. Polimerlerin sabit bir erime sıcaklığı yoktur. Polimerik malzeme yumuşaktır ve camsı geçiş sıcaklığının üzerinde kalıplama ile işlenebilir. Kolay kalıplanabilir olmaları sayesinde mikro analitik sistem bileşenlerini, özellikle pompaları ve valfleri elastomerlerden üretmek sert malzemelerden üretmekten daha kolaydır (Sommonte, Denora, ve Lamprou, 2023). Çoğu polimer, biyolojik malzemelerin işlenmesi için gerekli sıcaklıklarda (40-95°C) stabil olduğundan, sıcaklık gradyanları gerektiren uygulamalar için caziptir. Polimerlerin sahip olduğu düşük maliyet, çok yönlülük ve kolay kullanım özellikleri onları mikroakışkan sistemlerde kullanılmak üzere uygun malzemeler haline getiren en önemli avantajlarından olmuştur. Biyouyumluluk, polimerlerin cam ve silikona kıyasla bir diğer önemli avantajıdır. Birçok polimer doku ve kan ile uyumludur ve ilaç dağıtım uygulamaları için implante edilebilir mikroakışkan cihazlar için uygundur. Polimerik cihazlar hücre işleme, klinik teşhis, DNA analizi ve polimeraz zincir reaksiyonları için idealdir. Polimer mikroakışkan platformlar, nanopartikül sentezinden sıvı manipülasyonuna kadar çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Polimer bazlı mikroakışkan sistemleri, kullanılan polimerin

özelliklerine bağlı olmak kaydıyla çeşitli sıcaklık koşulları altında güvenilir üretim sağlayabilirler. Polimerler oda sıcaklığındaki veya daha yüksek sıcaklıklardaki uygulamalar için uygundur ve büyük ölçekli üretimler için oldukça kullanışlıdır. Bununla birlikte, polimerlerin hücre sinyal dinamiklerini etkileyebilen küçük molekül absorpsiyonu, organik çözücülere karşı yüksek hassasiyet ve buhar geçirgenliği ile ilgili sorunlar gibi bazı dezavantajları vardır. Birçok polimer, düşük uyarma dalga boylarında kendiliğinden floresan özelliğine sahiptir. Mikroakışkan uygulamasında algılama için floresan kullanıldığında bu durum cihazın hassasiyetini etkileyecektir ve polimerlerin bu tür mikro analizlerde kullanılmasını engelleyebilir. Çoğu polimer, cama kıyasla iyonize olabilen grupların eksikliği nedeniyle düşük yük yoğunluğuna sahiptir. Kararlı ve kontrol edilebilir elektro osmotik akış ise yüzeyde yüksek yük yoğunluğu gerektirmektedir. Elektro osmoz durumunda olduğu gibi, gerekli yüzey özelliklerinin polimerlerin yüzey özellikleri ile uyumlu olmadığı mikro analizlerde kullanılamazlar (Hamblin ve Karimi, 2020; Niculescu vd., 2021; Panigrahi, 2016). Mikroakışkan cihaz üretimi için kullanılan en yaygın polimerler arasında PDMS, PMMA, floropolimerler, siklo-olefin polimerler ve kopolimerler (COPs/COCs) ve Tiyol-ene polimerler (TES) bulunmaktadır. Son birkaç yılda en yaygın olarak kullanılan polimerlerden biri PDMS'dir.

Esneklik gibi mekanik özellikleri nedeniyle mikroakışkanların üretiminde sıklıkla kullanılan elastomerler grubunun en iyi örneği olan PDMS, çeşitli nedenlerden dolayı çok dikkat çekmiş ve 21. yüzyılın başından bu yana mikro cihaz üretiminde en sık kullanılan malzeme olmuştur. PDMS uygun fiziksel özellikleri, kolay üretim süreci ve düşük maliyeti ile mikrofabrikasyona katkıda bulunur. Buna ek olarak, kalıplanması kolaydır. PDMS çipleri üzerinde çok katmanlı kanallar, mikro valfler veya mikro pompalar kolayca oluşturulabilir. PDMS tabanlı mikroakışkan cihazlarda çok katmanlı tasarım kullanılarak, iç kanallar hem 2D hem de 3D olarak özelleştirilebilir ve modifiye edilebilir. PDMS, esnekliği ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle çip üzerinde organ platformu üretiminde en önemli malzemelerden biridir. Optik berraklığı nedeniyle, kültürlenmiş hücrelerin yüksek kaliteli mikroskopik görüntüleri yakalanabilir. PDMS'den yapılan cihazlar dış bileşenlerle kolayca entegre edilebilir çünkü polimer çoğu malzemeye uyum sağlar. PDMS pürüzsüz plastik veya cam alt tabakalarla uyumlu temas sağladığından hem geri dönüşümlü hem de geri dönüşümsüz sızdırmazlık mümkündür. PDMS biyolojik çalışmalar için avantajlıdır çünkü biyolojik olarak uyumludur, gazlara karşı geçirgendir, hücresel solunum için yeterlidir, otoklavlanabilir ve doğal olarak hücresel yapışmayı engeller. Bu nedenle PDMS, hücreler hala çipin içindeyken uzun süreli kültürle ve floresan/kemilüminesan çalışmalara izin vererek hücresel çalışmalar

için çok kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır. PDMS, yüksek hidrolik basınca dayanmasını sağlayan gerilme mukavemetine sahip bir polimerdir. Yüksek basınç toleransı, özellikle optimum karıştırma için genel akış hızının sürekli yüksek olduğu mikroakışkan tabanlı nanopartikül sentezinde mikroakışkan cihazların önemli bir özelliğidir (Popa vd., 2023; Seo vd., 2023). PDMS tabanlı mikroakışkan cihazlar bu açık avantajlara sahip olmakla birlikte, zayıf solvent uyumluluğu, yüzey kirlenmesi ve yüksek basınç altında deformasyon gibi bazı önemli dezavantajlara da sahiptir. PDMS'in sahip olduğu gözeneklilik bazı durumlarda dezavantaj haline gelebilir, birçok molekülün difüze olabileceği adsorptif bir malzeme haline getirir. Bu durum malzemeyi organik çözücülerle (örn. hekzan, toluen ve kloroform) uyumsuz hale getirir, çünkü molekülleri kanal duvarlarına adsorbe olabilir ve platformu şişirebilir. Bir başka sorun da kanal duvarlarından suyun buharlaşmasından kaynaklanabilir, bu da çözelti konsantrasyonunda değişikliğe yol açar. Aynı zamanda PDMS'nin içinden geçen gazla temas halinde olduğunda kabarcıklar oluşturabildiğini göstermiştir. Tüm bunlarla birlikte, PDMS'nin kullanılmaya başlanmasının teknolojik ve biyomedikal çalışmalar için daha kullanışlı mikroakışkan cihazların geliştirilmesine yardımcı olduğunu belirtmek gerekir (Hamblin ve Karimi, 2020).

1.2.2. Mikrofabrikasyon Yöntemleri

Mikroakışkan cihazların üretim teknolojisi bütünleşmiş sensör ve aktüatörlere sahip bir dizi mikroakışkan cihazın silikondan yapıldığı silikon mikro işleme ile başlamıştır. Günümüzde ise mevcut olan mikrofabrikasyon teknikleri yelpazesi oldukça genişlemiştir. Cam ve silikon gibi sert malzemeler kullanan mikro teknolojiler, aşındırma, litografi ve biriktirme gibi teknikler üzerine kuruludur ve sert teknolojiler olarak bilinirler. Sert mikro fabrikasyon teknolojileri genellikle karmaşıktır ve uygulanması zordur. Buna karşılık, yumuşak teknolojiler olarak adlandırılan plastik mikro teknolojiler tipik olarak polimer malzemeler kullanır. Hızlı prototipleme, şeffaflık ve malzeme çeşitliliği avantajları sunarlar.

Mikrofabrikasyon işlemlerinin genellikle temiz oda olarak bilinen son derece temiz bir ortamda gerçekleştirilmesi gerekir. Temiz oda, sıcaklık ve nem açısından düzenlenmiş ve sürekli olarak hava akımı ile geçilen bir ortamdır. Çünkü tozlu ortamda mikrometre boyutundaki standart partiküller yüzeyde adsorbe olma ve imal edilen mikro yapının doğasını değiştirme eğilimindedir. Eğer gerekliyse, genel temizlik, partikül giderme, oksit giderme ve diğer çeşitli kirleticileri giderme amaçlarına yönelik mikrofabrikasyon işleminden önce ön

adım olarak yüzey hazırlığı yapılmalıdır. Bunun için farklı sıcaklıklarda distile su, farklı asit türleri veya farklı tamponlar kullanılması gerekebilir (Panigrahi, 2016).

Bir mikroakışkan cihazın imal edilebileceği geniş bir malzeme yelpazesi vardır. Bu malzemelerin her biri farklı özelliklere sahiptir. Dolayısıyla işlenirken farklı davranışlar sergiler. Bu nedenle, imalat yöntemleri, ilgili malzemenin belirli özelliklerine ve son ürün gerekliliklerine göre uyarlanmalıdır. Üretim tekniğini seçerken bir diğer önemli husus maliyettir. Ayrıca, yaygın olarak benimsenmesi için çiplerin erişilebilir ve ölçeklenebilir bir şekilde üretilmesi gerekir. Alan ilerledikçe gerekli kanal boyutlarını ve özelliklerini üretmek için birçok üretim tekniği tanımlanmış ve benimsenmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Mikroakışkan üretim tekniklerinin sınıflandırılması (Niculescu vd., 2021).

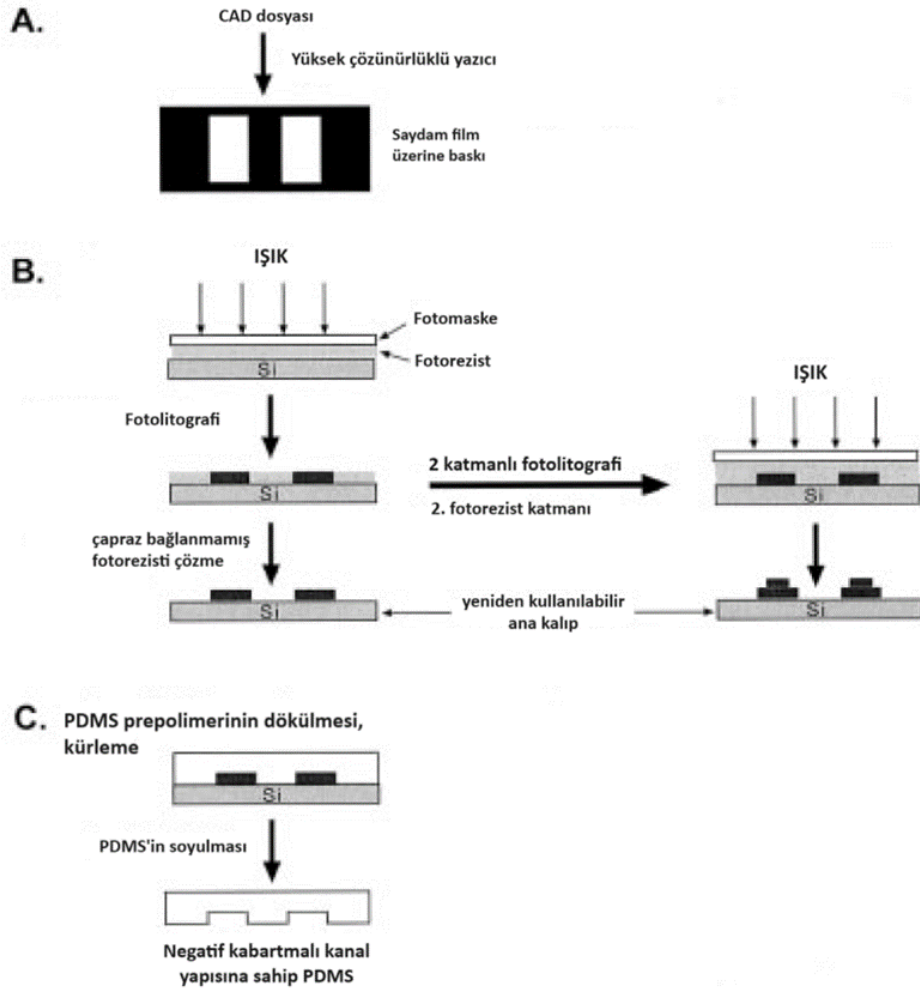
	Malzeme Kaldırma Teknikleri	Malzeme Biriktirme Teknikleri
Kimyasal prosesler	Elektrokimyasal deşarj ile işleme	Silikon yüzeyin mikro işlenmesi
	Islak aşındırma	Litografi
	Kuru aşındırma	Mürekkep püskürtmeli 3D baskı
		Toz 3D baskı
		Doğrudan yazı
		İki boyutlu sanal hidrofilik kanallar
Mekanik prosesler	Mikro öğütme	Enjeksiyon kalıplama
	Mikro taşlama	Sıcak kabartma
	Mikro-aşındırıcı hava jetli işleme	
	Mikro-aşındırıcı su jeti ile işleme	
	Ultrasonik işleme	
	Xurografi	
Lazer tabanlı prosesler	Foto termal süreç	Seçici lazer uygulaması
	Ultra kısa darbe süreci	Sterolitografi
	Emici malzeme süreci	İki foton polimerizasyonu
	Fotokimyasal modifikasyon süreci	
	Lazerle doğrudan işleme	
Diğer prosesler	Odaklanmış iyon ışını	Form verme süreci
		Yumuşak litografi
		Katmandan katmana üretim
		Katman katman üretim

Bir mikroakışkan sistemde polimerik mikroakışkan kanallar ve ağlar üretmek için kullanılan teknikler arasında yumuşak litografi, UV lazer işleme, sıcak kabartma, enjeksiyon kalıplama veya doğrudan mikro öğütme gibi çeşitli teknikler yer alır. Mikroakışkan cihazların imalatı için kullanılan polimerler arasında PDMS, mükemmel şeffaflık ve biyouyumluluk gibi avantajlı özellikleri nedeniyle akademide hala en yaygın kullanılan malzeme olmaya devam etmektedir. PDMS kanallarının yüzey kimyasını (örneğin biyomolekül immobilizasyonu, yüzey hidrofobikliği ve kirlenme önleyici özellikler) istenen uygulamaya göre uyarlamak için spesifik yüzey modifikasyonu ve işlevselleştirme adımları gerekebilir. PDMS temelli mikroakışkan cihazlarda mikro kanal geometrisinin ve kanal boşluklarının oluşturulması için en yaygın yaklaşım, ana kalıbın çözünürlüğüne bağlı olarak mikrometreden nanometre hassasiyetine kadar değişen mikroakışkan desen çözünürlüğü sağlayan yumuşak litografidir.

1.2.2.1. Yumuşak Litografi

Yumuşak litografi, mikroakışkan cihazların imalatı için kullanışlıdır ve cihazların hızlı prototiplemesini sağlar. İşlem laboratuvar ortamı koşullarında gerçekleştirilebilir; bu nedenle 20-100 μm boyut aralığında kanallara sahip çipler üretmek için pahalı temiz oda tesislerine ihtiyaç kalmaz. (Friend ve Yeo, 2010).

PDMS mikroakışkan çiplerin yumuşak litografi yöntemi ile üretiminde öncelikle ana kalıbın geleneksel fotolitografi teknikleri kullanılarak imal edilmesi ve sonrasında PDMS ön polimer ve kürleme maddesinin karıştırılması, ana kalıba dökülmesi ve belirli bir sıcaklıkta kürlenmesi işlemleri sırayla gerçekleştirilir (Şekil 1.2).



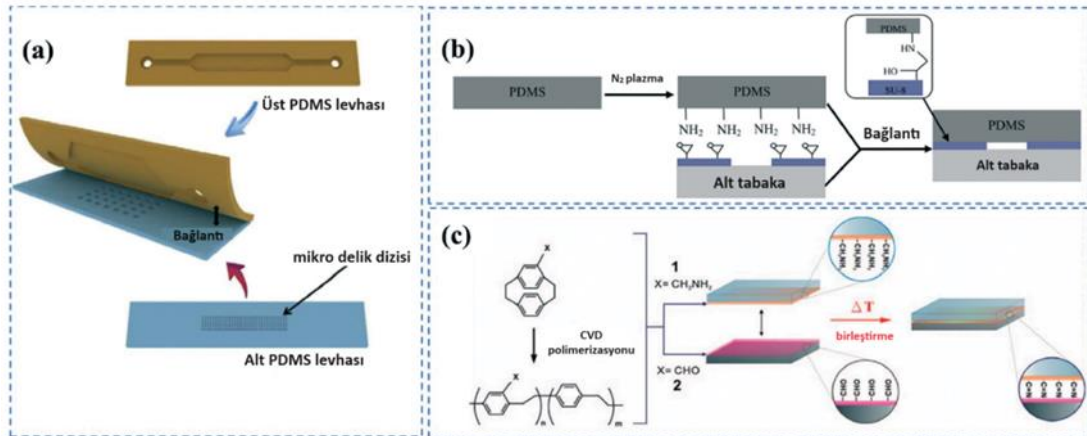
Şekil 1.2. Yumuşak litografi ile PDMS tabanlı mikroakışkan kanal yapılarının oluşturulması (Ng vd., 2002).

(A) hızlı prototipleme, (B) yeniden kullanılabilir ana kalıp üretimi ve (C) mikroakışkan sistemlerin çoğaltma kalıplaması için şemalar.

Hızlı prototipleme, mikro kanallar için bir tasarım oluşturmak üzere bilgisayar destekli tasarım (CAD) programı kullanılarak başlar. CAD dosyası daha sonra yüksek çözünürlüklü bir görüntü ayarlayıcı ile bir saydam film üzerine basılır; saydam film, fotolitografide bir foto maske görevi görür. Ana kalıp üretiminde, foto-kürlenabilir bir direnç katmanı, açıkta kalan bölgeleri polimerize etmek için foto-maske aracılığıyla UV ışığına maruz bırakılır. Polimerize olmamış fotorezist çözülür. Böylelikle tasarlanan kanal yapısının pozitif bir kabartması levha üzerinde bırakılır, bu yapı PDMS kanallarının dökümü için bir ana kalıp görevi görür. Eğer 3 boyutlu yapılar isteniyorsa, fotorezistin döndürülerek kaplanması, maskenin hizalanması ve UV ışınlarına maruz bırakılmasını içeren ek bir adım gerçekleştirilebilir. Bir ana kalıp

üretildikten sonra, levhanın yüzeyi florlu fonksiyonel gruplar içeren silan ile muamele edilir. Bu tek katmanlı silan, ana kalıp ve PDMS arasında geri dönüşü olmayan bağlanmayı önler. Kopya kalıplama, PDMS prepolimer ve kürlenme maddesi karışımının ana kalıp üzerine dökülmesini, $\sim 70^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca kürlenmesini ve kopyanın ana kalıp üzerinden soyulmasını içerir. Aynı kalıptan sınırsız sayıda kopya yapılabilir. Kanal girişleri ve çıkışları bir delici kullanılarak PDMS içine delinir ve kanal düz bir alt tabakaya mühürlenir (Ng vd., 2002).

Yumuşak litografi yöntemi ile üretilen, mikro kanal yapılarını içeren PDMS tabaka, uygun yöntemler kullanılarak düz bir alt tabakaya yapıştırılır (Şekil 1.3). Yapıştırılmaya yönelik en yaygın yaklaşım, yapıştırma yüzeyini yaklaşık 10 dakika boyunca oksijen plazmasına maruz bırakmaktır. Bu şekilde yapıştırılmaya hazır hale getirilen PDMS, mümkün olduğunca çabuk (genel olarak bir dakikadan kısa sürede) benzer şekilde temizlenmiş Si, cam veya başka bir PDMS katmanı üzerine yerleştirilerek bu iki katman arasında kalıcı bir bağ oluşturulabilir (Friend ve Yeo, 2010). Cihazın hazırlanmasının ardından, uygulanacak çalışmanın gerekliliklerine göre cihaz üzerinde yüzey modifikasyonu ve işlevselleştirme işlemleri çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir.



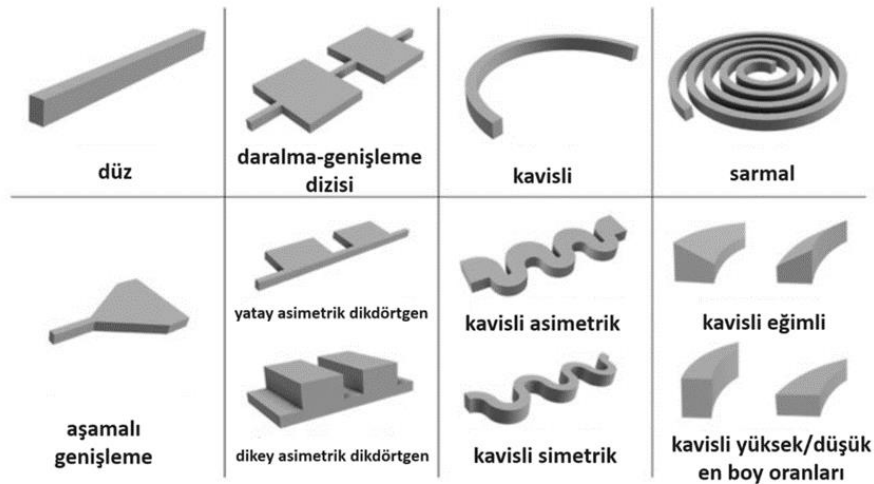
Şekil 1.3. PDMS yapıştırma teknikleri (Shakeri, Khan, ve Didar, 2021).

(a) Mikro kanal boşluğu ve mikro delikler içeren PDMS katmanları, oksijen plazma işleminden sonra hizalanmış ve yapıştırılmıştır. (b) PDMS'nin azot plazma ile indüklenen amin grupları, SU-8 substratın epoksi halkaları ile kimyasal olarak bağlanmıştır. (c) Parasiklophanların alt tabakalar üzerine CVD polimerizasyonu ile elde edilen mikro kanal tabakalarının kimyasal bağlanması.

1.2.3. Sistem Bileşenleri

Bir mikroakışkan cihazı çalıştırmak için gereken en temel bileşenler; akışın gerçekleştiği mikro kanallar, mikro kanallara giriş ve çıkış bağlantı noktaları, sıvıların akmasını sağlayacak bir pompa ve karışmalarını sağlayacak aktif ya da pasif karıştırıcılar olarak sayılabilir. Bunların dışında uygulanacak protokolün gerekliliklerine göre sisteme dahili veya harici çeşitli bileşenler eklenebilir. Örneğin valfler, bağlantı boruları, filtreler, mikro pompalar, anahtarlar, lensler, membranlar, ısıtıcılar, motorlar, optik fiberler, diğer çeşitli aktüatörler ve cihazlar, farklı uygulamalar için çeşitli sensörler, sızdırmaz contalar, sıkıştırılmış gaz hatları, sıvıların birbirine karışmasını önleyecek mikro üst ve alt geçitler, mikro akış ölçerler kullanılabilecek bileşen çeşitlerinden bazıları olarak sayılabilir (Battat, Weitz, ve Whitesides, 2022; Bragheri, Vázquez, ve Osellame, 2020; Deb, Sarma, ve Dalal, 2022; Huang ve Tsou, 2014; Ng vd., 2002). Bunlar ihtiyaç ve amaçlara göre seçilebilir ve çeşitlendirilebilir.

Herhangi bir mikroakışkan cihazdaki ana bileşen kanal ağıdır. Mikro kanallar, hidrolik çapı 1 mm'nin altında, genellikle 1-99 μm olan kanallardır. Çeşitli tasarım ve fabrikasyon yöntemleri kullanılarak kanal yapısı oluşturulabilir. Mikro kanallar düz, kavisli, dikdörtgen, zigzag, sarmal gibi çeşitli şeklinde olabilir (Şekil 1.4). Basit bir kanal ağı bazı uygulamalarda faydalı olabilse de diğer uygulamalar için işlevselliği artırmak üzere sisteme çeşitli bileşenler eklemek gerekir (Beebe, Mensing, ve Walker, 2002; Kandlikar vd., 2005).



Şekil 1.4. Mikroakışkanlarda sıklıkla kullanılan kanal geometrileri (Kalyan vd., 2021).

Cihaz içerisine sıvı akışını sağlamak için bir pompa kullanmak gerekir. Pompalama şemaları birçok farklı fiziksel prensip içermektedir. Farklı pompa türleri, akış hızı, kararlılık, verimlilik, güç tüketimi ve basınç yüksekliği gibi büyük ölçüde farklı özelliklere sahiptir. Harici pompa türleri arasında şırınga pompaları sürekli çalışma gerektiren küçük ölçekli sistemler için ilk tercih olsa da peristaltik pompalar ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi pompaları da iyi seçeneklerdir (Şekil 1.5). Şırınga pompaları, hassas ve sabit akış hızları elde etme kolaylığı nedeniyle çoğu mikroakışkan cihazda kullanılabilir. Peristaltik pompalar viskoz ve kaymaya duyarlı sıvılarla çalışmak için idealdir; HPLC pompaları ise genellikle yüksek basınç altında çalışarak şırınga pompalarından daha yüksek bir akış hızı sağlar. Bununla birlikte, HPLC pompaları valf arızası olasılığı nedeniyle viskoz sıvılarla kullanılamaz (Batista vd., 2020; Li vd., 2021; Melvad, Krühne, ve Frederiksen, 2010; Zeng, Li, ve Wang, 2015).

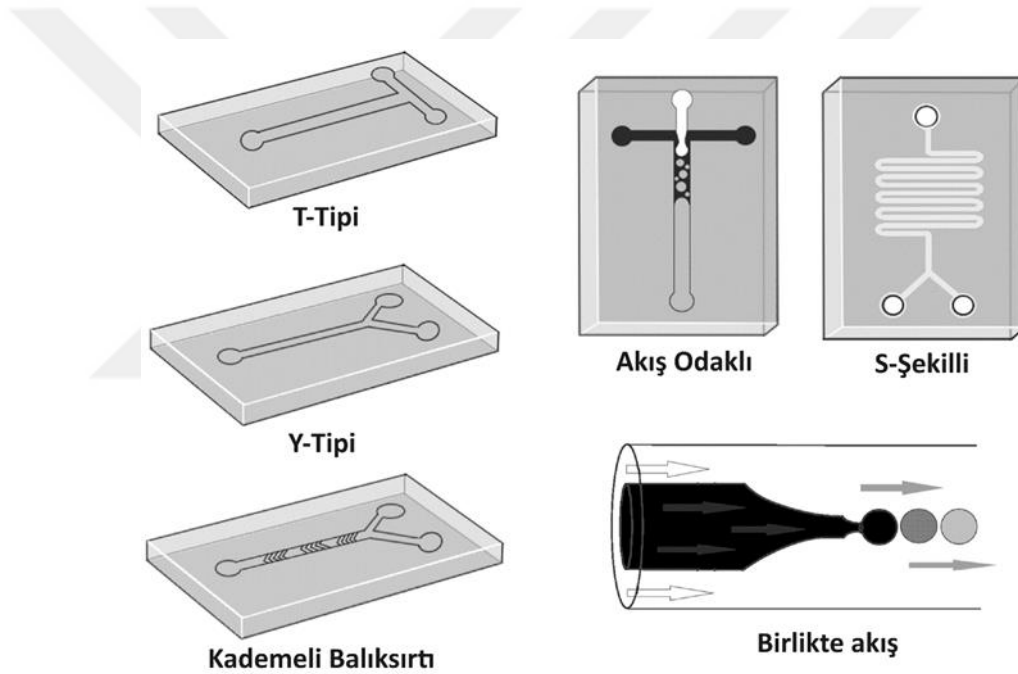


Şekil 1.5. Harici pompa türleri.

Mikro pompalar ise mikroakışkan cihaz içerisinde bir akış oluşturmayı ve sürdürmeyi amaçlayan çip üzerine gömülü dahili aktif cihazlardır. Çalışmak için harici bir etkiye ihtiyaç duyarlar. Mikro mikserlerden farklı olarak türbülanslı değil sürekli laminar bir akış oluştururlar. Mikro pompalar, yaygın olarak optik kuvvetler aracılığı ile çalıştırılır. Bu yaklaşım, hızlı dönüş hızı, uzaktan çalıştırma ve birkaç rotoru eşzamanlı olarak çalıştırma imkanı sağlar. Küçük sıvı damlalarında bulunan yüzey gerilimi de sıvıyı pompalamak için kullanılabilir. Pasif pompalama tekniği, sıvı damlalarının iç basıncındaki değişikliklerle sıvıyı hareket ettirmenin bir yolunu sağlar (Zhang, Xing, ve Li, 2007).

