



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**POLİ(LAMİNARİN) PARTİKÜLLERİNİN  
HAZIRLANMASI VE BİYOMEDİKAL  
UYGULAMALARININ İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MEHMET CAN**

**Tez Danışmanı**

**PROF. DR. NURETTİN ŞAHİNER**

**ÇANAKKALE – 2022**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**POLİ(LAMİNARİN) PARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI  
VE BİYOMEDİKAL UYGULAMALARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET CAN

Tez Danışmanı

PROF. DR. NURETTİN ŞAHİNER

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2020-3258

ÇANAKKALE – 2022



T.C.  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



Mehmet CAN tarafından Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER yönetiminde hazırlanan ve **28/01/2022** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Poli(Laminarin) Partiküllerinin Hazırlanması ve Biyomedikal Uygulamalarının İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER

.....

(Danışman)

Prof. Dr. Selhattin YILMAZ

.....

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

.....

Tez No : 10448889

Tez Savunma Tarihi : 28/01/2022

.....

Doç. Dr. Yener PAZARCIK

Enstitü Müdürü

...../...../2022

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Mehmet CAN

28/01/2022



## ÖZET

# POLİ(LAMİNARİN) PARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE BİYOMEDİKAL UYGULAMALARININ İNCELENMESİ

Mehmet CAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER

28/01/2022, 77

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, *Laminaria digitata* ve *Eisenia bicyclis* kaynaklı laminarin polisakkariti (*LD-LAM* ve *EB-LAM*) kullanılarak, DVS, TMPGDE ve STPP çapraz bağlayıcıları ile mikro ve nano boyutlarda partiküller sentezlenmiştir (*LD-LAM* ve *EB-LAM* partikülleri). Ters misel ortamında hazırlanan DVS ile çapraz bağlı *LD-LAM* partikülleri (*LD-LAM-1*) klorosülfonik asit ile modifiye edilmiştir (*LD-LAM-2*). *EB-LAM* molekülünden DVS, TMPGDE ve STPP çapraz bağlayıcıları ile ters misel mikroemülsiyon tekniği kullanılarak mikro/nano boyutlarda partiküller hazırlanmıştır (*EB-LAM-1*, -2 ve -3 partikülleri). Ayrıca *EB-LAM* polisakkaritinden yüzey aktif madde (sürfektan) kullanmadan nanopartikül hazırlamak için değişik oranlarda DVS ve TMPGDE çapraz bağlayıcıları ile izooktan-su emülsiyon ortamı kullanılarak sırasıyla *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partikülleri sentezlenmiştir. SEM analizleri sonucunda sürfektan içeren ortamda hazırlanan LAM partiküllerinin 0,1-15 µm arasında, sürfektan içermeyen ortamda sentezlenen partiküllerin ise 20-800 nm boyut aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Zeta potansiyeli ölçümleri sonucunda farklı çapraz bağlayıcılar ve sentez yöntemleri ile hazırlanan LAM esaslı mikro ve nanopartiküllerinin yüzey yüklerinin -11,5±0,1 mV ile -26,3±0,5 mV arasında olduğu tespit edilmiştir. LAM esaslı partiküllerin biyomedikal malzemeler olarak kullanım potansiyellerini belirlemek için biyoyumluluk (sitotoksosite) ve kan uyumluluk (hemoliz ve kan pıhtılaşma) özellikleri araştırılmıştır. *LD-LAM-1* partikülleri ve bunların modifiye edilmiş formları 2,0 mg/mL derişime kadar hemolitik ve kan pıhtılaştırıcı özellik göstermemiştir. Ayrıca, *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin 1000 µg/mL derişime kadar L929 fibroblast hücrelerine karşı toksik etkilerinin olmadığı partiküllerin pH

7,4 PBS ortamında 120 saatte yaklaşık %50'sinin bozunduğu bulunmuştur. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, literatürde ilk kez tek basamakta LAM polisakkaritinin doğrudan çapraz bağlanması ile mikro ve nano partiküllerinin sentezi ve ayrıca bu partiküllerin kolayca modifiye edilebilirliği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Laminarin, Biyopolimer, Mikro/nano partikül, Mikro/nano jel, Yüzey Modifikasyonu, Biyoyumlu





## ABSTRACT

### PREPARATION OF POLI (LAMINARIN) PARTICLES AND INVESTIGATION OF THEIR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Mehmet CAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Chemistry Science

Advisor: Prof. Dr. Nurettin Şahiner

28/01/2022, 77

In the studies conducted within the scope of this thesis, micro- and nano-sized particles (*LD-LAM* and *EB-LAM* particles) were synthesized from laminarin polysaccharides originated from *Laminaria digitata* and *Eisenia bicyclis* (*LD-LAM* and *EB-LAM*) employing DVS, TMPGDE, and STPP cross-linkers. The DVS-crosslinked *LD-LAM* particles (*LD-LAM-1*) synthesized in reverse micelle microemulsion system were modified with chlorosulfonic acid. Additionally, micro- and nano-sized particles were prepared from DVS, TMPGDE and STPP crosslinkers via reverse micelle microemulsion technique (*EB-LAM-1*, -2, -3 particles). Moreover, in order to prepare nanoparticles of *EB-LAM* polysaccharide without surfactant, DVS and TMPGDE were used to obtain *EB-LAM-1* and *EB-LAM-2* particles in isooctane-water emulsion medium. Upon SEM analysis of the *LD-LAM* and *EB-LAM* particles prepared in the reverse micelle microemulsion medium, the particles were found to range in 0,1-15 µm sizes. The *EB-LAM-1* ve *EB-LAM-2* particles prepared in surfactant-free microemulsion were found to reside within 20-800 nm sizes. Zeta potential measurements of the LAM-based particles revealed the surface charge of particles ranged within -11,5±0,1 mV ile -26,3±0,5 mV. In order to determine potential use of the LAM-based micro and nano particles as biomedical materials their biocompatibility (cytotoxicity) and blood compatibility (hemolysis and blood coagulation) behaviors were investigated. *LD-LAM-1* particles and their modified forms found not to exhibit hemolytic and blood coagulating effects up to 2.0 mg /mL concentration. Besides, it was found that *EB-LAM-1.X* and *EB-LAM-2.X* nanoparticles were not found toxic against L929 fibroblast cells up to 1000 µg/mL concentration, and approximately 50% of the particles were found

to degrade in 120 hours in the pH 7.4 PBS medium. The studies conducted within the scope of this thesis report synthesis of the micro and nanoparticles for the first time in the literature via direct crosslinking of LAM in a single step as well as their facile modification.

**Keywords:** Laminarin, Biopolymer, Micro/nano particle, Micro/nanogel, Surface modification, Biocompatible



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
BİRİNCİ BÖLÜM	
GİRİŞ	1
İKİNCİ BÖLÜM	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Polisakkaritlerin biyolojik önemi ve biyomedikal uygulamalardaki yeri .....	5
2.2. Laminarin polisakkaritinin özellikleri ve biyomedikal uygulamaları.....	9
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	13
MATERYAL VE YÖNTEM	
3.1. Kullanılan materyaller.....	13
3.2 Mikro/nano boyutlu LAM esaslı partiküllerinin ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu ile sentezi.....	14
3.2.1 DVS çapraz bağlı LD-LAM mikro/nano partikülleri .....	14
3.2.2 EB-LAM mikro/nano partikülleri.....	15
3.3. EB-LAM esaslı nanopartiküllerin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezi.....	15

3.4. <i>LD-LAM-1</i> mikro/nano partiküllerinin modifikasyonu.....	16
3.5. LAM esaslı partiküllerin karakterizasyonu.....	17
3.6. <i>LD-LAM</i> esaslı mikro/nano partiküllerin kan uyumluluk testleri.....	18
3.6.1 Hemoliz testi .....	19
3.6.2 Kan pıhtılaşma testi.....	19
3.7. <i>EB-LAM</i> esaslı nanopartiküllerin biyoyumluluk testleri.....	20
3.8. <i>EB-LAM</i> esaslı nanopartiküllerin hidrolitik bozunma testleri.....	21
3.8.1 Fenol-sülfürik asit metodu ile toplam şeker miktarı tayini.....	21

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. LAM esaslı partiküllerin sentezi ve karakterizasyonu.....	22
4.1.1 LAM esaslı partiküllerin ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu.....	23
<i>LD-LAM</i> mikro/nano partiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu.....	23
<i>LD-LAM-1</i> mikro/nano partiküllerinin modifikasyonu.....	31
<i>EB-LAM</i> mikro/nano partiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu.....	36
4.1.2 <i>EB-LAM</i> esaslı nanopartiküllerinin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu.....	41
4.2. LAM esaslı partiküllerin biyomedikal uygulamaları.....	51
4.2.1 <i>LD-LAM</i> esaslı mikro/nano partiküllerin kan uyumluluk çalışmaları.....	51
4.2.2 <i>EB-LAM</i> esaslı nanopartiküllerin biyoyumluluk çalışmaları.....	53
4.2.3 <i>EB-LAM</i> esaslı nanopartiküllerin hidrolitik bozunma çalışmaları.....	55

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA .....	63
EKLER .....	I
EK 1. ETİK KURUL İZİNİ.....	I
ÖZGEÇMİŞ .....	II

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
µs	Mikrosiemens
3B	3 boyutlu
AOT	Sodyum bis(2-etilheksil) sülfosüksinat
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum iyonu
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CSA	Klorosülfonik asit
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DVS	Divinil sülfon
EB-LAM	<i>Eisenia bicyclis</i> kaynaklı laminarin
EB-LAM-1	Ters misel mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %25 DVS çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-1.1	İzooktan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %25 DVS çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-1.2	İzooktan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %50 DVS çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-1.3	İzooktan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %100 DVS çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-1.4	Siklohekzan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %100 DVS çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-1.X	Sülfektansız mikroemülsiyon ortamında sentezlenen DVS çapraz bağlı LAM partikülleri

EB-LAM-2	Ters misel mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %25 TMPGDE çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-2.1	İzooktan-su ortamında sentezlenen %25 TMPGDE çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-2.2	İzooktan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %50 TMPGDE çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-2.3	İzooktan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %100 TMPGDE çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-2.4	Siklohekzan-su mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %25 TMPGDE çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-2.X	Süfektansız mikroemülsiyon ortamında sentezlenen TMPGDE çapraz bağlı LAM partikülleri
EB-LAM-3	Ters misel mikroemülsiyon ortamında sentezlenen %25 STPP çapraz bağlı LAM partikülleri
ECH	Epiklorohidrin
ECM	Ekstra selüler matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi ışımalı spektroskopisi
g	Gram
GDE	Gliserol diglisidil eter
GFP	Yeşil floresan protein
h/h	hacim/hacim
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
kV	Kilovolt
LAM	Laminarin
LD-LAM	<i>Laminaria digitata</i> kaynaklı laminarin

LD-LAM-1	%100 DVS apraz bağlı <i>Laminaria digitata</i> kaynaklı LAM partikülleri
LD-LAM-2	CSA ile modifiye edilmiş LD-LAM-1 partikülleri
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
mW	Milivat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
NSAID	Steroid olmayan antienflamatuvar ilaç
-OH	Hidroksil
PEI	Polietilenimin
RBC	Kırmızı kan h�resi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
-SO <sub>3</sub>	Sülfit
STMP	Sodyum trimetafosfat
STPP	Sodyum tripolifosfat
TGA	Termogravimetrik analiz
TMPGDE	Trimetilolpropan triglisidil eter
UV-Vis	Morötesi-Görünür bölge
ι	iota
κ	kappa
λ	lambda

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	<i>LD-LAM</i> esaslı partiküllerinin zeta potansiyeli değerleri ve DLS ölçümleri ile belirlenen ortalama hidrodinamik çapları	27
<b>Tablo 2</b>	<i>LD-LAM</i> , <i>LD-LAM-1</i> ve <i>LD-LAM-2</i> partiküllerinin kütlece elementel bileşimleri	28
<b>Tablo 3</b>	<i>LD-LAM</i> , <i>LD-LAM-1</i> ve <i>LD-LAM-2</i> partiküllerinin termal bozunma değerleri	35
<b>Tablo 4</b>	<i>EB-LAM</i> esaslı partiküllerinin zeta potansiyeli değerleri ve DLS ölçümleri ile belirlenen ortalama hidrodinamik çapları	38
<b>Tablo 5</b>	<i>EB-LAM-1.X</i> ve <i>EB-LAM-2.X</i> partiküllerinin zeta potansiyeli değerleri ve DLS ölçümleri ile belirlenen ortalama hidrodinamik çapları	46



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	LAM polisakkaritinin kimyasal yapısı ve uç gruplarına göre sınıflandırılması	10
Şekil 2	(a) AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon sisteminin şematik gösterimi ve (b) Oxa-Michael katılma reaksiyonu ile partikül oluşumunun mekanizması	24
Şekil 3	<i>LD-LAM-1</i> partiküllerinin (a) optik mikroskop ve (b) SEM görüntüleri	25
Şekil 4	<i>LD-LAM</i> molekülü ve <i>LD-LAM-1</i> partiküllerinin (a) FT-IR spektrumları ve (b) TGA grafikleri	30
Şekil 5	<i>LD-LAM-1</i> partiküllerinin CSA molekülü ile modifikasyonunun şematik gösterimi	32
Şekil 6	<i>LD-LAM-1</i> ve <i>LD-LAM-2</i> partiküllerinin (a) FT-IR spektrumları ve (b) TGA grafikleri	34
Şekil 7	<i>EB-LAM-1</i> , <i>EB-LAM-2</i> ve <i>EB-LAM-3</i> partiküllerinin AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezinin şematik olarak gösterimi	36
Şekil 8	(a) <i>EB-LAM-1</i> , (b) <i>EB-LAM-2</i> ve (c) <i>EB-LAM-3</i> partiküllerinin optik mikroskop ve SEM görüntüleri	37
Şekil 9	<i>EB-LAM</i> molekülü, <i>EB-LAM-1</i> , <i>EB-LAM-2</i> ve <i>EB-LAM-3</i> partiküllerinin (a) farklı pH ortamlarındaki zeta potansiyeli değerleri, (b) FT-IR spektrumları ve (c) TGA termogramları	40
Şekil 10	<i>EB-LAM-1.X</i> ve <i>EB-LAM-2.X</i> nanopartiküllerinin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon ortamında sentezinin şematik gösterimi	42
Şekil 11	DVS ile çapraz bağlı (a) <i>EB-LAM-1.1</i> , (b) <i>EB-LAM-1.2</i> ve (c) <i>EB-LAM-1.3</i> nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	43
Şekil 12	TMPGDE ile çapraz bağlı (a) <i>EB-LAM-2.1</i> , (b) <i>EB-LAM-2.2</i> ve (c) <i>EB-LAM-2.3</i> nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	44
Şekil 13	Sikloheksan-su emülsiyon ortamında hazırlanan (a) DVS ile çapraz bağlı <i>EB-LAM-1.4</i> ve (b) TMPGDE ile çapraz bağlı <i>EB-LAM-2.4</i> nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	45

<b>Şekil 14</b>	(a) <i>EB-LAM-1.X</i> ve (b) <i>EB-LAM-2.X</i> nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları	48
<b>Şekil 15</b>	DVS ile çapraz bağlı <i>EB-LAM-1.X</i> ve (b) TMPGDE ile çapraz bağlı <i>EB-LAM-2.X</i> nanopartiküllerinin TGA termogramları	50
<b>Şekil 16</b>	<i>LD-LAM-1</i> ve <i>LD-LAM-2</i> partiküllerinin (a) hemoliz ve (b) kan pıhtılaşma testleri ile belirlenen kan uyumlulukları	52
<b>Şekil 17</b>	<i>EB-LAM</i> polimeri, <i>EB-LAM-1.1,-1.3</i> ve <i>EB-LAM-2.1, -2.3</i> partiküllerinin 1000 µg/mL derişimdeki L929 fibroblast hücreleri ile 24 saat etkileşiminin ardından çekilen dijital kamera görüntüleri	54
<b>Şekil 18</b>	<i>EB-LAM</i> polimeri, <i>EB-LAM-1.1,-1.3</i> ve <i>EB-LAM-2.1, -2.3</i> partiküllerinin L929 fibroblast hücreleri ile 24 saat etkileşiminin ardından MTT testi ile belirlenen derişime karşı %hücre canlılığı değerleri	55
<b>Şekil 19</b>	Şekil 19. (a) <i>EB-LAM-1.X</i> ve (b) <i>EB-LAM-2.X</i> partiküllerinin pH 7,4 PBS tamponunda zamana bağlı % hidrolitik bozunma değerleri	57

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Herman Staudinger, 102 yıl önce yaptığı “Polimerizasyon Üzerine” (“Über Polymerisation”) (Staudinger, 1920) isimli çalışması ile polimer biliminin gelişmesinde öncül olarak kabul edilen bir çağın başlatıcısı olarak kabul görmüştür (Mülhaupt, 2004). O yıllardan günümüze kadar geçen sürede gelişen nanobilim ve teknoloji, doğal ve sentetik polimerlerden çok çeşitli özelliklere sahip polimerik yapıların sentezlenmesine ve bu malzemelerin enerji, elektronik, gıda, ilaç ve biyomedikal alanlar gibi birçok endüstride yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır (Can vd., 2020b).

Çapraz bağlı polimerik ağ yapıların en temel örneklerinden biri olan hidrojeller, polimerik veya monomerik öncüllerin fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanması ile oluşan üç boyutlu (3B) ağ yapılarıdır. Sentezlenme yöntemlerine göre nano, mikro ve makro boyutlarda hazırlanabilen hidrojeller, esnek ve yumuşak yapıli malzemelerdir. Ayrıca, içerdikleri fonksiyonel gruplara göre su veya uygun çözücüler içerisinde kendi ağırlıklarının binlerce katı oranında çözücüü tutarak şişebilen, birim hacim başına çok yüksek yüzey alanına sahip polimerlerdir (Sahiner, 2013). Hidrojeller, sentezlendikleri öncül malzemelere bağlı olarak ışık, elektrik, manyetik alan, pH ve sıcaklık gibi çevresel uyarılara karşı duyarlı olarak hazırlanabilmektedir (Can vd., 2020b; Suner vd., 2018; Zhang vd., 2019). Ayrıca, hidrojel yüzeyindeki fonksiyonel grupların çeşitli moleküller ile kolayca modifiye edilebilmesi, hidrojellerin yüzey özelliklerinin kullanımı amaçlanan uygulamalara göre tasarlanabilmesine imkan sağlar (Camci-Unal vd., 2010; Haagdoorens vd., 2019; Ashtiani vd., 2020; Lewandowska-Lańcucka vd., 2018; Li vd., 2011; Plunkett vd., 2003). Hidrojeller, sentezinde kullanılan öncül moleküllerin zenginliği ve modifiye edilebilmeleri sayesinde yüzey özellikleri, boyut, gözenek boyutu, şişme ve bozunma gibi kullanım amacına göre dizayn edilebilir. Bu üstün özellikleri sayesinde hidrojeller, endüstriyel alanda zararlı metal iyonlarının ve boyaların ayırımı (Kong vd., 2019; Shalla vd., 2019), atık su ve doğal kaynak sularının temizlenmesi (Tran vd., 2018), biyomedikal alanda ise hücre ve dokuların yenilenmesi (Maiz-Fernández vd., 2020; Ng vd., 2020), yara kaplama malzemesi (Tavakoli ve Klar, 2020), implant (Soler-Botija vd., 2014), biyosensor (Tavakoli ve Tang, 2017), yapay kas (Park ve Kim, 2020) ve organların geliştirilmesi (Wang vd., 2017), enzim immobilizasyonu (Dwamena vd., 2020), protein, RNA, gen ve ilaç gibi biyoaktif

moleküllerin taşıma/salın sistemleri (Li vd., 2016; Pertici vd., 2019) gibi birçok uygulamada kullanım potansiyeline sahip çok fonksiyonlu materyallerdir.

Mikropartiküller ve nanopartiküller olarak da adlandırılan mikrometre ve nanometre boyutlardaki hidrojellerin küçük boyutlarının sağladığı avantajlarından dolayı vücut içi uygulamalarda kullanımı tercih edilmektedir (Auwal vd., 2017; Ma vd., 2017). Mikropartiküller ve nanopartiküller çeşitli kimyasal yapı ve özelliklerdeki ilaç veya biyoaktif moleküller için koruyucu işlevi görerek bu moleküllerin vücut içinde oksidatif ve enzimsel olarak hızlı bir şekilde metabolize edilmelerini azaltır/geciktirir. Böylece taşıdıkları aktif moleküllerin daha yüksek plazma derişimlerine erişmesine ve dolayısıyla biyoyararlanımlarının artırılmasına olanak sağlarlar (Vinogradov, 2006; Yin vd., 2020). Ayrıca, mikro/nano partiküller, ilaçların sistemik yan etkilerini azaltma, çözünürlüklerini artırma gibi avantajlar sunmaktadır (Eckmann vd., 2014; Large vd., 2019; Nguyen vd., 2011; Smeets ve Hoare, 2013; Wanakule vd., 2012). Bunlara ek olarak, küçük molekül, peptit, antikor, aptamer, lektin gibi ajanlar ile fonksiyonlaştırılabilmesi ile çeşitli doku, hücre ve patolojilere spesifik, hedeflenmiş ve kontrollü ilaç salımı sağlayabilmektedir (Blackburn vd., 2009; Eckmann vd., 2014; Large vd., 2019; Nguyen vd., 2011; Ryu vd., 2012; Smeets ve Hoare, 2013; Wanakule vd., 2012).

İlaçların yan etkilerini azaltan polimerik mikro ve nanopartiküllerin kendilerinin de uyumlu, toksik etki göstermeyen ve biyobozunur özellikte olması bu yapıların *in vivo* olarak kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır (Can vd., 2020b; Can ve Sahiner, 2021; Kang vd., 2015; Kilcoyne ve Joshi, 2007; Seidi vd., 2018; Willner ve Willner, 2010). Biyoyumlu, biyobozunur, doğal ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilen mono, oligo ve polisakaritler, amino asitler, proteinler, nükleik asitler, polifenolik bileşikler gibi biyomoleküllerin bozunma/biyotransformasyon ürünleri de immunojenik olmayıp biyoyumlu olacağından bu yapılardan hazırlanan mikro ve nanopartiküller sentetik veya biyobozunmaz muadillerine kıyasla biyomedikal alanda oldukça fazla ilgi görmektedir (Shiraishi ve Yokoyama, 2019; Suner vd., 2018).

Biyopolimerlerin biyoyumlu ve biyobozunur özelliklerine ilaveten sahip olabilecekleri antioksidan, antipatojenik, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antikarsinojenik, antiapoptotik gibi daha birçok biyoyararlı özelliklere sahip olabilirler. Bu özelliklerin

biyopolimerlerden üretilen ilaç taşıyıcı sistemlere aktarılması ile taşıdıkları molekülün terapötik özelliklerine ek olarak destekleyici sinerjistik etki de gösterebilen oldukça etkili farmakolojik malzemeler üretilir (Can vd., 2020b; Williams, 2008; Willner ve Willner, 2010). Buna ilaveten, biyopolimerik moleküller kolay işlenebilir olmalarından dolayı çeşitli kimyasal modifikasyonlar ile çevresel tepkilere duyarlı fonksiyonel malzemeler elde edilebilmektedir (Oh vd., 2008; Suner vd., 2018). Sentetik polimerlerin doğal polimerler ile konjugasyon, kaplama gibi modifikasyon teknikleri kullanılarak biyoyumlulukları artırılmaktadır (Balas vd., 2018).

Bu tez çalışmasının temel motivasyonu birçok biyoaktiviteye sahip, doğal bir polisakkarit olan laminarinden üç boyutlu ağ yapıya sahip mikro ve nano partiküllerin sentezlenmesi, karakterizasyonu ve bu partiküllerin kimyasal modifikasyonu ile biyomedikal alanda kullanılacak potansiyel ilaç salım sistemleri olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Dolayısıyla bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, iki farklı organizmadan (*Laminaria digitata*, LD-LAM ve *Eisenia bicyclis*, EB-LAM) elde edilen laminarin (LAM) polisakkariti ile divinil sülfon (DVS), trimetilolpropan triglisidil eter (TMPGDE) ve sodyum tripolifosfat (STTP) gibi çapraz bağlayıcılar kullanılarak nano ve mikrometre boyutlarında partiküller sentezlenmiştir (LD-LAM ve EB-LAM partikülleri). LAM esaslı çapraz bağlı mikro/nano partiküllerin sentezi ters misel mikro emülsiyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, DVS ve TMPGDE çapraz bağlayıcıları kullanılarak EB-LAM polimerinden yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile nanopartiküller sentezlenmiştir. LD-LAM esaslı mikro/nano partiküller basit filtrasyon yöntemleri ile ayrılmıştır. Böylece polimerizasyon yöntemi, sentez parametrelerinin optimizasyonu ve basit filtrasyon yöntemleri ile kontrol edilebilir boyut dağılımına sahip polimerik partiküllerin hazırlanabilirliği gösterilmiştir. LAM esaslı mikro/nano partiküllerin sentezi tek adımda gerçekleştirilmiştir. Literatürde LAM polisakkaritlerinden sentez öncesi modifikasyon yapılmaksızın tek basamakta polimerik partiküllerin sentezine rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında belirtilen yöntemler ve çapraz bağlayıcılar ile hazırlanan mikro/nano partiküllerin sentezi ilk kez rapor edilmektedir. Hazırlanan LD-LAM esaslı nano ve mikropartiküller klorosülfonik asit (CSA) ile modifiye edilmiş ve partiküllerin tek basamakta modifiye edilebilirliği gösterilmiştir. Mikro/nano partiküllerin geniş çapta fiziksel ve yapısal karakterizasyonlarının yapılması bu malzemelerin biyomedikal uygulamalardaki avantaj ve limitlerinin belirlenmesinde, dolayısı ile bu alanlarda kullanım

potansiyellerinin genişletilmesi ve ölçeklendirilmesinde büyük öneme sahiptir (Su vd., 2018). Farklı çapraz bağlayıcı ve yöntemler ile hazırlanan modifiye edilmiş ve edilmemiş LAM esaslı mikro/nano partiküllerin morfoljik analizleri optik mikroskop ve alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile hidrodinamik partikül çapı dinamik ışık saçılımı (DLS) ile, yüzey yükleri zeta potansiyel ölçümleri ile, kimyasal bileşim ve yapıdaki fonksiyonel grupların tayini elemental analiz ve Fourier dönüşümlü kızılötesi ışımalı spektroskopisi (FT-IR) ile ve termal kararlılıkları ise termogravimetrik analiz (TGA) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

Mikro/nano partiküllerin, oral ve/ya parenteral yollardan vücuda enjeksiyonu bu yapıların kaçınılmaz olarak kan ve ekstra selüler matriks (ECM) gibi kompleks fizyolojik sıvılar ve dokularla etkileşimi ile sonuçlanacaktır. Bu etkileşimler *in vitro/in vivo* hücre/konak organizmada yapı ve işlev bozukluklarına sebep olabileceğinden, mikro/nano formülasyonların biyouyumluluk ve kan uyumluluk özelliklerinin belirlenmesi yüksek derecede önem arz etmektedir. Bu amaçla, hazırlanan LAM esaslı modifiye edilmiş ve edilmemiş mikro/nano partiküllerin biyouyumlulukları MTT testi ve kan uyumlulukları da hemoliz ve kan pıhtılaşma testleri ile gerçekleştirilmiştir.

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Polisakkaritlerin biyolojik önemi ve biyomedikal uygulamalardaki yeri

Biyopolimerler, polinükleotidler, proteinler, polifenolik bileşikler ve polisakkaritler gibi doğal olarak makromoleküler formda bulunan biyolojik kökenli polimerlerdir. Canlı organizmalarda yapısal ve fonksiyonel olarak çok sayıda önemli görevler üstlenen biyopolimerler, biyoyumlu ve biyobozunur yapıdadır (Kang vd., 2015; Kilcoyne ve Joshi, 2007; Osborn vd., 2004; Seidi vd., 2018; Tharanathan, 2002). Bu özellikleri ve ucuz maliyetlerle yüksek miktarda elde edilebilmelerinden dolayı biyopolimerler tekstil, gıda, kozmetik, çevre ve biyomedikal alanlarda oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir. (Akter vd., 2021; Klein ve Poverenov, 2020; Mitura vd., 2020). Genel olarak biyopolimer esaslı hidrojeller, yüksek aktif madde yükleme kapasiteleri, kontrol edilebilir boyut ve kolay modifiye edilebilen özellikleri sebebiyle hedeflenebilir ve sürekli salım yapabilen etkili, ileri düzey akıllı malzemelerin geliştirilmesinde vazgeçilmez bileşenler haline gelmiştir (Lee vd., 2011; Suner vd., 2018).

