

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI BOYUTLARDA SÜRFAKTAN İÇERMEYEN NİŞASTA BAZLI
MİKROKÜRELERİN SENTEZİ, SENTEZ SÜRECİNİ ETKİLEYEN
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif Naz KARAGÜLLE

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

NİSAN 2024

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI BOYUTLARDA SÜRFAKTAN İÇERMEYEN NİŞASTA BAZLI MİKROKÜRELERİN SENTEZİ, SENTEZ SÜRECİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

Elif Naz KARAGÜLLE

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

Tarih: Nisan 2024

Kontrollü boyut ve morfolojiye sahip olan mikroküreler, medikal alanda ilaç taşıma sistemleri başta olmak üzere çeşitli uygulamalarda tercih edilmektedir. Mikrokürelerin sentezlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem, emülsiyon polimerizasyon tekniğidir. Bu çalışmada, ilaç taşıyıcısı olarak dar boyut aralıklarına sahip, biyouyumlu ve biyobozunur mikrokürelerin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Sitotoksitesisi düşük mikrokürelerin üretimi için doğal bir polimer olan nişasta ile sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi (SFEP) tercih edilmiştir. Artan polimer konsantrasyonu (ağırlıkça %3 - %10), ortam pH'si (7 - 10), ortam sıcaklığı (30 - 70°C), çapraz bağlayıcı miktarı (hacimce %1 - %20) ve emülsiyon karıştırma hızlarında (500 – 1000 RPM) üretilen mikrokürelerin çaplarındaki azalma ve artan sürekli fazın dağınık faza oranında (%21 - %100) mikrokürelerin çapındaki artma optik mikroskop ile yapılmış gözlemlenmiştir. 400µm üzerinde dar boyut aralıklarında üretilen mikrokürelerin topografisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir. Ortam sıcaklığı koşullarında ağırlık ve boyut değişimleriyle genleşme değerlendirmeleri yapılmıştır. Ayrıca, UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak

partiküllerin ilaç yüklemesi analiz edilmiştir. %99,81 ile en yüksek ilaç yüklenme verimi 500 RPM karıştırma hızı ile elde edilen, bozunma süresi $55 \pm 2,33$ gün olan mikrokürelerde gözlemlenmiştir. Parçacıkların L-929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, canlılık testleri aracılığıyla değerlendirilmiş ve ağırlıkça %10 polimer konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan mikrokürelerde en yüksek canlılık ($113,53 \pm 5,54$) gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçları, SFEP yöntemi ile nişastadan üretilen stabil mikrokürelerin düşük sitotoksikite ve yüksek ilaç yüklenme verimi ile çeşitli tıbbi ve kozmetik uygulamalarda tercih edilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Polimerik mikroküre, Nişasta, Çapraz bağlayıcı, Sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu

ABSTRACT

Master of Science

SYNTHESIS OF SURFACTANT-FREE STARCH-BASED MICROSPHERES IN DIFFERENT SIZE RANGES AND FACTORS AFFECTING THE SYNTHESIS PROCESS

Elif Naz KARAGÜLLE

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

Date: April 2024

Microspheres with controlled size and morphology are preferred in various applications, especially in the medical field as drug delivery systems. Emulsion polymerization technique is commonly used for the synthesis of microspheres. In this study, the aim was to synthesize biocompatible and biodegradable microspheres with narrow size distribution as drug carriers. Starch, a natural polymer with low cytotoxicity, was chosen for the production of microspheres using the surfactant-free emulsion polymerization (SFEP) method. The increase in the ratio of dispersed phase to continuous phase (21% - 100%) was observed to increase the diameter of the microspheres and with increasing polymer concentration (3% - 10% by weight), pH (7 - 10), temperature (30 - 70°C), cross-linker amount (1% - 20% by volume), and emulsion stirring speeds (500 – 1000 RPM) were perceived to decrease the diameter of the microspheres. Microspheres produced with narrow size distribution above 400µm were examined by scanning electron microscopy (SEM) for their topography. Weight and size changes were evaluated with respect to temperature conditions. Additionally, drug loading of the particles was analyzed using UV-Vis Spectrophotometry. The highest drug loading efficiency (99.81%) was observed in

microspheres synthesized with 500 RPM stirring speed, with a degradation time of 55 ± 2.33 days. The cytotoxic effect of particles on the L-929 cell line was evaluated through viability tests, and the highest viability ($113.53 \pm 5.54\%$) was observed in microspheres synthesized with 10% polymer concentration by weight. The results of this thesis study demonstrate that stable microspheres produced from starch using the SFEP method exhibit low cytotoxicity and high drug loading efficiency, making them suitable for various medical and cosmetic applications.

Keywords: Polymeric microsphere, Starch, Crosslinker, Surfactant-free emulsion polymerization

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tamamlanmasında bilgi birikimini asla esirgemedi en yapıcı şekilde yönlendiren, hep destekleyen ve tüm çalışmam boyunca hep beni cesaretlendiren danışmanım Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN hocama,

Çalışmamdaki taramalı elektron mikroskopi görüntülemeleri ve liyofilizasyon deneylerinde yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Sevede ALTUNTAŞ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana burs sağlayarak finansal açıdan destekleyen TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesine,

Hayatımın her anında beni koşulsuz olarak maddi-manevi destekleyen ve her ne olursa olsun yanımdan ayrılmayarak beni hep en iyi halimde olmama teşvik eden, hayatta her şeyin en iyisine layık olan sevgili ailem Funda ALTIN'a ve Av. Bekir KARAGÜLLE'ye,

Eğitim hayatım boyunca akademik bilgileri ile beni hep destekleyen kıymetli büyükbabam Prof. Dr. Murat ALTIN'a, beni hep gülümseterek hiçbir şekilde umudumu kaybetmememi sağlayan anneannem Nuran ALTIN'a, beni hep destekleyen biricik teyzelerim Doç. Dr. Ayşegül ALTIN KAYHAN ile Fulya ÖZDEMİR'e ve değerli enişterim Dr. Mehmet KAYHAN ve Dr. Murat ÖZDEMİR'e,

Hayatıma neşe ve huzuru getirip, sevginin farklı bir boyutunu tatmamı sağlayan minik kuzenlerim Kerem KAYHAN, Derin ÖZDEMİR ve Selen KAYHAN'a,

Son olarak, hayatımda her türlü kararında beni her şekilde destekleyip asla yanımdan ayrılmayarak hep dayanağım olan, gülümsemesi yüzünden asla eksik olmadan varlığıyla beni güçlendiren değerli hayat arkadaşım Yusuf Alp PÜRÇEK'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xix
KISALTMALAR	xxi
SEMBOL LİSTESİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Polimerik Mikroküreler.....	1
1.2 Nişasta	1
1.2.1 Asetillenmiş Dinişasta Fosfat (ADP)	3
1.3 Epiklorohidrin (ECH)	5
1.4 Nişasta Mikroküreler.....	6
1.5 Emülsiyon Polimerizasyonu	9
1.6 Sürfaktan İçermeyen Emülsiyon Polimerizasyonu	11
1.7 Polimerik Mikrokürelerin Morfolojisini Etkileyen Parametreler	13
1.7.1 Nişasta Konsantrasyonunun Parçacık Morfolojisine Etkisi	13
1.7.2 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Parçacık Morfolojisine Etkisi	14
1.7.3 Ortam Sıcaklığının Parçacık Morfolojisine Etkisi	15
1.7.4 Ortam pH'sinin Parçacık Morfolojisine Etkisi	16
1.7.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranının Parçacık Morfolojisine Etkisi	18
1.7.6 Emülsiyonun Karıştırılma Hızının Parçacık Morfolojisine Etkisi	18
1.8 Polimerik Mikrokürelerin Tıpta Kullanım Alanları	19
1.9 Amaç	23
2. MATERYALLER VE METOTLAR	25
2.1 Malzemeler	25
2.2 Metodlar	25
2.2.1 Nişasta Mikrokürelerin Emülsiyon Polimerizasyonu Yöntemi İle Sentezlenmesi	25
2.2.2 Nişasta Mikrokürelerin Yıkanması	26
2.2.3 Nişasta Mikrokürelerin Kurutulması	26
2.2.4 Nişasta Mikrokürelerin Liyofilizasyonu	26
2.2.5 Nişasta Mikrokürelerin Bozunum Karakteristiklerinin İncelenmesi	27
2.2.6 Nişasta Mikrokürelerin Şişme Karakteristiklerinin İncelenmesi	27
2.2.7 Nişasta Mikrokürelerin Yüzey Yüklerinin İncelenmesi	27
2.2.8 Nişasta Mikrokürelerin İlaç Yüklenmesi	27
2.2.9 Nişasta Mikrokürelerin İlaç Salım Karakterizasyonu	28
2.2.10 Nişasta Mikrokürelerle Hücre Canlılık Analizi	28
2.2.11 İstatistiksel Analizlerin Gerçekleştirilmesi	28
3. BULGULAR.....	31
3.1 Polimer Konsantrasyonu	31

3.1.1	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	31
3.1.2	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi.....	34
3.1.3	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	35
3.1.4	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	35
3.1.5	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi	36
3.1.6	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Yüzey Yükünün Belirlenmesi	37
3.2	Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu	38
3.2.1	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	38
3.2.2	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi.....	41
3.2.3	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	41
3.2.4	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	42
3.2.5	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi	43
3.3	Ortam pH'si.....	44
3.3.1	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	44
3.3.2	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	47
3.3.3	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi	47
3.3.4	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	49
3.3.5	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi.....	49
3.4	Ortam Sıcaklığı	50
3.4.1	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	50
3.4.2	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	54
3.4.3	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi	54
3.4.4	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	55
3.4.5	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi.....	56
3.5	Dağılık Fazın Sürekli Faza Oranı	57

3.5.1	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	57
3.5.2	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	62
3.5.3	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	62
3.5.4	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Verimi ve Salım Karakteristiğinin İncelenmesi ..	63
3.5.5	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi.....	65
3.6	Emülsiyonun Karıştırılma Hızı	66
3.6.1	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	66
3.6.2	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	69
3.6.3	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	69
3.6.4	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	70
3.6.5	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi.....	72
4.	TARTIŞMA	75
4.1	Parçacıkların Boyut Dağılımları	75
4.1.1	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	75
4.1.2	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	76
4.1.3	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	77
4.1.4	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	78
4.1.5	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	79
4.1.6	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı.....	79
4.2	Şişme Karakteristiklerinin İncelenmesi	80
4.2.1	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi.....	80
4.2.2	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	82
4.2.3	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	83
4.2.4	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi	84

4.2.5	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi.....	85
4.2.6	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi.....	85
4.3	Bozunum Karakteristiklerinin İncelenmesi.....	86
4.3.1	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	86
4.3.2	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	87
4.3.3	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi	88
4.3.4	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi	89
4.3.5	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	89
4.3.6	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi.....	90
4.4	İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	91
4.4.1	Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	91
4.4.2	Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	91
4.4.3	Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	92
4.4.4	Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	92
4.4.5	Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi	93
4.4.6	Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin ve İlaç Salım Karakteristiğinin İncelenmesi.....	93
4.5	Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi.....	94
4.6	Standart Örnek Olarak Belirlenmiş Mikrokürenin Yüzey Yükünün İncelenmesi.....	95
5.	SONUÇ.....	99
	KAYNAKLAR.....	101

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Patates içinden ayrılmış nişastanın taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüsü. (Hui ve diğ., 2009).	2
Şekil 1.2: Kıkırdak ve kemik dokusu mühendisliği için enjekte edilebilir hidrojellerin şematik bir örneği (Liu ve diğ., 2017).	3
Şekil 1.3: Asetillenmiş dinişasta fosfatın iki boyutlu kimyasal bileşimi (URL-1).	4
Şekil 1.4: Epiklorohidrinin iki boyutlu kimyasal konformasyonu (Crini ve diğ., 2021).	5
Şekil 1.5: Domperidon ve domperidon yüklü mikrokürelerin SEM görüntüsü. Emülsifikasyon çapraz bağlama yöntemiyle hazırlanan domperidon içermeyen (sol) ve domperidon yüklü (sağ) mikrokürelerin SEM görüntüsü (Yadav ve diğ., 2008).	7
Şekil 1.6: PVA partiküllerinin ve mikroküresel embolizasyon ajanlarının kateter iletimi ve damar tıkanıklığı düzeyine göre özelliklerinin karşılaştırılması (Lewis, 2013).	8
Şekil 1.7: Geleneksel emülsiyon polimerizasyonunun aşamalarının şematik gösterimi (Jensen ve diğ., 2017).	10
Şekil 3.1: Ağırlıkça %7,5 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme).....	31
Şekil 3.2: Farklı polimer konsantrasyonları kullanılarak sentezlenen parçacıkların ortalama çapları.....	32
Şekil 3.3: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası.....	33
Şekil 3.4: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri	34
Şekil 3.5: Farklı nişasta konsantrasyonları ile sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri.....	35
Şekil 3.6: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi	36
Şekil 3.7: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları	37
Şekil 3.8: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonları kullanılarak sentezlenen parçacıkların ortalama çapları	38
Şekil 3.9: Hacimce %4 çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (50X büyütme).....	39
Şekil 3.10: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası.....	40
Şekil 3.11: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri.....	41

Şekil 3.12: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ile sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri	42
Şekil 3.13: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş parçacıklara yüklenebilen ilaç miktarı	43
Şekil 3.14: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları	44
Şekil 3.15: Farklı ortam pH'ları kullanılarak sentezlenen parçacıkların ortalama çapları	45
Şekil 3.16: Ortam pH'si 9'a sabitlenerek sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme)	45
Şekil 3.17: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası	46
Şekil 3.18: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri	47
Şekil 3.19: Ortam pH'si 7 ayarlanarak sentezlenmiş olan mikrokürelerin bozunum deneyi sürecindeki fotoğrafları. (a) bozunum deneyinden önce, (b) bozunum deneyine başladıktan 3 gün sonra, (c) bozunum deneyine başladıktan 20 gün sonra.	48
Şekil 3.20: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri ..	48
Şekil 3.21: Farklı pH'larda sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi	49
Şekil 3.22: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları	50
Şekil 3.23: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen parçacıkların ortalama çapları ..	51
Şekil 3.24: 40°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (200X büyütme)	52
Şekil 3.25: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası	53
Şekil 3.26: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri	54
Şekil 3.27: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri	55
Şekil 3.28: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi	56
Şekil 3.29: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları	57
Şekil 3.30: Dağınık fazın sürekli faza oranı değiştirilerek sentezlenen parçacıkların ortalama çapları	58
Şekil 3.31: Dağınık fazın sürekli faza oranı %33'te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin görüntüsü	58
Şekil 3.32: Dağınık fazın sürekli faza oranı %33'te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin SEM görüntüsü	59
Şekil 3.33: Dağınık fazın sürekli faza oranı %21'de tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin SEM görüntüsü	59

Şekil 3.34: Dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin liyofilizasyon sonrası optik mikroskop görüntüsü (50X büyütme).....	60
Şekil 3.35: Dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin liyofilizasyon işlemi sonrasında elde edilen optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme)	60
Şekil 3.36: Dağınık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş olan mikrokürelerin boyut dağılım haritası.....	61
Şekil 3.37: Dağınık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri.....	62
Şekil 3.38: Dağınık fazın sürekli faza oranı değiştirilerek sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri.....	63
Şekil 3.39: Dağınık fazın sürekli faza oranı değiştirilerek sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi.....	64
Şekil 3.40: Doksorubisinin dahil edilmesinden önceki ve sonraki parçacıkların morfolojik özelliklerini sunan görseller. (a) Dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesinden önce morfolojisi, (b) Dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesi sonrası morfolojisi, (c) Dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesinden önce morfolojisi (d), Dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesi sonrası morfolojisi.	65
Şekil 3.41: Dağınık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları	66
Şekil 3.42: Farklı emülsiyon karıştırma hızlarında sentezlenen parçacıkların ortalama çapları.....	67
Şekil 3.43: Emülsiyon 1000 RPM’de karıştırılarak sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (200X büyütme).....	67
Şekil 3.44: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası.....	68
Şekil 3.45: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri.....	69
Şekil 3.46: Farklı emülsiyon karıştırma hızlarında sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri.....	70
Şekil 3.47: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi.....	71
Şekil 3.48: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenen doksorubisin yüklü mikrokürelerden 48 saat boyunca salınan ilaç yüzdeleri	72
Şekil 3.49: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları.....	73
Şekil 3.50: Emülsiyonun 700 RPM’de karıştırılması ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme).....	73

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1: Çalışma boyunca incelenen parçacıkların, incelenen parametrelerde gösterdikleri genel eğilim	74
---	----



KISALTMALAR

SFEP	: Sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
ADP	: Asetillenmiş dinişasta fosfat
ECH	: Epiklorohidrin
TACE	: Transkateter arteriyel kemoembolizasyon
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
TEM	: Transmisyon elektron mikroskopu
FTIR	: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
XRD	: X-ışını kırınımı
MMA	: Metil metakrilat
EHS	: Enzimatik hidrolize nişasta
HMS	: Hidrofobik olarak değiştirilmiş nişasta
PMMA	: Poli(metil metakrilat)
UFE	: Uterus fibroid embolizasyon
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NaOH	: Sodyum hidroksit
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMEM	: Dulbecco's modified eagle media
dH₂O	: Saf su
Pen-Strep	: Penicillin-streptomycin
DOX	: Doksorubisin
PBS	: Phosphate buffered saline
SD	: Standart Sapma
ANOVA	: Varyans Analizi

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
mL	Mililitre
h	Saat
RPM	1 dakika içerisinde gerçekleştirilen devir sayısı
mbar	Milibar
µL	Mikrolitre
U	Unit
L	Litre
mg	Miligram
%	Yüzde
µm	Mikrometre
±	Artı-eksi

1. GİRİŞ

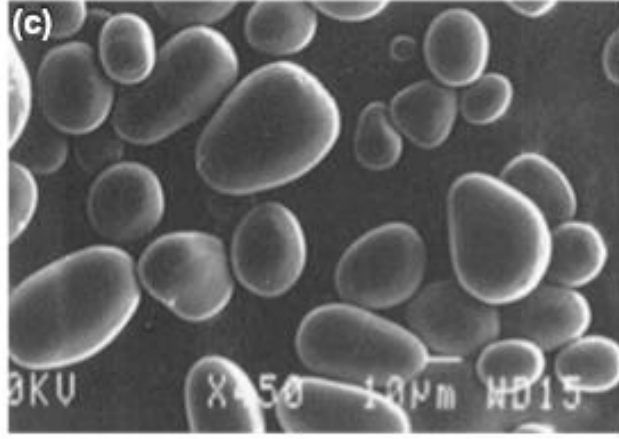
1.1 Polimerik Mikroküreler

Polimer tabanlı mikro boyutlu küreler olan polimerik mikroküreler, bilim ve teknoloji alanında büyük ilgi görmektedirler. Bu durumun altında yatan sebep ise bu mikrokürelerin boyutları, bileşenleri ve şekillerinin amaç doğrultusunda kolayca manipüle edilebilmeleri ve dolayısıyla birçok alanda kullanılabilmeleridir. Kullanım alanları arasında ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği, teşhis ve kaplama en yaygın örnekler olarak göze çarpmaktadır (Verma ve diğ., 2019).

Polimerik mikroküreler solvent buharlaştırma, faz ayrımı ve emülsiyon polimerizasyonu gibi birçok yöntemle sentezlenebilmektedirler (De La Vega ve diğ., 2013). Bileşen optimizasyonu ile biyoyumlu olmaları, hassas kimyasalları enkapsüle edebilmeleri, kontrollü bir salım mekanizması çizebilmeleri ve kapsüle ettikleri bileşene koruyucu bir etmen olarak davranmaları nedeniyle hedefli ilaç taşıma ve salım formülasyonlarında araştırma konusu olarak ciddi önem arz etmektedirler (Freiberg ve diğ., 2004). Polimerik mikrokürelerin yüzey işlevselleştirilebilmesi, hedefleyici ligandlar, antikorlar veya görüntüleme ajanları gibi bileşenlerin spesifik etkileşimlerle bağlanmasına izin vererek başarılı terapötik etkinlik sağladığı da raporlanmıştır (Sarialidze ve diğ., 2010). Doku mühendisliği alanında ise biyobozunur ve biyoyumlu olmaları sebebiyle yaygın olarak tercih edilmektedirler.

1.2 Nişasta

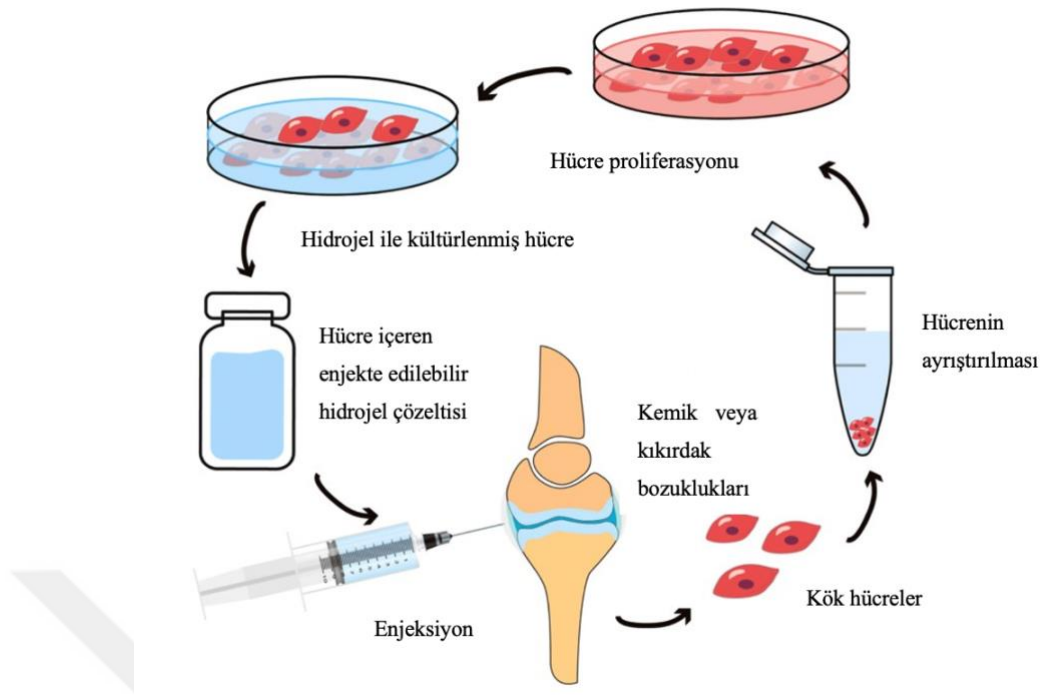
Nişasta, glikoz birimlerinden oluşan bir karbonhidrattır. Şekil 1.1'de SEM görüntüsü verilen patates nişastası da dahil olmak üzere nişasta, genel anlamda doğada en yaygın bulunan karbonhidratlardan biridir ve çeşitli uygulamalarda hayati önem taşımaktadır. Gıda endüstrisinde viskoz ve jel benzeri bir kıvam oluşturma yeteneği nedeniyle kalınlaştırıcı, stabilize edici ve jelleştirici bir madde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Wang ve diğ., 2015).



Şekil 1.1: Patates içinden ayrılmış nişastanın taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüsü. (Hui ve diğ., 2009).

Nişasta bazlı malzemeler, biyolojik olarak parçalanabilir, yenilebilir ve biyouyumlu oldukları için biyomedikal uygulamalar açısından büyük ilgi görmektedirler. Nişastanın, terapötik maddelerin kontrollü bir şekilde salınması için bir matris veya taşıyıcı olarak kullanıldığı ilaç verme sistemleri için nişasta bazlı malzemeler üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Builders ve diğ., 2016). Nişasta bazlı malzemelerin biyolojik olarak parçalanabilirliği, ilaçların kademeli olarak salınmasına olanak tanır ve bu da hastaların daha iyi uyumunu sağlamaktadır (Kaur ve diğ., 2007).

Nişasta bazlı hidrojeller, ayrıca doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için umut vaat etmektedirler (Xiao, 2013). Bu hidrojellerin, hücrelerin çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasına yardımcı olmak için üç boyutlu bir ortam sağlayabileceği araştırmacılar tarafından düşünülmektedir. Yara iyileşmesi, kemik doku mühendisliği ve kırık rejenerasyonu uygulamaları için nişasta bazlı iskeletler bir dizi çalışmada incelenmiştir ve Şekil 1.2’de sürecin şematize edilmiş hali gösterilmiştir. Doğal hücre dışı matrisi taklit ederek, hücre yapışmasını, göçünü ve doku yenilenmesini teşvik edebilmektedirler.



Şekil 1.2: Kıkırdak ve kemik dokusu mühendisliği için enjekte edilebilir hidrojellerin şematik bir örneği (Liu ve diğ., 2017).

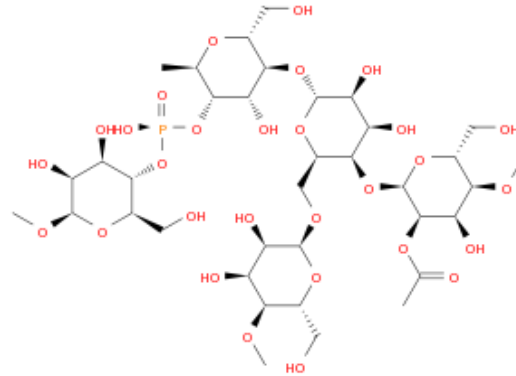
Tahıllar, patatesler ve baklagiller gibi gıdalarda bulunduğu ve insan diyetinin temel bir bileşeni olduğu için nişastanın kendisinin tüketilmesi güvenlidir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilebilen nişastaların tıp alanında mikrokürelerde kullanılması, çeşitli faktörleri içeren kapsamlı bir değerlendirme gerektirmektedir. Bitkisel nişastaların insanlar tarafından daha iyi tolere edildiği ve hayvansal kaynaklı glikojene kıyasla daha az alerjik reaksiyon oluşturduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Moon-Jeong, 2004).

Belirli biyomedikal uygulamalar için spesifik özelliklere sahip gelişmiş nişasta bazlı materyaller tasarlamak için, nişasta ve türevlerinin yapı-işlev ilişkilerini anlamak önem arz etmektedir.

1.2.1 Asetillenmiş Dinişasta Fosfat (ADP)

Kimyasal formülü $C_{36}H_{63}O_{29}P$ olan asetillenmiş dinişasta fosfat (ADP), dinişasta moleküler yapısındaki hidroksil gruplarına asetil gruplarının bağlanmasıyla oluşan bir türevidir (Yu ve diğ., 2020). Şekil 1.3'te de kimyasal bileşeni gösterilen bu nişasta

türevi, ADP'ye farklı özellikler kazandırmaktadır (Le Thanh, 2007). ADP'nin su tutma kapasitesini artıran asetil grupları, gıda endüstrisinde nem stabilizasyonu ve ürünlerin raf ömrünü uzatma gibi birçok amaç için kullanılabilir. Benzer şekilde asetil grupları, ADP'nin viskozitesini artırdıkları için kıvam artırıcı olarak tercih edilmelerine sebep olmaktadır (Yu ve diğ., 2020). Bu kimyasal değişiklik ayrıca ADP'nin ısıya dayanıklılığını artırarak onun yüksek sıcaklıklarda stabil kalmasına olanak tanımaktadır.



Şekil 1.3: Asetillenmiş dinişasta fosfatın iki boyutlu kimyasal bileşimi (URL-1).

ADP, dondurulmuş gıdalar, soslar, unlu mamuller, şekerleme ürünleri ve işlenmiş et ürünlerinde nem tutucu, kıvam artırıcı ve hacim artırıcı olarak gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Kapelko-Żeberska ve diğ., 2015).

Biyomedikal uygulamalarda özellikle ilaç taşınımı ve salım mekanizması açısından asetillenmiş dinişasta fosfat (ADP) umut vaat eden bir kimyasal olarak görülebilmektedir çünkü ADP, ilaç salım mekanizmasını geliştirmektedir (Malik ve diğ., 2023). Geliştirme nedenleri arasında ADP'nin su ile duyarlı yapısı kaynaklı hidrojel oluşturabilmesi ve bu nedenle de ilacın hedef dokuya daha efektif bir şekilde ulaşarak ilacın salımını destekleyip aynı zamanda etki süresini azaltması nedeniyle toksisiteyi de minimize edebilecek olmasıdır.

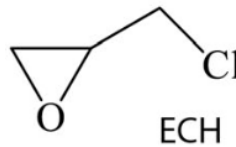
ADP'nin su tutma ve ısıya karşı direnci, doku mühendisliği ve yara iyileşmesi ile ilgili olarak da önem arz etmektedir. Bu özelliklerin, biyomalzemelerde veya yara örtülerinde kullanılarak nem stabilizasyonunu artırması ve doku yenilenmesini teşvik etmesi mümkündür (Gao ve diğ., 2022a).

Ek olarak, ADP'nin biyoaktif maddelerin taşınması ve kontrollü salımında potansiyel olarak katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu özellik, ilaç taşıyıcıları veya biyomalzemelerde kullanılarak belirli bir bölgede ilaç salımını kontrol etme yeteneğine sahip olabileceğini işaret etmektedir (Malik ve diğ., 2023).

Son olarak, ADP'nin, özellikle tanı amaçlı veya kontrast maddesi olarak kullanılan biyomedikal görüntüleme ve tanı teknolojilerinde kullanılması durumunda, belirli organların veya dokuların daha net bir şekilde görüntülenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu düşüncenin temelinde ise ADP'nin yüzeyi spesifik moleküllerle fonksiyonelleştirmeye açık olması ve taşıdığı moleküler bileşeni hedef noktaya ulaştırması sonrasında kısa sürede salabilmesi olduğu literatürde yorumlanmaktadır. Ek olarak ADP matrisi elastik bir yapı sağladığı için farklı dozaj formları kullanılarak görüntüleme ajanının etkisi lokalize bir şekilde artırılabilir (Malik ve diğ., 2023).

1.3 Epiklorohidrin (ECH)

Epiklorohidrin (ECH), çeşitli özellikleri ve geniş uygulama yelpazesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Yapısı Şekil 1.4'te gösterilen bu kimyasal, renksiz bir sıvıdır ve 116 °C kaynama noktasına sahiptir. Polaritesi ve hidrojen bağları oluşturma yeteneği, ECH'nin suda ve çeşitli organik çözücülerde yüksek çözünürlüğünü sağlamaktadır. Bir epoksi grubunun varlığı, ECH'nin polimerizasyon ve çapraz bağlama gibi çeşitli kimyasal reaksiyonlarda yer almasına izin veren önemli bir özelliğidir (Baldwin ve diğ., 1978).



Şekil 1.4: Epiklorohidrinin iki boyutlu kimyasal konformasyonu (Crini ve diğ., 2021).

ECH, çapraz bağlama maddesi olarak emülsiyon polimerizasyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Üstün mekanik özelliklere sahip ve suya karşı son derece dirençli sağlam polimer ağlarının oluşumuna katkıda bulunmaktadır. ECH, polimer zincirleri üzerindeki hidroksil grupları gibi fonksiyonel gruplarla reaksiyona girerek kovalent

bağlar oluşturmaktadır. Bu bağlar sayesinde polimerlerin dayanıklılığı ve stabilitesi artmaktadır. Aynı zamanda ECH, neme, kimyasallara ve mekanik strese karşı direnç gerektiren uygulamalar için idealdir (Wang ve diğ., 2000).

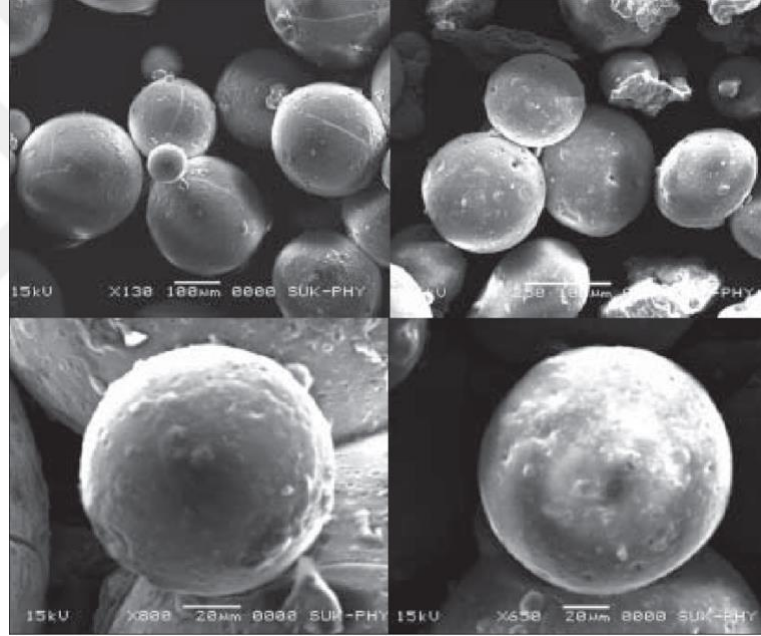
Ek olarak, ECH, nişasta bazlı malzemelerin modifikasyonunda yaygın olarak tercih edilmektedir. Nişastanın mekanik mukavemeti, suya duyarlılığı ve termal stabilitesi gibi sorunları nedeniyle pratik uygulamaları sınırlanabilmektedir. ECH'nin bir çapraz bağlama maddesi olarak dahil edilmesi, nişasta bazlı malzemelerin özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Nişastada ECH ve hidroksil grupları arasındaki reaksiyon, eter bağlantılarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum, daha fazla mekanik güç, daha az su buharı geçirgenliği ve termal bozunmaya karşı daha fazla direnç sağlamaktadır. Bu değişiklikler, nişasta bazlı malzemelerin ambalajlama, kaplamalar ve biyomedikal uygulamalar gibi çeşitli sektörlerde daha yaygın olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Kuniak ve diğ., 1972).

ECH, çok yönlülüğü nedeniyle emülsiyon polimerizasyon işlemlerinde önemli bir bileşendir. Bu, özelleştirilmiş niteliklere sahip polimerlerin üretimini kolaylaştırmaktadır. Nişasta modifikasyonunda kullanılması, yenilenebilir ve sürdürülebilir malzemelerin performansını artırma potansiyelini vurgulamaktadır (Hamdi ve diğ., 2001). Nişasta ve ECH arasındaki kimyasal reaksiyonun altında yatan mekanizmaları ve sentez koşullarını en iyi şekilde ayarlamayı amaçlayan ileri araştırma çabalarının, polimer bilimi ve malzeme mühendisliği alanlarında ECH kullanımının kapsamını genişletmeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

1.4 Nişasta Mikroküreler

Nişasta bazlı mikrot taşıyıcılar veya mikrobuncuklar olarak da bilinen nişasta mikroküreler, kritik bir takım özellikleri sebebiyle tıp ve farmasötik bilimleri alanında çok popülerdir. Biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilen ve yenilenebilir bir polisakkarit olan nişasta, mikrokürelerin geliştirilmesi için çekici bir platform sağlamaktadır. Bu mikroküreler, çok çeşitli tıbbi kullanımlarda tercih edilebilmektedir (Elfstrand ve diğ., 2006).

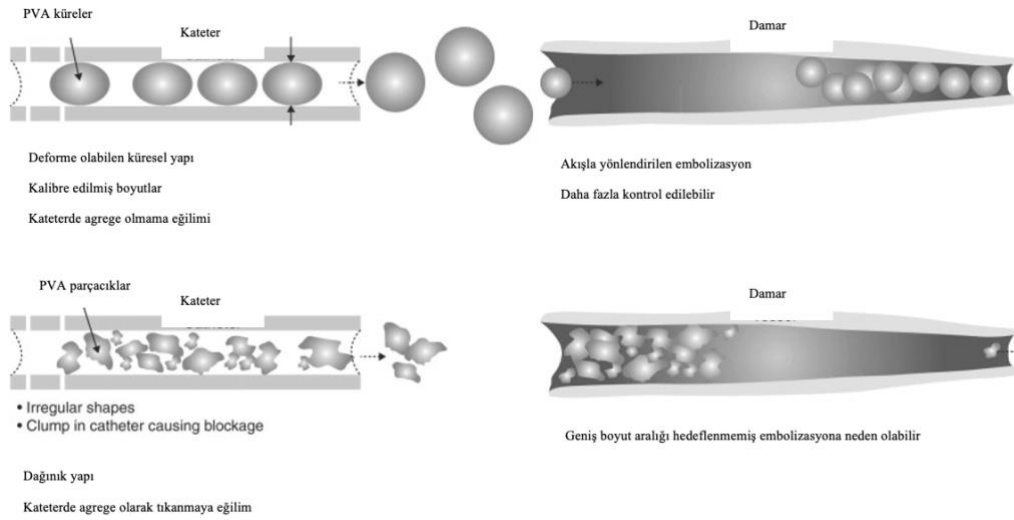
İlaç dağıtım sistemlerinde nişasta mikroküre kullanımı kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu parçacıkların küresel şekli ve gözenekli yapısı sayesinde terapötik maddelerin etkili bir şekilde yüklenmesine ve kontrollü bir şekilde salınmasına izin verdiği bilinmektedir. Bu mikroküreler, küçük moleküller, proteinler, peptitler ve nükleik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli ilaçları kapsülleyerek onları parçalanmaktan koruyarak hedeflenen miktarda ilaç salımını sürdürebilmektedir (Atyabi ve diğ., 2006). Nişasta mikrokürelerinde boyutu, morfolojisi ve/veya bileşimi gibi etmenler değiştirilerek ilaç salım kinetikleri kolayca kontrol edilebilmektedir. Bu duruma örnek olarak Şekil 1.5'te, araştırmacılar tarafından ilaç yüklü burun içi taşınım mekanizmasında rol oynaması amacıyla sentezlenmiş nişasta tabanlı mikrokürelerin taramalı electron mikroskopi (SEM) görüntüsü verilmiştir (Yadav ve diğ., 2008).



Şekil 1.5: Domperidon ve domperidon yüklü mikrokürelerin SEM görüntüsü. Emülsifikasyon çapraz bağlama yöntemiyle hazırlanan domperidon içermeyen (sol) ve domperidon yüklü (sağ) mikrokürelerin SEM görüntüsü (Yadav ve diğ., 2008).

Nişasta mikroküreler, ilaç dağıtımına ek olarak diğer tıbbi uygulamalarda da umut vaat etmektedir. Kan damarlarını bloke etmek ve tümörler ve arteriyovenöz malformasyonlar gibi birçok hastalığı tedavi etmek için kullanılan minimal invaziv bir prosedür olan transkateter arteriyel kemoembolizasyon (TACE) için embolik ajanlar olarak araştırılmışlardır (Iezzi ve diğ., 2019). Nişasta mikroküreler, hedef kan damarlarına seçici olarak enjekte edilerek lokalize doku iskemisine ve daha sonraki

tedavi etkilerine yol açabilmektedir. Bu alanda araştırmacılar, kanser tedavisinde intra-arteriyel oklüzyon ve ilaç dağıtımı için biyomedikal polimerlerden embolizasyon cihazları üzerine bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Şekil 1.6'da da gösterildiği üzere küresel formdaki parçacıkların akış ile yönlendirilmesi daha olası olan ve daha kontrol edilebilir yapılar olduğunu göstermişlerdir (Lewis, 2013).



