

Nostoc commune yüklü pH duyarlı taşıyıcı mikrokürelerin üretimi ve farklı pH değerlerindeki salım kinetiklerinin incelenmesi

Cankız Gizem DELİBALTA^{1*}, Ezgi EREN BELGİN², Cansu KORKMAZ¹, Hilal GÖNEN¹, Hüseyin ÇİÇEK²

¹Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kötekli Kampüsü, Muğla.

²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fak. Kimya Bölümü, Kötekli Kampüsü, Muğla.

Geliş Tarihi (Received Date): 27.08.2021

Kabul Tarihi (Accepted Date): 22.04.2022

Öz

Mikroküreler, kontrollü ilaç salımı için kullanılan, etkin maddeyi moleküler düzeyde partiküller şeklinde taşıyan ve çapları birkaç mikrondan milimetreye kadar değişebilen taşıyıcılardır. Mikroküreler, pH değişimine bağlı olarak kontrollü salım yapabilmektedir. Bu çalışmada, doğal jelatin ve sodyum aljinat polimerleri kullanılarak pH duyarlı ilaç taşıyıcı mikroküreler üretilmiştir. Mikrokürelere literatürde antikanser etkileri olduğu ve kolon kanserinde antitümör ajanı olarak kullanımının gelecek vadettiği raporlanan *N. commune* ekstraktı hazırlanarak hücre başına yaklaşık 0,12 mg yüklenmiştir. Gastrointestinal sistemde mikroküre parçalanma ve etkin madde salım özelliklerinin incelenmesi için farklı pH ortamlarında spektrofotometrik olarak salım kinetiği çalışmaları yapılmıştır. Sonuçta, ekstrakt salınımının kolonun pH'ında en hızlı olduğu ve mikrokürelerin etken madde hedefleme için kolon kanseri tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Nostoc commune*, mikroküre, pH duyarlı küre, salım kinetiği, kontrollü salım.

*Cankız Gizem DELİBALTA, cankizdelibalta@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3199-3709>

Ezgi EREN BELGİN, ebelgin@mu.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0002-1089-3741>

Cansu KORKMAZ, infloresans-cns@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3027-7687>

Hilal GÖNEN, h.lalg.nen@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4777-1713>

Hüseyin ÇİÇEK, hcicek@mu.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0001-9719-6481>

Production of *Nostoc commune* loaded pH sensitive carrier microspheres and analysis of release kinetics at different pH values

Abstract

Microspheres are carriers used for controlled drug release, carrying the active substance in the form of particles at the molecular level, and their diameters can vary from a few microns to millimeters. Microspheres can make controlled release depending on the pH change. In this study, pH sensitive drug carrier microspheres were produced using natural gelatin and sodium alginate polymers. N. commune extract, which has been reported to have anticancer effects in the literature and to be used as an antitumor agent in colon cancer, was prepared and loaded with approximately 0.12 mg per cell. In order to examine the microsphere fragmentation and drug release properties in the gastrointestinal system, spectrophotometric release kinetics studies were carried out in different pH environments. In conclusion, it was observed that the release of the extract is fastest at the pH of the colon and the microspheres have the potential to be used in colon cancer therapy for drug targeting.

Keywords: *Nostoc commune, microspheres, pH sensitives, release kinetics, controlled release.*

1. Giriş

Kontrollü ilaç salım sistemleri etkin maddeyi bölgesel veya sistematik olarak önceden belirlenmiş tedavi edici oranda hedef bölgede uygun süre koruyabilen sistemlerdir [1, 2]. Bu sistemlerinde hem taşıyıcının oluşturulması hem de sistemden salım hızını kontrol etmek için genellikle doğal ve/veya sentetik polimerler kullanılmaktadır [3-7]. Çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerde polimer malzemelerin çeşitli formları kullanılmakta ve sistem özellikleri polimer ve formülasyon özelliklerine bağlı olarak pH, iyonik kuvvetler, motilite hızı ve enzim gibi fizyolojik koşulları oluşturan faktörlerden etkilenmektedir [1-8].

Mikroküreler günümüzde kontrollü ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [9,10]. Mikroküreler, etkin maddeyi moleküler düzeyde partiküller şeklinde taşıyan, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olan ve boyutları birkaç mikrondan milimetreye kadar değişebilen çap büyüklüğüne sahip, monolitik yapıda mikro taşıyıcılardır [11-13]. Mikroküreler, etken maddelerin kontrollü salımı için oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir. Çeşitli uyaranlara karşı tasarlanabilen mikroküreler, pH değişimine bağlı olarak da kontrollü salım yapabilmektedir [14,15]. Son yıllarda ilaç salımını ile ilgili yapılan birçok çalışmada biyobozunur polimer mikroküreler üzerinde durulmuştur. Bu tür sistemler aracılığıyla ilacın verilmesi avantajlı haldedir. Bunun nedeni mikrokürelerin oral yolla ya da enjeksiyon yoluyla alınabilmesi ve istenilen serbest salım profilleri için uygun hale getirilebilmesidir [16-18]. Mikrokürelerden etkin madde salımı yüzey aşınması, toplam küre dağılması,

mikroküre hidrasyonu, etkin maddenin difüzyonu ve desorpsiyonu, sızma olayları ile gerçekleşmektedir.

Ancak oral yolla alınan mikroküre kontrollü salım sistemleri için sindirim sisteminin aşılması gereken önemli zorlukları vardır. Safra kesesinden ince bağırsağa salgılanan ve yağların emülsifiye olmasını sağlayan yüzey etkin özellikteki safra tuzları, sindirime yardımcı enzimlerin etkileri ve değişik pH değerine sahip bölgeler, etkin maddenin parçalanmasına ve biyoyararlanımının azalmasına sebep olabilecek başlıca faktörlerdir [19,20]. Gastrointestinal kanalın farklı segmentlerindeki pH çeşitliliği kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır [21]. Etkin madde çekirdeğinin pH'ya duyarlı polimerler olan akrilik ester ve metakrilik asiden kopolimerinden oluşan Eudragit®'lerle kaplanması, bu amaçla kullanılan en başarılı yöntemdir [22,23].