Polisakkaritler, biyopolimerlerin önemli bir grubu olan karbonhidratların üyesidir. Karbonhidratların, son yıllarda gelişen teknoloji sayesinde daha detaylı karakterizasyonu ve yapı-aktivite ilişkilerinin (structure-activity relationship) aydınlatılmaya başlanması ile canlı sistemlerdeki önemi ve biyomedikal alanlarındaki uygulamaları katlanarak artmıştır (Osborn vd., 2004). Karbonhidratların bütün canlı organizmalarda bulunmaları ve canlılar için başlıca enerji kaynağı olmalarının yanı sıra, proteinler ve lipitler gibi diğer biyopolimerler ile birleşerek glikoprotein ve glikolipit formlarında yapısal ve işlevsel olarak çok çeşitli rollerde görev aldığı bilinmektedir (Tharanathan, 2002). Polisakkaritlerin en yaygın örnekleri selüloz, pektin, amiloz, nişasta, inulin, kitin, kitosan, heparin, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, aljinat, dekstran, agar, ulvan, pullulan, karragenan ve bunların türevleridir. Polisakkaritler ticari olarak genellikle hayvanlar, bitkiler, algler ve mikroorganizmalar olmak üzere kara ve deniz ekosistemindeki çeşitli canlı kaynaklardan elde edilmektedir (Rinaudo, 2007; Seidi vd., 2018). Polisakkaritler şeker birimlerinden oluşan, genel olarak benzer yapılı polimerler olmasına karşın, şeker birimleri arasındaki glikozit bağının tipi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), bağlanma ve dallanma şekli, içerdikleri

şeker birimlerinin sayısı, çeşidi, fonksiyonel grupları ve yükleri farklılık göstermektedir (Kang vd., 2015; Seidi vd., 2018; Uthaman vd., 2014). Dolayısı ile farklı polisakkaritler çok çeşitli fizikokimyasal özellikler ve biyoaktiviteler göstermektedir (Kang vd., 2015; Kilcoyne ve Joshi, 2007). Polisakkarit esaslı terapötiklerin, enflamatuvar hastalıklar ve anti-trombotik tedavilerden yara iyileşmesine kadar birçok kardiyovasküler ve hematolojik hastalığın tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Kilcoyne ve Joshi, 2007).

Polisakkaritler hidrofilik yapıları, muko yapışkanlık ve biyoaktivitelerine ek olarak doğal, biyoyumlu ve biyobozunur özelliklerinden dolayı, üstün özelliklere sahip mikro/nano malzemelerin geliştirilmesi için başlıca tercih edilen biyopolimerler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda, nişasta, selüloz, pektin, inulin, heparin, dekstran, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, aljinat, kitosan, fukoidan, agar, ulvan, pullulan ve karragenan gibi çeşitli bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklı polisakkaritlerden hazırlanan çok sayıda hidrojel çeşidi rapor edilmiştir (Kang vd., 2015; Lee vd., 2011; Morales-Sanfrutos vd., 2015; Opanasopit vd., 2008; Quiñones vd., 2018; Sahiner, vd., 2017a; Sahiner vd., 2014b; Seidi vd., 2018; Uthaman vd., 2014). Bunlara ek olarak, siklodekstrin gibi oligomerik karbonhidratlar veya maltitol, laktoz, maltoz, sükroz gibi monomerik ve dimerik şeker birimleri de çeşitli hidrojel formlarının hazırlanmasında kullanılmıştır (Can vd., 2019; Kurt vd., 2021; Sahiner, 2018a; Sahiner vd., 2014a).

Polisakkarit esaslı mikro/nano partiküllerin sentezi kimyasal olarak çapraz bağlanma veya fiziksel olarak hidrofobik (Gonçalves ve Gama, 2008) ve elektrostatik etkileşimler ile (Myrick vd., 2014) polimer zincirlerinin kendiliğinden düzenlemesiyle (self assembly) mümkün olabilmektedir. Kullanılan çapraz bağlanma stratejisine göre farklı kimyasal ve fiziksel polimerizasyon yöntemleri mevcuttur. Örneğin fiziksel çapraz bağlanma yoluyla polimerizasyon için en yaygın kullanılan yöntemler iyonik jelyasyon ve polielektrolit kompleks oluşumdur. Anyonik (hiyalüronik asit, dekstran sülfat, ksantan vb.) veya katyonik (kitosan) gibi polisakkaritler ve metal iyonları arasındaki etkileşimler ile iyon-kompleks/polielektrolit-kompleks oluşturularak, kontrol edilebilir boyutta mikro/nano partiküller sentezlenebilir (Chen vd., 2007; de la Fuente vd., 2008; Gennari vd., 2019; Jeong vd., 2008; Shibaev vd., 2020). Kimyasal olarak çapraz bağlanmada ise, biyopolimer birimleri üzerinde modifikasyon ile vinil grupları oluşturulduktan sonra serbest radikal zincir polimerizasyonu (Majcher vd., 2020) veya epiklorohidrin (ECH), DVS, gliserol diglisidil eter (GDE), sodyum trimetafosfat (STMP) gibi epoksi, vinil ve



fosfat grupları içeren çapraz bağlayıcılar kullanılarak halka açılma ve nükleofilik katılma reaksiyonları ile süspansiyon ve mikroemülsiyon ortamlarında doğrudan mikro/nano partiküller sentezlenebilmektedir (Can vd., 2019; Chang vd., 2019; Hamdi ve Ponchel, 2001; Oh vd., 2008; Sahiner vd., 2017b). Ters misel mikroemülsiyon yönteminde, karışmakta olan yüzey aktif madde içeren organik çözücü üzerine sulu fazdaki polimer çözeltisi damla damla eklenerek mikro emülsiyon damlacıklarının oluşması sağlanır. Sisteme, eklenen sulu çözeltinin yüzey aktif madde molekülleri tarafından homojen olarak çevrelenmesi (mikro emülsiyon damlasının kararlı kılınması) için belli bir süre karıştıktan sonra sulu faz içerisine geçebilen (hidrofilik) çapraz bağlayıcılar ortama eklenerek çapraz bağlanma başlatılır. Termodinamik olarak kararlı olan ters misel mikro emülsiyon sistemleri, yüzey aktif maddenin kendiliğinden birleşmesi ile miseller üreterek sulu faz ve organik fazın birarada bulunarak üç boyutlu ağ yapıya sahip mikro/nano partiküllerin oluşması için birer reaktör görevi görür. Miseller dinamik sistemler olup, reaksiyon sırasında Brown hareketi sonucu sıklıkla çarpışarak birleşir ve ayrılırlar. Böylece miseller arası madde alışverişi gerçekleşir ve polimer birimleri ile çapraz bağlayıcıların bir araya gelerek reaksiyona girmesi sağlanır (Malik vd., 2012). Bu yöntemle sentezlenecek olan partiküllerin boyutları, ortama eklenen sulu fazın miktarı, polimer çözeltisinin derişimi, emülsiyon içerisindeki yüzey aktif maddenin derişimi, mikro emülsiyon sisteminin karışma hızı gibi parametreler değiştirilerek kontrol edilebilmektedir (Oh vd., 2008). Literatürde ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu kullanılarak çeşitli polisakkaritlerden biyopolimerik mikro/nano partiküllerin sentezlenmesi üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir (Suner vd., 2018).

Karasal canlılardan elde edilen polisakkaritlere ek olarak deniz ekosisteminden elde edilen aljinat, agar, karragenan, ulvan, fukoidan ve laminarin (LAM) gibi polisakkaritler de mevcuttur (Kang vd., 2015; Kilcoyne ve Joshi, 2007; Osborn vd., 2004; Rinaudo, 2007; Venkatesan vd., 2015, 2016). Bu polisakkaritler antioksidan, antienflamatuvar, antikarsinojenik, antikoagulan, antilipidemik, antimikrobiyal ve antiviral biyoaktivite özellikleri nedeniyle son yıllarda çok büyük ilgi görmüştür. Özellikle doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı gibi biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi görmüş ve bu yapılardan nano, mikro ve makro boyutlarda hidrojellerin sentezi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır (Popa vd., 2015; Venkatesan vd., 2015, 2016). Deniz yosunu polisakkaritleri yapılarında hidroksil, karboksil ve sülfat grupları gibi hidrofilik fonksiyonel gruplar içermektedir (Rinaudo,

2007). Bu gruplar biyolojik dokular ile kolayca etkileşebildiği için deniz yosunu polisakkaritlerinin biyomedikal uygulamalardaki önemi gittikçe artmaktadır (Venkatesan vd., 2015).

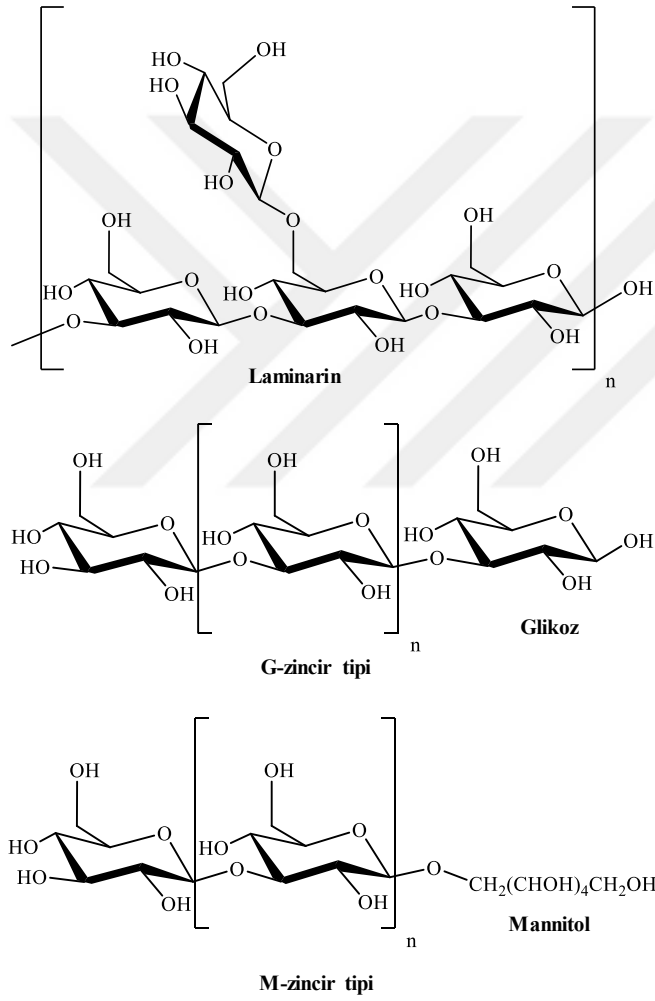
Keppeler vd. tarafından yapılan bir çalışmada yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile deniz yosunlarından elde edilen kappa-karragenan polisakkaritinden ECH çapraz bağlayıcısı kullanarak 106 µm boyutlarında küresel boncuk (beads) partikülleri sentezlenmiş ve hazırlanan partiküllerin ortamdaki tuz derişimine duyarlı şişme/büzülme davranışları incelenmiştir (Keppeler vd., 2009). Sahiner vd. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise κ (κ), iota (ι) ve lambda (λ) karragenan polisakkaritlerinden DVS çapraz bağlayıcısı kullanılarak ters misel mikroemülsiyon tekniği ile mikropartiküller sentezlenmiş ve elde edilen partiküller dietilen triamin ile modifiye edilmiştir (Sahiner vd., 2017a). Modifiye edilmiş partiküllerin HCl ile protonlanmasıyla elde karragenan partiküllerinin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* gibi bakteri ve mantar türlerine karşı antimikrobiyal aktive gösterdiği bildirilmiştir. Modifiye edilmiş ve edilmemiş κ-karragenan partikülleri içine rosmarinik asit model ilaç olarak yüklenerek ilaç salımları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan, modifiye edilmiş mikrojellerin modifiye edilmemiş mikrojellere göre yaklaşık 211 kat daha fazla ilaç yüklediği ve ayrıca modifiye edilmiş mikrojellerin modifiye edilmemiş mikrojellere kıyasla daha uzun süreli ve lineer salım profili sergilediği rapor edilmiştir (Sahiner vd., 2017a). Deniz yosunlarından elde edilen bir başka polisakkarit olan aljinat molekülleri ters misel mikroemülsiyon yöntemi kullanılarak  $Ca^{+2}$  iyonları ile çapraz bağlanmış ve 80 nm çapında nanopartiküller elde edilmiştir. Aljinat- $Ca^{2+}$  nanopartiküllerinin gen taşıyıcı sistemler olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla yeşil floresan protein (GFP) kodlayan plazmitler partiküller içine yüklenerek NIH 3T3 hücreleri tarafından hücre içine alınmaları ve GFP plazmitlerinin transfeksiyon oranı araştırılmıştır. Aljinat- $Ca^{2+}$  partiküllerinin gen taşıma ve transfeksiyon aktiviteleri aynı plazmidin polietilen imin (PEI) ile oluşturduğu kompleks partiküller ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, aljinat-Ca partiküllerinin hücrelerle 72 saat inkübasyonundan sonra %51 GFP transfeksiyon aktivitesi göstererek aynı sürede %57 aktivite gösteren plazmit-PEI kompleksinin transfeksiyon aktivitesine yakın etki gösteren doğal gen taşıma sistemleri olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (You ve Peng, 2005).

Literatürde yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı üzere deniz yosunu polisakkaritlerinin çok çeşitli terapötik özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalarda doğal yapılı çok yönlü malzemeler olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır. Bununla birlikte, aljinat, karragenan, agar, fukoidan, ulvan vb. gibi polisakkaritlerin koloidal partikül sistemleri olarak kullanımı üzerine çok sayıda araştırma yapılmasına karşın LAM polisakkaritlerinden partikül sistemlerinin hazırlanmasını öneren yalnızca birkaç çalışma rapor edilmiştir (Zargarzadeh vd., 2020). LAM polisakkaritinin fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri ve bu polisakkaritin biyomedikal alanda kullanımını içeren çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

## 2.2. Laminarin polisakkaritinin özellikleri ve biyomedikal uygulamaları

Laminaran veya lökosin olarak da bilinen laminarin, kahverengi deniz yosunlarında nişasta benzeri, karbon deposu olarak görev yapan, toksik özellik göstermeyen biyobozunur bir depo polisakkarittir. İlk kez 19. yüzyılda Schmiedeberg, 1885 tarafından *Laminariaceae* ailesine mensup deniz yosunlarından izole edilen LAM molekülü (Schmiedeberg, 1885) *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Saccharina latissima*, *Saccharina longicuris*, *Fucus vesiculosus*, *Eisenia bicyclis* gibi deniz yosunlarında bolca bulunmaktadır.  $\beta$ -glukan tipi bir polisakkarit olan LAM molekülü, ana zincirde  $\beta$ -(1-3), zincir içi  $\beta$ -(1-6) glikozit bağları ve elde edildiği organizmanın türüne bağlı olarak farklı oranlarda  $\beta$ -(1-6) dallanma gösteren glukopiranoz zincirlerinden oluşur. Örneğin, *Eisenia bicyclis* türlerinden elde edilen LAM molekülünün lineer zincir yapısında  $\beta$ -(1-3) bağlarının  $\beta$ -(1-6) glikozit bağlarına oranı 2:1 olarak bulunmuştur (Shin vd., 2009). LAM polimerizasyon derecesine bağlı olarak ortalama 5 kDa moleküler ağırlığa sahip 20-25 glikoz birimlerinden oluşmaktadır (Nelson ve Lewis, 1974). Bununla birlikte, LAM polisakkaritinin elde edildiği organizmaya ve ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücü çeşidi, ekstraksiyon süresi gibi parametrelere bağlı olarak değişen moleküler ağırlığa ve biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Benito-Román vd., 2013; Rioux vd., 2010; Smith vd., 2018). Örneğin *Saccharina longicuris* den elde edilen LAM moleküllerinin ekstraksiyon koşullarına göre 2.89–3.32 kDa aralığında olduğu bulunmuştur (Rioux vd., 2010). Bir diğer çalışmada, *Laminaria saccharina* türünden HCl ile ekstrakte elde edilen LAM molekülünün  $H_2SO_4$  ile ekstraksiyona göre daha yüksek

moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir (Devillé vd., 2004). Moleküler yapısı Şekil 1’ de verilen LAM polisakariti sonlandığı moleküle (reducing end) göre M zincir (D-mannitol) ve G zincir(D-glikoz) tipi olmak üzere 2 gruba ayrılır. Farklı bölgelerdeki deniz yosunlarında yapılan çalışmalarda, deniz yosununun türü, yaprağın yaşı, su sıcaklığı, tuzluluk oranı, dalgalar, deniz akıntıları ve derinlik gibi faktörlerin LAM molekülünün yapısını ve içerdiği M:G oranını değiştirdiği ve bu faktörlerin molekülün biyoaktivitesinde belirleyici roller oynadığı rapor edilmiştir (Chizhov vd., 1998; Rioux vd., 2010).



Şekil 1. LAM polisakaritinin kimyasal yapısı ve uç gruplarına göre sınıflandırılması.

LAM polisakariti, terapötik potansiyeli yüksek çok sayıda biyoaktiviteye sahip doğal bir polimerdir. LAM molekülünün biyoaktif özellikleri arasında yara iyileştirici, antibakteriyel, antioksidan (Sellimi vd., 2018), antitümör (Ermakova vd., 2013; Tsiapali vd., 2001), antiinflamatuvar, bağışıklık güçlendirici (Neyrinck vd., 2007) ve

antiapoptotik aktiviteler (Kim vd., 2006) gibi çok sayıda biyoyararlı özelliğın olduğu bildirilmiştir. Choi vd. tarafından yapılan bir çalışmada LAM moleküllerinin gamma ışınlarına maruz bırakılmasıyla yapıdaki glikozid bağları parçalanmış ve elde edilen düşük moleküler ağırlıklı LAM moleküllerinin antioksidan aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Choi vd., 2012). Ayrıca, LAM molekülü Dectin-1 reseptörlerine spesifik bir polisakkarittir. C-tipi bir lektin olan Dectin-1, mantar enfeksiyonlarında immün cevabın başlatılmasında görev alan bir reseptördür (Pattern recognition receptor) (Adams vd., 2008; Xie vd., 2010). Bildiren çalışmalardan da anlaşılacağı üzere LAM molekülü sahip olduğu bu çok sayıda biyolojik aktivelerden dolayı biyomedikal alanda oldukça ilgi çekici bir malzeme olup yüksek kullanım potansiyeline sahiptir.

LAM molekülünün fizikokimyasal ve mekanik özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla değişik fonksiyonel gruplar içeren moleküller ile modifikasyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ji vd. tarafından yapılan bir çalışmada lineer LAM molekülü klorosülfonik asit-piridin metodu ile modifiye edilmiş ve yapıya eklenen sülfonil asit gruplarının (-SO<sub>3</sub>) doğal polimere göre insan kolorektal adenokarsinom hücreleri üzerinde antikanserojen etkisinin arttığı bildirilmiştir (Ji vd., 2013). Yapılan diğer çalışmalarda sülfat grupları ile modifiye edilmiş LAM moleküllerinin pıhtılaşma önleyici, anti-heparanaz ve antimetastatik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Adams ve Thorpe, 2011; Miao vd., 1999).

LAM molekülü glisidil metakrilat grupları ile modifiye edilmiş ve elde edilen polimerin fotopolimerizasyonu ile mikropartiküller ve ayarlanabilir şişme, mekanik dayanım ve gözeneklilik özelliklerine sahip hidrojeller sentezlenmiştir (Custódio vd., 2016; Martins vd., 2018; Sellimi vd., 2018; Wang vd., 2018). Benzer bir başka çalışmada ise metakrilat grupları ile modifiye edilmiş LAM molekülü ve grafen köpük (graphen foam) ile fotopolimerizasyon yöntemi kullanılarak kompozit hidrojeller hazırlanmıştır. Sentez sırasında ortama eklenerek yani *in situ* olarak yapıya bağlanan argin–glisin–aspartik asit (RGD) hücre yapışma peptidinin hazırlanan hidrojellere insan mezenkimal kök hücrelerinin bağlanması ve gelişmesini artırdığı bildirilmiştir (Feng vd., 2019).

Diğer bir çalışmada azid grupları ile sonlanmış poli( $\gamma$ -benzil-L-glutamat) ve propargil ile modifiye edilmiş LAM moleküllerinin bakır katalizörlü Huisgen siklokatalizasyon reaksiyonu ile polimerizasyonu sonucunda amfifilik diblok kopolimerler

sentezlenmiştir (Duan vd., 2018). Ardından sentezlenen LAM esaslı polimerler nanoçöktürme yöntemi ile partikül formunda hazırlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada LAM ile hiyalüronik asit de senteze dahil edilerek çift hedeflemeli partiküller sentezlenmiş ve elde edilen partiküllerin reseptör etkileşimleri araştırılmıştır. Başka bir çalışmada benzer şekilde LAM molekülleri azid ve propargil grupları ile modifiye edildikten sonra bakır katalizörlü Huisgen siklokatılma reaksiyonu ile LAM mikropartikülleri sentezlenmiştir (Castanheira vd., 2020).

Bir başka çalışmada LAM molekülü N,N'-karbonildiimidazol molekülleri ile PEI moleküllerine konjuge edilmiştir. Elde edilen katyonik polimerin kanser hedefli anyonik siRNA molekülleri ile kompleks oluşturması ile siRNA taşıyıcı vektör partiküller elde edilmiştir. Bu partiküllerin MCF-7 hücrelerinde hedeflenen genin ekspresyonunu %90,9 oranında azalttığı ve fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmada %46,6 kanser inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Ren vd., 2016).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan materyaller

Bu tez kapsamında *Laminaria digitata* (LD) ve *Eisenia bicyclis* (EB) olmak üzere iki farklı organizmadan edile eldilen laminarin (LAM) polisakkariti sırasıyla LD-LAM (Sigma-Aldrich) ve EB-LAM (Biosynth-Carbosynth), LAM esaslı mikro/nano partiküllerin sentezi için biyopolimer olarak kullanılmıştır. LAM esaslı partiküllerin sentezinde sodyum hidroksit (NaOH, %99,9, VWR Chemicals) bazik LAM çözeltisinin hazırlanmasında, divinil sülfon (DVS, %98, Merck), trimetilolpropan triglisidil eter (TMPGDE, teknik-saflıkta, Sigma-Aldrich) ve sodyum tripolifosfat (STPP, %99,5, Acros Oganics) çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. LAM esaslı partiküllerin sentezi için yüzey aktif madde (sürfektan) içeren ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu ve sürfektan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Sürfektan içeren mikroemülsiyon polimerizasyonu için sodyum bis(2-etilheksil) sülfosüksinat (AOT, %98, Sigma-Aldrich) yüzey aktif madde olarak ve 2,2,4-trimetilpentan (izooktan, >%99,5, Carlo Erba) çözücü olarak ters misel mikroemülsiyon sisteminin oluşturulmasında kullanılmıştır. Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu için izooktan (ACS. Reag. Phr. Eur. saflık derecesi, Isolab) emülsiyon ortamı olarak kullanılmıştır. DVS ile çapraz bağlı LD-LAM partiküllerinin modifikasyonunda aseton (%99, BRK) çözücü olarak ve klorosülfonik asit (CSA, %98, Fluka) modifikasyon ajanı olarak kullanılmıştır. LAM esaslı partiküllerin yıkama/saflaştırma işlemlerinde çözücü olarak etanol (%99, Birkim) ve aseton (%99, Birkim) kullanılmıştır. LAM esaslı partiküllerin kan uyumluluk testleri için sodyum klorür (NaCl, ACS, ISO, Reag. Ph Eur. saflık derecesi, Merck) izotonik salin çözeltisinin (%0,9 NaCl) hazırlanmasında kullanılmıştır. Kan pıhtılaşma testi için pıhtılaşmayı indükleyici ajan olarak kalsiyum klörür (CaCl<sub>2</sub>, %99,99, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Partiküllerin hidrodinamik boyut analizleri için potasyum klorür (KCl, ≥ %99,5, Merck) ve sodyum klorür (ACS, ISO, Reag. Ph Eur. saflık derecesi, Merck) ile hazırlanan tuz çözeltileri kullanılmıştır. Fenol (puriss, Sigma) ve sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %96, Carlo Erba) LAM esaslı partiküllerin hidrolitik bozunma miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Tez çalışması boyunca hazırlanan sulu çözeltiler/süspansiyonlar GFL 2108 (25 °C'de 1.6 µS/cm) saf su cihazından alınan çift-distile saf su ile hazırlanmıştır.

### **3.2. Mikro/nano boyutlu LAM esaslı partiküllerin ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu ile sentezi**

Doğal bir polimer olan laminarin polisakkaritinden ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile farklı oranlarda (tekrar eden birime göre %molce) DVS, TMPGDE ve STPP gibi farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak LAM partikülleri sentezlenmiştir. Partiküllerin sentezine dair detaylar aşağıda belirtilmiştir.

#### **3.2.1 DVS çapraz bağlı LD-LAM mikro/nano partikülleri**

LD kaynaklı LAM polisakkariti kullanılarak DVS çapraz bağlayıcısı ile hazırlanan LAM partiküllerinin sentezi literatürdeki çalışmaya göre küçük değişiklikler ile yapılmıştır (Can vd., 2019) ve elde edilen partiküller LD-LAM-1 partikülleri olarak isimlendirilmiştir. Kısaca, 0,15 g LD-LAM polimeri 15 mL 0,2 M NaOH çözeltisi içinde çözülmüş ve bu çözeltiden 1,4 mL alınarak 1.000 rpm karıştırma hızı altında 30 mL 0,2 M AOT-izooktan çözeltisi üzerine damla damla eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra, ortama eklenen LAM polimerinin tekrar eden birimindeki her iki glikoz birimine göre molce 1:1 oranda DVS damla damla reaksiyon ortamına eklenmiş ve 1.000 rpm karıştırma hızında 1 saat daha karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda elde edilen LD-LAM-1 partikülleri mikroemülsiyon ortamının hacimce 2-3 kat fazlası kadar aseton içinde çöktürülmüştür. Sonrasında, aseton-mikroemülsiyon ortamı karışımı çöken partikülleri hareketlendirmeden dikkatlice dökülerek partiküllerin reaksiyona girmemiş kimyasallar ve reaksiyon ortamından temizlenmesi için sırası ile izooktan, aseton, aseton:etanol (50:50 h/h) ve aseton çözücülerini ile ikişer defa yıkanmıştır. Yıkama işlemi partiküllerin belirtilen çözücüler içinde süspanse edilmesi ve sonrasında 12.000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek çöktürülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yıkanan partiküller ısı tabancası ile düşük sıcaklıkta kurutulmuş ve kurutulan partiküller kapaklı falkon tüplerde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



### 3.2.2. *EB-LAM* mikro/nano partikülleri

*Eisenia bicyclis* kaynaklı LAM polisakariti kullanılarak DVS, TMPGDE ve STPP çapraz bağlayıcıları ile hazırlanan LAM partiküllerinin sentezi literatürde bildirilen laktoz esaslı partiküllerin hazırlanma yöntemine göre küçük modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir (Can vd., 2019) ve elde edilen partiküller sırasıyla *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partikülleri olarak isimlendirilmiştir. Özetle, 0,1 g *EB-LAM* 5 mL 0,2 M NaOH içinde çözülmüş, bu çözültiden 1 mL alınarak 0,2 M 30 mL AOT-izooktan çözeltilerine 1.000 rpm karıştırma hızı altında ayrı ayrı eklendikten sonra yarım saat boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında, *EB-LAM* polimerinde tekrar eden birime göre molce %25 oranlarında DVS, TMPGDE ve STPP çapraz bağlayıcıları ayrı ayrı emülsiyon ortamlarına damla damla eklenerek başlatılan polimerizasyon reaksiyonu oda sıcaklığında 1.000 rpm karıştırma hızı altında 1 saat devam etmiştir. Bu sürenin sonunda emülsiyon ortamı 12.000 rpm' de 15 dk santrifüjlenerek sentezlenen partiküller toplanmış ve partiküller tekrar 30 mL izooktanda süspanse edilerek aynı koşullarda tekrar santrifüjlenmiştir. Bu işlem 4 kez tekrar edildikten sonra çözücü olarak sırasıyla etanol, etanol-su ve aseton ile her bir çözücü için ikişer defa olmak üzere yıkama işlemleri yapılmış, reaksiyona girmemiş kimyasalların ve yüzey aktif maddelerin partiküllerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partikülleri ısı tabancası ile düşük sıcaklıklarda kurutulmuş ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere kapalı falkon tüplerde saklanmıştır.