Şekil 1.6: PVA partiküllerinin ve mikroküresel embolizasyon ajanlarının kateter iletimi ve damar tıkanıklığı düzeyine göre özelliklerinin karşılaştırılması (Lewis, 2013).

Borden ve arkadaşları, mikrokürelerin, kemik rejenerasyonu için bir substrat olarak potansiyel kullanım amacıyla entegre bir iskelede yapı taşları olarak kullanılabileceğini tespit etmiştir. Bu araştırmacılar, emülsiyon-çözücü ekstraksiyonu yoluyla üretilen ve ısı sinterleme yoluyla kaynaştırılan biyolojik olarak parçalanabilen poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) mikroküreleri kullanarak sentetik mikroküre bazlı bir yapı iskelesi geliştirmişlerdir (Borden ve diğ., 2002). Üretilen iskele, küre dolgunun temel kalitesi nedeniyle %100 gözenek ara bağlantısı ile %30-40 gözenekliliğe sahip bir yapı olarak üretilmiş ve böylece, mikroküre bazlı iskele, yaklaşık %30'luk bir kemik hacmine sahip olan süngerimsi kemik rejenerasyonu için negatif bir şablon görevi görmüştür. Ek olarak, PLGA mikroküre bazlı yapı iskeleleri 130 ila 300 MPa arasında değişen bir kuru basınç modülüne sahip olup, yapı iskelelerinin kemik rejenerasyonu için uygulanabilirliğinin altını çizmiştir (Borden ve diğ., 2003). Ayrıca, hücre ekme deneyleri, hücrelerin, mikroküre-küre bazlı iskelenin gözenekleri etrafındaki eşmerkezli halkalarda, bitişik mikroküreler arasında geniş

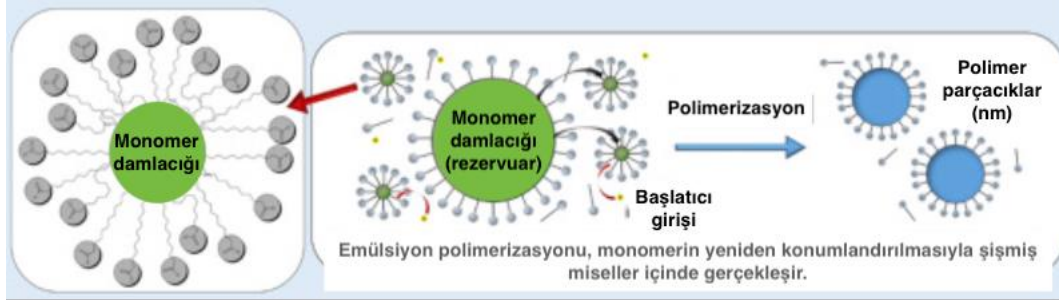
sitoplazmik bağlantılar oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır (Borden ve diğ., 2002). Küre şeklinde yapının doğası kaynaklı, mikroküre bazlı iskele, yenilenen dokuyu, merkezi bir Havers kanalı etrafında eşmerkezli halkalar halinde düzenlenmiş mineralize kollajen tabakalarından oluşan trabeküler kemiği anımsatan bir şekilde organize etmiştir.

Nişasta mikroküreleri de, hücre büyümesi ve doku yenilenmesi için uygun bir mikro ortam sağlamak için üç boyutlu yapılara veya hidrojellere dahil edilebilmektedir. Bu mikroküreler, doku rejenerasyonunu ve belirli hücrel tepkileri teşvik etmek için büyüme faktörleri veya biyoaktif moleküller içerebilmektedir (Balmayor ve diğ., 2009).

Nişasta mikrokürelerinin tıbbi uygulamalarda güvenliğini ve etkinliğini garanti etmek için biyouyumluluklarını, bozulma davranışlarını ve uzun vadeli etkilerini değerlendiren kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Nişasta mikrokürelerinin sitotoksitesini, immünojenitesini ve biyolojik olarak parçalanabilirliğini değerlendirmek için in vitro ve in vivo çalışmalar gibi bir dizi farklı teknik kullanılmaktadır (Pereira ve diğ., 2013). Ayrıca, daha iyi terapötik sonuçlar elde etmek için boyutlarını, yüzey özelliklerini ve ilaç yükleme kapasitelerini en üst düzeye çıkarmak için çaba sarf edilmektedir.

1.5 Emülsiyon Polimerizasyonu

Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu, kontrollü boyut, morfoloji ve bileşime sahip polimer parçacıkları oluşturmak için yaygın olarak kullanılan ve çok yönlü bir yöntemdir. Şekil 1.7’de de şematize edildiği üzere sürfaktanlar veya emülgatörlerle stabilize edilmiş bir sürekli faz içinde damlacıklar halindeki monomerlerin polimerizasyonunu içeren bir dispersiyon polimerizasyon yöntemidir. İşlem, monomerlerin mekanik ajitasyon veya ultrasonikasyon yoluyla sulu fazda dağılmasıyla başlar. Ardından suda çözünür bir başlatıcı eklenir. Bu, polimerizasyon reaksiyonunu başlatır ve polimer parçacıklarının oluşumuna neden olur. Su-yag arayüzü, polimerizasyon reaksiyonunda polimer zincirlerinin büyümesi ve kolloidal partiküllerin oluşumuna neden olmaktadır (Wang ve diğ., 1994).



Şekil 1.7: Geleneksel emülsiyon polimerizasyonunun aşamalarının şematik gösterimi (Jensen ve diğ., 2017).

Geleneksel olmayan yöntemde ise polimer zincirleri kullanılarak emülsiyon içerisinde bu polimerlerin birbirlerine tutunumunu sağlayacak bir çapraz bağlayıcı dahil edildiğinde de parçacık sentezlenebilmektedir. Bu yöntem özellikle yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerden polimerik parçacıkların sentezi için sıkça tercih edilmektedir çünkü parçacıkların boyut kontrolünü desteklemektedir (Chern, 2006). Bu yöntemle sentezlenme işlemi sırasında monomer ve başlatıcı gibi bileşenler kullanılmamakta, onun yerine polimer zinciri, bu zincire uygun olarak seçilmiş çapraz bağlayıcı ve bazı durumlarda sürfaktanlar tercih edilebilir.

Diğer polimerizasyon yöntemlerine göre emülsiyon polimerizasyonu çok sayıda avantaj sağlamaktadır. İlk olarak, monomer damlacıklarının boyutunu ve polimerizasyon koşullarını kontrol ederek nanometreden mikrometreye kadar değişen küçük bir boyut dağılımına sahip parçacıkların üretilmesine izin vermektedir. İkinci olarak, emülgatörlerin veya sürfaktanların kullanılması stabilizasyon sağlayarak, partikül topaklanmasını önlemektedir. Üçüncüsü, işlem, hidrofilik veya hidrofobik monomerlerin dahil edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu, elde edilen partiküllerin yüzey özelliklerini ve işlevselliğini uygun hale getirmektedir. Emülsiyon polimerizasyonu, hafif reaksiyon koşulları altında da yapılabilir, bu durum da onu çok çeşitli monomerler ve polimerler için uygun hale getirmektedir (Lovell ve diğ., 2020).

Emülsiyon polimerizasyon sürecinde, istenen partikül özelliklerini elde etmek için bir dizi önemli parametrenin dikkatle kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu parametreler arasında pH, sıcaklık, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, monomer veya polimerin konsantrasyonu ve reaksiyon süresi yer almaktadır. Elde edilen polimer

parçacıklarının morfolojisi, boyutu ve özellikleri, tüm bu değişkenler tarafından etkilenebilmektedir. Örneğin, geleneksel emülsiyon polimerizasyonu yönteminde monomer veya sürfaktan konsantrasyonunun artması daha küçük partikül boyutuna neden olabilirken, çapraz bağlayıcı türünün değiştirilmesi polimerizasyon hızını ve partikül morfolojisini değiştirebilmektedir. İstenilen özelliklere sahip partiküller elde etmek için bu parametrelerin optimizasyonu çok önemlidir (Asua, 2004).

Sentezlenen parçacıkların özelliklerinin değerlendirilmesinde, karakterizasyon teknikleri önem arz etmektedir. Emülsiyon polimerize parçacıkların parçacık boyutu, morfolojisi, kimyasal bileşimi ve yapısal özellikleri, dinamik ışık saçılımı (DLS) veya lazer kırınımı kullanılarak ölçülebilmektedir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) veya transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi elektron mikroskobu teknikleri, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve X-ışını kırınımı (XRD) gibi spektroskopik yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır (Lovell ve diğ., 2020).

Emülsiyon polimerizasyonu, kaplamalar, yapıştırıcılar, boyalar, ilaç dağıtım sistemleri ve biyomedikal uygulamalar gibi çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Parçacık boyutunu, yüzey işlevselliğini ve bileşimi kontrol etme yeteneği, emülsiyon polimerizasyonunu, belirli uygulama gereksinimlerini karşılamak üzere polimer parçacıklarının özelliklerini değiştirmek için çok yönlü bir yaklaşımdır. Örneğin, ilaç dağıtım sistemlerinde emülsiyon polimerizasyonu, terapötik maddelerin polimerik parçacıklar içinde kapsüllenmesini sağlamaktadır. Bu durum, kontrollü ve hedeflenmiş salım profilleri sağlamaktadır (Asua, 2004).

Sonuç olarak, emülsiyon polimerizasyonu, morfolojisi, boyutu ve bileşimi net olan polimer partiküllerinin sentezi için etkili bir yöntemdir. Çok sayıda faydası olduğu için çeşitli sektörlerde ve bilimsel araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Emülsiyon polimerizasyonu, parçacıkların özelliklerini değiştirme ve sentez parametrelerini kontrol etme yeteneği sayesinde çok yönlü bir yöntemdir.

1.6 Sürfaktan İçermeyen Emülsiyon Polimerizasyonu

Sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu, genelde emülsiyon sistemlerini stabilize etmek için kullanılan sürfaktanlar dahil edilmeden suda dağılmış polimer parçacıkları oluşturmak için kullanılan bir tür polimerizasyon işlemidir (Tauer ve diğ.,

1999). Bu yöntem, polimer parçacıklarının agregasyonunu önlemek için diğer stabilizasyon mekanizmalarına dayanmaktadır ve sürfaktanların kullanıldığı geleneksel emülsiyon polimerizasyon tekniklerine kıyasla birçok avantaj sağlamaktadır.

Bu avantajlar temel olarak çevresel kaygılar, ürün saflığı ve nihai polimer ürünlerinin spesifik özellikleriyle ilgilidir (El-Hoshoudy, 2018). Hiçbir sürfaktan kullanılmadığından, üretilen polimer sürfaktan kalıntıları içermemektedir; tıbbi ve farmasötik uygulamalar, yüksek performanslı kaplamalar ve gıda ambalaj malzemeleri gibi ürün saflığının kritik olduğu uygulamalar için faydalıdır. Sürfaktanların bulunmaması, bunların üretimi, kullanımı ve bozunumu ile ilgili çevresel etkiyi azaltmaktadır. Sürfaktanlar biyobirikimli olabilir ve su ve toprak organizmaları için potansiyel olarak toksik olabileceği bilinilmektedir (Chern, 2006). Bunları ortadan kaldırarak sürfaktan içermeyen polimerizasyon, çevresel açıdan daha sürdürülebilir bir yöntem haline gelmektedir. Sürfaktanlar nihai polimerin özelliklerine müdahale ederek berraklık, yapışma ve mekanik özellikler gibi şeyleri etkileyebilmektedir. Sürfaktan içermeyen polimerler genellikle optik malzemeler ve yüksek kaliteli kaplamalar gibi belirli uygulamalar için çok önemli olan gelişmiş film berraklığı ve gelişmiş mekanik özellikler göstermektedir (Moradi ve diğ., 2012). Özellikle katı çevre yasalarına sahip bölgelerde, kimyasalların kullanımına ilişkin düzenlemelerin artmasıyla birlikte, sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu, üreticilerin bu düzenlemelere uymasına ve sürfaktan kalıntılarını gidermek için maliyetli atık su arıtma işlemlerine duyulan ihtiyacı ortadan kaldırmasına yardımcı olmaktadır. Geleneksel emülsiyon polimerizasyonundan polimerlerin saflaştırılması, sürfaktan kalıntılarının uzaklaştırılması ihtiyacı nedeniyle zorlayıcı olabilmektedir. Sürfaktan içermeyen sistemlerde, çıkarılacak sürfaktan olmadığından saflaştırma işlemi genellikle daha basit ve daha az maliyetlidir. Süreç dikkatli kontrol ve optimizasyon gerektirse de sürfaktanların ortadan kaldırılması, hammadde ve atık yönetimi ile ilgili maliyet tasarruflarına yol açabilmektedir (Sharma ve diğ., 2023). Sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu, polimer konsantrasyonu ve kullanılıyorsa koruyucu kolloidlerin moleküler ağırlığı gibi işlem parametrelerinin manipülasyonu yoluyla parçacık boyutu ve dağılımı üzerinde daha iyi kontrol sağlayabilmektedir. Bu gibi avantajlar, sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonunu, sürfaktanların

varlığının ürünün performansına veya çevresel profiline zararlı olabileceği özel uygulamalar için çekici bir seçenek haline getirmektedir.

1.7 Polimerik Mikrokürelerin Morfolojisini Etkileyen Parametreler

Emülsiyon polimerizasyon yöntemiyle polimerik mikrokürelerin sentezi, mikrokürelerin boyutu, morfolojisi ve özelliklerini belirleyen bir dizi kritik parametreden etkilenmektedir. Emülsiyon polimerizasyonu yoluyla sentezlenen polimerik mikrokürelerin özelliklerini çeşitli amaçlarla uyumlu hale getirmek için bu parametrelerin optimizasyonu çok önemlidir.

1.7.1 Nişasta Konsantrasyonunun Parçacık Morfolojisine Etkisi

Emülsiyon polimerizasyonu kullanılarak nişasta mikrokürelerinin sentezi sırasında, elde edilen mikrokürelerin morfolojisi, nişasta konsantrasyonu tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir. Nişasta konsantrasyonunun mikroküre özellikleri üzerindeki etkisini inceleyen bir dizi çalışma, nişastanın çeşitli biyomedikal uygulamalarda ne kadar önemli olduğunu göstermiştir.

Bir araştırma grubu çapraz bağlanarak sentezlenmiş nişasta mikrokürelerde çapraz bağlanma durumlarının parçacık morfolojisine etkisini araştırdıkları bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (Atyabi ve diğ., 2006). Bu bağlamda nişasta konsantrasyonunun da etkisini analiz eden bu grup, daha yüksek nişasta konsantrasyonları ile sentezlenmiş olan parçacıklarda daha yoğun bir çapraz bağlanma yapısı gözlemledikleri için parçacık boyutunda artış gözlemlemişlerdir. Ek olarak ilaç enkapsülasyonunda da daha yüksek konsantrasyonda nişasta ile sentezlenmiş olan parçacıkların daha yüksek hacimlerde ilacı depolayabildiği raporlanmıştır.

Başka bir araştırma grubu ise nişasta mikrokürelerin ilaç yüklenme kapasitelerinin, kullanılan nişasta miktarından nasıl etkilendiğini araştırmıştır (Fang ve diğ., 2008). Çalışmada sodium trimetafosfat çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış ve elde edilen küresel parçacıklarda yüklenme süresinin, ilaç konsantrasyonunun ve parçacık sentezi sırasında kullanılan nişasta konsantrasyonunun artışının parçacığın ilaç yüklenme veriminde artışa neden olduğu raporlanmıştır.

Araştırmacılar, nişasta konsantrasyonunu dikkatli bir şekilde değiştirerek mikrokürelerin morfolojisi ve ilaç yüklenme verimi gibi belirli biyomedikal gereksinimleri karşılayacak şekilde değiştirebilmektedirler. Nişasta konsantrasyonunun mikroküre morfolojisi üzerindeki etkisini anlamak, performanslarını optimize etmek ve ilaç dağıtım sistemlerinde, doku mühendisliğinde ve diğer biyomedikal alanlarda kullanımını geliştirmek için gereklidir.

1.7.2 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Parçacık Morfolojisine Etkisi

Çapraz bağlı polimerik mikroküreler elde edilirken, en önemli unsurlardan biri çapraz bağlayıcıların konsantrasyonudur. Araştırmacılar tarafından yapılan deneyler ışığında polimerik mikrokürelerde arttırılan çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun, parçacık direncinde de artışa sebep olarak şişme oranlarını azalttığı ve çevresel faktörlere karşı daha dayanıklı hale getirdiği gözlemlenmiştir (Yuan ve diğ., 2007). Polimer zincirlerinin oluşumuna da sebep olan çapraz bağlayıcıların sentez ortamında miktarları arttırıldıkça, üretilen mikrokürelerin ağ yapısında da artışa sebep olduğu bazı çalışmalarda raporlanmıştır. Bununla birlikte, aşırı miktarda ECH kullanımının, yoğun ve düzensiz şekilli mikrokürelerin oluşumuna neden olabileceği ve bu bağlamda ilaç yükleme ve salım kapasitelerini etkileyebileceği literatürde gerçekleştirilen araştırmalarda gösterilmiştir.

Araştırmacılar bir çalışmada, emülsiyon polimerizasyonu yoluyla hidrofobik olarak değiştirilmiş nişastayı (HMS) temel malzeme olarak kullanarak biyolojik olarak parçalanabilen nanopartiküller oluşturmayı amaçlamışlardır. Özellikle artan çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun, daha küçük parçacık boyutlarına ve daha yoğun yapılaraya yol açtığını raporlamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, parçacıkların kontrollü ilaç salım uygulamalarına yönelik potansiyellerini vurgulayarak sürekli salım davranışı sergilediklerini raporlamışlardır (Torres ve diğ., 2022).

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen mikrokürelerin morfolojisini ve özelliklerini belirleyen kritik bir faktördür. Mikroküre sentezi sırasında epiklorohidrin (ECH) kimyasalının çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı senaryolarda parçacık özelliklerindeki değişimi gözlemlenmiştir. Nişasta mikroküreleri sentezlenirken ECH'nin çapraz bağlayıcı olarak kullanılması,

sentezlenen mikrokürelerin mekanik mukavemetinde ve stabilitesinde artışa sebep olmuştur. Mikrokürelerin boyutu, şekli ve yüzey özellikleri, ECH konsantrasyonuna bağlı olarak çapraz bağlanma derecesini etkilemektedir (Zhou ve diğ., 2014).

Daha düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ise, daha az dirençli ve daha fazla gözenekli mikrokürelerin oluşumuna sebep olmaktadır. Aynı zamanda, bazı çalışmalarda mikroküre boyutunun da düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonu nedeniyle arttığı raporlanmıştır. Bu özellikler nedeniyle düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonuyla sentezlenmiş mikrokürelerin daha fazla ilaç yüklenebildiği ve daha hızlı salım karakteristikleri gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak, aşırı düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonları, parçacıkların kırılğan ve zayıf olmasına neden olabilmektedir (Zhou ve diğ., 2014).

1.7.3 Ortam Sıcaklığının Parçacık Morfolojisine Etkisi

Mikrokürelerin özellikleri ve reaksiyon kinetiği, ortam sıcaklığı tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir. Daha yüksek sıcaklıklar, monomerlerin difüzyonu ve reaksiyon hızlarının artması nedeniyle daha büyük partikül boyutlarına neden olmaktadır. Daha yüksek sıcaklıklarda artan kinetik enerji, monomerlerin aktivasyonunu ve radikallerin difüzyonunu kolaylaştırarak, yayılma ve agregasyonun daha verimli bir şekilde gerçekleşmesine neden olacaktır. Tersine, daha düşük sıcaklıklar daha yavaş polimerizasyona ve daha küçük parçacık boyutlarına neden olabilmektedir. Reaktanların daha düşük sıcaklıklarda yavaş yayılması ve azaltılmış hareketliliği, büyüyen partiküllerin birleşmesini kısıtlayarak partikül büyümesini azaltacaktır. Emülsiyon sisteminin termodinamik viskozitesini ve stabilitesini etkileyen sıcaklık, polimer partiküllerinin çekirdeklenmesini ve stabilizasyonunu etkileyen faktörlerden biridir (Virmani ve diğ., 2017).

Bir araştırmacı grubu sodyum trimetafosfatı çapraz bağlayıcı olarak kullandıkları nişasta mikroküre sentezi sırasında parçacık morfolojisine ortam sıcaklığının etkisini analiz etmişlerdir (Fang ve diğ., 2008). Sonuçları değerlendirdiklerinde ortam sıcaklığındaki artışın parçacık morfolojisinde bozulmalara ve parçacıkların aggrege olmalarına yol açtığını gözlemlemişlerdir.

Başka bir grup ise mısır nişastasından sentezledikleri mikrokürelerde ortam sıcaklığının parçacıktaki kristalin yapıya etkisini analiz etmiştir (Bai ve diğ., 2013). Bu çalışma sonucunda daha yüksek sıcaklıklarda sentezlenmiş olan mikrokürelerin retrogradasyonunun hızlandığını raporlamışlardır.

Araştırmacılar, polietilen glikol mikrokürelerin sentezlenmesi sırasında düşük ve yüksek sıcaklıkların parçacık morfolojisine etkilerini incelemişlerdir (Elfstrand ve diğ., 2009). Mikrokürelerin iç yapısının kristalin/düzenli olduğunu vurgulayan araştırmacılar, daha yüksek sıcaklıkta sentezlenmiş olan parçacıklarda yüzey pürüzünün ve gözeneklerin artmış olduğunu raporlamışlardır.

1.7.4 Ortam pH'sinin Parçacık Morfolojisine Etkisi

Emülsiyon düzeneğinde ortam pH koşullarının değiştirilmesi mikrokürelerin morfolojisini, boyutlarını ve özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Sistemin elektrostatik ve koloidal stabilitesini etkileyerek emülsiyon damlacıklarının iyonizasyonuna ve yük yoğunluğuna etki etmektedir ve bu nedenle pH'ın ayarlanmasının, polimer parçacıklarının çekirdeklenme ve büyüme hızlarını da değiştirebileceği bilinmektedir (Cummings ve diğ., 2019). Özellikle nişasta granülleri soğuk suda düşük çözünürlüğe sahiptir ve pH, nem, sıcaklık ve mekanik streste karşı değişikliklere karşı duyarlıdır (Hashim, 2011).

Sulu fazın pH'ı, emülsiyon içindeki monomer damlacıklarının stabilitesinin belirlenmesinde çok önemli bir rol üstlenmektedir. Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlenen parçacıklarda monomer üzerindeki fonksiyonel gruplar ile sulu fazdaki yüklü türler arasındaki farklı etkileşimler, damlacık boyutu, birleşme dinamikleri ve sonuç olarak ortaya çıkan mikrokürelerin nihai boyutu ve morfolojisi üzerinde fark edilebilir etkiler yaratmaktadır (Li ve diğ., 2011).

Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlenen parçacıklarda kullanılan başlatıcı sisteme bağlı olarak ortam pH'ı, damlacıklar içindeki polimerizasyon hızını etkileyen kritik bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Bu dinamik etkileşim, mikrokürelerin nihai morfolojisini önemli ölçüde şekillendirerek; daha

düşük pH değerlerinin, yavaşlayan polimerizasyon süreci nedeniyle potansiyel olarak daha büyük, daha gözenekli mikrokürelerin üretimine neden olacağı araştırmacılar tarafından raporlanmıştır (Li ve diğ., 2011).

Sulu fazın pH'ı, monomer veya polimer zincirleri üzerinde bulunan fonksiyonel grupların iyonizasyon durumu üzerinde derin bir etki yapmaktadır, böylece mikrokürelerin yüzey yükünü modüle etmektedir. Yüzey yükündeki bu değişiklik, mikrokürelerin diğer moleküllerle etkileşimleri ve biyolojik ortamlardaki davranışları üzerinde değişiklikler yaratmaktadır (Li ve diğ., 2011).

Bu duruma örnek olarak PMMA mikroküreleri üzerinde yapılan araştırmalar, sulu fazın pH'ındaki değişikliklerin, parçacık boyutunda, yüzey pürüzlülüğünde ve gözenekliliğinde gözlemlenen değişiklikler olarak ortaya çıktığını göstermektedirler. Bunun gibi dikkate değer çalışmalar, pH'ın PMMA mikroküre morfolojisi üzerindeki incelikli etkisinin altını çizmektedir (Zhang ve diğ., 2013).

Ortam pH'sinin etkisi, PLA mikrokürelerine kadar uzanmaktadır ve parçacık boyutu, yüzey dokusu ve iç yapı gibi kritik faktörleri etkilemektedir. Araştırmacılar tarafından örneklenen öncü araştırma, pH değişimleri ile PLA mikrokürelerinin morfolojisi arasındaki korelasyona ilişkin değerli bilgiler sağlamıştır: daha yüksek pH değerlerinin daha büyük gözeneklere yol açmıştır. Ayrıca nano lifli yapıya sahip yapı iskelelerin, mezenkimal kök hücre tutunmasını ve yaşayabilirliğini trombosit benzeri yapılara sahip olanlara göre daha fazla desteklediği de raporlanmıştır (He ve diğ., 2009).

Bir araştırma grubu, pirinç nişastasından sentezledikleri parçacıklarda ortam pH'sindeki değişimin parçacık morfolojisine etkisini araştırdıklarında yüzey morfolojisinin parçacıklarda değişiklik göstermediğini ancak parçacık boyutunun artan pH ile arttığını raporlamışlardır (Zhu ve diğ., 2023). Başka bir araştırma grubu ise karnasyon bazlı nişasta parçacıklarda net olarak sonucu araştırmamış olsalar da pH değerinin parçacıkların şişme karakteristikleri üzerinde önemli etkileri olabileceğini raporlamışlardır (Karoyo ve diğ., 2018).

1.7.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranının Parçacık Morfolojisine Etkisi

Emülsiyon polimerizasyonu yoluyla nişasta mikrokürelerinin sentezi sırasında dağınık fazın sürekli faza oranı, elde edilen mikrokürelerin morfolojisini ve özelliklerini önemli ölçüde etkileyen kritik faktörlerden biridir. Dağınık fazın sürekli faza oranı, reaksiyon kinetiğini, çekirdeklenmeyi ve polimer büyümesini doğrudan etkileyen ve böylece mikrokürelerin boyutunu, şeklini ve yüzey özelliklerini de etkilemektedir (Lee ve diğ., 2002), (Malafaya ve diğ., 2006).

Bir araştırmacı grubu gerçekleştirdiği çalışmada iki karışmayan sıvının imping-jets hücresinde dağınık fazın sürekli faza oranının parçacık morfolojisini nasıl etkilediğini araştırmıştır (Tsaoulidis ve diğ., 2017). Bu bağlamda araştırmacılar, sıvı-sıvı dispersiyonlarda fazların birbirlerine oranları manipüle edildiğinde değişiklikler olduğunu ve özellikle kendi çalışmalarında bu oranın arttırılmasının boyutta bir azalışa neden olduğunu raporlamışlardır.

Başka bir araştırma grubu ise emülsiyon tabanlı sentez yöntemi ile porlu silika parçacıkları sentezlemişler ve bu süreçte dağınık fazın sürekli faza oranının parçacık morfolojisi üzerindeki etkisini araştırmışlardır (Gustafsson ve diğ., 2017). Çalışma sonucunda dağınık fazın sürekli faza oranı artırıldığında parçacıkların daha porlu bir yapı sergilemiş olduğunu raporlamışlardır.

1.7.6 Emülsiyonun Karıştırılma Hızının Parçacık Morfolojisine Etkisi

Karıştırma hızı, emülsiyon polimerizasyonu ile parçacık sentezi işlemi sırasında parçacık morfolojisini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bu parametre, reaktanların karışma hızını belirleyerek parçacıkların boyut, boyut dağılımını ve morfolojisini etkilemektedir. Emülsiyon daha yüksek hızda karıştırıldığında, parçacıkların daha küçük boyutlara indirgenerek monomer difüzyonunu arttırdığı ve boyut aralığının daha dar olacağı bilinmektedir (Shunmukham ve diğ., 1951). Hızlı karıştırma bu etmenin yanısıra parçacıklarda aggregasyona eğilimi de arttırabilmektedir. Bu nedenlerle emülsiyonun karıştırma hızının, parçacıklarda istenen boyut aralığında elde edilebilmesi için optimize edilmesi kritik bir rol oynamaktadır.

Bazı araştırmacıların yayınlarında karıştırma hızındaki artışın, sürekli fazda dağınık faz içerisinde dağılımını arttırarak monomer çözeltisinin daha verimli bir şekilde parçalandığı ve bu nedenle daha küçük boyutların elde edildiği sonucuna varılmıştır (Park ve diğ., 2011), (Karataş ve diğ., 2010).

Bir diğer araştırmacı grubu tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ise daha yavaş karıştırma hızlarında sentezlenen parçacıkların damlacıklar üzerindeki kayma geriliminin azaldığı gözlemlenmiş ve bu durum sonucunda elde edilen mikrokürelerde daha pürüzsüz yüzey morfolojisi elde edildiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, artan karıştırma hızlarında ise damlacık formlarının küresel olmayan ve koagüle yapıda oldukları görülmüştür (Badr ve diğ., 2018).

Başka bir çalışmada ise daha yüksek karıştırma hızlarında sentezlenen parçacıklarda polimer zincirlerinin polimerizasyon sırasında oluşumda parçalanabildiği ve bu nedenle parçacıkların porlu yapıda oluştuğu görülmüştür (Vlachopoulos ve diğ., 2022). Başka bir raporda ise bu hızın belirli bir seviyeden daha yüksek tutulması durumunda gözeneklerin boyutlarındaki homojenitenin kaybedilebileceği bildirilmiştir (Park ve diğ., 2011).

Parçacıkların iç yapısına bu parametrenin etkisi incelendiğinde ise spesifik sistem ve karıştırma koşullarındaki değişimlere göre parçacıkların içlerindeki doluluk veya boşluğun da manipüle edilebildiği raporlanmıştır (Karataş ve diğ., 2010). Son olarak emülsiyonun karıştırılma hızının parçacıklardaki ilaç salım kinetiğine etkisinin gerçekleştirildiği bir çalışmada ise porlu parçacıklarda ilaç salımı daha hızlı gerçekleştiğinden dolayı daha küçük boyutlu ve daha porlu parçacıkların salım hızının daha yüksek olduğu raporlanmıştır (Vlachopoulos ve diğ., 2022).

1.8 Polimerik Mikrokürelerin Tıpta Kullanım Alanları

Çıplak gözle zor seçilebilir olan polimerik mikroküreler modern tıpta devrim yaratma konusunda yüksek bir potansiyele sahiptir. Sentetik veya doğal polimerlerden oluşan ve boyutları birkaç mikrometreden yüzlerce mikrometreye kadar değişebilen bu çok yönlü parçacıklar, çeşitli tıbbi alanlarda kullanılmaktadırlar. İlaç taşınımı, teşhis, hücre

ve doku mühendisliğindeki uygulamaları ile bu mikroküreler, hasta sonuçlarının iyileştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar (Slomkowski ve diğ., 2002).

Polimerik mikroküreler, kontrollü ilaç salımında önemli bir rol oynamaktadırlar ve hastalara uygulanan ilaç tedavisinde sofistike ve çok yönlü bir yaklaşımı temsil ederler. Küçük boyutları sayesinde moleküllerden kompleks proteinlere ve nükleik asitlere kadar geniş bir terapötik ajan kapsülleme kapasitesine sahiptirler. Bu mikrokürelerin doğal biyouyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği, onlara sürekli ve hedefe yönelik salımını düzenleme yeteneği sağlayarak terapötik etkileri en üst düzeye çıkartarak olumsuz yan etkileri de minimize ederler (Benoit ve diğ., 2000).

Hedeflenen ilaç dağıtım alanı içerisinde polimerik mikroküreler, hedef hücreler üzerindeki reseptörlere bağlanmak için özel olarak tasarlanmış ligandlarla işlevselleştirilerek stratejik ajanlar olarak rol oynayabilirler. Bu moleküler özelleştirme, terapötik yükün etkilenen dokulara kesin ve yönlendirilmiş bir şekilde verilmesini sağlayarak ilaçlara sistemik maruziyeti en aza indirerek istenmeyen yan etkileri azaltabilmektedir (Bahrami ve diğ., 2017).

Kontrollü salım yönünden incelendiğinde mikrokürelerin polimer bileşimi ve morfolojisi manipüle edilerek yönetilebilmektedir. Salım profili üzerindeki bu kontrol edilebilirlik sayesinde günleri haftalar ve hatta ayları kapsayan uzun süreler boyunca sürekli ilaç salımı gerçekleştirilebilir. Bu sayede hasta konforu iyileştirilebilir ve sürekli ilaç uygulama ihtiyacı minimize edilebilir (Chen ve diğ., 2022).

Ayrıca, ilaçların polimerik mikroküreler içinde kapsüllenebilmesi, enzimatik bozulmaya ve erken inaktivasyona karşı koruyucu bir kalkan görevi görerek hassas ilaçların stabilitesini önemli ölçüde artırır, böylece terapötik güçlerini koruyup ve raf ömrünü uzatır. Hedefe yönelik taşınım, kontrollü salım ve gelişmiş ilaç stabilitesinin bu karmaşık etkileşimi, polimerik mikroküreleri, modern tıp alanında ilaç etkinliğini ve hasta sonuçlarını optimize etme arayışında önemli bir araç olarak konumlandırmaktadır (Arpicco ve diğ., 2016). Bu duruma TACE önemli bir örnek olarak verilebilir. Bu yöntemde karaciğer kanserine karşı mücadelede kemoterapötik ajanlarla yüklü mikroküreler doğrudan tümörün beslenme arterine enjekte edilir. Sonrasında ise, bu embolik mikroküreler, tümörün kan akışını engelleyerek ikili bir

amaca hizmet eder, böylece besin ve oksijen yoksunluğunu indüklerken, aynı zamanda gelişmiş bir terapötik etki için kemoterapötik ajanları serbest bırakmaktadır (Andreozzi ve diğ., 2023).

Ayrıca, polimerik mikrokürelerin uygulanmasına başka bir örnek olarak Uterus Fibroid Embolizasyonuna (UFE) verilebilir ve uterus fibroidleriyle mücadele eden kadınlara hedefe yönelik bir müdahale sunabilmektedir. Bu bağlamda mikroküreler, fibroidleri besleyen arterlere stratejik olarak enjekte edilirler ve ortaya çıkan kan akışının tıkanması durumu, ağrı ve aşırı kanama gibi semptomları hafifleterek fibroidlerin boyutunda bir azalmaya neden olur. Bu çok yönlü uygulama, hedeflenen terapötik müdahalelerin ilerlemesinde araçsal varlıklar olarak polimerik mikrokürelerin çok yönlülüğünün ve etkinliğinin altını çizmektedir (Pelage ve diğ., 2003).

Polimerik mikrokürelerin bir başka kullanım alanı ise çeşitli görüntüleme yöntemleri için kontrast maddelerin iletimidir. Manyetik rezonans görüntülemede (MRI) mikroküreler içine yüklenen süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları kontrast madde görevi görerek MRI taramalarında belirli dokuların veya tümörlerin görünürlüğünü arttırabilmektedir. Bu durum, hastalıkların olağanüstü doğrulukla erken teşhis edilmesini ve evrelemesini sağlamaktadır (Shuvaev ve diğ., 2021).

Araştırmacıların gerçekleştirdiği bir çalışmada polimer kaplama ile sarılmış gazla dolu mikrokürelerin ultrason görüntüleme alanında önemli kontrast maddeleri olarak işlev gördüğü raporlanmıştır. Bu parçacıkların temel rolleri, ultrason dalgası etkileşimlerinin arttırılmasında yatarak; vasküler yapıların, kan akış dinamiklerinin ve vasküler sistem içindeki anormalliklerin daha iyi görüntülenmesine yol açmasıdır. Bu mikrokürelerin ultrason dalgalarına yanıt olarak salınımlara maruz kalma kapasitesi, yalnızca görüntülemedeki kontrastı arttırmakla kalmayarak, aynı zamanda vasküler düzensizliklerin belirlenmesi bağlamında tanısal kesinliğin iyileştirilmesine de önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Unnikrishnan ve diğ., 2012).

Mikrokürelerin başka bir uygulama alanı olan floresan boyalarla etiketlenmesi, tümörlerden patojenlere kadar spesifik biyolojik hedeflerin görsel temsiliinin sağlanmasında çok önemli bir strateji oluşturmaktadır. Bu gelişmiş yaklaşım,

biyomedikal görüntüleme alanında, karmaşık biyolojik süreçlere ilişkin gelişmiş içgörüler sunan değerli bir araç olarak hizmet vermektedir. Floresan etiketli mikrokürelerin kullanımı, cerrahi müdahaleler sırasında gerçek zamanlı geri bildirim sağlamada ve hedef yapıların dinamik bir şekilde görüntülenmesini kolaylaştırmada özel bir öneme sahiptir. Ayrıca bu teknik, hedeflenen ilaç dağıtımı bağlamında yol gösterici bir mekanizma görevi görür; burada floresan, uygulanan terapötik ajanların kesin olarak izlenmesine ve lokalizasyonuna olanak tanıyarak müdahalenin genel etkinliğini arttırmaktadır. Mikroküre teknolojisinin floresan görüntülemeyle birleştirilmesi, yalnızca teşhis yeteneklerinin kapsamını genişletmekle kalmaz, aynı zamanda biyomedikal alandaki tedavi stratejilerinin geliştirilmesine de önemli ölçüde katkıda bulunur (Das ve diğ., 2022).

Polimerik mikroküreler bu kullanım alanlarının yanısıra sert doku mühendisliği ve rejenerasyon çabalarının kolaylaştırılmasında önemli bir rol üstlenerek etkilerini mevcut hastalıklarla mücadele alanının ötesine taşımaktadırlar. Mikroskalada yapı birimleri olarak hizmet veren bu küreler, hücre büyümesi ve doku restorasyon süreçlerinde temel bir rol oynayan biyouyumlu yapı iskelelerinin geliştirilmesine katkıda bulunurlar (Wee ve diğ., 2021).

Bu paradigmanın merkezinde, kemik rejenerasyonu için tasarlanmış 3 (üç) boyutlu yapı iskelelerinin oluşturulmasında mikrokürelerin kullanılması yer almaktadır. Bu biyolojik olarak parçalanabilen mikrokürelerden gözenekli yapı iskeleleri inşa edilerek, doğal dokuların karmaşık mimarisini taklit edecek bir çerçeve oluşturulabilmektedir. Bu çerçeve yalnızca mekanik destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kemik hücrelerinin çoğalması ve hasarlı dokuyu yeniden yapılandırması için elverişli bir ortam görevi görür (Hollister, 2005).