Mikroakışkan sistemlerde nanoparçacık üretimi konusu açısından bakarsak, bu sistemlerin, formülasyon bileşenleri olan sıvıları karıştırma yeteneği esas olacaktır. Bu nedenle, çeşitli mikroakışkan karıştırma teknikleri kullanılır. Kanal ağı içerisine mikro mikserler dahil edilir. Mikro mikserler iki veya üç boyutlu olabilir ve genellikle aktif veya

pasif olarak sınıflandırılır. Mikro mikserlerin büyük çoğunluğu pasiftir. Pasif mikro mikserler akışkanları itmek, akışkan içindeki partikülleri yönlendirmek veya ayırmak için herhangi bir dış kuvvet kullanmaz, akışkanın türbülans ve kaotik ilerlemesini oluşturmak için şekil ve geometrileri kullanılır ve sıvıların birbirine karışması difüzyon yoluyla gerçekleşir. Karışma işlemi difüzyon yolu ile gerçekleştiğinden, karıştırmanın performansı akışkanlar arasındaki temas alanına ve temas halinde oldukları süreye bağlıdır. Pasif mikro mikserler laminar akışı bozmak, sıvılar arasındaki temas alanını en üst düzeye çıkarmak ve sonuç olarak karıştırma performansını iyileştirmek için çeşitli geometriler halinde tasarlanabilir (Hessel, Löwe, ve Schönfeld, 2005). Bunlar T-tipi, Y-tipi, akış odaklı, birlikte akış (*co-flowing*), S-şekilli, kademeli balıksırtı mikro mikser gibi geometriler olabildikleri gibi bazı mikroakışkan sistemlerde bu geometriler kombine halde de kullanılabilir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Farklı tasarımlara sahip mikro mikser türleri (Bezelya, Küçüktürkmen, ve Bozkır, 2023).

Pasif mikro mikserler, aktif mikro mikserlere göre daha düşük maliyet, daha fazla taşınabilirlik ve Çip-Üstü-Laboratuvar sistemlerine daha kolay entegrasyon gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Daha basit ve daha ekonomik olmalarına rağmen pasif karıştırıcılar bazı dezavantajlara da sahiptir. Kanalı uzatarak sıvıların temas alanını artırmak, kanala ek akışkan direnci sağlarken, akış hızını yavaşlatarak temas süresini artırmak mikroakışkan sistemin veriminin azalmasına neden olur. Aktif bir mikro mikserde ise, karıştırma olayını tetiklemek veya hızlandırmak için harici bir kuvvet veya harici bir fiziksel alan (örneğin manyetik, elektro kinetik, termal, akustik, ultrasonik) kullanılmaktadır, böylece karıştırma performansı artırılır.

Aktif karıştırıcılar genellikle pasif karıştırıcılardan daha verimlidir. Ancak, platforma harici bir kuvvet veya alan entegre etme gereksinimi, istenmeyen karmaşıklık ve ek maliyetler getirdiğinden, aktif karıştırıcılar hızlı prototipleme ve ticari uygulamalar için daha az uygun bir seçenek haline gelir (Kamat vd., 2023). Tercih edilen karıştırıcı tipi genellikle karıştırılması gereken reaktiflerin türüne ve çalışma akışkan rejimine bağlıdır. Bazı karıştırıcılar daha hızlı akış hızlarında daha verimli olurken, diğerleri daha yavaş akış hızlarında daha verimli çalışır (Beebe, Mensing, ve Walker, 2002).

Akış özelliklerini düzenlemek için kullanılabilecek bir diğer bileşen türü mikro valflerdir. Bir mikro valf, mikro ölçekli bir valftir, yani mikroakışkan sistem içerisinde bölümler arasındaki akışı düzenleyen iki portlu bir bileşendir. Mikroakışkan cihazların temel bileşenlerinden biridir ve akışkan aktarımını kontrol etmek için kullanılırlar. İki tür valf vardır: enerji gerektirmeyen pasif valfler ve çalışma için enerji kullanan aktif valfler. Bir cihazda kullanılan valf türü, uygulama için gereken kontrol miktarına ve türüne bağlıdır (Peshin, Madou, ve Kulinsky, 2022).

1.2.4. Mikroakışkanların Avantajları ve Dezavantajları

Azaltılmış boyut ölçeği ve daha büyük yüzey-hacim oranı sayesinde mikroakışkan teknolojilerinin geleneksel makro ölçekli platformlara kıyasla daha az numune ve reaktif hacmi gerektirmesi, daha yüksek verimle çalışmaları, daha yüksek hassasiyet göstermeleri, düşük maliyetleri, küçültülmüş boyutları nedeniyle daha kolay taşınabilir olmaları, biyolojik sistemleri taklit etme yetenekleri, numuneleri daha hızlı işlemeleri ve otomatik ve yüksek düzeyde entegre olma potansiyelleri sayesinde insan hatalarını azaltmaları gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Mikroakışkan sistemlerin avantajları (Bezelya, Küçüktürkmen, ve Bozkır, 2023).

Mikroakışkan teknolojilerin bir "çip üzerinde laboratuvara" entegrasyonu, numunelerin tek bir platformda işlenmesi ve analiz edilmesi için güçlü bir çözüm sunar ve geleneksel yöntemlere göre çoklu işlem ve daha hızlı bir süreç kontrolü sağlar. Mikro boyutlu kanalların gösterdiği laminer akış gibi, geleneksel sıvı işleme platformlarında görülmeyen bazı akış özellikleri çeşitli yaratıcı uygulamalara izin vermektedir (Surappa vd., 2023). Mikroakışkan cihazların dikkate değer özelliklerinden biri, belirli hücreleri, biyomolekülleri, bakterileri ve partikülleri seçici olarak yakalama ve serbest bırakma yetenekleridir. Geleneksel analiz cihazlarıyla karşılaştırıldığında, mikroakışkan platformları temassız çalışma, etiketsiz algılama, yüksek doğruluk, iyi hassasiyet ve minimum reaktif gereksinimi gibi çeşitli avantajlar sunar (Gong, Cretella, ve Lin, 2023). Nanopartikül üretimi alanında mikroakışkan teknolojiler çok çeşitli bileşimlere ve işlemlere sahip partiküller üretmek için kullanılabilirler ve geleneksel üretim yöntemlerine göre çok sayıda avantaj sunarlar. Kontrollü ve güvenli ilaç üretimi için nanopartikül üretiminde, küçük boyut ve geniş yüzey alanı, değiştirilebilir yüzey kimyası, yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve yüksek yüzey-hacim oranı ve tekrarlanabilirliğe sahip mikro/nanopartiküller mikroakışkan cihazlarla üretilebilir. Emülsiyon polimerizasyonu, dispersiyon polimerizasyonu, püskürterek kurutma vb. gibi geleneksel mikro/nanopartikül sentez yöntemleri sıklıkla yüksek polidispersiteye, zayıf tekrarlanabilirliğe, sınırlı işlemlere ve düzensiz morfolojiye sahip mikro/nanopartiküller üretir. Mikroakışkan sistemler kullanılarak nanopartikül üretilmesinin en önemli avantajlarından biri, geleneksel yöntemlere kıyasla daha küçük boyutlu ve daha homojen partiküller üretme yeteneğidir. Mikroakışkanlar, sıvı fazların akış hızını manipüle ederek üretilen partiküllerin boyutu üzerinde kolay kontrol sağlar,

enkapsülasyon etkinliğini ve etken madde yükleme kapasitesini artırır. Mikroakışkan cihazın yapı tasarımı, akış hızı düzenlemesi, malzeme bileşimi modülasyonu ve sıvı viskozitesi seçimi ile mikro/nanopartikülün boyutu, yapısı, işlevi ve dağılımını hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Bu sayede farklı bileşimlere ve özelliklere sahip çeşitli partiküller kolayca tasarlanabilir. Mikroakışkanlara dayalı yaklaşımlar, artan hassasiyet, entegrasyon yetenekleri, yüksek esneklik ve hammadde tüketiminin azalması nedeniyle maliyet etkinliğinin yanı sıra daha güvenli kullanım ve depolama gibi avantajlar sağlamaktadır. Çeşitli ısıtıcılar, sensörler, akış kontrol elemanları gibi yapılarla kolayca entegre edilebilme yetenekleri, ısı transferinin iyileştirilmesi, sıcaklık ve besleme akışlarının geri bildirim kontrolü, tekrarlanabilirlik ve yerinde reaksiyon izleme gibi avantajlar sağlayabilir. Ayrıca, ayrı ayrı tasarlanabilen mikro kanallar ve rezervuarlardan oluşan mikrofabrik ağlar içeren tek bir çip üzerinde çoklu işlem aşamaları ve/veya paralel reaksiyonlar uygulanabilir. Dahası, mikroakışkanların kullanımı sentez alanını (örneğin sıcaklık, basınç, reaktifler) geleneksel parti prosedürlerinde kolayca erişilemeyen koşullara genişletir ve böylece karmaşık mühendislik nanoyapılarının ve yeni malzeme sistemlerinin gerçekleştirilmesi için yeni yöntemler açar. Mikroakışkan teknolojilerle oluşturulan partiküller pH duyarlılığı ve kontrollü salım gibi gelişmiş niteliklere sahip olabilir (Forigua vd., 2021; Jia, Gao, ve Wang, 2022). Bununla birlikte, mikroakışkanlar, mikro/nanopartikül sentezi alanında bazı kaçınılmaz zorluklarla karşı karşıyadır. Mikroakışkanların nanopartikül sentezine uygulanmasındaki temel zorluk, ürünler sistemi tıkamadan istenen malzemeleri istenen koşullarda (basınç, sıcaklık, kimyasal uyumluluk, konsantrasyon...) üretebilen mikrosistemler tasarlamaktır. Karmaşık geometrilere ve konfigürasyonlara sahip cihazların üretimi, üretim maliyetlerini ve işlem karmaşıklığını artırmaktadır. Mikroakışkan cihazların tasarımı ve üretimi yüksek vasıflı teknisyenler gerektirmektedir. Mikroakışkan cihazların çeşitliliği, biyologları ve kimyagerleri bu tekniği laboratuvarlarında uygulamaktan caydırmaktadır. Sistemi oluşturmak için kullanılan her bir malzemenin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Yapılacak işlemin gereklilikleri göz önünde bulundurularak, malzeme seçimi ve cihazı üretimi dikkatlice tasarlanmalıdır. Örneğin PDMS gibi yaygın olarak kullanılan mikroakışkan çip malzemeleri, hidrofobik küçük moleküllü ilaçları adsorbe edebilir ve bu da ilaç araştırmalarında etkili bir şekilde kullanılamamalarına neden olur. Bu sorunu çözmek için yüzey modifikasyonu ile adsorpsiyonu azaltmak gerekebilir. Malzeme sentezi sırasında kanalların tıkanması da bazı sistemler için zorlayıcı olmaya devam etmektedir (Marre ve Jensen, 2010; Wu vd., 2023).

1.3. Polimerik Nanopartiküler Sistemler

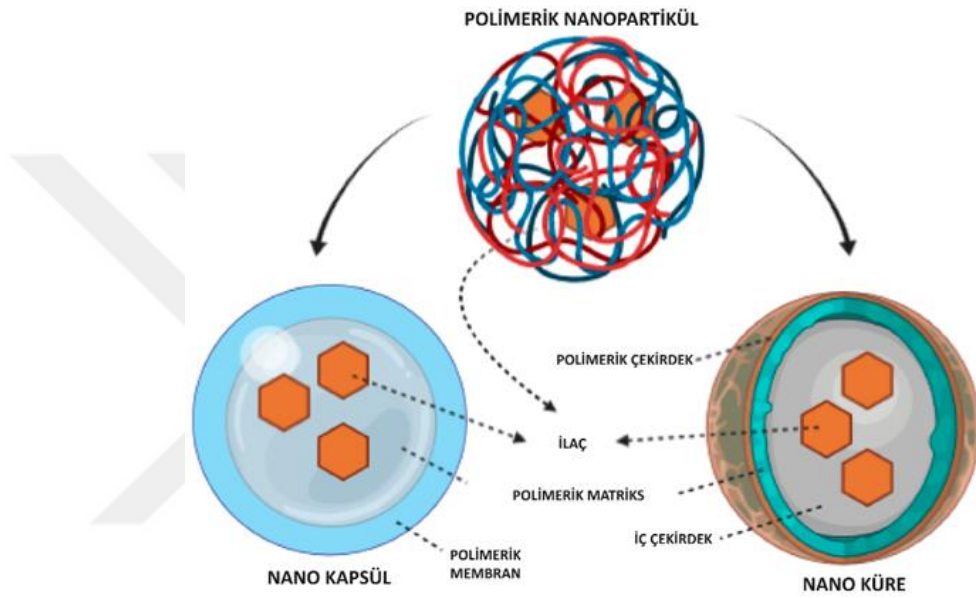
Polimer bazlı nanopartiküller 1970'lerden beri etken madde verilmesi ve görüntüleme uygulamaları için inceleme altındadır ve hedeflemeye katkıda bulunan sayısız avantajları nedeniyle araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, kararlılıkları ve NP özelliklerinin ve etki süresinin hassas kontrolünü sağlamak için hazırlanabilmeleri nedeniyle tercih edilirler (Agha vd., 2023; Zimmermann vd., 2023).

Polimerik NP'leri üretmek için hem doğal hem de sentetik polimerler kullanılmaktadır; sentetik polimerler daha geniş bir formülasyon çeşitliliği ve partiden partiyeye daha hassas bir tutarlılık sunmaktadır. Sentetik polimerler arasında PLGA, poli(alkil siyanoakrilat) (PACA), poli(etilen oksit) (PEO), poli(laktik asit) (PLA), polianhidritler, poli(L-Lizin) (PLL) ve poli-kaprolakton (PCL) gibi polimerler bulunurken, doğal polimerler arasında kitosan, jelatin, hyaluronan ve aljinat gibi örnekler bulunmaktadır (Liu vd., 2022; Maged vd., 2022).

Polimerik nanopartiküllerin üretim süreçleri nispeten basittir ve polimerler farklı özelliklere sahip çok çeşitli monomerlerden sentezlenebildiğinden, tasarlanmış polimerik NP'ler çeşitli şekillerde, boyutlarda veya gözeneklilik gibi farklı yüzey özelliklerine sahip olacak şekilde üretilir. Bu da onları etken madde taşıyıcı sistem olarak çeşitli uygulamalar için oldukça uyarlanabilir ve özelleştirilebilir hale getirir. Kullanılan malzeme ve tekniğe bağlı olarak, çeşitli yapı ve özelliklere sahip farklı nihai NP ürünleri elde edilebilir. Polimerik NP'lerde, etken madde molekülleri NP'nin çekirdeklerine enkapsüle edilebilir, polimer matrislere hapsedilebilir, konjuge edilebilir ya da partikül oluşumundan sonra yüzeylerine bağlanabilir. Dahası, spesifik uyarıcı unsurlar yoluyla terapötik ajanları serbest bırakacak şekilde tasarlanabilirler (Agha vd., 2023; Pondman, Le Gac, ve Kishore, 2023; Zimmermann vd., 2023).

Polimerik nano yapıları sistemler içerisinde nano küreler, nano kapsüller, nano emülsiyonlar ve nano jeller gibi yapılar sayılabilir. Nano küreler, etken maddenin polimerik ağlar içinde hapsediği veya yüzeyine yapıştığı, kompakt ve homojen bir polimer matrisinden oluşur. Nano kapsüller ise, etken maddenin bir rezervuar görevi gören akışkan bir iç çekirdekte bulunduğu ve bu çekirdeğin tek bir polimer katmanla çevrildiği veziküller sistemlerdir (Şekil 1.8). İyi tasarlanmış nano kapsül kabukları enkapsüle edilmiş etken maddeleri korur,

dış uyaranlara yanıt olarak iç yapısındaki etken maddeleri istenilen anda serbest bırakır. Nano jeller ise, hidrojellerin ve kolloidal partiküllerin özelliklerine sahip üç boyutlu çapraz bağlı yapılardır. Nano jeller etken maddeleri dış ortamdan etkili bir şekilde koruyabilir ve yüzey modifikasyonu yoluyla ilaçları belirli dokulara ve/veya hücrelere taşıyabilir. Nano emülsiyonlar, moleküllerin taşınması ve dağıtımı için en umut verici kolloidal sistemlerden birini temsil etmekte olup ilaç, kozmetik, gıda ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Wu vd., 2023; Zimmermann vd., 2023).



Şekil 1.8. Nano kapsül ve nano küre yapısının şematik gösterimi (Zielińska vd., 2020).

Polimerik NP'lerin hazırlanması için literatürde tanımlanan birçok yöntem vardır. Bununla birlikte, en yaygın kullanılan süreçler önceden oluşturulmuş polimerlerin kullanıldığı süreçlerdir. Bu grupta çeşitli teknikler vardır, ancak öne çıkanlar çözücü emülsifikasyon-buharlaştırma, çözücü emülsifikasyon-difüzyon ve nano presipitasyon gibi sentetik polimerlerin kullanıldığı tekniklerdir (Zimmermann vd., 2023). Bu geleneksel yöntemler genellikle "yığın yöntemine" dayanmaktadır, bu nedenle genellikle karıştırma, çekirdeklenme ve partikül büyümesi üzerinde kontrolden yoksundurlar, bu da büyük boyutlu, geniş boyut dağılımlı ve heterojen NP yapısına sahip NP'lerin oluşmasına neden olur (Liu vd., 2022). Bu yöntemler kullanılarak üretilen NP'lerin klinik uygulaması, sınırlı ölçeklenebilirlik, reaksiyon parametreleri üzerinde çok az kontrol, geniş nanopartikül polidispersitesi, seriden seriye zayıf tekrarlanabilirlik ve büyük miktarlarda kimyasal ve terapötik ajan kullanma ihtiyacı gibi sentez sırasında var olan sınırlamalar nedeniyle kısıtlıdır. Buna karşılık, mikroakışkan

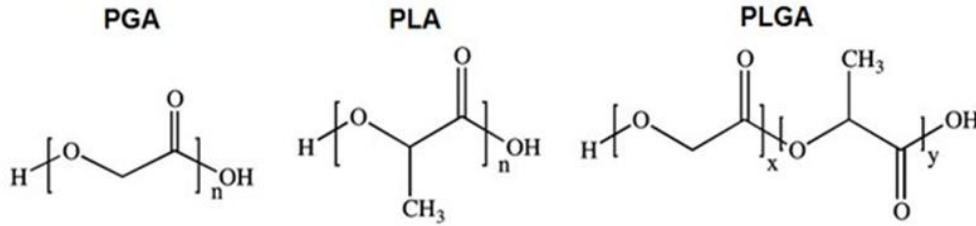
cihazlar, polimerik nanopartiküllerin yapımı ve sentezi için yeni bir yol sağlar. Polimer bazlı NP'lerin mikroakışkanlarla üretiminin avantajı boyut, boyut dağılımı ve morfolojik özellikler gibi fizikokimyasal özelliklerin kontrolünün geliştirilmesine dayanmaktadır (Fabozzi vd., 2023). Çok yönlü HFF (*hydrodynamic flow-focusing*) cihazı, kademeli balıksırtı mikro karıştırıcı, iki fazlı gaz-sıvı mikroakışkan karıştırıcılar, otomatik mikroakışkan akış reaktörü, T-tipi (*T-junction*), birlikte akış (*co-flowing*) mikroakışkanlar ve darbe jetli mikro mikserler son yıllarda sentetik polimer NP'leri hazırlamak için geliştirilmiştir (Jia, Gao, ve Wang, 2022).

1.3.1. PLGA

PLGA, biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu ile tanınır, geniş bir erozyon süresi yelpazesi ve ayarlanabilir mekanik özellikler sunar. Özellikle hem ticari hem de araştırma ortamlarında küçük moleküllü etken maddeler, proteinler ve çeşitli makromoleküller için kontrollü salım sistemleri tasarlamak için kapsamlı olarak araştırılan FDA onaylı bir polimerdir. Özelleştirilebilir bozunma özellikleri ve kanıtlanmış klinik geçmişi ile PLGA hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları barındıran sürekli salım stratejilerinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Polimer moleküler ağırlığı, laktik-glikolik oranı ve etken madde konsantrasyonu gibi faktörleri kontrol ederek polimer-ilâç matrisinin genel fiziksel özelliklerini uyarlamak mümkündür (Danhier vd., 2012; Makadia ve Siegel, 2011).

PLGA kopolimerleri amorf yapıdadır ve camsı geçiş sıcaklığı 45 ila 55°C arasındadır. Diklorometan, tetrahidrofur, etil asetat, kloroform, hekzafloroizopropanol, aseton ve benzil alkol gibi çok çeşitli çözücülerde çözünürler. PLGA formları tipik olarak kullanılan monomerlerin oranı ile karakterize edilir. Örneğin, PLGA 50:50, %50 laktik asit (LA) ve %50 glikolik asitten (GA) oluşan bir kopolimeri ifade eder. Polimeri meydana getiren monomer oranının (LA: GA) polimerin özellikleri üzerinde belirgin bir etkisi vardır. Bu nedenle, PLGA'nın biyomedikal uygulamalarda kullanımı, taşıyıcı sistemin vücuttaki bozunma kinetiğini yönlendirecek uygun LA ve GA oranının seçilmesine bağlıdır. Bu, belirli etken madde türüne bağlı olarak istenen dozaj ve salım aralıklarının elde edilmesini sağlar (Makadia ve Siegel, 2011). PLGA, homo polimerleri olan polilaktik asit (PLA) veya poliglikolik asite (PGA) göre daha hızlı bozunma kinetiğine sahiptir. PLA polimeri, düzensiz konfigürasyonuna atfedilen oldukça amorf bir yapıya sahip bir polimer zincirinden oluşur, metil yan gruplarının varlığı nedeniyle PGA polimerine kıyasla daha fazla hidrofobiklik sergiler. PGA herhangi bir metil yan grubu içermez ve PLA'nın aksine oldukça kristal yapı gösterir (Şekil 1.9). Bu nedenle laktik bakımından zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofiliktir, daha az su emer

ve daha yavaş bozunur. PLGA'nın fizyolojik koşullar altında özelliklerinde meydana gelen değişim, içerdiği etken madde moleküllerinin salım ve bozunma oranlarını etkileyebilir (Kapoor vd., 2015). Ayrıca PLGA polimerinin PEGilasyonu veya kitosan kaplama gibi yüzey modifikasyon teknikleri PLGA nanopartiküllerinin negatif yüklerini sırasıyla nötr veya pozitif yüklere kaydırabilir.



Şekil 1.9. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı (Miranda vd., 2020).

PLGA, biyolojik olarak parçalanabilen en başarılı polimerlerden biridir çünkü polimer omurgası boyunca bulunan ester bağlarının rastgele hidrolize olduğu sulu ortamda hidrolitik bozunmaya uğrar. Hidroliz ile parçalanması sonucunda metabolit monomerler olan laktik asit ve glikolik asit üretir. Bu monomerler endojendir ve vücut tarafından krebs döngüsü yoluyla kolayca metabolize edilir, bu da PLGA ilaç dağıtımı veya biyomateryal uygulamaları için kullanıldığında minimum sistemik toksisite ile sonuçlanır. Hidrolitik bozunma dışında PLGA ayrıca oto-katalitik bozunmaya da uğrayabilir. Oto-katalitik bozunma sırasında, asidik yan ürün, bozunma sürecini otomatik olarak katalize eden ve yüksek derecede asidik mikro ortama neden olan polimer kütesinde sarılı kalır. Biyolojik sistemde laktik asit ve glikolik asit oluşumu lokal asiditeyi artırarak özellikle terapötik proteinler olmak üzere hapsedilen ilaçların stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Asidik mikro çevrenin, PLGA matrisinden hapsedilen proteinlerin stabilizasyonunun ve zayıf salımının temel nedenlerinden biri olduğu gözlemlenmiştir. Proteinleri stabilize eden suda az çözünen bazların dahil edilmesi yoluyla pH kontrolü ile daha iyi ilaç stabilitesi elde edilmiştir. Bunun yanı sıra Pluronik F68, trehaloz, sodyum bikarbonat gibi çeşitli stabilizatör ajanlar protein stabilitesini artırmak için test edilmiştir (Danhier vd., 2012; Kapoor vd., 2015).

1.3.2. Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen ve saflaştırılan nanopartiküllerin karakterizasyonu, bu partiküllerin kalitelerini ve özelliklerini belirlemek ve dolayısıyla biyomedikal uygulamalara uygunluklarını kontrol etmek için kritik bir adımdır (Crucho ve Barros, 2017). Polimerik

nanopartiküllerde yapılan karakterizasyon ve kontrollerden bazıları morfolojik karakterizasyon, partikül büyüklüğü ve dağılımı, termal özellikler, yüzey özellikleri, kristal yapı analizi, yüzey alanı ve porozite, içerik ve saflık, mekanik özellikler, stabilite ve depolama koşulları, nano partikül ve biyolojik ortamlar arasındaki etkileşimler ve toksisite testleri olarak sayılabilir. Çizelge 1.2’de çeşitli karakterizasyon yöntemleri paylaşılmıştır. Stabilite tayini için zaman içerisinde çeşitli koşullarda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği gibi çeşitli özelliklerde görülen değişimler değerlendirilebilir (das Neves vd., 2013). Biyolojik ortamlar arasındaki etkileşimler ve toksisite testleri hücre kültürü çalışmaları ve hayvan deneyleri ile gerçekleştirilebilir (Voigt vd., 2014).

Çizelge 1.2. Polimerik nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesine yönelik temel teknikler (Lin vd., 2014).

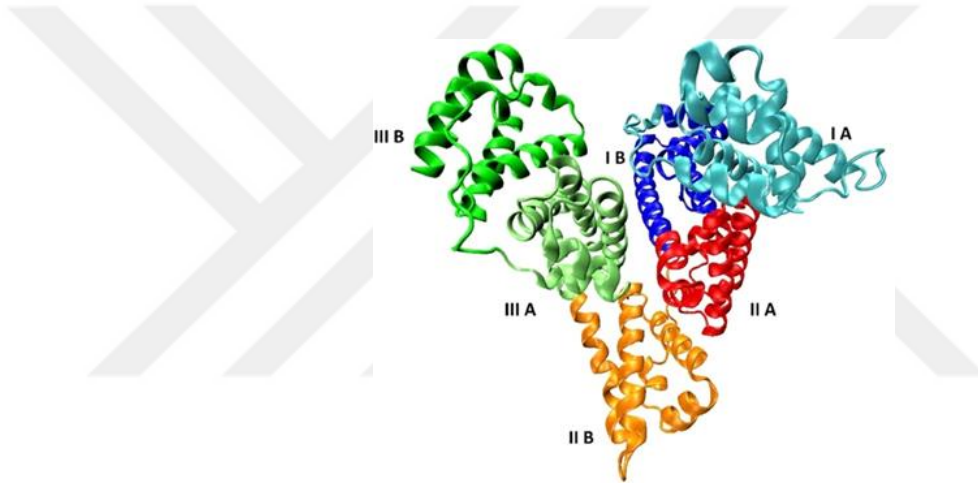
Teknikler	Analiz edilen fizikokimyasal özellik
Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	Boyut ve boyut dağılımı Şekil Yapı Adsorpsiyon Agregasyon
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Stabilite Erime Kristalleşme Camsı geçiş
Dinamik ışık saçılımı (DLS)	Hidrodinamik boyut dağılımı
Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	Boyut ve boyut dağılımı Şekil heterojenliği Agregasyon
Zeta potansiyeli	Yüzey yükü Stabilite

1.4. Model Proteinler

Protein modelleri ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde protein davranışını anlamak için gerekli önemli yapısal bilgiler sunar. Karşılaştırmalı modelleme her zaman kusursuz yapılar vermese de modeller ilgili proteinlerin çeşitli formülasyonda uygulanabilirliklerini ve kullanışlılıklarını hakkında fikir sahibi olunmasını sağlar.

1.4.1. BSA

Sığır serum albümini (BSA), 66,5 kDa moleküler ağırlığa sahip, 583 amino asitin tek bir amino asit zinciri halinde bir araya gelmesiyle oluşan monomerik bir proteindir (Şekil 1.10). Karaciğer tarafından üretilen BSA, kan plazmasının önemli bir bileşenidir. BSA, laboratuvarlarda biyokimyasal ve doku kültürü ortamlarında takviye olarak yaygın bir şekilde kullanılır, hücre dışı sıvı hacmini stabilize eder ve steroidler, yağ asitleri ve tiroit hormonları gibi küçük moleküller için bir taşıyıcı görevi görür. BSA'nın dikkate değer bir yönü, toksik ve antijenik olmayan doğasıdır (Roy vd., 2019). BSA, ilaç geliştirme, protein saflaştırma ve gıda işleme dahil olmak üzere çeşitli araştırma ve endüstriyel alanlarda uygulama alanı bulmaktadır.



Şekil 1.10. BSA yapısının gösterimi. Altı BSA alt alanı farklı renklerle vurgulanmıştır (Oliva vd., 2020).

BSA molekül uzunluğu boyunca eşit olarak yüklenmemiştir, sığır albümini için pH 7'de hesaplanan net yük I, II ve III bölgelerinde -10'dan -8'e ve 0'a kademeli olarak düşmektedir. İnsan albümini için rakamlar -9, -8 ve +2 ve sıçan albümini için -9, -5 ve +2'dir (Peters Jr, 1985). BSA'nın pI değeri yaklaşık olarak 5'tir (Salis vd., 2011).