Oral yolla alınan mikroküre kontrollü salım sistemleri için aljinat ve jelatin gibi polimerlerin kullanımı da mevcuttur. Sodyum aljinat kahverengi deniz yosunu türlerinde bulunan yapısal bir polisakkarittir. Aljinat ise D-mannuronik asit ile D-gluronik asidin (1-4) bağlanmasıyla elde edilen anyonik bir polimerdir. Aljinat 100-3000 arasında değişen bu yapı taşlarının esnek bir bağ ile birbirine bağlandığı polisakkarit yapıdadır [24,25]. Doğal olarak oluşan bu polimerik yapılar, biyopolimer olarak adlandırılır. Jelatin ise hayvansal deri, kemik ve bağ dokusunun başlıca bileşeni olan kollajenin belirli şartlarda hidrolizi ile elde edilen doğal bir biyopolimerdir [26-28]. Jelatin de sodyum aljinat gibi biyoyoumlu bir polimerdir.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde hedeflenen etkiye göre farklı doğal ve yapay ajanlar kullanılmaktadır. Doğal ajanlar özellikle son yıllarda çok tercih edilmekte ve farklı ajanların farklı tedaviler için kullanımları araştırılmaktadır. Alglerin de yara iyileştirici, antikanser, antiviral, antioksidatif, kolesterol düşürücü gibi birçok faydalı etkileri mevcuttur. Bu etkileri nedeniyle, ilaç ve kozmetik alanında oldukça geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Mavi yeşil algler adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek olması nedeniyle tuz gölleri, sıcak su kaynakları, deniz ve tatlı su ortamları gibi birçok ortamda dağılım göstermektedirler [29,30]. Siyanobakteri şubesinin (Cyanobacteria) makroskopik üyesi olan *Nostoc commune* de gösterdiği birçok etki sebebiyle gelecek vaad eden biyoaktif bileşenlere sahiptir.

Nostoc commune (*N. commune*) morfolojik olarak yaş halde iken mavimsi yeşil, zeytin yeşili veya kahverengidir; ancak kuru ortamda hafif mat kahverengimsidir [31]. Yarı karasal (çöllerde, kuru otlaklarda ve dağlarda kutuplardan tropikal bölgelere değişen kuru ve ıslak çıplak topraklarda ve kaya yüzeylerinde) olarak genel dağılıma sahiptir ve 1-5 mm kalınlığında mavi yeşil tabaka ile jelatinimsi yapıda koloni oluşturmaktadır [32-34]. *N. commune*, Çin'de uzun yıllardan beri toplanıp pazarlanmaktadır [35]. *N. commune*, kimyasal içeriğinin yaklaşık %51'ini karbohidratlar (galaktoz, glikoz, trehaloz, fruktoz, ksiloz ve polihidrik alkol dahil olmak üzere), kuru ağırlığının yaklaşık % 0.21'ini yağ asitleri, yaklaşık %27'sini proteinler, peptitler ve serbest amino asitleri, yaklaşık % 4'ünü (Fe, Zn, Ca gibi) temel elementlerce zenginleştirilmiş mineraller oluşturmaktadır. Bu türün antiinflamatuvar, antibakteriyel, antikanserojen, immünomodüle edici, antifungal aktivite özellikleri gösterdiği literatürde bildirilmiştir [31].

Nostoc sphaeroids Kütz türünün yüksek yağ organizasyonuna sahip farelerin bağırsak duvarını ve bağırsak mikrobiyota bileşimini korumasına, kronik iltihaplanmayla ilişkili olan hiperlipidemiye iyileştirmesine yönelik çalışma literatürde yer almaktadır [36].

Buradan hareketle, *N. commune*'nin antikanser etkileri olduğu ve kolon kanserinde antitümör ajanı olarak kullanımının gelecek vadettiği düşünülmektedir.

Bu sebeple bu çalışmada *N. commune* ekstraktı yüklü ilaç taşıyıcı mikroküreler üretilmiş ve gastrointestinal sistemde kolona hedeflenmiş sistem olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi için farklı pH ortamlarında salım kinetikleri incelenmiştir.

2. Deneysel çalışmalar

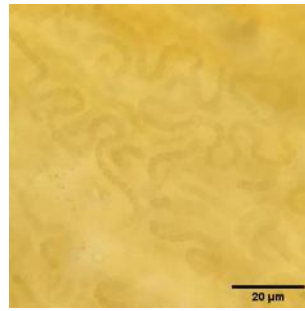
2.1. Malzeme

Yapılan çalışmada *N. commune* etanol ekstraktı kullanılmıştır. *N. commune*, Muğla-Menteşe Kötekli Bölgesi'nden, yağmur sonrası toprakta oluşan su birikintilerinin üzerinde, bazı tek yıllık bitkilerinin yakınında, Nisan 2019-Aralık 2020 dönemlerinde toplanıp herbaryumda teşhisi yapılarak CK0001 ile numaralandırılmış, saf su ile yıkandıktan sonra laboratuvar ortamında kurumaya bırakılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. *N. commune* makroskobik görünümü (a ve b: yaş, c: kuru)

Ekstraksiyon işlemi çözücüsü olarak n-Hegzan (%99, Tekkim) ve etanol ($\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. *N. commune* türünün mikroskobik görüntüsü Şekil 2.'de verilmiştir.



Şekil 2. *N. commune* mikroskobik görünümü

Mikrokürelerin üretimi için, Sodyum Aljinat (Sigma Aldrich, orta viskozite), ve Jelatin (Huaxuan, 80-120 bloom) doğal polimerleri ticari olarak temin edilip kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak ise ticari olarak temin edilen CaCl_2 (Riedel-de-Haen) kullanılmıştır. CaCl_2 çözeltisinin iyonik gücü NaCl (Merck) ile ayarlanmıştır.