Dahası, polimerik mikrokürelerin uygulanması, kıkırdak ve sinir dokularının onarımı ve yenilenmesine kadar uzanır. Mikrokürelerden oluşturulan benzer biyobozunur yapı iskelelerinin, hasarlı kıkırdağı onarmak veya sinir hücresi yenilenmesini kolaylaştırmak için gerekli olan hücrelerin büyümesine rehberlik etmede etkili olduğu kanıtlanmıştır. Doku mühendisliğinde mikrokürelerin bu kapsamlı kullanımı,

yaralanmalar veya dejeneratif hastalıklarla boğuşan hastalar için umut vaat eden, paradigma değiştiren bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır (Li ve diğ., 2023).

1.9 Amaç

Minimal toksisiteye sahip mikrokürelerin biyomedikal kullanımında, özellikle boyut çeşitliliği göz önüne alındığında, belirli gereksinimlerin karşılanmasını gerektirmektedir. Her şeyden önce, sistemik uygulama amaçlandığında, hayati organlarda embolizasyon riskini azaltmak için titiz boyut kontrolü zorunludur. Mikrometre ölçekli boyutlarla karakterize edilen mikroküreler, retiküloendotelyal sistemden kaçabildikleri için özellikle avantajlıdır, bu da dolaşım sürelerinin uzamasına ve toksisite potansiyelinin azalmasına yol açar (Sinha ve diğ., 2003). Bu duruma ek olarak hemoroid rahatsızlıklarında mikrokürelerin embolizan olarak kullanılmalarının venler üzerindeki basıncı azaltarak yaşanan semptomların hafifletilebilmesini sağlanabilmektedir. Ancak bu durum için piyasada yerel kalmalarının yanı sıra dokuya uygulanabilecek veya ilaç yüklendiğinde yeterli salımı yapabilecek boyutlarda ürün bulunmamaktadır (Talaie ve diğ., 2022). Bu duruma ek olarak adenomyosis tedavisinde ise uterus arter embolizasyonunun hedeflenmiş bir tedavi sağlamasının yanı sıra adenomyozisi besleyen damarlara kan akışını engelleyerek semptomlarda azalma sergileyebileceği raporlanmıştır. Ancak hemoroid rahatsızlığına benzer şekilde, bu işlem için ihtiyaç duyulan boyut aralığındaki parçacıklar stabil olarak sentezlenememiştir (Popovic ve diğ., 2011). İkinci olarak, biyoyumumluluk büyük önem taşımaktadır. Mikroküreler, güvenli bir şekilde bozunmalarını ve biyolojik sistemden elimine edilmelerini sağlamak için biyolojik olarak parçalanabilen ve immünojenik olmayan malzemelerden üretilmelidir (Feng ve diğ., 2023). Üçüncüsü, mikrokürelerin ilaç yükleme kapasitesi ve salım profilleri, etkin ve kontrollü ilaç dağıtımını mümkün kılacak şekilde spesifik uygulamaya uyarlanmalıdır (Freiberg ve diğ., 2004). Ek olarak, doku mühendisliğinde mikroküreler, yeterli mekanik stabilite sağlarken hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kolaylaştırma yeteneğine sahip olmalıdır (Raj ve diğ., 2021). Son olarak, özellikle farklı boyut aralıklarında mikrokürelerin potansiyel olumsuz etkilerini değerlendirmek için kapsamlı in vitro ve in vivo toksisite değerlendirmeleri yapılmalıdır, böylece klinik çeviriden önce bunların güvenlik ve etkinliği garanti

edilmelidir (Häfeli ve diğ., 1999). Bu gerekliliklere bağılı kalarak, mikroküreler çeşitli biyomedikal uygulamalarda etkili ve güvenli bir şekilde kullanılabilir, böylece tıbbi tedaviler ve teşhis metodolojileri geliştirilebilir.

Bu çalışma, yukarıda bahsi geçen gereksinimleri sağlamak için dar boyut aralıklarında stabil mikroküre üretimi elde etmek, emülsiyon polimerizasyonu yoluyla toksik olmayan, yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir nişasta bazlı mikrokürelerin sentezlenmesini amaçlamıştır. Bu araştırmada, hem parçacık stabilitesini hem de boyutunu etkileyen çeşitli parametrelerin araştırılmasına büyük önem verilmiştir. Mikroküre sentezi için birincil malzeme biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerini taşıması nedeniyle nişasta olarak seçilmiştir, bu sayede biyomedikal uygulamalar için yüksek potansiyel taşımaktadır. Emülsiyon polimerizasyon tekniğı mikrokürelerin boyut dağılımı üzerinde kesin kontrol sağlamaktadır. Bu özel yaklaşım, biyomedikal mikroküre kullanımı alanında karşılaşılan toksisite endişeleri ve boyut kontrolü ile ilgili zorlukların ele alınmasında önemli bir umut vaat etmektedir. Buna katkı sunma amacıyla toksik etki gösterebilen sürfaktan kullanımı olmadan kontrollü mikroküre üretimi üzerine odaklanılmıştır. Literatürde dar boyut aralıklı ve sürfaktan içermeyen nişasta mikrokürelerin boyut kontrollü eldesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ek olarak, nişastanın temel malzeme olarak kullanılması, fonksiyonel katkı maddeleri veya terapötik ajanların dâhil edilmesi için potansiyel fırsatlar sunarak iyileştirilmiş terapötik sonuçların eldesini de olası kılacaktır. Kapsamlı karakterizasyon ve titiz değerlendirme yoluyla gerçekleştirilen bu çalışma, biyomedikal uygulamalar için katı gereklilikleri karşılayan mikrokürelerin süregelen gelişimine katkıda bulunma potansiyeli de taşımaktadır.

2. MATERYALLER VE METOTLAR

2.1 Malzemeler

Parçacık sentezi için Paraffin yağı (Sigma-Aldrich, Lot #STBH6154, US), Nişasta (Avebe - Paselli BC, NL), Epiklorohidrin (ECH) (Sigma-Aldrich, Lot #S7895596 117, US), Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich, Lot #SZBF0820V, US) kullanılmıştır. Parçacıkların yıkanmasında Hekzan (ISOLAB, Lot #LR0732108AKQ, GE) kullanılmıştır. Parçacıklarda ilaç yüklenimi ve salımı deneylerinin gerçekleştirilmesi için Adrimycin (Saba Pharmaceuticals, TR) kullanılmıştır. Canlılık analizinde 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (SERVA, Lot #180770, GE), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Fisher Scientific, Lot #142589, US), Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), high glucose, with glutamine (Sartorius, Lot #2204092, GE), Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) (Biological Industries, Lot #1551655, US), Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), no calcium, no magnesium (Sartorius, Lot #1545513, US), NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (ATCC, CCL-1, US) kullanılmıştır.

2.2 Metodlar

2.2.1 Nişasta Mikrokürelerin Emülsiyon Polimerizasyonu Yöntemi İle Sentezlenmesi

0.5M, 1M, 2M NaOH çözeltisi içerisinde ağırlıkça %3, %5, %7.5, %10 nişasta çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti tamamen çözündükten sonra, manyetik karıştırıcıda 500, 700, 900, 1000 RPM'de karışmakta olan paraffin yağına bir şırınga pompası yardımıyla 21G uçlu şırınga ile 40 mL/h hızda damlatılmıştır. Damlatma bitiminde hacimce %1, %4, %20 çapraz bağlayıcı da ortama şırınga pompası yardımıyla 18G uçlu şırınga içerisinde eklenerek 30°C, 40 °C, 60 °C ve 70 °C ortam sıcaklıklarında, 7, 8, 9, 10 ortam pH'larında elde edilen emülsiyon 500 RPM, 700 RPM, 900 RPM, 1000

RPM hızlarında karışmaya bırakılmıştır. Bu süreçte standart kriterlerde tutulacak olan parçacık, sentez parametreleri 1M NaOH çözeltisi içerisinde ağırlıkça %5 nişasta çözeltisi ile hacimce %4 çapraz bağlayıcı konsantrasyonu kullanılarak dağılık fazın sürekli faza oranı %21 olarak ayarlanmış bir şekilde manyetik karıştırıcıda 700 RPM'de karıştırma işlemi gerçekleştirilen, ortam pH'si 9'da ve ortam sıcaklığı 30°C'de tutularak sentezlenmiş parçacıklar olarak belirlenmiştir.

2.2.2 Nişasta Mikrokürelerin Yıkınması

Emülsiyon, karıştırma süresi bittikten sonra 50 mL'lik eppendorf tüplere bölünmüştür. Daha sonrasında her birinin üzerine 10 mL hekzan eklenmiş ve tüpler parafilm ile kapatılarak alt-üst edilmiştir. Tüpler, oda sıcaklığında 15 dakika 500 RPM'de santrifüjlenmiştir. Bu santrifüjleme işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Her santrifüjleme işleminden sonra atık hekzan ve parafin yağının üst tabakası ortamdaki uzaklaştırılarak 10 mL daha hekzan eklenmiştir. Tüpler parafilm ile kapatılıp, alt-üst edilerek tekrar santrifüjlenmiştir. Son santrifüjleme işleminin ardından üst tabakadaki sıvı uzaklaştırılmış ve tüpler saf su ile doldurularak alt-üst edilmiştir. Tüpler daha sonra +4°C'ye yerleştirilmiştir. Üç gün boyunca, her saat, saf suyun üst tabakası kaldırılmış ve taze saf su ile değiştirilmiştir. Tüpler alt üst edilmiş ve işlem boyunca +4°C'de tutulmuştur.

2.2.3 Nişasta Mikrokürelerin Kurutulması

Parçacıklar bir cam petri kabına yayılmıştır. Ortamda bulunan fazla sıvı mümkün olduğunca mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Petri kabı parafilm ile kaplanmış ve parafilmde steril şırınga iğnesi yardımıyla küçük delikler açılmıştır. Daha sonra vakumlu fırına yerleştirilmiştir. Vakumlu etüvün sıcaklığı 27,9°C ile 28,9°C arasında ve basınç 1500 mbar olacak şekilde ayarlanmıştır. Parçacıklar en az 5 gün, en fazla 14 gün vakumlu etüvde bırakılmıştır.

2.2.4 Nişasta Mikrokürelerin Liyofilizasyonu

Mikroküreler, suyun çoğunu buharlaştırmak için bir vakum altında ısıtılmıştır. Sonrasında ortamdaki suyun katılaşması için hızlı bir şekilde dondurulmuştur. Son olarak parçacıklar vakum altında ve düşük sıcaklıklarda kurutulmuştur.

2.2.5 Nişasta Mikrokürelerin Bozunum Karakteristiklerinin İncelenmesi

Sağlıklı bir bireyin kanındaki amilaz konsantrasyonu 30-110 U/L arasında değiştiği için bu çalışmada bu konsantrasyon aralığında bozunması incelenmiştir. 5 mg/mL partikül solüsyonu hazırlanmış ve bu solüsyona istenilen konsantrasyonda 5 mL amilaz çözeltisi eklenmiştir. Karışım daha sonra 50 RPM'de ve 37°C'de çalkalayıcı bir inkübatöre veya su banyosuna yerleştirilmiştir. Analiz için istenilen zaman aralıklarında (1 saat, 3 saat, 5 saat, 12 saat vb.) partiküller distile su ile yıkanıp, hassas terazide ağırlık ölçümleri gerçekleştirilmiş ve daha sonra taze çözeltiye konularak tekrar çalkalayıcı inkübatöre veya su banyosuna yerleştirilmiştir.

2.2.6 Nişasta Mikrokürelerin Şişme Karakteristiklerinin İncelenmesi

Mikroküreler vakumlu etüvde kurutulmuştur. 5 mg/mL konsantrasyonda kuru CSM4-24 mikroküreler, 5 mL saf su (dH₂O) içeren amber tüplere eklenmiştir. Tüpler, 50 RPM'de ve 37°C'de çalkalayıcı bir inkübatöre yerleştirilmiştir. Yerleştirildikten sonra 24 saat boyunca partiküller karıştırıcı inkübatörde bırakılmıştır. Süre sonunda partiküller tüplerden alınarak fazla su kağıda emdirilerek uzaklaştırılmış, akabinde ağırlık ve boyut ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler tamamlandıktan sonra, parçacıklar tekrar vakumlu etüvde kurutulmuştur. Daha sonrasında, parçacıklar taze dH₂O içeren amber tüplere tekrar yerleştirilmiş ve çalkalayıcı inkübatöre (veya su banyosuna) konulmuştur.

2.2.7 Nişasta Mikrokürelerin Yüzey Yüklerinin İncelenmesi

Parçacıkların yüzey yükünün ölçülmesi için ZetaSizer kullanılmıştır. Parçacıkların boyutu cihaza ait küvete büyük geldiği için parçacıklar saf suya eklenip sonikatörde mekanik olarak parçalandıktan sonra elde edilen çözeltiden küvete 1 mL eklenerek ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.8 Nişasta Mikrokürelerin İlaç Yüklenmesi

10 mL ağırlıkça %5 doksorubisin (DOX) çözeltisi hazırlanmıştır. Her sentezlenen örnekten 10 mg kurutulmuş mikroküreler tartılmış ve DOX çözeltisine eklenmiştir. Karışım, yüklemenin 24 saat boyunca gerçekleşmesini sağlamak için bir karıştırıcı

inkübatöre (veya su banyosuna) yerleştirilmiştir. Karıştırıcı inkübatörün (veya su banyosunun) parametreleri 50 RPM ve 25°C'ye ayarlanmıştır. Yükleme bitiminde parçacıklar vakumlu etüvde kurutulmuştur.

2.2.9 Nişasta Mikrokürelerin İlaç Salım Karakterizasyonu

DOX yüklü parçacıklar saf su ile yıkanmıştır. Sonrasında her örnekten en az beş tekrar olacak şekilde amber şişelere aktararak 5 mL saf su eklenmiştir. Şişeler, karıştırıcı inkübatöre (veya su banyosuna) yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında şişelerden 1 mL numune alınmış ve 1 mL saf su eklenmiştir. Toplanan numunelerin absorbans değerleri UV-Vis spektroskopi yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.10 Nişasta Mikrokürelerle Hücre Canlılık Analizi

Her kuyuya 5×10^3 hücre ekilmiş ve her kuyuya 200 uL büyüme ortamı eklenmiştir. Plaka 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saat sonra incelenecek partiküller/çözeltiler ilgili kuyucuklara yerleştirilmiştir. Plaka tekrar 24 saat inkübe edilerek sürenin sonunda partiküller ve büyüme ortamı kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. 5 mg/mL'lik bir MTT:Phosphate-Buffered Saline (PBS) solüsyonu hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 20 µL MTT solüsyonu ve 200 µL serumsuz büyüme ortamı eklenmiştir. Plaka, 4 saat inkübe edilmiştir. MTT içeren büyüme ortamı daha sonra kuyulardan çıkarılmıştır. Plakanın dibine yapışan hücreler, her kuyucukta 200 uL DMSO içinde çözülmüştür. Absorbans değerleri, hücrelerin canlılığını hesaplamak için bir ELISA okuyucusu kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.11 İstatistiksel Analizlerin Gerçekleştirilmesi

Ölçüm sonuçlarının tanımlanmasında ortalama $\pm$ standart sapma (SD) istatistikleri tanımlayıcı istatistik olarak kullanılmıştır. Polimer konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, ortam pH'si, ortam sıcaklığı, dağınık fazın sürekli faza oranı ve emülsiyonun karıştırılma hızı parametrelerinin karşılaştırmalarında varyansların homojen olması durumunda tek yönlü varyans analizi, varyansların homojen olmaması durumunda ANOVA kullanılmıştır. Gruplar arasında fark bulunması durumunda farkı yaratan grup ya da grupların belirlenmesinde Tukey testi

kullanılmıştır. Sonuçların görsel sunumunda ortalama $\pm$ standart sapma (SD) grafiği, çubuk grafiği ve çizgi grafiği kullanılmıştır. Yanılma düzeyi olarak $\alpha = 0,05$ alınmıştır. Verilerin istatistiksel değeriendirmeleri RStudio versiyon 2023.12.1 Build 402 ile yapılmıştır.



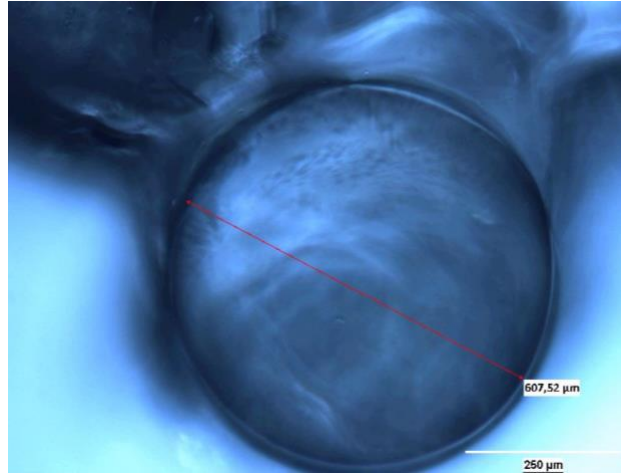
3. BULGULAR

3.1 Polimer Konsantrasyonu

3.1.1 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

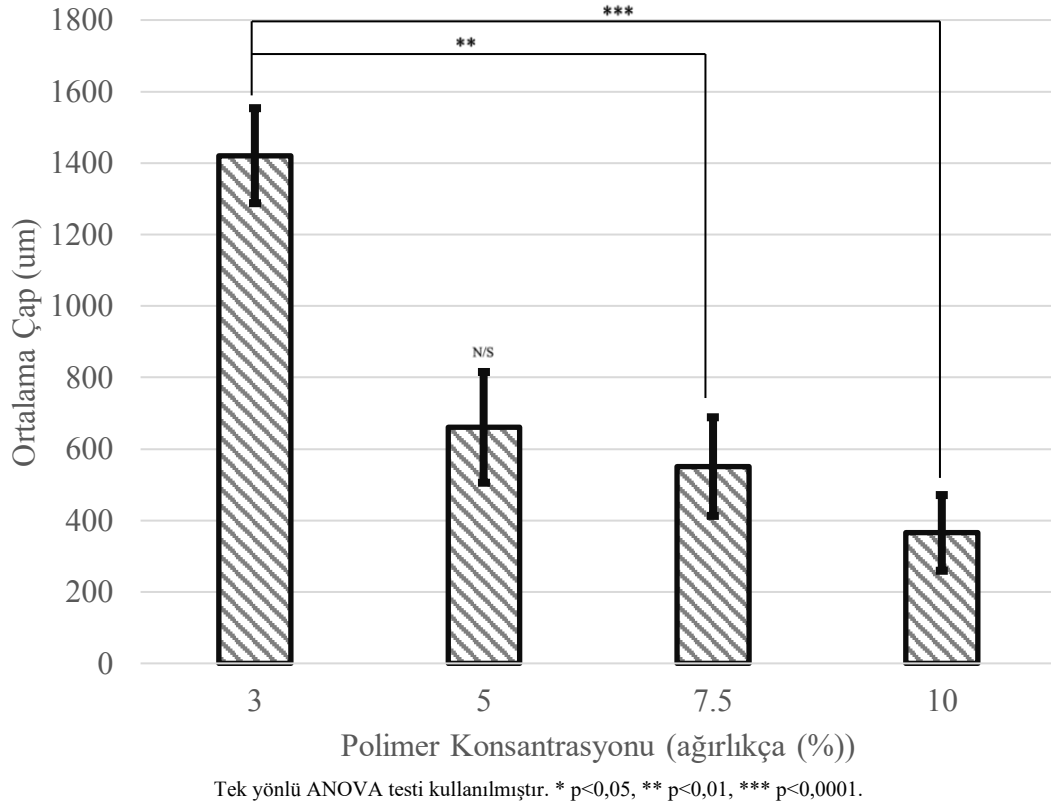
Farklı nişasta konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin, o nişasta konsantrasyonuna karşılık gelen ortalama çapları ve boyut aralığı hakkında genel bir yorumlama yapılabilmesi için standart sapmaları Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Bu sonuca ulaşabilmek için parçacıklar optik mikroskop ile görüntülenmiş ve farklı parçacıkların görüntüleri alınarak bu görsellerden ImageJ ile boyut analizi yapılmıştır.

Her parametreden alındığı gibi ağırlıkça %7,5 nişasta kullanılarak sentezlenmiş olan mikrokürelerden de 150 adet farklı parçacığın optik mikroskop ile görüntüsü alınmış ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



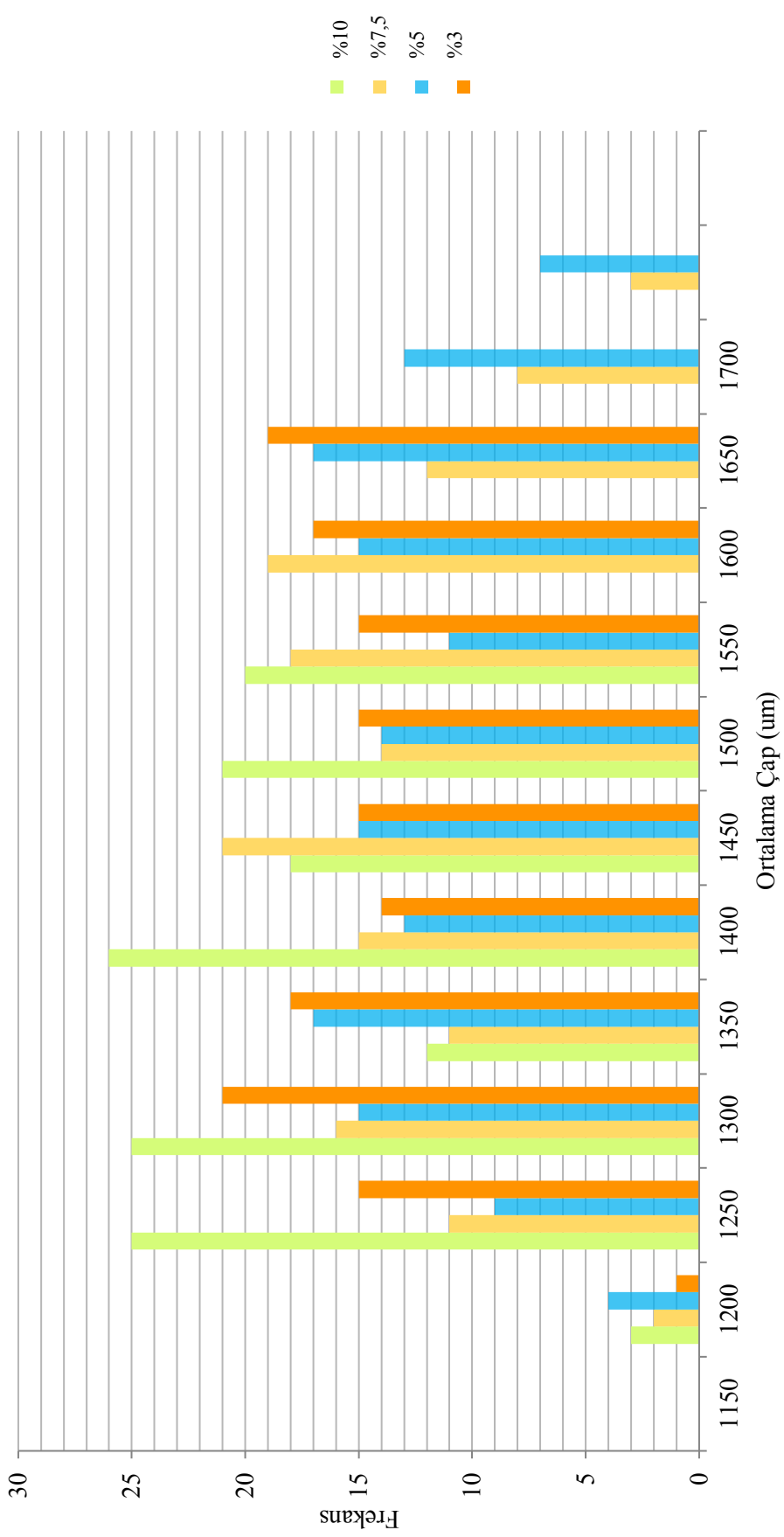
Şekil 3.1: Ağırlıkça %7,5 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme)

Her örnekten en az 150 farklı parçacık görüntüsü alınmış ve bu çapların ortalaması ile standart sapması Excel üzerinden hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2: Farklı polimer konsantrasyonları kullanılarak sentezlenen parçacıkların ortalama çapları

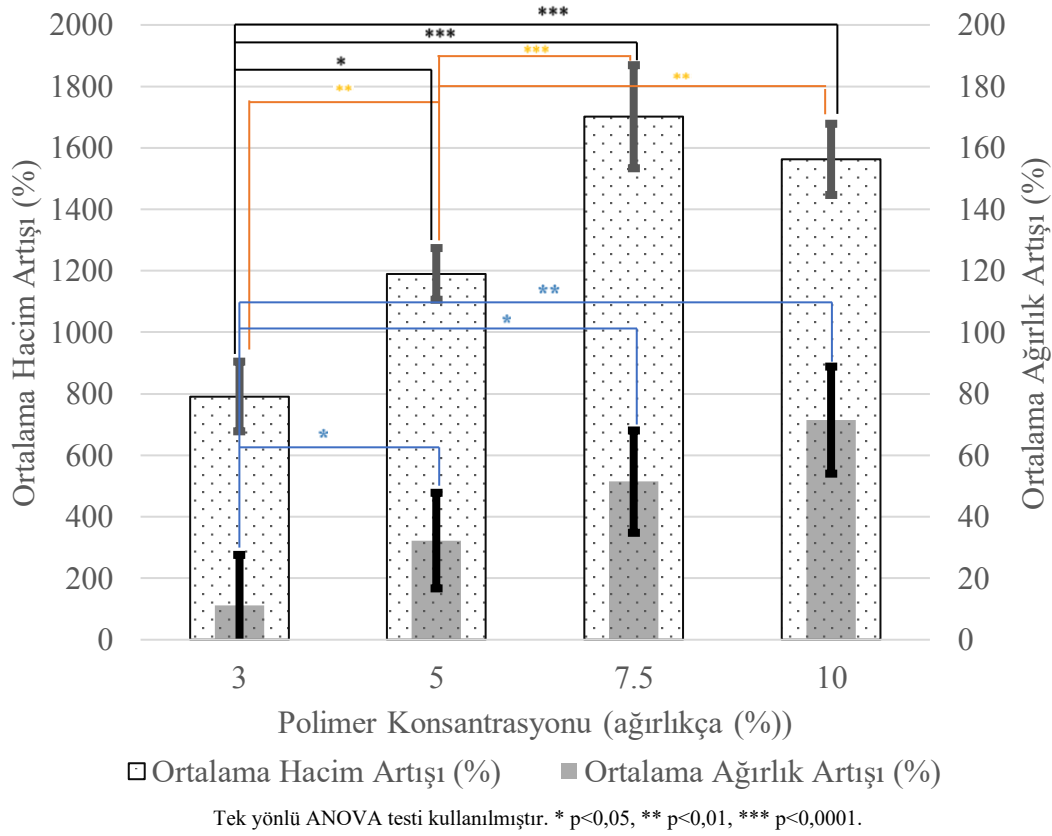
Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritalaması gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.3'te grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası

3.1.2 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

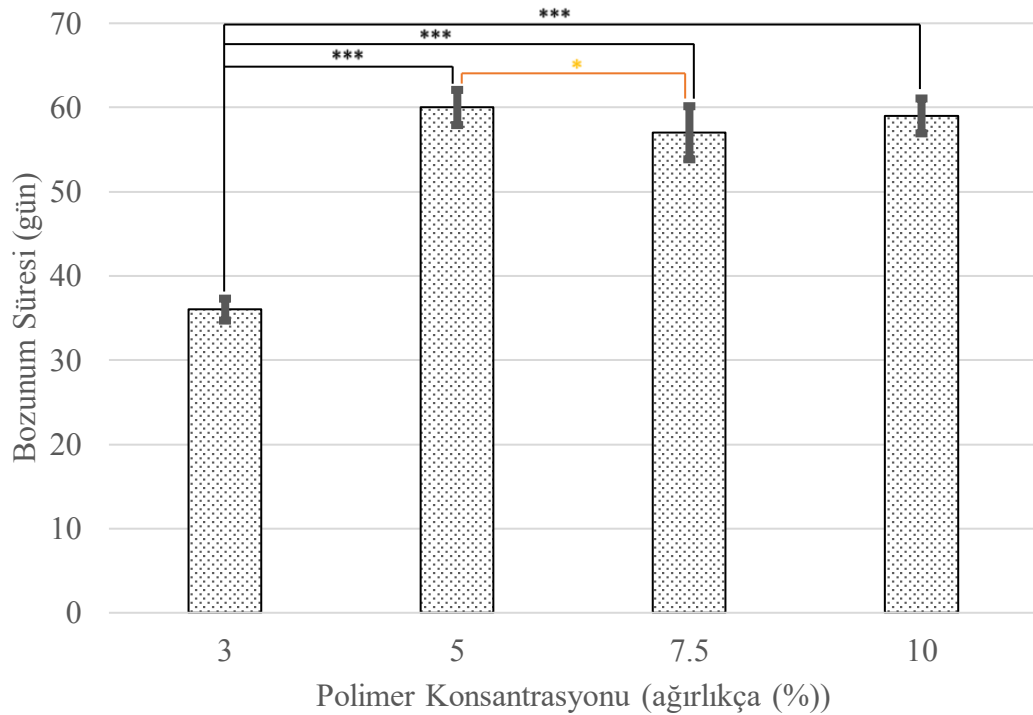
Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin şişme deneyleri gerçekleştirilerek ortalama hacim ve ağırlık artışları analiz edilmiştir. Deney 5 kere tekrarlanmış ve analiz 150 parçacık üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri

3.1.3 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin bozunum deneyleri gerçekleştirilerek parçacıkların tamamen bozundukları günler analiz edilmiştir. Deney, her örnek için 5 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5'te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



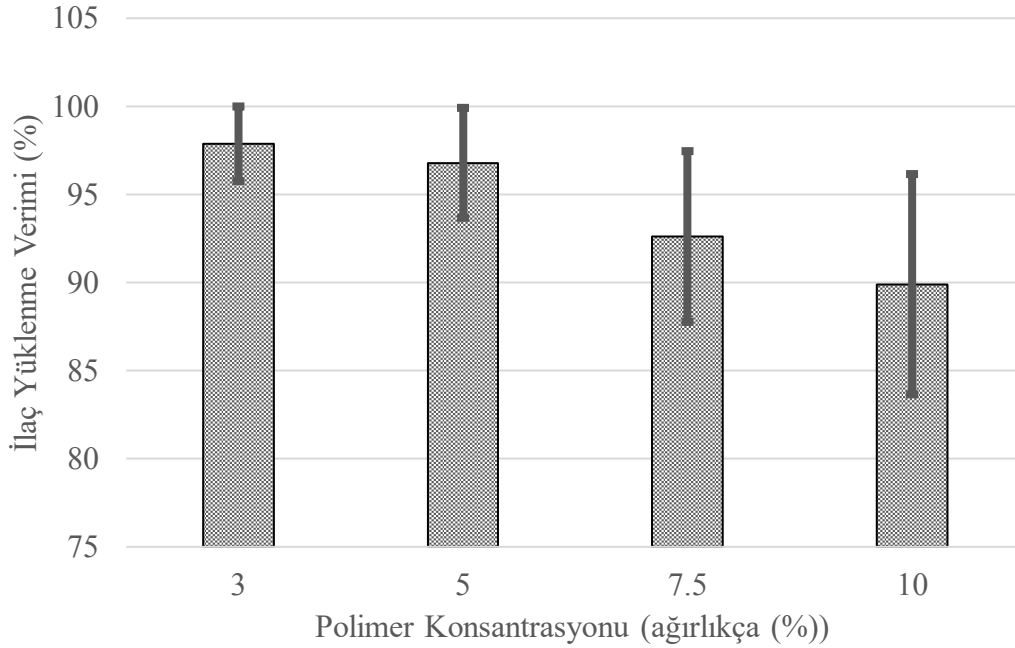
Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.5: Farklı nişasta konsantrasyonları ile sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri

3.1.4 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan parçacıklar bir kanser ilacı olan doksorubisin ile yüklenmiş ve parçacıklar tamamen salım işlemini gerçekleştirdikten sonra UV-Vis spektroskopi ile yüklenme verimi analiz edilmiştir. Deney her bir örnek için 5 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda yüklenebildikleri ilaç yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.6'da gösterilmiştir. İstatistiksel

olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

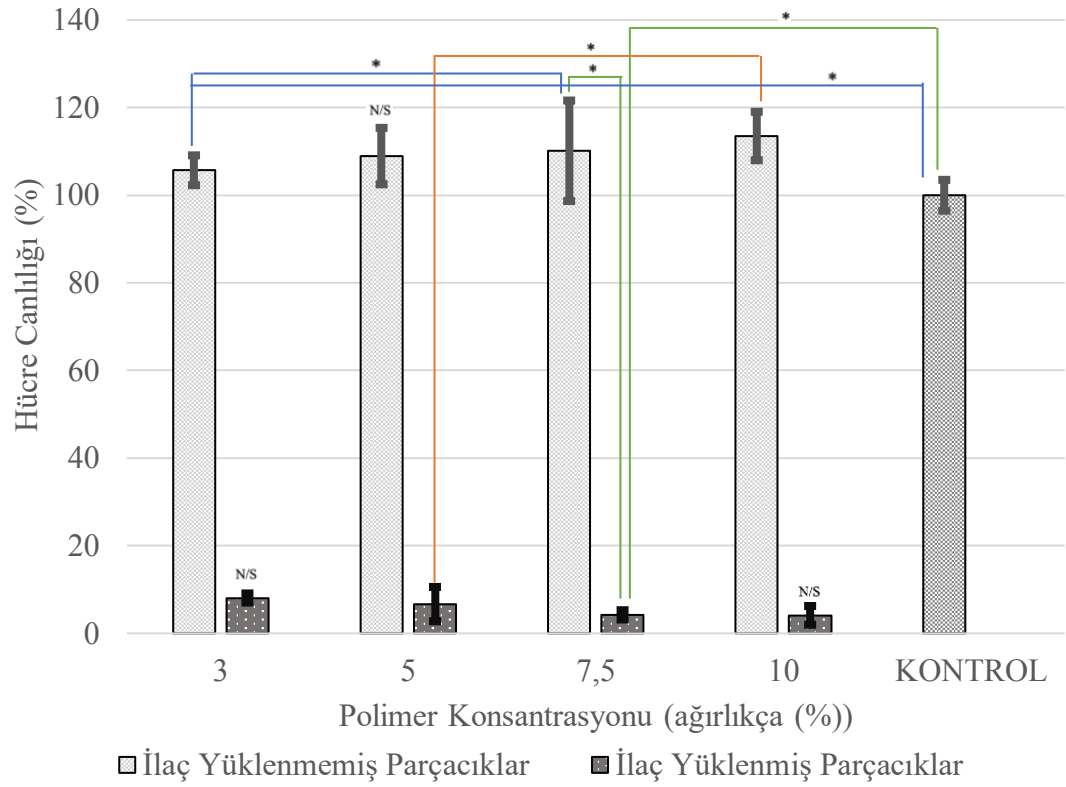


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.6: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi

3.1.5 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi

Canlılık analizi, farklı nişasta konsantrasyonlarında sentezlenen parçacıklar kullanılarak sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. Özellikle, tüm numunelerdeki değerlendirmede hem doksorubisin yüklü hem de ilaçsız parçacıklar kullanılmıştır. Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde korelasyonun anlamlı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için Excel üzerinden t-test gerçekleştirilmiştir. L-929 hücre hattında yapılan inceleme sonrasında canlılık analizi sonuçları Şekil 3.7’de sunulmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,0001.

Şekil 3.7: Farklı polimer konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları

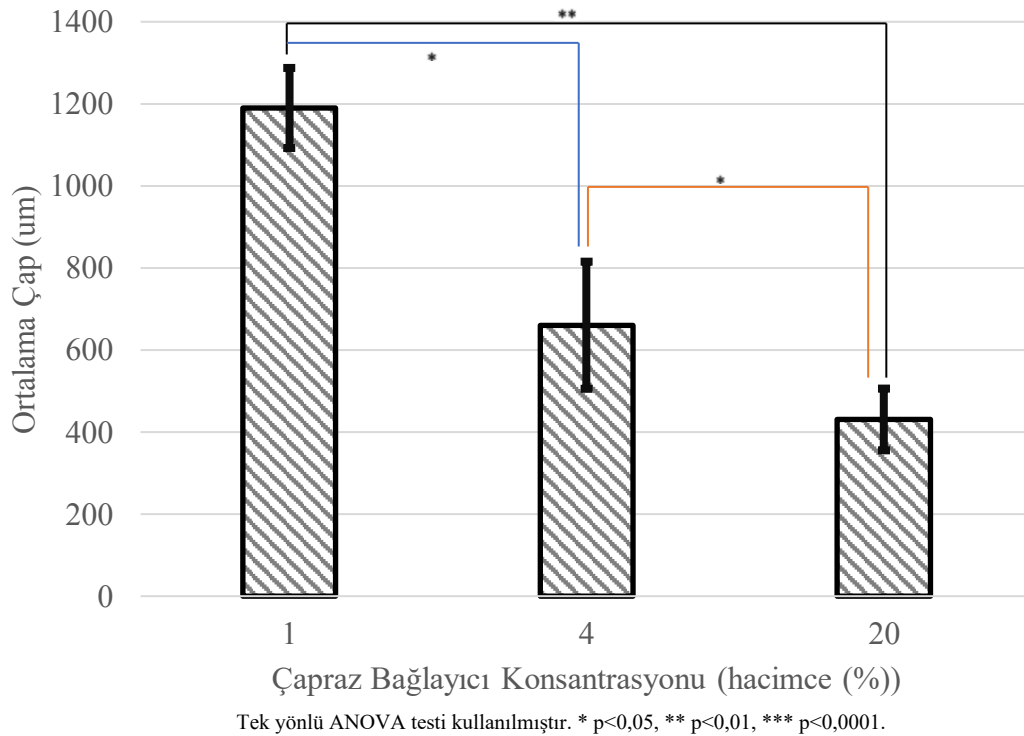
3.1.6 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Yüzey Yükünün Belirlenmesi

Bu aşamada ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan ve standart örnek olarak belirlenmiş olan mikrokürenin zeta potansiyeli analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ölçüm doğrultusunda yüzey yükü ortalama -17.41±0,48 mV olarak elde edilmiştir.