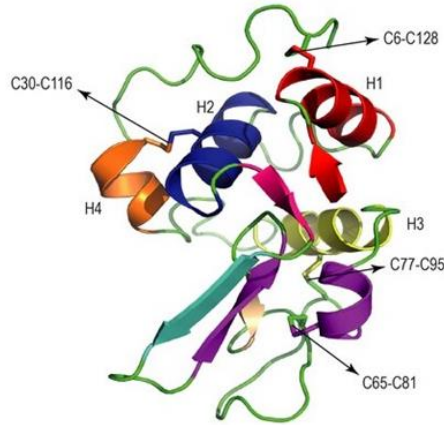
BSA, nanopartikül formülasyonlarında yaygın ve kapsamlı bir şekilde çalışılan bir protein olarak öne çıkmaktadır. BSA'nın yüksek saflığı, suda çözünürlüğü, maliyet etkinliği ve kolay bulunabilirliği ve oldukça stabil yapısı onu ilaç endüstrisinde temel bir ürün haline getirmektedir. Bu doğal özellikler, BSA'nın çok çeşitli araştırma ve geliştirme çabaları için tercih edilen bir model protein olmasını sağlamıştır. BSA, çok yönlülüğü ve çeşitli ilaç

uygulama sistemleriyle uyumluluğu sayesinde nanopartikül formülasyonları için hem bir ilaç taşıyıcı hem de bir model protein olarak ikili rol oynamaktadır (Yadav ve Yadav, 2021).

1.4.2. Lizozim

Lizozim bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunur. İnsan lizozimi burun boşluğu ve gözyaşı kanallarının mukoz membranlarında eksprese edilir. Ayrıca tükürük, gözyaşı, süt, servikal mukus, lökositler ve böbrek dokusunda da bulunur. Lizozim bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde önemli rol oynayan bir enzimdir. Bunu, belirli bakteri hücre duvarlarının spesifik bir bileşeni olan peptidoglikana saldırarak yapar. Peptidoglikan, peptit köprüleri ile çapraz bağlanmış, tekrar eden amino şekerlerden, N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asitten (NAM) oluşur. Lizozim, NAG ve NAM arasındaki bağı hidrolize ederek bakterinin geçirgenliğini artırır ve bakterinin parçalanmasına neden olur. Özellikle aralarında bir dizi gıda patojeninin de bulunduğu gram-negatif bakterilere karşı bakteriyostatik, bakteriyolitik ve bakteriyosidal aktivite gösterir (Lesnierowski ve Kijowski, 2007).

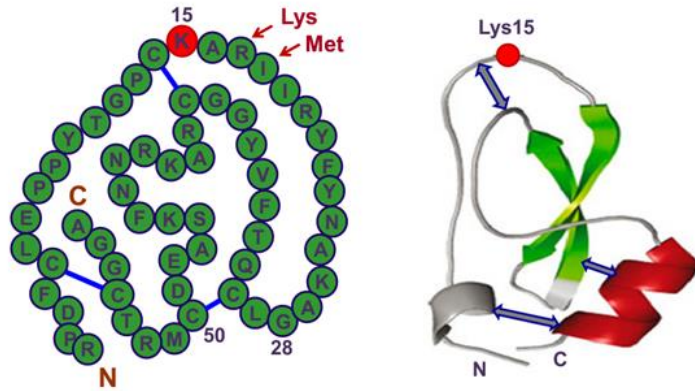
Araştırmalarda kullanılan lizozimin büyük bir kısmı tavuk yumurtası akından saflaştırılır. Biyolojik aktiviteye sahip bir preparat olarak ticari ölçekte elde edilebilir. Lizozim 1922 yılında Fleming tarafından keşfedildiğinden beri, bu protein, protein yapısı ve işlevi üzerine yapılan araştırmalar için bir model olarak ortaya çıkmıştır. Yıllar içinde, yüksek çözünürlüklü veri analizleri ile, lizozim hakkında zengin yapısal bilgiler elde edilmesini sağlamıştır. Lizozimin katlanması üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar, bu proteinin farklı bölgelerinin birbirleriyle dinamik olarak nasıl etkileşime girdiğini göstermiştir (Swaminathan vd., 2011). Yüksek izoelektrik noktaya sahip, 14,3 kDa ağırlığında, 129 amino asit içeren tek bir polipeptit yapısından oluşan, temel bir protein olan lizozim (Şekil 1.11), çeşitli çalışmalarda pozitif yüklü bir protein modeli olarak kullanılmıştır. Bu seçim, ayrıntılı karakterizasyonu ve biyolojik aktivitesini değerlendirmenin kolaylığından kaynaklanmaktadır (Cai vd., 2008). Lizozimin pI değeri 11'dir ve pH 7'de pozitif (+8) yüklüdür (Steudle ve Pleiss, 2011).



Şekil 1.11. Lizoziminin yapısı (Jafari ve Mehrnejad, 2016).

1.4.3. Aprotinin

6512 Da moleküler ağırlığa sahip, tek zincirli, 58 amino asitli bir polipeptit olan aprotinin (Şekil 1.12), kan kaybını ve transfüzyon gereksinimlerini azaltma kabiliyeti nedeniyle kalp cerrahisi prosedürleri sırasında yaygın uygulama alanı bulmuş, anti fibrinolitik özelliklere sahip bir proteinaz inhibitörüdür (Huang vd., 2014).



Şekil 1.12. Aprotinin yapısı (Zhironov, Klenk, ve Wright, 2011).

Aprotinin sığır akciğerinden ekstrakte edilir. Sığır pankreatik tripsin inhibitörü (BPTI) olarak da bilinir. Plazmin, kallikrein, tripsin ve aktive faktör XII dahil olmak üzere çoklu serin proteazları doğrudan inhibe eder. Serbest plazmini nötralize eden geri dönüşümlü enzim-inhibitör kompleksleri oluşturur ve bu da pıhtı lizisini azaltır (Michalets ve Harris, 2018).

Aprotinin, pI değeri 10,5'tir ve fizyolojik pH 7,4'te yüksek pozitif (+6) net yüke sahiptir. Bu nedenle bazı etkilerini negatif yüklü maddeler veya yüzeylerle iyonik etkileşimler yoluyla gerçekleştirir (Agić vd., 2019; Moreau ve Gauthier, 1996). Aprotinin, lizozim ve BSA'nın molekül ağırlıkları, pI değerleri ve yükleri Çizelge 1.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. Aprotinin, lizozim ve BSA'nın molekül ağırlığı, pI değerleri ve yükleri.

	Aprotinin	Lizozim	BSA
Molekül Ağırlığı	6,5 kDa	14,3 kDa	66,5 kDa
pH 7'de Yaklaşık Yük	+6	+8	-18
pI değerleri	10,5	11	4,7

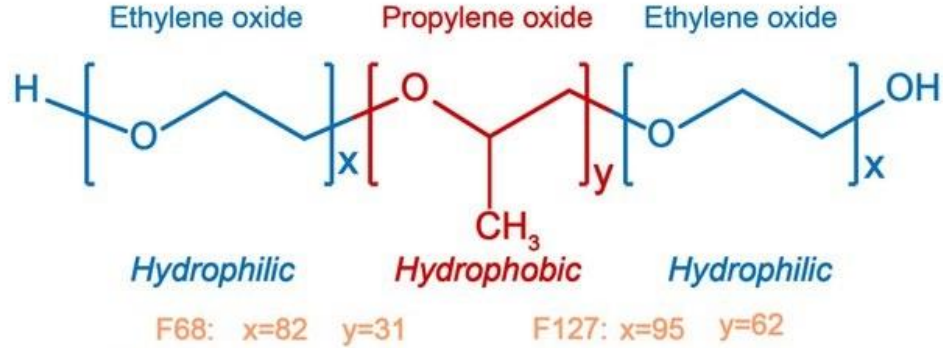
1.5. Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127

Yüzey aktif maddeler (sümfaktanlar), molekül yapısında hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlar bulunduran kimyasal bileşiklerdir. Nanopartikül sentezi sırasında eklenen yüzey aktif maddeler, nanopartikül özelliklerini doğrudan etkiledikleri için optimizasyonda kritik bir rol oynamaktadır (Shaban, Kang, ve Kim, 2020). Sümfaktanlar, nanopartikül formülasyonlarında kritik öneme sahiptir ve yüzey gerilimini azaltma, partikül boyutunu kontrol etme, yüzey modifikasyonu ve dağılım kararlılığı gibi çeşitli nedenlerle kullanılırlar.

Pluronikler, PEO-PPO-PEO şeklinde düzenlenmiş hidrofobik polipropilen oksit (PPO) ve hidrofilik polietilen oksit (PEO) içeren bir sentetik triblok kopolimer sınıfıdır. Biyouyumluluklarının yüksek olması nedeni ile, diğer uygulamaların yanı sıra ilaç verilili, hastalık teşhisi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan noniyonik sümfaktanlardır (Yu vd., 2021).

Pluronic F-68 (poloksamer 188) ve F-127 (poloksamer 407), pluronikler arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA onaylı tek malzemelerdir ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Khaliq vd., 2023). Pluronic® F68; moleküler ağırlığı ~ 8400 g/mol ve hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri ~29 olan bir yüzey etkin maddedir. Pluronic®

F127'nin ise moleküler ağırlığı 12600 g/mol ve hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri ~ 22'dir. Her iki maddenin de kimyasal yapısı Şekil 1.13'te özetlenmiştir.



Şekil 1.13. Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127 kimyasal yapısı (Yu vd., 2021).

Bu tez çalışması kapsamında, özel tasarım mikroakışkan çip kullanılarak polimerik nanopartikül sistemlerinin üretimi gerçekleştirilmiş ve mikroakışkan platformda akış hızı oranları (FRR); toplam akış miktarı (TFR); polimer, protein ve yüzey aktif madde konsantrasyonları düzenlenerek üretilen nanopartikül sistemlerin optimizasyonu sağlanması amaçlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve insanda kullanımı için FDA tarafından onay almış polimerlerden poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılması tercih edilmiştir. Elde edilen nanopartiküllere yüklenmesi için küçük ve büyük molekül ağırlığına sahip örnek proteinler kullanılmıştır. Büyük molekül ağırlığına sahip model protein olarak 66,5 kDa moleküler ağırlığına sahip sığır serum albümini (BSA); küçük molekül ağırlığına sahip model protein olarak 14,3 kDa moleküler ağırlığına sahip lizozim ve 6,5 kDa ağırlığına sahip aprotinin kullanılmış, bu proteinlerin PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu ve *in vitro* değerlendirilmesi yapılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid	Sigma, Almanya
Amonyum persülfat	Sigma, Almanya
Amonyum sülfat	Merck
Aseton	Sigma, Almanya
Asetik asit	Sigma, Almanya
BCA re ajanları	Thermo Scientific, ABD
Brilliant Blue R	Sigma, Almanya
Bromfenol mavisi	Sigma, Almanya
BSA (sığır serum albümini)	Sigma, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma, Almanya
Etanol 96°	Carlo Elba, İtalya
Gliserol	Sigma, Almanya
Glisin	Sigma, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma, Almanya
Lizozim	Merck
Marker (dar aralıklı)	Biolegend, ABD
PLGA (lactide:glycolide 50:50)	Sigma, Almanya
Pluronic® F-68	Sigma, Almanya
Pluronic® F-127	Sigma, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma, Almanya
Potasyum klorür	Sigma, almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, Almanya
Sodyum azotür	Sigma, Almanya
Sodyum asetat	Loba Chemie, Hindistan

Sodyum hidroksit	Sigma, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid	N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid
N,N,N',N' - Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris bazı (TrismaBase)	Sigma, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Ağırlıklı kapatma klipsleri	Spectrum Laboratories, ABD
Buzdolabı	Vestel, Türkiye
Cam malzeme	İldam, Türkiye
Çalkalayıcı İnkübatör	Lab Companion, SI-300, ABD
Çelik iğne ucu	Henke Sass Wolf, Almanya
Derin dondurucu	Heto, Almanya
Diyaliz Membranı (300kDa MWCO)	Spectrum Laboratories, ABD
DSC cihazı	TA DSC Q2000, Çin
Elektroforez Cihazı	Bio-Rad, ABD
Eppendorf Tüpü	Isolab, Almanya
Etüv	Miprolab, Türkiye
Geçirimli Elektron Mikroskobu	ZEISS EVO 40
Hassas Terazı	Mettler Toledo, Almanya
İnfiltrasyon İğnesi	Kruuse, Danimarka
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Kanada
Luer lock Enjektör	Becton Dickinson, ABD
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Mikroakışkan Çip	Nehir Biyoteknoloji, Türkiye
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Mikroplak okuyucu	Molecular Devices, Spectra Max 190, İngiltere
Mikroplak (96 kuyucuklu)	Greiner Bio-One, Almanya
Parafilm	Bemis Packaging, ABD

Partikül büyüklüğü analizi cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Pipet Ucu	Isolab, Almanya
PTFE hortum	Isolab, Almanya
Santrifüj	Sigma 2-16 P, Almanya
Şırınga Pompası	NEW ERA, NE300, ABD
Şırınga Ucu Filtre	Isolab, Almanya
Terazi	RADWAG, Polonya
Ultra santrifüj	Hitachi, CS120FNX, Japonya
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30, Almanya
Vorteks cihazı	Heidolph Reax Top, Almanya
Zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Instruments, İngiltere

2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar

Peptit ve proteinlerin formülasyonlardan salımının araştırılmasında, pH 7,4 fosfat-salin tuz çözeltisi (PBS) ve pH 4,5 asetat tamponu kullanılmıştır. Her iki tampon da, Avrupa Farmakopesi 9'un önerilerine göre hazırlanmıştır (9th Edition of the European Pharmacopoeia, 2016)

pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu (PBS):

Disodyum hidrojen fosfat.....	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat.....	0,19 g
Sodyum klorür.....	8 g
Distile su.....y.m.....	1000 mL

pH 4,5 Asetat Tamponu:

Sodyum asetat.....	2,99 g
2 M Asetik Asit.....	14 mL
Distile su.....y.m.....	1000 mL

Derişik HCl ile pH'ı ayarlanır.

2.2. Yöntemler

2.2.1 BSA, Lizozimin ve Aprotinin Bikinkoninik Asit Yöntemi (BCA) ile Kalibrasyonu

BCA protein analizi, bir numunedeki toplam proteinin miktarının belirlenmesi için kullanılır. Bu yöntemin prensibi, proteinlerin alkali bir çözeltide Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgeyebilmesi (biüret reaksiyonu) ve bikinkoninik asit tarafından mor bir renk oluşumuyla sonuçlanmasıdır. Oluşan renk değişimi bir spektrofotometre kullanılarak 562 nm'de ölçülebilir. Protein konsantrasyonu ve absorbans arasındaki ilişki geniş bir çalışma aralığında doğrusaldır. (Bainor vd., 2011).

İn vitro salım çalışmalarında kullanılmak üzere BSA'nın PBS (pH 7,4 fosfat salin tamponu); lizozim ve aprotinin proteinlerinin, PBS (pH 7,4 fosfat salin tamponu) ve pH 4,5 asetat tamponu ile hazırlanan ve içerdiği protein miktarı bilinen çözeltilerinin BCA yöntemi ile miktar tayinleri yapılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği hesaplamalarında kullanılmak üzere proteinlerin geliştirilen formülasyonlarda sulu faz olarak kullanılan sürfaktan çözeltileri ile hazırlanan protein çözeltileri kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Stok protein çözeltisinden (1 mg/mL) dilüsyonlar yapılarak 5-100 µg/mL konsantrasyonlar arasında sekiz farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden ve kör olarak kullanılmak amacıyla içerisinde protein bulunmaya tamponlardan, mikro plakada bulunan kuyucuklara üç paralel şekilde 100'er µL koyulmuştur. Ardından analiz protokolü gereğince Reajan A ile Reajan B 50:1 oranında karıştırılmış ve her bir kuyucuğa bu karışımdan da 100'er µL eklenmiştir. Mikro plaka 60°C'deki etüvde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda plak oda sıcaklığına kadar soğutulmuş (yaklaşık 10 dakika) ve mikro plaka okuyucusunda (Molecular Devices, Spectra Max 190) 562 nm'de

çözeltilerin absorpsanları ölçülmüştür. İçerdiği protein miktarı bilinen çözeltilerden okunan absorpsan değerleri ile kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon denklemlerinden hareketle örneklerde bulunan toplam protein miktarları hesaplanmıştır.

2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışmaları

Nanopartiküllerin hazırlanmasında mikroakışkan platformda emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan mikroakışkan çipin görseli Şekil 2.1’de paylaşılmıştır. Üretimde iki farklı yüzey aktif madde (Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127), 4 farklı sürfaktan konsantrasyonu (%2, %1, %0,5 ve %0,1), iki farklı PLGA konsantrasyonu (1mg/mL ve 5mg/mL), 6 farklı “Akış Hızı Oranı” (Flow Rate Ratio, FRR), 8 farklı “Toplam Akış Hızı” (Total Flow Rate, TFR), 3 farklı protein (BSA, lizozim ve aprotinin) yüklenmesi ve farklı protein konsantrasyonları denenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında sürfaktan tipi ve konsantrasyonunun, PLGA konsantrasyonunun, FRR ve TFR oranlarının, protein konsantrasyonu ve proteinin fizikokimyasal özelliklerinin formülasyon üzerindeki farklı etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının üretiminde kullanılan PDMS mikroakışkan çipin görseli.

PLGA, aseton içerisinde çözdürülerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve organik faz olarak adlandırılmıştır. Polimerik nanopartikül yapısını oluşturan polimeri içeren bu faz çipin “dış” kanalından şırınga pompası yardımıyla pompalanmıştır. Yüzey aktif maddeler (Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127), distile su içerisinde çözdürülerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Boş (protein yüklü olmayan) formülasyon çalışmalarında, sürfaktanlı faz su fazı olarak adlandırılmış, protein yüklü formülasyonlarda ise sürfaktan fazına protein ilave edilmiş ve su fazı olarak çipin “iç” kanalından şırınga pompası yardımıyla pompalanmıştır. Çıkış kanalından toplanan formülasyon, manyetik karıştırıcı üzerinde 400 rpm’de karıştırılmıştır. Organik çözücüsü uzaklaştırılan formülasyon, 30000 rpm’de 5°C’de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant enkapsülasyon

etkinliği ve miktar tayininde kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Elde edilen şökelti ise nanopartikül karakterizasyon şalışmalarında kullanılmıştır.

2.2.2.1. Protein İçermeyen Nanopartiküllerin Hazırlanması

Protein içermeyen (boş) nanopartiküllerin hazırlanması için yüzey aktif maddeler (Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127) 2 farklı konsantrasyonda (%1 ve %2) hazırlanmış ve su fazı olarak kullanılmıştır. PLGA 2 farklı konsantrasyonda (1 mg/mL vs 5 mg/mL) hazırlanmış ve organik faz olarak kullanılmıştır. Su fazı:organik faz akış oranı (FRR) olarak 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 olmak üzere 5 farklı akış hız oranı denenmiştir. Akış hızları 1 mL/dk’ya orantısal olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu formülasyon şalışmaları ile polimer konsantrasyonu, yüzey aktif madde tipi, yüzey aktif madde konsantrasyonu ve FRR üzerinde yapılan değişikliklerin partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve PDI değerleri üzerindeki genel etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

2.2.2.2. BSA Yüklü Nanopartikül Hazırlanması

BSA yüklü nanopartiküllerin hazırlanması için 2 farklı protein konsantrasyonu (5 mg/mL, 1 mg/mL) denenmiştir. Yüzey aktif maddeler (Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127) 2 farklı konsantrasyonda (%1 ve %2) hazırlanmıştır. PLGA 2 farklı konsantrasyonda (1 mg/mL vs 5 mg/mL) hazırlanmıştır. FRR oranları 1:1 ve 1:2 (su fazı:organik faz) olarak denenmiştir. Hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI ve enkapsülasyon etkinliği parametreleri değerlendirilmiş, bu parametrelerden hareketle seçilen formüllerde *in vitro* salım şalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3. Lizozim Yüklü Nanopartikül Hazırlanması

Lizozim yüklü nanopartiküllerin hazırlanması için 4 farklı protein konsantrasyonu (5 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL) denenmiştir. Yüzey aktif maddeler (Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127) 4 farklı konsantrasyonda (%2, %1, %0,5 ve %0,1) hazırlanmıştır. PLGA 2 farklı konsantrasyonda (1 mg/mL vs 5 mg/mL) hazırlanmıştır. FRR oranları 1:0,5, 0,5:0,5, 1:1, 1:2, 2:1, 3:1, 5:1 (su fazı:organik faz) olarak denenmiştir. Su fazının PBS 7,4 ile hazırlanması denenmiştir. Hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI ve enkapsülasyon etkinliği parametreleri değerlendirilmiş, bu parametrelerden hareketle seçilen formüllerde *in vitro* salım şalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.4. Aprotinin Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Aprotinin yüklü nanopartiküllerin hazırlanması için 3 farklı protein konsantrasyonu (5 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL) denenmiştir. Yüzey aktif madde olarak Pluronic® F-68 kullanılmış ve 2 farklı konsantrasyonda (%2, %1) hazırlanmıştır. PLGA 2 farklı konsantrasyonda (1 mg/mL vs 5 mg/mL) hazırlanmıştır. FRR oranları 1:1 ve 3:1 (su fazı:organik faz) olarak denenmiştir. Hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI ve enkapsülasyon etkinliği parametreleri değerlendirilmiş, bu parametrelerden hareketle seçilen formüllerde *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.3. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması

Elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) belirlemek için dinamik ışık saçılma yöntemi (Malvern Zetasizer NanoZS) kullanılmıştır. Ölçümler 3 seri şeklinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

2.3.2. Zeta Potansiyeli Analizi

Nanopartiküllerin yüzeyindeki yüklerin değişimini belirlemek için zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Üretilen farklı nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler 3 seri şeklinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

2.3.3. Hazırlanan Formülasyonlarda Madde Miktar Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında madde miktar tayini indirekt yöntemle saptanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar, 30000 rpm hızında 1 saat boyunca 5 °C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantta bulunan peptit ve protein konsantrasyonu microBCA yöntemi kullanılarak mikropilaya okuyucuda ölçülmüştür. Yapılan analiz 3 seri şeklinde tekrarlanmıştır.

2.3.4. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Bölüm 2.3.3'te anlatılan şekilde indirekt yöntem kullanılarak elde edilen örnekler, Bölüm 2.2.1'de anlatılan miktar tayini metoduna göre ölçülmüştür. Enkapsülasyon etkinliğinin (%EE) hesaplanması için eşitlik 2.1 kullanılmıştır.

$$(2.1) \% EE = [(A1-A2) / A1] * 100$$

A1: Nanopartikül formülasyonuna başlangıçta eklenen madde miktarı

A2: Süpernatantta bulunan madde miktarı

2.3.5. *In Vitro* Salım Çalışmaları

In vitro çözünme hızı testi ya da bir diğer ifade ile *in vitro* salım çalışmaları, geliştirilen ilaç formülasyonlarının *in vivo* performansının tahmin edilmesinin yanı sıra, ürünlerin güvenilirliğinin, etkinliğinin ve kalitesinin değerlendirilmesi için de önemli bir araçtır (Shen ve Burgess, 2013). Nanopartikül tabanlı formülasyonların etken madde salım profillerinin belirlenmesinde genellikle sürekli akış, diyaliz membran ve örnek ayrıştırma yöntemleri kullanılır. DM yöntemi, nanopartiküllerin *in vitro* salımını değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemdir (Weng, Tong, ve Chow, 2020).

Maddelerin nanopartikül formülasyonlarından *in vitro* çözünme hızı çalışmaları için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. *In vitro* çözünme hızı çalışmaları BSA, lizozim ve aprotinin yüklenen nanopartikül formülasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Çözünme ortamı olarak pH 7,4 PBS tamponu ve pH 4,5 asetat tamponu kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda salım ortamına %0,05 oranında sodyum azit bakteriyostatik olarak ilave edilmiştir. Hazırlanan nanopartiküller 0,5 mL çözünme ortamında disperse edilerek diyaliz membrana (Sigma, 300 kDa MWCO) yerleştirilmiştir. Membranlar 25 mL çözünme ortamına konulmuş, 37±0,5°C ve 50 rpm'e ayarlanan çalkalayıcı inkübatöre yerleştirilmiştir. 1 ay boyunca belirli aralıklarla 0,5 mL salım numuneleri alınmış, alınan salım numuneleri eşit hacimde taze çözünme ortamı ile değiştirilmiştir. Alınan numunelerde mikroBCA yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır. Deneysel çalışma her bir nanopartikül formülasyonu için üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve formülasyonlardan açığa çıkan yüzde madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek *in vitro* salım profilleri elde edilmiştir.

2.3.6. SDS-PAGE Analizi

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), proteinleri veya nükleik asitleri elektroforetik hareketliliklerine göre ayırmak için yaygın olarak kullanılan bir tekniği tanımlar. Proteinler için, sodyum dodesil sülfat (SDS), proteinleri doğrusallaştırmak ve doğrusallaştırılmış proteinlere negatif bir yük vermek için protein örneğine uygulanan anyonik bir deterjandır. Bu prosedüre SDS-PAGE adı verilir (Roy ve Kumar, 2014). Bir proteinin görünür moleküler ağırlığı, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE), proteinin göç mesafesinden belirlenebilir (Matsumoto, Haniu, ve Komori, 2019). Bu amaçla SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Proteinlerin formülasyon sürecindeki stabilitesini kanıtlamak için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır.

SDS-PAGE için %10'luk ve %20'lik ayırma jeli hazırlanmış ve cam kasetler arasına dökülmüştür. Hazırlanan jelin bekletilerek donması sağlanmıştır. İn vitro salım hızı çalışmalarından elde edilen numunelerde 40 µL alınmış, üzerlerine 10 µL hazırlanan örnek tamponundan eklenmiştir. Örnek tamponu ile karıştırılan numunelere 95 °C'de 5 dakika bekletilerek redüksiyon işlemi yapılmıştır. Cam kasetler içindeki jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir Her bir formülasyon için 20 µL örnek kuyucuklara uygulanmıştır. İç ve dış rezervuarlar elektroforez tamponu ile gerekli yerlere kadar doldurulmuştur. 100 volt gerilim uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel, cam kasetler arasından dikkatlice çıkartılarak oda sıcaklığında bir saat fiksasyon, iki saat sensitizasyon çözeltisiyle çalkalanmış ve sonrasında boyama çözeltisinde bir gece boyunca çalkalanmıştır. Bir sonraki gün jel, bir saat destaining I çözeltisinde (boyayı geri alma çözeltisi), yaklaşık 2 saat boyunca destaining II çözeltisinde çalkalanmıştır. Boyanın uzaklaştırılmasının ardından jelin fotoğrafı çekilmiş ve ultra saf su içerisinde saklanmıştır. BSA yüklü nanopartikül formülasyonları için %10'luk jel, lizozim ve aprotinin yüklü nanopartikül formülasyonları için %20'lik jel kullanılmıştır.

SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 2.1'de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler.

Ayırma Jeli	%10'luk	%20'lik
%30 Akrilamid Karışımı	2,67 mL	5,33 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2 mL	2 mL
Distile su y.m.	3,2 mL	0,5 mL
%10 a/h SDS	0,08 mL	0,08 mL
%10 a/h Amonyum persülfat	0,08 mL	0,08 mL
TEMED	0,008 mL	0,008 mL
TEMED ve %10 a/h amonyum persülfat polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.		
%30 Akrilamid Karışımı	100 mL	
Akrilamid	29 g	
N, N'-metilenbisakrilamid	1 g	
Distile su y.m.	100 mL	
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	100 mL	
Tris	18,2 g	
Distile su y.m.	100 mL	
Konsantre HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlanır.		
%10 SDS	100 mL	
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	10 g	
Distile su y.m.	100 mL	
pH 7,2'ye ayarlanır.		
%10'luk Amonyum persülfat	2 mL	
Amonyum persülfat	0,2 g	
Distile su y.m.	2 mL	
Elektroforez tamponu	1000 mL	
Tris	3 g	
Glisin	14,4 g	
SDS	1 g	
Distile su y.m.	1000 mL	
pH 8,3'e ayarlanır.		

Çizelge 2.1. Devam. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler.

