

# TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

AlgalTech

PROJE ADI

Yeni Nesil Kanser Tedavisi için Mikroalg Bazlı-Nanofiber Yüklü  
Karbon Nanotüp Yapıların Geliştirilmesi

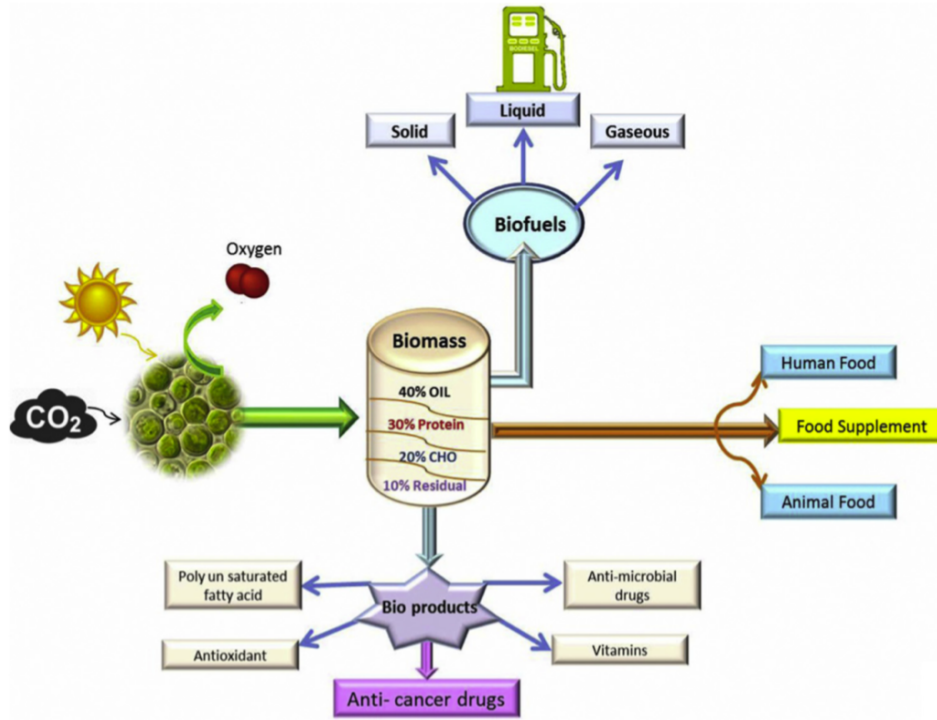
BAŞVURU ID

466960

## İçindekiler

### 1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan)

Günümüzde birçok gelişmiş teşhis ve tedavi yöntemi olmasına rağmen, kanser en önemli sağlık sorunlarından birisidir ve bu sorunun çözümü için milyarlarca dolar araştırma yatırımı yapılmaktadır. Kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesi, farklı doku veya bölgelerde farklı davranışlar sergilemesi, komşu dokuları istila etmesi veya kan/lenfatik sistem yoluyla metastaz yapabilmesi, heterojen bir yapıya sahip olmaları gibi özelliklerinden dolayı kanser teşhis ve tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Geleneksel yöntemlerdeki olumsuzlukların önüne geçebilmek için sadece hedeflenen bölgedeki tümörlü bölgedeki ilaç salınımını sağlayan tedavi yöntemleri son yıllarda nanoteknoloji uygulamalarının da gelişmesiyle birlikte artış göstermektedir. Bu yöntem ile kanserle savaşta oldukça önemli bir noktaya gelmesine rağmen kullanılan kimyasal ilaçların vücut içerisindeki zararları hala çözülmesi gereken bir problemdir. Bu açıdan düşünüldüğünde bazı bitki ve mikroorganizma türleri tarafından sentezlenen antikanser etkili sekonder metabolitler bu sorunun çözümü için oldukça önemli yapılardır. Bu nanoteknolojik uygulamalardan birisi de dünyada bulunan en çok yönlü element olan karbondan oluşan, kanser tedavisine yönelik ilaç salım sistemlerinde, moleküler algılama ve biyomühendislik gibi biyoteknolojinin pek çok alanında kullanılan karbon nanotüpler (CNT)'dir. Karbon nanotüpleri sentezlemek için kimyasal işlemler (CVD) ve fiziksel (arc discharge, laser ablation) başta olmak üzere çeşitli teknikler de mevcuttur. Çalışmada kullanılacak olan CNT'ler iletkenlikleri, yüksek ilaç yüklem kapasiteleri sağlayan yüzey alanları, yapısal boyutları, mukavemetleri, düşük yoğunluk, adsorpsiyon özellikleri, biyouyumlulukları, hedefe yönelik tedavilerde kullanımları ve maliyet etkinliği gibi özelliklerinden dolayı içerlerine kanser ilaçları veya bazı biyolojik malzemelerin yüklenmesi sonucu kanser tedavisine yönelik ilaç salım sistemlerinde kullanıldıkları için tercih edilmiştir. Kanser tedavisi ilaç salım sistemlerinde ilaçlara ek olarak proteinler, peptitler ve nükleik asitler de CNT'lere bağlanarak verilebilir. Yine çalışmada kullanılacak olan ve son yıllarda birçok alanda kullanımı yaygınlaşan mikroalgler birçok tür barındıran ve fotosentez ile güneş enerjisi kullanarak CO<sub>2</sub> sabit düzeyde tutarak sera gazı etkilerinin azaltılmasına ve su, toprak, hava kirliliğini önlenmesine yardımcı olan ökaryotik canlılardır. Mikroalgler içeriklerindeki biyoaktif maddeler sayesinde antioksidan, anti-inflamatuar, anti-viral ve anti-kanser dâhil olmak üzere geniş biyoaktivite göstermekte olup, özellikle yüksek antikanserojen aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Önerilen projede kutup mikroalgleri kullanılacaktır; çünkü kutup mikroalgleri buldukları zorlu çevre şartlarına adaptasyonları gereği diğer bölgelerdeki mikroalglere kıyasla daha farklı biyokimyasal içeriğe sahip olan ekstremofilik mikroorganizmalardır. Araştırmacılar, bu bölgede bulunan mikroalglerin çevre koşullarını tolere etmek amacıyla metabolik adaptasyon mekanizması olarak değerli biyoaktif bileşenleri ve daha etkili antioksidanların biosentezini gerçekleştirdiği düşüncesindedir.



Şekil 1. Mikroalglerden üretilen ürünler ve başlıca kullanım alanları. (referans)

Önerilen projenin amacı kutupta ekstrem koşullarına uyum sağlamış mikroalg ekstrakt bazlı nanofiberlerin adsorbe edildiği CNT'lerin kanser tanı ve tedavisindeki kullanımının incelenmesidir. Bu kapsamda ilaç salım performansını artırmak ve CNT'lerin toksik özelliklerini azaltmak amacıyla elektrospinning yöntemi ile Antarktika bölgesindeki Horse Shoe Adası Skua Lake'den, ülkemiz imkanlarıyla gerçekleştirilen ulusal bilim seferi sırasında alınan örneklerden "Algal Biyoteknoloji ve Biyoproses Laboratuvarı"nda izole edilip, tanımlanan, yetiştirilen ve çoğaltılan kutup mikroalglerinin antikanser özellikli biyoaktiflerce zengin ekstraktlarıyla yüklü nanofiberler elde edilecek ve bu nanofiberler; mikroalglerin ekstraksiyon sonrası kalan posalarından sıfır atık yaklaşımıyla üretilecek olan CNT'ler içerisine yüklenecektir. Elde edilen nanofiber yüklü CNT'ler ise kanser tanı ve tedavisinde kullanılarak bu yapıların kanser çalışmalarının kullanım potansiyelleri belirlenecektir. Böylece hem kanser tedavisinde kullanılmak üzere mikroalg kaynaklı alternatif sürdürülebilir yöntem geliştirilecek hem de patent, yayın, proje ve ticari ürün gibi çıktılarının önü açılmış olacaktır.

