



**ENJEKTE EDİLEBİLİR HİBRİT BİYOMALZEMELERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE KONTROLLÜ SALIM ETKİNLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Zeynep ÇİMEN

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına 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 beyan ederim.

Zeynep ÇİMEN

04/08/2021

ENJEKTE EDİLEBİLİR HİBRİT BİYOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE KONTROLLÜ SALIM ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Zeynep ÇİMEN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2021

ÖZET

Kanser tedavisinin klinik uygulamaları göz önüne alındığında enjekte edilebilir, pH duyarlı, kendi kendini iyileştirebilen hibrit hidrojel lokalize, kontrollü ve uzun süreli ilaç salım sistemleri için ümit vadeden biyomalzeme setleri olarak görülmektedir. Bu kapsamda bu çalışmada jelatin adipik asit dihidrazit (Jel-ADH) polimerindeki hidrazit fonksiyonel grupları ile polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG2000) polimerindeki aldehit fonksiyonel gruplarının hidrazon bağı ile çapraz bağlanması sonucu Jel-ADH/diBA-PEG2000 enjekte edilebilir bir hidrojel sistemi geliştirilmiştir. Bu hidrojin kemoterapötik ilaç deposu olarak işlev görmesi için anti kanser ilacı doksorubisin (DOX) yüklü laponit (LAP) nanodisk, jel oluşturma esnasında hidrojele entegre edilerek Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojel biyomalzeme seti oluşturulmuştur. Sentezlenen hidrojel ATR-FTIR, SEM-EDX ve reolojik analizler ile karakterize edilmiştir. Hibrit hidrojin jelleşme süresi 80 sn iken Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojinin jelleşme süresi 137 sn'dir. LAP'ın hidrojele entegre edilmesiyle jelleşme süresi kısalırken mekanik dayanım da artmıştır. Ayrıca sentezlenen hibrit hidrojel hidrazon bağının tersinir olması nedeniyle kendi kendini iyileştirebilme, pH duyarlı olma ve enjekte edilebilme özellikleri göstermektedir. DOX ilacının hidrojellerden *in-vitro* salımı ise 37°C'de üç farklı fosfat tamponu ortamında (pH=5,0; 6,8; 7,4) incelenmiştir. DOX ilacının hibrit hidrojellerden salımı pH duyarlı olup 10 günden fazla devam ederken Jel-ADH/diBA-PEG2000@DOX hidrojellerine göre daha yavaş ve uzun süreli bir salım gerçekleşmiştir. Jel öncül bileşenleri (Jel-ADH, diBA-PEG2000 ve LAP) ve hidrojellerin sitotoksiteleri insan meme epiteli hücre hattı (SVCT) ve endotel hücre hattı (HUVEC) kullanılarak belirlenmiştir. Jel öncül bileşenleri ve hidrojel mükemmel bir biyoyumluluk göstermelerinin yanı sıra hücre çoğalmasında sağlamıştır. Ayrıca DOX yüklü hibrit hidrojellerin toksisiteleri insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında lokal kanser tedavisi için büyük bir umut vaat eden, uzun süreli ve kontrollü ilaç salım yapabilen yeni nesil pH duyarlı, kendi kendini iyileştirebilen, enjekte edilebilir hibrit hidrojel sistemi geliştirilmiştir.

Bilim Kodu : 20115
Anahtar Kelimeler : Enjekte edilebilir hidrojel, hibrit hidrojel, lokalize kemoterapi, pH duyarlı, kendi kendini iyileştirebilen, ilaç taşıyıcı sistem
Sayfa Adedi : 112
Danışman : Doç. Dr. Gökhan DEMİREL

DEVELOPMENT OF INJECTABLE HYBRID BIOMATERIALS AND
INVESTIGATION OF CONTROLLED RELEASE EFFICIENCIES

(Ph. D. Thesis)

Zeynep ÇİMEN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2021

ABSTRACT

Considering the clinical applications of cancer therapy, injectable, pH sensitive, and self-healable hybrid hydrogels stand out as promising biomaterial sets for localized, controlled, and sustained drug release systems. Within this scope, in this study, injectable hydrogel system was fabricated through the cross-linking of hydrazide functional groups in gelatin adipic acid dihydrazide (Gel-ADH) polymer and aldehyde functional groups in polyethylene glycol dibenzaldehyde (diBA-PEG2000) polymer with hydrazone bond. For this set of materials, to perform as a chemotherapeutic drug depot, laponite (LAP) nanodisc loaded with the anticancer drug doxorubicin (DOX) was integrated into the hydrogel during gel formation yielding to hybrid Gel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX. The synthesized hydrogels were characterized by ATR-FTIR, SEM-EDX and rheological analysis. The gelation time of hybrid hydrogel is 80 s while the gelation time of Gel-ADH/diBA-PEG2000 hydrogel is 137 s. With the integration of LAP into the hydrogel, the gelation time of hydrogel decreased, and mechanical strength increased. Additionally, the synthesized hybrid hydrogel exhibits self-healing, pH-sensitive, and injectable properties due to the reversibility of the hydrazone bond. *In-vitro* DOX release from hydrogels was evaluated in three different phosphate buffer environments (pH=5.0; 6.8; 7.4) at 37°C. The release of DOX from the hybrid hydrogels was found to be pH sensitive and long-term sustained release continued for over 10 days. Compared to the Gel-ADH/diBA-PEG@DOX hydrogels, hybrid hydrogels exhibited a slower and longer release behaviour. The cytotoxicity of the gel precursor components (Gel-ADH, diBA-PEG2000, and LAP) and the hydrogels was determined using the human breast epithelial cell line (SVCT) and endothelial cell line (HUVEC). Gel precursors and hydrogels showed excellent biocompatibility as well as cell proliferation. Moreover, the cytotoxicity of DOX loaded hybrid hydrogels was investigated on human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). In conclusion, within the scope of this thesis, a new generation pH sensitive, self-healable, and injectable hybrid hydrogel system, which is capable of long-term and controlled drug release, has been developed with great promise for local cancer treatment.

Science Code : 20115

Key Words : Injectable hydrogel, hybrid hydrogel, localized chemotherapy, pH-sensitive, self-healing, drug delivery system

Page Number : 112

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Gökhan DEMİREL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca büyük bir özveri ile destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgmeden değerli önerileriyle ufkumu açan ve geliştiren, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum kıymetli hocalarım Doç. Dr. Gökhan DEMİREL'e ve Prof. Dr. Gökçen BİRLİK DEMİREL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Sedat ODABAŞ ve yüksek lisans öğrencisi Sena BABADAĞ'a, Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi değerli hocalarımla her birine, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Nalan Oya SAN ve sayın Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK'e, değerli çalışma arkadaşlarıma, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Halil Murat AYDIN ve doktora öğrencisi Gülçin GÜNAL KARATAŞ'a ve sevgili GBD araştırma grubu üyelerinin her birine çok teşekkür ederim.

Tezimin şekillenmesinde fikir ve önerileriyle katkı sağlayan tez izleme komisyonumda bulunan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Lokman UZUN ve Doç. Dr. Servet ÇETE'ye teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca bütün hayatım boyunca fikirleri ve tecrübeleri ile her daim bana ışık olan, ideallerimi gerçekleştirmem konusunda desteklerini hiçbir zaman esirgmeden yanımda olan ve iyi ki benim ailem dediğim canım anneme, babama ve sevgili kardeşlerime sonsuz teşekkürler.

Tez kapsamında yaptığım çalışmalar Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 01/2019-28 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser ve Tedavi Yöntemleri	5
2.2. Nanoteknoloji Tabanlı Yeni İlaç Sistemleri.....	7
2.3. Hidrojeller	10
2.3.1. Enjekte edilebilir hidrojellerin hazırlanması, özellikleri ve oluşumunda yer alan mekanizmalar.....	11
2.3.2. Kimyasal çapraz bağlı enjekte edilebilir hidrojeller	12
2.3.3. Fiziksel çapraz bağlı enjekte edilebilir hidrojeller.....	14
2.3.4. Enjekte edilebilir hidrojel hazırlamak için kullanılan polimerler ve özellikleri.....	15
2.3.5. Enjekte edilebilir hidrojellerin kendi kendini iyileştirme ve kayma incelmesi özellikleri.....	19
2.4. İlaç Taşıma Sistemleri ve Enjekte Edilebilir Hidrojel Sistemleri	21
2.4.1. Kontrollü ilaç salım mekanizmaları.....	23
2.5. Enjekte Edilebilir Hidrojellerin Lokal Kanser Kemoterapi Tedavisinde Uygulamaları.....	24
2.6. Nanokompozit Hidrojeller	25

	Sayfa
2.6.1. Nanokil tabanlı enjekte edilebilir nanokompozit hidrojeller	26
3. DENEYSEL KISIM	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	29
3.2. Öncül Polimerlerin Sentezi	31
3.2.1. Polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG) sentezi.....	31
3.2.2. Adipik asit dihidrazit modifiye jelatin sentezi (Jel-ADH).....	31
3.3. Jel-ADH Polimerinin Adipik Asit Dihidrazit ile Modifikasyon Derecesinin Trinitrobenzensülfonik Asit (TNBS) Testi ile Belirlenmesi.....	32
3.4. Laponit Kiline DOX Yükleme.....	33
3.5. Hidrojel Oluşumu.....	33
3.5.1. Jelleşme sürelerinin belirlenmesi.....	34
3.6. Jel Öncül Bileşenleri ve Hidrojellerin Karakterizasyonu	34
3.6.1. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR).....	34
3.6.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre (FTIR)	34
3.6.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	34
3.6.4. Reometre.....	35
3.6.5. Zetasizer.....	35
3.6.6. UV-vis spektrofotometresi.....	35
3.7. Reolojik Analizler	35
3.8. Jel-ADH/diBA-PEG2000 Hidrojelinin Çapraz Bağlanma Etkinliğinin Belirlenmesi	36
3.9. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojelinin pH Duyarlılığının İncelenmesi	36
3.10. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojelinin Kendi Kendini İyileştirme ve Enjekte Edilebilirlik Özelliklerinin İncelenmesi	36
3.11. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin <i>In-Vitro</i> Şişme ve Degradasyon Davranışlarının İncelenmesi	37
3.12. <i>In vitro</i> İlaç Salım Profillerinin İncelenmesi.....	38
3.12.1. LAP kilinden DOX ilacının salım profilinin incelenmesi.....	38

Sayfa

3.12.2. Hidrojellerden DOX ilacının salım profilinin incelenmesi	38
3.13. Hidrojel Öncül Bileşenleri ve Hidrojellerin Hücre Sitotoksosite Deneyleri	39
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Hidrojel Öncü Polimerlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	41
4.1.1. Polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG) sentezi ve karakterizasyonu	41
4.1.2. Jelatin Adipik asit dihidrazit (Jel-ADH) sentezi ve karakterizasyonu	44
4.2. Hidrojel Oluşumu ve Jelleşme Süresi Optimizasyonu	48
4.2.1. diBA-PEG2000 ve diBA-PEG4000 polimerleri ile hazırlanan hidrojellerin jelleşme sürelerinin karşılaştırılması	51
4.3. Laponit Kiline DOX İlacı Yükleme ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hibrit Hidrojellerinin Sentezi	54
4.4. Hidrojellerin Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi	62
4.5. Hibrit Hidrojelin Enjekte Edilebilirlik Kendi Kendi İyileştirme ve pH duyarlılık Özelliklerinin İncelenmesi	71
4.6. Jel-ADH/diBA-PEG ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin <i>In-Vitro</i> Şişme ve Degradasyon Davranışlarının İncelenmesi	73
4.7. <i>In-Vitro</i> İlaç Salım Profillerinin İncelenmesi	79
4.8. Hidrojel Öncül Bileşenleri ve Hidrojellerin Hücre Sitotoksosite Deneyleri	82
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	111

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler	29



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser oluşum mekanizmasının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.2. İlaç taşıma sistemlerinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Nanotaşıyıcı sistemlerin aktif ve pasif hedefleme mekanizması	9
Şekil 2.4. Hidrojel oluşum mekanizmaları.....	14
Şekil 2.5. Çapraz bağlanma türüne göre hidrojellerin genel özellikleri.....	15
Şekil 2.6. Jelatin polimerinin kimyasal yapısı	18
Şekil 2.7. Polietilen glikol polimerinin kimyasal yapısı	19
Şekil 2.8. Kayma incelmesi ve kendi kendini iyileştirme özelliği gösteren hidrojellerde polimerler arasındaki dinamik ve tersinir etkileşimlerin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.9. Efektif konsantrasyon ve toksik konsantrasyona göre ani salım, aralıklı salım ve kontrollü salım profili sergileyen sistemlerde terapötik etkinliğin gösterimi.....	24
Şekil 2.10. (a) Laponit kilinin kimyasal yapısının (b) laponit nanokristal geometrisinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.1. diBA-PEG Polimerlerinin sentezinin şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.2. Jel-ADH polimeri sentezinin şematik gösterimi.....	32
Şekil 4.1. diBA-PEG2000 Polimerinin ¹ H-NMR spektrumu (500 MHz, CDCl ₃)	41
Şekil 4.2. PEG2000 ve diBA-PEG2000 Polimerlerine ait ATR-FTIR spektrumları...	42
Şekil 4.3. diBA-PEG4000 Polimerinin ¹ H-NMR spektrumu (500 MHz, CDCl ₃).....	43
Şekil 4.4. PEG4000 ve diBA-PEG4000 Polimerlerine ait ATR-FTIR spektrumları...	44
Şekil 4.5. Jel ve Jel-ADH polimerlerinin ¹ H-NMR spektrumları (500 MHz, DMSO-d ₆).....	45
Şekil 4.6. Jel ve Jel-ADH Polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları	46
Şekil 4.7. Primer amin grubu içeren molekülün TNBS ile reaksiyonun şematik gösterimi	46
Şekil 4.8. TNBS testi sonucu; β-alanin'in (a) UV spektrumu (b) kalibrasyon grafiği	47

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Farklı katı miktarı oranında bileşenlerin hacmine bağlı olarak Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojellerinin jelleşme süresi (a) %5 (a/v), (b) %10 (a/v), (c) %15 (a/v), (d) %20 (a/v).....	50
Şekil 4.10. Farklı katı miktarı oranında bileşenlerin hacmine bağlı olarak Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojellerinin jelleşme süresi (a) %5 (a/v), (b) %10 (a/v), (c) %15 (a/v), (d) %20 (a/v).....	51
Şekil 4.11. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojellerinin %20 katı miktarı 8/2 hacim oranında jelleşme süreleri	52
Şekil 4.12. Jel-ADH/diBA-PEG2000 Hidrojeli ve hidrojel öncü polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları.....	53
Şekil 4.13. DOX kalibrasyon grafiği	55
Şekil 4.14. LAP, DOX ve LAP@DOX kilinin ATR-FTIR spektrumları.....	56
Şekil 4.15. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin LAP konsantrasyonuna bağlı jelleşme süreleri	58
Şekil 4.16. Jel-ADH/diBA-PEG2000, LAP@DOX ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hidrojellerinin ATR-FTIR spektrumu	59
Şekil 4.17. (a) Farklı katı miktarlarına sahip Jel-ADH /diBA-PEG hidrojellerinin (b) farklı konsantrasyonlarda LAP içeren Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojellerinin %0,5 gerinim ve 37°C'de frekans taramaları.....	64
Şekil 4.18. Reolojik zaman taraması (a) Jel-ADH/diBA-PEG and (d) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelleri	66
Şekil 4.19. Hidrojellerin viskozite ve kayma incelmesi davranışları a) Jel-ADH/diBA-PEG b) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP	68
Şekil 4.20. (a) 25°C'de sabit bir frekansta (1 rad/sn) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin gerinim taraması, (b) 1 rad/sn sabit frekansta Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin alternatif basamak gerinim taraması ($\gamma = \% 1$ gerinimde 120 sn ve $\gamma = \% 500$ gerinimde 60 sn her bir döngü).....	70
Şekil 4.21. pH=5,0 ve pH=7,4'te (a) Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve (b) Jel-ADH/diBA-PEG LAP hidrojellerinin şişme oranı.	75
Şekil 4.22. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin (a) PBS pH=5,0 (b) pH=7,4'te hidrolitik bozunması	78
Şekil 4.23. DOX'un LAP nanodiskinden 37°C'de farklı pH ortamlarında <i>in-vitro</i> salım profili.....	80
Şekil 4.24. 37°C'de farklı pH ortamlarında (a) Jel-ADH/diBA-PEG2000, (b) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin <i>in-vitro</i> DOX salım profilleri	81

Şekil	Sayfa
Şekil 4.25. Jel öncül bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda SVCT ve HUVEC hücre hatlarına karşı <i>in-vitro</i> sitotoksiteleri a) diBA-PEG2000 polimeri b) Jel-ADH polimeri c) LAP nanodisk.....	83
Şekil 4.26. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin hücre yaşayabilirliği.....	85
Şekil 4.27. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre ortamlarında farklı zaman aralıklarında kümülatif DOX salımı, (b) Farklı inkübasyon sürelerinde DOX yüklü hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP DOX'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine karşı sitotoksitesi (karşılaştırma, hidrojellerdeki eşdeğer miktarda serbest DOX ile gerçekleştirilmiştir.).....	88



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 1.1. Enjekte edilebilir hibrit hidrojel sisteminin hazırlanmasının şematik gösterimi.....	3
Resim 4.1. Hidrojel oluşum mekanizması şematik gösterimi	49
Resim 4.2. Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....	54
Resim 4.3. DOX yüklü LAP nanokillerinin SEM görüntüsü.....	57
Resim 4.4. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojelinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.....	60
Resim 4.5. Farklı konsantrasyonlarda LAP içeren Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit jellerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri ve EDX analizi (a) %0,05 (a/v), (b) %0,1 (a/v), (c) %0,2 (a/v)	61
Resim 4.6. %0,05 (a/v) LAP içeren hibrit hidrojin a) başlangıç görüntüsü, b) frekans taraması analizi öncesi görüntüsü, c) frekans taraması analizi sonrası görüntüsü	63
Resim 4.7. Hibrit hidrojin enjekte edilebilirlik testi (a) Hibrit hidrojin enjekte edilmesi (b) Hibrit hidrojin PBS tamponuna enjekte edilmesi ve enjekte edildikten sonra hidrojin görüntüsü	71
Resim 4.8. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojinin kendi kendini iyileştirme davranışının gösterilmesi: (a) Farklı renklerde hazırlanan hidrojin iki yarım disk parçasının yeni kesilmiş yüzeylerden birleştirilmesi ve 1 saat sonra kendi kendini iyileştiren hidrojin görüntüsü (b) 1 saat sonra hidrojin kendi kendini iyileştirebildiğinin çekme testi uygulanması ile gösterilmesinin görüntüsü	72
Resim 4.9. Enjekte edilebilir hibrit hidrojin pH' a bağlı sol-jel faz geçiş döngüsü ..	73
Resim 4.10. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojinin farklı pH ortamlarında 24 saat şişirildikten sonraki SEM görüntüleri	76
Resim 4.11. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin canlı-ölü deneyi floresan görüntüleri (analizde canlı ve sağlıklı hücreler yeşil ışığı floresan ederken, ölü ve sağlıklı hücreler turuncu-kırmızı ışığı floresan etmektedir.).....	86

KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar

Açıklamalar

¹H-NMR	Hidrojen nükleer manyetik spektroskopisi
ADH	Adipik asit dihidrazit
DCC	N,N'–Disikloheksilkarbodiimit
diBA-PEG	Polietilen glikol dibenzaldehit
DK	Dakika
DMAP	4-Dimetilamino piridin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DOX	Doksorubisin
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometre
G	Gram
HOBt	1-Hidroksibenzotriazol
Jel-ADH	Jelatin adipik asit dihidrazit
MB	Metilen mavisi
MG	Miligram
ML	Mililitre
MMOL	Milimol
NM	Nanometre
PBS	Fosfat Tamponu
PEG	Polietilen glikol
RhB	Rodamin B
SN	Saniye
THF	Tetrahidrofuran
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asit

1. GİRİŞ

Kanser biyolojisindeki araştırmalar önemli ölçüde ilerlemiş olmasına rağmen ölüm oranındaki artış, kanserin dünya çapında en yıkıcı hastalıklardan biri olmaya devam ettiğini göstermektedir [1]. Dünya sağık örgütü verilerine göre 2018’de tahmini olarak 9,6 milyon ölümün kanser kaynaklı olduğu bilinmektedir. Dünyadaki her altı ölümden birinin de kansere bağılı olduğu düşünölmektedir [2]. Kanser tedavisi için cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır [3]. Özellikle sistematik kemoterapi, kanserli hücrelerin yok edilmesi amacıyla kanser ilaçlarının damar veya deri altı yoluyla verilmesini sağılayan geleneksel ve en yaygın kullanılan tedavi yöntemleri arasındadır [4]. Ancak damar veya deri altı yoluyla verilen kemoterapötik ilaçların çoğı sistematik dolaşımdan sonra tümörlü bölgeye ulaştığından hem terapötik etkisi azalmakta hem de sağılıklı dokulara zarar verebilmektedir. Kemoterapötik ilaçların sağılıklı dokular ve organlar üzerinde neden olduğı ciddi yan etkiler ise kanser hastalarının yüksek ölüm oranlarının arkasındaki ana neden olarak görölmektedir. Ayrıca, bu ilaçların tümör dokularına istenilen düzeyde taşınamamasından dolayı terapötik konsantrasyonun sağılanabilmesi için daha yüksek veya tekrarlayan dozların uygulanması gerekmektedir. Bu durum ise sağılıklı hücrelerde toksisitenin ve çoklu ilaç direncinin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, kanser hücrelerini pasif veya aktif olarak hedefleyebilen, böylece terapötik etkinliğı artırılmasını sağılarken olumsuz yan etkileri azaltan kemoterapötiklerin geliştirilmesi arzu edilmektedir [5]. Son zamanlarda terapötik etkinliğı artırmak ve yan etkileri azaltmak için aktif veya pasif hedefleme ile ilaçların tümör dokusunda seçici birikmesini sağılayabilen nanomalzeme tabanlı çok sayıda ilaç taşıma sistemi geliştirilmiştir [6]. Nanomalzemeler hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri için birçok avantaja sahip olsa da nanopartiköl protein etkileşimi ve kan dolaşımı gibi bir dizi biyolojik süreç kaçınılmaz olarak nanopartiköllerin tümöre iletilmesini ve etkinliğini etkilerken nanotıbbın klinik gelişimini de sınırlamaktadır [7]. Bu nedenle kemoterapötik ilaçların etkinliğinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılması için alternatif ilaç taşıma sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

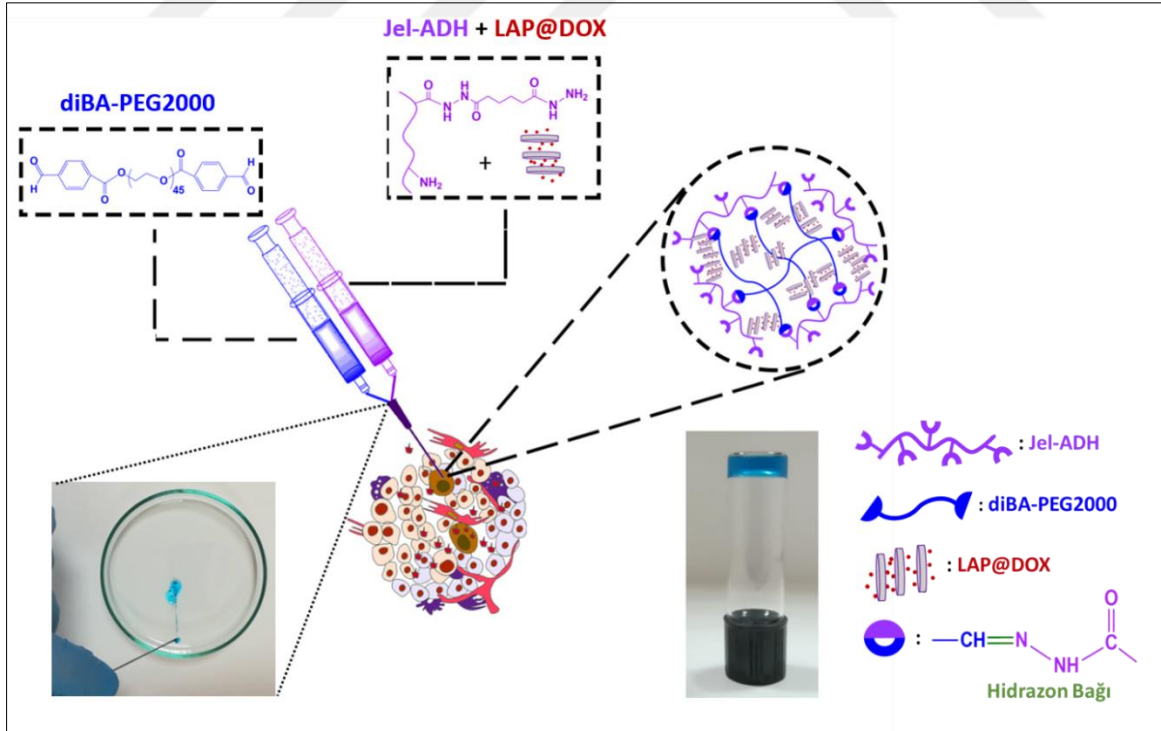
Bu noktada, son yıllarda kemoterapötik ilaçların hidrojeller ile lokal olarak verilmesi, kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır [8]. Bilindiğı gibi, hidrojeller, üç boyutlu ağı yapısı, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek gözeneklilik, biyoyoumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve hücre dışı matrise (ECM) olan

benzerliği gibi pek çok eşsiz özelliği bir arada bulundurabilen sistemlerdir [9, 10]. Bu özellikler hidrojellerin ilaç taşıma sistemlerinde yaygın kullanımını sağlamaktadır. Bu sistemin en büyük avantajlarından birisi ilaç salımının lokalize olmasıdır. Böylelikle sistematik uygulamaya göre daha düşük dozlar uygulanabilirken, hedef bölgede ilaç uzun süre tutulabilmektedir. Ancak geleneksel önceden oluşturulan hidrojellerin cerrahi operasyonla lokal bölgeye implante edilmesi ve jelleşme için toksik çapraz bağlayıcıların kullanılması gibi dezavantajları vardır [11]. Enjekte edilebilir hidrojeller ise hidrojellerin bir alt sınıfı olup, cerrahi operasyona gerek duyulmaksızın kemoterapi ilaçlarının enjeksiyon yoluyla lokal olarak hedef bölgeye taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır [12]. Enjekte edilebilir hidrojeller, hidrojel öncül bileşenlerinin *in-vivo* lokal enjeksiyonundan hemen sonra *in-situ* jelleşmesi ve/veya hidrojin *in-vitro* oluşturulmasından sonra kayma incelmesi davranışı ile enjektörden lokal bölgeye enjekte edilmesi şeklinde tasarlanabilmektedir [11].

Enjekte edilebilir hidrojeller, doğal ve sentetik polimerlerin veya bu polimerlerin kombinasyonlarının, disülfür, Schiff bazı (hidrazon, imin, oksim) ve fenilboronik ester bağı gibi çeşitli dinamik kovalent bağlarla çapraz bağlanmasıyla hazırlanabilmektedir [13, 14]. Bu dinamik ve tersinir kovalent bağlar hidrojele; uyaran duyarlı olma, kendi kendini iyileştirebilme ve enjekte edilebilir olma gibi ilaç taşıma sistemlerinde önemli olan özellikler kazandırabilmektedir [15]. Ancak hidrojellerin hidrofilik doğası; zayıf mekanik dayanıma, ilacın depolanma kararsızlığına, hızlı ve kısa süreli salımına neden olmaktadır [16, 17]. İlaç yüklü nanopartiküllerin hidrojeller ile entegrasyonu ile oluşturulan nanokompozit (hibrit) hidrojeller ise, her iki sistemin de ilaç taşıma sistemlerindeki dezavantajlarını ortadan kaldırabilmektedir [18]. Hibrit sistemlerde, hidrojel sisteme hem biyouyumluluk hem biyobozunur özellik sağlarken hem de nanopartikülün lokal enjeksiyonunu sağlamaktadır. Nanopartikül ise yüklenmiş ilaç salımını düzenlemektedir [19]. Nanokompozit enjekte edilebilir hidrojeller ile uzun süreli kontrollü salım sistemleri hazırlanabilmektedir. Nanopartikül sistemleri arasında nanokiller yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve uzun süreli kontrollü salım sağlayabilen ilaç taşıma sistemleridir [20]. Özellikle laponit nanodiskler iki boyutlu sentetik silikatlar olup ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilmektedir. Laponitin negatif yüzey yükü ve geniş yüzey alanı etkin bir şekilde ilacın yüklenmesini sağlamaktadır [21]. İdeal bir hibrit hidrojel sisteminin ise lokal olarak uygulanabilme, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olma, ilacın stabilitesini sağlama,

mekanik dayanıklılık, uzun süreli ve kontrollü bir ilaç salımı sağlama gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir [16].

Bu kapsamda bu tez çalışmasında ise, lokal meme kanseri tedavisinde uzun süreli ilaç salımı için pH duyarlı ve kendi kendini iyileştirebilme özelliklerine sahip enjekte edilebilir bir hibrit hidrojel sistemi geliştirilmiştir. Enjekte edilebilir hidrojel sistemi (Jel-ADH/diBA-PEG), jelatin adipik asit dihidrazit (Jel-ADH) polimerindeki hidrazit fonksiyonel grupları ile polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG2000) polimerindeki aldehit fonksiyonel gruplarının hidrazon bağı ile çapraz bağlanması sonucu sentezlenmiştir. Antikanser ilacı DOX, LAP nanodisklere yüklenerek jel oluşturma esnasında hidrojele entegre edilmiş ve pH duyarlı, kendi kendini iyileştirebilen ve enjekte edilebilir bir hibrit hidrojel (Jel-ADH/diBA-PEG/LAP) elde edilmiştir. Bu çok fonksiyonlu hibrit hidrojel sisteminin pH kontrollü salım etkinliği *in-vitro* koşullarda incelenmiş ve hazırlanan sistemin kanser tedavisinde kullanılabilirliği MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmaları ile incelenmiştir.

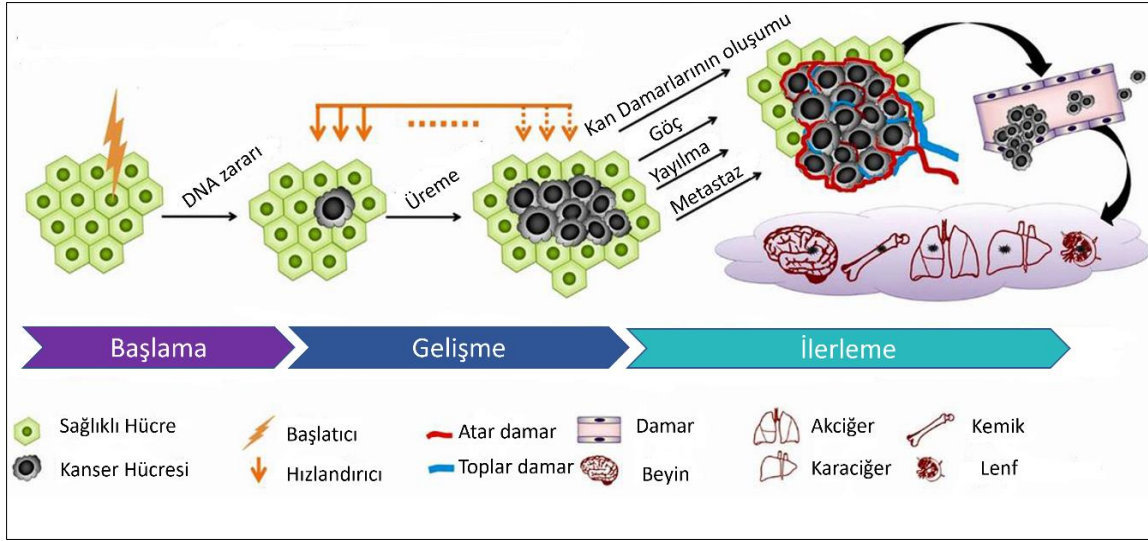


Resim 1.1. Enjekte edilebilir hibrit hidrojel sisteminin hazırlanmasının şematik gösterimi

2. GENEL BİLGİLER

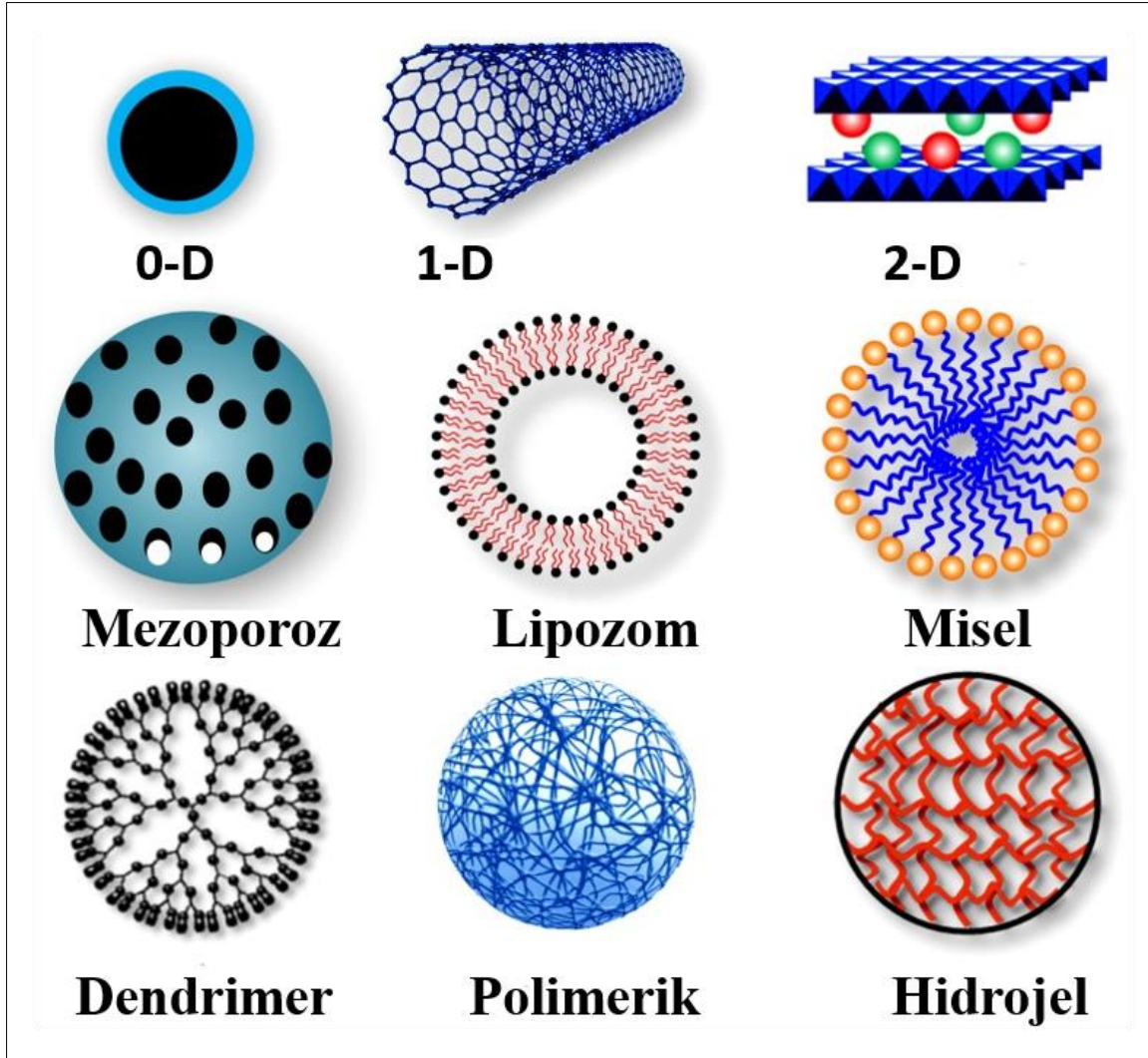
2.1. Kanser ve Tedavi Yöntemleri

Her yıl dünyada milyonlarca insanın ölümüne sebep olan kanser ciddi sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Ulusal Kanser Enstitüsü verilerine göre dünya çapında kanser vakalarının 2012 yılından 2030 yılına kadar %50 artarak 14 milyondan 21 milyona artması tahmin edilirken, kansere bağlı ölümlerin ise %60 artarak 8 milyondan 13 milyona artması tahmin edilmektedir [22]. Kanser, hücre çoğalmasını ve ölümünü düzenleyen genlerin (proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) çoklu genetik ve somatik mutasyonlarının artması nedeniyle hücrelerin kontrolsüzce bölünmesidir [23]. Kanser hastalığının gelişimi ise çok aşamalı kompleks bir süreç olup hem genetik hem de epigenetik değişimler sonucu hücrelerin belirli ayırt edici niteliklere sahip olmasıdır. Kanserin gelişimi öncelikle genetik kod ve gen ifadesinin değişimi sonucu oluşmaktadır. Gen ifadesindeki değişiklikler sırasıyla hücrelerin çoğalma sinyallerini korumasına, büyümeyi baskılayıcı sinyallerden kaçmasına, hücre ölümüne direnmesine, yayılma ve metastazın teşvik edilmesine, hücresel enerjinin düzensizleşmesine, immün tahribatı ve kan damarlarının oluşumuna sebep olmaktadır [24]. Tümör hücreleri tek başına kanserin ilerleyişinden sorumlu olmayıp kanserli olmayan stromal hücreler de bu durumda aktif rol almaktadır. Bu hücreler endotel hücreleri, perisitler, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve kanser kök hücreleri vb. çeşitli sağlıklı hücrelerden oluşup tümör mikro çevresini oluşturmaktadır. Tümörle birleşmiş normal hücrelerin oluşturduğu çevre (metabolik tekrar düzenlenme, oksijeni az olan ortam, daha düşük pH ortamı) tümör hücrelerinin büyümesini sağlarken yıkım mekanizmasını da zorlaştırmaktadır. Yani tümör mikro çevresi olarak da bilinen stroma ve immün sistemin tümörle etkileşimi kanserli hücrelerin çoğalmasını ve metastazını sağlamaktadır [25]. Ayrıca epigenetik faktörlerde (deoksiribonükleik asit DNA, histon modifikasyonu) herhangi bir genotipik farklılık vermeden kanser oluşumuna sebep olmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser oluşum mekanizmasının şematik gösterimi [26]

Kanser hastalığının gelişiminin araştırılması hastalığın tedavisinde daha etkin terapilerin geliştirilmesine imkan tanımaktadır. Şu anda kanser tedavisinde kullanılan cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliği hala istenilen düzeyde değildir [24]. Tümörün heterojen yapısı, tümör hücrelerinin göstermiş olduğu genetik çeşitlilik ve ilaç direnci etkin tedavi sistemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Birçok kanser için en önemli tedavi yöntemlerinden olan kemoterapi, DNA sentezi ve mitozuna engel olarak hızlı büyüyen, bölünebilen kanser hücrelerinin ölümünü sağlamaktadır [5]. Klinik olarak yoğun kullanılmasına rağmen geleneksel kemoterapötik ilaçların çeşitli dezavantajları vardır. Kemoterapötik ilaçların seçici olmaması ve kanser hücreleri yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermesi istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir [27, 28]. Ayrıca kanser hücreleri mutasyona uğrayabilmeleri nedeni ile kemoterapötik ilaçlara karşı direnç oluşturabilmektedir [29]. Bu nedenlerden dolayı kanser tedavisinde kullanılabilecek etkin ilaç sistemlerinin geliştirilmesi dünyada büyük ilgi görmektedir. İlaç taşıma sistemlerinin temel amacı, terapötik ajanların farmokinetik ve farmodinamik olarak geliştirilip terapötiklerin tümörde konsantrasyonunun ve süresinin artırılmasıdır. Bununla birlikte sağlıklı hücrelerde ilaç konsantrasyonunun mümkün olduğunca azaltılarak terapötik etkinliğinin minimal toksik yan etkilerle artırılmasının başarılabilesidir [30]. Minimal yan etkilere ulaşmanın yanı sıra terapötik etkinliğin artırılması için ise kanser nanoilaçlar kemoterapide büyük ilgi görmektedir. Kanser tedavisi için nanoteknoloji uygulaması olan nanoilaç sistemleri de son yıllarda büyük ilerleme kaydetmektedir [31].



