T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİŞASTA NANOJELLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Pelin SARAÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Eş Danışman
Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Şubat, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİŞASTA NANOJELLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Pelin SARAÇOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 28.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Mehmet Murat ÖZMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Mehmet Murat ÖZMEN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Suzan ABDURRAHMANOĞLU, Üye
Marmara Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Nişasta Nanojellerinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Pelin SARAÇOĞLU

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Her daim umut taşımak adına gelecekteki kendime
ve
Her zaman yanımda olan aileme,

TEŞEKKÜR

Bilim dünyasının kapısını araladığım lisansüstü hayatımda öncelikle tez danışmanlığımı üstlenen, desteklerini, tavsiyelerini ve zamanını benimle paylaşan, tez çalışmam boyunca yol göstericim olduğu için danışmanım Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN'e;

Her ihtiyaç duyduğumda bilgi birikimini paylaştığı, yardımlarını ve tavsiyelerini hiç eksik etmediği ve zamanını verimli bir şekilde benimle paylaştığı için eş danışmanım Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na;

Tez çalışmamın antibakteriyel analizlerini yapmamı sağlayan, kıymetli zamanını ayıran ve fikir paylaşımında bulunan Doç. Dr. Tülin ÖZBEK ARASOĞLU ile umutla her daim yardımcı olan lisansüstü öğrencisi Senanur DOKUZ'a;

Lisansüstü hayatımda kazandığım ve daha uzun yıllar birlikte olacağımıza inandığım arkadaşlarım, 'biyomühendis kızlarım' Özge YILMAZ ve Cansu GÜLCAN'a;

Tanıdığım ilk andan beri enerjisini sevdiğim, beraber ağlayıp beraber güldüğüm, akademik bilgisinden her daim faydalandığım sevgili Nilbeste BONCUKÇU başta olmak üzere, ikinci evim olarak gördüğüm 306-307 laboratuvarlarındaki tüm çalışma arkadaşlarıma;

Hayatıma girdiği andan itibaren desteğini ve sevgisini hep hissettiğim, tezi bitirme sürecimde ve her zor anımda elimden tutan kıymetli arkadaşım Eren Ercan ÖZDEMİR'e;

En önemlisi bana iyiliği ve sevgiyi aşılayan, bu dünyada doğru kalabilmenin önemini hiç unutturmayan, bugünlere güçlü bir kadın olarak gelmemi sağlayan ve

emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim anneme, babama ve kardeşlerime;

Ve son olarak yüksek lisans tez sürecimde BİDEB 2210/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında mali destekte bulunarak çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmanın konuyla ilgilenen bilim insanlarına yarar sağlaması dileğiyle…

"Be less curious about people and more curious about ideas" Marie Curie

Pelin SARAÇOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ x

KISALTMA LİSTESİ xi

ŞEKİL LİSTESİ xiii

TABLO LİSTESİ xv

ÖZET xvi

ABSTRACT xviii

1 GİRİŞ **1**

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 4

1.3 Hipotez 5

2 GENEL BİLGİLER **6**

2.1 Polimerik Jeller 6

2.1.1 Hidrojeller 6

2.1.2 Nanojeller 8

2.2 Nişasta 16

2.2.1 Nişastanın Yapısı ve Sınıflandırılması 16

2.2.2 Nişastanın Fiziksel, Kimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri 18

2.2.3 Nişastanın Jelatinizasyonu ve Retrogradasyonu 19

2.2.4 Nişastanın Modifikasyonu 20

2.3 Nişasta Nanojelleri 24

2.3.1 Modifiye Nişasta İle Hazırlanan Nanojeller 25

2.3.2 Nişastanın Diğer Polimerle Kombinasyonu İle Hazırlanan Nanojeller 25

2.4 Antimikrobiyal Jeller 28

2.4.1 Antimikrobiyal Nişasta Hidrojelleri 29

2.4.2 Antimikrobiyal Jellere Yüklenen Ajanlar 33

2.5 Oral Mukozit ve Tedavisinde Kullanılan Antibakteriyel Jeller 34

2.5.1 Oral Mukozit Patobiyolojisi 35

2.5.2 Oral Mukozitin Klinik Seyri 37
2.5.3 Oral Mukozitin Tedavisi 38
2.5.4 Oral Mukozit Tedavisinde Jeller 42

3 MATERYAL VE METOD 44
3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler 44
3.2 Kullanılan Cihazlar 44
3.3 Deneysel Yöntem 46
3.3.1 Ön Formülasyon Denemeleri 46
3.3.2 Boş Nişasta Nanojellerinin Sentezi 46
3.3.3 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojellerinin Sentezi 47
3.3.4 Deneysel Parametrelerin Nişasta Nanojellerinin Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi 48
3.4 Karakterizasyon Teknikleri 50
3.4.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi 50
3.4.2 X-Işınları Difraksiyonu (XRD) Analizi 51
3.4.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri 51
3.4.4 Vankomisinin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması 52
3.4.5 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması (RV%) 53
3.4.6 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması (EE%) 53
3.4.7 Etken Madde Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması (YK%) 54
3.4.8 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 54
3.4.9 *In vitro* Salım Çalışmaları 55
3.4.10 Nanojellerin Biyobozunurluk Testi 56
3.4.11 Antibakteriyel Aktivite Testi 57

4 DENEYSEL SONUÇLAR 59
4.1 Ön Deneme Sonuçları 60
4.2 Boş Nişasta Nanojellerinin Karakterizasyon Sonuçları 60
4.2.1 FT-IR Analiz Sonuçları 61
4.2.2 XRD Analizi Sonuçları 62
4.2.3 Boyut, Zeta Potansiyel ve Reaksiyon Verimi Sonuçları 63
4.3 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojellerinin Karakterizasyon Sonuçları 64
4.3.1 Polimer Konsantrasyonunun Etkisi 66
4.3.2 Polimer:Çapraz Bağlayıcı Oranının Etkisi 68

4.3.3 Sürfaktan Konsantrasyonunun Etkisi 71
4.3.4 Antibiyotik Konsantrasyonunun Etkisi 74
4.4 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojelin Yapısal, Morfolojik, *in vitro* Salım ve Antibakteriyel Aktivitesi 76
4.4.1 FT-IR Analiz Sonuçları 77
4.4.2 XRD Analizi Sonuçları 78
4.4.3 SEM Görüntüleri 78
4.4.4 *In vitro* Salım Sonuçları 80
4.4.5 Nanojellerin Biyobozunurluğu 83
4.4.6 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojellerinin Antibakteriyel Aktivitesi ... 84

5 SONUÇ VE ÖNERİLER **87**

KAYNAKÇA **90**

EKLER **107**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **110**

SİMGE LİSTESİ

%w/w	Ağırlıkça Yüzde
α	Alfa
Å	Ångström
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
%w/v	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
kV	Kilovolt
mA	Miliamper
μl	Mikrolitre
M	Molar
mV	Milivolt
nm	Nanometre

KISALTMA LİSTESİ

ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
BDDE	1,4-bütandiol diglisidil eter
CMS	Karboksimetil Nişasta
DCR	Işık Saçılması Şiddeti
DEAP	3-(dietilamino) propilamin
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DSLT	Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi
ELS	Elektroforetik Işık Saçılması
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktörü
HA	Hyaluronik Asit
ISOO	Uluslararası Oral Onkoloji Derneği
KCl	Potasyum Klorür
MASCC	Kanserde Destekleyici Bakım Derneği ve
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hilton Broth
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NaCl	Sodyum Klorür
NAG	N-asetilglukozamin
$NaHCO_3$	Sodyum Hidrojen Karbonat

NaOH	Sodyum Hidroksit
NAM	N-asetilmuramik asit
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NNJ	Boş Nişasta Nanojel
PEG	Polietilen Glikol
PEGDE	Polietilen Glikol Diglisidil Eter
PDI	Polidispersite İndeksi
REB	Rebamipidin
S/Y	Su İçinde Yağ Emülsiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
RAFT	Tersinir Katılma Ayrılma Transfer Polimerizasyonu
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi
VNJ	Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojel
Y/S	Yağ İçinde Su Emülsiyonu
XRD	X-Işınları Difraksiyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Polimer ağının bir çözücü içinde şişmesinin şematik gösterimi 6
Şekil 2. 2 Hidrojellerin farklı parametrelere göre sınıflandırılması 7
Şekil 2. 3 Nanojellerin farklı parametrelere göre sınıflandırılması 9
Şekil 2. 4 Nanojel ağından biyomolekül salımının şeması. 14
Şekil 2. 5 Polisakkarit bazlı nanojellerin avantajları 15
Şekil 2. 6 Nişastanın amiloz ve amilopektin bileşenleri 17
Şekil 2. 7 Nişastanın jelatinizasyonu ve retrogradasyonu 20
Şekil 2. 8 Genel modifikasyon süreci 21
Şekil 2. 9 Nişasta nanojellerinin genel sentez şeması ve çeşitli alanlardaki uygulamaları. 24
Şekil 2. 10 (a) Hyaluronatlı nişastanın sentez şeması, (b) Dosetaksel salımı için önerilen hyaluronatlı nişasta nanojel. 27
Şekil 2. 11 Vankomisinin kimyasal yapısı 31
Şekil 2. 12 Vankomisinin etki mekanizması 32
Şekil 2. 13 Oral mukozitin beş aşamalı patobiyolojisi. 35
Şekil 2. 14 Ağız mukozasının tamamında kanama eğilimi gösteren ülseratif ve eritemli lezyonlar. 37
Şekil 3. 1 Vankomisin yüklü nişasta nanojellerin sentez şeması. 47
Şekil 3. 2 Zetasizer Nano ZS cihazı. 52
Şekil 3. 3 UV-VIS Spektroskopisi. 52
Şekil 3. 4 A) SEM cihazı, B) altın/paladyum kaplama cihazı. 55
Şekil 4. 1 Nişastanın PEGDE ile çapraz bağlanma mekanizması ve Y/S ters emülsiyon yöntemi ile nanojel oluşumu. 59
Şekil 4. 2 Nişasta, PEGDE ve boş nanojelin FT-IR spektrumları. 61
Şekil 4. 3 Nişasta ve boş nanojelin XRD spektrumu. 63
Şekil 4. 4 Vankomisinin 280 nm'deki kalibrasyon eğrisi. 65
Şekil 4. 5 %1, %2 ve %3 w/v nişasta konsantrasyonlarının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği,

C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi. 67
Şekil 4. 6 1:1, 1:4 ve 1:8 nişasta:PEGDE oranının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi. 70
Şekil 4. 7 %0,5, %1 ve %2 w/v Tween 80 konsantrasyonlarının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi. 73
Şekil 4. 8 %0,1, %0,2 ve %0,4 w/v vankomisin konsantrasyonlarının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi. 75
Şekil 4. 9 Boş nanojel (NNJ-1), VNJ-13 ve vankomisinin FT-IR spektrumları. .. 77
Şekil 4. 10 Nişastanın, NNJ-1 ve VNJ-13'ün X-ışını kırınım spektrumları. 78
Şekil 4. 11 NNJ-1 ve VNJ-13'ün 75.000x, 50.000x ve 30.000 kat büyütme ile çekilmiş SEM görüntüleri. 79
Şekil 4.12 Vankomisinin simüle tükürük sıvısında 280 nm'deki kalibrasyon eğrisi 81
Şekil 4. 13 Vankomisinin nanojellerden kümülatif salım profili..... 82
Şekil 4. 14 Vankomisin yüklü nanojellerin DCR-zaman grafiği. 83

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler……..……..44
Tablo 3.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar……..……45
Tablo 3.3 Optimizasyon çalışmasında sabit ve değişken parametreler ile değişken parametrelerin değerleri…….....49
Tablo 4.1 Boş nanojelin boyut, PDI, zeta potansiyel ve reaksiyon verimi sonuçları……..……62
Tablo 4.2 %80 w/v etanol de çözünmüş 0,001–0,1 mg/ml konsantrasyonları arasında 19 adet vankomisin çözeltisinin 280 nm'deki absorbans değerleri.....….63
Tablo 4.3 Nişasta konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi…….65
Tablo 4.4 Nişasta: PEGDE oranının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi…….68
Tablo 4.5 Sürfaktan konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi……..……71
Tablo 4.6 Vankomisin konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi.76
Tablo 4.7 Simüle tükürük sıvısında hazırlanan 0,001–0,2 mg/ml konsantrasyonları arasındaki 20 adet çözeltinin 280 nm'deki absorbans değerleri……...80
Tablo 4.8 VNJ-13 test örneği ve vankomisin antibiyotiğin MİKdeğerleri…….83
Tablo 4.9 *E.coli, S.aureus, S.mutans* ve *S.pyogenes* organizmaları için kabul edilen MİK değerindeki standart plate görüntüleri……..85

ÖZET

Nişasta Nanojellerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Pelin SARAÇOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Eş-Danışman: Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Hidrojeller, çözünmeden suyu tutabilen, polimer zincirleri çapraz bağlı olan üç boyutlu malzemelerdir. Nanoteknolojinin ilerlemesiyle, nanojel olarak adlandırılan hidrojel partikülleri sentezlenmiştir. Nanojeller, çözücü içinde şişebilen, çapraz bağlı nano boyutlarda polimer ağlarıdır. Geniş yüzey alanları ve yüksek yükleme kapasiteleri nedeniyle ilgi görmektedirler. Özellikle polisakkarit nanojeller, biyoaktif ajan salımı ve antimikrobiyal uygulamalarda umut verici nanomalzemelerdir. Polisakkaritlerden olan nişasta, bitki kaynaklı ucuz, yenilenebilir ve biyobozunur bir biyopolimerdir. Ancak doğal nişastanın işlenebilirliği zordur, bu sebeple çapraz bağlanarak modifiye edilmektedir.

Bu tez çalışmasında nişasta, polietilen glikol digilsidil eter (PEGDE) ile çapraz bağlanarak nanojeller sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Üretilen nanojellerin bir antimikrobiyal ajan yüklenerek kanser hastalarının ağızlarında oluşan oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaç

doğrultusunda tez çalışmasının ilk bölümünde, nanojellerinin özelliklerini değiştirebilecek parametrelerden polimer konsantrasyonu, polimer:çapraz bağlayıcı oranı, sürfaktan konsantrasyonu ve antibakteriyel ajan konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Değişen parametrelerle nanojellere yüklenen antibakteriyel ajanın enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasiteleri Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-VIS) Spektroskopisi kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen nanojeller, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), X-Işınları Difraksiyonu Spektroskopisi (XRD), Dinamik Işık Saçılması Spektroskopisi (DLS) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) teknikleriyle incelenmiştir. İkinci bölümde ise, optimize edilen nanojellerin *in vitro* salım çalışmaları yapılmış, antibakteriyel aktivitesi broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Boş ve antibakteriyel ajan yüklü nanojellerin, 84 ile 159 nm hidrodinamik çap aralığında küresel yapıda ve zeta potansiyellerinin -12,0 ile -25,0 mV aralığında olduğu görülmüştür. Reaksiyon verimlerinin %77 ile %99, enkapsülasyon etkinliğinin %61 ile %88 ve yükleme kapasitelerinin %5 ile %26 aralığında olduğu bulunmuştur. Nanojellerden antibakteriyel ajanın 15. dakikada %70'lik salım yaparak oral mukozit tedavisi için uygun bir salım profili sergilediği görülmüştür. Bununla birlikte, nanojellerin 60-120 dakika süresince biyobozunmaya uğradığı ve bu sürenin ilaç salım profilleriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Nanojellerin oral mukozit enfeksiyonları patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Böylelikle, yeni nişasta nanojellerinin ağız yaraları enfeksiyonlarının tedavisi için sağlık biyoteknolojisinde ümit vadeden nanotaşıyıcı ürünler olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel ajan, nanojel, polietilen glikol digilsidil eter, nişasta, oral mukozit.

ABSTRACT

Synthesis, Characterization and Determination of Antimicrobial Activity of Starch Nanogels

Pelin SARAÇOĞLU

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Hydrogels are three-dimensional materials with cross-linked polymer chains that can retain water without dissolving. With the advancement of nanotechnology, hydrogel particles called nanogels have been synthesized. Nanogels are cross-linked nano-sized polymer networks that swell in solvent. They attract attention due to their large surface area and high loading capacity. In particular, polysaccharide nanogels are promising nanomaterials in bioactive agent delivery and antimicrobial applications. Starch, one of the polysaccharides, is an inexpensive, renewable and biodegradable biopolymer of plant origin. However, natural starch is difficult to process, so it is modified by cross-linking.

In this thesis, nanogels were synthesized and characterized by cross-linking starch with polyethylene glycol digylcidyl ether (PEGDE). It is aimed to use the nanogels produced for loading an antimicrobial agent and then apply them in the treatment

of oral mucositis infections that take place in the mouth of cancer patients. For this purpose, in the first part of the thesis, the effects of polymer concentration, polymer:crosslinker ratio, surfactant concentration and antibacterial agent concentration were investigated. The encapsulation efficiency and loading capacities of the antibacterial agent loaded in the nanogels with varying parameters were examined using Ultraviolet and Visible (UV-VIS) Spectroscopy. The obtained nanogels were tested by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-Ray Diffraction Spectroscopy (XRD), Dynamic Light Scattering Spectroscopy (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) techniques. In the second part, *in vitro* release studies of the optimized nanogels were carried out, and their antibacterial activity was determined by broth microdilution method.

It was observed that the empty and antibacterial agent loaded nanogels were spherical and exhibiting hydrodynamic diameter ranging between 84 and 159 nm depending on the varying parameters. While the zeta potentials of the nanogels were in the range of -12.0 and -25.0 mV, the reaction yields were between 77% and 99%, the encapsulation efficiency was between 61% and 88%, and the loading capacities were between 5% and 26%. The antibacterial agent showed a 70% release in 15 minutes indicating that it exhibits a release profile suitable for oral mucositis treatment. Moreover, it was observed that the nanogels were biodegraded in 60-120 minutes, which was consistent with their drug release profile. It was determined that the nanogels showed antibacterial activity against pathogens of oral mucositis infections. Thus, the novel starch nanogels synthesized are promising nanocarrier products in health biotechnology as they have potential in the treatment of oral mucositis infections.

Keywords: Antibacterial agent, nanogel, polyethylene glycol digylcidyl ether, starch, oral mucositis.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Hidrojel adı verilen hidrofilik jeller, çözünmeden suyu tutabilen, polimer zincirleri çapraz bağlı olan üç boyutlu malzemelerdir [1]. Büyük miktarda su veya biyolojik sıvı tutabilme kapasitesi ve canlı dokulara benzer yumuşak yapıları, hidrojelleri hem bilimsel hem teknolojik açıdan üstün ve vazgeçilmez kılmaktadır [2]. Bununla birlikte, nanoteknolojinin ilerlemesiyle birlikte boyuta bağlı benzersiz özelliklere sahip yeni nano malzemeler geliştirilmiştir [3]. Nanomalzemelerin bir çeşidi olan nanojeller, bir çözücü içinde şişebilen nano boyutlardaki çapraz bağlı polimer ağlarıdır [4]. Nanojeller, ayarlanabilir boyutları ile geniş yüzey alanına, yüksek yükleme kapasitelerine ve yüksek stabiliteye sahiptirler [5]. Ayrıca, iyonik güç, pH, enzim ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere duyarlı olmaları nedeniyle umut verici nanomalzemelerdir [6]. Bu özellikleri sebebiyle nanojeller, özellikle biyoaktif ajan/ilaç salımı ve antimikrobiyal uygulamalarda uzun bir süredir kullanılmaktadır [7].

Son yıllarda, nanojellerin sentezi için kolay, hızlı ve verimli stratejilerin geliştirilmesine yoğun ilgi gösterilmiştir. Nanojeller kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanarak, doğal veya sentetik polimerler ile sentezlenebilmektedirler [8]. Nanojel sentezinde birçok çeşit polimer kullanılabilmesi ve bu polimerlerin özelliklerinin değiştirilebilmesi nanojel sentezinde kolaylıklar sağlamaktadır [5]. Örnek olarak polisakkaritler, yapılarında bulunan reaktif fonksiyonel grupları nedeniyle nanojel sentezinde yaygın olarak kullanılan polimerlerdir [9]. Ayrıca, bakteriyel enzimler tarafından parçalanabildikleri için nano ölçekte salım sistemlerinin hazırlanması için çok umut verici polimerler olarak görünmektedir [10]. Bu polisakkaritlerden biri olan nişasta, bitki kaynaklı gıdalarda bulunan

ucuz, yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen bir doğal polimerdir [11] [12]. Nişasta, doğada en bol bulunan biyopolimerlerden biridir ve benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip nano boyutlu malzemeler hazırlamak için kullanılmaktadır [13]. Asit veya enzimatik hidroliz, yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonikasyon, ekstrüzyon, mikroemülsiyon ve nanoçökeltme gibi yöntemler nişasta nanomalzemelerin hazırlanması için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir [14]. Hem çevre dostu hem de biyouyumlu bir polimer olduğundan, nişasta nanomalzemeleri gıda, kozmetik, kimya ve ilaç gibi endüstriyel uygulamalarda yer bulmaktadır [11], [15], [16].

Ancak, doğal nişastanın nem ve sıcaklık gibi dış etkenlere karşı yüksek hassasiyeti, hidrofobik polimerlerle düşük karışabilirliği, zayıf mekanik özellikleri, işlenebilirliğinin zor olması gibi bazı sınırlayıcı özellikleri uygulamalarını kısıtlamaktadır [17]. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için doğal nişasta istenilen özelliklere göre modifiye edilmektedir [18]. Nişastanın modifikasyonu, çapraz bağlama, esterleştirme, eterleştirme, aşılama, ikili modifikasyon gibi yöntemler ile yapılmaktadır [19]. Çapraz bağlama yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir ve nişasta, glutaraldehit, epiklorohidrin, fosfor oksiklorür, ve adipat gibi farklı çapraz bağlama ajanları ile bağlanabilmektedir [20]. Çapraz bağlama, nişastanın su ile etkileşimini sınırlama eğilimindedir ve basınç ya da neme maruz kaldığında nişasta bazlı malzemelere yapısal bir bütünlük sağlamaktadır [21]. Bu tür bir çapraz bağlama ile ortaya çıkan nişasta nanojelleri, çeşitli uygulamalar için önemli bir potansiyele sahiptir.

Literatürde çapraz bağlama yöntemi kullanılarak, çeşitli biyoaktif bileşiklerin taşınımı için fonksiyonel nişasta nanojelleri hazırlanmış ve rapor edilmiştir [22]. Örneğin Yu vd., tümör hücresi büyümesini engellemek için nişastayı 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) kullanarak hyaluronik asit (HA) ile çapraz bağlamış ve nişasta nanojelleri sentezlemiştir [23]. Bir başka çalışmada ise karboksimetil nişasta (CMS), 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil-1-karbodiimid) (EDC)'nin çapraz

bağlayıcı olarak kullanılmasıyla kitosan hidroklorür ile bağlanmış ve Pickering emülsiyon stabilizatörü olarak kullanılmıştır [24].

Poli (etilen glikol) diglisidil eter (PEGDE), polimer biliminde çeşitli amaçlarla, özellikle farmasötik ve biyomalzeme sektörlerinde kullanılan bir çapraz bağlama ajanıdır [25]. Hidroksil, amin ve karboksil grupları içeren polimerleri çapraz bağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır [26]. Hidroksil grupları bakımından zengin olan nişastanın çağraz bağlanması için de uygun bir çapraz bağlayıcıdır. Örneğin, PEGDE kullanılarak kimyasal çapraz bağlama yoluyla nişasta hidrojelleri hazırlanmış ve protein direnç mekanizmaları araştırılmıştır [27], [28]. Literatürde makro boyutlarda çapraz bağlı nişasta jelleri olsa da, PEGDE ile çapraz bağlanmış bir nişasta nanojel çalışması bulunmamaktadır.

Nişasta nanomalzemeleri doğal kökenleri ve kolay bulunabilirliği nedeniyle, antimikrobiyal ajan yüklü nanotaşıyıcılar olarak karşımıza çıkmaktadır [29]. Bu nanotaşıyıcılar, gıda alanında antimikrobiyal paketleme uygulamaları [30], biyomedikal alanda antimikrobiyal ajan/ilaç taşıma sistemlerinde patojen enfeksiyonlarını önlemek için [31] kullanılmıştır. Nişasta nanomalzeme çalışmaları biyomedikal ve gıda alanlarında yoğunlaşmış olsa da, bildiğimiz kadarıyla antimikrobiyal aktivesi araştırılmış bir nişasta nanojel çalışması bulunmamaktadır.

Oral mukozit, radyasyon ve kemoterapi tedavisi gören kanserli hastalarda, ağızın içini kaplayan dokuların iltihaplanması durumudur [32]. Tedaviye bağlı zayıflamış bağışıklık ile oral mukozaya verilen hasar, lokal ve sistemik enfeksiyonlar gibi hastanın yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen zayıflatıcı yan etkilerle de ilişkilidir [33]. Oral mukozit, ağız boyunca kırmızı yanık benzeri yaralar veya ülserler ile sonuçlanmaktadır [34]. Bu toksik yan etkileri azaltmak veya yok etmek için gargaralar, antimikrobiyal pastiller, kriyoterapi ve lazer tedavisi gibi bazı tedavi yöntemleri uygulanmıştır [35]. Ancak, oral mukozit

enfeksiyonunu önlemek için şu ana kadar hiçbir tedavi yöntemi tek başına yeterli olmadığından yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için antibiyotikleri doğrudan hastaya vermek yerine, bu tür antibakteriyel ajanları nanotaşıyıcılara yükleyerek bakterileri hedeflemek daha avantajlıdır [36]. Ancak, literatür çalışmalarımız doğrultusunda gözlemlediğimiz kadarıyla; oral mukozit kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için literatürdeki nanomalzemelerin sayısı oldukça azdır.

Bu tez kapsamında, literatürde ilk defa sentezlenecek nişasta-PEGDE nanojelleri oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisi için araştırılacak ve yine ilk defa bir antibakteriyel ajan yüklenerek salım ve antibakteriyel aktiviteleri incelenecektir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, literatürdeki eksikler göz önüne alınarak, radyoterapi ve kemoterapi kaynaklı oral mukozit enfeksiyonunun tedavisinde kullanılma potansiyelini araştırmak için nişasta bazlı nanojellerin sentezlenmesi ve karakterize edilmesidir. Bu doğrultuda, biyobozunur bir polimer olan nişasta, nanojellerin sentezi için literatürde ilk kez PEGDE ile çapraz bağlanacaktır. Üretilen nişasta nanojellere antibakteriyel bir ajan olan vankomisinin enkapsüle edilerek optimize edilmesi ve antibakteriyel etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede, sağlık endüstrisi uygulamalarında başarılı olabilecek vankomisin yüklü nişasta nanojellerin üretimi ile oral enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek ucuz, doğal ve toksik olmayan nanomalzemeler elde edilecektir. Bu nanojeller, hem literatürdeki ilk nişasta-PEGDE nanojelleri, hem de antimikrobiyal özelliklere sahip ilk nişasta nanojeller olmasının yanı sıra, oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisi için araştırılacak ilk nişasta nanojeller olması sebebiyle yeni bir nanomalzeme olacaktır.

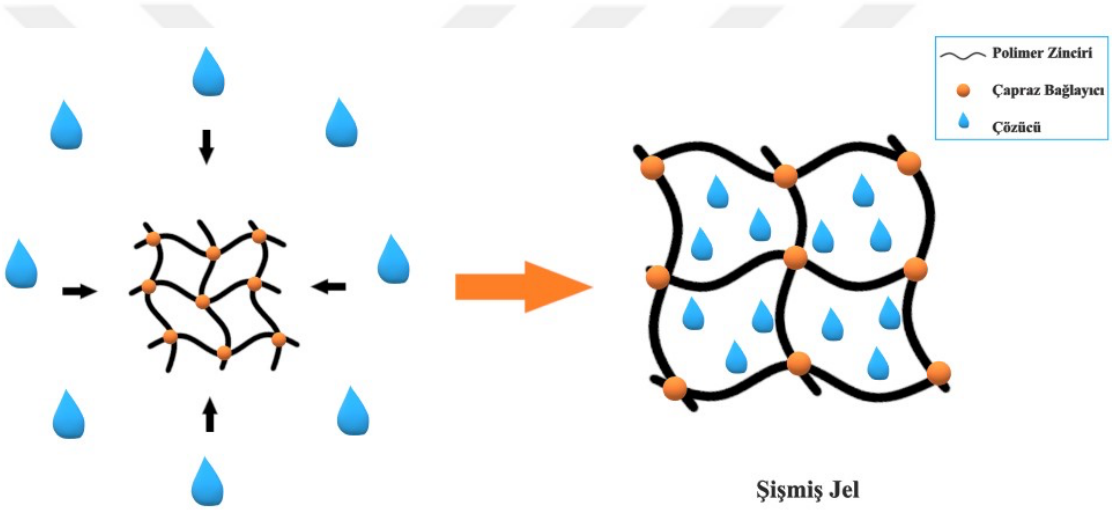
1.3 Hipotez

Literatürde oral mukozit için çok sayıda önleyici ve terapötik yaklaşım değerlendirilmiştir ancak hem araştırma bulguları çok sınırlı kalmıştır hem de klinikte ciddi eksiklikler görülmektedir. Oral mukozit için etkili ve tedavi sürecini kolaylaştıracak farmakoekonomik taşıyıcıların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, vankomisinin nişasta nanojellerine enkapsülasyonu ile oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceği öngörülmektedir. Nişastanın oral mukoza içerisinde amilaz enzimi tarafından parçalanarak içerisindeki vankomisin ile oral mukozit şiddetini ve enfeksiyonunu azaltacağı ve/veya tedavi edeceği düşünülmektedir. Böylelikle, üretilecek nişasta nanojellerinin klinik uygulamalar da dahil olmak üzere sağlık endüstrisinde kullanılabilecek biyopolimer bazlı potansiyel bir nanomalzeme olacakları varsayılmaktadır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Polimerik Jeller

Polimerik jeller, bir polimerden veya monomerden yola çıkılarak sentezlenmiş çapraz bağlı makromoleküler ağlar olarak tanımlanmaktadır [37]. Jeller, polimerin temel ağ yapısı bozulmadan yüksek miktarlarda sıvı tutabilen ve böylelikle şişen polimer ağlarıdır [38] (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Polimer ağının bir çözücü içinde şişmesinin şematik gösterimi.

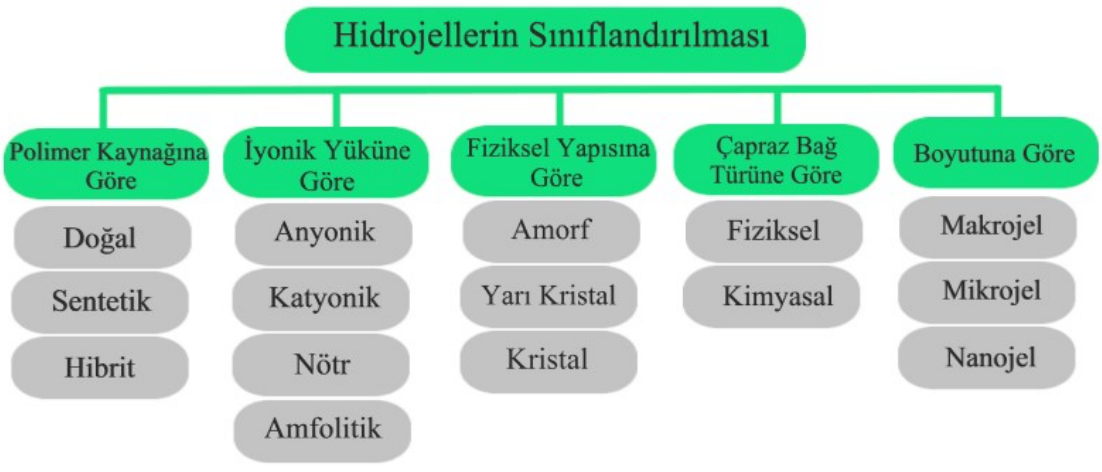
Böyle bir polimerik ağ, sıvı moleküllerle dolduğunda şişmiş bir yapı oluşturmakta ve bu sıvı su olduğunda jel, hidrojel olarak adlandırılmaktadır [39].

2.1.1 Hidrojeller

Hidrojeller, yüksek derecede esnekliğe sahip doğal veya sentetik polimerlerden oluşturulabilen üç boyutlu çapraz bağlı polimer ağlarıdır [2]. Yüksek miktarda su

veya biyolojik sıvı tutma kapasitesi, dokulara fiziksel benzerlik sağlamakta ve hidrojellere mükemmel biyouyumluluk ve hidrofilik ilaçları kolayca kapsülleme yeteneği vermektedir [40]. Suyu emme özelliğinden dolayı şişmiş olan polimer ağları oldukça ilgi çekicidir ve protein ayırma malzemeleri, kontakt lensler, hücreleri kapsüllemek için kalıplar ve ilaçların kontrollü salımı için birçok biyoteknolojik alanda geniş uygulama alanına sahiptir [41].

Hidrojeller köken, bileşim, iyonik yük, fiziksel yapı ve çapraz bağlanma temelinde birkaç kategoriye ayrılabilmektedir. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, hidrojeller kökenlerine göre doğal, sentetik veya doğal polimerlerin sentetik polimerlerle birleştirilmesiyle hibrit olarak hazırlanabilmektedir. Ağların fiziksel yapılarına göre, hidrojeller amorf, yarı kristal veya kristal olabilmektedir. Bir polimer ağında bulunan iyonik yükler açısından incelendiğinde anyonik, katyonik, nötr ve amfolitik hidrojeller olarak sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte, hidrojeller temelde polimerlerin çapraz bağlama ağları ile oluşturulduğundan, çapraz bağlamaya dayalı olarak fiziksel ve kimyasal olarak çapraz bağlı; boyutuna bağlı olarak makrojel, mikrojel ve nanojel olarak sentezlenebilmektedir [42]–[45].



Şekil 2. 2 Hidrojellerin farklı parametrelere göre sınıflandırılması.

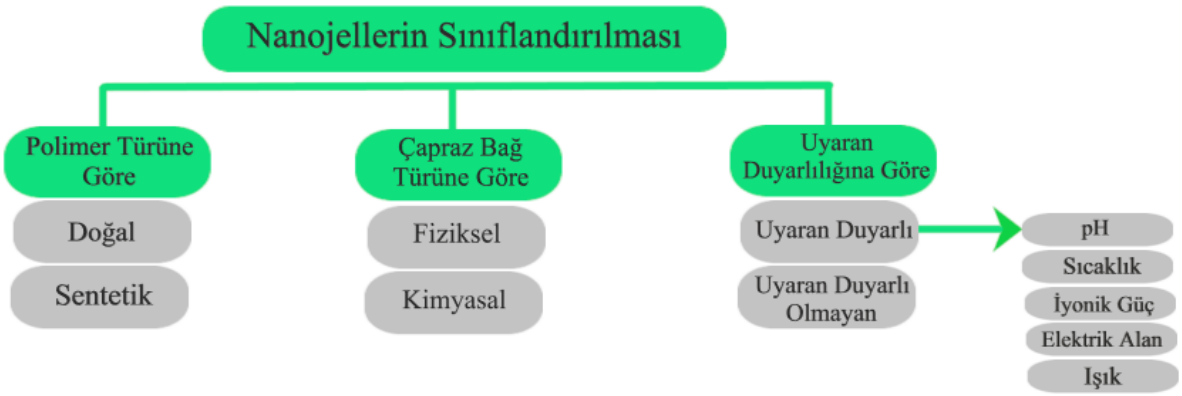
İdeal bir hidrojel, çözücüde yüksek absorpsiyon kapasitesi, gözeneklilik, toksik olmama, yük altında yüksek miktarda çözücü absorplama ve yüksek dayanıklılık gibi özelliklere sahip olmalıdır [43]. Ayrıca hidrojeller pH, sıcaklık veya diğer çevresel uyaranlara duyarlı olma gibi özelliklere sahiptirler [46]. Özellikle son yıllarda, çevreye duyarlı, kendi kendini iyileştiren, kendiliğinden birleşen iletken, şekil hafızalı ve süper moleküler hidrojeller dahil olmak üzere çeşitli hidrojel türleri geliştirilmiş ve doku mühendisliği, biyosensör, ilaç salım sistemleri vb. çeşitli uygulamalar için araştırılmıştır [44], [47]. Ancak bunun yanında hidrojellerin ana dezavantajları, şişmiş durumda düşük mekanik mukavemetleri, hidrofobik ilaçların homojen olmaması, hızlı ilaç salımı, zayıf bakteri bariyeri ve gazlara ve su buharına karşı yarı geçirgen olmalarıdır [48]. Bu dezavantajlar, nano boyutta hidrojeller kullanılarak aşılabilmektedir [49].