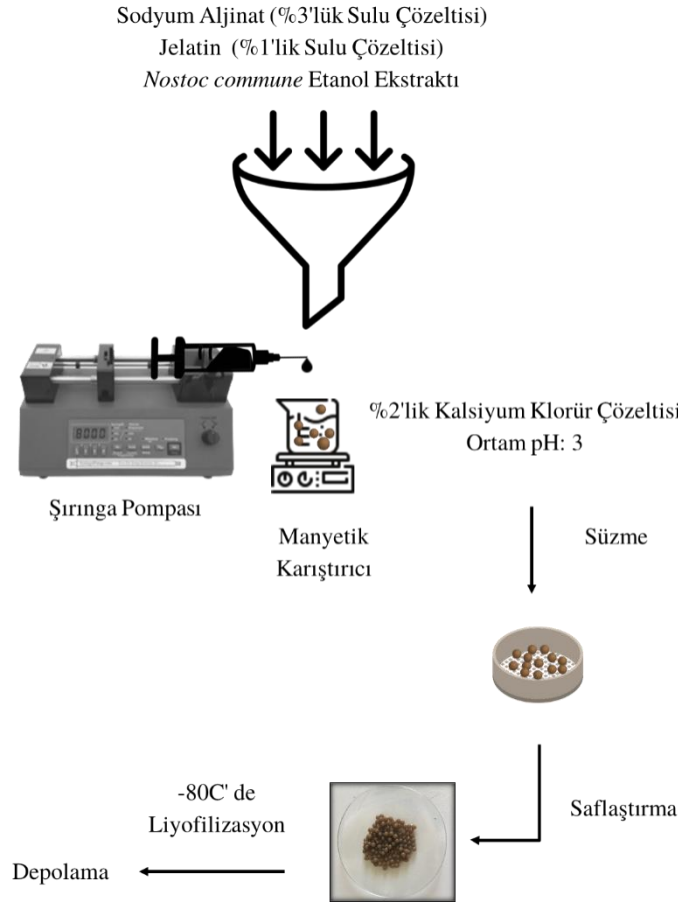
2.2. *N. commune* ekstraktı hazırlanması

Kurutulmuş ve küçük parçalara ayrılmış *N. commune* numuneleri ilk önce 1/3 (v/v, katı numune/sıvı) oranında hegzan ile çalkalamalı inkübatörde 37°C ' de 24 saat süreyle

muamele edilmiş, 24 saatlik devir sonunda karışım süzölmüş ve katı kısım 24 saat havada kurutulmuştur. Ardından kuruyan numunelere, 1/3 (v/v, katı numune/sıvı) oranında etanol ilave edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37°C’de, 24 saat ekstraksiyon yapılmıştır. İşlem 3 kere tekrar edilmiştir. Elde edilen çözeltiler birleştirilerek 40°C’de döner buharlaştırıcı kullanılarak 4 saat boyunca çözücü uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır [37-40]. Ardından *N. commune* ekstraktı ışık almayacak şekilde 72 saat havada kurutulmuş ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C’de depolanmıştır.

2.3. *N. commune* yüklü mikrokürelerin üretilmesi

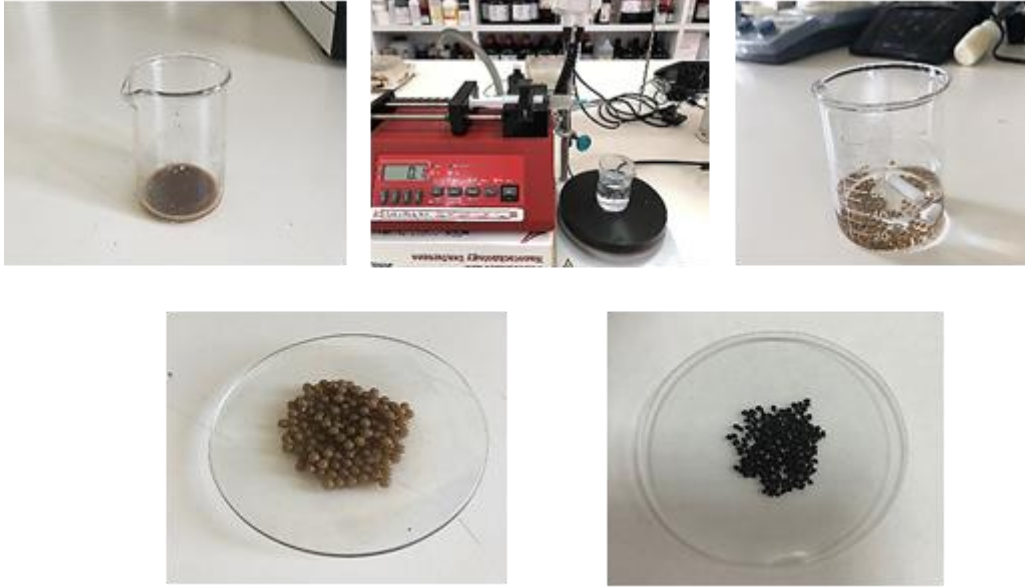
N. commune etanol ekstraktı yüklenmiş mikrokürelerin üretilmesi için öncelikle CaCl₂ (0.15 M) çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltinin iyonik gücü NaCl kullanılarak 0.1’e, pH’sı ise 0.1M HCl ve/veya 0.1M NaOH kullanılarak 3.0’e ayarlanmıştır. Daha sonra %3’lük sodyum aljinat çözeltisi (NaAlg) hazırlanmış ve çözelti ultrasonik banyo yardımıyla homojenize edilmiştir. Son olarak %1’lik jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. Mikroküre üretiminde kullanılmak üzere hazırlanan NaAlg ve jelatin çözeltileri karıştırılmış ve homojenize edilmiştir [41]. Mikroküre üretimi işlem basamakları Şekil 3.’de verilmiştir.