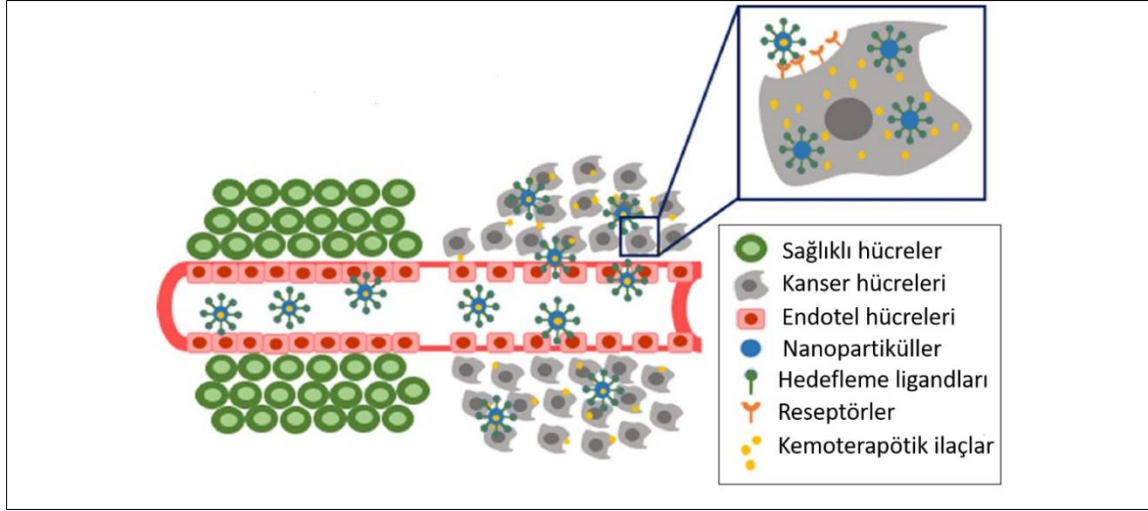
Şekil 2.2. İlaç taşıma sistemlerinin şematik gösterimi [5]

2.2. Nanoteknoloji Tabanlı Yeni İlaç Sistemleri

Geleneksel kemoterapi ilaçları ile tümöre yeterli ilaç taşınamaması tümörün başarılı bir şekilde yok edilememesinin en önemli sorunları başında gelmektedir [32]. Modern terapi yöntemleri ise ileri kanser tedavisi için hedefe yönelik, yüksek verimlilik gösteren ve minimum yan etkilere sahip özelleştirilmiş tedavilere eğilim göstermektedir [33]. Son zamanlarda, nanoteknolojideki hızlı ilerlemelerle birlikte, her yıl çok sayıda yeni kanser ilacı taşıma sistemi rapor edilmektedir (Şekil 2.2) [30]. Nanotaşıyıcı sistemlerin ayarlanabilir boyutları ve yüzey kimyası, farklı biyolojik özellikte sistemlerin tasarlanmasına imkan sağlarken kargo moleküllerin yüksek etkinlikle yüklenmelerini de sağlamaktadır. [5, 34]. Küçük boyutları (10 nm'den birkaç yüz nanometreye kadar) ve

ayarlanabilir özellikleri sayesinde, terapötik nanoajanlar kanserle ilişkili sağlık sorunlarının ele alınmasında büyük umut vaat etmektedir [35].

Nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıma sistemleri kullanılarak ilacın *in-vivo* stabilitesi, çözünürlüğü, kan dolaşım süreci, biyouyumluluğu artırılmakla beraber pasif ve aktif hedefleme ile tümör dokularında ilaçların seçici birikmesi de sağlanabilmektedir [36-38]. Tümörlü dokularda kan damarlarının bozuk yapısı ve zayıf lenfatik süzülmeden dolayı endotel hücreleri arasında daha büyük boşlukların mevcut olması nanotaşıyıcı sistemlerin bu boşluklardan sızarak tümörlü dokularda birikebilmesini sağlamaktadır. Bu olay artırılmış geçirgenlik ve tutma olarak da bilinen pasif hedefleme olarak tanımlanmaktadır [39]. Kanser hücrelerinde aşırı üretilen hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilecek antikor, peptid gibi ligandların nanotaşıyıcı sisteme bağlanarak hedefe yönlendirilmesi ise aktif hedeflemedir (Şekil 2.3) [23]. Nanotaşıyıcı sistemler ile kanserli hücrelerin bu iki yaklaşımla belirlenmesinin ardından ilaçların belirlenen yerde ve belli bir zamanda kontrollü bir şekilde salımı ise nanotaşıyıcı sistemlerin türüne akıllılıklarına bağlı olarak iç veya dış uyaranla sağlanabilmektedir [40]. İç uyaranlara bağlı kontrollü salım yapan nanotaşıyıcı sistemler tümör mikro çevresi ve patolojik durumdaki değişiklikleri kullanmaktadır. Örneğin, normal hücrelerin fizyolojik çevresi ile tümör mikro çevresi karşılaştırıldığında tümör çevresinde glikolize bağlı olarak laktik asit miktarındaki artış pH azalmasına sebep olmaktadır. Bu özellikten yararlanılarak pH duyarlı salım yapan sistemler geliştirilmiştir [41]. Sıcaklık, ışık, manyetik alan gibi dış uyaranlara bağlı olarak tasarlanmış sistemler de ise bu uyarıların varlığında ilaç salımı gerçekleştirilebilmektedir [42].



Şekil 2.3. Nanotaşıyıcı sistemlerin aktif ve pasif hedefleme mekanizması [43]

Ancak geleneksel ilaçların sistematik verilmesinde olduğu gibi, nanoilaç taşıyıcı sistemlerde tümöre ulaşmadan önce biyolojik olarak ilaç taşımalarını etkileyebilecek çeşitli biyolojik engeller yaşamaktadır. Bu etkileşimler nanopartikül-protein etkileşimi, kan dolaşımı bariyeri ve tümör mikro çevresi ile olan etkileşimlerdir [32]. Örneğin, nanopartiküller aktif hedefleme olarak tasarlanmış olsa bile nanopartikül üzerindeki ligandlar nanopartikül-protein etkileşmesi sonucu etkinliğini yitirebilmektedir [31]. Chan ve arkadaşları, 2005-2015 yılları arasında tümörlere pasif veya aktif hedeflendirilmiş nanopatiküllerle yapılan çalışmaları incelediklerinde uygulanan nanopartiküllerin sadece %0,7 gibi az bir oranının katı tümör dokularına taşındığını rapor etmişlerdir [44]. Bu sorun belirli hücrel reseptörleri hedefleyerek tasarlanmış nanoilaç taşıyıcı sistemlerde bile geçerlidir. Çünkü farklı hücre tipleri aynı ligandı kullanabilmekte veya ligandın yoğunluğu bağlanma için yetersiz olabilmektedir [45]. Birçok klinik formülasyonun da mevcudiyetine rağmen, mevcut ilaçların etkinliği tümör bölgelerinde etkili bir şekilde birikememelerinden dolayı sınırlıdır. İlacın sistematik verilmesinden sonra düşük terapötik indeks sürekli terapötik doz sağlayamamaktadır. Kanserli bölgede terapötik dozu sağlayabilmek için ilacın düzenli aralıklarla uygulanması gerekmektedir. Bu nedenle kanserli bölgede kemoterapötiklerin sürekli terapötik konsantrasyonunu koruyabilen ve yan etkileri en aza indirgeyebilen yeni alternatif ilaç taşıyıcı teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Tümörlü bölgeye kemoterapötik ajanların lokal olarak implantasyonu veya enjeksiyonun yapılabildiği hidrojel gibi sistemler kanser tedavisinde büyük ilgi görmektedir [8, 46].

2.3. Hidrojeller

Hidrojeller, hidrofilik polimerlerin çapraz bağlanması sonucu oluşan üç boyutlu ağ yapıdaki biyomalzemeler olup biyomedikal uygulamalar için eşsiz özelliklere sahip önemli bir malzeme sınıfıdır [47]. Ayrıca polimerik hidrojeller, ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra yumuşak insan dokularına ve hücre dışı matrikse olan benzerlikleri nedeniyle en çok ilgi gören biyomalzemeler olarak ortaya çıkmıştır. Hidrojin polimerik omurgası, hidrojin suyu tutmasını sağlayan hidroksil ($-OH$), karboksil ($-COOH$), amin ($-NH_2$) ve sülfonik asit ($-SO_3H$) grupları gibi birçok hidrofilik fonksiyonel gruba sahip olabilmektedir. Polimerler arasındaki çapraz bağlar ise hidrojin suda çözünmesini engelleyerek geometrik bir yapıda olmasını sağlamaktadır [48]. Çapraz bağlanma özelliklerine göre ‘kimyasal’ veya ‘fiziksel’ çapraz bağlı hidrojeller olarak sınıflandırılmaktadır [49]. Yüksek su tutma kapasitesi ve gözenekli yapısı hidrojele mükemmel bir biyoyumluluk sağlarken, hücre veya ilaç, gen gibi biyoaktif bileşenleri kapsülleme yeteneği de kazandırmaktadır. Bu nedenle son yıllarda ilaç taşıma sistemleri, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamaları için geniş çapta araştırılmaktadır [50, 51]. Hidrojellerin ilaç taşıma sistemlerinden doku mühendisliğine kadar çeşitli biyomedikal uygulamalar için tasarlanmasında biyoyumluluk, gözeneklilik, biyobozunurluk mekanik dayanım ve biyoyapışkanlık gibi bazı parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

- **Biyoyumluluk:** Hidrojellerin implante edildikten sonra vücutta hücresel veya sistemik toksisiteye neden olmaması ve immün sistemi uyarıcı aktiviteyi indüklememesi uygulamalar için önemli bir özelliktir [6]. Hidrojellerin hidrofilik karakterleri ve hücre dışı matrise (ECM) benzerlikleri biyoyumluluk için uygun bir zemin hazırlamaktadır. Uygun bir biyoyumluluk hidrojin fiziksel ve kimyasal yapısı düzenlenerek elde edilebilmektedir. Örneğin, literatürde, sentetik polimerlere kıyasla doğal polimerlerin ECM’e daha iyi benzerlik göstermesinden dolayı biyoyumluluğu artırdığı raporlanmıştır [52].
- **Biyobozunurluk:** Hidrojel sisteminden ilaç salımı, temel olarak, polimerik ağların ayrışmasının bir sonucu olan bozunma hızı ile düzenlenmektedir. Polimerik içerik, çapraz bağlanma yöntemi ve çapraz bağlanma derecesi, hidrojellerin bozunma oranını belirleyen birincil faktörlerdir [52]. Hidrojellerin biyobozunurlukları enzimatik, hidrolitik ve çevresel (pH, sıcaklık) olarak ayarlanabilmektedir [53]. Bu amaçla

biyolojik olarak parçalanabilen kitosan, aljinat gibi birçok doğal polimer veya poliestere gibi sentetik polimerler biyobozunur hidrojenlerin tasarlanmasında kullanılabilmektedir [6].

- Gözeneklilik: Biyoaktif bileşenlerin yüklenmesi ve salımlarında önemli olan hidrojenlerin gözenekli yapısı hidrojeldeki çapraz bağ yoğunluğu kontrol edilerek ayarlanabilmektedir [53].
- Mekanik Dayanım: Biyolojik dokular için mekanik özellikler, fizyolojik performanslarında önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin kasların ve derinin kemik hareketlerine uyabilecek şekilde yumuşak ve esnek olduğu tespit edilmiştir [54]. Hidrojenlerin biyolojik dokuların mekanik özelliklerine uyum sağlaması ise fiziksel veya kimyasal etkileşimlerin değiştirilmesi, çapraz bağ yoğunluğu optimizasyonu ve nanokompozit hidrojenlerin sentezi ile ayarlanabilmektedir [55, 56].
- Biyoyapışkanlık: Bazı hidrojenlerin muko- veya biyo-yapışkan özellikleri, hidrojenlerin uygulama yerinde sabit olması gerektiğinde veya düzgün olmayan yüzeylere uygulanmasında avantajlı olabilmektedir [53].

Ancak klasik implante edilebilir hidrojenler cerrahi operasyon ve implantasyon gerektirdiğinden enfeksiyon riskini artırabilmekte ve lokal olarak uygulanan bölgede düzgün olmayan implantasyon sonrası doku iskelesi zarar görebilmektedir. Son yıllarda klasik hidrojenlere kıyasla enjekte edilebilir hidrojenler cerrahi operasyona ve implantasyona gerek duyulmaması, lokal olarak uygulanan bölgeyi tam doldurabilmesi gibi birçok avantaj sunmasından dolayı daha çok ilgi çekmektedir [41].

2.3.1. Enjekte edilebilir hidrojenlerin hazırlanması, özellikleri ve oluşumunda yer alan mekanizmalar

Enjekte edilebilir hidrojenler, lokal ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzemelerin tasarlanmasında büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir. Enjekte edilebilir hidrojenler kateter veya enjektör ile ilgili hedef bölgeye uygulanabilmektedir [6]. Hidrojenler enjekte edilebilir özellikleri sayesinde, cerrahi operasyonla ulaşılması zor ve olanaksız vücut bölgelerine kolaylıkla uygulanabilmektedir [55]. Özellikle de ilaç taşıma sistemlerinde terapötiklerin hidrojel ile lokal enjeksiyonu hem terapötik etkinliği artırmakta hem de sistematik tedavinin yan etkilerini azaltmaktadır. Ayrıca cerrahi operasyona gerek kalmadan uygulanabildikleri için yüksek düzeyde hasta konforu da sağlamaktadır. Enjekte edilebilir hidrojenler, *in-situ* lokal jelleşebilen veya kayma incilmesi davranışı gösterebilen hidrojenler olarak farklı şekilde

tasarlanabilmektedir. Bazen her iki özellikte tek bir hidrojelde birleştirilebilmektedir [8, 57].

In-situ enjekte edilebilir hidrojeller, jeli oluşturan öncül polimer çözeltilerinin ve terapötik ajanların sıvı formda lokal olarak enjekte edildikten sonra bu bileşenlerin vücut içerisindeki pH, sıcaklık gibi etkenlere bağlı olarak veya kimyasal, fiziksel çapraz bağlanmasıyla jelleşebilen sistemlerdir [58]. Böyle sistemlerde terapötik ajanlar jel oluşma esnasında jele hapsedilmektedir. Ancak yavaş jelleşme kinetiği gösteren jellerde terapötik ajanların çevre dokulara akarak yan etkilere sebep olma ihtimali de vardır. [59]. İdeal jelleşme kinetiğinin, jel öncül bileşenlerinin enjekte edilirken enjektör iğnesinde pıhtılaşmasını önleyecek kadar yavaş, vücut içerisinde lokal bölgeye enjeksiyonundan sonra vücut sıvıları tarafından jel öncül bileşenlerinin seyrelmesini önleyecek kadar hızlı olması gerekmektedir [58].

Kayma incelmesi davranışı gösteren hidrojeller ise lokal bölgeye uygulanmadan önce *in-vitro* jelleştirilerek belli kayma gerilimi altında enjekte edilebilmekte ve enjekte edildikten sonra jel yapısını koruyabilmektedir. Bu sistemlerde terapötik ajanlar homojen bir şekilde jel içine hapsedildikten sonra ilgili hedef bölgeye enjekte edilebilmekte ve enjeksiyondan sonra jel yapısını korudukları için terapötiklerin başka dokulara akması engellenmektedir [60, 61]. Enjekte edilebilir hidrojeller jelleşme mekanizmalarına göre kimyasal çapraz bağlı ve fiziksel çapraz bağlı hidrojeller olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

2.3.2. Kimyasal çapraz bağlı enjekte edilebilir hidrojeller

Kimyasal çapraz bağlı enjekte edilebilir hidrojeller foto-ışınlatma, disülfid bağı oluşumu, Schiff bazı, Michael katılması ve Diels-Alder vb. reaksiyonları ile polimer zincirlerinin kovalent çapraz bağlanması sonucu elde edilmektedir (Şekil 2.4). Terapötik ajanlar veya hücreler jel oluşumu esnasında hidrojele kapsüllendiğinde ise sistem ilaç taşıma sistemi veya doku iskelesi görevi görmektedir [62].

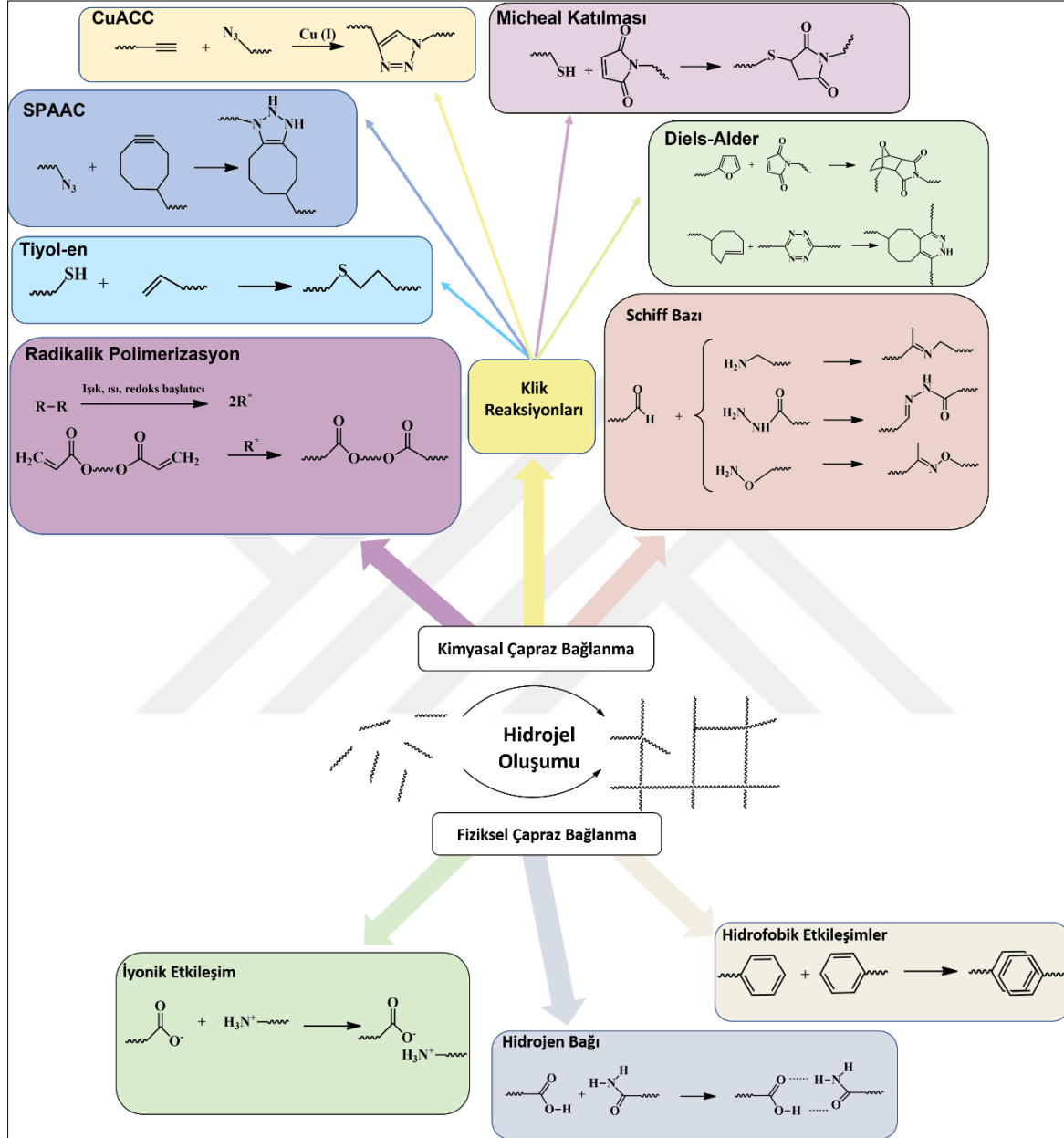
Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller fiziksel çapraz bağlı hidrojellere kıyasla daha iyi mekanik özelliklere ve uzun süreli kararlılığa sahiptir (Şekil 2.5). Ancak bazı kimyasal çapraz bağlama yöntemlerinde kullanılan toksik çapraz bağlayıcılar (foto-başlatıcılar, çapraz bağlayıcı monomerler, katalizörler vb.) yan etkilere sebep olabilmektedir [48].

Dinamik kovalent bağlar ile toksik başlatıcılara, çapraz bağlayıcılara veya katalizörlere gerek kalmadan polimer zincirlerinin kendiliğinden çapraz bağlanması ile enjekte edilebilir hidrojel sentezi sağlanabilmektedir [63]. Disülfid, Schiff bazı (hidrazon, imin), boronat ester gibi dinamik kovalent bağlar enjekte edilebilir hidrojellerin sentezinde kullanılmaktadır [14]. Dinamik kovalent bağların oluşumu ve ayrışması ortamın fiziksel ve kimyasal koşullarına göre ayarlanabilirken, kovalent bağların sağlamlığını ve kovalent olmayan bağların tersine çevrilebilirliğini tek bir sistemde toplama gibi özelliklere sahip olduklarından akıllı hidrojellerin tasarlanmasında kullanılan bağlardır [64]. Dinamik kovalent bağın kinetik olarak tersinirliği, pH ve redoks gibi uyaranlarla tetiklenebilirliği hidrojellere kendi kendini iyileştirebilme, uyarana duyarlı olma, enjekte edilebilirlik, kayma incelmeleri davranışı sergileme gibi pek çok özellik kazandırabilmektedir [15].

Hidrazon bağı

Hidrazon bağı, karbonil ve hidrazin gruplarının kondenzasyon reaksiyonu ile oluşan dinamik kovalent bir bağıdır [14]. Hidrazon bağları, imin bağlarından daha kararlı olup hidrojel stabilitesini artırmak için de kullanılabilmektedir [55]. Bir hidrazon bağı ile çapraz bağlı hidrojel oluşturabilmesi için hidrojel oluşturacak öncül polimerlerin bağı oluşturabilecek karbonil ve hidrazin fonksiyonlu gruplara sahip olması gereklidir. Genellikle bu fonksiyonel grupları taşıyan polimerler kimyasal modifikasyon sonucu elde edilebilmektedir [65]. Hidrazon bağının dinamik tersinir doğası gereği bu bağın kullanılması ile enjekte edilebilir ve kendi kendini iyileştirebilen hidrojeller tasarlanabilmektedir [61]. Hidrazon bağı fizyolojik koşullarda kararlı iken asidik çözeltilerde hidroliz olmaktadır [66]. Doğal pH'a duyarlı dinamik yapıları nedeniyle hidrazon bağları lokal tümör tedavisi için hidrojellerin tasarlanmasında kullanılmaktadır. Hidrazon bağı ile oluşturulan hidrojellerin pH'a duyarlı ve enjekte edilebilirlik özellikte olması katı tümör dokularına lokal olarak kemoterapötik ajanların kontrollü bir şekilde salımını sağlamaktadır [67]. Sharma ve arkadaşları okside edilmiş ksantan polisakkarit ve 8 kollu PEG hidrazin polimerinin hidrazon bağı ile çapraz bağlanması sonucu pH'a duyarlı, biyolojik olarak parçalanabilen hidrojel sistemi geliştirmişlerdir. Bu hidrojel sisteminin güçlü viskoelastik yapısı, kendi kendini iyileştirme ve tiksotropik özellik göstermesi, hidrojinin enjekte edilebilir bir ilaç deposu olarak kullanılmasını sağlamıştır. Aynı çalışmada kemoterapötik ajan olan DOX'un hidrojele yüklenerek salım profili

incelendiğinde 30 güne kadar pH duyarlı bir salım sergilediği ve fizyolojik pH ortamına göre tümör pH ortamında daha hızlı bir salım gerçekleştirdiği raporlanmıştır [13].

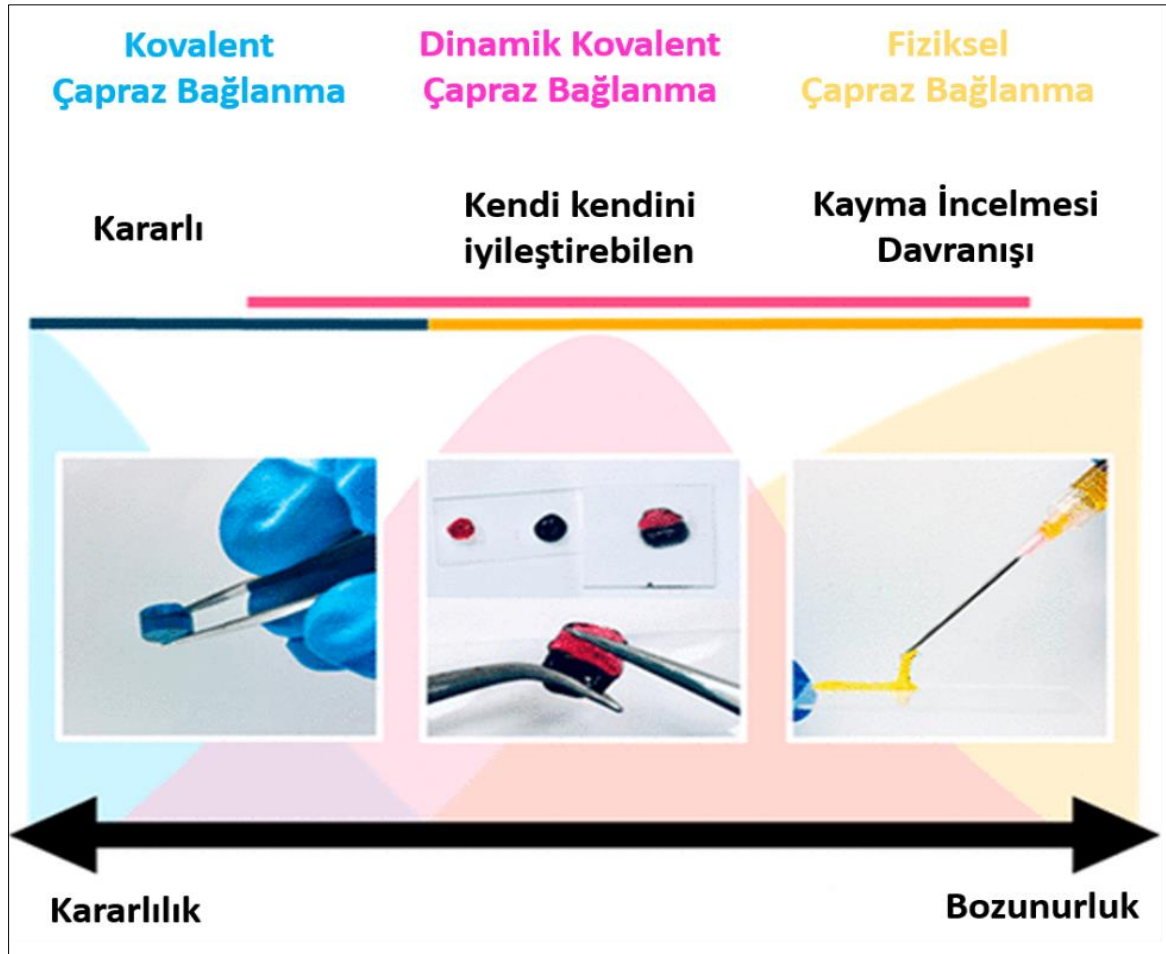


Şekil 2.4. Hidrojel oluşum mekanizmaları [68]

2.3.3. Fiziksel çapraz bağlı enjekte edilebilir hidrojeller

Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, konuk-konak etkileşimi, iyonik etkileşim gibi kovalent olmayan etkileşimler ile oluşturulabilmektedir (Şekil 2.4) [69]. Toksik çapraz bağlayıcılara gerek kalmadan sıcaklık, iyonik konsantrasyon gibi fiziksel uyarılarla polimerler çapraz bağlanabilmektedir [48]. Fiziksel

çapraz bağlı hidrojeller kimyasal çapraz bağlı hidrojellere göre zayıf mekaniksel özellik göstermelerine rağmen fiziksel etkileşimlerin doğal tersine çevrilebilirliği hidrojele kayma incelmesi ve kendi kendini iyileştirebilme özellikleri kazandırmaktadır (Şekil 2.5) [55]. Ayrıca fiziksel çapraz bağlı hidrojellerde toksik çapraz bağlayıcılar kullanılmadığından reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların sebep olduğu sitotoksisite görülmemekte, bu durum ise hidrojellerin biyomedikal uygulamaları için güven vermektedirler [70].



Şekil 2.5. Çapraz bağlanma türüne göre hidrojellerin genel özellikleri [55]

2.3.4. Enjekte edilebilir hidrojel hazırlamak için kullanılan polimerler ve özellikleri

Enjekte edilebilir bir hidrojel sisteminin tasarlanmasında kullanılan polimerler hidrojellerin mekanik dayanımını, biyouyumluluğunu ve biyobozunurluğunu etkilediklerinden hidrojellerin uygulama alanına bağlı olarak polimer seçilmesi gerekmektedir. Enjekte edilebilir hidrojel sistemi hazırlamak için doğal ve sentetik polimerler kullanılabilir.

Enjekte edilebilir jel hazırlamak için kullanılan bu polimerlerin birtakım özelliklere sahip olması gerekmektedir [71].

- i. Polimer çözeltilerinin viskozitesi biyoaktif moleküllerin oda sıcaklığında enjekte edilmesini ve kapsüllenmesini kolaylaştıracak kadar düşük olmalıdır.
- ii. Enjeksiyondan sonra polimerlerin ve biyoaktif moleküllerin dağılmasını önlemek için jelleşme hızlı olmalıdır.
- iii. Hazırlanan jeller biyobozunur olmalıdır. Biyobozunurluk, terapötik ilaçların taşınabilmesi için gerekli olup biyobozunur özellik göstermeyen malzemeler vücutta birikerek istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır.
- iv. Polimerler ve bozunma ürünleri biyoyumlu olmalıdır ve vücutta inflamatuvar tepki oluşturmamalıdır.
- v. Jeller uygulamaya elverişli fiziksel ve mekaniksel özellikler göstermelidir. Örneğin sert jeller kemik dokusu için uygunken, yumuşak jeller beyin dokuları için uygundur.

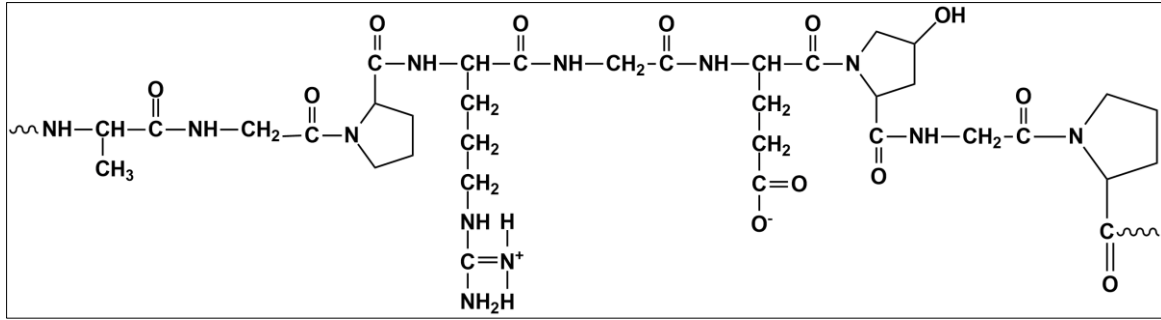
Doğal polimerler

Doğal polimerler doğada oluşan malzemeler olup bitkiler, hayvanlar, algler gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir [49]. Hidrojel hazırlamada kullanılan 2 ana doğal malzeme sınıfı proteinler ve polisakkaritlerdir. Tekrar eden şeker ve peptid birimleri doğal polimerlerin özelliklerini belirlemektedir. Polisakkarit sınıfını oluşturan doğal polimerler kitosan, aljinat, hiyalüronik asit vb. iken, protein sınıfını oluşturan doğal polimerler ise jelatin, elastin vb. olup hidrojel hazırlamada kullanılan malzeme setleridir [72]. Polisakkaritler ve proteinler yapışma, farklılaşma ve çoğalma gibi hücre faaliyetlerini desteklemek için kimyasal, fiziksel ve biyolojik sinyaller sağlayan ekstraselüler matrisin bileşenleri olup ekstraselüler matrise benzerlikleri, biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olmalarından dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın kullanılmaktadırlar [73-75]. Ancak biyomedikal uygulamalarda önemli bir özellik olan mekanik dayanım doğal polimerler ile elde edilen hidrojellerde zayıftır [68].