3.2 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu

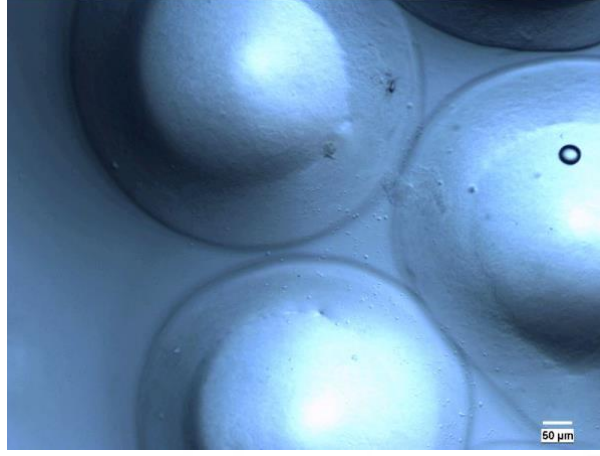
3.2.1 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin, o çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna karşılık gelen ortalama çapları ve boyut aralığı hakkında genel bir yorumlama yapılabilmesi için standart sapmaları Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Bu sonuca ulaşabilmek için parçacıklar optik mikroskop ile görüntülenmiş ve farklı parçacıkların görüntüleri alınarak bu görsellerden ImageJ ile boyut analizi yapılmıştır. Her örnekten en az 150 farklı parçacık görüntüsü alınmış ve bu çapların ortalaması ile standart sapması Excel üzerinden hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



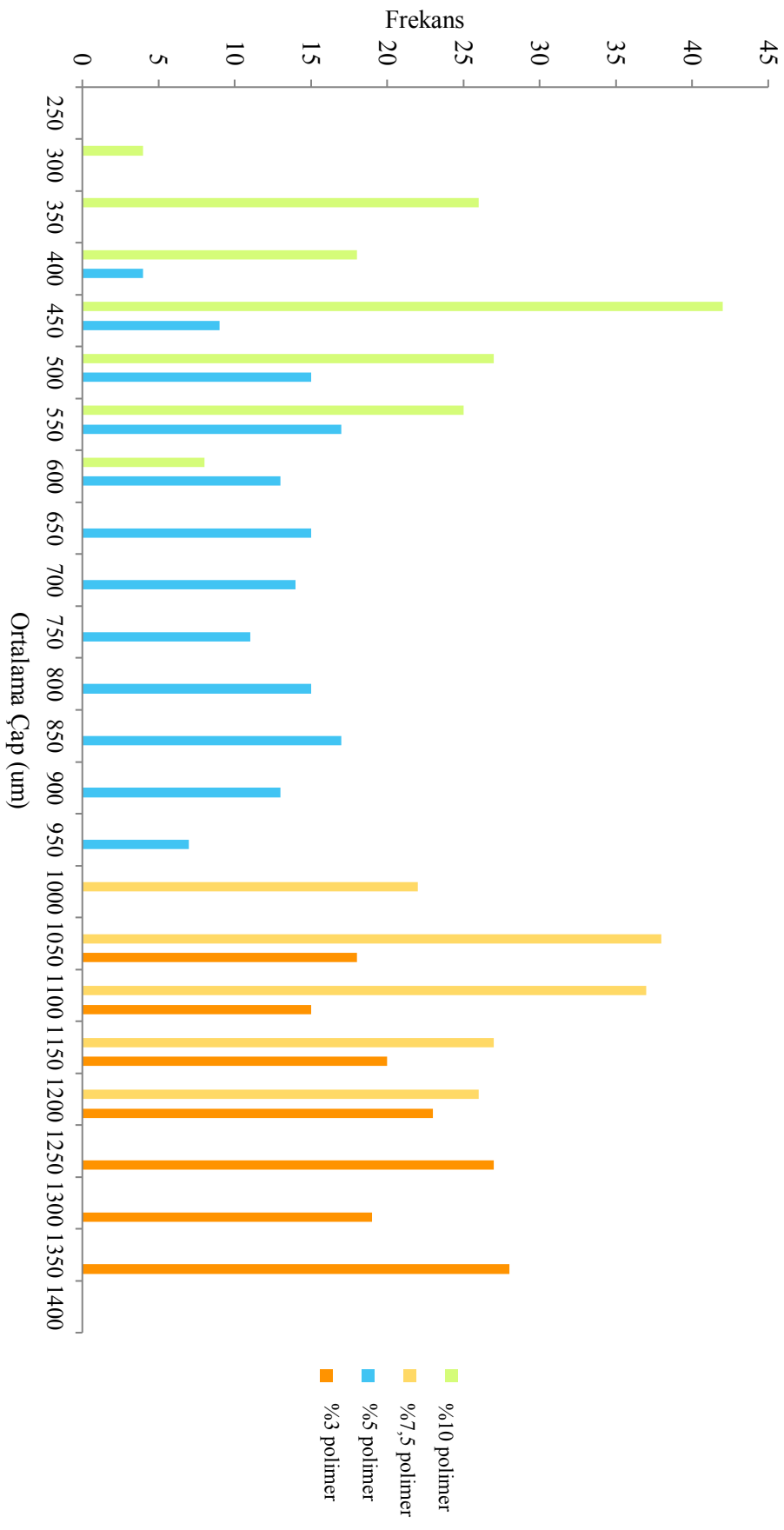
Şekil 3.8: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonları kullanılarak sentezlenen parçacıkların ortalama çapları

Hacimce %4 apraz bağlayıcı konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan parçacıkların optik mikroskop görüntüsü ise şekil 3.9’da gösterilmiştir.



şekil 3.9: Hacimce %4 apraz bağlayıcı konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (50X büyütme)

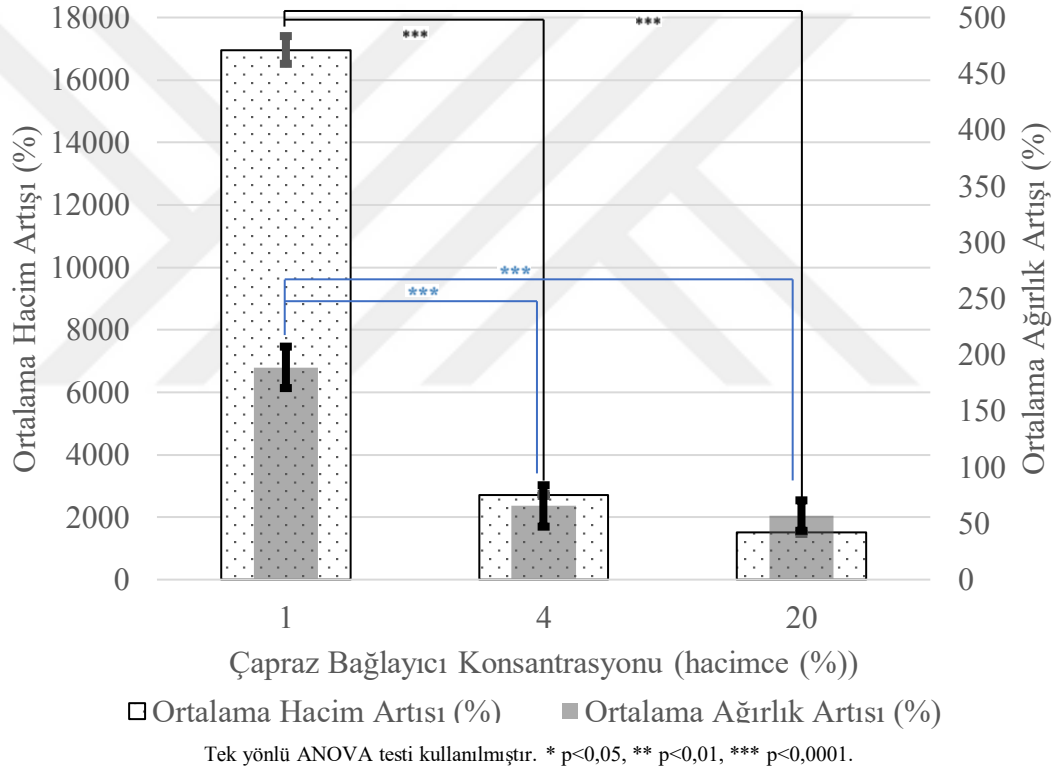
Farklı apraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritalaması gerçekleştirilmiş ve şekil 3.10’da grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.10: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası.

3.2.2 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin şişme deneyleri gerçekleştirilerek ortalama hacim ve ağırlık artışları analiz edilmiştir. Deney 5 kere tekrarlanmış ve analiz 150 parçacık üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.11’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

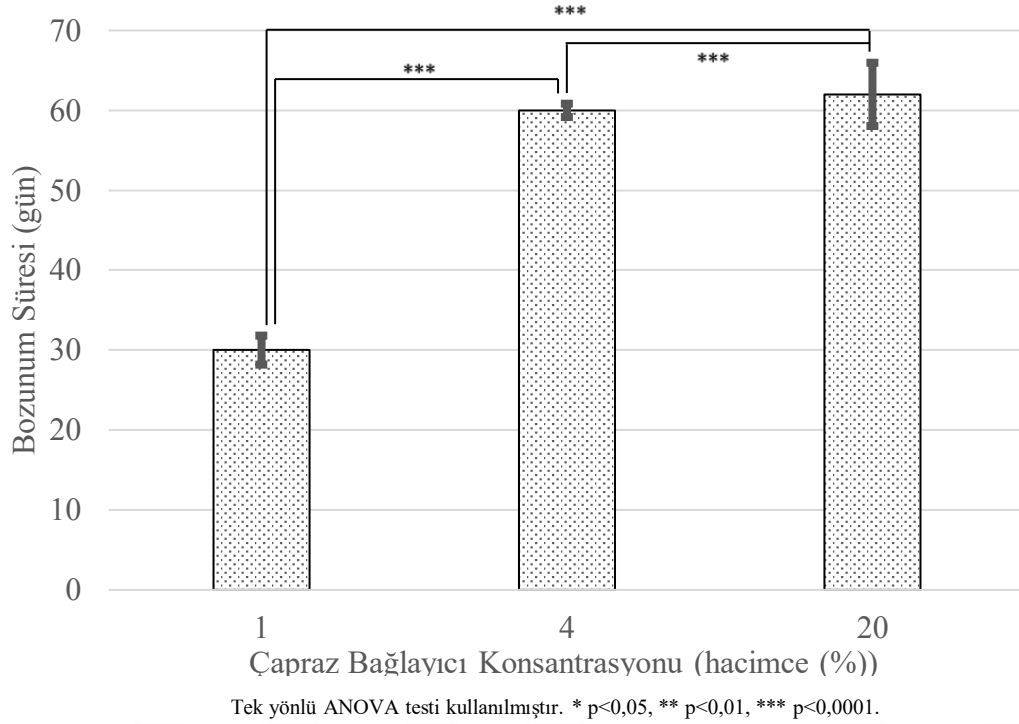


Şekil 3.11: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri

3.2.3 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin bozunum deneyleri gerçekleştirilerek parçacıkların tamamen bozundukları günler

analiz edilmiştir. Deney, her örnek için 5 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

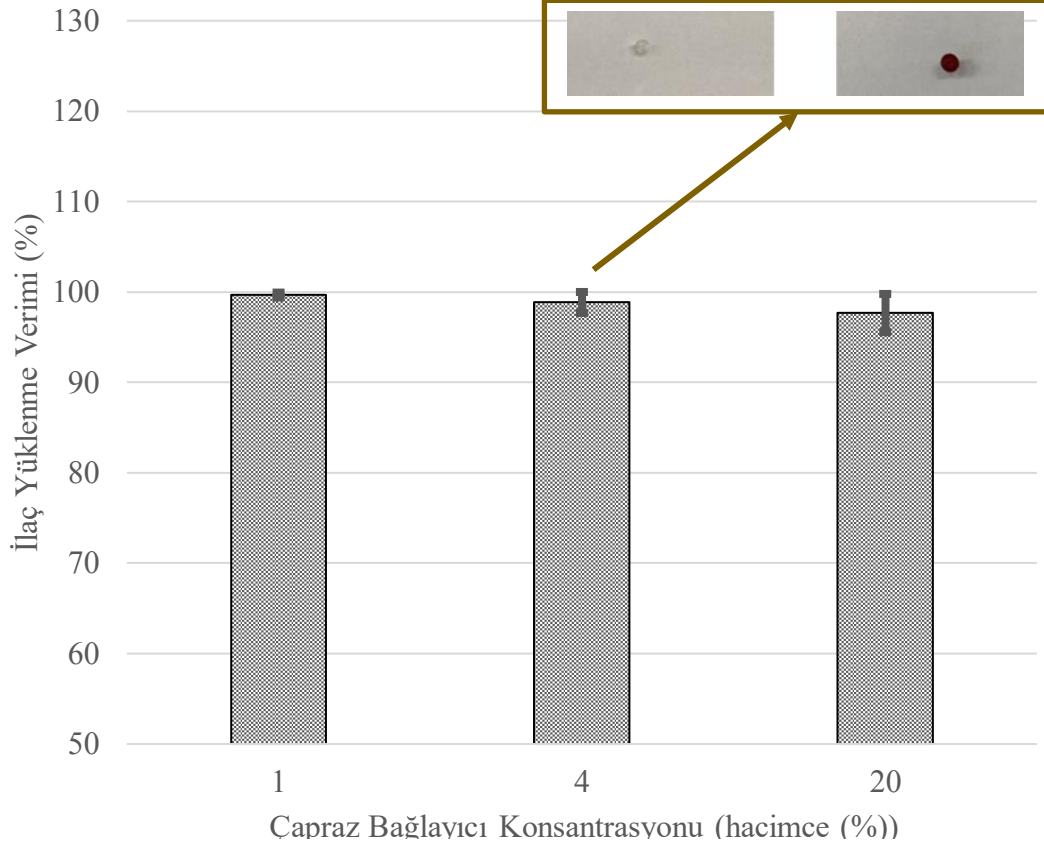


Şekil 3.12: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ile sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri

3.2.4 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yükleme Veriminin İncelenmesi

Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş olan parçacıklar bir kanser ilacı olan doksorubisin ile yüklenmiş ve parçacıklar tamamen salım işlemini gerçekleştirdikten sonra UV-Vis spektroskopi ile yükleme verimi analiz edilmiştir. Deney her bir örnek için 5 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda yüklenebildikleri ilaç yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.13’te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri

gerçekleştirilmiştir.

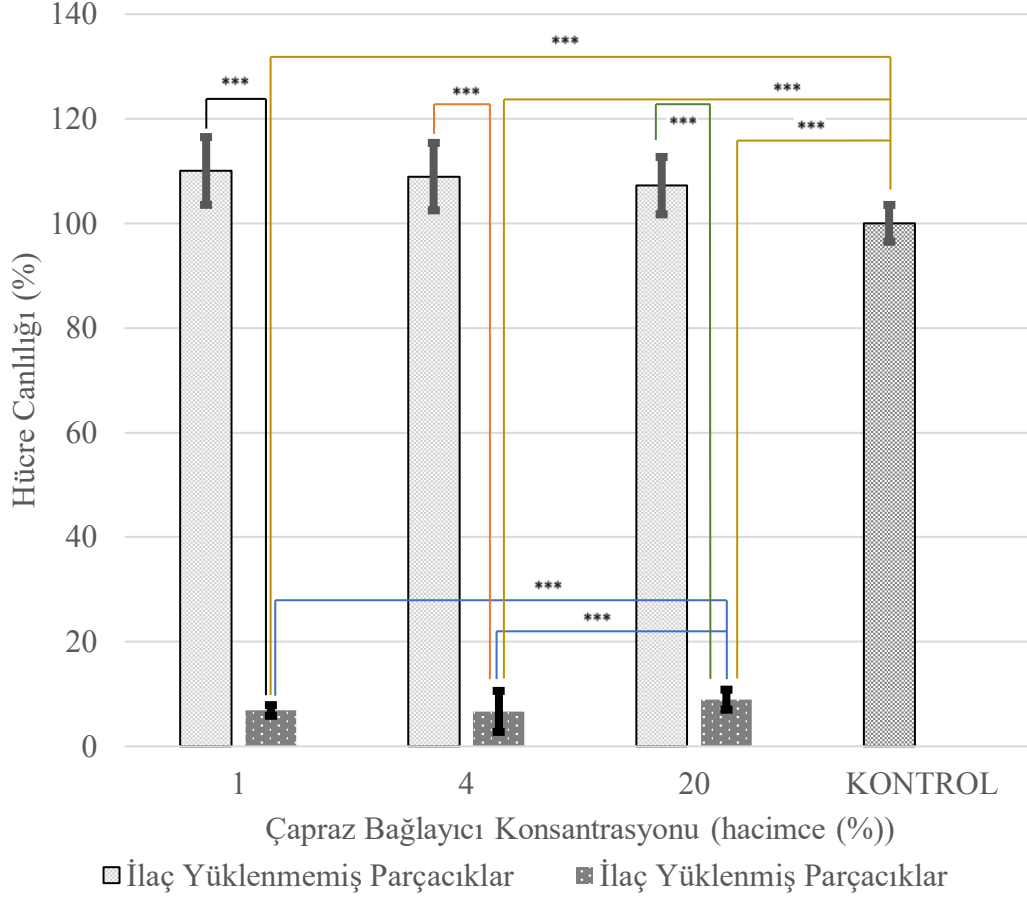


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$.

Şekil 3.13: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş parçacıklara yüklenebilen ilaç miktarı

3.2.5 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi

Canlılık analizi, farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenen parçacıklar üzerinde sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde korelasyonun anlamlı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için Excel üzerinden t-test gerçekleştirilmiştir. L-929 hücre hattında yapılan inceleme sonrasında canlılık analizi sonuçları Şekil 3.14’te sunulmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



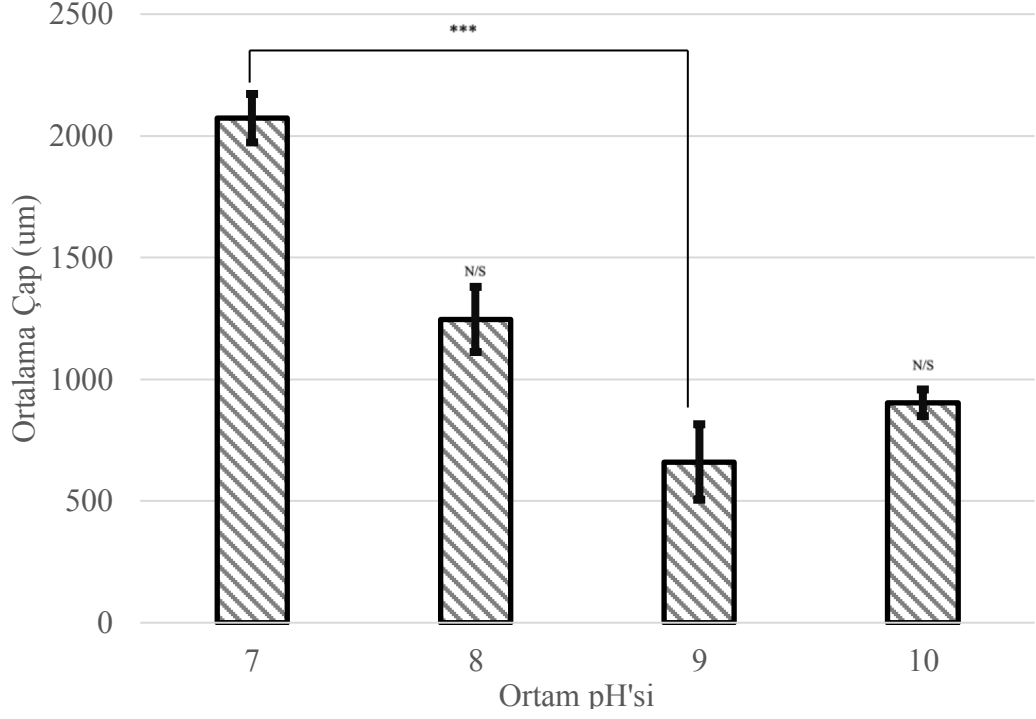
Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.14: Farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları

3.3 Ortam pH'si

3.3.1 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

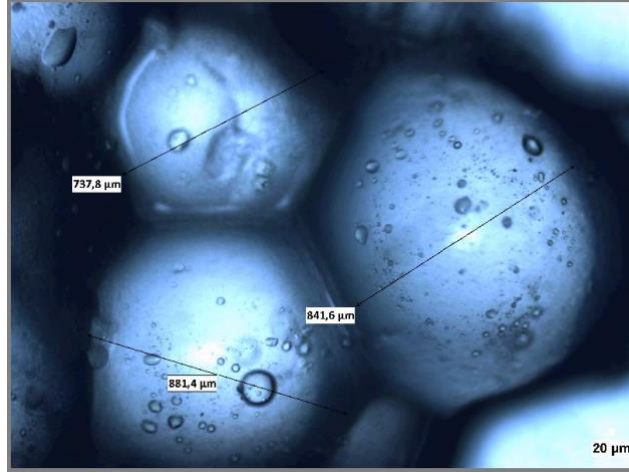
Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin, o pH değerine karşılık gelen ortalama çapları ve boyut aralığı hakkında genel bir yorumlama yapılabilmesi için standart sapmaları Şekil 3.15'te gösterilmiştir. Bu sonuca ulaşabilmek için parçacıklar optik mikroskop ile görüntülenmiş ve farklı parçacıkların görüntüleri alınarak bu görsellerden ImageJ ile boyut analizi yapılmıştır. Her örnekten en az 150 farklı parçacık görüntüsü alınmış ve bu çapların ortalaması ile standart sapması Excel üzerinden hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

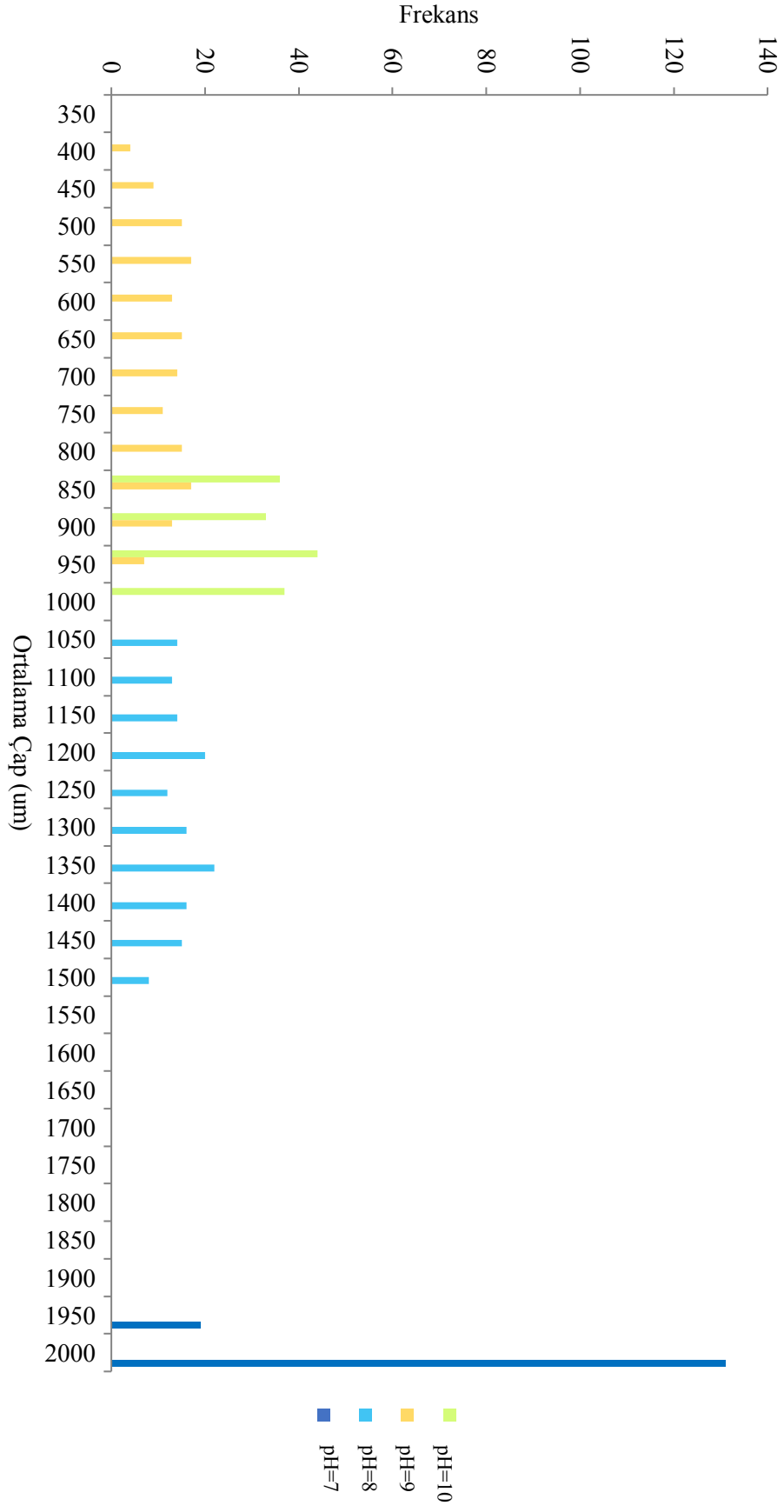
Şekil 3.15: Farklı ortam pH'ları kullanılarak sentezlenen parçacıkların ortalama çapları

Ek olarak optik mikroskop ile alınmış görüntüleri ise Şekil 3.16'da gösterilmiştir.



Şekil 3.16: Ortam pH'si 9'a sabitlenerek sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme)

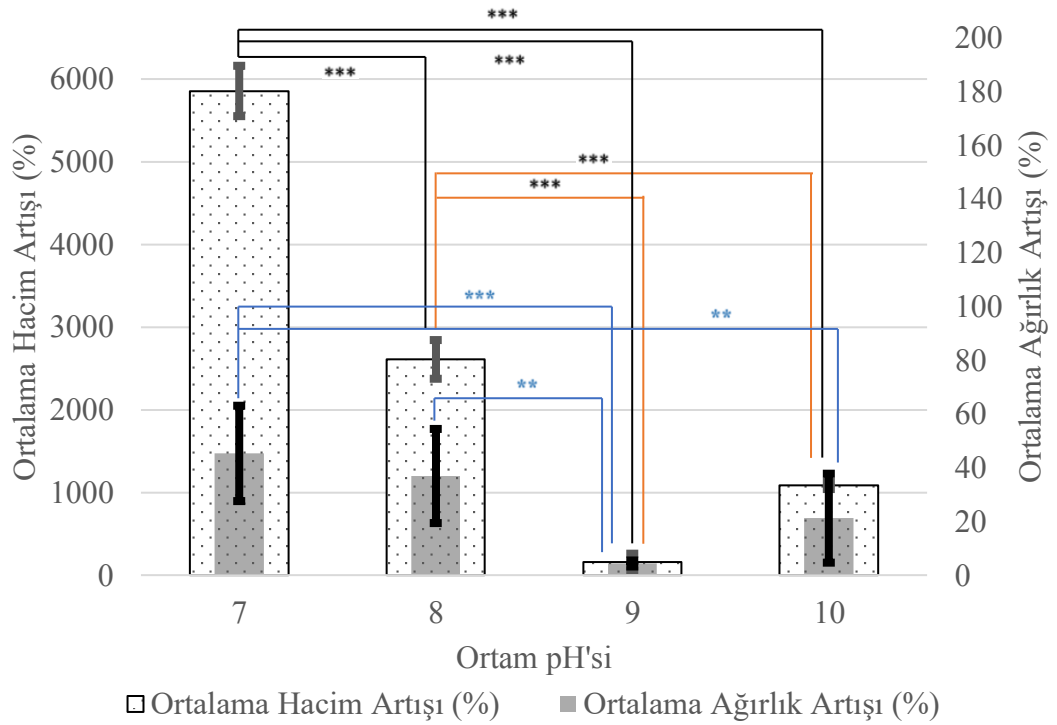
Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritalaması gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.17'de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.17: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası

3.3.2 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı ortam pH'lerinde ile sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin şişme deneyleri gerçekleştirilerek ortalama hacim ve ağırlık artışları analiz edilmiştir. Deney 5 kere tekrarlanmış ve analiz 150 parçacık üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.18'de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

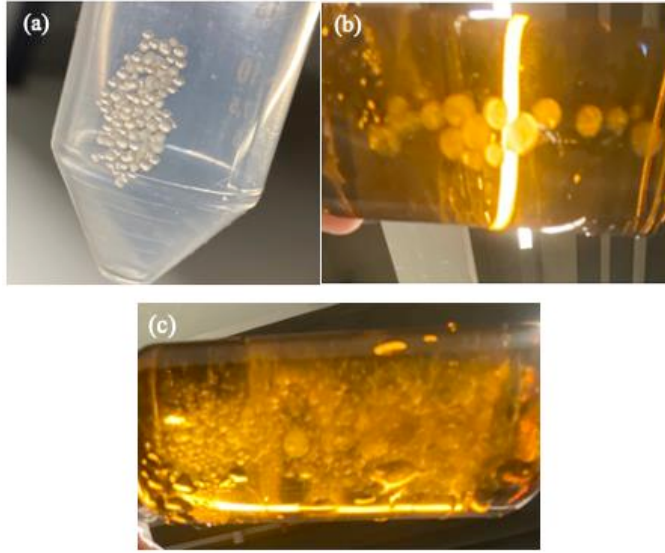


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.18: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri

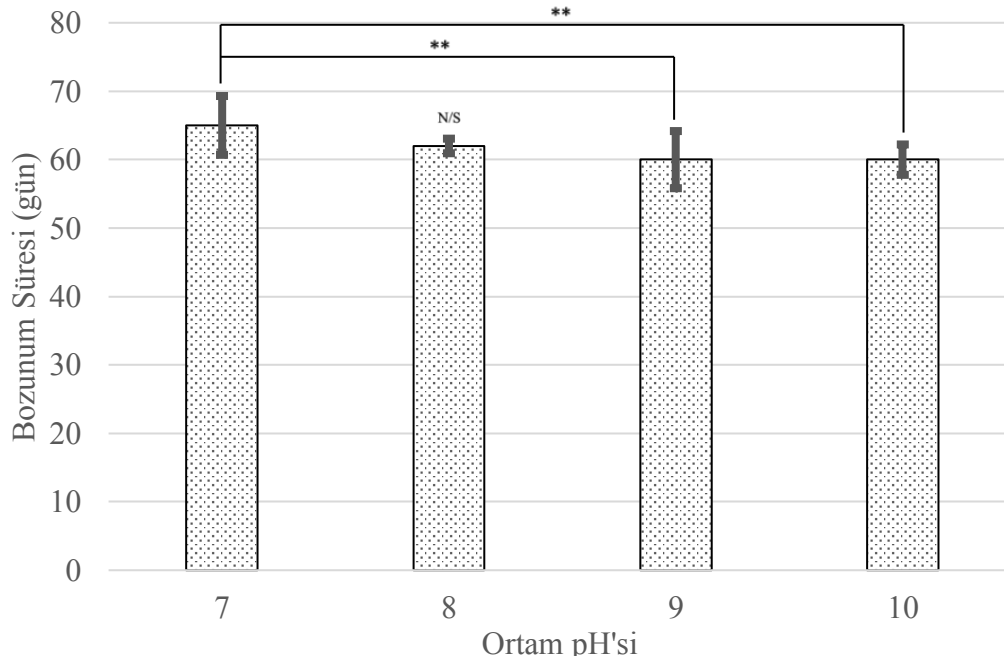
3.3.3 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin bozunum deneyleri gerçekleştirilerek parçacıkların tamamen bozundukları günler analiz edilmiştir. Ortam pH'si 7'ye ayarlanarak sentezlenmiş olan mikrokürelerin bozunum deneyi sürecindeki görselleri deney sürecine örnek olarak Şekil 3.19'da verilmiştir.



Şekil 3.19: Ortam pH'si 7 ayarlanarak sentezlenmiş olan mikrokürelerin bozunum deneyi sürecindeki fotoğrafları. (a) bozunum deneyinden önce, (b) bozunum deneyine başlandıktan 3 gün sonra, (c) bozunum deneyine başlandıktan 20 gün sonra.

Deney, her örnek için 5 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.20'de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

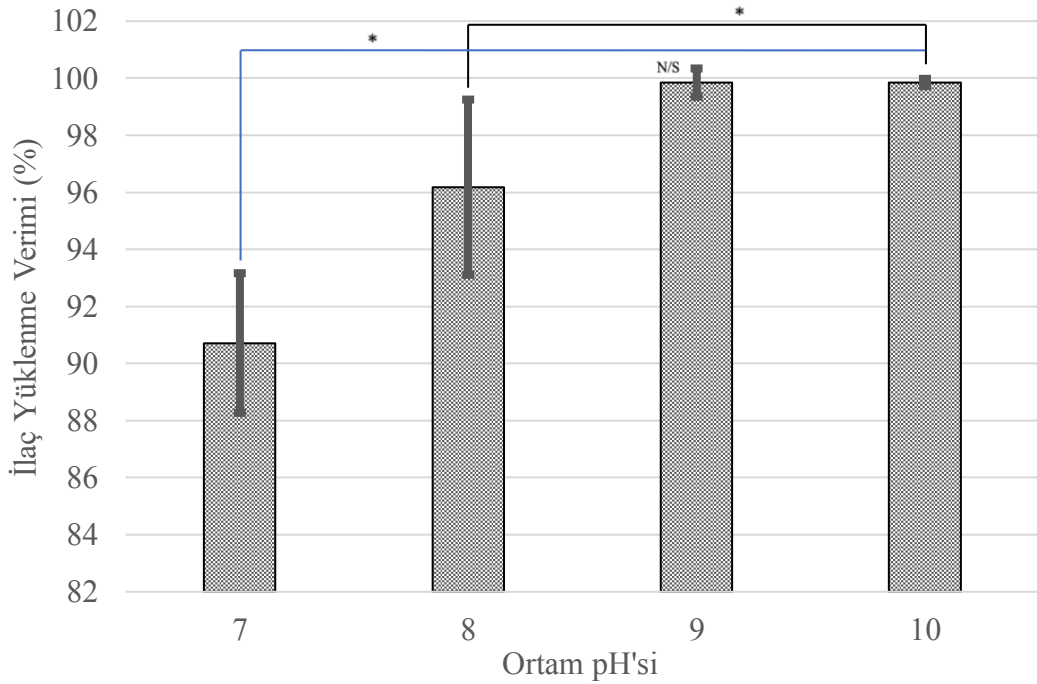


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.20: Farklı ortam pH'lerinde sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri

3.3.4 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş olan parçacıklar bir kanser ilacı olan doksorubisin ile yüklenmiş ve parçacıklar tamamen salım işlemini gerçekleştirdikten sonra UV-Vis spektroskopi ile yükleme verimi analiz edilmiştir. Deney her bir örnek için 5 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda yüklenebildikleri ilaç yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.21'de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



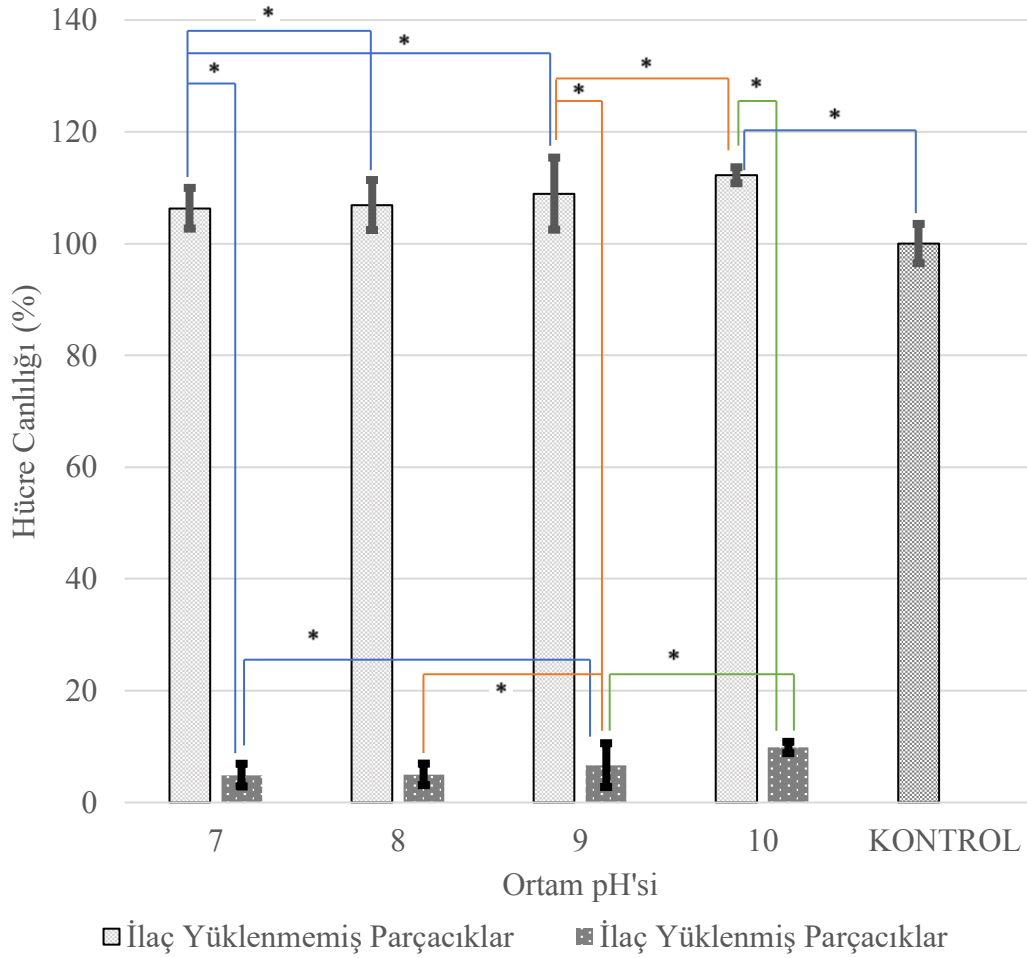
Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.21: Farklı pH'larda sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi

3.3.5 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi

Canlılık analizi, farklı ortam pH'lerinde sentezlenen parçacıklar kullanılarak sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde korelasyonun anlamlı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için Excel

üzerinden t-test gerçekleştirilmiştir. L-929 hücre hattında yapılan inceleme sonrasında canlılık analizi sonuçları Şekil 3.22’de sunulmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,0001.