## 2. Problem/Sorun (5 puan)

### 2.1 Geleneksel Kanser Tedavisine Yönelik Problemler

Kanser; hücrelerin kontrolsüz bölünme, farklı doku veya bölgelerde farklı davranışlar sergileme, komşu dokuları istila etme veya kan/lenfatik sistem yoluyla metastaz yapabilme, heterojen yapıda olmaları gibi özelliklerinden dolayı tıp alanındaki tüm gelişmelere rağmen, ölüm oranının yüksek olduğu, dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Dolayısıyla kanser tedavisine yönelik yıllardır çeşitli araştırmalar ve yatırımlar yapılmaktadır. Ancak kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi geleneksel yöntemlerdeki düşük hedefleme etkinliği, normal ve sağlıklı hücrelerde meydana getirdikleri toksisite ve ilaç direnci gibi problemlerden dolayı alternatif çözüm arayışları aranmaktadır. Bu kapsamda projede geleneksel yöntemlere alternatif olarak biyoteknoloji ve biyomühendislik alanlarını içine alan bir araç olan ilaç salım sistemleri kullanılacaktır.

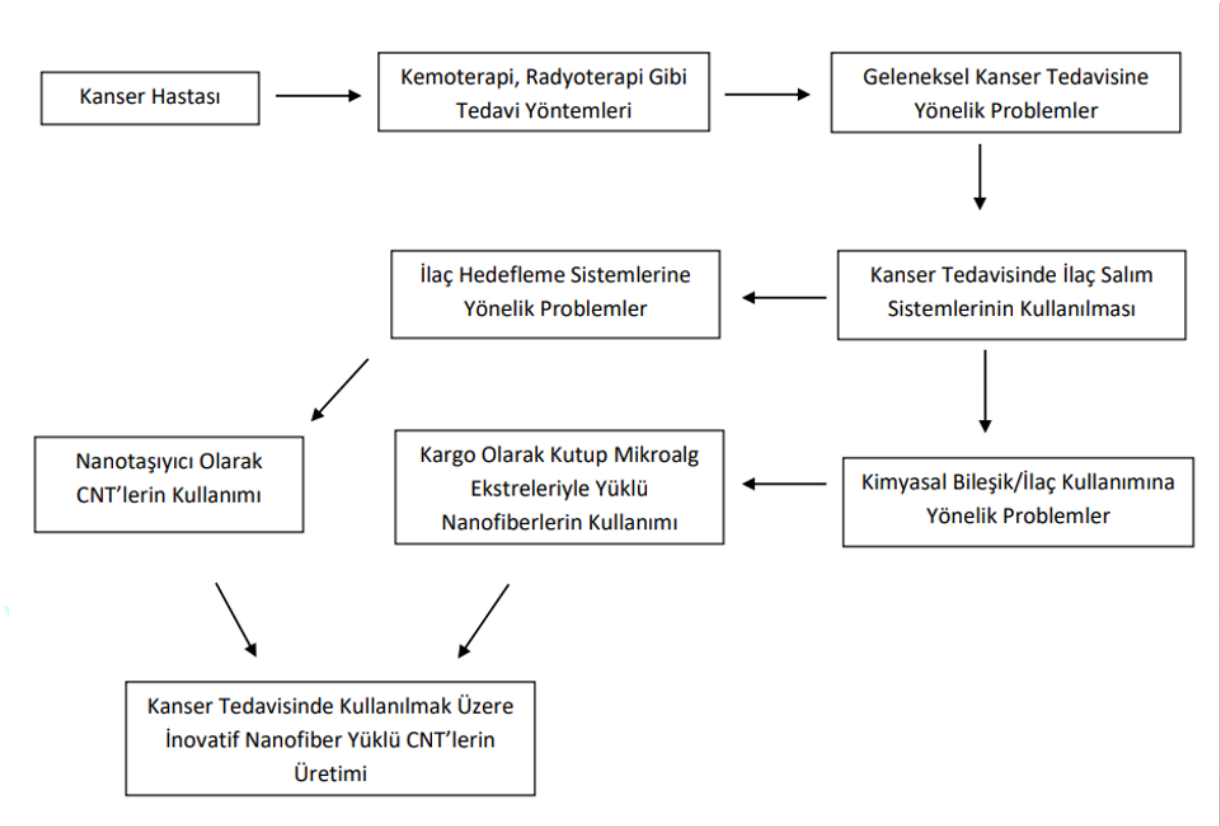
### 2.2 İlaç Hedefleme Sistemlerine Yönelik Problemler

Günümüzde var olan ve ilaç hedefleme sistemlerinde kullanılan ilaç taşıyıcıların düşük ilaç yükleme kapasitesi, düşük yüzey alanları, stabilite sorunları, düşük salım etkinliği ya da uygun olmayan bölgede salım yapılması, yanlış bölge hedeflemesi ve potansiyel toksik ajan ya da degrade ürün içermesi gibi çeşitli kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu sınırlamaları minimize etmek için farklı taşıyıcı arayışlarıyla birlikte mevcut taşıyıcıların işlevselleştirilmesi için çeşitli çalışmalar bulunmakta ve bu alandaki araştırmalar hızla artmaktadır. Bu proje fikrinde kanser tedavisine yönelik kullanılması planlanan, gelecek için umut vaat eden CNT'ler, ilaçların veya diğer moleküler maddelerin hedefe yönelik olarak verilmesi için taşıyıcı olarak kullanılacaktır.

### 2.3 Kanser Tedavisinde Kimyasal Bileşik Kullanımına Yönelik Problemler

Kanser tedavisine yönelik gerçekleştirilen hedefli ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan ikinci, üçüncü ve son yıllarda dördüncü nesil kimyasal yapıları farklı kanser ilaçlarının yanı sıra çeşitli biyoaktif bileşiklerin (örneğin; curcumin, hiperisin) salımı gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Çeşitli araştırmalar, ilaç/biyoaktif bileşik tipi, ilaç/biyoaktif bileşik konsantrasyonu, kanser hücre hattı tipi ve sitotoksikite analizinin maruz kalma süresinin antikanser etkisinin değerlendirilmesinde farklı sonuçlara neden olduğunu göstermektedir. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kanser ilaçlarının etkinliği yüksek olmasına rağmen saç dökülmesi, kemik iliği baskılanması, kusma ve kızarıklık gibi önemli yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürmek için kimyasal içerikli kanser ilaçları gibi ilaçların ikamesine ihtiyaç vardır. Biyoaktif bir bileşik kaynağı olarak algler, antikanser çalışmaları için geniş çapta araştırılmaktadır. Alglerin ürettiği bileşiklerin farklı kanser türlerinde etkinliği bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu proje fikrinde ekstrem koşullardan izole edilmiş kutup mikroalglerinden ekstrakte edilen, antikanser özellikli biyoaktiflerce zengin ekstraktları ile yüklü nanofiberler elde edilerek CNT'ler içerisine tutturulacaktır.

### 3. Çözüm (20 puan)



Şekil 2. Önerilen projemize yönelik sorun ve çözüm aşamaları.

Bu proje fikrinde kanser hastaları için ağır yan etkileri ve düşük hedefleme etkinliği bulunan kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemlerine alternatif olarak ilaç salım sistemlerinin kullanılması amaçlanmıştır. İlaç salım sistemlerinin taşıyıcı ve bu taşıyıcıların içerdikleri kimyasal bileşikler gibi limitasyonları azaltmak için ise projede nanotaşıyıcı olarak CNT, kargo olarak ise biyoaktifçe zengin kutup mikroalgi ekstraktlarıyla yüklü nanofiberlerin kullanılması tercih edilmiştir.