2.1.2 Nanojeller

Nanoteknoloji, yüksek teknoloji uygulamaları için benzersiz nanomalzemeler sunar [50]. Bu nanomalzemelerden biri olan nanojeller, sıvı içinde şişebilen fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlı polimer ağları tarafından oluşturulan nano boyutta jel partikülleridir [4], [6]. Nanojeller, hem hidrojellerin hem de nanopartikül sistemlerinin avantajlarını birleştiren malzemelerdir [51]. Nanojeller, geniş yüzey alanları, yüksek yükleme kapasiteleri, yüksek stabiliteleri ve kontrollü salım özelliklerinin yanı sıra, iyonik güç, pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere duyarlı olarak sentezlenebildikleri için avantajlar sağlamaktadır [6], [52].

Nanojeller, çeşitli doğal ve sentetik polimerlerden veya bunların bir kombinasyonundan oluşabilir; hidrojen bağları, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler yoluyla kimyasal ya da fiziksel bağlarla çapraz bağlanabilmektedir [4], [53], [54]. Nanojel sentezlemek için yaygın olarak kullanılan doğal polimerlere, dekstran, dekstrin, pullulan, kitosan, heparin, HA ve aljinat; sentetik polimerlere ise, poli(metil metakrilat), poli(d,l-laktik asit), poli(glikolik asit),

poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) ve poli(ε-kaprolakton) örnek verilebilmektedir [55]. Nanojellerin sıvı emme kapasitesinin yüksek olması, bu polimerlerin yapısındaki –OH, –CONH–, $–CONH_2–$ ve $–SO_3H$ gibi hidrofilik fonksiyonel grupların varlığındandır [54]. Nanojeller çözücünün absorpsiyonu sayesinde şişebilir ve fiziksel ya da kimyasal olarak çapraz bağlı polimerik ağ yapısı sayesinde çözünmezler [56].



Şekil 2. 3 Nanojellerin farklı parametrelere göre sınıflandırılması.

Bir nanojelin çözücü ortamında şişebilmesi en önemli özelliğidir. Nanojellerin şişmesine polimer matrisinin kimyasal yapısı, çapraz bağlanma derecesi, polielektrolit jellerdeki yük yoğunluğu ve çevresel değişkenler gibi yapısal özellikler etki etmektedir [54]. Nanojellerin kimyasal bileşimlerinde yapılan değişikliklerle yük, boyut, bozunabilirlik, gözeneklilik, amfifiliklik ve yumuşaklık gibi özellikleri de ayarlanabilmektedir [57]. Tipik olarak nanojeller küresel şekil ile karakterize edilirler, ancak üretim yöntemlerine bağlı olarak farklı şekiller de mümkün olmaktadır [58].

Nanojeller sadece şişme, boyut ve çapraz bağlanma yoğunluğu açısından değil, aynı zamanda spesifik hedefleme ligandları gibi yüzey modifikasyonları ile ihtiyaç doğrultusunda özelleştirilebildiği için günümüzde çok çeşitli uygulama alanlarında yoğun bir şekilde araştırılmaktadır [59].

2.1.2.1 Nanojel Hazırlama Yöntemleri

Son yıllarda, nanojellerin tasarımı ve sentezi için kolay, hızlı ve verimli stratejilerin geliştirilmesine büyük ilgi gösterilmiştir [54]. Sentetik veya doğal polimerlere dayalı nanojel ağları, çapraz bağlı yapılarına göre temel olarak iki şekilde sentezlenebilmektedir: kovalent bağlarla çapraz bağlanma oluşturan kimyasal olarak çapraz bağlı nanojeller ve kovalent olmayan bağlarla daha zayıf bağlantılar yoluyla kendi kendine birleşme ile oluşan fiziksel olarak çapraz bağlı nanojeller [60]. Kimyasal çapraz bağlama, nanojellerin içinde moleküller arası veya molekül içi kovalent bağlar oluştuğundan daha kararlı nanoyapılar elde edilmektedir [55]. Polimer-polimer ve polimer-biyomolekül fiziksel etkileşimleri ile üç boyutlu nanojeller elde edilebilmektedir. Bu durumda, kendi kendine bir araya gelme yoluyla nanoagregatların üretilmesi nedeniyle supramoleküler çapraz bağlanma meydana gelir [58]. Fiziksel olarak çapraz bağlanmış nanojeller, hidrojen bağları, elektrostatik, van der Waals ve hidrofobik etkileşimler ile oluşmaktadır ve kovalent olarak bağlanmış nanojellere kıyasla daha az kararlıdır [54]. Polimerin kimyasal yapısındaki fonksiyonel grupların sayısı da nanojelin fiziksel birleşimini etkilemektedir [49]. Bu yöntem, suda çözünür polimerlerin kendi kendine birleşmesiyle protein ve gen yüklü nanojeller hazırlamak için sıkça kullanılmaktadır [61].

Nanojeller, emülsiyon polimerizasyonu, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma, nanoçökeltme, radikalik polimerizasyon ve foto-indüklenmiş çapraz bağlama gibi yöntemler ile sentezlenebilmektedir.

Emülsiyon/Ters Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon bazlı polimerizasyon, sürekli bir fazda monodispers ve kararlı damlacıkların oluşumuyla sonuçlanan nanojel sistemlerinin sentezi için popüler bir yöntemdir. Başlıca emülsiyon polimerizasyon teknikleri, geleneksel emülsiyon polimerizasyonu, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu, mini

veya nanoemülsiyonlar ve mikroemülsiyon polimerizasyonlarını içerir [62]. Sulu çözelti içinde reaktif monomerler/polimerler içeren organik damlacıkların (su içinde yağ, S/Y emülsiyonu) dağılımı emülsiyon polimerizasyonu olarak belirtilir; organik çözücüde dağılan sulu damlacıkları ortamda ise (yağ içinde su, Y/S emülsiyonu) ters emülsifikasyon polimerizasyonu olarak bilinmektedir. Bu yöntemde süreç üç adımda gerçekleşmektedir: çekirdeklenme, öncü nanoparçacık büyümesi ve polimerizasyon [58]. Hem organik çözücünün hem de emülgatörün uzaklaştırılmasından sonra, sulu bir ortamda stabil bir şekilde dağılabilen nanojeller elde edilmektedir [63].

Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma

Nanojel sentezinde kullanılan başka bir teknik, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemidir. Bu yöntemin mantığı, ayarlanabilir gözenek boyutuna sahip nanojeller üretmek için monomerlerin polimerizasyonu yerine önceden oluşturulmuş polimer zincirlerinin kovalent çapraz bağlanmasına dayanır. Aktifleştirilmiş bir polimer organik bir fazda ve diğeri ise suda çözülür; birinin diğerine kuvvetli karıştırılması veya sonikasyon altında eklenmesi, bir S/Y emülsiyonuna yol açmaktadır. Sulu fazda polimerler arasında kovalent bağların oluşumu ile nanojeller meydana gelmekte, ardından organik çözücü buharlaştırılmaktadır. Bu aşamada nanojelleri oluşturmak için reaktif grupların varlığı önemlidir, bu gruplar polimer omurgasında mevcut olabilir veya polimerizasyon sonrası işlevselleştirme ile aşılanabilmektedir. Bunun yanında, organik çözücü tercihi de önemlidir, sürekli fazda az çözünür olmalı, düşük kaynama noktasına, yüksek uçuculuğa ve tercihen düşük toksisiteye sahip olmalıdır [58], [62].

Ters Nanoçökeltme

Ters nanoçökeltme yöntemi ile aseton vb. çözücülerde makromonomerlerin çökeltilmesiyle nanojeller elde edilmektedir. Bu yöntemde genellikle yüzey aktif

maddeler veya yüksek frekanslı ses dalgaları gerekmemektedir, bu nedenle sentez koşullarının çok basit olduğu kabul edilmektedir [64].

Radikal Polimerizasyonu

Radikal polimerizasyon, özellikle atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), nitroksit aracılı polimerizasyon ve Tersinir Katılma Ayrılma Transfer Polimerizasyonu (RAFT) gibi radikal polimerizasyonu teknikleri mikro ve nanojelleri sentezlemek için kullanılan yöntemlerdir. Normalde başlatıcı moleküllerden üretilen serbest radikaller, polimerizasyonu başlatmak için kullanılır ve monovinilik monomerler, önceden oluşturulmuş kolloidal olarak kendiliğinden birleşen damlacıklar içinde iki veya çok işlevli çapraz bağlayıcılarla çapraz bağlanmasıyla nanojeller elde edilmektedir. Geleneksel radikal polimerizasyon ile hazırlanan nanojellere kıyasla ATRP ile sentezlenen nanojeller, daha yüksek şişme oranları, daha homojen ve kontrollü yapılar, daha iyi kolloidal stabilite ve kontrollü bozunma gibi avantajlara sahip olmaktadır [65].

Foto-İndüklenmiş Çapraz Bağlanma

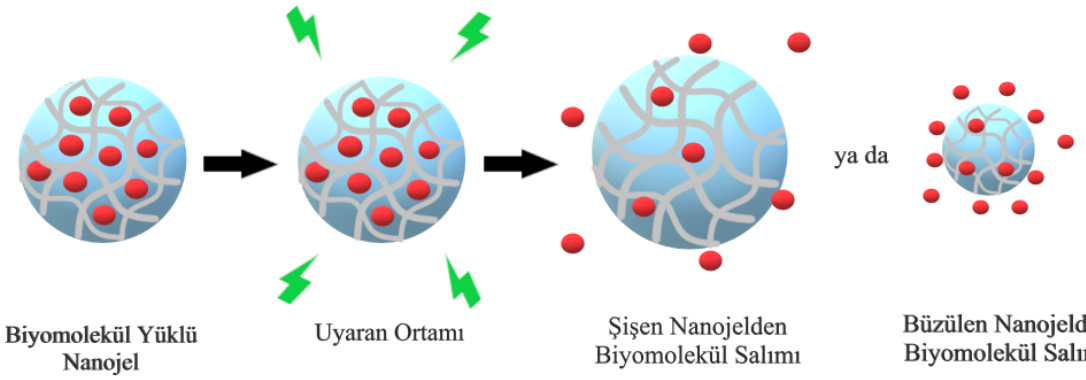
Foto çapraz bağlama, nanojellerin yukarıda açıklanan polimerizasyona dayalı yöntemlere alternatif olacak bir yaklaşımı temsil etmektedir ve hiçbir yan ürün oluşmamaktadır. Foto-aktive edilebilir veya dimerize edilebilir gruplarla işlevselleştirilmiş polimerler, kovalent bağlar ile üretilen kararlı bir nanojel üretmeyi sağlamaktadır. Reaksiyon, fotoliz veya ışıkla indüklenen bölünme yoluyla reaktif radikal türlere dönüştürülen bir fotobaşlatıcının varlığı ile olmaktadır. İlk radikallerin oluşum hızı, kovalent çapraz bağlanmayı ve sonuç olarak nano ağın şişme davranışı, stabilite ve yüzey alanını etkilemektedir [58].

2.1.2.2 İlaç Salım Sistemleri Olarak Nanojeller

Nanojeller, basit teknikler kullanarak çeşitli terapötikleri kapsülleme ve taşıma potansiyeline sahiptir. Polimerik bir nanojelin yükleme kapasitesi, jeli formüle

etmek için kullanılan polimerin özelliklerine bağlıdır [49]. Nanojeller ve diğer nano boyutlu ilaç salım sistemleri, makro boyutlu salım sistemlerine göre daha avantajlı olabilmektedir. Nano boyuttaki ilaç dağıtım sistemlerinin kilit noktalarından biri, makro boyutlu sistemlere kıyasla, ilaç salım oranları üzerinde daha iyi zamansal kontrol sağlamasıdır [66]. Ayrıca, biyokonjugasyon için geniş bir yüzey alanı, kanda uzun dolaşım süresi ve istenen bölgeye, aktif veya pasif olarak hedefleme imkânı sağlamaktadır. Bunun yanında, biyomoleküllerin kapsüllenmesi için bir iç ağın varlığı, nanojelleri nanotıp uygulamaları için ideal adaylar yapmaktadır [67]. Nanojeller ayrıca, bir patlama salımı gerektiren sistemlerde de faydalı olabilmektedir [66].

Kimyasal veya fiziksel çapraz bağlama ile oluşturulan nanojeller, küçük moleküllü bileşikler, proteinler ve DNA/RNA dizileri dâhil olmak üzere çeşitli hidrofilik veya hidrofobik terapötikleri polimer ağları içinde kapsülleme yeteneği sergilemektedir [50]. Bununla birlikte, nanojeller pH, sıcaklık, enzim, manyetik alan, ışık gibi değişikliklere yanıt veren uyaranlara duyarlı malzemeler olarak tasarlanabilmektedir. Verdikleri yanıt, nanojellerin yapısında değişikliklere sebep olarak taşıdığı biyomolekülü istenilen bölgede serbest bırakmasını sağlamaktadır [68] (Şekil 2.4). Matriks sisteminden basit difüzyon veya uyaranlar yoluyla olabilen salımın sürdürülmesinde nanojel matrisinin ağ boyutu, önemlidir. Biyolojik ajanların temel olarak salım mekanizmaları 1) difüzyon, 2) nanojel matrislerinin erozyonu, 3) çevredeki pH değişiklikleri, 4) çevrede bulunan karşı iyonlarla yer değiştirme, 5) manyetik alan ve ışık gibi dışardan gelen enerji kaynaklarının tetiklediği salım mekanizmalarıdır [69].



Şekil 2. 4 Nanojel ağından biyomolekül salımının şeması.

Sonuç olarak, yüksek miktarda su tutma kabiliyeti, kullanılan polimerlerin biyouyumluluğu, nanojel matrisi içinde büyük miktarda ilaç kapsülleme kabiliyeti, yüksek stabilite ve uyaranlara duyarlı olmaları nanojelleri avantajlı kılan özellikleridir. Bununla birlikte, kontrollü bir şekilde ilacı serbest bırakması onları ilaç salımı uygulamalarında kullanımını çok çekici kılmaktadır [70]. Ayrıca, hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavisinde birçok uygulaması olan nanojeller, oral, pulmoner, nazal, oküler ve topikal yollar gibi çeşitli yollardan uygulanabilmektedir [71].

Son yıllarda hem sentetik hem de doğal polimerler, polimerik nanojeller geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Polisakkaritler fizikokimyasal özelliklerine ek olarak, çok işlevli grupları nedeniyle çeşitli özelliklere sahip nanomalzemeler sentezlemek için kimyasal modifikasyona elverişli polimerlerdir. Böylece, farklı farmasötik ajanlar için bir taşıyıcı sistem olarak dikkat çekmektedir [72].

2.1.2.3 Polisakkarit Bazlı Nanojeller

Polisakkaritler, yeryüzünde en bol bulunan biyopolimerlerin arasında yer alan organik moleküllerdir. Bu tür biyopolimerler, genellikle toksik olmayıp biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunurdurlar [73]. Polisakkaritler omurgasında bulunan

reaktif fonksiyonel gruplar sayesinde, çeşitli yapılara sahip nanomalzemeler sentezlemek için kolay bir şekilde kimyasal olarak modifiye edilebilmektedir [74]. Polisakkarit bazlı nanojeller yüksek su içeriğine, işlevselliğe, biyouyumluluğa, ayarlanabilir nano boyuta, biyokonjugasyon için geniş yüzey alanına ve terapötiklerin kapsüllenmesi için polimerik bir ağ yapısına sahiptirler [75] (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5 Polisakkarit bazlı nanojellerin avantajları.

Doğal polimerler bazlı nanojeller genellikle kitosan, HA, aljinat ve nişasta gibi farklı fizikokimyasal özelliklere sahip polisakkaritlerden hazırlanmaktadır [9], [22], [76]. Polisakkaritler, sentetik polimerlerin toksisitesini azaltmak, öldürücü bakterisit etkileri veya biyo-yapışmayı indüklemek için sıklıkla hibrit nanojel sentezinde kullanılmaktadır. Ek olarak, insan hücre dışı matrisleri ile karşılaştırılabilir biyokimyasal özellikleri nedeniyle, polisakkaritler vücut tarafından kolayca tanınmakta, metabolize edilmekte ve antimikrobiyal ve anti-inflamatuar yanıtların aktivasyonundan sorumlu olan bağışıklık tanıma ve hücre sinyali dahil birçok biyolojik süreçte yer almaktadır [77]. Çeşitli enzimler

tarafından sindirilmekte ve vücutta biyomateryal olarak kullanıldığında geri dönüştürülebilmektedir. Polisakkaritlerin çoğu, ilaç salımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalar için onları çekici kılan düşük toksisite ve immünojenisite gösterirler [78]. Bu sebeple kitosan, aljinat, HA ve nişasta gibi polisakkaritler biyomedikal uygulamalar için nanojellerin sentezinde daha kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

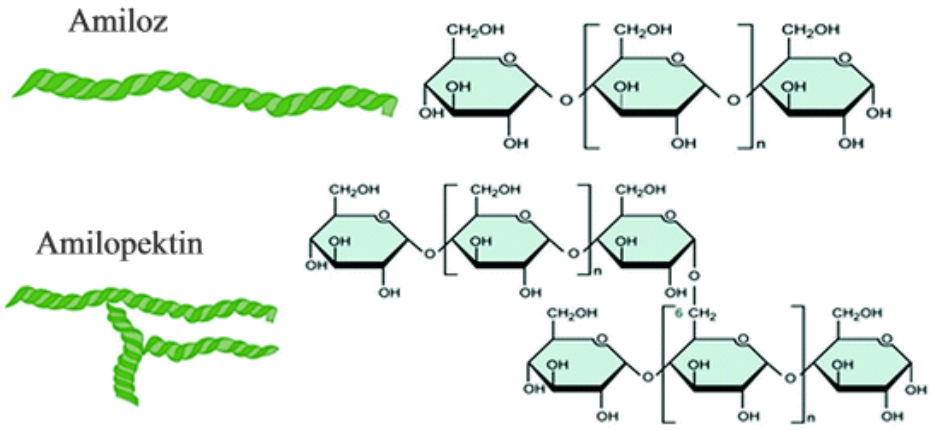
2.2 Nişasta

Doğada en bol bulunan ikinci polisakkarit olan nişasta, bitkilerde enerji depolayan bir doğal polimerdir [12]. Bitkiler tarafından yaygın olarak tohumlarda, köklerde ve yumrularda karbonhidrat olarak depolanmakta, ancak gövde, yaprak ve meyvelerde de bulunmaktadır [79]. Başlıca nişasta kaynakları buğday, pirinç, arpa ve mısır gibi tahıl taneleri nohut, fasulye, bezelye ve bakliyat gibi baklagillerin tohumları, patates, zencefil, zerdeçal ve yerfıstığı gibi yumru kökler ve olgunlaşmamış meyve ve sebzelerdir [80], [81]. Nişastanın fiziko-kimyasal ve yapısal özellikleri, farklı botanik kaynaklar arasında farklılık göstermektedir [82]. Kaynağına göre de nişasta gıda, kâğıt, tekstil, plastik, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.1 Nişastanın Yapısı ve Sınıflandırılması

Nişasta, bitki hücrelerinde doğal olarak granüller formda bulunmaktadır. Nişasta granülleri boyutlarına göre çok küçük (5 μm), küçük (5-10 μm), orta (10-25 μm) ve büyük (25 μm'den büyük) olarak sınıflandırılabilmektedir [83]. Nişasta değişen kristallik seviyeleri ile yarı kristal bir haldedir. Kristallik, yalnızca amilopektin bileşeni ile bağlantılıyken, amorf bölgeler esas olarak amilozu temsil etmektedir. Amiloz, α-(1→4) glikozidik bağlarla bağlanan glukopiranoz birimlerinden oluşan lineer bir polimerdir, amilopektin ise α-(1→6) dal bağlantılı α-(1→4) bağlarla bağlanarak doğal olarak oluşan polimerler arasında bilinen en yüksek moleküler ağırlıklardan birine sahip dallı bir polimerdir [81], [84]. Amiloz ve amilopektin, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi farklı yapılara ve özelliklere sahiptir. Bu iki

anhidroglikoz polimerinin oranı, nişastanın botanik kökenine göre farklılık göstermektedir [85].



Şekil 2. 6 Nişastanın amiloz ve amilopektin bileşenleri [85].

Nişasta, üretilen X-ışını kırınımına ve beslenme özelliklerine göre kategorize edilebilmektedir. Üretilen X-ışını kırınımına göre;

1. Tip A (zincir uzunluğu 23-29 glikoz birimi olan amilopektine sahip, örneğin tahıl nişastası),
2. Tip B (zincir uzunluğu 30-44 glikoz birimi olan amilopektine sahip, örneğin yumrular ve amilozca zengin nişastalar),
3. Tip C (26-29 glikoz molekülü zincir uzunluğuna sahip amilopektin içeren Tip A ve B karışımı, örneğin baklagil nişastası),
4. Tip V (şişmiş granüllerde bulunmakta ve jelatinleşme üzerine oluşmaktadır. Amiloz, yağ asitleri ve monogliseritlerin bir özelliğidir) şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Oluşan bu farklı X-ışını desenleri kristal yapı içinde bağlı suyun varlığı, amilopektin zincir uzunluğu ve granüller içindeki paketlenmelerinin kompaktlığına atfedilmektedir. A tipi, B tipine göre daha yoğundur, dolayısıyla

daha az su bağlar. A ve B tipi yapı olarak hemen hemen kristal iken, C tipi hem kristal hem de amorf parçacıkların bir karışımıdır. Besin özelliklerine bağlı olarak ise, nişasta üç gruba ayrılmaktadır; Hızlı sindirilebilir nişasta, yavaş sindirilebilir nişasta ve dirençli nişasta [86], [87].

2.2.2 Nişastanın Fiziksel, Kimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri

Farklı kaynaklardan elde edilen nişastalar, yapıları ve bileşimleri bakımından büyük bir çeşitlilik oluşturmaktadır. Bu sebeple, farklı fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikler sergilemektedir [88]. Nişasta granüllerinin çapı 0,1 ile 200 μm arasında değişen mikroskobik boyutlara ve botanik kaynağa bağlı olarak oval, elipsoidal, küresel, pürüzsüz ve köşeli gibi farklı şekiller arasında dönüşüme sahiptir [89]. α-glukan zincirlerinin uzunluğu, amiloz/amilopektin oranı ve amilopektinin dallanma derecesi, her bitki türünde nişasta granüllerinin boyutunu, yapısını ve fonksiyonel özelliklerini tanımlamaktadır. Formu, yüzey tipi ve fosfat grupları gibi granülle ilişkili diğer özellikleri de, nişastanın özelliklerini ve kullanımlarını etkilemektedir [90].

Fiziksel özellikler, nişastanın kimyasal özelliklerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın sergilenen ve çözünürlük, jelatinleşme, retrogradasyon, camsı geçiş vb. kimyasal bağların kırılmasını ve oluşmasını içermeyen özelliklerdir [88]. Örneğin, nişasta granül şekli ve yüzeyi fonksiyonellik üzerinde etkisi olan basit fiziksel özelliklerdir. Bu genellikle nişastanın renkler, tatlar, baharatlar ve hatta böcek ilaçları gibi malzemelerin yüzey taşıyıcısı olmasını gerektiren uygulamalar için kritik bir faktördür [91]. Öte yandan, nişastanın kimyasal yapıları, amiloz ve amilopektin düzeylerini değiştirebilen botanik kökene, bitkinin olgunluğuna ve genetik yapısına bağlıdır; lipidler, fosfor ve proteinler gibi karbonhidrat olmayan bileşenlerin küçük miktarları da farklı fonksiyonel özelliklere katkıda bulunmaktadır. Bu tür farklılıklar nişastanın viskozitesini, sıcaklığını ve jelleşme gücünü etkilemektedir [92].

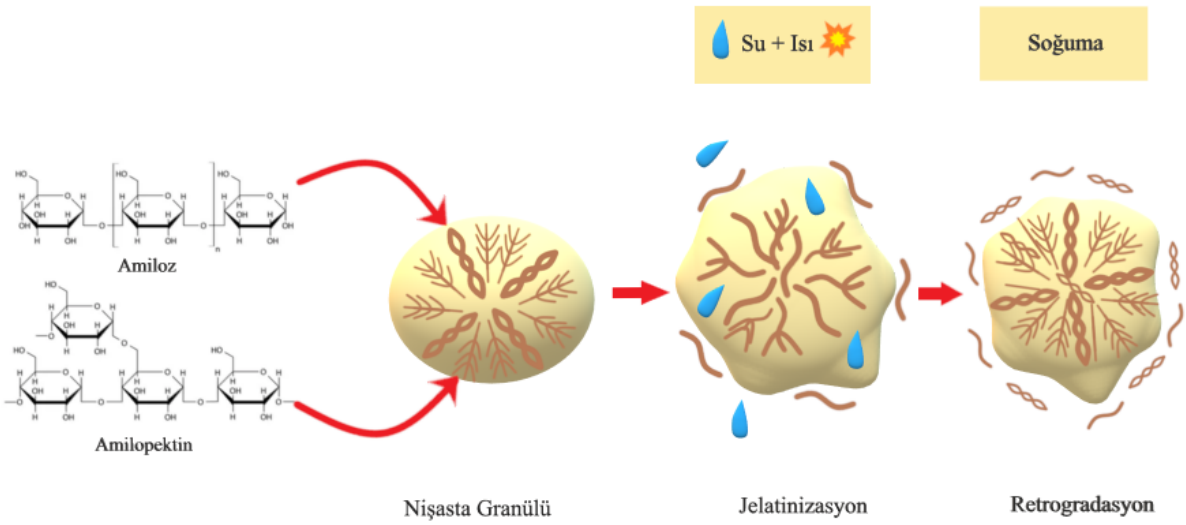
Ayrıca, nişastanın en önemli özelliklerinden biri, su emmeden granül parçalanmasına kadar farklı aşamalardan geçmesidir [89]. Nişasta yapısında bulunan hidroksillerin bolluğu, polimere hidrofilik özellikler kazandırarak, ona bir nem afinitesi ve suda dağılabilme özelliği vermektedir. Ancak nişasta granülleri genellikle soğuk suda çözünmezler [92]. Nişasta granüllerindeki fosfolipid içeriği amiloz ile orantılıdır. Fosfolipidler, amiloz ve uzun amilopektinin dalları ile kompleks yapılar oluşturma eğilimindedir, bu da sınırlı çözünürlüğe sahip nişasta granülleri ile sonuçlanmaktadır [90]. Bu sebeple, nişastayı çözebilmek için farklı yöntemler kullanılmaktadır.

2.2.3 Nişastanın Jelatinizasyonu ve Retrogradasyonu

Jelatinizasyonun ilerlemesi ve kapsamı, birincil olarak, uygulanan ürün parametrelerinin yanı sıra ham madde özellikleri tarafından belirlenmektedir. Hammadde özelliklerinin yanında, jelatinleştirme işlemi nişasta granüllerinin bileşim, morfoloji, moleküler mimari ve moleküler ağırlık gibi özelliklerinden etkilenmektedir [93]. Nişastanın jelatinizasyonu, genellikle granülün yapısının bozulmasından kaynaklanmaktadır. Bu bozulma işlemi, nişasta granüllerinin bir süspansiyonunun su içinde ısıtılmasıyla, suyun 100°C'ye kadar kaynatılmasıyla veya 121°C'de basınç altında otoklavlanmasıyla gerçekleşmektedir [94]. Şekil 2.7'de görüldüğü gibi, bu sıcaklıklara ulaşıldığında, suyun difüzyonu ve absorpsiyonu nedeniyle granüller şişmekte ve sonunda amiloz ve amilopektin molekülleri kırılarak geri dönüşü olan/olmayan (sıcaklığa bağlı olarak) dönüşümlere uğramaktadır [95]. Nişasta granüllerini düşük sıcaklıklarda ya da soğukta jelatinleştiren alkali sodyum hidroksit (NaOH) ve dimetil sülfoksit gibi kimyasal nişasta çözme yöntemleri de kullanılabilmektedir [94].

Nişasta moleküllerinin jelatinazyonu işleminden sonra yüksek viskoz bir çözelti oluşmakta ve depolandıktan bir süre sonra güçlü bir jelleşme yani retrogradasyon durumuna geçmektedir. Retrogradasyon esnasında amiloz ve amilopektin molekülleri arasında yeni hidrojen bağları meydana gelmektedir. Bu bağlanma,

depolama sırasında amilopektin ve su moleküllerinin Brownian hareketindeki ve kinetik enerjisindeki azalmadan kaynaklanmaktadır [96].



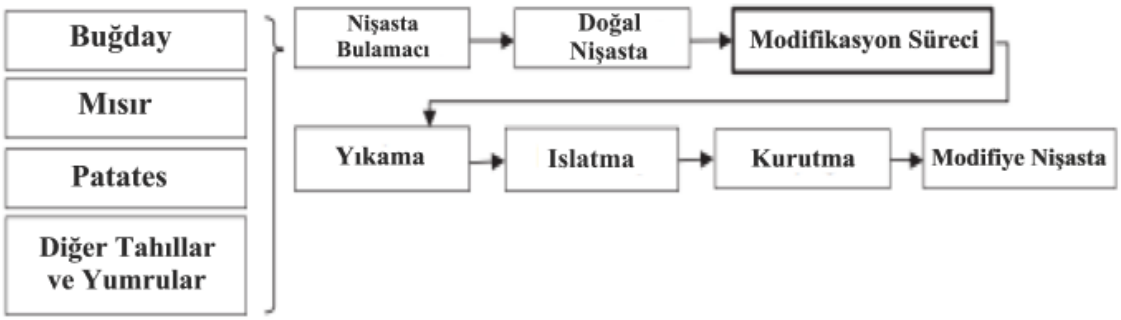
Şekil 2. 7 Nişastanın jelatinizasyonu ve retrogradasyonu.

2.2.4 Nişastanın Modifikasyonu

Nişasta yenilenebilir, toksik olmayan, biyobozunur, biyouyumlu ve ucuz bir polimer olduğu için gıda, kağıt, tekstil ve ilaç endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (91,92). Ancak, bitkilerden ekstrakte edilen doğal nişasta, örneğin yüksek sıcaklık, neme karşı düşük direnç, güçlü asit ve alkali işlemleri ve yüksek kesme oranları gibi aşırı işleme koşullarına her zaman dayanıklı değildir, bu da birçok endüstriyel uygulamada kullanımı sınırlamaktadır [99], [100]. Bu sebeple, nişastanın doğal özelliklerini geliştirmek için endüstriyel uygulamaların ihtiyaçlarını karşılamak üzere modifiye etmek için farklı teknikler kullanılmaktadır. Şekil 2.8'de nişastanın genel modifikasyon süreci verilmiş olmakla birlikte [98], yaygın modifikasyon metodları arasında fiziksel (yüksek basınçlı otoklav, ozmotik basınç işlemi, ekstrüzyon), kimyasal (oksidasyon, esterifikasyon, eterleştirme) ve enzimatik modifikasyonlar (dekstrin) yer almaktadır [99].

Nişasta modifikasyonunun fiziksel yöntemleri, fraksiyonlama dahil, kuru veya ıslak durumda ısı, basınç veya mekanik etkisi altındaki herhangi bir işlemi içermektedir. Enzimatik yollarla modifikasyon, suda çözünürleştirilmiş veya kısmen hidrolize edilmiş ürünler elde etmek için nişastanın küçük miktarlarda enzimlerin varlığında işlenmesiyle yapılmaktadır. Son olarak kimyasal modifikasyon ise, nişastanın bir veya daha fazla kimyasal maddenin varlığında işlenmesiyle gerçekleşmektedir [92].

Enzimatik yöntemler biraz karmaşık ve zaman alıcı olduğundan endüstriyel sektörlerde uygulamaları sınırlıdır. Kimyasal yöntemler daha hızlı olmalarına rağmen nihai üründe belirli kimyasal kalıntılar bırakmaları nedeniyle risk oluşturmaktadır. Bu sebeple, nişasta modifikasyonu için uygun fiziksel yöntemlere yoğun ilgi vardır [86].



Şekil 2. 8 Genel modifikasyon süreci [101].

2.2.4.1 Fiziksel Modifikasyonlar

Nişastanın fiziksel modifikasyonları, bazı fiziksel faktörlerin etkisi altında nişastanın morfolojisinde ve yapısında meydana gelen değişiklikleri içermektedir. Suda çözünürlüğünü iyileştirmekle birlikte, nişasta granüllerinin boyutunu azaltabilmektedir. Fiziksel yöntemler doğal granüllerin farklı sıcaklık, nem,

basınç, kesme ve ışınlama kombinasyonlarını iyileştirmektedir. Nişasta granüllerinin fiziksel modifikasyonu basit, ucuz ve güvenlidir. Bu teknikler kimyasal veya biyolojik ajanlar gerektirmemekte ve bu nedenle ürün tüketimi sırasında tercih edilmektedir [89], [102]. Fiziksel modifikasyonlar, termal ve termal olmayan yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Termal modifikasyonlar, nişastanın granül yapısını bozmadan fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek yapılan modifikasyon işlemlerdir [103]. Isı-nem işlemi, tavlama ve ekstrüzyon ısıtma yöntemleri bunlardan bazılarıdır [102], [104], [105]. Termal olmayan modifikasyonlar ise, geleneksel ısıtma süreçlerine bir alternatiftir. Yüksek enerjili geleneksel ısıl işlemler genellikle istenen üründe vitamin ve temel besin maddelerinin kaybına neden olmaktadır. Termal olmayan işlem kavramı, termal işlemlerin eksikliklerini en aza indirmek için ortaya çıkmıştır [103]. Öğütme, yüksek basınçlı işlemler ve ultrason bu yöntemler arasında yer almaktadır [103], [106].

2.2.4.2 Kimyasal Modifikasyonlar

Kimyasal modifikasyon işleminin hızı ve verimliliği, reaktif tipine, nişastanın botanik kökenine ve granüllerinin boyutuna ve yapısına bağlıdır. Bu tür modifikasyonlar genellikle nişastanın jelatinleşme ve yapıştırma özelliklerini değiştirerek, amiloz ve amilopektin arasındaki ilişkilerin bloke edildiği daha kararlı bir nişasta türevi ile sonuçlanmaktadır [107]. Nişastanın kimyasal modifikasyonu, nişasta molekülü üzerine yeni fonksiyonel grupların eklenmesiyle yapılmaktadır. Yeni fonksiyonel gruplar, nişastayı belirli uygulamalara uygun hale getiren özellikler kazandırmaktadır. Asit hidrolizi, oksidasyon, esterleştirme, eterleştirme ve çapraz bağlama gibi çeşitli kimyasal modifikasyon yöntemleri ile gerçekleştirmektedir [94], [101], [107], [108].