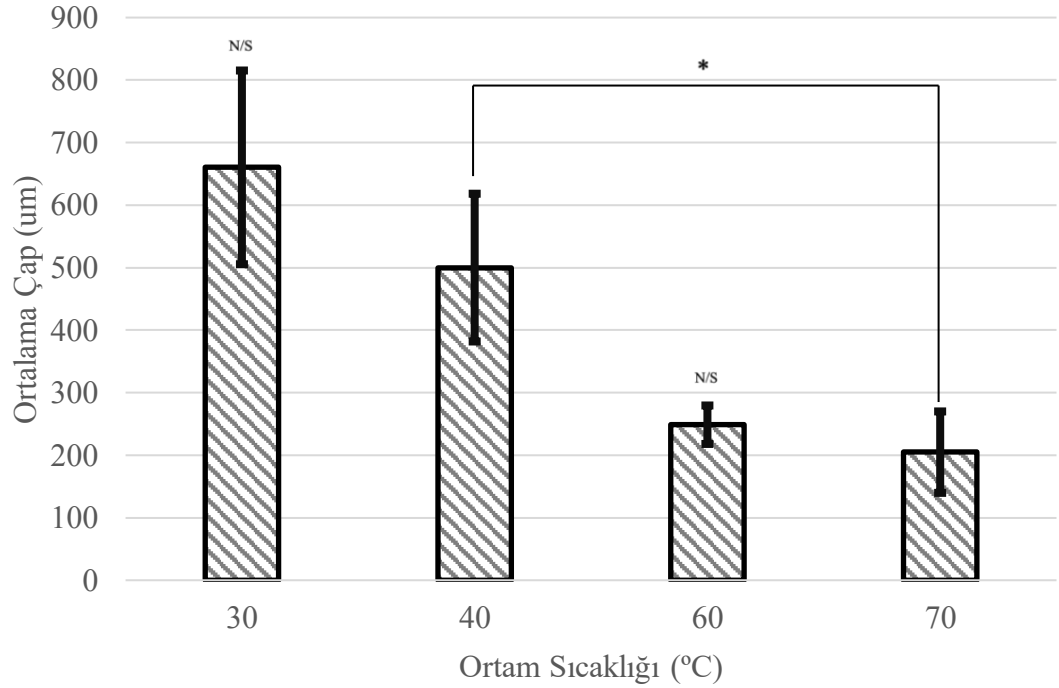
Şekil 3.22: Farklı ortam pH’lerinde sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları

3.4 Ortam Sıcaklığı

3.4.1 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin, o ortam sıcaklığına karşılık gelen ortalama çapları ve boyut aralığı hakkında genel bir yorumlama yapılabilmesi için standart sapmaları Şekil 3.23’te gösterilmiştir. Bu sonuca ulaşabilmek için parçacıklar optik mikroskop ile görüntülenmiş ve farklı

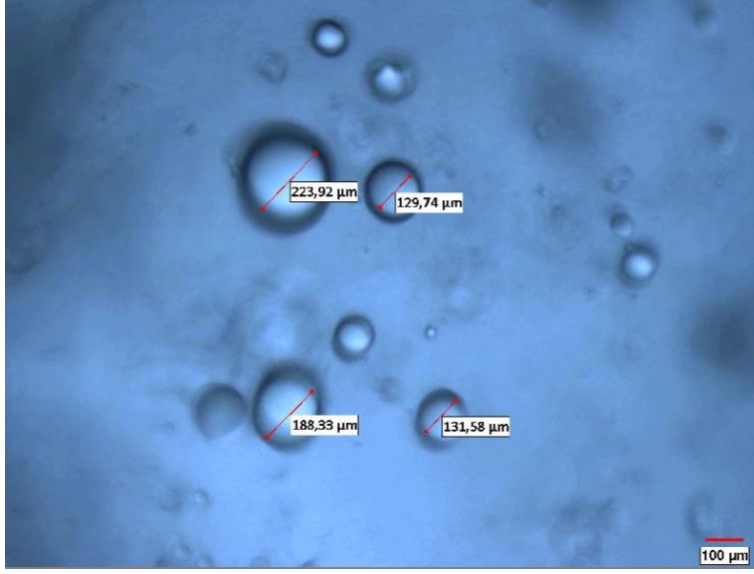
parçacıkların görüntüleri alınarak bu görsellerden ImageJ ile boyut analizi yapılmıştır. Her örnekten en az 50 farklı parçacık görüntüsü alınmış ve bu çapların ortalaması ile standart sapması Excel üzerinden hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

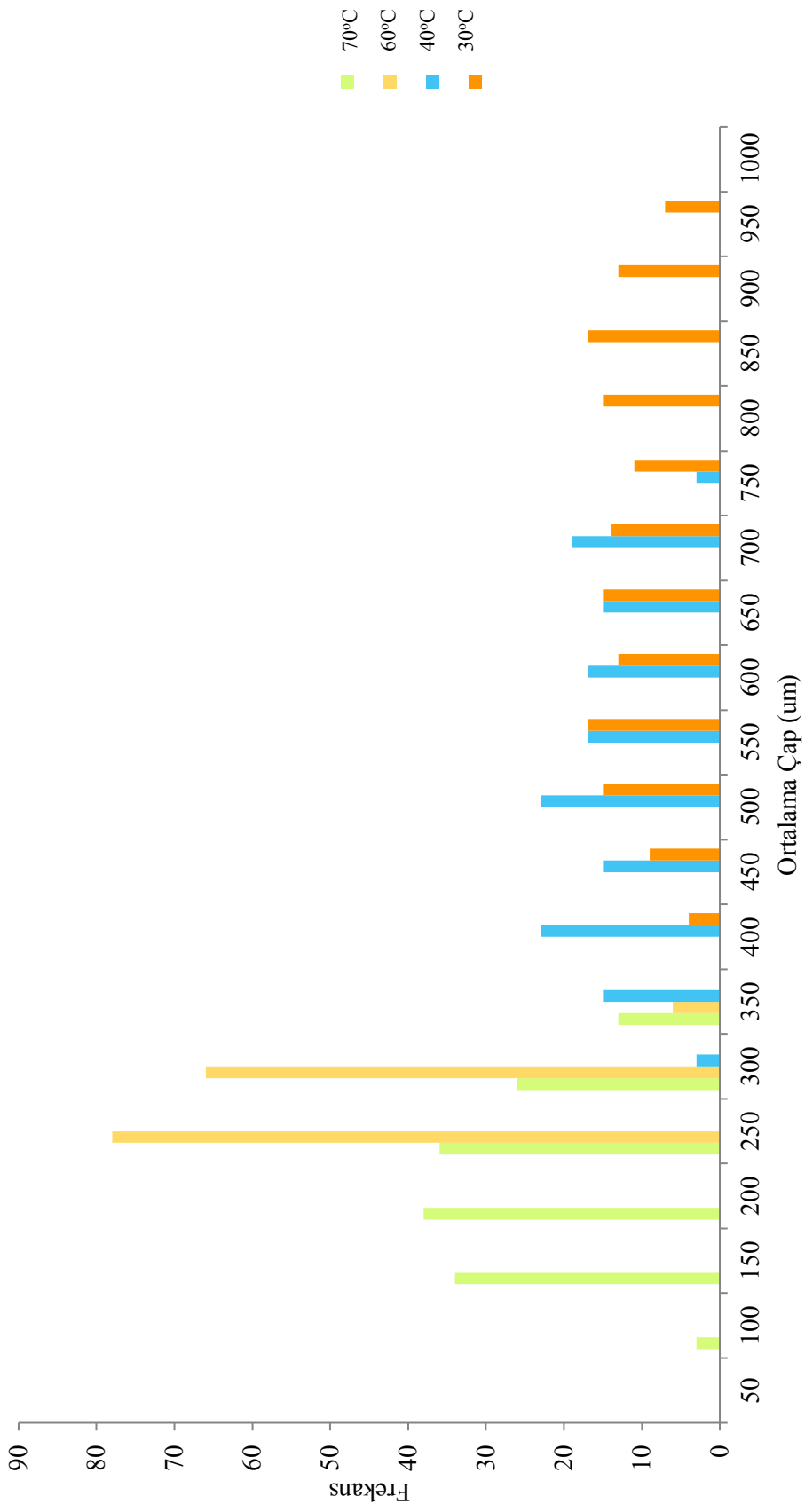
Şekil 3.23: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen parçacıkların ortalama çapları

Ortam sıcaklığı 30°C'ye sabitlenerek sentezlenmiş olan mikrokürelerden 150 adet farklı parçacığın optik mikroskop ile görüntüsü alınmış ve Şekil 3.24'te gösterilmiştir. Bu parçacıkların ImageJ aracılığıyla çapları analiz edilerek Excel üzerinden boyut dağılım haritalaması yapılmıştır.



Şekil 3.24: 40°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (200X büyütme)

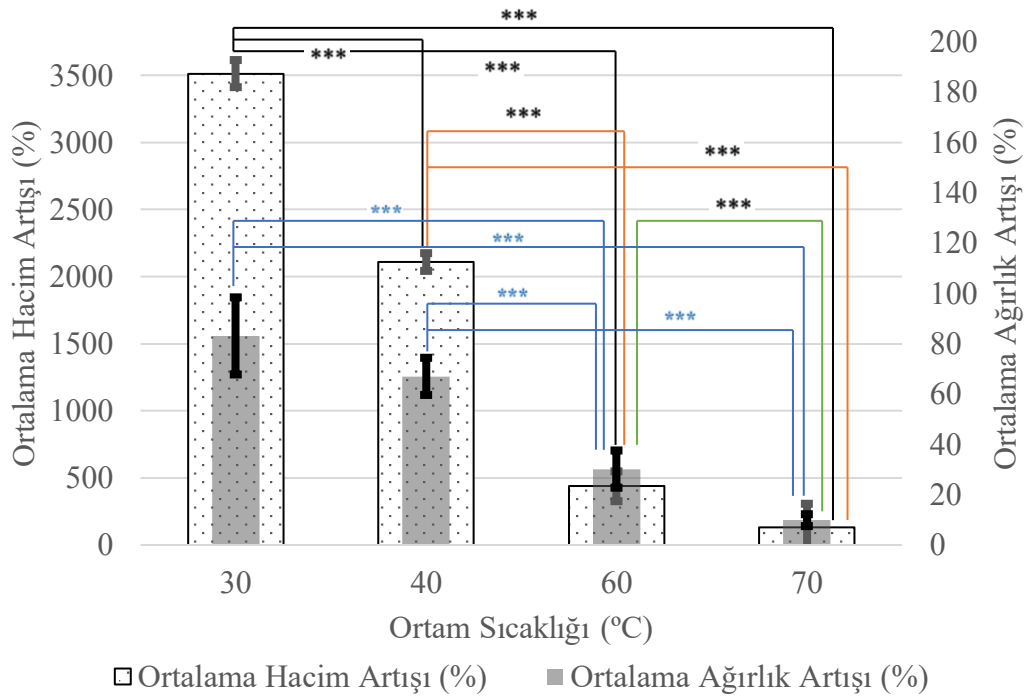
Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritalaması gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.25'te grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.25: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası

3.4.2 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin şişme deneyleri gerçekleştirilerek ortalama hacim ve ağırlık artışları analiz edilmiştir. Deney 5 kere tekrarlanmış ve analiz 150 parçacık üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.26’da gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



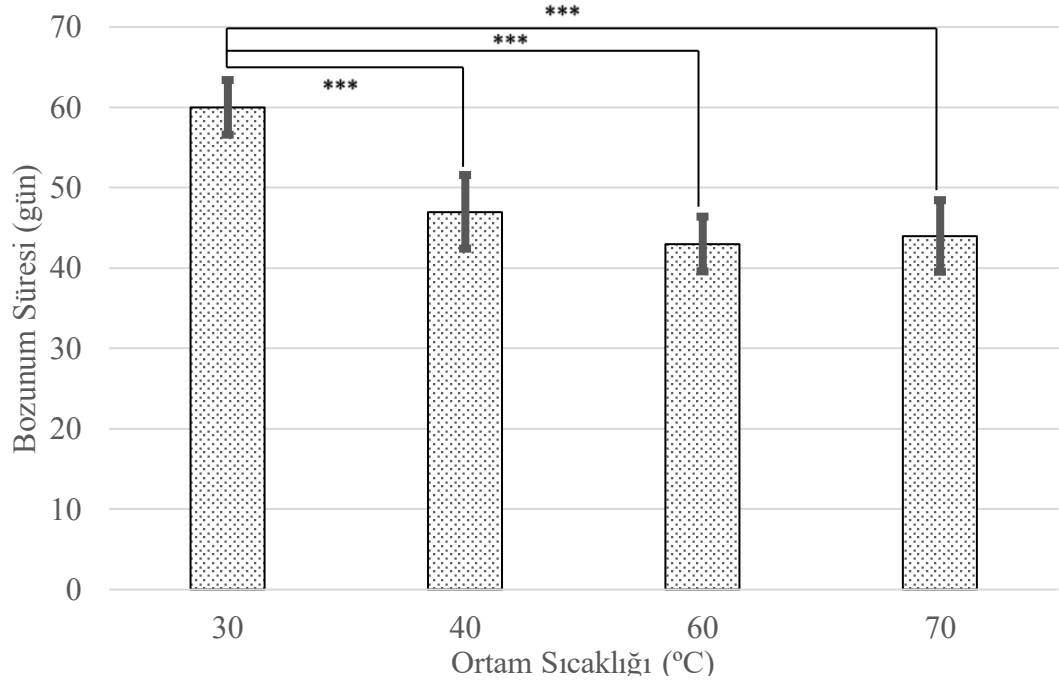
Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.26: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri

3.4.3 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin bozunum deneyleri gerçekleştirilerek parçacıkların tamamen bozundukları günler analiz edilmiştir. Deney, her örnek için 5 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.27’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark

olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

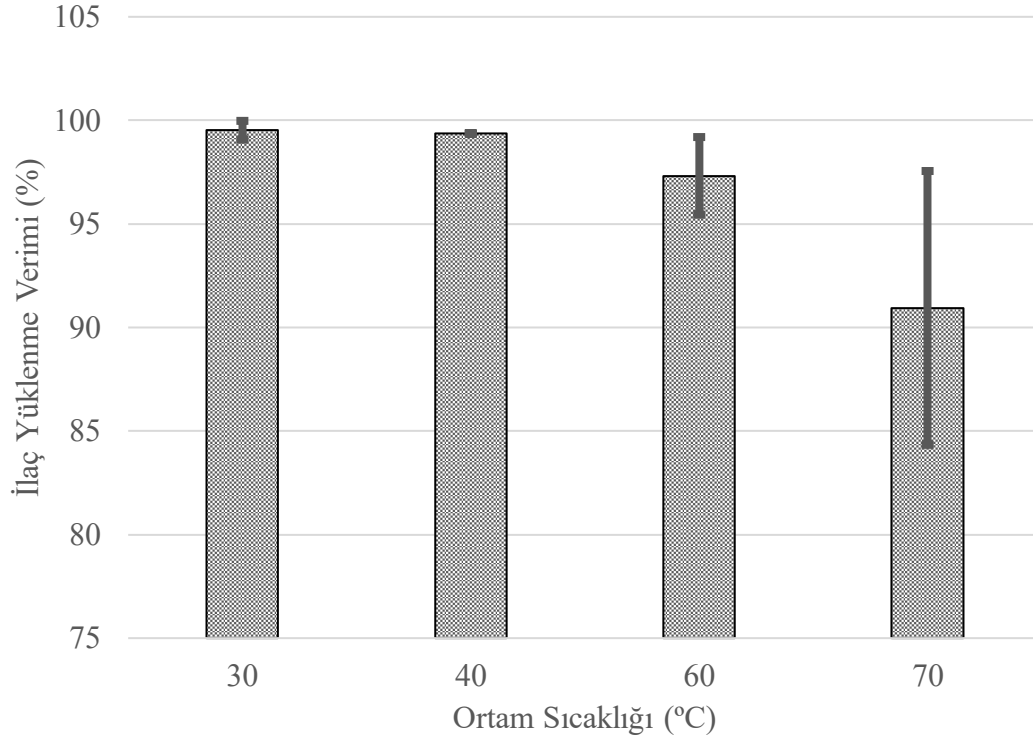


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.27: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri

3.4.4 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş olan parçacıklar bir kanser ilacı olan doksorubisin ile yüklenmiş ve parçacıklar tamamen salım işlemini gerçekleştirdikten sonra UV-Vis spektroskopisi ile yükleme verimi analiz edilmiştir. Deney her bir örnek için 5 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda yüklenebildikleri ilaç yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.28’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

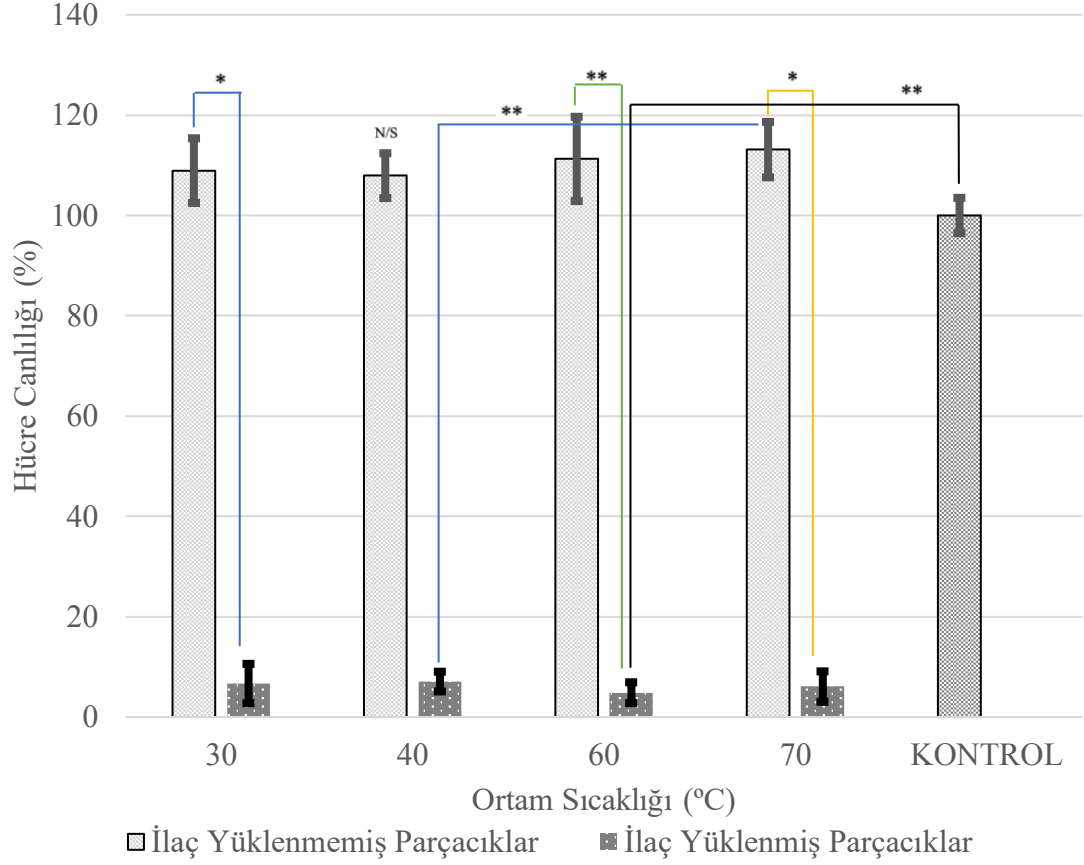


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.28: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi

3.4.5 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi

Canlılık analizi, farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenen parçacıklar üzerinde sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde korelasyonun anlamlı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için Excel üzerinden t-test gerçekleştirilmiştir. L-929 hücre hattında yapılan inceleme sonrasında canlılık analizi sonuçları Şekil 3.29’da sunulmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

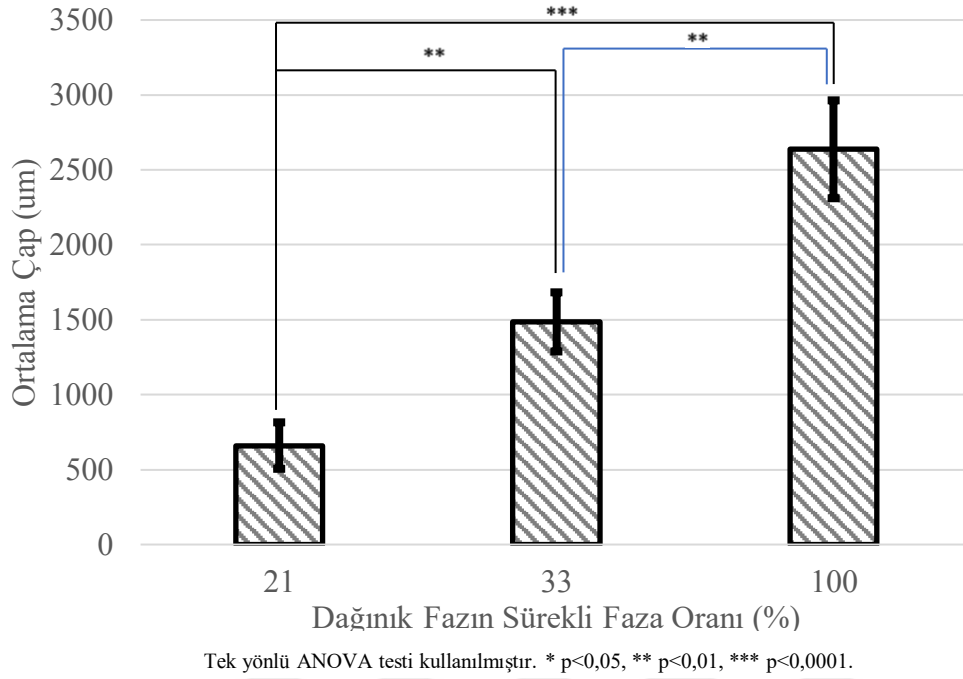
Şekil 3.29: Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları

3.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranı

3.5.1 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

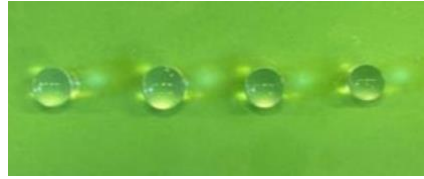
Dağınık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin, o dağınık fazın sürekli faza oranına karşılık gelen ortalama çapları ve boyut aralığı hakkında genel bir yorumlama yapılabilmesi için standart sapmaları Şekil 3.30'da gösterilmiştir. Bu sonuca ulaşabilmek için parçacıklar optik mikroskop ile görüntülenmiş ve farklı parçacıkların görüntüleri alınarak bu görsellerden ImageJ ile boyut analizi yapılmıştır. Her örnekten en az 150 farklı parçacık görüntüsü alınmış ve bu çapların ortalaması ile standart sapması Excel üzerinden hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının

belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



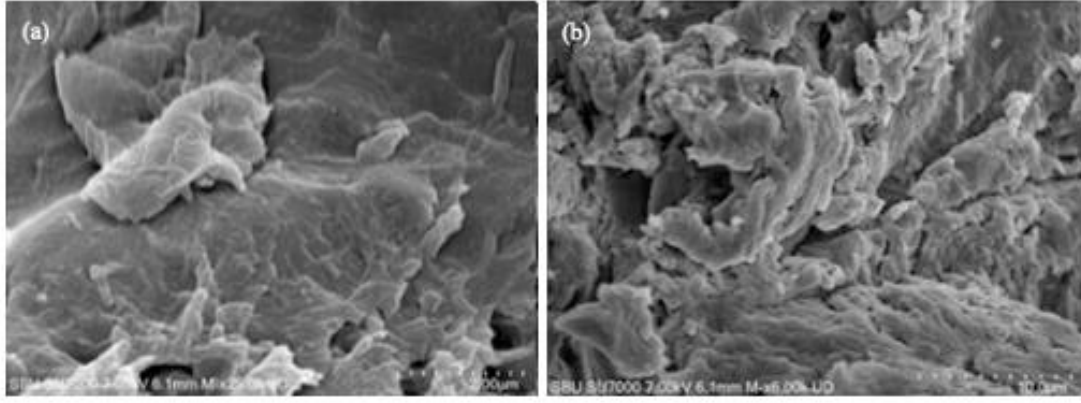
Şekil 3.30: Dağılık fazın sürekli faza oranı değiştirilerek sentezlenen parçacıkların ortalama çapları

Dağılık fazın sürekli faza oranını %33'te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerden 150 adet farklı parçacığın görüntüsü alınmış ve Şekil 3.31'de örnek olarak verilmiştir.

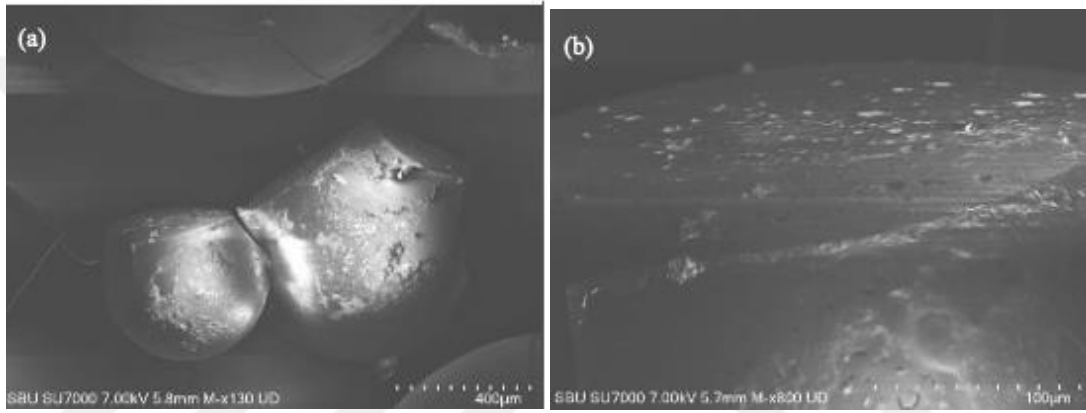


Şekil 3.31: Dağılık fazın sürekli faza oranı %33'te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin görüntüsü

Ek olarak bu parçacıkların yüzey morfolojisinin daha derinlemesine gözlemlenebilmesi için SEM görüntüleri alınmış ve Şekil 3.32 ile Şekil 3.33'te iki farklı parametre için SEM görüntüleri verilmiştir.

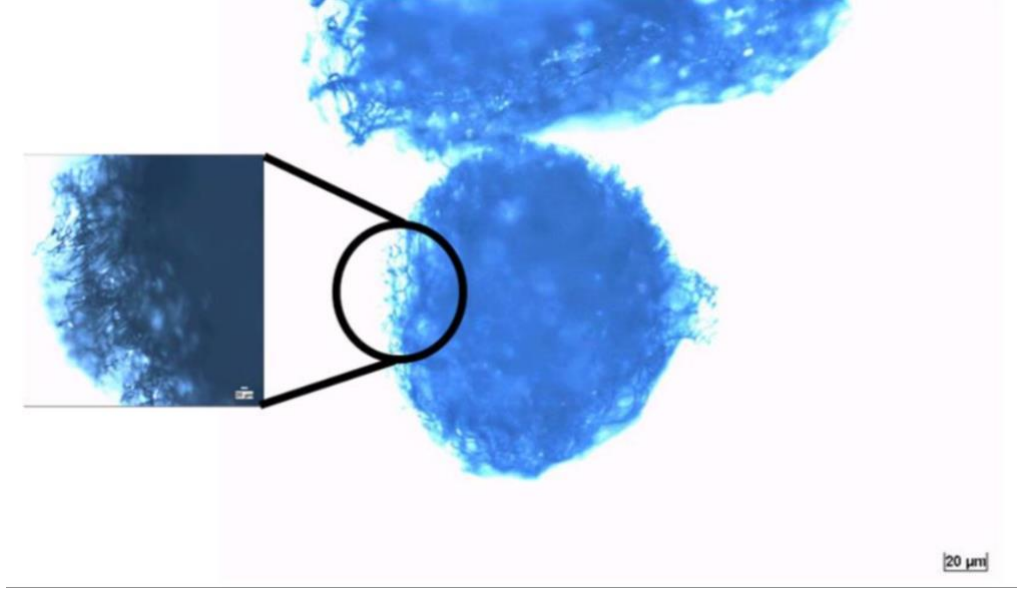


Şekil 3.32: Dağınık fazın sürekli faza oranı %33'te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin SEM görüntüsü



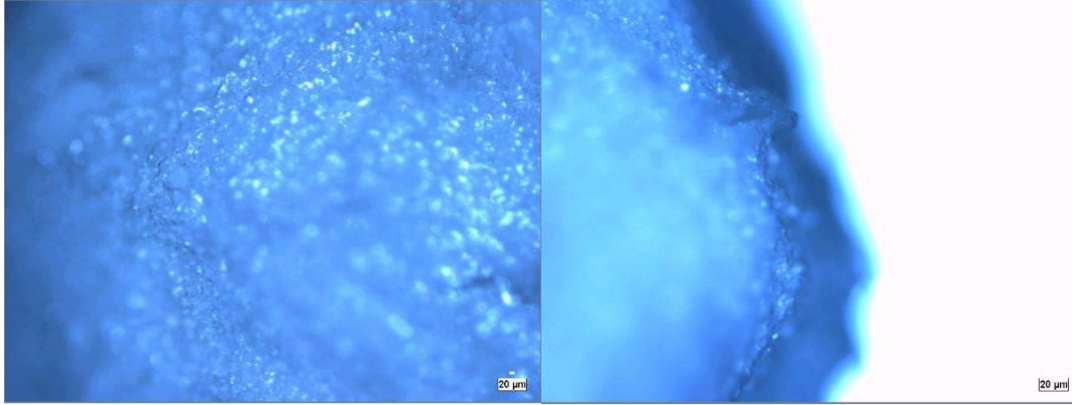
Şekil 3.33: Dağınık fazın sürekli faza oranı %21'de tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin SEM görüntüsü

Ek olarak bu parçacıklarda liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bu parçacıklar optik mikroskopta görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.34'te sunulmuştur.



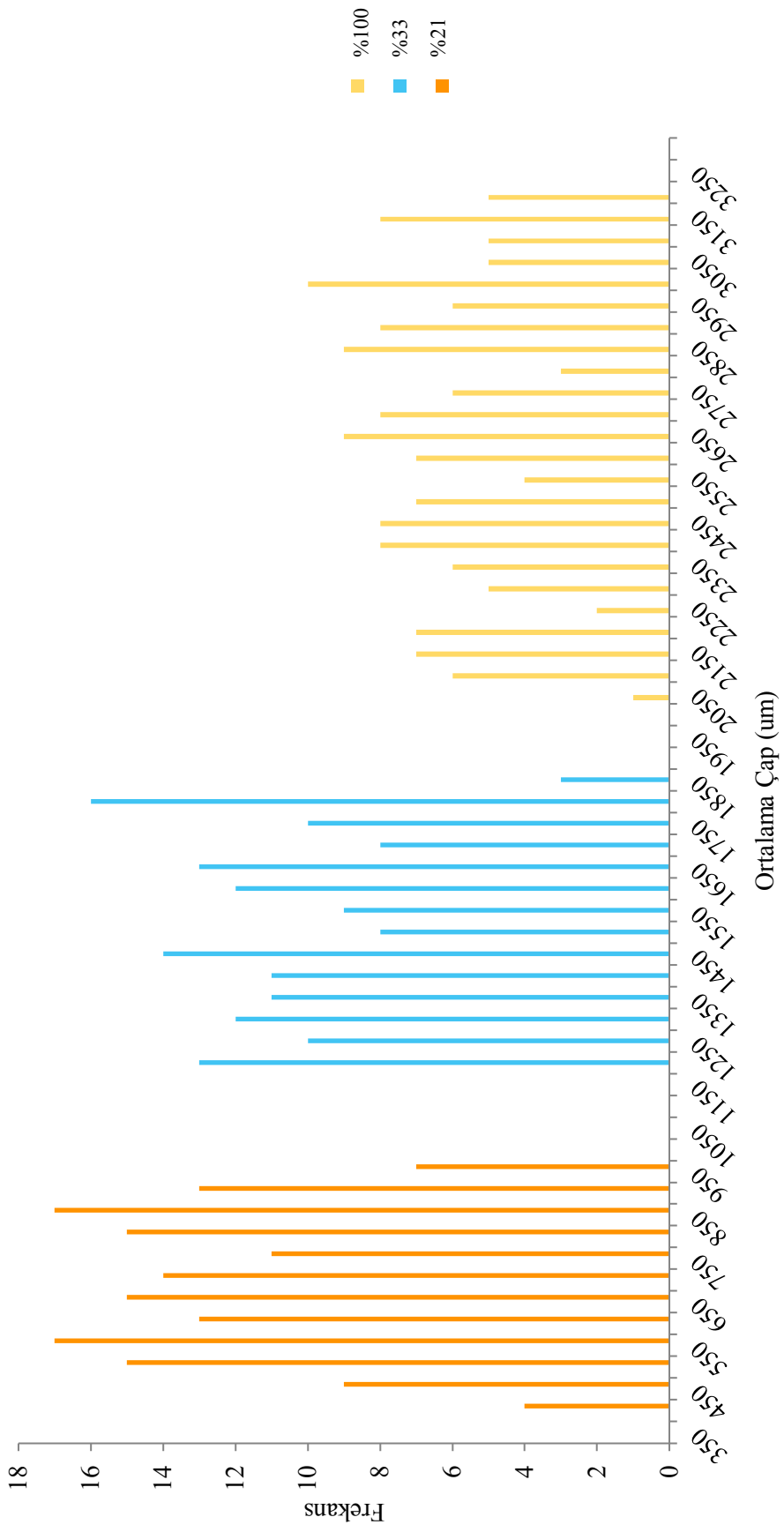
Şekil 3.34: Dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin liyofilizasyon sonrası optik mikroskop görüntüsü (50X büyütme)

Elde edilen sonucun bir diğer deneylerde optimize sonuç gösteren parçacık üzerinde de aynı olup olmayacağının gözlemlenmesi için dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin de liyofilizasyon işlemleri gerçekleştirilerek elde edilen sonuçların optik mikroskop görüntüleri de Şekil 3.35’te sunulmuştur.



Şekil 3.35: Dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin liyofilizasyon işlemi sonrasında elde edilen optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme)

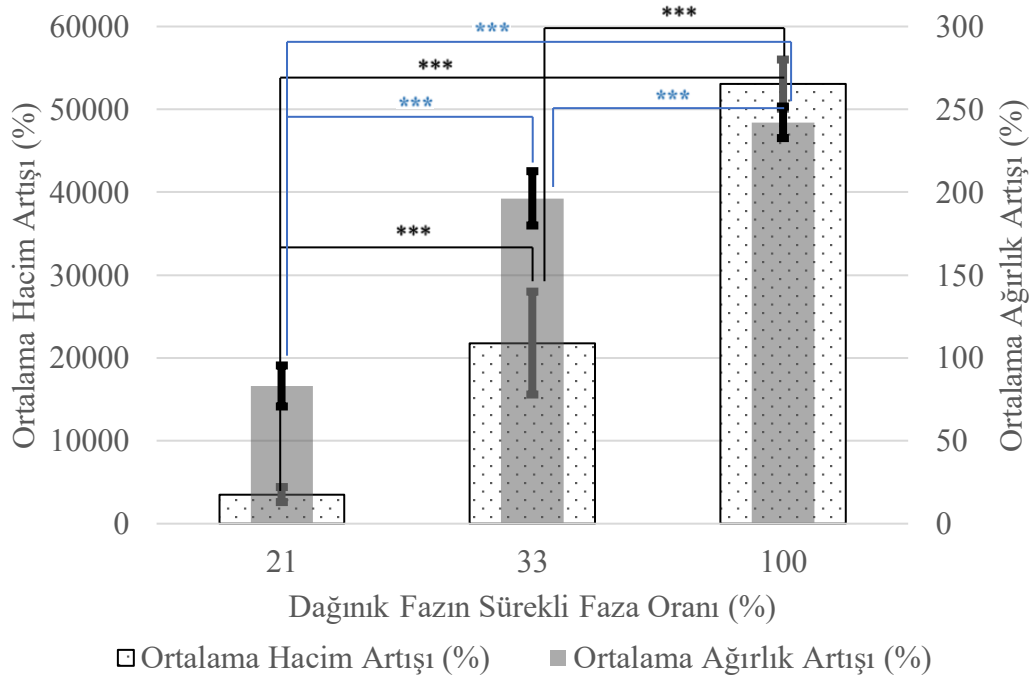
Parçacıkların parametrelere göre boyut dağılımı analizleri de her örnek için 150 parçacık üzerinden olacak şekilde analiz edilmiş ve elde edilen sonuç Şekil 3.36’da gösterilmiştir.