### 3.3. *EB-LAM* esaslı nanopartiküllerinin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezi

*EB-LAM* kaynaklı LAM partiküllerinin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanması literatürü takiben bazı değişiklikler ile gerçekleştirilmiştir (Sagbas Suner vd., 2019). Özetle, 0,4 g *EB-LAM* 0,5 M 5 mL NaOH çözeltilinde çözülmüştür. Daha sonra bu çözültiden 0,5 mL alınarak 10.000 rpm'de karışmakta olan 150 mL izooktan üzerine damla damla eklenmiş ve polimer çözeltilinin çözücü içinde homojen

bir şekilde dağılması için 10.000 rpm'de 4 dakika boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında, DVS çapraz bağlayıcısı *EB-LAM* polimerinin tekrar eden birimine göre molce %25, %50 ve %100 oranlarında ayrı emülsiyon ortamlarına eklenerek 15 dakika süresince 10.000 rpm'de karıştırılmış ve sırasıyla elde edilen *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2* ve *EB-LAM-1.3* partikülleri emülsiyon ortamının hacimce 2-3 katı kadar etanol veya aseton üzerine eklenerek çöktürülmüştür. Bir başka reaksiyon düzeneğinde *EB-LAM* polimer çözeltisinin izoktan içinde 4 dakika homojenizasyonundan sonra çapraz bağlayıcı olarak polimerin tekrar eden birine göre molce %25, %50 ve %100 oranında TMPGDE çapraz bağlayıcısı ayrı ayrı emülsiyon ortamlarına eklenerek yarım saat reaksiyona tabi tutulmuş ve elde edilen *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2* ve *EB-LAM-2.3* partikülleri yukarıda belirtildiği gibi etanol veya aseton içinde çöktürülmüştür. Daha sonra malzeme kaybını engellemek için organik faz 12.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen partiküller çöken partiküllere eklenerek sırasıyla etanol, etanol-su (90:10 h/h) etanol ve aseton olmak üzere her bir çözücü ile ikişer kez yıkanmıştır. Yıkanan partiküller ısı tabancası ile düşük sıcaklıklarda kurutularak oda sıcaklığında kapalı falkon tüplerde saklanmıştır. Reaksiyon ortamının partiküllerin şekil ve boyutları üzerindeki etkilerini araştırmak için, *EB-LAM-1.3* ve *EB-LAM-2.3* partiküllerinin sentezi izooktan-su ortamına ek olarak yukarıda belirtilen koşullarda sikloheksan-su ortamında yapılmış ve elde edilen partiküller sırasıyla *EB-LAM-1.4* ve *EB-LAM-2.4* partikülleri olarak isimlendirilmiştir.

### **3.4. *LD-LAM-1* mikro/nano partiküllerinin modifikasyonu**

*LD-LAM-1* partiküllerinin kimyasal modifikasyonu daha önce bildirilen bir çalışmayı takiben bazı değişiklikler ile gerçekleştirilmiştir (Sagbas vd., 2015). Kısaca, 0,25 g *LD-LAM-1* partikülü 30 mL aseton içinde 500 rpm'de 15 dakika karıştırılarak süspansiyon edilmiştir. Daha sonra partikül süspansiyonunun üstüne buzda soğutulmuş 1 mL CSA ilave edilmiş ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda reaksiyon ortamı 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek modifiye edilmiş *LD-LAM-2* partikülleri toplanmıştır. Elde edilen *LD-LAM-2* partikülleri, yukarıda belirtilen koşullarda santrifüjlenmiş ve reaksiyona girmemiş CSA moleküllerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra *LD-LAM-2* partikülleri ısı tabancası ile düşük sıcaklıklarda kurutularak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kapalı kaplarda oda sıcaklığında saklanmıştır.

### 3.5. LAM esaslı partiküllerin karakterizasyonu

LAM esaslı partiküllerin geometrik, boyut ve morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM, Hitachi Regulus 8230 ve QUANTA 400F alan emisyon-SEM) analizleri ile belirlenmiştir. Analiz öncesinde partiküller, püskürtme kaplama (sputter coating) yöntemi ile birkaç nm kalınlığa kadar altın ve platin ile kaplanarak 20-30 kV çalışma voltajı altında görüntüleme yapılmıştır.

*LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin hidrodinamik boyut analizleri partiküllerin oda sıcaklığında, 1 mM NaCl çözeltisi içinde 1 mg/mL derişimdeki dispersiyonu kullanılarak 35 mW gücünde 658 nm katı hal kırmızı diyot lazer ışık kaynağına sahip partikül boyut analizörü (90+ partikül boyutu analizörü, Brookhaven Ins. & Corp.) ile dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi kullanılarak 90° saçılım açısında belirlenmiştir. Ayrıca, *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partikülleri 5 µm gözenek boyutuna sahip şırınga filtre ve 2,5 µm gözenek boyutuna sahip Whatman kağıdı ile filtre edilmiş ve partiküllerin hidrodinamik boyutu aynı koşullar altında analiz edilmiştir. Verilen hidrodinamik çap değerleri cihaz içi 10 ardışık ölçümün ardından her bir örnek için 6 ayrı ölçümün ortalaması ve karşılık gelen standart sapma değerleri olarak sunulmuştur.

*LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin zeta potansiyeli ölçümleri 4 mW 633 nm He-Ne ışık kaynağına sahip zeta potansiyel analizörü (Zetasizer Nano ZS, Malvern Ins. Ltd) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerler herbir okuma için cihaz içi 15 ardışık ölçüm yapılarak 3 ayrı ölçümün ortalaması ve karşılık gelen standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

*EB-LAM* esaslı partiküllerin DLS ve zeta potansiyel analizleri 10 mM KCl sulu çözeltisi içinde 0,25 mg/mL derişimdeki partikül dispersiyonu kullanılarak 4 mW 633 nm He-Ne ışık kaynağına sahip partikül boyutu ve zeta potansiyel analizörü (Zetasizer Nano ZS, Malvern Ins. Ltd) ile herbir okuma için cihaz içi 15 ardışık ölçüm yapılarak 3 farklı ölçümün ortalaması ve karşılık gelen standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

Lineer *LD-LAM* polimeri ve *LD-LAM* partiküllerinin yapısındaki C, H ve S atomlarının kütle fraksiyonu yaklaşık 2 mg örnek kullanılarak elemental analiz cihazı (LECO, CHNS-932) ile belirlenmiştir.

LAM esaslı partiküllerin fonksiyonel grup analizleri Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Işımalı (FT-IR) spektroskopisi (Spectrum, Perkin Elmer) ile azaltılmış toplam yansıma (ATR) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin FT-IR spektrumları 4.000-650  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlük hassasiyeti ile 4 tekrarlı taramanın sonucunda elde edilmiştir.

LAM esaslı partiküllerin termal kararlılıkları, yaklaşık 5 mg partikül numunelerinin seramik küvetler içine yerleştirildikten sonra termogravimetrik analiz (TGA) cihazı (Seiko, SII 6300, Exstar) ile 70 °C'den 700 °C ye kadar ısıtılması sırasında gözlenen %ağırlık kaybı ölçülerek belirlenmiştir. TGA ölçümleri 100 mL/dk yüksek saflıkta azot gazı akışı altında 10 °C/dk ısıtma hızı ile kaydedilmiştir.

### **3.6. *LD-LAM* esaslı mikro/nano partiküllerin kan uyumluluk testleri**

Mikro ve nano yapılı malzemelerin vücut içi uygulamalarda kullanılabilirliğini etkileyen önemli parametrelerden biri bu malzemelerin kan ile olan etkileşimleridir (Can vd., 2019; Can vd., 2020a). Dolayısı ile LAM esaslı partiküllerin biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla *LD-LAM* partiküllerinin kan uyumluluk profilleri, literatürde yaygın olarak kullanılan hemoliz ve kan pıhtılaşırma testleri ile araştırılmıştır (Kurt vd., 2021; N. Sahiner vd., 2018b). Partiküllerin kan uyumluluk testleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Komitesi tarafından onaylanan ve EK 1'de verilen 2011-KAEK-27/2020-E.2000045671 no'lu etik kurul onayı ile yapılmıştır. Kan uyumluluk testlerinde kullanılan kan numuneleri testlerin yapıldığı tarihten itibaren en az iki haftadır steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç (NSAID) kullanmamış sağlıklı bağışçılardan gönüllü olarak alınmıştır. Alınan kan numuneleri etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren hemogram tüplerinde muhafaza edilerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin kan uyumluluk testleri 0,25, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/mL derişimde yapılmıştır.

### 3.6.1. Hemoliz testi

Hemoliz testi için, LD-LAM partikülleri 0,25-2,0 mg/mL arasındaki derişimlerde %0,9 NaCl (izosalin) çözeltisi içinde süspansiyon edilmiş ve kan ile temas ettirilmeden önce 37 °C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra, alınan kan örnekleri, 2,5:2 (kan: izosalin çözeltisi, h/h) oranında önceden inkübe edilmiş izosalin çözeltisi ile seyreltilmiş ve 0,2 mL seyreltilmiş kan partiküller üzerine eklenmiştir. Sonrasında, partikül-kan süspansiyonları tüplerin yavaşça yukarı-aşağı sallanması yoluyla karıştırılmış ve çalkalamalı su banyosu içinde 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Negatif ve pozitif kontrol olarak 0,2 mL seyrelmiş kan sırasıyla 9.8 mL izosalin ve saf su üzerine eklenerek aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örneklerden 1,5 mL alınarak 1340 rpm’ de 5 dakika santrifüjlenmiş ve çöken kırmızı kan hücrelerini (RBC) dağıtmadan süpernatant kısmından 1 mL alınarak hemoglobin içerikleri 542 nm’de UV-Vis spektrofotometresinin kullanılarak ölçülmüştür. Partiküller tarafından indüklenen hemoliz yüzdesi Denklem 3.1’den hesaplanmıştır.

$$\%Hemoliz\ Oranı = \left[ \frac{(A_{örnek} - A_{negatif})}{(A_{pozitif} - A_{negatif})} \times 100 \right] \quad (3.1)$$

Burada, “A<sub>örnek</sub>” partiküller ile etkileştirilmiş kan örneklerinin absorbansı, “A<sub>pozitif</sub>” sadece saf su içinde inkübe edilmiş kan örneklerinin absorbansı ve “A<sub>negatif</sub>” sadece izosalin çözeltisi içinde inkübe edilmiş kan örneklerinin absorbans değerleridir.

### 3.6.2. Kan pıhtılaşma testi

Kan pıhtılaşma testi için, son derişimleri yukarıda belirtildiği aralıkta olan izosalin çözeltisi içindeki LD-LAM esash partikül süspansiyonu kanla temas etmeden önce 37°C’ de inkübe edilmiştir. Sonrasında 3 mL kan yeni hazırlanmış 0,24 mL 0,2 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile karıştırılmış ve bu çözeltiden 0,27 mL örnekler üzerine eklendikten sonra 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından örnekler üzerine 10 mL saf su eklenmiş ve örnekler 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında örneklerin süpernatant kısımları 40 mL saf su üzerine dikkatlice aktararak 37 °C’ de 1 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak 0,27 mL kan 50 mL saf su içine eklenmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örneklerin

absorbansları 542 nm’de ölçülmüş ve kan pıhtılaştırma etkileri Denklem 3.2’ ye göre hesaplanmıştır.

$$\%Kan\ Pıhtılaştırma\ İndeksi = \left[ \left( \frac{A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right) \times 100 \right] \quad (3.2)$$

Burada, “A<sub>örnek</sub>”, *LD-LAM* partikülleri ile inkübe edilen kan örneklerinin absorbansı ve “A<sub>kontrol</sub>” sadece saf su içinde inkübe edilen kan örneklerinin absorbans değerleridir.

### 3.7. *EB-LAM* esaslı nanopartiküllerin biyoyumluluk testleri

*EB-LAM* esaslı nanopartiküllerin biyoyumluluk testleri literatüre rapor edilen 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi ile gerçekleştirilmiştir (Mosmann, 1983). Biyoyumluluk testleri için L929 fibroblast hücreleri kullanılmıştır. L929 fibroblast hücreleri büyüme ortamı olarak %10 (h/h) fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) besi yeri kullanılarak, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş hava ortamı koşullarında 37 °C’de büyütülmüştür. Sonrasında, hücreler standart tripsin-EDTA yöntemi ile kültür kabından kaldırılarak 5x10<sup>4</sup> hücre/mL derişimde olacak şekilde DMEM içinde süspansiyon edilmiştir. Daha sonra, bu hücre süspansiyonundan 100’er µL alınarak 96-kuyucuklu mikro plaka kuyucuklarına ekilmiş ve 24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş hava atmosferinde 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besi yeri kuyucuklardan çekilerek farklı derişimlerde *LD-LAM* esaslı partiküllerin süspansiyonunu içeren 100 µL taze besi yeri kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki besi yeri çekilerek hücreler 1 kez fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır ve kuyucuklar içine 90 µL besi yeri ve 2,5 mg/mL derişimde 10 µL MTT ajanı eklenerek hücreler 2-4 saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. MTT çözeltisi kuyucuklardan çekilmiş ve oluşan formazan kristallerini çözmek için 200 µL dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. İnkübasyondan 5 dakika sonra formazan çözeltisinin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda mikro plaka okuyucu (Multiskan SKY, Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. Her bir örnek için analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen değerler ortalama ve karşılık gelen standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

### **3.8. EB-LAM esaslı nanopartiküllerin hidrolitik bozunma testleri**

*EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerin pH 7,4 PBS çözeltisinde zamana bağlı hidrolitik bozunma testleri bazı değişiklikler ile fenol-sülfürik asit metodu kullanılarak yapılmıştır (Rasouli vd., 2014). Özetle, 10 mg *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partikülleri 1 mL PBS içinde süspansiyon edilerek selüloz membranlar (moleküler ağırlığı geçirgenliği 14.000) içerisine hapsedilmiştir. Daha sonra membranlar ayrı ayrı 29 mL PBS içeren falkon tüpler içine yerleştirilmiş ve 37 °C’de çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında bozunma ortamından 0,250 mL alınarak fenol-sülfürik asit metodu ile şeker miktarı tayin edilmiştir. *EB-LAM* esaslı partiküllerin bozunma miktarı doğal *EB-LAM* polimerinden fenol sülfürik asit metodu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri ile belirlenmiştir.

#### **3.8.1. Fenol-sülfürik asit metodu ile toplam şeker miktarı tayini**

Fenol-sülfürik asit metodu ile toplam şeker tayini literatürdeki çalışmalara göre yapılmıştır (Rasouli vd., 2014). Kısaca, *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerinin bozunma ortamından alınan örneklerden 100 µL alınarak 3 mL’lik cam viallere eklenmiştir. Örnekler üzerine sırasıyla 100 µL su, 200 µL %6,5’lik fenol çözeltisi eklendikten sonra 1 mL %96’lık derişik sülfürik asit çözeltisi dikkatli bir şekilde eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında örneklerin absorbanans değerleri 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Doğal *EB-LAM* polimeri ile hazırlanan kalibrasyon ile zamana karşı bozunan *EB-LAM* miktarı belirlenmiş ve %Bozunma±standard sapma olarak verilmiştir.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. LAM esaslı partiküllerin sentezi ve karakterizasyonu

Kahverengi deniz yosunlarından elde edilen LAM polimeri, deniz ekosisteminde bulunan en yaygın polisakkaritlerden biri olup suda yaşayan canlıların birincil karbon kaynağıdır (Becker vd., 2020). Büyük miktarlarda ve düşük maliyetler ile elde edilebilir olması, biyoyumlu, biyobozunur, toksik olmayan doğal yapısının yanı sıra çeşitli biyoaktif özelliklerinden dolayı biyomedikal alanda kullanım potansiyeli yüksek olan mikro/nano malzemelerin üretimi için iyi bir başlangıç malzemesi olabilir. LAM polisakkariti, yapısında bulunan çok sayıda hidrosil (-OH) grupları ve nispeten düşük molekül ağırlığı nedeniyle biyomedikal uygulamalar için kolay işlenebilirliğin yanı sıra kimyasal modifikasyonlar için oldukça elverişli bir malzemedir. Literatürde LAM polimerinin modifikasyonunu içeren ve biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini öneren sadece birkaç çalışma vardır (Zargarzadeh vd., 2020). Bildiren çalışmalarda, LAM polimerine kimyasal modifikasyonlar ile öncelikle çeşitli propargil, azid ve metakrilat grupları gibi polimerize edilebilir fonksiyonel grupların eklenmiş ve ardından bu gruplar aracılığı ile polimer çapraz bağlanmış (Castanheira vd., 2020; Custódio vd., 2016; Duan vd., 2018; Martins vd., 2018). LAM esaslı mikro/nano yapıları biyomalzemelerin tek basamakta ve maliyeti düşük alternatif yöntemler ile hazırlanabilmesi, yüksek kullanım potansiyeline sahip bu polimerin nanoteknoloji, malzeme bilimi ve biyomedikal alanlarında kullanımının genişletilmesinde önemli katkılar sağlayacaktır. Bu tez kapsamında LAM polisakkaritlerinden DVS, TMPGDE ve STPP gibi farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak, literatürde ilk defa sentez öncesi modifikasyon yapılmadan, tek adımda 3B ağ yapıya sahip LAM mikro ve nano partikülleri sentezlenmiştir.

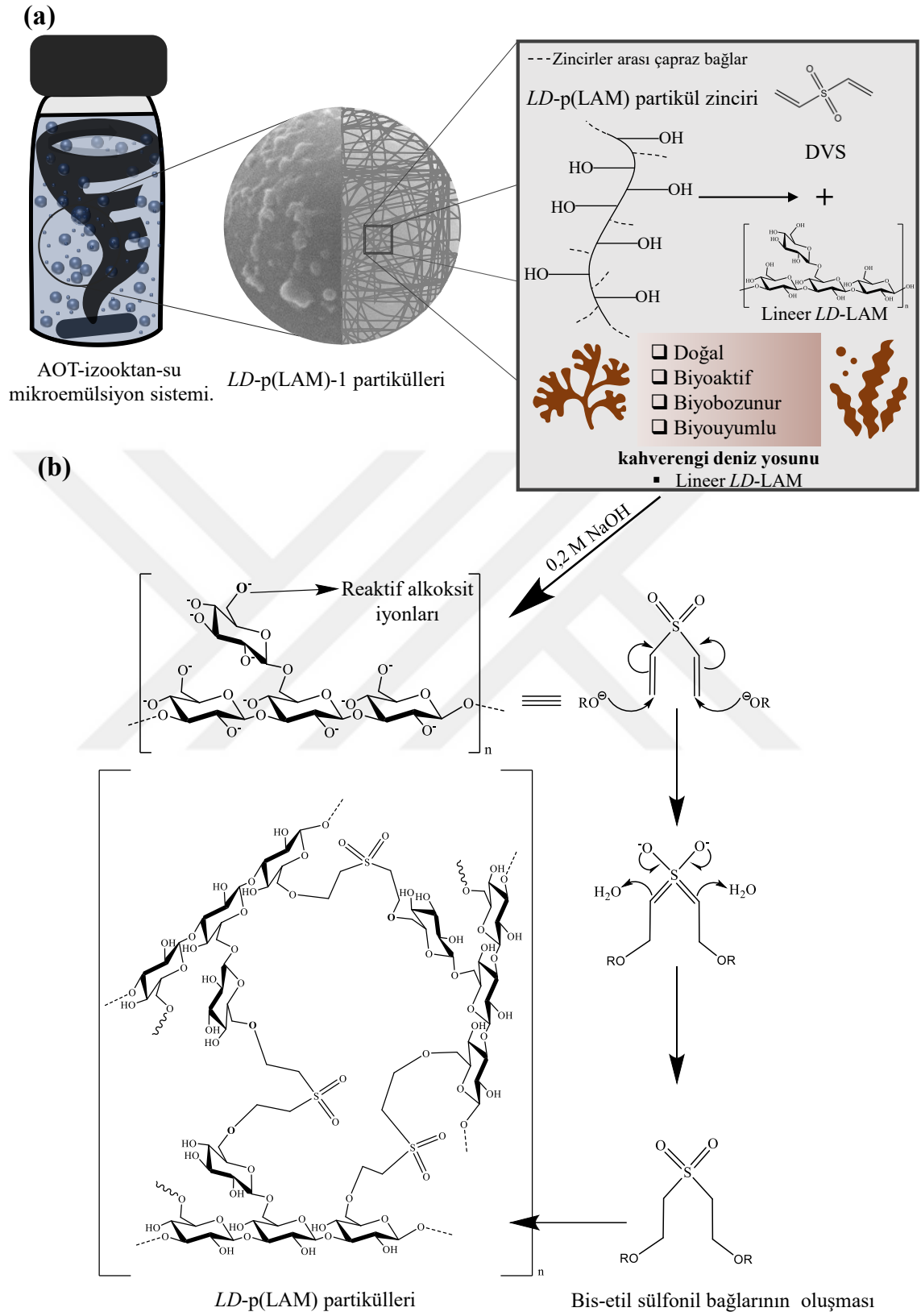


#### 4.1.1. LAM esaslı partiküllerin ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu

##### *LD-LAM* mikro/nano partiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu

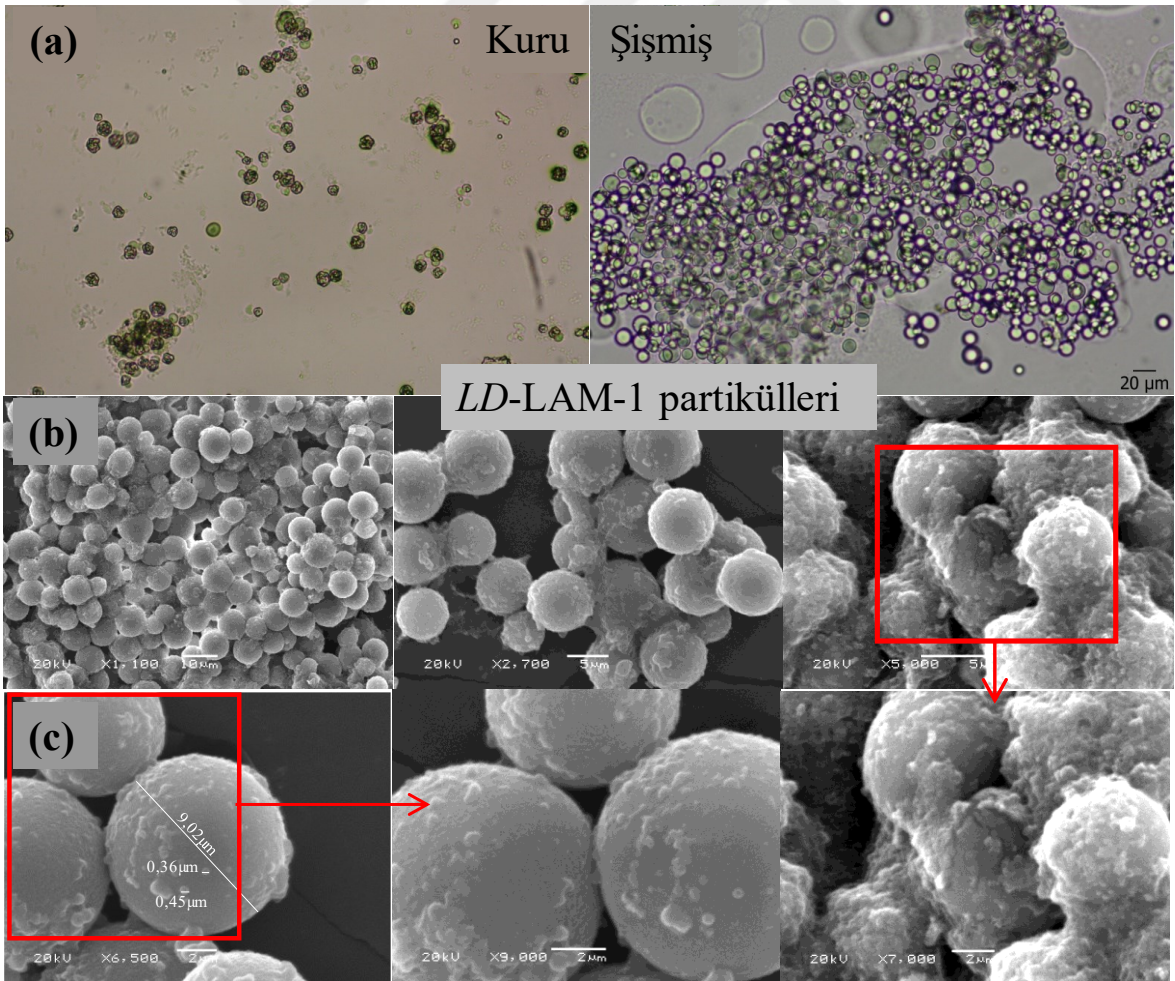
Çapraz bağlı *LD-LAM-1* partiküllerinin sentezi *LD-LAM* polimerindeki her iki glikoz birine göre molce %100 oranında DVS eklenerek AOT-izooktan-su ters misel ortamında Oxa-Micheal katılma reaksiyon mekanizması ile gerçekleştirilmiştir (Can ve Sahiner, 2021; Shimojo vd., 2015). *LD-LAM-1* partikül sentezinin şematik gösterimi ve reaksiyon mekanizması sırasıyla Şekil 2 (a) ve (b)'de verilmiştir.





Şekil 2. (a) AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon sisteminin şematik gösterimi ve (b) Oxa-Michael katılma reaksiyonu ile partikül oluşumunun mekanizması.

Şekil 2'den anlaşılacağı gibi 0,2 M NaOH içinde çözülmüş *LD-LAM* moleküllerinin hidroksil grupları alkali ortam içerisinde proton ayrılması (deprotone) olarak alkoksi formuna dönüşür. Çapraz bağlayıcı DVS molekülleri reaksiyon ortamına eklendikten sonra LAM molekülündeki reaktif alkoksi radikalleri DVS'nin vinil gruplarındaki düşük elektron yoğunluğuna sahip bölgelere nükleofilik atak yapar. Böylece *LD-LAM* ve DVS molekülleri arasında sülfonil bis-etil çapraz bağları oluşur ve 3B ağ yapısında *LD-LAM* partikülleri oluşması ile sonuçlanır. Reaksiyon ortamındaki su molekülleri izooktan fazındaki AOT molekülleri tarafından çevrelenerek küresel ters miseller oluşturduğundan bu reaksiyonun küresel partiküller üretmesi beklenmektedir. *LD-LAM-1* partikülleri %93±7 gibi yüksek gravimetrik verimle sentezlenmiştir. Hazırlanan partiküllerin morfolojik özellikleri optik mikroskop ve SEM ile analiz edilmiş ve görüntüler sırasıyla Şekil 3 (a) ve (b)'de verilmiştir.



Şekil 3. *LD-LAM-1* partiküllerinin (a) optik mikroskop ve (b) SEM görüntüleri.

Şekil 3 (a)'da verilen optik mikroskop görüntülerinden anlaşılacağı gibi *LD-LAM-1* partikülleri küresel yapılıdır. Partiküllerin suda çözünmeden şişmesi çapraz bağlanmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve beklenildiği üzere ters misel mikroemülsiyon polimerizasyon yönteminin 3B küresel partiküller oluşturduğunu gösterilmiştir. Şekil 3 (b)'de verilen SEM görüntüleri incelendiğinde partiküllerin boyut dağılımının 3-10 µm arasında olduğu görülmüştür. Ancak Şekil 3 (c)'de verilen daha yüksek büyütmelelerde yakından çekilmiş SEM görüntüleri incelendiğinde, 5 µm civarı *LD-LAM-1* partiküllerinin çevresinde 0,3-1,0 µm arasında değişen boyut dağılımına sahip çok sayıda mikron-altı partikül olduğu görülmüştür.

Mikro/nano yapı malzemelerin boyut dağılımı ve yüzey yükü özellikleri bu malzemelerin uygulama alanlarının sınırlarını belirleyen en önemli parametrelerdendir (Dolai vd., 2021; Fröhlich, 2012; Xiao vd., 2011). *LD-LAM-1* partiküllerinin yüzey yükleri zeta potansiyeli ölçümleriyle ve hidrodinamik çapları da DLS ölçümleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, partikül boyut dağılımının filtreleme yöntemi ile kolayca kontrol edilebilirliğini göstermek amacı ile partiküller 5,0 µm ve 2,5 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtrelerden geçirilerek DLS ölçümleri yapılmıştır. *LD-LAM-1* partiküllerinin zeta potansiyeli değerleri ve filtrelemeden önce ve sonra ölçülen ortalama hidrodinamik çapları Tablo 1'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, *LD-LAM-1* partiküllerinin ortalama hidrodinamik boyutunun filtrasyondan önce 724,2±94,1 nm olarak bulunmuştur. Ayrıca 5,0 µm ve 2,5 µm gözenek boyutuna sahip filtreler ile ayırma işleminden sonra ortalama partikül boyutu sırasıyla 452,4±49,6 ve 395,5±38,9 nm olarak ölçülmüştür. Mikroemülsiyonlar termodinamik olarak kararlı sistemlerdir ve nanometreden mikrometre boyutuna kadar partiküllerin üretilmesine olanak sağlarlar (Ruckenstein, 1978). Ters misel mikroemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle polisakkarit ve disakkaritler gibi çeşitli sakkaritlerden sentezlenen DVS çapraz bağlı şeker partiküllerinin benzer şekilde, onlarca mikrometreden birkaç yüz nanometre aralığına kadar çok dağılımlı yapıda olduğu bildirilmiştir (Can vd., 2019; Sahiner vd., 2014a; Sahiner vd., 2014b).