Jelatin

Jelatin protein esaslı doğal bir polimer olup kollajen polimerinin hidrolizi ile oluşmaktadır. Jelatinin oluşumunu sağlayan kollajen ise protein esaslı bir polimerdir ve moleküler yapısı

hidrojen bağı ve kovalent bağlarla bir arada tutulan üç iç içe polipeptid sarmal zincirinden oluşmaktadır. Jelatin kolajenin hidrolizi sonucu doğal üçlü sarmalın tek zincirli moleküle dönüşmesi ile oluşmaktadır. Kolajenin amorf olan jelatin, kolajen ile aynı aminoasit sekansına sahip olup kolajenin birçok biyoaktif özelliğini korumaktadır [76]. Jelatin balık derileri, kemikler ve yüzgeçler, deniz kestanesi, deniz anası gibi doğal kaynaklardan da elde edilebilirken çoğunlukla sığır ve domuzdan elde edilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen jelatin polimerinin amino asit bileşiminde az da olsa farklılıklar mevcuttur. Genel olarak jelatin, glutamik asit, aspartik asit, arjinin, lizin ve hidrofobik polimer zincirlerinden (izolösin, metiyonin, lösin ve valin) oluşmaktadır. Polimer zincirlerinin geri kalanı ise genellikle prolin, glisin, ve hidrokisprolin içermektedir (Şekil 2.6) [77]. En yaygın kullanılan biyomalzemelerden biri olan jelatin, mükemmel bir biyouyumluluk, biyobozunurluk, hücre yapışması ve çoğalmasını sağlama gibi özelliklerinden dolayı giderek artan bir ilgi görmektedir. Üstün özellikleri nedeniyle jelatin hem sert hem de yumuşak doku mühendisliğinde, ilaç taşıma sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Jelatin polimeri 30°C ve altındaki sıcaklıklarda kendiliğinden sıcaklık duyarlı olarak jelleşebilmektedir. Bununla beraber fiziksel çapraz bağlı olan bu jelatin hidrojel fizyolojik sıcaklıkta (37°C) kararlı değildir ve mekanik özellikleri zayıftır [78]. Herhangi bir fiziksel ve kimyasal modifikasyon olmaksızın saf doğal polimer bazlı hidrojeller doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemleri için gerekli olan ihtiyaçları karşılayamamaktadır [55]. Jelatin hidrojellerin fizyolojik sıcaklıkta kararlı olmamasından dolayı biyomedikal uygulamalarda kimyasal olarak modifiye edilmiş jelatin polimerinin kovalent çapraz bağlanması tercih edilmektedir [79]. Hozumi ve arkadaşları, karbohidrazit ile modifiye edilmiş jelatin (Gel-CDH) ve hiyalüronik asit monoaldehit (HA-mCHO) oluşan ve yavaş bozunma davranışı sergileyen enjekte edilebilir bir hidrojel sistemi geliştirmişlerdir. Jel-CDH/HA-mCHO hidrojellerinin fosfat tamponunda, doğal jelatin, adipik asit dihidrazit ile modifiye edilmiş jelatin veya hiyalüronik asit dialdehitten oluşan diğer Schiff bazı çapraz bağlı jelatin /hiyalüronik asit hidrojellerinden çok daha yavaş bozunduğunu belirlemişlerdir. Jel-CDH/HA-mCHO hidrojelinin, yumuşak doku iskeleleri için uygun olan 10–50 µm’lik bir gözenek boyutuna ve 0,1–1 kPa’lık bir depolama modülüne sahip olduğunu ve doku iskelesi uygulamaları için uygun olabileceğini raporlamışlardır [80].



Şekil 2.6. Jelatin polimerinin kimyasal yapısı [77]

Sentetik polimerler

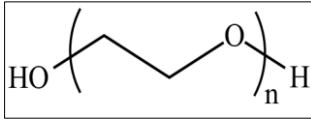
Sentetik polimerler doğal polimerler ile karşılaştırıldığında, doğal kaynaklardan elde edilen polimerin özellikleri elde edilen kaynağa bağlı iken, sentetik polimerin kontrol edilebilir fiziksel ve kimyasal özellikleri spesifik özelliklere sahip malzemelerin hazırlanmasını sağlamaktadır [72]. Ancak sentetik polimerler ile hazırlanan hidrojeller doğal polimerler ile hazırlanan hidrojellere göre daha düşük biyouyumluluk ve biyobozunurluk göstermektedir [68, 81]. Polietilen glikol, poli N-isopropil akrilamit, polivinil alkol, polihidroksietil metakrilat vb. hidrojel hazırlamada çok kullanılan sentetik polimerlerdir [73].

Son zamanlarda ise hem sentetik hem de doğal kaynaklı polimerleri içeren hibrit hidrojeller sentezlenmektedir. Hibrit sistemlerden hazırlanan hidrojeller hem doğal hem de sentetik polimerlerin avantajlarına sahiptir [49].

Polietilen Glikol (PEG)

PEG suda çözünebilen, sitotoksik ve immünojenik olmayan özelliklerinden dolayı biyomalzeme tasarımında yaygın olarak kullanılan sentetik bir polimerdir (Şekil 2.7) [82]. Ayrıca Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından ayarlanabilir özellikleri ve güvenilir profili ile birçok klinik uygulama için onaylanmıştır [83]. Polietilen glikol reaktif olmayan bir polimer olmasından dolayı PEG tabanlı hidrojel hazırlanabilmesi için kimyasal modifikasyon veya kopolimerizasyon gereklidir. Hidroksil sonlu di- ve çok fonksiyonlu PEG polimerleri aldehit, aminoksi, azid tiyol gibi fonksiyonel gruplar ile modifiye edilerek PEG hidrojelleri hazırlanabilmektedir. Ayrıca hazırlanan PEG hidrojelleri terapötik ilaçların kontrollü salımı için sentetik matrisler oluşturmaktadır [84]. Li ve arkadaşları,

dibenzaldehit fonksiyonlu PEG ve α,β -poliaspartilhidrazit polimerlerini kullanarak açilhidrazon bağı ile çapraz bağı pH duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel sentezlemişlerdir. Elde edilen hidrojel, karakterize edilerek, hidrojele DOX yüklenmiştir. DOX yüklü hidrojinin insan fibrosarkomlu farelere intratümöral uygulamasından sonra terapötik etkisi değerlendirilmiştir. DOX yüklü hidrojinin, insan fibrosarkomunun lokal kemoterapi tedavisi için uygun bir biyomalzeme seti olabileceğini raporlamışlardır [85].

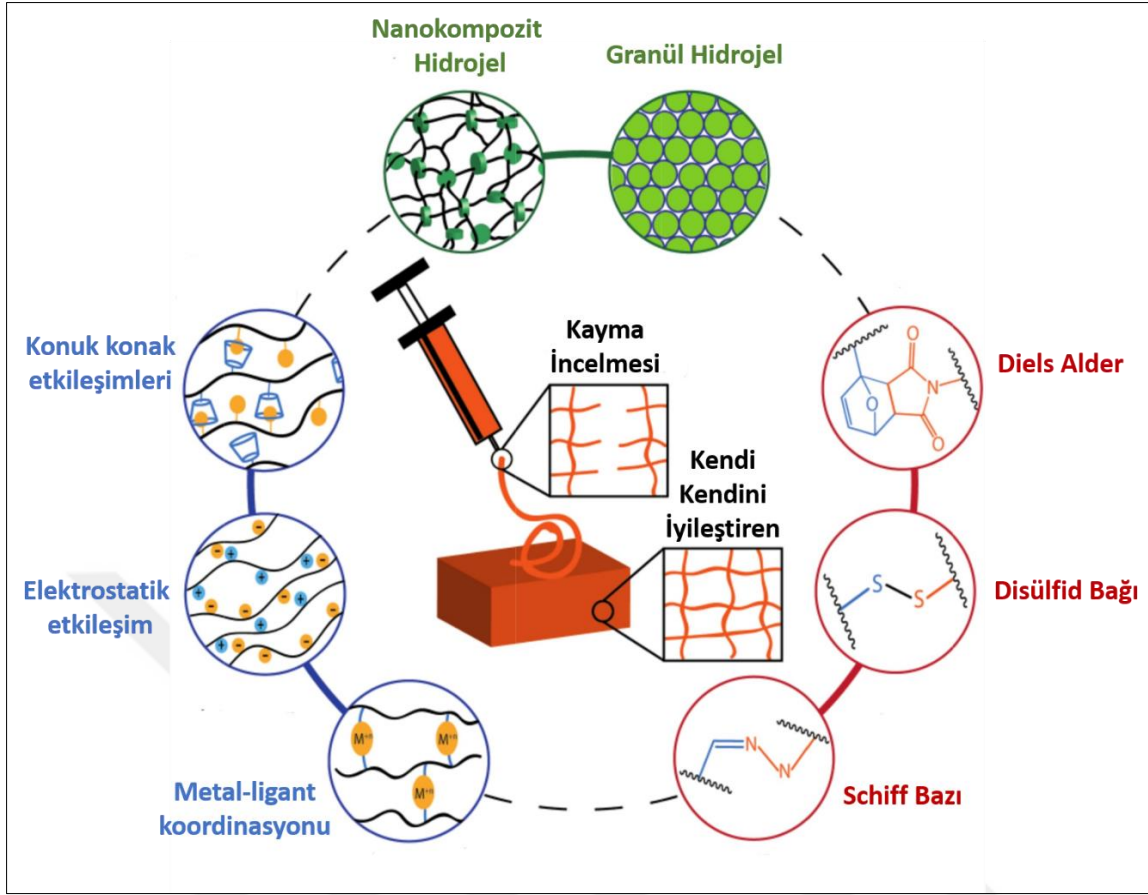


Şekil 2.7. Polietilen glikol polimerinin kimyasal yapısı

2.3.5. Enjekte edilebilir hidrojellerin kendi kendini iyileştirme ve kayma incelmesi özellikleri

In-situ enjekte edilebilir hidrojeller, yavaş jelleşme kinetiğine bağlı olarak ilaç ve hücre gibi kargo moleküllerin kaybına, hedeflenen bölgeden kargo moleküllerin ve polimerlerin difüzyona uğramasına sebep olabilmektedir. İstenmeyen hızlı jelleşme enjektörü tıkayabilmektedir [86, 87]. Bu problemler ise kayma gerilimi altında viskoz akış gösteren (kayma incelmesi) ve uygulanan stres kalktığında iyileşebilen (kendi kendini iyileştirme) hidrojellerin sentezlenmesi ile çözülebilmektedir. Kayma incelmesi özelliği gösteren hidrojellerde stresin uygulanması ile viskozitede bir azalma meydana geldiği ve daha sonra stres azaldığında mekanik özelliklerin geri kazanıldığı reolojik olarak da gösterilmiştir [61]. Bu nedenle bu hidrojeller enjektörde önceden hazırlanarak enjekte edilebilmektedir. Yani önceden hazırlanan hidrojel enjektörden enjekte edilirken daha az viskoz hale gelerek iğneyi tıkamadan lokal olarak enjekte edilebilmektedir. Lokal olarak enjekte edildikten sonra ise stresin azalmasıyla beraber kendi kendini iyileştirip daha viskoz hale gelerek jel özelliğini korumaktadır (Şekil 2.8) [88, 89].

Enjekte edilebilir hidrojellerin hazırlanması sırasında kullanılan hidrojen bağı, hidrofobik, konuk konak gibi kovalent olmayan etkileşimler veya disülfid, Schiff bazı, hidrazon bağı gibi dinamik kovalent etkileşimlerin tersinir olması elde edilen hidrojellerin kendi kendini iyileştirebilme ve kayma incelmesi gibi özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır [54].



Şekil 2.8. Kayma incelmesi ve kendi kendini iyileştirme özelliği gösteren hidrojellerde polimerler arasındaki dinamik ve tersinir etkileşimlerin şematik gösterimi [61]

2.3.6. Kayma incelmesi davranışı gösteren enjekte edilebilir hidrojellerin reolojik karakterizasyonu

Kayma incelmesi davranışı gösteren malzemeler, Newton'a uymayan davranış sergileyen polimerik malzemeler olup Newton'a uymayan akışkanların viskozitesi uygulanan kayma hızına bağlıdır. Bu tür malzemelerde belirli kayma hızı uygulandığında artan kayma hızı ile viskozite azalmaktadır ve böylece katı malzeme akmaya başlamaktadır. Bu tür malzemelerin diğer bir önemli özelliği ise kayma incelmesi etkisinin tersinir olmasıdır. Kayma kuvveti kaldırıldığında malzeme katı haline geri dönebilmektedir. Kayma incelmesi gösteren hidrojeller, kayma gerilimi altında viskoz akışkanlar gibi davranan ve gerilimin ortadan kaldırılmasıyla katı benzeri özellikleri geri kazanan Newton'a uymayan malzemelerdir. Reoloji ise kontrollü test parametreleri altında malzemelerin deforme olma ve akma şeklini nicel olarak belirleyebilen bir bilim dalıdır [90]. Reoloji, özellikle de hidrojellerin enjekte edilebilirliğinin önemli belirleyicileri olan viskozite, depo modülü ve kayıp modülü gibi parametrelerin nicel olarak belirlenmesini sağlayabilmektedir.

Viskozite, bir malzemenin strese tepki olarak deformasyona direnme yeteneğinin veya hidrojel formülasyonlarının enjeksiyon sırasında kayma stresindeki değişikliklere bağlı olarak tepki verme yeteneğinin doğrudan ölçümü olarak açıklanabilmektedir. Depolama ve kayıp modülleri, dinamik osilasyon testlerinde salınımlı kaymaya yanıt olarak sırasıyla bir hidrojin elastik ve viskoz tepki davranışları hakkında bilgi sağlamaktadır. Özellikle, bir hidrojin strese ne kadar tepki verebildiği ve enerjiyi ne kadar absorpladığı (depolama modülü) veya enerjiyi dağıtmak için stres gevşemesine (kayıp modülü) ne ölçüde maruz kaldığı ölçülebilmektedir [89]. Salınımsal kayma reolojisi gibi testler, hidrojinlerin enjekte edildikten sonra mekanik özelliklerini koruma kabiliyetini ve taşıdıkları kargo moleküllerinin bu akıştan nasıl etkilendiğini açıklamaya yardımcı olabilmektedir [90].

2.4. İlaç Taşıma Sistemleri ve Enjekte Edilebilir Hidrojel Sistemleri

Tıp, hastalıkları yönetmek ve tedavi etmek için farmakolojik olarak aktif terapötiklerin (ilaçlar) kullanımına dayanmaktadır. Bununla birlikte bir ilacın etkisi nasıl uygulandığına ve taşındığına bağlıdır. İlacın taşınması ise ilacın farmakinetiğini, emilimini, dağılımını, metabolizmasını, terapötik etki süresini, atılımını ve toksisitesini etkileyebilmektedir. Geleneksel ilaç taşıma sistemleri vücutta ilaçların terapötik seviyesini korumak için ilaçların tekrar tekrar uygulanmasını gerektirmektedir. Bu durum hastanın tedavi sürecine uyumunu, ilacın etkinliğini azaltmakta ve uygulanan yüksek dozlar yan etkilere sebep olmaktadır. Yeni terapötiklerin geliştirilmesiyle bunların vücuttaki hedef bölgeye, terapötik bir konsantrasyonda ve gereken sürede taşınması için daha gelişmiş malzeme setlerine ihtiyaç duyulmaktadır. [45, 91]. Bu nedenle, ilacın dokulara ve hücrelere taşınabilirliğini önemli bir süre boyunca kontrol edebildikleri için kontrollü ilaç taşıma sistemleri uygulanmaya başlanmıştır. Kontrollü ilaç salım sistemleri ilacın terapötik etkinliğini artırması, gerekli doz sağlaması ve yan etkileri azaltma gibi özelliklere sahip olmasından dolayı önem kazanmaktadır. Son yıllarda ise polimerik malzeme esaslı kontrollü ilaç taşıma sistemleri arasında hidrojinler biyouyumlu olmaları, yan etkilerinin olmaması ve ayarlanabilir salım kinetiklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir [92]. Özellikle enjekte edilebilir hidrojinler ilaçların istenilen bölgede yüksek terapötik etkinlikte lokal olarak uygulanabilmesini sağlarken sistematik olarak uygulanan ilaç konsantrasyonunu ve buna bağlı yan etkileri en aza indirmektedir. Ayrıca cerrahi operasyonla ulaşılması zor veya mümkün olmayan bölgelerde kolaylıkla uygulanabilmektedir. Bu malzemeler tek bir uygulama ile uzun süreli etki sağlamak üzere tasarlanabilmektedir [93]. Polimerik

hidrojeller yüksek oranda su absorplama kapasitesi, biyoyumluluk, biyobozunurluk ve gözenekli yapıda olma özellikleri sayesinde ilaçların farmasötik aktivitesini korurken ilaç salımının gerçekleşmesini de sağlamaktadır [94].

Hidroojeller, taşıdıkları ilaç gibi kargo moleküllerin lokal bölgedeki terapötik konsantrasyonlarını şişme, difüzyon, kimyasal ve çevresel uyaranlara bağlı salım mekanizmaları ile kontrol edebilmektedir.

Difüzyon kontrollü salım mekanizması: Bu salım mekanizması polimer ağından oluşan hidrojel matrisi içine dağılan ilacın makromoleküler ağ yapısından veya gözeneklerden difüzyon bazlı salımına dayanmaktadır [95]. Bu salım mekanizması Fick yasası ile açıklanabilmektedir [69].

Şişme kontrollü salım mekanizması: Hidrojellerden şişme ile kontrollü ilaç salımı, biyolojik sıvılar ile temas eden hidrojin şişmeye başlamasıyla serbest polimer hacminin ve çözücü miktarının artması sonucu ilacın difüzyona uğraması temeline dayanmaktadır [96]. İlaç difüzyonu hidrojin şişmesinden daha hızlı olduğu durumlarda şişme kontrollü salım gerçekleşmektedir [97].

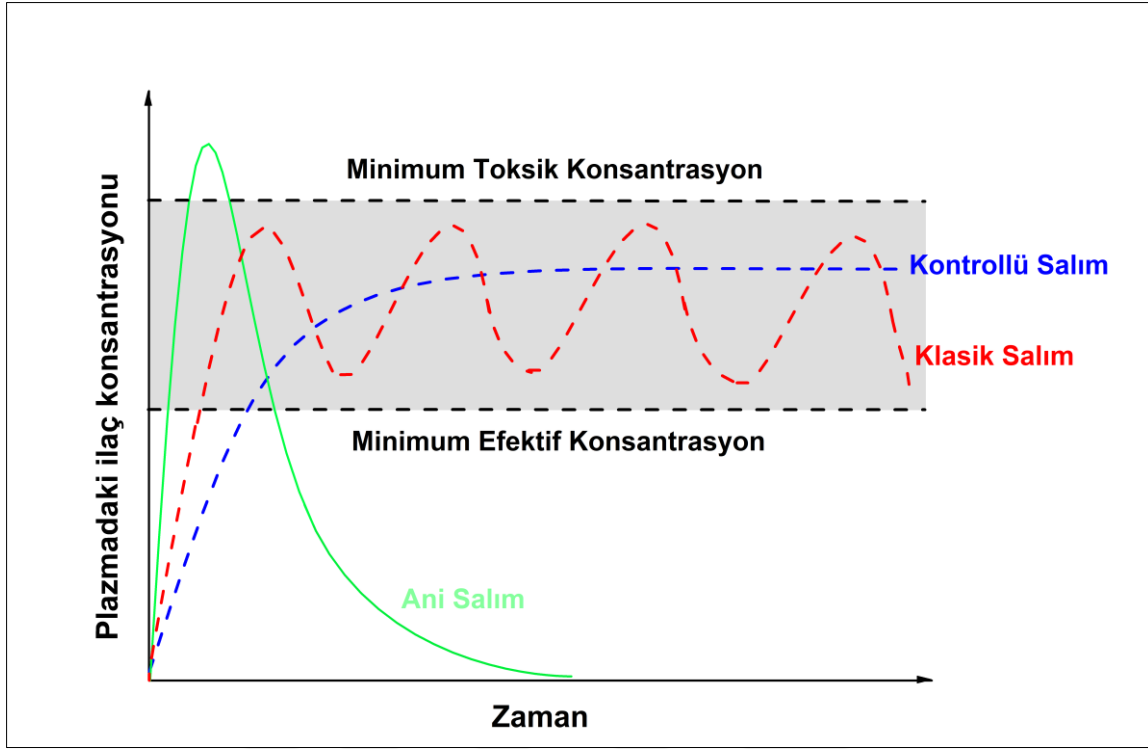
Kimyasal kontrollü salım: Bu mekanizma, taşıyıcı matriks içinde meydana gelen reaksiyonlar ile ilaç salımının gerçekleşmesini sağlamaktadır. Hidrojel taşıma sistemlerinde meydana gelen en yaygın reaksiyonlar polimer zincirlerinin enzimatik veya hidrolitik degradasyona uğraması veya polimer ağı ile ilaç arasında tersinir veya tersinmez reaksiyonların meydana gelmesidir. Belli koşullar altında hidrojinlerin yüzey ve yığın erozyonu ilaç salım hızını kontrol etmektedir. Genel olarak kapsüllenmiş veya kimyasal olarak bağlanmış ilaçların salımı; polimer zincirlerinin degradasyonu, polimer omurgasının yüzey erozyonu veya yığın bozulması ile meydana gelebilmektedir [97].

Çevresel uyaranlara duyarlı kontrollü salım mekanizması: Sıcaklık, pH, manyetik alan vb. çevresel uyaranlara duyarlı mekanizmalar ile salım yapabilen akıllı hidrojel sistemlerinde salım bu mekanizmalar ile kontrol edilebilmektedir. Çevresel uyaranlara duyarlı hidrojellerde, pH, sıcaklık, ışık ve analit konsantrasyonu gibi dış uyaranlara bağlı olarak fizikokimyasal bir değişim meydana gelmektedir. Uyaranlara bağlı tepki genellikle jelin yüzey yükünde, jelin faz hacminde bir değişiklik, degradasyon sonucu bağların kırılması,

jel-sol geçişi şeklinde olabilmektedir [98]. rnekşin insan vücudundaki tümör dokularında farklılık gösteren pH bir i uyaran olarak işlev görebilmekte ve ilaçların salımını gerçekleştirmek için kullanılmaktadır [15]. Tümör dokusundaki pH normal sağlıklı hücrelere göre farklılık göstermektedir ve bu bölgedeki pH, pH'a duyarlı bir ilaç sistemini uyatarak terapötiklerin hedef bölgeye salımını sağlamaktadır [49]. Hidrojel sistemini oluşturan polimer bileşimleri de çevreye duyarlı bir salım profili geliştirmek için tasarlanabilmektedir [95].

2.4.1. Kontrollü ilaç salım mekanizmaları

Geleneksel ilaç taşıma sistemlerinin en büyük dezavantajı hem kontrolsüz hem de hedefe yönelik olmamalarıdır. İlacın hedef bölgeye kan dolaşımını yoluyla iletilmesinden dolayı hedef bölgenin dışındaki bölgelerde toksik seviyelerin oluşması kaçınılmaz olmaktadır. İlacın bu şekilde uygulanması ise şekil 2.9'da gösterildiği gibi başlangıçta ilaç konsantrasyonunun artarak toksik etkiye neden olmasına ve sonra metobolizma yoluyla atılım ile azalarak terapötik etkinin azalmasına sebep olmaktadır. Terapötik dozu sağlamak için ise tekrarlayan dozların uygulanması gerekmektedir. Bu durum ilacın toksisitesine bağlı olarak yan etkileri artırmakla beraber tedaviyi verimsizleştirmektedir. Her ilacın toksik olduğu ve etkisiz olduğu bir konsantrasyon aralığı mevcut olup bu ikisi arasındaki konsantrasyon ise ilacın terapötik dozudur. Kontrollü ilaç taşıma sistemlerinde ise kandaki ilaç seviyesi sabit bir şekilde terapötik doz etkinliğini gerekli olduğu sürece koruyabilirken tek bir uygulama ile tedavi sağlanabilmektedir (Bkz. şekil 2.9) [96, 99].



Şekil 2.9. Efektif konsantrasyon ve toksik konsantrasyona göre ani salım, aralıklı salım ve kontrollü salım profili sergileyen sistemlerde terapötik etkinliğin gösterimi [100]

2.5. Enjekte Edilebilir Hidrojellerin Lokal Kanser Kemoterapi Tedavisinde Uygulamaları

Sistematik olarak uygulanan kemoterapötik ilaçların az bir dozunun tümör dokusunda birikmesi tümör tedavisini yetersiz kılmakla beraber sistematik toksisiteye sebep olmaktadır [101, 102]. Kemoterapötik ilaçlar için bir taşıma sistemi olarak kullanılan enjekte edilebilir hidrojeller, ilacın lokalize olarak uygulanabilmesini sağlamakla birlikte hedeflenen bölgede salım ile ilacın etkinliği artırılabilmekte ve sistematik toksisitesini azaltabilmektedir [48]. Literatürde rapor edilen çalışmalar incelendiğinde tümör büyümesinin baskılanması, metastazın ve kanserin yeniden nüks etmesinin önlenmesi için kemoterapötik ilaçlar enjekte edilebilir hidrojellere kapsüllenebilmekte veya kimyasal bağlanabilmektedir [94, 103-105]. Tümör bölgesindeki pH, sıcaklık gibi çevresel koşullar hedef bölgede kemoterapötik ilacın salımı için hidrojele karşı uyaran olarak kullanılabilir. Bu çevresel uyarılara bağlı olarak salım gerçekleştirebilecek uyaran duyarlı hidrojel sistemleri tasarlanabilmektedir [106]. İlaçlar için kargo görevi gören hidrojellerin lokal bölgede çevresel uyarılara bağlı olarak iç yapısı ve fizikokimyasal özellikleri kademeli olarak değişirken kontrollü ilaç salımı gerçekleştirilebilmektedir. Ancak hidrojeller hidrofilik doğaları gereği suda çözünebilen ilaçların kontrollü salımı için

uygun olabilse de bazı antikanser ilaçları gibi hidrofobik yapıdaki ilaçların salımı için uygun değildir [107]. Hidrofobik ilaçların jel matrisi içinde homojen dağılmaması sonucu lokal bölgeye ani salımı gerçekleşmektedir. Ayrıca hidrojelden salımı gerçekleşen çoğu ilacın kendisi iç hücreye nüfuz edemediğinden etkinliği azalmaktadır. Uyarıcı duyarlı hidrojel ve nanomalzemelerin entegre edilmesi ile oluşturulan hibrit hidrojel ise bu dezavantajları ortadan kaldırabilmektedir [108].

2.6. Nanokompozit Hidrojel

Nanokompozit hidrojel biyomedikal ve biyoteknolojik alanlarda büyük ilgi görmektedir. Hibrit hidrojel olarak da bilinen nanokompozit hidrojel polimer ağına entegre edilmiş nanomalzemelerden oluşan biyomalzeme setleridir [109].

Karbon bazlı nanomateryaller (karbon nanotüpler, grafen vb.), polimerik nanopartiküller, inorganik/seramik nanopartiküller (hidroksiapatit, silikatlar ve kalsiyum fosfat vb.) ve metal/metal oksit (altın, gümüş ve demiroksit vb.) nanopartiküller nanokompozit hidrojellerin tasarımında kullanılan nanomalzemeler olup fiziksel entegrasyon yöntemi veya kovalent çapraz bağlanma ile hidrojel ağına entegre edilebilmektedir [110]. Nanomalzemelerin hidrojele entegre edilmesi hidrojin mekanik özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra hidrojele fonksiyonel özellik de (termoduyarlılık, iletkenlik vb.) kazandırabilmektedir [10, 61]. Son zamanlarda terapötik nanopartiküllerin hidrojel sistemine entegre edilmesiyle yeni alternatif ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir. İlaç yüklü nanomalzemelerin birleşimi ile oluşan kompozit hidrojel, ilaçların nanopartiküller ile sistematik taşınması veya hidrojel sistemleri ile lokal taşınmasının sebep olduğu sınırlamaların üstesinden gelebilmektedir. Nanokompozit hidrojel sistemlerinin en önemli avantajlarından bir tanesi terapötiklerin lokal olarak uygulanabilirliği ve kontrollü ilaç salımının sağlanabilmesidir [111]. Kompozit hidrojel, kontrollü ilaç salım kinetiğinde iki kontrol katmanı sağlamaktadır; i) ilaç salım kinetiğini azaltarak nanopartiküllerin tümör bölgesindeki bulunma sürelerinin uzatılmasını sağlarken, ii) ilaç salımını da düzenlemektedirler [18]. Örneğin porozlu silika nanoparçacıklar yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olup ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilmesine rağmen bu sistemler genel olarak hızlı ve kontrol edilemeyen ilaç salım profili sergilemektedir [111]. Bu sorunun çözümü için Alvarez ve arkadaşları antibiyotik yüklü silika nanopartikülü kolajen hidrojeline entegre ederek bir nanokompozit hidrojel sistemi geliştirmişlerdir.

Nanokompozit hidrojelden ilaç salımı 7 gün boyunca sürdürülerek uzun süreli antibakteriyel etki gözlemlenmiştir [112]. Nanokompozit hidrojeller, kontrollü ilaç salım sistemleri için umut verici olsa da cerrahi operasyona ihtiyaç duyulmasından dolayı enjekte edilebilir özelliğe sahip cerrahi operasyon gerektirmeyen nanokompozit hidrojellerin geliştirilmesi ilgi odağı haline gelmiştir. Özellikle lokal kanser tedavisi için geliştirilen enjekte edilebilir nanokompozit hidrojeller tümör büyümesini inhibe etme, kanser çoklu ilaç direncinin üstesinden gelme, tümör metastazı ve nüksetmesini önleme gibi lokal kanser tedavilerinde tatmin edici bir terapötik etkinlik göstermektedirler [113]. Enjekte edilebilir nanokompozit hidrojeller çoğunlukla nanopartikül veya nanopartikül çözeltisinin jel öncül bileşenleri ile karıştırılması sonucu elde edilmektedir [114]. Ono ve arkadaşları alkin ve azid grupları ile fonksiyonelleştirilmiş polikarbonat bazlı ABA triblok kopolimerlerinin alkin azid siklokatılma reaksiyonu ile kimyasal çapraz bağlanması sonucu enjekte edilebilir bir jel sistemi geliştirmişlerdir DOX yüklü miselin hidrojele entegre edilmesiyle de enjekte edilebilir kompozit bir jel sistemi geliştirmişlerdir. DOX ilacının miselden salımı 6 saatte tamamlanırken, kompozit hidrojelden salımı bir hafta sürdürülebilmektedir. Ayrıca DOX yüklü hibrit hidrojelin MD-MB-231 göğüs kanseri hücre hattı ile 48 saat boyunca etkileştirilmesi sonucu %25 hücre yaşayabilirliği belirlenmiştir [115].

2.6.1. Nanokil tabanlı enjekte edilebilir nanokompozit hidrojeller

Son yıllarda, polimerik hidrojellerin özelliklerini iyileştirmek ve mekanik dayanımı artırılmış organik/inorganik hibrit hidrojeller elde etmek için çeşitli kil nanopartiküllerinin kullanılması oldukça ilgi görmektedir. Özellikle LAP, geliştirilmiş mekanik özelliklere sahip nanokompozit hidrojelleri sentezlemek için kullanılan kil nanopartiküllerindendir [116]. LAP nanosilikatlar ($\text{Na}^{+0.7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0.7}$), yaklaşık 25-30 nm çapında ve 0,92 nm kalınlığında disk şeklindeki nanokristallerden oluşan iki boyutlu (2D) toksik olmayan sentetik nanomalzemelerdir. Disk şeklindeki nano ölçekli kristallerin yüzeyleri negatif yüklü iken kenarları ise pozitif yüklüdür (Şekil 2.10) [117]. LAP'ın negatif yüzey yükü ve geniş yüzey alanı ($330 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$) etkili ilaç yükleme kapasitesi sağlamaktadır [118, 119]. Bu özellikler LAP'ın anyonik, katyonik ve nötral polimerler ile etkileşmesini sağlayarak mekanik özellikleri iyileştirilmiş ve kayma incilmesi özelliğine sahip enjekte edilebilir hidrojellerin tasarlanmasına imkan vermektedir [120]. Ayrıca ilaç taşıyıcı

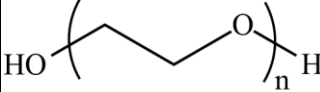
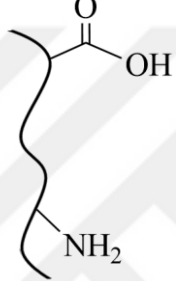
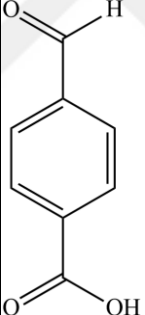
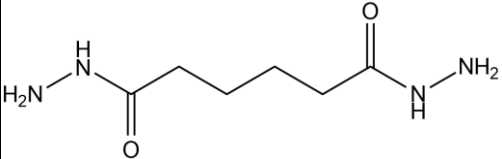
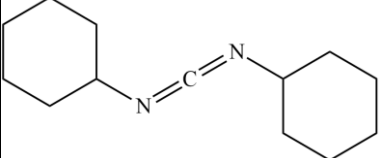
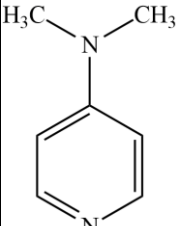


3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasalın Adı ve Özellikleri	Yapı Formülü
Polietilen glikol (PEG) Molekül Kütlesi: 2000; 4000 g/mol	
Jelatin (Jel) tip: A, Domuz derisinden	
4-Formil benzoik asit Molekül Kütlesi: 150,13 g/mol	
Adipik Asit Dihidrazit Molekül Kütlesi: 174,20 g/mol	
N,N’-Disikloheksilkarbodiimid (DCC) Molekül Kütlesi: 206,33 g/mol	
4-dimetilamino piridin (DMAP) Molekül Kütlesi: 122,17 g/mol	

Çizelge 3.1. (devam) Kullanılan kimyasal malzemeler

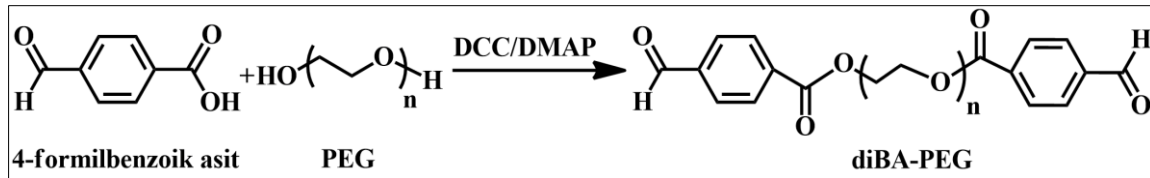
N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) Molekül Kütlesi: 191,70 g/mol	
1-Hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt) Molekül Kütlesi: 135,12 g/mol	
Laponit	$\text{Na}^{+}_{0,7} [(\text{Si}_{8,5} \text{Mg}_{5,5} \text{Li}_{0,3}) \text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0,7}$
2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) Molekül Kütlesi: 293,17 g/mol	
Doksorubisin hidroklorür (DOX. HCl) Molekül Kütlesi: 579,98 g/mol	
β-Alanin Molekül Kütlesi: 89,09 g/mol	
Tetrahidrofuran (THF) Molekül Kütlesi: 72,11 g/mol	
Dimetil sülfoksit (DMSO) Molekül Kütlesi: 78,13 g/mol	
Dietil eter Molekül Kütlesi: 74,12 g/mol	
Hidroklorik asit Molekül Kütlesi: 36,46 g/mol	HCl
Sodyum hidroksit Molekül Kütlesi: 40,00 g/mol	NaOH

3.2. Öncül Polimerlerin Sentezi

3.2.1. Polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG) sentezi

Polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG) polimeri iki farklı molekül ağırlığına sahip PEG (2000 ve 4000 g/mol) polimerleri kullanılarak sentezlenmiştir (Şekil 3.1) [124].