Çapraz Bağlama

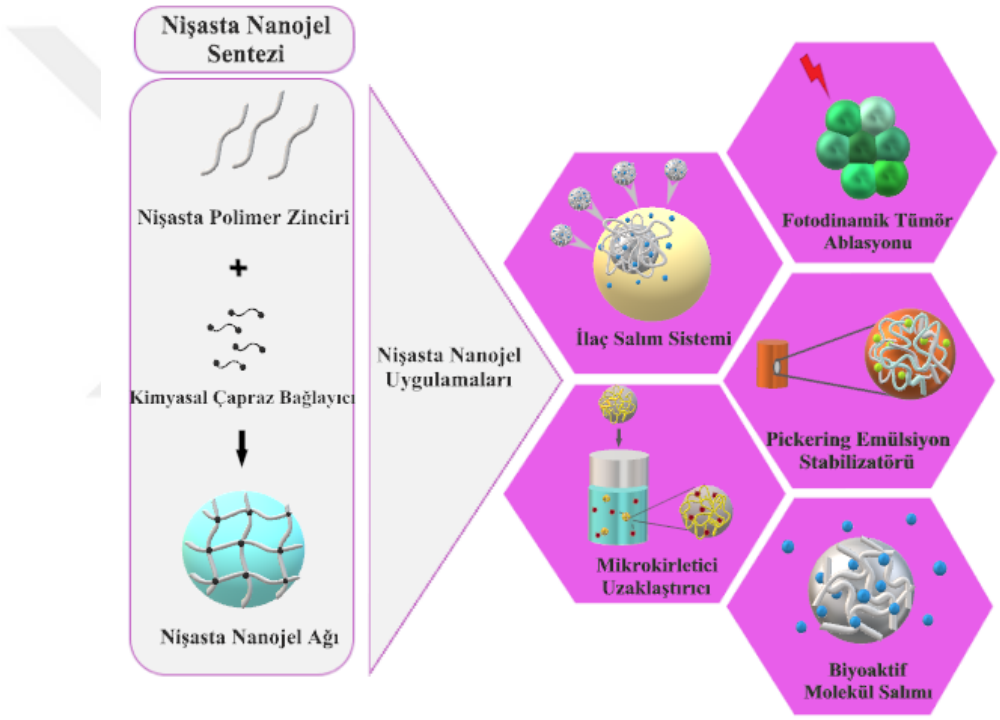
Nişasta ağ yapıları sıklıkla çapraz bağlama uygulanarak güçlendirilmektedir. Monosodyum fosfat, sodyum trimetafosfat, sodyum tripolifosfat, epiklorohidrin, fosforil klorür, adipik ve asetik anhidritlerin bir karışımı ve süksinik anhidrit ve vinil asetatın bir karışımı, nişastaları çapraz bağlamak için sık olarak kullanılan reaktiflerdir. Kullanılan reaktifler nişasta moleküllerindeki hidroksil gruplarıyla eter veya ester bağları oluştururlar. Bu çapraz bağlama, yapıları stabilize etmek ve güçlendirmek, yüksek sıcaklığa, düşük pH'a ve yüksek kesmeye karşı direnci geliştirmek ve kontrollü salım formülasyonlarında matrisler hazırlamak için daha fazla yapısal bütünlük sağlayan kimyasal bağlar oluşturmaktadır [90], [92], [109]. Bu tez çalışmasında çapraz bağlama yöntemiyle nişasta ile PEGDE çapraz bağlanarak bir nanotaşıyıcı sistem olarak nanojeller hazırlanmıştır.

2.2.4.3 Enzimatik Modifikasyon

Enzimatik modifikasyonun kullanılması, daha az yan ürün, daha spesifik hidroliz ürünleri ve yüksek verimin yanı sıra, belirli özelliklere sahip proses ve son ürünlerin daha iyi kontrol edilebilmesini sağlayan bir dizi avantaja sahiptir. Nişasta yapısını değiştirmek ve istenen fonksiyonelliği elde etmek için kullanılan birçok enzim vardır. Enzimler, α-d-glukopiranozil kalıntıları arasındaki (1→4) veya (1→6) bağları hidrolize eder. Nişasta modifikasyonu için kullanılan en yaygın enzimler; a-amilaz, β-amilaz, glukoamilaz, pullulanaz ve izoamilazı'dır [110]. Amilazlar, çözünür nişasta polimerlerini ve bozulmamış nişasta granüllerini hidrolize etme yeteneğine sahiptir [111]. Enzimatik hidroliz ile nişasta bozunmasının genel mekanizması, enzimlerin difüzyonu ve bunların nişasta substratına bağlanması ve ardından bağları kırmasıdır. Bu yöntem gıda, kağıt, tekstil endüstrilerinde vb. geniş uygulamalar için doğal nişastanın viskozite, çözünürlük ve jelleşme özelliklerini değiştirmek için kullanılmaktadır [112].

2.3 Nişasta Nanojelleri

Polisakkarit bazlı nanojeller arasında, yüksek teknoloji alanlarındaki birçok uygulama için önemli bir potansiyele sahip olan nişasta bazlı nanojeller ortaya çıkmıştır. Şekil 2.9 nişasta nanojellerinin genel sentez şemasını ve çeşitli alanlardaki uygulamalarını göstermektedir [22]. Nişasta nanojellerinin başta biyomedikal ve farmasötik ilaç salım sistemleri olmak üzere, çeşitli çevresel uygulamaların da dahil olduğu endüstriyel uygulamalardaki kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.



Şekil 2. 9 Nişasta nanojellerinin genel sentez şeması ve çeşitli alanlardaki uygulamaları [22].

Nişasta nanojelleri, genellikle gözenekli yapılarında yüksek miktarda su içeren, fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlı nişasta ağları yoluyla oluşturulmaktadır [113]. Nişasta, jelatinize edildiğinde kolayca üç boyutlu bir ağ oluşturduğundan nanojellerin üretimi için büyük avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, nişastada bol

miktarda hidroksil gruplarının bulunması sayesinde nişasta bazlı nanojeller eterifikasyon veya esterifikasyon ile, ya da Schiff-baz reaksiyonları, tiyol-disülfid değişimi, foto-indüklenmiş ve enzim aracılı çapraz bağlama gibi çeşitli çapraz bağlama yöntemleri ile sentezlenebilmektedir [22].

Nişastanın farklı türleri kullanılarak sentezlenmiş çeşitli nişasta nanojelleri bulunmaktadır. Mısır, patates ve bezelye nişastalarının fiziksel olarak çapraz bağlanmış nanojelleri, ters emülsifikasyon ve iç jelasyon ile elde edilmiştir [114]. Amiloz hidrojen bağı yoluyla fiziksel çapraz bağlanma, yaklaşık 100 nm çapındaki nanojelleri oluşturmuştur. Nişasta tipi, jelleşme süresi ve amiloz içeriğinin nişasta nanojellerinin özellikleri üzerindeki etkisini detaylı olarak araştıran ilk çalışma olması nedeniyle oldukça önemlidir.

2.3.1 Modifiye Nişasta İle Hazırlanan Nanojeller

Çapraz bağlama ile birlikte doğal nişastanın dezavantajlarını gidermek için modifiye nişastanın kullanılması, istenen özelliklere sahip nişasta bazlı nanojellerin oluşumunu kolaylaştıran bir yöntemdir. Örneğin CMS, nişastanın hidroksil gruplarının karboksimetil fonksiyonel gruplarıyla eterleştirilmesi yoluyla sentezlenen bir nişasta türevidir [115]. Bu tür CMS çapraz bağlanması ile ilk nişasta nanojelleri, bir elektron ışını lineer hızlandırıcı kullanılarak radyasyon çapraz bağlama yolu ile sentezlenmiştir [116]. Radyasyon ile, CMS'nin molekül içi çapraz bağlanmasını sağlanmış ve 50 nm veya daha az partikül boyutuna sahip CMS nanojelleri elde edilmiştir. Literatürde bu çalışma dışında hazırlanmış bir modifiye nişasta nanojel bulunmamakla birlikte, var olan diğer CMS nanojelleri bir başka polimer ile birleştirilmiştir.

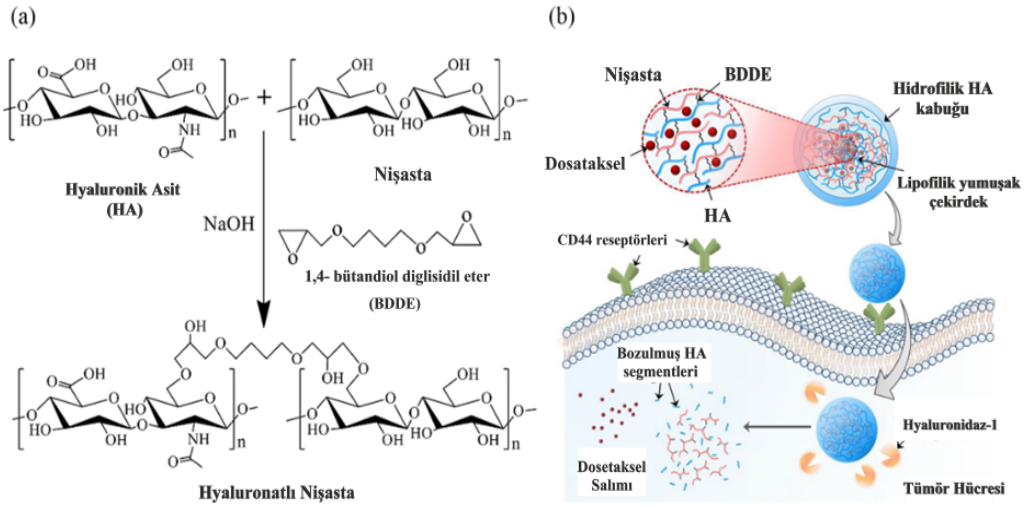
2.3.2 Nişastanın Diğer Polimerle Kombinasyonu İle Hazırlanan Nanojeller

Nişasta nanojel oluşumunu kolaylaştıran bir diğer yöntem, nişastanın diğer polimerlerle kombinasyonudur. Prensipte, nişasta bazlı nanojellerin özellikleri,

nişastanın sentetik veya doğal polimerlerle kullanılmasıyla önemli ölçüde geliştirilebilmektedir. Bu amaçla, CMS suda çözünür kitosan hidroklorür ile birlikte kullanılmıştır. Pozitif yüklü kitosan hidroklorür ve negatif yüklü CMS'nin kompleks oluşumu, polimer çözünürlüğünü artırarak nanojel oluşumunu sağlamaktadır. Kitosan hidroklorür ve CMS'nin bu özellikleri, biyoaktif ajan dağıtımında umut verici olabilecek yeni ve yenilenebilir bir Pickering emülsiyon stabilizatörleri olarak kitosan hidroklorür/CMS nanojellerini hazırlamak için birleştirilmiştir.

Farmakolojik kullanımlar için Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan polietilen glikolün (PEG) kullanımı yaygındır [117]. Bir çalışmada PEG, ilaç salımı için ve 3-(dietilamino) propilamin (DEAP) ile aşılanmış nişasta kullanılarak pH'a duyarlı nişasta bazlı nanojellerin sentezinde kullanılmıştır. Nanojellerin *in vivo* stabilitesini arttırmak için PEG kullanılırken, pH duyarlılığı elde etmek için DEAP ilave edilmiştir. pH 7.4'te DEAP parçaları nanojel çekirdeğin lipofilikliğini ve dolayısıyla çekirdekte doksorubisinin yükleme verimliliğini arttırmıştır [118].

Yu ve çalışma arkadaşları da, bir başka polimer olan HA tümör hücresi büyümesini engellemek için nişasta ile birleştirmiş ve bunların dikkate değer tümör ablasyonu için kullanımlarını önermiştir [23]. Nişasta, çapraz bağlayıcı olarak BDDE kullanılarak HA ile çapraz bağlanmıştır (Şekil 2.10). Nişasta ve HA birincil hidroksil grupları ile çapraz bağlayıcının epoksit grupları arasında çapraz bağlama başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu hyaluronlanmış nişasta nanojeller, antitümör ilaç salımındaki potansiyellerini araştırmak için dosetaksel ile yüklenmiştir. Üretilen nanojellerin gelişmiş bir antitümör aktivitesi sergilemesine rağmen, tümör ablasyonundaki terapötik yeteneklerini daha fazla belirlemek için *in vivo* analizlere ihtiyaç vardır.



Şekil 2. 10 (a) Hyaluronatlı nişastanın sentez şeması, (b) Dosetaksel salımı için önerilen hyaluronatlı nişasta nanojel [23].

Gelişmiş tümör hücresi ablasyonu için Kim ve ark. [119], nişastayı glikol kitosan ve pH'a duyarlı DEAP ile birleştirerek pH'a duyarlı nanojeller sentezlemişlerdir. Amaç, bu pH'a duyarlı nişasta-glikol kitosan-DEAP nanojelleri aracılığıyla hedeflenen sitozolik peptit salımının gerçekleştirilmesidir. Nanojellerin çekirdeğine pH'a duyarlı DEAP'nin dahil edilmesi, asidik pH'da hızlı peptit salımına izin vererek nanojellerin endosomolitik aktivitesini arttırmıştır. *In vitro* hücre deneyleri, pH'a duyarlı nişasta nanojellerin gelişmiş tümör hücresi ablasyonu sağladığını göstermiştir.

Nişasta bazlı nanojellerin ortak uygulaması, biyomedikal ve farmasötik alanlarda kullanılan salım sistemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak, uygulamalar ilaç salım sistemleriyle sınırlı değildir, boya çıkarma ve yağ geri kazanımı da dahil olmak üzere çevresel uygulamalarda da kullanılmıştır [120]–[122]. Uyaranlara duyarlı davranışları, boyut, yük, gözeneklilik ve kimyasal bileşimin ayarlanabilmesi gibi özellikleri sebebiyle nişasta nanojeller, makrojellere göre bazı avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar birlikte ele alındığında, genel olarak polimerik jeller,

sadece ilaç salım sistemleri değil enfeksiyonun tedavisinde de çeşitli antimikrobiyal malzemelerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

2.4 Antimikrobiyal Jeller

İnsan sağlığı alanında zararlı mikroorganizmaların varlığı, enfeksiyon ve hastalıkların çeşitliliği nedeniyle büyük bir endişe haline gelmiştir [123]. Bu sebeple, enfeksiyonları azaltmak için biyomedikal kullanımda antimikrobiyal aktivite sağlayabilecek materyaller araştırılmaktadır [124]. Antimikrobiyal malzemeler yüzeylerindeki veya çevrelerindeki mikropları inhibe etme veya öldürme yeteneğine sahiptir. Ancak, klinik olarak zayıf antimikrobiyal aktivite, mikrobiyal dirençle ilgili sorunlar ve dinamik bir ortamda çalışma zorluğu gibi önemli eksiklikleri vardır. Bu nedenle klinikteki talepleri karşılamak için etkili ve uzun süreli antibakteriyel etkinlik gösterecek malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır [125]. Bu anlamda, polimerler fizikokimyasal özellikleri nedeniyle bu alanlarda kapsamlı ve verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Polimerler, antimikrobiyal maddeleri tutan malzemelerin matrisi olarak işlev görmektedir. Bu nedenle, antimikrobiyal özelliklere sahip polimerik malzemelerin kullanımı hem akademik hem de endüstriyel açıdan ilgi görmektedir [126].

Hem doğal hem veya sentetik polimerlerden üretilen jeller, antimikrobiyal malzemeleri tasarlamak için ilgi çekici malzemelerdir. Bununla birlikte, biyouyumlu ve doğal dokulara benzer mekanik özelliklere sahip olmaları sebebiyle ilaç salımı, kronik ve travmatik yaraların iyileşmesi, implantlar için yüzey kaplamaları gibi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır [127]. Jeller, yüksek su içeriklerinden dolayı yara bölgesine nemli, yoğun şekilde hidratlı bir ortam sağlayarak yara iyileşme süreci için gerekli olan hücresel immünolojik aktiviteyi kolaylaştırmaktadır [128]. Ancak, aynı sulu ortam mikrobiyal enfeksiyona da sebep olabilmektedir. Bu nedenle, yara iyileşmesi, ilaç verme, gibi birincil işlevsel rollerinin yanı sıra antimikrobiyal etki verebilen jeller arzu edilen malzemelerdir [127]. Özellikle selüloz, nişasta, kitosan ve aljinat gibi polisakkaritler,

konjugasyon için ideal olan fonksiyonel grupları, toksik olmamaları, biyobozunurlukları biyouyumlulukları ve doğada bol olmaları sebebiyle antimikrobiyal jel hazırlamak için tercih edilmektedir [127],[129].

2.4.1 Antimikrobiyal Nişasta Hidrojelleri

Antimikrobiyal hidrojeller hazırlamak için yaygın olarak kullanılan yöntem, antimikrobiyal ajanları hidrojellere yüklemektir [130]. Nişastanın, patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip biyoaktif bileşikleri stabilize etmek için çeşitli nişasta bazlı malzemelerin üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir [131]. Literatürde nişasta jellerinin antimikrobiyal uygulamaları hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle, biyomedikal uygulamalar için bir antimikrobiyal maddenin makro boyuttaki jellerle birleştirilmesine dayanmaktadır.

Chin ve ark.[132], toksik organik çözücüler ve kimyasallar kullanılmadan kolayca penisilin G yüklü nişasta-sitrat hidrojelleri sentezlemişlerdir. Sitrik asit, bakteri hücre zarlarından geçebilen ve mikroorganizma hücrelerinin hücre içi pH'ını düşürerek bakteri büyümesini baskılayan doğal bir antimikrobiyal ajan olması sebebiyle nişasta üzerine işlevselleştirilmiştir. Sürekli salım sergileyen nişasta-sitrat hidrojelleri, gram pozitif ile gram negatif bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Bir başka çalışmada, antimikrobiyal aktiviteye sahip bir malzeme elde etmek için nişasta hidrojeli silika ile kaplanmış bakır nanopartiküllerle birleştirilmiştir [133]. Sentezlenen malzemenin dermal akut toksisite testi ile hafif tahriş edici olarak değerlendirilerek biyouyumlu olduğu belirtilmiştir ve gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı aktif olduğu görülmüştür. Tasarlanan nişasta bazlı hidrojelin, yara örtüleri ve dolgu maddeleri gibi çeşitli klinik alanlardaki uygulamalar için yüksek potansiyele sahip olabileceği belirtilmiştir.

Yapılmış olan bir çalışmada, nişasta/polivinil alkol hidrojel filmleri ve bu hidrojellerin bor kompleksleri sentezlenmiş ve *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerini araştırılmıştır [134]. Nişasta bazlı hidrojellerin hazırlanmasında; çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehit kullanılmıştır. İyi mekanik özellikler sergileyen hidrojellerin orta düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Yine çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehit kullanılarak yara örtüsü uygulamaları için biyolojik olarak parçalanabilen nişasta/polivinil alkol hidrojelleri, gümüş nanopartiküller kullanılarak hazırlanmıştır [135]. Nanopartiküllü hidrojel membranların şişme ve nem tutma kapasitesinin nanopartikülsüz olanlara kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, organik ekstrakt yoluyla hazırlanan nanopartiküllerin olduğu hidrojellerde antibakteriyel aktivitenin arttığı bulunurken, nanopartikülsüz hidrojel membranlarında antimikrobiyal aktivite görülmemiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, nişasta bazlı nanomalzemelerin de gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal ajanlar olarak ve ayrıca biyoaktif bileşikleri kapsülleyen nanotaşıyıcılar olarak kullanılabileceğini göstermektedir [131]. Ancak, yukarıda bahsedilen makro boyutta antimikrobiyal nişasta hidrojelleri dışında, literatürde antimikrobiyal ajan yüklenmiş ve antibakteriyel etkinliği araştırılmış bir nişasta nanojel çalışması bulunmamaktadır.

2.4.2 Antimikrobiyal Jellere Yüklenen Ajanlar

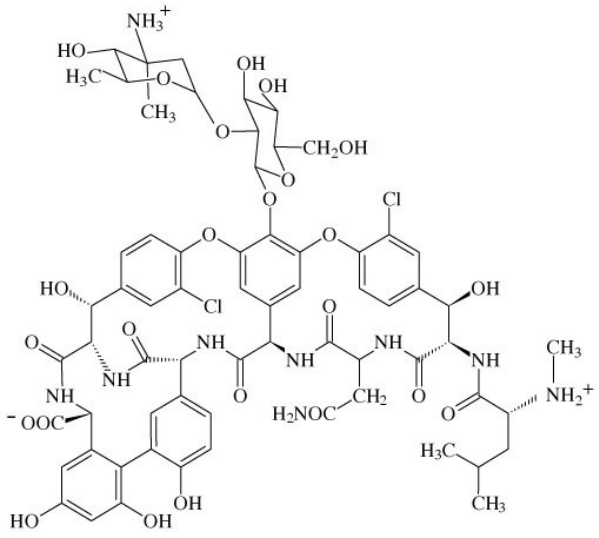
Antimikrobiyaller, patojenik mikroorganizmaları (bakteriler, arkler, virüsler, protozoa, mikroalgler ve mantarlar) öldürebilen veya büyümesini engelleyebilen bileşiklerdir [136]. Antimikrobiyal ajanlar antibiyotikleri, bazı biyolojik özleri, kitosan gibi doğal polimerleri ve bazı metal nanoparçacıklar olabilmektedir [130].

Jeller, çeşitli biyoaktif molekülleri iletmek için kontrollü salım sistemleri olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar, lokal olarak dokuya kontrollü salımları için jel içine yüklenebilmektedir [127]. Mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek

için, bağışıklık hücrelerine girmek ve patojenik mikropları içeriden öldürmek için antimikrobiyal bileşenlerin jellerden salınabilmesi çok önemlidir. Antibiyotikler, metal nanopartiküller, antimikrobiyal polimerler ve peptitler ile yüklü hidrojeller, antimikrobiyal ajanları sürekli bir şekilde serbest bırakabilir, bu da enfeksiyonları etkili bir şekilde tedavi etmek ve biyofilm oluşumunu önlemek için önemlidir [137]. Bu ajanların arasından antibiyotikler, diğer antimikrobiyallerden farklı olarak yaygın bir şekilde hem insanlarda hem de hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmaktadır [138].

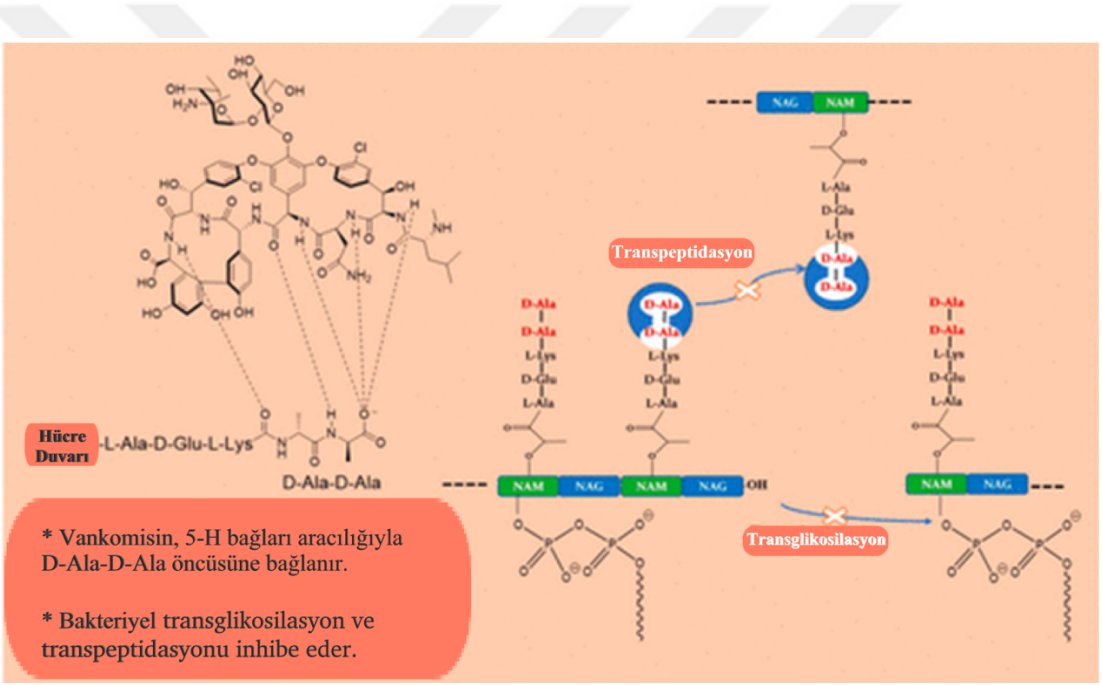
2.4.2.1 Vankomisin

Yararlı bir bakterisidal antibiyotik olan vankomisin, *Streptococcus orientalis* tarafından üretilen kompleks bir trisiklik glikopeptid antibiyotiktir (Şekil 2.11)[139]. Klinik olarak penisilin, metisilin ve diğer β-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştiren gram pozitif bakteri (*streptokok ve stafilokok*) suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonlara karşı genellikle son savunma hattıdır [140].



Şekil 2. 11 Vankomisinin kimyasal yapısı [139].

Vankomisinin etki mekanizması, bakteri hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonu veya daha spesifik olarak peptidoglikan biyosentezinin inhibisyonu yoluyladır (Şekil 2.12). Gram pozitif bakterilerde daha belirgin olan peptidoglikan, hücre zarının dış kısmında büyük ve çözünmeyen katmanlar oluşturmaktadır [141]. İlaç, lipide bağlı hücre duvarı öncülerinin C-terminali D-alanil D-alanin kalıntılarına yüksek afinite ile bağlandığında ve glikopeptid polimere olan bağlantıyı bloke ettiğinde, bu polimerizasyonu veya transglikosilaz reaksiyonunu inhibe etmektedir. Sonuç olarak, peptitlerin çapraz bağlarının tetrapeptit yan zincirlerine bağlanmasını yani peptidoglikanın büyüyen ucuna bağlanmasını engellemektedir [139], [142].



Şekil 2. 12 Vankomisinin etki mekanizması [143].

Vankomisin özellikle gram pozitif bakterilerde etkilidir ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ≤4 μg/ml ise suşlar duyarlı kabul edilmektedir. Genel olarak *S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes, S. pneumoniae, S.viridans* ve *Bacillus, Actinomyces, Clostridium* ve *Corynebacterium* türlerine karşı etkilidir. Öte yandan

gram negatif basillerin, mikobakterilerin ve mantarların büyük bir kısmı vankomisine dirençlidir [139].

Antibiyotiklere dirençli mikrobiyal suşların ortaya çıkması ve yayılması, ciddi enfeksiyonların tedavisini karmaşık hale getirmiştir. Bununla birlikte, lokal olarak uygulanan vankomisinin etkinliği, yüksek su çözünürlüğü ve dolayısıyla zayıf emilim ve ilacın hızlı eliminasyonu nedeniyle sınırlanmaktadır [144]. Bu nedenle son yıllarda antimikrobiyal ajanlar, mikrobisidal performansları iyileştirmek ve antibiyotik direncinin üstesinden gelmek için jeller gibi biyouyumlu taşıyıcılara yüklenmiştir. Daha sonra uyaranlar veya enfeksiyon bölgelerinin mikro-çevreleri tarafından aktive edilerek kontrollü bir şekilde salınmıştır [125], [144].

2.4.3 Vankomisin Yüklü Hidrojeller

Vankomisin gibi hidrofilik ilaçlar söz konusu olduğunda, yüksek ilaç salım hızı, ilaç salım/degradasyonuna uyum sağlamak için hızla bozunan bir hidrojel matrisi gerekmektedir. Biyomalzemelere yüklenen moleküllerin salımı, genellikle bir patlama ile hızla salınır ve bu durum biyomalzemenin bozunma periyodu ile eşlememektedir. Bu sebeple antibiyotik salma sistemlerinde kalan malzeme, salınan molekül tükendiğinde bakteriyel biyofilmler için uygun bir yer haline gelmekte ve yaşamı tehdit etmektedir. Bu tür enfeksiyonları önlemek ve bir antibiyotiğin etkinliğini sürdürmek için, vankomisinin ilaç salma hızının ve hidrojelin bozunma hızının, hidrojel omurgasına vankomisinin kovalent olarak dahil edilmesiyle bağlantılı olduğu bir hidrojel ilaç salım sistemi raporlanmıştır [145]. Burada, PEG bazlı monomer vankomisin ile birleştirilmiş ve ilaç salımı ile matris bozunma çalışmaları doğrulanmıştır. Antibiyotik salımı ve taşıyıcı malzeme bozunması, hidrojel matrisinin hidrofobik/hidrofilik içeriği ile ayarlanabilmiştir.

Vankomisin yüklü aljinat hidrojeller bir başka çalışmada ortopedik ameliyatlarda kullanılan tıbbi ve implante edilebilir metalik malzemeleri kaplamak için sentezlenmiştir [146]. Metal alaşımlar insan vücudunda enfeksiyona sebep

olabilmektedir ve bu yüzden yüzey modifikasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Burada aljinat hidrojellere, vankomisin yüklenerek metal alaşımlarının içsel özelliklerini etkilemeden antibakteriyel özellik kazandırılmıştır. Vankomisin yüklü enjekte edilebilir hidrojelin, bakteriler ile doğrudan temasında metisiline dirençli *Stafilokok aureus*'un çoğunu öldürebildiği bildirilmiştir. Benzer bir diğer çalışmada da, implantla ilişkili enfeksiyonların tedavisinde enjekte edilebilir hidrojeller ısıya duyarlı olarak tasarlanmış ve vankomisin ile yüklenerek kontrollü salımı yapılmıştır [147]. Antibakteriyel aktivitesine ek olarak, vankomisinin zayıf stabilitesinden kaynaklı uzun süreli salımı ile ilişkili sınırlamaları, kapsülleme ile beraber yüksek oranda arttırıldığını göstermişlerdir.

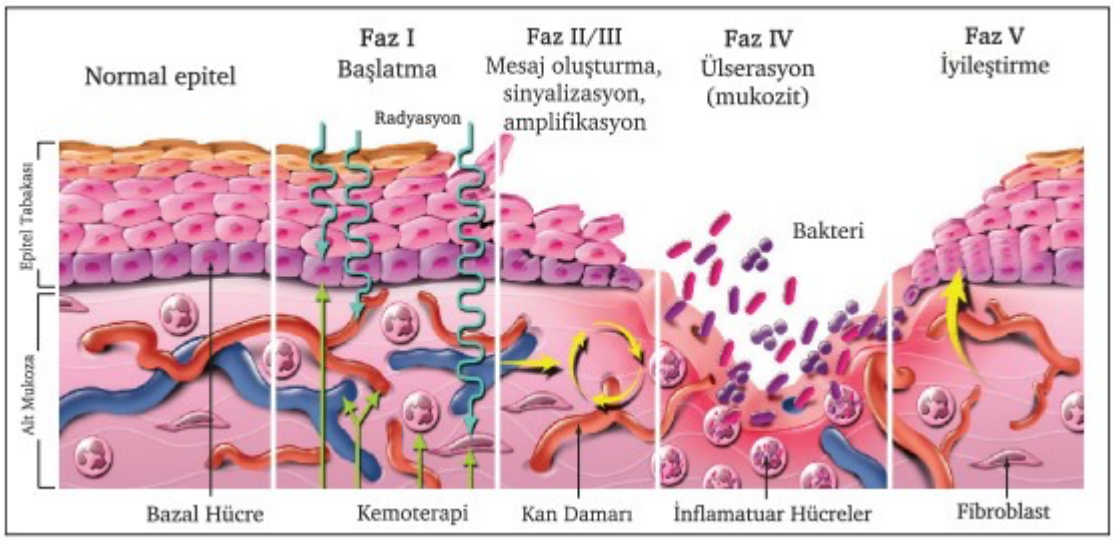
Vankomisin yüklü hidrojel çalışmaları literatürde sıklıkla kemik enfeksiyonunu önlemek veya osteomiyeliti tedavi etmek için imlantlarda antibakteriyel kaplama olarak araştırılmış ve doğal polimerler tercih edilmiştir [148]–[150].

2.5 Oral Mukozit ve Tedavisinde Kullanılan Antibakteriyel Jeller

Radyasyon tedavisi ve kemoterapinin neden olduğu oral mukozit, kanserli hastalarda sıklıkla görülen bir toksisitedir. Yüksek doz tedavi gören hastalar tarafından, yaşanılan en rahatsız edici semptomun oral mukozit olduğu bildirmiştir [32]. Oral mukozit, epitelyal bariyerin bütünlüğünün bozulması ile karakterize edilen ülserasyonlar olarak ortaya çıkmaktadır. Mukozit ile ilişkili ağrı sıklıkla hastanın fonksiyonel durumunu ve yaşam kalitesini bozmaktadır [34]. Hastanın tedavi sürecini riske atabilmekte ve dolayısıyla dozların atlanmasına veya doz azaltımına sebep olabilmektedir. Ayrıca, farklı sağlık sorunlarına da neden olabilmekte, enfeksiyon riskini ve sepsise bağlı ölüm riskini artırabilmektedir. Enfekte hale gelen ülseratif lezyonları olan hastalar da daha maliyetli antibiyotiklere, beslenme desteğine ve dolayısıyla daha uzun hastanede kalış süresine ihtiyaç duymaktadırlar. Sonuç olarak, mukozit hem daha yüksek tedavi maliyetlerine sebep olmakta hem de kanser hastalarının yaşamsal faaliyetlerini kısıtlamaktadır [151].

2.5.1 Oral Mukozit Patobiyolojisi

Mukozitin yalnızca klonojenik hücre ölümünün sonucu olmaktan ziyade, karmaşık biyolojik olaylar dizisinin sonucu olduğunun anlaşılması, mukozal hasarın patobiyolojisinin araştırılması için önemli bir gelişmedir [152]. Yapılan hayvan çalışmaları, oral mukozitin patobiyolojisinin çok daha karmaşık olduğunu göstermiş, bu yüzden Sonis epitel dokuların yanı sıra bağ dokularını da içeren bir model önermiştir (Şekil 2.13) [153]. Bu modelde, mukozitin biyolojik dizisi beş aşamaya ayrılmaktadır: başlatma, düzenleme ve mesaj oluşturma, amplifikasyon ve sinyal verme, ülserasyon ve iyileşme.



Şekil 2. 13 Oral mukozitin beş aşamalı patobiyolojisi [153].

Başlatma. Radyasyon veya kemoterapiye maruz kaldıktan hemen sonra hem DNA hem de DNA dışı hasar meydana gelmektedir. Submukoza ile beraber epitelde de DNA iplikçik kırılmaları görülmekte ve hücrelerin bir bölümünün hızla ölmesine neden olmaktadır. Böylece bu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi bir dizi biyolojik olayı başlatmaktadır.

Mesaj oluşturma. Radyasyon, kemoterapi ve reaktif oksijen türleri doğrudan hücre hasarına neden olmakla birlikte, bazı transkripsiyon faktörleri de dahil olmak

üzere bir dizi merkezi biyolojik kontrol mekanizmasını aktive etmektedir. Bunlar arasında en önemlilerinden biri nükleer faktör kappa (NF-κB)'dir. Aktive edildiğinde, upregülasyon ve mesaj üretimi meydana gelmektedir. Transkripsiyon faktörleri daha sonra diğer sitokinleri ve daha fazla doku hasarına ve yıkımına yol açan yolları aktive etmektedir.

Sinyalizasyon ve amplifikasyon. Bu aşamada, değiştirilmiş yollar birbirini etkilemeye devam ederek, değişmiş bir mukozal ortama yol açmaktadır. Sürecin bu noktasına kadar klinik etkiler, epitele yönelik apoptotik değişiklikler başladığında görünmekte ve belirginleşmektedir.