Şekil 3. Mikroküre üretim aşamaları şematik gösterimi

Mikroküre üretimi için 8 mL NaAlg-Jelatin çözeltisine 0.035 gram *N. commune* etanol ekstraktı (NC) doğrudan eklenmiş ve NaAlg-Jelatin-NC karışımı homojenize edilmiştir. NaAlg-Jelatin-NC karışımının pH’sı 0.1M HCl ve/veya 0.1M NaOH ile 7’ye ayarlanmıştır. Aljinat-Jelatin-NC karışımı şırınga pompası enjektörüne çekilerek, manyetik karıştırıcıda karışımı sağlanmakta olan 40 mL’lik CaCl₂ çözeltisine 10 cm yükseklikten 0.1 mL hız ile damlatılmış böylece çözelti içinde mikrokürelerin oluşumu

sağlanmıştır. Mikroküreler oluştuktan sonra manyetik karıştırıcıda 5 dakika daha karıştırılmaya devam edilmiş, mikroküreler süzülerek CaCl_2 çözeltisi ayrılmış ve distile su ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra mikroküreler falkon tüplerine alınmış ve -80°C 'de 2 gün boyunca liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır. Liyofilize mikroküreler $+4^\circ\text{C}$ 'de depolanmıştır. Şekil 4'te bazı mikroküre üretimi basamakları ve üretilen mikroküreler görülmektedir.



Şekil 4. *N. commune* yüklü mikrokürelerin hazırlanması işleminin farklı basamakları ve üretilen mikroküreler

2.4. Üretilen mikrokürelerin farklı pH'larda salım kinetiklerinin incelenmesi

Kullanımı esnasında oral yolla alınp kolona hedeflenmesi planlanan mikrokürelerin ilaç salım kinetiklerinin incelenmesi için öncelikle sindirim sistemini simüle eden tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler pH: 1.3/3.0/5.0/6.0 ve 7.0 değerlerinde olup sindirim sistemi elemanları olan yapay ağız, mide ve bağırsak ortamını simüle etmesi amaçlanmıştır [44]. Tablo-1'de pH tampon çözeltilerinin hazırlanışı verilmiştir.

Tablo 1. pH tampon çözeltilerinin hazırlanması

pH Değeri	Hazırlanma şekli
pH: 1.3	15,9 mL 0,1 M Sodyum Sitrata çözeltisi 0,1 M HCl asit çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanarak pH'ı 1,3 olarak ayarlanmıştır.
pH: 3.0	81 ml 0,1 M Glisin çözeltisine 0,1 M HCl Asit çözeltisi eklenir.
pH: 5.0	0,95 mL 0,067 M Na_2HPO_4 çözeltisi 0,067 M KH_2PO_4 çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanarak pH'ı 5,0 olarak ayarlanmıştır.
pH: 6.0	12,1 mL 0,067 Na_2HPO_4 çözeltisi 0,067 M KH_2PO_4 çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanarak pH'ı 6,0 olarak ayarlanmıştır.
pH: 7.0	49,2 mL 0,067 Na_2HPO_4 çözeltisi 0,067 M KH_2PO_4 çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanarak pH'ı 7,0 olarak ayarlanmıştır.

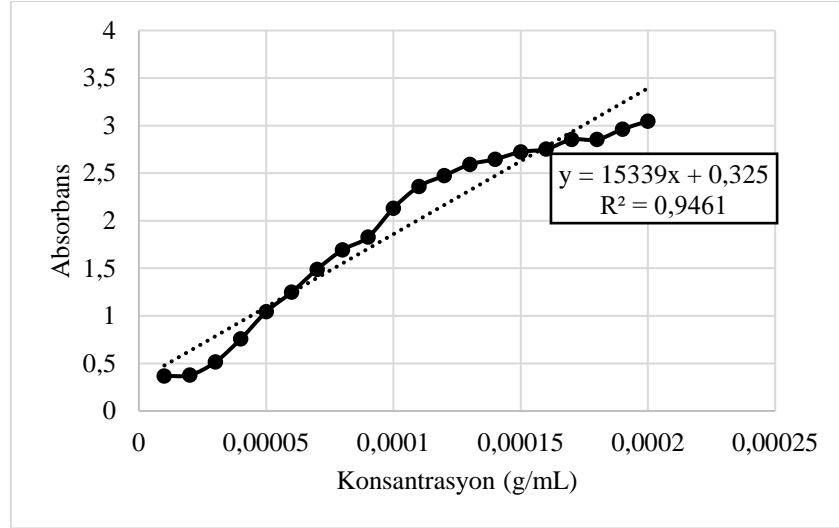
Daha sonra 0.05'şer gram liyofilize edilmiş *N. commune* yüklü ve yüksüz mikroküre hazırlanan tampon çözeltilerden 100'er mL içeren beherlere alınmıştır. Tampon çözelti içindeki mikroküreler 37°C sabit sıcaklıkta tutulan kabine yerleştirilmiş 200 cpm'de çalkalanmaya başlamıştır. Belirlenen zaman aralıklarında, (0, 5, 10, 25, 35, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480. dk) çözeltilerden 3'er mL sıvı alınıp salınan *N. commune* absorbanı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler her değer için üç kez tekrarlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler için UV spektrometresi (Wise Clean; EWUC-A03H) kullanılmış ve analizler 200-800 nanometre dalga boyu aralığı için taramalı olarak yapılmıştır. Elde edilen grafikler ve absorban değerleri kayıt altına alınmıştır. Sadece mikrokürelere salınan ekstraktan gelen absorban değerlerini belirlemek amacıyla aynı işlemler yüksüz mikroküreler için de gerçekleştirilmiştir. Yüklü ve yüksüz kürelerden elde edilen absorban değerleri farkının salınan ekstraktan kaynaklandığı kabul edilmiştir.