Geleneksel yöntemlerdeki ilaç direnci, etkinlik ve sitotoksinite gibi sorunlar, hedeflenen ilaç salımı ile çözülmektedir. Hedefe yönelik ilaç dağıtımının bir avantajı, ilaçların yalnızca tümörde salınması ve böylece normal ve sağlıklı hücrelere yönelik toksisitenin en aza indirilmesidir. İlacın, hedef bölgesinde istenen hızda etkinliği bakımından en uygun etkileşmeyi sağlaması, etken maddenin dozunun azaltılması, etken maddenin sadece hedef organa salınımı, hastaya daha yüksek uyum ve yüksek seçicilik, biyouyumluluk ve stabilite kullanılan yöntemi geleneksel yöntemlere göre oldukça avantajlı hale getirmektedir. Böylece oluşabilecek yan etkiler büyük oranda minimuma indirilebilecek ve böylece bölgeye özgü ilacın/kargonun taşınmasıyla da terapötik indeks iyileştirebilecektir.

Ekibimiz mikroalgler konusunda tecrübeye sahip olmakla birlikte laboratuvarımızda kutup mikroalgleriyle ilgili çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu kapsamda ilk olarak Horseshoe Adası, Skua Gölü, Antarktika'dan izole edilmiş *Chlorella sp.* (Egemen.001) türü kutup mikroalgi laboratuvar ortamında yetiştirilip ekstraksiyon işlemine uğratılmıştır. Ekstraksiyon prosesi sonucunda antikanser etkisi olan ve sekonder metabolitlerce zengin ekstraktlar ve atık biyokütle olarak mikroalg posası elde edilmiştir. Önerilen projede kutup mikroalgleri buldukları zorlu çevre şartlarına adaptasyonları gereği diğer bölgelerdeki mikroalglerle kıyasla daha farklı biyokimyasal içeriğe sahip olan ekstremofilik mikroorganizma oluşlarından dolayı çevre koşullarını tolere etmeleri amacıyla metabolik adaptasyon mekanizması olarak değerli biyoaktif bileşenleri ve daha etkili antioksidanların biyosentezini gerçekleştirdiği düşüncesi ile kullanılacaktır. Bu nedenle diğer mikroalg türlerine kıyasla daha yüksek anti-kanserojen aktivite göstermesi amacıyla kutup mikroalglerinin kullanılması tercih edilmiştir.

İlk olarak ilaç hedefleme sisteminde nanotaşıyıcı olarak kullanılmak üzere atık mikroalg posasından piroliz işlemi sonucu biyochar üretimi yapılmış ve sonrasında elde edilen biyocharlardan mikrodalga irradyasyonu tekniği ile CNT yapısı üretilmiştir. İlaçlar, genler, hedef moleküller ve çok değerlik özellikleri uygulayan hücreleri gibi terapötiklerin hedef bölgelere taşınmasında kullanıldığı bilinen ve sitotoksik bir etki yapmadan hücrelere etkili ve rahat bir şekilde nüfuz etme, penetre olma ve ilaç hedefleme etkinliklerini iyileştirmek amacıyla çeşitli biyomoleküller ile işlevselleştirilebilme kabiliyetleri nedeniyle kanser tedavisine yönelik çalışmalarda CNT'lerin ilaç taşıyıcı olarak kullanılması istenmiştir. Bir nanomalzeme olan CNT'ler aktif ve pasif hedefleme elde etmek için manipüle edilebilen iğne benzeri yapıda küçük partikül boyutuna ve artan yüzey alanına sahiptirler. Dolayısıyla ilaç yüklü nanotaşıyıcı olan CNT'ler gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi olarak adlandırılan tümör yerlerinde hızla birikme özelliklerine de sahiptir. Karbon nanotüplerin taşıyıcı olarak kullanılması aynı zamanda CNT'lerin kargo ile esnek etkileşim, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, olağanüstü mukavemet, optik ve elektriksel özellikler, yüksek stabilite, biyoyumluluk ve hedeflenen bölgelerde terapötik ajanları salma gibi yetenekleri sayesinde ilaç hedefleme sistemlerindeki birçok sorunun üstesinden gelmektedir. Karbon nanotüp bazlı hedefe yönelik ilaç dağıtımının en önemli avantajlarından biri olarak bir ilacın/kargonun aynı etkinlikte ancak daha düşük bir dozda kullanılabilmesini sağlayarak maliyet ve malzeme konusunda tasarruf sağlayarak, kargo olarak toksik bir ilaç kullanılacağı zaman da bunların yan etkilerinin azaltılması sağlanmaktadır. Tüm bu avantajların yanı sıra CNT'lerin projemizde sürdürülebilirlik ve sıfır atık prensibine bağlı olarak kutup mikroalg posasından elde edilmesiyle biyoyumluluk ve biyobozunabilirliğin artırılması, kargoyu korurken mükemmel izole edilmiş bir ortam sağlaması, minimum yan etki ile hedef bölgeye ulaşması ve salım yapması istenirken çevreye verilen zarar da minimize edilmiştir.

Diğer aşamada ise kutup mikroalg ekstraktı yüklü nanofiber üretimi için elektrospinning tekniği kullanılmış ve bu nanofiberlerin CNT'lere tutturulmasıyla kanser tanı ve tedavisinde kullanılması hedeflenmiştir. Kimyasal bileşikler yerine doğada bulunan ve esansiyel/esansiyel olmayan bileşiklerden oluşan biyoaktif bileşikler yan etki olmaksızın kanser hücrelerinin canlılığını azaltarak umut verici sonuçlar vermekte ve bu projede kimyasal ilaç ikamesi olarak zengin bir biyoaktif bir bileşik kaynağı olarak kutup mikroalglerinin kullanılmasına karar

verilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu birçok kanser türünde mikroalglerin anti-kanser özelliği sergilediği ve kanser hücrelerinde doğal öldürücü hücre aktivitesi gösterirken aynı zamanda bağışıklık sisteminin aktivasyonu sağladığı görülmüştür. Bu sayede vücuttaki kanser hücresi büyümesini inhibe ederken aynı zamanda vücudun savunmasını da geliştirmektedirler. Mikroalglerdeki son gelişmeler, ilaç yükleme, hedeflenen dağıtım ve floresan görüntüleme için önemli biyomedikal potansiyel sergilemiştir. Son zamanlarda, bazı alg türevli kaynakların antikanser özelliklerinin, hücrenel sitotoksisite, tümör hücrelerinin invazyonunu regüle etme ve kanser hücrelerinin apoptozunu artırma gibi çeşitli hücrenel mekanizmaları modüle ettiği bulunmuştur, birçok hücrenel ve moleküler araştırma sonucunda da alg türevli bileşiklerin doğal güçlü anti-malign aktivitesi ne sürülmüştür. Bu kısımda nanofiberlerin kimyasal bileşik yerine mikroalg ekstraktıyla yüklü olması ve CNT'lerin nanofiberler ile etkinliğinin artırılmasıyla da birçok limitasyonun üstesinden gelinmektedir. Mikroalg ekstraktlarının antioksidan, anti-inflamatuar, anti-viral ve anti-kanser gibi biyoaktif etkilerini kaybetmemesi için bir enkapsülasyon yolu olan elektrospinning yöntemi alglerin biyoaktif bileşiklerini kapsüllemek ve üretilen nanofiberlerin boyutunu küçültmek amacıyla kullanılmıştır.