Fiksasyon çözeltisi	100 mL
Etanol	40 mL
Metanol	10 mL
Distile su y.m.	100 mL
Asetik asit	10 mL
Sensitizasyon çözeltisi	100 mL
Amonyum sülfat	10 g
Distile su y.m.	100 mL
Asetik asit	1 mL
Boyama çözeltisi	100 mL
Etanol	45 mL
Distile su y.m.	100 mL
CBBR-250	0,125 g
Asetik asit	5 mL
Destaining çözeltisi-I	100 mL
Etanol	40 mL
Distile su y.m.	100 mL
Asetik asit	5 mL
Destaining çözeltisi-II	100 mL
Etanol	67 mL
Distile su y.m.	100 mL
Asetik asit	3 mL

2.3.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Lizozim, lizozim nanopartikül, aprotinin, aprotinin nanopartikül, boş nanopartikül ve PLGA'nın termal özellikleri TA Q2000 DSC cihazı ile incelenmiştir. Yaklaşık 2-5 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek preslenmiştir. Azot gazı 50 mL/dakika akış hızında kullanılarak, örnekler 25-300 °C sıcaklık aralığında 10°C/dk doğrusal ısıtma hızında analiz edilmiştir. Analizde kör olarak boş pan kullanılmıştır.

2.3.8. Nanopartikül Formülasyonunun Görüntülenmesi

Nanopartikül formülasyonunun şekli ve yüzey morfolojisinin görüntülenmesi için Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi gerçekleştirilmiştir. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi için hazırlanan nanopartikül formülasyonu distile su ile disperse edilmiştir. Daha sonra 200 mesh bakır grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. FEI Tecnai G2 marka TEM (120 Kw) cihazı ile görüntülenmiştir.

2.3.9. Stabilité Çalışmaları

Farmasötik ürünlerin kararlılığını ve güvenliğini değerlendirmek için stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, ürünlerin zaman içinde kalitesini, etkinliğini ve güvenliğini koruyup koruyamadığını belirlemek için yapılmıştır.

Hazırlanan formülasyonun stabilitesini değerlendirmek amacıyla, ürünün farklı saklama koşullarındaki dayanıklılığı incelenmiştir. Bu kapsamda, hazırlanan formülasyon hem oda sıcaklığında (25°C ± 2) hem de buzdolabı koşullarında (4°C ± 2) depolanarak, her iki ortamda gösterdiği değişimler partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği (%EE) açısından analiz edilmiştir. Stabilité çalışmalarına 30 gün devam edilmiştir.

2.3.10. Hücre Canlılığı Testi

Gelişme aşamasındaki hücreler, farklı dozlarda ilaçlara maruz kaldıklarında çeşitli tepkiler gösterirler. Bu tepkiler apoptoz veya nekroz gibi hücre ölümüyle sonuçlanabileceği gibi, hücrelerin proliferasyon yeteneklerini kaybetmeleriyle de sonuçlanabilir. Yaşayan hücreler, kullanılan yöntemlerden biri olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-

tetrazolyum bromür) boyasının indirgenmesi yoluyla dolaylı olarak tespit edilir (Das vd., 2017). MTT testinin temel prensibi, sarı renkli ve çözünebilir özellikte olan MTT boyasının, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi tarafından koyu mavi renkli ve çözünmez formazan ürününe dönüştürülmesidir. Oluşan formazan ürünü daha sonra çözünür hale getirilir ve meydana gelen mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

Hücre kültürü çalışmalarında L929 fare fibroblast hücre hattı ve hücre kültür ortamı olarak %1 penisilin ve %10 fetal sıgır serumu içeren kültür ortamı Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanılmıştır. L929 hücreleri sitotoksosite çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta ve sitotoksosite testleri için uluslararası standartlar (ISO, 2009) tarafından referans hücre dizisi olarak gösterilmektedir (Karamustafa vd., 2006).

Çalışmada, boş nanopartikülün, BSA yüklü nanopartikülün, lizozim yüklü nanopartikülün ve aprotinin yüklü nanopartikülün, hücre canlılığına etkilerini incelemek için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi kullanılmıştır.

96 kuyucuklu plakta kuyucukların her birine 1×10^4 L929 fare fibroblast hücresi olacak şekilde hücreler ekilmiş ve %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kültür ortamı uzaklaştırılarak, boş nanopartikül, BSA yüklü nanopartikül, lizozim yüklü nanopartikül ve aprotinin yüklü nanopartikül tatbik edilmiş ve yeniden 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, her kuyucuğa 100 µL taze hücre ortamı ve 13 µL MTT çözeltisi (PBS içinde 5 mg/mL konsantrasyonda) ilave edildikten sonra örnekler 2 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda ortam uzaklaştırılarak, örneklerin üzerine oluşan mor renkli formazon bileşiklerini çözmek için 100 µL dimetilsülfoksit çözeltisi eklenmiş ve 570 nm'de mikroparka okuyucu ile absorbanslar ölçülüp kontrol grubu canlılığı %100 kabul edilerek diğer örneklerin hücre canlılık hesapları yapılmıştır. Deneyler 10 paralel olacak şekilde yapılmıştır (Yücel vd., 2022).

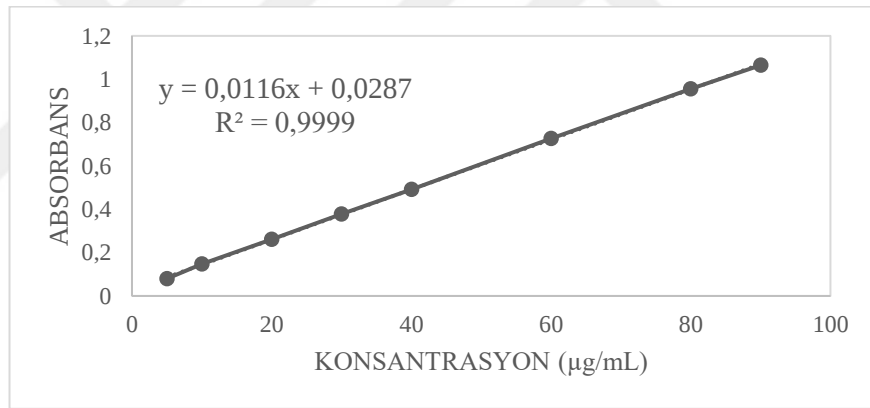
3. BULGULAR

3.1. Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular

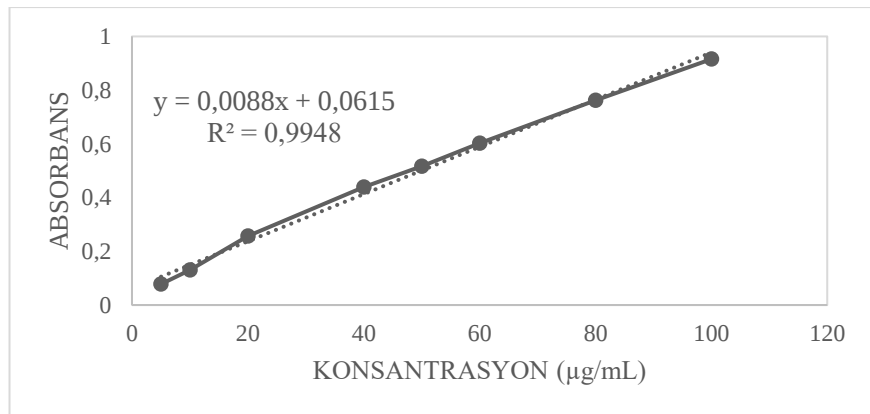
Tüm ölçümler bölüm 2.2.1’de açıklanan şekilde yapılmış ve kalibrasyonlara ait grafik ve denklemler bulunmuştur.

3.1.1. BSA Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular

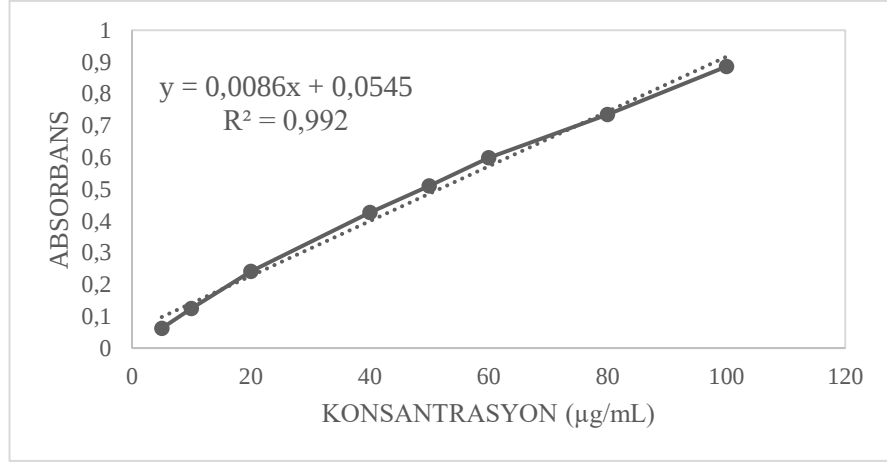
Grafikler sırasıyla BSA pH 7,4 fosfat-salin tampon kalibrasyonu için Şekil 3.1’de, BSA %1 Pluronic® F-68 kalibrasyonu için Şekil 3.2’de, BSA %2 Pluronic® F-68 kalibrasyonu için Şekil 3.3’te, BSA %1 Pluronic® F-127 kalibrasyonu için Şekil 3.4’te, BSA %2 Pluronic® F-127 kalibrasyonu için Şekil 3.5’te verilmiştir.



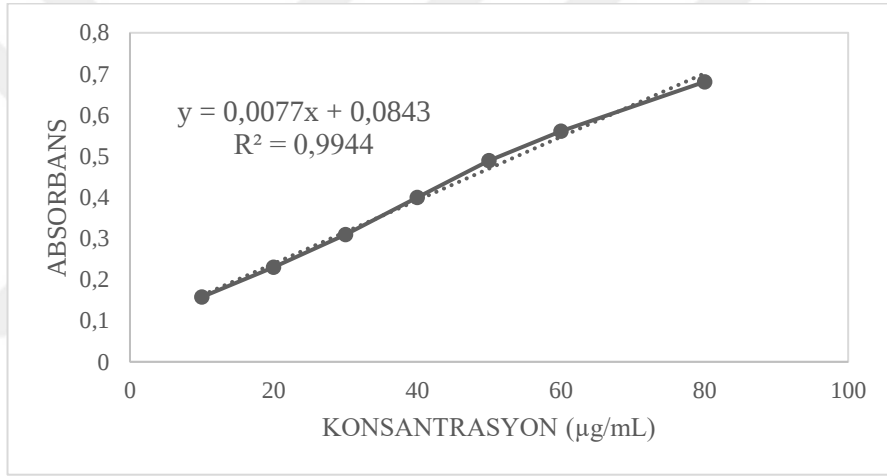
Şekil 3.1. BSA'nın PBS pH 7,4 ile kalibrasyon grafiği.



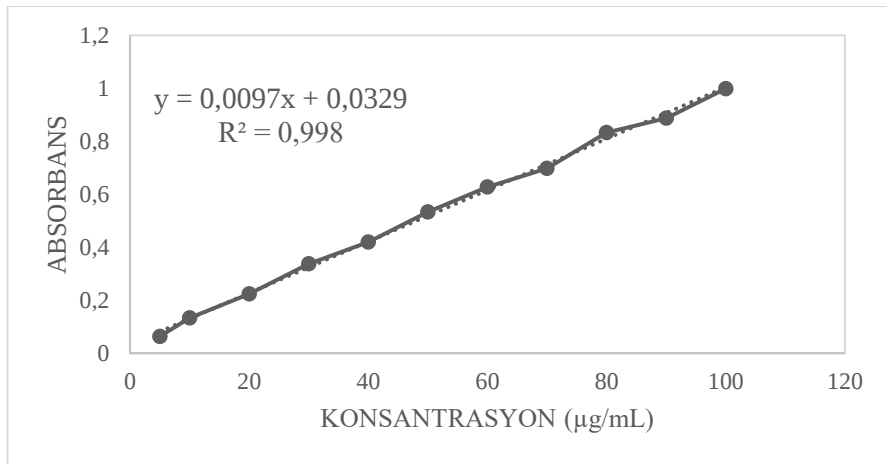
Şekil 3.2. BSA'nın %1 Pluronic® F68 ile kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.3. BSA'nın %2 Pluronic® F68 ile kalibrasyon grafiği.



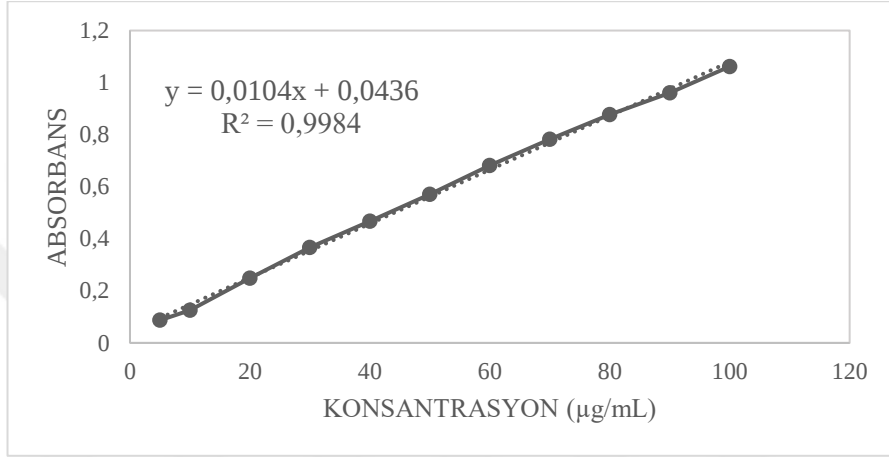
Şekil 3.4. BSA'nın %1 Pluronic® F127 ile kalibrasyon grafiği.



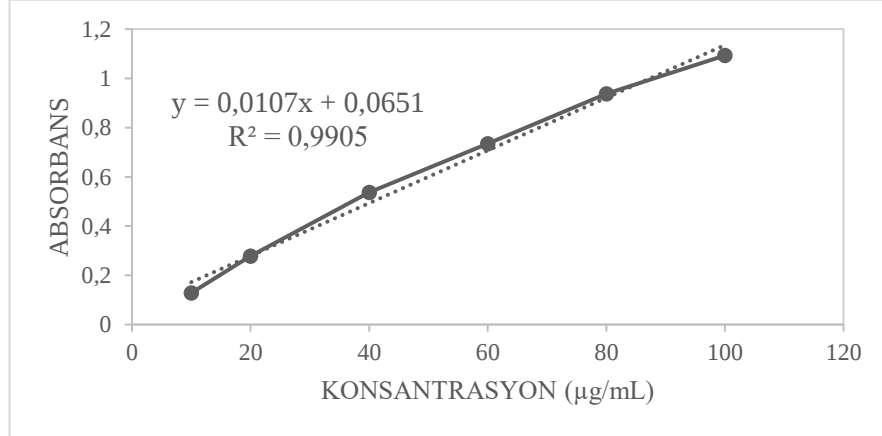
Şekil 3.5. BSA'nın %2 Pluronic® F127 ile kalibrasyon grafiği.

3.1.2. Lizozim Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular

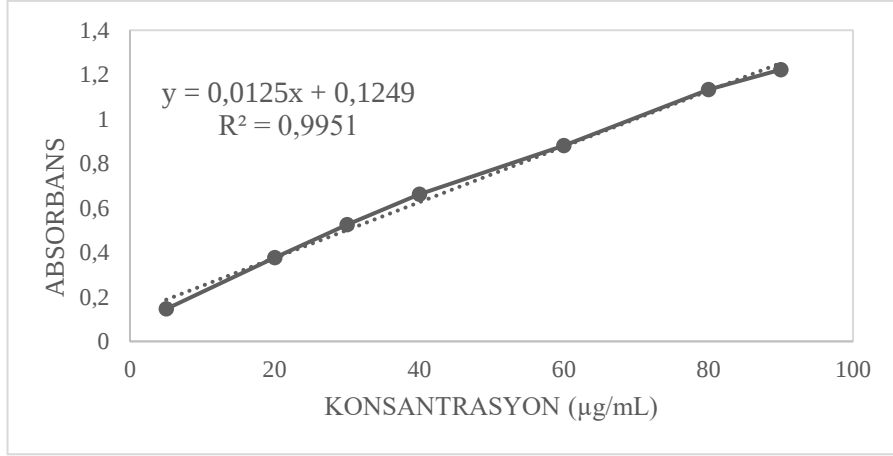
Grafikler sırasıyla lizozim pH 7,4 fosfat-salin tampon kalibrasyonu için Şekil 3.6’da, lizozim pH 5,5 asetat tampon kalibrasyonu için Şekil 3.7’de, lizozim %0,1 Pluronic® F-68 kalibrasyonu için Şekil 3.8’de, lizozim %0,5 Pluronic® F-68 kalibrasyonu için Şekil 3.9’da, lizozim %1 Pluronic® F-68 ile kalibrasyonu için Şekil 3.10’da, lizozim %2 Pluronic® F-68 kalibrasyonu için Şekil 3.11’de verilmiştir.



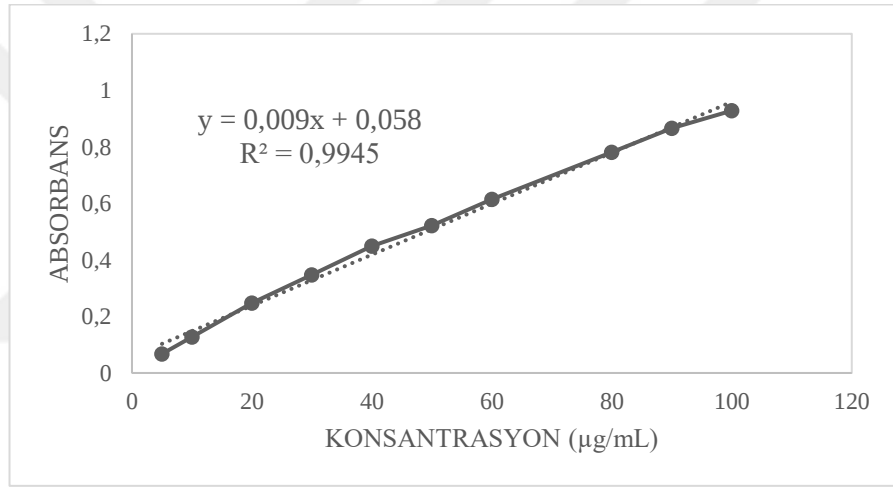
Şekil 3.6. Lizozim pH 7,4 PBS tamponu ile kalibrasyon grafiği.



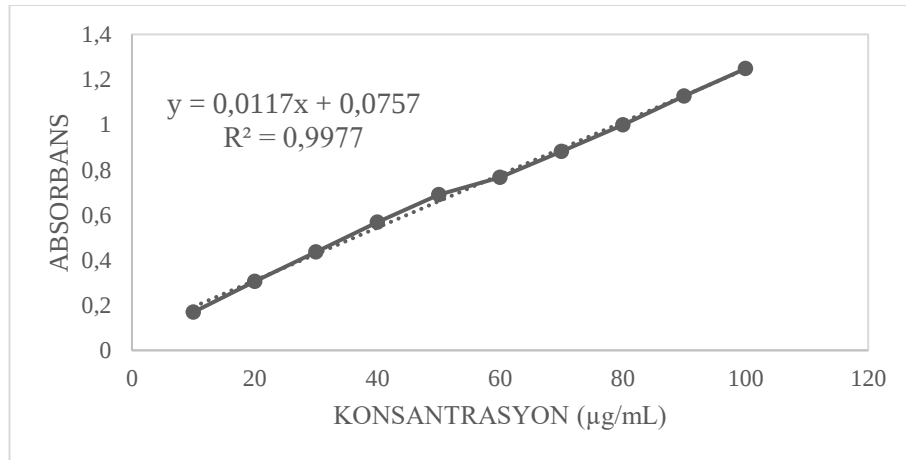
Şekil 3.7. Lizozim pH 5,5 Asetat tamponu ile kalibrasyon grafiği.



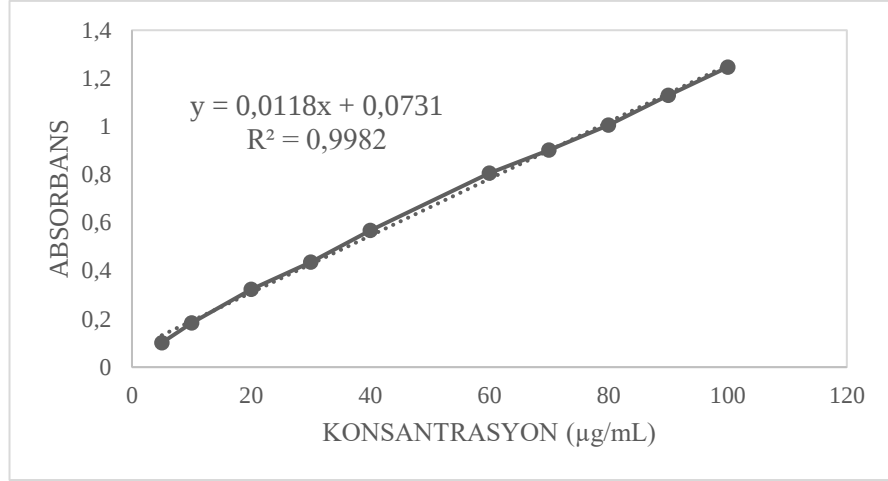
Şekil 3.8. Lizozim %0,1 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.9. Lizozim %0,5 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği.



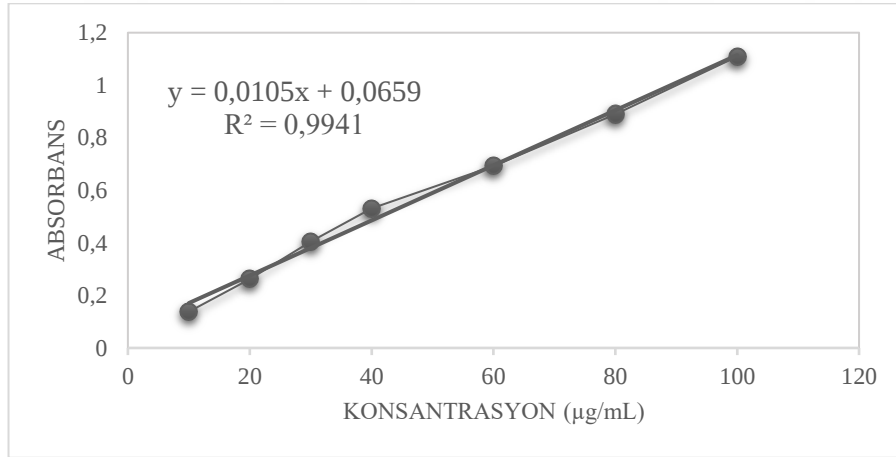
Şekil 3.10. Lizozim %1 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği.



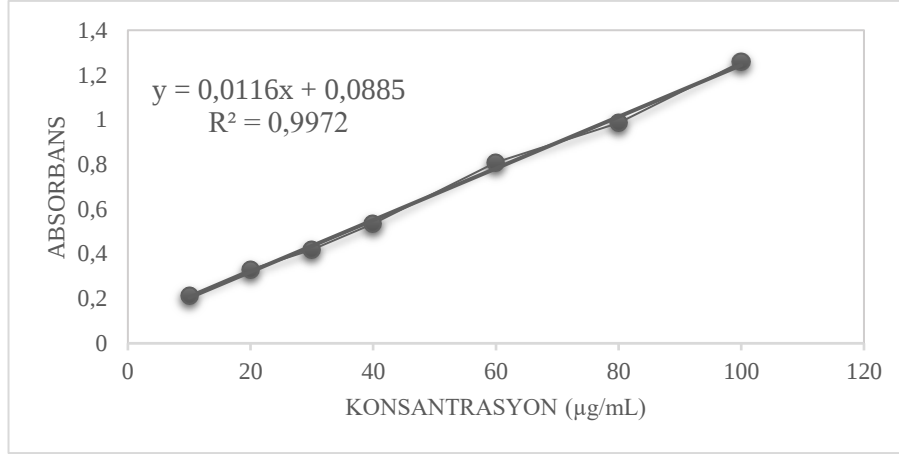
Şekil 3.11. Lizozim %2 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği.

3.1.3. Aprotinin Miktar Tayinleri için Hazırlanan Kalibrasyonlara Ait Bulgular

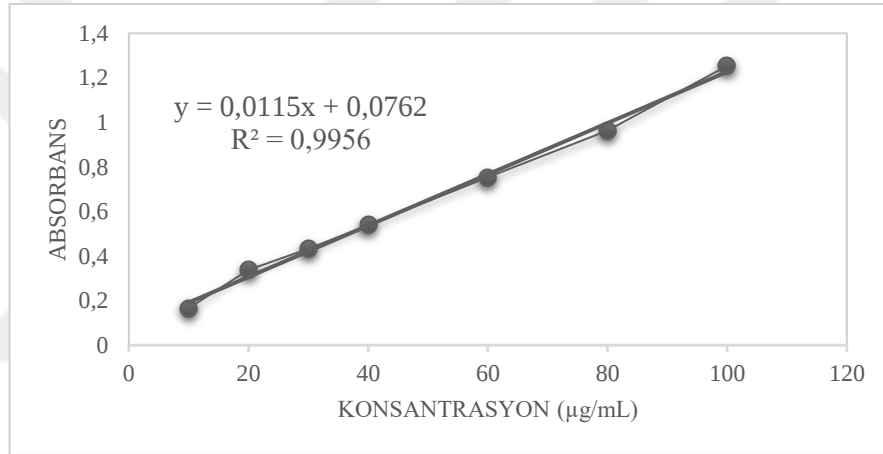
Grafikler sırasıyla aprotinin pH 7,4 fosfat-salin tampon kalibrasyonu için Şekil 3.12’de, aprotinin pH 5,5 asetat tampon kalibrasyonu için Şekil 3.13’te, aprotinin %2 Pluronic® F-68 kalibrasyonu için Şekil 3.14’te verilmiştir.



Şekil 3.12. Aprotinin pH 7,4 PBS tamponu ile kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.13. Aprotinin pH 5,5 Asetat tamponu ile kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.14. Aprotinin %2 Pluronic® F-68 ile kalibrasyon grafiği.

3.2 Protein İçermeyen Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

Protein içermeyen (boş) nanopartiküllere ait formülasyon değerleri ve sonuçlar Çizelge 3.1’de listelenmiştir. Bu çalışma ile polimer konsantrasyonu, yüzey aktif madde türü, yüzey aktif madde konsantrasyonu ve FRR değişikliklerinin partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve PDI değerleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirilerek, protein yüklü NP formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Polimer içeren dış fazın akış oranını arttırdıkça ortalama partikül boyutunun arttığı bulunmuştur. Sürfaktan içeren iç fazın akış oranı arttıkça ortalama partikül boyutunun azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Protein İçermeyen Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları.

Formülasyon adı	Dış faz	İç faz	Akış hızı oranları (mL/dk) iç (süpfaktan): dış (PLGA)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
F1	PLGA 1mg/mL	%1 F68	1:1	163,7 ± 0,7	0,058 ± 0,031	-28,1 ± 0,1
F2	PLGA 1mg/mL	%1 F68	1:2	173,6 ± 1,1	0,035 ± 0,012	-20,3 ± 1,9
F3	PLGA 1mg/mL	%1 F68	1:3	258,2 ± 0,2	0,113 ± 0,017	-30,3 ± 1,2
F4	PLGA 1mg/mL	%1 F68	2:1	147,3 ± 1,1	0,047 ± 0,009	-24,9 ± 1,9
F5	PLGA 1mg/mL	%1 F68	3:1	133,5 ± 0,6	0,118 ± 0,048	-29,1 ± 0,3
F6	PLGA 1mg/mL	%2 F68	1:1	157,8 ± 0,2	0,078 ± 0,015	-26,2 ± 1,1
F7	PLGA 1mg/mL	%2 F68	1:2	169,6 ± 1,6	0,067 ± 0,01	-29,2 ± 0,1
F8	PLGA 1mg/mL	%2 F68	1:3	311,4 ± 1,9	0,24 ± 0,026	-32,7 ± 0,5
F9	PLGA 1mg/mL	%2 F68	2:1	143,5 ± 1,1	0,073 ± 0,007	-21,8 ± 0,9
F10	PLGA 1mg/mL	%2 F68	3:1	127,1 ± 0,8	0,101 ± 0,022	-23,4 ± 0,9

Çizelge 3.1. Devam. Protein İçermeyen Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları.