Ülserasyon. Klinik olarak en anlamlı olan fazdır ve ağrı ve fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Ülser veya lezyon şeklinde gözle görülür değişiklikler ortaya çıkar. Bu ülserler psödomembran ile kaplıdır ve oral bakterilerle doludur. Ağız boşluğundaki mikroflora daha sonra mukotoksik sürece katkıda bulunan çeşitli ürünler üretmektedir. Kolonize eden bakterilerin hücre duvarı ürünleri, ek sitokinleri boşaltmak için infiltre makrofajları yetkin bir şekilde aktive ettikleri submukozaya nüfuz etmektedir. Bu organizmalar ayrıca septisemiye neden olabilmektedir.

İyileştirme. Kemoterapiye ve radyasyoterapiye bağlı ülserlerin büyük çoğunluğu, bu süreç biyolojik olarak dinamik olmasına rağmen, kendiliğinden iyileşmektedir. Hücre dışı matristen gelen sinyaller, epitel hücrelerini göç etmeye, çoğalmaya ve farklılaşmaya yönlendirmektedir. Epitel hücreleri, sağlam bir yara yüzeyi oluşturmak için psödomembranın altına göç etmektedir. Sonrasında mukoza kalınlığı normale dönene kadar devam proliferasyon gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, mukozanın altta yatan hücreleri ve dokuları normal durumlarına geri dönemezler, bu nedenle gelecekteki yaralanmalara ve diğer zorluklara hassas hale gelmektedirler [32], [153].

2.5.2 Oral Mukozitin Klinik Seyri

Kemoterapötik ajanların neden olduğu oral mukozitin ilk belirti ve semptomları, Şekil 2.14'te görüldüğü gibi tipik olarak kemoterapinin ilk haftasında başlayan oral mukozada ağrılı bir eritem ve sonrasında erozyonlar ve beyaz bir psödomembran ile düzensiz ülserasyondur [154], [152]. Psödomembranlarla kaplı ülserasyon bakteriyel kolonizasyonu destekleyen bir yapıda olabilmektedir [33]. Lezyonlar tipik olarak keratinize olmayan hareketli mukoza üzerinde bulunmaktadır ve yutmayı, konuşmayı, beslenmeyi ve ağız hijyenini tehlikeye atabilecek şiddetli ağrılara neden olmaktadır [154]. Hastalar bu aşamada sıklıkla yanma ve baharatlı yiyeceklere tahammül edememekten şikâyet etmektedir [155].



Şekil 2. 14 Ağız mukozasının tamamında kanama eğilimi gösteren ülseratif ve eritemli lezyonlar [156].

Kemoterapiye bağlı mukozit yaklaşık 1 hafta sürer ve genellikle infüzyondan 21 gün sonra kendiliğinden iyileşir. Radyasyona bağlı mukozit ise, radyoterapinin

tamamlanmasını takiben en az 2 hafta süresince kalır. Sonuç olarak, ağız ve yakın bölge kanserleri için radyoterapi alan hastalarda sıklıkla 5-7 hafta süren şiddetli ülseratif oral mukozit görülürken, nadiren de olsa radyasyon tedavisini takiben kronik mukozit meydana gelebilmektedir [155].

Bunlarla birlikte, tedaviye bağlı zayıflamış bağışıklık ile oral mukozaya verilen hasar, lokal ve sistemik enfeksiyonlar gibi hastanın yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen zayıflatıcı yan etkilerle de ilişkilidir. Bu enfeksiyonlar şiddetli ağrıya neden olan bakteriyemiye de yol açabilmektedir [33]. Bu nedenle, oral mukozitin doğru teşhis edilmesi ve tedaviye başlanması oldukça önemlidir.

2.5.3 Oral Mukozitin Tedavisi

Kanser tedavisi ile ilişkili mukozit giderek doz sınırlayıcı bir toksisite haline geldiğinden, bilimsel ve klinik ortamlarda oral mukoziti önleme ve tedavi etme girişimleri hız kazanmıştır. Karmaşık biyolojik yapısı oral mukozit tedavisini zorlaştırsa da, onkologlar tarafından antikanser tedavisinin olumsuz etkilerini en aza indirmek için doz azaltma ve diğer hem terapötik hem de önleyici tedbirler dahil olmak üzere bazı tedavi yöntemleri uygulanmıştır [35]. Ancak, oral mukoziti önlemek için uygun şekilde tasarlanmış klinik deneylere ve müdahalelere halen ihtiyaç vardır. Çünkü bugüne kadar hiçbir tedavi yöntemi tek başına oral mukoziti iyileştirememiştir [157].

Lokal Olarak Uygulanan Tedavi Yöntemleri Ve Farmakoterapötikler

Oral hijyen programları, oral mikrofloranın miktarını ve aktivitesini azaltmak ve oral mukozit ile ilişkili rahatsızlığı önlemek veya azaltmak için yaygın olarak tavsiye edilmektedir [33]. Oral mukozanın hijyeni için Çokuluslu Kanserde Destekleyici Bakım Derneği ve Uluslararası Oral Onkoloji Derneği (MASCC/ISOO) yönergeleri, yumuşak bir diş fırçasıyla fırçalamayı, diş ipi kullanmayı ve ilaçsız durulamaların (örn. salin veya sodyum bikarbonat durulamalar) kullanımını

içeren standart bir ağız bakımı protokolünün kullanılmasını önermektedir [158]. Bu uygulamalar, floradaki oral enfeksiyon olasılığını azaltmakta, travmaya bağlı mukozal doku yaralanmasını en aza indirmeye yardımcı olup rahatlığı artırmaktadır [159]. Ağız hijyeni önlemlerinin alınmasının kritik olduğu ve oral mukozit ve oral enfeksiyonun önlenmesinde en önemli faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir [160].

Sükralfat, yarayı mekanik hasarlardan koruyan peptik ülser tedavisinde yaygın olarak kullanılan sakaroz oktasülfatın bazik bir alüminyum tuzudur. Sükralfatın farklı ülseratif durumlarda iyileşmeyi hızlandırdığı ve hem ağrıda hem de mukozit sıklığında azalmaya neden olduğu görülmüştür [161], [162]. Benzer şekilde, birer antimikrobiyal ve antiseptik ajan olan povidon-iyodin ve anestezik özelliği olan anti-inflamatuar benzidamin hidroklorür radyokemoterapinin neden olduğu oral mukoziti önemli ölçüde azaltmıştır [163], [164].

Oral mukozit tedavisinde çeşitli çok ajanlı topikal ağız gargaraları kullanılmıştır. Bunlar, epitelizasyonu teşvik edici, ağız kaplama maddeleri, iltihap önleyici ilaçlar, lokal anesteziklerle birleştirilmiş antimikrobiyal ve mantar önleyici maddelerdir. Örneğin, hidrojen peroksit, betaizodon, nistatin ve dekspantenol dörtlüsü veya hidrokortizon, nistatin, tetrasiklin veya difenhidramin dörtlüsü vb. Ancak bunların etkinliğini değerlendirmek zordur ve bu tür tedavileri destekleyen uzun süreli çalışmalar henüz mevcut değildir [165].

Lokal Olarak Uygulanan Farmakolojik Olmayan Yöntemler

Kriyoterapi, farmakolojik olmayan yöntemler arasında mukozit tedavisinde önerilen yöntemlerden biri olmuştur [166]. Ağızda buz veya soğuk su uygulaması geleneksel kriyoterapi yöntemleri arasında yer almaktadır. Bu durumda hastalar kemoterapiden en az 5 dakika önce, kemoterapi sırasında ve tamamlandıktan sonra 30 dakika boyunca buz küpleri kullanılmaktadır [167]. Bu tedavi lokal vazokonstriksiyona ve oral mukozaya kan akışının azalmasına neden olarak oral

mukozanın sitotoksik ilaçlara maruziyetin azalmasına neden olmaktadır [168]. Birkaç çalışma, katı tümörlerin tedavisi için bolus dozlarda 5-florourasil kemoterapisi alan hastalarda oral mukoziti önlemede kriyoterapinin etkinliğini göstermiştir [169], [170]. Diğer stratejiler ve ajanların aksine, oral kriyoterapi klinik uygulamalarda kolaylıkla uygulanabilir ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Düşük seviyeli lazer tedavisi (DSLT), kemoterapi ve radyoterapi alan hastaların tedavisi için uygulanan etkili yöntemlerden bir diğeridir [171]. DSLT'nin analjezik, anti-inflamatuar ve yara iyileştirici özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [172]. Lazer ışınları, hücreleri aktive etmek için farklı yolları tetiklemekte, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklemekte ve hızlandırılmış bir rejenerasyon süreci ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, inflamatuar kontrolü düzenleyen ve ağrının azalmasına neden olan yolları da tetiklemektedir [173]. Son yıllarda yayınlanan bir çalışmada, DSLT'nin pediatrik hastalarda oral mukozitin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabileceği vurgulanmıştır [174].

Sistemik Olarak Uygulanan Farmakoterapötikler

Granülosit koloni uyarıcı faktörün (G-CSF) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörün (GM-CSF) sistemik olarak uygulanmasının geleneksel kemoterapi gören hastalarda oral mukozit insidansını ve şiddetini azalttığı bulunmuştur. Ancak, GM-CSF'nin bazı miyeloablatif rejimlerde mukozit süresini, miyeloablatif kemoterapiden sonra oral mukozit insidansını etkilemeden kısalttığı da görülmüş ve bu deri altı uygulamayı takiben GM-CSF'nin mukozal birikiminin olmamasından kaynaklanmaktadır [175].

Bir A vitamini türevi olan beta karoten, hücresel farklılaşmayı indükleyen, oksijen temizleyicisidir. Hücresel proliferasyon üzerinde önemli inhibitör etkileri bulunmaktadır. Beta karoten takviyesi verilmiş farelerde lokal ve sistemik toksik etkilerin azaldığı bildirilmiştir [165], [175]. Benzer şekilde, kesik rekombinant insan keratinosit büyüme faktörünün (Palifermin®), preklinik modellerde ve insan çalışmalarında oral mukozitinin şiddetini ve süresini azaltmada etkili olduğu

bildirilmiştir [176], [177]. Ancak, paliferminin yüksek maliyetini dezavantaj olmaktadır. Yine bir tedavi yöntemi olarak oral mukozit için profilaktik ve terapötik seçenekler olarak intravenöz veya intramüsküler immünoglobulinler sıklıkla uygulanmaktadır [178].

Diğer Tedavi Yöntemleri

Bal ve bitkisel bileşikler tarih boyunca tıpta çeşitli yaraların tedavisinde kullanılmıştır. Bal, mukozadaki doku yaralanmalarında hızlı epitelizasyonun olabileceği mantığıyla kullanılmıştır. Saf doğal bal, mukoziti azaltmada etkili olmuştur. Benzer şekilde, antibakteriyel, antifungal ve anti-inflamatuar etkilere sahip manuka ve kanuka uçucu yağları denenmiştir ancak büyük ölçekte klinik çalışmalar gerekmektedir [33]. Bir başka çalışmada ise, oral aloe vera jelinin baş-boyun kanserli hastalarda radyasyona bağlı mukoziti iyileştirme üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ancak, oral mukozitin iyileşmesinde anlamlı bir gelişme gözlenmemiştir [179].

MASCC kılavuzlarında yer almamasına rağmen, oral mukozit tedavisinde 'sihirli gargaraların' kullanımı da yaygındır. Amfoterisin B ve klorheksidin içeren bazı ağız gargaraları oral mukozite karşı olumlu etki göstermiştir ancak, sırasıyla alerjik etkisi ve alkol içermeleri nedeniyle uygulamalarında sınırlayıcı olabilmektedirler [178]. Mukozitin önlenmesi için topikal antimikrobiyal ajanların kullanımı da önerilmiştir. Antimikrobiyal pastiller (polimiksin-tobramisin-amfoterisin B pastilleri/macun ve basitrasin-klotrimazol-gentamisin pastilleri) kullanılması tavsiye edilen antimikrobiyal ajanlar arasındadır [180].

Tüm bunlar değerlendirildiğinde, kanser hastalarına kemoterapi veya radyoterapi sırasında lokal veya sistematik olarak uygulanan birçok yöntem bulunmasına rağmen, oral mukozit insidansında ve şiddetinde azaltmada etkinlikleri zayıftır. Yürütülen klinik çalışmalar yetersizdir veya çelişkili sonuçlar vermektedir [181].

Bu sebeple hastalığın yönetiminde jellerin de kullanıldığı yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

2.5.4 Oral Mukozit Tedavisinde Jeller

Hidrojellerin çeşitli doku yaralanmalarında yara pansuman malzemeleri olarak kullanımının iyi bir teknik olduğu kanıtlanmıştır [182]. Hedef dokuya kolayca erişilebilir olduğu için oral mukozitte de jel gibi topikal formülasyonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, oral mukozitin tedavisi için rebamipidin (REB) nanokristallerini içeren bir hidrojel tasarlanmıştır [183]. REB gargara formülasyonlarında kullanılmaktadır ancak tek başına ciddi oral mukozit vakalarında tedavi için yeterli olmamıştır. Jelin içerisine yüklenen REB nanokristallerin partikül boyutunun 50-180 nm aralığında olduğunu ve oral mukozit tedavisi için bir ilaç salım sistemi olarak uygulama için çapın 400 nm'den küçük partiküllerin hazırlanmasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. REB nanokristalleri yüklü hidrojellerin yara iyileşmesine katkı sağladığını göstermişlerdir.

Xu vd., sıcaklığa duyarlı polimerlerden biri olan triblok poli(laktik-ko-glikolik asit)-poli(etilen glikol)-poli(laktik-ko-glikolik asit) ile mukoadezif bir hidrojeli oral mukozitin tedavisi için araştırmışlardır. Hidrojellere bir çay polifenolü olan epigallokateşin gallat yüklenmiştir. Vücut sıcaklığına tepki olarak ülserli oral mukozaya uygulandığında yara yüzeyine yapışarak hidrojelin, bir anti-inflamatuar ve antibakteriyel etkinlik göstererek kemoterapinin neden olduğu mukozitin onarımında potansiyel bir malzeme olacağını bildirmişlerdir [184].

Benzer şekilde, Rezazade vd., anti-inflamatuar, antioksidan ve yara iyileştirici özelliklere sahip olan eritropoietini oral mukozitin önlenmesi ve tedavisi için sıcaklığa duyarlı trimetil kitosan bazlı hidrojele yüklemişlerdir [185]. Jelleşme sıcaklığı ve süresinin araştırıldığı çalışmada, geliştirilen formülasyonun antimikrobiyal ve *in vitro–in vivo* yara iyileştirici özelliklerini göstermişlerdir. Bu

hidrojellerin, kanser hastalarında oral mukozitin tedavisi için umut verici bir yaklaşımı temsil ettiğini ve ayrıca diğer yaralanma ve yara türlerinin tedavisinde potansiyellere sahip olabileceği bildirilmiştir. Çeşitli polimerler ile sentezlenen hidrojeller incelendiğinde hem oral mukoziti iyileştirecek ilaçlar hem de ağrı ve acıyı azaltacak anestezikler yüklenerek etkinlikleri incelenmiştir. Bu hidrojeller son birkaç yılda, oral mukozitin tedavisi için araştırılmaya başlanmış ve sonuçlar bu jellerin umut verici malzemeler olduğunu göstermektedir [186], [187].

Hidrojellerin aksine, oral mukozitin tedavisi için araştırılmış nanojellerin sayısı yok denilecek kadar azdır. Literatürdeki tek çalışmada, kurkumin multiakrilat ve çapraz bağlayıcı 4,7,10-Trioxa-1,13-tridekandiamin asetonitril içinde reaksiyon vermesiyle çapraz bağlı kurkumin poli(β-amino ester) nanojelleri sentezlenmiştir [188]. Ortalama parçacık boyutu yaklaşık 221 nm olan kurkumin poli(β-amino ester) nanojellerinin, PBS içinde süspanse edildiğinde 36 saat içinde sürekli bir şekilde kurkumin'in %90'ını, sonraki 30 saat boyunca ise kalan %10'unu saldığı görülmüştür. Sentezlenen nanojellerin geliştirilerek, bir oral durulama ürünü için daha uygun olacak daha kısa salım sürelerine sahip nanojel formülasyonların geliştirilebileceğini önermişlerdir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında, oral mukozit enfeksiyonu için uygun salım sürelerine sahip vankomisin yüklü nişasta nanojelleri sentezlenmiştir. Literatürde ilk kez sentezlenen bu nişasta-PEGDE nanojelleri, yine literatürdeki ilk antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış nişasta nanojelleri olmasının yanı sıra, oral mukozit enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan ender nanojellerden biri olması sebebiyle oldukça özgündür. Aşağıdaki bölümlerde ayrıntılı olarak görüleceği gibi, elde edilen vankomisin yüklü nişasta nanojelleri çeşitli karakterizasyon yöntemleriyle testlere tabi tutularak, farklı sentez parametrelerinin nanojel özellikleri üzerine etkisi ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Sonraki aşamada ise, üretilen nanojellerin ağız mikrobiyotası içinde bulunan bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir.

3
MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar satın alındıkları firmalarla birlikte Tablo 3.1'de listelenmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kimyasal Malzeme	Satın Alındığı Firma
Çözünebilir Nişasta	(Sigma Aldrich)
Polietilen Glikol Diglisidil Eter (PEGDE)	(Sigma Aldrich)
Vankomisin Hidroklorür	(Sigma Aldrich)
Sodyum Hidroksit	(Sigma Aldrich)
Tween 80	(Merck)
Etanol	(Merck)
Sodyum Klorür (NaCl)	(Merck)
Potasyum Klorür (KCl)	(Merck)
Sodyum Hidrojen Karbonat ($NaHCO_3$)	(Merck)
α-amilaz	(Sigma Aldrich)
Ultra Saf Su	(Millipore-Q Gradient)

3.2 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar kullanım amaçlarıyla birlikte Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Cihaz/Ekipman	Kullanım Amacı
Hassas Terazi (Sartorius CP 225D)	Tartım İşlemleri
Hassas Terazi (Precisa XB 220A)	Tartım İşlemleri
Çoklu Manyetik Karıştırıcı (IKA)	Çözeltilerin Hazırlanması
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolp)	Çözeltilerin Hazırlanması
Mikropipet (Finnpipette, Isolab)	Çözeltilerin Hazırlanması
Vortex (Heidolph)	Örneklerin Karıştırılması ve Çözünmesi
Prob Sonikatör (Bandelin Sonoplus)	Nanojellerin Üretilmesi
ZetaSizer Nano ZS Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Spektrometresi (Malvern/Zen3600)	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri
Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen)	Çöktürme ve Yıkanma İşlemleri
UV-VIS Spektrofotometresi (Shimadzu UV-1700)	Nanojellerin Analizleri
Liyofilizatör (Telstar)	Nanojellerin Kurutulması
Ultrasonik Su Banyosu (Bandelin Sonorex)	Nanojellerin Çözünmesi
Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Zeiss EVO LS10)	Nanojellerin Karakterizasyonu
Fouirer Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR) (Shimadzu, Prestige 2100)	Nanojellerin Karakterizasyonu
X-Işınları Difraksiyonu (XRD) (PANalytical X'Pert)	Nanojellerin Karakterizasyonu
Millipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı	Çalışmalarda Kullanılacak Ultra Saf Suyun Temini
İnkübatör (Biosan ES20)	Nanojellerin Salım Çalışmaları

3.3 Deneysel Yöntem

Bu bölümde, nişasta nanojellerinin optimizasyonu, vankomisin yüklü nanojel formülasyon çalışmaları, karakterizasyon yöntemleri, seçilmiş olan formülasyonun *in vitro* salım çalışmaları ve antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi için yapılan deneyler ve uygulanan yöntemler detaylı olarak verilmiştir.

3.3.1 Ön Formülasyon Denemeleri

Nişasta nanojellerin optimizasyonu için öncelikle istenilen nano boyutlara ulaşmak amacıyla ön denemeler yapılmıştır. Yapılan deneylerde nişasta polimerini çözmek için kullanılan yöntemler, farklı organik fazların kullanımı, değişen ultrasonikasyon süresi ve gücü ve yüklenen antibakteriyel ajanlar gibi parametreler nanojellerin sentezi için uygun bir metot elde edene kadar değiştirilerek denenmiştir ve yapılan denemeler tezin ek kısmında verilmiştir.

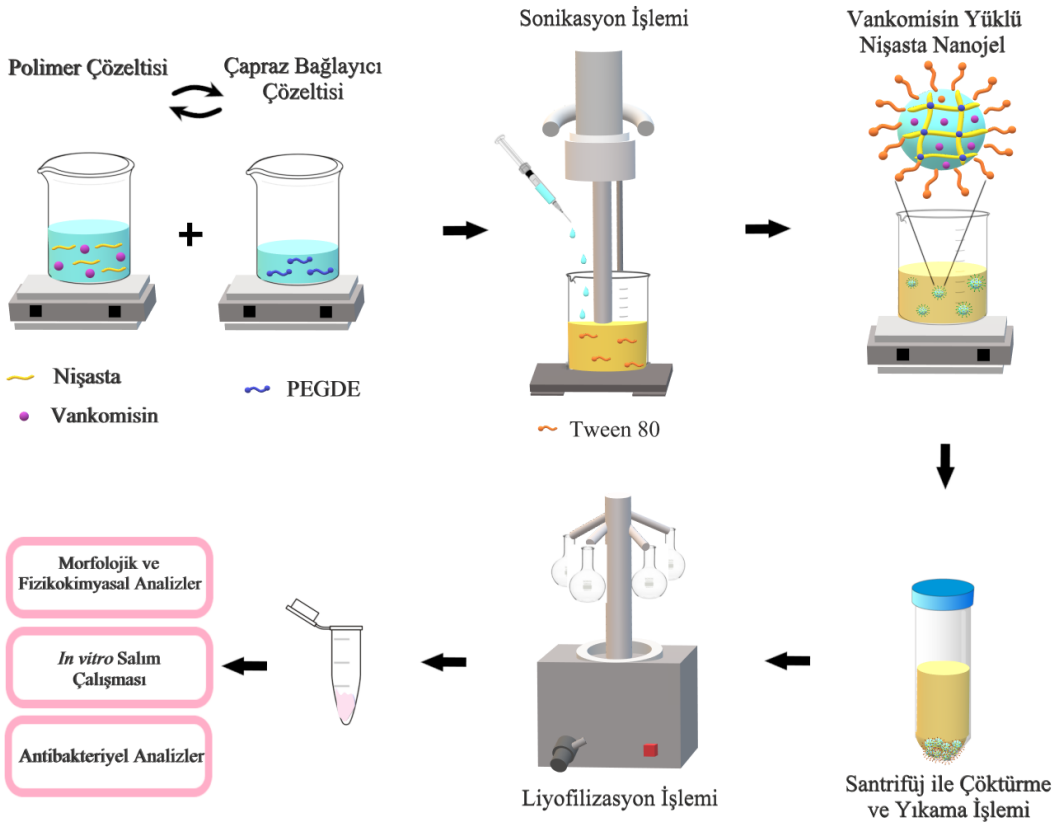
3.3.2 Boş Nişasta Nanojellerinin Sentezi

Nişasta nanojelleri yağ içinde su (Y/S) ters emülsiyon yöntemi ile literatürdeki çalışmalarda belirtilen yönteme göre hazırlanmıştır [157],[158],[191]. İlk olarak, su fazını oluşturmak için %1 w/v nişasta çözeltisi %5 w/v NaOH'ta 1 saat boyunca 80°C de ısıtılarak hazırlanmış ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Kimyasal çapraz bağlama için, diepoksit bir çapraz bağlayıcı olan PEGDE, ultra saf suda çözünmüş ve nişasta çözeltisine eklenmiştir. Ardından organik faz; yüzey aktif maddesi olan Tween 80, %1 w/v olacak şekilde etanole eklenip vortekslenerek oluşturulmuştur. Emülsiyon elde etmek için ultrasonikasyon cihazı altında, nişasta içeren su fazı steril enjektör yardımıyla yavaşça organik faza damlatılmıştır. Karışım, 5 dakika boyunca ve 100 W enerji altında sonike edilmiştir. Bu esnada sıcaklık artışını önlemek için işlem buz banyosunda gerçekleştirilmiştir. Oluşan emülsiyon, çapraz bağlanma reaksiyonunun ilerlemesi için oda sıcaklığında 2 saat karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra oluşan nanojeller

6000 devir/dakika'da 30 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Süpernatant boşaltıldıktan sonra pellet, reaksiyona girmemiş polimerlerin uzaklaştırılması için 6000 devir/dakika'da 10 dakika boyunca %80 w/v etanol ile yıkanmış ve bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Çöken nanojeller son olarak liyofilize edilmiş ve toz halde elde edilen nanojeller ileri analizlerde kullanılmak üzere +4°C de muhafaza edilmiştir.

3.3.3 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojellerinin Sentezi

Vankomisin yüklü nişasta nanojelleri ise 3.3.2'te verilen yönteme benzer şekilde hazırlanmıştır. Ek olarak, hidrofilik bir etken madde olması sebebiyle vankomisinin farklı oranlarda su fazına eklenmesiyle vankomisin yüklü nişasta nanojelleri sentezlenmiştir.



Şekil 3. 1 Vankomisin yüklü nişasta nanojellerin sentez şeması.

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi vankomisin yüklü nişasta nanojeller de Y/S ters emülsiyon yöntemi ile ultrasonikasyon cihazı altında, vankomisin-nişasta-PEGDE içeren su fazının steril enjektör yardımıyla organik faza damlatılmasıyla elde edilmiştir. Sentezlenen nanojellerin çöktürme ve yıkama işlemlerinden sonra tüm süpernatantlar vankomisinin enkapsülasyon yüzdesini ve yükleme verimini hesaplamak için toplanmıştır. Daha sonra her bir nanojel formülasyonu liyofilize edilerek morfolojik, fizikokimyasal karakterizasyonları, *in vitro* salım çalışması ve antibakteriyel analizleri için +4°C de saklanmıştır.

3.3.4 Deneysel Parametrelerin Nişasta Nanojellerinin Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Nanojellerin sentez süreci farklı polimer konsantrasyonları, çapraz bağlanma oranı, sürfaktan tipi ve miktarı, reaksiyon süresi, pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet gibi çeşitli çevresel faktörler dahil olmak üzere çok sayıda faktörden etkilenmektedir [192].

Bu tez çalışmasında vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin optimizasyonu aşamasında polimer çözeltisi konsantrasyonu, polimer:çapraz bağlayıcı oranı, sürfaktan ve ilaç konsantrasyonu parametre olarak belirlenmiştir. Optimizasyon için belirlenen parametreler ve değerleri Tablo 3.3'te gösterildiği gibi tek tek değiştirilerek deneyler tekrar edilmiştir. NNJ-1 boş nişasta nanojellerini, VNJ-2 ile VNJ-13 arasındaki formülasyonlar ise farklı sentez koşullarında elde edilen vankomisin yüklü nanojelleri ifade etmektedir ve tezin bundan sonraki bölümlerinde bu kısaltmalar kullanılacaktır.

Tablo 3.3 Optimizasyon çalışmasında sabit ve değişken parametreler ile değişken parametrelerin değerleri.

	Nişasta Nanojel Formülasyonu	Su Fazı Bileşenleri			Organik Faz Bileşenleri		Sonikasyon Süresi/Gücü
		Nişasta (%w/v)	Vankomisin (%w/v)	Nişasta:PEGDE oranı	Tween 80 (%w/v)	Etanol (ml)	
Boş	NNJ-1	%1	-	1:1	%1	50	5 dk/100 W
Polimer Konsantrasyonu	VNJ-2	%1	%0,2	1:1	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-3	%2	%0,2	1:1	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-4	%3	%0,2	1:1	%1	50	5 dk/100 W
Polimer:Çapraz Bağlayıcı Oranı	VNJ-5	%1	%0,2	1:1	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-6	%1	%0,2	1:4	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-7	%1	%0,2	1:8	%1	50	5 dk/100 W
Sürfaktan Konsantrasyonu	VNJ-8	%1	%0,2	1:1	%0,5	50	5 dk/100 W
	VNJ-9	%1	%0,2	1:1	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-10	%1	%0,2	1:1	%1,5	50	5 dk/100 W
Antibiyotik Konsantrasyonu	VNJ-11	%1	%0,1	1:1	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-12	%1	%0,2	1:1	%1	50	5 dk/100 W
	VNJ-13	%1	%0,4	1:1	%1	50	5 dk/100 W

Vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin optimizasyonu için ilk değişken parametre olarak nişasta konsantrasyonu seçilmiştir. Çapraz bağlayıcı, sürfaktan ve ilaç konsantrasyonları sabit tutularak, farklı nişasta konsantrasyonları (%1, %2 ve %3 w/v) ile deney yapılmıştır. Sentezlenen nanojellerin boyut, zeta potansiyel,

FT-IR analizleri yapılmış ve enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve etken madde yükleme kapasitesi hesaplanmıştır. Alınan sonuçlara göre optimum konsantrasyon belirlenmiş ve bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Optimizasyon deneylerinin ikinci aşamasında, optimum seviyede olan nişasta konsantrasyonu değeri sabit tutulurak, ikinci değişken parametre olan nişasta:PEGDE oranı (1:1, 1:4, 1:8 w/w) değiştirilerek deney tekrarlanmıştır. Sentezlenen nişasta nanojellerin karakterizasyonu yapılarak uygun çapraz bağlanma oranı belirlenmiştir. Daha sonra, optimum koşullardaki nişasta:PEGDE oranı seçilmiş ve yüzey aktif madde konsantrasyonunun nişasta nanojelleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlar da Tween 80 (%0,5, %1 ve %2 w/v) içeren organik fazlar hazırlanmış ve sentez yapılmıştır. Son olarak, optimum polimer çözeltisi konsantrasyonu, çapraz bağlanma oranı ve sürfaktan konsantrasyonu belirlendikten sonra optimize edilen nanojellere farklı konsantrasyonlarda vankomisin (%0,1, %0,2 ve %0,4 w/v) enkapsüle edilerek deneyler yapılmış ve böylece tüm parametreler için optimum değerler belirlenmiştir.

3.4 Karakterizasyon Teknikleri

3.4.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

FT-IR, moleküllerin elektromanyetik spektrumun kızılötesi aralığında bulunan ışığı absorplayarak, molekül yapısındaki bağlara ait dalga boylarında absorpsiyon bantları oluşturarak bağların durumu, bağlanma yerleri hakkında bilgi vermektedir. Boş nişasta nanojellerinin, vankomisinin ve vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi için FT-IR spektroskopisi (Shimadzu, Prestige 2100) kullanılmıştır. Liyofilize edilen kuru nanojellerin FT-IR spektrumu ATR aparatı kullanılarak 600-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçülmüştür.

3.4.2 X-Işınları Difraksiyonu (XRD) Analizi

XRD, her bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanmaktadır. XRD cihazı (PANalytical X'Pert) kullanılarak, nişasta, boş ve vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin polimorfik özellikleri ve değişimi X-ışını tüpünün tarama voltajı 40,0 kV ve akımı 40,0 mA'de olan difraktometre (Cu Kα, λ=1,5406 Å) kullanılarak yapılan ölçümler ile belirlenmiştir. Difraktometre konumu 2Θ=5-90° kırınım açısı aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.4.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

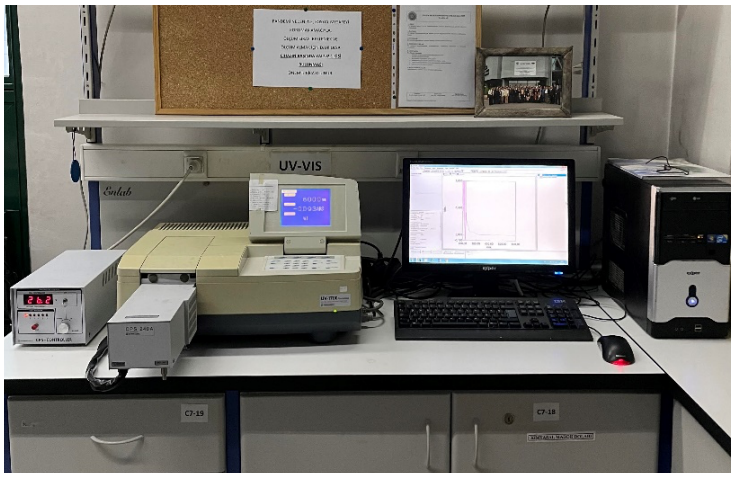
Bu çalışmada boş ve vankomisin yüklü nişasta nanojellerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli bir Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Boyut analizleri; 4.0 mV He-Ne lazer lamba ile donatılmış cihazda dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle 25°C'de ±0,1°C hassasiyeti ile otomatik modda 3 tekrarlı yapılmış ve ortalaması alınmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri de; kapiler küvetlerde elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği kullanılarak yine aynı cihazda 25°C'de ±0,1°C hassasiyeti ile 3 kez tekrar edilmiş ve ortalaması alınmıştır. Tüm nanojellerin ortalama hidrodinamik çapı, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri 90°C'lik bir saçılma açısı ile 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indisinde, 1:30 seyreltme yapılarak alınmıştır.



Şekil 3. 2 Zetasizer Nano ZS cihazı.

3.4.4 Vankomisinin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesinin hesaplanması için, vankomisin etken maddesi %80 w/v etanolde çözünerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. 0,5 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisinden seyreltilerek 0,001–0,1 mg/ml arasında 18 farklı konsantrasyondaki kalibrasyon numunesi hazırlanmıştır. Her bir numunenin Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-VIS) Spektroskopisi kullanılarak 280 nm de absorbans değerleri ölçülmüş ve konsantrasyon-absorbans kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3. 3 UV-VIS Spektroskopisi.

Bununla birlikte, *in vitro* salım çalışmasında salınan ilaç miktarının hesaplanabilmesi için vankomisin etken maddesinin simüle tükürük ortamına göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Vankomisin simüle tükürük sıvısında çözünerek hazırlanan stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak 0,001–0,2 mg/ml arasında 20 farklı konsantrasyonda örnek hazırlanmıştır. Örneklerin UV-VIS Spektroskopisi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri okunmuş ve konsantrasyon-absorbans kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

3.4.5 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması (RV%)

Liyofilize edilerek katı olarak elde edilen nanojeller hassas terazi ile tartılmıştır. Kuru nanojel miktarının, nanojel hazırlanmasında kullanılan toplam madde miktarına oranlanmasıyla reaksiyon verimi elde edilmiştir.

$$\mathrm{RV\%} = \frac{\text{Üretilen nanojel miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçtaki toplam madde miktarı (mg)}} \times 100 \qquad \textbf{(3.1)}$$

Toplam madde miktarı nanojel üretiminde kullanılan başlangıçtaki toplam nişasta ve vankomisin miktarıyken, üretilen nanojel miktarı ise sentezlenen nanojellerin liyofilizatör aşamasından sonra hassas terazi ile tartılan katı kütlesidir.

3.4.6 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması (EE%)

Nanojel içerisine enkapsüle edilen vankomisin miktarı indirekt yöntem ile saptanmıştır. Sentezlenen nanojellerin çöktürme ve yıkama işlemleri sırasında uzaklaştırılan süpernatantları toplanarak nanojellere yüklenmeyen serbest vankomisin miktarının tayininde kullanılmıştır. Süpernatantların 280 nm de UV-VIS spektroskopi kullanılarak absorbans değeri ölçülmüştür. Nanojel içerisindeki vankomisin miktarı, sentez aşamasında kullanılan vankomisin miktarından

yüklenmeyen vankomisin miktarının çıkarılması ile bulunmuştur. Nanojellerin içerisindeki vankomisin miktarının, ilk eklenilen vankomisin miktarına oranlanmasıyla enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır.

$$\text{EE\%} = \frac{\text{Kapsüllenmiş ilaç miktarı (mg)}}{\text{İlk eklenen ilaç miktarı (mg)}} \times 100 \qquad \textbf{(3.2)}$$

Kapsüllenmiş ilaç miktarı nanojel üretilirken içerisine yüklenen vankomisin miktarını, ilk eklenen ilaç miktarı ise sentez sırasında eklenen vankomisinin miktarını temsil etmektedir.