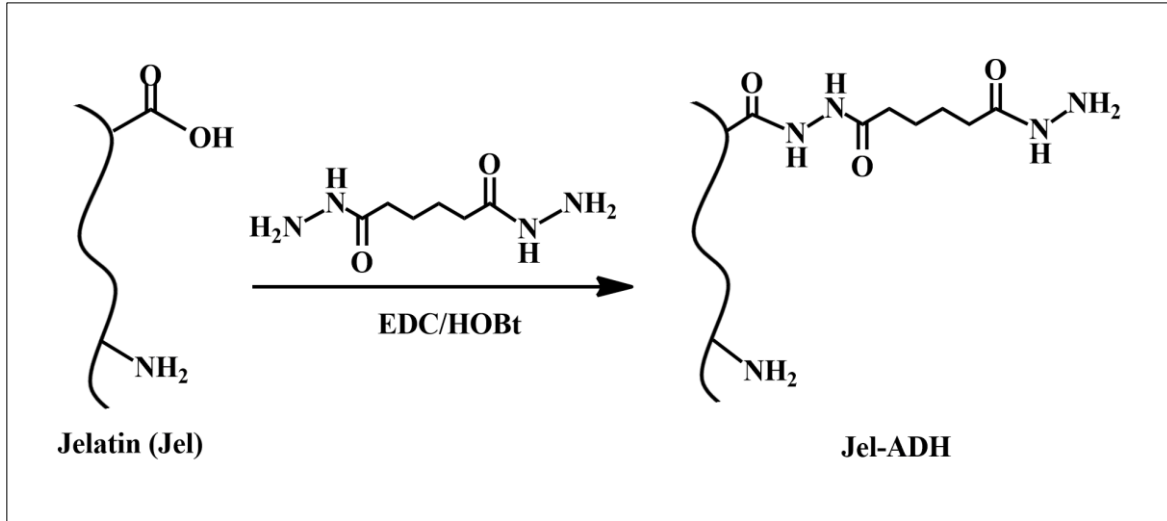
Bu amaçla öncelikle polietilen glikol 2000 (0,5 g, 0,25 mmol) veya 4000 (1,0 g, 0,25 mmol) polimerinin 30 mL tetrahidrofurandaki (THF) çözeltisine 4-formilbenzoik asit (0,751 g, 5 mmol) ve 4-dimetilamino piridin (DMAP) (0,123 g, 1 mmol) eklenerek çözölmüştür. Bu karışıma N,N'-Disikloheksilkarbodiimid'in (DCC) (0,258 g, 1,25 mmol) 5 mL THF'deki çözeltisi azot atmosferi altında eklenerek oda sıcaklığında 72 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı süzölerek elde edilen süzöntüye soğuk dietil eter eklenmiş ve beyaz renkli ham ürün elde edilmiştir. Saflaştırma işlemi için ham ürün tekrar THF'de çözölerek soğuk dietileter de çöktürölmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen diBA-PEG polimerlerinin kimyasal yapısı ATR-FTIR ve ¹H-NMR ile karakterize edilmiştir. PEG polimeri Şekil 3.1'de gösterildiği gibi modifiye edilmiştir.



Şekil 3.1. diBA-PEG Polimerlerinin sentezinin şematik gösterimi

3.2.2. Adipik asit dihidrazit modifiye jelatin sentezi (Jel-ADH)

Jel-ADH polimeri sentezi için öncelikle 0,5 g jelatin (Jel) polimeri 50 mL deiyonize suda 37°C'de çözölmüştür ve 2,09 g adipik asit dihidrazit eklenmiştir. Sonra 5 mL dimetil sülfoksitte (DMSO) çözölen 0,271 g 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) ve 5 mL deiyonize suda çözölen 0.384 g N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) sırasıyla jelatin polimeri çözeltisine eklenmiştir. Reaksiyon karışımı pH'ı pH=5,0'e ayarlanarak 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Oluşan ürün 6-8 kDa diyaliz membran ile suya karşı diyaliz edilerek saflaştırılmış ve liyafilizatörde kurutulmuştur [80]. Elde edilen Jel-ADH polimerlerinin kimyasal yapısı ATR-FTIR ve ¹H-NMR ile karakterize edilmiştir. Jelatin polimeri Şekil 3.2'de gösterildiği gibi modifiye edilmiştir.



Şekil 3.2. Jel-ADH polimeri sentezinin şematik gösterimi

3.3. Jel-ADH Polimerinin Adipik Asit Dihidrazit ile Modifikasyon Derecesinin Trinitrobenzensülfonik Asit (TNBS) Testi ile Belirlenmesi

Jelatin polimerinin sahip olduğu karboksil gruplarının hidrazit türevi bileşik ile modifiye edilmesi sonucu artan primer amin gruplarının TNBS reaktifi ile reaksiyon vermesinden yararlanılarak modifikasyon derecesi hesaplanmıştır [125]. Bu amaçla öncelikle β -alaninin sodyumbikarbonat (NaHCO_3 , 0,1M, pH=8,5) tamponunda farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerine %0,01 (a/v) 1 mL TNBS çözeltisi eklenmiştir ve 37°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan çözeltilere 0,25 mL sodyum dodesil sülfat (%10 a/v) ve 0,125 mL 1 M hidroklorik asit eklenerek UV-vis spektrofotometresinde 349 nm'de absorbans değerleri belirlenmiş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir. 0,1 mg/ml Jel ve Jel-ADH polimer çözeltilerine de aynı işlemler uygulanarak absorbans değerleri ölçülmüştür ve adipik asit dihidrazit ile modifiye edilen jelatin polimerinin modifikasyon derecesi eşitlik (Eş. 3.1) ile hesaplanmıştır [126].

$$\text{Karboksil Gruplarının Dönüşüm Yüzdesi (\%)} = \frac{A_a - A_0}{C_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada A_a , bir Jel-ADH moleküler zincirindeki amino grubu miktarını; A_0 , bir başlangıç jelatin moleküler zincirindeki amino grubu miktarını ve C_0 , ise bir başlangıç jelatin moleküler zincirindeki karboksil grubu miktarını göstermektedir.

3.4. Laponit Kiline DOX Yükleme

Laponit (LAP) kiline DOX yükleme işlemi için öncelikle, deiyonize suda dağıtılan 8 mg LAP çözeltisine DOX'un deiyonize sudaki çözeltisi (2 mg/mL) damla damla ilave edilerek bir gece oda sıcaklığında karıştırılmıştır. DOX yüklü LAP 12000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür ve üç kez saf su ile yıkanarak kurutulmuştur [127].

LAP'e DOX yüklemesinin tamamlanması işleminden sonra ilaç yükleme kapasitesi ve yükleme etkinliğinin hesaplanması için öncelikle DOX'un 3 mL distile su içerisinde farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanarak UV spektrumları alınmış ve DOX'un 480 nm dalga boyundaki absorbans değerleri için kalibrasyon grafiği çizilmiştir. DOX yüklü LAP'in ilk santrifüjleme ve üç yıkama sonrası santrifüjlemeden sonra alınan süpernatantlarının UV spektrofotometresinde 480 nm'deki absorbansları ölçülerek absorbans-konsantrasyon kalibrasyon grafiği yardımıyla derişimleri belirlenmiştir. Eş. 3.2 ve Eş. 3.3 kullanılarak LAP'in DOX yükleme kapasitesi ve yükleme etkinliği belirlenmiştir [128].

$$\text{DOX Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Yüklenen DOX miktarı}}{\text{Yüklenmiş Laponit Nanodisk miktarı}} \quad (3.2)$$

$$\text{DOX Yükleme Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Yüklenen DOX miktarı}}{\text{Ortama beslenen DOX miktarı}} \quad (3.3)$$

3.5. Hidrojel Oluşumu

Jel-ADH/diBA-PEG hidrojel sentezi için iki farklı molekül ağırlığına sahip çapraz bağlayıcı görevi gören diBA-PEG4000 ve diBA-PEG2000 polimerleri kullanılmıştır. Bu kapsamda katı miktarının ve molar oranın jelleşme süresine etkisini incelemek için diBA-PEG ve Jel-ADH jel öncül polimerlerinin ayrı ayrı farklı konsantrasyonlarda (%5, %10, %15, %20 (a/v)) fosfat tamponu (PBS) pH=7,4'de çözeltileri hazırlanmıştır. Aynı konsantrasyonda (%5, %10, %15, %20 (a/v)) hazırlanan Jel-ADH ve diBA-PEG çözeltileri 7 farklı hacim oranında sırasıyla (9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7) 37°C'de karıştırılarak jelleşme süreleri belirlenmiştir.

Hibrit hidrojel sentezi için LAP nanodisk Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline entegre edilmiştir. Bu amaçla (0,05 % (a/v), 0,1 % (a/v), 0,2 % (a/v)) konsantrasyonlarında LAP çözeltisi, PBS (pH=7,4) tamponundaki Jel-ADH çözeltisine eklendikten sonra PBS

(pH=7,4) tamponundaki diBA-PEG (%15 a/v) polimer çözeltisi ile hacimce sırasıyla 8/2 oranında 37 °C’de karıştırılarak jelleşme süresi optimizasyonu yapılmıştır.

3.5.1. Jelleşme sürelerinin belirlenmesi

Hidrojellerin makroskopik olarak jelleşme süreleri belirlemek amacıyla hidrojel öncül çözeltileri 37°C ve 250 rpm’de manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Jel öncül bileşenlerinin manyetik balık ile karıştırılıp oluşan jelin balığın etrafına tamamen sarıldığı nokta jelleşme süresi olarak kabul edilmiştir [129].

3.6. Jel Öncül Bileşenleri ve Hidrojellerin Karakterizasyonu

3.6.1. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Sentezlenen Jel-ADH ve diBA-PEG jel öncül polimerlerinin kimyasal karakterizasyonu ¹H NMR (Bruker 500 MHz) analizi ile yapılmıştır.

3.6.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre (FTIR)

Jel öncül bileşenleri Jel-ADH, diBA-PEG, LAP, LAP@DOX ve Jel-ADH/diBA-PEG, Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin fonksiyonel gruplarının karakterizasyonu, ATR-FTIR Spektroskopisi (Alpha FTIR Spectrometer Bruker) kullanılarak yapılmıştır.

3.6.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Sentezlenen hidrojellerin şişirilmeden önce ve PBS tampon çözeltilerinde (pH=5,0 ve pH=7,4) şişirildikten sonra morfolojik özelliklerin ve farklılıkların belirlenebilmesi için SEM analizleri yapılmıştır. Bu amaçla sentezlenen ve PBS’de şişirilen hidrojeller liyofilize edilerek kurutulmuş, kesilerek altınla kaplanmış ve analiz için Tescan GAIA 3 taramalı elektron mikroskop cihazı kullanılmıştır. Ayrıca farklı miktarlarda LAP içeren hibrit jellerin morfolojileri, SEM ve enerji dağılımı X-ışını (EDX) analizi ile belirlenmiştir.

3.6.4. Reometre

Bu çalışma kapsamında sentezlenen hidrojellerin viskoelastik davranışları, mikroskopik jelleşme süreleri, enjekte edilebilirlik ve kendi kendini iyileştirebilme özelliklerinin belirlenebilmesi için Malvern Kinexus Pro reolojik reometre cihazı kullanılmıştır.

3.6.5. Zetasizer

LAP ve ilaç yüklü LAP@DOX killerinin zeta potansiyelinin ölçümü için Zetasizer Nano ZSP system (Malvern) cihazı kullanılmıştır.

3.6.6. UV-vis spektrofotometresi

Tez çalışması kapsamında LAP kiline ilaç yükleme ve salım çalışmalarında UV Görünür Bölge Spektrofotometresi (Shimadzu UV mini-1240) kullanılmıştır.

3.7. Reolojik Analizler

Hidrojellerin reolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla öncelikle, Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelleri 37°C'de kalıpta oluşturulmuştur. Jellerin oluşturulmasının ardından 2 saat bekletildikten sonra elde edilen hidrojellerin viskoelastik davranışını incelemek amacıyla 1-10 rad/sn aralığında %0,5 kontrollü gerinim altında frekans taraması yapılarak depo modülü (G') ve kayıp modülü (G'') değerleri frekansa karşı ölçülmüştür. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin enjekte edilebilirlik davranışlarının incelenebilmesi için 37°C'de oluşturulup 2 saat bekletilen hidrojellere 25°C'de 0,1-100/s aralığında kayma hızı uygulanarak viskozite değerleri belirlenmiştir. Reolojik olarak jelleşme sürelerinin belirlenebilmesi için ise Jel-ADH/diBA-PEG2000, Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin jel öncül bileşenleri reometre plakası üzerinde karıştırılarak zamana karşı G' ve G'' değerleri 37°C'de belirlenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojeline ayrıca 25°C'de 1 rad/sn sabit frekansta gerinim genliği taraması yapılarak jel özelliğini yitirdiği gerinim değeri belirlenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin kendi kendini iyileştirebilme özelliğinin belirlenebilmesi için de hidrojele 25°C ve 1 rad/sn sabit frekansta basamaklı gerinim taraması analizi yapılmıştır. Bunun için hidrojel düşük gerinim genliğinden ($\gamma=1\%$, 120 sn her bir basamak için) yüksek bir gerinim genliğine (γ

=%500, 60 sn her bir basamak için) değiştirilen gerinime maruz bırakılmıştır ve bu döngü üç kez tekrarlanmıştır. Bu deneylerde hidrojel oluşturulduktan hemen sonra reometre plakasına yerleştirilmiş ve üst plaka 0,5 mm yüksekliğine kadar indirilerek ölçümler alınmıştır.

3.8. Jel-ADH/diBA-PEG2000/LAP Hidrojelinin Çapraz Bağlanma Etkinliğinin Belirlenmesi

Hidrojinin çapraz bağlanma etkinliği TNBS testi belirlenmiştir [130,131]. Bu amaçla liyofilize edilerek kurutulan 1,6 mg Jel-ADH polimeri ve 2 mg hidrojel tartılmıştır. Jel-ADH ve hidrojele 1 mL %4 (a/v) NaHCO₃ ve 1mL %0,05 (a/v) TNBS çözeltisi eklenerek 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 6 M 3 mL HCl asit ilave edilerek 37°C’de 4 saat daha inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda her bir çözeltinin absorbansı UV-vis spektrofotometresi kullanılarak 340 nm’de ölçülmüştür ve çapraz bağlanma etkinliği Eş. 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır [132].

$$\text{Çapraz bağlanma etkinliği (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Çapraz bağlı jelin absorbansı}}{\text{Çapraz bağlı olmayan jelin absorbansı}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

3.9. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojelinin pH Duyarlılığının İncelenmesi

Hidrazon bağı ile hazırlanan hibrit hidrojinin pH duyarlılık özelliğini gösterebilmek için jeller Rodamine B (RhB) boyası katılarak hazırlanmıştır. Buradaki amaç görsel olarak sol-jel oluşumunu daha net gözlemleyebilmektir. Jel öncül bileşenlerine eser miktarda RhB eklenerek hazırlanan Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojinine öncelikle derişik HCl asit (60 µL, 10 M) eklenerek vortekslenmiş ve sıvı (sol) hale getirilmiştir. Daha sonra sol haldeki sisteme NaOH (60 µL, 10 M) ilave edilerek tekrar jel oluşturulmuştur. Sol-jel geçişi sırasıyla HCl (20 µL, 10 M) ve NaOH (20 µL, 10 M) eklenerek 3 kez daha tekrarlanmıştır.

3.10. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojelinin Kendi Kendini İyileştirme ve Enjekte Edilebilirlik Özelliklerinin İncelenmesi

Sentezlenen enjekte edilebilir hibrit hidrojinin kendi kendini iyileştirebilme özelliğini göstermek için makroskopik ölçekte deney yapılmıştır. Hibrit hidrojinin kendi kendini iyileştirebilme özelliğini incelemek amacıyla metilen mavisi (MB) ve RhB ile renklendirilmiş Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojielleri silindirik veya disk şeklinde kalıpta

hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı renkteki hidrojel kesilerek iki farklı renkteki silindir veya disk şeklindeki jeller birleştirilerek 37°C’de 1 saat bekletilmiştir. Silindirik hidrojele manuel olarak pens ile çekme testi uygulanmıştır.

Hibrit hidrojinin makroskopik düzeyde enjekte edilebilir özelliğini incelemek amacıyla ise oluşturulan hidrojel 21-gauge iğneye sahip enjektörden boş petri kabına ve PBS içeren vialer enjekte edilmiştir.

3.11. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin *In-Vitro* Şişme ve Degradasyon Davranışlarının İncelenmesi

Hidrojellerin şişme davranışının belirlenmesinde gravimetrik yöntem kullanılmıştır. Bunun için öncelikle kalıpta disk şeklinde oluşturulan hidrojel liyofilize edilerek kurutulmuştur. Hidrojellerin şişme davranışını farklı ortamlarda belirlemek amacıyla pH=5,0 ve pH=7,4 PBS tampon çözeltileri kullanılmıştır. Bunun için kurutulmuş hidrojel 30 mL pH=5,0 ve pH=7,4 PBS içeren ortamlara yerleştirilerek 37°C’de inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında ortamlardan alınan hidrojel yüzeyindeki aşırı su peçete ile hassas bir şekilde emdirildikten hemen sonra tartılmıştır. Her bir şişme ortamı için deney üç kez tekrarlanmıştır. Şişme oranı Eş. 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır [133].

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \left(\frac{W_s - W_k}{W_k} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

W_s ve W_k sırasıyla şişmiş jelin ve kuru jelin ağırlıklarıdır.

Hidrojellerin degradasyonu zamana bağlı ağırlık kayıplarına göre incelenmiştir. Bu amaçla disk şeklinde hazırlanan hidrojel liyofilize edilerek kurutulmuş ve tartılmıştır. Sonra hidrojel 30 mL pH=5,0 ve pH=7,4 PBS ortamlarına yerleştirilerek denge konumuna gelinceye kadar bekletilmiş ve sonra çalkalayıcıya yerleştirilerek 80 rpm’de 37°C’de inkübe edilmiştir. Belli zaman aralıklarında hidrojel alınarak üzerlerindeki aşırı su peçete ile hassas bir şekilde emdirildikten hemen sonra tartılmıştır. Deney her bir ortam için üç kez tekrarlanmıştır. Hidrojellerin *in-vitro* degradasyonu Eş. 3.6 kullanılarak hesaplanmıştır [134].

$$\text{Kalan hidrojel ağırlığı (\%)} = \frac{W_s}{W_i} \times 100 \quad (3.6)$$

W_i , dengedeki ilk hidrojelin ağırlığı, W_s ise belirli zaman aralıklarında kalan hidrojelin ağırlığıdır.

3.12. *In vitro* İlaç Salım Profillerinin İncelenmesi

3.12.1. LAP kilinden DOX ilacının salım profilinin incelenmesi

DOX yüklü LAP kilinin pH-duyarlı *in-vitro* DOX salım profillerini incelemek amacıyla 37°C'de pH=7,4; 6,8 ve 5,0 olmak üzere üç farklı PBS tamponu çözeltisi kullanılmıştır. Bu amaçla, her bir pH için PBS tamponunda dağıtılmış DOX yüklü kil (0,5 mg/mL) diyaliz membranına (1 kDa) alınarak 19 mL aynı tampon ortamına karşı 37°C sıcaklıkta diyaliz edilmiştir. Belli zaman aralıklarında bu diyaliz ortamından 3 mL alınarak yerine 3 mL taze tampon çözelti eklenmiştir. Salım ortamından alınan 3 mL örneklerin UV-vis spektrofotometresinde 480 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır. Bilinen derişimlerde DOX çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğı ve Eş. 3.7 kullanılarak % kümülatif DOX salım miktarı farklı pH ortamlarında zamana karşı belirlenmiştir. *In-vitro* ilaç salım deneyleri üç kez tekrarlanmıştır.

3.12.2. Hidrojellerden DOX ilacının salım profilinin incelenmesi

Jel-ADH/diBA-PEG@DOX and hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hidrojellerinden DOX ilacının farklı pH ortamlarında (pH 5,0; pH 6,8; pH 7,4) salım profilleri incelenmiştir. Bu amaçla 0,125 mg DOX veya 0,5 mg LAP@DOX içeren Jel-ADH (15% w/v) ve diBA-PEG (15% w/v) polimer çözeltileri sırasıyla 8/2 hacminde karıştırılarak Jel-ADH/diBA-PEG@DOX and Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hidrojelleri hazırlanmıştır. Hazırlanan hidrojeller 1mL salım ortamı içeren diyaliz membranına (1kDa) alınarak 19 mL aynı tampon ortamına karşı 37°C sıcaklıkta diyaliz edilmiştir. Salım ortamından alınan 3 mL örneklerin UV-vis spektrofotometresinde 480 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır. Bilinen derişimlerde DOX çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğı ve eşitlik Eş. 3.7 kullanılarak % kümülatif DOX salım miktarı farklı pH ortamlarında zamana karşı belirlenmiştir [125]. Hidrojellerden *in-vitro* ilaç salım deneyleri üç kez tekrarlanmıştır.

$$\text{Kümülatif DOX Salımı (\%)} = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (3.7)$$

burada M_t ve M_0 değerleri sırasıyla hidrojelden belirli bir zamanda salınan DOX miktarı ve başlangıçta hidrojele yüklenen DOX miktarıdır.

3.13. Hidrojel Öncül Bileşenleri ve Hidrojellerin Hücre Sitotoksisite Deneyleri

Hidrojel öncül bileşenleri Jel-ADH, diBA-PEG2000, LAP ve Jel-ADH/diBA-PEG 2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin sitotoksisiteleri insan meme epitel (SVCT) ve insan umbilikal damar endotel (HUVEC) hücre hatlarına 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, insan meme epitel hücreleri (SVCT), %10 FBS, %1 antibiyotik/antimikotik çözelti, %1 L-Glutamin, 10 µg/mL insülin ve 5µg/mL hidrokortizol ile takviye edilmiş DMEM /12'de kültürlenmiştir. İnsan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) ise 37°C'de %10 FBS, %1 antibiyotik/antimikotik çözelti ve %5 CO₂ ile takviye edilmiş DMEM yüksek glikozda kültürlenmiştir. Her iki hücrede 96 kuyucuklu plaklara 1×10^4 hücre yoğunluğunda ekilmiştir. Hidrojel öncül bileşenleri hücre kültürü ortamında belirli derişimlerde çözölmüştür ve hidrojeller hücre kültürü ortamında oluşturulmuştur. Hazırlanan örnekler 30 dk boyunca UV ile sterilize edildikten sonra, jel öncül bileşenlerinin ve hidrojellerin ekstraktını elde etmek için malzemeler hücre kültür ortamı ile 24 saat etkileştirilmiştir. Daha sonra plaklara ekilen hücreler üzerine malzeme ekstraktları eklenmiştir. Plaklar 24 ve 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra plaklardaki besi yeri atılmış ve MTT çözeltisi ile değiştirilmiştir ve 4 saat daha inkübe edilmiştir. MTT çözeltisi inkübasyondan sonra atılarak her bir plakaya DMSO eklenmiştir ve plakların absorbansı 570 nm'de mikropilaka okuyucu ile okunmuştur. Bağlı hücre yaşayabilirliği, kontrol kuyucuklarındaki kültür ortamı absorbansı ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. MTT deneyine ek olarak, canlı/ölü deneyleri (Thermo, UK) yapılmıştır. Canlı/ölü deneyi için hücreler, 24 kuyucuklu plaklara 1×10^4 hücre yoğunluğunda ekilmiş ve ekstraksiyon ortamı ile 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler, FITC standart filtre seti ile bir floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir.

DOX yüklü Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin sitotoksisiteleri meme kanseri hücre hatları MCF-7 and MDA-MB-231 kullanılarak Resazurin boya bazlı alamar mavisi deneyi ile incelenmiştir. Her iki hücrede 12 kuyucuklu plaklara $4,5 \times 10^4$ hücre yoğunluğunda ekilmiştir. Hücre ekilmesinden bir gün sonra hidrojeller kuyucuklara eklenerek hidrojellerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksisite analizi 72 saate

boyunca incelenmiştir. Bu sitotoksisite analizlerine ek olarak, kültür periyodu boyunca bu hidrojellerden DOX salımı aynı kuyulardan spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve kümülatif olarak hesaplanmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanarak sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) ile verilmiştir.

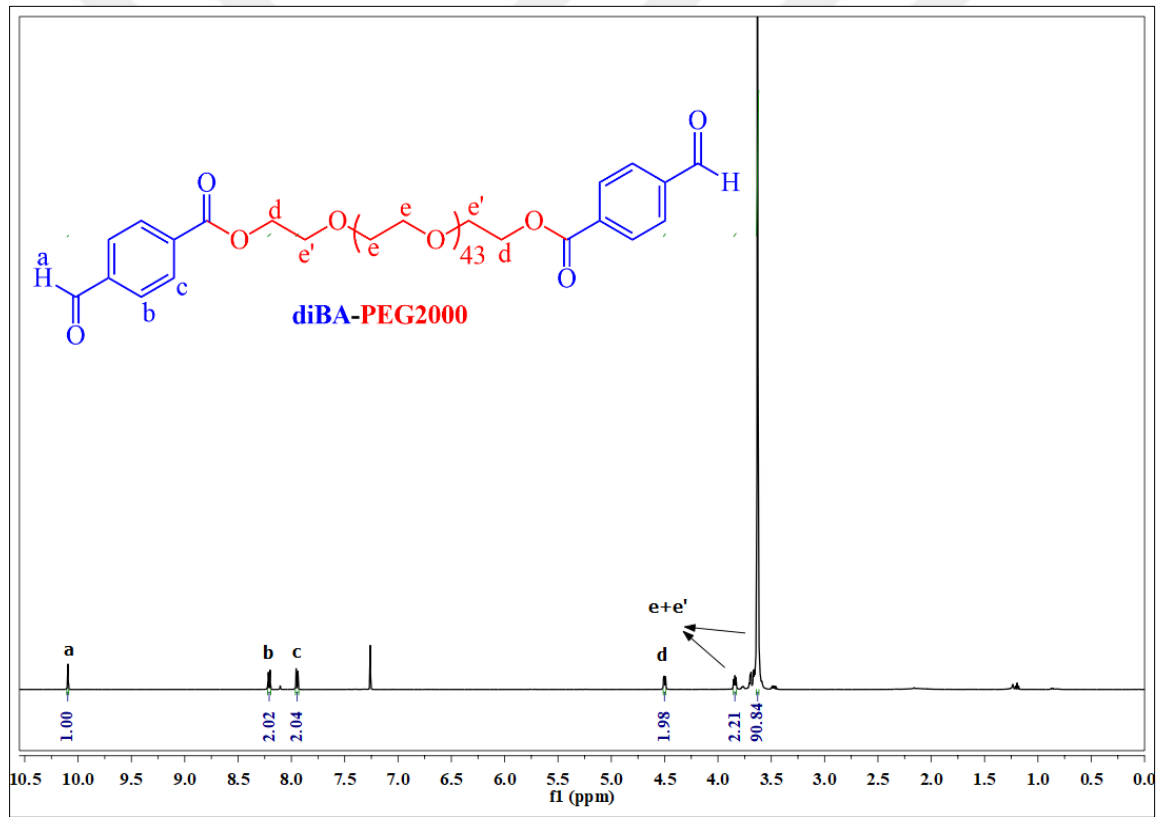


4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hidrojel Öncül Polimerlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

4.1.1. Polietilen glikol dibenzaldehit (diBA-PEG) sentezi ve karakterizasyonu

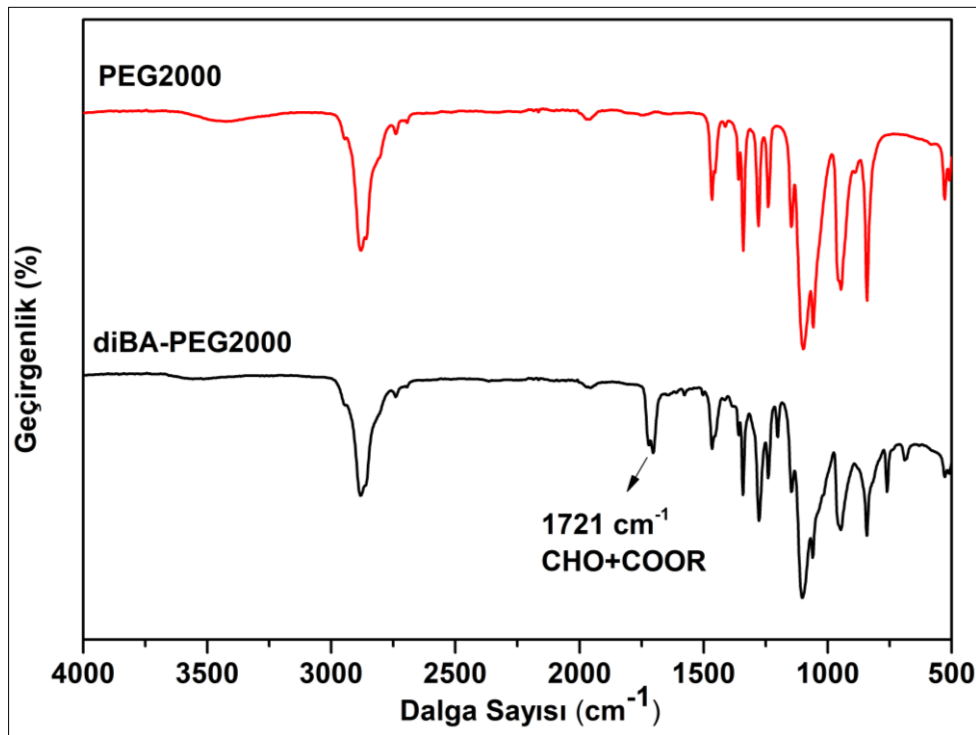
diBA-PEG polimeri hidroksil sonlu polietilen glikol (PEG) polimeri ve 4-formilbenzoik asitin esterleşme reaksiyonu ile sentezlenmiştir. diBA-PEG polimeri iki farklı molekül ağırlığına sahip PEG2000 ve PEG4000 polimerleri kullanılarak sentezlenmiştir. diBA-PEG polimerlerinin kimyasal yapısı ^1H -NMR ve ATR-FTIR analizleri ile aydınlatılmıştır.



Şekil 4.1. diBA-PEG2000 Polimerinin ^1H -NMR spektrumu (500 MHz, CDCl_3)

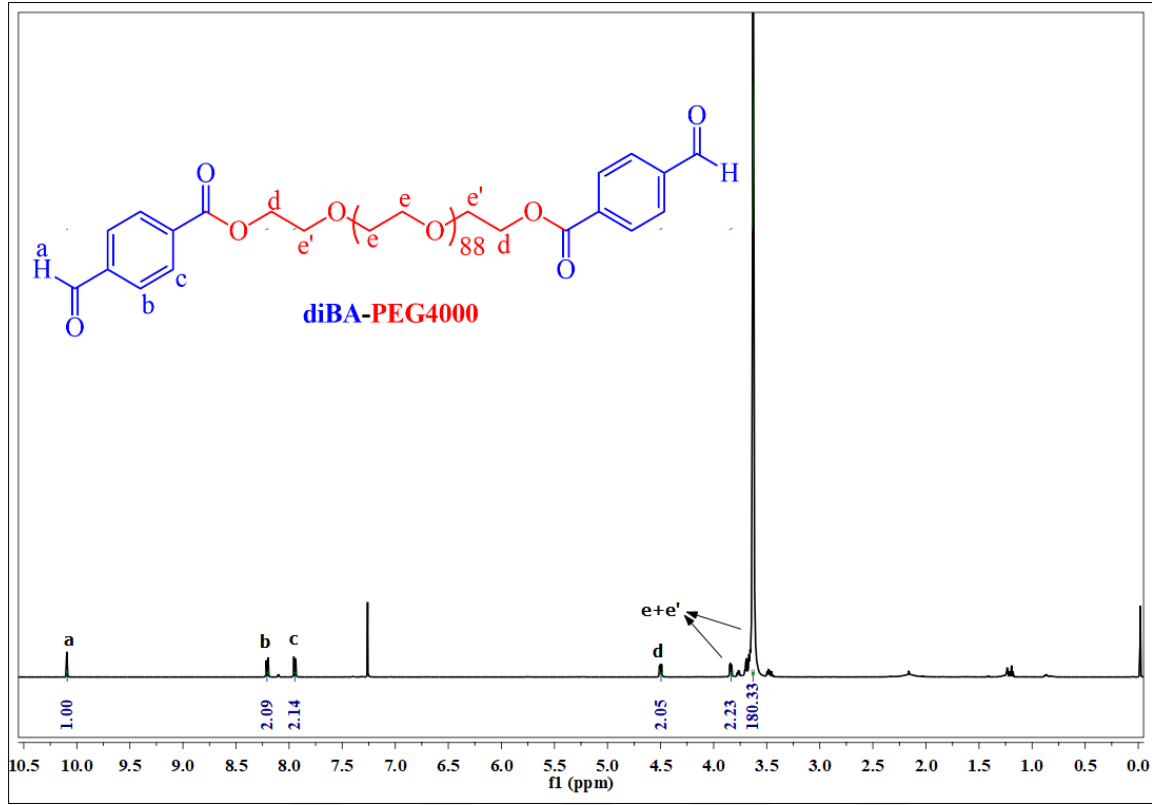
Şekil 4.1’de verilen diBA-PEG2000 polimerine ait ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde 10,08 ppm’de aldehit protonları, 8,18 ve 7,94 ppm’de, benzen halkalarına ait protonlar, 4,49 ppm’de ester metilen protonları, 3,61 ppm’de eter metilen protonları görülmektedir. 8,18; 7,94; 4,49 ve 3,61 ppm’deki piklerin integrasyon oranları 4/4/4/182 olup teorik olarak hesaplanan 4/4/4/172 integral oranlarına yakın değerdedir.

Şekil 4.2’de ise PEG2000 ve PEG2000 polimerinin 4-formilbenzoik asit ile reaksiyon ürünü olan diBA-PEG2000 polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları bir arada verilmiştir. diBA-PEG2000 polimerinin ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde; PEG2000 polimerinin spektrumundan farklı olarak dibenzaldehit modifikasyonunun bir göstergesi olan benzaldehit ve ester C=O grubuna ait gerilme titreşim bandı 1721 cm^{-1} ’de görülmektedir. Bu sonuçlar polietilen glikol polimer zincirlerinin hemen hemen hepsinin her iki hidroksil sonlu gruplarından benzaldehit ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir [135].