Formülasyon adı	Dış faz	İç faz	Akış hızı oranları (mL/dk) iç (sürfaktan): dış (PLGA)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV) _{zcc x}
F11	PLGA 1mg/mL	%1 F127	1:1	149,2 ± 0,4	0,039 ± 0,029	-29,9 ± 1,5
F12	PLGA 1mg/mL	%1 F127	1:2	161,1 ± 1,1	0,056 ± 0,006	-28,3 ± 0,4
F13	PLGA 1mg/mL	%1 F127	1:3	168,9 ± 0,8	0,066 ± 0,02	-35,4 ± 5,7
F14	PLGA 1mg/mL	%1 F127	2:1	131,4 ± 0,9	0,045 ± 0,039	-26,6 ± 0,6
F15	PLGA 1mg/mL	%1 F127	3:1	121 ± 0,5	0,169 ± 0,022	-21,2 ± 0,7
F16	PLGA 1mg/mL	%2 F127	1:1	154,5 ± 1,1	0,084 ± 0,046	-27,3 ± 0,5
F17	PLGA 1mg/mL	%2 F127	1:2	164,8 ± 3,9	0,091 ± 0,004	-22,9 ± 1,6
F18	PLGA 1mg/mL	%2 F127	1:3	208,9 ± 1,6	0,054 ± 0,01	-31,4 ± 0,6
F19	PLGA 1mg/mL	%2 F127	2:1	138,5 ± 1,3	0,049 ± 0,044	-24,5 ± 2,3
F20	PLGA 1mg/mL	%2 F127	3:1	123 ± 1,6	0,094 ± 0,019	-21,0 ± 0,3
F21	PLGA 5mg/mL	%1 F68	3:1	249,9 ± 5,7	0,145 ± 0,002	-27,7 ± 0,9

3.3 BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

Hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI ve enkapsülasyon etkinliği parametreleri değerlendirilmiştir. Bu parametreler temel alınarak seçilen formüller üzerinde *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır.

Hazırlanan BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarında ilk olarak BSA konsantrasyonu 5 mg/mL’de, sürfaktan yüzdeleri %2 değerinde, akış hız oranı 1:1’de sabit tutulmuş, sürfaktan tipi olarak Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127 kullanılarak sırasıyla BSANP-1 ve BSANP-2 formülasyonları oluşturulmuş, elde edilen nanopartiküllere ait karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan BSANP-1 ve BSANP-2 formülasyonlarındaki akış hızı oranı ve iç faz sürfaktan oranı değiştirilerek BSANP-3, BSANP-4, BSANP-5, BSANP-6, BSANP-7 ve BSANP-8 formülasyonları oluşturulmuştur. Formülasyon parametreleri Çizelge 3.2’de paylaşılmıştır.

Dış fazın 5 mg/mL PLGA, iç fazın %2 Pluronic® F68 ve BSA konsantrasyonunun 5 mg/mL olduğu BSANP-1 formülasyonunda ortalama partikül büyüklüğü 192,6 nm bulunurken diğer parametrelerin sabit tutulup iç faz sürfaktan oranının %1’e düşürüldüğü BSANP-5 formülasyonunda çip kanalları içerisinde mikro boyutlarda partiküller oluşmuştur. BSANP-1 formülasyonuna kıyasla tüm parametrelerin sabit tutulup akış hız oranının 1:2 olarak değiştirildiği BSANP-3 formülasyonunda da mikro boyutlarda partiküllerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde dış fazın 5 mg/mL PLGA, iç fazın %2 F127 ve BSA konsantrasyonunun 5 mg/mL olduğu BSANP-2 formülasyonunda ortalama partikül büyüklüğü 167,9 nm bulunurken diğer parametrelerin sabit tutulup iç faz sürfaktan oranının %1’e düşürüldüğü BSANP-6 formülasyonunda çip kanalları içerisinde mikro boyutlarda partiküller oluşmuştur. BSANP-2 formülasyonuna kıyasla tüm parametrelerin sabit tutulup akış hız oranının 1:2 olarak değiştirildiği BSANP-4 formülasyonunda da mikro boyutlarda partiküllerin oluştuğu gözlemlenmiştir. BSANP-1 formülasyonuna kıyasla hem iç faz sürfaktan oranının %1’e düşürüldüğü hem de akış hız oranının 1:2 olarak değiştirildiği BSANP-7; BSANP-2 formülasyonuna kıyasla hem iç faz sürfaktan oranının %1’e düşürüldüğü hem de akış hız oranının 2:1 olarak değiştirildiği BSANP-8 formülasyonlarında da mikro boyutlarda partiküller oluşmuştur. Sonuç olarak BSA konsantrasyonunun 5mg/mL olarak belirlendiği bu 8 formülasyondan yalnızca BSANP-1 ve BSANP-2 formülasyonlarında nanopartikül yapısı başarı ile oluşturulabilmiştir.

Formülasyon geliştirme denemelerine, çalışılan 8 formülasyonun tamamında 5 mg/mL’de sabit tutulan BSA ve PLGA konsantrasyonları 1 mg/mL’ye sabitlenerek devam edilmiştir. (PLGA-BSA konsantrasyon oranı sabit tutulmuştur.) BSANP-1 ve BSANP-2 formüllerine kıyasla diğer tüm parametrelerin sabit tutulup BSA ve PLGA konsantrasyonlarının 1 mg/mL olarak değiştirildiği BSANP-9 ve BSANP-10 formülasyonlarında ortalama partikül büyüklüğünün azaldığı, ancak buna karşılık olarak mutlak zeta potansiyeli değerinin ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir. BSANP-9 ve BSANP-10 formülasyonlarında diğer tüm parametreler sabit tutulup akış hızı oranı 1:2’ye ayarlanarak sırasıyla BSANP-11 ve BSANP-12 formülasyonları üretilmiştir. BSANP-9 ve BSANP-10 formülasyonlarına kıyasla ortalama partikül büyüklüğü artmış, enkapsülasyon etkinliği değerleri azalmıştır. BSANP-9, BSANP-10, BSANP-11 ve BSANP-12 formülasyonlarının diğer tüm formülasyon parametreleri sabit tutulup iç faz sürfaktan oranı %2’den %1’e düşürülerek sırasıyla BSANP-13, BSANP-14, BSANP-15 ve BSANP-16 formülasyonları hazırlanmıştır. Oluşturulan bu formülasyonlarda ortalama partikül büyüklüğü artmış, enkapsülasyon etkinliği azalmış ancak mutlak zeta potansiyelleri artmıştır. Sonuç olarak BSA ve PLGA konsantrasyonlarının 1 mg/mL olarak belirlendiği bu 8 formülasyonun tamamı mikro boyutta partikül oluşumu gözlemlenmeden oluşturulmuş, karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Formülasyon parametreleri Çizelge 3.2’de paylaşılmıştır.

Yapılan tüm formülasyon çalışmaları incelendiğinde, sürfaktan olarak Pluronic® F-68’in kullanıldığı formülasyonların, diğer parametreleri sabit tutulup sürfaktan olarak Pluronic® F-127 kullanılan formülasyonlara kıyasla zeta potansiyeli mutlak değerlerinin daha yüksek olduğu ve enkapsülasyon etkinliklerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak Pluronic® F-68 kullanılan formülasyonlarda ortalama partikül büyüklüğünün daha yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

Ortalama partikül büyüklüğü, zeta değerleri ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirilerek BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülleri *in vitro* salım çalışmaları yapılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 3.2. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları.

Formülasyon adı	Dış faz	İç faz	İç faz BSA konsantrasyonu	Akış hızı oranları (mL/dk) iç faz: dış faz	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)	%EE
BSANP-1	PLGA 5 mg/mL	%2 F68	5mg/mL	1:1	192,6 ± 0,8	0,103 ± 0,022	-34,3 ± 0,6	92,02 ± 3,79
BSANP-2	PLGA 5 mg/mL	%2 F127	5mg/mL	1:1	167,9 ± 0.5	0,201 ± 0,015	-30,3 ± 0,1	91,58 ± 1,99
BSANP-3*	PLGA 5mg/mL	%2 F68	5mg/mL	1:2	*	*	*	*
BSANP-4*	PLGA 5mg/mL	%2 F127	5mg/mL	1:2	*	*	*	*
BSANP-5*	PLGA 5mg/mL	%1 F68	5mg/mL	1:1	*	*	*	*
BSANP-6*	PLGA 5mg/mL	%1 F127	5mg/mL	1:1	*	*	*	*
BSANP-7*	PLGA 5mg/mL	%1 F68	5mg/mL	1:2	*	*	*	*

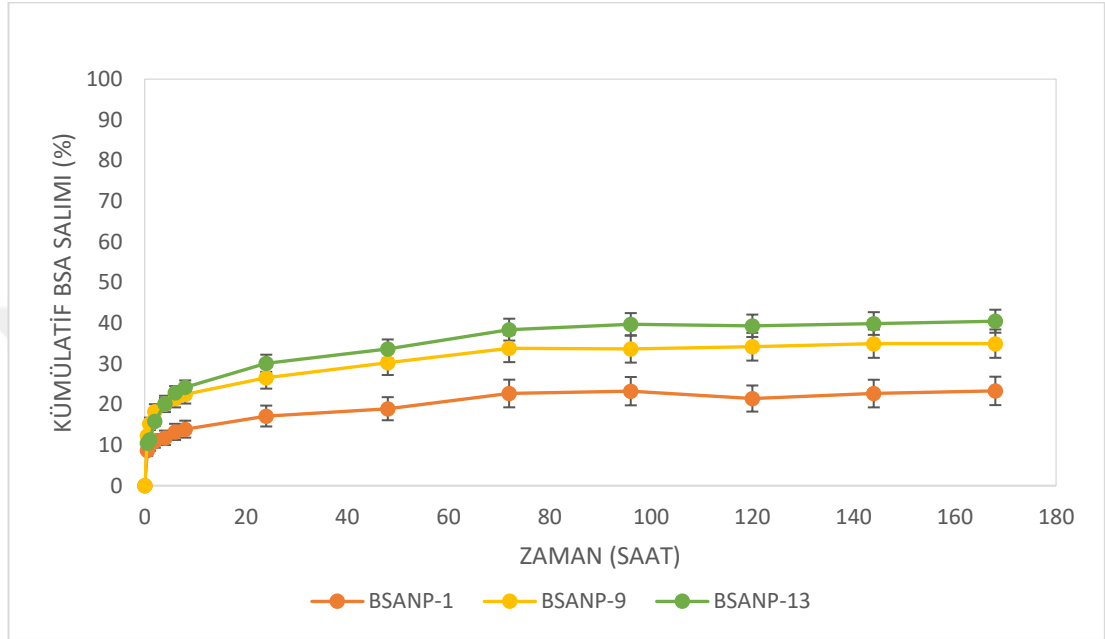
Çizelge 3.2. Devam. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları.

BSANP-8*	PLGA 5mg/mL	%1 F127	5mg/mL	1:2	*	*	*	*
BSANP-9	PLGA 1mg/mL	%2 F68	1mg/mL	1:1	131,7 ± 0,7	0,182 ± 0,006	-20,6 ± 0,7	78,04 ± 2,84
BSANP-10	PLGA 1mg/mL	%2 F127	1mg/mL	1:1	112,4 ± 0,3	0,171 ± 0,001	-16,0 ± 0,7	77,4 ± 0,91
BSANP-11	PLGA 1mg/mL	%2 F68	1mg/mL	1:2	133,3 ± 0,8	0,215 ± 0,007	-23,3 ± 0,2	71,8 ± 1,52
BSANP-12	PLGA 1mg/mL	%2 F127	1mg/mL	1:2	125,0 ± 1,4	0,219 ± 0,008	-11,1 ± 0,3	71,3 ± 0,49
BSANP-13	PLGA 1mg/mL	%1 F68	1mg/mL	1:1	141,2 ± 0,7	0,161 ± 0,009	-33,6 ± 1,4	73,9 ± 2,50
BSANP-14	PLGA 1mg/mL	%1 F27	1mg/mL	1:1	126,5 ± 1,7	0,156 ± 0,013	-18,3 ± 0,6	69,37 ± 3,55
BSANP-15	PLGA 1mg/mL	%1 F68	1mg/mL	1:2	142,9 ± 1,7	0,227 ± 0,004	-33,2 ± 5,5	65,51 ± 3,08
BSANP-16	PLGA 1mg/mL	%1 F127	1mg/mL	1:2	140,8 ± 3,4	0,182 ± 0,006	-18,2 ± 1,1	62,81 ± 1,62

* ile işaretli formülasyonlarda mikron boyutlu partiküller oluşmuştur.

3.3.1. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

Bölüm 2.3.5.'te anlatıldığı şekilde diyaliz membran yöntemiyle yapılan *in vitro* salım çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.15'te gösterilmiştir.



Şekil 3.15. BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülasyonlarının *in vitro* salım profili.

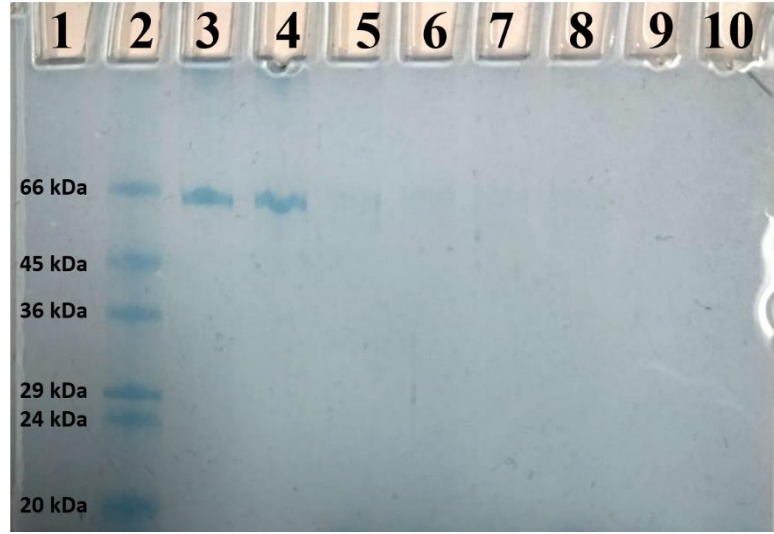
İn vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler, her üç formülasyonda da salımın ilk 8 saat boyunca hızlı bir şekilde gerçekleştiğini ve 24., 48. ve 72. saatler arasında bu hızlı salımın yavaşladığını göstermiştir. Takip eden günlerde ise salımın 96 saate kadar devam ettiği ve sonunda bir platoya ulaştığı gözlemlenmiştir. Salım çalışmaları üç paralel olarak yürütülmüştür. Salım kinetiği verileri Çizelge 3.3'te paylaşılmıştır. Elde edilen veriler her 3 formülasyonun da Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetiklerine uyum sağladığını göstermiştir.

Çizelge 3.3. BSA yüklü nanopartiküllerin in vitro salım kinetikleri.

		BSANP-1	BSANP-9	BSANP-13
0°	r^2	0,790	0,766	0,722
	k_0 ($\mu\text{g/sa}$)	0,082	0,118	0,162
1°	r^2	0,759	0,759	0,759
	k (sa^{-1})	0,029	0,029	0,029
Higuchi	r^2	0,926	0,912	0,898
	k_H ($\mu\text{g/sa}^{-1}$)	1,186	1,726	2,379
Peppas	r^2	0,986	0,984	0,968
	n	0,176	0,173	0,237
Weibull	r^2	0,985	0,988	0,976
	β	0,192	0,198	0,273

3.3.2. BSA Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının SDS-PAGE Analizi Sonuçları

SDS-PAGE analizi bölüm 2.3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Jelde gözlemlenen proteinlerin molekül ağırlıklarının tespiti için marker (dar aralıklı) kullanılmıştır. Analiz sonucunda BSA molekül ağırlığına ait 66,5 kDa’lık bantlar ilgili numunelerde görülmüştür. Proteinlerin nanopartiküllere etkin bir şekilde yüklendiği ve yapılan çalışmalarda protein yapı bütünlüğünün korunduğu görülmüştür. İlgili jelin görseli Şekil 3.16’da paylaşılmıştır.



Şekil 3.16. BSA ile üretilen nanopartikül ve saf BSA'ya ait SDS-PAGE jeli.

Jel uygulama sırası: 2. kuyucuk: Marker 3. kuyucuk: 50 µg/mL saf BSA, 4. kuyucuk: BSANP-13 nanopartikül formülü 24 saat *in vitro* salım numunesi.

3.4. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

Lizozim yüklü nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi amacıyla, BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 kodlu formülasyonlarda protein içeriği olarak lizozim kullanılmasıyla lizozim yüklü nanopartiküllerin üretilmesi denenmiştir. Ancak bu formülasyon tiplerinin tamamı çip kanalları içerisinde partikül agregasyonuna neden olduğundan yeni formülasyon geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle protein içermeyen nanopartikül formülasyonları çalışılmış, bu çalışmalar sonucunda, akış hızı oranı olarak en küçük ortalama partikül büyüklüğü verilerini sağlayan 3:1 oranı seçilmiştir. PLGA konsantrasyonu 5mg/ml, lizozim konsantrasyonu 1mg/ml'ye sabitlenmiş, farklı sürfaktan tipi ve oranları seçilerek LZNP-1, LZNP-2, LZNP-3 ve LZNP-4 formülasyonları çalışılmıştır. Formülasyon parametreleri Çizelge 3.4'te paylaşılmıştır. LZNP-1 ve LZNP-2 formülasyonları için Pluronic® F-68 sürfaktanı sırasıyla %1 ve %2 oranlarında kullanılmıştır. LZNP-3 ve LZNP-4 formülasyonları için Pluronic® F-127 sürfaktanı sırasıyla %1 ve %2 oranlarında kullanılmıştır. LZNP-3 ve LZNP-4 formülasyonlarında çip içerisinde mikro boyutlu partiküllerin oluşması üzerine ilerleyen çalışmalara Pluronic® F-68 sürfaktanı ile devam edilmiştir.

Protein içermeyen nanopartikül formülasyon çalışmaları sonucunda iç fazın akış hızı oranı arttırıldıkça partikül boyutu küçüldüğü görülmüştür. LZNP-1 formülasyonundaki tüm parametreler sabit tutulup, akış hızı oranları 5:1 olarak ayarlanarak LZNP-5 formülasyonu geliştirilmiş, ancak bu değişiklik formülasyonda mikro partiküllerin oluşması ile sonuçlanmıştır.

LZNP-1 ve LZNP-2 formülasyonları karşılaştırıldığında, oransal olarak daha düşük sürfaktana sahip LZNP-1 formülasyonunda ortalama partikül boyutunun daha küçük olması ve aynı zamanda enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olması nedeniyle, diğer parametreler sabit tutulup % sürfaktan oranı 0,5'e düşürülerek LZNP-6 formülasyonu oluşturulmuştur. Oluşturulan bu formülasyonda ortalama partikül boyutu azalmış ancak enkapsülasyon etkinliği LZNP-1 formülasyonundan ~%12 daha az bulunmuştur.

LZNP-1 formülasyonunda diğer parametreler değiştirilmeden lizozim konsantrasyonu 0,5 ve 0,1 mg/ml olarak ayarlanarak sırasıyla LZNP-13 ve LZNP-7 formülasyonları oluşturulmuştur. İç fazdaki lizozim konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliğine olan etkisi incelenmiştir. Bu üç formül karşılaştırıldığında, lizozim konsantrasyonunun 0,5 mg/ml olarak ayarlandığı LZNP-13 formülasyonunda enkapsülasyon etkinliği en yüksek olarak bulunmuştur.

Hazırlanan bütün formülasyonlarda akış hızı oranları mL/dk olarak çalışılmıştır. LZNP-7 formülasyonunda akış hızı oranı (3:1) değiştirilmeden, toplam akış hızı miktarını azaltmak amacıyla iç ve dış fazın akış hızlarının sırasıyla 300 µL/dk ve 100 µL/dk olarak ayarlanması ile LZNP-8 formülasyonu oluşturulmuştur. Bu formülasyonlar karşılaştırılarak TFR'nin nanopartikül üzerindeki etkileri incelenmiştir. LZNP-7 ve LZNP-8 formülasyonu karşılaştırıldığında toplam akış hızı azaltılmış olan LZNP-8 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği ~%2 artmış, buna karşılık ortalama partikül büyüklüğü ~106 nm artmıştır.

LZNP-1, LZNP-5, LZNP-7 ve LZNP-8 formülasyonlarındaki diğer parametreler değiştirilmeden iç faz sürfaktan çözeltisi pH 7,4 PBS ile hazırlanmış ve sırasıyla LZNP-9, LZNP-10, LZNP-11 ve LZNP-12 formülasyonları oluşturulmuştur. Formülasyon geliştirilmesinde PBS kullanılmasının enkapsülasyon etkinliği, ortalama partikül büyüklüğü ve formülasyonlarda görülen mikro partiküllerin oluşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. LZNP-5 ve LZNP-10 formülasyonları incelendiğinde, iç faz çözücüsü olarak PBS kullanılmasının LZNP-5 formülasyonunda görülen mikro partikül oluşumunun önüne geçtiği

gözlemlenmiştir. Buna karşılık olarak LZNP-9, LZNP-11 ve LZNP-12 formülasyonları incelendiğinde PBS kullanımının ortalama partikül büyüklüğünde artma ve enkapsülasyon etkinliğinde azalma ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir.

LZNP-11 ve LZNP-12 formülasyonları karşılaştırıldığında, LZNP-7 ve LZNP-8 formülasyonlarına benzer şekilde, toplam akış hızı azaltılmış olan LZNP-12 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği ~%6 artmış, buna karşılık ortalama partikül büyüklüğü ~109 nm artmıştır.

LZNP-13 formülasyonunda sürfaktan konsantrasyonları %0,5 ve %0,1 olarak değiştirilerek sırasıyla LZNP-14 ve LZNP-15 formülasyonları oluşturulmuştur. Hazırlanan formülasyonlar ortalama partikül büyüklüğünde artma ve enkapsülasyon etkinliğinde azalma ile sonuçlanmıştır. Tüm formülasyon parametreleri Çizelge 3.4'te paylaşılmıştır.

Ortalama partikül büyüklüğü, zeta değerleri ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirilerek LZNP-13 formülü *in vitro* salım çalışmaları yapılmak üzere seçilmiştir.

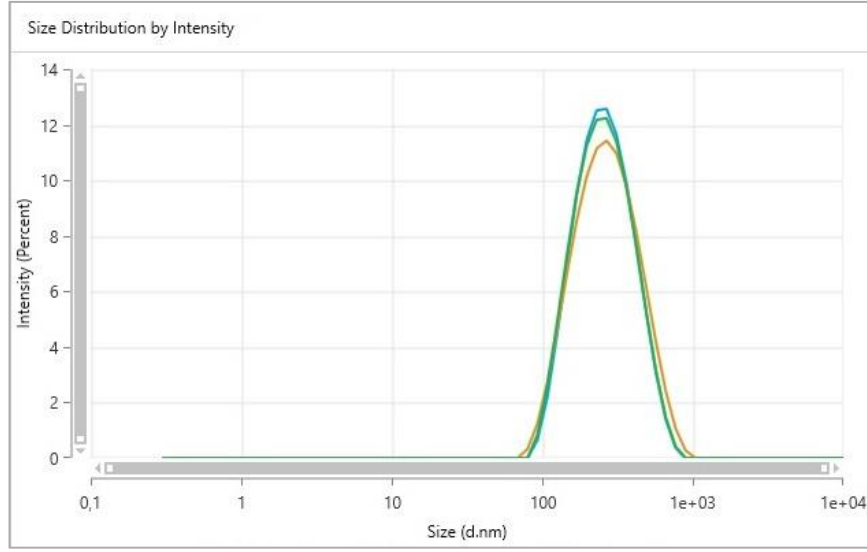
Çizelge 3.4. Lizozim Yüklü Nanopartiküllerin Formülasyon Değerleri ve Bulguları.

Formülasyon adı	Dış faz	İç faz	İç faz Lizozim Konsantrasyonu	Akış hızı oranları (mL/dk) İç faz: dış faz	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)	%EE
LZNP-1	PLGA 5mg/mL	%1 F68	1mg/mL	3:1	212,5 ± 3,6	0,094 ± 0,01	-6,7 ± 0,3	28,8 ± 1,26
LZNP-2	PLGA 5mg/mL	%2 F68	1mg/mL	3:1	243,4 ± 2,05	0,22 ± 0,014	-4,5 ± 0,4	13,33 ± 2,37
LZNP-3*	PLGA 5mg/mL	%1 F127	1mg/mL	3:1	*	*	*	*
LZNP-4*	PLGA 5mg/mL	%2 F127	1mg/mL	3:1	*	*	*	*
LZNP-5*	PLGA 5mg/mL	%1 F68	1mg/mL	5:1	*	*	*	*
LZNP-6	PLGA 5mg/mL	%0,5 F68	1mg/mL	3:1	197,5 ± 1,7	0,086 ± 0,039	+13,3 ± 1,8	16,52 ± 2,86
LZNP-7	PLGA 5mg/mL	%1 F68	0,1 mg/mL	3:1	208,5 ± 1,7	0,12 ± 0,027	+1,08±0,6	27,0 ± 1,16

Çizelge 3.4. Devam. Lizozim Yüklü Nanopartiküllerin Formülasyon Değerleri ve Bulguları.

LZNP-8	PLGA 5mg/mL	%1 F68	0,1 mg/mL	0,3:0,1	314,5 ± 4,7	0,202 ± 0,067	+3,07 ± 1,5	28,5 ± 1,13
LZNP-9	PLGA 5mg/mL	%1 F68 PBS	1mg/mL	3:1	241,4 ± 4,2	0,127 ± 0,016	-0,3 ± 0,7	14,34 ± 1,02
LZNP-10	PLGA 5mg/mL	%1 F68 PBS	1mg/mL	5:1	182,2 ± 1,8	0,083 ± 0,041	-0,7 ± 1,01	14,4 ± 0,11
LZNP-11	PLGA 5mg/mL	%1 F68 PBS	0,1 mg/mL	3:1	329,4 ± 3,2	0,269 ± 0,015	+2,7 ± 6,1	11,33 ± 0,78
LZNP-12	PLGA 5mg/mL	%1 F68 PBS	0,1 mg/mL	0,3:0,1	438,2 ± 9,2	0,168 ± 0,111	+5,9 ± 3,2	17,5 ± 1,87
LZNP-13	PLGA 5mg/mL	%1 F68	0,5 mg/mL	3:1	237 ± 3,1	0,176 ± 0,009	+4,02 ± 0,8	36,39 ± 1,33
LZNP-14	PLGA 5mg/mL	%0,5 F68	0,5 mg/mL	3:1	272,6 ± 0,9	0,241 ± 0,01	+4,8 ± 0,4	25,08 ± 0,99
LZNP-15	PLGA 5mg/mL	%0,1 F68	0,5 mg/mL	3:1	568,1 ± 17,8	0,311 ± 0,018	+3,7 ± 0,6	11,35 ± 1,73

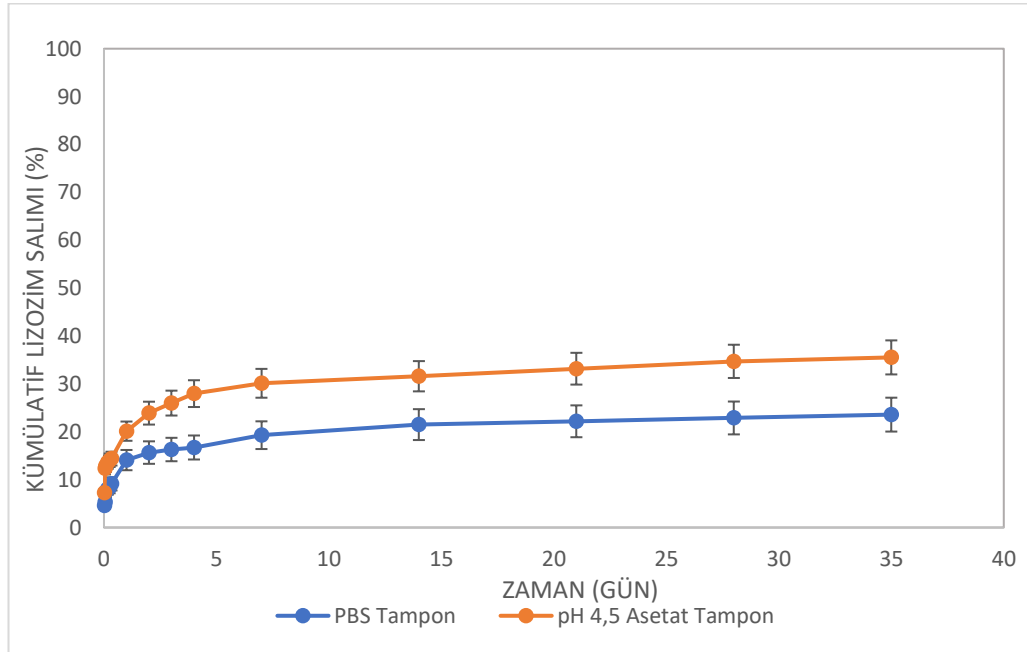
* ile işaretli formülasyonlarda mikron boyutlu partiküller oluşmuştur.



Şekil 3.17. LZNP-13 kodlu formüle ait partikül boyutu ve dağılımı grafiği.

3.4.1. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

Bölüm 2.3.5.'te anlatıldığı şekilde diyaliz membran yöntemiyle yapılan *in vitro* salım çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.18'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. LZNP-13 kodlu formülasyonun pH 7,4 PBS tamponunda ve pH 4,5 asetat tamponunda gerçekleştirilen *in vitro* salım profilleri.