3.4.7 Etken Madde Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması (YK%)

Vankomisin yüklenmiş nanojellerin etken madde yükleme kapasitesi indirekt yöntem ile saptanmıştır. Enkapsüle edilen vankomisin miktarı UV-VIS spektroskopi kullanılarak tayin edilmiştir. Yüklenmiş olan etken madde miktarının, elde edilen nanojel miktarına oranı ile etken madde yükleme verimi hesaplanmıştır.

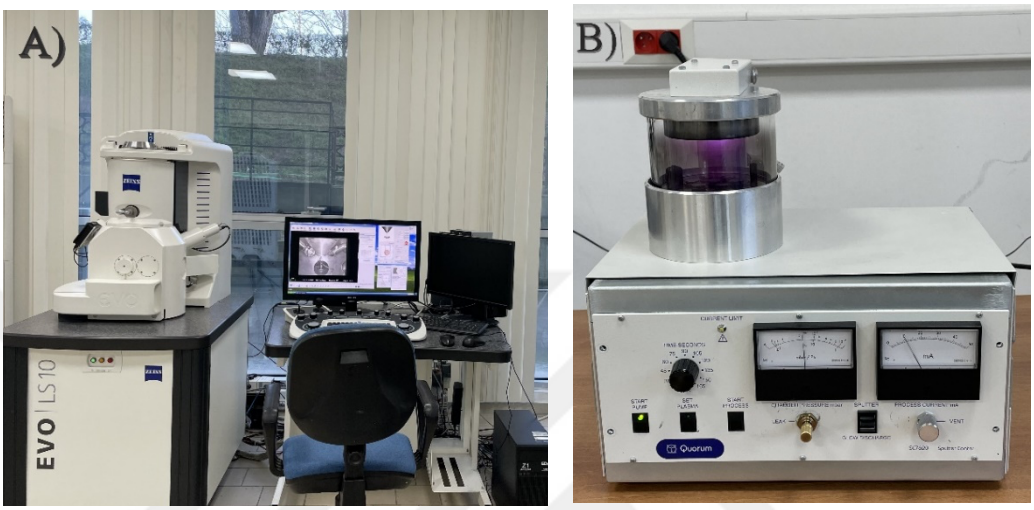
$$\text{YK\%} = \frac{\text{Kapsüllenmiş ilaç miktarı (mg)}}{\text{Üretilen nanojel miktarı (mg)}} \times 100 \qquad \textbf{(3.3)}$$

Toplam ilaç miktarı nanojel üretilirken yüklenen vankomisin miktarını, üretilen nanojel miktarı ise sentezlenen nanojellerin liyofilizatör aşamasından sonra hassas terazi ile tartılan katı kütlesini temsil etmektedir.

3.4.8 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

SEM malzemelerin morfolojik özelliklerini incelemek için yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmeyi sağlayan bir cihazdır. Y/S ters emülsiyon yöntemi ile

oluşturulan boş ve vankomisin yüklü nanojellerin yüzey morfolojisi, yapısal karakterizasyonu ve boyut ile ilgili morfolojik analizleri SEM (SEM, Zeiss EVO LS 10) cihazı ile yapılmıştır. Kuru nanojeller, karbon bant üzerine serpilmiş ve 2-4x10^{-2} mbar vakum altında Quorum SC7620 markalı cihaz ile 120 saniye boyunca altın/paladyum püskürtülerek kaplanmıştır.



Şekil 3. 4 A) SEM cihazı, B) altın/paladyum kaplama cihazı.

3.4.9 *In vitro* Salım Çalışmaları

Salım çalışması optimize edilen nişasta nanojellerden en çok vankomisin enkapsüle etmiş olan formülasyon (VNJ-13) için yapılmıştır. Öncelikle, literatürde belirtildiği şekilde simüle tükürük sıvısı hazırlanmıştır [193]. 0,149 g KCl tartılarak 1 L'lik balon joje içerisindeki 500 ml ultra saf suda çözünmüştür. Aynı zamanda 0,117 g NaCl tartılarak ultra saf suda çözünmüştür. Balon jojede hazırlanan çözeltinin üzerine 2,100 g $NaHCO_3$ eklenip karıştırılmıştır. Son olarak karışıma 2,000 g α-amilaz eklenip karıştırmaya devam edilmiştir. Çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanarak pH'ı 5 M HCl ile 6,8'e ayarlanmıştır.

Liyofilize nanojel 5 mg/ml olacak şekilde tartılmış ve simüle tükürük sıvısında disperse edilerek çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 150 rpm'de inkübe edilmiştir.

Belirli zaman aralıklarında 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek, üst fazın UV-VIS spektrofotometrede 280 nm dalga boyundaki absorbans değeri okunmuş ve nanojellerden salınan vankomisinin miktarı hesaplanmıştır. Pellet yeniden simüle tükürük sıvısında süspanse edilmiş ve salım analizi nişasta nanojellerden salınan vankomisin miktarı kantitatif olarak tespit edilemeyinceye kadar tekrar edilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi yardımıyla, periyodik aralıklarla ölçülen vankomisinin salım değerleri zamana bağlı kütle hesabı eşitliği kullanılarak kümülatif olarak hesaplanmıştır.

M_t, t zamanındaki etken madde miktarı (mg);

$C_{t,}$ t zamanındaki etken madde konsantrasyonu (mg/ml);

V, salım ortamı hacmi (ml);

V_s, belirli zamanlarda alınıp ölçülen salım ortamı hacmi (ml) olarak ifade edilmektedir.

$$M_t = C_t \times V + \sum C_{t-1} \times V_s \quad \textbf{(3.4)}$$

M_t, t anındaki etken madde miktarı (mg);

M_0, başlangıçta nanojellere yüklenen etken madde miktarı (mg) olarak ifade edilmektedir.

$$\%M = (M_t/M_0) \times 100 \quad \textbf{(3.5)}$$

3.4.10 Nanojellerin Biyobozunurluk Testi

Biyobozunurluk testi, ZetaSizer cihazında nanojellerin ışık saçılması şiddetinin (Derived Count Rate) (DCR), zamana bağlı olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için nanojeller simüle tükürük çözeltisinde 1 mg/mL olacak şekilde disperse edilmiş ve 36-38°C'de ZetaSizer cihazında 10 dakika

aralıklarla (kontrol) boyut ölçümleri gerçekleştirilerek biyobozunurluk takip edilmiştir.

3.4.11 Antibakteriyel Aktivite Testi

Bu çalışmada elde edilen vankomisin yüklü nişasta nanojellerin antibakteriyel aktivitesi; *Staphylococcus aureus (S. aureus*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) olmak üzere 4 farklı bakteri türü kullanılarak broth mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Vankomisin yüklü nişasta nanojellerin mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel aktivitesi, salım çalışması sırasında 0, 15, 30 ve 60. dakikalarda alınan üst fazlar ile test edilmiştir. Test metotlarında kullanılan mikroorganizmaların süspansiyonları, tek gecelik kültürden hazırlanmıştır.

Besiyerlerinin Hazırlanması

Muller Hilton Agar (MHA) ve Muller Hilton broth (MHB) besiyerleri dehidre besiyeri olarak ticari alınmıştır ve 34,0 g/L konsantrasyonda distile su içerisinde ısıtılarak eritilmiştir. Daha sonra eritilen besiyeri otoklavda 125°C'de 15 dakika boyunca sterilize edilerek, steril petri kutularına 12,5'er ml dökülmüştür.

Bakteriyel Süspansiyonların Hazırlanması

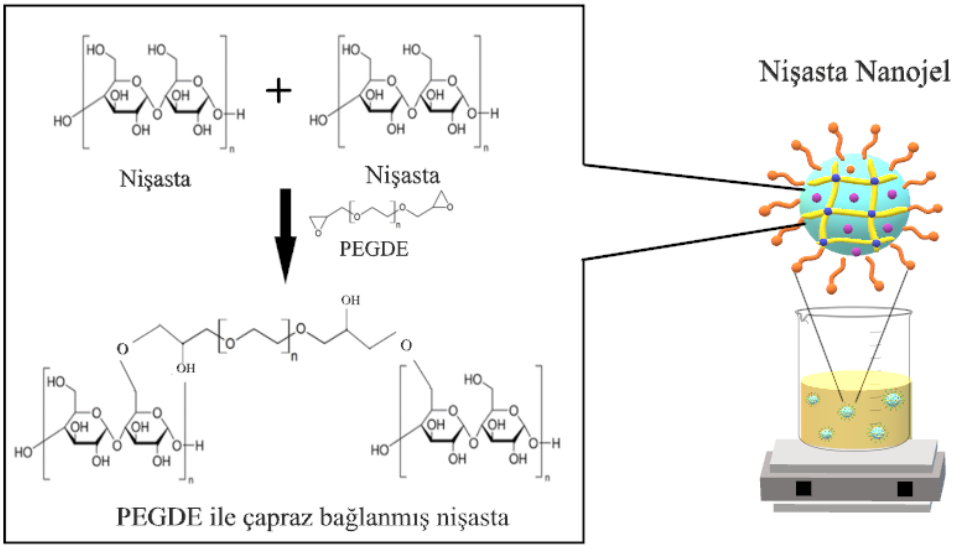
Çalışma kültüründeki *E.coli* (Gram negatif) ve *S.aureus* (Gram pozitif), bakterileri kolonilerinden bir kaçı alınarak MHB besiyerinde 200 rpm çalkalanarak; *S. mutans* (Gram pozitif) ve *S. pyogenes* (Gram pozitif), ise çalkalanmadan bir gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bakteri kültürleri, optik yoğunluğu OD_{600nm} 0,1-0,2 aralığında olacak şekilde MHB besiyeri ile seyreltilmiştir. (Yaklaşık 10^8 CFU ml^{-1} konsantrasyon).

3.4.11.1 Broth Mikrodilüsyon Yöntemi

Broth mikrodilüsyon yöntemi, CLSI standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir [194]. Yöntemde, test örneklerinin MİK değeri, broth mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak belirlenmiş olup analiz 96 kuyucuklu plate kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, her bir kuyucuğa ilgili mikroorganizma çalışma kültüründen (10^6 CFU ml^{-1}) 100 µL eklenmiştir. Ardından, ilk kuyucuktan başlanarak sırasıyla son hacim 100 µL olacak şekilde test örnekleri seyreltilerek eklenmiş ve sonra her kuyunun son hacmi besiyeri ile 200 µL'ye tamamlanmıştır. Test örnekleri salım ortamından belirli sürelerde alınmıştır ve konsantrasyonları 7-1514 μg/ml aralığındadır. Daha sonra örnekler 37°C' de 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ise MİK değeri, kuyucuklardaki mikrobiyal üreme hem spektrofotometrik hem de standart petri sayma metodu ile tespit edilmiştir. Çalışma iki tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Vankomisin antibiyotiği pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir (62,5-1,9 μg/ml aralığı).

4
DENEYSEL SONUÇLAR

Bu tezin amacı, Y/S ters emülsiyon yöntemi ile bir nanotaşıyıcı sistem olarak nişasta nanojeller sentezlemek, karakterize etmek ve antibakteriyel etkinliklerini incelemektir. Nanojeller, Şekil 4.1'de görüldüğü gibi nişastanın PEGDE ile çapraz bağlanmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra nişasta nanojellerine vankomisin enkapsüle edilerek kanserli hastalarda oluşan oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaları hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, ön denemeler gerçekleştirilerek optimal özelliklere sahip nanojeller elde edilmiştir. Bu nanojeller ile ilgili deneysel sonuçlar üç bölüm altında tartışılmıştır. Sonuçların ilk bölümünde, sentezlenen boş nişasta nanojellerinin partikül boyutları, PDI ve zeta potansiyelleri ile FT-IR ve XRD ile yapıları ele alınmıştır. İkinci bölümde, farklı sentez parametreleri koşullarında vankomisin yüklenerek nişasta nanojellerinin özellikleri ortaya konurken son bölümde, optimize edilmiş olan VNJ-13 formülasyonunun yapısal ve morfolojik analizleri ile simüle tükürük sıvısında *in vitro* salım ve antibakteriyel aktivite test sonuçları verilmiştir.



Şekil 4. 1 Nişastanın PEGDE ile çapraz bağlanma mekanizması ve Y/S ters emülsiyon yöntemi ile nanojel oluşumu.

4.1 Ön Deneme Sonuçları

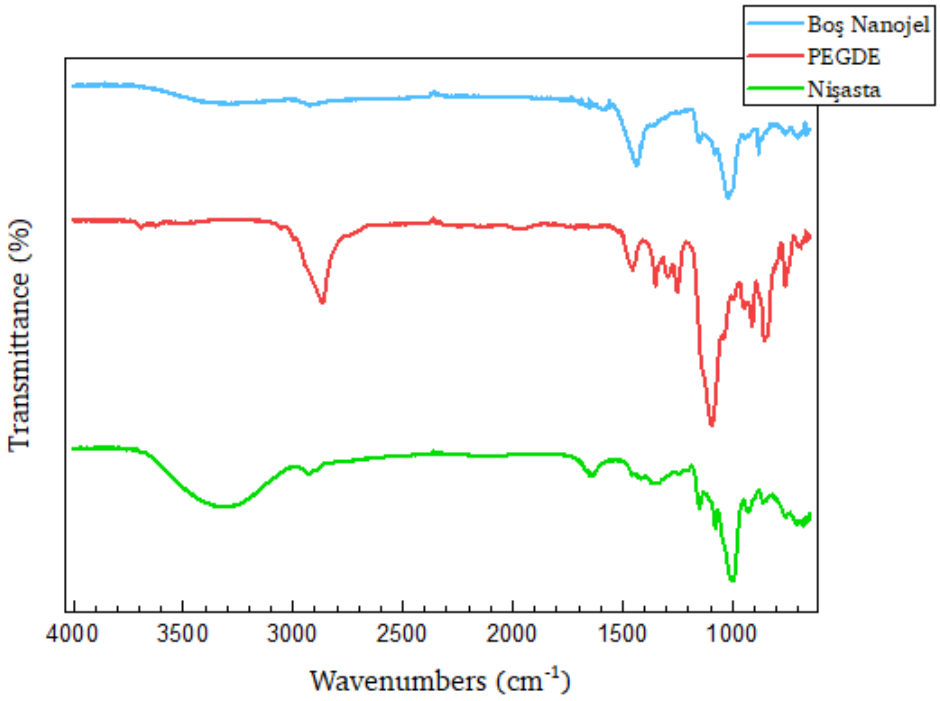
Nişasta nanojellerini optimize etmek için yapılan ön deneylerde nişastayı çözmek için kullanılan yöntemler, farklı organik fazların kullanımı, değişen ultrasonikasyon süresi ile gücü ve yüklenen antibakteriyel ajanlar gibi parametreler nanojellerin sentezi için uygun bir metot elde edilene kadar değiştirilerek denenmiştir ve yapılan ön denemelerin sonuçları tezin ek kısmında verilmiştir (Tablo Ek 1). Nanojellerin sentezinde nanoçöktürme ve Y/S emülsiyon yöntemi denenmiş olup, daha kararlı ve küçük boyutlarda partiküller elde edilmesi sebebiyle Y/S emülsiyon yöntemi seçilmiştir. Sentez sırasında kullanılan nişasta çözeltisi, nişastanın soğuk suda çözünmesi, ısıtılarak çözünmesi ve NaOH kullanılarak çözünmesiyle farklı şekillerde hazırlanmış ve sonuç olarak %5 w/v NaOH'ta ısıtılarak tam olarak çözündüğü ve daha berrak bir çözelti elde edildiği görülmüştür. Çapraz bağlayıcı olarak epiklorohidrin ve PEGDE nişasta ile çapraz bağlanmış ve toksik olmaması nedeniyle PEGDE tercih edilmiştir. Son olarak kullanılan farklı organik fazlar incelendiğinde ise, ayçiçek yağı, hekzan, siklohekzan ve etanol kullanılarak yapılan sentezlerde, ayçiçek yağı ve hekzan ile homojen bir emülsiyon oluşamamış, siklohekzanda ise nano boyutlarda partikül elde edilememiştir. Bu nedenle, homojen bir emülsiyon oluşturması sebebiyle etanol ve sürfaktan olarak Span 80 ile kıyaslandığında Tween 80 ile daha kararlı nanojeller elde edilmiştir. Bu ön formülasyon çalışmalarının ardından uygun parametreler seçilmiş ve nanojellerin optimizasyonu için bu paramatrelerin nanojel özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.2 Boş Nişasta Nanojellerinin Karakterizasyon Sonuçları

Optimizasyon deneyleri için öncelikle boş nişasta nanojelleri (NNJ-1) sentezlenmiş olup sentezlenen nişasta nanojellerin yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi ve nanojellerin kristalitesinin incelenmesi için FT-IR ve XRD gibi yapısal analizleri yapılmıştır ve boyut, PDI ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

4.2.1 FT-IR Analiz Sonuçları

Nişastanın, PEGDE'nin ve hazırlanan boş nanojele ait FT-IR spektrumları Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Dört ana bölgede nişastaların FT-IR spektrumları, bantların yorumlanmasına ve karakterizasyonuna yardımcı olmaktadır. Bu bölgeler: 800 cm^{-1}'in altı, 800−1500 cm^{-1} (parmak izi bölgesi), 2800-3000 cm^{-1} arasındaki bölge (C−H germe bölgesi) ve son olarak 3000-3600 cm^{-1} arasındaki bölge (O−H germe bölgesi) şeklindedir [195].



Şekil 4. 2 Nişasta, PEGDE ve boş nanojelin FT-IR spektrumları.

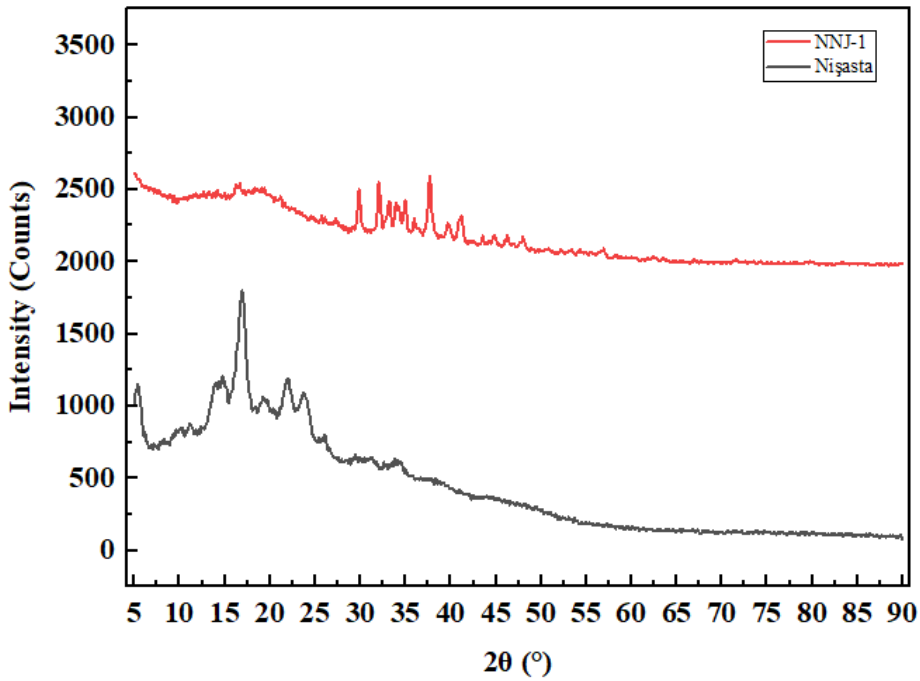
Şekil 4.2'de patates nişastası 3250 cm^{-1}, 2900 cm^{-1} ve 1650 cm^{-1}, 1360 cm^{-1}, 1150 cm^{-1}, 1000 cm^{-1}'de karakteristik pikler göstermiştir. 3250 cm^{-1}'deki geniş bandın tüm nişastalarda olduğu gibi OH germe titreşimine ve 2900 cm^{-1}'deki pikin ise CH_2 deformasyonuna ait olduğu bilinmektedir [196]. Bununla birlikte, 1650 cm^{-1}'deki pikler, amorf bölgede emilen su moleküllerine ve CO bandının (çift bağ amid I) gerilme titreşimine atfedilmiştir [197]. Parmak izi bölgesinde, 1360 cm^{-1}, 1150 cm^{-1} ve 1000 cm^{-1} de görülen pikler ise sırasıyla birincil veya ikincil alkollerin OH

bükülmesine, C-O-C alifatik eterdeki asimetrik gerilmeye ve siklik karbon halkalarına ait olduğu düşünülmektedir.

Yine Şekil 4.2'de PEGDE'nin FTIR spektrumunda, 2863 cm^{-1}'de çıkan bant CH_2 deformasyonuna aittir. 1095 cm^{-1} de görülen şiddetli pik alifatik eterlerdeki C-O-C antisimetrik gerilmesine aittir. 1454 cm^{-1}'deki pik ise CH_2 gruplarının titreşimlerine aittir. Boş nanojelin FT-IR spektrumu incelendiğinde ise, 3250 cm^{-1} bantın nişastaya göre zayıfladığı görülmüştür. Bununla birlikte, nanojelde PEGDE'ye ait 1454 cm^{-1}'deki pik net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca nişastaya ait pik 1000 cm^{-1}deki pik ise nanojelin spektrumunda da bulunmaktadır. Sonuç olarak nanojelin spektrumunda hem nişastanın hem de PEGDE'nin karakteristik piklerinin varolduğu anlaşılmıştır.

4.2.2 XRD Analizi Sonuçları

Nişasta ve boş nanojelin (NNJ-1) X-ışını kırınım spektrumları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Nişasta kristal yapısına göre A, B ve C tipi kristalite olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır [198]. X-ışını kırınım spektrumları incelendiğinde bu çalışmada kullanılan patates nişastası, 2θ=5.33°, 14.78°, 17.08°, 21.97°, 24.04° ve 25.99° 2θ'da belirgin pikler vererek B-tipi kırınım modeline ait yapıyı sergilemiştir. B-tipi kristal yapı yumru köklerde, meyvelerde ve gövdelerde (örneğin patates, muz ve sago'dan ekstrakte edilen nişastalar) bulunan yüksek amilozlu nişastaların tipik özelliğidir [199]. Diğer taraftan, boş nanojelde 2θ=32.0°, 33.27°, 34.27°, 35.95°, 37.69°, 39.64° ve 41.25° noktalarında belirgin pikler gözlenmektedir. Ancak, nişasta ile kıyaslandığında boş nanojelin spektrumunda keskin piklerin kaybolduğunu görmek mümkündür. Bu durum, ultrasonikasyon yöntemi kullanarak nişasta ve PEGDE'nin çapraz bağlanması ve dolayısıyla nanojellerin elde edilmesiyle yapının kristalitesinin azaldığını göstermektedir. Benzer sonuçlar yakın zamanda yayınlanan bir nişasta nanopartikül çalışmasında da raporlanmış olup ultrasonikasyon işleminin, kristalit boyutunda azalmaya ve bunun sonucunda kırınım pikinin kaybolmasına neden olduğu bildirilmiştir [200].



Şekil 4. 3 Nişasta ve boş nanojelin XRD spektrumu.

4.2.3 Boyut, Zeta Potansiyel ve Reaksiyon Verimi Sonuçları

Boş nanojelin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemi ile tespit edilmiştir. Ayrıca, reaksiyon verimi de Bölüm 3.4.5'te verilen eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanarak tüm sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Boş nanojelin boyut, PDI, zeta potansiyel ve reaksiyon verimi sonuçları.

Nanojel Formülasyonu	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	Reaksiyon Verimi (%)
Boş nanojel	99,76±16,18	0,212	-15,1±9,99	98,56

Nanojellerin hidrodinamik çapının 99,76±16,18 nm olduğu ve 0,212 PDI değeri ile monodispers dağılım gösterdikleri görülmüştür. Zeta potansiyelleri ise -15,1±9,99 mV olarak ölçülmüş ve dolayısıyla nanojellerin negatif yüklü oldukları

tespit edilmiştir. Bununla birlikte, boş nanojel için %98,56 gibi yüksek bir reaksiyon verimi hesaplandığından ortamdaki reaktanların çoğunun reaksiyona girdiği anlaşılmıştır. Dolayısıyla, tezin bundan sonraki kısmında bu boş nanojel denemeleri vankomisin varlığında tekrarlanarak farklı sentez parametrelerinin vankomisin yüklü nanojel özelliklerine etkisi araştırılmıştır.

4.3 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojellerinin Karakterizasyon Sonuçları

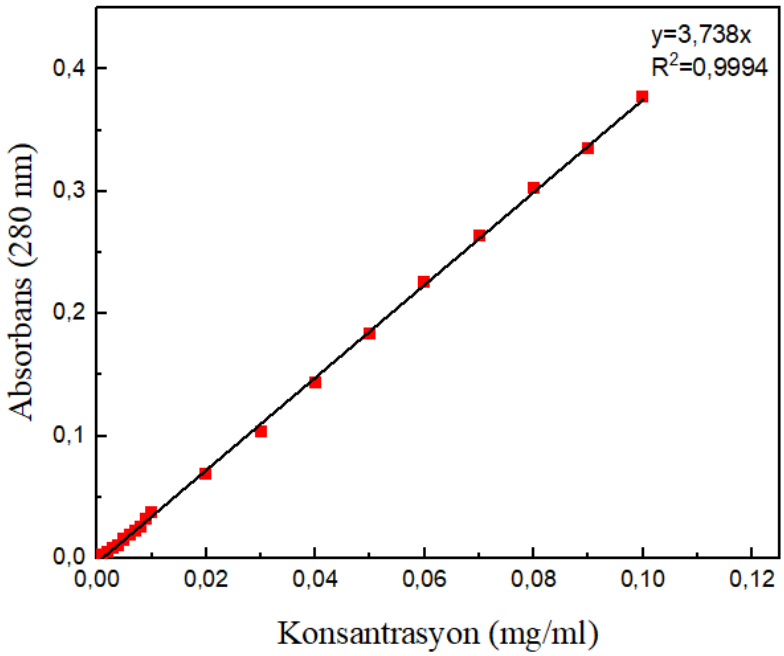
Tezin bu aşamasında, vankomisin yüklü nanojel özelliklerine nişasta konsantrasyonu, nişasta:PEGDE oranı, sürfaktan ve antibiyotik konsantrasyonunun etkisi incelenerek farklı nişasta nanojel formülasyonları hazırlanmıştır. Yüklü nanojeller için, optimizasyon parametrelerinin her aşamasında boyut, PDI, zeta potansiyel, reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesi hesaplanmıştır. Vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin enkapsülasyon etkinliğini ve etken madde yükleme kapasitesini hesaplamak için öncelikle kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Vankomisin etken maddesi için kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi amacıyla stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan 0,001–0,1 mg/ml arasında 18 farklı konsantrasyondaki örneklerin UV-VIS Spektroskopisi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiş (Tablo 4.2) ve Şekil 4.4'te görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Tablo 4.2 %80 w/v etanol de çözünmüş 0,001–0,1 mg/ml konsantrasyonları arasında 19 adet vankomisin çözeltisinin 280 nm'deki absorbans değerleri.

Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans (280 nm)	Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans (280 nm)
0	0	**0,01**	0,037
0,001	0,003	**0,02**	0,069
0,002	0,005	**0,03**	0,103
0,003	0,008	**0,04**	0,143

Tablo 4.2 %80 w/v etanol de çözünmüş 0,001–0,1 mg/ml konsantrasyonları arasında 19 adet vankomisin çözeltisinin 280 nm'deki absorbans değerleri (devamı).

0,004	0,01	**0,05**	0,183
0,005	0,015	**0,06**	0,226
0,006	0,019	**0,07**	0,264
0,007	0,022	**0,08**	0,302
0,008	0,025	**0,09**	0,335
0,009	0,032	**0,1**	0,377



Şekil 4. 4 Vankomisinin 280 nm'deki kalibrasyon eğrisi.

Çizilen kalibrasyon eğrisine göre molar absorbsiyon katsayısı 3,738 ml/mg.cm, regresyon katsayısı ise 0,9994 olarak bulunmuştur. Grafikten elde edilen R^2 değeri belirlenen regresyonu sağladığı için kullanılan analitik metodun doğruluğu kanıtlanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesi hesaplamalarında nişasta nanojellere yüklenmeyen serbest vankomisin miktarının tayininde oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Yüklü nanojellerin, bu denklemle elde edilen enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi sonuçlarıyla birlikte, boyut, PDI, yük, reaksiyon verimi değerleri de farklı deney parametrelerine göre ele alınarak aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

4.3.1 Polimer Konsantrasyonunun Etkisi

Optimizasyon deneyleri sırasında nişasta konsantrasyonunun etkisi partikül boyutları, PDI ve zeta potansiyelleri ile vankomisinin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimi üzerindeki etkisi de incelenmiş ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimal özelliklere sahip formülasyon seçilmiştir.

Nişasta konsantrasyonunun etkisi öncelikle vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin partikül boyutları, PDI ve zeta potansiyelleri araştırılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir. Nişastanın çözünmesi için NaOH'ın yaygın olarak kullanıldığı literatürde bildirilmiştir [201]. Bu çalışmada kullanılan %5 w/v NaOH çözeltisi, su ve nişasta molekülleri arasındaki moleküller içi ve moleküller arası hidrojen bağını kırmış ve nişasta granülü içindeki moleküler düzeni bozarak çözünmesini sağlamıştır.

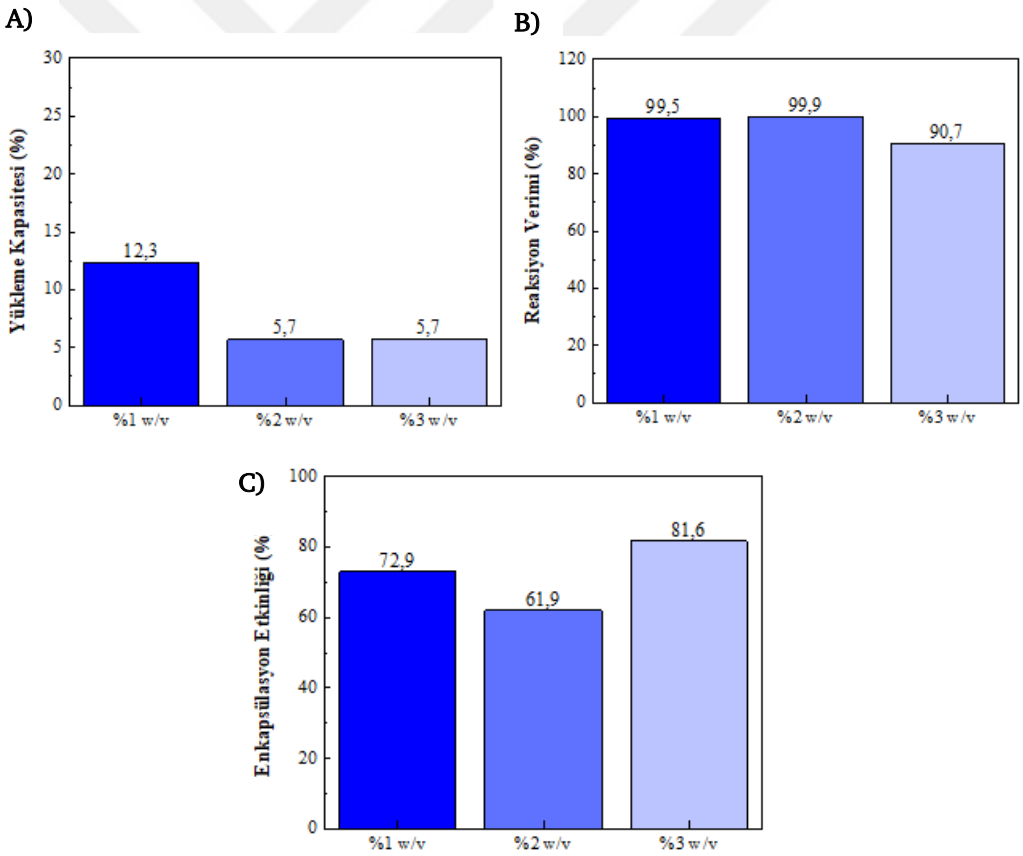
Tablo 4.3 Nişasta konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi.

Polimer Konsantrasyonu (w/v)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
% 1	96,07±11,61	0,338	-17,8±6,0
% 2	109,6±17,23	0,345	-12,0±5,14
% 3	158,7±12,37	0,296	-13,1±6,0

Yapılan ön denemelerden sonra 3 farklı nişasta konsantrasyonu optimizasyon deneyleri için seçilmiştir (%1, %2 ve %3 w/v). Sulu NaOH içindeki jelatinleştirilmiş nişastanın artan konsantrasyonu, retrogradasyon ve jelleşme eğilimi ile yüksek viskoziteli çözelti oluşumuna yol açmıştır. Nişasta konsantrasyonunun arttırılması, nanojellerin partikül boyutlarında artışa sebep olurken, partiküllerin boyut dağılımı üzerinde önemli bir etki göstermemiştir.

Ayrıca, nanojeller -12,0 mV ile -17,8 mV arasında bir zeta potansiyel aralığı ile negatif olarak yüklenmiş ve en kararlı formülasyon %1 w/v nişasta konsantrasyonu ile VNJ-2 örneği olmuştur. Zaten literatürdeki çalışmalar gözden geçirildiğinde, düşük nişasta konsantrasyonlarının (%1 w/v) kullanılması ile, nispeten düşük viskoziteli çözelti sebebiyle daha küçük partikül boyutlarına sahip ve daha kararlı nanojellerin oluşmasını sağlamak mümkündür [202]–[205] ve diğer parametreler sabit kalırken polimer konsantrasyonunu değiştirerek nanojel boyutunu kontrol etme imkanı verdiği için önemlidir.

Şekil 4.5'te nişasta konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimleri üzerindeki etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 5 %1, %2 ve %3 w/v nişasta konsantrasyonlarının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.5 A'da görüldüğü gibi, reaksiyon verimleri üç formülasyon için de %90'nın üzerindedir. Bu sonuçlar, ortamdaki reaktanların çoğunun reaksiyona girdiğini göstermektedir. Artan nişasta konsantrasyonunun reaksiyon verimini azalttığı görülmüştür. Nişasta konsantrasyonu için enkapsülasyon etkinliğinde ise belirgin bir eğilim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5 B). Aslında, nişasta çözeltisinin yüksek viskozitesi nedeniyle nanojellerin partikül boyutu önemli ölçüde artmıştır. Bunun da yüzey alanını ve dolayısıyla ilaç yüklenmesini azaltması beklenebilir. Polimer konsantrasyonunun arttırılması ile kapsüllemenin son derece zorlaştığı literatürde de bildirilmiştir [206]. Bu da, %1 w/v nişasta konsantrasyonunun tercih edilmesinde önemli bir etken olmuştur. Vankomisin yüklü nişasta nanojellerin etken madde yükleme kapasiteleri de Şekil 4.5 C'de verilmiştir. Nişasta konsantrasyonunun azalması ile yükleme kapasitesinin artması, daha az viskoz çözelti dolayısıyla daha az kompakt bir yapı oluşmasına bağlanabilir. Bu da vankomisin için daha yüksek bir yükleme kapasitesine sahip nanojeller ile sonuçlanabilmektedir.