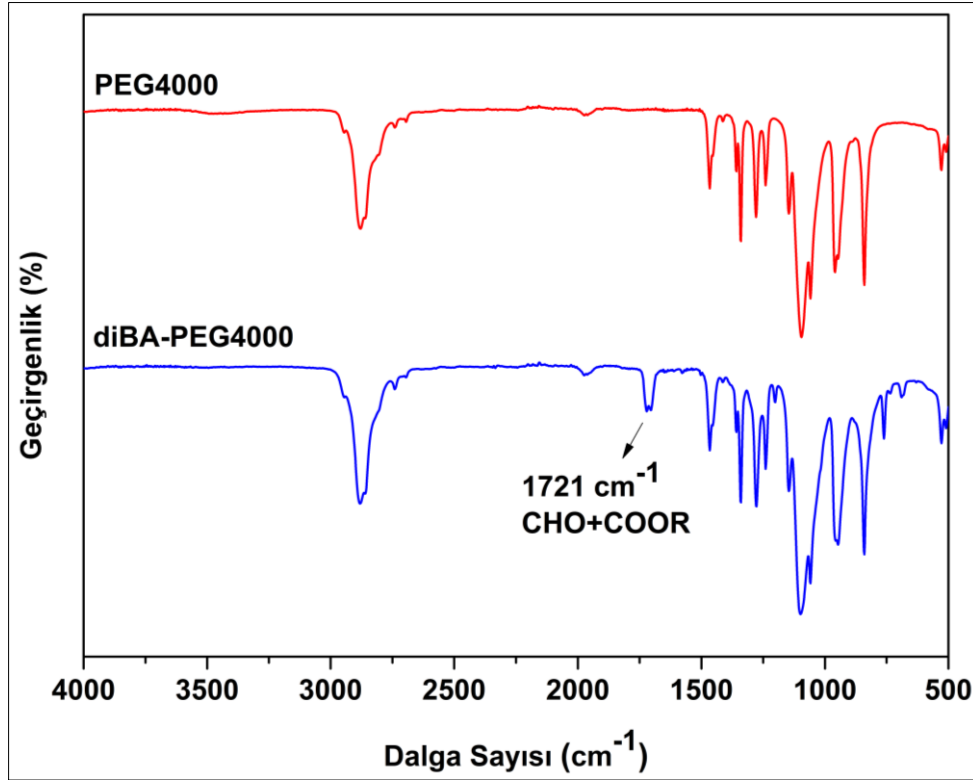
Şekil 4.2. PEG2000 ve diBA-PEG2000 Polimerlerine ait ATR-FTIR spektrumları

diBA-PEG4000 polimerine ait ^1H -NMR spektrumu ise Şekil 4.3’te verilmiştir. İlgili spektrum incelendiğinde 10,1 ppm’de aldehit protonu, 8,21 ve 7,95 ppm’de benzen halkalarına ait protonlar, 4,50 ppm’de ester metilen protonları ve 3,63 ppm’de eter metilen protonları görülmektedir. 8,21; 7,95; 4,50 ve 3,63 ppm deki piklerin integrasyon oranları 4/4/4/360 olup teorik olarak hesaplanan 4/4/4/352 integral oranlarına yakın değerde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. diBA-PEG4000 Polimerinin ¹H-NMR spektrumu (500 MHz, CDCl₃)

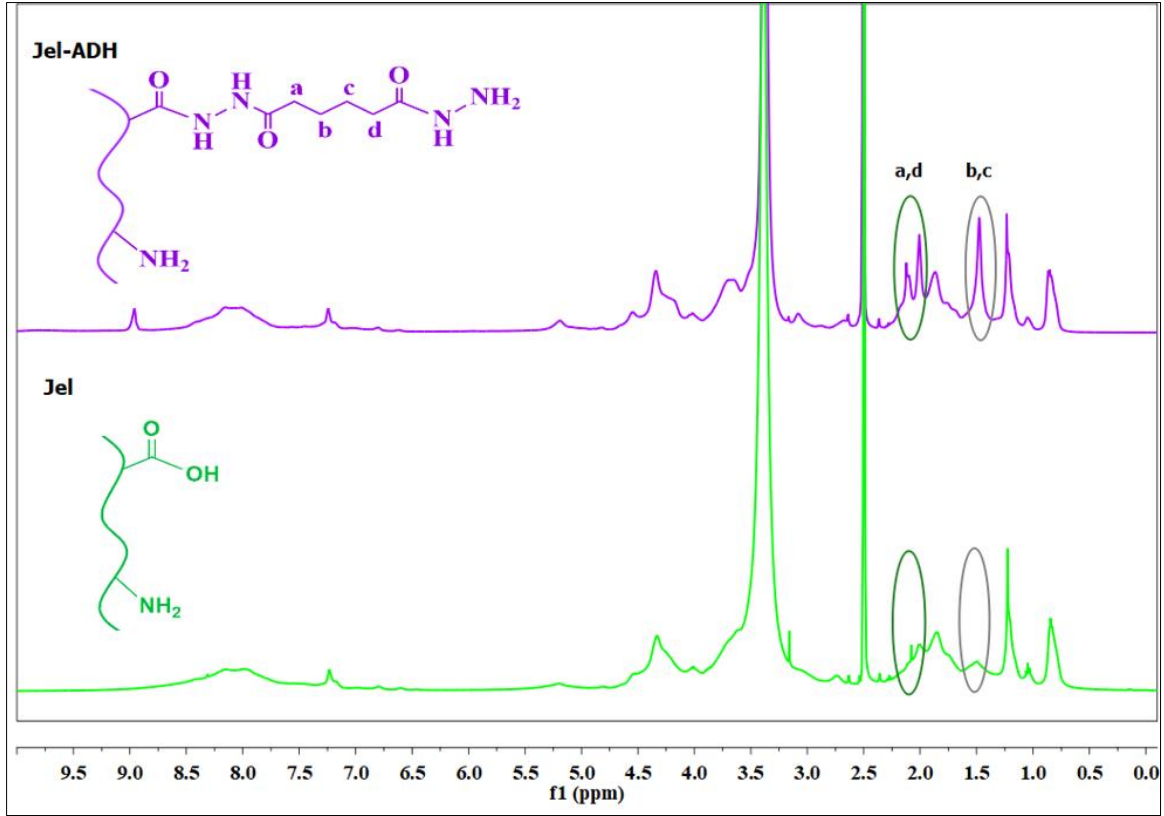
PEG4000 ve diBA-PEG4000 polimerlerine ait ATR-FTIR spektrumları ise Şekil 4.4'te verilmektedir. diBA-PEG4000 polimerine ait spektrum incelendiğinde aldehit ve ester C=O grubuna ait olan gerilme titreşim bandı 1721 cm⁻¹'de görülmektedir. Bu sonuçlar dibenzaldehyt fonksiyonlu diBA-PEG2000 ve diBA-PEG4000 polimerinin başarı ile sentezlendiğini göstermektedir [135].



Şekil 4.4. PEG4000 ve diBA-PEG4000 Polimerlerine ait ATR-FTIR spektrumları

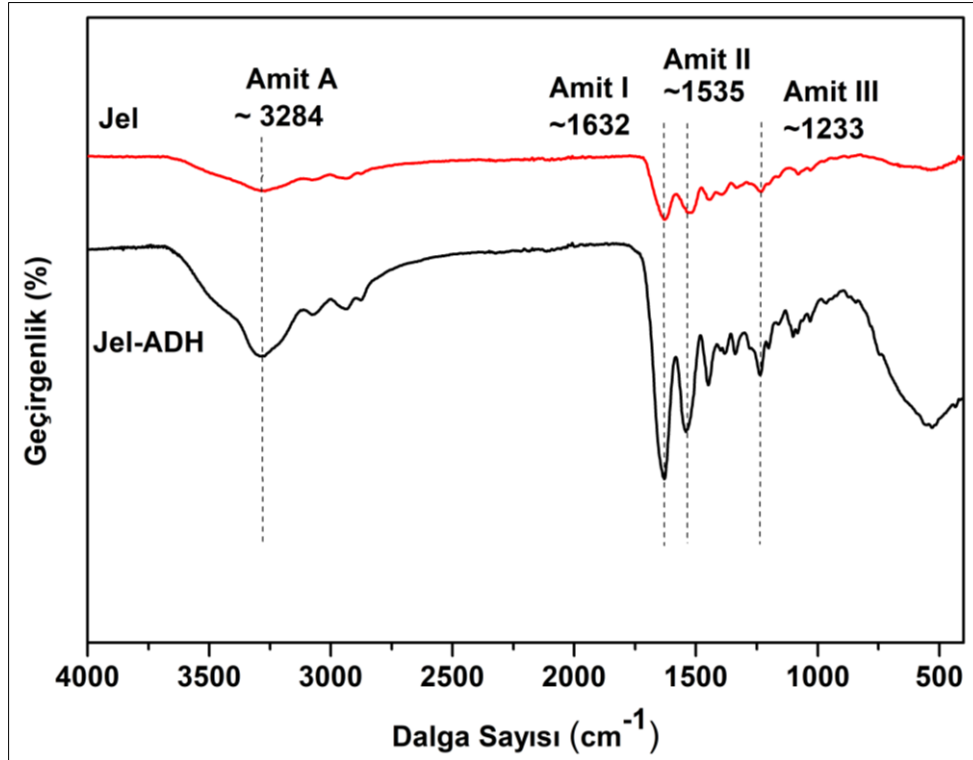
4.1.2. Jelatin Adipik asit dihidrazit (Jel-ADH) sentezi ve karakterizasyonu

Jel-ADH polimeri, jelatin polimeri ile adipik asit dihidrazit arasında 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) ve N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) varlığında amit bağı oluşması sonucu elde edilmiştir. Jel ve Jel-ADH polimerlerinin ^1H -NMR spektrumları Şekil 4.5'te bir arada verilmiştir. Jel polimerinin spektrumu incelendiğinde alanin C_βH_3 , pirolin C_βH_2 , valin $\text{C}_\gamma\text{H}_3$ ve lösin $\text{C}_\delta\text{H}_3$ protonlarına ait karakteristik pikler sırasıyla 1,5 ppm, 1,23 ppm ve 0,85 ppm'de görülmektedir. Jel-ADH polimerinin spektrumu, Jel polimeri ile karşılaştırıldığında ise 1,5 ppm'deki pik integrasyonunun adipik dihidrazitin metilen protonuna $[-\text{NHNHCOCH}_2\text{CH}_2-]$ bağlı olarak arttığı görülmektedir [136]. Ayrıca 2,12 ppm'de görülen yeni pik de jelatin polimerinin adipik asit dihidrazit ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir [137].



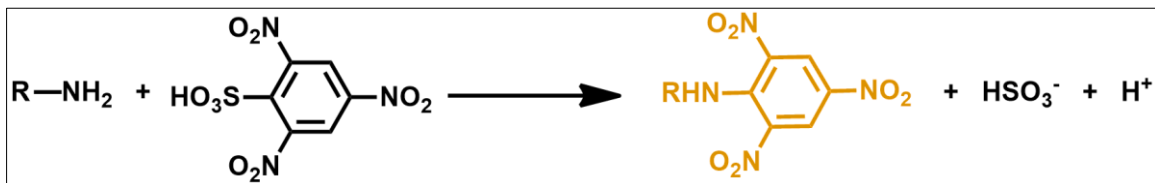
Şekil 4.5. Jel ve Jel-ADH polimerlerinin ¹H-NMR spektrumları (500 MHz, DMSO-d₆)

Şekil 4.6'da ise Jel ve Jel-ADH polimerlerinin bir arada verilen ATR-FTIR spektrumları görülmektedir. İlgili spektrum incelendiğinde, jelatin polimerinin 3284 cm⁻¹ (amit A, N-H gerilme titreşimi), 1632 cm⁻¹ (amit I, C=O gerilme titreşimi), 1535 cm⁻¹ (amit II, N-H eğilme titreşimi), 1233 cm⁻¹'de (amit III, N-H eğilme titreşimi) karakteristik bandları görülmektedir. Jelatin polimerinin adipik asit dihidrazit ile modifiye edilmesinden elde edilen Jel-ADH polimerine ait spektrumda da benzer bandlar görülmekte olup daha fazla amit bağı oluşumuna sahip amino gruplarının band şiddetlerini artırdığı görülmektedir. Bu sonuçlar sentezin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir [80, 138].



Şekil 4.6. Jel ve Jel-ADH Polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları

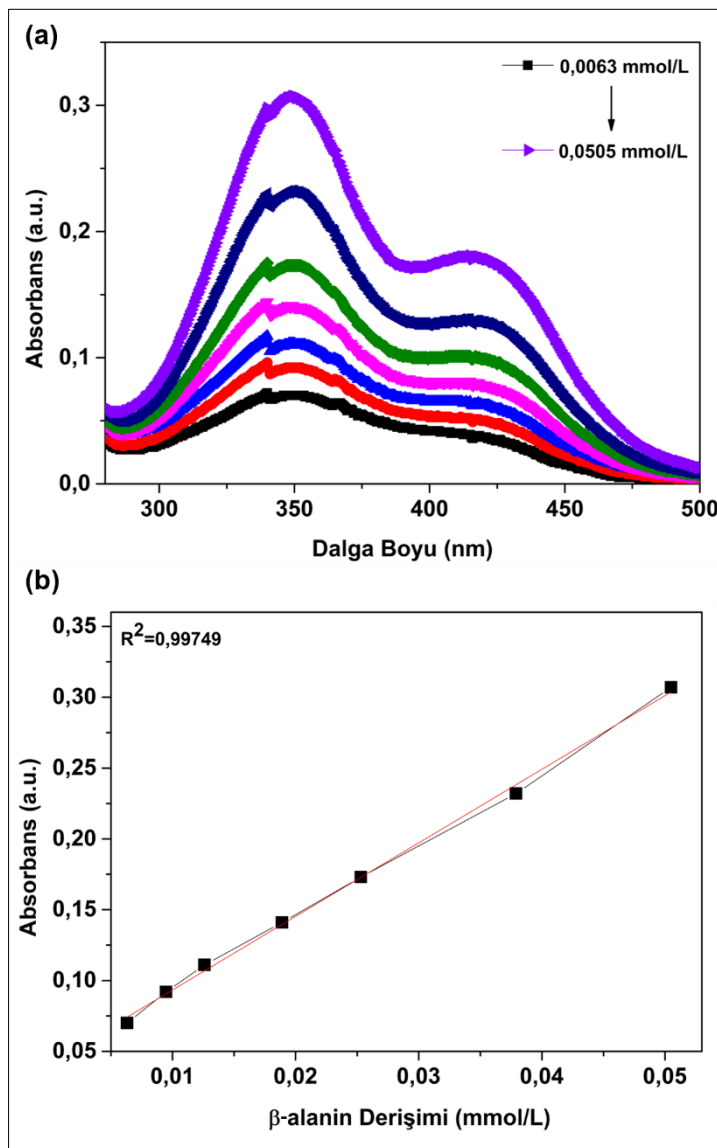
Kimyasal yapısı $^1\text{H-NMR}$ ve ATR-FTIR ile aydınlatılan jelatin polimeri üzerindeki hidrazitin (Jel-ADH) modifikasyon derecesinin belirlenmesi için TNBS testi yapılmıştır. Bilindiği gibi TNBS testi yapıdaki primer amin gruplarının kantitatif miktarının belirlenmesi için yapılmaktadır. Bu test ile, yapıdaki primer amin gruplarının TNBS reaktifi ile oluşturduğu turuncu renkli kompleksin (Şekil 4.7) absorbands değeri UV-vis spektrofotometresi ile ölçülür ve çizilen kalibrasyon eğrisi ile yapıdaki amin gruplarının miktarı belirlenebilir [139].



Şekil 4.7. Primer amin grubu içeren molekülün TNBS ile reaksiyonun şematik gösterimi

Bu amaçla jelatin polimerinin sahip olduğu karboksi gruplarının hidrazit türevi bileşik ile modifiye edilmesi sonucu artan primer amin gruplarının TNBS ile reaksiyon vermesinden yararlanılarak modifikasyon derecesi hesaplanmıştır. Bu kapsamda farklı derişimlerde hazırlanan β -alaninin çözeltilerinin TNBS ile reaksiyon vermesinden yararlanılarak bir

kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Bunun için öncelikle şekil 4.8 (a)'da görüldüğü gibi farklı derişimlerde β -alanin zeltilerinin TNBS ile oluşturduğu rnlerin UV spektrumları alınmış ve ilgili spektrumda 349 nm'deki spesifik absorbens değerleri okunarak şekil 4.8 (b)'de verilen kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Oluşturulan kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak Jel polimeri ve Jel-ADH polimeri üzerindeki amin gruplarının miktarı belirlenmiş ve modifikasyon yüzdesi Eş.3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Jelatin polimerindeki karboksil gruplarının $\sim 43\%$ 'nn hidrazit grupları ile yer değiştirdiği belirlenmiştir.



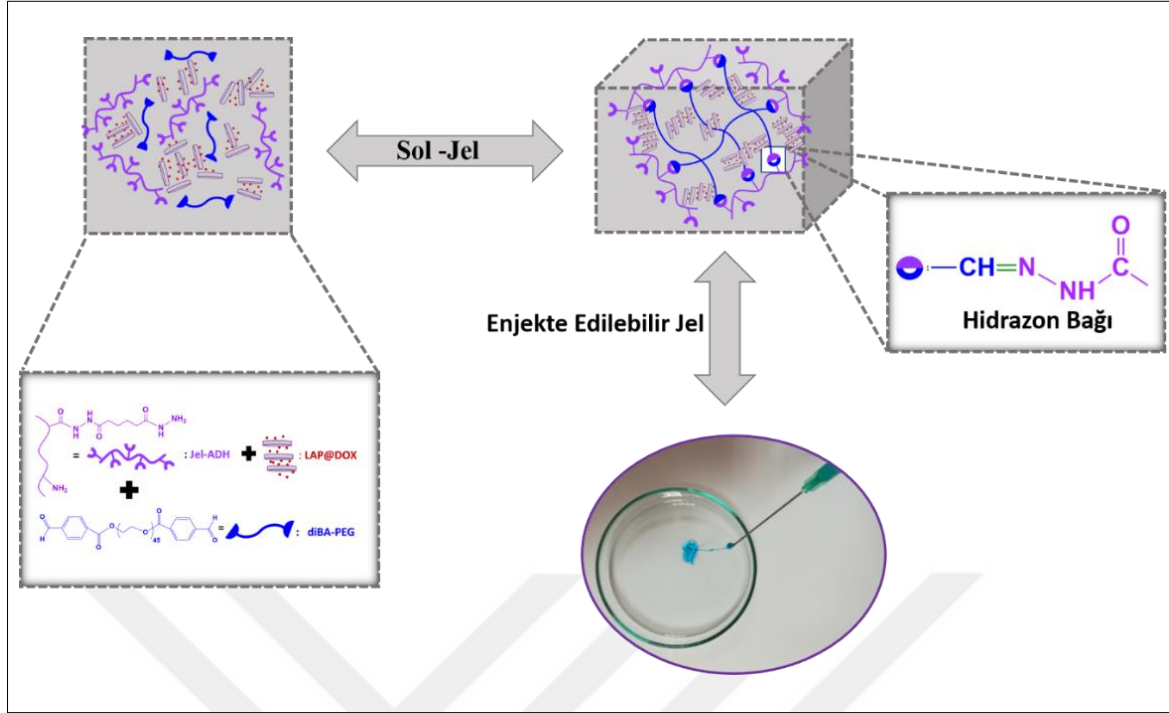
şekil 4.8. TNBS testi sonucu; β -alanin'in (a) UV spektrumu (b) kalibrasyon grafiği

4.2. Hidrojel Oluşumu ve Jelleşme Süresi Optimizasyonu

Hidrojeller fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanma yöntemleri ile oluşturulabilmektedir. Kimyasal çapraz bağlanma yöntemleri ile oluşturulan hidrojellerin fiziksel yöntemlerle oluşturulan jellere göre mekanik özellikleri daha güçlü olmasına rağmen kimyasal yöntemle oluşturulan hidrojel sentezinde toksik çapraz bağlayıcılar ve çözücüler kullanılmaktadır.

Son zamanlarda toksik çapraz bağlayıcılara gerek kalmadan jel oluşumunda jel öncül bileşenleri arasında gerçekleşecek kendiliğinden çapraz bağlanma reaksiyonları kullanılmaktadır [140]. Bu kapsamda jel öncül bileşenleri arasında gerçekleşecek kendiliğinden çapraz bağlanmalarda; disülfid bağı, Micheal katılması, enzimatik reaksiyon ve Schiff bazı (imin, hidrazon, oksim) gibi reaksiyon yöntemleri kullanılmaktadır [14, 141-143]. Bu yöntemler arasında, özellikle Schiff bazı reaksiyonu ile oluşturulan hidrojeller kolay oluşturulabilmeleri, kendi kendini iyileştirebilme, *in-situ*/enjekte edilebilme özellikleri ve pH duyarlı sol-jel geçişine sahip olmaları gibi pek çok üstün özelliğe sahiptir [144]. Bu nedenle enjekte edilebilir jellerin hazırlanmasında diğer yöntemlere kıyasla daha çok tercih edilen bir çapraz bağlanma yöntemi olarak öne çıkmaktadır.

Bu noktadan hareketle, bu tez çalışması kapsamında Jel-ADH/diBA-PEG hidrojel, Jel-ADH polimerindeki hidrazit fonksiyonel grupları ile diBA-PEG polimerindeki aldehit fonksiyonel gruplarının bir tür Schiff bazı reaksiyonu olan hidrazon bağı ile çapraz bağlanması sonucu oluşturulmuştur (Resim 4.1).

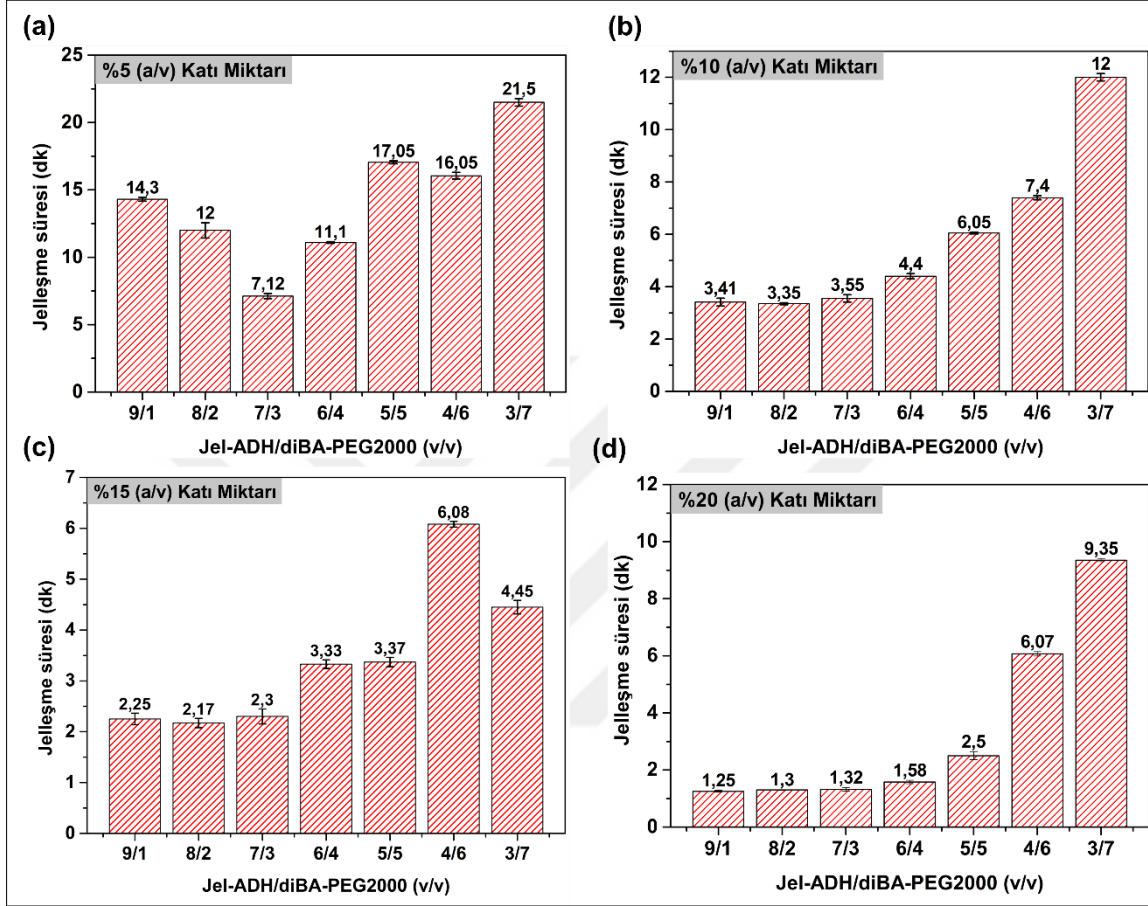


Resim 4.1. Hidrojel oluşum mekanizması şematik gösterimi

Klinik uygulamalar için enjekte edilebilir hidrojel biyomalzeme setlerinin hazırlanmasında özellikle de ilaç gibi biyoaktif moleküllerin lokal olarak uygulanabilmesinde jelleşme süresi oldukça önemli bir faktördür [145]. Uygun bir *in-situ* (lokal olarak yerinde) jelleşebilen enjekte edilebilir hidrojeli oluşturan polimer çözeltileri kolaylıkla çözelti halinde enjekte edilip, enjekte edildiği yerde hızlıca çapraz bağlanıp jelleşebilme özelliğine sahip olmalıdır [146]. Bu nedenle uygun bir *in-situ* enjekte edilebilir jel hazırlanmasında jelleşme süresi oldukça önemlidir. Daha önce de ifade edildiği gibi jeli oluşturan öncül bileşenlerin enjekte edildiği yerde difüze olmadan jelleşebilmesi için jelleşmenin hızlı olması istenmektedir. Ancak jeli oluşturan öncüllerin enjekte edilirken jelleşip enjektörü tıkamaması da gerekmektedir.

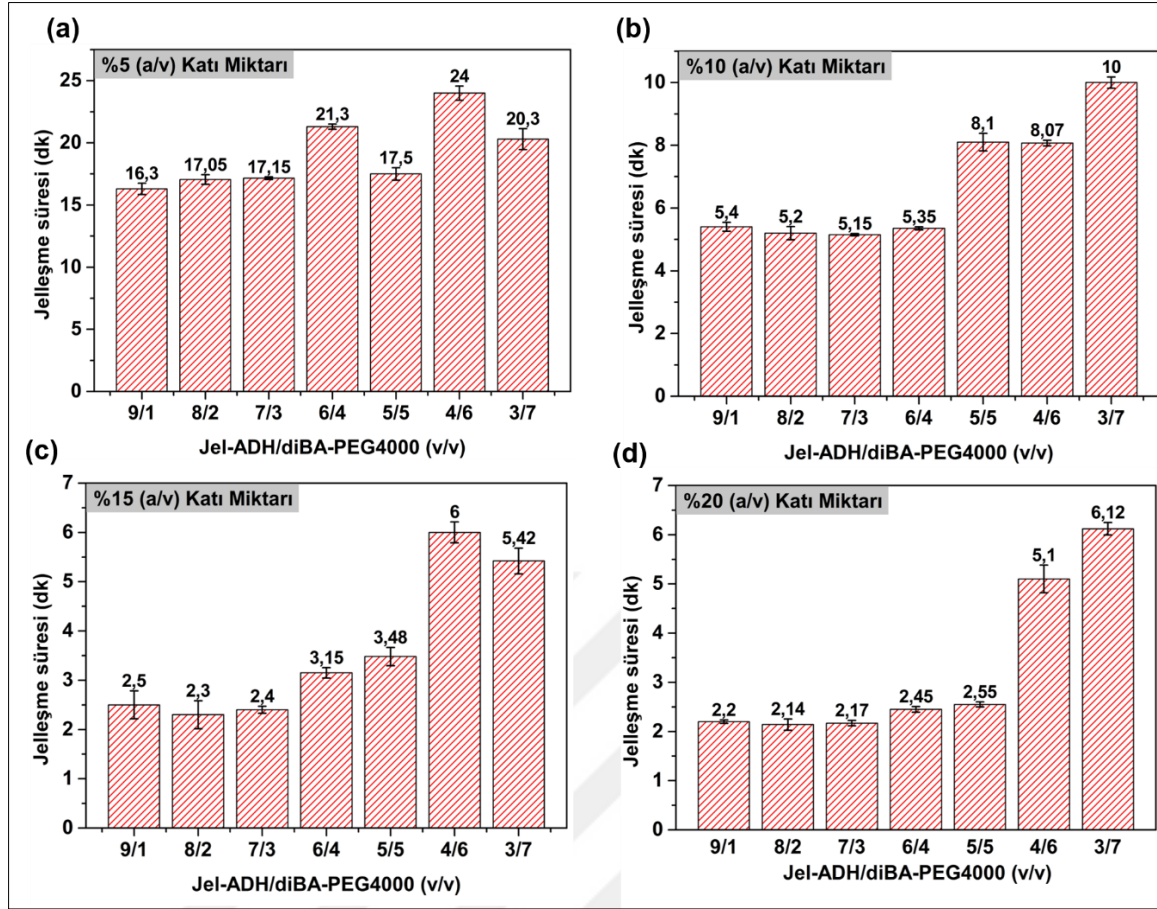
Bu amaçla, öncelikle katı miktarı oranının ve jel öncül polimerlerinin hacim oranının jelleşme süresine etkisi incelenmiştir. Katı miktarı oranı (%5, 10, 15 ve 20 (a/v)) ve bileşenlerin hacim oranı (9/1; 8/2; 7/3; 6/4; 5/5; 4/6; 3/7 (v/v)) değiştirilerek Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojellerinin jelleşme süreleri optimize edilmiştir. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da katı miktarı oranının ve hacim oranının sırasıyla Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojellerinin jelleşme sürelerine etkisi gösterilmektedir. Katı miktarı oranı %5'ten %20'ye (a/v) artırıldığında bütün hacimlerde jelleşme süresinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Jel öncül

polimerleri Jel-ADH ve diBA-PEG2000 polimerlerinin 8/2 hacminde karıştırılmasıyla Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojel için %5'lik katı miktarı oranında jelleşme süresi 12 dk iken %20 (a/v)'lik katı miktarı oranında 90 sn'ye azalmaktadır.



Şekil 4.9. Farklı katı miktarı oranında bileşenlerin hacmine bağlı olarak Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojellerinin jelleşme süresi (a) %5 (a/v), (b) %10 (a/v), (c) %15 (a/v), (d) %20 (a/v)

Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojelinde ise (Jel-ADH ve diBA-PEG4000 polimerlerinin 8/2 hacminde karıştırılmasıyla) %5'lik (a/v) katı miktarı oranında jelleşme süresi 17,05 dk iken %20 (a/v)'lik katı madde oranında 2,14 dk'ya kadar azaldığı görülmektedir (Şekil 4.10). Bu sonuçlara göre katı miktarı oranının artması birim hacme düşen reaktif grup sayısını ve çapraz bağlanma olasılığını artırdığı için jelleşme prosesini hızlandırarak jelleşme süresinin azalmasını sağlamaktadır [147].



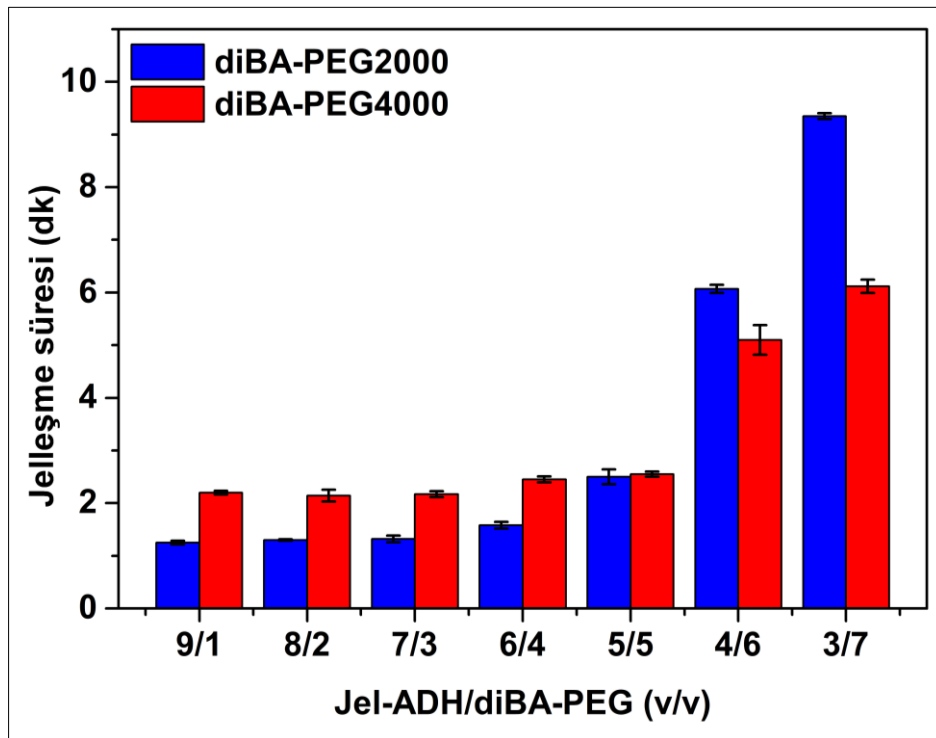
Şekil 4.10. Farklı katı miktarı oranında bileşenlerin hacmine bağlı olarak Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojenlerinin jelleşme süresi (a) %5 (a/v), (b) %10 (a/v), (c) %15 (a/v), (d) %20 (a/v)

Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojenlerinin bileşenlerinin (%5, %10, %15, %20 (a/v)) aynı konsantrasyonlarda farklı hacim oranlarında (9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7) hazırlanması ile oluşan jellerde ise jelleşme süresi değişkenlik göstermektedir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bu sonuçlara göre aynı konsantrasyonlarda farklı hacimlerde hazırlanan jellerde $-CHO$ ve $-NH_2$ oranlarının farklı olmasının her iki jelde de jelleşme süresini etkileyebileceği görülmektedir [148].