Mikroküre spektrofotometrik ölçümleri tamamlandıktan sonra, salınan *N. commune* ekstraktı miktarını belirlemek için *N. commune* 0.01- 0.20 gmL⁻¹ aralığında derişimi bilinen 20 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmış ve aynı koşullarda spektrofotometrik ölçümler alınarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Mikrokürelere salınan *N. commune* miktarlarının belirlenmesi için kalibrasyon eğrisinden regrasyon eşitliği bulunmuştur. Daha sonra elde edilen regrasyon eşitliği yardımıyla her numuneden salınan *N. commune* ekstraktı konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3. Sonuçlar ve tartışma

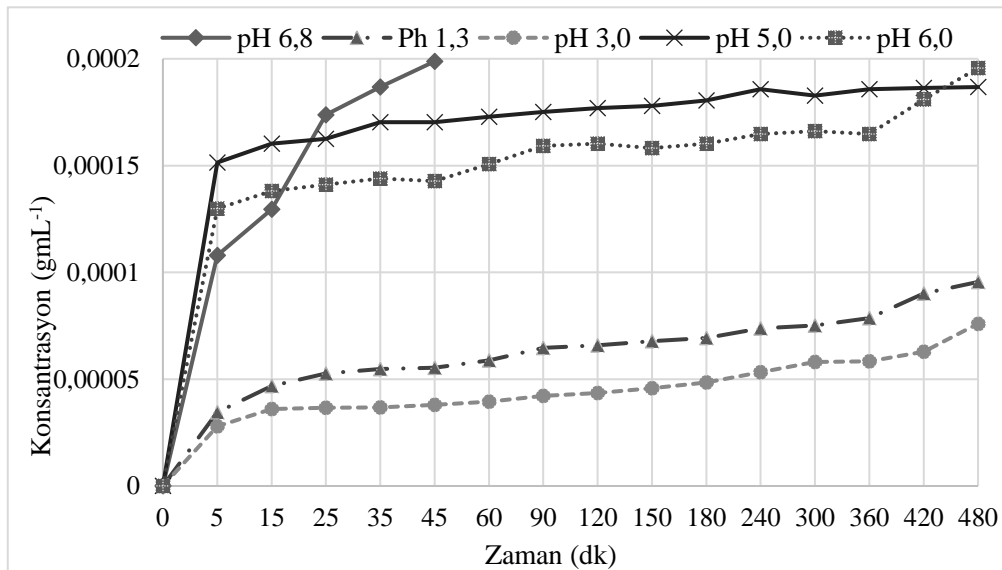
Literatürde doğal bileşen yüklü pH kontrollü kürelerin salım kinetiğinin incelenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada sodyum aljinat kullanılmış ve mikroküreler elektrospay ile CaCl₂ çözeltisinde toplanmıştır. Elde edilen kürelerin salım kinetikleri incelendiğinde pH 1.7 de çok az olan salımın pH 7 civarında oldukça arttığı tespit edilmiştir [45]. Bu çalışmada da sistemde sodyum aljinatın yanı sıra jelatin de kullanılarak bu iki polimer arasında pH 3'te oluşacak pozitif ve negatif gruplar arasındaki etkileşimden faydalanılması ve böylece çok farklı bileşenlere sahip ekstrakt ile daha uyumlu bir yapının elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla su ortamında oluşturulan mikrokürelerin kararlılığının artırılması amacıyla çapraz bağlayıcı ajan olarak CaCl₂ kullanılmıştır.

Mikrokürelere farklı pH'larda salınan *N. commune* ekstraktı konsantrasyonunun hesaplanabilmesi amacıyla hazırlanan derişimi bilinen çözeltilerden elde edilen dalga boyu-absorban grafiği elde edilmiştir. Absorban piki *N. commune* için yaklaşık 217.0 nm dalga boyunda görülmüştür [46]. Bu yüzden kalibrasyon eğrisinin elde edilmesinde bu dalga boyundaki absorban değerleri kullanılmıştır. Standart çözeltilerin 217.0 nanometre dalga boyundaki absorban değerleri ve bilinen derişimleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Absorban/Konsantrasyon (gmL⁻¹) kalibrasyon eğrisinin çizilmesini takiben grafik programı yazılımı aracılığı ile kalibrasyon eğrisine ait kalibrasyon denklemi bulunmuştur ve grafikte gösterilmiştir (Şekil-5) .

Şekil 5: *N. commune* kalibrasyon eğrisi

Daha sonra yüksüz mikrokürelerden gelebilecek olası absorbans değerleri incelenmiş, ancak yüksüz mikrokürelerin UV spektrumlarında ilgili absorbans değerinde pik bulunmamıştır. Bu nedenle yüklü kürelerin absorbans değerlerinin sadece *N. commune*'den geldiği kabul edilmiştir.

Kalibrasyon denkleminin elde edilmesi ve yüksüz küre UV spektrumlarının incelenmesini takiben mikrokürelerden zaman ve ortam pH'ına bağlı olarak *N. commune* salınımının incelenmesi için hazırlanan tampon çözeltilerde *N. commune* absorbansı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Belirlenen absorbans değerlerinin elde edilen kalibrasyon denkleminde yerine konulması ile çözeltilere salınan *N. commune* konsantrasyonu hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 2.'de verilmiştir. Ayrıca belirlenen absorbans değerlerinin elde edilen kalibrasyon denkleminde yerine konulması ile çözeltilere salınan *N. commune* konsantrasyonu hesaplanmıştır. Elde edilen konsantrasyon değerlerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile Şekil 6.'da verilen salım grafiği elde edilmiştir.