Çalışmalar her iki salım ortamı için de 5 hafta boyunca gerçekleştirilmiştir. İn vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler, pH 4,5 asetat tamponunda ilk günden itibaren daha hızlı bir in vitro salım olduğunu göstermektedir. Her iki salım ortamı için de salımın ilk gün hızlı bir şekilde gerçekleştiğini ve takip eden günlerde ise uzun ve yavaş bir salım gerçekleştiğini göstermektedir. Salım çalışmaları üç paralel olarak yürütülmüştür.

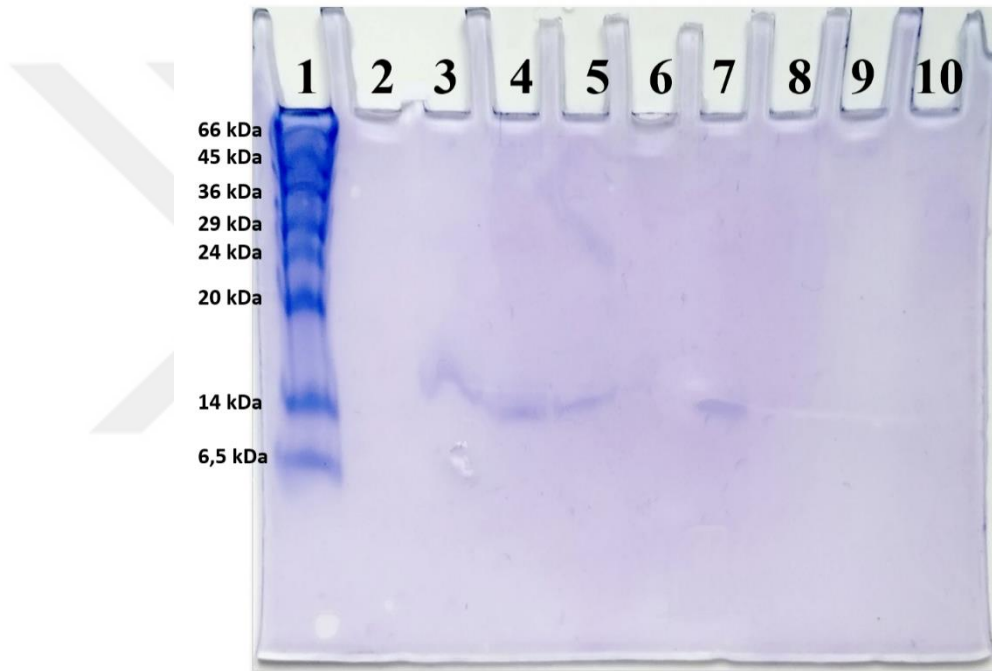
Salım kinetiği verileri Çizelge 3.5'te paylaşılmıştır. Elde edilen veriler her 2 salım ortamı için de Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetiklerine uyum sağlandığını göstermiştir.

Çizelge 3.5. Lizozim yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım kinetikleri.

		pH 7.4 PBS tampon	pH 4,5 asetat tampon
0°	r^2	0,760	0,803
	k_0 ($\mu\text{g/sa}$)	0,083	0,126
1°	r^2	0,699	0,699
	k (sa^{-1})	0,030	0,30
Higuchi	r^2	0,926	0,946
	k_H ($\mu\text{g/sa}^{-1}$)	1,200	1,781
Peppas	r^2	0,982	0,950
	n	0,249	0,218
Weibull	r^2	0,983	0,954
	β	0,264	0,241

3.4.2. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının SDS-PAGE Analizi Sonuçları

SDS-PAGE analizi bölüm 2.3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Jelde gözlemlenen proteinlerin molekül ağırlıklarının tespiti için marker (dar aralıklı) kullanılmıştır. Analiz sonucunda lizozim molekül ağırlığına ait 14,5 kDa’lık bantlar ilgili numunelerde görülmüştür. Proteinlerin nanopartiküllere etkin bir şekilde yüklendiği ve yapılan çalışmalarda protein yapı bütünlüğünün korunduğu görülmüştür. İlgili jelin görseli Şekil 3.19’da paylaşılmıştır.

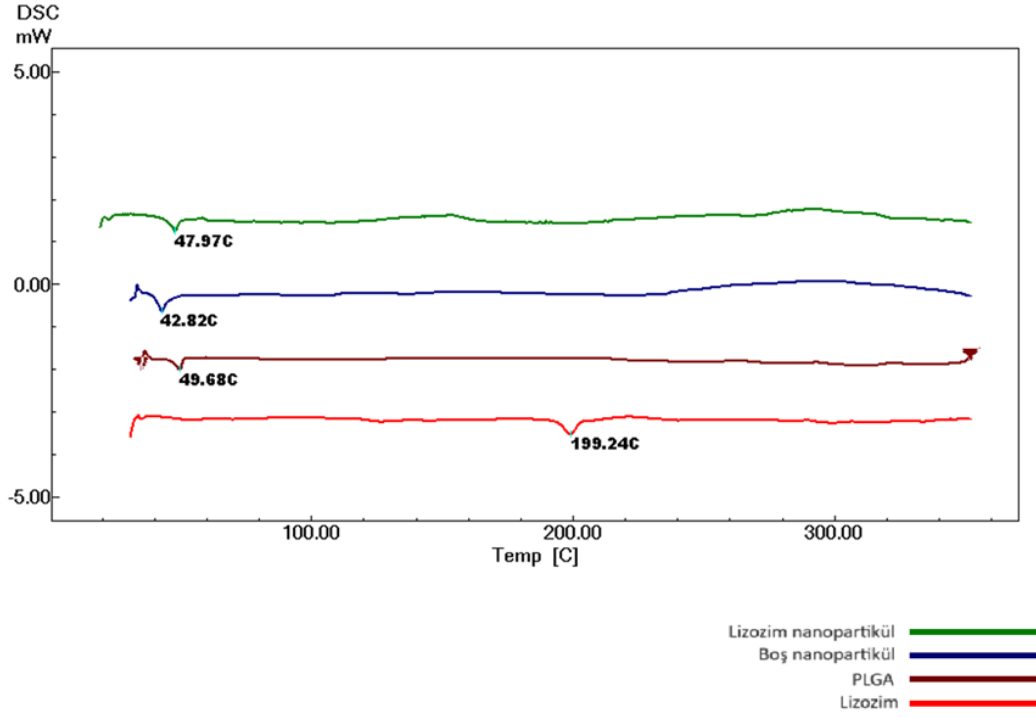


Şekil 3.19. Lizozim ile üretilen nanopartikül ve saf lizozime ait SDS-PAGE jeli.

Jel uygulama sırası: 1. kuyucuk: Marker, 3. kuyucuk: 5 µg/mL saf lizozim çözeltisi, 4. kuyucuk: 10 µg/mL saf lizozim çözeltisi, 5. kuyucuk: 20 µg/mL saf lizozim çözeltisi, 7. kuyucuk: LZNP-13 nanopartikül formülü 24.saat *in vitro* salım numunesi.

3.4.3 Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi bölüm 2.3.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. LZNP-13 kodlu lizozim nanopartikülüne ait DSC analiz sonucu Şekil 3.20’de paylaşılmıştır.



Şekil 3.20. LZNP-13 nanopartikül formülasyonu ve formülasyonda bulunan maddelere ait DSC termogramları. Yukarıdan aşağıya; LZNP-13 nanopartikül, boş nanopartikül, PLGA ve lizozime ait DSC termogramları.

Verilen sonuçlara göre PLGA, boş nanopartikül ve lizozim ile üretilen nanopartikül formülasyonu 42-50 °C aralığında pik vermiştir. Saf lizozim ~200 °C’de pik vermiştir. Elde edilen piklerin literatür çalışmaları ile uyumu kontrol edilmiştir (Mahajan, Sakarkar, ve Manmode, 2011; Mohammad, Grimsey, ve Forbes, 2015; Sun vd., 2015). Lizozim nanopartikülünün pik verdiği bölge ve saf lizozimin pik verdiği bölgeler karşılaştırıldığında lizozim nanopartikül formülasyonunda lizozime ait pikin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Lizozim nanopartikülü, PLGA ve boş nanopartiküle ait piklerin aralığında pik vermiştir. Bu sonuç formülasyondaki maddelerin bir araya gelerek nanopartikül yapısını oluşturduğu ve lizozimin yapıya enkapsüle olduğunu göstermektedir.

3.4.4. Lizozim Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Stabilité Çalışmaları

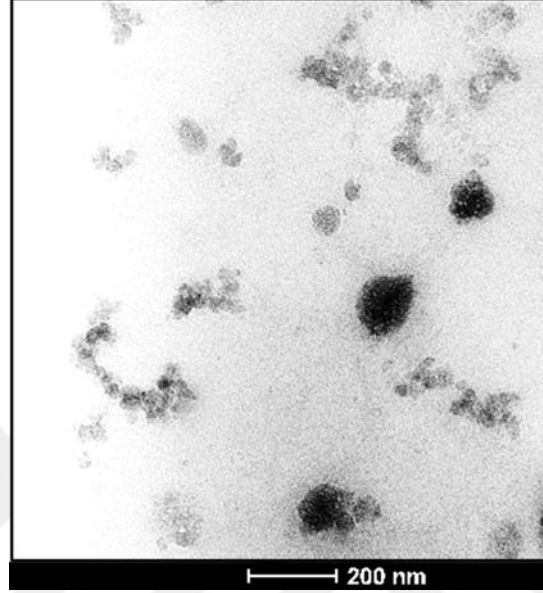
Stabilité çalışmaları LZNP-13 kodlu nanopartikül formülasyonunda bölüm 2.3.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 3.6’da paylaşılmıştır.

Çizelge 3.6. LZNP-13 Kodlu Formülasyonun Oda Koşulları ve Buzdolabı Stabilité Bulgularının Sonuçları.

Stabilité şartları	Süre	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)	Zeta potansiyeli (mV)	% Enkapsülasyon etkinliği
	0. Gün	237 ± 3,1	0,176 ± 0,009	+4,02 ± 0,8	36,39 ± 1,08
25 °C ± 2 °C	30. Gün	224,1 ± 2,2	0,217 ± 0,015	+7,5 ± 0,7	24,17 ± 0,62
4 °C ± 2 °C	30. Gün	250,6 ± 1,5	0,207 ± 0,019	+5,7 ± 0,8	32,35 ± 0,87

3.4.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi Sonuçları

Görüntüleme çalışmaları bölüm 2.3.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara ait görüntüler Şekil 3.21’de verilmiştir.



Şekil 3.21. LZNP-13 kodlu formülastona ait TEM görüntüsü.

3.5. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

Hazırlanan formülasyonlarda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI ve enkapsülasyon etkinliği parametreleri değerlendirilmiştir. Bu parametreler temel alınarak seçilen formüller üzerinde *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır.

Aprotinin yüklü nanopartikül formülasyon geliştirme çalışmalarına BSA yüklü nanopartikül geliştirme çalışmalarından elde edilen veriler değerlendirilerek başlanmıştır. BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 kodlu formülasyonlardan hareketle, BSA yerine protein olarak aynı konsantrasyonda aprotinin kullanılarak APRONP-1, APRONP-2 ve APRONP-3 formülasyonları çalışılmıştır. Formülasyon parametreleri Çizelge 3.7’de paylaşılmıştır. Bu 3 formülasyonun tamamında mikro boyutlu partikül oluşumu gözlemlenmiştir. Aprotinin nanopartikül formülasyonu geliştirme amacıyla yürütülen ön formülasyon çalışmalarına, boyut ve yük açısından aprotinine daha yakın olan lizozim proteini kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.

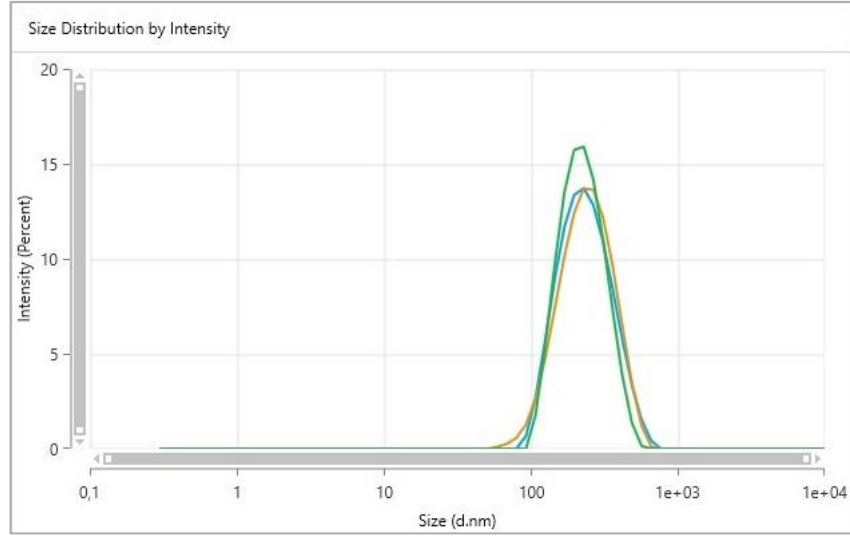
Çizelge 3.7. Aprotinin Nanopartikül Deneme Formülasyonları

Formülasyon adı	Dış faz	İç faz	İç faz aprotinin konsantrasyonu	Akış hızı oranları (mL/dk) iç:dış
APRONP-1	5mg/mL	%2 F68	5mg/mL	1:1
	PLGA			
APRONP-2	5mg/mL	%2 F68	1mg/mL	1:1
	PLGA			
APRONP-3	5mg/mL	%1 F68	1mg/mL	1:1
	PLGA			

Bölüm 3.2’de anlatıldığı üzere, çalışmalara protein içermeyen nanopartikül formülasyon denemeleri ile devam edilmiş, elde edilen veriler sonucunda, akış hızı oranı olarak, en küçük ortalama partikül büyüklüğü verilerini sağlayan 3:1 oranı seçilmiştir. Bölüm 3.4’te anlatıldığı şekilde lizozim nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda LZNP-13 formülü optimum özellikleri gösteren formülasyon olarak seçilmiş ve bu formülasyondan hareketle APRONP-4 formülasyonu üretilmiştir. Formülasyon parametreleri Çizelge 3.8’de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.8. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyon Değerleri ve Bulguları

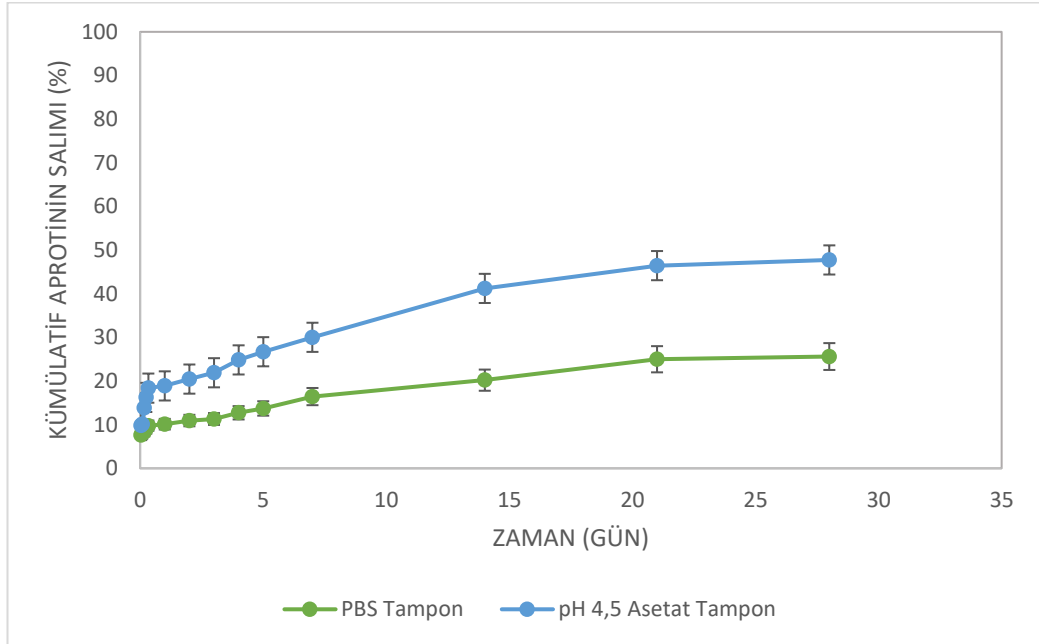
Formülasyon adı	Dış faz	İç faz	İç faz Aprotinin Konsantrasyonu	Akış hızı oranları (mL/dk) İç faz: dış faz	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)	%EE
APRONP-4	PLGA 5mg/mL	%1 F68	0,5 mg/mL	3:1	218,1 ± 1,8	0,15 ± 0,007	-5,4 ± 0,3	19,32 ± 1,91



Şekil 3.22. APRONP-4 kodlu formüle ait partikül boyutu ve dağılımı grafiği

3.5.1. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının İn Vitro Salım Çalışmaları

Bölüm 2.3.5.'te anlatıldığı şekilde diyaliz membran yöntemiyle yapılan *in vitro* salım çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.23'te gösterilmiştir.



Şekil 3.23. APRONP-4 kodlu formülasyonun pH 7,4 PBS tamponunda ve pH 4,5 asetat tamponunda gerçekleştirilen *in vitro* salım profilleri

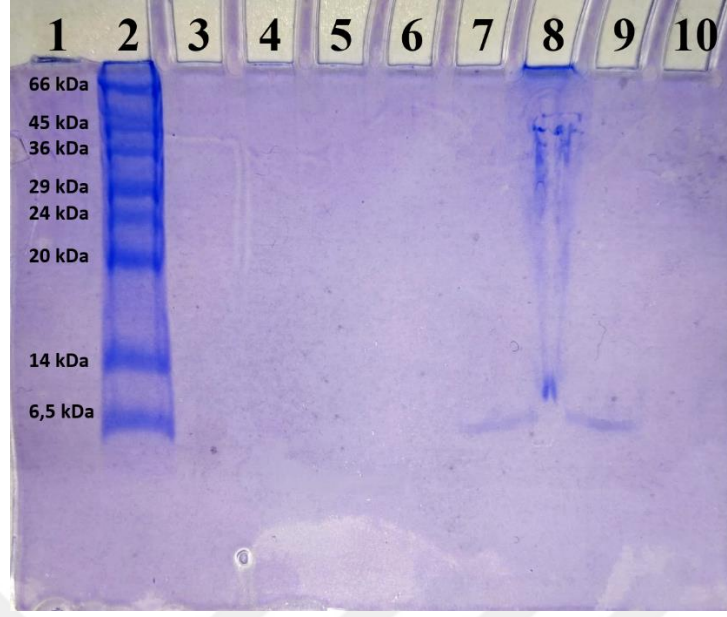
Salım çalışmaları üç paralel olarak yürütülmüştür. Salım kinetiği verileri Çizelge 3.9'da paylaşılmıştır. Elde edilen veriler her 2 salım ortamı için de Higuchi kinetiğine uyum sağlandığını göstermiştir.

Çizelge 3.9. Aprotinin yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım kinetikleri.

		pH 7.4 PBS tampon	pH 4,5 asetat tampon
0°	r^2	0,849	0,892
	k_0 ($\mu\text{g/sa}$)	0,028	0,056
1°	r^2	0,623	0,623
	k (sa^{-1})	0,008	0,008
Higuchi	r^2	0,978	0,976
	k_H ($\mu\text{g/sa}^{-1}$)	0,745	1,531
Peppas	r^2	0,877	0,950
	n	0,181	0,234
Weibull	r^2	0,869	0,940
	β	0,195	0,270

3.5.2. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının SDS-PAGE Analizi Sonuçları

SDS-PAGE analizi bölüm 2.3.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Jelde gözlemlenen proteinlerin molekül ağırlıklarının tespiti için marker (dar aralıklı) kullanılmıştır. Analiz sonucunda aprotinin molekül ağırlığına ait 6,5 kDa'lık bantlar ilgili numunelerde görülmüştür. Proteinlerin nanopartiküllere etkin bir şekilde yüklendiği ve yapılan çalışmalarda protein yapı bütünlüğünün korunduğu görülmüştür. İlgili jelin görseli Şekil 3.24'te paylaşılmıştır.

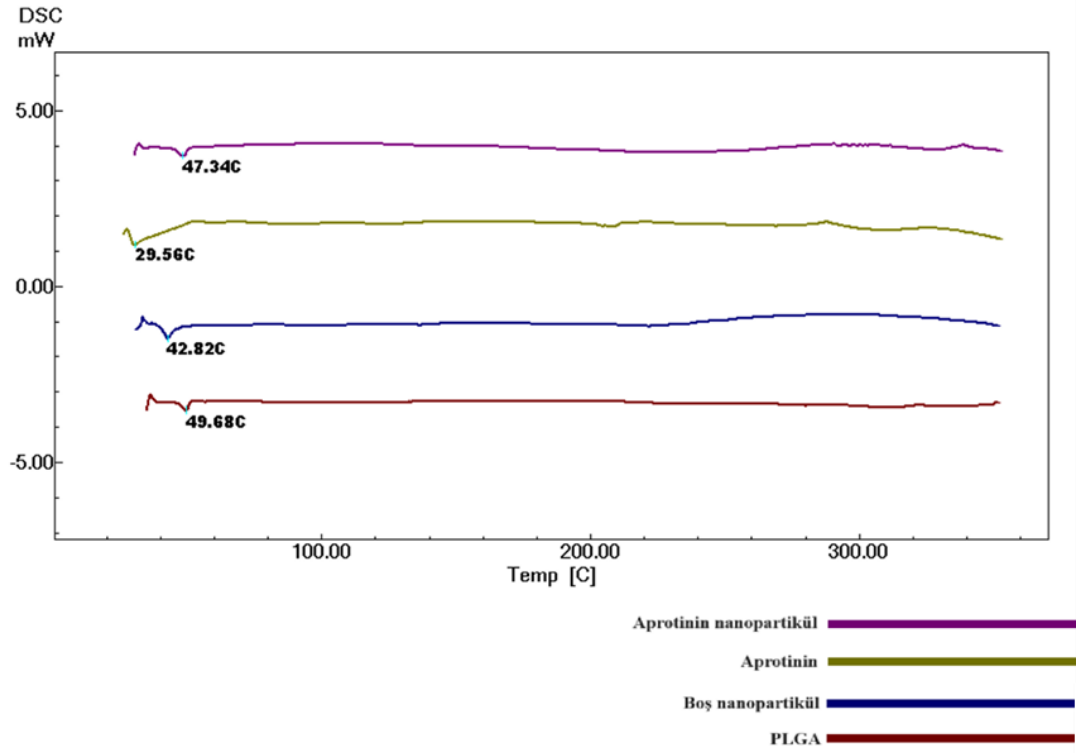


Şekil 3.24. Aprotinin ile üretilen nanopartiküle ait SDS-PAGE jeli.

Jel uygulama sırası: 2. kuyucuk: Marker, 7. kuyucuk: APRONP-4 24. Saat *in vitro* salım numunesi, 9. kuyucuk: APRONP-4 72. Saat *in vitro* salım numunesi.

3.5.3. Aprotinin Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi bölüm 2.3.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. APRONP-4 kodlu aprotinin nanopartikülüne ait DSC analiz sonucu Şekil 3.25’te paylaşılmıştır.



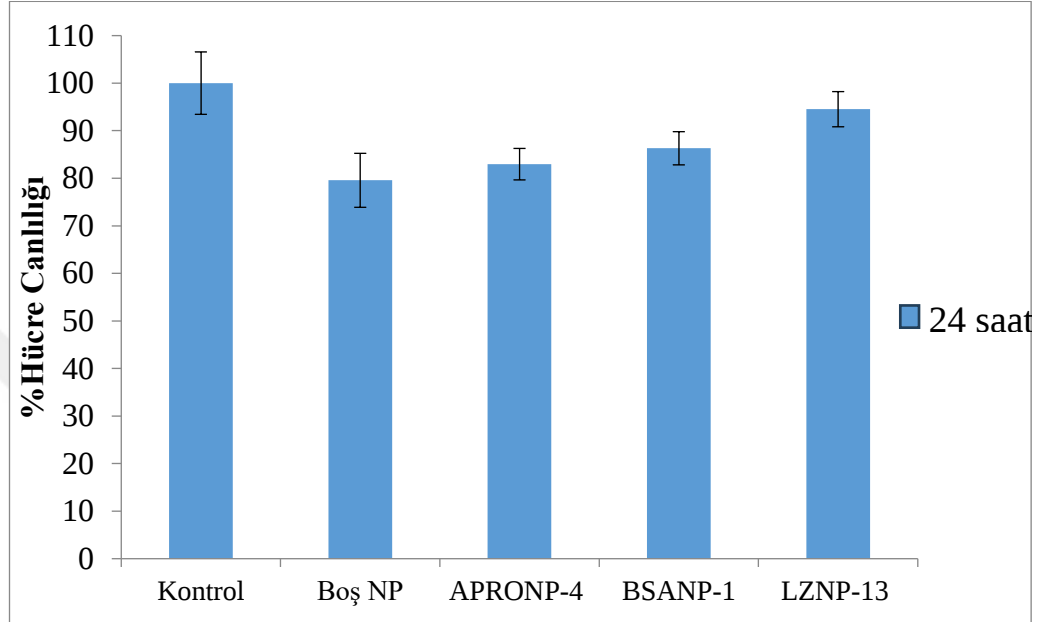
Şekil 3.25. APRONP-4 kodlu nanopartikül formülasyonunun DSC termogramı.

Yukarıdan aşağıya; APRONP-4 nanopartikül, aprotinin, boş nanopartikül ve PLGA'ya ait DSC termogramları.

Verilen sonuçlara göre PLGA, boş nanopartikül ve aprotinin ile üretilen nanopartikül formülasyonu 42-50 °C aralığında pik vermiştir. Saf aprotinin ~30 °C'de pik vermiştir. Aprotinin nanopartikülünün pik verdiği bölge ve saf aprotininin pik verdiği bölgeler karşılaştırıldığında, aprotinin nanopartikül formülasyonunda aprotinine ait pikin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Aprotinin nanopartikülü, PLGA ve boş nanopartiküle ait piklerin aralığında pik vermiştir. Bu sonuç formülasyondaki maddelerin bir araya gelerek nanopartikül yapısını oluşturduğu ve aprotininin yapıya enkapsüle olduğunu göstermektedir.

3.6. Hücre Canlılığı Çalışmaları Sonuçları

Bölüm 2.3.10’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen çalışma sonucu elde edilen veriler Şekil 3.26’da paylaşılmıştır.



Şekil 3.26. Nanopartikül hücre canlılığı sonuçları.

4. TARTIŞMA

4.1. Çalışmalarda Kullanılan Peptit ve Proteinlerin Seçimi

BSA ve lizozim, uzun süredir kullanımda olan ve günümüzde hala protein peptit içeren formülasyon araştırmalarında yaygın bir şekilde tercih edilen model proteinlerdir. Bunun nedeni, kolay temin edilebilirlikleri ve düşük maliyetleridir (Fleuren, Grond, ve Hoedemaeker, 1980; Li vd., 2024). Her iki protein de uzun süredir araştırmacılar tarafından çalışıldığından iyi karakterize edilmiş yapı ve özelliklere sahiptirler. Hem BSA hem de lizozim'in moleküler yapısı, amino asit dizilimleri ve fizikokimyasal özellikleri iyi bilinmektedir. Bu özellikleri sayesinde, proteinlerin davranışlarını ve etkileşimlerini anlamak daha kolaydır. Bu nedenlerle tez çalışmasında, mikroakışkan sistem ile protein yüklü polimerik nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu amacı ile BSA ve lizozim model proteinler olarak seçilmiştir.

Moleküler ağırlığı 10 kDa'dan az olan ve 50'den az amino asitten oluşan polimerler olarak tanımlanan peptitler, büyük proteinler veya küçük moleküllü ilaçlarla karşılaştırıldığında benzersiz farmakokinetik özelliklere sahip, hızla gelişen yeni bir terapötik sınıfı oluşturur (Diao ve Meibohm, 2013). Çizelge 1.3'te paylaşıldığı üzere, lizozim ve BSA'nın moleküler ağırlıkları sırası ile 14,3 kDa ve 66,5 kDa olup bu tanımlamaya göre protein olarak kategorize edilmektedirler. Molekül ağırlığı 6,5 kDa olan aprotinin ise, doğal olarak oluşan bir polipeptit olup doku ve plazmada tripsin, plazmin ve kallikreinleri inhibe eden geniş spektrumlu bir serin-proteaz inhibitörüdür (Kuklo, Owens, ve Polly Jr, 2003). Çizelge 1.3'te paylaşıldığı üzere, aprotinin, lizozim ve BSA'nın yükleri sırası ile +6, +8 ve -18'dir. Yapılan formülasyon çalışmalarında çalışılan protein-peptit yapısının boyutunun ve yükünün formülasyon özelliklerine olan etkilerinin saptanabilmesi adına aprotinin mikroakışkan sistem ile peptit yüklü polimerik nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu amacı ile seçilmiştir.