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, optimizasyon deneylerinin ilk aşamasında %1 w/v nişasta konsantrasyonu ile VNJ-2 formülasyonu seçilmiştir ve sonraki aşamalar bu nişasta konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 Polimer:Çapraz Bağlayıcı Oranının Etkisi

Nişasta:PEGDE oranının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin partikül boyutları, PDI ve zeta potansiyelleri üzerindeki etkileri, farklı çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak araştırılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir.

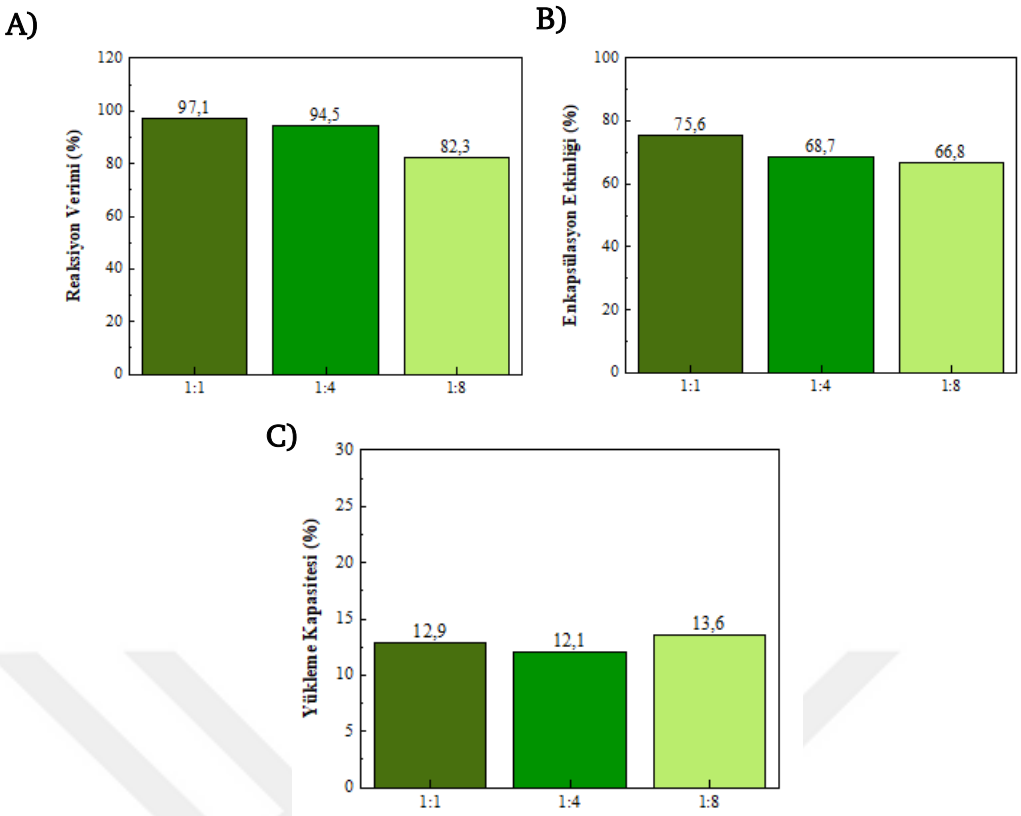
Nişasta nanojellerin sentezlenmesi için Y/S ters emülsiyon çapraz bağlama tekniği kullanılarak PEGDE çapraz bağlayıcının epoksi gruplarıyla nişastanın hidroksil grupları bağlanmıştır (Şekil 4.1). Bu çalışmada PEGDE, yüksek hidrofilikliği ve biyouyumluluğu gibi özelliklerinden dolayı seçilmiştir. Optimizasyon deneylerinin

ilk aşamasında seçilen %1 w/v nişasta konsantrasyonu ile 3 farklı nişasta:PEGDE oranı çalışılmıştır.

Tablo 4.4 Nişasta: PEGDE oranının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi.

Polimer:Çapraz Bağlayıcı Oranı	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
1:1	110,02±13,38	0,394	-18,9±13,5
1:4	99,65±14,85	0,246	-13,5±7,23
1:8	99,87±14,93	0,303	-15,8±12,9

Nişasta:PEGDE oranı 1:1'den 1:4'e arttıkça, yani daha fazla çapraz bağlayıcı kullanıldıkça nanojellerin partikül boyutunun azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte, nişasta:PEGDE oranının 1:8'e artması partikül boyutu üzerinde ciddi bir değişime neden olmamıştır ve genel olarak monodispers bir dağılım göstermiştir. Çapraz bağlama ajanı PEGDE'nin artması ile nişasta hidroksil grupları ile kovalent etkileşimler oluşturduğu ve bunun nanojellerde daha kompakt bir konformasyona yol açtığı belirtilebilir. Benzer şekilde, literatürde çapraz bağlayıcı yoğunluğunun arttıkça, elde edilen parçacık boyutunun düştüğü çalışmalar mevcuttur [207], [208]. Ayrıca, nişasta nanojeller -13,5 mV ila -18,9 mV arasında bir zeta potansiyel aralığı ile negatif olarak yüklenerek nispeten kararlı olmuştur [209]. Şekil 4.6'da nişasta:PEGDE oranının vankomisin yüklü nişasta nanojellerin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimleri üzerindeki etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 6 1:1, 1:4 ve 1:8 nişasta:PEGDE oranının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.6 A'da görüldüğü gibi artan PEGDE miktarının reaksiyon veriminin azalmasına sebep olmuştur. Ortamda yüksek miktarda PEGDE bulunduğu durumda reaksiyona girmeyenler yıkama işlemi ile uzaklaştırıldığında reaksiyon veriminde bir azalma gerçekleştiğini söylemek mümkündür.

Nişasta:PEGDE oranının 1:1'den 1:8'e yükselmesi ile enkapsülasyon etkinliği %75,6'dan %66,78'e düşmüştür (Şekil 4.6 B). Kapsülleme etkinliğinin çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna olan bağlılığı, çapraz bağlı nanojelin gözenek boyutu üzerindeki etkisine bağlı olabilir. 1:8 oranındaki gibi daha yüksek PEGDE konsantrasyonunda daha sıkı bir ağ oluşturması ve daha küçük bir gözenek boyutu

sağlaması beklenmektedir. Dolayısıyla, enkapsülasyon etkinliğinin düşmesine neden olabileceği düşünülmektedir.

Nişasta:PEGDE oranının yükleme kapasitesine önemli bir etki göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.6 C). Bunun sebebinin, PEGDE miktarının artması ve bu doğrultuda zaten çapraz bağlanmayan fazla PEGDE'nin yıkama ile uzaklaşmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Çünkü, nanojeller yeterli olan maksimum miktardaki çapraz bağlayıcı ile bağlanmıştır ve birbirine benzer ağ yapısına sahip nanojeller oluşturmuştur. Bu da dolayısıyla benzer ağ yapısına sahip nanojellerde benzer miktarda vankomisin yükleme kapasitesine sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, nişasta:PEGDE'nin 1:1 oranı ile VNJ-5 formülasyonu sonraki optimizasyon deneyleri için uygun görülmüştür.

4.3.3 Sürfaktan Konsantrasyonunun Etkisi

Tween 80 konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerin partikül boyutları, PDI ve zeta potansiyelleri üzerindeki etkileri, farklı Tween 80 oranları kullanılarak araştırılmıştır.

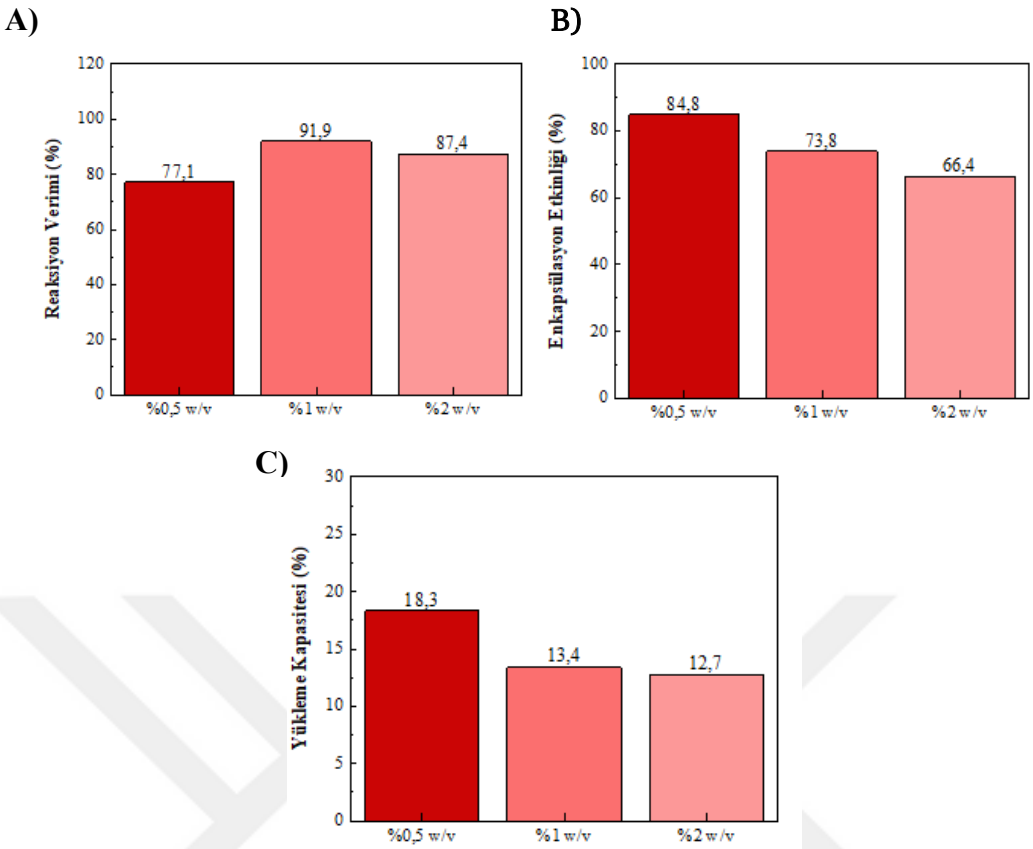
Tween 80, nispeten hidrofilik olması ve nişasta molekülleri ile güçlü bir şekilde etkileşime gireceği beklenilen bir yüzey aktif madde olması sebebiyle seçilmiştir. Tablo 4.5, Tween 80 konsantrasyonunun boyut, PDI ve yük üzerine etkisini göstermektedir. Tablo 4.5'te görüldüğü gibi, literatürdekine benzer şekilde [189], Tween 80'nin yağ ve su fazları arasındaki ara yüzey gerilimini azalttığı ve dağılmış fazı oluştuktan sonra birleşmeye karşı stabilize ederek nişasta nanojellerinin partikül boyutlarının azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, agregasyonu engelleyerek sterik stabilizasyonu sağlayan Tween 80 tabakası daha monodispers partiküller elde etmeyi de sağlamıştır.

Tablo 4.5 Sürfaktan konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi.

Sürfaktan Konsantrasyonu (w/v)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
% 0,5	112,9±13,76	0,417	-16,8±6,49
% 1	89,23±12,67	0,340	-18,3±7,51
% 2	88,77±15,31	0,198	-22,1±7,43

Tween 80 konsantrasyonu %0,5'ten %1'e (w/v) arttırıldıkça nişasta nanojellerinin ortalama parçacık boyutlarının 112,9 nm'den 89,23 nm'ye düştüğü görülmüştür. Ancak, Tween 80 konsantrasyonunun %1'den %2'ye (w/v) artması ise partikül boyutlarını etkilememiştir. Bu sonuçlar, yüzey aktif madde adsorpsiyonunun doygunluğa ulaşmasının nanojellerin boyutunu daha fazla azaltmadığını düşündürmektedir. Bu bulgular, literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir [191], [202], [210]. Bununla birlikte, %0,5 w/v Tween 80 miktarı nanojellerin yüzey alanını kaplamak için yetersiz olduğundan agrege olma eğilimindendir ve -16,8 mV ile nispeten kararlıdır [209]. %2 w/v'ye artan Tween 80 konsantrasyonu ile zeta potansiyel -22,1 mV olarak ölçülmüş ve daha kararlı hale gelmiştir.

Şekil 4.7 de sürfaktan konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimleri üzerindeki etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 7 %0,5, %1 ve %2 w/v Tween 80 konsantrasyonlarının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.7 A'da görüldüğü gibi tüm formülasyonlar için reaksiyon verimi %77'nin üzerindedir. Artan Tween 80 konsantrasyonu ile reaksiyon veriminde önce artma sonra azalma olduğu görülmüştür. Vankomisin yüklü nanojellerde enkapsülasyon etkinliğine bakıldığında ise, Tween 80 konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.7 B). Tween 80 miktarının artması, enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte, Tween 80 konsantrasyonunun yüzey alanı ile ilişkili olduğu bilinmektedir [211]. Daha yüksek sürfaktan konsantrasyonu, nişasta nanojellerin yüzey gerilimini azaltarak vankomisinin nişasta nanojellerine yükleme kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır (Şekil 4.7 C).

Sonuç olarak, nanojellerin birleşmesine karşı yüksek stabilite sağlayan %1 w/v Tween 80 yüzdesi ile daha küçük parçacık boyutlarında ve daha kararlı nişasta nanojelleri sentezlenmekle birlikte, enkapsülasyon etkinliği ve reaksiyon verimi dikkate alındığında %1 w/v Tween 80 olan VNJ-9 formülasyonunun optimum özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.4 Antibiyotik Konsantrasyonunun Etkisi

Vankomisin konsantrasyonunun nişasta nanojellerin partikül boyutları, PDI ve zeta potansiyelleri üzerindeki etkileri, farklı miktarlarda vankomisin kullanılarak araştırılmıştır.

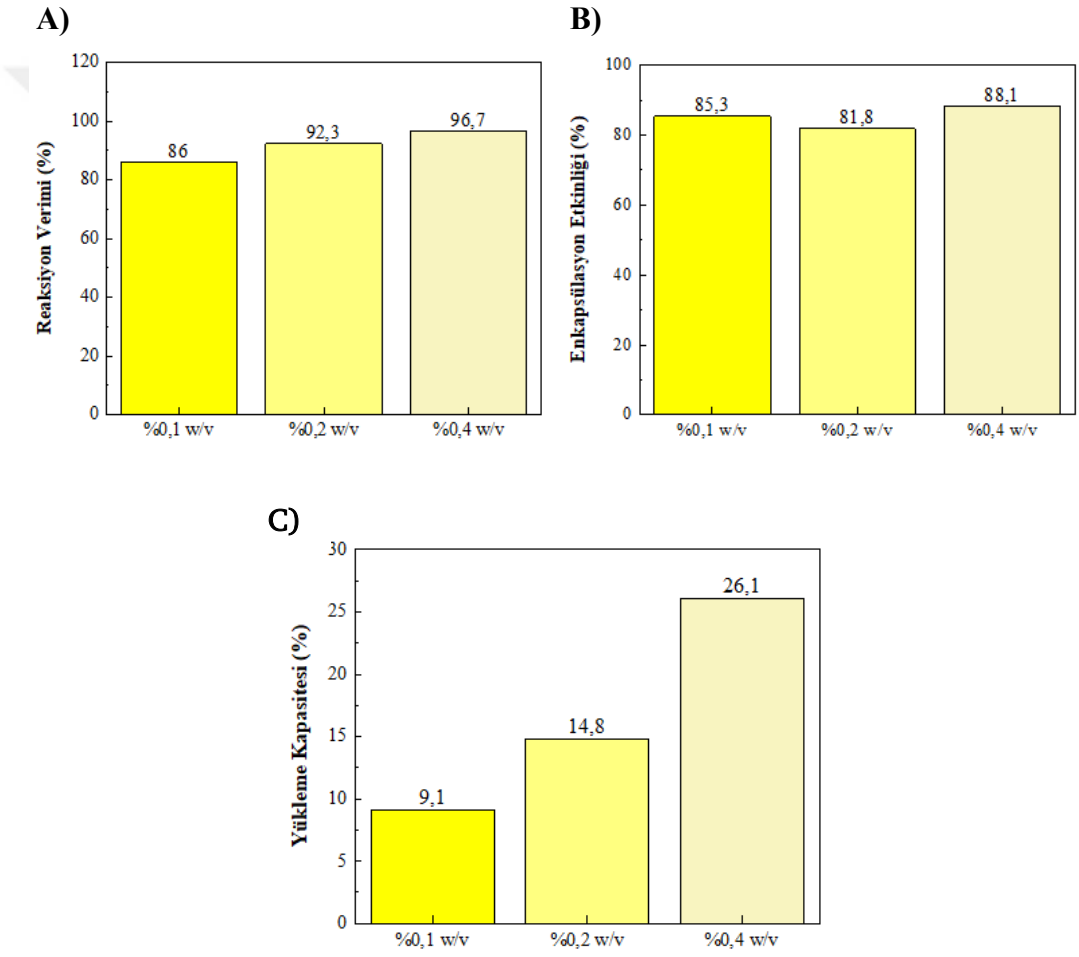
Vankomisin hidrofilik bir antibiyotik olması sebebiyle nişasta nanojellere daha iyi kapsüllenebileceği düşünülerek seçilmiştir. Vankomisin konsantrasyonunun %0,1'den %0,2'ye yükselmesiyle partikül boyutu azalmış, %0,2'den %0,4'e yükselmesiyle tekrar artmıştır, ancak belirgin bir fark görülmemektedir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Vankomisin konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin boyut analizleri, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkisi.

Antibiyotik Konsantrasyonu (w/v)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
% 0,1	96,62±13,84	0,328	-14,4±6,83
% 0,2	84,28±11,44	0,349	-14,5±22,2
% 0,4	87,39±3,95	0,353	-25,0±7,22

Artan konsantrasyonun, nişasta nanojellerin doygunluğa ulaşarak partikül boyutunda ciddi bir değişime yol açmadığını düşündürmektedir. Nanojellerin boyut dağılımı değerleri ise birbirine çok yakın monodispers şeklindedir. Bununla birlikte, zeta potansiyelleri incelendiğinde %0,4 w/v vankomisin içeren formülasyonunun diğerlerine kıyasla daha kararlı olduğu görülmektedir.

Şekil 4.8'de ise vankomisin konsantrasyonunun vankomisin yüklü nişasta nanojellerin enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimleri üzerindeki etkisi verilmiştir.



Şekil 4. 8 %0,1, %0,2 ve %0,4 w/v vankomisin konsantrasyonlarının vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin A) reaksiyon verimi, B) enkapsülasyon etkinliği, C) yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.8 A'da görüldüğü gibi artan vankomisin konsantrasyonu ile reaksiyon verimi de artmıştır. Vankomisin konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliğine bakıldığında ise, yüklü nişasta nanojellerinde daha önce %0,2 w/v vankomisin ile ideal boyutlar ve enkapsülasyon etkinliği elde edildiğinden, %0,1 ve %0,4 w/v vankomisin içeren formülasyonlar ile oluşacak fark araştırılmıştır (Şekil 4.8 B). Vankomisin konsantrasyonunun azalması ve artması ile enkapsülasyon etkinliği değeri önemli ölçüde değişmemiştir. Ancak, optimum miktarda hapsolmuş ilaç ile daha küçük partikül boyutu ve kararlı bir yapı elde etmek için yüksek vankomisin konsantrasyonlarının daha uygun olabileceği görülmektedir. Şekil 4.8 C'de ise, vankomisin konsantrasyonunun artması ile yükleme kapasitesinin belirgin bir şekilde arttığını görmek mümkündür. Su fazında nişasta ve artan vankomisin birbirleriyle daha çok etkileşime girerek yüklenme kapasitesini arttırıyor olabilir. Diğer parametre değerleri ile birlikte yükleme kapasitesinde de VNJ-13 formülasyonu en yüksek değere sahip olduğundan, sonraki karakterizasyon teknikleri ile incelenmek için optimal özelliklere sahip nanojeller olarak belirlenmiştir.

Böylece, tüm sentez parametreleri incelendiğinde, %1 w/v nişasta konsantrasyonu, 1:1 nişasta:PEGDE oranı, %1 w/v Tween 80 konsantrasyonu ve % 0,4 w/v vankomisin konsantrasyonu ile optimum koşullara sahip nanojellerin VNJ-13 formülasyonu olduğu görülmüştür ve tezin bundan sonraki salım ve antibakteriyel aktivite incelemelerine bu formülasyon ile devam edilmiştir.

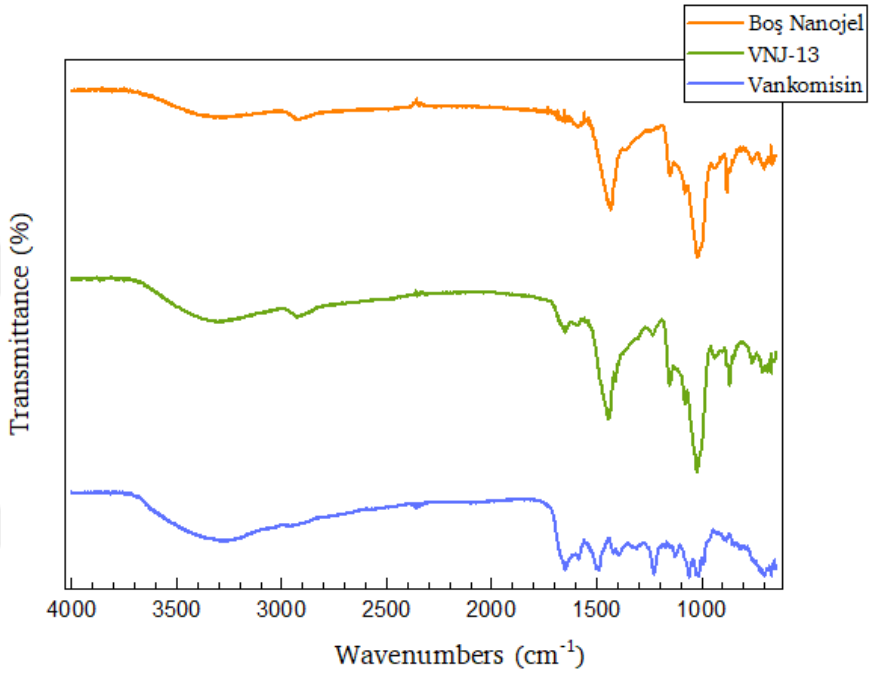
4.4 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojelin Yapısal, Morfolojik, *in vitro* Salım ve Antibakteriyel Aktivitesi

Bu bölümde, oral mukozit enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmak üzere optimal özelliklere sahip VNJ-13 kodlu vankomisin yüklü nişasta nanojellerin yapısal ve morfolojik analizleri ele alınmış, *in vitro* salım ve antibakteriyel aktivite sonuçları

verilmiştir. Vankomisin yüklü nişasta nanojellerin (VNJ-13) etkinliği, boş nişasta nanojeller (NNJ-1) ile mukayese edilerek sonuçlar ele alınmıştır.

4.4.1 FT-IR Analiz Sonuçları

Vankomisin, NNJ-1 kodlu boş nişasta nanojel ve optimal özelliklere sahip olan VNJ-13 kodlu vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin FT-IR spektrumları Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



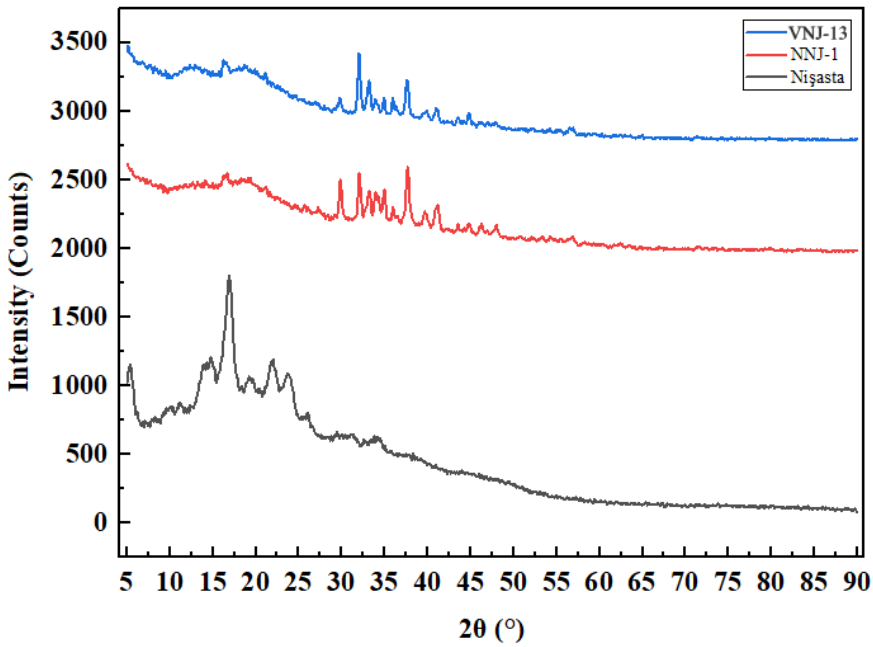
Şekil 4. 9 Boş nanojel (NNJ-1), VNJ-13 ve vankomisinin FT-IR spektrumları.

Şekil 4.9'da vankomisinin IR spektrumuna ait, O-H gerilmesi, C=O gerilmesi, C=C ve fenoller için sırasıyla 3405 cm^{-1}, 1650 cm^{-1}, 1505 cm^{-1} ve 1230 cm^{-1}'de karakteristik pikler görülmektedir [212]. 1650 cm^{-1}'de görülen pik vankomisinin amid grubuna aittir. VNJ-13'ün spektruma bakıldığında ise, vankomisine ait olarak amid piki görülmektedir. Bu pikin de dalga sayısında küçük bir değişiklik olduğu görülmektedir. Ancak vankomisine ait diğer karakteristik pikler nanojel spektrumunda görülmemektedir. Bu durum, vankomisinin büyük bölümünün

nanojel içerisine hapsolduğunu, az miktarının ise yüzeye adsorbe olduğunu düşündürmektedir.

4.4.2 XRD Analizi Sonuçları

Nişastanın, boş nanojelin ve vankomisin yüklü VNJ-13'ün X-ışını kırınım spektrumları Şekil 4.10'da gösterilmiştir. X-ışını kırınım spektrumları incelendiğinde VNJ-13, 2θ=31.99°, 33.91°, 34.94°, 35.93°, 37.62°, 39.87° ve 41.06°'de belirgin pikler vermiştir. XRD sonuçları, nişastanın ultrasonikasyonla işlenerek PEGDE ile çapraz bağlanması sonucu doğal kristal yapısında ciddi bir bozulma ile sonuçlandığını ve düşük kristallik veya amorf bir karaktere sahip nanojellere yol açtığını göstermiştir. Buna ek olarak, nanojellere vankomisin yüklenmesi yapısındaki bazı kırınım piklerinin şiddetinin azalmasına ve dolayısıyla kristalitesinin daha da azalmasına neden olmuştur.

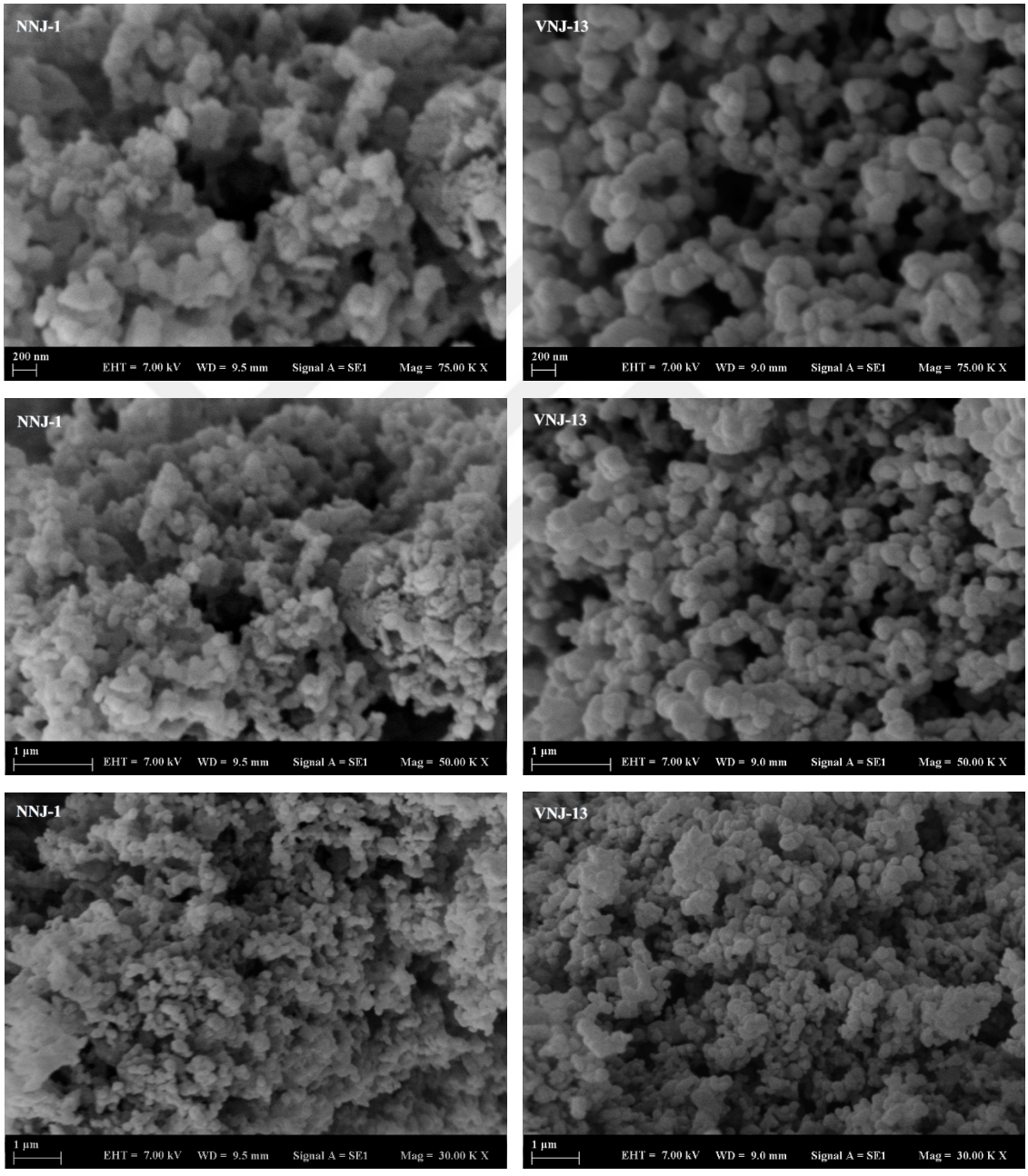


Şekil 4. 10 Nişastanın, NNJ-1 ve VNJ-13'ün X-ışını kırınım spektrumları.

4.4.3 SEM Görüntüleri

Boş ve VNJ-13 nanojellerinin morfolojisini, parçacık boyutunu ve boyut dağılımını araştırmak için SEM analizleri yapılmıştır. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, NNJ-1 ve

VNJ-13 yaklaşık 80 nm ila 100 nm arasında değişen boyutlarda ve küresel şekildedir. Dar boyut dağılımları ile ortalama 99,76±16,18 nm çapa sahip boş nanojel ile ortalama 87,39±3,95 nm çapa sahip VNJ-13, DLS sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Boş nanojel ile karşılaştırıldığında, VNJ-13 daha homojen bir yapı ve pürüzsüz bir yüzeye sahip küresel partiküller olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 11 NNJ-1 ve VNJ-13'ün 75.000x, 50.000x ve 30.000 kat büyütme ile çekilmiş SEM görüntüleri.

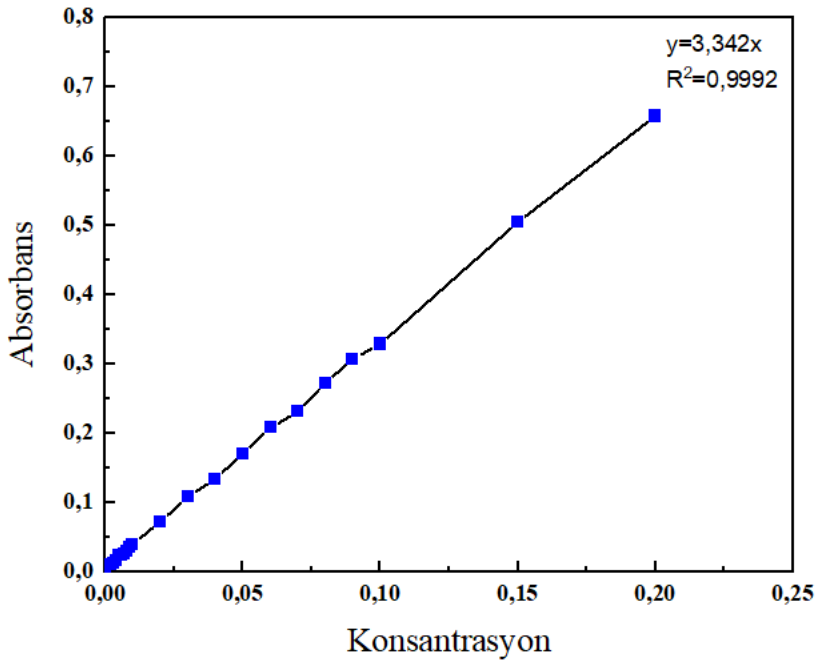
Şekil 4.11'de görüldüğü gibi boş ve VNJ-13 nanojellerinin ölçülen yüksek zeta potansiyeline rağmen, liyofilize edilen nanojellerde literatürdeki çalışmalara benzer şekilde agregatlar oluşturduğu görülmüştür [213]–[215]. Oluşan agregatlar, elektrostatik ivmenin artması ve dolayısıyla Van der Waals kuvvetlerinin azalmasıyla açıklanabilir. Bu bulguları destekleyen Liu ve arkadaşları, nişasta nanopartiküllerinin van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları yoluyla agregatlar oluşturma eğiliminde olduğunu ve bunların kolayca çökebileceğini belirtmiştir [216].

4.4.4 *In vitro* Salım Sonuçları

VNJ-13 kodlu vankomisin yüklü nişasta nanojellerden vankomisinin salımı, hazırlanan simüle tükürük sıvısı ortamında kanser kemoterapisinin neden olduğu oral mukozit tedavisi için araştırılmıştır. *In vitro* salım çalışmasında salınan ilacın miktarını belirlemek için öncelikle vankomisinin simüle tükürük sıvısında 280 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiş (Tablo 4.7) ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.12).

Tablo 4.7 Simüle tükürük sıvısında hazırlanan 0,001–0,2 mg/ml konsantrasyonları arasındaki 20 adet çözeltinin 280 nm'deki absorbans değerleri.

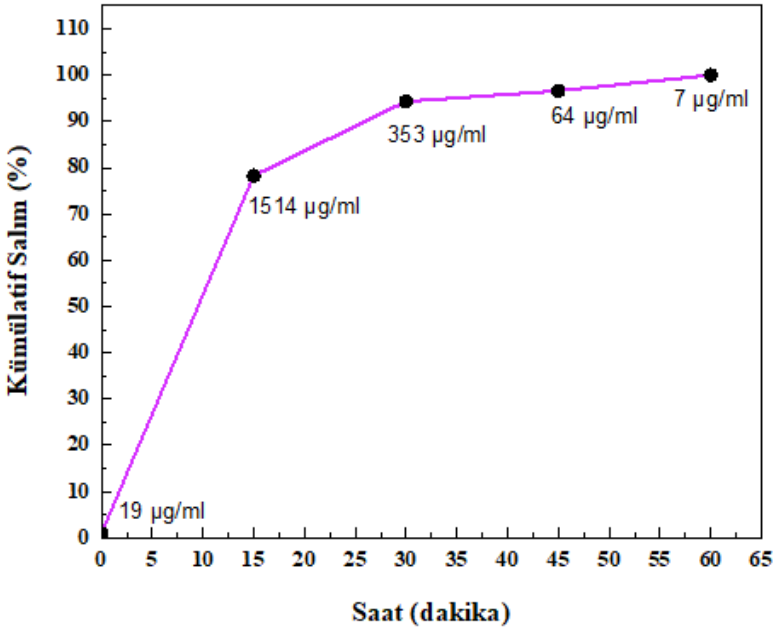
Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans (280 nm)	Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans (280 nm)
0	0	**0,02**	0,072
0,001	0,01	**0,03**	0,108
0,002	0,01	**0,04**	0,134
0,003	0,013	**0,05**	0,171
0,004	0,016	**0,06**	0,208
0,005	0,024	**0,07**	0,231
0,006	0,024	**0,08**	0,273
0,007	0,026	**0,09**	0,307
0,008	0,030	**0,1**	0,329
0,009	0,035	**0,15**	0,505
0,01	0,040	**0,2**	0,658



Şekil 4.12 Vankomisinin simüle tükürük sıvısında 280 nm'deki kalibrasyon eğrisi.