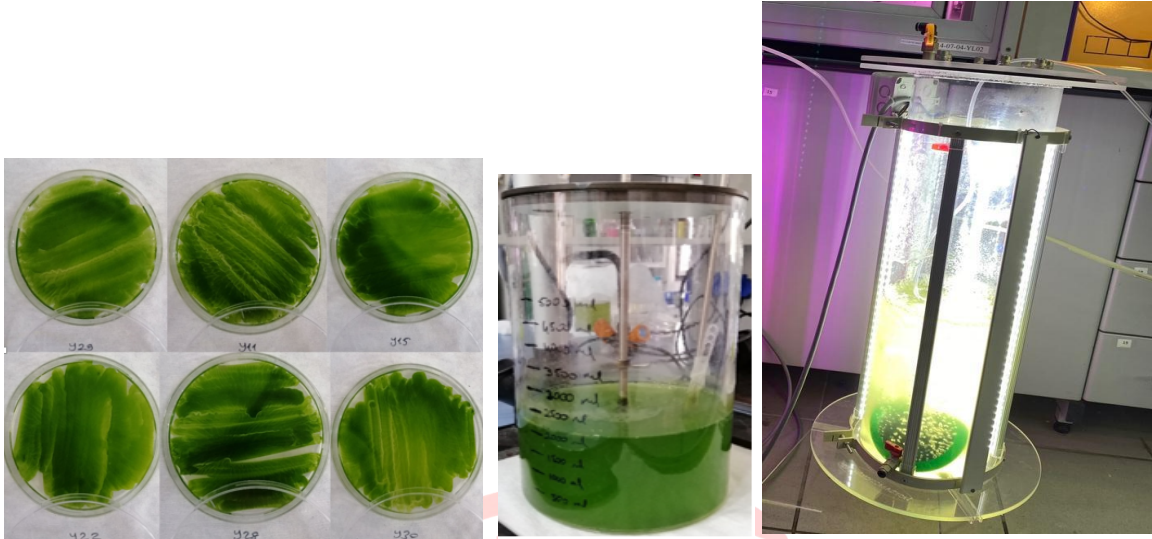
#### 4. Yöntem (20 puan)

Önerilen proje çalışmasının 4 iş paketinde gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Bunlar:

- Kutup mikroalglerinin yetiştirilmesi ve ekstraksiyonu
- Ekstraktardan elektrospinning yöntemiyle nanofiber yapıların retimi
- Ekstraksiyon sonrası kalan mikroalg posasından karbon nanotüp retimi
- Nanofiber-nanotüp yapılarının oluşturulması ve antikanser aktivite analizleri

##### ***İP1. Kutup mikroalglerinin yetiştirilmesi ve Ekstraksiyonu***

Bu iş paketinde kutup mikroalglerinin yetiştirilmesi gerçekleştirilecektir. Bu bağlamda Cumhurbaşkanlığı himayesinde, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı uhdesinde gerçekleştirilen 3. Ulusal Antarktika Bilim Seferi (2019) kapsamında getirilen örneklerden izole edilmiş ve gen bilgisi NCBI Gen Bankası'nda yayınlanmış olan *Chlorella variabilis* türü mikroalg (Genbank Erişim Numarası: MN372092) laboratuvar ortamında farklı boyutlardaki fotobiyoreaktörlerde yetiştirilecektir. Bu kapsamda ilk olarak kutup mikroalglerinin biyoaktif içeriğinin yüksek olması için küçük ölçekte optimizasyon işlemi gerçekleştirilecektir. Bunun için azot miktarı, fosfor miktarı, ışık yoğunluğu ve aydınlatma döngüsü, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin mikroalgin toplam fenolik ve karotenoid içeriğine olan etkileri Box-Behnken Deneysel Tasarım yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak incelenecektir. Bu deneyler sonucunda belirlenen optimum mikroalg yetiştirme ve besiyeri koşulları kullanılarak daha büyük ölçekli mikroalg üretimine geçilecektir. Bu koşullarda üretilen mikroalgler yetiştirme sonrasında 3000 RPM hızda 15 dakika boyunca santrifüjleme işlemi ile hasatlanacaktır. Elde edilen algal posa ekstraksiyon işlemi için +4 C sıcaklıkta buzdolabında saklanacaktır.



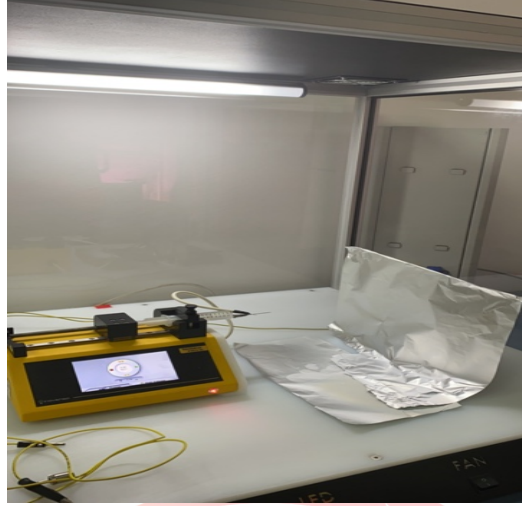
Şekil 3. Kutup mikroalgleri ve bunların yetiştirilmesinde kullanılan fotobiyoreaktör sistemleri

Hasatlanan mikroalgler ekstraksiyon öncesinde liyofilizatörde kurutulacaktır. Daha sonra en etkili ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi için farklı çözücü ve koşullarda ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilecektir. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilecek ve optimum ekstraksiyon yöntemi belirlenecektir. Belirlenen koşullarda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen ekstraktlar ve açığa çıkan posa ayrılarak iki ürün de +4 C sıcaklıkta nanofiber ve karbon nanotüp üretiminde kullanılmak üzere saklanacaktır.

### ***İP2. Elektrospreying yöntemiyle nanofiber yapıların üretimi***

Bu iş paketinde mikroalgal ekstraktların elektrospreying yöntemi kullanılarak nanofiber üretimi gerçekleştirilecektir. PVA ve sodyum aljinat, mikroalgal yağ ekstraktları ile yüklü nanopartiküllerin üretimi için kullanılacaktır. Öncelikle PVA çözeltileri distile suda çözülerek 90°C sıcaklıkta farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde ısıtılmış manyetik karıştırıcıda tamamen eriyene kadar karıştırılarak hazırlanacaktır. Aljinat çözeltisi, %2 (w/v) damıtılmış su içinde karıştırılarak hazırlanacaktır. Çözeltiler soğutulduktan sonra, aljinat çözeltisine 80:20 (v/v %) nihai konsantrasyon olacak şekilde PVA çözeltisi ilave edilip ardından, %1 (w/v) mikroalg yağı ve %1 (w/v) Tween 20 solüsyonu ilave edilerek homojen bir çözelti elde etmek için manyetik karıştırıcıda karıştırılacaktır. Daha sonra elde edilen karışın şırınga içerisine yüklenecektir. Şırınga içerisindeki solüsyon elektrosprey (Inovenso, StarterKit) cihazı içerisine pompanın üzerine yerleştirilecek ve elektrodun diğer ucu metal şırınga ucuna takılacaktır. İşlem oda sıcaklığında ve uygun voltajda gerçekleştirilecektir. Elektrospreyleme yöntemiyle nanoparçacık üretimi için PVA konsantrasyonu, akış hızı ve şırınga ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe gibi parçacık boyutunu etkileyen parametreler incelenecektir.





Şekil 4. Kutup Mikroalglerinin elektrosprey yöntemi ile enkapsülasyon işlemi.