4.2.1. diBA-PEG2000 ve diBA-PEG4000 polimerleri ile hazırlanan hidrojenlerinin jelleşme sürelerinin karşılaştırılması

Jel-ADH, diBA-PEG2000 veya diBA-PEG4000 ve polimerlerinin %20 (a/v) derişimde farklı hacimlerde (9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7) karıştırılması ile oluşan Jel-ADH/diBAPEG hidrojenlerinin jelleşme süresi Şekil 4.11'de gösterilmektedir. diBA-PEG4000 ve diBA-PEG2000 polimerleri ile oluşturulan hidrojenlerinde jelleşme süresi

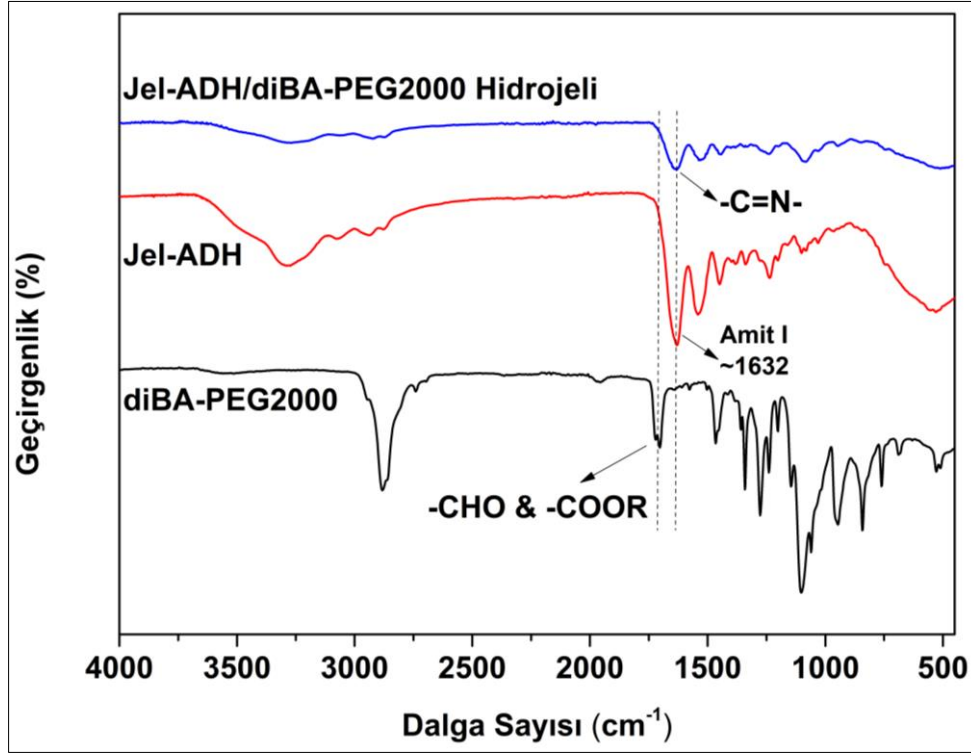
hacim 9/1'den 4/6'ya kadar Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelinde daha kısa olduğu görülmektedir. Jel öncül polimerlerinin hacim oranı 4/6 veya 3/7 olduğunda ise jelleşme süresinin Jel-ADH/diBA-PEG4000 polimerinde daha kısa olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar daha kısa zincirler içeren diBA-PEG2000 polimerinin, hidrojel kompozisyonunda artan Jel-ADH polimeri oranı ile daha kolay çapraz bağlanabilme özelliği gösterebileceğini, azalan Jel-ADH polimeri oranında ise çapraz bağlayıcının zincir uzunluğunun artmasının jel oluşumunu hızlandırarak jelleşme süresini kısaltabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.11. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG4000 hidrojellerinin %20 katı miktarı farklı hacim oranlarında jelleşme süreleri

%20'lik katı miktarı ve 9/1 (Jel-ADH:diBA-PEG) (v/v)) hacim oranında hazırlanan Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelinin diBA-PEG4000 ile hazırlanan hidrojele kıyasla daha hızlı jelleşme özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle bu tez kapsamında enjekte edilebilir jel sisteminin sentezlenmesinde diBA-PEG2000 kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte, %20'lik katı miktarı ve 9/1 (Jel-ADH/diBA-PEG2000) (v/v)) hacim oranında hazırlanan Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeli hızlı jelleşme özelliğine sahip olmasına rağmen enjekte edilemeyecek kadar katı bir özelliğe sahiptir. Bu nedenle %15'lik katı miktarı ve 8/2 (Jel-ADH:diBA-PEG) (v/v)) hacim oranında hazırlanan ve 137 sn

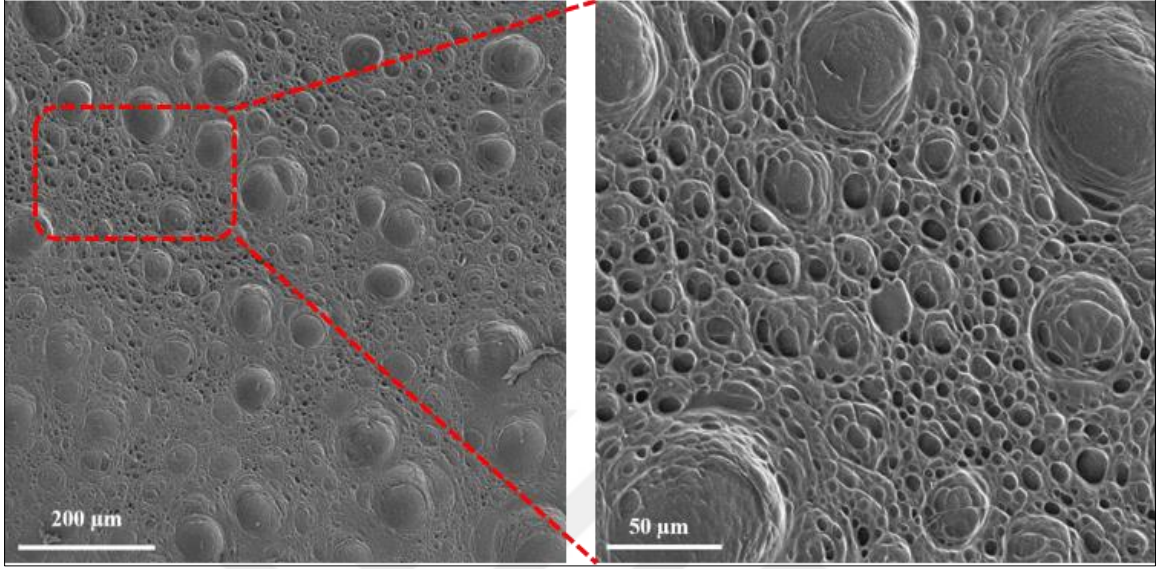
jelleşme süresine sahip Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelı enjekte edilebilir hibrit jel sisteminin sentezlenmesi için ilerleyen deneylerde kullanılmıştır. Jelleşme süresi optimize edilen Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelının kimyasal yapısı ATR-FTIR ile karakterize edilmiştir.



Şekil 4.12. Jel-ADH/diBA-PEG2000 Hidrojeli ve hidrojel öncül polimerlerinin ATR-FTIR spektrumları

Şekil 4.12’de verilen Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelı ve hidrojel öncül polimerlerinin karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde diBA-PEG2000 polimerinin aldehit ve ester karbonil grubunun gerilme titreşimlerine ait 1721 cm^{-1} ’de görülen bandın, hidrojele ait spektrumda kaybolduğu görülmektedir. Hidrojel oluşumunu gösteren C=N bağına ait gerilme titreşim bandının ise Jel-ADH polimerinin 1632 cm^{-1} ’de görülen amit I bandı ile örtüştüğü görülmektedir [149]. Bu sonuçlarla hidrojel oluşumu kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelının morfolojisi ise SEM analizi ile incelenmiştir (Resim 4.2). Resim 4.2’de verilen SEM görüntüsünde Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelının birbirine bağlı küçük gözeneklerden oluştuğu ve gözenek boyutunun 2 ile $16\text{ }\mu\text{m}$ arasında değiştiği görülmektedir. Gözenekler arasında oluşan ara bağlantılar ise Jel-ADH ve diBA-PEG2000 polimerlerinin çapraz bağlanması sonucu bir ağ yapısının oluştuğunu göstermektedir. Hidrojeldeki küçük ve sık gözenek boyutunun gözlenmesinde

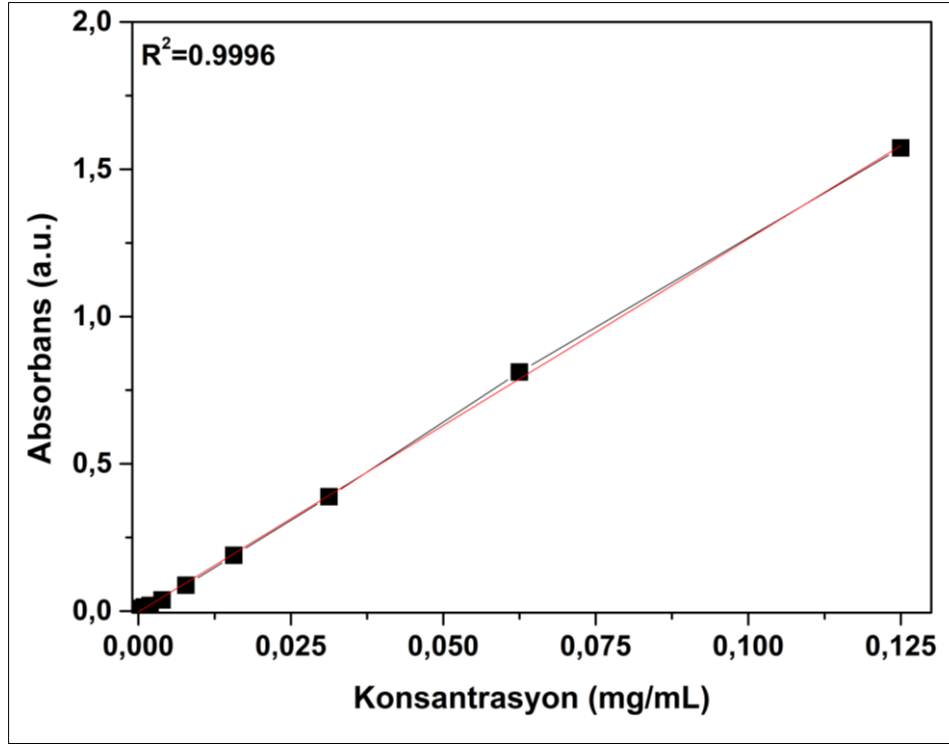
düşük mol kütleli çapraz bağlayıcı görevi gören diBA-PEG polimerinin etken olabileceği düşünülmektedir [150, 151].



Resim 4.2. Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri

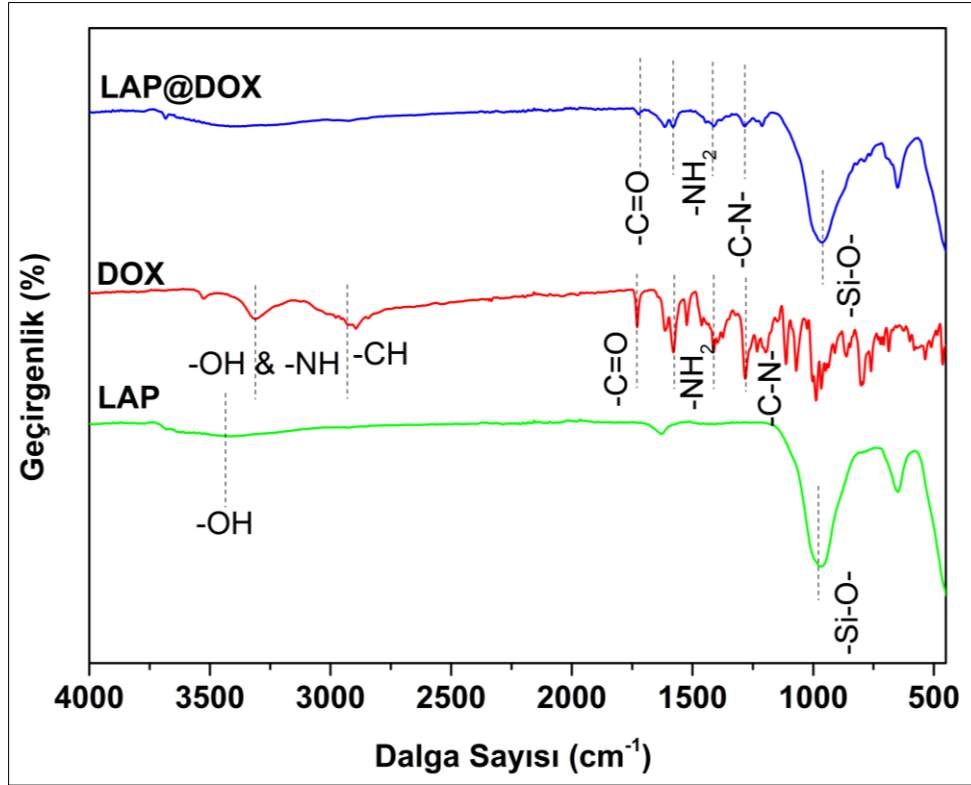
4.3. Laponit Kiline DOX İlacı Yükleme ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hibrit Hidrojellerinin Sentezi

Bu çalışmada, meme kanseri tedavisi için uzun süreli kontrollü salım yapabilen pH duyarlı kendi kendini iyileştirebilen enjekte edilebilir hibrit hidrojelilerin hazırlanması hedeflenmiştir. Bu kapsamda uzun süreli bir kontrollü salım için antikanser ilacı DOX LAP kiline yüklenmiştir. LAP kiline yüklenen DOX miktarının ve etkinliğinin hesaplanabilmesi için öncelikle farklı derişim aralıklarında DOX çözeltilerinin UV spektrumları alınmış ve DOX'a ait 480 nm'deki spesifik absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Şekil 4.13'de DOX'un farklı konsantrasyonları için oluşturulan kalibrasyon grafiği verilmiştir. İlgili kalibrasyon grafiğinden korelasyon katsayısı (R^2) 0,9996 olarak bulunmuştur. Oluşturulan bu kalibrasyon grafiği, Eş. 3.2 ve Eş. 3.3 kullanılarak LAP kiline DOX yükleme kapasitesi $\%24,6 \pm 0,04$ ve yükleme etkinliği $\%98,5 \pm 0,16$ olarak hesaplanmıştır. LAP'in iki boyutlu disk şeklindeki tabakalı yapısından dolayı DOX ilacı yüksek yükleme etkinliği ile başarılı bir şekilde yüklenmiştir [127, 152].



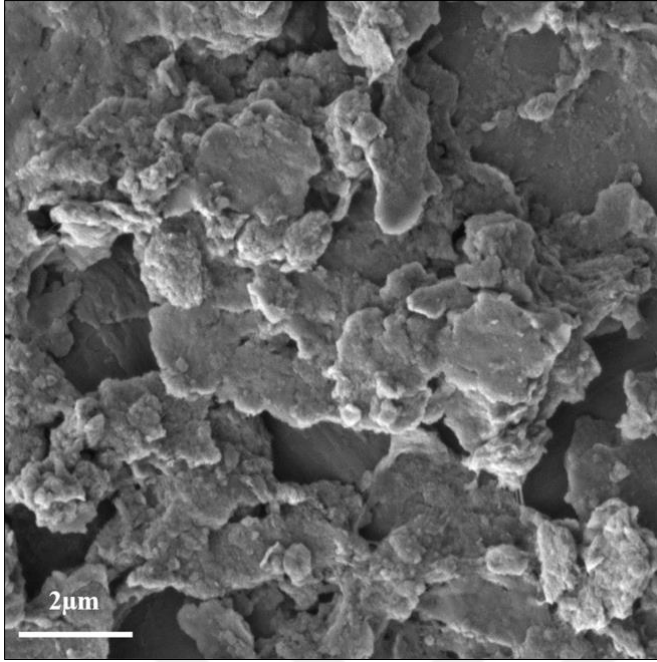
Şekil 4.13. DOX kalibrasyon grafiği

DOX yüklü LAP@DOX nanokilinin kimyasal yapısının aydınlatılabilmesi için LAP, DOX ve LAP@DOX nanokilinin ATR-FTIR spektrumları alınarak Şekil 4.14'te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Şekil 4.14'te LAP'ın spektrumu incelendiğinde 3437 ve 974 cm^{-1} 'deki bandların sırasıyla LAP'ın -OH eğilme ve Si-O gerilme titreşimlerine ait olduğu görülmektedir. DOX ilacına ait ilgili spektrum incelendiğinde ise; 3310 cm^{-1} 'deki bandın örtüşen -OH ve -NH gerilme titreşimlerine, 2924 cm^{-1} 'deki bandın -CH gerilme titreşimlerine, 1730 cm^{-1} 'deki bandın C=O grubuna, 1580 cm^{-1} ve 1412 cm^{-1} 'deki bandların sırasıyla -NH₂ grubunun aromatik halka ve C-H bağı üzerindeki eğilme titreşimlerine, 1282 cm^{-1} 'deki bandın C-N gerilme titreşimine ait olduğu görülmektedir [127]. LAP@DOX nanokilinin ATR-FTIR spektrumunda ise LAP kilinin spektrumdan farklı olarak DOX'a ait olan karakteristik bandlar görülmektedir. ATR-FTIR spektrumu sonuçlarına göre DOX ilacı LAP nanokiline başarı ile yüklenmiştir.



Şekil 4.14. LAP, DOX ve LAP@DOX kilinin ATR-FTIR spektrumları

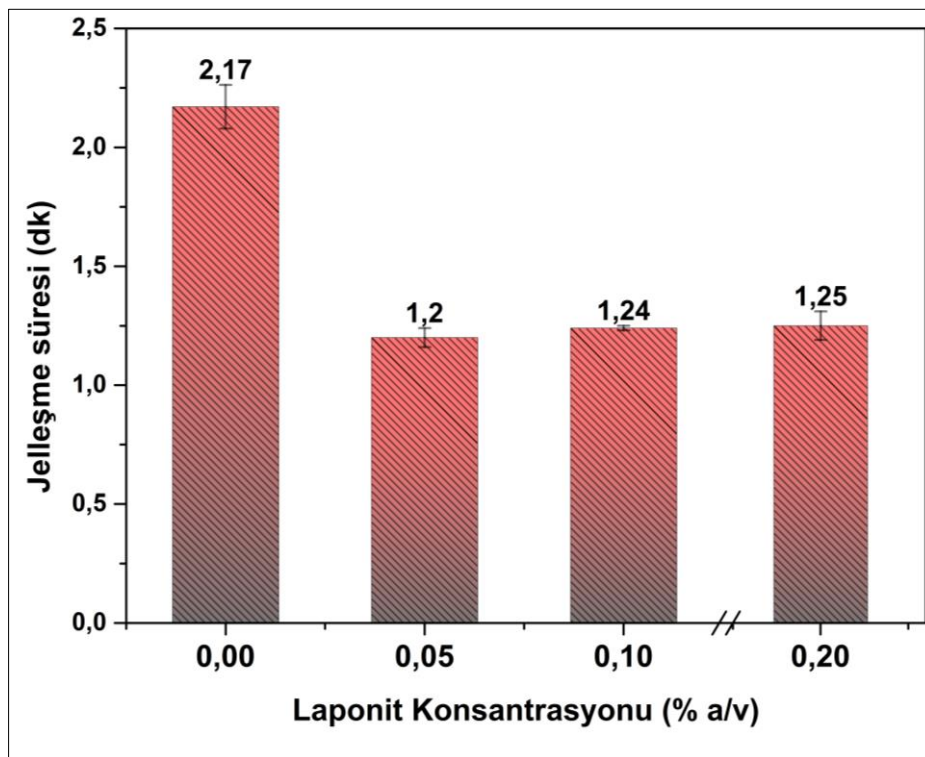
Resim 4.3'te ise DOX yüklü LAP kilinin SEM görüntüsü verilmiştir. SEM görüntüsünde disk şeklindeki nanotabakaların görüntüsünün LAP'in literatürde bulunan SEM görüntüleri ile uyumlu olduğu görülmektedir [117, 153]. Ayrıca LAP kiline DOX yüklemesinden sonra LAP kilinin zeta potansiyel değerinin $-26,5 \pm 1,57$ 'dan $-12,2 \pm 0,95$ mV'a değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuç DOX'un bir kısmının LAP kili yüzeyine hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim ile adsorplanabileceğini ve LAP'in yüzey potansiyelini değiştirebileceğini göstermektedir [152]. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda DOX'un LAP kiline başarılı bir şekilde yüklendiği gösterilmiştir.



Resim 4.3. DOX yüklü LAP nanokillerinin SEM görüntüsü

Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojel i se %0,05 (w/v); %0,1 (w/v); ve %0,2 (w/v) LAP kili içerecek şekilde hazırlanmış ve jelleşme süresi optimizasyon çalışması yapılmıştır. Şekil 4.15'te hidrojel kompozisyonundaki LAP konsantrasyonuna bağlı olarak jelleşme süresi verilmiştir. %15 (w/v) katı miktarı içeren hacimce 8/2 oranında hazırlanan Jel-ADH/diBA-PEG hidrojelinin jelleşme süresi 2,17dk iken %0,05 (a/v); %0,1 (a/v); ve %0,2 (a/v) laponit kili içeren Jel-ADH /diBA-PEG/LAP hibrit hidrojellerinin jelleşme süreleri sırasıyla 1,20; 1,24 ve 1,25 dk olarak belirlenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG hidrojeline laponit kilinin entegre edilmesi ile jelleşme sürelerinin azaldığı ve LAP konsantrasyonun artmasıyla beraber jelleşme süresinin çok az değiştiği görülmektedir. Literatürde rapor edilen çalışmalar incelendiğinde LAP kilinin hidrojellerde çapraz bağlayıcı olarak kullanılabildiği ve jelleşme süresini etkiledikleri görülmüştür [154-156]. LAP nanosilikatlar (LAP, $\text{Na}^{+}_{0.7}[(\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0.7}$), disk şeklindeki nano ölçekli kristallerden oluşan iki boyutlu (2D) sentetik nanomateryaller olup ortalama 25–30 nm çapında ve yaklaşık 1 nm kalınlığındadır. Disk şeklindeki nano ölçekli kristallerin yüzeyleri negatif yüklü iken, kenarları pozitif yüklüdür. Bu özelliklerinden dolayı anyonik, katyonik ve nötral polimerler ile fiziksel çapraz bağlı yapılar oluşturabilmektedir [157]. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin hazırlanmasında kullanılan Jel-ADH polimeri ile LAP arasında oluşabilecek hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerinde jelleşme süresini kısaltabileceği öngörülmektedir [20, 120, 154]. Ayrıca hidrojelde artan LAP

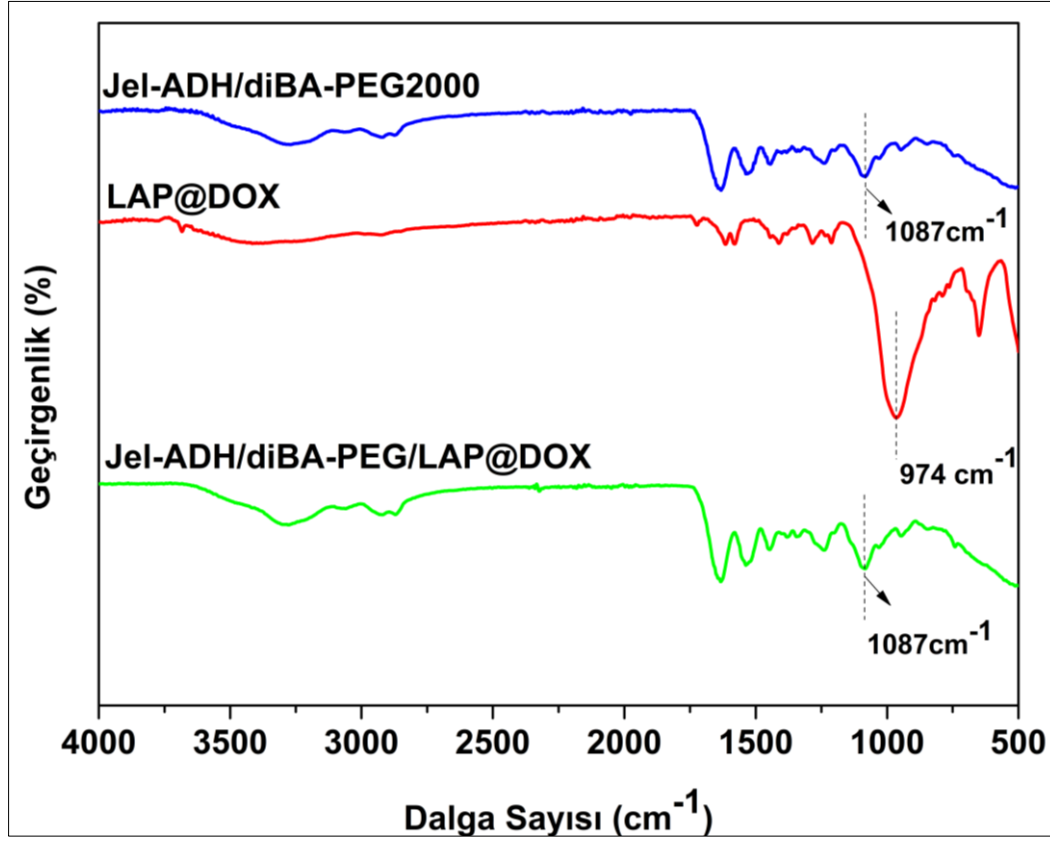
konsantrasyonu ile birlikte jelleşme süresinde az da olsa artışların gözlenmesinin sebebi LAP'ın agregasyonuna bağlı olarak çapraz bağlanmanın az da olsa engellendiği düşünülmektedir [158]. Enjekte edilebilir jel sisteminin hazırlanmasında jelleşme süresi önemli bir parametre olmasından dolayı en hızlı jelleşme süresine sahip 0,05 %(w/v) LAP içeren hidrojel ilerleyen deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Hibrit hidrojellerde optimum bileşenin belirlenmesinden sonra Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin çapraz bağlanma etkinliği TNBS testi ile (Eş. 3.4) kullanılarak yaklaşık $55 \pm 0,73$ hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin LAP konsantrasyonuna bağlı jelleşme süreleri

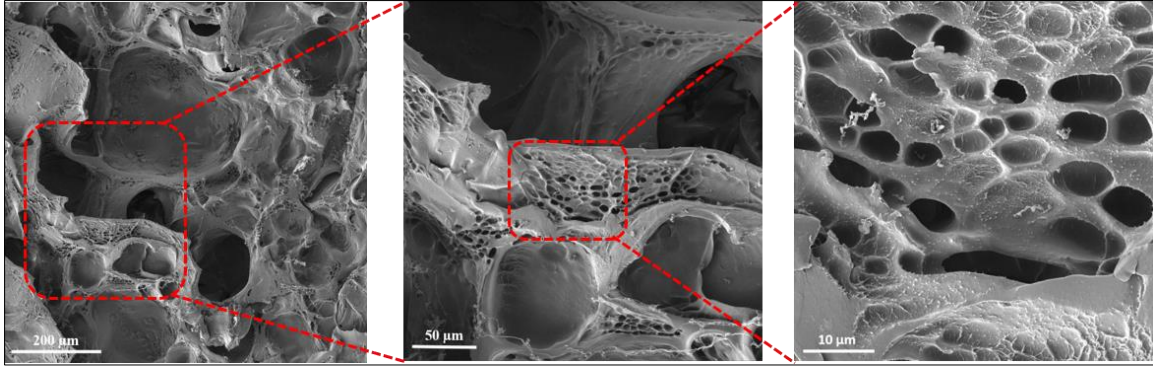
Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit jelinin kimyasal yapısı ATR-FTIR ile aydınlatılmış olup Şekil 4.16'da Jel-ADH/diBA-PEG2000, LAP@DOX ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hidrojellerinin ATR-FTIR spektrumu bir arada verilmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit jelinin spektrumu incelendiğinde, Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline göre 1087 cm^{-1} 'deki band şiddetinin LAP'ın entegrasyonundan sonra arttığı görülmekte olup bu bandın şiddetinin artmasının LAP'ın Si-O gerilme titreşimlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit jelinin spektrumunda 1087 cm^{-1} 'de görülen Si-O gerilme titreşimine ait olan bandın LAP

spektrumunda 974 cm^{-1} 'de görülen Si-O bandına göre kayması ise Jel-ADH ile laponit arasındaki moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [159]. Bu sonuç, laponit nanodiskinin, polimer zincirlerinin daha fazla çapraz bağlanması için fiziksel çapraz bağlayıcı görevi gördüğünü de doğrulamaktadır [158].



Şekil 4.16. Jel-ADH/diBA-PEG2000, LAP@DOX ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hidrojenlerinin ATR-FTIR spektrumu

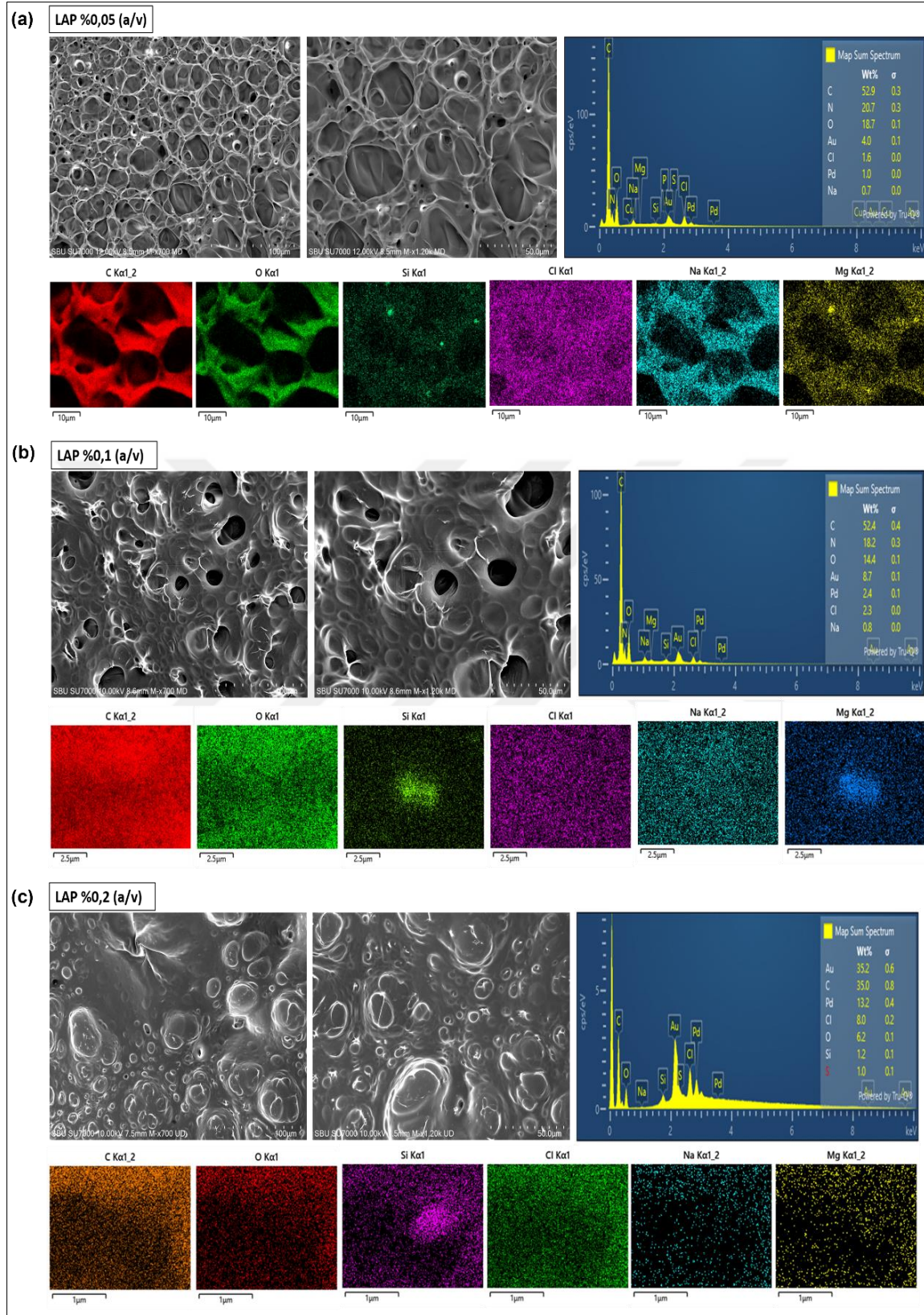
Sentezlenen Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojenlerinin morfolojileri SEM analizi ile karakterize edilmiştir (Resim 4.4). Jel-ADH/diBA-PEG2000 (Bkz. Resim 4.2) hidrojeninden farklı olarak (%0,05 (a/v) LAP@DOX) içeren Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojeninde daha büyük gözenek oluşumlarının yanı sıra bu büyük gözeneklerin içinde daha küçük gözeneklerin olduğu görülmektedir. Hibrit hidrojenelde (%0,05 (a/v) LAP@DOX) gözenek hacmindeki artışın LAP nanodisklerinin lokal yoğunlaşması sonucu olduğu düşünülmektedir [160].



Resim 4.4. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojelinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde de, Ianchis ve arkadaşları tarafından kil ile modifiye polimetakrilik asit nanokompozit hidrojelinin mikro yapısında polimetakrilik asit hidrojeline göre daha büyük gözenekler ve bu büyük gözeneklerin içinde daha küçük gözeneklerin olduğu gözlemlenmiştir [161]. Xavier ve arkadaşları tarafından rapor edilen başka bir çalışmada ise jelatin metakrilat ve LAP ile oluşturulan nanokompozit hidrojelinde jelatin hidrojeline göre daha büyük gözeneklere sahip olduğu gözlemlenmiştir [160]. Buna göre sunulan tez kapsamında hazırlanan hibrit jelin morfolojisinin literatürle uyumlu olduğu söylenebilir.

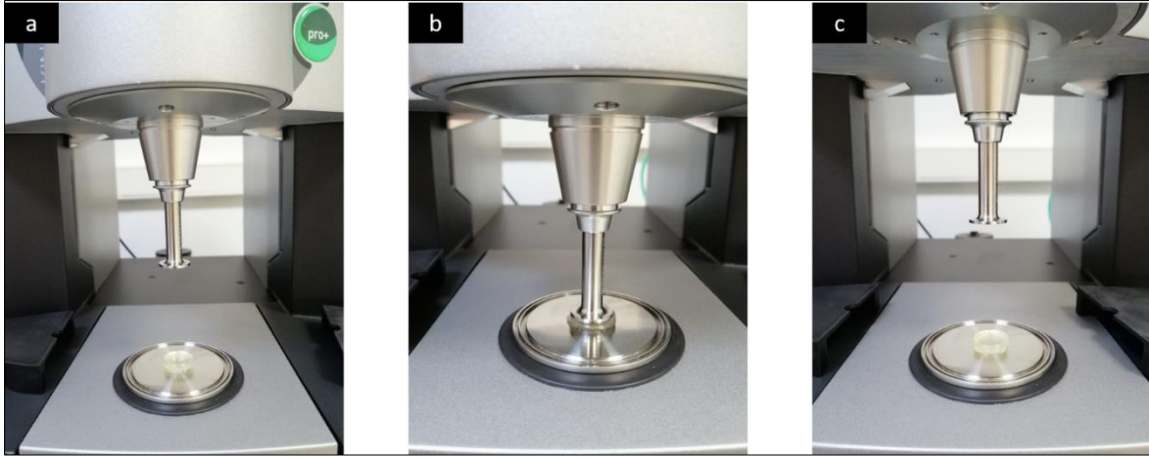
Ayrıca hidrojel ağındaki LAP miktarının artırılmasıyla hibrit hidrojellerin morfolojilerindeki değişiklikler SEM-EDX analizi ile belirlenmiştir. (Resim 4.5). Hibrit hidrojeldeki LAP konsantrasyonunun %0,05 (a/v)'ten %0,1 (a/v)'e artırılmasıyla hidrojeldeki ortalama gözenek çapının küçüldüğü, LAP konsantrasyonunun %0,2 (a/v)'ye artırılmasıyla beraber ise gözeneklerin kaybolduğu görülmektedir. Li ve arkadaşları da jelatin hidrojelinde laponit miktarının artırılması ile gözenek boyutunun azaldığını raporlamışlardır [162]. EDX sonuçlarında ise hibrit hidrojeldeki LAP nanodisk yapısında bulunan Silisyum (Si) ve Magnezyum (Mg) elementleri ve DOX antikanser ilacının yapısında bulunan Klor (Cl) elementi görülmektedir. Ayrıca EDX sonucunda hibrit hidrojeldeki artan LAP konsantrasyonu (%0,05; %0,1; %0,2 (a/v)) ile Si elementinin oranının arttığı da görülmektedir (Bkz. Resim 4.5).