Çizilen kalibrasyon eğrisine göre molar absorbsiyon katsayısı 3,342 ml/mg.cm, regresyon katsayısı ise 0,9992 olarak bulunmuştur. Böylece, analitik metot belirlenen konsantrasyon aralıklarına doğrusal yanıt vermektedir.

Şekil 4.13 ise, simüle tükürük sıvısında nişasta nanojellerden salınan vankomisinin kümülatif salım eğrisini göstermektedir. *In vitro* salım için vankomisinin nanojellerden salım profilinin belirlenmesi için simüle tükürük sıvısında ortamından belirli zaman aralıklarında (0, 15, 30, 45 ve 60. dakika) örnek alınıp salınan vankomisin miktarı tayin edilmiştir. Ölçülen vankomisin miktarı değerleri 7-1514 μg/ml aralığında olmuştur ve yine Şekil 4.13'de verilmiştir.

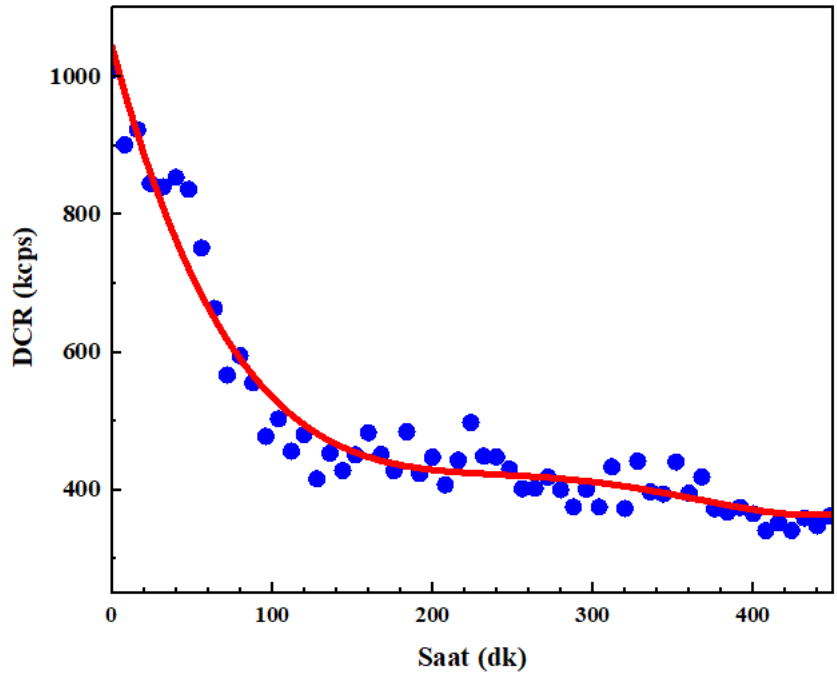


Şekil 4. 13 Vankomisinin nanojellerden kümülatif salım profili.

Nanojellerin salım profilinin, ilk 15 dakikada %70'in üzerine ulaştığı gözlemlenmiştir ve 60.dakikada vankomisinin salımı tamamlanmıştır. Nanojellerden ilaç salım hızı teorik olarak polimer bozunma hızı, ilacın nanojellerden difüzyonu ve nanojellerin sulu ortamda şişme derecesi gibi birçok faktörden etkilenmektedir [53]. Hızlı ve ilk patlama salımı, bu tür nanosistemlerde karşılaşılan ana zorluklardan biridir ancak, bu tezin konusu olan oral mukozada meydana gelen enfeksiyonun tedavisi için Şekil 4.13'de elde edilen kümülatif salım profilinin süre açısından avantajlı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada sentezlenen nanojeller biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan nişastadan elde edilmiştir ve nişasta amilaz enzimi ile parçalanabilmektedir. Bu sebeple, amilaz enzimi içeren sulu simüle tükürük ortamı gözenekli parçacık yüzeyinden nanojel ağına nüfuz edip şişerek vankomisinin salımına yol açmaktadır. Nanojellerin sulu ortamda şişmesi nedeniyle gözeneklerin boyutunun artması ve vankomisinin nanojellerin dışına difüze olabileceği düşünülmektedir.

4.4.5 Nanojellerin Biyobozunurluğu

Şekil 4.14, ZetaSizer ölçümleriyle elde edilen DCR'ye karşı zaman grafiğini göstermektedir. DCR burada ışık saçılması şiddetini göstermektedir. Normalde, çözelti içerisinde nanojellerin boyut ve miktarları artınca DCR artmaktadır [217]. Ancak, Şekil 4.14'te görüldüğü üzere, simüle tükürük ortamında bulunan nanojellerin DCR değerlerinin zamanla azaldığı ve yaklaşık 130. dakikadan sonra sabitlendiği görülmektedir. Bu durum, nanojellerin boyutunda veya miktarında azalma gerçekleştiğini yani biyobozunmaya uğradıklarını göstermektedir. Şekil 4.14'te görülen biyobozunma davranışı yukarıda Şekil 4.13'de verilen salım profili ile karşılaştırıldığında, nanojellerin biyobozunma ile salım sürelerinin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 14 Vankomisin yüklü nanojellerin DCR-zaman grafiği.

4.4.6 Vankomisin Yüklü Nişasta Nanojellerinin Antibakteriyel Aktivitesi

Çalışmada optimize edilen VNJ-13 formülasyonunun antibakteriyel aktivitesi broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak *E.coli*, *S.aureus*, *S.mutans* ve *S.pyogenes* organizmaları üzerinde değerlendirilmiştir.

Kantitatif bir yöntem olan broth mikrodilüsyon testinde, antibakteriyel aktivitenin tespiti için 96 kuyucuklu plate kullanılarak mikrobiyal büyüme analiz edilmiştir. Vankomisin yüklü nişasta nanojelin salım sırasında 0, 15, 30 ve 60. dakikalarda simüle tükürük ortamından alınan örnekleri seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda incelenmiştir. Kontrol grubu olarak ise 1 mg/ml stok vankomisin çözeltisi seri dilüsyon yöntemi ile yine 96 kuyucuklu plate de seyreltilmiş ve karşılaştırma için test edilmiştir. İçerisinde ağız mukozasına ait spesifik bakterilerinde *(S.mutans* ve *S.pyogenes*) dahil olduğu dört farklı bakteri ile broth mikrodilüsyon analizine ait MİK değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8 VNJ-13 test örneği ve vankomisin antibiyotiğin MİK değerleri.

Test örnekleri	**MİK (μg/ml)**			
	E. coli	***S. aureus***	***S. mutans***	***S. pyogenes***
VNJ-13 formülasyonu	8,80	1,10	8,80	8,80
Vankomisin	31,25	< 1.9	31,25	61,5
Vankomisin (EUROCAST)	-	2.0	2.0	2.0

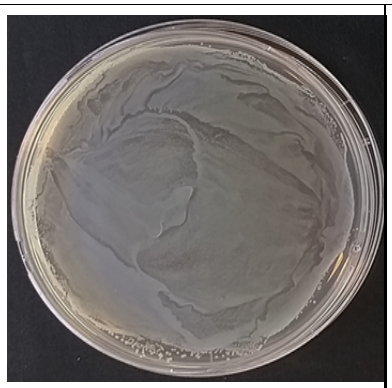
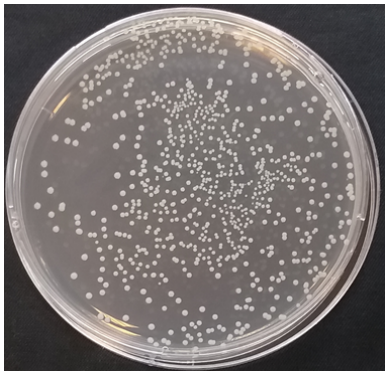
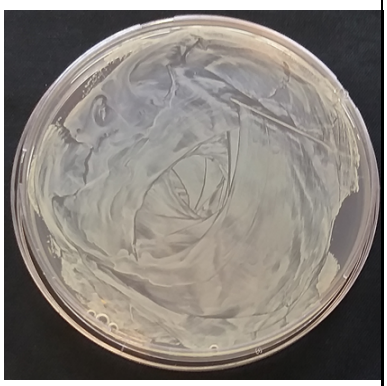
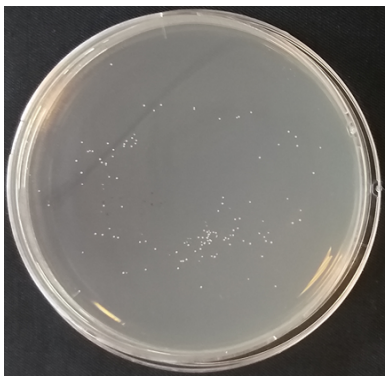
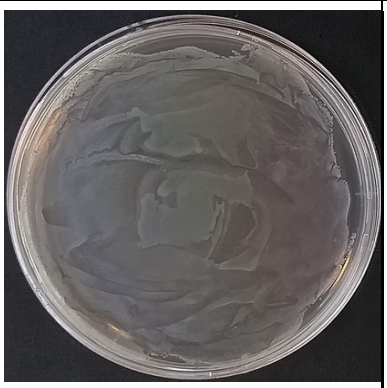
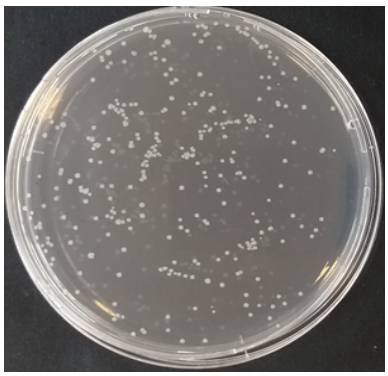
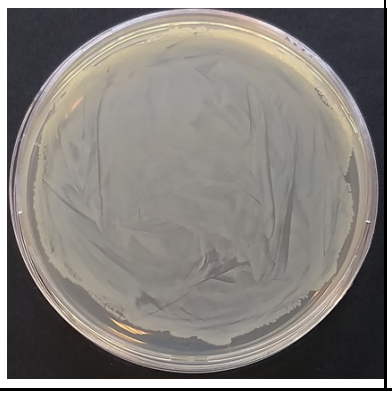
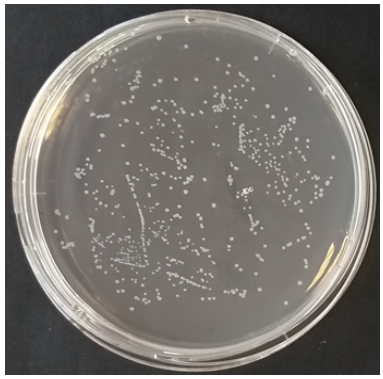
Vankomisinin uygulandığı tüm konsantrasyonlarda *S. aureus* üremesinin gözlenmediği, *E. coli* ve *S. mutans*'ta 31,25 μg/ml, *S. pyogenes*'te 61,5 μg/ml konsantrasyonlarında bakteriyal üremenin kontrol grubuna göre az olduğu görülmektedir (≤ MİK50). EUROCAST standardındaki vankomisin antibiyotiğinin MİK değerleri ile karşılaştırıldığında; ticari vankomisin etkinliğinin ATCC duyarlı referans *E.coli* ve *S. aureus* strainlerinde düşük olması beklenilen bir durumdur. İlaveten klinik izolat *S. mutans* ve *S. pyogenes* ise değerlerin yüksek olması direnç

potansiyeli ile açıklanabilir. VNJ-13 formülasyonunun MİK değerleri ise ticari vankomisin antibiyotiğine kıyasla çok daha düşük elde edilmiştir. İlgili miktarlar nanojelden 0, 15, 30 ve 60. dakikalarda salınan vankomisin konsantrasyonu esas alınarak hesap edilmiştir (Şekil 4.13). Sentezlenen VNJ-13 nanojelinin salım esnasında yüksek konsantrasyonlara ulaştığı 15. ve 30. dakikalarda antibakteriyel aktivitenin varlığı hem spektrofotometrik sonuçlar hem de standart petri sayım sonuçlarında görülmektedir (Tablo 4.9). Standart petri sayımı için örnekler broth mikrodilüsyon kuyucuklarından alınmış ve Tablo 4.9'da kontrol grubu petrileri mikroorganizmaların kuyulardan direkt ekimi ile, VNJ-13 örneğinin petrileri ise mikroorganizma için MİK değeri kabul edilen kuyulardan 10^{-6} seyreltme yapılarak ekimi gerçekleştirilmiş petri görüntülerini içermektedir. Salımın başladığı 0.dakika ile salımın sonlandığı 60. dakikalarda aktivite görülmemiştir. Ancak 15. ve 30. dakikalarda elde edilen aktivite, ticari vankomisin antibiyotiğinin mevcut etkinliğinden çok daha düşük konsantrasyonda tespit edilmiştir. Özellikle Gram pozitif bakterilere karşı etkin olduğu bilinen vankomisinin (vankomisinin yükü -8,64 olarak ölçülmüştür), yüksek dozlarda Gram negatif *E.coli* üzerinde de etkili olduğu görülmekle birlikte nanojel formülasyonunda bu etkinliğin çok daha düşük konsatrasyonlarda tespit edilmiş olması çalışmanın önemli çıktılarından biridir. Ayrıca Gram pozitif olmasına rağmen klinik örneklerden elde edilmiş *S. mutans* ve *S. pyogenes'*in direnç potansiyelinin mevcudiyetinden dolayı *S. aureus'*a (duyarlı ATCC referans strain) göre daha yüksek bir MİK değeri elde edilmiştir. Ancak yine ticari vankomisinden elde edilen değerlerden oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 4.9 *E.coli, S.aureus, S.mutans* ve *S.pyogenes* organizmaları için kabul edilen MİK değerindeki standart plate görüntüleri.

Test Mikroorganizması	**Kontrol**	**VNJ-13**

Tablo 4.9 *E.coli, S.aureus, S.mutans* ve *S.pyogenes* organizmaları için kabul edilen MİK değerindeki standart plate görüntüleri (devamı).

E. coli		
S. aureus		
S. mutans		
S. pyogenes		

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde, oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisi için etkili ve tedavi sürecini kolaylaştıracak vankomisin yüklü nişasta nanojellerin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, ilk kez nişasta ile PEGDE çapraz bağlanarak farklı sentez koşullarında nanojeller üretilmiş ve optimize edilmiştir. Yapılan çalışma ile literatürde ilk defa oral mukozit enfeksiyonlarının tedavisi için antibakteriyel nişasta nanojeller sentezlenmiş ve araştırılmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda aşağıdaki bulgulara ulaşılmıştır:

- Gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinden sonra en uygun parametreler; nişasta konsantrasyonu (%1 w/v), nişasta:PEGDE oranı (1:1), Tween 80 konsantrasyonu (%1 w/v) ve vankomisin konsantrasyonu (%0,4 w/v) olarak belirlenmiştir. Bu parametrelere göre hazırlanan nanojellerin nano boyutlarda monodispers ve kararlı olduğu görülmüştür.

- Elde edilen nanomalzemenin yapısal analizleri için FT-IR ve XRD ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin fonksiyonel grupları FT-IR spektroskopisi ile tanımlanmış olup nişasta:PEGDE çapraz bağlanmasının ve dolayısıyla jelleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. XRD verileri incelendiğinde ise nişastanın PEGDE ile çapraz bağlanması sonucu kristal yapısında bir değişim meydana geldiği ve daha düşük kristalliğe ya da amorf bir karaktere sahip nanojeller oluştuğu görülmektedir.

- Üretilen nanojeller DLS yöntemiyle incelendiğinde; boş ve vankomisin yüklü nanojellerin boyutunun genel olarak 84,28±11,44 ile 112,9±13,76 nm aralığında olduğu bulunmuştur. Ancak, artan nişasta konsantrasyonu ile nanojellerin boyutları 158,7±12,37 nm'ye kadar yükselmiştir. Daha

düşük nişasta konsantrasyonları ve artan Tween 80 miktarı ile daha küçük ve kararlı nanojeller elde etmek mümkündür. Ayrıca nanojellerin boyut dağılımları 0,198 ile 0,417 arasındadır. Sonuçlar, özellikle polimer ve sürfaktan konsantrasyonunun partikül boyutu ve PDI üzerindeki etkisinin ihmal edilemeyeceğini ortaya koymuştur.

- Sentezlenen nanojeller ELS yöntemiyle incelendiğinde; boş ve vankomisin yüklü nanojellerin zeta potansiyellerinin -12,0 mV ile -25,0 mV arasında değişen değerlerle negatif yüklü olduğu görülmektedir.

- Optimizasyon deneyleri esnasında tüm sentez parametreleri değerlendirilirken, elde edilen nanojellerin enkapsülasyon etkinliği, reaksiyon verimi ve yükleme kapasitesi hesaplanmıştır. Üretilen nanojellerin reaksiyon verimlerinin %77,08 ile %99,85, enkapsülasyon etkinliğinin %61,9 ile %88,08 ve yükleme kapasitelerinin %5,62 ile %26,04 arasında değişiklik gösterdiği bulunmuştur.

- Boş (NNJ-1) ve vankomisin yüklü nişasta nanojellerin (VNJ-13) SEM görüntülerine bakıldığında, ortalama 99,76 nm çapa sahip NNJ-1 ve 84,28 nm ile 158,7 nm arasında değişen çapa sahip VNJ-13 boyutlarının, DLS sonuçlarıyla doğrulandığı ve nanojellerin küresel şekillere sahip olduğu görülmüştür.

- Optimize edilen vankomisin yüklü nişasta nanojellerinin (VNJ-13) *in vitro* salım çalışmasının, vankomisinin 15.dakikada %70'inin 60.dakikada ise tamamının salınması ile sonlandığı tespit edilmiştir.

- Nanojellerin simüle tükürük çözeltisi içerinde yaklaşık 2 saat içerisinde salım profili ile uyumlu olarak biyobozunarak, oral mukozit için uygun bir biyobozunma davranışı gösterdikleri ortaya konmuştur.

- VNJ-13 formülasyonunun *E.coli, S.aureus, S.pyogenes ve S.mutans*'a karşı broth mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Broth mikrodilüsyon analizi sonuçları vankomisin yüklü nişasta nanojelin *S.aureus*'a için 1,10 μg/ml, *E.coli, S.aureus, S.pyogenes* ve *S.mutans'*a için ise 8,80 μg/ml MİK değeri ile antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir.

Tez çalışmasındaki bulgular ele alındığında, küresel şekillere sahip nano boyutlarda monodispers yeni nişasta nanojellerin elde edildiği görülmüştür. Nişasta konsantrasyonu, nişasta:PEGDE oranı, Tween 80 konsantrasyonu ve vankomisin konsantrasyonu değiştirildiğinde, boyut, PDI, zeta potansiyel, reaksiyon verimi, yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliğinin de değiştiği tespit edilmiştir. Elde edilen vankomisin yüklü nişasta nanojellerin simüle oral mukoza ortamında salım yaptığı ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlara göre, üretilen nanojellerin oral mukozitin yanı sıra, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmak üzere potansiyel bir nanotaşıyıcı adayı olduğu ortaya çıkmıştır. Gelecek çalışmaları kapsamında farklı antibakteriyel ajanlar veya ilaçlar kapsüllenebileceği veya her ikisinin sinerjik etkisinin araştırılabileceği düşünülmektedir. Yüklenen farklı biyoaktif bileşikler ile oral mukozada bulunan bakteriler dışında çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği de araştırılabilecektir. Böylece ilaç, gıda, kozmetik vb. sektörlerdeki diğer uygulamalarda kullanılabilecektir. Uygulamaya uygun olarak, antimikrobiyal aktiviyi arttırmak için nanojellerin yüzeyini hedeflenen mikroorganizmayı tanıyan peptitlerle fonksiyonelleştirmek bir araştırma konusu olabilecektir. Bununla birlikte, üretilen nanojellerin biyomedikal alana yönelik uygulamalardaki güvenilirliğini ve etkinliğini belirlemek için biyouyumluluk testlerinin yapılması önerilmektedir.

KAYNAKÇA

[1] O. S.Wolfbeis, *Hydrogel sensors and actuators, Springer series on chemical sesnors and biosensors*, vol. 4, no. 5. 2006.

[2] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, and H. M. Akil, "Classification, processing and application of hydrogels: A review," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 414–433, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.

[3] O. V Salata, "Journal of Nanobiotechnology," *J. Nanobiotechnology*, vol. 6, no. 3, pp. 1–6, 2004, doi: 10.1186/1477-3155-2-12.

[4] K. S. Soni, S. S. Desale, and T. K. Bronich, "Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation," *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 109–126, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009.

[5] A. Sharma *et al.*, "Nanogel - An advanced drug delivery tool: Current and future," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 165–177, 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.930745.

[6] A. V. Kabanov and S. V. Vinogradov, "Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 30, pp. 5418–5429, 2009, doi: 10.1002/anie.200900441.

[7] D. Keskin, G. Zu, A. M. Forson, L. Tromp, J. Sjollema, and P. van Rijn, "Nanogels: A novel approach in antimicrobial delivery systems and antimicrobial coatings," *Bioact. Mater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3634–3657, 2021, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.004.

[8] Y. Sasaki and K. Akiyoshi, "Nanogel engineering for new nanobiomaterials: From chaperoning engineering to biomedical applications," *Chem. Rec.*, vol. 10, no. 6, pp. 366–376, 2010, doi: 10.1002/tcr.201000008.

[9] T. A. Debele, S. L. Mekuria, and H. C. Tsai, *Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents*, vol. 68. Elsevier B.V., 2016.

[10] K. Malzahn *et al.*, "Advanced dextran based nanogels for fighting Staphylococcus aureus infections by sustained zinc release," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 15, pp. 2175–2183, 2014, doi: 10.1039/c3tb21335h.

[11] K. E. Gerçekaslan, "Besinsel Lif Kaynağı Olarak Enzime Dirençli Nişasta," *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.*, vol. 40, no. 1, pp. 103–107, 2009, doi: 10.17097/zfd.50741.

[12] S. Pokhrel, "A review on introduction and applications of starch and its biodegradable polymers," *Int. J. Environ.*, vol. 4, no. 4, pp. 114–125, 2015, doi: 10.3126/ije.v4i4.14108.

[13] H. Y. Kim, S. S. Park, and S. T. Lim, "Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 126, pp. 607–620, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.011.

[14] G. Gutiérrez, D. Morán, A. Marefati, J. Purhagen, M. Rayner, and M. Matos,

"Synthesis of controlled size starch nanoparticles (SNPs)," *Carbohydr. Polym.*, vol. 250, no. April, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116938.
[15] N. Properties, "A Comprehensive Review on Corn Starch-Based," 2020.
[16] M. Bilal, I. Gul, A. Basharat, and S. A. Qamar, "Polysaccharides-based bio-nanostructures and their potential food applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 176, pp. 540–557, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.107.
[17] A. Zarski, K. Bajer, and J. Kapuśniak, "Review of the most important methods of improving the processing properties of starch toward non-food applications," *Polymers (Basel).*, vol. 13, no. 5, pp. 1–33, 2021, doi: 10.3390/polym13050832.
[18] D. Ceylan, S. Abdurrahmanoglu, and I. Gazioglu, "Rheological characterization of starch gels : A biomass based sorbent for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)," *J. Hazard. Mater.*, vol. 371, no. February, pp. 406–414, 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.03.037.
[19] Q. Chen *et al.*, "Recent progress in chemical modification of starch and its applications," *RSC Adv.*, vol. 5, pp. 67459–67474, 2015, doi: 10.1039/C5RA10849G.
[20] W. Wang *et al.*, "Effect of vapor-phase glutaraldehyde crosslinking on electrospun starch fibers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 140, pp. 356–361, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.12.061.
[21] S. Mehboob, T. M. Ali, M. Sheikh, and A. Hasnain, "Effects of cross linking and/or acetylation on sorghum starch and film characteristics," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 155, pp. 786–794, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.144.
[22] P. Saracoglu and M. M. Ozmen, "Starch Based Nanogels: From Synthesis to Miscellaneous Applications," *Starch/Staerke*, vol. 73, no. 9–10, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1002/star.202100011.
[23] H. S. Yu *et al.*, "Facile fabrication of hyaluronated starch nanogels for efficient docetaxel delivery," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 34, no. 4–5, pp. 321–330, 2019, doi: 10.1177/0883911519876067.
[24] X. M. Li *et al.*, "Chitosan hydrochloride/carboxymethyl starch complex nanogels as novel Pickering stabilizers: Physical stability and rheological properties," *Food Hydrocoll.*, vol. 93, no. February, pp. 215–225, 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.02.021.
[25] D. Monticelli *et al.*, "Chemical characterization of hydrogels crosslinked with polyethylene glycol for soft tissue augmentation," *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 1077–1081, 2019, doi: 10.3889/oamjms.2019.279.
[26] D. Kim *et al.*, "Diglycidyl Ether (PEGDE) Administered Subcutaneously in Mice," 2021.
[27] J. Wang, H. Sun, J. Li, D. Dong, Y. Zhang, and F. Yao, "Ionic starch-based hydrogels for the prevention of nonspecific protein adsorption," *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, pp. 384–391, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.077.
[28] J. Wang, J. Li, H. Yang, C. Zhu, J. Yang, and F. Yao, "Preparation and

characterization of protein resistant zwitterionic starches: The effect of substitution degrees," *Starch/Staerke*, vol. 67, no. 11–12, pp. 920–929, 2015, doi: 10.1002/star.201500083.
[29] D. Arora, N. Sharma, V. Sharma, V. Abrol, R. Shankar, and S. Jaglan, "An update on polysaccharide-based nanomaterials for antimicrobial applications," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 6, pp. 2603–2615, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7315-0.
[30] R. Sharma, S. M. Jafari, and S. Sharma, "Antimicrobial bio-nanocomposites and their potential applications in food packaging," *Food Control*, vol. 112, no. September 2019, p. 107086, 2020, doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107086.
[31] M. Hasanin, M. A. Al Abboud, M. M. Alawlaqi, T. M. Abdelghany, and A. H. Hashem, "Ecofriendly Synthesis of Biosynthesized Copper Nanoparticles with Starch-Based Nanocomposite: Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities," *Biol. Trace Elem. Res.*, no. 0123456789, pp. 14–16, 2021, doi: 10.1007/s12011-021-02812-0.
[32] J. Eilers and R. Million, "Prevention and Management of Oral Mucositis in Patients With Cancer," *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 23, no. 3, pp. 201–212, 2007, doi: 10.1016/j.soncn.2007.05.005.
[33] A. Rodríguez-Caballero, D. Torres-Lagares, M. Robles-García, J. Pachón-Ibáñez, D. González-Padilla, and J. L. Gutiérrez-Pérez, "Cancer treatment-induced oral mucositis: A critical review," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 41, no. 2, pp. 225–238, 2012, doi: 10.1016/j.ijom.2011.10.011.
[34] N. M. D. Ni Nyoman Deni Witari, "The Management of Oral Mucositis, Angular Cheilitis and Acute Pseudomembranous Candidiasis Induced by Radiotherapy and Chemotherapy Treatment of Nasopharyngeal Cancer Patient," *Indian J. Public Health*, vol. 11, no. 1, pp. 1–8, 2020.
[35] B. Chaveli-López and J. V. Bagán-Sebastián, "Treatment of oral mucositis due to chemotherapy," *J. Clin. Exp. Dent.*, vol. 8, no. 2, pp. e201–e209, 2016, doi: 10.4317/jced.52917.
[36] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, "The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 1227–1249, 2017.
[37] X. Wang and W. Hong, "A visco-poroelastic theory for polymeric gels," *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 468, no. 2148, pp. 3824–3841, 2012, doi: 10.1098/rspa.2012.0385.
[38] Y. Mao and L. Anand, "A theory for fracture of polymeric gels," *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 115, pp. 30–53, 2018, doi: 10.1016/j.jmps.2018.02.008.
[39] A. Kumar and A. Kumar, *Antimicrobial polymeric gels*, no. Cmc. Elsevier Ltd, 2018.
[40] J. Li and D. J. Mooney, "Designing hydrogels for controlled drug delivery," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 1, no. 12, pp. 1–18, 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2016.71.
[41] M. F. Akhtar, M. Hanif, and N. M. Ranjha, "Methods of synthesis of hydrogels A review," *Saudi Pharm. J.*, vol. 24, no. 5, pp. 554–559, 2016,

doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.022.
[42] S. Sharma and S. Tiwari, “A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 162, pp. 737–747, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.110.
[43] M. K. T. Vijay Kumar Thakur, *Hydrogels: Recent Advancess*. 2018.
[44] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, and Z. Shakoori, “Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications,” *Mater. Today Chem.*, vol. 8, pp. 42–55, 2018, doi: 10.1016/j.mtchem.2018.02.004.
[45] A. ULUSOY and N. DİKMEN, “Hidrojellerin Tıpta Uygulamaları,” *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, vol. 29, no. 2, pp. 129–137, 2020, doi: 10.17827/aktd.603432.
[46] M. M. Ozmen and O. Okay, “Superfast responsive ionic hydrogels: Effect of the monomer concentration,” *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, vol. 43, no. 8, pp. 1215–1225, 2006, doi: 10.1080/10601320600737393.
[47] N. Annabi *et al.*, “25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine,” *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 85–124, 2014, doi: 10.1002/adma.201303233.
[48] S. Jacob, A. B. Nair, J. Shah, N. Sreeharsha, S. Gupta, and P. Shinu, “Emerging role of hydrogels in drug delivery systems, tissue engineering and wound management,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 3, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13030357.
[49] A. Setia and P. Ahuja, *Nanohydrogels*. Elsevier Inc., 2018.
[50] Y. Yin, B. Hu, X. Yuan, L. Cai, H. Gao, and Q. Yang, “Nanogel: A versatile nano-delivery system for biomedical applications,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12030290.
[51] W. Gao, Y. Zhang, Q. Zhang, and L. Zhang, “Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 44, no. 6, pp. 2049–2061, 2016, doi: 10.1007/s10439-016-1583-9.
[52] M. Hadian, A. Rajaei, A. Mohsenifar, and M. Tabatabaei, “Encapsulation of Rosmarinus officinalis essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against Salmonella typhimurium during refrigerated storage,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 84, pp. 394–401, 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.075.
[53] M. Suhail *et al.*, “Nanogels as drug-delivery systems: A comprehensive overview,” *Ther. Deliv.*, vol. 10, no. 11, pp. 697–717, 2019, doi: 10.4155/tde-2019-0010.
[54] I. Neamtu, A. G. Rusu, A. Diaconu, L. E. Nita, and A. P. Chiriac, “Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications,” *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 539–557, 2017, doi: 10.1080/10717544.2016.1276232.
[55] S. A. Ferreira, F. M. Gama, and M. Vilanova, “Polymeric nanogels as vaccine delivery systems,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 9, no. 2, pp. 159–173, 2013, doi: 10.1016/j.nano.2012.06.001.
[56] M. Vicario-de-la-Torre and J. Forcada, “The Potential of Stimuli-Responsive

Nanogels in Drug and Active Molecule Delivery for Targeted Therapy," *Gels*, vol. 3, no. 2, p. 16, 2017, doi: 10.3390/gels3020016.
[57] C. Pathak, F. U. Vaidya, and S. M. Pandey, *Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System*. Elsevier Inc., 2019.
[58] E. Mauri, S. M. Giannitelli, M. Trombetta, and A. Rainer, "Synthesis of nanogels: Current trends and future outlook," *Gels*, vol. 7, no. 2, pp. 1–23, 2021, doi: 10.3390/gels7020036.
[59] R. Kandil and O. M. Merkel, "Recent progress of polymeric nanogels for gene delivery," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 39, pp. 11–23, 2019, doi: 10.1016/j.cocis.2019.01.005.
[60] E. S. Anooj *et al.*, "Nanogels: An overview of properties, biomedical applications, future research trends and developments," *J. Mol. Struct.*, vol. 1239, p. 130446, 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130446.
[61] F. Sabir *et al.*, "Polymeric nanogels as versatile nanoplatforms for biomedical applications," *J. Nanomater.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/1526186.
[62] D. Kesharwani, S. Mishra, S. D. Paul, R. Paliwal, and T. Satapathy, "The Functional Nanogel: An Exalted Carrier System," *J. Drug Deliv. Ther.*, vol. 9, no. s, pp. 570–582, 2019.
[63] H. Wang, Q. Chen, and S. Zhou, "Carbon-based hybrid nanogels: A synergistic nanoplatform for combined biosensing, bioimaging, and responsive drug delivery," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 11, pp. 4198–4232, 2018, doi: 10.1039/c7cs00399d.
[64] A. Jha, A. Rama, B. Ladani, N. Verma, S. Kannan, and A. Naha, "Temperature and pH-responsive nanogels as intelligent drug delivery systems: A comprehensive review," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 12, pp. 1–16, 2021, doi: 10.7324/japs.2021.1101201.
[65] X. Zhang, S. Malhotra, M. Molina, and R. Haag, "Micro- and nanogels with labile crosslinks-from synthesis to biomedical applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 7, pp. 1948–1973, 2015, doi: 10.1039/c4cs00341a.
[66] R. T. Chacko, J. Ventura, J. Zhuang, and S. Thayumanavan, "Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 9, pp. 836–851, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.02.002.
[67] M. Molina, M. Asadian-Birjand, J. Balach, J. Bergueiro, E. Miceli, and M. Calderón, "Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 17, pp. 6161–6186, 2015, doi: 10.1039/c5cs00199d.
[68] L. A. Manzanares-Guevara, A. Licea-Claverie, I. Oroz-Parra, J. Bernaldez-Sarabia, F. Diaz-Castillo, and A. F. Licea-Navarro, "Smart Nanoformulation Based on Stimuli-Responsive Nanogels and Curcumin: Promising Therapy against Colon Cancer," *ACS Omega*, vol. 5, no. 16, pp. 9171–9184, 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b04390.
[69] S. Shah, N. Rangaraj, K. Laxmikeshav, and S. Sampathi, "'Nanogels as drug carriers – Introduction, chemical aspects, release mechanisms and potential applications,'" *Int. J. Pharm.*, vol. 581, no. February, p. 119268, 2020, doi:

10.1016/j.ijpharm.2020.119268.
[70] S. Maya, B. Sarmento, A. Nair, N. S. Rejinold, S. V Nair, and R. Jayakumar, “Smart Stimuli Sensitive Nanogels in Cancer Drug Delivery and Imaging: A Review,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, pp. 7203–7218, 2013.
[71] P. N. Kendre and T. S. Satav, “Current trends and concepts in the design and development of nanogel carrier systems,” *Polym. Bull.*, vol. 76, no. 3, pp. 1595–1617, 2019, doi: 10.1007/s00289-018-2430-y.
[72] T. A. Debele, S. L. Mekuria, and H. C. Tsai, “Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 68, pp. 964–981, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.05.121.
[73] R. S. Dassanayake, S. Acharya, and N. Abidi, “Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications,” *Adv. Sorption Process Appl.*, pp. 1–24, 2019, doi: 10.5772/intechopen.80898.
[74] G. Saravanakumar, D.-G. Jo, and J. H. Park, “Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 19, pp. 3212–3229, 2012, doi: 10.2174/092986712800784658.
[75] J. K. Oh, D. I. Lee, and J. M. Park, “Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 12, pp. 1261–1282, 2009, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.08.001.
[76] L. Kumari and H. R. Badwaik, *Polysaccharide-based nanogels for drug and gene delivery*. Elsevier Ltd., 2019.
[77] I. Neamtu, A. P. Chiriac, L. E. Nita, A. Diaconu, and A. G. Rusu, *Nanogels containing polysaccharides for bioapplications*. Elsevier Inc., 2018.
[78] H. Wang, H. Deng, M. Gao, and W. Zhang, “Self-Assembled Nanogels Based on Ionic Gelation of Natural Polysaccharides for Drug Delivery,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, no. July, pp. 1–8, 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.703559.
[79] S. Pérez, P. M. Baldwin, and D. J. Gallant, *Structural Features of Starch Granules I*, Third Edit. Elsevier Inc., 2009.
[80] L. Dai, J. Zhang, and F. Cheng, “Effects of starches from different botanical sources and modification methods on physicochemical properties of starch-based edible films,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 132, pp. 897–905, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.197.
[81] L. Minden and N. Henser, “Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources,” vol. 81, pp. 1–31, 2003.
[82] J. Singh, A. Dartois, and L. Kaur, “Starch digestibility in food matrix: a review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 21, no. 4, pp. 168–180, 2010, doi: 10.1016/j.tifs.2009.12.001.
[83] R. V. Manek *et al.*, “Physical, thermal and sorption profile of starch obtained from Tacca Ieontopetaloides,” *Starch/Staerke*, vol. 57, no. 2, pp. 55–61, 2005, doi: 10.1002/star.200400341.