Şekil 3.36: Dağılık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş olan mikrokürelerin boyut dağılım haritası

3.5.2 Dağılık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Dağılık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin şişme deneyleri gerçekleştirilerek ortalama hacim ve ağırlık artışları analiz edilmiştir. Deney 5 kere tekrarlanmış ve analiz 150 parçacık üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.37’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



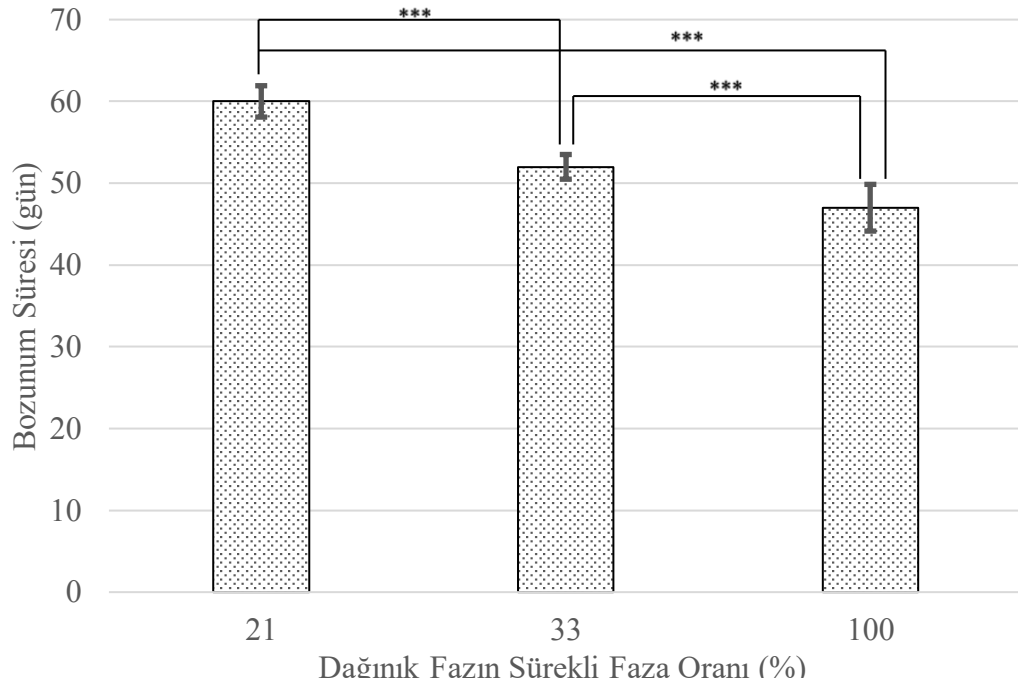
Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.37: Dağılık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri

3.5.3 Dağılık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Dağılık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin bozunum deneyleri gerçekleştirilerek parçacıkların tamamen bozundukları günler analiz edilmiştir. Deney, her örnek için 5 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.38’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen

sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

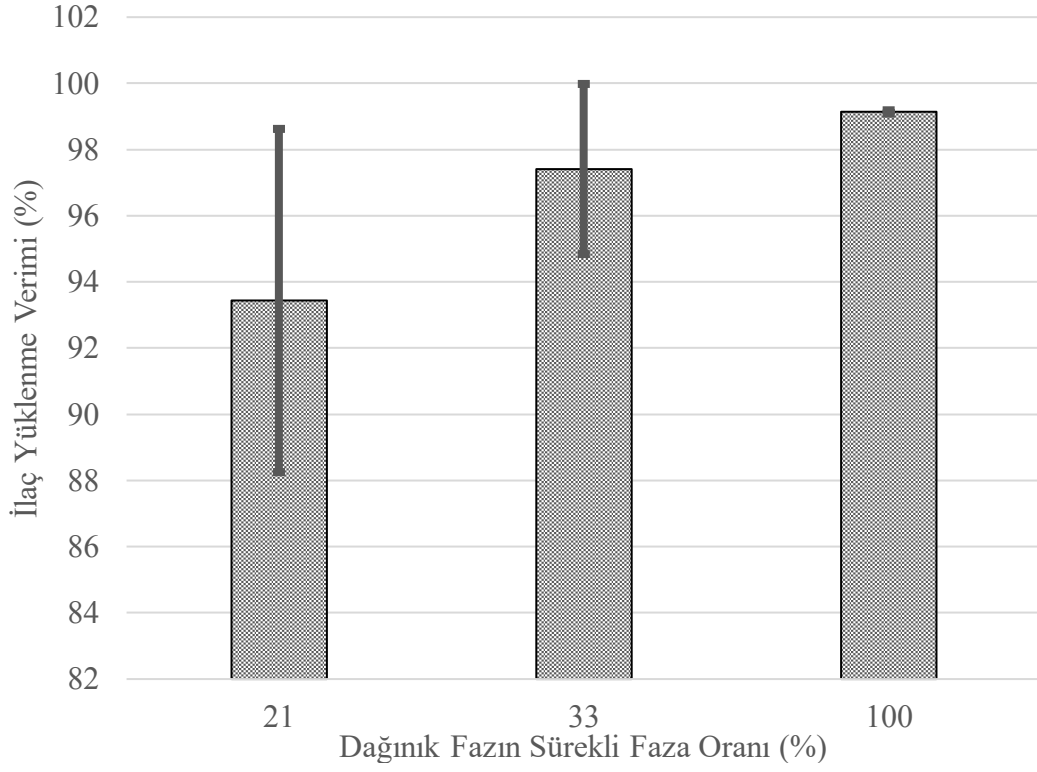


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.38: Dağınık fazın sürekli faza oranı değiştirilerek sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri

3.5.4 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Verimi ve Salım Karakteristiğinin İncelenmesi

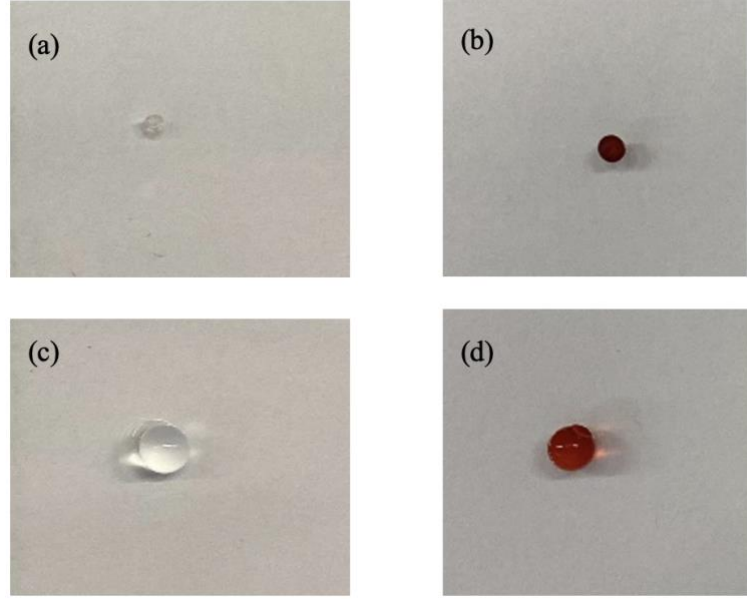
Dağınık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş olan parçacıklar bir kanser ilacı olan doksorubisin ile yüklenmiş ve parçacıklar tamamen salım işlemini gerçekleştirdikten sonra UV-Vis spektroskopi ile yükleme verimi analiz edilmiştir. Deney her bir örnek için 5 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda yüklenebildikleri ilaç yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.39’da gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.39: Dağılık fazın sürekli faza oranı değiştirilerek sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi

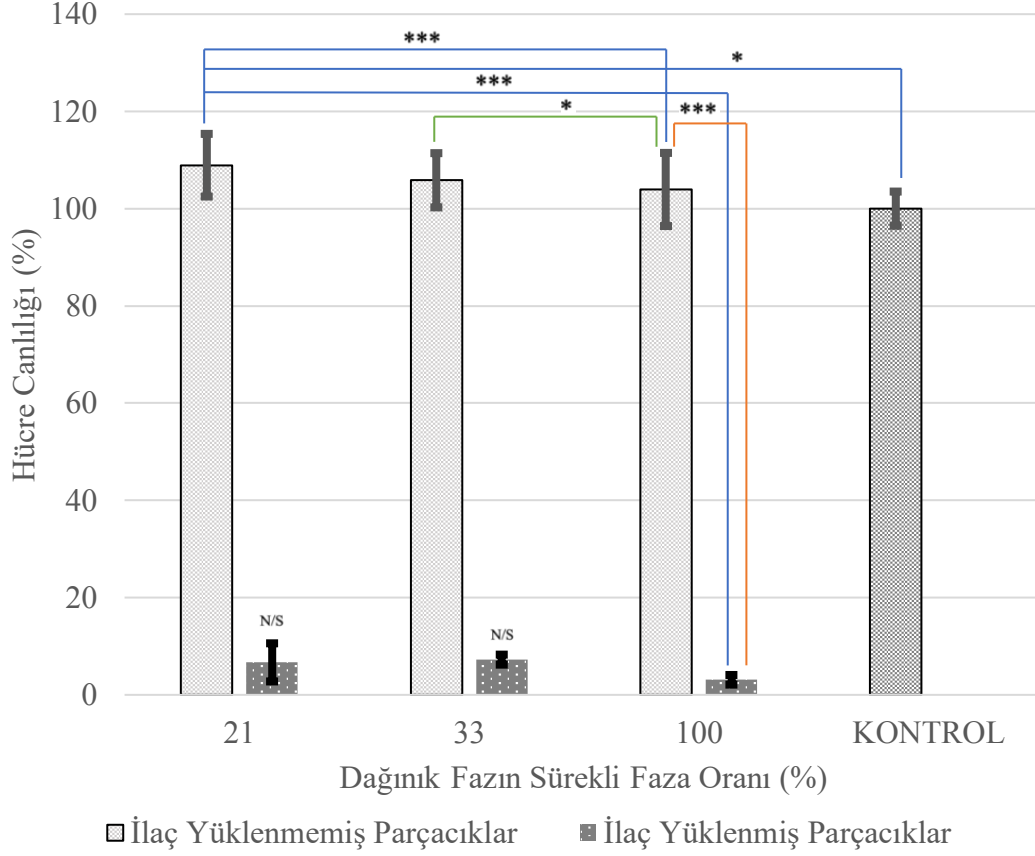
Standart parçacık olarak belirlenen örnek ile dağılık fazın sürekli faza oranı %33'te tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerin canlılık analizinde etkilerinin incelenmesi için parçacıkların DOX yüklenmesi aşamasında hem yükleme öncesi hem de sonrası görselleri Şekil 3.40'ta örnek olarak eklenmiştir.



Şekil 3.40: Doksorubisinin dahil edilmesinden önceki ve sonraki parçacıkların morfolojik özelliklerini sunan görseller. (a) Dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesinden önce morfolojisi, (b) Dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesi sonrası morfolojisi, (c) Dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesinden önce morfolojisi (d), Dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenen parçacığın doksorubisin yüklemesi sonrası morfolojisi.

3.5.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi

Canlılık analizi, dağınık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenen parçacıklar kullanılarak sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde korelasyonun anlamlı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için Excel üzerinden t-test gerçekleştirilmiştir. L-929 hücre hattında yapılan inceleme sonrasında canlılık analizi sonuçları Şekil 3.41’de sunulmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,0001.

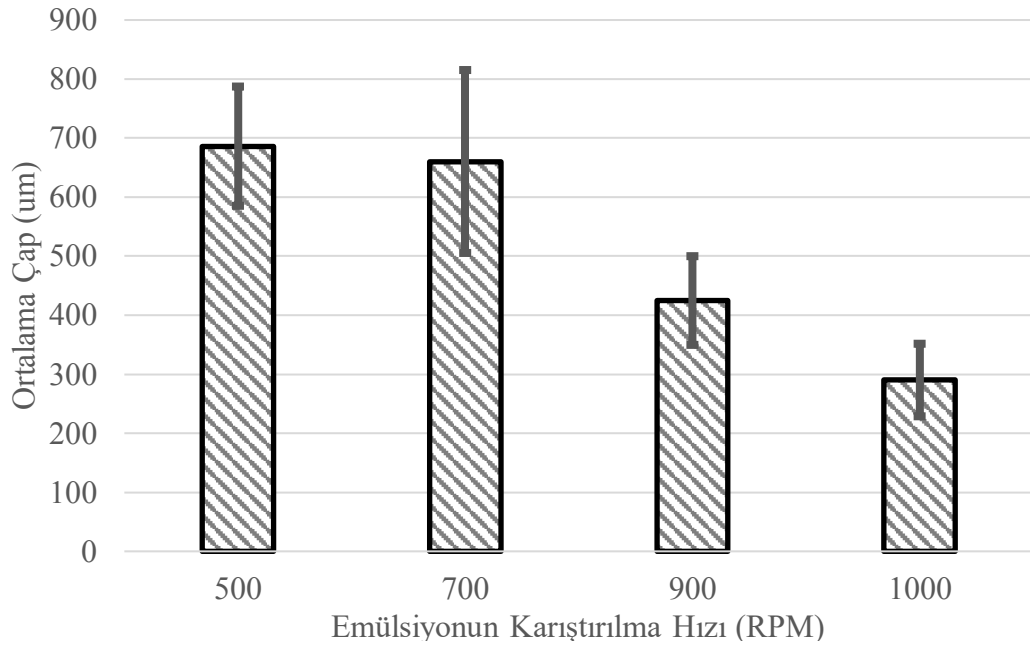
Şekil 3.41: Dağılık fazın sürekli faza oranları değiştirilerek sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları

3.6 Emülsiyonun Karıştırılma Hızı

3.6.1 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin, o karıştırma hızına karşılık gelen ortalama çapları ve boyut aralığı hakkında genel bir yorumlama yapılabilmesi için standart sapmaları Şekil 3.42’de gösterilmiştir. Bu sonuca ulaşabilmek için parçacıklar optik mikroskop ile görüntülenmiş ve farklı parçacıkların görüntüleri alınarak bu görsellerden ImageJ ile boyut analizi yapılmıştır. Her örnekten en az 150 farklı parçacık görüntüsü alınmış ve bu çapların ortalaması ile standart sapması Excel üzerinden hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının

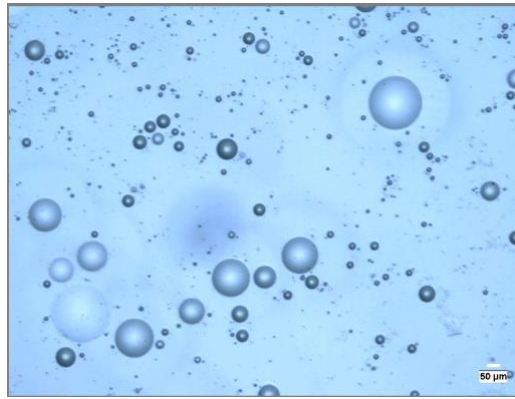
belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

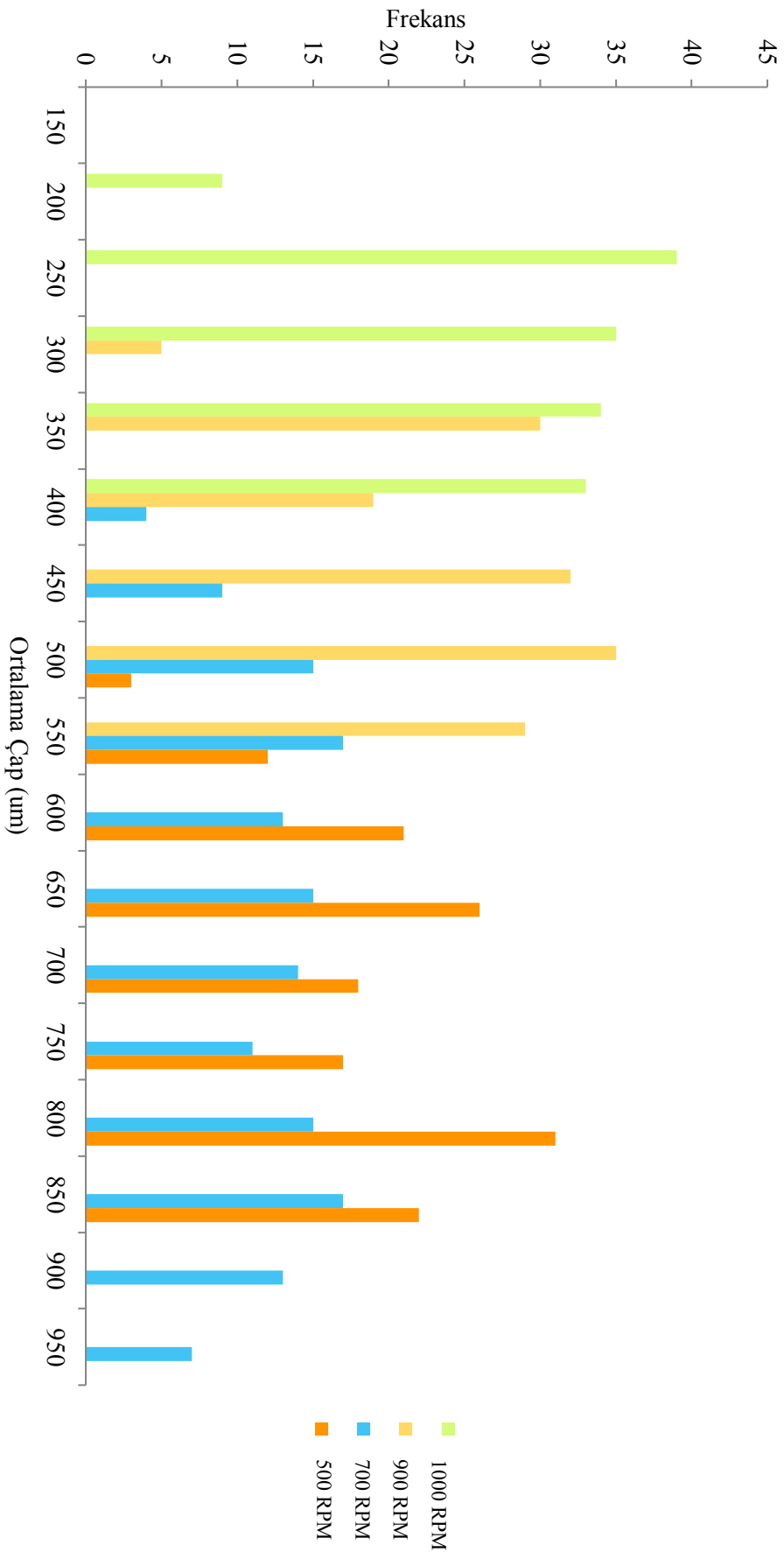
Şekil 3.42: Farklı emülsiyon karıştırma hızlarında sentezlenen parçacıkların ortalama çapları

Ayrıca emülsiyonun 1000 RPM’de karıştırılması ile elde edilmiş olan parçacıkların optik mikroskop görüntüsü Şekil 3.43’te verilmiştir.



Şekil 3.43: Emülsiyon 1000 RPM’de karıştırılarak sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (200X büyütme)

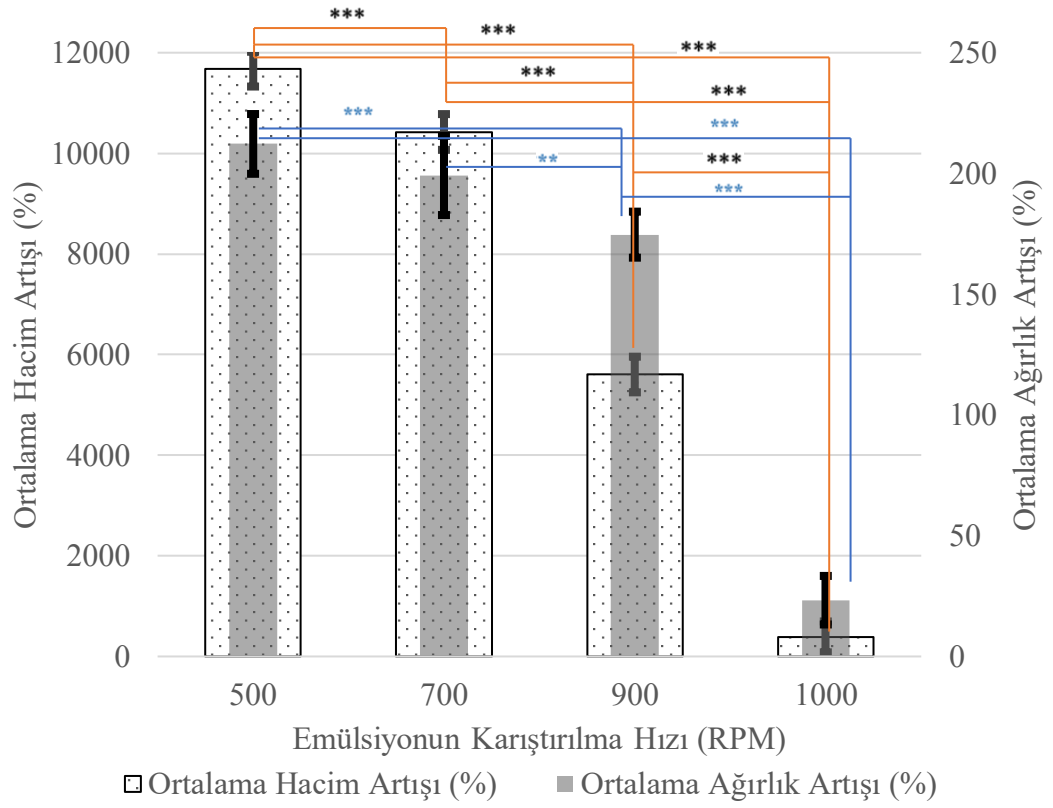
Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritalaması gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.44’te grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.44: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş mikrokürelerin boyut dağılım haritası

3.6.2 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin şişme deneyleri gerçekleştirilerek ortalama hacim ve ağırlık artışları analiz edilmiştir. Deney 5 kere tekrarlanmış ve analiz 150 parçacık üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.45'te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



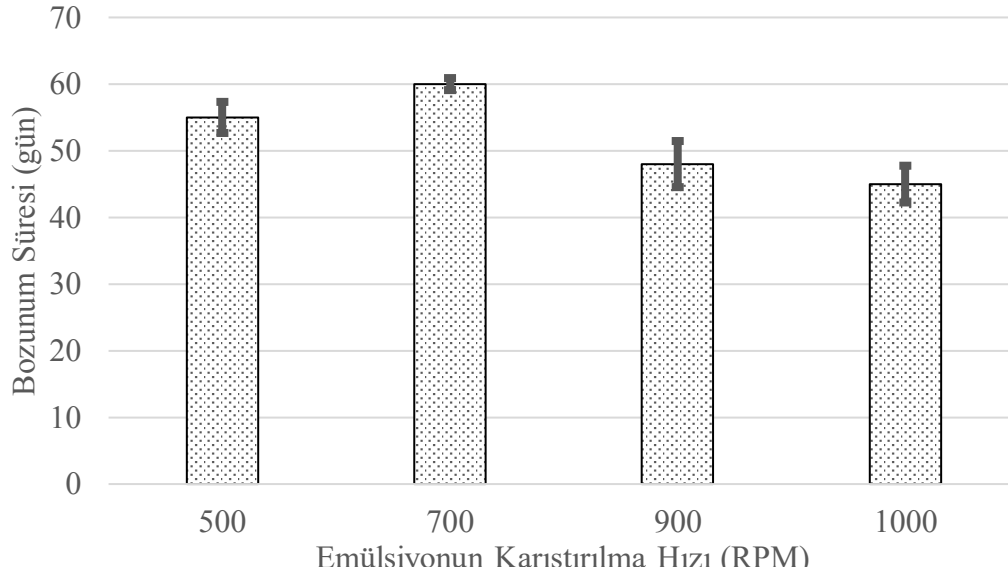
Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.45: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenen nişasta mikrokürelerin şişme deneyindeki ortalama hacim ve ortalama ağırlık değişimleri

3.6.3 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş olan nişasta mikrokürelerin bozunum deneyleri gerçekleştirilerek parçacıkların tamamen bozundukları günler

analiz edilmiştir. Deney, her örnek için 5 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.46’da gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.

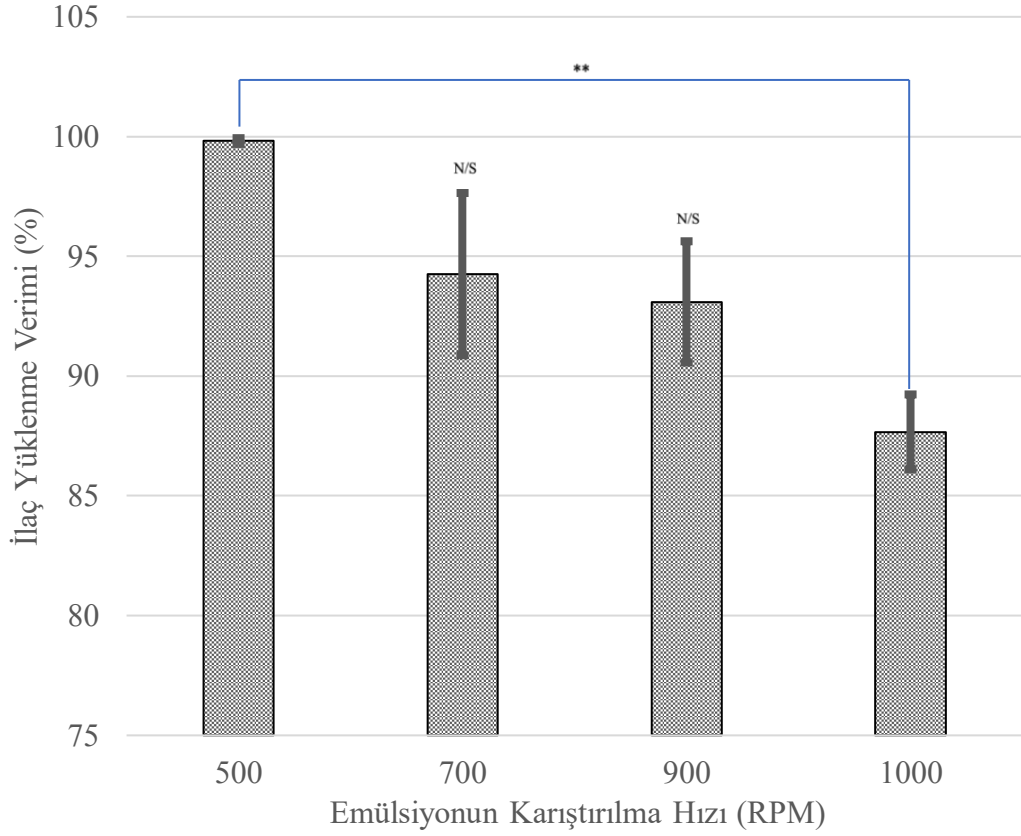


Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.46: Farklı emülsiyon karıştırma hızlarında sentezlenen mikrokürelerin bozunum süreleri

3.6.4 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

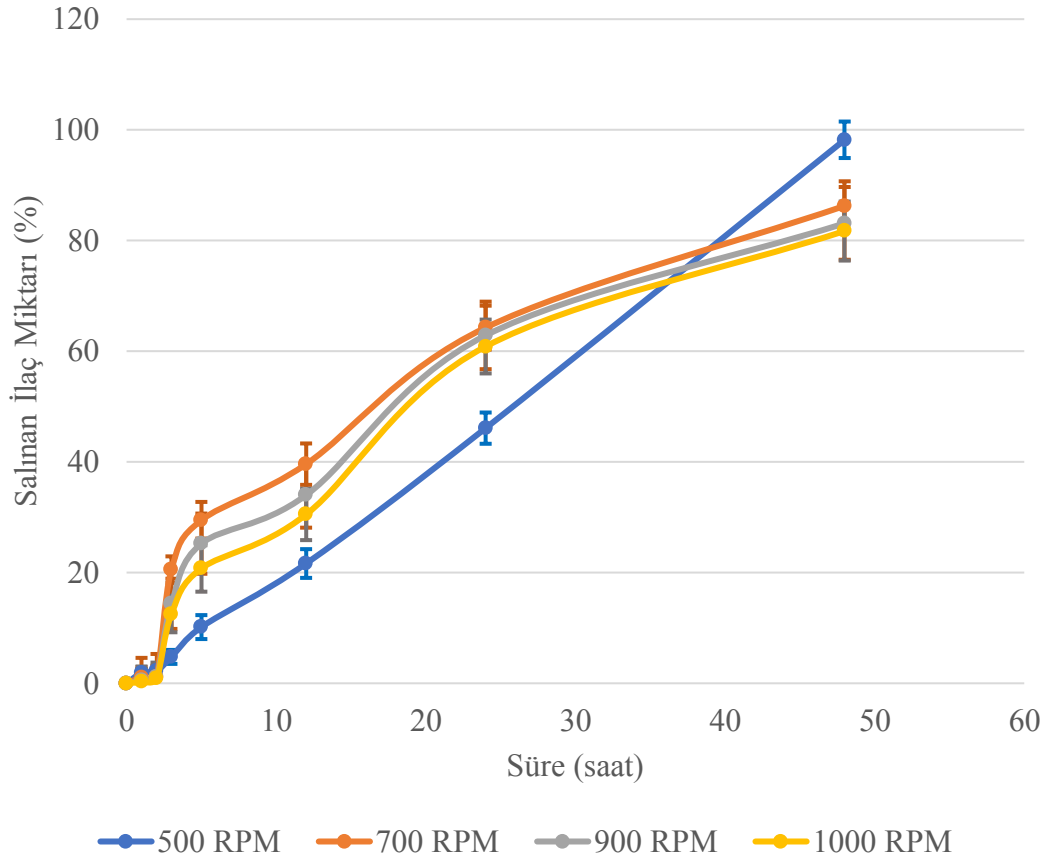
Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş olan parçacıklar bir kanser ilacı olan doksorubisin ile yüklenmiş ve parçacıklar tamamen salım işlemini gerçekleştirdikten sonra UV-Vis spektroskopi ile yükleme verimi analiz edilmiştir. Deney her bir örnek için 5 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda yüklenebildikleri ilaç yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.47’de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$.

Şekil 3.47: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş parçacıkların ilaç yüklenme verimi

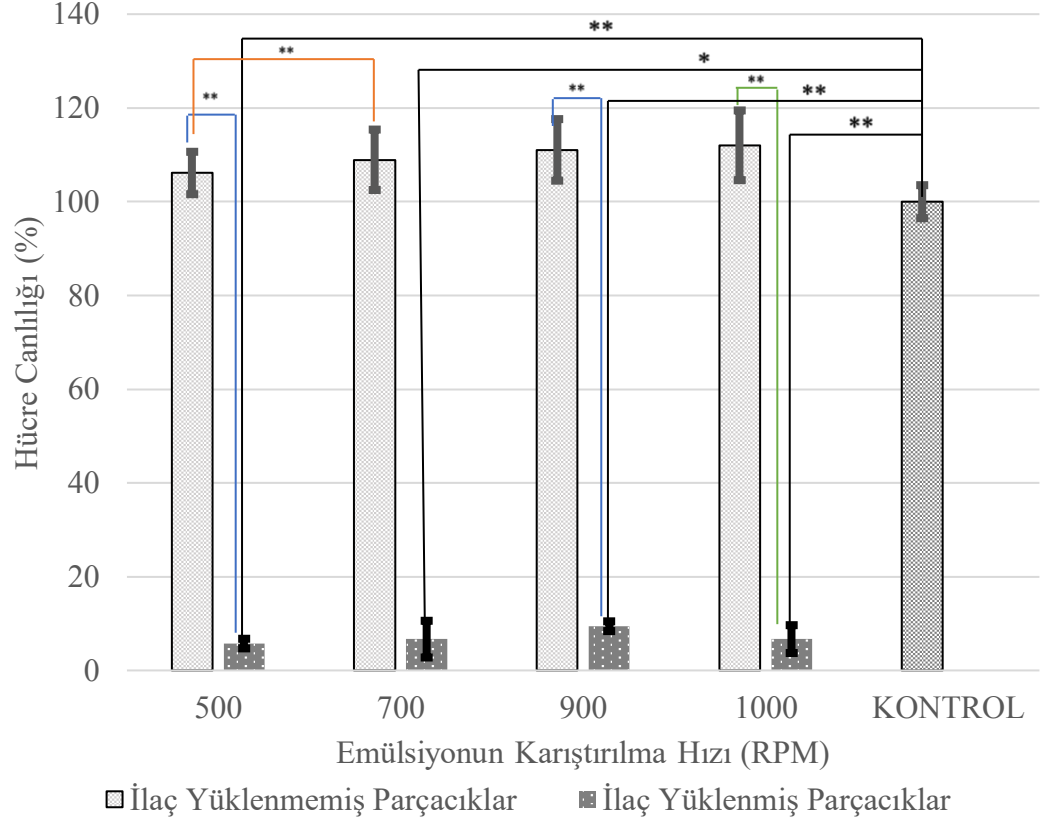
Sonrasında salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deney süresince parçacıkların 48 saat sonunda ortama saldıkları ilaç miktarı UV-Vis spektroskopi ile ölçülerek yüzde salım oranları hesaplanmıştır. Deney her bir örnek için 15 kez tekrarlanmış ve bu doğrultuda salım yüzdeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 3.48’de gösterilmiştir.



Şekil 3.48: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenen doksorubisin yüklü mikrokürelerden 48 saat boyunca salınan ilaç yüzdeleri

3.6.5 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Hücre Canlılığına Etkisi

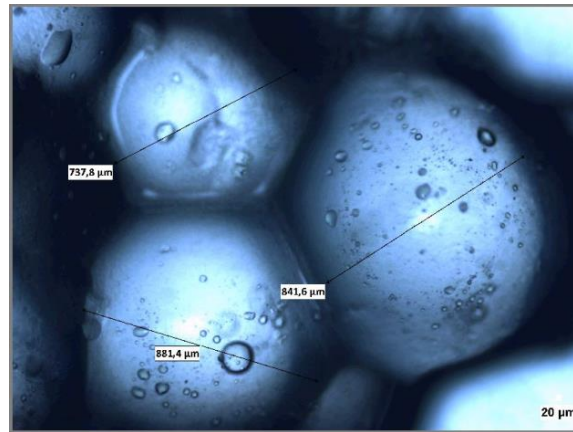
Canlılık analizi, emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenen parçacıklar ile sistematik olarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde korelasyonun anlamlı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için Excel üzerinden t-test gerçekleştirilmiştir. L-929 hücre hattında yapılan inceleme sonrasında canlılık analizi sonuçları Şekil 3.49’da sunulmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için R yazılımı üzerinden Tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirilmiştir.



Tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Şekil 3.49: Emülsiyonun farklı hızlarda karıştırılması ile sentezlenmiş mikrokürelerin ilaç yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş formlarının canlılık analizi sonuçları

Ek olarak parçacıkların optik mikroskop görüntüsüne örnek olarak 700 RPM’de emülsiyonun karıştırılması ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü Şekil 3.50’de sunulmuştur.



Şekil 3.50: Emülsiyonun 700 RPM’de karıştırılması ile sentezlenmiş olan mikrokürelerin optik mikroskop görüntüsü (100X büyütme)

Ek olarak, çalışma kapsamında incelenmiş olan tüm parçacıkların, incelenen parametrelerde gösterdikleri genel eğilim, Çizelge 3.7’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1: Çalışma boyunca incelenen parçacıkların, incelenen parametrelerde gösterdikleri genel eğilim

	Ortalama Çap (um)	Şişme Kapasitesi (%)	Bozunum Hızı	İlaç Yükleme Verimi (%)
Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranı (%) ↑	↑	↑	↑	↑
Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu (hacimce %) ↑	↓	↓	↓	↓
Ortam pH’si ↑	↓	↓	↑	↑
Emülsiyonun Karıştırılma Hızı (RPM) ↑	↓	↓	↑	↓
Ortam Sıcaklığı (°C) ↑	↓	↓	↑	↓
Polimer Konsantrasyonu (ağırlıkça %) ↑	↓	↑	↓	↓

4. TARTIŞMA

4.1 Parçacıkların Boyut Dağılımları

4.1.1 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Sentezlenen mikrokürelerde kullanılan nişasta konsantrasyonu arttıkça parçacık boyutunda azalma gözlemlenmiştir. Elde edilen parçacıkların boyutları sırasıyla ağırlıkça %3 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için 1420.47 ± 132.95 μm , ağırlıkça %5 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için 660.35 ± 154.95 μm , ağırlıkça %7.5 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için 550.64 ± 137.95 μm ve ağırlıkça %10 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için 365.03 ± 105.93 μm olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü ANOVA uygulandığında genel olarak farklı konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,01$). Bu bağlamda ikili karşılaştırmalar için Tukey analizi uygulandığında ise polimer konsantrasyonu ağırlıkça %3 olan grup ile polimer konsantrasyonu ağırlıkça %7,5 olan grup arasında ($p < 0,01$); polimer konsantrasyonu ağırlıkça %10 olan grup ile polimer konsantrasyonu ağırlıkça %3 olan grup arasında ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. Farkı yaratan konsantrasyonun belirlenmesinde Tukey ikili karşılaştırma testi ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (olası karşılaştırmaların hepsinde $p < 0,001$).

Bu durum birkaç parametre ile açıklanabilmektedir. Açıklamalardan ilki, polimer konsantrasyonundaki bu artışın, polimer zincirleri arası etkileşimleri de arttıracak yönündedir. Etkileşimlerin artması çözeltinin yüzey gerilimini artırarak daha küçük parçacıkların oluşumuna neden olabilir. Ayrıca daha yüksek nişasta konsantrasyonunun daha kalın bir polimer tabakası oluşturarak parçacıkların stabilizasyonunu artıracak da söylenebilir (Nölle ve diğ., 2014).

Elde edilen sonuca verilebilecek bir diğer sebep ise bazı durumlarda yüksek polimer konsantrasyonunun büyüyen bir polimer zincirinin başka bir polimer zincirinden bir hidrojen atomunu soyutlayarak daha kısa zincirlere ve potansiyel olarak daha küçük parçacıklara neden olduğu zincir transfer reaksiyonlarını destekleyebiliyor olması olarak önerilebilir (Chiefari ve diğ., 1999).

Ağırlıkça %3, %5, %7,5 ve %10 nişasta konsantrasyonu ile sentezlenmiş parçacıkların boyut dağılım haritalamalarında; sentez sürecinde nişasta konsantrasyonunun en dar boyut dağılım aralığı, ağırlıkça %10'luk nişasta çözeltisi ile sentezlenmiş olan parçacıklarda elde edilmiştir. Bu durumun altında yatan sebepler arasında artan çekirdeklenme, difüzyon kısıtlamaları ve ostwald olgunlaşması olduğu düşünülebilir.

Artan çekirdeklenmede; daha düşük konsantrasyonlarda daha az miktarda polimer bulunduğu için, parçacık büyümesi için başlangıç noktaları daha fazla oluşacaktır. Bu başlangıç noktalarının fazlalığı ile de sentezlenen parçacıklarda daha geniş bir boyut dağılım yelpazesi gözlemlenmiştir (Romero ve diğ., 2012).

Ostwald olgunlaşması, daha küçük parçacıkların çözünmesini ve ardından daha büyük parçacıklara yeniden konumlandırılmasını tanımlamaktadır. Herhangi bir konsantrasyonda meydana gelebilirken, daha düşük konsantrasyonlarda birçok küçük parçacığın ilk varlığı, onları çözünmeye daha duyarlı hale getirerek bu etki nedeniyle daha büyük parçacıkların daha da büyümesine yol açmıştır (Taylor ve diğ., 1998).

4.1.2 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Sentezlenen mikrokürelerde kullanılan çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça parçacık boyutunda azalma gözlemlenmiştir. Elde edilen parçacıkların boyutları sırasıyla hacimce %1 çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için $1189.87 \pm 97.61 \mu\text{m}$, hacimce %4 çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için $660.35 \pm 154.95 \mu\text{m}$ ve hacimce %20 çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile sentezlenen parçacıklar için $430.67 \pm 75.24 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü ANOVA uygulandığında genel olarak farklı konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) ve bu bağlamda gerçekleştirilmiş olan ikili karşılaştırmalarda Tukey analizinde çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %1 olan grup ile çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %4 olan grup arasında ($p < 0,05$); çapraz bağlayıcı

konsantrasyonu hacimce %1 olan grup ile çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %20 olan grup arasında ($p<0,01$); çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %4 olan grup ile çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %20 olan grup arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir.

Artan çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile birlikte nişasta mikroküre boyutunda gözlemlenen azalma, bilimsel literatüre dayanan çeşitli açıklamalarla desteklenen ilgi çekici bir eğilim sunmaktadır. İlk olarak, yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarından kaynaklanan moleküller arası çapraz bağlanmanın artması, nişasta matrisi içinde daha kompakt ve dirençli bir ağ meydana getirmektedir. Bu artan yapısal bütünlük, araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda açıklandığı gibi, sentez sırasında nişasta granülünün şişmesini engelleyerek, boyut genişlemesinin önüne geçebilmektedir (Mane ve diğ., 2015). Ayrıca, çapraz bağlanmanın artması nedeniyle serbest hidroksil gruplarındaki azalma, bir araştırma grubu tarafından bildirildiği gibi mikroküre boyutunu sınırlayarak şişmenin ve nişasta granülünün genişlemesinin azalmasına katkıda bulunmaktadır (Desai ve diğ., 2005b). Şişmedeki bu azalma aynı zamanda sentez sırasında çözünür nişasta bileşenlerinin sızmasını da en aza indirerek daha küçük nihai mikrokürelerle sonuçlanmasına yol açmaktadır.