Resim 4.5. Farklı konsantrasyonlarda LAP içeren Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit jellerinin farklı büyütme ölçeklerinde SEM görüntüleri ve EDX analizi (a) %0,05 (a/v), (b) %0,1 (a/v), (c) %0,2 (a/v)

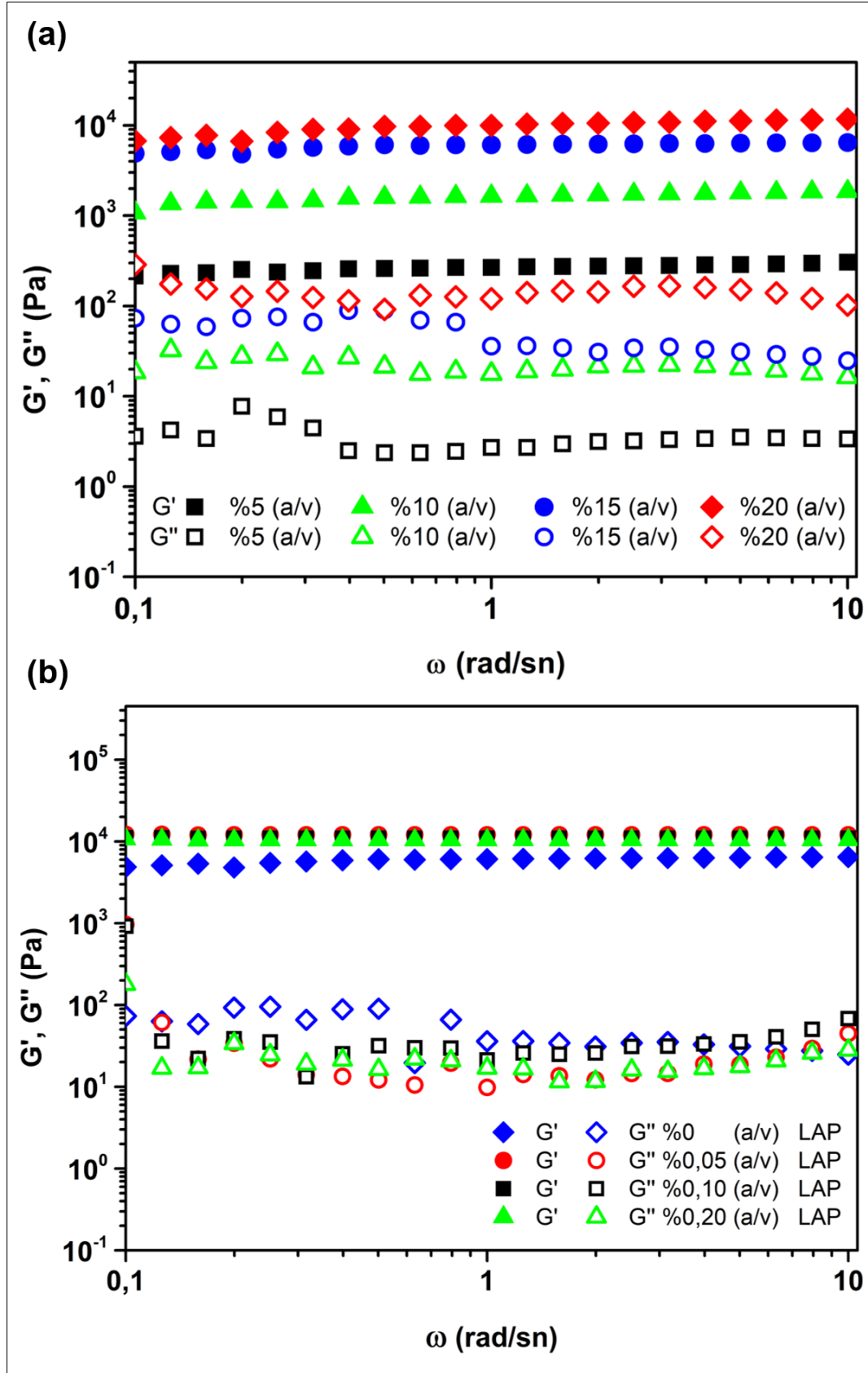
4.4. Hidrojellerin Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Enjekte edilebilir hidrojellerin mekanik dayanımı lokal ilaç salım sistemleri için önemli bir faktördür. Antikanser ilaçların lokal uygulanması için kullanılan hidrojellerin mekanik dayanımı tümör dokusunun elastik modülü ile uyumlu olmalıdır [8]. Rapor edilen çalışmalarda kanserli meme dokularının elastik modülünün sağlıklı meme dokusundan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Sağlıklı meme dokusunun elastik modülü 3,25 kPa iken kanserli meme dokularında 10 ile 40 kPa aralığında ölçülmüştür [163]. Bu amaçla sentezlenen hidrojellerin mekanik özellikleri reolojik ölçümler ile tespit edilmiştir (Resim 4.6). Öncelikle Jel-ADH/diBA-PEG hidrojellerinin vizkoelastik özellikleri belirli gerinimde ($\gamma=0,5$) frekans taramasına (ω) karşı depo modülü (G') ve kayıp modülü (G'') değişiminin izlenmesiyle belirlenmiştir (Şekil 4.17). Şekil 4.17 (a)'da jel öncül polimerlerinin Jel-ADH/diBA-PEG2000 (8/2) hacim oranında karıştırılmasıyla oluşturulan farklı katı miktarlarındaki hidrojellerin (%5, %10, %15, %20 (a/v)) frekans tarama eğrileri gösterilmektedir. Bütün frekans tarama aralığında (0,1-10 rad/sn) hidrojellerde depo modülüs değerleri kayıp modülüs değerlerinden yüksek olup bu sonuçlar üç boyutlu çapraz bağlanan hidrojellerin kararlı ve viskoelastik katı gibi davrandığını göstermektedir [135]. Katı miktarı %5 (a/v) olan hidrojelde 10 rad/s frekansta G' değeri 0,304 kPa iken %10, %15, %20 (a/v) olan hidrojellerde bu değerler sırasıyla 1,85; 6,4; 11,7 kPa olup katı madde miktarı attıkça artış göstermektedir. En yüksek katı miktarına sahip olan hidrojelde (%20 (a/v)) çapraz bağlanma miktarı fazla olmasından kaynaklı mekanik dayanımının yüksek olduğu düşünülmektedir [140]. Ancak %20 (a/v) katı içeriğine sahip hidrojel hızlı jelleşme özelliği ve iyi mekanik dayanım göstermesine rağmen, enjekte edilemeyecek kadar sert olmasından dolayı optimum hidrojel bileşimi, 6,4 kPa elastik modülü (G') ve 137 sn jelleşme süresi ile %15 (a/v) katı içeriğine sahip hidrojel seçilmiştir.



Resim 4.6. %0,05 (a/v) LAP içeren hibrit hidrojinin a) başlangıç görüntüsü, b) frekans taraması analizi öncesi görüntüsü, c) frekans taraması analizi sonrası görüntüsü

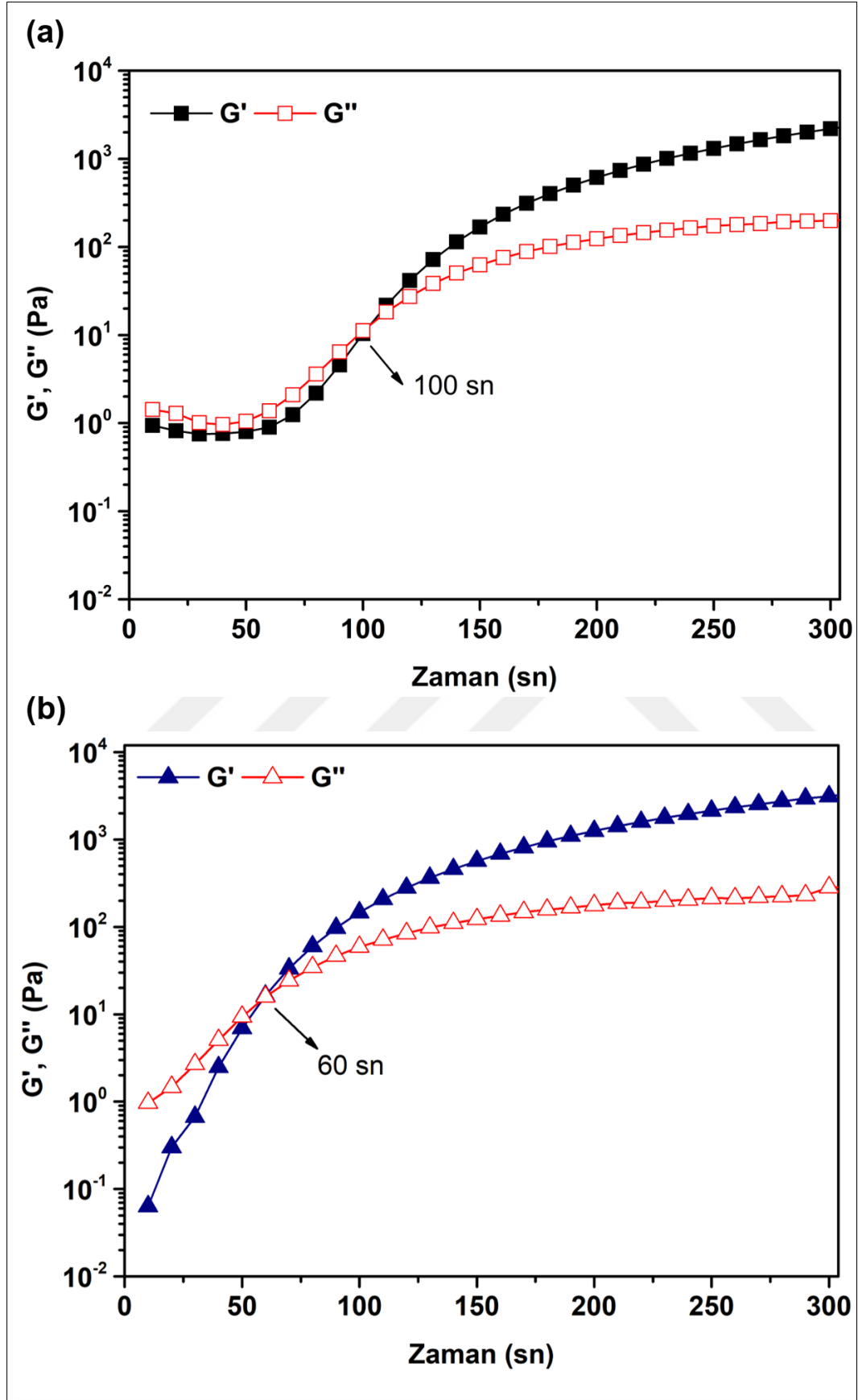
LAP kilinin hidrojinin mekanik dayanımına etkisi ise hibrit hidrojinlerin belirli gerinimde ($\gamma=0,5$) frekans taramasına (ω) karşı depo modülü (G') ve kayıp modülü (G'') değişiminin izlenmesiyle belirlenmiştir. Şekil 4.17 (b)'de %0; %0,05; %0,1 ve %0,2 (a/v) oranında LAP kili içeren hidrojinler için frekans tarama eğrileri gösterilmektedir. Bütün frekans tarama aralığında (0,1-10 rad/sn) hidrojinlerde G' değerleri G'' değerlerinden yüksektir. Bu sonuç hidrojinlerin viskoz bir polimer çözeltisi yerine elastik davranışı sergilediğini göstermektedir [164]. Ayrıca Jel-ADH/diBA-PEG/LAP içeren hidrojinlerin depolama modüllerinin Jel-ADH/diBA-PEG hidrojininin depolama modülünden büyük olduğu görülmektedir. LAP kilinin hidrojele eklenmesi Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojininin depolama modülünü Jel-ADH/diBA-PEG hidrojinine göre; 0.05% (a/v) LAP konsantrasyonunda yaklaşık 2 kata kadar artırarak 12 kPa'a kadar arttığı görülmektedir. Bu sonuç ise LAP'ın hidrojeldeki çapraz bağlanmayı güçlendirdiğini göstermektedir [164, 165]. Ancak yüksek derişimde LAP ($>0.05\%$ (a/v)) laponit kullanıldığı zaman depolama modülünün bir miktar azaldığı görülmektedir. Bunun ise hidrojeldeki LAP'ın agregasyonundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [158]. Reolojik olarak elde edilen mekanik dayanım sonuçlarına göre %0,05 (a/v) LAP içeren hibrit hidrojel ilerleyen deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 4.17. (a) Farklı katı miktarlarına sahip Jel-ADH /diBA-PEG hidrojellerinin (b) farklı konsantrasyonlarda LAP içeren Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojellerinin %0,5 gerinim ve 37°C'de frekans taramaları

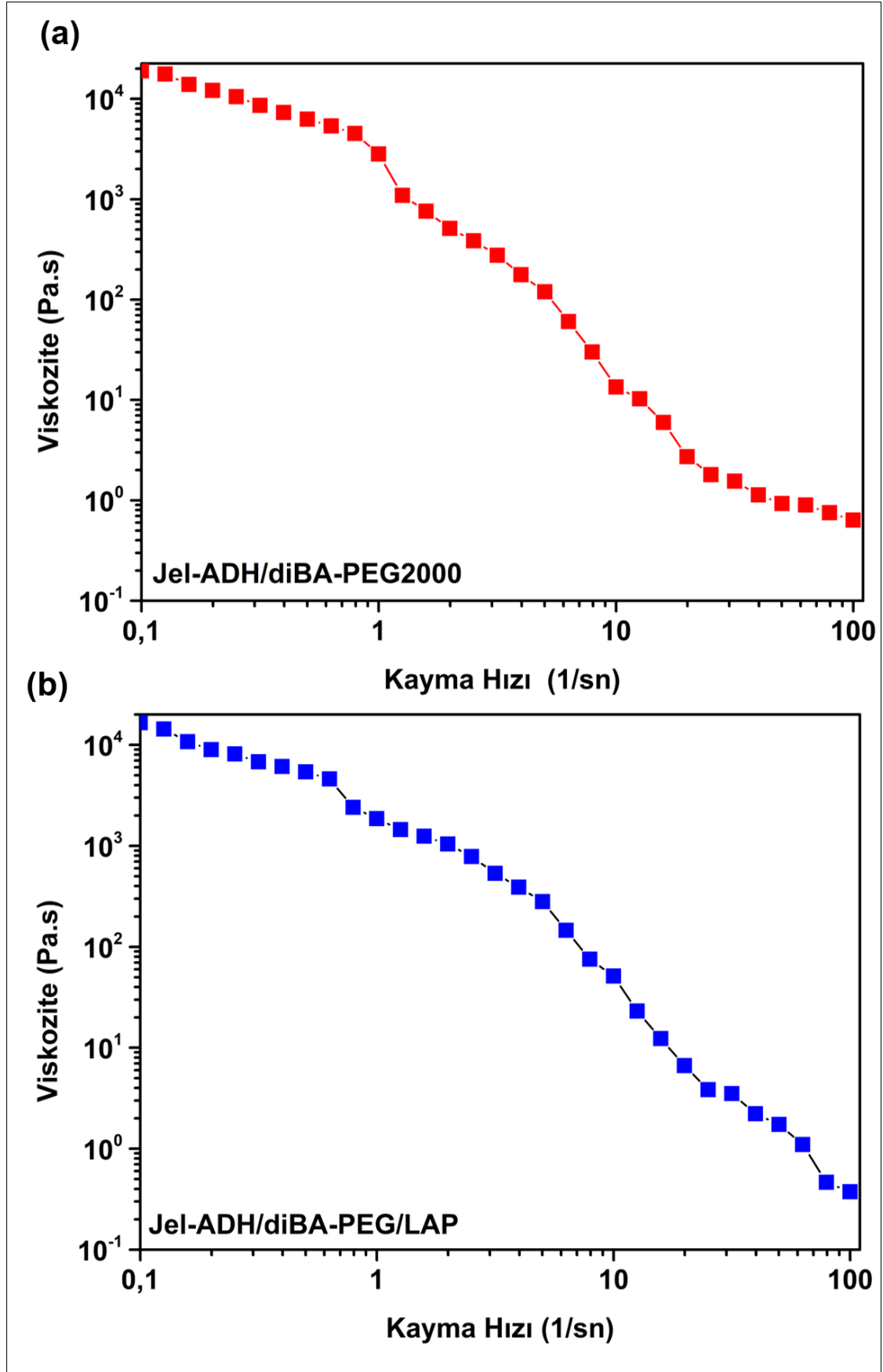
Makroskopik ölçekte jelleşme süresinin belirlenmesinin yanı sıra mikroskopik düzeyde jelleşme süresinin tayin edilmesi için reolojik yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla hidrojellerin zamana bağlı olarak G' ve G'' modülüs değerleri ölçülmüştür.

Şekil 4.18'de Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin zamana karşı G' ve G'' değerlerinin reolojik olarak ölçümü verilmiştir. G' ve G'' zamanla artarken belli bir bölgede kesişmektedirler ve daha sonra G' değeri G'' değerinden daha büyük olmaktadır. G' ve G'' kesişme noktası hidrojel oluşumunu gösterirken kesişme noktasına karşılık gelen zaman ise reolojik olarak jelleşme süresini vermektedir [166]. Reolojik yöntemle belirlenen Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeli için jelleşme süresi 100 sn iken Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojeli için ise 60 sn olup makroskopik olarak belirlenen jelleşme sürelerine göre daha kısadır. Hidrojellerin makroskopik olarak jelleşme süreleri belirlenirken belli bir rpm de jel öncül polimerlerinin manyetik balık ile karıştırılıp oluşan jelin balığın etrafına tamamen sarıldığı nokta jelleşme süresi olarak kabul edilirken, mikroskopik reolojik ölçümlerde ise jelleşme süresinin belirlenmesinde jelleşmenin başladığı nokta jelleşme süresi olarak kabul edilmektedir [129, 167]. Bu nedenle reolojik olarak belirlenen jelleşme süresi manyetik balık yöntemine göre daha hızlı olmaktadır.



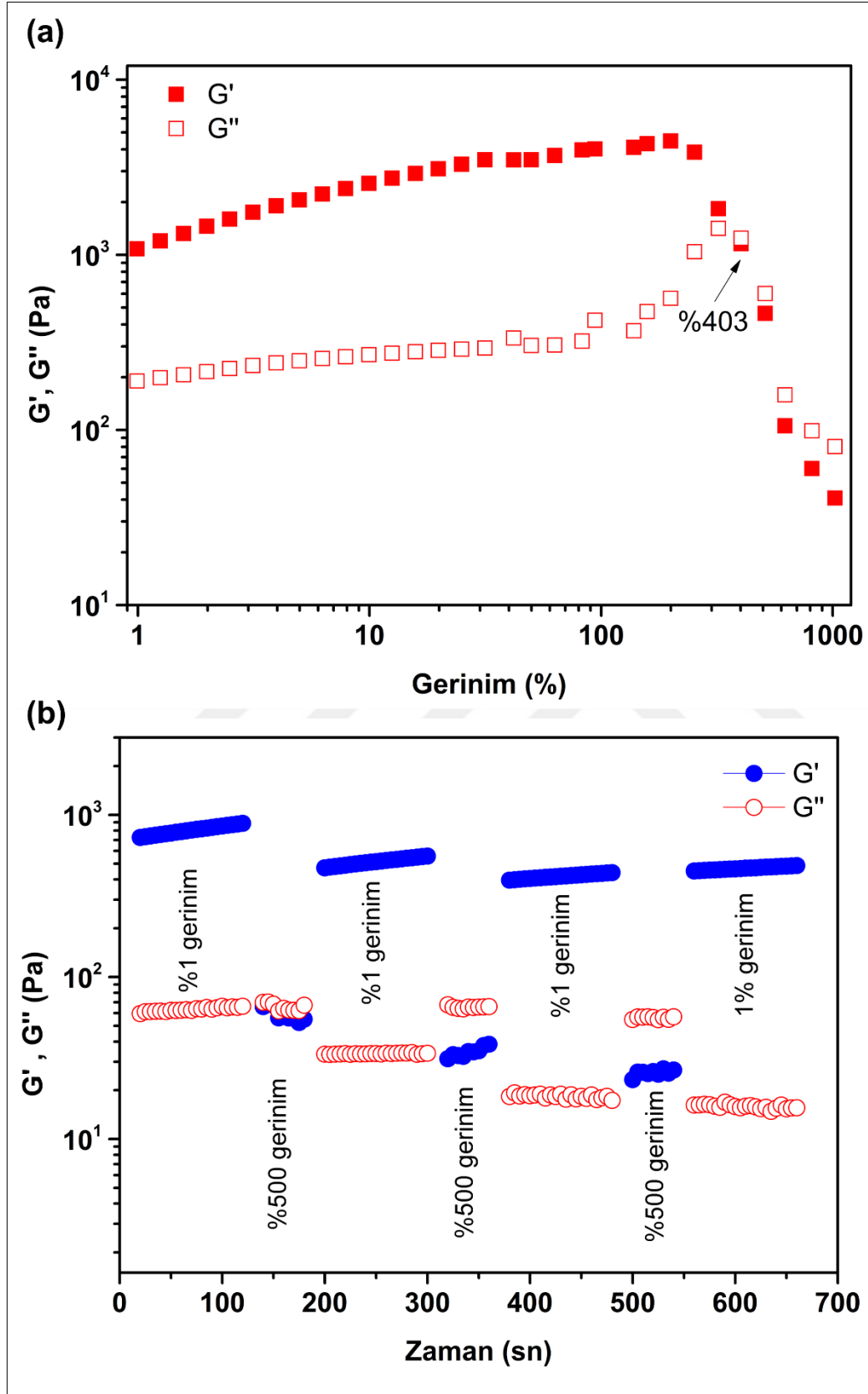
Şekil 4.18. Hidrojellerin depo/kayıp modülüs değerlerinin zamana bağlı değişimi (a) Jel-ADH/diBA-PEG2000 (b) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelleri

Jel-ADH/diBA-PEG ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojenlerinin kayma incelmesi ve enjekte edilebilirlik davranışlarını incelemek amacıyla belirli kayma hızı değerleri aralığında viskozite değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi artan kayma değerlerinde Jel-ADH/diBA-PEG (Şekil 4.19 (a)) ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP (Şekil 4.19 (b)) hidrojenlerinin viskozitesi azalmaktadır. Bu sonuç Jel-ADH/diBA-PEG ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojenlerinin kayma incelmesi davranışı sergilediğini ve enjekte edilebilirlik özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Kayma incelmesi özelliği önceden oluşturulan hidrojenin kayma gerilimi altında enjektörden akmasını sağlarken, kayma gerilimi ortadan kaldırıldığında hidrojenin tekrar jel özelliğini korumasını sağlamaktadır. Bu ise jelin *in-vivo* uygulanması açısından önemlidir [133]. Jel-ADH/diBA-PEG hidrojeninin kayma incelmesi özelliği göstermesinin yapısında bulunan dinamik tersinir hidrazon bağlarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [67]. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojeninde ise kayma incelmesi özelliğinin hem hidrazon bağları hem de LAP ve polimerler arasındaki adsorpsiyon/desorpsiyon dengesinin bozulmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Polimer zincirleri, LAP tabakaları arasında dinamik çapraz bağlayıcı görevi görmektedir. Kayma gerilimi uygulandığında ise, polimer zincirleri tamamen gerilirken tabakalar da kayma yönünde hizalanmaktadır. Kayma hızının artmasıyla polimerler ile LAP arasındaki adsorpsiyon/desorpsiyon dengesi bozulmakta ve polimer zincirleri ortamda serbestçe dolaşabilecek şekilde akışkan özellik gösterebilmektedir [168].



Şekil 4.19. Hidrojellerin viskozite ve kayma incelmesi davranışları a) Jel-ADH/diBA-PEG
b) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP

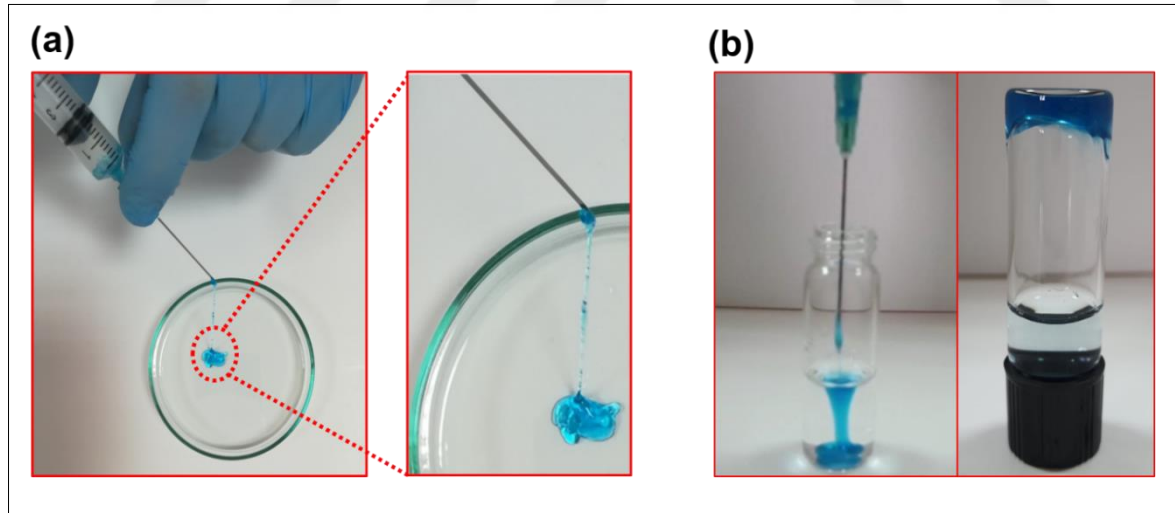
Ayrıca hibrit hidrojinin elastik davranışını ve kendi kendini iyileştirebilme özelliğini göstermek amacıyla reolojik geri kazanım testi yapılmıştır. Bu amaçla önce hibrit hidrojele gerinim tarama testi uygulanmıştır. Reolojik gerinim tarama testi sonucuna göre G' ve G'' değerleri yaklaşık %403 gerinimde kesişmektedir (Şekil 4.20 (a)). Bu, %403 gerinim üzerinde hidrojel oluşturarak dinamik hidrazon bağının bozulduğunu ve hidrojinin sol durumuna geçtiğini göstermektedir [166]. Ayrıca reolojik olarak jelin kendi kendini iyileştirebilme özelliğini göstermek amacıyla hibrit hidrojele 1 rad/sn sabit frekansta %1 ve %500 arasında değişen sürekli basamaklı bir gerinim uygulanmıştır (Şekil 4.20 (b)). Hidrojele düşük gerinim (%1, 120 sn) uygulandığında G'' değerinin G' değerinden küçük olduğu hidrojinin mekanik kararlılığını koruduğu görülmektedir. Yüksek gerinim (%500, 60 sn) uygulandığında ise G'' değerinin G' değerinden büyük olduğu hidrojinin mekanik kararlılığını koruyamadığı ve jel özelliğini yitirdiği görülmektedir. Tekrar düşük gerinim (%1, 120 sn) uygulandığında ise tekrar jel davranışı kazanmaktadır. Bu geri kazanım davranışının tersinir ve tekrarlanabilir döngü halinde olması hidrojel ağı içerisindeki hidrojen ve hidrazon bağlarının oluşumunun ve ayrışmasının dinamik olduğunu ve hidrojele kendi kendini iyileştirebilme özelliği kazandırdığını göstermektedir [13, 88].



Şekil 4.20. (a) 25°C’de sabit bir frekansta (1 rad/sn) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin gerinim taraması, (b) 1 rad/sn sabit frekansta Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin alternatif basamak gerinim taraması ($\gamma = \%1$ gerinimde 120 sn ve $\gamma = \%500$ gerinimde 60 sn her bir döngü)

4.5. Hibrit Hidrojelin Enjekte Edilebilirlik Kendi Kendi İyileştirme ve pH Duyarlılık Özelliklerinin İncelenmesi

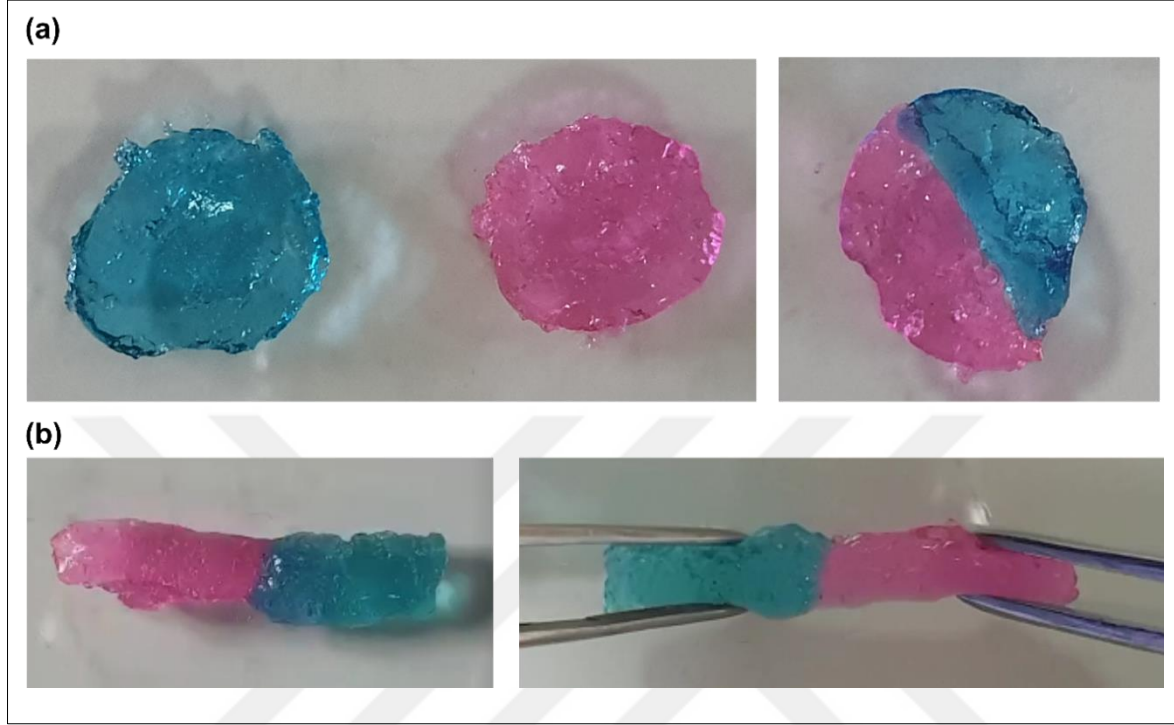
Hidrojellerin lokal kemoterapötik ilaç deposu olarak işlev görebilmesi ve ilaçların uygulanan lokal bölgede etkinliğinin artırılması için kendi kendini iyileştirebilme ve enjekte edilebilme özelliklerine sahip olmaları gerekmektedir. Kendi kendini iyileştirebilme ve enjekte edilebilme özelliklerine sahip hidrojeller ise dinamik kovalent bağ (hidrazon, Schiff bazı) ile çapraz bağlanan hidrojellerde görülmektedir [169, 170]. Bu amaçla, reolojik analizlerin yanı sıra makroskopik deneylerle de hibrit jelin enjekte edilebilme ve kendi kendini iyileştirme davranışları incelenmiştir. Resim 4.7 (a)'da görüldüğü gibi hibrit hidrojel 21-gauge iğneye sahip enjektörden enjekte edilebilmektedir ve enjekte edildikten sonra jel yapısını koruduğu görülmektedir. Ayrıca hibrit hidrojel *in-vivo* şartlar taklit edilerek 37°C'de PBS pH=7,4 içeren vialde enjekte edilmiştir ve 10 dk sonra vial ters çevrilmiş ve jelin yapısını koruduğu görülmüştür (Resim 4.7 (b)). Bu sonuçlara göre hibrit hidrojelin kayma incelmesi özelliği ile enjekte edilebildiği ve enjekte edildikten sonra kendi kendini iyileştirebilme özelliğinden dolayı jel yapısını koruduğu görülmektedir.



Resim 4.7. Hibrit hidrojelin enjekte edilebilirlik testi (a) Hibrit hidrojelin enjekte edilmesi (b) Hibrit hidrojelin PBS tamponuna enjekte edilmesi ve enjekte edildikten sonra hidrojin görüntüsü

Hibrit hidrojelin kendi kendini iyileştirebilme davranışını incelemek için MB ve RhB ile renklendirilmiş hibrit hidrojeller disk şeklinde kalıpta hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan farklı renkteki disk şeklindeki hidrojeller ikiye kesilerek farklı renkteki

hidrojeller birleştirilmiş 37°C’de bir saat inkübe edilmiştir ve farklı renkteki hidrojellerin dinamik bağ ile birbirine bağlandığı görülmüştür (Resim 4.8 (a)).

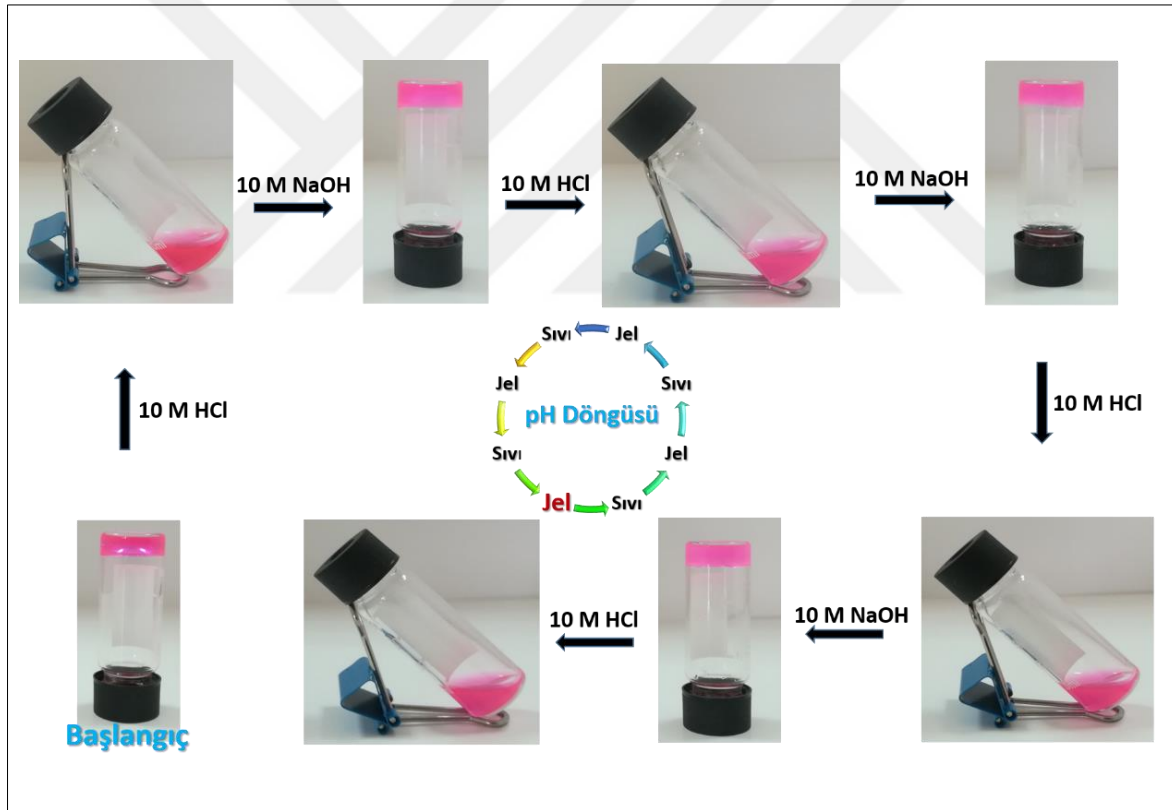


Resim 4.8. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin kendi kendini iyileştirme davranışının gösterilmesi (a) Farklı renklere hazırlanan hidrojelin iki yarı disk parçasının yeni kesilmiş yüzeylerden birleştirilmesi ve 1 saat sonra kendi kendini iyileştiren hidrojelin görüntüsü (b) 1 saat sonra hidrojelin kendi kendini iyileştirebildiğinin mekanik çekme testi uygulaması ile gösterilmesi

Ayrıca farklı renkte silindir şeklinde hazırlanan hibrit hidrojeller ikiye kesilerek farklı renkteki hidrojeller birleştirilmiş ve 1 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İyileşme prosesinden sonra hidrojele uygulanan çekme testi Resim 4.8 (b)’de görülmektedir. Kendi kendini iyileştiren hidrojelin iyileşen bölgede kırılmadan esnemeye dayanabildiği görülmektedir. Bu sonuçlar hidrojellere yapısal olarak hasar verilse de hidrojeli oluşturan dinamik hidrazon bağından dolayı kendi kendilerini iyileştirebilme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir [67].