### ***İP3. Karbon nanotüp üretimi***

Bu aşamada mikroalg ekstraksiyonu sonrası açığa çıkan mikroalg posaları kullanılarak karbon nanotüp üretimi gerçekleştirilecektir. Bu kapsamda ilk olarak mikroalg posalarında pirolizle biyochar üretimi gerçekleştirilecektir. Piroliz deneyleri Protherm marka karbonizasyon fırınında gerçekleştirilecek olup karbonizasyon koşulları olarak 500 C sıcaklık, 20 C/dakika ısıtma hızı, 300 mL/dakika azot gazı debisi ve 30 dakika final sıcaklığında bekleme süresi belirlenmiştir. Piroliz reaksiyonu sonucu elde edilen biyocharlar fırından çıkarılarak karbon nanotüp üretiminde kullanılmak üzere desikatörde saklanacaktır.

Elde edilen biyocharlardan karbon nanotüplerin üretimi için mikrodalga irradasyon metodu kullanılacaktır. İlk olarak elde edilen biyocharlar elekten geçirilerek 75 mikrometreden daha küçük olan parçacıklar toplanacaktır. Daha sonra 75 mikrometrelik biyocharlar ve ferrosen (Sigma Aldrich'ten temin edilmiş) 1'e 1 oranında karıştırılarak mikrodalga fırını yerleştirilecektir. Mikrodalga fırını 2.45 GHz, 80 °C sıcaklık, 200 W güç and 17 psi koşullarında 5 dakika boyunca çalıştırılacak ve reaksiyon sonucunda karbon nanotüpler elde edilecektir.

### ***İP4. Nanofiber-nanotüp yapılarının oluşturulması ve antikanser aktivite analizleri***

Bu iş paketinde daha önceki iş paketlerinde elde edilen yapılardan adsorpsiyon yöntemiyle nanofiber-nanotüp yapıları elde edilecektir. Bu kapsamda adsorpsiyon deneyleri NÜVE marka çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilecektir. İlk olarak etkili adsorpsiyon için sıcaklık, süre ve çalkalama hızı parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Belirlenen optimum koşullarda nanofiber – nanotüp yapıları üretilip antikanser aktivite analizleri yapılacaktır.

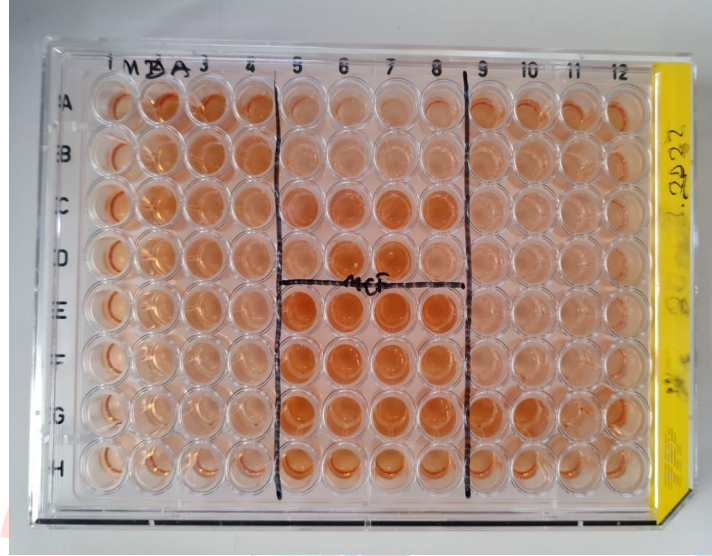
Antikanser çalışmaları için ilk olarak kanser hücre hatlarının büyütülmesi ve canlılık analizinin yapılması gerçekleştirilecektir. Bu iş paketinde 'Hücre Kültürü Laboratuvar'ında bulunan L929 fare fibroblast (ATCC; CCL-1), MCF-7 insan meme kanseri (ATCC; HTB-22) ve A549 insan

akciğer kanseri (ATCC; CCL-185), A375 insan cilt kanseri (ATCC; CRL-1619) hücre hatları öncelikle kriyobanktan çıkarılacak ve çözdürme prosedürü uygulanacaktır. Bunun için 37°C'lik su banyosunda bekletilen kriyotüp içerisindeki hücreler %10 (v/v) Fetal Bovin Serum (FBS) ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM/F12 besiyerine aktarılacak ve 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilecektir. Santrifüj sonrası hücelere taze besiyeri eklenerek T25 flasklara ekimi yapılacak ve hücreler flask içerisinde %70-80 yoğunluğa eriştiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işlemi sırasında hücreler 2 mL steril Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) çözeltisi ile yıkanıp ve ardından %0.25'lik Tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilecek ve yüzeyden kaldırılacaktır. Flasklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör içerisinde 5 dakika bekletilecek ve bu sayede yüzeyden kaldırılan hücreler daha sonrasında steril falkonlara aktarılacak ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecektir. Santrifüj sonrası süpernatant atılacak ve hücre sayım işlemi için pelletten alınan 1 µl hücre ile 49 µl tripan blue ile boyanacaktır. Hücreler Thoma lamı kullanılarak invert mikroskop altında sayılacaktır. Ardından her flaskta 1,5×10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılacaktır. Ekimi yapılan hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kullanılıncaya kadar kültüre edilecektir. Yetiştirilen ve besi ortamında bekletilen akciğer, meme ve cilt kanseri hücre hatları ve fibroblast hücre %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında hücre proliferasyonu, apoptoz ve protein toplanması gibi deneyler gerçekleştirilecektir hücreler inkübasyona bırakılacaktır. Daha sonrasında hücelere çeşitli konsantrasyonlarda kutup mikroalg ekstraktlarının özütü ilave edilerek etkiye maruz bırakılacaktır.

Hücre canlılık testi analizi: Kutup mikroalgal ekstraktların normal hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi ve uygun çalışma konsantrasyonlarının belirlenmesi 10993-5 standardına uygun olarak XTT [2,3-Bis(2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum] sitotoksosite testleri ile yapılacaktır (ISO 10993-1:2018 ve ISO 10993-5:2009). Sitotoksosite testleri için hızlı çoğalan ve toksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan L929 fare fibroblast (ATCC; CCL-1) hücre hattı kullanılacaktır. Kutup mikroalgal ekstraktlarının antikanser etkilerinin incelenmesi sırasında MCF-7 insan meme kanseri (ATCC; HTB-22), A549 insan akciğer kanseri (ATCC; CCL-185) ve A375 insan cilt kanseri (ATCC; CRL-1619) hücre hatları kullanılacaktır. Her kuyucukta 1x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi yapılacaktır. Mikropalaka, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilerek hücrelerin plaka yüzeyine tutunmaları ve %70-80 yoğunluğa ulaşmaları sağlanacaktır. Konfluent yapı oluşturan hücreler üzerine farklı konsantrasyonlardaki kutup mikroalglerinden hazırlanan ekstraktlarının eklenecektir. Mikroalgal yağ ekstraktları hücelere eklenmeden önce 0,45 µm'lik filtreden süzülerek steril edilip ve dilüsyonlar DMEM-F12 besiyeri içerisinde hazırlanacaktır. Kontrol olarak ekstrakt içermeyen besiyeri kullanılacaktır. Mikropalaka 37°C 'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilecek ve inkübasyonun ardından kuyucuklardaki besiyeri çekilerek her kuyucuğa 100µl XTT solüsyonu eklenecektir. Mikropalaka, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edilecek ve absorbans değerleri çoklu mikropalaka okuyucu yardımıyla 450 nm dalga boyunda ölçülecek ve not edilecektir. Yüzde hücre canlılığı değerleri örneğin absorbans değerinin kontrolün absorbans değerine bölünmesi ile bulunacak. Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplanacak ve deney gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analizi yapılacaktır.