[84] D. Le Corre and H. Angellier-Coussy, “Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review,” *React. Funct. Polym.*, vol. 85, pp. 97–120, 2014, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2014.09.020.
[85] M. Jawaid and S. K. Swain, *Bionanocomposites for packaging applications*. 2017.
[86] K. Bashir and M. Aggarwal, “Physicochemical, structural and functional properties of native and irradiated starch: a review,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 2, pp. 513–523, 2019, doi: 10.1007/s13197-018-3530-2.
[87] M. A. Hubbe, P. Tyagi, and L. Pal, *Nanopolysaccharides in barrier composites*, vol. 15. 2019.
[88] H. Omoregie Egharevba, “Chemical Properties of Starch and Its Application in the Food Industry,” *Chem. Prop. Starch*, pp. 1–26, 2020, doi: 10.5772/intechopen.87777.
[89] A. Noman *et al.*, “Study the Classification, Chemical, Physical, hysical, Methods Modification and Starch odification and Starch Applications in Some ome Industrial Processes. Review,” *Int. J. Res. Agric. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 189–196, 2016.
[90] S. C. Alcázar-Alay and M. A. A. Meireles, “Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources,” *Food Sci. Technol.*, vol. 35, no. 2, pp. 215–236, 2015, doi: 10.1590/1678-457X.6749.
[91] M Satin, “Functional properties of starches,” *AGSI Agric.*, pp. 1–9, 1998.
[92] M. A. V. T. Garcia, C. F. Garcia, and A. A. G. Faraco, “Pharmaceutical and Biomedical Applications of Native and Modified Starch: A Review,” *Starch/Staerke*, vol. 72, no. 7–8, pp. 1–15, 2020, doi: 10.1002/star.201900270.
[93] M. Schirmer, M. Jekle, and T. Becker, “Starch gelatinization and its complexity for analysis,” *Starch/Staerke*, vol. 67, no. 1–2, pp. 30–41, 2015, doi: 10.1002/star.201400071.
[94] O. Konur, *Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology*. 2016.
[95] D. Donmez, L. Pinho, B. Patel, P. Desam, and O. H. Campanella, “Characterization of starch–water interactions and their effects on two key functional properties: starch gelatinization and retrogradation,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 39, pp. 103–109, 2021, doi: 10.1016/j.cofs.2020.12.018.
[96] M. Tako, Y. Tamaki, T. Teruya, and Y. Takeda, “The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation,” *Food Nutr. Sci.*, vol. 05, no. 03, pp. 280–291, 2014, doi: 10.4236/fns.2014.53035.
[97] J. Gonzalez-Gutierrez, P. Partal, M. Garcia-Morales, and C. Gallegos, “Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 6, pp. 2007–2013, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.025.
[98] B. R. Mose and S. M. Maranga, “A Review on Starch Based Nanocomposites for Bioplastic Materials,” *Former. part J. Mater. Sci. Eng.*, vol. 1, pp. 239–245, 2011.
[99] G. Liu, Z. Gu, Y. Hong, L. Cheng, and C. Li, “Structure, functionality and

applications of debranched starch: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 63, pp. 70–79, 2017, doi: 10.1016/j.tifs.2017.03.004.
[100] L. Ribba, N. L. Garcia, N. D'Accorso, and S. Goyanes, *Disadvantages of Starch-Based Materials, Feasible Alternatives in Order to Overcome These Limitations*. Elsevier Inc., 2017.
[101] Y. F. Chen, L. Kaur, and J. Singh, *Chemical Modification of Starch*. Elsevier Ltd, 2018.
[102] T. Ting Gu and H. Lei Xu, "Physical and Chemical Modifications in Starch Structure and Reactivity," *Waveguide Technol. Photonics Microw. Eng. [Working Title]*, p. 91238, 2020, doi: 10.5772/intechopen.91238.
[103] W. S. Org and A. O. Ashogbon, "Current Research Addressing Physical Modification of Starch from Various Botanical Sources," vol. 1, no. 1, pp. 1–7, 2018.
[104] J. N. BeMiller, *Physical Modification of Starch*. Elsevier Ltd, 2018.
[105] J. Ye *et al.*, "Properties of Starch after Extrusion: A Review," *Starch/Staerke*, vol. 70, no. 11–12, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1002/star.201700110.
[106] J. N. Bemiller and K. C. Huber, "Physical modification of food starch functionalities," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 6, pp. 19–69, 2015, doi: 10.1146/annurev-food-022814-015552.
[107] N. Masina *et al.*, "A review of the chemical modification techniques of starch," *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 1226–1236, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.094.
[108] A. D. Betancur, G. L. Chel, and H. E. Cañizares, "Acetylation and Characterization of Canavalia ensiformis Starch," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 2, pp. 378–382, 1997, doi: 10.1021/jf960272e.
[109] J. Singh, L. Kaur, and O. J. McCarthy, "Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–22, 2007, doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.02.006.
[110] A. Dura, W. Błaszczak, and C. M. Rosell, "Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments," *Carbohydr. Polym.*, vol. 101, no. 1, pp. 837–845, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.013.
[111] S. Punia, "Barley starch modifications: Physical, chemical and enzymatic - A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 144, pp. 578–585, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.088.
[112] E. Ojogbo, E. O. Ogunsona, and T. H. Mekonnen, "Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials," *Mater. Today Sustain.*, vol. 7–8, p. 100028, 2020, doi: 10.1016/j.mtsust.2019.100028.
[113] M. Yu, N. Ji, Y. Wang, L. Dai, L. Xiong, and Q. Sun, "Starch-based nanoparticles: Stimuli responsiveness, toxicity, and interactions with food components," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 20, no. 1, pp. 1075–1100, 2021, doi: 10.1111/1541-4337.12677.
[114] N. Ji *et al.*, "Fabrication and Characterization of Starch Nanohydrogels via Reverse Emulsification and Internal Gelation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66,

no. 35, 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b02601.
[115] K. Wilpiszewska, A. K. Antosik, and T. Spychaj, “Novel hydrophilic carboxymethyl starch/montmorillonite nanocomposite films,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 128, pp. 82–89, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.023.
[116] D. Binh, Pham Thi Thu Hong, Nguyen Ngoc Duy, Nguyen Thanh Duoc, and Nguyen Nguyet Dieu, “A study on size effect of carboxymethyl starch nanogel crosslinked by electron beam radiation,” *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 81, no. 7, pp. 906–912, 2012, doi: 10.1016/j.radphyschem.2011.12.016.
[117] R. Mathiyalagan *et al.*, “Protopanaxadiol aglycone ginsenoside-polyethylene glycol conjugates: synthesis, physicochemical characterizations, and in vitro studies,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 8, pp. 1803–1809, 2016, doi: 10.3109/21691401.2015.1105236.
[118] G. J. Noh, S. A. Lim, and E. S. Lee, “pH-responsive squeezing polysaccharidic nanogels for efficient docetaxel delivery,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 30, no. 8, pp. 2067–2074, 2019, doi: 10.1002/pat.4639.
[119] S. K. Kim, Y. S. Youn, K. T. Oh, and E. S. Lee, “Development of pH-responsive starch-glycol chitosan nanogels for proapoptotic (KLAKLAK)2 peptide delivery,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 32, no. 4, pp. 345–354, 2017, doi: 10.1177/0883911516676848.
[120] G. Sharma *et al.*, “Efficient removal of coomassie brilliant blue R-250 dye using starch/poly(alginic acid-cl-acrylamide) nanohydrogel,” *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 109, pp. 301–310, 2017, doi: 10.1016/j.psep.2017.04.011.
[121] T. Liang *et al.*, “The EOR mechanism and flow behaviors of high-viscosity modified starch nanogel particles in porous media,” *Soc. Pet. Eng. - SPE/IATMI Asia Pacific Oil Gas Conf. Exhib. 2019, APOG 2019*, 2019, doi: 10.2118/196414-ms.
[122] T. Liang, J. Hou, M. Qu, M. Zhao, and I. Raj, “High-viscosity α-starch nanogel particles to enhance oil recovery,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 14, pp. 8275–8285, 2020, doi: 10.1039/c9ra06938k.
[123] A. Jain, L. S. Duvvuri, S. Farah, N. Beyth, A. J. Domb, and W. Khan, “Antimicrobial Polymers,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 3, no. 12, pp. 1969–1985, 2014, doi: 10.1002/adhm.201400418.
[124] D. Sun, M. Babar Shahzad, M. Li, G. Wang, and D. Xu, “Antimicrobial materials with medical applications,” *Mater. Technol.*, vol. 30, no. B2, pp. B90–B95, 2015, doi: 10.1179/1753555714Y.0000000239.
[125] S. Duan *et al.*, “Multifunctional antimicrobial materials: From rational design to biomedical applications,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 125, p. 100887, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.PMATSCI.2021.100887.
[126] A. Muñoz-Bonilla and M. Fernández-García, “Polymeric materials with antimicrobial activity,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 281–339, 2012, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005.
[127] A. S. Veiga and J. P. Schneider, “Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection,” *Biopolymers*, vol. 100, no. 6, pp. 637–644, 2013, doi: 10.1002/bip.22412.

[128] M. W. Tibbitt and K. S. Anseth, “Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, no. 4, pp. 655–663, 2009, doi: 10.1002/bit.22361.
[129] I. Gholamali, “Stimuli-Responsive Polysaccharide Hydrogels for Biomedical Applications: a Review,” *Regen. Eng. Transl. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 91–114, 2021, doi: 10.1007/s40883-019-00134-1.
[130] X. Zhang *et al.*, “The fabrication of antibacterial hydrogels for wound healing,” *Eur. Polym. J.*, vol. 146, no. January, p. 110268, 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110268.
[131] M. J. dos S. Alves, W. D. C. Chacon, T. R. Gagliardi, A. C. Agudelo Henao, A. R. Monteiro, and G. Ayala Valencia, “Food Applications of Starch Nanomaterials: A Review,” *Starch/Staerke*, vol. 73, no. 11–12, 2021, doi: 10.1002/star.202100046.
[132] S. F. Chin, A. N. B. Romainor, S. C. Pang, and S. Lihan, “Antimicrobial starch-citrate hydrogel for potential applications as drug delivery carriers,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 54, no. July, p. 101239, 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.101239.
[133] M. E. Villanueva *et al.*, “Antimicrobial activity of starch hydrogel incorporated with copper nanoparticles .,” 2016.
[134] E. A. Bursali, S. Coskun, M. Kizil, and M. Yurdakoc, “Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activities of boron/starch/polyvinyl alcohol hydrogels,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 3, pp. 1377–1383, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.09.056.
[135] S. Batool, Z. Hussain, M. B. K. Niazi, U. Liaqat, and M. Afzal, “Biogenic synthesis of silver nanoparticles and evaluation of physical and antimicrobial properties of Ag/PVA/starch nanocomposites hydrogel membranes for wound dressing application,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 52, no. May, pp. 403–414, 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.05.016.
[136] P. Grenni, V. Ancona, and A. Barra Caracciolo, “Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review,” *Microchem. J.*, vol. 136, pp. 25–39, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2017.02.006.
[137] K. Yang *et al.*, “Antimicrobial hydrogels: Promising materials for medical application,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 2217–2263, 2018, doi: 10.2147/IJN.S154748.
[138] C. J. van Boxtel, “Antimicrobial agents,” *Drug Benefits Risks Int. Textb. Clin. Pharmacol.*, pp. 407–433, 2008, doi: 10.5005/jp/books/10546_1.
[139] F. R. Bruniera *et al.*, “The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: A review,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 19, no. 4, pp. 694–700, 2015.
[140] M. Schäfer, T. R. Schneider, and G. M. Shieldrick, “Crystal structure of vancomycin,” *Structure*, vol. 4, no. 12, pp. 1509–1515, 1996, doi: 10.1016/S0969-2126(96)00156-6.
[141] M. De Hoog, J. W. Mouton, and J. N. Van Den Anker, “Vancomycin: Pharmacokinetics and administration regimens in neonates,” *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 43, no. 7, pp. 417–440, 2004, doi: 10.2165/00003088-

200443070-00001.
[142] A. Kaur, S. Preet, V. Kumar, R. Kumar, and R. Kumar, “Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 176, no. December 2018, pp. 62–69, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.12.043.
[143] G. Dhanda, P. Sarkar, S. Samaddar, and J. Haldar, “Battle against Vancomycin-Resistant Bacteria: Recent Developments in Chemical Strategies,” *J. Med. Chem.*, vol. 62, no. 7, pp. 3184–3205, 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01093.
[144] V. Giannakaki and S. Miyakis, “Novel Antimicrobial Agents Against Multi-drug-resistant Gram-positive Bacteria: An Overview,” *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, vol. 7, no. 3, pp. 182–188, 2012, doi: 10.2174/157489112803521959.
[145] A. L. Lakes, R. Peyyala, J. L. Ebersole, D. A. Puleo, J. Z. Hilt, and T. D. Dziubla, “Synthesis and characterization of an antibacterial hydrogel containing covalently bound vancomycin,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 8, pp. 3009–3018, 2014, doi: 10.1021/bm5006323.
[146] M. Du *et al.*, “Preparation of vancomycin-loaded alginate hydrogel coating on magnesium alloy with enhanced anticorrosion and antibacterial properties,” *Thin Solid Films*, vol. 693, no. September 2019, 2020, doi: 10.1016/j.tsf.2019.137679.
[147] R. Censi *et al.*, “Thermosensitive hybrid hydrogels for the controlled release of bioactive vancomycin in the treatment of orthopaedic implant infections,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 142, no. July, pp. 322–333, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.07.006.
[148] J. Tao *et al.*, “Injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel/nanoparticle-loaded system for local delivery of vancomycin in the treatment of osteomyelitis,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 5855–5871, 2020, doi: 10.2147/IJN.S247088.
[149] W. Boot *et al.*, “A hyaluronic acid hydrogel loaded with gentamicin and vancomycin successfully eradicates chronic methicillin-resistant staphylococcus aureus orthopedic infection in a sheep model,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 65, no. 4, 2021, doi: 10.1128/AAC.01840-20.
[150] F. Ahadi, S. Khorshidi, and A. Karkhaneh, “A hydrogel/fiber scaffold based on silk fibroin/oxidized pectin with sustainable release of vancomycin hydrochloride,” *Eur. Polym. J.*, vol. 118, no. February, pp. 265–274, 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.06.001.
[151] B. S. T. Sonis *et al.*, “Sonis ST, Oster G, Fuchs H, et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol. 2001;19(8):2201-2205.,” vol. 19, no. 8, pp. 2201–2205, 2017.
[152] S. T. Sonis, “Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis,” *Oral Oncol.*, vol. 45, no. 12, pp. 1015–1020, 2009, doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.08.006.
[153] S. T. Sonis, “A biological approach to mucositis,” *J. Support. Oncol.*, vol. 2,

no. 1, pp. 21–32, 2004.
[154] S. Seiler, J. Kosse, S. Loibl, and C. Jackisch, “Adverse event management of oral mucositis in patients with breast cancer,” *Breast Care*, vol. 9, no. 4, pp. 232–237, 2014, doi: 10.1159/000366246.
[155] C. Scully, S. Sonis, and P. D. Diz, “Oral mucositis,” *Oral Dis.*, vol. 12, no. 3, pp. 229–241, 2006, doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01258.x.
[156] H.-J. Lee, J.-S. Kwon, Y.-C. Choi, and H. J. Ahn, “Methotrexate-induced Oral Mucositis,” *J. Oral Med. Pain*, vol. 40, no. 2, pp. 82–87, 2015, doi: 10.14476/jomp.2015.40.2.82.
[157] J. E. Raber-Durlacher, S. Elad, and A. Barasch, “Oral mucositis,” *Oral Oncol.*, vol. 46, no. 6, pp. 452–456, 2010, doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.012.
[158] E. Bardellini, F. Amadori, and A. Majorana, “Oral hygiene grade and quality of life in children with chemotherapy-related oral mucositis: a randomized study on the impact of a fluoride toothpaste with salivary enzymes, essential oils, proteins and colostrum extract versus a fluoride toothpaste witho,” *Int. J. Dent. Hyg.*, vol. 14, no. 4, pp. 314–319, 2016, doi: 10.1111/idh.12226.
[159] D. B. McGuire *et al.*, “Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients,” *Support. Care Cancer*, vol. 21, no. 11, pp. 3165–3177, 2013, doi: 10.1007/s00520-013-1942-0.
[160] K. K. F. Cheng, A. Molassiotis, A. M. Chang, W. C. Wai, and S. S. Cheung, “Evaluation of an oral care protocol intervention in the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in paediatric cancer patients,” *Eur. J. Cancer*, vol. 37, no. 16, pp. 2056–2063, 2001, doi: 10.1016/S0959-8049(01)00098-3.
[161] S. Ala, M. Saeedi, G. Janbabai, R. Ganji, E. Azhdari, and A. Shiva, “Efficacy of Sucralfate Mouth Wash in Prevention of 5-fluorouracil Induced Oral Mucositis: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial,” *Nutr. Cancer*, vol. 68, no. 3, pp. 456–463, 2016, doi: 10.1080/01635581.2016.1153666.
[162] J. L. Shenep *et al.*, “Efficacy of oral sucralfate suspension in prevention and treatment of chemotherapy-induced mucositis,” *J. Pediatr.*, vol. 113, no. 4, pp. 758–763, 1988, doi: 10.1016/S0022-3476(88)80397-4.
[163] F. Ayrancı, M. M. Ömezli, D. Torul, K. Kahveci, and H. Akpınar, “Ozonun Oral Cerrahide Kullanımı : Güncel Yaklaşımlar,” 2020, doi: 10.22312/sdusbed.620795.
[164] G. Roopashri, K. Jayanthi, and R. Guruprasad, “Efficacy of benzydamine hydrochloride, chlorhexidine, and povidone iodine in the treatment of oral mucositis among patients undergoing radiotherapy in head and neck malignancies: A drug trail,” *Contemp. Clin. Dent.*, vol. 2, no. 1, p. 8, 2011, doi: 10.4103/0976-237x.79292.
[165] P. Plevová, “Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: A review,” *Oral Oncol.*, vol. 35, no. 5, pp. 453–470, 1999, doi: 10.1016/S1368-8375(99)00033-0.
[166] M. Harman, N. Ovayolu, and O. Ovayolu, “The Effects of Oral Cryotherapy

on Chemotherapy-Induced Oral Mucositis in Patients Undergoing Autologous T," *J. Pak. Med. Assoc.*, vol. 69, no. 6, pp. 811–816, 2019, doi: 10.5812/ircmj.24775.
[167] E. Ernst, "Putting Evidence Into Practice®: Evidence-Based Interventions for the Management of Oral Mucos," *Focus Altern. Complement. Ther.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–2, 2007, doi: 10.1211/fact.12.1.0001.
[168] L. Wang *et al.*, "Efficacy of oral cryotherapy on oral mucositis prevention in patients with hematological malignancies undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A meta-analysis of Randomized controlled trials," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0128763.
[169] D. E. Peterson *et al.*, "Systematic review of oral cryotherapy for management of oral mucositis caused by cancer therapy," *Support. Care Cancer*, vol. 21, no. 1, pp. 327–332, 2013, doi: 10.1007/s00520-012-1562-0.
[170] M. E. P. Correa, K. Kin, F. Cheng, K. Chiang, A. Kandwal, and C. L. Loprinzi, "Systematic review of oral cryotherapy for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines," *Support. Care Cancer*, 2019.
[171] V. H. S. de Lima, O. B. de Oliveira-Neto, P. H. da Hora Sales, T. da Silva Torres, and F. J. C. de Lima, "Effectiveness of low-level laser therapy for oral mucositis prevention in patients undergoing chemoradiotherapy for the treatment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis," *Oral Oncol.*, vol. 102, no. June 2019, p. 104524, 2020, doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104524.
[172] F. Amadori, E. Bardellini, G. Conti, N. Pedrini, R. F. Schumacher, and A. Majorana, "Low-level laser therapy for treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in childhood: a randomized double-blind controlled study," *Lasers Med. Sci.*, vol. 31, no. 6, pp. 1231–1236, 2016, doi: 10.1007/s10103-016-1975-y.
[173] J. Peng *et al.*, "Low-level laser therapy in the prevention and treatment of oral mucositis: a systematic review and meta-analysis," *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, vol. 130, no. 4, pp. 387-397.e9, 2020, doi: 10.1016/j.oooo.2020.05.014.
[174] M. He, B. Zhang, N. Shen, N. Wu, and J. Sun, "A systematic review and meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) on chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric and young patients," pp. 7–17, 2018.
[175] W. J. Kostler, M. Hejna, C. Wenzel, and C. C. Zielinski, "Oral Mucositis Complicating Chemotherapy and/or Radiotherapy: Options for Prevention and Treatment," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 51, no. 5, pp. 290–315, 2001, doi: 10.3322/canjclin.51.5.290.
[176] V. Schmidt *et al.*, "Efficacy and safety of keratinocyte growth factor (palifermin) for prevention of oral mucositis in TBI-based allogeneic hematopoietic stem cell transplantation," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 53, no. 9, pp. 1188–1192, 2018, doi: 10.1038/s41409-018-0135-3.
[177] S. Kanuga, "Cryotherapy and keratinocyte growth factor may be beneficial

in preventing oral mucositis in patients with cancer, and sucralfate is effective in reducing its severity," *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 144, no. 8, pp. 928–929, 2013, doi: 10.14219/jada.archive.2013.0211.

[178] O. M. Maria, N. Eliopoulos, and T. Muanza, "Radiation-Induced Oral Mucositis," *Front. Oncol.*, vol. 7, no. MAY, 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00089.

[179] C. K. Su *et al.*, "Phase II double-blind randomized study comparing oral aloe vera versus placebo to prevent radiation-related mucositis in patients with head-and-neck neoplasms," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 60, no. 1, pp. 171–177, 2004, doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.02.012.

[180] D. P. Saunders *et al.*, "Systematic review of antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, and analgesics for the management of oral mucositis in cancer patients," *Support. Care Cancer*, vol. 21, no. 11, pp. 3191–3207, 2013, doi: 10.1007/s00520-013-1871-y.

[181] A. Kusiak, B. Alicjajereczek-Fossa, D. Cichońska, and D. Alterio, "Oncological-therapy related oral mucositis as an interdisciplinary problem—literature review," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 17, no. 7, 2020, doi: 10.3390/ijerph17072464.

[182] J. Qu, X. Zhao, Y. Liang, Y. Xu, P. X. Ma, and B. Guo, "Degradable conductive injectable hydrogels as novel antibacterial, anti-oxidant wound dressings for wound healing," *Chem. Eng. J.*, vol. 362, no. October 2018, pp. 548–560, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2019.01.028.

[183] N. Nagai *et al.*, "Hydrogel formulations incorporating drug nanocrystals enhance the therapeutic effect of rebamipide in a hamster model for oral mucositis," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 6, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12060532.

[184] W. Shao *et al.*, "In situ mucoadhesive hydrogel capturing tripeptide KPV: The anti-inflammatory, antibacterial and repairing effect on chemotherapy-induced oral mucositis," *Biomater. Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 227–242, 2022, doi: 10.1039/d1bm01466h.

[185] M. Rezazadeh *et al.*, "A mucoadhesive thermosensitive hydrogel containing erythropoietin as a potential treatment in oral mucositis: in vitro and in vivo studies," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 1226–1237, 2018, doi: 10.1007/s13346-018-0566-9.

[186] J. C. Campos, D. Cunha, D. C. Ferreira, S. Reis, and P. J. Costa, "Oromucosal precursors of in loco hydrogels for wound-dressing and drug delivery in oral mucositis: Retain, resist, and release," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 118, no. August 2020, p. 111413, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111413.

[187] R. R. Allison *et al.*, "Multi-institutional, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess the efficacy of a mucoadhesive hydrogel (MuGard) in mitigating oral mucositis symptoms in patients being treated with chemoradiation therapy for cancers of the head and neck," *Cancer*, vol. 120, no. 9, pp. 1433–1440, 2014, doi: 10.1002/cncr.28553.

[188] N. M. Shah, *Oral Mucositis as a Target for Antioxidant Biomaterial Therapy*. Elsevier Inc., 2016.

[189] S. F. Chin, S. N. A. Mohd Yazid, and S. C. Pang, “Preparation and characterization of starch nanoparticles for controlled release of curcumin,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/340121.
[190] X. Wang, H. Chen, Z. Luo, and X. Fu, “Preparation of starch nanoparticles in water in oil microemulsion system and their drug delivery properties,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 138, pp. 192–200, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.11.006.
[191] W. Q. Zhu, L. Xu, J. Ma, J. M. Ren, and Y. S. Chen, “Size Controlled Synthesis of Starch Nanoparticles by a Microemulsion Method,” *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Phys. - Chim. Sin.*, vol. 26, no. 5, pp. 1284–1290, 2010, doi: 10.3866/PKU.WHXB20100333.
[192] C. Li, S. R. Obireddy, and W. F. Lai, “Preparation and use of nanogels as carriers of drugs,” *Drug Deliv.*, vol. 28, no. 1, pp. 1594–1602, 2021, doi: 10.1080/10717544.2021.1955042.
[193] M. R. C. Marques, R. Loebenberg, and M. Almukainzi, “Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing,” *Dissolution Technol.*, vol. 18, no. 3, pp. 15–28, 2011, doi: 10.14227/DT180311P15.
[194] WIKLER and MA, “Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically : approved standard,” *CLSI*, vol. 26, pp. M7-A7, 2006.
[195] R. M. Amir, F. M. Anjum, M. I. Khan, M. R. Khan, I. Pasha, and M. Nadeem, “Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1018–1023, 2013, doi: 10.1007/s13197-011-0424-y.
[196] I. Dankar, A. Haddarah, F. E. L. Omar, M. Pujolà, and F. Sepulcre, “Characterization of food additive-potato starch complexes by FTIR and X-ray diffraction,” *Food Chem.*, vol. 260, no. December 2017, pp. 7–12, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.138.
[197] V A Sajeevkumar, “The Influence of Bound Water on the FTIR Characteristics of Starch and Starch Nanocrystals Obtained from Selected Natural Sources,” *Starch - Stärke*, vol. 2, no. January, p. 6, 2018.
[198] A. Korkut and K. Kahraman, “Nişasta Nanokristali Üretimi ve Karakterizasyonu,” *Eur. J. Sci. Technol.*, no. 17, pp. 471–476, 2019, doi: 10.31590/ejosat.626229.
[199] K. Dome, E. Podgorbunskikh, A. Bychkov, and O. Lomovsky, “Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment,” *Polymers (Basel).*, vol. 12, no. 3, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/polym12030641.
[200] M. K. Remanan and F. Zhu, “Encapsulation of rutin using quinoa and maize starch nanoparticles,” *Food Chem.*, vol. 353, p. 128534, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128534.
[201] M. B. Cardoso, J. L. Putaux, D. Samios, and N. P. da Silveira, “Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 70, no. 2, pp. 160–165, 2007, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.03.014.

[202] A. Hebeish, M. H. El-Rafie, M. A. EL-Sheikh, and M. E. El-Naggar, “Ultra-Fine Characteristics of Starch Nanoparticles Prepared Using Native Starch With and Without Surfactant,” *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 24, no. 3, pp. 515–524, 2014, doi: 10.1007/s10904-013-0004-x.
[203] X. Wu, Y. Chang, Y. Fu, L. Ren, J. Tong, and J. Zhou, “Effects of non-solvent and starch solution on formation of starch nanoparticles by nanoprecipitation,” *Starch/Staerke*, vol. 68, no. 3–4, pp. 258–263, 2016, doi: 10.1002/star.201500269.
[204] A. M. Shi, D. Li, L. J. Wang, B. Z. Li, and B. Adhikari, “Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and miniemulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and stability,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 4, pp. 1604–1610, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.011.
[205] Y. Farrag *et al.*, “Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 426–433, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.134.
[206] Y. Xu and Y. Du, “Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 250, no. 1, pp. 215–226, 2003, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00548-3.
[207] S. A. Papadimitriou, D. S. Achilias, and D. N. Bikiaris, “Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly(glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems,” *Int. J. Pharm.*, vol. 430, no. 1–2, pp. 318–327, 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.004.
[208] D. Song, Y. S. Thio, and Y. Deng, “Starch nanoparticle formation via reactive extrusion and related mechanism study,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, no. 1, pp. 208–214, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.02.016.
[209] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential - What they are and what they are not?,” *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
[210] A. Kardos, T. Gilányi, and I. Varga, “How small can poly(N-isopropylacrylamide) nanogels be prepared by controlling the size with surfactant?,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 557, pp. 793–806, 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2019.09.053.
[211] K. Prabhakar, S. M. Afzal, G. Surender, and V. Kishan, “Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 3, no. 5, pp. 345–353, 2013, doi: 10.1016/j.apsb.2013.08.001.
[212] V. Zarghami, M. Ghorbani, K. P. Bagheri, and M. A. Shokrgozar, “In vitro bactericidal and drug release properties of vancomycin-amino surface functionalized bioactive glass nanoparticles,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 241, p. 122423, 2020, doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122423.
[213] X. Lin, S. Sun, B. Wang, B. Zheng, and Z. Guo, “Structural and physicochemical properties of lotus seed starch nanoparticles,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 157, pp. 240–246, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.155.
[214] A. Das and N. Sit, “Modification of Taro Starch and Starch Nanoparticles by

Various Physical Methods and their Characterization," *Starch/Staerke*, vol. 73, no. 5–6, pp. 1–8, 2021, doi: 10.1002/star.202000227.
[215] M. Ziaee, S. Moharramipour, and A. Mohsenifar, "MA-chitosan nanogel loaded with Cuminum cyminum essential oil for efficient management of two stored product beetle pests," *J. Pest Sci. (2004).*, vol. 87, no. 4, pp. 691–699, 2014, doi: 10.1007/s10340-014-0590-6.
[216] D. Liu, Q. Wu, H. Chen, and P. R. Chang, "Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro- to nanometer," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 339, no. 1, pp. 117–124, 2009, doi: 10.1016/j.jcis.2009.07.035.
[217] S. Hoffmann, C. Gorzelanny, B. Moerschbacher, and F. M. Goycoolea, "Physicochemical characterization of FRET-labelled chitosan nanocapsules and model degradation studies," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 10, 2018, doi: 10.3390/nano8100846.

EKLER

Tablo Ek 1. Nişasta nanojellerini optimize etmek için kullanılan farklı yöntemler, polimer konsantrasyonları, çapraz bağlayıcılar, organik fazlar, antibakteriyel ajanlar ile değişen ultrasonikasyon süresi ve gücü.

Polimer	Çapraz Bağlayıcı	Organik Faz	Sürfaktan	Antimikrobiyal Ajan	Yöntem	Çöktürme	Yıkama	Boyut (nm)	PDI
%1 w/v nişasta	%2 w/v PEGDE	Ayçiçek Yağı	%0,8 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	6000 rpm /15 dk	Etanol /10 dk	-	-
%2 w/v nişasta	%2 w/v PEGDE	Ayçiçek Yağı	%1 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	4000 rpm /20 dk	Etanol /10 dk	-	-
%0,5 w/v nişasta	%2,5 w/v PEGDE	Ayçiçek Yağı	%1,25 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 3 dk/50 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	-	-
%4 w/v nişasta	%2 w/v PEGDE	Hekzan	%2 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	-	-
%1 w/v nişasta	%2 w/v Epiklorohidrin	Hekzan	%1 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	-	-
%1 w/v nişasta	%1 w/v Epiklorohidrin	Hekzan	%1 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	-	-
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Siklohekzan	%1 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	330	-
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Siklohekzan	%2 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 3 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	715	-

%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Siklohekzan	%2 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 3 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	569	-
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Siklohekzan	%2 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 3 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Aseton /10 dk	980	-
%2 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Siklohekzan	%2 w/v Tween 80	-	Ultrasonikasyon 3 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	4120	-
%2 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Siklohekzan	%4 w/v Span 80	-	Ultrasonikasyon 3 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	2341	-
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Siklohekzan	%2 w/v Span 80	-	Ultrasonikasyon 2 dk/75 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	1522	-
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	-	-	Nanoçöktürme	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	2352	-
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%0,5 w/v Span 80	-	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	535	-
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%3 w/v Span 80	-	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	180	-
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	-	Nanoçöktürme	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	214	-
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	-	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	123	-
%0,5 w/v nişasta	%0,25 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	-	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	107	-
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	%0,5 v/v Kekik Yağı	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	116	0,167

%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	%1,5 v/v Kekik Yağı	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	152	0,198
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	%1 v/v Kekik Yağı	Nanoçöktürme	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	179	0,180
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	%1 v/v Lavanta Yağı	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	147	0,162
%1 w/v nişasta	%0,5 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	%2 v/v Lavanta Yağı	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	189	0,162
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Span 80	%1 w/v Timol	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	129	0,176
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%1 w/v Timol	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	72	0,276
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%3 w/v Timol	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	109	0,2
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%1 w/v Timol	Nanoçöktürme	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	270	0,2
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%0,1 w/v Kateşin	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	110	0,265
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%0,1 w/v Kateşin (70°C)	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	85	0,335
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%0,2 w/v Vankomisin	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	84	0,279
%1 w/v nişasta	%1 w/v PEGDE	Etanol	%1 w/v Tween 80	%0,4 w/v Vankomisin	Ultrasonikasyon 5 dk/100 W	6000 rpm /30 dk	Etanol /10 dk	80	0,294

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Bildiriler

[1] Saracoglu P., Topuzoğulları M., Özmen M. M. "Nişasta-Polietilen Glikol Diglisidil Eter Nanojellerinin Sentezi ve Karakterizasyonu", 33.Ulusal Kimya Kongresi, 7-9 Ekim 2021, Online.

Makaleler

[1] Saracoglu P., Özmen M. M., "Starch Based Nanogels: From Synthesis To Miscellaneous Applications" Starch-Stärke 2021, DOI: 10.1002/star.202100011.