4.2. Seçilen Peptit ve Proteinlerin Kalibrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Hazırlanan nanopartiküllere kullanılan peptit/proteinlerin enkapsülasyonu bölüm 2.3.4'te anlatıldığı üzere indirekt yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. Seçilen formülasyonlarda *in vitro* salım çalışmaları bölüm 2.3.5'te anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. İndirekt yöntemde ile elde edilen numunelerde ve *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen numunelerde miktar tayini yapılabilmesi için, ilgili peptit ve proteinlerde, her çözünme ortamında ayrı ayrı olmak üzere, bikinkoninik asit yöntemi ile kalibrasyon çalışmaları bölüm 2.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Miktar tayinleri için hazırlanan kalibrasyonlara ait bulgular bölüm 3.1'de paylaşılmıştır.

Hazırlanan kalibrasyon verileri incelendiğinde (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14), elde edilen kalibrasyon denklemlerinin tamamında determinasyon kat sayısının (R^2) $> 0,99$ olduğu görülmektedir. Determinasyon katsayısı, R^2 , istatistiksel bir model tarafından açıklanan varyans oranını ölçer ve önemli bir özet istatistiktir. 0 ile 1 arasında bir değer alır ve değerinin 1'e yakın olması, bu denklemlerin doğrusal ilişkileri temsil ettiğini ve elde edilen sonuçların güvenilir olduğunu belirtir (Nakagawa, Johnson, ve Schielzeth, 2017).

4.3. Mikroakışkan Çip Kanallarında Mikropartiküllerin Oluşumu

Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları incelendiğinde, protein içermeyen (boş) nanopartikül formülasyonlarının hiçbirinde mikroakışkan çipin kanallarında mikropartikül oluşumu veya tıkanma gözlenmemiştir. Buna karşın, BSA, lizozim ve aprotinin içeren nanopartikül formülasyonlarında, formülasyon parametrelerine bağlı olarak, mikroakışkan çip kanallarında mikron boyutlu partiküllerin oluşumuna bağlı tıkanmalar gözlemlenmiştir.

Kapalı ortamlarda mikropartikül süspansiyonlarının taşınması, akışkanlar mekaniği ve yumuşak madde arayüzündeki karmaşık olaylarla ilişkilidir. Nitekim, akış altında parçacıkların birikmesi ve bir araya gelmesi hidrodinamik, sterik ve kolloidal kuvvetleri içerir ve mikrokanaalların tıkanmasına yol açabilir (Dressaire ve Sauret, 2017). Mikrokanaallar içerisindeki tıkanma bir partikül kendi boyutundan daha küçük bir kanalda aktığında, kanaldan daha küçük partiküller çözelti içinde toplanarak büyüdüğünde ya da kanal gözenek yüzeyinde partiküllerin birikmesiyle meydana gelebilir. Bu durumda, tıkanma kanal boyutuna, parçacık

boyutuna ve en küçük daralmadan geçen parçacık sayısına yani katı madde oranına bağlıdır (Massenburg, Amstad, ve Weitz, 2016).

Katı kürelerden oluşan bir süspansiyonun reolojik özellikleri, içindeki katı partiküllerin oranına büyük ölçüde bağlıdır. Düşük katı madde oranlarında, süspansiyon, normal bir sıvı gibi davranır. Ancak, bu süspansiyonun viskozitesi, içindeki katı partiküllerin miktarı arttıkça artar. Yani, süspansiyonun akışkanlığı, katı partiküllerin oranına bağlı olarak değişir. Süspansiyon yoğunlaştıkça, akış davranışı daha karmaşık hale gelir ve bir aşamadan sonra akışın artık mümkün olmadığı bir katı fraksiyonu vardır (sıkışma katı fraksiyonu). Bu sıkışma geçişi sistemin tıkanmasına yol açar. Bu sıkışma katı fraksiyonunun altındaki konsantrasyonlar için tıkanma oluşumu, sürekli reolojik modelleme yoluyla yakalanamayan karmaşık yerel süreçlerle ilişkilidir. Bu tür tıkanma süreçlerinin nedenleri, günümüzde hala tam olarak anlaşılamamış ve yoğun araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda, çapları yüz nanometre ile birkaç mikrometre arasında değişen mikropartikül süspansiyonlarına dayanan bir dizi mikroakışkan araştırması, bu tıkanma süreçlerini tanımlamaya odaklanmıştır (Dressaire ve Sauret, 2017). Kanalların tıkanması, bütün avantajlarına rağmen mikroakışkan sistemlerin yaygınlaşmasının önündeki en büyük engellerden biri olmaya devam etmektedir (X. Xu vd., 2024).

Hazırlanan BSA yüklü nanopartikül formülasyonları incelendiğinde, PLGA konsantrasyonunun 5 mg/mL, BSA konsantrasyonunun 5 mg/mL seçildiği 8 formülasyondan 6'sında mikrokanaalların tıkanması ile karşılaşıldığını, ancak PLGA konsantrasyonunun 1 mg/mL, BSA konsantrasyonunun 1 mg/mL seçildiği 8 formülasyondan hiçbirinde bu problemle karşılaşılmadığını gözlemlemekteyiz (Çizelge 3.2). Sonuç olarak, yukarıda açıklandığı üzere, BSA formülasyonlarında görülen mikrokanaallardaki tıkanmanın bir nedeninin yüksek katı fraksiyon olabileceği düşünülmektedir.

Hazırlanan lizozim yüklü nanopartikül formülasyonları incelendiğinde, LZNP-3, LZNP-4 ve LZNP-5 kodlu formülasyonlarda mikropartikül oluşumu ve bu nedenle mikrokanaallarda tıkanma gerçekleştiğini gözlemlemekteyiz (Çizelge 3.4). LZNP-1, LZNP-2 ve LZNP-3, LZNP-4 formülasyonları karşılaştırıldığında, formülasyon parametrelerinden yalnızca sürfaktan tipinin farklı olduğunu; herhangi bir tıkanma gözlemlenmeyen LZNP-1 ve LZNP-2 formülasyonlarında Pluronic® F68 kullanılmışken tıkanma gözlemlenen LZNP-3 ve LZNP-4 formülasyonlarında Pluronic® F127 kullanıldığı görmektedir. Bu durumda, kullanılan sürfaktan tiplerinin özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiği kanısına

varılmıştır. Bölüm 1.5'te anlatıldığı üzere, Pluronic® F68; moleküler ağırlığı ~ 8400 g/mol ve hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri ~29 olan bir yüzey etkin maddedir. Pluronic® F127'nin ise moleküler ağırlığı ~12600 g/mol ve hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri ~ 22'dir. Pluronic F-68, F-127'ye kıyasla daha az hidrofobik PPO birimi içerir.

LZNP-3 ve LZNP-4 formülasyonlarında oluşan kanal tıkanmasının olası nedenleri arasında reolojik özellikler olabilir. Pluronic® F127'nin moleküler ağırlığı ~12600 g/mol olup, çözündüğü sıvı içerisinde moleküler ağırlığı ~ 8400 g/mol olan Pluronic® F68'den daha viskoz bir yapı oluşturmuş olabilir. Reolojik özellikler, yukarıda açıklandığı üzere, bir mikroakışkan sistem üzerinde tıkanma oluşmasının başlıca nedenlerindendir. Ancak bu durum tıkanmaya bir neden olarak gösterilebilecekse de mikro boyutta gözlemlenen partikül oluşumunu açıklayamayacaktır.

LZNP-5 ve LZNP-10 formülasyonları (Çizelge 3.4) incelendiğinde, diğer formülasyon özelliklerinin tamamının aynı tutulup, LZNP-10 formülasyonunda iç fazda PBS kullanılması ile mikrobeyutlu partikül oluşumunun önüne geçildiği görülmüştür. Hazırlanan nanopartiküllerin özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi adına lizozimin ve PLGA'nın fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Çizelge 1.3'te açıklandığı üzere lizozimin pH 7'de yaklaşık yükü +8'dir. PLGA ise genellikle negatif yüklü nanopartiküller oluşturması ile bilinmektedir (Kumar, Bakowsky, ve Lehr, 2004). Bu durumda, lizozim ile PLGA partikülleri arasındaki birincil etkileşimin iyonik güç ve elektrostatik etkileşimler olduğu düşünülmektedir (Chesko vd., 2005). Bu etkileşimler, nonkovalent agregasyonlar ile sonuçlanmıştır. Formülasyonda iç fazda PBS kullanılması, PBS'in barındırdığı yüksek tuz konsantrasyonunun iyonik etkileşimleri maskeleyesi ile bu agregasyonların oluşmasını önlemiş olabilir. Benzer bir durum +6 yüklü olan aprotinin formülasyonlarında da görülmektedir. Bölüm 3.5'te anlatıldığı üzere, aprotinin yüklü nanopartikül formülasyon geliştirme çalışmalarına BSA yüklü nanopartikül geliştirme çalışmalarından elde edilen veriler değerlendirilerek başlanmıştır. BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 kodlu formülasyonlardan hareketle, BSA yerine protein olarak aynı konsantrasyonda aprotinin kullanılarak APRONP-1, APRONP-2 ve APRONP-3 formülasyonları çalışılmıştır. Ancak bu 3 formülasyonun tamamında mikro boyutlu partikül oluşumu gözlemlenmiştir. Boyut olarak BSA'dan 10 kat küçük olan aprotinin ile üretilen formülasyonlarda, BSA ile hazırlanan formülasyonlarda görülmeyen bu mikro boyuttaki partiküllerin oluşumu yukarıda açıklandığı üzere iyonik etkileşimlerin tetiklediği nonkovalent agregasyon oluşumu ile gerçekleşmiş olabilir. Bu durumda, LZNP-3 ve LZNP-4 formülasyonlarında oluşan agregatlar, Pluronic® F127 sürfaktanının Pluronic® F68'e kıyasla

daha hidrofobik yapısından kaynaklanabilir. Pluronic® F127 sürfaktanının kullanıldığı formülasyonlarda hidrofobik etkileşimler daha güçlü olacaktır ve bu nonkovalent agregasyonların oluşmasını tetikleyebilir. Ayrıca, Pluronic F-68'in, yapılan çalışmalarda, proteinlerin ve antikorların enjekte edilebilir formülasyonlarını stabilize eden tek poloksamer olduğu bildirilmiştir (Khaliq vd., 2023).

LZNP-1 formülasyonundaki tüm parametreler sabit tutulup, 3:1 olan akış hızı oranları 5:1 olarak ayarlanması formülasyonda mikro partiküllerin oluşması ile sonuçlanmıştır. Sistemden dakikada geçen lizozim miktarının artması, polimer ve protein arasındaki olası etkileşimleri arttırarak iyonik etkileşimlerin güçlenmesini ve bunun sonucunda nonkovalent agregasyonların oluşmasını tetikleyebilir. Aynı zamanda, aseton ve su fazlarının karışma hızının arttırılması, küçük ve homojen boyutlu partiküllerin oluşumunu teşvik eder. Hızlı karışma, çözücü ve anti-çözücü arasında ani bir doygunluk durumu yaratarak çok sayıda küçük çekirdek oluşturur. Küçük boyut, yüksek yüzey enerjisine neden olur ve bu da nanopartiküllerin yüzey enerjisini azaltmak için bir araya gelme eğilimini artırır (Shrestha, Wang, ve Dutta, 2020). Bu mekanizmalar agregat oluşumu ile sonuçlanabilir. Diğer yandan, Shkodra ve diğerlerinin 2019'da yaptığı çalışmada Pluronic® F68 ve Pluronic® F127 sürfaktanlarının PLGA nanopartikülleri oluşturmada kullanılmasının nanopartikül agregasyonuna ve zayıf resüpsansiyona neden olduğu bildirilmiştir (Shkodra vd., 2019).

Tüm bunlarla beraber, mikroakışkan sistemlerde tıkanma ve agregatların oluşması karmaşık birçok yerel süreçlerle ilişkilidir. Sürdürülebilir ve tekrar edilebilir formülasyon geliştirme çalışmaları için bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Mikroakışkan sistemler hala karmaşık çip yapıları ve tıkanma kolaylığı gibi sorunlara sahiptir (H. Xu vd., 2024).

4.4. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarında Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının, Polidispersite İndeksinin ve Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi

4.4.1. Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Nanopartiküller, genellikle boyut, şekil, yüzey yapısı ve doku gibi fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olan performans özelliklerine sahiptir. Partikül büyüklüğü ve dağılımı, nanopartiküllerin kalitesini, güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için temel özelliklerdendir (Caputo vd., 2019). Nanopartiküllerde ortalama partikül büyüklüğü ve

dağılımı; biyoyararlanım, farmakokinetik özellikler, stabilite, toksisite, hücresel alım, vasküler dağılım, dolaşım süresi ve etken madde salımı üzerinde etkilere sahiptir.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan protein içermeyen (boş) nanopartikül formülasyon değerleri ve bulguları Çizelge 3.1’de, BSA yüklü nanopartikül formülasyon değerleri ve bulguları Çizelge 3.2’de, lizozim yüklü nanopartiküllerin formülasyon değerleri ve bulguları Çizelge 3.4’te, aprotinin yüklü nanopartikül formülasyon değerleri ve bulguları Çizelge 3.8’de paylaşılmıştır.

Bölüm 2.2.2’de açıklandığı üzere, üretimde iki farklı yüzey aktif madde (Pluronic® F-68 ve Pluronic® F-127), 4 farklı sürfaktan konsantrasyonu (%2, %1, %0,5 ve %0,1), iki farklı PLGA konsantrasyonu (1mg/mL ve 5mg/mL), 6 farklı “Akış Hızı Oranı” (Flow Rate Ratio, FRR), 8 farklı “Toplam Akış Hızı (Total Flow Rate, TFR), 3 farklı protein (BSA, lizozim ve aprotinin) yüklenmesi ve farklı protein konsantrasyonları denenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan tüm formülasyon çalışmaları akış hızı oranları (FRR) açısından incelendiğinde, polimer içeren dış fazın akış oranını arttırdıkça ortalama partikül boyutunun arttığı, sürfaktan içeren iç fazın akış oranı arttıkça ortalama partikül boyutunun azaldığı bulunmuştur. Bu nedenle optimum FRR oranı (iç:dış) 3:1 olarak belirlenmiştir. Sürfaktan içeren iç fazın akış oranının daha fazla artırılması denenmiştir ancak, bölüm 3.4’te açıklandığı üzere LZNP-1 formülasyonundaki tüm parametreler sabit tutulup, 3:1 olan akış hızı oranları 5:1 olarak ayarlanması formülasyonda mikro partiküllerin oluşması ile sonuçlanmıştır.

Toplam akış hızı miktarının (TFR) formülasyon çıktıları üzerindeki etkilerinin anlaşılması için LZNP-7 formülasyonunda akış hızı oranı (3:1) değiştirilmeden, toplam akış hızı miktarını azaltmak amacıyla iç ve dış fazın akış hızlarının sırasıyla 300 µL/dk ve 100 µL/dk olarak ayarlanması ile LZNP-8 formülasyonu oluşturulmuştur. LZNP-7 ve LZNP-8 formülasyonu karşılaştırıldığında toplam akış hızı azaltılmış olan LZNP-8 formülasyonunun ortalama partikül büyüklüğü ~106 nm arttığı görülmüştür. Benzer şekilde, LZNP-11 formülasyonunda akış hızı oranı (3:1) değiştirilmeden, iç ve dış fazın akış hızlarının sırasıyla 300 µL/dk ve 100 µL/dk olarak ayarlanması ile LZNP-12 formülasyonu oluşturulmuştur. LZNP-12 formülasyonunun ortalama partikül büyüklüğü ~109 nm arttığı görülmüştür.

Yapılan literatür çalışmalarında da akış hızı oranı (FRR) ve toplam akış hızının (TFR) üretilen partiküllerin fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. TFR'nin veya FRR'nin artırılması partikül boyutunu azaltmıştır (Roces vd., 2020)

Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2 incelendiğinde, yüzey aktif madde olarak Pluronic® 127 kullanılması partikül boyutunda azalmaya neden olduğu görülmektedir. PLGA ile yapılan nanopartikül çalışmaları incelendiğinde, elde edilen sonucun literatür ile benzerlik gösterdiği görülmektedir (Shkodra vd., 2019).

Düşük konsantrasyonda polimer oranı ile üretilen formülasyonlar (1 mg/mL) ve yüksek oranda polimer içeren formülasyonlar (5 mg/mL) karşılaştırıldığında, düşük konsantrasyonda polimer kullanılan formülasyonlarda daha küçük partiküller elde edildiği görülmüştür. Literatürde artan polimer konsantrasyonunun tipik olarak artan partikül boyutuna neden olduğu bildirilmiştir (Dao vd., 2014).

4.4.2. Polidispersite İndeksi

Polidispersite terimi partiküllerin boyut dağılımının tekdüze olmama derecesini tanımlamak için kullanılır. Heterojenlik indeksi olarak da bilinen PDI, nanopartiküllerde, değerleri dinamik ışık saçılımı (DLS) gibi tekniklerle belirlenir. PDI'nin sayısal değeri 0,0 (partikül boyutuna göre tamamen homojen bir numune için) ile 1,0 (birden fazla partikül boyutu popülasyonuna sahip oldukça polidispers bir numune için) arasında değişir. 0,05'ten küçük değerler çoğunlukla yüksek oranda tek dağılımlı standartlarda görülecek şekilde ölçeklendirilken, PDI'nin 0,7'den büyük değerleri numunenin çok geniş bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu ve muhtemelen dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniğiyle analiz edilmeye uygun olmadığını gösterir. Polimer bazlı nanopartikül malzemeler için 0,2 ve altındaki değerler pratikte en yaygın kabul gören değerlerdir (Danaei vd., 2018).

BSA yüklü nanopartikül formülasyonları arasından *in vitro* salım için seçilen BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülasyonlarının PDI değerleri sırasıyla $0,103 \pm 0,022$, $0,182 \pm 0,006$ ve $0,161 \pm 0,009$ olarak ölçülmüştür. Lizozim yüklü nanopartikül formülasyonları arasından *in vitro* salım için seçilen LZNP-13 formülasyonunun PDI değeri $0,176 \pm 0,009$ olarak ölçülmüştür. Aprotinin yüklü nanopartikül formülasyonu olan APRONP-4'ün PDI değeri $0,15 \pm 0,007$ olarak ölçülmüştür. Değerlerin tamamının literatürde bildirilen kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmektedir.

4.4.3. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli (ζ), bir kolloid veya süspansiyon içindeki partiküllerin yüzey yükünü ölçen bir parametredir. Elektrokimyasal bir potansiyel olup, partiküllerin yüzeyindeki yüklerin sıvıdaki karşıt iyonlarla etkileşimi sonucunda oluşan elektriksel çift tabaka potansiyelini ifade eder. Nanopartiküllerin stabilitesi, dolaşım süresi, protein etkileşimleri, geçirgenliği ve biyouyumluluğu hakkında bilgi verir. Genel bir kural olarak, mutlak değer olarak $\zeta \geq 30$ mV ve ≤ 60 mV sırasıyla iyi ve mükemmel stabilite olarak kabul edilir. Bununla birlikte, zeta potansiyel değeri nanopartikül stabilitesinin mutlak işareti değildir (Németh vd., 2022).

Protein içermeyen PLGA nanopartikülleri incelendiğinde, geliştirilen formülasyonların tamamında zeta potansiyelinin $>|-20|$ mV olduğu görülmektedir. BSA yüklü nanopartikül formülasyonları arasından *in vitro* salım için seçilen BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülasyonlarının zeta potansiyeli değerleri sırasıyla $-34,3 \pm 0,65$, $-20,6 \pm 0,709$ ve $-33,6 \pm 1,48$ olarak ölçülmüştür. Lizozim yüklü nanopartikül formülasyonları arasından *in vitro* salım için seçilen LZNP-13 formülasyonunun zeta potansiyeli $+4,022 \pm 0,8879$ olarak, Aprotinin yüklü nanopartikül formülasyonu olan APRONP-4'ün zeta potansiyeli ise $-5,432 \pm 0,3637$ olarak ölçülmüştür. Literatür çalışmalarında katyonik lizozimin nanopartiküllere kapsüllenmesinin, PLGA nanopartiküllerinin yüksek negatif zeta potansiyelini nötralize ettiği gösterilmiştir (Khan vd., 2024; Xie vd., 2008). Yapılan literatür araştırmasında, aprotinin yüklenen bir PLGA NP ya da polimerik NP örneğine rastlanmamıştır. Aprotinin +6 yüke sahip olduğundan, lizozim örneğinde olduğu gibi partiküllerin negatif zeta potansiyellerinin düşmesine yol açtığı gözlemlenmiştir.

4.5. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarında Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

İlaç taşıyıcı sistemlerde nanopartiküllerin en kritik özelliklerinden biri, etken madde yükleme kapasitesidir. Nanopartiküllerin etken madde yükleme miktarı, polimerin moleküler ağırlığı, taşınan madde ile olan etkileşimi, uç gruplarının türü gibi faktörlere ve etken maddenin çözünürlüğüne bağlı olarak değişir. Ayrıca, nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve hazırlama yöntemleri de yükleme kapasitesini etkileyebilir. Bu parametreler, ilacın etkinliğini ve salım profilini optimize etmek için dikkatlice kontrol edilmelidir (Klojdová vd., 2023).

Hazırlanan BSA yüklü nanopartikül formülasyonları incelendiğinde, polimer ve protein konsantrasyonunun en yüksek olduğu BSANP-1 ve BSANP-2 formülasyonlarında enkapsülasyon etkinliğinin en yüksek olduğu (>%90) bulunmuştur. Mikroakışkan bir sistem kullanarak BSA yüklü PLGA nanopartikülleri üreten Roces ve arkadaşları, enkapsülasyon etkinliğini %56 olarak bulmuşlardır (Roces, Christensen, ve Perrie, 2020).

Hazırlanan lizozim yüklü nanopartikül formülasyonları arasında en yüksek enkapsülasyon etkinliğini %36 ile LZNP-13 formülasyonu göstermiştir. APRONP-4 kodlu aprotinin yüklü nanopartikül ise %19 enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. Yapılan çalışmalar kapsamında lizozim ve aprotinin yüklü PLGA nanopartiküller mikroakışkan sistem kullanılarak hazırlanmıştır. Literatür araştırmaları, bu çalışma ile lizozim ve aprotinin yüklü PLGA nanopartiküllerin ilk defa mikroakışkan sistem kullanılarak hazırlandığını göstermektedir.

4.6. *In vitro* Salım Profillerinin ve Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonlarda ortalama partikül büyüklüğü, zeta değerleri ve enkapsülasyon etkinliği verileri değerlendirilmiş, bu verilerden yola çıkarak seçilen formülasyonlarda *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmaların sonuçları Şekil 3.15, Şekil 3.18 ve Şekil 3.23'te paylaşılmıştır.

BSA yüklü nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* salım grafikleri incelendiğinde, elde edilen veriler, her üç formülasyonda da salımın ilk 8 saat boyunca hızlı bir şekilde gerçekleştiğini ve 24., 48. ve 72. saatler arasında bu hızlı salımın yavaşladığını göstermiştir. Takip eden günlerde ise salımın 96 saate kadar devam ettiği ve sonunda bir platoya ulaştığı gözlemlenmiştir.

Lizozim ve aprotinin yüklü PLGA nanopartiküllerindeki *in vitro* salım çalışmalarında gözlemlenilen yavaş ve tamamlanmamış salım, literatürde de bildirildiği gibi, polimer ve protein arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. (Paillard-Giteau vd., 2010). PLGA polimeri negatif yüklü, lizozim proteini ise pozitif yüklüdür. Bu zıt yükler arasında oluşan elektrostatik çekim kuvvetleri, lizozimin PLGA matrisine sıkıca bağlanmasına neden olmaktadır. Bu elektrostatik etkileşimler, lizozimin salım hızını azaltmakta ve salımın tamamlanmasını engellemektedir.

Literatür çalışmalarından yola çıkarak, *in vitro* salım çalışmaları pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tamponu olmak üzere 2 farklı çözünme ortamında gerçekleştirilmiştir (Khan vd., 2024). Şekil 3.18’de görüldüğü üzere, lizozimin pH 4,5 ortamındaki salımı ilk günden itibaren daha yüksektir. Lizozim yüklü PLGA nanopartiküllerinin düşük pH ortamlarında daha yüksek salım gösterdiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Şekil 3.23’te görüldüğü üzere, aprotininin pH 4,5 ortamındaki salımı ilk günden itibaren daha yüksektir. Bu durum, PLGA’nın düşük pH ortamında protonlanması ve pozitif yüke kayması ile açıklanmaktadır. PLGA, asidik ortamlarda protonlanarak negatif yükünü kaybeder ve nötr ya da pozitif yüklü hale gelir. Bu değişim, PLGA ve lizozim arasındaki iyonik etkileşimlerin azalmasına neden olur. Nötr veya pozitif yüklü PLGA, lizozimin pozitif yüküyle daha az elektrostatik çekim kuvveti oluşturur. Bu azalan çekim kuvveti, lizozimin PLGA matrisinden daha kolay salımına olanak tanır.

Belirli hastalıkların veya enfeksiyonların tedavisinde, hedef doku veya organların genellikle farklı pH seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, tümör mikroçevresi genellikle normal dokulardan daha asidik bir pH’a sahiptir. Bu nedenle, daha düşük pH’ta daha yüksek salım, ilacın doğrudan hedef bölgeye daha etkili bir şekilde ulaşmasını sağlayarak tedavi etkinliğini artırabilir.

İlaçların formülasyonlardan salım kinetiğini tanımlamak için matematiksel modeller sıkça kullanılmaktadır. Bu modeller, salım mekanizması hakkında önemli bilgiler sunabilir ve ilacın zaman içindeki salım profilini öngörmeye yardımcı olabilir (Zhang vd., 2010). Çalışmalarda Sıfırıncı Derece, Birinci Derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Weibull matematiksel modelleri ile uyum incelenmiştir. Hangi modelin deneysel verilere en iyi uyumu sağladığını belirlemek için düzeltilmiş korelasyon katsayısı (R^2) kullanılmıştır.

BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülasyonlarının salım kinetikleri incelendiğinde, elde edilen veriler her 3 formülasyonun da Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetiklerine uyum sağladığını göstermiştir. LZNP-13 formülasyonunun pH 7,4 PBS tamponunda ve pH 4,5 asetat tamponundaki salım kinetikleri incelendiğinde elde edilen veriler her 2 salım ortamı için de Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetiklerine uyum sağlandığını göstermiştir. APRONP-4 formülasyonunun pH 7,4 PBS tamponunda ve pH 4,5 asetat tamponundaki salım kinetikleri incelendiğinde elde edilen veriler her 2 salım ortamı için de Higuchi kinetiğine uyum sağlandığını göstermiştir. Weibull kinetiğinde yer alan şekil faktörü β değerinin 1’den küçük olması başlangıçta hızlı etkin madde salımı ve sonrasında hızla platoya ulaşıldığını göstermiştir. Higuchi kinetiğine uyum görülmesi matris tipi yapıdan

başlıca difüzyonla salımın gerçekleştiğini, Korsmeyer-Peppas kinetiğinde yer alan n değerlerinin 0,45'ten küçük olması salımın difüzyon ile gerçekleştiğini göstermektedir (Costa ve Lobo, 2001).

4.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizlerinin Değerlendirilmesi

LZNP-13 nanopartikül formülasyonunun DSC termogramı Şekil 3.20'de, APRONP-4 kodlu nanopartikül formülasyonunun DSC termogramı Şekil 3.25'te paylaşılmıştır.

Saf lizozim ~200 derecede ve PLGA ~50 derecede pik vermiştir. Bölüm 3.4.3'te belirtildiği üzere, elde edilen termogramlar literatür ile uyumludur. Lizozim nanopartikül formülasyonunda lizozime ait pikin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, aprotinin nanopartikül formülasyonunda aprotinine ait pikin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar formülasyondaki maddelerin bir araya gelerek nanopartikül yapısını oluşturduğu ve yapıya enkapsüle olduklarını göstermektedir.

4.8. SDS-PAGE Analizlerinin Değerlendirilmesi

Yapısal bütünlük tespiti için SDS-PAGE analizi yürütülmüştür. Formülasyonlardan elde edilen salım numunelerine ait bantların ilgili proteinlerin molekül ağırlığına ait seviyelerde olması, proteinlerin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve üretim basamaklarından etkilenmediğini göstermektedir.

4.9. Stabilité Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Stabilite çalışmaları LZNP-13 kodlu nanopartikül formülasyonunda bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 3.6'da paylaşılmıştır. Partikül boyutu, PDI, Zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği incelendiğinde oda koşullarında ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) zeta potansiyeli mutlak değeri artmış ve ortalama partikül boyutu azalmıştır ancak PDI değeri artmış ve enkapsülasyon etkinliği ~% 12 azalmıştır. Buzdolabı koşullarında ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) ise ortalama partikül boyutu, zeta potansiyeli mutlak değeri ve PDI değeri artmış, enkapsülasyon etkinliği ise ~% 4 azalmıştır. Buzdolabı şartlarında meydana gelen PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğindeki değişimin daha az olması, buzdolabı koşullarının daha iyi saklama ortamı sağladığını göstermektedir.