Hücre canlılığı aşağıdaki formülle hesaplanacaktır ,

$$\%Viability = \left( \frac{\text{Optical density (OD) of treated cells}}{\text{OD of control cells}} \right) \times 100$$



Şekil 5. İnsan meme kanseri (MCF-7) hücre hattında XTT analizi

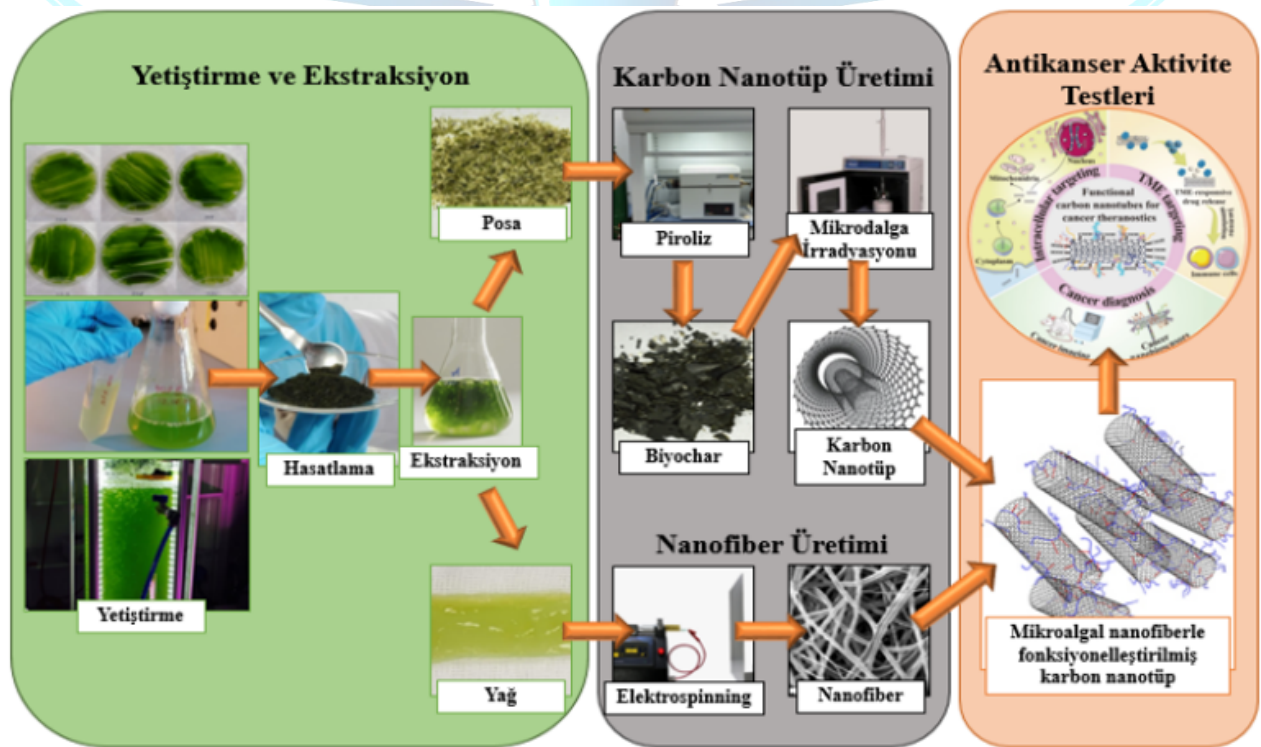
##### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan)

Mikroalglerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki yaptığı daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Mikroalgler electrospin cihazı kullanılarak elektro-spreyleme yöntemi sonucu nano boyutta enkapsüle edilmiştir. “Algal Biyoteknoloji ve Biyoproses Laboratuvarı”ımızda nanofiber üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında laboratuvarımızda gerçekleştirilen deneyler sonucunda biyochar üretimi ve karbon nanotüp üretimi gerçekleştirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada karbon nanotüpler farklı bir yöntemle ve yöntem bölümünde de değindiğimiz üzere diğer iş paketlerimizden çıkan posanın değerlendirilmesi şeklinde yani daha sürdürülebilir şekilde elde edilecektir. Sonuç olarak projemiz literatüre birçok açıdan katkı sağlayacaktır. Önerilen projenin yenilikçi yönleri aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

- Bu proje ile ilk kez kutuplardan izole edilen *Chlorella sp.* (Egemen.001) türü mikroalg ekstraktı yüklü nanofiber üretimi elektrospinning yöntemiyle gerçekleştirilecektir.
- Yine bu proje çalışması kapsamında ilk kez kutup mikroalglerinin ekstraksiyonu sonucu açığa çıkan atıklar sıfır atık yaklaşımıyla karbon nanotüp üretiminde değerlendirilecektir.
- Kutuplardan izole edilen mikroalgal ekstrakt yüklü nanofiberlerin, yine mikroalgal posa atıklarından üretilen karbon nanotüplere yüklenerek elde edilecek olan yapıların antikanserojen aktivitesinin araştırılması projenin yenilikçi yönlerindedir.

## 6. Uygulanabilirlik (10 puan)

Önerilen projede temel olarak kutuplardan izole edilen mikroalglerin yetiştirilerek bunlardan üretilen nanofiber-nanotüp yapıların antikanser etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda halihazırda Yıldız Teknik Üniversitesi Algal Biyoteknoloji ve Biyoproses Laboratuvarında kutup mikroalglerinin izolasyonu, yetiştirilmesi ve ekstraksiyonu yapılmaktadır. Proje ekibindeki Yüksek Biyomühendis Anıl Tevfik Koçer'in de arasında bulunduğu bir çalışma grubu tarafından kutup mikroalglerinin izolasyonu, yetiştirilmesi ve farklı alanlarda kullanımıyla alakalı birçok bildiri yayınlanmış olup, bu konularla ilgili bir makale de SCI indexli bir dergide hakem değerlendirme sürecindedir. Proje ekibinde bulunan Araş. Gör. Beyza Karacaoğlu da karbon nanotüp üretimiyle alakalı çalışmalarda bulunmuş ve ön denemelerde başarılı sonuçlar elde etmiştir. Proje ekibinde bulunan Araş. Gör. Gülcan Aysin Karaca ise mikroalgal ekstraktlardan elde edilen malzemelerin antikanser aktivitelerinin belirlenmesiyle alakalı tez çalışması sürdürmekte olup antikanser aktivite analizleriyle alakalı yaptığı çalışmalar başarıyla devam etmektedir. Bu kapsamda proje ekibimiz ve danışmanımız Prof. Dr. Didem Özçimen'in çalışmaları incelendiğinde bu projenin gerçekleştirilmesi hususunda yeterli tecrübe ve imkana sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 6. Proje fikri kapsamında gerçekleştirilecek olan çalışmalar

## 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması (5 puan)

Önerilen proje çalışmasının sağlıklı ve verimli bir şekilde yürütülebilmesi ve sonlandırılabilmesi için gerekli bütçeler ve gerekçeler Tablo 1’de özetlenmiştir. Proje çalışması kapsamında gerçekleştirilecek olan iş paketlerinin zaman planlaması ise Tablo 2’te verilmiştir.