Şekil 6. Farklı pH değerlerinde zamana bağlı olarak salınan ekstrakt konsantrasyonu

Tablo 2. Farklı pH değerlerine sahip çözeltilerde *N. commune* salımı çalışmaları kapsamında zamana bağlı olarak elde edilen absorban ve konsantrasyon değerleri

Konsantrasyon (gmL ⁻¹)	Absorbans (≅217.0 nm)	Konsantrasyon (gmL ⁻¹)	Absorbans (≅217.0 nm)	Konsantrasyon (gmL ⁻¹)	Absorbans (≅217.0 nm)	Konsantrasyon (gmL ⁻¹)	Absorbans (≅217.0 nm)	Konsantrasyon (gmL ⁻¹)	Absorbans (≅217.0 nm)	Zaman (dk)
pH 6.8		pH 6.0		pH 5.0		pH 3.0		pH 1.3		
0.0001080±0.0000526	1.9817	0.0000212±0.0000242	0	0.000151±0.0000464	2.6469	0.0000345±0.0000389	0.8536	0.0000279±0.0000297	0.7527	5
0.0001296±0.0000239	2.3123	0.0001381±0.0000258	2.4434	0.000160±0.0000382	2.9159	0.0000469±0.0000297	1.044	0.0000360±0.0000248	0.8773	15
0.0001738±0.0000506	2.9908	0.0001411±0.0000464	2.4899	0.000162±0.0000235	2.8167	0.0000527±0.0000546	1.133	0.0000366±0.0000248	0.886	25
0.0001868±0.0000248	3.1896	0.0001440±0.0000345	2.5331	0.000170±0.0000187	2.9368	0.0000547±0.0000389	1.164	0.0000368±0.0000296	0.8899	35
0.0001988±0.0000369	3.3737	0.0001428±0.0000533	2.5151	0.000170±0.0000187	2.9368	0.0000554±0.0000369	1.175	0.0000379±0.0000446	0.9066	45
0.0002241±0.0000652	3.7628	0.0001506±0.0000369	2.6357	0.000173±0.0000658	3.0726	0.0000589±0.0000147	1.228	0.0000395±0.0000389	0.9307	60
0.0002367±0.0000384	3.9565	0.0001593±0.0000248	2.7682	0.000175±0.0000240	3.0103	0.0000647±0.0000283	1.3173	0.0000421±0.0000521	0.9709	90
0.0002396±0.0000302	3.9999	0.0001602±0.0000459	2.783	0.000177±0.0000339	3.0391	0.0000659±0.0000300	1.3353	0.0000435±0.0000491	0.9915	120
0.0002396±0.0000415	3.9999	0.0001582±0.0000802	2.752	0.000178±0.0000356	2.985	0.0000678±0.0000567	1.365	0.0000457±0.0000459	1.0267	150
0.0002396±0.0000588	3.9999	0.0001602±0.0000501	2.783	0.000181±0.0000412	2.936	0.0000693±0.0000384	1.3879	0.0000484±0.0000369	1.0675	180
0.0002396±0.0000457	3.9999	0.0001648±0.0000412	2.853	0.000186±0.0000236	3.174	0.0000737±0.0000290	1.4561	0.0000533±0.0000387	1.1427	240
0.0002396±0.0000446	3.9999	0.0001661±0.0000658	2.8721	0.000183±0.0000203	3.0138	0.0000752±0.0000248	1.4784	0.0000580±0.0000598	1.215	300
0.0002396±0.0000520	3.9999	0.0001648±0.0000366	2.853	0.000186±0.0000412	3.1749	0.0000786±0.0000214	1.5302	0.0000584±0.0000585	1.2205	360
				0.000186±0.0000338	3.1014	0.0000901±0.0000252	1.7074	0.0000628±0.0000290	1.2883	420
				0.000187±0.0000724	3.1896	0.0000955±0.0000226	1.7903	0.0000760±0.0000125	1.4902	480

Çalışmada mikroküre üretiminde kullanılan sodyum aljinatın sulu çözeltisi, pH 7.0 değerinin altında negatif yüklü olup bu değer üzerinde yükü yoktur. Bu yüzden pH 7.0 değerinin üzerinde, sodyum aljinat ve jelatin arasında çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleşmemiştir [46,47]. Fakat daha sonra elde edilen karışıma düşük pH değerine sahip çözeltinin eklenmesi, jelatine pozitif yük kazandırmış ve çevresindeki sodyum aljinat molekülleri ile çapraz bağlanmıştır. $CaCl_2$ 'den gelen Ca^{+2} katyonlarının her biri, negatif (-) yüklü aljinat anyonları ile iyonik etkileşime neden olarak çapraz bağlanmaya neden olmuştur. Böylece daha kararlı hale getirilen ve liyofilize edilen mikroküreler, beklendiği gibi sindirim sistemini simüle eden tampon çözeltilerde deforme olmuş ve şişmiştir. Bu deformasyon ve zincir hareketleri sonucu birbirinden uzaklaşan zincirler arasında oluşan açıklıklardan ekstrakt ortama salınmıştır.

Farklı pH değerlerine sahip çözeltiler için elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; pH 1.3'de polimer zincirlerindeki şişme kaynaklı oluşan açıklıklar sebebiyle mikroküre yapısı içerisinde bulunan *N. commune* ekstraktı çözelti ortamına salınmaya başlamıştır. Ancak partikül yapısının oluşmasını sağlayan ve pH 3.0 değerinin altında ağırlıklı olarak oluşan iyonik etkileşimlerin önemli bir değişime uğramaması nedeniyle pH 1.3'de salım miktarı düşük kalmıştır. Benzer şekilde yine nispeten düşük bir pH değeri olan pH 3.0'de mikrokürelerin yapısını oluşturan iyonik etkileşimlerin önemli miktarda değişime uğramaması nedeniyle deformasyon minimum seviyelerde seyretmiş ve ekstrakt salım miktarı düşük olmuştur. Zaman geçtikçe her iki pH değerinde de mikrokürelerden salınan ekstrakt miktarı mikrokürelerin 8 saatlik süre boyunca şişmesi ve kısmen çözünmeye uğraması sonucu artmış ancak bu sürenin sonlarına doğru artış miktarında azalma gözlemlenmiştir. 8 saatlik süre sonuna doğru salınan ekstrakt miktarında önemli bir artış gözlemlenmemiştir. Bu durum mikrokürelerin 8 saatin sonunda salılabildiği ekstrakt miktarının maksimum değerine ulaştığı kanısını doğurmuştur.