Tablo 1

*LD-LAM* esaslı partiküllerin zeta potansiyel değerleri ve DLS ölçümleri ile belirlenen ortalama hidrodinamik çapları

Malzemeler	Ortalama hidrodinamik çap (nm)			Zeta Potansiyeli (mV)
	Filtrelenmemiş	Filtrelenmiş		
		5,0 $\mu\text{m}$	2,5 $\mu\text{m}$	
<b><i>LD-LAM-1</i> partikülleri</b>	724,2 $\pm$ 94,1	452,4 $\pm$ 49,6	395,5 $\pm$ 38,9	-18,7 $\pm$ 3,7
<b><i>LD-LAM-2</i> partikülleri</b>	1408,9 $\pm$ 210,6	670,1 $\pm$ 99,1	502,6 $\pm$ 56,3	-24,9 $\pm$ 1,3

Ayrıca, partiküllerin boyutu ve morfolojik yapısı basit filtrasyon yöntemlerinin yanı sıra sıcaklık, başlangıç malzemelerinin derişimi, çapraz bağlayıcı oranı ve mikroemülsiyon ortamının özelliklerine (sulu faz, yağ fazı ve yüzey aktif madde oranı, kosürfektan vb.) bağlı olarak da optimize edilebilmektedir (Deng vd., 2003; Li vd., 2014; Lovell ve Schork, 2020; Palkovits vd., 2005). Hazırlanan *LD-LAM-1* partiküllerinin yüzey karakterleri incelendiğinde ise 1 mM NaCl sulu çözeltisi içinde yapılan zeta potansiyeli ölçümleri sonucunda yüzey yükleri -18,7 $\pm$ 3,7 mV olarak bulunmuştur.

Çapraz bağlı partikül oluşumunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermek ve deneysel çapraz bağlanma miktarını belirlemek amacıyla *LD-LAM* ve *LD-LAM-1* partiküllerinin kütlece % C, H ve S bileşimleri elementel analiz yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi *LD-LAM* polisakkaritindeki C atomlarının yüzdesi %39,20’den *LD-LAM-1* partikül formunda %28,30’a düşmüştür. Benzer şekilde, H atomlarının yüzdesi *LD-LAM* molekülünde %6,29 olarak bulunmuş ve partikül formunda bu değerin %3,97’ye düştüğü gözlemlenmiştir. Bu değişim doğal *LD-LAM* polisakkaritinin yapısına yeni bir malzemenin katıldığına göstergesidir.

Tablo 2

*LD-LAM*, *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin kütlece elementel bileşimleri.

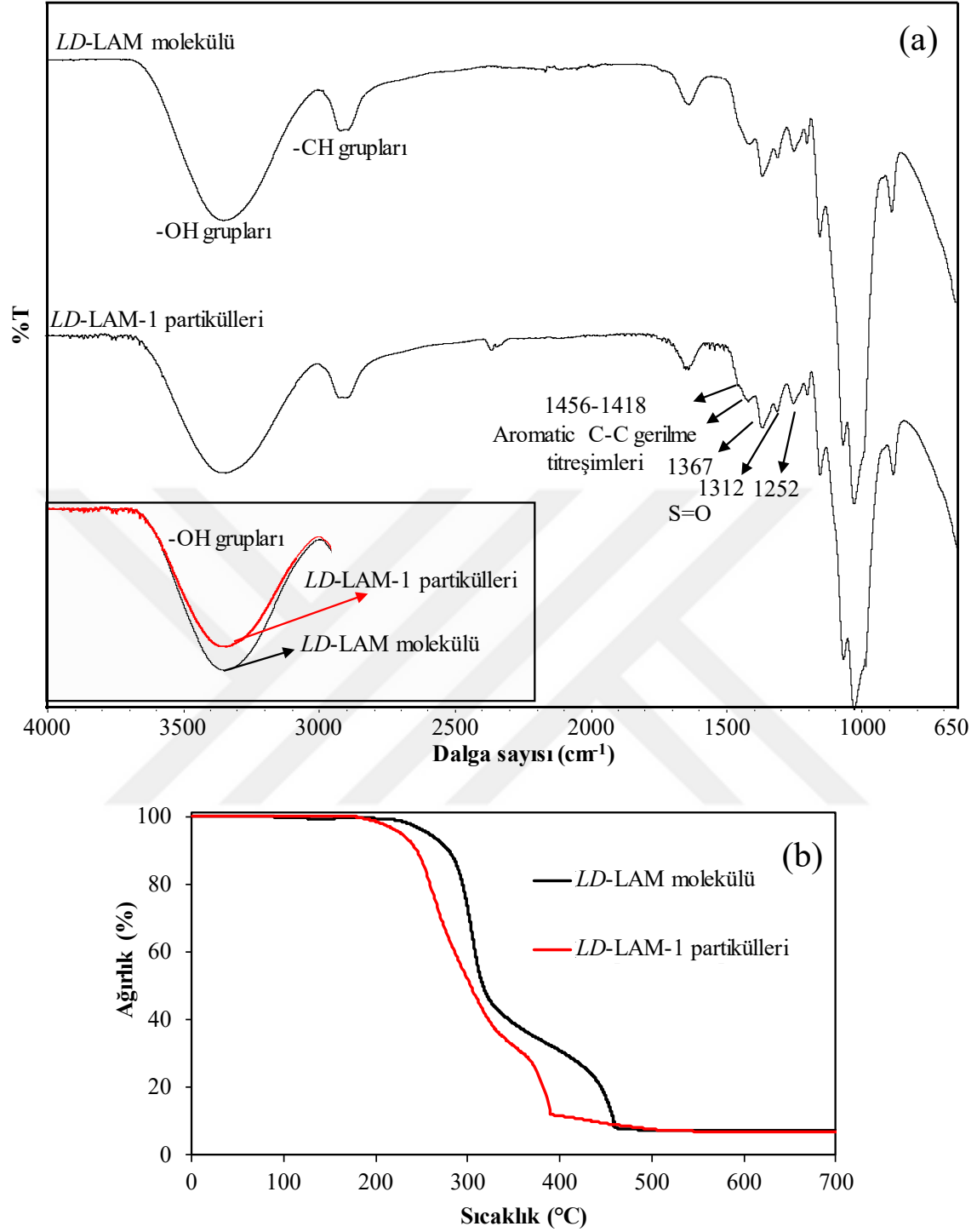
Malzemeler	Elementel Bileşim (%)		
	C	H	S
<b><i>LD-LAM</i> polisakkariti</b>	39,20	6,29	-
<b><i>LD-LAM-1</i> partikülleri</b>	28,30	3,97	6,10
<b><i>LD-LAM-2</i> partikülleri</b>	26,50	3,82	7,81

Beklenildiği üzere *LD-LAM* polisakkaritlerinin yapısında S atomuna rastlanmazken, DVS ile çapraz bağlanma sonrasında elde edilen *LD-LAM-1* partiküllerinin yapısında %6,1 oranında S elementi tespit edilmiştir. Buradan çapraz bağlanma reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır (Can ve Sahiner, 2021). *LD-LAM-1* partikül sentezi sırasında ortama *LD-LAM* polisakkaritinin tekrar eden birimindeki her iki glikoz molekülüne göre molce %100 oranında DVS molekülü eklenmiştir. Buna karşılık *LD-LAM-1* partiküllerinin elementel analizi sonucunda elde edilen %S değeri çapraz bağlanma oranının %84,6 olduğunu tespit edilmiştir.

*LD-LAM-1* partiküllerinin fonksiyonel grup analizleri FT-IR spektroskopisi ile yapılmıştır. *LD-LAM* molekülü ve *LD-LAM-1* partiküllerinin FT-IR spektrumları Şekil 4 (a)'da verilmiştir. Görüldüğü gibi, *LD-LAM* molekülü ve *LD-LAM* partiküllerinde  $3335\text{ cm}^{-1}$ 'de geniş bir bant olarak kaydedilen –OH gerilme frekansının % geçirgenliğinin *LD-LAM* partiküllerinde artmış olması *LD-LAM* partiküllerinde polisakkarit zincirlerindeki serbest –OH gruplarının azaldığını göstermektedir. Bunun yanında,  $2888\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler C-H gruplarından gelmektedir. DVS biyomoleküllerden mikro/nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır (Can ve Sahiner, 2021; Kurt vd., 2021; Sahiner, 2018a; Shimojo vd., 2015). DVS ile çapraz bağlı *LD-LAM-1* partiküllerinin FT-IR spektrumunda, –OH gruplarının sayısındaki azalmaya ek olarak,  $1367$ ,  $1312$ ,  $1215$  ve  $1067\text{ cm}^{-1}$ 'de kaydedilen pikler, DVS'den gelmekte olup yapıda S=O

gruplarının varlığını göstermektedir (Can vd., 2019; Can ve Sahiner, 2021; Sahiner vd., 2014a). DVS'nin FT-IR piklerinden bazıları, doğal *LD-LAM* polisakkaritinin pikleriyle örtüşmektedir. Ancak *LD-LAM-1* partikülleri yapısındaki DVS'ye ait çapraz bağlayıcı pikleri, literatürde rapor edilen DVS ile çapraz bağlı karbonhidrat esaslı mikro/nanopartiküllerinde de benzer şekilde gözlenmiştir (Can vd., 2019; Sahiner vd., 2014a; Sahiner vd., 2014b). *LD-LAM-1* partiküllerinin FT-IR spektrumları, optik mikroskop ve SEM görüntüleri ve elementel analiz sonuçları çapraz bağlı *LD-LAM-1* partiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır.





Şekil 4. LD-LAM molekülü ve LD-LAM-1 partiküllerinin (a) FT-IR spektrumları ve (b) TGA grafikleri.

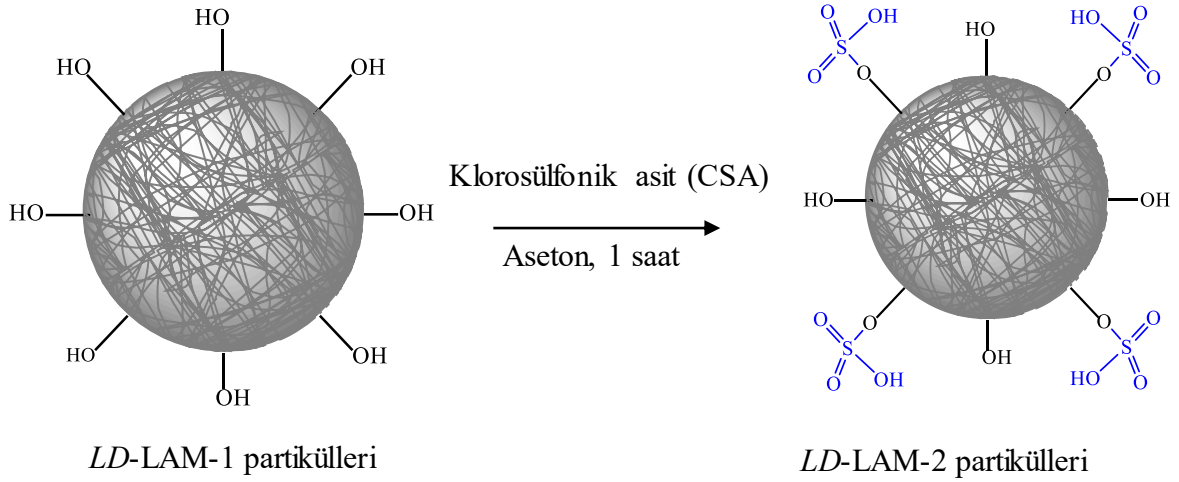
LD-LAM molekülü ve LD-LAM-1 partiküllerinin termal kararlılıkları TGA ölçümleri ile yapılmıştır ve sıcaklığa bağlı elde edilen ağırlık kaybı Şekil 4 (b)'deki grafikte



verilmiştir. Verilen TGA grafiğine göre, *LD-LAM* molekülü 218-319 °C arasında %52,0 ve 319-532 °C arasında %92,9 ağırlık kaybı göstermiştir. Çapraz bağlı *LD-LAM-1* partiküllerinin termogramları incelendiğinde ise, partiküllerin termal olarak ilk bozunmaya başladığı sıcaklığın 173 °C'ye düşerek 390 °C'ye kadar %92,6 ağırlık kaybı gösterdiği ve 390-626 °C arasında kümülatif olarak ağırlığının %93,2'sini kaybettiği gözlemlenmiştir. *LD-LAM* molekülü ve *LD-LAM-1* partikülleri için 700 °C'de gözlemlenen sırasıyla %7,1 ve %6,8 kalıntılarının şeker birimlerinin yanmasıyla oluşan karbon siyahından oluştuğu düşünülmektedir.

### ***LD-LAM-1* mikro/nano partiküllerinin modifikasyonu**

*LD-LAM-1* partikülleri, yapısındaki çok sayıda hidroksil gruplarından dolayı işlevselleştirme ve kimyasal modifikasyonlar için oldukça uygundur. Partiküllerinin kolay bir şekilde modifiye edilebilirliğini göstermek ve yeni özellikler kazandırmak amacıyla *LD-LAM-1* partikülleri, *CSA* molekülü ile modifiye edilmiştir ve elde edilen partiküller *LD-LAM-2* partikülleri olarak isimlendirilmiştir. *LD-LAM-1* partiküllerinin modifikasyon şeması Şekil 5'te verilmiştir. *CSA* molekülündeki -Cl atomlarının, *LD-LAM* partiküllerinde bulunan -OH gruplarına nükleofilik atak yapması ile sülfonik asit (-SO<sub>3</sub>) grupları -OH gruplarındaki oksijen atomlarından bağlanması ile *LD-LAM-2* partikülleri elde edilmiştir.



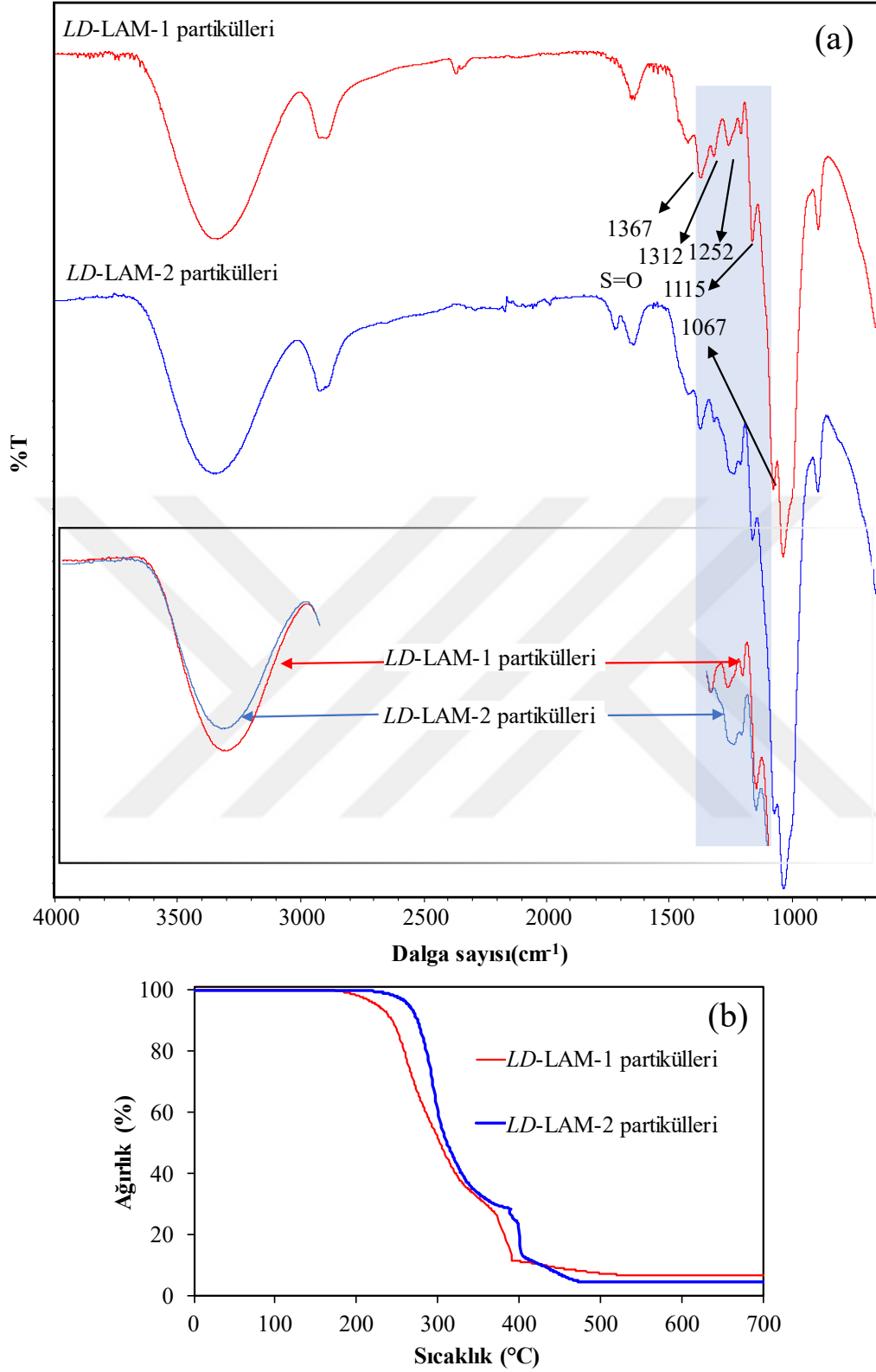
Şekil 5. *LD-LAM-1* partiküllerinin CSA molekülü ile modifikasyonunun şematik gösterimi.

Tablo 1’den anlaşılacağı gibi, CSA modifikasyonundan önce  $-18,7 \pm 3,7$  mV olarak ölçülen *LD-LAM-1* partiküllerinin zeta potansiyel değeri modifikasyondan sonra  $-24,9 \pm 1,3$  mV olarak ölçülmüştür. Ayrıca, *LD-LAM-1* partiküllerinin modifikasyondan önce  $724,2 \pm 94,1$  nm olarak belirlenen ortalama hidrodinamik partikül çapı, modifikasyondan sonra yaklaşık olarak iki katına çıkarak  $1408,9 \pm 210,6$  nm olarak bulunmuştur. *LD-LAM-2* partikülleri  $5,0 \mu\text{m}$  ve  $2,5 \mu\text{m}$  gözenek boyutuna sahip filtrelerden süzildükten sonra partiküllerin ortalama hidrodinamik çapı sırasıyla  $670,1 \pm 99,1$  nm ve  $502,6 \pm 56,3$  nm olarak ölçülmüştür. Mikro/nanopartiküllerin yapısına dahil edilen iyonlaşabilir fonksiyonel grupların iyonize olmuş gruplar arasındaki elektrostatik ve sterik etkileşimler ve ayrıca iyonik şiddet, yük yoğunluğu gibi diğer parametrelerden dolayı partiküllerin şişme kapasiteleri ve şişme kinetikleri üzerinde önemli etkileri olduğu bildirilmiştir (Adroher-Benítez vd., 2015; Fernández-Nieves vd., 2000; Reid vd., 2017). Dolayısı ile *LD-LAM-2* partiküllerinin hidrodinamik çaplarındaki artış partikül yapısına eklenen  $-\text{SO}_3^-$  grupları arasındaki elektrostatik itme etkileşimlerinden dolayı ve partikül yüzeyindeki serbest  $-\text{OH}$  gruplarının azalmasından kaynaklı zincirler arası hidrojen bağı kuvvetlerinin zayıflamasıyla *LD-LAM-2* partiküllerinin *LD-LAM-1* partiküllerine göre daha çok şişmiş olabileceğini göstermiştir.

Modifiye *LD-LAM-2* partiküllerinin elemental bileşimi Tablo 2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi *LD-LAM-1* partiküllerinin %S bileşimi CSA ile modifikasyondan sonra

%6,10'dan %7,81'e yükselmiştir. Bu sonuçlardan, *LD-LAM-1* partiküllerinin CSA modifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Ayrıca, modifikasyon aşamasında ortama eklenen CSA moleküllerinin miktarına göre modifikasyon verimi %31,5 olarak hesaplanmıştır.

*LD-LAM-1* ve modifiye *LD-LAM-2* partiküllerinin FT-IR spektrumları ve TGA eğrileri Şekil 6 (a) ve (b)'de karşılaştırılmıştır. Verilen FT-IR spektrumlarında görüldüğü gibi -OH gerilme titreşimleri için, CSA modifikasyonu sonrasında kaydedilen piklerin geçirgenliğinin artması *LD-LAM-1* partikülleri yüzeyinde serbest -OH grupları sayısının azaldığına işaret etmektedir. Ayrıca, 1367, 1312, 1252, 1205, 1115 ve 1067  $\text{cm}^{-1}$ 'de kaydedilen karakteristik S=O gerilme frekansının geçirgenliğinin azalması S=O gruplarından gelen titreşimlerin yoğunluğunun arttığını göstermiştir. Dolayısı ile zeta potansiyeli ve DLS ölçümlerine ek olarak, *LD-LAM-1* partiküllerinin CSA molekülü ile modifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 6. LD-LAM-1 ve LD-LAM-2 partiküllerinin (a) FT-IR spektrumları ve (b) TGA grafikleri.

Şekil 6 (b)'de verilen TGA sonuçları incelendiğinde, *LD-LAM* partiküllerinin 173 °C'de kaydedilen termal bozunma başlangıç sıcaklığının 216 °C'ye kaydığı ve dolayısı ile *LD-LAM-2* partiküllerinin *LD-LAM-1* partiküllerine göre termal kararlılığının arttığı görülmüştür. *LD-LAM-2* partikülleri 216-400 °C arasında %80,7 ağırlık kaybına uğramış ve partiküllerin termal bozunması 493 °C'de başlangıç ağırlığının kümülatif olarak %95,4'ünü kaybetmesinin ardından %4,6 kalıntı ile sonlanmıştır. *LD-LAM* molekülü, *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin termal bozunma basamakları ve 700 °C' de kaydedilen %kalıntı miktarları Tablo 3'te karşılaştırılmıştır.

Tablo 3

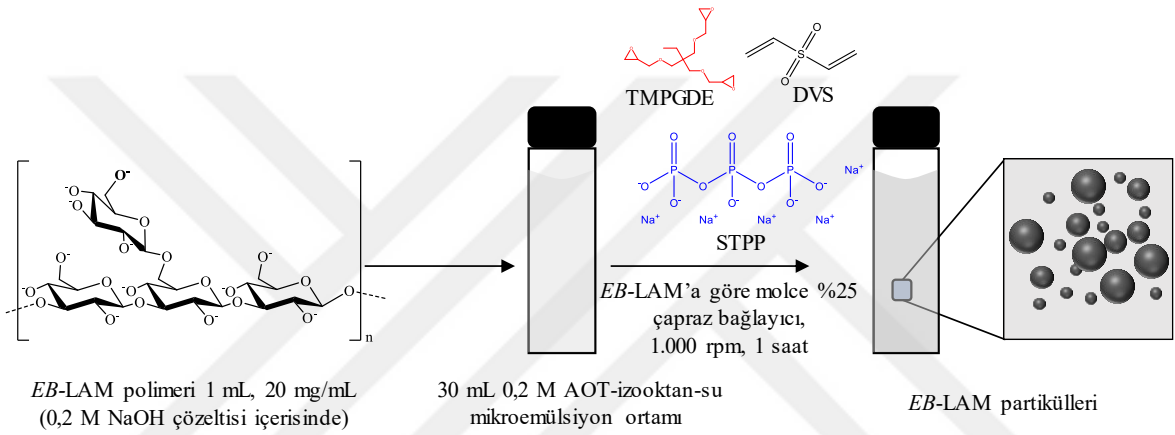
*LD-LAM*, *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin termal bozunma değerleri.

Malzemeler	Termal bozunma basamakları (°C)		700 °C'de ölçülen ağırlık (%)
	I	II	
<b><i>LD-LAM</i> molekülü</b>	218-319	319-532	7.1
<b><i>LD-LAM-1</i> partikülleri</b>	173-390	390-626	6.8
<b><i>LD-LAM-2</i> partikülleri</b>	216-400	400-493	4.6

Özetle, TGA ölçümü sonuçlarından *LD-LAM* molekülünün DVS ile çapraz bağlanması sonrasında *LD-LAM-1* partiküllerinin bozunmaya başladığı sıcaklığın düşerek termal kararlılığının bir miktar azaldığı tespit edilmiştir. Buna karşın CSA ile modifiye edilmiş *LD-LAM-2* partiküllerin bozunmaya başladığı sıcaklığın, doğal *LD-LAM* molekülünün başlangıç termal bozunma sıcaklığına yakın olduğu bulunmuştur. 700 °C'de ölçülen kalıntı miktarlarının *LD-LAM* molekülünden *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerine doğru azaldığı görülmüştür.

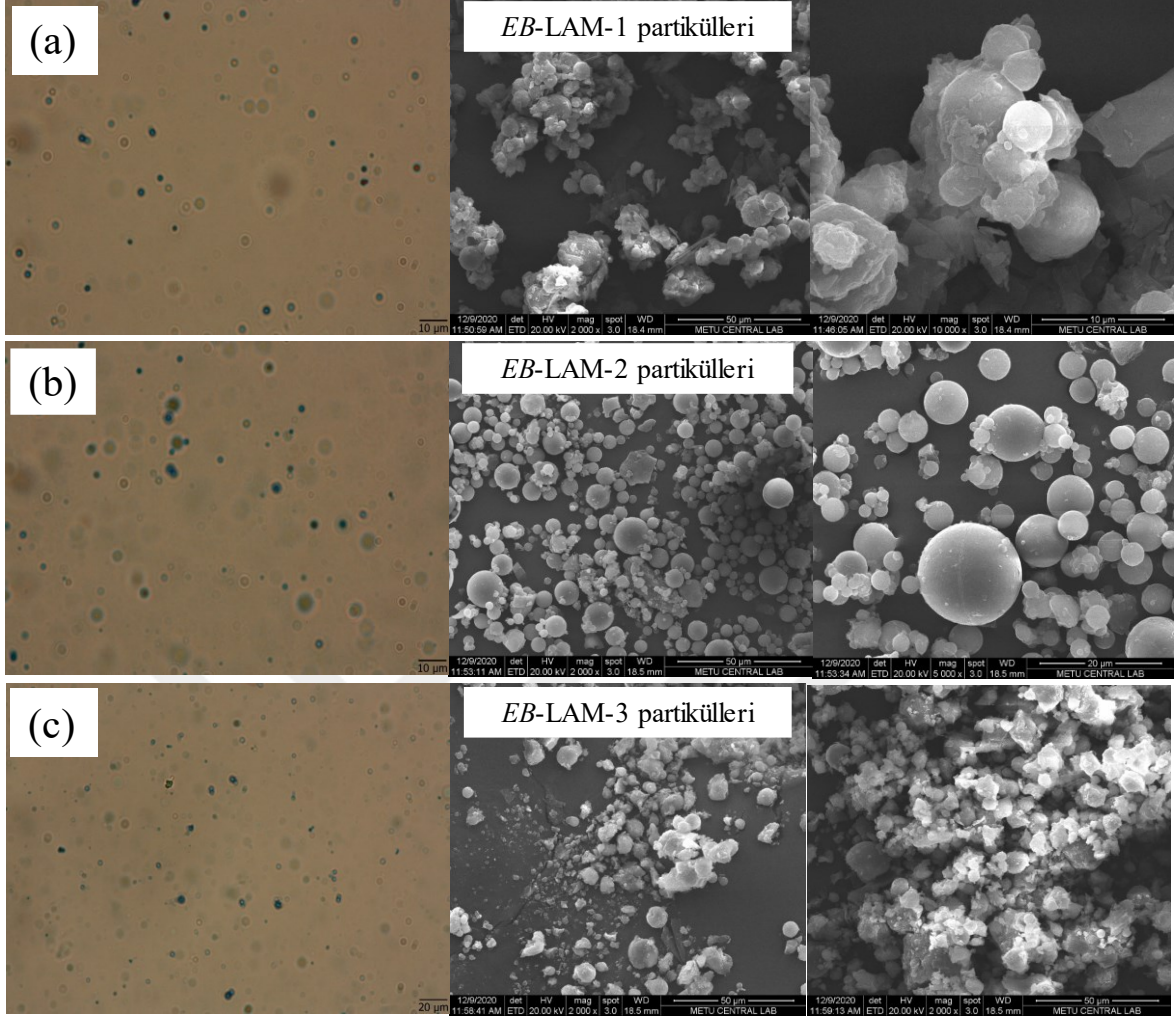
## EB-LAM mikro/nano partiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu

EB-LAM esaslı partiküllerinin sentezi, EB-LAM polimerinin tekrar eden birimine göre molce %25 oranında DVS, TMPGDE ve STPP çapraz bağlayıcıları kullanılarak AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve sırasıyla EB-LAM-1, EB-LAM-2 ve EB-LAM-3 partikülleri elde edilmiştir. EB-LAM partiküllerinin AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu ile sentezi Şekil 7’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 7. EB-LAM-1, EB-LAM-2 ve EB-LAM-3 partiküllerinin AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezinin şematik olarak gösterimi.