4.1.3 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Sentezlenen mikrokürelerde sentez sırasında ortam pH'si değiştirildiğinde parçacık boyutunun belli düzeyde etkilendiğini görülmüştür. Elde edilen parçacıkların boyutları sırasıyla pH=7 için 2072.79 ± 99.42 μm , pH=8 için 1245.91 ± 133.85 μm , pH=9 için 660.35 ± 127.988 μm ve pH=10 için 903.55 ± 54.70 μm olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü ANOVA uygulandığında genel olarak farklı konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). İkili karşılaştırmalarda Tukey analizi gerçekleştirildiğinde ise ortam pH'si 7'de tutulan grup ile ortam pH'si 9'da tutulan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p<0,001$). Bu durum bize ortam pH'si arttıkça parçacık boyutunda genel anlamda bir azalmaya eğilim olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuç, pH arttıkça polimer zincirleri arası itme kuvvetini artırıp, daha küçük parçacık boyutlarının elde edilmesine yol açması olarak yorumlanabilir, nitekim nişasta zincirindeki fosfat gruplarının protonasyon düzeyi ortam pH'sinden direkt etkilenmekte ve pH artışı zincirleri daha da negatif hale getirmektedir (Nelson ve diğ.,

2008). Bir başka yorum ise pH değişiminin polimer çözünürlüğünü etkiliyor olabilmektedir (Kawaguchi, 2000). pH artışı asetilenmiş dinışta fosfatın çözünürlüğünü artırarak çekirdeklenme ve çapraz bağlanma yoğunluğunu artırıp, daha küçük boyutlu parçacıklar elde edilmesine neden olabilir. Bir başka neden ise epiklorohidrinin yüksek pH ortamlarında reaktivitesinin artması nedeniyle parçacıkların daha verimli ve yoğun bir şekilde çapraz bağlanması ve bu doğrultuda ortalama boyutun azalması olarak yorumlanabilir. pH, 9'un üzerinde ise tepkime ve ECH reaktivite düzeyi muhtemelen düşmekte, bu da boyutun bu noktadan sonra artmasına neden olmaktadır.

4.1.4 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Sentezlenen mikrokürelerde sentez sırasında ortam sıcaklığı değiştirildiğinde parçacık boyutunun belirli düzeyde etkilendiği görülmüştür. Elde edilen parçacıkların boyutları sırasıyla 30°C ortam sıcaklığı için $660.35 \pm 1154.94 \text{ } \mu\text{m}$, 40°C ortam sıcaklığı için $500.05 \pm 118.19 \text{ } \mu\text{m}$, 60°C ortam sıcaklığı için $248.74 \pm 30.76 \text{ } \mu\text{m}$ ve 70°C ortam sıcaklığı için $204.86 \pm 65.13 \text{ } \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Bu durum bize ortam sıcaklığı arttıkça parçacık boyutunda azalma olduğunu göstermektedir. Tek yönlü ANOVA uygulandığında genel olarak farklı konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalarda Tukey analizi yapıldığında ise ortam sıcaklığı 40°C'de tutulan grup ile ortam sıcaklığı 70°C'de tutulan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p < 0,05$).

Bu durumun açıklaması olabilecek sebepler arasında sıcaklık arttıkça, yukarıdaki pH etkisine benzer şekilde çapraz bağlanma reaksiyonunun hızı artacağı için bu sürecin yoğun bir şekilde olduğu ve bu nedenle nişasta zincirlerinin daha hızlı birbirlerine tutunum sağlayarak daha küçük boyutlu parçacıklar sentezlenmesine neden olacağı söylenebilir.

İkinci bir açıklama olarak ise yüksek sıcaklıklarda çözeltinin viskozitesi azalacak ve bu nedenle polimer zincirleri daha rahat hareket ederek çapraz bağlanma reaksiyonunu daha kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleştirebilecektir (Chien, 1979).

Ayrıca ortamdaki sıcaklık artışı polimer zincirlerinin ve çapraz bağlayıcının termal enerjisini artırarak daha hızlı hareket etmelerine neden olacak ve bu bağlamda parçacık oluşumu sırasında gerçekleşen reaksiyonun daha yoğun gerçekleşmesine neden olarak

yüksek sıcaklıklarda daha küçük boyutlu parçacıkların sentezlenmesine neden olacaktır.

4.1.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Sentezlenen mikrokürelerde sentez sırasında dağınık fazın sürekli faza oranı değiştirildiğinde parçacık boyutunda artış gözlemlenmiştir. Elde edilen parçacıkların boyutları sırasıyla %21 oran için $660.35 \pm 1154.94 \mu\text{m}$, %33 oran için $1485.55 \pm 197.32 \mu\text{m}$ ve %100 oran için $2637.27 \pm 326.57 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Tek yönlü ANOVA uygulandığında genel olarak farklı konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,01$). İkili karşılaştırmalarda Tukey analizi yapıldığında faz oranı %21’de tutulan grup ile faz oranı %33’te tutulan grup arasında ($p < 0,01$); faz oranı %21’de tutulan grup ile faz oranı %100’de tutulan grup arasında ($p < 0,001$); faz oranı %33’te tutulan grup ile %100’de tutulan grup arasında ($p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir.

Bu durumun altında yatan temel neden dağınık fazın sürekli faza oranı arttıkça emülsiyon ortamında daha çok damlacık oluşacağı için çapraz bağlayıcı çok sayıda parçacık arasında etkisini göstermek zorunda kalarak parçacıklarda koalesans etkisi yaratıp daha büyük boyutlu parçacıkların oluşmasına neden olabilir. Ayrıca ikinci bir neden olarak ise emülsiyon ortamında dağınık fazın artmasının ortam viskozitesini artırarak polimer zincirlerinin hareketini yavaşlatıp çapraz bağlanmanın daha yavaş gerçekleşmesine neden olması şeklinde açıklanabilir. Aynı zamanda bu viskozite artışı sadece polimer zincirlerinin hızını değil çapraz bağlayıcının hızını da azaltarak parçacık oluşum sürecini yavaşlatacak ve daha büyük parçacıkların oluşmasına neden olacaktır.

4.1.6 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Boyut Dağılımı

Sentezlenen mikrokürelerde sentez sırasında emülsiyonun karıştırılma hızının değiştirilmesinde parçacık boyutunu etkileyecek bir değişim gözlemlenmiştir. Elde edilen parçacıkların boyutları sırasıyla 500 RPM için $686.32 \pm 101.00 \mu\text{m}$, 700 RPM için $660.35 \pm 1154.94 \mu\text{m}$, 900 RPM için $424.86 \pm 75.15 \mu\text{m}$ ve 1000 RPM için

290.19±61.45 µm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar emülsiyonun karıştırılma hızındaki artışın parçacık boyutunda azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Tek yönlü ANOVA uygulandığında genel olarak farklı konsantrasyonlarda anlamlı fark bulunmamıştır.

Karıştırma hızının artması, emülsifikasyonun verimini artırarak daha küçük boyutlu parçacıkların oluşmasına yol açıyor olabilir. Yüksek karıştırma hızları, aynı zamanda polimer zincirlerinin bulunduğu fazın yüzey gerilimini aşmasını kolaylaştıracağı için küçük damlacıklar daha fazla bölünüp sentez sürecinden sonra daha küçük parçacıklara dönüşmektedir. Aynı zamanda daha yüksek karıştırma hızı, çapraz bağlayıcının emülsiyon içerisindeki hızını artırarak çapraz bağlanma işleminin daha yoğun gerçekleşmesini sağlayacaktır ve bu da daha küçük parçacıkların sentezlenmesine neden olacaktır. Son olarak verilebilecek neden ise yüksek karıştırma hızının reaktanlar arası etkileşimi kolaylaştıracak olması ve aynı zamanda emülsiyon içerisindeki sıcaklık dağılımını daha homojen hale getirerek reaksiyonun optimal koşullarda ve hızlı gerçekleşmesine neden olacak olmasıdır.

4.2 Şişme Karakteristiklerinin İncelenmesi

4.2.1 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Tek yönlü ANOVA uygulandığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). İki yönlü Tukey analizinde ise ağırlıkça %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikrokürelerin şişme deneylerindeki hacim artışı ile ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikrokürelerin hacim artışı arasında ($p<0,05$); ağırlıkça %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %7,5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,001$); ağırlıkça %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %10 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,001$); ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %7,5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,001$); ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %10 polimer

konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Şişme deneylerinden elde edilen ağırlık artışlarında ise ağırlıkça %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,05$); %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %7,5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,05$); ağırlıkça %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %10 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir.

Artan polimer konsantrasyonu ile nişasta mikrokürelerinde gözlemlenen şişmenin artması, katkıda bulunan çeşitli faktörlerin kapsamlı bir şekilde incelenmesiyle açıklanabilir. Artan ortalama hacim ve ağırlık, yoğunlaştırılmış su alımı ve tutma mekanizmalarına atfedilebilir. Daha yüksek polimer konsantrasyonu ile ilişkili mikroküresel matrisin yoğunlaşması, birim hacim başına polimer zincirlerinin varlığının artmasına neden olarak yüksek hidrojen bağlanması ve kılcal kuvvetler yoluyla gelişmiş su tutma kapasitesini desteklemiş olabilir. Ek olarak, daha yoğun olan mikro yapı bir rezervuar görevi görerek matris içinde ve özellikle amiloz zincirleri sayesinde daha fazla miktarda suyu hapsederek, böylece hem ağırlık hem de hacim artışını doğrulayacaktır.

Ayrıca nişastanın şişme davranışının araştırılması, işleme veya kurutma sırasında amorfizasyonun dönüştürücü etkisini ortaya çıkarmaktadır. Nişasta granülleri kısmi kristal yapı kaybına uğrayarak daha amorf hale gelip, böylece suya erişilebilirlik ve şişme potansiyelini artırmaktadırlar. Su molekülleri ile nişasta polimerleri arasındaki, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler ile karakterize edilen etkileşimler, genel şişme sürecine ayrıca katkıda bulunur. Konsantrasyona bağlı etkiler, maksimum şişme için optimal konsantrasyon aralığı kavramını ortaya koyarak; burada su difüzyon sınırlamaları ve yoğunluk matrisi içindeki gözenek boyutu, daha fazla şişme potansiyelini etkileyen önemli faktörler haline gelmektedir (Chien, 1979).

Literatürden alınan örnekler, bir araştırma grubunun çalışmaları ile bu mekanizmalara ampirik destek sağlamaktadır (Desai ve diğ., 2005a). Araştırmacılar, değişen polimer konsantrasyonları altında nişasta mikrokürelerinde artan su alımı, hacim değişimi ve

daha yüksek şişme oranları rapor etmektedir (Roy ve diğ., 2009). Son olarak, şişme davranışını yöneten spesifik mekanizmaların, nişasta kaynağı, kullanılan işleme yöntemleri ve mikrokürelerin başlangıç bileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğunun altını çizmek önemlidir. Benzer bir durum araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da gözlemlenmiştir (Yin ve diğ., 2007). Bu araştırmacılar, polimer konsantrasyonunun hidrojenlerin şişme ve ilaç salma özellikleri üzerindeki etkisini araştırmışlar ve polimer konsantrasyonu ile şişme deneylerinin sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki elde etmişlerdir.

4.2.2 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Tek yönlü ANOVA uygulandığında gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$). İki taraflı Tukey analizinde ise hacim artışında hacimce %1 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenen grup ile hacimce %4 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenen grup arasında ($p < 0,001$); hacimce %1 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenen grup ile hacimce %20 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenen grup arasında ($p < 0,001$) anlamlı bir fark elde edilirken; ağırlık artışında hacimce %1 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenen mikroküreler ile diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir ($p < 0,001$).

Şişme davranışında gözlemlenen değişikliklerin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması için kullanılan çapraz bağlayıcı konsantrasyonu detaylıca incelenmiştir. Artan çapraz bağlanma, aynı anda daha dirençli bir ağ içinde su alımını kısıtlayarak şişmeyi azaltmıştır (Elliott ve diğ., 2004). Ek olarak, gözenek boyutu ve dağılımındaki değişiklikler suyun nüfuzunu ve tutulmasını etkileyerek karşıt etkilerin telafi edilmesine yol açmış olabilir. Bu etkiye örnek verilecek olursa, araştırmacılar, epiklorohidrin ile çapraz bağlanan karboksimetil kitosan-nişasta mikrokürelerindeki şişmede minimal değişiklikler olduğunu fark etmiş ve bunu şişme ve çapraz bağlayıcı kaynaklı hidrofiliklik üzerindeki karşıt etkilere bağlamıştır (Omranı ve diğ., 2023). Çapraz bağlayıcının sınırlı etkisi, özellikle seçilen konsantrasyon aralığının şişmede önemsiz değişikliklere neden olacak şekilde belirli bir eşik dahilinde olması durumunda başka bir makul açıklama olabilir. Yetersiz çapraz bağlantıların su alımını

önemli ölçüde kısıtlamayabileceği düşük çapraz bağlanma seviyelerinde veya daha fazla çapraz bağlanmanın halihazırda katı bir ağı minimum düzeyde etkileyebileceği yüksek düzeyde çapraz bağlı sistemlerde meydana gelebileceği için bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve şişmelerdeki önemli değişimler aslında parçacıklar sentezlenirken çapraz bağlanma reaksiyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Bir araştırma grubu, düşük sodyum trimetafosfat çapraz bağlanma seviyeleri ile patates nişastasının şişmesinde küçük, anlamlı olmayan değişiklikler gözlemlemiştir (Wongsagonsup ve diğ., 2014). Başka bir araştırma grubu, amiloz ve amilopektin ile farklı etkileşimler nedeniyle epiklorohidrin ve sodyum trimetafosfat ile çapraz bağlanan mısır nişastası mikrokürelerinde, çeşitli şişme davranışları gözlemlemiştir. Yetersiz hassasiyet veya doğruluk gibi ölçüm sınırlamalarının, şişme davranışındaki ince değişikliklerin tespitini engelleyebildiğini ve mısır nişastasında daha yüksek sodyum sitrat çapraz bağlanmasıyla şişmede hafif artışlar gözlemlendiğini belirtmişlerdir (Liu ve diğ., 2013).

4.2.3 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Tek yönlü ANOVA uygulandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$). İkili karşılaştırmalarda Tukey testi yapıldığında hacim artışında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Şişme deneylerinden elde edilen ağırlık artışlarında ise ortam pH'si 7'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 8'de tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$); ortam pH'si 7'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 9'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$); ortam pH'si 7'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 10'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$); ortam pH'si 7'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 9'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$); ortam pH'si 8'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 9'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$); ortam pH'si 8'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 10'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. Ağırlık artışı açısından gerçekleştirilen karşılaştırmalarda ise ortam pH'si 7'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 9'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p < 0,001$);

ortam pH'si 7'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 10'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p<0,01$); ortam pH'si 8'de tutularak sentezlenen parçacıklar ile ortam pH'si 9'da tutularak sentezlenen parçacıklar arasında ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir.

Şişme davranışına ilişkin gerçekleştirilen bu araştırmada, elde edilen sonuçlar, çalışılan aralıktaki ortam pH'sindeki değişikliklerin, nişasta mikrokürelerinin genel şişme özellikleri üzerinde önemli bir etki yaratmayabileceğini göstermiştir. Bu tekdüzeliğin olası açıklamaları arasında çapraz bağlanma yoğunluğu, kristallik veya su molekülleri ile etkileşimler gibi pH'ın ötesindeki faktörlerin potansiyel baskınlığı yer alıyor olabilir. Ancak gözlemlenen bir ilişki, farklı pH değerlerinde sentezlenmiş olan parçacıkların ortalama çapları ile şişme karakteristikleri arasında bir ilişki olduğu yönündedir. Ortalama boyut ile orantılı bir şekilde değişen şişme hacmi ve ağırlığı belirli şekillerde yorumlanabilir. Bunlardan ilki, daha büyük boyutlu parçacıkların daha fazla su tutma kapasitesine sahip olmalarıdır. Bir diğer sebep ise daha büyük boyutlu parçacıkların iç yapısında gözeneklerin daha fazla olabileceğidir. Ayrıca daha büyük boyutlu olan parçacıklar şişme sürecinde ortamdaki mekanik gerilimlere daha yoğun bir şekilde maruz kaldıkları için nişasta zincirleri arasında mesafede artış gözlemlenebilir ve su moleküllerinin bu boşluklara girişi daha kolay gerçekleşiyor olabilir (Guigas ve diğ., 2006).

4.2.4 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Değişen sıcaklıklarda sentezlenen nişasta mikrokürelerinin şişme davranışına ilişkin araştırmada, sıcaklık ile hem boyut artışı hem de ağırlık artışı arasında anlamlı ilişkiler gösteren sonuçlar ortaya çıkmıştır. Tek yönlü ANOVA gerçekleştirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p<0,001$). İkili karşılaştırmalarda ise Tukey testinde tüm olası grup karşılaştırmalarında hacim artışları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir (tüm gruplar için $p<0,001$). Ek olarak ağırlık artışlarında ise gerçekleştirilen Tukey testleri doğrultusunda 30°C ile 60 °C arasında ($p<0,001$); 30 °C ile 70°C arasında ($p<0,001$); 40°C ile 60°C arasında ($p<0,001$); 40°C ile 70°C arasında ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. Ortam sıcaklığı arttıkça parçacıklarda şişme kapasitesinde bir azalma

gözlemlenmiştir. Bu durumun nedeni farklı ortam pH'lerinde sentezlenmiş olan parçacıklarda yorumlandığı gibi esasen ortalama boyutlar ile bu şişme kapasiteleri arasındaki fark edilebilir ilişki kaynaklı olabilir. Ortam sıcaklığı arttıkça sentezlenen parçacıklarda boyutun küçülmesi, parçacıkların suyu enkapsüle etme kapasitelerini azaltmış olabilir.

4.2.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Dağınık fazın sürekli faza oranının parçacık morfolojisi üzerindeki etkisinin şişme deneyleri yoluyla incelenmesi üzerine, bulgularda gözle görülür bir korelasyon elde edilmiş ve parçacıkların çapları ile şişme kapasiteleri arasında bariz bir ilişki gözlemlenmiştir. Tek yönlü ANOVA uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir (tüm gruplar için $p < 0,001$). İkili karşılaştırmalarda Tukey testi yapıldığında ise tüm gruplar arasında hem hacim artışı açısından hem de ağırlık artışı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir (tüm gruplar için $p < 0,001$).

Burada da boyutu daha küçük olan parçacıkların şişme kapasitesi daha küçük olarak sonuç vermiş ve bir kez daha küçük boyutlu parçacıklarda difüzyonun ve mekanik gerilim gibi etmenlerin, büyük parçacıklara oranla daha zayıf bir şekilde su enkapsülasyonuna izin verdiğini göstermiştir (Chien, 1979). Ek olarak dağınık fazın sürekli faza oranı, nişasta mikrokürelerde hidrofilitik/hidrofobiklik dengesini doğrudan etkileyeceği için su temelli olan dağınık fazdaki artış parçacık hidrofilitesini arttırmış ve bu nedenle enzim çözeltisinin parçacıkların içerisine difüzyonunu destekleyerek şişme kapasitesinin artmasındaki nedenlerden biri olabilir.

4.2.6 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Şişme Karakteristiğinin İncelenmesi

Emülsiyonun karıştırılma hızı arttıkça parçacıkların şişme kapasitesinde düzenli bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak önceki parametrelerde de olduğu gibi bu azalma esasen parçacıkların ortalama boyutu ile orantılı bir şekilde sonuç vermiştir. Daha yavaş hızlarda karıştırılmış olan parçacıklarda daha büyük boyutlar elde edilmiş ve bu nedenle bu parçacıklarda şişme kapasitesi daha yüksek sonuç vermiştir. Hacim artışında tek yönlü ANOVA yapıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak

anlamli bir fark elde edilmiştir (tüm gruplar için $p<0,001$). Ağırlık artışı için tek yönlü ANOVA analizleri gerçekleştirildiğinde anlamlı farklar bulunmuş olup ($p<0,001$); ikili karşılaştırmalarda Tukey yapılarak 500 RPM ile 700 RPM hızda sentezlenmiş olan parçacıklar dışında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p_{500-900}<0,001$, $p_{500-1000}<0,001$, $p_{700-900}<0,01$, $p_{700-1000}<0,001$, $p_{900-1000}<0,001$).

4.3 Bozunum Karakteristiklerinin İncelenmesi

4.3.1 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteriştiğinin İncelenmesi

Genel anlamda bozunum süreleri incelendiğinde nişasta konsantrasyonu arttıkça parçacıkların bozunma süresinin uzadığı gözlemlenmiştir. Sentezlenen mikrokürelerdeki yüksek nişasta konsantrasyonları, çok faktörlü mekanizmaların karmaşık etkileşimine atfedilen bir olgu olan bozunma sürelerinin dikkate değeri bir şekilde uzamasını göstermektedir. Tek yönlü ANOVA analizinden elde edilen sonuçlarda anlamlı fark elde edilmiştir ($p<0,001$) ve ikili karşılaştırmalarda Tukey testi uygulandığında ağırlıkça %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş mikroküreler arasında ($p<0,001$); %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %7,5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş mikroküreler arasında ($p<0,001$); %3 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %10 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş mikroküreler arasında ($p<0,001$); ağırlıkça %5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile ağırlıkça %7,5 polimer konsantrasyonunda sentezlenmiş mikroküreler arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark sergiledikleri sonucu elde edilmiştir.

Öncelikle, daha yüksek nişasta konsantrasyonlarının neden olduğu mikroküresel matrisin yoğunlaşması, hem su nüfuzunu hem de enzim difüzyonunu engelleyen, gözenek boyutunun azalmasıyla karakterize edilen bir ağ oluşturmaktadır (Chien, 1979). Bu kısıtlama bozunabilir bileşenlere erişimi kısıtlayarak bozunma sürecini yavaşlatmaktadır. Eř zamanlı olarak, artan nişasta konsantrasyonu, nişasta yapısı içindeki enzimatik bozunmaya karşı dirençleriyle bilinen kristalin bölgelerin artan bir

kısmını ortaya çıkararak bozunma kinetiğinin genel olarak geciktirilmesine daha da katkıda bulunmaktadır.

Enzim-substrat etkileşimlerinin karmaşıklığı devreye girerek, bu sayede artırılmış nişasta içeriği potansiyel olarak mevcut bozunma bölgelerini dağıtıp onları enzimatik eylem için daha az erişilebilir hale getirmektedir. Ayrıca, bazı araştırmacıların önerdiği gibi, yüksek nişasta konsantrasyonunun bozunma sürecine dahil olan belirli enzimler üzerindeki önleyici etkisi, enzimatik etkinliği engelleyen ve dolayısıyla bozunma sürecini uzatan ek bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır (Suhasini ve diğ., 2014).

Artan nişasta içeriğinin kolaylaştırdığı artırılmış hidrojen bağıyla karakterize edilen, mikroküre matrisi içindeki moleküller arası etkileşimler, parçalanmaya karşı daha dirençli bir yapının yaratılmasına katkıda bulunmaktadır. Bu incelikli moleküller arası etkileşimler, yüksek nişasta konsantrasyonlarıyla sentezlenen mikrokürelerdeki bozunma sürelerinin gözlenen uzamasına toplu olarak katkıda bulunmaktadır (Bergel ve diğ., 2018).

4.3.2 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Parametreler arasında gözlemlenen ters korelasyon, mevcut literatürdeki iyi desteklenen bulgularla uyumludur. Tek yönlü ANOVA uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir ($p < 0,001$). İkili karşılaştırmalarda Tukey testi yapıldığında hacimce %1 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile hem hacimce %4 konsantrasyon içeren grup ($p < 0,001$) hem de hacimce %20 konsantrasyon içeren grup ($p < 0,001$) arasında; hacimce %4 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler ile hacimce %20 çapraz bağlayıcı konsantrasyonunda sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlenmiştir.

Bu olguya ilişkin çeşitli makul açıklamalar, destekleyici referanslarla açıklanabilmektedir. İlk olarak, artan çapraz bağlanma, mikroküreler içinde daha yoğun ve daha dirençli bir ağ oluşumunu tetikleyerek enzimatik erişimi engellemektedir. Özellikle amilaz gibi enzimler için bu sınırlı erişilebilirlik, nişasta zincirlerini parçalama kapasitesinin azalmasına yol açarak sonuç olarak bozunma

sürecini yavaşlatmaktadır (Liu ve diğ., 2013). Çapraz bağlanmanın su nüfuzu üzerindeki etkisi, yoğunlaştırılmış çapraz bağlanmanın mikrokürelerin şişme kabiliyetini kısıtlaması nedeniyle ikinci bir açıklayıcı faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sınırlama, parçalayıcı enzimlerin çekirdeğe difüzyonunu engelleyerek kısıtlı enzimatik erişime ve dolayısıyla uzun süreli bir bozunma zaman çizelgesine neden olmaktadır (Chien, 1979). Ek olarak, bazı çapraz bağlayıcılar mikroküreler içindeki nişasta kristalinitesini değiştirerek yapısal direnci artırabilir ve nişasta matrisini enzimatik bozunmaya karşı daha dirençli hale getirebileceği düşünülmektedir. Ampirik kanıtların sentezinden elde edilen bu bilgiler, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile nişasta mikrokürelerinin bozunma kinetiği arasında gözlemlenen ilişkiyi yöneten karmaşıklıkların kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır (Bendoraitiene ve diğ., 2018).

Değişen çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında sentezlenen nişasta mikrokürelerinin bozunma özellikleri incelendiğinde, çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artmasıyla birlikte bozunma oranında bir azalma olduğunu gösteren bir sonuç ortaya çıkmıştır. Bu durum, çapraz bağlanmanın artması, enzimatik erişimin kısıtlanması ve aynı zamanda su penetrasyonunun engellenmesi gibi karşıt etkilerin dengesi, farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında tutarlı bir bozunma oranına yol açan mekanizmadan kaynaklanmaktadır (Koo ve diğ., 2010).

4.3.3 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Bu parametre değerlendirilirken önceki incelenen parçacık karakteristiklerine bakıldığında, farklı pH değerlerinde sentezlenmiş olan parçacıkların ortalama boyutları, şişme kapasiteleri ve bozunum süreleri arasında benzer bir örüntü gözlemlenmiştir. . Tek yönlü ANOVA uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir ($p < 0,01$). İkili karşılaştırmalarda Tukey testi yapıldığında ise ortam pH'si 7'de tutulan grup ile ortam pH'si 9'da tutulan grup arasında ($p < 0,01$); ortam pH'si 7'de tutulan grup ile ortam pH'si 10'da tutulan grup arasında ($p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. Bu durumun nedeni, epiklorohidrinin asetilenmiş dinişasta fosfat zincirleri arasında kompakt bir bağ oluşturarak parçacıkların sentez aşamasında mekanik ve kimyasal dayanımını

etkilemesi olabilir. Çünkü farklı pH değerlerinde bu etkileşimin verimi de etkileneceği için boyutun küçülmesi veya büyümesi parçacıkların içinde bulundukları çözeltiyi absorbe etmelerindeki kapasiteyi etkilemiş ve bu nedenle bozunuma neden olan enzimin etkisini manipüle etmiştir. Çapraz bağlayıcı reaksiyonunun daha yoğun gerçekleştiği parçacıklarda parçacık boyutunda azalma gözlemlenmiştir ve bu durum da onların parçacık içine su difüzyonunu düşürmüş olabilir (Chien, 1979). Bu nedenle daha küçük boyutlu parçacıklarda amilaz çözeltisi parçacık içine daha az absorbe edilerek bozunum sürecini yavaşlatmış olabilir.

4.3.4 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Tek yönlü ANOVA testi yapıldığında anlamlı sonuç elde edilmiş olup ($p<0,05$) ikili karşılaştırmalarda Tukey testi doğrultusunda 30°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikroküreler ile 40°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,001$); 30°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikroküreler ile 60°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,001$); 30°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikroküreler ile 70°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikroküreler arasında ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. Değişen ortam sıcaklıklarında sentezlenen nişasta mikrokürelerinin bozunma özelliklerine incelendiğinde; genel anlamda parçacıklarda sentez sırasında ortam sıcaklığı artışı ile parçacık boyutunda azalma gözlemlenmiş ve bozunum hızında da bu durum ile benzer örüntüde bir artış gözlemlenmiştir. Bu durumun temel sebepleri arasında daha küçük boyutlu parçacıklarda yüzey alanının hacme oranı daha yüksek olduğu için, içerisinde bulunduğu enzim çözeltisinin daha yüksek oranda parçacık ile etkileşiminin gerçekleşmesi ve bu nedenle bozunum süresinin kısılması olabilir (Kang ve diğ., 2007).

4.3.5 Dağılık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Bozunum deneylerinde parçacık morfolojisi üzerinde dağılmış fazın sürekli faza etkisinin araştırılması üzerine, bu orandaki bir artışın bozunma süresindeki bir azalma ile ilişkili olduğunu ortaya koyan göze çarpan bir eğilim ortaya çıkmıştır. Tek yönlü ANOVA analizleri yapıldığında anlamlı fark elde edilmiş ($p<0,05$); ikili

karşılaştırmalarda Tukey testi yapıldığında ise tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir (tüm gruplar için $p < 0,001$). Dağınık fazın sürekli faz içerisindeki oranının artmış olması parçacıkların boyutunu ve şişme kapasitesini arttırdığı için, içinde bulunduğu amilaz çözeltisini daha hızlı içine alarak bozunumu da hızlandırmış olabilir. Ek olarak dağınık fazın sürekli faza oranı, nişasta mikrokürelerde hidrofiliklik/hidrofobiklik dengesini doğrudan etkileyeceği için su temelli olan dağınık fazdaki artış parçacık hidrofilitesini arttırmış ve bu nedenle enzim çözeltisinin parçacıkların içerisine difüzyonunu destekleyerek şişme kapasitesini ve de bozunum hızını da arttırmış olabilir (Chien, 1979). Aynı zamanda bu yorumları destekleyici SEM görselleri, dağınık fazın sürekli faza oranı %21’de tutularak sentezlenmiş olan mikroküreler için Şekil 3.30’da; dağınık fazın sürekli faza oranı %33’te tutularak sentezlenmiş olan mikroküreler için Şekil 3.29’da gösterilmiştir. Bu şekillerde, dağınık fazın sürekli faza oranı arttıkça parçacıkların gözenekli ve pürüzlü yapısının daha fazla belirginleştiği gözlemlenebilmektedir.

4.3.6 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların Bozunum Karakteristiğinin İncelenmesi

Tek yönlü ANOVA analizi uygulandığında anlamlı fark elde edilmemiştir. Bozunum deneylerinde artan karıştırma hızlarının azalan bozunma süresiyle ilişkili görüldüğü fark edilen eğilim, belirli nedenlerle açıklanabilir. Bunlardan ilki, karıştırma hızı arttıkça parçacıklarda gözlemlenen boyut azalması olabilir. Daha küçük boyutlu parçacıkların yüzey alanı/hacim oranı daha fazla olduğu için içinde bulundukları çözeltideki amilaz enziminin parçacıklarla daha yoğun etkileşim sağlamasına neden olabilir. Ek olarak karıştırma hızı arttıkça parçacıkların sentez aşamasında artan bir mekanik kuvvete maruz kalmış olmaları, nişasta zincirleri arasında kopukluklara neden olarak içinde bulundukları çözeltinin difüzyonunu arttırmış ve bu nedenle sadece dış yüzeyden bozunma yerine iç yapıdan da bozunmaya neden olmuş olabilir (Chien, 1979). Son bir neden olarak, parçacık sentezi sırasında yüksek karıştırma hızı emülsiyon içerisinde hava baloncuğu oluşumu ve bu nedenle parçacıklara oksijen girişine neden olarak sonrasında maruz bırakıldıkları enzim çözeltisinin parçacık içine nüfuzunu arttırmış olabilir.

4.4 İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

4.4.1 Farklı Polimer Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Nişasta mikrokürelerindeki nişasta içeriğinin artmasıyla birlikte ilaç yüklenme veriminde azalma gözlemlenmiştir. Tek yönlü ANOVA uygulanmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Prensip olarak, nişasta konsantrasyonundaki artışın, gözenek boyutları azalmış, daha yoğun bir mikroküre ağına neden olarak suyun içindeki doksorubisinin difüzyonunu engellediği düşünülebilir. Mikrokürenin iç kısmındaki bu kısıtlı hareketlilik, ilacın yüklenme verimini azaltan önemli bir engel görevi görebilir (Rodrigues ve diğ., 2012). Artan nişasta içeriği, nişastanın doğasında bulunan kristalli bölgelerin artırılmış bir kısmını açığa çıkararak bu bölgelerin, hem suya karşı geçirgenliğini artırırken, doksorubisin moleküllerine karşı geçirgenliğin azalmasına neden olarak ilaç difüzyonuna yönelik engeli arttırmış olabilir (Prajapati ve diğ., 2015). İyonik etkileşimleri veya kompleksleşmeyi kapsayan doksorubisin ve nişasta bileşenleri arasındaki moleküler etkileşimler, ilaç hareketliliğini daha da kısıtlayarak parçacığın ilacı enkapsüle etmesini engelliyor olabilir (Biswas ve diğ., 2014). Ayrıca artırılmış nişasta içeriği, fiziksel bir bariyer olarak kalıcı bir matrisin varlığını vurgulayarak ve sonuç olarak genel ilaç salınımını geciktirerek, difüzyondan ziyade erozyonu destekleme eğiliminde olabilir (Soares ve diğ., 2010).

4.4.2 Farklı Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonlarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Nişasta mikrokürelerinde çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artmasıyla birlikte ilaç yüklenme veriminin azaldığı gözlemlenmiştir. Ek olarak gerçekleştirilen Tek yönlü ANOVA'da anlamlı fark bulunmamıştır. Bu eğilime neden olan temel faktörlerden biri, mikroküre ağındaki difüzyon mekanizmaları üzerindeki etki olarak düşünülebilir. Çünkü yüksek çapraz bağlanma, yapıyı yoğunlaştırarak daha küçük gözenekler oluşturur ve ilaç molekülleri için daha dolambaçlı bir yol oluşturarak etkin difüzyonunu engeller (Tangri ve diğ., 2011). Aynı zamanda, çapraz bağlanmanın artması nedeniyle yüzey özelliklerinde meydana gelen değişiklikler, mikrokürelerin ilaç içeren su bazlı çözelti ortamı ile etkileşimlerini etkileyerek ilacın difüzyon

katsayısını daha da düşürebilir. Ek olarak, şişme davranışı ile ilacın çözünmesi arasındaki etkileşimin de önemli olduğu bilinmektedir. Çapraz bağlanmanın bir sonucu olarak sınırlı su alımı, suyun mikroküre çekirdeğine nüfuz etmesini engeller, çözünme hızını azaltır ve ardından ilacın enkapsüle edilmesini yavaşlatır (Hanna ve diğ., 2023). Ek olarak, ortamdaki çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artması, reaksiyonun daha yoğun gerçekleşmesine neden olarak mekanik olarak dayanımı yüksek parçacıklar elde edilmesine neden olmuş ve daha dirençli olan bu parçacıkların doksorubisin molekülleri ile yüklenme sürecini zayıflamış olabilir.

4.4.3 Farklı Ortam pH'lerinde Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Emülsiyon polimerizasyonunda farklı ortam pH koşulları altında sentezlenen nişasta mikrokürelerinden ilaç yüklenme verimleri araştırıldığında, pH değeri arttıkça parçacıkların ilaç yüklenme veriminin de arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca gruplar arasında Ek olarak gerçekleştirilen Tek yönlü ANOVA'da anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$) ve ikili karşılaştırmalarda Tukey testi uygulandığında pH 8'da tutularak sentezlenmiş grup ile pH 10'da sabit tutularak sentezlenmiş olan grubun ($p<0,05$); pH 7'de tutularak sentezlenmiş grup ile pH 10'da sabit tutularak sentezlenmiş olan grubun ($p<0,05$) ikili karşılaştırması istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. Bu durumun temelinde artan pH değeri ile birlikte parçacık boyutunda bir azalma gözlemlenmiş olması ve bu durum kaynaklı ilaç çözeltisine yükleme esnasında parçacıkların temas ettiği yüzey alanı/hacim oranı daha fazla olduğu için daha yüksek oranda ilacı enkapsüle etmiş olması olarak açıklanabilir (Ashrafizadeh ve diğ., 2023).

4.4.4 Farklı Ortam Sıcaklıklarında Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirmeleri Ek olarak gerçekleştirilen Tek yönlü ANOVA'da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Farklı ortam sıcaklıklarında sentezlenmiş olan mikrokürelerde, sıcaklık artışı ile birlikte viskozite ve ortamdaki reaktanların termal enerjilerinin artması kaynaklı boyutta küçülme ve bu küçük parçacıkların kompakt bir yapı sergilemesi nedeniyle bulundukları ortamdaki suyun difüzyonuna daha az izin vererek şişme kapasitesinde de azalışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Barakat ve diğ., 2011). Bu etmenler neticesinde, daha küçük boyutlu

parçacıkların, ilaç çözeltisinde de difüzyona daha az izin vermesi kaynaklı parçacıkların ilaç yüklenme veriminde azalma gözlemlendiği söylenebilir.

4.4.5 Dağınık Fazın Sürekli Faza Oranları Değiştirilerek Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin İncelenmesi

Ek olarak gerçekleştirilen Tek yönlü ANOVA’da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Dağınık fazın sürekli faza oranı artırıldıkça parçacıkların boyutunda, şişme kapasitesinde ve bozunum hızlarında da bir artış gözlemlendiği önceki kısımlarda belirtilmişti. Bu duruma ek olarak ilaç yüklenme verimi analiz edildiğinde, dağınık fazın sürekli faza oranı arttıkça yüklenme veriminde de artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun temel nedeni diğer parametrelerle ilintili bir şekilde açıklanabilir. Burada dağınık fazın sürekli faza oranı arttırıldığında daha büyük boyutlu parçacıklar elde edilmiş ve parçacıklar içerisindeki polimer zincirleri arası boşlukların büyük boyutlu parçacıklarda daha fazla olması nedeniyle ilaç çözeltisinin parçacığın içine difüzyonu artarak daha verimli bir şekilde yüklenme işleminin gerçekleştiği düşünülmektedir.

4.4.6 Emülsiyonun Farklı Hızlarda Karıştırılması İle Sentezlenmiş Parçacıkların İlaç Yüklenme Veriminin ve İlaç Salım Karakteristiğinin İncelenmesi

Emülsiyon karıştırma hızının, nişasta mikrokürelerinden ilaç yüklenme verimi ve ilaç salımı üzerindeki önemli etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak gerçekleştirilen Tek yönlü ANOVA’da anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$) ve ikili karşılaştırmalarda Tukey testi uygulandığında 500 RPM hızda karıştırılarak elde edilen grubun ile 1000 RPM hızda karıştırılarak elde edilen grubun arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,01$). Karıştırılma hızındaki artış ile birlikte ilaç yüklenme miktarında da salımda da bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum parçacıklarda karıştırma hızı arttıkça, sentez sırasında reaktanların termal enerjinin artması kaynaklı etkileşimin daha yoğun gerçekleşerek daha kompakt iç yapıya sahip parçacıkların sentezlenmiş olması ile açıklanabilir (Elfstrand ve diğ., 2006). Çünkü daha kompakt iç yapılı parçacıklar, bulundukları çözeltinin parçacık içerisine difüzyonunu azaltarak hem yükleme sırasında ilacın parçacık içine enkapsüle edilmesini hem de salım sürecinde enkapsüle etmiş oldukları ilacı ortama

bırakmalarını da yavaşlatacaktır. Bu kompakt yapı, parçacıkların ortamdaki yüzey alanı/hacim oranının daha yüksek olması kaynaklı beklenen hızlı difüzyonun önüne geçerek salım sürecini yavaşlatmış olabilir.