Ortam pH'ının artmasına paralel olarak pH 5.0'de ekstrakt salım miktarı da artmaya başlamıştır. Bu pH değerinde polimer zincirlerinin yer değiştirmesi sonucu mikroküre yüzeyindeki konformasyonel yapı değişimlerine ek olarak yapıdaki iyonik bağlar da azalmaya başladığından ekstrakt salım miktarı da artmıştır. İyonik bağların azalması polimer zincir yapısını bozarak mikrokürelerden daha fazla ekstrakt salınmasına neden olmuştur. Diğer yandan pH 6.0 tampon çözeltisinde zamana bağlı olarak salınan ekstrakt miktarlarına bakıldığında ekstraktın mikrokürelerden daha fazla zayıflayan iyonik etkileşimler dolayısıyla pH 5.0'e göre daha hızlı salındığı gözlemlenmiştir.

Ortam pH değerinin 7.0 olması ile beraber mikroküre polimer zincirleri arasındaki iyonik etkileşim yok olmaya başlamış ve şişme sonucu zincirler hızla birbirinden uzaklaşmaya başlamıştır. Böylece ekstrakt mikrokürelerden çok hızlı bir şekilde salınmıştır. Üretilen mikrokürelerin pH 7.0'de belirli bir süre sonra parçalandığı bilinmektedir. Parçalanma pH 7.0'de mikroküre yapısındaki iyonik bağların ortadan kalkması ve mikrokürelerin yüzeyden hızlıca çözelti alıp şişmesi sonucu gerçekleşmektedir. Böylece pH 7.0'da 45 dakika gibi kısa bir sürede mikrokürelere yüklenen ekstraktın tamamı çözeltiliye salınmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde üretilen taşıyıcı mikrokürelerin pH duyarlı olduğu, kolon pH'ında (yaklaşık pH 7) en yüksek ve hızlı salımı yaptığı anlaşılmıştır. Bu sebeple özellikle kolona hedeflenen ilaç taşınımı uygulamaları için potansiyelleri olduğu görülmüştür.

Kaynaklar

- [1] Tüylek, Z., İlaç taşıyıcı nanosistemler, **Arşiv Kaynak Tarama Dergisi**, 28, 3, 184-192, (2019).
- [2] Ummadi, S., Shrivani, B., Rao, N. G. R., Reddy, M. S. Nayak, B. S., Overview on controlled release dosage form, **International Journal of Pharma Sciences**, 3, 4, 258-269, (2013).
- [3] Sung, Y. K., Kim, S. W., Recent advances in polymeric drug delivery systems, **Biomaterials Research**, 24, 12, (2020).
- [4] Akash, M. S. H, Rehman, K., Chen, S., Natural and synthetic polymers as drug carriers for delivery of therapeutic proteins, **Polymer Reviews**, 55, 3, 371-406, (2015).
- [5] Mogoşanu, G., D., Grumezescu, A. M., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Natural and synthetic polymers for drug delivery and targeting, **Nanobiomaterials in Drug Delivery**, 229-284, William Andrew Publishing, (2016).
- [6] Aravamudhan, A., Ramos, D., Nada, A., Kumbar, S., **Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications**, Elsevier, 67-89, (2014).
- [7] Kim, J. K., Kim, H. J., Chung, J. Y., Lee, J. H., Young, S. B., Kim, Y. H., Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery, **Archives of Pharmacal Research**, 37, 1,60, 8, (2014).
- [8] Gültekin, H. E., Değim, Z., Biodegradable polymeric nanoparticles are effective systems for controlled drug delivery, **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, 38, 2, 107-118, (2013).
- [9] Tüylek Z., İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim, **Bozok Tıp Dergisi**, 7, 3, 89-98, (2017).
- [10] Dhakar, R. C., Maurya, S., D., Sagar, B., PS., Bhagat, S., Prajapati, S., K., Jain, C. P., Variables influencing the drug entrapment efficiency of microspheres: A pharmaceutical review, **Der Pharmacia Lettre**, 2, 5, 102-116, (2010).
- [11] Singh, A., Sharma, A., Kaur, S. Micro carrier as colon drug delivery system: a review. **International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences**, 3, 6, 1211-1216, (2014).
- [12] Singh, C., Purohit, S., Singh, M., Pandey, B. L., Design and evaluation of microspheres: a review, **Journal of Drug Delivery Research**, 2, 2, (2013).
- [13] Singh, P., Prakash, D., Ramesh, B., Singh, N., Mani, T. T., Biodegradable polymeric microspheres as drug carriers; a review, **Indian Journal of Novel Drug delivery**, 3, 2, 70-82, (2011).
- [14] Brannon-Peppas, L., Peppas, N. A., Dynamic and equilibrium swelling behaviour of pH-sensitive hydrogels containing 2-hydroxyethyl methacrylate, **Biomaterials**, 11, 9, 635-644, (1990).
- [15] Balamuralidhara, V., Pramodkumar, T. M., Srujana, N., Venkatesh, M. P., Gupta, N. V., Krishna, K. L., Gangadharappa, H. V., pH sensitive drug delivery systems:a review, **American Journal of Drug Discovery and Development**, 1, 1, 24-48, (2011).
- [16] Kawaguchi, H., Functional polymer microspheres, **Progress in Polymer Science**, 25, 8, 1171-1210, (2000).
- [17] Vasir, J. K., Tambwekar, K., Garg, S., Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system, **International Journal of Pharmaceutics**, 255, 1–2, 2, 13-32, (2003).