Vinil, epoksi veya fosfat grubu içeren çapraz bağlayıcılar, bazik koşullarda EB-LAM molekülünün serbest hidroksil (-OH) gruplarına doğrudan bağlanarak çapraz bağlı partiküller hazırlanmıştır. EB-LAM'ın bazik ortamda aktifleşmesiyle oluşan alkoksi grupları (R-O-) DVS üzerinde bulunan vinil gruplarına nükleofilik reaksiyonu ile bağlanmış ve çapraz bağlanma EB-LAM'ın zincirler arası hidroksil grupları ile devam ederek çapraz bağlı küresel partiküller oluşmuştur. EB-LAM ve STPP arasındaki reaksiyonda ise bazik koşullarda STPP'nin fosfat gruplarının açılmasıyla polifosfat zinciri ile EB-LAM'ın hidroksil gruplarına bağlanarak gerçekleşmiştir. TMPGDE çapraz bağlayıcısının epoksi halkaları ise bazik ortamda aktive olarak (halka açılma reaksiyonu) EB-LAM molekülü üzerindeki aktif hidroksil gruplarından bağlandığı düşünülmektedir. EB-LAM partiküllerinin şekil ve boyut analizleri optik mikroskop ve SEM ile yapılmış ve görüntüleri Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. (a) *EB-LAM-1*, (b) *EB-LAM-2* ve (c) *EB-LAM-3* partiküllerinin optik mikroskop ve SEM görüntüleri.

Şekil 8 incelendiğinde *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin küresel yapıda ve 0,1 µm ile 15 µm arasında boyutlara sahip olduğu görülmüştür. *EB-LAM-2* partiküllerinin SEM görüntülerinden, partiküllerin boyut dağılımında *EB-LAM-1* ve *EB-LAM-3* partiküllerine göre mikron-altı partiküllerin dağılımının daha az olduğu anlaşılmaktadır. SEM görüntülerine ek olarak *EB-LAM* partiküllerinin hidrodinamik çapları DLS ve yüzey yükleri de zeta potansiyeli ölçümleri ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4

*EB-LAM* esaslı partiküllerinin zeta potansiyeli değerleri ve DLS ölçümleri ile belirlenen ortalama hidrodinamik çapları.

Malzemeler	Hidrodinamik Çap (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
<i>EB-LAM-1</i> partikülleri	370,5±8,4	-20,9±0,8
<i>EB-LAM-2</i> partikülleri	477,1±11,6	-17,3±0,3
<i>EB-LAM-3</i> partikülleri	239,3±4,6	-24,6±0,3

*EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin hidrodinamik çapları sırasıyla 370,5±8,4, 477,1±11,6 ve 239,3±4,6 nm olarak bulunmuştur. SEM görüntülerinde de görüldüğü gibi *EB-LAM-2* partiküllerinin boyutunun *EB-LAM-1* ve *EB-LAM-3* partiküllerine göre daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *EB-LAM-3* partiküllerinin DLS değerinin daha düşük olması bu partiküllerin dağılımında nanometre boyutlarındaki partikül yoğunluğunun daha fazla olduğunu göstermiştir. Hazırlanan *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin zeta potansiyelleri ise sırasıyla -20,9±0,8, -17,3±0,3 ve -24,6±0,3 mV olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi STPP çapraz bağlayısından gelen fosfat gruplarından dolayı en düşük zeta potansiyel değeri *EB-LAM-3* partiküllerinde gözlemlenmiştir. *EB-LAM-1* ve *EB-LAM-2* partikülleri karşılaştırıldığında ise DVS'den gelen sülfon gruplarının TMPGDE'den gelen hidroksil gruplarına kıyasla daha negatif yüzey yüküne sahip partiküller oluşturduğu görülmüştür.

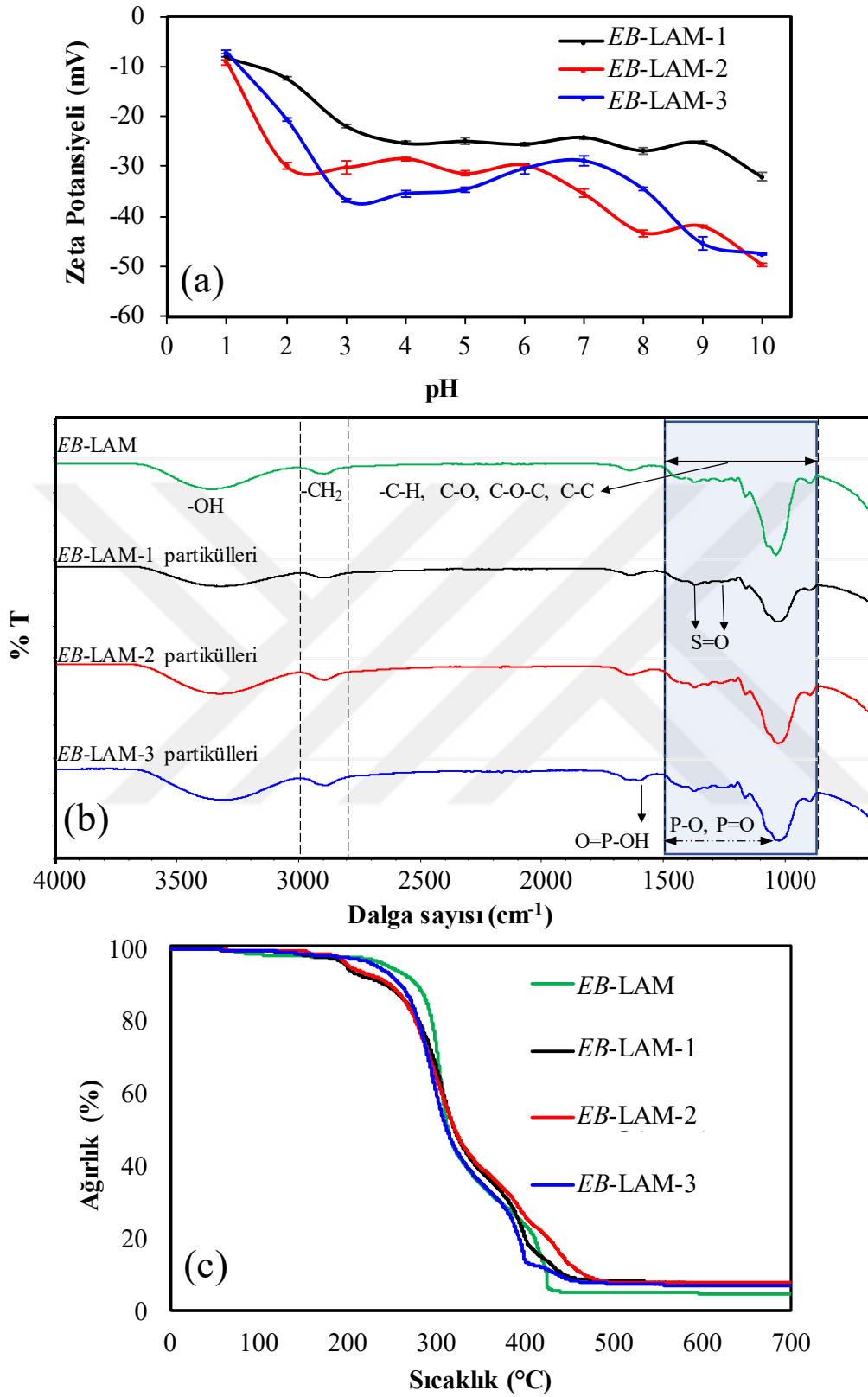
*EB-LAM* partiküllerinin pH 1-10 arasındaki zeta potansiyeli değerleri Şekil 9 (a)'da karşılaştırılmıştır. Verilen grafiklerde görüldüğü gibi sırasıyla DVS, TMPGDE ve STPP ile çapraz bağlı *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin fizyolojik pH değerinde (~pH 7) -24,1±0,1, -35,4±0,8 ve -28,9±1,1 mV yüzey yüküne sahip oldukları bulunmuştur.

*EB-LAM* partiküllerinin fonksiyonel grup analizleri FT-IR spektroskopisi ile yapılmış ve Şekil 9 (b)'de lineer *EB-LAM* molekülü ile karşılaştırılmıştır. *EB-LAM* moleküllerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde 3600-3000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında görülen ve 3365 cm<sup>-1</sup>'de merkezlenmiş geniş spektral bant *EB-LAM* moleküllerindeki



hidroksil gruplarından gelmektedir. 2892  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen pikler  $-\text{CH}_2$  gruplarından gelen  $-\text{C}-\text{H}$  gerilme titreşimlerine, 1423 ile 1371  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler  $-\text{C}-\text{H}$  bükülme titreşimlerine ve 1316  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler  $\text{C}-\text{O}$  gerilme titreşimlerine aittir. Ayrıca 1258 ve 1203  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  gerilme titreşimlerine, 1159, 1066, 1034 ve 892  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen karakteristik pikler ise (1-3) ve (1-6) bağlı  $\beta$ -glukanlara spesifik  $-\text{anomerik}$  bölge ve aromatik halkadaki  $\text{C}-\text{O}$  titreşimlerine aittir (Mecozzi vd., 2012; Šandula vd., 1999; Szeghalmi vd., 2007; Wiercigroch vd., 2017).

*EB-LAM-1* partiküllerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde DVS molekülünün vinil gruplarından *EB-LAM* molekülüne bağlanması ile partikül yapısında 2885  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{C}-\text{H}$  gerilme titreşimlerine ait piklerin ve ayrıca  $\text{C}-\text{C}$  ve  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  gruplarına ait pik şiddetlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, 1236 1262 ve 1275  $\text{cm}^{-1}$ 'de oluşan  $\text{S}=\text{O}$  gerilme pikleri DVS molekülünün partikül yapısına katıldığını göstermektedir (Can ve Sahiner, 2021; Sahiner vd., 2019b). *EB-LAM-2* partiküllerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde, TMPGDE moleküllerinin halka açılma reaksiyonu ile *EB-LAM* moleküllerine bağlanmasıyla partiküllerde oluşan  $-\text{CH}_2$ ,  $\text{C}-\text{C}$  ve  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  gruplarından dolayı, *EB-LAM* molekülünde de bulunan bu gruplara ait pik şiddetlerinin artması ile sonuçlanmıştır (Sahiner vd., 2019b). *EB-LAM-3* partiküllerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde STPP molekülünden gelen  $\text{P}=\text{O}$  ve  $\text{P}-\text{O}$  karakteristik gerilme piklerinin *EB-LAM* moleküllerinden gelen  $\text{C}-\text{C}$ ,  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  pikleri ile etkileşerek partiküllerin total spektrumunda küçük değişikliklere sebep olduğu görülmektedir. Bunlar, 1594  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $\text{O}=\text{P}-\text{OH}$  gruplarına ait yeni pik oluşumu, 1371, 1205, 1158 ve 981  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik şiddetlerinin artması, 1235  $\text{cm}^{-1}$ 'de yeni pik oluşumu ve ayrıca 1066  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikin kaybolması olarak 1034  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikin 1021  $\text{cm}^{-1}$ 'e kayması olarak özetlenebilir. *EB-LAM* partiküllerinin SEM görüntülerine ek olarak FT-IR spektrumlarından elde edilen sonuçlar partiküllerin ilgili çapraz bağlayıcılar ile başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir (Sahiner vd., 2016).



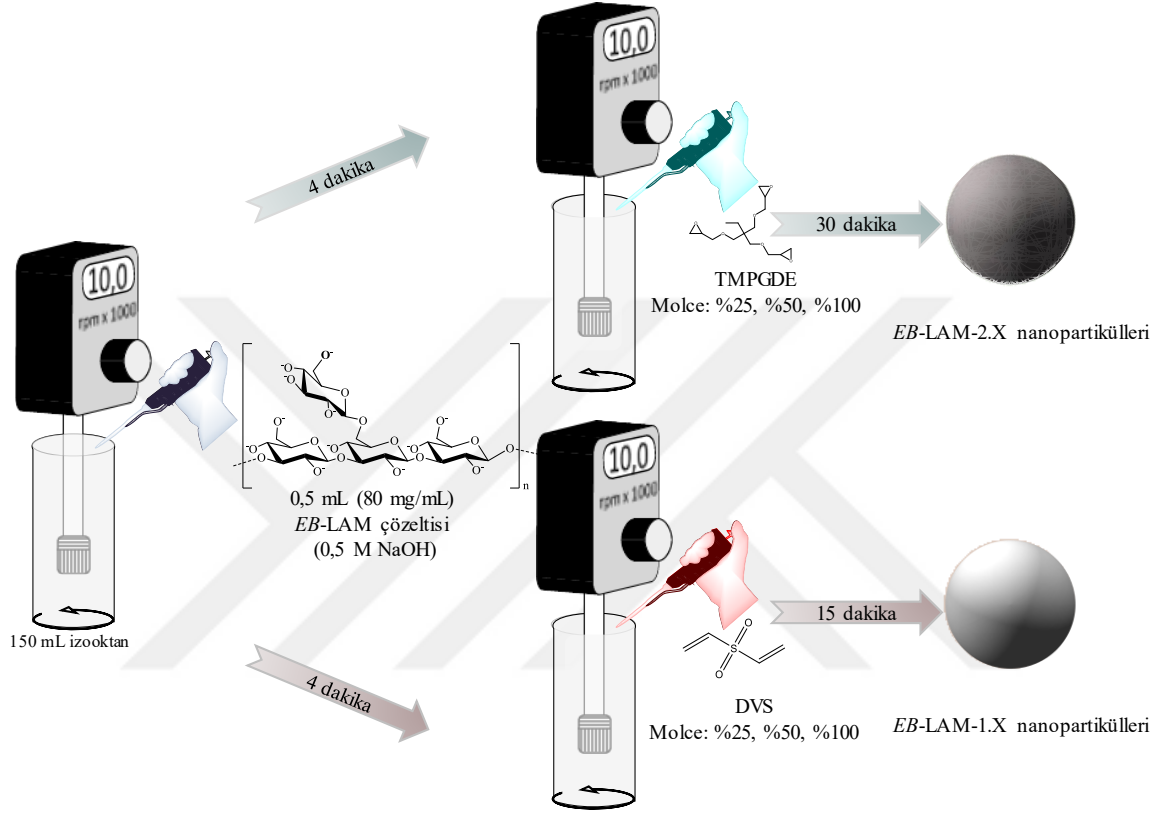
Şekil 9. LAM molekülü, *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin (a) farklı pH ortamlarındaki zeta potansiyeli değerleri, (b) FT-IR spektrumları ve (c) TGA termogramları.

*EB-LAM* partiküllerinin termal bozunma sıcaklıkları TGA ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 9 (c)'de karşılaştırılmıştır. Termogramlardan anlaşılacağı üzere *EB-LAM* molekülü ve *EB-LAM* partikülleri 70-700 °C arasında benzer termal bozunma göstermiştir. *EB-LAM* molekülünün termogramı incelendiğinde, 70-233 °C görülen %2'lik ağırlık kaybı bağlı olan suyun uzaklaşmasından kaynaklıdır. *EB-LAM* molekülü 233 °C ile 314 °C arasında ağırlığının %50,7'sini ve 314-470 °C arasında ise %94,9'unu kaybetmiştir. *EB-LAM* molekülü 700 °C'ye kadar ısıtıldığında toplam ağırlığının kümülatif olarak %95,1'ini kaybetmiş ve %4,9 kalıntı kaydedilmiştir. *EB-LAM-1* partiküllerinin 189 °C'ye kadar kaybettiği yaklaşık %3'lük ağırlık kaybı ile yapıdaki nem uzaklaşırken, bu sıcaklıkta başlayan termal bozunma 312 °C'de %44,3 ağırlık kaybı ile sonuçlanmıştır. Son adımda ise *EB-LAM-1* partikülleri 312 ile 451 °C arasında %90,7 ağırlık kaybı göstermiştir. Partiküllerin 700 °C'ye kadar ısıtılması ile %6,9 kalıntı gözlemlenmiştir. *EB-LAM-2* partiküllerinde ise 70-187 °C arasında yapıdaki nemden kaynaklı %2'lik ağırlık kaybının ardından 187 °C'den 328 °C'ye kadar ağırlığının %52'sini ve 328-470 °C arasında ise kümülatif olarak başlangıç ağırlığının %92'sini kaybettiği görülmüştür. *EB-LAM-2* partikülleri 700'ye kadar ısıtıldığında %6,5 kalıntı kaydedilmiştir. *EB-LAM-3* partiküllerinde ise 70-215 °C arasında yaklaşık %3'lük bir ağırlık kaybı ile nem uzaklaşırken termal bozunma 215-328 °C arasında %57,8 ve 328-524 °C arasında %92,6 kümülatif ağırlık kaybı gözlenmiştir. *EB-LAM-3* partiküllerinin 700 °C'de %6,5'inin bozunmadan kaldığı görülmüştür. *EB-LAM* moleküllerinin DVS, TMPGDE ve STPP ile çapraz bağlanması sonucu termal kararlılığının hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.1.2. *EB-LAM* esaslı nanopartiküllerin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu**

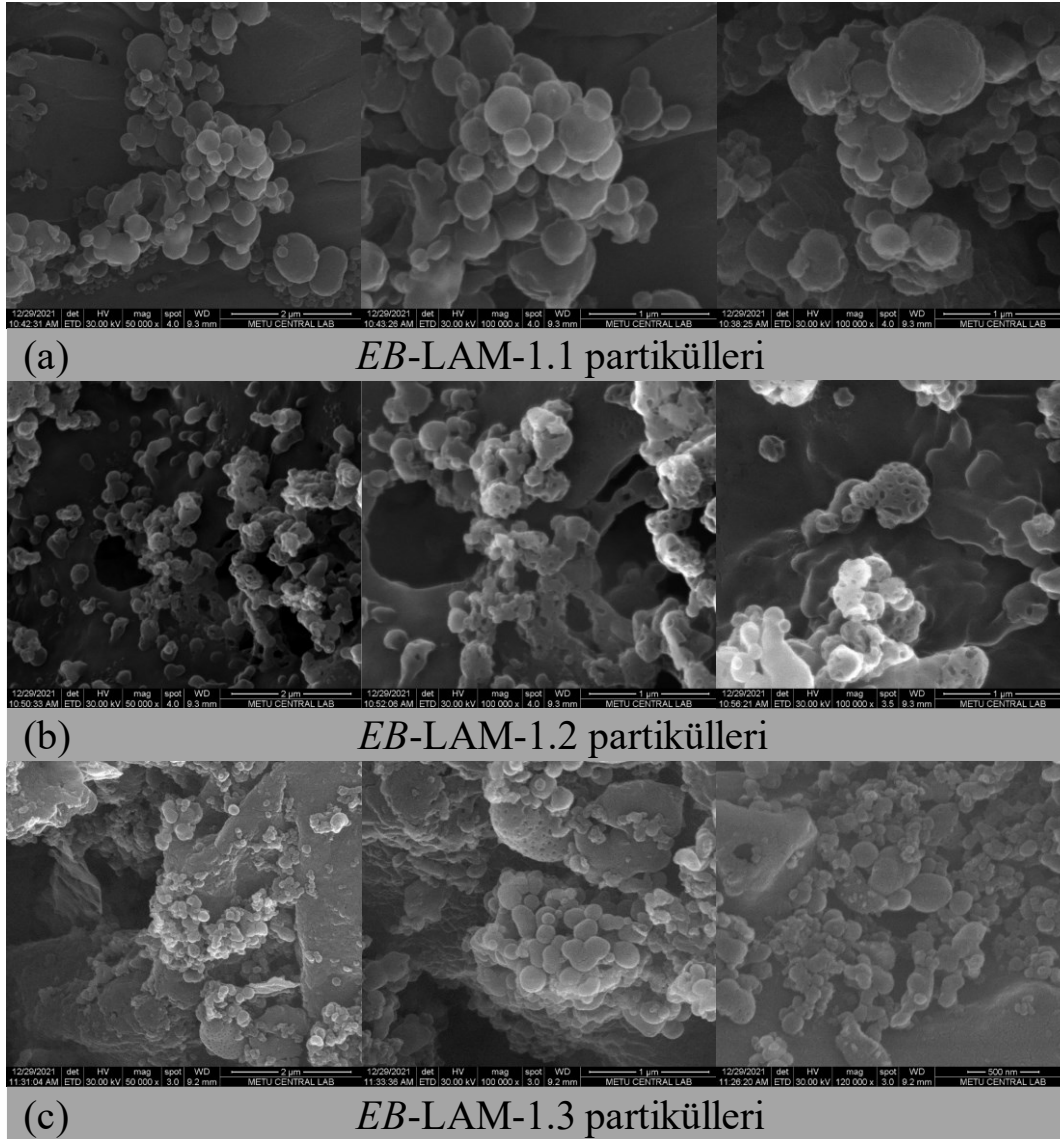
Mikro/nanopartiküllerin hazırlanmasında yüzey aktif madde içeren emülsiyon ortamlarının kullanılması, partiküllerin sentezi, temizlenmesi ve saflaştırılması adımlarında ekstra maliyet ve zaman gerektirmektedir. Bu maliyetli adımları ortadan kaldırmak için *EB-LAM* esaslı partiküllerin sentezi yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon ortamı olan izooktan-su ortamında gerçekleştirilmiştir. *EB-LAM* esaslı nanopartiküller *EB-LAM* polimeri, DVS ve TMPGDE çapraz bağlayıcıları kullanılarak polimerin tekrar eden birimine göre %25, %50 ve %100 gibi farklı oranlarda çapraz bağlayıcı ile reaksiyona sokularak hazırlanmıştır. DVS çapraz bağlayıcısı için %25, %50 ve %100 çapraz bağlayıcı oranları

ile elde edilen *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2* ve *EB-LAM-1.3* nanopartiküllerinin (*EB-LAM-1.X*) ve aynı oranlarda TMPGDE çapraz bağlayıcısı ile elde edilen *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2* ve *EB-LAM-2.3* nanopartiküllerinin (*EB-LAM-2.X*) sentez şeması Şekil 10'da verilmiştir.



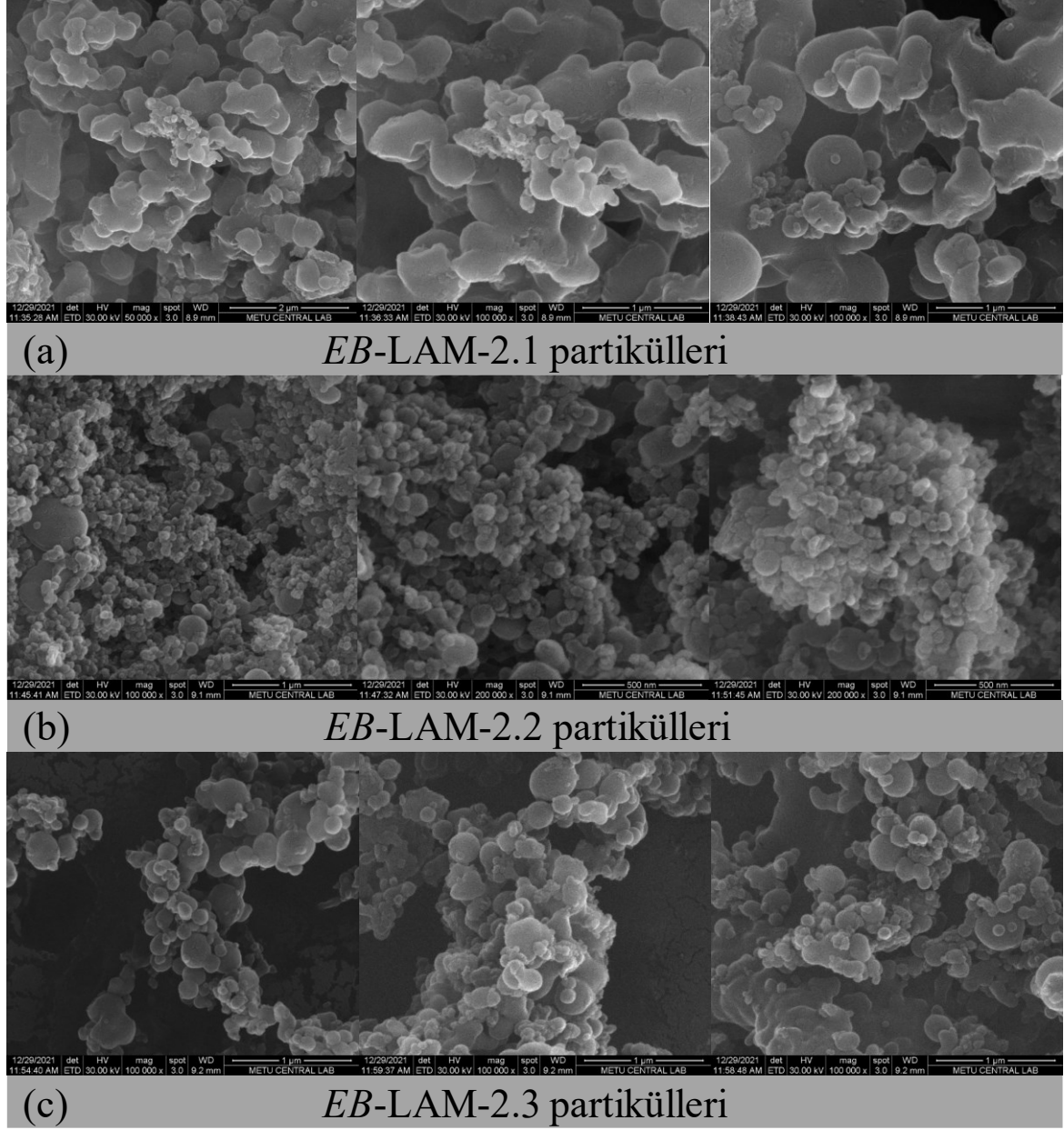
Şekil 10. *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon ortamında sentezinin şematik gösterimi.

Şekil 10'da gösterildiği gibi *EB-LAM* polimerinin bazık ortamda çözülmüş sulu çözeltisi 10.000 rpm 'de 150 mL izooktan üzerine damla damla eklenmiştir. Daha sonra, eklenen sulu polimer çözeltisinin izooktan fazında dağılması ve nanoemülsiyon damlacıklarının oluşması için, izooktan-su mikroemülsiyon ortamı 4 dakika 10.000'de karıştırılmış ve sonrasında belirtilen oranlarda DVS ve TMPGDE ortama eklenerek sırasıyla 15 ve 30 dakika reaksiyona tabi tutulmuştur. Ayrıca, 10.000 rpm gibi yüksek karıştırma hızı altında oluşan emülsiyon damlacıklarının nanopartiküller üretmesi beklenmektedir. Hazırlanan *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin morfolojik analizleri SEM ile gerçekleştirilmiştir. *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2* ve *EB-LAM-1.3* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 11 (a), (b) ve (c)'de verilmiştir.



Şekil 11. DVS ile çapraz bağlı (a) *EB-LAM-1.1*, (b) *EB-LAM-1.2* ve (c) *EB-LAM-1.3* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.

Şekil 11 incelendiğinde DVS ile çapraz bağlı *EB-LAM-1.X* nanopartiküllerinin oval ve küresel şekillerde olduğu görülmüştür. Hazırlanan *EB-LAM-1.X* nanopartiküllerin boyut dağılımının 30 nm ile 800 nm arasında değiştiği ve partikül dağılımının çoğunun 250 nm ve altında partiküllerden oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca, *EB-LAM-1.2* nanopartiküllerinin çoğunda ve *EB-LAM-1.3* nanopartiküllerinin ise bazılarında gözenekli küresel partiküllere rastlanmıştır. *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2* ve *EB-LAM-2.3* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 12 (a), (b) ve (c)'de verilmiştir.

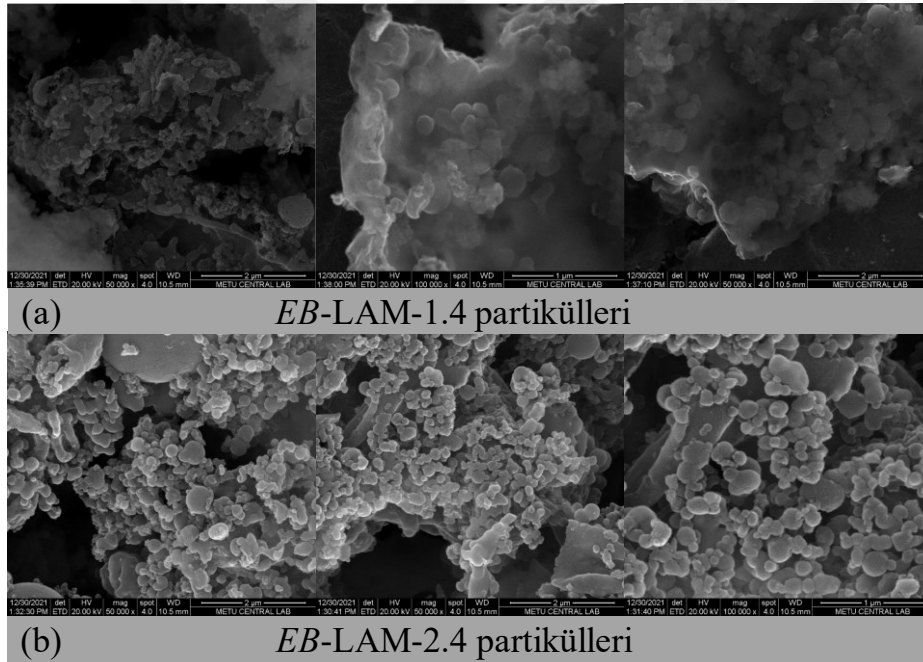


Şekil 12. TMPGDE ile çapraz bağlı (a) *EB-LAM-2.1*, (b) *EB-LAM-2.2* ve (c) *EB-LAM-2.3* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.