Tablo 1. Bütçe Gerekçesi

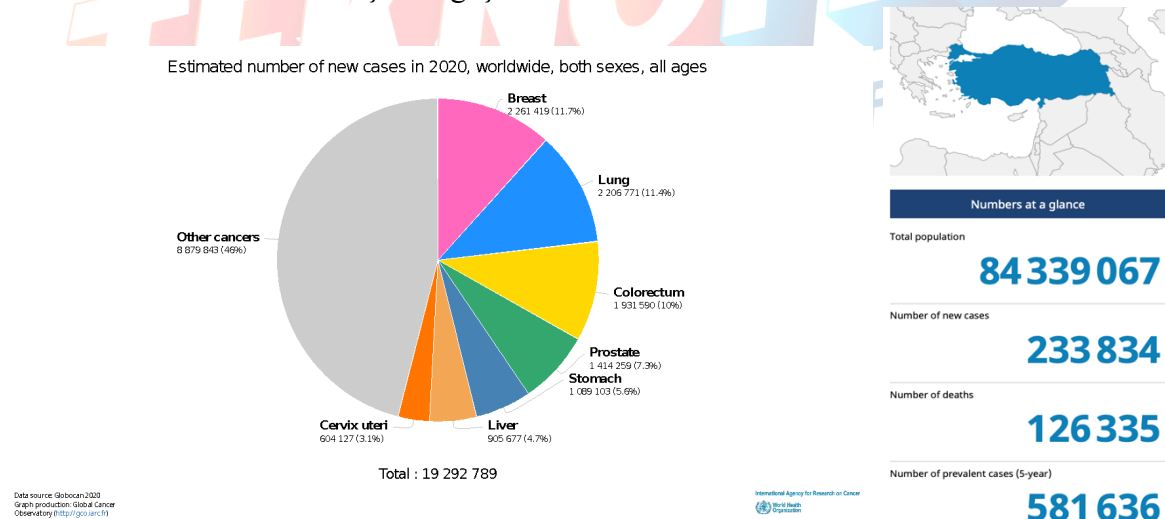
Adı	Gerekçe	Fiyat	Harcama Zamanı
Cam ve Plastik Sarflar (petri kabı, erlen, beher, büret, balon, kruse, baget vb.)f	Mikroalg Yetiştirme, Ekstraksiyon, CNT üretimi ve antikanser aktivite analizlerinde kullanılacaktır.	20000	Bu malzemeler 1., 3., ve 4. iş paketlerinde kullanılacağı için İP1 esnasında harcama yapılacaktır.
Kimyasal Sarflar (Mikroalg yetiştirme kimyasalları, etanol, DMSO, hücre sitotoksosite besiyerleri, CO <sub>2</sub> gazı vb.)	Mikroalg Yetiştirme, Ekstraksiyon, Nanofiber üretimi, CNT üretimi ve antikanser aktivite analizlerinde kullanılacaktır.	100000	Bu malzemeler bütün aşamalarda kullanıldığı için İP1 esnasında harcama yapılacaktır.
Analizler (HPLC, GC-MS, SEM, DLS, FTIR ve XTT )	Bu analizler, ekstraktların içeriği, nano boyuttaki malzemelerin karakterizasyonları ve antikanser aktivitelerin belirlenmesinde kullanılacaktır.	10000	Bu analizler bütün iş paketlerinde yapılacağı için her iş paketinde harcama yapılacaktır.
Biyogüvenlik malzemeleri (eldiven, maske, önlük, gözlük vb.)	Güvenli analiz ve üretim koşullarının sağlanmasında kullanılacaktır.	5000	Bu malzemeler bütün iş paketlerinde kullanılacağı için her iş paketinde harcama yapılacaktır.

Tablo 2. Proje Zaman Planlama Çizelgesi

İş Paketi	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay	7.ay	8.ay	9.ay	10.ay	11.ay	12.ay
İP 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
İP 2									X	X	X	X
İP 3									X	X	X	X
İP 4										X	X	X

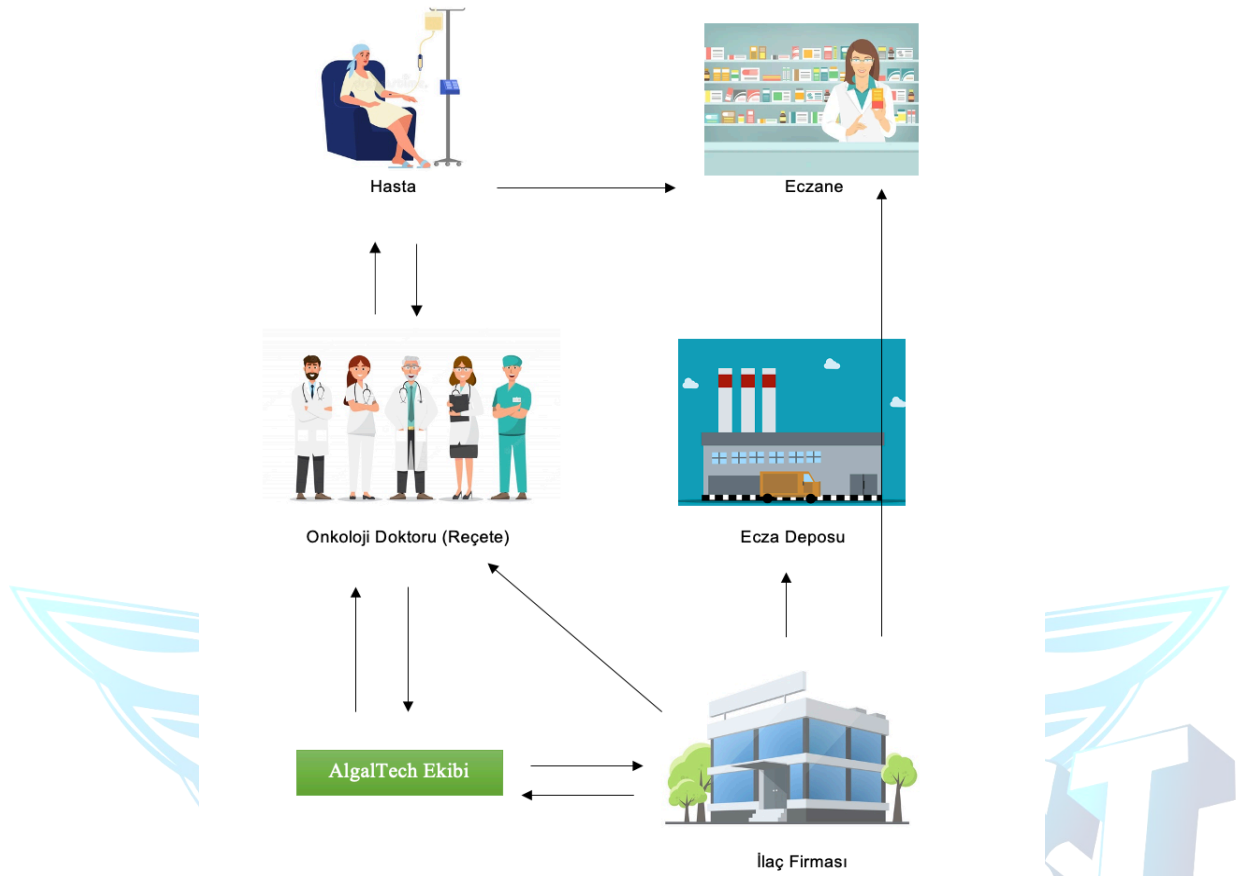
## 8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar) (5 puan)

Kanser üzerine yapılan birçok araştırmaya rağmen, kanser halen dünya çapında hem erkek hem de kadınlarda tüm ölümlerin %21'inden sorumludur ve kalp hastalıklarından sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Kanser özellikle 40-79 yaş arası kadınlarda ve 60-79 yaş arası erkeklerde görülmektedir. Önde gelen kanser türleri arasında aşağıdaki Grafik 1 dikkate alınarak en sık gözlenen kanser türlerinin akciğer ve meme kanseri olduğu söylenilmektedir. Bunun yanı sıra giderek artan küresel ısınmanın da yan etkilerinin çoğalmasıyla, cilt üzerindeki hasarlar artmakta ve bununla birlikte cilt kanserinin görülme sıklığı da giderek artmaktadır. Bu istatistiksel veriler ülkemiz için de geçerlidir.