- [18] Edlund, U., A., Degradable polymer microparticles for controlled drug delivery, **Advances in Polymer Science**, 157, 487-495. (2002).
- [19] Şengel Türk, C. T., Haşçıçek, C., Gönül, N., Kolona Hedeflenen İlaç Taşıyıcı Sistemler, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 35,2, 125-148, (2006).
- [20] Wang, G., Wang, J., Wu, W., To, S. S. T., Zhao, H., Wang, J., Review advances in lipid-based drug delivery: enhancing efficiency for hydrophobic drugs, **Expert Opinion Drug Delivery**, 12, 9, (2015).
- [21] Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., Hicks, K. B., Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route, **Biomaterials**, 24, 19, 3333-3343, (2003).
- [22] Thakral, S., Thakral, N. K., Majumdar, D. K., Eudragit®: a technology evaluation, **Expert Opinion on Drug Delivery**, 10, 1, 131-149, (2013).
- [23] Nollenberger, K., Albers, J., Review, Poly(meth)acrylate-based coatings, **International Journal of Pharmaceutics**, 457, 2, 461-469, (2013).
- [24] Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Alginate based new materials, **International Journal of Biological Macromolecules**, 21, 1-2, 47-55, (1997).
- [25] Lee, K. Y., Mooney, D. J., Alginate: properties and biomedical applications, **Progress in Polymer Science**, 37, 1,106-126, (2012).
- [26] Erge, A., Zorba, Ö., Derleme Makale jelatin ve fizikokimyasal özellikleri, **Akademik Gıda**, 14, 4, 431-440, (2016).
- [27] Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P., Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review, **Food Hydrocolloids**, 25, 8, 1813-1827, (2011).
- [28] Gorgieva, S., Kokol, V., Collagen-vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility:review and perspectives, **Biomaterials: Applications for Nanomedicine InTech**, 17-52, (2011).
- [29] Ward, D. M., Castenholz, R. W., Miller, S. R., **Cyanobacteria in geothermal habitats**, In: Whitton B., Ecology of Cyanobacteria II, Springer, 39-63, Dordrecht, (2012).
- [30] Ak, İ., Cirik, S., Mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) ve termalizm, **Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 34, 2, 227-233, (2017).
- [31] Li, Z., Guo, M., Healthy efficacy of *Nostoc commune* vaucher, **Oncotarget**, 9, 18, 14669-14679, (2018).
- [32] Novis, P. M., Whitehead, D., Gregorich, E. G., Hunt, J. E., Sparrow, A. D., Hopkins, D. W., Elberling, B., Greenfield, L.G., Annual carbon fixation in terrestrial populations of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) from an antarctic dry valley is driven by temperature regime, **Global Change Biology**, 13, 224-1237, (2007).
- [33] Holst, J., Butterbach-Bahl, K., Liy, C. Y., Cheng, X. H., Kaiser, A.J., Schnitzler, J. P., Zechmeister-Boltenstern, S., Brüggemann, N., Dinitrogen fixation by biological soil crusts in inner mongolian steppe, **Biology and Fertility of Soils**, 45, 679-690, (2009).
- [34] Møller, C. L., Vangsøe, M. T., Sand-Jensen, K., Comparative growth and metabolism of gelatinous colonies of three cyanobacteria, *Nostoc commune*, *Nostoc pruniforme* and *Nostoc zetterstedtii*, at different temperatures, **Freshwater Biology**, 59, 10, 2183-2193, (2014).
- [35] Schmidt, T., **Cyanobacteria**, in Soule, T., Garcia-Pichel, F., **Encyclopedia of Microbiology**, Elsevier, 799-817, (2019).
- [36] Wei, F., Liu, Y., Bi, C., Chen, S., Wang Y., Zhang, B., *Nostoc* sphaeroids Kütz ameliorates hyperlipidemia and maintains the intestinal barrier and gut microbiota

- composition of high-fat diet mice, **Food science & nutrition**, 8, 5, 2348-2359, (2020).
- [37] Rakhimzhanova, A., Kılınçarslan, Ö., Mammadov, R., *Stellaria media* ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ve fenolik bileşenlerinin karakterizasyonu, **Ordu Ünivertitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 8(2), 165-173, (2018).
- [38] Ninomiya, M., Satoh, H., Yamaguchi, Y., Takenaka, H., Koketsu, M., Antioxidative activity and chemical constituents of edible terrestrial alga *Nostoc commune vauch.*, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 75:11, 2175-2177, (2011).
- [39] Wang, H. B., Wu, S. J., & Liu, D., Preparation of polysaccharides from cyanobacteria *Nostoc commune* and their antioxidant activities, **Carbohydrate Polymers**, 99, 553–555, (2014).
- [40] Mercan, N., Kivrak, I., Duru, M.E., Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey, **Annals of Microbiology**, 56, 373, (2006).
- [41] Ceylan, O., Karakus, H., Çiçek, H., Design and in vitro antibiofilm activity of propolis diffusion-controlled biopolymers. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 68(4), 789–800, (2021).
- [42] Zhi-Cheng, Y., Jin, L., Ahmad, Z., Huang, J., Chang, M., Li, J., *Ganoderma lucidum* polysaccharide loaded sodium alginate micro-particles prepared via electrospraying in controlled deposition environments, **International Journal of Pharmaceutics**, 524 148–158, (2017).
- [43] Karakuş, H., Propolis için uygun taşıyıcı sentezi ve ağız sindirim sistemindeki bazı biyolojik aktivitelerin tayini, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, (2017).
- [44] Saarai, A., Kasparkova, V., Sedlacek, T., Saha, P., A Comparative Study of Crosslinked Sodium Alginate/Gelatin Hydrogels for Wound Dressing, **Gemesed'11: Proceedings of the 4th WSEAS**, International conference on Energy and development, environment, biomedicine, 384–389, (2011).
- [45] Zhi-Cheng, Y., Jin, L., Ahmad, Z., Huang, J., Chang, M., Li, J., *Ganoderma lucidum* polysaccharide loaded sodium alginate micro-particles prepared via electrospraying in controlled deposition environments, **International Journal of Pharmaceutics**, 524 148–158, (2017).
- [46] Hameed, M. S. A., Hassan, S. H., Mohammed, R., Gamal, R., Isolation and characterization of antimicrobial active compounds from the cyanobacterium *Nostoc commune Vauch.*, **Journal of Pure and Applied Microbiology**, (2013).
- [47] Afzal, S., Khan, S., Ranjha, N. M., Jalil, A., Riaz, A., Haider, M. S., Sarwar, S., Saher, F., Naeem, F., The Structural, Crystallinity, and Thermal Properties of pH-responsive Interpenetrating Gelatin/Sodium Alginate-based Polymeric Composites for the Controlled Delivery of Cetrizine HCl, **Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences**, 15, 1, 63-76, (2018).