Şekil 12 incelendiğinde *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin oval ve küresel şekillerde olduğu görülmektedir. Şekil 12 (a) da verilen düşük oranda çapraz bağlayıcı içeren *EB-LAM-2.1* nanopartiküllerin görüntülerinde küresel şekilli partiküllerin yanında birbirine yapışık oval şekillerde partiküller olduğu görülürken, Şekil 12 (b) ve (c)'de verilen daha yüksek oranlarda çapraz bağlayıcı içeren *EB-LAM-2.2* ve *EB-LAM-2.3* partiküllerinin daha düzgün küresel şekillerde olduğu görülmektedir. Bu görüntülerden yola çıkarak, TMPGDE ile hazırlanan *EB-LAM-2.X* partikülleri için küresel geometrinin oluşmaya başladığı çapraz

bağlayıcı oranın %25'e yakın olduğu sonucuna varılmıştır. TMPGDE ile çapraz bağlı *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin boyut dağılımının 20 nm ile 750 nm arasında değiştiği ve partikül dağılımının çoğunun 20-250 nm arasında olduğu bulunmuştur. Şekil 12 (b)'de verilen *EB-LAM-2.2* nanopartiküllerinin SEM görüntülerinden, boyut dağılımı olarak partiküllerin çoğunun 150 nm ve altındaki boyutlarda olduğu görülmektedir.

Emülsiyon ortamının partikül şekli ve boyut dağılımına etkisini belirlemek amacı ile LAM nanopartikülleri izooktan-su emülsiyon ortamının yanında, sikloheksan-su-emülsiyon ortamı içerisinde de hazırlanmıştır. Sikloheksan-su ortamında hazırlanan DVS ile çapraz bağlı *EB-LAM-1.4* ve TMPGDE ile çapraz bağlı *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 13 (a) ve (b)'de verilmiştir.



Şekil 13. Sikloheksan-su emülsiyon ortamında hazırlanan (a) DVS ile çapraz bağlı *EB-LAM-1.4* ve (b) TMPGDE ile çapraz bağlı *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.

Görüntüler incelendiğinde, sikloheksan-su ortamında sentezlenen *EB-LAM-1.4* ve *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerinin küresel geometride olduğu ve boyut dağılımı olarak partiküllerin çoğunun 250 nm ve altında olduğu görülmektedir. Buradan *EB-LAM-1.4* ve *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerinin izooktan-su ortamında sentezlenen *EB-LAM-1.3* ve *EB-*

LAM-2.3 nanopartikülleri ile benzer boyut dağılımında olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, hazırlanan *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin hidrodinamik çapları ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 5’ te verilmiştir.

Tablo 5

*EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin zeta potansiyeli değerleri ve DLS ölçümleri ile belirlenen ortalama hidrodinamik çapları.

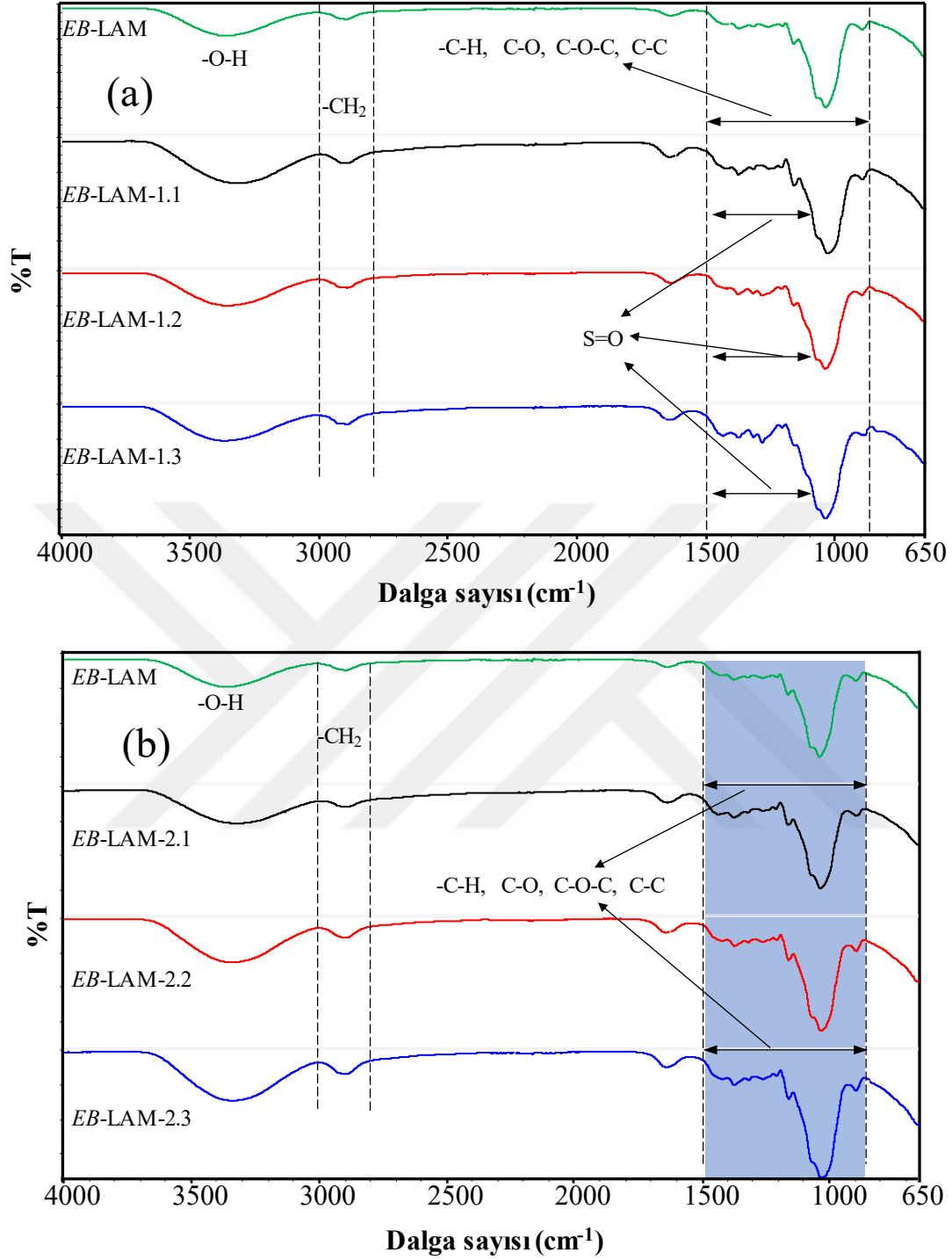
Malzemeler	Hidrodinamik çap (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
<i>EB-LAM-1.1</i> partikülleri	310,0±14,5	-19,9±0,4
<i>EB-LAM-1.2</i> partikülleri	291,1±4,6	-11,9±0,5
<i>EB-LAM-1.3</i> partikülleri	468,7±6,5	-19,4±0,4
<i>EB-LAM-1.4</i> partikülleri	304,0±16,0	-26,3±0,5
<i>EB-LAM-2.1</i> partikülleri	366,3±14,5	-18,4±0,3
<i>EB-LAM-2.2</i> partikülleri	125,5±2,6	-11,5±0,1
<i>EB-LAM-2.3</i> partikülleri	351,6±9,5	-17,3±0,3
<i>EB-LAM-2.4</i> partikülleri	385,6±12,6	-24,3±0,2

*EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2*, *EB-LAM-1.3* ve *EB-LAM-1.4* nanopartiküllerinin hidrodinamik çapları sırasıyla 310,0±14,5, 291,1±4,6, 468,7±6,5 ve 304,0±16,0 nm olarak ölçülmüştür. Farklı oranlarda DVS ile sentezlenen *EB-LAM-1.X* nanopartiküllerinin hidrodinamik çaplarının genel olarak benzer aralıkta olduğu anlaşılmaktadır. Ancak izooktan ortamında sentezlenen *EB-LAM-1.3* nanopartiküllerinin sikloheksan-su ortamında sentezlenen *EB-LAM-1.4* nano partiküllerine göre biraz daha büyük ortalama hidrodinamik çapa sahip olduğu bulunmuştur. *EB-LAM-1.X* nanopartiküllerinin SEM görüntüleri, partiküllerin %25, %50 ve %100 oranlarında DVS çapraz bağlayıcısı ile izooktan-su



ortamında ve %100 DVS oranında her iki çözücüde de başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır. Ayrıca, *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2*, *EB-LAM-1.3* ve *EB-LAM-1.4* nanopartiküllerinin yüzey yükleri sırasıyla  $-19,9\pm 0,4$ ,  $-11,9\pm 0,5$ ,  $-19,4\pm 0,4$  ve  $-26,3\pm 0,5$  mV olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlardan partiküllerin benzer yüzey yüküne sahip olduğu görülmektedir. *EB-LAM-1.2* partiküllerinin diğer *EB-LAM-1.X* partiküllerine göre biraz daha pozitif yüzey yüküne sahip olması, bu partiküllerin gözenekli olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Farklı oranlarda TMPGDE ile sentezlenen *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2*, *EB-LAM-2.3* ve *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerinin hidrodinamik çapları sırasıyla  $366,3\pm 14,5$ ,  $125,5\pm 2,6$ ,  $351,6\pm 9,5$  ve  $385,6\pm 12,6$  nm olarak ölçülmüştür. *EB-LAM-2.X* partiküllerinin hidrodinamik çaplarının benzer olduğu ancak *EB-LAM-2.2* partiküllerinin SEM görüntülerinden de anlaşılabilen gibi partiküllerin boyut dağılımında 150 nm ve altında partikül sayısının daha fazla olmasıyla diğer *EB-LAM-2.X* partiküllerine kıyasla daha küçük ortalama boyut çapına sahip olduğu bulunmuştur. Bunun dışında farklı emülsiyon ortamlarında hazırlanan *EB-LAM-2.3* ve *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerin ise benzer hidrodinamik çaplara sahip olduğu görülmektedir. Buradan izooktan-su ve sikloheksan su ortamlarının ikisinin de *EB-LAM* polimerinden TMPGDE çapraz bağlayıcısı ile küresel nanopartiküller elde edebilmek için uygun birer çözücü olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca TMPGDE ile sentezlenen *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerin DVS ile sentezlenen *EB-LAM-1.X* nanopartiküllerine benzer şekilde negatif yüzey yüklerine sahip olduğu bulunmuştur. *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2*, *EB-LAM-2.3* ve *EB-LAM-2.4* nanopartiküllerin yüzey yükleri sırasıyla  $-18,4\pm 0,3$ ,  $-11,5\pm 0,1$ ,  $-17,3\pm 0,3$  ve  $-24,3\pm 0,2$  mV olarak ölçülmüştür. Özetle, *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin sentezlen diğer LAM esaslı partiküller ile benzer yüklere sahip olduğu bulunmuştur. LAM esaslı partiküllerin farklı sentez yöntemleri ve karıştırma hızı gibi reaksiyon parametreleri ile küresel geometride ve ayarlanabilir boyut aralıklarında sentezlenebileceği gösterilmiştir. *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerinin FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 14 (a) ve (b)'de verilmiştir.



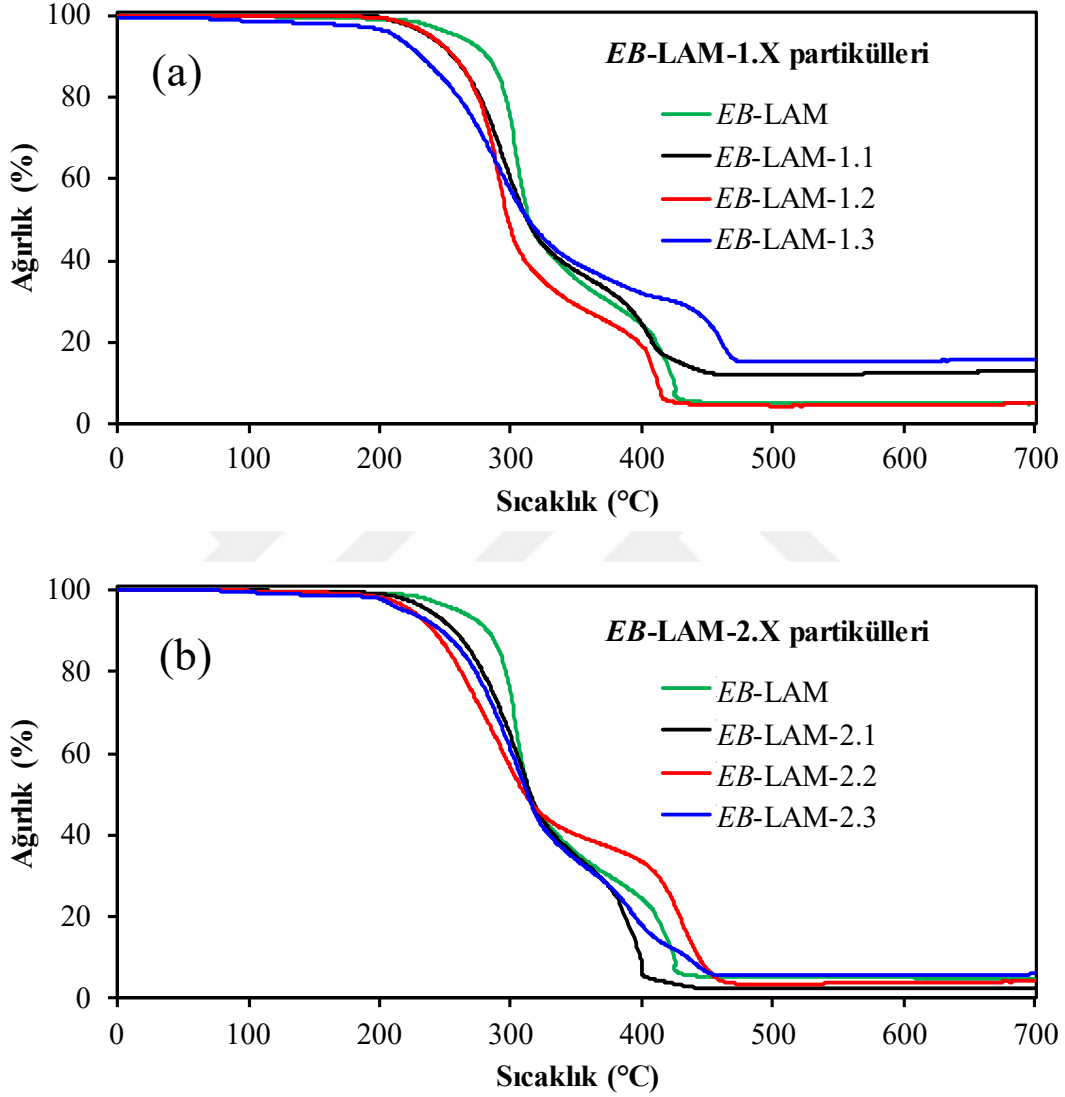
Şekil 14. (a) *EB-LAM-1.X* ve (b) *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları.

Şekil 14 (a)'da verilen spektrumlar incelendiğinde *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2* ve *EB-LAM-1.3* partikülleri için sırasıyla 3349, 3365 ve 3369 cm<sup>-1</sup>'de merkezlenen geniş spektral bantlar partiküllerde bulunan -OH gruplarından gelmektedir. Aynı sıra ile 2888,

2891 ve 2890  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen pikler  $-\text{CH}_2$  gruplarından gelen  $-\text{C}-\text{H}$  gerilme titreşimlerine, 1422-1372  $\text{cm}^{-1}$  aralığında kaydedilen pikler  $-\text{C}-\text{H}$  bükülme titreşimlerine, yaklaşık 1314  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen pik ise  $-\text{C}-\text{O}$  gerilme titreşimlerine aittir. Ayrıca, yaklaşık 1158, 1028 ve 894  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen piklerin (1-3) ve (1-6) bağlı  $\beta$ -glukanlara spesifik anomerik bölge ve halkadaki  $\text{C}-\text{O}$  titreşimlerine ait olup  $\beta$ -glukan yapısının korunduğunu göstermektedir (Šandula vd., 1999; Szeghalmi vd., 2007; Wiercigroch vd., 2017). Son olarak, 1255-1280  $\text{cm}^{-1}$  civarı ve 1205  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısında görülen pikler DVS'den gelen  $\text{S}=\text{O}$  gerilme piklerine ait olup, *EB-LAM* polimerinin 1258 ve 1203  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  gerilme titreşimleri ile etkileştiği görülmektedir. Bu durum, yukarıda belirtilen DVS ile çapraz bağlı diğer LAM esaslı partiküllerde de görülmüştür. Şekil 14 (b)'de verilen *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde TMPGDE molekülünden gelen  $-\text{CH}_2$ ,  $\text{C}-\text{C}$  ve  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  gruplarının *EB-LAM* polimerinin spektrumunda değişiklik oluşturmazken, polimerin bu gruplara ait pik şiddetlerinin artmasına sebep olmuştur (Sahiner vd., 2019b).

*EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerinin termal bozunma sıcaklıkları TGA analizleri ile belirlenmiş ve termogramlar sırasıyla Şekil 15 (a) ve (b)'de *EB-LAM* molekülü ile karşılaştırılarak verilmiştir. *EB-LAM* molekülünün termogramı incelendiğinde, 70-233  $^{\circ}\text{C}$  arasında görülen %2'lik ağırlık kaybı bağlı-suyun uzaklaşmasından kaynaklanmıştır. *EB-LAM* molekülü 233  $^{\circ}\text{C}$  ile 314  $^{\circ}\text{C}$  arasında ağırlığının %50,7'sini ve 314-470  $^{\circ}\text{C}$  arasında ise %94,9'unu kaybetmiştir. *EB-LAM* molekülü 700  $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtıldığında toplam ağırlığının kümülatif olarak %95,1'ini kaybetmiş ve %4,9 kalıntı kaydedilmiştir. Şekil 15 (a)'da verilen DVS ile çapraz bağlı *EB-LAM-1.X* partiküllerinin termogramları incelendiğinde, *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2* ve *EB-LAM-1.3* partikülleri için sırasıyla 70  $^{\circ}\text{C}$ 'den 220, 220 ve 156  $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar olan %2,2, %2,0 ve %2,0'lik ağırlık kaybı yapıdaki nemin uzaklaşmasından kaynaklıdır. Partiküllerin bu sıcaklıklarda başlayan termal bozunmasının 312  $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar aynı sırayla %49,7, %60,5 ve %49,5 ağırlık kaybına sebep olduğu görülmüştür. Son adımda *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2* ve *EB-LAM-1.3* nanopartikülleri 312  $^{\circ}\text{C}$ 'den 481, 504 ve 485  $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar sırasıyla başlangıç ağırlıklarının kümülatif olarak %88,1, %95,6 ve %84,9 unu kaybetmiştir. *EB-LAM-1.X* nanopartiküllerin 700  $^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtılması sonucu aynı sıra ile %11,9, %4,4 ve %15,1 kalıntı gözlenmiştir. Yapıdaki çapraz bağlayıcı yüzdesi arttıkça partiküllerin termal kararlılıklarının artmasına

karşın, %50 çapraz bağlı *EB-LAM-1.2* partiküllerinin %100 çapraz bağlı *EB-LAM-1.3* partiküllerinden daha fazla bozunmasının yapıdaki gözeneklerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 15 (a) DVS ile çapraz bağlı *EB-LAM-1.X* ve (b) TMPGDE ile çapraz bağlı *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin TGA termogramları.

*EB-LAM-2.X* partiküllerinin termogramları incelendiğinde, *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2* ve *EB-LAM-2.3* partikülleri için sırasıyla 70 °C'den 216,9, 202,7 ve 198,1 °C'ye kadar kaybedilen %2,0'lik ağırlık kaybı ile partiküllerin yapısındaki nem uzaklaşırken 216,9-314,8, 202,7-311,0 ve 198,1-311,7 °C arasındaki sıcaklıklarda sırasıyla %49,8, %50,0

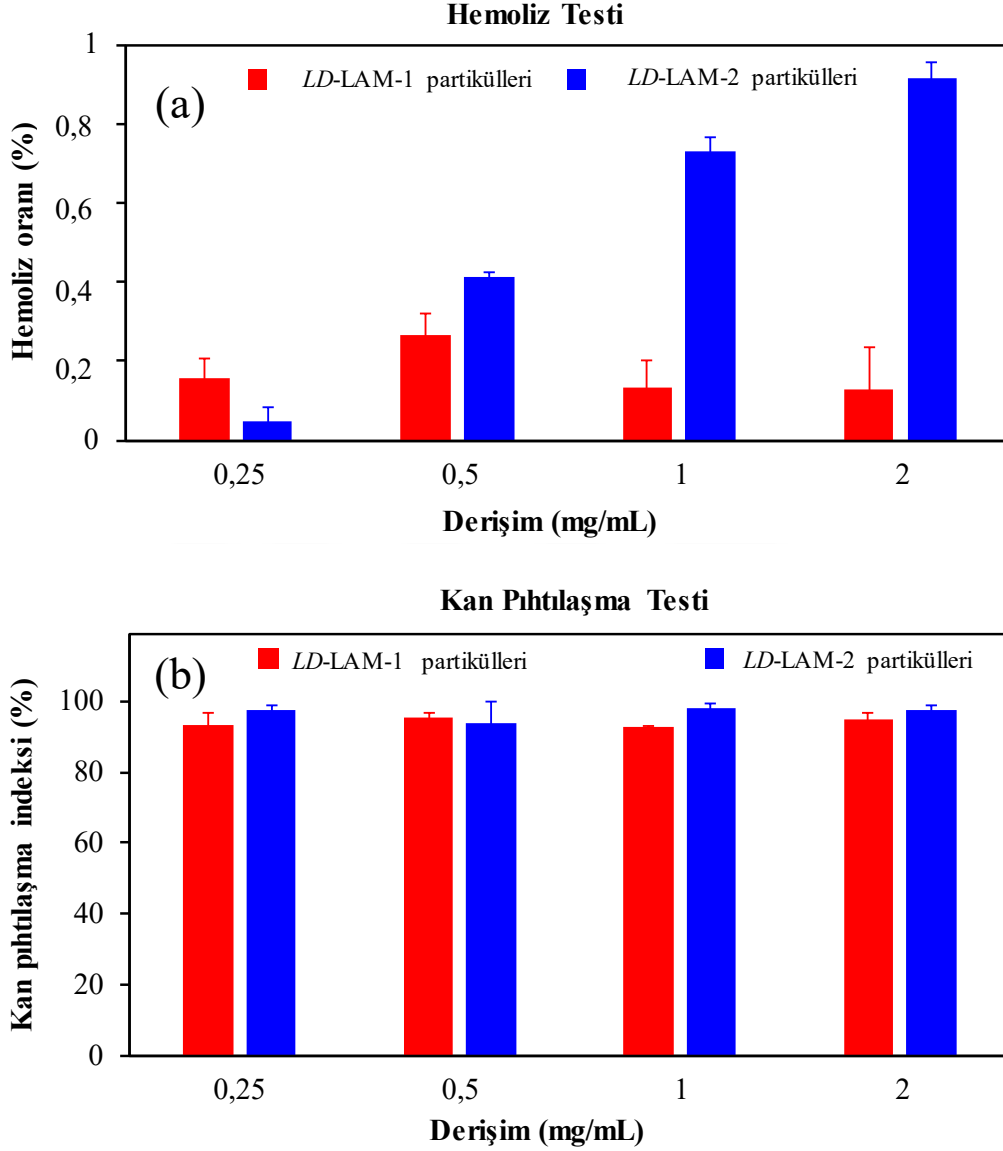
ve %49,2 ağırlık kaybı gözlenmiştir. Son adımda, *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2* ve *EB-LAM-2.3* partiküllerinin sırasıyla 314,8-470,0, 311,0-496,8 ve 311,7-481,7 °C arasındaki sıcaklıklarda başlangıç ağırlıklarının %97,6 %96,5 ve %94,4'ünü kaybettiği görülmüştür. *EB-LAM-2.X* partiküllerinin 700 °C'ye kadar ısıtılmasıyla aynı sıra ile %2,4, %3,5 ve %5,6 kalıntı kaydedilmiştir. *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerinin termal bozunma analizleri sonucunda çapraz bağlayıcı oranı arttıkça *EB-LAM* polimerine kıyasla partiküllerin bozunmaya başladığı sıcaklığın düştüğü sonucuna ulaşılmıştır.

## **4.2. LAM esaslı partiküllerin biyomedikal uygulamaları**

### **4.2.1. LD-LAM esaslı mikro/nano partiküllerin kan uyumluluk çalışmaları**

Mikro/nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalar için kullanım potansiyelinin belirlenmesinde malzemelerin kan uyumlulukları en önemli parametrelerden biridir (Can ve Sahiner, 2021). Eritrositler ve plazma proteinleri, damar içi uygulamalarda mikro/nanopartiküllerin birincil etkileşime geçtiği biyomoleküller olduğundan dolayı, mikro/nano yapıli biyomalzemelerin kan uyumluluğunun belirlenmesi bu tür malzemelerin biyogüvenliğinin tespiti açısından son derece önemlidir (Can vd., 2019). Ayrıca, partiküllerin kan uyumluluğu genel olarak diğer doku ve hücrelere karşı sitotoksik karakteri ile ilgili ön bilgi sağlayabilmektedir. Bu bağlamda partiküllerin hemolitik özellikleri ve kan pıhtılaşma mekanizması üzerine etkisinin belirlenmesi, bu malzemelerin kan uyumluluğunun değerlendirilmesi için sıklıkla uygulanan prosedürlerdir (Kurt vd., 2021; Sahiner vd., 2018b). LAM esaslı mikro/nanopartiküllerin kan uyumluluklarının belirlenmesi amacıyla, hazırlanan partikül formülasyonları arasından *LD-LAM-1* partikülleri ve bu partiküllerin CSA ile modifiye edilmiş formları (*LD-LAM-2* partikülleri) için hemoliz ve kan pıhtılaşma testleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 16 (a) ve (b)'de verilmiştir. Şekil 16 incelendiğinde, *LD-LAM-1* partiküllerinin 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında kırmızı kan hücrelerinde sırasıyla %0,15±0,05, %0,26±0,05, %0,13±0,07 ve %0,13±0,10 hemoliz oluşumuna sebep olurken, *LD-LAM-2* partiküllerinin %1'den küçük ancak modifiye edilmemiş partiküllere göre daha yüksek hemoliz oranları gösterdiği tespit edilmiştir. *LD-LAM-2* partiküllerinin hemoliz oranları 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında %0,05±0,03, %0,41±0,01, %0,73±0,03, ve %0,92±0,03 olarak bulunmuştur. *LD-LAM-2* partiküllerinin *LD-LAM-1* partiküllerine göre biraz daha yüksek bulunan hemoliz

değerlerinin bu partiküllerin modifiye *LD-LAM-2* partiküllerinin yapısındaki CSA gruplarının kan hücreleri üzerine az da olsa toksik etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 16. *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin (a) hemoliz ve (b) kan pıhtılaşma testleri ile belirlenen kan uyumlulukları.

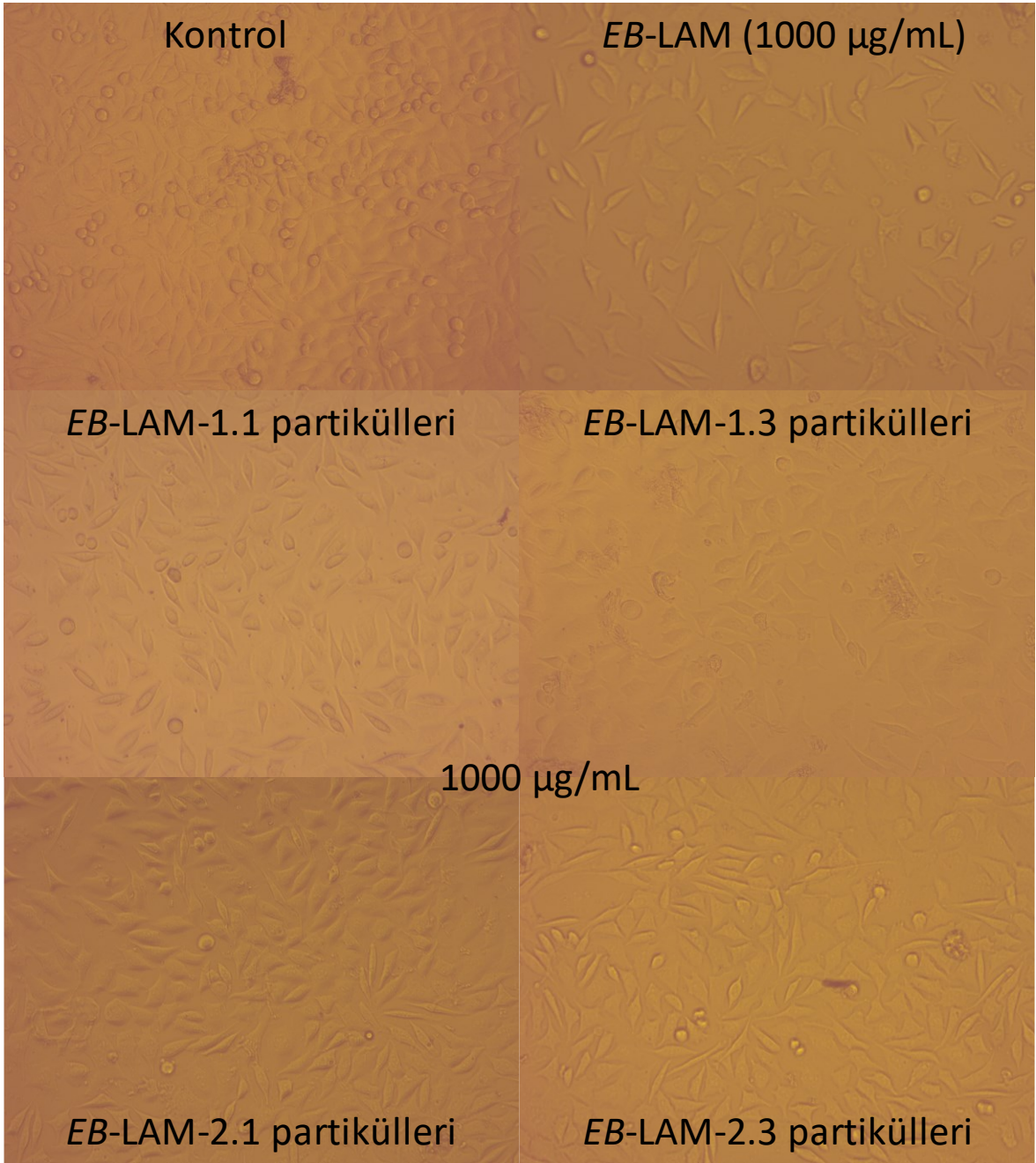
Literatürde yapılan çalışmalarda mikro/nano malzemelerin hemoliz oranlarının %0-2 arasında hemolitik etki göstermeyen, %2-5 arasında az hemolitik ve %5'ten büyük olması bu malzemelerin hemolitik olduğunu bildirmektedir (Can vd., 2019; Can vd., 2020a; Can ve Sahiner, 2021). Dolayısı ile hem *LD-LAM-1*, hem de *LD-LAM-2* partiküllerinin 2 mg/mL

gibi yüksek derişimlerde bile %1'den küçük hemoliz değerleri ile hemoliz açısından güvenli biyomalzemeler olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu görülmektedir.