Şekil 7. Dünya genelinde ve Türkiye’de çeşitli kanser türlerinin istatistiksel verileri.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda elde edeceğimiz bu ürün için hedef kitlemiz kanser hastalarıdır. Ancak hastalara ürünün temini başta İlaç Firmaları olmak üzere Eczaneler, Onkoloji doktorlardır.



Şekil 8. Proje fikri hedef kitlesinin şematik olarak gösterimi.

## 9. Riskler (10 puan)

Önerilen proje çalışmasındaki risklerden birisi yeterli miktarda kutup mikroalginin yetiştirilememesidir. Çünkü bu mikroalgler kutup koşullarına uyum sağlayabilseler de büyüme ve çoğalma hızları normal mikroalglerle oranla daha düşük olabilmektedir. Bu durumda Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde bulunan mikroalg yetiştirme serasındaki pilot ölçekli fotobiyoreaktörler kullanıma alınacaktır.

Önerilen projedeki diğer bir risk de üretilecek olan nanofiber ve karbon nanotüplerin yeterli miktarda ve istenilen boyutta üretilememesidir. Gerçekleştirilen deneme çalışmalarında iki malzemenin de nanoboyutta üretimi gerçekleştirilmiştir. Ancak bu denemelerde üretim miktarı oldukça azdır. İstenilen miktarda ve boyutta nanoyapılı malzeme üretilememesi durumunda optimizasyon parametreleri değiştirilip tekrar istatistiksel analiz yapılacaktır.

Önerilen projedeki başka bir risk de istenilen verimde nanofiber-nanotüp yapıların oluşturulamamasıdır. Bu durumda tekrar proses koşulları değiştirilerek tekrar optimizasyon yapılacaktır. Ayrıca bu yapıların oluşturulması için planlanan yöntemin de değiştirilmesi B planlarımız arasındadır.

## 10. Kaynaklar (5 puan)

- Alisani, R., Rakhshani, N., Abolhallaj, M., Motevalli, F., Abadi, P. G. S., Akrami, M., Shahrousvand, M., Jazi, F. S., & Irani, M. (2022). Adsorption, and controlled release of doxorubicin from cellulose acetate/polyurethane/multi-walled carbon nanotubes composite nanofibers. *Nanotechnology*, 33(15). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac467b>
- Abd El-Hack, M. E., Abdelnour, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M. A., Khafaga, A. F., Mahgoub, S. A., Elnesr, S. S., & Gebriel, M. G. (2019). Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.069>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Ceren Karakaş, & Didem Özcimen. (2017). Production of Tomato Stalk Biochar and its Usage in Hydroponic Agriculture. *Journal of Chemical Engineering Research Updates*, 4, 15–22. <https://doi.org/10.15377/2409-983x.2017.04.3>
- Daneshvar, E., Sik Ok, Y., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., & Bhatnagar, A. (2021). Insights into upstream processing of microalgae: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 329). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>
- Dos Santos, F. A., Pereira, M. C., de Oliveira, T. B., Mendonça Junior, F. J. B., de Lima, M. do C. A., Pitta, M. G. da R., Pitta, I. da R., de Melo Rêgo, M. J. B., & da Rocha Pitta, M. G. (2018). Anticancer properties of thiophene derivatives in breast cancer MCF-7 cells. *Anti-Cancer Drugs*, 29(2), 157–166. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000581>
- El-fayoumy, E. A., Shanab, S. M. M., Gaballa, H. S., Tantawy, M. A., & Shalaby, E. A. (2021). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of crude extract and different fractions of *Chlorella vulgaris* axenic culture grown under various concentrations of copper ions. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03194-x>
- Ferdous, U. T., & Yusof, Z. N. B. (2021). Medicinal Prospects of Antioxidants From Algal Sources in Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 593116. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.593116>
- Fraguas-Sánchez, A. I., Fernández-Carballido, A., Delie, F., Cohen, M., Martin-Sabroso, C., Mezzanatica, D., Figini, M., Satta, A., & Torres-Suárez, A. I. (2020). Enhancing ovarian cancer conventional chemotherapy through the combination with cannabidiol loaded microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 154, 246–258. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.07.008>
- González-Domínguez, J. M., Grasa, L., Frontiñán-Rubio, J., Abás, E., Domínguez-Alfaro, A., Mesonero, J. E., Criado, A., & Ansón-Casaos, A. (2022). Intrinsic and selective activity of functionalized carbon nanotube/nanocellulose platforms against colon cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112363>
- İnan, B., Çakır Koç, R., & Özçimen, D. (2021). Comparison of the anticancer effect of microalgal oils and microalgal oil-loaded electrosprayed nanoparticles against PC-3, SHSY-5Y and AGS cell



- lines. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 49(1), 381–389. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1906263>
- İnan, B., & Özçimen, D. (2021). Preparation and characterization of microalgal oil loaded alginate/poly (vinyl alcohol) electrosprayed nanoparticles. *Food and Bioproducts Processing*, 129, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.07.008>
- Kazaks, A., Collier, M., & Conley, M. (2019). Cytotoxicity of Caffeine on MCF-7 Cells Measured by XTT Cell Proliferation Assay (P06-038-19). *Current Developments in Nutrition*, 3(Supplement\_1), nzz031.P06-038-19. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz031.P06-038-19>
- Leyva-González, C. A., Salas-Treviño, D., Contreras-Torres, F. F., Loera-Arias, M. de J., Gómez-Tristán, C. A., Piña-Mendoza, E. I., García-Rivas, G. de J., Guillén-Meléndez, G. A., Montesde-Oca-Luna, R., Saucedo-Cárdenas, O., & Soto-Domínguez, A. (2021). Hyaluronate Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes Loaded with Carboplatin Enhance Cytotoxicity on Human Cancer Cell Lines. *Materials*, 14(13), 3622. <https://doi.org/10.3390/ma14133622>
- Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2018). Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*, 18(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3953-6>
- Mohamed E. Abd El-Hack, Sameh Abdelnour, Mahmoud Alagawany, Mohamed Abdo, Moustafa A. Sakr, Asmaa F. Khafaga, Samir A. Mahgoub, Shaaban S. Elnesr, Manar G. Gebriel, *Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge*, Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 111, 2019, Pages 42-50, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.069>
- Martínez Andrade, K.A.; Lauritano, C.; Romano, G.; Ianora, A. Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties. *Mar. Drugs* 2018, 16, 165. <https://doi.org/10.3390/md16050165>
- Mutlu, B., Erci, F., & Çakir Koç, R. (2022). Production of alginate films containing *Hypericum perforatum* extract as an antibacterial and antioxidant wound dressing material. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 37(2), 134–148. <https://doi.org/10.1177/08839115211073155>
- Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R., & Goulding, K. W. T. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.017>
- Şerbetçioğlu Sert, B., İnan, B., & Özçimen, D. (2018). Effect of Chemical Pre-treatments on Bioethanol Production from *Chlorella minutissima*. *Acta Chimica Slovenica*, 65(1), 160–165. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3728>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Zare, H., Ahmadi, S., Ghasemi, A., Ghanbari, M., Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Karimi, M., Webster, T. J., Hamblin, M. R., & Mostafavi, E. (2021). Carbon nanotubes: Smart drug/gene delivery carriers. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 16, pp. 1681–1706). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S299448>
- Zhou, Y., Vinothini, K., Dou, F., Jing, Y., Chuturgoon, A. A., Arumugam, T., & Rajan, M. (2022). Hyper-branched multifunctional carbon nanotubes carrier for targeted liver cancer therapy. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103649>