4.5 Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi

Canlılık analizlerinde parçacıkların ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş formları için L-929 hücre hattına etkileri analiz edildiğinde, ilaç yüklenmemiş parçacıklarda farklı parametrelerde sentezlenmiş olan örnekler arasında bir trend gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça canlılığı azaltıcı etki ettiği gözlemlenmiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %1'de tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerden ilaç yüklenmemiş formları için canlılık analizi $110,02 \pm 6,86$ olarak elde edilirken, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu hacimce %20'de tutularak sentezlenmiş olan mikroküreler için canlılık verisi $107,25 \pm 8,92$ olarak elde edilmiştir. Bu durum, kullanılan çapraz bağlayıcı olan epiklorohidrinin, L-929 hücre hattına sito toksik etkisi ve bulunduğu ortamda hücreler üzerindeki öldürücü etkisi ile açıklanabilir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna ek olarak polimer konsantrasyonu, ortam pH'ı, ortam sıcaklığı ve emülsiyon karıştırma hızı parametrelerinde yapılan değişikliklerle sentezlenmiş olan mikrokürelerin ilaç yüklenmemiş formları için canlılık analizi yapılmış ve benzer bir trend gözlemlenmiştir. Canlılık analizleri ile gerçekleştirilen Tek yönlü ANOVA'da istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı farklar özellikle DOX yüklenmiş gruplar ile kontrol grupları arasında elde edilmiştir. İkili karşılaştırmalarda polimer konsantrasyonu, ortam pH'si ve dağınık fazın sürekli faza oranında Tukey testi uygulanırken; çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, ortam sıcaklığı ve emülsiyonun karıştırılma hızı için Tukey testleri yapılmıştır.

Polimer konsantrasyonu parametresinin etkisini gözlemlemek için yapılan deneylere göre; ağırlıkça %3 nişasta çözeltisi ile sentezlenmiş olan mikrokürelerden $105,70 \pm 3,41$ canlılık, ağırlıkça %10 polimer konsantrasyonu ile sentezlenmiş olan mikrokürelerde ise $113,53 \pm 5,54$ bir canlılık gözlemlenmiştir. Ortam pH'sının etkisini incelemek için yapılan deney sonuçlarına göre; ortam pH'si 7 iken ilaç yüklenmemiş parçacıklarda hücre canlılığı $106,32 \pm 3,64$ olarak elde edilmiş ortam

pH'si 10'da tutularak sentezlenmiş olan mikrokürelerde bu canlılık $112,23 \pm 1,43$ olarak gözlemlenmiştir. Ortam sıcaklığı değiştirilerek sentezlenmiş mikrokürelerde ise 30°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikrokürelerin ilaç yüklenmemiş formlarındaki hücre canlılığı $108,94 \pm 6,45$ olarak sonuç verirken 70°C ortam sıcaklığında sentezlenmiş olan mikrokürelerin canlılık verisi $113,13 \pm 5,53$ olarak elde edilmiştir. Emülsiyonun karıştırılma hızının etkisini gözlemlemek için yapılan deneylerde emülsiyon 500 RPM'de karıştırıldığında elde edilen parçacıklardaki canlılık $106,12 \pm 4,53$ olarak elde edilirken, 1000 RPM'de karıştırılarak sentezlenen mikrokürelerin canlılığı $112,03 \pm 7,44$ olarak gözlemlenmiştir. Bu parametrelerin hepsinde değer arttırıldıkça, hücre canlılığının arttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu parametrelerin hepsinde artan polimer konsantrasyonu, artan ortam pH'si, artan ortam sıcaklığı ve emülsiyonun karıştırılma hızı arttıkça parçacık boyutunda küçülme gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ostwald etkisi ile ilişkilendirilebilir. Ostwald etkisi nedeniyle küçük boyutlu parçacıklarda nişasta zincirleri daha kolay koparak hücreleri daha kısa sürede daha çok besleyebilmektedir ve bu nedenle parametre değerlerindeki artışla birlikte boyuttaki azalış da bu örneklerdeki canlılığını artmış olduğunu göstermektedir (Taylor ve diğ., 1998).

İlaç yüklenmiş olan mikrokürelerde ise sentez parametrelerinden bağımsız olarak $3,10 \pm 0,99$ ile $9,83 \pm 1,01$ oranlarınca canlılık sonuçları elde edilmiştir. Bu durumun parametreden bağımsız olmasının nedeni ise çok kuvvetli bir kanser karşıtı olan doksorubisinin, hücreler üzerindeki toksistesinin baskın gelmesidir (Carvalho ve diğ., 2009).

4.6 Standart Örnek Olarak Belirlenmiş Mikrokürenin Yüzey Yükünün İncelenmesi

Parçacıkların yüzey yükünün ölçülmesinde zeta potansiyeli önemli indikasyonları ortaya çıkarmaktadır. Çalışma boyunca standart parçacık olarak belirlenmiş olan örneğin zeta potansiyelinin ortalama $-17,41 \pm 0,48$ mV ölçülmesi mikroküreler arasında orta düzeyde bir itme kuvvetinin olduğunu göstermekte (Kang ve diğ., 2002) ve parçacıkların orta düzeyde stabilizeye ve kısmi agregre olma riskinin varlığına işaret etmektedir (Butterworth ve diğ., 1995).

Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu yönteminde, parçacık sentezi sırasında hem boyut kontrolünün sağlanabilmesi hem de parçacık stabilizasyonun artırılması için sürfaktanlar yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Sürfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonunda ise parçacık stabilizasyonu, mekanik karıştırma veya kullanılan polimerin kendisinden kaynaklı olarak elde edilebilmektedir (Tauer ve diğ., 1999). Bu çalışmada, polimer kaynağı olarak asetillenmiş dinişasta fosfat kullanılması nedeniyle sürfaktana ihtiyaç duyulmamıştır. ADP'deki fosfat grupları (Lewandowicz ve diğ., 2022), ortam pH'sinin de bazik olmasının yarattığı etki ile birlikte negatif parçacıklar sentezlenmesine neden olarak bu parçacıkların stabilizasyon için herhangi bir sürfaktana ihtiyaç duymadan birbirlerine itici kuvvet uygulamalarına ve hali hazırda stabil parçacıkların sentezlenmesine yol açmıştır. Bu nedenle de parçacıkların yüzey yükü ölçümlendiğinde negatif bir değer elde edilmiştir. Elde edilen bu sonucun artıları arasında bu yöntem ile parçacık sentezlenmesini daha düşük maliyet ve daha düşük toksisiteye neden olacağı verilebilir.

Tüm parçacıklar incelendiğinde, her bakılan parametre ve gerçekleştirilen deneylerin parçacıklardaki etkisi Çizelge 3.7'de özetlenmiştir. Bu tablo gözden geçirildiğinde dağınık fazın sürekli fazla oranındaki artışın, parçacıkların ortalama boyutunda da bir artışa neden olarak, bu parçacıklardaki polimer zincirleri arası boşlukların fazlalığı nedeniyle şişme kapasitesinde de bir artışa neden olduğu ve difüzyona daha çok izin verdiği için içinde bulundukları amilaz çözeltisinin de etkisini daha çok göstermesine neden oldukları için bozunum hızlarının da arttığı gözlemlenmiştir. Bu duruma ek olarak aynı sebepten ötürü, ilaç yükleme verimlerinde de bir artış gözlemlenmiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonun etkisi analiz edildiğinde ise dağınık fazın sürekli fazla oranının tam tersi bir sonuç elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça elde edilen parçacıkların boyutları azalmış, bu parçacıklar içerisindeki polimer zincirleri birbirlerine daha yakın konumlandığından dolayı difüzyona daha az izin vererek şişme kapasitesinde ve bozunum hızında bir azalış sergilemişlerdir. İlaç yükleme verimlerinde de aynı trend kaynaklı bir azalma gözlemlenmiştir. Emülsiyonun karıştırılma hızı ve ortam sıcaklığı parametreleri analiz edildiğindeyse, ikisinde de artış gerçekleşmesi durumunda ortalama boyutlarda ve dolayısıyla şişme kapasitelerinde de bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak bu parçacıkların bozunum hızlarında bir artış göze çarpmıştır. Bu artışın temel sebebi ise

parçacıkların içinde bulundukları amilaz çözeltisinde yüzey alanı/hacim oranının daha fazla olmasından kaynaklı ister istemez çözeltinin temas ettiği yüzeyin daha yoğun olmasıdır. Son olarak, parçacıkların ortalama boyutlarındaki bu azalma, şişme kapasitesindeki düşüklüğe neden olmuş ve bu nedenle difüzyonun daha az olduğunu göstererek su ortamında ilaç yükleme verimini de düşürmüştür. Polimer konsantrasyonunda ise konsantrasyon arttıkça parçacık boyutlarında bir azalma gözlemlenmiş ancak tam tersi yönde bir etki ile şişme kapasitesinde artış gözlemlenmiştir. Bu durumun altında yatan temel sebep, nişasta zincirlerinin suyu absorbe etmeye karşı olan eğilimleri olarak belirtilebilir. Ancak bu parçacıklar bozunum hızı analizi için kullanılmış amilaz çözeltisi ve ilaç yükleme verimi için kullanılmış olan doksorubisin çözeltisi için aynı absorplama eylemini göstermediklerinden dolayı bu hızlarda azalma gözlemlenmiştir. Son olarak ortam pH'si değiştirilerek sentezlenmiş mikroküreler analiz edildiğinde ise ortam pH'si arttıkça parçacıkların ortalama boyutunda ve şişme kapasitesinde bir azalma gözlemlenirken; bozulma hızı ve ilaç yükleme veriminde bir artış gözlemlenmiştir. Bu durumun altında yatan temel sebepler arasında parçacıkların şişme kapasitesini azaltacak şekilde difüzyona engel olacak formasyonlarının, bozunum hızında kullanılan amilaz çözeltisinin temas ettiği yüzey alanının üstesinden gelememesi olarak açıklanabilir. Aynı şekilde ilaç yükleme veriminde doksorubisin çözeltisinin parçacık içine alımı daha kolay olmuş olabilir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada nişasta mikroküreler sentezlenirken altı farklı parametrenin parçacık morfolojisi, şişme kapasiteleri, bozunum süreleri, ilaç yüklenme verimleri ve canlılığa etkilerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Artan polimer konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, ortam sıcaklığı, ortam pH'si ve emülsiyonun karıştırılma hızı ile parçacık boyutunda azalma gözlemlenmiştir. Daha kompakt yapıda elde edilen bu parçacıklarda ortam pH'si, emülsiyonun karıştırılma hızı, ortam sıcaklığı ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça şişme kapasitesinde azalma gözlemlenirken polimer konsantrasyonu arttıkça; parçacık içerisindeki artan nişasta miktarının suyu daha fazla içine alma eğilimi sebebiyle şişme kapasitesinde artış gözlemlenmiştir. Ortam pH'si, emülsiyonun karıştırılma hızı ve ortam sıcaklığı arttıkça parçacıklar daha küçük boyutlu elde edilerek artan yüzey alanı-hacim oranı kaynaklı bozunum sürelerinde kısalma gözlemlenmiştir. Ancak daha yoğun parçacıklar elde edilmesini sağlamış olan çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve polimer konsantrasyonundaki artış, bozunum süresini uzatmıştır. İlaç yüklenme verimleri analiz edildiğinde ise dağınık fazın sürekli faza oranı artırılarak sentezlenen parçacıklarda ve ortam pH'si artırılarak sentezlenen parçacıklarda yüklenme veriminin arttığı gözlemlenmiştir. Parçacıkların hepsinde canlılık analizi gerçekleştirildiğinde, ilaç yüklenmemiş olan parçacıkların barındırdıkları nişasta ile hücreleri besleyerek canlılık yüzdesini arttırdıkları ve ilaç yüklü olan parçacıkların ise ortama doksorubisin salımını gerçekleştirerek toksik etkiye neden olduğu gözlemlenmiştir.

Bu araştırma, geniş bir boyut aralığında (200 µm ila 2600 µm) minimum toksisiteye sahip nişasta bazlı mikrokürelerin başarılı sentezini sunmuş ve çeşitli tıbbi ve kozmetik uygulamalar için önemli bir potansiyel göstermiştir. Özellikle adenomyozis ve hemoroid tedavilerinde hasta konforunu ve tedavi etkinliğini artıracak olan 600 – 900 µm boyut aralığında biyobozunur, biyoyumlu, yenilebilir ve minimal toksisiteye sahip mikroküreler başarıyla sentezlenmiştir. Nişasta mikroküreleri kontrollü ve

sürekli ilaç salınımı sunarak hasta uyumunu artırmakta ve yan etkileri en aza indirmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, biyouyumlulukları ve değiştirilebilir yüzey özellikleri, onları hedefe yönelik tedavi ve rejeneratif tıp için uygun hale getirmektedir.

Belirli boyut aralıkları (200-300 μm , 300-450 μm , 450-550 μm , 650-700 μm , 700-850 μm , 1000-1200 μm , 1400-1500 μm , 2000-2600 μm) embolizasyondan hücre tedavisine ve minimal invaziv ameliyatlara kadar hassas uygulamalara olanak tanıyarak boyut kontrolünün önemini vurgulamıştır.

Şişme, bozunma ve ilaç salınım özelliklerinin ayrıntılı incelenmesi ve L-929 hücre hattında canlılık değerlendirmelerinin yanı sıra, bu mikroküreler özel ilaç dağıtımı, doku mühendisliği ve tanısal görüntüleme için özelleştirilebilir özellikler sergilemiştir. Şişme özellikleri, kontrollü ilaç salınımı ve gelişmiş doku entegrasyonu potansiyelini ortaya koyarak hücre tedavisi ve doku mühendisliği uygulamalarına işaret etmektedir. Ek olarak şişme kapasitelerindeki genel yükseklik sayesinde botoks, dolgu malzemeleri gibi kozmetik uygulamalarda da kullanılabilecek bir ürün olarak umut vaad etmektedir.

Yüksek doksorubisin yüklenme verimleri, terapötik etkileri en üst düzeye çıkarmayı ve hasta sonuçlarını iyileştirmeyi amaçlayan kanser tedavisi gibi tedaviler için önemli bir potansiyele işaret etmektedir.

Hücre canlılığı deneyleri ilaçsız mikrokürelerin yüksek biyouyumluluğuna işaret ederken, ilaç yüklü mikroküreler toksisiteyi azaltmak için ilaç salım profillerini optimize etme ihtiyacının altını çizmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sentezlenen nişasta mikrokürelerin, toksik olmama, yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir olma avantajı ile piyasada bulunmayan boyut aralıklarında, güvenli, verimli ve kontrollü dağıtım mekanizmaları sunarak hem tıbbi hem de kozmetik alanlarda geniş uygulanabilirlik potansiyeli taşıyacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agnihotri, S. A., & Aminabhavi, T. M.** (2005). Development of novel interpenetrating network gellan gum-poly (vinyl alcohol) hydrogel microspheres for the controlled release of carvedilol. *Drug development and industrial pharmacy*, 31(6), 491-503.
- Andreozzi, G., Lorenzoni, V., Bargellini, I., Cioni, R., & Turchetti, G.** (2023). Drug-eluting Microspheres Compared to Conventional Transarterial Chemoembolization as First Line Treatment for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Single-center Retrospective Cost-utility Analysis. *Cardiovascular and Interventional Radiology*, 46(3), 319-326.
- Arpicco, S., Battaglia, L., Brusa, P., Cavalli, R., Chirio, D., Dosio, F., ... & Ceruti, M.** (2016). Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 298-312.
- Ashrafizadeh, M., Hushmandi, K., Mirzaei, S., Bokaie, S., Bigham, A., Makvandi, P., ... & Orive, G.** (2023). Chitosan-based nanoscale systems for doxorubicin delivery: Exploring biomedical application in cancer therapy. *Bioengineering & Translational Medicine*, 8(1), e10325.
- Asua, J. M.** (2004). Emulsion polymerization: from fundamental mechanisms to process developments. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(5), 1025-1041.
- Atyabi, F., Manoochehri, S., Moghadam, S. H., & Dinarvand, R.** (2006). Cross-linked starch microspheres: Effect of cross-linking condition on the microsphere characteristics. *Archives of pharmacal research*, 29, 1179-1186.
- Badr, I., Lahmar, H., Kaewsaneha, C., Saidi-Besbes, S., & Elaissari, A.** (2018). Preparation and characterization of poly (methyl methacrylate) particles by combined dispersion and emulsion polymerization. *Macromolecular Research*, 26, 819-824.
- Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M., & Jadidi-Niaragh, F.** (2017). Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunology letters*, 190, 64-83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.015>.
- Bai, X., Dong, Z., Wu, X., Tong, J., & Zhou, J.** (2013). Changes in crystalline structure of microspheres of corn starch and amylose under isothermal and temperature cycling treatments. *Industrial crops and products*, 51, 220-223.

- Baldwin, J. J., Raab, A. W., Mensler, K., Arison, B. H., & McClure, D. E.** (1978). Synthesis of (R)-and (S)-epichlorohydrin. *The Journal of Organic Chemistry*, 43(25), 4876-4878.
- Balmayor, E. R., Tuzlakoglu, K., Azevedo, H. S., & Reis, R. L.** (2009). Preparation and characterization of starch-poly- ϵ -caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta biomaterialia*, 5(4), 1035-1045.
- Barakat, N. S., & Almurshedi, A. S.** (2011). Design and development of gliclazide-loaded chitosan microparticles for oral sustained drug delivery: in-vitro/in-vivo evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(2), 169-178.
- Bendoraitiene, J., Lekniute-Kyzike, E., & Rutkaite, R.** (2018). Biodegradation of cross-linked and cationic starches. *International journal of biological macromolecules*, 119, 345-351.
- Benoit, J. P., Faisant, N., Venier-Julienne, M. C., & Menei, P.** (2000). Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications. *Journal of controlled release*, 65(1-2), 285-296.
- Bergel, B. F., da Luz, L. M., & Santana, R. M. C.** (2018). Effect of poly (lactic acid) coating on mechanical and physical properties of thermoplastic starch foams from potato starch. *Progress in Organic Coatings*, 118, 91-96.
- Biswas, S., Nahar, K., Hossain, M. K., Bhuiyan, J. R., Abdullah-Al-Mamun, M., & Rana, M. S.** (2014). Formulation design and in-vitro release profile evaluation of theophylline hydrochloride sustained release tablet using different polymer at different concentration. *J. Chem. Pharm. Res*, 6(8), 12-23.
- Borden M, Attawia M, Laurencin CT.** (2002). The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: in vitro osteoconductivity studies. *J. Biomed. Mater. Res.* 61:421–29.
- Borden M, El-Amin SF, Attawia M, Laurencin CT.** (2003). Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials* 24:597–609.
- Builders, P. F., & Arhewoh, M. I.** (2016). Pharmaceutical applications of native starch in conventional drug delivery. *Starch-Stärke*, 68(9-10), 864-873.
- Butterworth, M. D., Corradi, R., Johal, J., Lascelles, S. F., Maeda, S., & Armes, S. P.** (1995). Zeta potential measurements on conducting polymer-inorganic oxide nanocomposite particles. *Journal of colloid and interface science*, 174(2), 510-517.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I.** (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current medicinal chemistry*, 16(25), 3267-3285.

- Chen, W. H., Chen, Q. W., Chen, Q., Cui, C., Duan, S., Kang, Y., ... & Chen, X.** (2022). Biomedical polymers: synthesis, properties, and applications. *Science China Chemistry*, 65(6), 1010-1075.
- Chern, C. S. (2006).** Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. *Progress in polymer science*, 31(5), 443-486.
- Chiefari, J., Jeffery, J., Mayadunne, R. T., Moad, G., Rizzardo, E., & Thang, S. H.** (1999). Chain transfer to polymer: A convenient route to macromonomers. *Macromolecules*, 32(22), 7700-7702.
- Chien, J. C.** (1979). Criteria for diffusion limitation in coordination polymerization. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 17(8), 2555-2565.
- Crini, G.** (2021). Cyclodextrin–epichlorohydrin polymers synthesis, characterization and applications to wastewater treatment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(3), 2383-2403.
- Cummings, S., Zhang, Y., Smeets, N., Cunningham, M., & Dubé, M. A.** (2019). On the use of starch in emulsion polymerizations. *Processes*, 7(3), 140.
- Das, A., Raposo, G. C. C., Lopes, D. S., da Silva, E. J., Carneiro, V. S. M., Mota, C. C. B. D. O., ... & Gomes, A. S. L.** (2022). Exploiting nanomaterials for optical coherence tomography and photoacoustic imaging in nanodentistry. *Nanomaterials*, 12(3), 506.
- De La Vega, J. C., Elischer, P., Schneider, T., & Häfeli, U. O.** (2013). Uniform polymer microspheres: monodispersity criteria, methods of formation and applications. *Nanomedicine*, 8(2), 265-285.
- Desai, K. G. H.** (2005). Preparation and characteristics of high-amylose corn starch/pectin blend microparticles: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 6, E202-E208.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J.** (2005). Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *Journal of microencapsulation*, 22(4), 377-395.
- Dodero, A., Scarfi, S., Mirata, S., Sionkowska, A., Vicini, S., Alloisio, M., & Castellano, M.** (2021). Effect of crosslinking type on the physical-chemical properties and biocompatibility of chitosan-based electrospun membranes. *Polymers*, 13(5), 831.
- El-Hoshoudy, A. N. M. B.** (2018). Emulsion polymerization mechanism. *Recent research in polymerization*, 1.
- Elfstrand, L., Eliasson, A. C., Jönsson, M., Reslow, M., & Wahlgren, M.** (2006). From starch to starch microspheres: Factors controlling the microspheres quality. *Starch-Stärke*, 58(8), 381-390.

- Elfstrand, L., Eliasson, A. C., & Wahlgren, M.** (2009). Changes in starch structure during manufacturing of starch microspheres for use in parenteral drug formulations: Effects of temperature treatment. *Carbohydrate polymers*, 75(1), 157-165.
- Elgindy N., Elkhodairy K., Molokhia A., ElZoghby A.** (2011). Biopolymeric Nanoparticles for Oral Protein Delivery: Design and In Vitro Evaluation. *J Nanomedic Nanotechnol* 2:110. doi:10.4172/2157-7439.1000110
- Elliott, J. E., Macdonald, M., Nie, J., & Bowman, C. N.** (2004). Structure and swelling of poly (acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure. *Polymer*, 45(5), 1503-1510.
- Fang, Y. Y., Wang, L. J., Li, D., Li, B. Z., Bhandari, B., Chen, X. D., & Mao, Z. H.** (2008). Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 379-384.
- Feng, Z., Su, X., Wang, T., Sun, X., Yang, H., & Guo, S.** (2023). The Role of Microsphere Structures in Bottom-Up Bone Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 15(2), 321.
- Freiberg, S., & Zhu, X. X.** (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International journal of pharmaceutics*, 282(1-2), 1-18.
- Gao, Y., Gao, Y., Zhang, Z., Jia, F., & Gao, G.** (2022). Acetylated distarch phosphate-mediated tough and conductive hydrogel for antibacterial wearable sensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(45), 51420-51428.
- Guigas, G., & Weiss, M.** (2006). Size-dependent diffusion of membrane inclusions. *Biophysical journal*, 91(7), 2393-2398.
- Gustafsson, H., & Holmberg, K.** (2017). Emulsion-based synthesis of porous silica. *Advances in Colloid and Interface Science*, 247, 426-434.
- Häfeli, U. O., & Pauer, G. J.** (1999). In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 194(1-3), 76-82.
- Hamdi, G., Ponchel, G., & Duchêne, D.** (2001). Formulation of epichlorohydrin cross-linked starch microspheres. *Journal of microencapsulation*, 18(3), 373-383.
- Hanna, D. H., Hamed, A. A., & Saad, G. R.** (2023). Synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate)/chitosan-graft poly (acrylic acid) conjugate hyaluronate for targeted delivery of methotrexate drug to colon cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 240, 124396.
- Hashim, A. A. (Ed.).** (2011). Advances in nanocomposite technology. *BoD—Books on Demand*.

- He, L., Zhang, Y., Zeng, X., Quan, D., Liao, S., Zeng, Y., ... & Ramakrishna, S.** (2009). Fabrication and characterization of poly (l-lactic acid) 3D nanofibrous scaffolds with controlled architecture by liquid–liquid phase separation from a ternary polymer–solvent system. *Polymer*, 50(16), 4128-4138.
- Hollister, S. J.** (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4(7), 518-524.
- Hui, R., Qi-He, C., Ming-liang, F., Qiong, X., & Guo-qing, H.** (2009). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. *Food Chemistry*, 114(1), 81-86.
- Iezzi, R., Pompili, M., Rinninella, E., Annicchiarico, E., Garcovich, M., Cerrito, L., ... & HepatoCatt Study Group.** (2019). TACE with degradable starch microspheres (DSM-TACE) as second-line treatment in HCC patients dismissing or ineligible for sorafenib. *European Radiology*, 29, 1285-1292.
- Jensen, A. T., Neto, W. S., Ferreira, G. R., Glenn, A. F., Gambetta, R., Gonçalves, S. B., ... & Machado, F.** (2017). Synthesis of polymer/inorganic hybrids through heterophase polymerizations. In *Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends* (pp. 207-235). Woodhead Publishing.
- Kang, H. S., Kwon, S. S., Nam, Y. S., Han, S. H., & Chang, I. S.** (2002). Determination of zeta potentials of polymeric nanoparticles by the conductivity variation method. *Journal of colloid and interface science*, 255(2), 352-355.
- Kang, S. W., Cho, E. R., Jeon, O., & Kim, B. S.** (2007). The effect of microsphere degradation rate on the efficacy of polymeric microspheres as bulking agents: An 18-month follow-up study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 80(1), 253-259.
- Kapelko-Żeberska, M., Zięba, T., & Singh, A. V.** (2015). Physically and chemically modified starches in food and non-food industries. *Surface Modification of Biopolymers*, 173-193.
- Karataş, A., Sonakin, Ö., Kiliçarslan, M., & Baykara, T.** (2010). EFFECTS OF STIRRING RATE AND DRUG: POISMER RATIO (ON THE CHARACTERISTICS OF LEVOBUNOLOL HCL LOADED POLY (ε-CAPROLACTONE) MICROPARTICLES. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(3).
- Karoyo, A. H., Dehabadi, L., & Wilson, L. D.** (2018). Renewable starch carriers with switchable adsorption properties. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6(4), 4603-4613.

- Kaur, K., Seth, N., & Gill, N. S.** (2019). Advancement in chronotherapeutic drug delivery system: Marketed technologies and current scenario. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(5), 1984-1989.
- Kaur, L., Singh, J., & Liu, Q.** (2007). Starch—a potential biomaterial for biomedical applications. *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*, 83-98.
- Kawaguchi, H.** (2000). Functional polymer microspheres. *Progress in polymer science*, 25(8), 1171-1210.
- Koo, S. H., Lee, K. Y., & Lee, H. G.** (2010). Effect of cross-linking on the physicochemical and physiological properties of corn starch. *Food hydrocolloids*, 24(6-7), 619-625.
- Kuniak, L., & Marchessault, R. H.** (1972). Study of the crosslinking reaction between epichlorohydrin and starch. *Starch-Stärke*, 24(4), 110-116.
- Le Thanh, J., Błaszczak, W., & Lewandowicz, G.** (2007). Digestibility vs. structure of food grade modified starches. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 10(3).
- Lee, J. M., Lim, K. H., & Smith, D. H.** (2002). Formation of two-phase multiple emulsions by inclusion of continuous phase into dispersed phase. *Langmuir*, 18(20), 7334-7340.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M.** (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Lewandowicz, J., Le Thanh-Blicharz, J., & Szwengiel, A.** (2022). The effect of chemical modification on the rheological properties and structure of food grade modified starches. *Processes*, 10(5), 938.
- Lewis, A. L.** (2013). Embolisation devices from biomedical polymers for intra-arterial occlusion and drug delivery in the treatment of cancer. *In Biomaterials for cancer therapeutics* (pp. 207-239e). Woodhead Publishing.
- Li, Q., Chang, B., Dong, H., & Liu, X.** (2023). Functional microspheres for tissue regeneration. *Bioactive Materials*, 25, 485-499.
- Li, T., Liu, H., Zeng, L., Miao, W., & Wu, Y.** (2011). Study of emulsion polymerization stabilized by amphiphilic polymer nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, 289, 1543-1551.
- Liu, B., Luo, J., Wang, X., Lu, J., Deng, H., & Sun, R.** (2013). Alginate/quaternized carboxymethyl chitosan/clay nanocomposite microspheres: preparation and drug-controlled release behavior. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(5), 589-605.

- Liu, J., Zheng, X. J., & Tang, K. Y.** (2013). Study on the gravimetric measurement of the swelling behaviors of polymer films. *Rev. Adv. Mater. Sci*, 33(5), 452-458.
- Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., ... & He, N.** (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone research*, 5(1), 1-20.
- Lovell, P. A., & Schork, F. J.** (2020). Fundamentals of emulsion polymerization. *Biomacromolecules*, 21(11), 4396-4441.
- Malafaya, P. B., Stappers, F., & Reis, R. L.** (2006). Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 17, 371-377.
- Malik, M. K., Bhatt, P., Kumar, T., Singh, J., Kumar, V., Faruk, A., ... & Kumar, S.** (2023). Significance of chemically derivatized starch as drug carrier in developing novel drug delivery devices. *The Natural Products Journal*, 13(6), 40-53.
- Mane, S., Ponrathnam, S., & Chavan, N.** (2015). Effect of chemical cross-linking on properties of polymer microbeads: A review. *Can Chem Trans*, 3(4), 473-485.
- Moon-Jeong, C.** (2004). Starch in human health. *Food Industry And Nutrition*, 9(2), 10-18.
- Moradi, M., & Yamini, Y.** (2012). Surfactant roles in modern sample preparation techniques: a review. *Journal of separation science*, 35(18), 2319-2340.
- Nölle, J. M., Jüngst, C., Zumbusch, A., & Wöll, D.** (2014). Monitoring of viscosity changes during free radical polymerization using fluorescence lifetime measurements. *Polymer Chemistry*, 5(8), 2700-2703.
- Omrani, Z., Pourmadadi, M., Yazdian, F., & Rashedi, H.** (2023). Preparation and characterization of pH-sensitive chitosan/starch/MoS₂ nanocomposite for control release of curcumin macromolecules drug delivery; application in the breast cancer treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 250, 125897.
- Park, K. H., Jeong, Y. J., & Park, H. G.** (2011). Key techniques to control porous microsphere morphology in S/O/W emulsion system. *In International Conference on BioMedical Engineering and Technology* (pp. 797-801). IEEE.
- Pelage, J. P., Le Dref, O., Beregi, J. P., Nonent, M., Robert, Y., Cosson, M., ... & Rymer, R.** (2003). Limited uterine artery embolization with trisacryl gelatin microspheres for uterine fibroids. *Journal of vascular and interventional radiology*, 14(1), 15-20.

- Pereira, A. G., Fajardo, A. R., Nocchi, S., Nakamura, C. V., Rubira, A. F., & Muniz, E. C.** (2013). Starch-based microspheres for sustained-release of curcumin: preparation and cytotoxic effect on tumor cells. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 711-720.
- Popovic, M., Puchner, S., Berzaczy, D., Lammer, J., & Bucek, R. A.** (2011). Uterine artery embolization for the treatment of adenomyosis: a review. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 22(7), 901-909.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., & Kapadia, J. R.** (2015). Current knowledge on biodegradable microspheres in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 12(8), 1283-1299.
- Raj, H., Sharma, S., Sharma, A., Verma, K. K., & Chaudhary, A.** (2021). A novel drug delivery system: Review on microspheres. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(2-S), 156-161.
- Rodrigues, A., & Emeje, M.** (2012). Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydrate polymers*, 87(2), 987-994.
- Romero, M., Del Valle, M. A., Del Rio, R., Díaz, F. R., & Armijo, F.** (2012). Polymers nucleation and growth mechanism: Solubility, a determining factor. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(10), 10132-10141.
- Roy, A., Bajpai, J., & Bajpai, A. K.** (2009). Dynamics of controlled release of chlorpyrifos from swelling and eroding biopolymeric microspheres of calcium alginate and starch. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 222-231.
- Saralidze, K., Koole, L. H., & Knetsch, M. L.** (2010). Polymeric microspheres for medical applications. *Materials*, 3(6), 3537-3564.
- Sharma, J., Sundar, D., & Srivastava, P.** (2023). Advantages and disadvantages of biosurfactants over other synthetic surfactants. In *Advancements in Biosurfactants Research* (pp. 505-523). Cham: Springer International Publishing.
- Shunmukham, S. R., Hallenbeck, V. L., & Guile, R. L.** (1951). Emulsion polymerization of styrene. II. Effect of agitation. *Journal of Polymer Science*, 6(6), 691-698.
- Shuvaev, S., Akam, E., & Caravan, P.** (2021). Molecular MR contrast agents. *Investigative radiology*, 56(1), 20.
- Sinha, V. R., & Trehan, A.** (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 90(3), 261–280. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(03\)00194-9](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(03)00194-9)
- Slomkowski, S., Basinska, T., & Miksa, B.** (2002). New types of microspheres and microsphere-related materials for medical diagnostics. *Polymers for Advanced Technologies*, 13(10-12), 905-918.

- Soares, J. S., & Zunino, P.** (2010). A mixture model for water uptake, degradation, erosion and drug release from polydisperse polymeric networks. *Biomaterials*, 31(11), 3032-3042.
- Suhasini, G.** (2014). Formulation and in Vitro Characterisation of Glipizide Loaded Mucoadhesive Gelatin Microspheres (*Doctoral dissertation, College of Pharmacy, Madras Medical College, Chennai*).
- Talaie, R., Torkian, P., Moghadam, A. D., Tradi, F., Vidal, V., Sapoval, M., & Golzarian, J.** (2022). Hemorrhoid embolization: A review of current evidences. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 103(1), 3-11.
- Tangri, P., & Madhav, N. S.** (2011). Oral mucoadhesive drug delivery systems: a review. *JBI*, 2229, 7499.
- Tauer, K., Deckwer, R., Kühn, I., & Schellenberg, C.** (1999). A comprehensive experimental study of surfactant-free emulsion polymerization of styrene. *Colloid and Polymer Science*, 277, 607-626.
- Taylor, P.** (1998). Ostwald ripening in emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 75(2), 107-163.
- Torres, F. G., & De-la-Torre, G. E.** (2022). Synthesis, characteristics, and applications of modified starch nanoparticles: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 289-305.
- Tsaoulidis, D., & Angeli, P.** (2017). Liquid-liquid dispersions in intensified impinging-jets cells. *Chemical engineering science*, 171, 149-159.
- Unnikrishnan, S., & Klibanov, A. L.** (2012). Microbubbles as ultrasound contrast agents for molecular imaging: preparation and application. *American journal of roentgenology*, 199(2), 292-299.
- Verma, R., Verma, S., & Kumar, S.** (2019). Microsphere-a novel drug delivery system. *Research Chronicle in Health Sciences*, 5(1), 5-14.
- Virmani, T., & Gupta, J.** (2017). Pharmaceutical application of microspheres: an approach for the treatment of various diseases. *Int J Pharm Sci Res*, 8(8), 3253-60.
- Vlachopoulos, A., Karlioti, G., Balla, E., Daniilidis, V., Kalamas, T., Stefanidou, M., ... & Bikiaris, D. N.** (2022). Poly (lactic acid)-based microparticles for drug delivery applications: An overview of recent advances. *Pharmaceutics*, 14(2), 359.
- Wang, F., & Polavarapu, P. L.** (2000). Conformational stability of (+)-epichlorohydrin. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104(26), 6189-6196.
- Wang, Q. U. N., Fu, S., & Yu, T.** (1994). Emulsion polymerization. *Progress in polymer science*, 19(4), 703-753.

- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S.** (2015). Starch retrogradation: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568-585.
- Wee, C. Y., Yang, Z., & Thian, E. S.** (2021). Past, present and future development of microspheres for bone tissue regeneration: a review. *Materials Technology*, 36(6), 364-374.
- Wongsagonsup, R., Pujchakarn, T., Jitrakbumrung, S., Chaiwat, W., Fuongfuchat, A., Varavinit, S., ... & Suphantharika, M.** (2014). Effect of cross-linking on physicochemical properties of tapioca starch and its application in soup product. *Carbohydrate polymers*, 101, 656-665.
- Xiao, C.** (2013). Current advances of chemical and physical starch-based hydrogels. *Starch-Stärke*, 65(1-2), 82-88.
- Yadav, A. V., & Mote, H. H.** (2008). Development of biodegradable starch microspheres for intranasal delivery. *Indian Journal of pharmaceutical sciences*, 70(2), 170.
- Yin, L., Fei, L., Cui, F., Tang, C., & Yin, C.** (2007). Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials*, 28(6), 1258-1266.
- Yu, B., Zheng, L., Cui, B., Zhao, H., & Liu, P.** (2020). The effects of acetylated distarch phosphate from tapioca starch on rheological properties and microstructure of acid-induced casein gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 1132-1139.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Utturkar, G., Haggard, W. O., Yang, Y., Ong, J. L., & Bumgardner, J. D.** (2007). The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 561-567.
- Zakaria, N. H., Muhammad, N., & Abdullah, M. M. A. B.** (2017, June). Potential of starch nanocomposites for biomedical applications. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 209, No. 1, p. 012087)*. IOP Publishing.
- Zhang, W., d'Agosto, F., Dugas, P. Y., Rieger, J., & Charleux, B.** (2013). RAFT-mediated one-pot aqueous emulsion polymerization of methyl methacrylate in presence of poly (methacrylic acid-co-poly (ethylene oxide) methacrylate) trithiocarbonate macromolecular chain transfer agent. *Polymer*, 54(8), 2011-2019.
- Zhou, G., Luo, Z., & Fu, X.** (2014). Preparation of starch nanoparticles in a water-in-ionic liquid microemulsion system and their drug loading and releasing properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(32), 8214-8220.

Zhu, P., Du, X., Liu, C., Zhao, G., & Wang, M. (2023). Effects of pH during dry-heat preparation on the physicochemical and emulsifying properties of rice starch and whey protein isolate mixtures. *Food Hydrocolloids*, 140, 108614.

URL-1: <https://www.molinstincts.com/structure/Acetylated-distarch-phosphate-cstr-CT1087467043.html>. Erişim tarihi:18.01.2024