Şekil 16 (b) incelendiğinde *LD-LAM-1* partiküllerinin 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında sırasıyla %92,99±3,50, %95,16±1,59, %92,57±0,50 ve %94,88±1,59 kan pıhtılaşma indekslerine sahip olduğu görülmektedir. Modifiye *LD-LAM-2* partiküllerinin ise modifiye edilmemiş partiküllere benzer ancak daha yüksek kan pıhtılaşma indislerine sahip olması hem modifiye edilmiş hem de edilmemiş partiküllerin test edilen en yüksek derişim olan 2 mg/mL derişime kadar pıhtılaştırıcı etkilerinin olmadığını göstermiştir. Dolayısı ile *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin hem hemoliz hem de kan pıhtılaştırma özellikleri açısından kan uyumlu biyomalzemeler olarak değerlendirmek mümkündür (Can ve Sahiner, 2021; Sahiner vd., 2018b). Bununla birlikte, *LD-LAM* partiküllerinin *in vivo* uygulamaları için uygun doz belirlenmesi hususunda daha detaylı analizler yapılmalıdır.

#### **4.2.2 *EB-LAM* esaslı nanopartiküllerin biyoyumluluk çalışmaları**

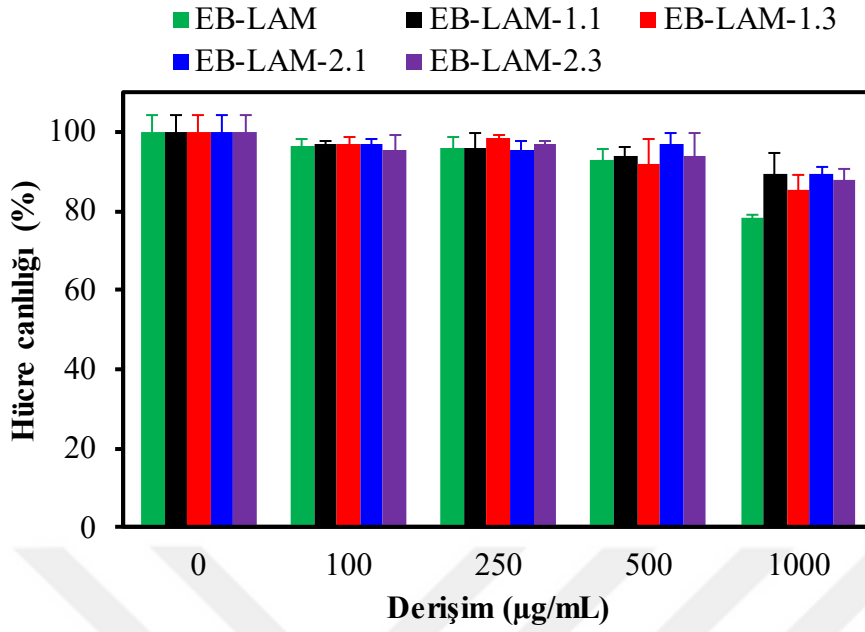
Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon ortamında hazırlanan *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin L929 fibroblast hücrelerine karşı biyoyumluluk zellikleri MTT testi ile belirlenmiştir. *EB-LAM* polisakkariti ve *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin 1000 µg/mL derişimde L929 hücreleri ile etkileşiminden 24 saat sonra çekilen optik mikroskop görüntüleri Şekil 17'de verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, 1000 µg/mL derişimde *EB-LAM* polimerinin kontrol grubuna göre hücre canlılığını bir miktar azalttığı görülmektedir. Aynı derişimde *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerinin lineer polimere kıyasla hücreler üzerinde daha az toksik etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca optik mikroskop görüntülerinden anlaşıldığı üzere hem DVS hem de TMPGDE apraz bağlayıcıları için %25 ve %100 çapraz bağlı partiküllerin aynı derişimde benzer etki gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 17. *EB-LAM* polimeri, *EB-LAM-1.1,-1.3* ve *EB-LAM-2.1, -2.3* partiküllerinin 1000 µg/mL derişimdeki L929 fibroblast hücreleri ile 24 saat etkileşiminin ardından çekilen dijital kamera görüntüleri.

*EB-LAM* polimeri, *EB-LAM-1.1,-1.3* ve *EB-LAM-2.1, -2.3* partiküllerinin 0-1000 µg/mL derişim aralığında L929 fibroblast hücrelerine karşı MTT testi ile belirlenen sitotoksosite profilleri Şekil 18’de verilmiştir.





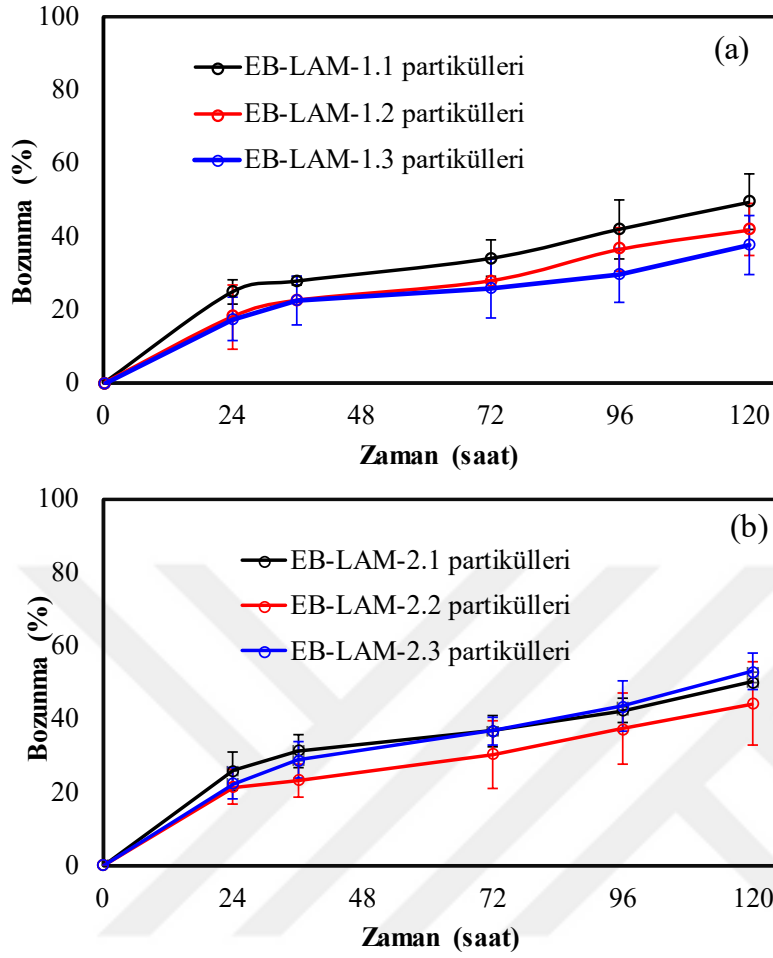
Şekil 18. *EB-LAM* polimeri, *EB-LAM-1.1*, *-1.3* ve *EB-LAM-2.1*, *-2.3* partiküllerinin L929 fibroblast hücreleri ile 24 saat etkileşiminin ardından MTT testi ile belirlenen derişime karşı %hücre canlılığı değerleri.

Şekil 18'den anlaşılacağı üzere *EB-LAM* polimeri ve *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* esaslı partiküllerin 500 µg/mL derişime kadar L929 fibroblast hücreleri ile etkileşimi sonucunda %90' in üzerinde hücre canlılığı gözlenmiş ve toksik etkilerinin olmadığı görülmüştür. 1000 µg/mL derişimde ise *EB-LAM* polimeri %78,5±0,8 hücre canlılığı gösterirken *EB-LAM 1.X* ve *2.X* esaslı partiküllerin %85'in üzerinde ölçülen hücre canlılığı değerleri bu partiküllerin 1000 µg/mL derişime kadar L929 fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermektedir. *EB-LAM-1.X* ve *-2.X* esaslı partiküllerin *in vivo* kullanımlarının araştırılması için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

#### 4.2.3 *EB-LAM* esaslı nanopartiküllerin hidrolitik bozunma çalışmaları

Nano/mikro yapı malzemelerin biyomedikal kullanım potansiyellerinin belirlenmesinde oldukça önemli diğer bir parametre de bu malzemelerin biyolojik ortamlardaki bozunurluğudur (Oh vd., 2008; Suner vd., 2018; Zargarzadeh vd., 2020). Farklı çapraz bağlayıcı oranlarında DVS ve TMPGDE ile sentezlenen *EB-LAM* esaslı nanopartiküllerin vücut içi bozunurluğunun araştırılması için partiküllerin fizyolojik pH koşullarını simüle eden PBS, pH 7,4 tampon çözeltilerinde 120 saat (5 gün) süresince

zamana bağı hidrolitik bozunması çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 19'da verilmiştir. Belirli zaman aralıklarında bozunma ortamından alınan numunelerdeki LAM miktarı fenol sülfürik asit metodu kullanılarak lineer LAM molekülü ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır. DVS ile %25, 50 ve 100 oranında çapraz bağı *EB-LAM-1.1*, *-1.2* ve *-1.3* partiküllerinin hidrolitik bozunma profilleri Şekil 19 (a)'da karşılaştırılmıştır. Şekilden anlaşılacağı gibi DVS ile çapraz bağı üç nanopartikül formülasyonunun da hidrolitlik olarak bozunur özellikte olduğu görülmektedir. *EB-LAM-1.1*, *-1.2* ve *-1.3* partiküllerinin bozunma profilleri incelendiğinde, 24. saatte partiküllerin sırasıyla %25,0±3,2, %18,2±8,7 ve %17,5±5,9'unun bozunduğu bulunmuştur. *EB-LAM-1.1*, *-1.2* ve *-1.3* partiküllerinin hidrolitik bozunmasının 120 saate kadar lineer bir şekilde arttığı görülmüş ve partiküllerin 120. saatte sırasıyla %49,5±7,5, %41,9±7,1 ve %37,7±8,0'inin bozunduğu tespit edilmiştir. TMGDE ile %25, 50 ve 100 oranlarında çapraz bağı *EB-LAM-2.1*, *-2.2* ve *-2.3* partiküllerinin hidrolitik bozunma profilleri Şekil 19 (b)'de karşılaştırılmıştır. Görüldüğü gibi *EB-LAM-2.1*, *-2.2* ve *-2.3* partiküllerinin de hidrolitik olarak bozunur özellikte olduğu saptanmıştır. TMGDE ile çapraz bağı *EB-LAM-2.X* partikülleri DVS ile çapraz bağı *EB-LAM-1.X* partiküllerine benzer bozunma profili göstermiştir.



Şekil 19. (a) *EB-LAM-1.X* ve (b) *EB-LAM-2.X* partiküllerinin pH 7,4 PBS tamponunda zamana bağlı % hidrolitik bozunma değerleri.

*EB-LAM-2.1*, *-2.2* ve *-2.3* partiküllerinin 24 saat içinde sırasıyla %25,7±5,2, %21,3±4,7 ve %22,3±4,2 oranında bozunduğu bulunmuştur. Partiküllerin bozunurluğu 120 saate kadar lineer bir şekilde artmış ve 120. saatteki bozunma oranları aynı sıra ile %50,0±5,5, %44,1±11,5 ve %52,8±5,0 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan, *EB-LAM-1.X* ve *2.X* nanopartiküllerinin vücut içinde biyobozunur olabileceği öngörülmektedir. *EB-LAM-1.X* ve *2.X* nanopartiküllerinin partiküllerin test edilen derişimlerde biyoyumlu özellik göstermesi ve ayrıca biyobozunur olmasından dolayı hazırlanan *EB-LAM-1.X* ve *2.X* nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalarda ilaç salım sistemleri olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında farklı çapraz bağlayıcılar ve sentez yöntemleri ile tek basamakta hazırlanan LAM esaslı partiküller (*LD-LAM* ve *EB-LAM* partikülleri) literatürde ilk kez rapor edilmektedir. Yapılan tez çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- *LD-LAM* polimerinin tekrar eden birimindeki her iki glikoz birimine oranla %100 DVS çapraz bağlayıcısı eklenerek AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon ortamında sentezlenen *LD-LAM-1* partiküllerinin morfolojik karakterizasyonu SEM analizleri ile yapılmıştır. Elde edilen SEM görüntülerinden partiküllerinin küresel şekillerde 0,3 ile 10 µm arasında çok dağılımlı boyutlara sahip olduğu bulunmuştur. *LD-LAM-1* partiküllerinin hidrodinamik çapı DLS ölçümleri ile  $724,2 \pm 94,1$  nm olarak bulunmuştur. Partiküllerin boyut dağılımının filtrasyon yöntemi ile kolay bir şekilde ayrılabilirdiğini göstermek amacı ile *LD-LAM-1* partikülleri 5,0 µm ve 2,5 µm gözenek boyutuna sahip filtreler ile ayrılmıştır. Filtrasyondan sonra partiküllerin hidrodinamik çap değerleri sırasıyla  $452,4 \pm 49,6$  ve  $395,5 \pm 38,9$  nm olarak ölçülmüştür.

- *LD-LAM-1* partiküllerinin yüzey yükleri zeta potansiyeli ölçümleri ile belirlenmiş ve  $-18,7 \pm 3,7$  mV olarak bulunmuştur.

- *LD-LAM-1* partiküllerinin elementel bileşimi elementel analiz yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar partiküllerin yapısında %6,10 S atomu olduğu bulunmuştur. Böylece *LD-(LAM)-1* partiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiği doğrulanmıştır. Elemental analiz sonuçlarından, partiküllerin sentezinde teorik olarak molce %100 oranında eklenen DVS çapraz bağlayıcısının *LD-LAM* molekülleri ile deneysel olarak %84,6 oranında çapraz bağlandığı sonucuna ulaşılmıştır.

- *LD-LAM-1* partiküllerinin fonksiyonel grup analizleri FT-IR spektroskopisi ve termal kararlılık özellikleri TGA analizleri ile yapılmıştır. Partiküllerin FT-IR spektrumunda LAM molekülündeki -OH gruplarının yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca DVS

çapraz bağlayıcısına ait S=O piklerinin LAM molekülünün pikleri ile etkileşerek molekülün spektrumunda büyük değişikliklere sebep olmazken pik şiddetlerini arttığı bulunmuştur.

▪ *LD-LAM-1* partiküllerinde bulunan -OH gruplarının kolay bir şekilde modifiye edilebilirliğini göstermek için *LD-LAM-1* partikülleri anyonik CSA molekülleri ile modifiye edilmiştir. Modifikasyon sonucunda elde edilen *LD-LAM-2* partiküllerinin elementel analizi ile bileşimindeki %S oranının %6,10'dan %7,81'e yükseldiği ve modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği bulunmuştur. *LD-LAM-2* partiküllerinin hidrodinamik yarıçapı  $1408,9 \pm 210$  nm olarak ölçülmüştür. Modifikasyon sonrasında partiküllerde gözlemlenen boyut artışının yapıya katılan  $-HSO_3$  grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *LD-LAM-2* partiküllerinin 5,0  $\mu$ m ve 2,5  $\mu$ m gözenek boyutuna sahip filtreler ile filtrasyondan sonra hidrodinamik çapları sırasıyla  $670,1 \pm 99,1$  ve  $502,6 \pm 56,3$  nm olarak ölçülmüştür. *LD-LAM-2* partiküllerinin zeta potansiyeli  $-24,9 \pm 1,3$  mV olarak belirlenmiştir. *LD-LAM-1* partiküllerinin modifikasyon sonrasında (*LD-LAM-2*) daha negatif yüzey yüküne sahip olması da CSA molekülleri ile modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini teyit etmiştir.

▪ *EB-LAM* polimerinden AOT-izooktan-su ters misel mikroemülsiyon ortamında DVS, TMPGDE ve STPP gibi farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partikülleri sentezlenmiştir. Partiküllerin SEM analizi sonucunda partiküllerinin küresel geometride ve 0,1 ile 15  $\mu$ m arasında boyutlara sahip olduğu görülmüştür. Yapılan SEM analizlerinden *EB-LAM* molekülünün farklı çapraz bağlayıcılar ile partikül sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

▪ *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin fonksiyonel grup analizleri FT-IR ve TGA analizleri ile yapılmıştır. Ayrıca partiküllerin hidrodinamik çapları DLS ölçümleri ile belirlenmiş ve sırasıyla  $370,5 \pm 8,4$ ,  $477,1 \pm 11,6$  ve  $239,3 \pm 4,6$  nm olarak bulunmuştur. *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerin zeta potansiyeli değerleri  $-20,9 \pm 0,8$ ,  $-17,3 \pm 0,3$  ve  $-24,6 \pm 0,3$  mV olarak belirlenmiştir. Dahası, *EB-LAM-1*, *EB-LAM-2* ve *EB-LAM-3* partiküllerinin pH 7'de (yaklaşık olarak fizyolojik pH değeri) sırasıyla  $-24,1 \pm 0,1$ ,  $-35,4 \pm 0,8$  ve  $-28,9 \pm 1,1$  mV yüzey yüklerine sahip olduğu bulunmuştur.

▪ *EB-LAM* esaslı partiküllerin sentezi *EB-LAM* polimeri ile DVS ve TMPGDE çapraz bağlayıcıları kullanılarak %25, %50 ve %100 çapraz bağlayıcı oranlarında yüzey aktif madde içermeyen izooktan-su ortamında 10.000 rpm yüksek karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerinin SEM analizleri sonucunda partiküllerin küresel şekillerde ve 20-800 nm arasında boyutlara sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, partiküllerinin farklı bir emülsiyon ortamında sentezlenebilirliğini göstermek amacı ile *EB-LAM-1.3* ve *EB-LAM-2.3* partikülleri (%100 çapraz bağlayıcı oranı) sikloheksan-su su emülsiyon ortamında sentezlenmiş ve elde edilen *EB-LAM-1.4* ve *EB-LAM-2.4* partiküllerinin izooktan-su ortamında sentezlenen diğer *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerine benzer küresel şekillerde ve benzer boyut dağılımına sahip olduğu bulunmuştur.

▪ *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2*, *EB-LAM-1.3* ve *EB-LAM-1.4* partiküllerinin hidrodinamik çapları sırasıyla  $310,0 \pm 14,5$ ,  $291,1 \pm 4,6$ ,  $468,7 \pm 6,5$  ve  $304,0 \pm 16,0$  nm olarak ölçülmüştür. *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2*, *EB-LAM-2.3* ve *EB-LAM-2.4* partiküllerinin hidrodinamik çapları ise sırasıyla  $366,3 \pm 14,5$ ,  $125,5 \pm 2,6$ ,  $351,6 \pm 9,5$  ve  $385,6 \pm 12,6$  nm olarak ölçülmüştür.

▪ *EB-LAM-1.1*, *EB-LAM-1.2*, *EB-LAM-1.3* ve *EB-LAM-1.4* partiküllerinin yüzey yükleri sırasıyla  $-19,9 \pm 0,4$ ,  $-11,9 \pm 0,5$ ,  $-19,4 \pm 0,4$  ve  $-26,3 \pm 0,5$  mV olarak bulunmuştur. *EB-LAM-2.1*, *EB-LAM-2.2*, *EB-LAM-2.3* ve *EB-LAM-2.4* partiküllerinin yüzey yükleri ise  $-18,4 \pm 0,3$ ,  $-11,5 \pm 0,1$ ,  $-17,3 \pm 0,3$  ve  $-24,3 \pm 0,2$  mV olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlardan *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* partiküllerinin yüzey yükünün ters misel mikroemülsiyon ortamında sentezlenen *EB-LAM-1* ve *EB-LAM-2* partikülleri ile benzer olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

▪ Bu tez kapsamında hazırlanan LAM esaslı partiküllerin biyomedikal alanlarda kullanım potansiyelini göstermek amacı ile *LD-LAM* esaslı modifiye edilmiş ve edilmemiş *LD-LAM* partiküllerinin (*LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2*) kan uyumluluğu 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında hemoliz ve kan pıhtılaşma testleri ile araştırılmıştır. *LD-LAM-1* partiküllerinin % hemoliz oranları 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında sırayla  $0,15 \pm 0,05$ ,  $0,26 \pm 0,05$ ,  $0,13 \pm 0,07$  ve  $0,13 \pm 0,10$  olarak bulunmuştur. *LD-LAM-2*

partiküllerinin %hemoliz oranları ise aynı aralıkta  $0,05 \pm 0,03$ ,  $0,41 \pm 0,01$ ,  $0,73 \pm 0,03$ , ve  $0,92 \pm 0,03$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan, modifiye edilmiş ve edilmemiş *LD-LAM* partiküllerinin 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında hemoliz açısından güvenli malzemeler olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

- *LD-LAM-1* partiküllerinin 0,25 ile 2,0 mg/mL derişim aralığında sırasıyla  $92,99 \pm 3,50$ ,  $95,16 \pm 1,59$ ,  $92,57 \pm 0,50$  ve  $94,88 \pm 1,59$  kan pıhtılaşma indekslerine sahip olduğu bulunmuştur. Modifiye edilmiş *LD-LAM-2* partiküllerinin ise modifiye edilmemiş partiküllere benzer ancak daha yüksek kan pıhtılaşma indislerine sahip olması hem modifiye edilmiş hem de edilmemiş partiküllerin test edilen en yüksek derişim olan 2,0 mg/mL derişime kadar pıhtılaştırıcı etkilerinin olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlardan *LD-LAM-1* ve *LD-LAM-2* partiküllerinin 2,0 mg/mL derişime kadar hem hemoliz hem de kan pıhtılaştırma etkileri bakımından güvenli malzemeler olduğu sonucuna varılmıştır.

- *EB-LAM-1.X* ve *EB-LAM-2.X* nanopartiküllerin L929 fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmalarının sonucunda partiküllerin 500 µg/mL derişimde %90' ın üzerinde ve 1000 µg/mL derişimde ise %85'in üzerinde hücre canlılığı gözlenmiş ve *EB-LAM 1.X* ve *2.X* esaslı partiküllerin bu derişime kadar L929 fibroblast hücrelerine toksik etkilerinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

- Ayrıca *EB-LAM 1.X* ve *2.X* nanopartiküllerinin fizyolojik koşulları simüle eden pH 7,4 PBS çözeltisi içindeki hidrolitik bozunmaları araştırılmış ve her iki grup partikül formülasyonlarının da 120 saat içinde yaklaşık %50'sinin bozunduğu bulunmuştur. Böylece biyoyumlu ve biyobozunur *EB-LAM 1.X* ve *2.X* nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyellerinin yüksek olduğu gösterilmiştir.

- Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda birçok biyoaktif özelliğe sahip doğal LAM polimerinden DVS, TMPGDE ve STPP gibi farklı çapraz bağlayıcılar ile ters misel mikroemülsiyon polimerizasyonu ve yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu gibi değişik sentez yöntemleri kullanılarak mikro/nano ve nano boyutlarda partiküllerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, karıştırma hızı sentez yöntemi gibi parametreler ve filtrasyon tekniği ile partiküllerin boyut dağılımının ayarlanabilirliği gösterilmiştir. Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile

hazırlanan DVS ve TMPGDE ile çapraz bağlı partiküller için sırasıyla 15 ve 30 dakika gibi kısa reaksiyon süreleri ile partikül sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi bu yöntem ile hazırlanan malzemelerin zaman, maliyet ve enerji açısından avantaj sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan yola çıkarak ileriki çalışmalar için öneriler aşağıda verilmiştir.

LAM polimerinin Dectin-1 reseptörlerine spesifik olduğu ve vücutta çeşitli biyolojik moleküller ile etkileşime geçerek antioksidan, anti tümör, antiinflamatuvar ve bağışıklık güçlendirici etki gösterdiği bilinmektedir (Zargarzadeh vd., 2020). Dolayısı ile bu tez kapsamında hazırlanan;

- LAM esaslı partiküllerin Dectin-1 reseptör spesifitesinin araştırılması,
- Hazırlanan LAM esaslı partiküller içine absorpsiyon, hapsedme ve konjugasyon gibi çeşitli yöntemlerle partiküllerin biyoaktif özelliklerine sinerjistik etki gösterebilecek ilaçlar yüklenmesi ile bu ilaçların salım kinetiklerinin araştırılması,
- Hazırlanan LAM esaslı polimerik partiküllerin bilgisayar ortamında çeşitli yöntemler ile modellenerek moleküller dinamik simülasyonlarının ve biyomolekül etkileşimlerinin araştırılması,
- LD-LAM-1.X ve 2.X partiküllerin değişik boyut aralıklarının örneğin 100-200, 200-500, 500-800 nm aralıktaki partiküllerin *in vitro* biyoyumluluk, kan uyumluluk ve kontrollü ilaç salım sistemleri olarak kullanılabilirliğinin araştırılması,
- LAM esaslı partiküllerin *in vivo* biyoyumluluklarının ve antioksidan, antiinflamatuvar ve anti tümör etkileri gibi biyoaktif özelliklerinin araştırılması önerilmektedir.