4.10. TEM Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla TEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin TEM görüntüleri incelendiğinde küresel nanopartiküller elde edildiği gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir (Bohrey, Chourasiya, ve Pandey, 2016).

4.11. Hücre Canlılığı Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların hücre canlılığına etkilerini incelemek için MTT yöntemi ile hücre canlılığı çalışmaları uygulanmıştır. Yapılan MTT hücre canlılığı testi sonuçlarına göre, uygulanan tüm formülasyonların % hücre canlılığının %80 veya üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, formülasyonların hücreler üzerinde toksik bir etki göstermediğini ve hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir (Bohrey, Chourasiya, ve Pandey, 2016).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikroakışkan sistem ile protein yüklü polimerik nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

- ✓ Çalışmalarda kullanılan BSA, lizozim ve aprotinin protein/peptit yapılarının miktar tayin çalışmaları çeşitli yüzdelerdeki Pluronic® 68 ve Pluronic® 127 çözeltilerinde ayrıca pH 7,4 PBS ve pH 4,5 asetat tampon ortamlarında Bikinkoninik Asit Yöntemi (BCA) ile gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Mikroakışkan platform kullanılarak uygun partikül büyüklüğü ve dağılımına sahip protein içermeyen (boş) PLGA formülasyonları oluşturulmuştur. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Boş formülasyonlar üzerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda mikroakışkan sistemin formülasyon parametreleri üzerinde oluşturduğu çeşitli etkiler incelenmiştir.
- ✓ BSA yüklü nanopartikül formülasyonları mikroakışkan platform kullanılarak üretilmiş ve hazırlanan formülasyonların karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Hazırlanan BSA yüklü nanopartikül formülasyonları partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI değerleri ve enkapsülasyon etkinliği açılarından değerlendirilerek, PDI değerleri <0,2 ve enkapsülasyon etkinliği > %70 olan BSANP-1, BSANP-9 ve BSANP-13 formülasyonları *in vitro* salım çalışmaları için seçilmiştir.
- ✓ Lizozim yüklü nanopartikül formülasyonları mikroakışkan platform kullanılarak üretilmiş ve hazırlanan formülasyonların karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Hazırlanan lizozim yüklü nanopartikül formülasyonları partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, PDI değerleri ve enkapsülasyon etkinliği açılarından

değerlendirilmiş, enkapsülasyon etkinliği > %30 olan LZNP-13 formülasyonu *in vitro* salım çalışmaları için seçilmiştir.

- ✓ Aprotinin yüklü nanopartikül formülasyonu mikroakışkan platform kullanılarak üretilmiş ve hazırlanan formülasyonun karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş, *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır.
- ✓ Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına SDS-PAGE analizi yapılarak proteinlerin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve üretim basamaklarından etkilenmediği gösterilmiştir.
- ✓ Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında DSC analizi ve TEM görüntüleme gerçekleştirilerek yapısal değerlendirmeleri yapılmıştır.
- ✓ Buzdolabı ve oda koşulları stabiliteleri çalışmaları 1 ay boyunca gerçekleştirilmiş, buzdolabı koşullarındaki stabilitenin daha uygun olduğunu görülmüştür.
- ✓ Yapılan literatür araştırmalarına göre bu çalışma ile ilk defa bir mikroakışkan platform kullanılarak lizozim PLGA nanopartiküllerine yüklenmiştir.
- ✓ Yapılan literatür araştırmalarına göre bu çalışma ile ilk defa bir mikroakışkan platform kullanılarak aprotinin yüklü nanopartiküller üretilmiştir.

Sonuçlar protein peptit yapılarının nanopartikül formülasyonlarına mikroakışkan platform kullanılarak yüklenebildiğini göstermiştir. Mikroakışkanlar geleneksel nanopartikül üretim yöntemleri ile karşılaştırıldıklarında, küçük boyut ve daha büyük yüzey-hacim oranı, daha yüksek hassasiyet göstermeleri, düşük maliyetleri, küçültülmüş boyutları, tekrarlanabilir sonuçlar vermeleri, kontrollü mikroçevre koşulları sağlayarak, protein ve peptitlerin biyolojik aktivitesini ve yapısal bütünlüğünü korumaları, numuneleri daha hızlı işlemleri ve otomatik ve yüksek düzeyde entegre olma potansiyelleri gibi birçok avantaj göstermektedir.

Ancak mikroakışkan sistemlerde ürünler sistemi tıkamadan nanopartikülleri istenen koşullarda üretebilmek hala bu sistemlerin en temel sorunlarından birini oluşturmaktadır.

Yüksek karıştırma hızları hazırlanan nanopartiküllerin boyutunu ve dağılımını küçüktense de azalan temas süreleri enkapsülasyon verimliliğini düşürebilmektedir.

Çalışmanın bulgularına ve analizlere dayanarak, aşağıda gelecekteki araştırmalar ve uygulamalar için öneriler listelenmiştir:

- ✓ Benzer boyutta ancak farklı yüke sahip protein ve peptitler ile farklı boyutta ancak benzer yüke sahip protein ve peptitler kullanılarak karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalı ve protein yapısının hazırlanan nanopartiküller üzerindeki etkileri anlaşılmalıdır.
- ✓ Farklı polimer türleri ile çalışmalar yapılarak polimer-protein etkileşimlerinin hazırlanan nanopartiküller üzerindeki etkileri anlaşılmalıdır.
- ✓ Farklı sürfaktan türleri ile denemeler gerçekleştirilmelidir.
- ✓ Mikroakışkan çip kanallarında yaşanan tıkanma problemi ile ilgili ileri çalışmalar yapılmalı ve problemin nedenleri daha ayrıntılı şekilde aydınlatılmalıdır.
- ✓ Farklı çip malzeme ve tasarımlarının hazırlanan formülasyonlar üzerindeki etkileri üzerine ileri çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 9th Edition of the European Pharmacopoeia. (2016). In. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.
- Agha, A., Waheed, W., Stiharu, I., Nerguizian, V., Destgeer, G., Abu-Nada, E., & Alazzam, A. (2023). A review on microfluidic-assisted nanoparticle synthesis, and their applications using multiscale simulation methods. *Discover Nano*, 18(1), 18.
- Agić, D., Brkić, H., Kazazić, S., Tomić, A., & Abramić, M. (2019). Aprotinin interacts with substrate-binding site of human dipeptidyl peptidase III. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
- Andrus, J., & Bond, W. (1958). Photoengraving in transistor fabrication. *Transistor technology*, 3, 151-162.
- Aryasomayajula, A., Bayat, P., Rezai, P., & Selvaganapathy, P. R. (2017). Microfluidic devices and their applications. *Springer handbook of nanotechnology*, 487-536.
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical biochemistry*, 410(2), 310-312.
- Bardeen, J. W., H. Brattain (1952). *Oscillation generator* (United States Patent No. U. S. P. Office.
- Batista, E., Sousa, J. A., Cardoso, S., & Silverio, V. (2020). Experimental testing for metrological traceability and accuracy of liquid microflows and microfluidics. *Flow Measurement and Instrumentation*, 71, 101691.
- Battat, S., Weitz, D. A., & Whitesides, G. M. (2022). An outlook on microfluidics: the promise and the challenge. *Lab on a Chip*, 22(3), 530-536.
- Bawa, R. (2010). Nanopharmaceuticals: nanopharmaceuticals. *European Journal of Nanomedicine*, 3(1), 34-40.
- Beebe, D. J., Mensing, G. A., & Walker, G. M. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering*, 4(1), 261-286.
- Bezelya, A., Küçüktürkmen, B., & Bozkır, A. (2023). Microfluidic Devices for Precision Nanoparticle Production. *Micro*,
- Bohrey, S., Chourasiya, V., & Pandey, A. (2016). Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. *Nano Convergence*, 3(1), 3.

- Bragheri, F., Vázquez, R. M., & Osellame, R. (2020). Microfluidics. In *Three-dimensional microfabrication using two-photon polymerization* (pp. 493-526). Elsevier.
- Cai, C., Bakowsky, U., Rytting, E., Schaper, A. K., & Kissel, T. (2008). Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 69(1), 31-42.
- Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M., & Prina-Mello, A. (2019). Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of controlled release*, 299, 31-43.
- Castillo-León, J. (2014). Microfluidics and lab-on-a-chip devices: history and challenges. In *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems: A Practical Guide* (pp. 1-15). Springer.
- Chesko, J., Kazzaz, J., Ugozzoli, M., O'Hagan, D. T., & Singh, M. (2005). An investigation of the factors controlling the adsorption of protein antigens to anionic PLG microparticles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94(11), 2510-2519.
- Convery, N., & Gadegaard, N. (2019). 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering*, 2, 76-91.
- Costa, P., & Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.
- Couvreux, P. (2013). Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 21-23.
- Crucho, C. I., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771-784.
- Cui, P., & Wang, S. (2019). Application of microfluidic chip technology in pharmaceutical analysis: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 9(4), 238-247.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, 161(2), 505-522.
- Dao, T. P. T., Nguyen, T. H., Ho, T. H., Nguyen, T. A., & Dang, M. C. (2014). A new formulation of curcumin using poly (lactic-co-glycolic acid)—polyethylene glycol diblock copolymer as carrier material. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(3), 035013.

- das Neves, J., Amiji, M., Bahia, M. F., & Sarmiento, B. (2013). Assessing the physical–chemical properties and stability of dapivirine-loaded polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 456(2), 307-314.
- Das, Y. K., Guven, D., Guvenc, D., Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). Organochlorine compounds in the adipose tissue of urban and rural women who gave birth by cesarean delivery in northern Turkey. *Toxicology Research*, 6(5), 664-670.
- Deb, R., Sarma, B., & Dalal, A. (2022). Magnetowetting dynamics of sessile ferrofluid droplets: a review. *Soft Matter*, 18(12), 2287-2324.
- Diao, L., & Meibohm, B. (2013). Pharmacokinetics and pharmacokinetic–pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clinical pharmacokinetics*, 52, 855-868.
- Dressaire, E., & Sauret, A. (2017). Clogging of microfluidic systems. *Soft Matter*, 13(1), 37-48.
- Emerich, D. F., & Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert opinion on biological therapy*, 3(4), 655-663.
- Fabozzi, A., Della Sala, F., di Gennaro, M., Barretta, M., Longobardo, G., Solimando, N., Pagliuca, M., & Borzacchiello, A. (2023). Design of functional nanoparticles by microfluidic platforms as advanced drug delivery systems for cancer therapy. *Lab on a Chip*, 23(5), 1389-1409.
- Feynman, R. P. (1959). Plenty of Room at the Bottom. APS annual meeting,
- Fleuren, G., Grond, J., & Hoedemaeker, P. J. (1980). In situ formation of subepithelial glomerular immune complexes in passive serum sickness. *Kidney International*, 17(5), 631-637.
- Forigua, A., Kirsch, R. L., Willerth, S. M., & Elvira, K. S. (2021). Recent advances in the design of microfluidic technologies for the manufacture of drug releasing particles. *Journal of controlled release*, 333, 258-268.
- Friend, J., & Yeo, L. (2010). Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. *Biomicrofluidics*, 4(2).
- Gerami, A., Alzahid, Y., Mostaghimi, P., Kashaninejad, N., Kazemifar, F., Amirian, T., Mosavat, N., Ebrahimi Warkiani, M., & Armstrong, R. T. (2019). Microfluidics for porous systems: fabrication, microscopy and applications. *Transport in Porous Media*, 130, 277-304.
- Gimondi, S., Ferreira, H., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2023). Microfluidic devices: a tool for nanoparticle synthesis and performance evaluation. *ACS nano*, 17(15), 14205-14228.
- Golay, M. J. (1957). A performance index for gas chromatographic columns. *nature*, 180(4583), 435-436.

- Gong, L., Cretella, A., & Lin, Y. (2023). Microfluidic systems for particle capture and release: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 115426.
- Grimmer, A., Wille, R., Grimmer, A., & Wille, R. (2020). Designing Meanders. *Designing Droplet Microfluidic Networks: A Toolbox for Designers*, 63-76.
- Hagen, G. (1839). Ueber die Bewegung des Wassers in engen cylindrischen Röhren. *Annalen der Physik*, 122(3), 423-442.
- Hamblin, M. R., & Karimi, M. (2020). *Biomedical applications of microfluidic devices*. Academic Press.
- Harrison, D. J., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z., Effenhauser, C. S., & Manz, A. (1993). Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science*, 261(5123), 895-897.
- Hessel, V., Löwe, H., & Schönfeld, F. (2005). Micromixers—a review on passive and active mixing principles. *Chemical engineering science*, 60(8-9), 2479-2501.
- Huang, C., & Tsou, C. (2014). The implementation of a thermal bubble actuated microfluidic chip with microvalve, micropump and micromixer. *Sensors and actuators A: Physical*, 210, 147-156.
- Huang, F., Zhao, Q., Guo, C., Ma, G., Wang, Q., Yin, Y., & Wu, Y. (2014). Use of aprotinin to reduce blood loss and transfusion in major orthopedic surgery: a meta-analysis. *Transfusion and Apheresis Science*, 51(2), 152-161.
- Illath, K., Kar, S., Gupta, P., Shinde, A., Wankhar, S., Tseng, F.-G., Lim, K.-T., Nagai, M., & Santra, T. S. (2022). Microfluidic nanomaterials: From synthesis to biomedical applications. *Biomaterials*, 280, 121247.
- ISO, E. (2009). 10993-5: 2009. *Biological evaluation of medical devices—Part, 5*.
- Jafari, M., & Mehrnejad, F. (2016). Molecular insight into human lysozyme and its ability to form amyloid fibrils in high concentrations of sodium dodecyl sulfate: a view from molecular dynamics simulations. *PLoS One*, 11(10), e0165213.
- Jia, F., Gao, Y., & Wang, H. (2022). Recent advances in drug delivery system fabricated by microfluidics for disease therapy. *Bioengineering*, 9(11), 625.
- Jurin, J. (1718). II. An account of some experiments shown before the Royal Society; with an enquiry into the cause of the ascent and suspension of water in capillary tubes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 30(355), 739-747.
- Kalyan, S., Torabi, C., Khoo, H., Sung, H. W., Choi, S.-E., Wang, W., Treutler, B., Kim, D., & Hur, S. C. (2021). Inertial microfluidics enabling clinical research. *Micromachines*, 12(3), 257.

- Kamat, V., Dey, P., Bodas, D., Kaushik, A., Boymelgreen, A., & Bhansali, S. (2023). Active microfluidic reactor-assisted controlled synthesis of nanoparticles and related potential biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(25), 5650-5667.
- Kandlikar, S., Garimella, S., Li, D., Colin, S., & King, M. R. (2005). *Heat transfer and fluid flow in minichannels and microchannels*. elsevier.
- Kapoor, D. N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., & Dhawan, S. (2015). PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic delivery*, 6(1), 41-58.
- Karamustafa, F., Çelebi, N., Degim, Z., & Yilmaz, F. (2006). Evaluation of the viability of L-929 cells in the presence of alendronate and absorption enhancers. *FABAD journal of pharmaceutical sciences*, 31(1), 1.
- Keservani, R. K., Sharma, A. K., & Jarouliya, U. (2015). Protein and peptide in drug targeting and its therapeutic approach.
- Khaliq, N. U., Lee, J., Kim, S., Sung, D., & Kim, H. (2023). Pluronic F-68 and F-127 based nanomedicines for advancing combination cancer therapy. *Pharmaceutics*, 15(8), 2102.
- Khan, M. R. H., Armstrong, Z., Lenertz, M., Saenz, B., Kale, N., Li, Q., MacRae, A., Yang, Z., & Quadir, M. (2024). Metal–Organic Framework Induced Stabilization of Proteins in Polymeric Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(12), 14405-14420.
- Kilby, J. S. (1964). Miniaturized electronic circuits. In: Google Patents.
- Kipping, F. S., & Lloyd, L. L. (1901). XLVII.—Organic derivatives of silicon. Triphenylsilicic and alkyloxysilicon chlorides. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 79, 449-459.
- Klojdová, I., Milota, T., Smetanová, J., & Stathopoulos, C. (2023). Encapsulation: a strategy to deliver therapeutics and bioactive compounds? *Pharmaceutics*, 16(3), 362.
- Kuklo, T. R., Owens, B. D., & Polly Jr, D. W. (2003). Perioperative blood and blood product management for spinal deformity surgery. *The Spine Journal*, 3(5), 388-393.
- Kumar, A., & Whitesides, G. M. (1993). Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching. *Applied physics letters*, 63(14), 2002-2004.
- Kumar, M. R., Bakowsky, U., & Lehr, C. (2004). Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25(10), 1771-1777.
- Lei, K. F. (2018). Introduction: The origin, current status, and future of microfluidics. *Microfluidics: fundamental, devices and applications: fundamentals and applications*, 1-18.

- Lesnierowski, G., & Kijowski, J. (2007). Lysozyme. *Bioactive egg compounds*, 33-42.
- Li, H., Liu, J., Li, K., & Liu, Y. (2021). A review of recent studies on piezoelectric pumps and their applications. *Mechanical Systems and Signal Processing*, 151, 107393.
- Li, J., Zhang, Y., Dong, J., Li, D., Ba, X., & Wang, S. (2024). Dissimilar effects of the hydrophilic carbon dots on the amyloid aggregation of two model proteins and the mechanism discussion. *Journal of Molecular Recognition*, e3085.
- Lin, P.-C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology advances*, 32(4), 711-726.
- Liu, Y., Yang, G., Hui, Y., Ranaweera, S., & Zhao, C. X. (2022). Microfluidic nanoparticles for drug delivery. *small*, 18(36), 2106580.
- Maged, A., Abdelbaset, R., Mahmoud, A. A., & Elkasabgy, N. A. (2022). Merits and advances of microfluidics in the pharmaceutical field: design technologies and future prospects. *Drug delivery*, 29(1), 1549-1570.
- Mahajan, N., Sakarkar, D., & Manmode, A. (2011). Preparation and characterization of meselamine loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 3(4).
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.
- Marre, S., & Jensen, K. F. (2010). Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, 39(3), 1183-1202.
- Massenburg, S. S., Amstad, E., & Weitz, D. A. (2016). Clogging in parallelized tapered microfluidic channels. *Microfluidics and nanofluidics*, 20, 1-5.
- Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, 101-105.
- McClements, D. J. (2018). Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Advances in colloid and interface science*, 253, 1-22.
- Melvad, C., Krühne, U., & Frederiksen, J. (2010). Design considerations and initial validation of a liquid microflow calibration setup using parallel operated syringe pumps. *Measurement Science and Technology*, 21(7), 074004.
- Michalets, E., & Harris, L. (2018). Chapter 44—Antifibrinolytics: Pharmacologic Profile and Clinical Utilization in Cardiovascular Thrombus. *Academic Press: Cambridge, MA, USA*, 615-649.

- Miranda, C. S., Ribeiro, A. R., Homem, N. C., & Felgueiras, H. P. (2020). Spun biotextiles in tissue engineering and biomolecules delivery systems. *Antibiotics*, 9(4), 174.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB journal*, 19(3), 311-330.
- Mohammad, M. A., Grimsey, I. M., & Forbes, R. T. (2015). Mapping the solid-state properties of crystalline lysozyme during pharmaceutical unit-operations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 176-183.
- Moreau, T., & Gauthier, F. (1996). Homology modelling of rat kallikrein rK9, a member of the tissue kallikrein family: implications for substrate specificity and inhibitor binding. *Protein Engineering, Design and Selection*, 9(11), 987-995.
- Muttenthaler, M., King, G. F., Adams, D. J., & Alewood, P. F. (2021). Trends in peptide drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 20(4), 309-325.
- Nakagawa, S., Johnson, P. C., & Schielzeth, H. (2017). The coefficient of determination R² and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(134), 20170213.
- Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., Sipos, B., Haspel, H., Kozma, G., Kónya, Z., & Dobó, D. G. (2022). Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. *Pharmaceutics*, 14(9), 1798.
- Ng, J. M., Gitlin, I., Stroock, A. D., & Whitesides, G. M. (2002). Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis*, 23(20), 3461-3473.
- Niculescu, A.-G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2011.
- Oliva, R., Banerjee, S., Cinar, H., Ehrt, C., & Winter, R. (2020). Alteration of protein binding affinities by aqueous two-phase systems revealed by pressure perturbation. *Scientific reports*, 10(1), 8074.
- Oroojalian, F., Charbgo, F., Hashemi, M., Amani, A., Yazdian-Robati, R., Mokhtarzadeh, A., Ramezani, M., & Hamblin, M. R. (2020). Recent advances in nanotechnology-based drug delivery systems for the kidney. *Journal of controlled release*, 321, 442-462.
- Osborne, J. W. (1861). *Improvement in photolithographic transfers* (AUSTRALIA Patent No. 33,172).
- Otvos Jr, L., & Wade, J. D. (2014). Current challenges in peptide-based drug discovery. In (Vol. 2, pp. 62): Frontiers Media SA.
- Paillard-Giteau, A., Tran, V.-T., Thomas, O., Garric, X., Coudane, J., Marchal, S., Chourpa, I., Benoît, J.-P., Montero-Menei, C., & Venier-Julienne, M.-C. (2010). Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an

s/o/w emulsion technique. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 75(2), 128-136.

Panigrahi, P. K. (2016). *Transport phenomena in microfluidic systems*. John Wiley & Sons.

Pattanayak, P., Singh, S. K., Gulati, M., Vishwas, S., Kapoor, B., Chellappan, D. K., Anand, K., Gupta, G., Jha, N. K., & Gupta, P. K. (2021). Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives. *Microfluidics and nanofluidics*, 25, 1-28.

Peshin, S., Madou, M., & Kulinsky, L. (2022). Microvalves for applications in centrifugal microfluidics. *Sensors*, 22(22), 8955.

Peters Jr, T. (1985). Serum albumin. *Advances in protein chemistry*, 37, 161-245.

Poiseuille, J. (1838). Ecoulement des Liquides: Societe Philomatique de Paris. *Extraits des Proces-Verbaux des Seances Pendant l'Annee*, 3, 77-81.

Poiseuille, J. L. (1844). *Recherches experimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très-petits diamètres*. Imprimerie Royale.

Pondman, K., Le Gac, S., & Kishore, U. (2023). Nanoparticle-induced immune response: Health risk versus treatment opportunity? *Immunobiology*, 228(2), 152317.

Rayleigh, L. (1879). On the capillary phenomena of jets. *Proc. R. Soc. London*, 29(196-199), 71-97.

Ren, K., Zhou, J., & Wu, H. (2013). Materials for microfluidic chip fabrication. *Accounts of chemical research*, 46(11), 2396-2406.

Roces, C. B., Christensen, D., & Perrie, Y. (2020). 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, 582-593.

Roces, C. B., Lou, G., Jain, N., Abraham, S., Thomas, A., Halbert, G. W., & Perrie, Y. (2020). Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics. *Pharmaceutics*, 12(11), 1095.

Rogers, J. A., & Nuzzo, R. G. (2005). Recent progress in soft lithography. *Materials today*, 8(2), 50-56.

Roy, A., Tiwari, S., Karmakar, S., Reddy, K. A., & Pandey, L. M. (2019). The effect of the stoichiometric ratio of zinc towards the fibrillation of Bovine Serum Albumin (BSA): A mechanistic insight. *International journal of biological macromolecules*, 123, 409-419.

Roy, S., & Kumar, V. (2014). A practical approach on SDS PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8), 955-960.

- Salis, A., Boström, M., Medda, L., Cugia, F., Barse, B., Parsons, D. F., Ninham, B. W., & Monduzzi, M. (2011). Measurements and theoretical interpretation of points of zero charge/potential of BSA protein. *Langmuir*, 27(18), 11597-11604.
- Shaban, S. M., Kang, J., & Kim, D.-H. (2020). Surfactants: Recent advances and their applications. *Composites communications*, 22, 100537.
- Shakeri, A., Khan, S., & Didar, T. F. (2021). Conventional and emerging strategies for the fabrication and functionalization of PDMS-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 21(16), 3053-3075.
- Shen, J., & Burgess, D. J. (2013). In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug delivery and translational research*, 3, 409-415.
- Shkodra, B., Grune, C., Traeger, A., Vollrath, A., Schubert, S., Fischer, D., & Schubert, U. (2019). Effect of surfactant on the size and stability of PLGA nanoparticles encapsulating a protein kinase C inhibitor. *International journal of pharmaceutics*, 566, 756-764.
- Shrestha, S., Wang, B., & Dutta, P. (2020). Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. *Advances in colloid and interface science*, 279, 102162.
- Steudle, A., & Pleiss, J. (2011). Modelling of lysozyme binding to a cation exchange surface at atomic detail: the role of flexibility. *Biophysical journal*, 100(12), 3016-3024.
- Stokes, G. G. (2007). On the theories of the internal friction of fluids in motion, and of the equilibrium and motion of elastic solids.
- Sun, S.-B., Liu, P., Shao, F.-M., & Miao, Q.-L. (2015). Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(10), 19670.
- Surappa, S., Multani, P., Parlatan, U., Sinawang, P. D., Kaifi, J., Akin, D., & Demirci, U. (2023). Integrated “lab-on-a-chip” microfluidic systems for isolation, enrichment, and analysis of cancer biomarkers. *Lab on a Chip*, 23(13), 2942-2958.
- Sutera, S. P., & Skalak, R. (1993). The history of Poiseuille's law. *Annual review of fluid mechanics*, 25(1), 1-20.
- Swaminathan, R., Ravi, V. K., Kumar, S., Kumar, M. V. S., & Chandra, N. (2011). Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 84, 63-111.
- Sweet, R. G., & Cumming, R. C. (1968). Fluid droplet recorder with a plurality of jets. In: Google Patents.
- Terry, S. C., Jerman, J. H., & Angell, J. B. (1979). A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE transactions on electron devices*, 26(12), 1880-1886.

- Van Deemter, J., Zuiderweg, F., & Klinkenberg, A. v. (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, 5(6), 271-289.
- Voigt, N., Henrich-Noack, P., Kockentiedt, S., Hintz, W., Tomas, J., & Sabel, B. A. (2014). Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. *Journal of nanoparticle research*, 16, 1-13.
- Weng, J., Tong, H. H., & Chow, S. F. (2020). In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*, 12(8), 732.
- Whitesides, G. (2018). Microfluidics in late adolescence. *arXiv preprint arXiv:1802.05595*.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *nature*, 442(7101), 368-373.
- Wu, J., Fang, H., Zhang, J., & Yan, S. (2023). Modular microfluidics for life sciences. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 85.
- Xie, S., Wang, S., Zhao, B., Han, C., Wang, M., & Zhou, W. (2008). Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(2), 199-204.
- Xu, H., Wang, Z., Wei, W., Li, T., & Duan, X. (2024). Microfluidic confined acoustic streaming vortex for liposome synthesis. *Lab on a Chip*, 24(10), 2802-2810.
- Xu, X., Tang, Q., Gao, Y., Chen, S., Yu, Y., Qian, H., McClements, D. J., Cao, C., & Yuan, B. (2024). Recent developments in the fabrication of food microparticles and nanoparticles using microfluidic systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Yadav, P., & Yadav, A. B. (2021). Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 1-9.
- Ye, C., & Venkatraman, S. (2019). The long-term delivery of proteins and peptides using micro/nanoparticles: overview and perspectives. *Therapeutic delivery*, 10(5), 269-272.
- Yeo, L. Y., Chang, H. C., Chan, P. P., & Friend, J. R. (2011). Microfluidic devices for bioapplications. *small*, 7(1), 12-48.
- Yu, J., Qiu, H., Yin, S., Wang, H., & Li, Y. (2021). Polymeric drug delivery system based on pluronics for cancer treatment. *Molecules*, 26(12), 3610.
- Yücel, Ç., Karatoprak, G. Ş., Yalçıntaş, S., & Böncü, T. E. (2022). Ethosomal (–)-epigallocatechin-3-gallate as a novel approach to enhance antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase effects. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 13(1), 491-502.

- Zeng, W., Li, S., & Wang, Z. (2015). Characterization of syringe-pump-driven versus pressure-driven microfluidic flows. 2015 International Conference on Fluid Power and Mechatronics (FPM),
- Zhang, C., Xing, D., & Li, Y. (2007). Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends. *Biotechnology advances*, 25(5), 483-514.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal*, 12, 263-271.
- Zhao, P., Wang, J., Chen, C., Wang, J., Liu, G., Nandakumar, K., Li, Y., & Wang, L. (2022). Microfluidic applications in drug development: Fabrication of drug carriers and drug toxicity screening. *Micromachines*, 13(2), 200.
- Zhirnov, O., Klenk, H., & Wright, P. (2011). Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral research*, 92(1), 27-36.
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., & Silva, A. M. (2020). Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731.
- Zimmermann, R., Leal, B. B. J., Braghirolli, D. I., & Pranke, P. (2023). Production of nanostructured systems: Main and innovative techniques. *Drug Discovery Today*, 28(2), 103454.