## KAYNAKÇA

Adams, E. L., Rice, P. J., Graves, B., Ensley, H. E., Yu, H., Brown, G. D., Gordon, S., Monteiro, M. A., Papp-Szabo, E., Lowman, D. W., Power, T. D., Wempe, M. F., Williams, D. L. (2008). “Differential High-Affinity Interaction of Dectin-1 with Natural or Synthetic Glucans Is Dependent upon Primary Structure and Is Influenced by Polymer Chain Length and Side-Chain Branching”. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325 (1), 115–123. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.133124>

Adams, S. S., Thorpe, H. M. (2011). “The Anticoagulant Activity and Toxicity of Laminarin Sulphate K”. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9 (1), 459–463. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1957.tb12298.x>

Adroher-Benítez, I., Ahualli, S., Martín-Molina, A., Quesada-Pérez, M., Moncho-Jordá, A. (2015). “Role of Steric Interactions on the Ionic Permeation Inside Charged Microgels: Theory and Simulations”. *Macromolecules*, 48 (13), 4645–4656. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00356>

Akter, M., Bhattacharjee, M., Dhar, A. K., Rahman, F. B. A., Haque, S., Rashid, T. U., Kabir, S. M. F. (2021). “Cellulose-Based Hydrogels for Wastewater Treatment: A Concise Review”. *Gels*, 7 (1), 30. <https://doi.org/10.3390/gels7010030>

Auwal, S., Zarei, M., Tan, C., Basri, M., Saari, N. (2017). “Improved In Vivo Efficacy of Anti-Hypertensive Biopeptides Encapsulated in Chitosan Nanoparticles Fabricated by Iontropic Gelation on Spontaneously Hypertensive Rats”. *Nanomaterials*, 7 (12), 421. <https://doi.org/10.3390/nano7120421>

Balas, M., Dumitrache, F., Badea, M., Fleaca, C., Badoi, A., Tanasa, E., Dinischiotu, A. (2018). “Coating Dependent In Vitro Biocompatibility of New Fe-Si Nanoparticles”. *Nanomaterials*, 8 (7), 495. <https://doi.org/10.3390/nano8070495>

Becker, S., Tebben, J., Coffinet, S., Wiltshire, K., Iversen, M. H., Harder, T., Hinrichs, K.-U., Hehemann, J.-H. (2020). “Laminarin is a major molecule in the marine carbon cycle”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (12), 6599–6607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917001117>

Benito-Román, Ó., Alonso, E., Gairola, K., Cocero, M. J. (2013). “Fixed-bed extraction of

- $\beta$ -glucan from cereals by means of pressurized hot water”. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.07.003>
- Blackburn, W. H., Dickerson, E. B., Smith, M. H., McDonald, J. F., Lyon, L. A. (2009). “Peptide-Functionalized Nanogels for Targeted siRNA Delivery”. *Bioconjugate Chemistry*, 20 (5), 960–968. <https://doi.org/10.1021/bc800547c>
- Camci-Unal, G., Aubin, H., Ahari, A. F., Bae, H., Nichol, J. W., Khademhosseini, A. (2010). “Surface-modified hyaluronic acid hydrogels to capture endothelial progenitor cells”. *Soft Matter*, 6 (20), 5120. <https://doi.org/10.1039/c0sm00508h>
- Can, M., Ayyala, R. S., Sahiner, N. (2019). “Crosslinked poly(Lactose) microgels and nanogels for biomedical applications”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 553, 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.06.078>
- Can, M., Demirci, S., Sunol, A. K., Sahiner, N. (2020a). “An amino acid, L-Glutamic acid-based metal-organic frameworks and their antibacterial, blood compatibility, biocompatibility, and sensor properties”. *Microporous and Mesoporous Materials*, 309, 110533. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110533>
- Can, M., Güven, O., Sahiner, N. (2020b). “Micro and Nanogels for Biomedical Applications”. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48 (5), 407–424. <https://doi.org/10.15671/hjbc.810599>
- Can, M., Sahiner, N. (2021). “A facile one-pot synthesis of microgels and nanogels of laminarin for biomedical applications”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 588, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.053>
- Castanheira, E. J., Correia, T. R., Rodrigues, J. M. M., Mano, J. F. (2020). “Novel Biodegradable Laminarin Microparticles for Biomedical Applications”. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 93 (6), 713–719. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20200034>
- Chang, S., Ma, A. W. K., Lai, H. (2019). “New Insight into the Preparation of Starch-Based Spherical Microgels with Tunable Volume”. *Starch - Stärke*, 71 (9–10), 1800288. <https://doi.org/10.1002/star.201800288>
- Chen, Y., Mohanraj, V. J., Wang, F., Benson, H. A. E. (2007). “Designing chitosan-dextran sulfate nanoparticles using charge ratios”. *AAPS PharmSciTech*, 8 (4), 131–139. <https://doi.org/10.1208/pt0804098>

- Chizhov, A. O., Dell, A., Morris, H. R., Reason, A. J., Haslam, S. M., McDowell, R. A., Chizhov, O. S., Usov, A. I. (1998). “Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry”. *Carbohydrate Research*, 310 (3), 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00177-3)
- Choi, J.-I., Kim, H.-J., Kim, J.-H., Lee, J.-W. (2012). “Enhanced biological activities of laminarin degraded by Gamma-Ray irradiation”. *Journal of Food Biochemistry*, 36 (4), 465–469. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00552.x>
- Custódio, C. A., Reis, R. L., Mano, J. F. (2016). “Photo-Cross-Linked Laminarin-Based Hydrogels for Biomedical Applications”. *Biomacromolecules*, 17 (5), 1602–1609. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01736>
- de la Fuente, M., Seijo, B., Alonso, M. J. (2008). “Novel Hyaluronic Acid-Chitosan Nanoparticles for Ocular Gene Therapy”. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49 (5), 2016. <https://doi.org/10.1167/iov.07-1077>
- Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Fu, S., Elaïssari, A. (2003). “Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process”. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 257 (1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(02\)00987-3](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00987-3)
- Deville, C., Damas, J., Forget, P., Dandrifosse, G., Peulen, O. (2004). “Laminarin in the dietary fibre concept”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (9), 1030–1038. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1754>
- Dolai, J., Mandal, K., Jana, N. R. (2021). “Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications”. *ACS Applied Nano Materials*, 4 (7), 6471–6496. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00987>
- Duan, H., Donovan, M., Foucher, A., Schultze, X., Lecommandoux, S. (2018). “Multivalent and multifunctional polysaccharide-based particles for controlled receptor recognition”. *Scientific Reports*, 8 (1), 14730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32994-y>
- Dwamena, A. K., Woo, S. H., Kim, C. S. (2020). “Enzyme immobilization on porous chitosan hydrogel capsules formed by anionic surfactant gelation”. *Biotechnology Letters*, 42 (5), 845–852. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02829-w>
- Eckmann, D. M., Composto, R. J., Tsourkas, A., Muzykantov, V. R. (2014). “Nanogel

carrier design for targeted drug delivery”. *J. Mater. Chem. B*, 2 (46), 8085–8097. <https://doi.org/10.1039/C4TB01141D>

Ermakova, S., Men'shova, R., Vishchuk, O., Kim, S.-M., Um, B.-H., Isakov, V., Zvyagintseva, T. (2013). “Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity”. *Algal Research*, 2 (1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.10.002>

Feng, L., Hao, Y., Zhu, M., Zhai, Y., Yang, L., Liu, Y., Cheng, G. (2019). “Incorporation of Laminarin-Based Hydrogel with Graphene Foam To Enhance the Toughness of Scaffold and Regulate the Stem Cell Behavior”. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5 (10), 5295–5304. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.9b00752>

Fernández-Nieves, A., Fernández-Barbero, A., Vincent, B., de las Nieves, F. J. (2000). “Charge Controlled Swelling of Microgel Particles”. *Macromolecules*, 33 (6), 2114–2118. <https://doi.org/10.1021/ma991520l>

Fröhlich, E. (2012). “The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles”. *International Journal of Nanomedicine*, 5577. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>

G. Hamdi, G. Ponchel, D. D. (2001). “Formulation of epichlorohydrin cross-linked starch microspheres”. *Journal of Microencapsulation*, 18 (3), 373–383. <https://doi.org/10.1080/02652040010019505>

Gennari, A., Rios de la Rosa, J. M., Hohn, E., Pelliccia, M., Lallana, E., Donno, R., Tirella, A., Tirelli, N. (2019). “The different ways to chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: templated vs direct complexation. Influence of particle preparation on morphology, cell uptake and silencing efficiency”. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 10, 2594–2608. <https://doi.org/10.3762/bjnano.10.250>

Gonçalves, C., Gama, F. M. (2008). “Characterization of the self-assembly process of hydrophobically modified dextrin”. *European Polymer Journal*, 44 (11), 3529–3534. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.08.034>

Haagdorens, M., Cèpla, V., Melsbach, E., Koivusalo, L., Skottman, H., Griffith, M., Valiokas, R., Zakaria, N., Pintelon, I., Tassignon, M.-J. (2019). “In Vitro Cultivation of Limbal Epithelial Stem Cells on Surface-Modified Crosslinked Collagen Scaffolds”. *Stem*

*Cells International*, 2019, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2019/7867613>

Jeong, Y., Kim, S., Jin, S., Ryu, H., Jin, Y., Jung, T., Kim, I., Jung, S. (2008). “Cisplatin-incorporated hyaluronic acid nanoparticles based on ion-complex formation”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (3), 1268–1276. <https://doi.org/10.1002/jps.21103>

Ji, C.-F., Ji, Y.-B., Meng, D.-Y. (2013). “Sulfated modification and anti-tumor activity of laminarin”. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6 (5), 1259–1264. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1277>

Kang, B., Opatz, T., Landfester, K., Wurm, F. R. (2015). “Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction”. *Chemical Society Reviews*, 44 (22), 8301–8325. <https://doi.org/10.1039/C5CS00092K>

Kazemi Ashtiani, M., Zandi, M., Shokrollahi, P., Ehsani, M., Baharvand, H. (2020). “Chitosan surface modified hydrogel as a therapeutic contact lens”. *Polymers for Advanced Technologies*, 31 (4), 741–748. <https://doi.org/10.1002/pat.4810>

Keppeler, S., Ellis, A., Jacquier, J. C. (2009). “Cross-linked carrageenan beads for controlled release delivery systems”. *Carbohydrate Polymers*, 78 (4), 973–977. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.029>

Kim, K.-H., Kim, Y.-W., Kim, H. B., Lee, B. J., Lee, D. S. (2006). “Anti-apoptotic Activity of Laminarin Polysaccharides and their Enzymatically Hydrolyzed Oligosaccharides from *Laminaria japonica*”. *Biotechnology Letters*, 28 (6), 439–446. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-6177-9>

Klein, M., Poverenov, E. (2020). “Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (6), 2337–2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>

Kong, Y., Zhuang, Y., Han, Z., Yu, J., Shi, B., Han, K., Hao, H. (2019). “Dye removal by eco-friendly physically cross-linked double network polymer hydrogel beads and their functionalized composites”. *Journal of Environmental Sciences*, 78, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.006>

Kurt, S. B., Ayyala, R. S., Sahiner, N. (2021). “Versatile poly(maltose) micro/nanoparticles with tunable surface functionality as a biomaterial”. *Journal of Applied Polymer Science*, 138 (9), 49906. <https://doi.org/10.1002/app.49906>

Large, D. E., Soucy, J. R., Hebert, J., Auguste, D. T. (2019). “Advances in Receptor-Mediated, Tumor-Targeted Drug Delivery”. *Advanced Therapeutics*, 2 (1), 1800091. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800091>

Lee, E. J., Park, J. K., Khan, S. A., Lim, K.-H. (2011). “Preparation of Agar Nanoparticles by W/O Emulsification”. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 44 (7), 502–508. <https://doi.org/10.1252/jcej.11we016>

Lewandowska-Łańcucka, J., Karewicz, A., Wolski, K., Zapotoczny, S. (2018). “Surface Functionalization of Nanocellulose-Based Hydrogels” . Mondal M.I.H. (eds.). in: *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels. Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Springer, Cham. (pp. 1–29). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0\\_24-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_24-1)

Li, L., Lu, L., Zhou, C. R., Xu, Z. C. (2011). “Surface Modified Polylactic Acid Microspheres Reinforced Calcium Alginate Hydrogels”. *Applied Mechanics and Materials*, 140, 58–62. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.140.58>

Li, X., Zheng, W., He, G., Zhao, R., Liu, D. (2014). “Morphology Control of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle in Microemulsion and Its Photocatalytic Property”. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2 (2), 288–295. <https://doi.org/10.1021/sc400328u>

Li, Y., Wang, F., Cui, H. (2016). “Peptide-based supramolecular hydrogels for delivery of biologics”. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1 (3), 306–322. <https://doi.org/10.1002/btm2.10041>

Lovell, P. A., Schork, F. J. (2020). “Fundamentals of Emulsion Polymerization”. *Biomacromolecules*, 21 (11), 4396–4441. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00769>

Ma, Z., Garrido-Maestu, A., Jeong, K. C. (2017). “Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review”. *Carbohydrate Polymers*, 176, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>

Maiz-Fernández, S., Pérez-Álvarez, L., Ruiz-Rubio, L., Vilas-Vilela, J. L., Lanceros-Mendez, S. (2020). “Polysaccharide-Based In Situ Self-Healing Hydrogels for Tissue Engineering Applications”. *Polymers*, 12 (10), 2261. <https://doi.org/10.3390/polym12102261>

Majcher, M. J., McInnis, C. L., Himbert, S., Alsop, R. J., Kinio, D., Bleuel, M., Rheinstädter,

- M. C., Smeets, N. M. B., Hoare, T. (2020). “Photopolymerized Starchstarch Nanoparticle (SNP) network hydrogels”. *Carbohydrate Polymers*, 236, 115998. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115998>
- Malik, M. A., Wani, M. Y., Hashim, M. A. (2012). “Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials”. *Arabian Journal of Chemistry*, 5 (4), 397–417. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.027>
- Martins, C. R., Custódio, C. A., Mano, J. F. (2018). “Multifunctional laminarin microparticles for cell adhesion and expansion”. *Carbohydrate Polymers*, 202, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.029>
- Mecozzi, M., Pietroletti, M., Scarpiniti, M., Acquistucci, R., Conti, M. E. (2012). “Monitoring of marine mucilage formation in Italian seas investigated by infrared spectroscopy and independent component analysis”. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184 (10), 6025–6036. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2400-4>
- Miao, H.-Q., Elkin, M., Aingorn, E., Ishai-Michaeli, R., Stein, C. A., Vlodaysky, I. (1999). “Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides”. *International Journal of Cancer*, 83 (3), 424–431. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991029\)83:3<424::AID-IJC20>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991029)83:3<424::AID-IJC20>3.0.CO;2-L)
- Michelle Kilcoyne, Lokesh Joshi. (2007). “Carbohydrates in Therapeutics”. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 5 (3), 186–197. <https://doi.org/10.2174/187152507781058663>
- Mitura, S., Sionkowska, A., Jaiswal, A. (2020). “Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31 (6), 50. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06390-w>
- Morales-Sanfrutos, J., Lopez-Jaramillo, F., Elremaily, M., Hernández-Mateo, F., Santoyo-Gonzalez, F. (2015). “Divinyl Sulfone Cross-Linked Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis and Applications as Sorbents and Encapsulating Agents”. *Molecules*, 20 (3), 3565–3581. <https://doi.org/10.3390/molecules20033565>
- Mosmann, T. (1983). “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”. *Journal of Immunological Methods*,

65 (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mülhaupt, R. (2004). “Hermann Staudinger and the Origin of Macromolecular Chemistry”. *Angewandte Chemie International Edition*, 43 (9), 1054–1063. <https://doi.org/10.1002/anie.200330070>

Myrick, J. M., Vendra, V. K., Krishnan, S. (2014). “Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications”. *Nanotechnology Reviews*, 3 (4). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2012-0050>

Nelson, T. E., Lewis, B. A. (1974). “Separation and characterization of the soluble and insoluble components of insoluble laminaran”. *Carbohydrate Research*, 33 (1), 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82940-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82940-7)

Neyrinck, A. M., Mouson, A., Delzenne, N. M. (2007). “Dietary supplementation with laminarin, a fermentable marine  $\beta$  (1–3) glucan, protects against hepatotoxicity induced by LPS in rat by modulating immune response in the hepatic tissue”. *International Immunopharmacology*, 7 (12), 1497–1506. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.06.011>

Ng, J. Y., Obuobi, S., Chua, M. L., Zhang, C., Hong, S., Kumar, Y., Gokhale, R., Ee, P. L. R. (2020). “Biomimicry of microbial polysaccharide hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine – A review”. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116345. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116345>

Nguyen, D. H., Joung, Y. K., Choi, J. H., Moon, H. T., Park, K. D. (2011). “Targeting ligand-functionalized and redox-sensitive heparin-Pluronic nanogels for intracellular protein delivery”. *Biomedical Materials*, 6 (5), 055004. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/5/055004>

Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J., Matyjaszewski, K. (2008). “The development of microgels/nanogels for drug delivery applications”. *Progress in Polymer Science*, 33 (4), 448–477. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.01.002>

Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Ruktanonchai, U. (2008). “Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery”. *AAPS PharmSciTech*, 9 (1), 67–74. <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9007-7>

Osborn, H. M. I., Evans, P. G., Gemmell, N., Osborne, S. D. (2004). “Carbohydrate-based therapeutics”. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56 (6), 691–702.



<https://doi.org/10.1211/0022357023619>

Palkovits, R., Althues, H., Rumplecker, A., Tesche, B., Dreier, A., Holle, U., Fink, G., Cheng, C. H., Shantz, D. F., Kaskel, S. (2005). “Polymerization of w/o Microemulsions for the Preparation of Transparent SiO<sub>2</sub>/PMMA Nanocomposites”. *Langmuir*, 21 (13), 6048–6053. <https://doi.org/10.1021/la050630k>

Park, N., Kim, J. (2020). “Hydrogel-Based Artificial Muscles: Overview and Recent Progress”. *Advanced Intelligent Systems*, 2 (4), 1900135. <https://doi.org/10.1002/aisy.201900135>

Pertici, V., Pin-Barre, C., Rivera, C., Pellegrino, C., Laurin, J., Gigmes, D., Trimaille, T. (2019). “Degradable and Injectable Hydrogel for Drug Delivery in Soft Tissues”. *Biomacromolecules*, 20 (1), 149–163. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01242>

Plunkett, K. N., Chatterjee, A. N., Aluru, N. R., Moore, J. S. (2003). “Surface-modified hydrogels for chemoselective bioconjugation”. *Macromolecules*, 36 (23). <https://doi.org/10.1021/ma035166+>

Popa, E. G., Reis, R. L., Gomes, M. E. (2015). “Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage”. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35 (3), 410–424. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.889079>

Quiñones, J. P., Peniche, H., Peniche, C. (2018). “Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery”. *Polymers*, 10 (3), 235. <https://doi.org/10.3390/polym10030235>

Rasouli, M., Ostovar-Ravari, A., Shokri-Afra, H. (2014). “Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen”. *European review for medical and pharmacological sciences*, 18 (14), 2020–2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027341>

Reid, M. S., Kedzior, S. A., Villalobos, M., Cranston, E. D. (2017). “Effect of Ionic Strength and Surface Charge Density on the Kinetics of Cellulose Nanocrystal Thin Film Swelling”. *Langmuir*, 33 (30), 7403–7411. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01740>

Ren, X., Liu, L., Zhou, Y., Zhu, Y., Zhang, H., Zhang, Z., Li, H. (2016). “Nanoparticle siRNA against BMI-1 with a Polyethylenimine–Laminarin Conjugate for Gene Therapy in Human Breast Cancer”. *Bioconjugate Chemistry*, 27 (1), 66–73.

<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00650>

Rinaudo, M. (2007). “Seaweed Polysaccharides”. H. Kamerling (eds.). in: *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier. (pp. 691–735). <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00140-9>

Rioux, L.-E., Turgeon, S. L., Beaulieu, M. (2010). “Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicruris*”. *Phytochemistry*, 71 (13), 1586–1595. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.021>

Ruckenstein, E. (1978). “The origin of thermodynamic stability of microemulsions”. *Chemical Physics Letters*, 57 (4), 517–521. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(78\)85311-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(78)85311-1)

Ryu, J.-H., Bickerton, S., Zhuang, J., Thayumanavan, S. (2012). “Ligand-Decorated Nanogels: Fast One-Pot Synthesis and Cellular Targeting”. *Biomacromolecules*, 13 (5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1021/bm300201x>

Sagbas, S., Aktas, N., Sahiner, N. (2015). “Modified biofunctional p(tannic acid) microgels and their antimicrobial activity”. *Applied Surface Science*, 354, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.06.163>

Sagbas Suner, S., Ari, B., Onder, F. C., Ozpolat, B., Ay, M., Sahiner, N. (2019). “Hyaluronic acid and hyaluronic acid: Sucrose nanogels for hydrophobic cancer drug delivery”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1150–1157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.021>

Sahiner, N. (2013). “Soft and flexible hydrogel templates of different sizes and various functionalities for metal nanoparticle preparation and their use in catalysis”. *Progress in Polymer Science*, 38 (9), 1329–1356. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.004>

Sahiner, N., Sagbas, S., Turk, M. (2014a). “Poly(sucrose) micro particles preparation and their use as biomaterials”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.012>

Sahiner, N., Sagbas, S., Yoshida, H., Lyon, L. A. (2014b). “Synthesis and Properties of Inulin Based Microgels”. *Colloids and Interface Science Communications*, 2, 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2014.08.003>

Sahiner, N., Sagbas, S., Aktas, N., Silan, C. (2016). “Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable

degradability”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.006>

Sahiner, N., Sagbas, S., Yılmaz, S. (2017a). “Microgels Derived from Different Forms of Carrageenans, Kappa, Iota, and Lambda for Biomedical Applications”. *MRS Advances*, 2 (47), 2521–2527. <https://doi.org/10.1557/adv.2017.415>

Sahiner, N., Sagbas, S., Sahiner, M., Ayyala, R. S. (2017b). “Polyethyleneimine modified poly(Hyaluronic acid) particles with controllable antimicrobial and anticancer effects”. *Carbohydrate Polymers*, 159, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.024>

Sahiner, N. (2018a). “One step preparation of polymeric maltitol particles, from a sugar molecule, maltitol for biomedical applications”. *Materials Science and Engineering: C*, 89, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.017>

Sahiner, N., Sagbas, S., Sahiner, M., Blake, D. A., Reed, W. F. (2018b). “Polydopamine particles as nontoxic, blood compatible, antioxidant and drug delivery materials”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.019>

Sahiner, M., Blake, D. A., Fullerton, M. L., Suner, S. S., Sunol, A. K., Sahiner, N. (2019a). “Enhancement of biocompatibility and carbohydrate absorption control potential of rosmarinic acid through crosslinking into microparticles”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.032>

Sahiner, N., Suner, S. S., Ayyala, R. S. (2019b). “Mesoporous, degradable hyaluronic acid microparticles for sustainable drug delivery application”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.015>

Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. (1999). “Microbial (1→3)-β-d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity”. *Carbohydrate Polymers*, 38 (3), 247–253. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X)

Schmiedeberg, J. E. O. (1885). “Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte: Leipzig”. *Tageblatt der Versammlung*, 58, 427.

Seidi, F., Jenjob, R., Phakkeeree, T., Crespy, D. (2018). “Saccharides, oligosaccharides, and polysaccharides nanoparticles for biomedical applications”. *Journal of Controlled Release*, 284, 188–212. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.026>

- Sellimi, S., Maalej, H., Rekik, D. M., Benslima, A., Ksouda, G., Hamdi, M., Sahnoun, Z., Li, S., Nasri, M., Hajji, M. (2018). “Antioxidant, antibacterial and in vivo wound healing properties of laminaran purified from *Cystoseira barbata* seaweed”. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 633–644. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.171>
- Shalla, A. H., Yaseen, Z., Bhat, M. A., Rangreez, T. A., Maswal, M. (2019). “Recent review for removal of metal ions by hydrogels”. *Separation Science and Technology*, 54 (1), 89–100. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1503307>
- Shibaev, A. V., Muravlev, D. A., Muravleva, A. K., Matveev, V. V., Chalykh, A. E., Philippova, O. E. (2020). “pH-Dependent Gelation of a Stiff Anionic Polysaccharide in the Presence of Metal Ions”. *Polymers*, 12 (4), 868. <https://doi.org/10.3390/polym12040868>
- Shimojo, A. A. M., Pires, A. M. B., Lichy, R., Santana, M. H. A. (2015). “The Performance of Crosslinking with Divinyl Sulfone as Controlled by the Interplay Between the Chemical Modification and Conformation of Hyaluronic Acid”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26 (3), 506-512. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150003>
- Shin, H. J., Oh, S. J., Kim, S. I., Won Kim, H., Son, J.-H. (2009). “Conformational characteristics of  $\beta$ -glucan in laminarin probed by terahertz spectroscopy”. *Applied Physics Letters*, 94 (11), 111911. <https://doi.org/10.1063/1.3100778>
- Shiraishi, K., Yokoyama, M. (2019). “Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review”. *Science and Technology of Advanced Materials*, 20 (1), 324–336. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1590126>
- Smeets, N. M. B., Hoare, T. (2013). “Designing responsive microgels for drug delivery applications”. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 51 (14), 3027–3043. <https://doi.org/10.1002/pola.26707>
- Smith, A. J., Graves, B., Child, R., Rice, P. J., Ma, Z., Lowman, D. W., Ensley, H. E., Ryter, K. T., Evans, J. T., Williams, D. L. (2018). “Immunoregulatory Activity of the Natural Product Laminarin Varies Widely as a Result of Its Physical Properties”. *The Journal of Immunology*, 200 (2), 788–799. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701258>
- Soler-Botija, C., Bagó, J. R., Lluçà-Valldeperas, A., Vallés-Lluch, A., Castells-Sala, C., Martínez-Ramos, C., Fernández-Muiños, T., Chachques, J. C., Pradas, M. M., Semino, C. E., Bayes-Genis, A. (2014). “Engineered 3D bioimplants using elastomeric scaffold, self-

assembling peptide hydrogel, and adipose tissue-derived progenitor cells for cardiac regeneration”. *American Journal of Translational Research*, 6 (3), 291–301. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936221>

Staudinger, H. (1920). “Über Polymerisation”. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 53 (6), 1073–1085. <https://doi.org/10.1002/cber.19200530627>

Su, H., Wang, Y., Gu, Y., Bowman, L., Zhao, J., Ding, M. (2018). “Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine”. *Journal of Applied Toxicology*, 38 (1), 3–24. <https://doi.org/10.1002/jat.3476>

Suner, S. S., Sahiner, M., Sengel, S. B., Rees, D. J., Reed, W. F., Sahiner, N. (2018). “Responsive biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications”. Makhlouf, A. S. H., Abu-Thabit, N. Y. (eds.). in: *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1*. Elsevier. (pp. 453–500). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00021-7>

Szeghalmi, A., Kaminskyj, S., Gough, K. M. (2007). “A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (5), 1779–1789. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0850-2>

Tavakoli, J., Tang, Y. (2017). “Hydrogel Based Sensors for Biomedical Applications: An Updated Review”. *Polymers*, 9 (12), 364. <https://doi.org/10.3390/polym9080364>

Tavakoli, S., Klar, A. S. (2020). “Advanced Hydrogels as Wound Dressings”. *Biomolecules*, 10 (8), 1169. <https://doi.org/10.3390/biom10081169>

Tharanathan, R. N. (2002). “Food-Derived Carbohydrates - Structural Complexity and Functional Diversity”. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (1), 65–84. <https://doi.org/10.1080/07388550290789469>

Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., Browder, I. W., Williams, D. L. (2001). “Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity”. *Free Radical Biology and Medicine*, 30 (4), 393–402. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00485-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00485-8)

Uthaman, S., Maya, S., Jayakumar, R., Cho, C.-S., Park, I.-K. (2014). “Carbohydrate-Based Nanogels as Drug and Gene Delivery Systems”. *Journal of Nanoscience and*

*Nanotechnology*, 14 (1), 694–704. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8904>

Van Tran, V., Park, D., Lee, Y.-C. (2018). “Hydrogel applications for adsorption of contaminants in water and wastewater treatment”. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (25), 24569–24599. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2605-y>

Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S.-K., Shim, M. (2016). “Seaweed Polysaccharide-Based Nanoparticles: Preparation and Applications for Drug Delivery”. *Polymers*, 8 (2), 30. <https://doi.org/10.3390/polym8020030>

Venkatesan, J., Lowe, B., Anil, S., Manivasagan, P., Kheraif, A. A. Al, Kang, K.-H., Kim, S.-K. (2015). “Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications”. *Starch - Stärke*, 67 (5–6), 381–390. <https://doi.org/10.1002/star.201400127>

Vinogradov, S. V. (2006). “Colloidal microgels in drug delivery applications”. *Current pharmaceutical design*, 12 (36), 4703–4712. <https://doi.org/10.2174/138161206779026254>

Wanakule, P., Liu, G. W., Fleury, A. T., Roy, K. (2012). “Nano-inside-micro: Disease-responsive microgels with encapsulated nanoparticles for intracellular drug delivery to the deep lung”. *Journal of Controlled Release*, 162 (2), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.026>

Wang, H., Xu, Z., Wu, Y., Li, H., Liu, W. (2018). “A high strength semi-degradable polysaccharide-based hybrid hydrogel for promoting cell adhesion and proliferation”. *Journal of Materials Science*, 53 (9), 6302–6312. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2019-8>

Wang, X., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., Tong, H., Hou, W., Bai, S. (2017). “Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting”. *Polymers*, 9 (12), 401. <https://doi.org/10.3390/polym9090401>

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Malek, K. (2017). “Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review”. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317–335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>

Williams, D. F. (2008). “On the mechanisms of biocompatibility”. *Biomaterials*, 29 (20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>

- Willner, I., Willner, B. (2010). “Biomolecule-Based Nanomaterials and Nanostructures”. *Nano Letters*, 10 (10), 3805–3815. <https://doi.org/10.1021/nl102083j>
- Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J. S., Xiao, W., Gonik, A. M., Agarwal, R. G., Lam, K. S. (2011). “The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligochohic acid based micellar nanoparticles”. *Biomaterials*, 32 (13), 3435–3446. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.021>
- Xie, J., Guo, L., Ruan, Y., Zhu, H., Wang, L., Zhou, L., Yun, X., Gu, J. (2010). “Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391 (1), 958–962. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.173>
- Yin, Y., Hu, B., Yuan, X., Cai, L., Gao, H., Yang, Q. (2020). “Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System for Biomedical Applications”. *Pharmaceutics*, 12 (3), 290. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030290>
- You, J.-O., Peng, C.-A. (2005). “Calcium-Alginate Nanoparticles Formed by Reverse Microemulsion as Gene Carriers”. *Macromolecular Symposia*, 219 (1), 147–153. <https://doi.org/10.1002/masy.200550113>
- Zargarzadeh, M., Amaral, A. J. R., Custódio, C. A., Mano, J. F. (2020). “Biomedical applications of laminarin”. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115774. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115774>
- Zhang, H., Zeng, H., Priimagi, A., Ikkala, O. (2019). “Programmable responsive hydrogels inspired by classical conditioning algorithm”. *Nature Communications*, 10 (1), 3267. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11260-3>