Hidrazon bağı ile çapraz bağlanan hidrojellerde hidrazon bağı ile hidrazit ve aldehit reaktifleri arasında dinamik bir denge vardır ve pH gibi bir dış uyarı ile bu dengenin yönü değiştirilebilmektedir. [124, 171]. Hazırlanan enjekte edilebilir jellerin pH duyarlı sol-jel geçişinin incelenmesi için öncelikle RhB ile renklendirilen hibrit hidrojel 10 M HCl asitte vortekslenerek “sol” hale getirilmiştir. Daha sonra bu “sol” sisteme 10 M NaOH ilave

edildiğinde tekrar “jel” haline geldiği görülmüştür. Sol- jel geçişi sırasında 10 M HCl asit ve 10 M NaOH eklenerek 3 kez tekrarlanmıştır. Resim 4.9’da hazırlanan enjektörde edilebilir hibrit hidrojelde pH değişimlerine karşılık sol-jel geçişlerinin tekrarlanabildiği gösterilmiştir. Bu özellik hidrojel oluşturulan dinamik hidrazon bağının pH duyarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü hidrazon bağları asidik ortamda hidroliz olmaktadır, nötral ve bazik ortamda tekrar oluşmaktadır [172]. Eklenen HCl ile sol hale gelen sistem, NaOH eklenmesi sonucu artan pH ile hidrazon bağının tekrar oluşmasıyla tekrar jelleşebilmektedir. Bu işlemin tekrarlanabilme özelliği ise hidrojel oluşumunun tersinir olduğunu göstermektedir. Şekilde görülen jellerin başlangıçtaki jele göre de opak olduğu da görülmektedir. Bunun sebebi ise ortama ilave edilen HCl ile NaOH in nötralleşme reaksiyonu sonucu NaCl tuzu oluşturmasıdır [85].



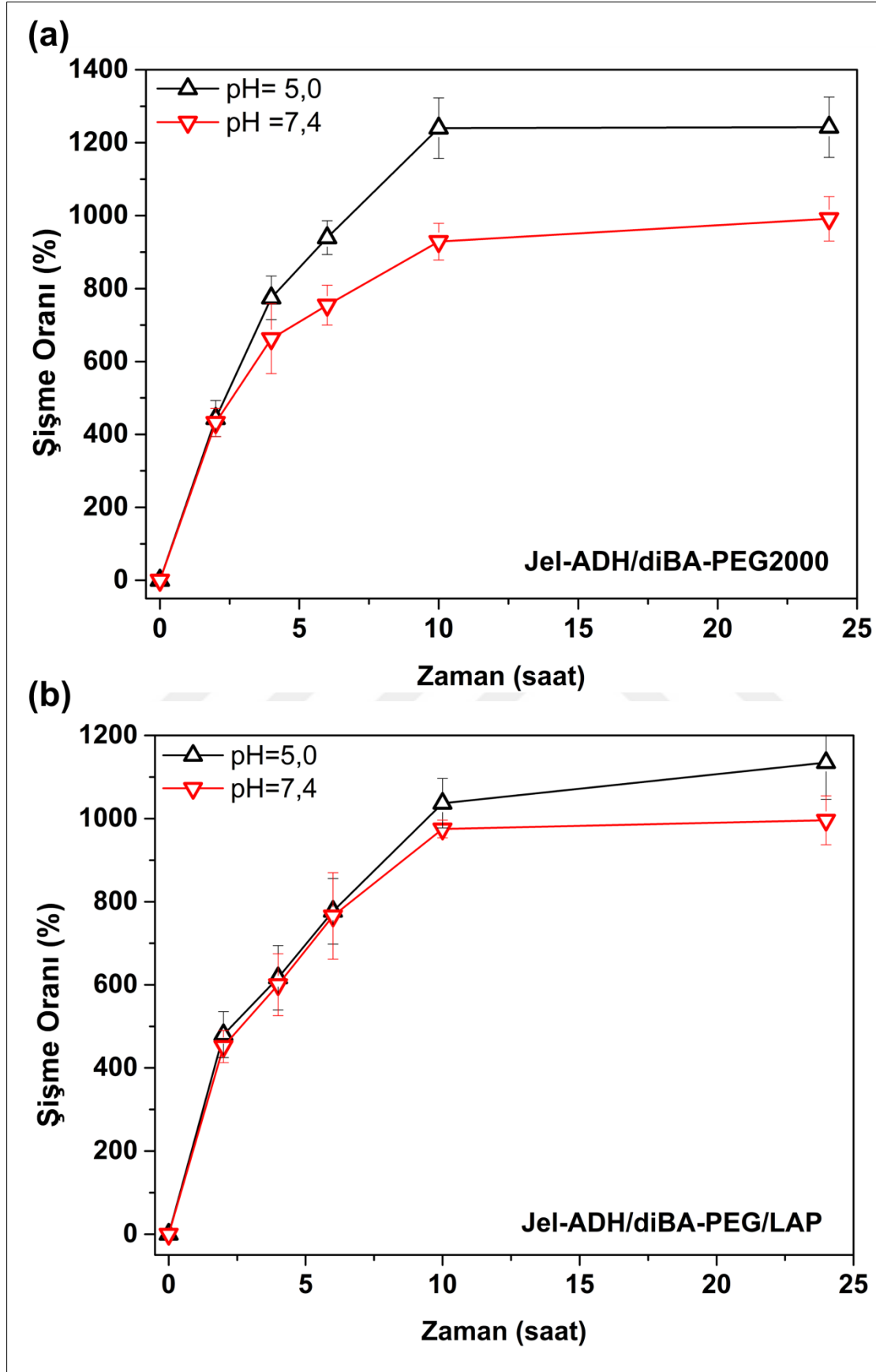
Resim 4.9. Enjektörde edilebilir hibrit hidrojinin pH’ a bağlı sol-jel faz geçiş döngüsü

4.6. Jel-ADH/diBA-PEG ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin *In-Vitro* Şişme ve Degradasyon Davranışlarının İncelenmesi

Hidrojellerin şişme özellikleri, biyolojik performanslarını, mekanik özelliklerini ve ilaç salım performanslarını etkileyebilmektedir [116]. Hidrojellerin şişme özelliğini genellikle çapraz bağlanma oranı, jel kompozisyonu, gözeneklilik, iyonik şiddet ve pH gibi pek çok

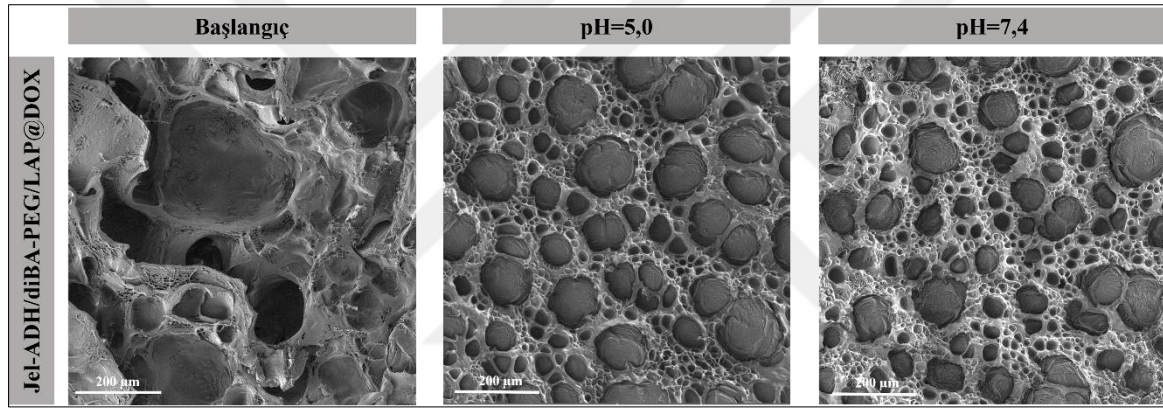
faktör etkilemektedir [173]. Bu çalışmada, hidrojellerin şişme özellikleri pH=5,0 ve pH=7,4 PBS ortamında 37°C’de incelenmiştir. Şekil 4.21’de gösterildiği gibi Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin her ikisi de pH duyarlı şişme karakteristiği sergilemektedir. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelleri 37°C’de pH=5,0’te sırasıyla %1240 ve %1130 maksimum şişme oranı gözlemlenmiştir. Hidrojellerin pH duyarlı şişme özelliklerinin ise jel kompozisyonundaki jelatinin izoelektrik noktasından (pI=7-9) etkilenebileceği düşünülmektedir. Şişme deneyleri sonucunda, pH=7,4’te hidrojellerin şişmesinin en az olduğu görülürken, şişme ortamı pH değeri jelatinin pI değerinin altında olduğu pH=5,0 ortamında hidrojellerin şişmesinin maksimum olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, jelatinin amin gruplarının protonlaşması sonucu net pozitif yük miktarının artması ve buna bağlı olarak şişmenin artışı olarak gözlemlenmektedir [174, 175].

Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin pH=5,0 ve pH=7,4 ortamlarındaki şişme oranları karşılaştırıldığında ise hibrit hidrojel her iki ortamda da daha az şişmektedir. Nanohibritlerin şişme oranını nanopartiküllerin hidrofilik yeteneği, polimer ağ yapısı ve polimer zincirleri ile nanopartiküller arasındaki etkileşim gibi çeşitli parametreler etkileyebilmektedir. Hibrit hidrojeldeki şişme oranının azalması LAP’in hidrojelde ekstra çapraz bağlayıcı görevi görmesinden dolayı hidrojin su emme kapasitesini azaltmasından kaynaklanmaktadır [158].



Şekil 4.21. pH=5,0 ve pH=7,4'te (a) Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve (b) Jel-ADH/diBA-PEG LAP hidrojellerinin şişme oranı.

Ayrıca hibrit hidrojellerin pH=5,0 ve pH=7,4 ortamlarında şişmesinden sonra şişme davranışının hibrit hidrojellerin gözenekliliği üzerindeki etkisini incelemek amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Resim 4.10'da hibrit hidrojelinin şişmeden önceki ve pH=5,0 ve pH=7,4 tamponlarında şişirildikten sonraki SEM görüntüleri görülmektedir. Şişirilmeden liyofilize edilen Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojelinde daha düzensiz gözenek yapıları gözlemlenirken, pH=5,0 ve pH=7,4'te şişirilerek liyofilize edilen hidrojellerin daha düzenli birbirine bağlı gözenekler içerdiği görülmektedir. Hibrit hidrojellerin gözenek boyutu da pH=5,0'de $120 \pm 17 \mu\text{m}$ iken, pH=7,4'te $90 \pm 9 \mu\text{m}$ 'ye düştüğü görülmektedir. Bu sonuç ise pH=5,0'de hibrit hidrojelin pH=7,4'e göre daha fazla şiştiğini göstermektedir.

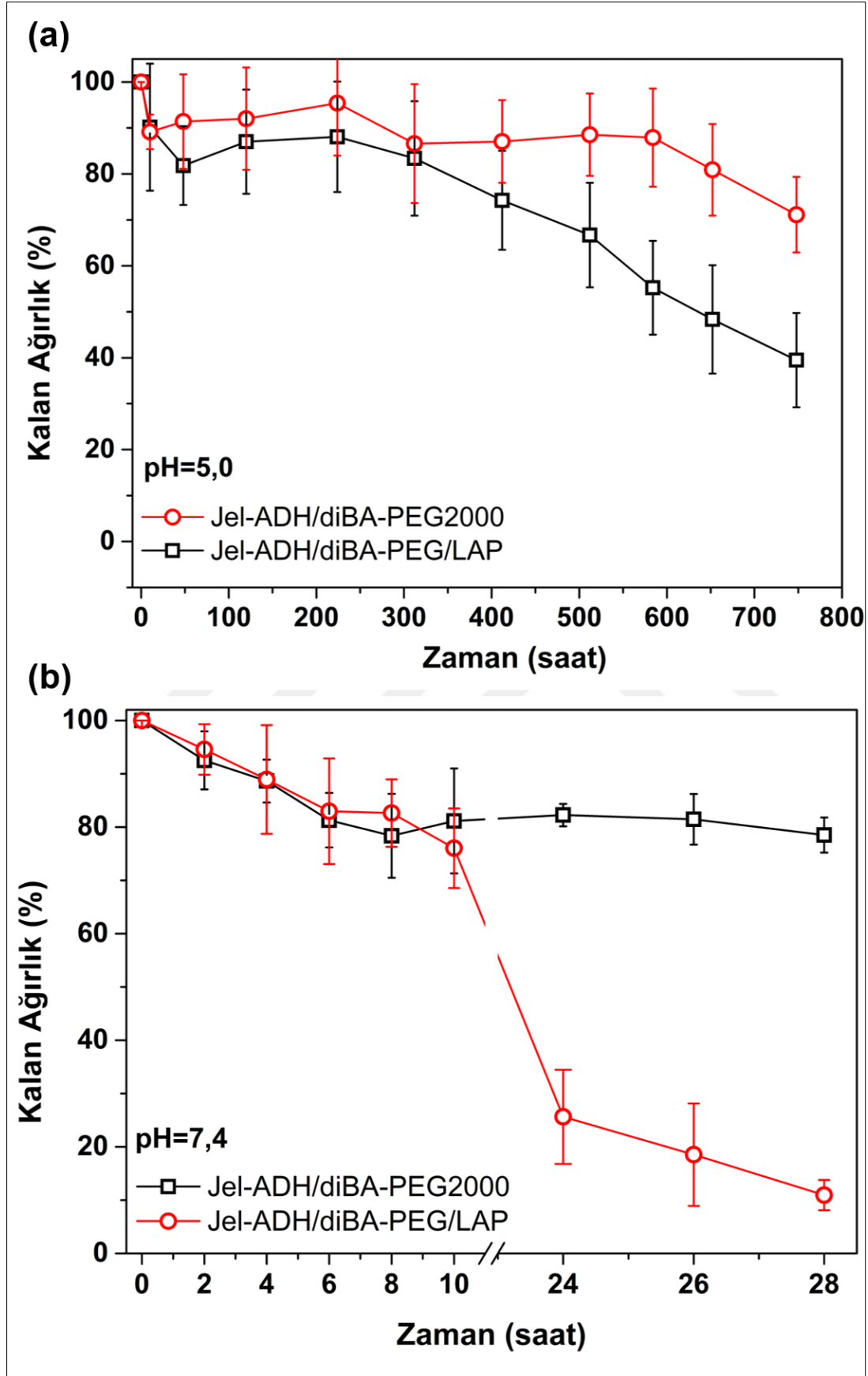


Resim 4.10. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX hibrit hidrojelinin farklı pH ortamlarında 24 saat şişirildikten sonraki SEM görüntüleri

Bir biyomateriyalin biyolojik olarak parçalanabilir olması, tedaviden sonra herhangi bir cerrahi operasyon gerektirmediğinden klinik uygulamalar için oldukça önemlidir. Hidrojellerin de ilaç salım sistemi olarak kullanılabilmesi için uygun bir bozunma hızına sahip olmaları gereklidir. İdeal olarak, hidrojellerin *in-vivo* bozunması, ilaç salımının tüm süresi ile uyumlu olmalıdır. Hidrojelden ilaç salımı bitmeden önce jel bozulursa, ilacın ani salımı meydana gelmektedir. Bu durum ise, ilacın istenmeyen yan etki riskinin artmasına ve ilaçların terapötik etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir [176]. Hidrojellerin bozunması ise hidrojelin çapraz bağlanma derecesi, gözenekliliği, bozunma ortamının pH değeri ve enzim konsantrasyonu gibi dış faktörlerden etkilenebilmektedir [177]. Bu amaçla, ortamın pH değerinin hidrojellerin hidrolitik bozunma davranışı üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.22). Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerin *in-vitro* biyolojik bozunması, 37°C sıcaklıkta pH=5,0 (tümör ortamı) ve

pH=7,4 (fizyolojik ortam) ortamlarında farklı zaman aralıklarında ağırlık değişimlerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi, pH=5,0'te Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelileri için, 10 güne kadar yavaş bir bozunma gözlemlenmiştir. Ayrıca pH=5,0'te 30 gün sonra Jel-ADH/diBA-PEG hidrojelinde yaklaşık %29 ağırlık kaybı görülürken, hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinde %60 ağırlık kaybı görülmektedir. Her iki hidrojelde de pH=5,0'te görülen uzun süreli bozunma hidrojelileri oluşturan hidrazon bağının asidik hidrolizine bağlı gerçekleştiği düşünülmektedir [178]. Ancak hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin pH=5,0 ortamında Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline göre daha hızlı bozunduğu görülmektedir (Şekil 4.22 (a)). pH=7,4'te ise, Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojellerinin 2 gün içinde yaklaşık %20 oranında bozunduğu, Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojelinin ise ~% 90 oranında bozunma gösterdiği Şekil 4.22 (b)'de görülmektedir. pH=7,4'te pH=5,0 ortamına göre her iki hidrojelde de daha hızlı bir bozunma görülmektedir. PBS pH=7,4'te şişen hidrojellerde jelatin polimerinden dolayı amin grubu ve karboksil grubu nötr olup birbiriyle hidrojen bağı oluşturabilmektedir. Bu hidrojen bağı oluşumunun ise PBS ortamındaki iyonlar tarafından engellenmesi sonucu hidrojel oksidasyonla bozunabilmektedir [179]. Bu sonuç, pH=7,4'te hidrojellerin bozunma davranışında oksidasyon bozunma prosesinin, hidrazon bağı hidrolizi ile bozunma prosesine göre baskın olduğunu göstermektedir.

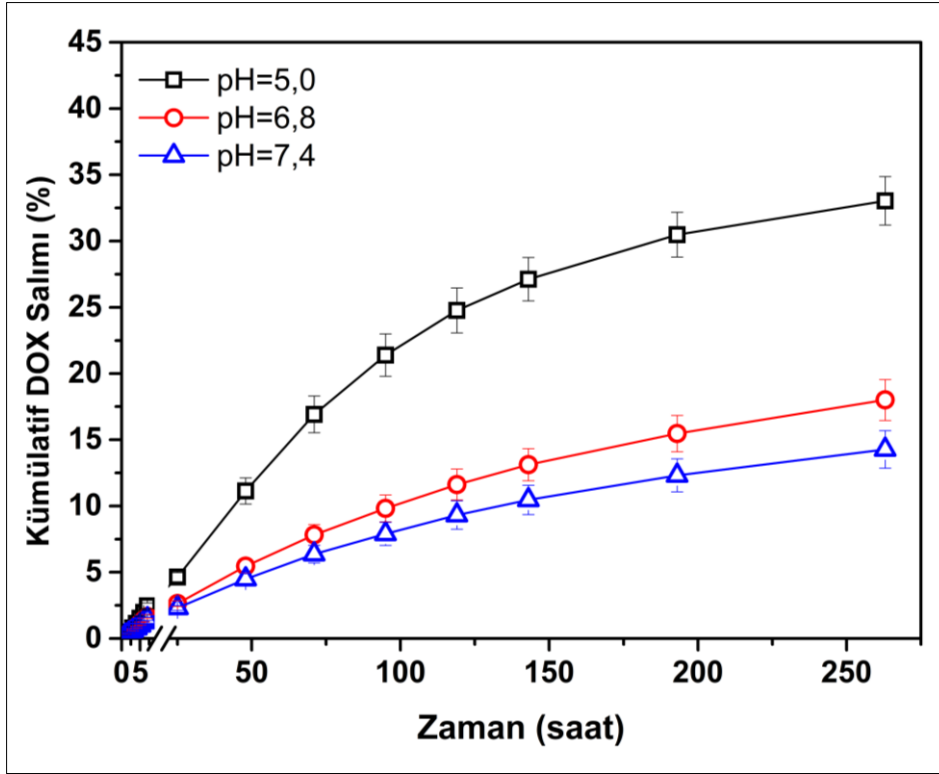
Ayrıca pH=5,0 ve pH=7,4 ortamlarında Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojeli Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline göre daha hızlı bozunma davranışı sergilemektedir. Bu duruma LAP yapısında bulunan iyonların sebep olabileceği düşünülmektedir. Van den Bosch ve Gielens tuz iyonlarının varlığında yaptıkları deneylerde, tuz iyonlarının tipinin, konsantrasyonlarının ve çözeltinin pH'ının jelatinin bozunma derecesi üzerinde bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Tuz iyonlarının hem jelatin polipeptit zincirlerinin açılması hem de suyun hidrolitik aktivitesi üzerinde etkili olarak jelatinin bozunmasına sebep olduklarını raporlamışlardır [180].



Şekil 4.22. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojenlerinin (a) PBS pH=5,0 (b) pH=7,4'te hidrolitik bozunması

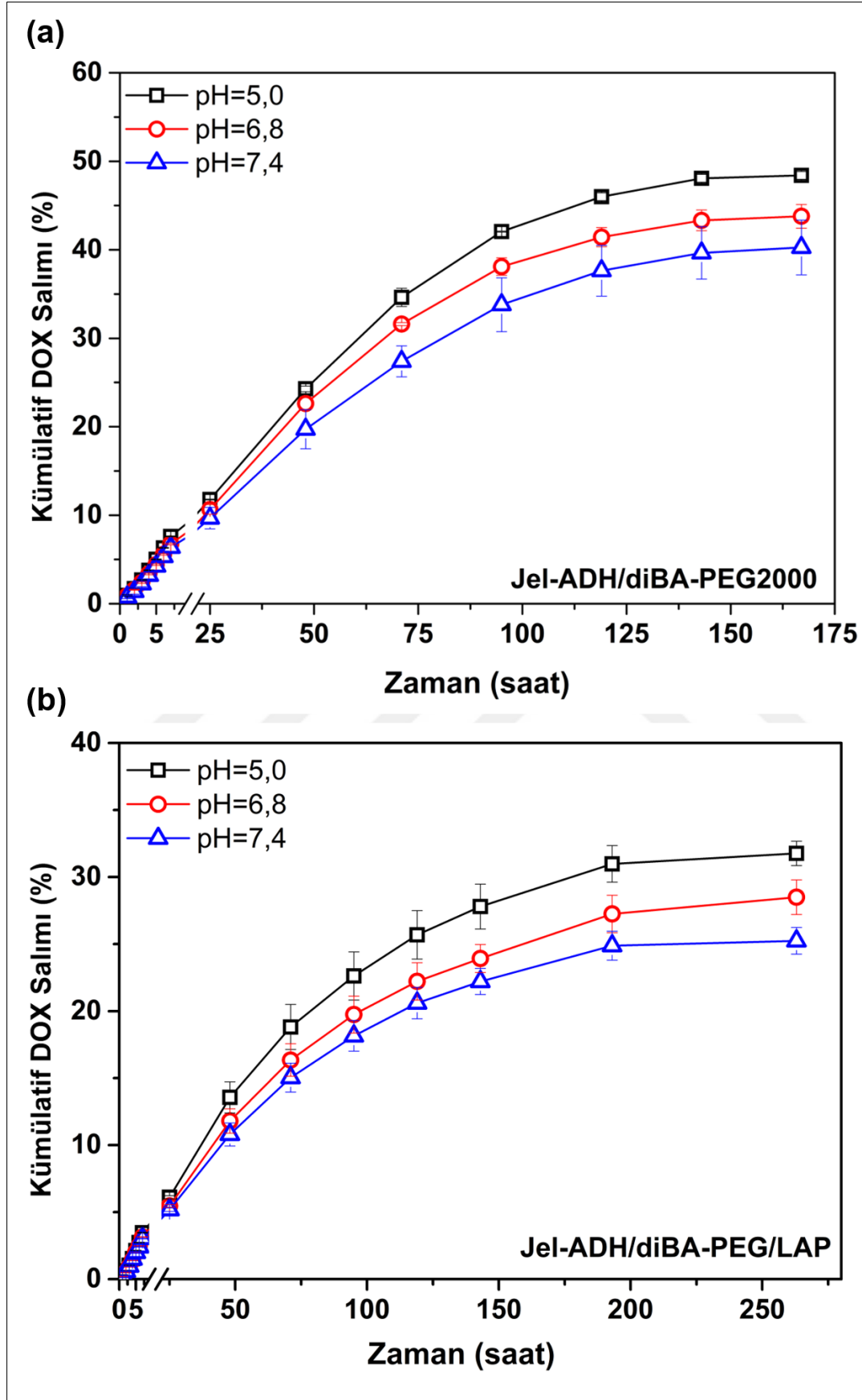
4.7. *In-Vitro* İlaç Salım Profillerinin İncelenmesi

Lokelize bir ilaç deposu olarak tasarlanan hidrojel sisteminin başarılı bir şekilde uygulanması için, tümör bölgesini hedeflemesi ve uzun süreli salım yapma kabiliyetine sahip olması gerekmektedir. Bu bağlamda bu çalışmada da uzun süreli ve pH duyarlı bir salım sistemi elde etmek için DOX yüklü LAP nanokilleri kullanılarak enjekte edilebilir bir hibrit hidrojel sistemi geliştirilmiş ve ilaç salım profilleri incelenmiştir. Bilindiği gibi genel olarak tümör dokularının hücre dışı pH'ı ($\text{pH}=6,6-6,8$), normal sağlıklı dokuların pH'ından ($\text{pH}=7,4$) biraz düşüktür. Ayrıca hücre içi endozomlarda $\text{pH}=5,0-5,5$ arasında iken lizozomlarda $\text{pH}=4,0-4,5$ arasındadır [3]. Bu amaçla öncelikle farklı pH ortamlarında ($\text{pH}=5,0$; $\text{pH}=6,8$ ve $\text{pH}=7,4$) ve 37°C 'de DOX yüklü LAP'in salım profilleri incelenmiştir. Şekil 4.23'te görüldüğü gibi DOX'un LAP@DOX kilinden DOX salımının pH duyarlı olduğu ve en yüksek miktardaki salımın asidik ortamda ($\text{pH}=5,0$) gerçekleştiği görülmektedir. LAP@DOX nanodisk sisteminden 10 gün içerisinde pH 5,0'te yaklaşık %33 DOX salımı gözlemlenirken pH 6,8 ve 7,4'te sırasıyla %18 ve %14,3 DOX salımı gözlemlenmiştir. Asidik pH ortamında katyonik yapıda olan DOX'un ortamda bulunan yüksek hidronyum iyonu konsantrasyonundan dolayı iyon değişimi yoluyla LAP@DOX nanodisk sisteminden daha hızlı salımının gerçekleşebileceği düşünülmektedir [181]. Ayrıca bütün pH ortamlarında on gün içinde DOX salımının dengeye ulaştığı görülmektedir. Bu sonuçlar LAP@DOX sisteminin uzun süreli salım sağlayabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.23. DOX'un LAP nanodiskinden 37°C'de farklı pH ortamlarında *in-vitro* salım profili

Hidrojellerden DOX salım profilleri farklı pH ortamlarında (pH=5,0; pH=6,8 ve pH=7,4) 37°C'de incelenmiştir (Şekil 4.24). Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin her ikisinde farklı pH ortamlarında *in-vitro* koşullarda salım profilleri incelendiğinde pH duyarlı bir salım profili sergiledikleri görülmektedir. Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojel sisteminden 7 gün içinde pH=5,0; pH=6,8 ve pH=7,4'te sırasıyla yaklaşık %48,40; %43,78 ve %40,27 oranlarında DOX salımının gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.24 (a)). Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojel sisteminde ise, 10 gün içinde yaklaşık pH=5,0'te %31,76; pH=6,8'de %28,49 ve pH=7,4'te %25,24 oranında DOX salımı gerçekleşmektedir (Şekil 4.24 (b)). Bu sonuçlara göre Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline kıyasla daha yavaş bir salım profili sergilediği görülmektedir.

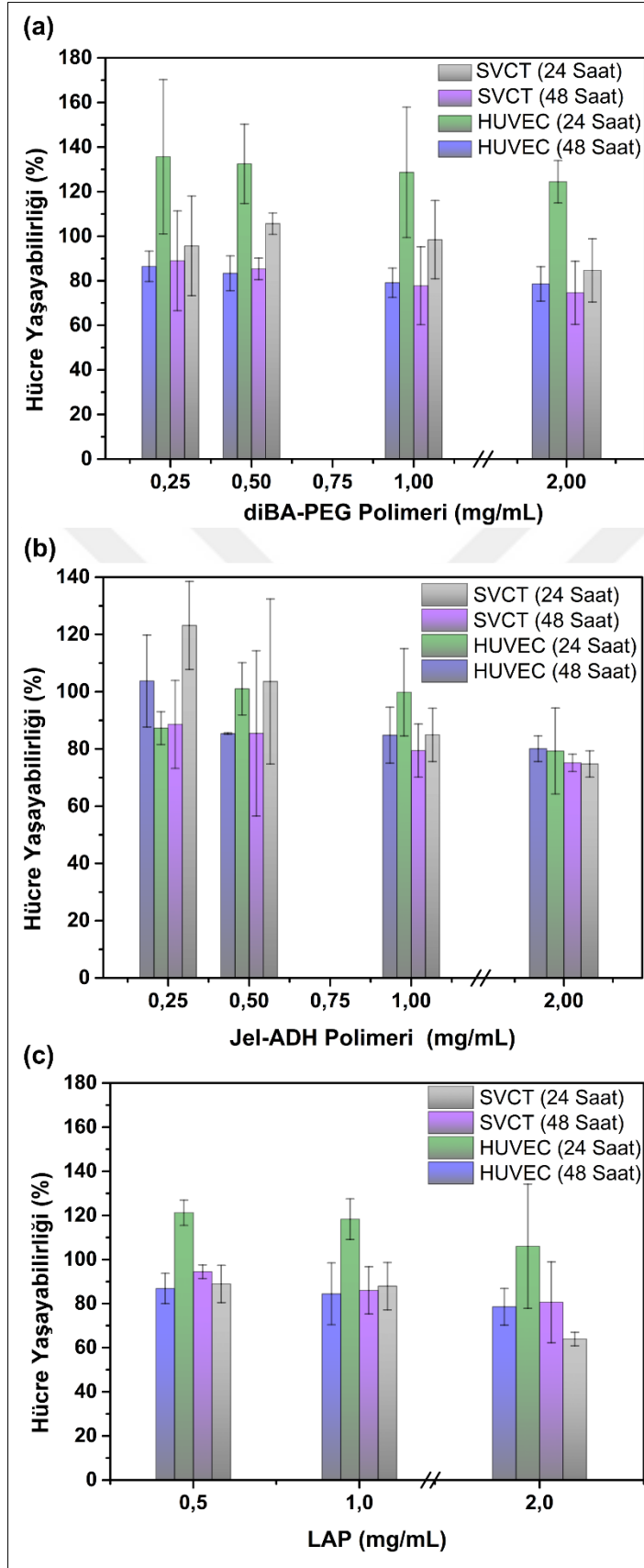


Şekil 4.24. 37°C’de farklı pH ortamlarında (a) Jel-ADH/diBA-PEG2000, (b) Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin *in-vitro* DOX salım profilleri

4.8. Hidrojel Öncül Bileşenleri ve Hidrojellerin Hücre Sitotoksosite Deneyleri

Kemoterapötik ilaç deposu olarak kullanılabilen hidrojel biyomalzeme setlerinin sağlıklı dokulara zarar vermemesi önemli bir husustur. Bu amaçla hidrojel oluşturulan öncül bileşenleri, Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin sitotoksiteleri sağlıklı insan hücre hatları olan SVCT (meme epiteli), HUVEC (endotel hücresi) hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Hidrojel öncül bileşenlerinin HUVEC ve SVCT hücre hatları ile 24 ve 48 saat etkileştirildikten sonra MTT denemesi ile belirlenen sitotoksite sonuçları Şekil 4.25'te verilmektedir.





Şekil 4.25. Jel öncül bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde SVCT ve HUVEC hücre hatlarına karşı *in-vitro* sitotoksiteleri (a) diBA-PEG2000 polimeri (b) Jel-ADH polimeri (c) LAP nanodisk

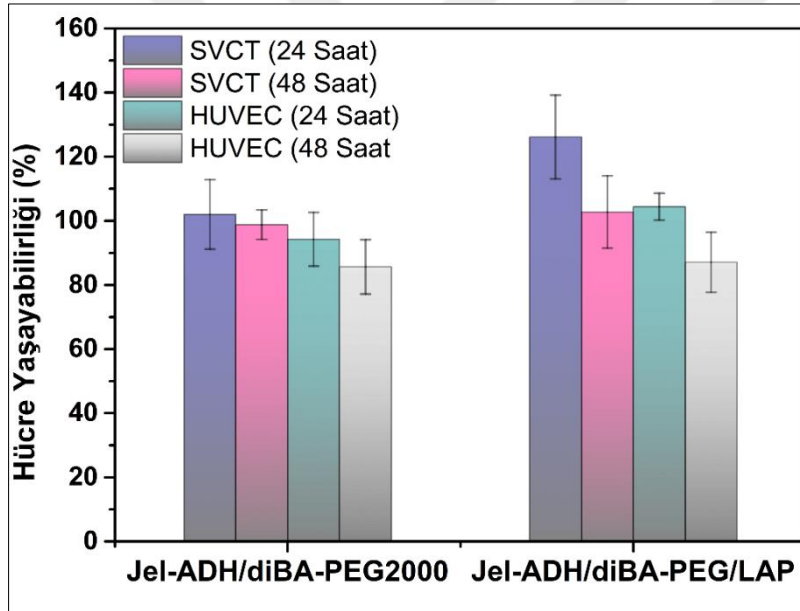
diBA-PEG2000 Hidrojel öncül polimeri her iki hücre hattına karşı genel olarak minimum toksisite göstermektedir (Şekil 4.25 (a)). Ayrıca HUVEC ve SVCT hücre hatlarında 48 saat sonunda bile %80'den fazla hücre uyumluluğu görülebilmektedir. Ayrıca 24 saat sonunda HUVEC hücrelerinde bütün derişimlerde, SVCT hücrelerinde ise 0,5 mg/mL derişimde %100'den fazla hücre yaşayabilirliği görülmektedir. Her iki hücre hattında da artan konsantrasyonla birlikte hücre yaşayabilirliğinin biraz düşmesi ise polimerde bulunan karbonil gruplarının konakçı proteinleri ile etkileşimlerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [67].

Jel-ADH polimeri de farklı her iki hücre hattına karşı genel olarak minimum toksisite göstermektedir (Şekil 4.25 (b)). HUVEC ve SVCT hücre hatlarında 48 saat sonunda bile %80'den fazla hücre uyumluluğu görülebilmektedir. Ayrıca bazı derişimlerde 24 ve 48 saatlik etkileşimler sonucu her iki hücrede de %100'den fazla hücre yaşayabilirliği görülmektedir. Bunun sebebi ise jelatinin hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını sağlayan arjinin-glisin-aspartik asit gibi motiflere sahip olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [182].

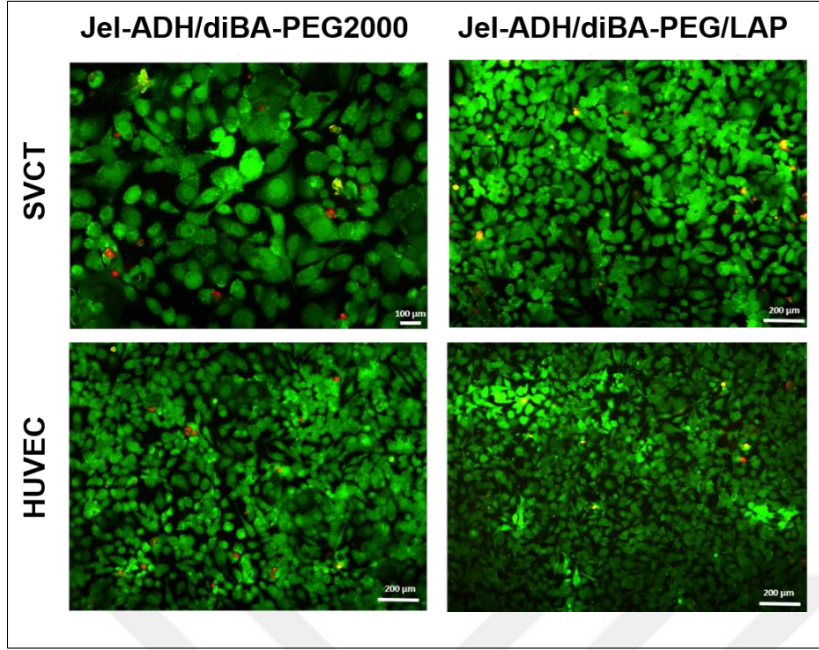
LAP kilinin ise 2 mg/mL konsantrasyonda SVCT hücre hattı ile 24 saat etkileştirilmesi hariç bütün derişimlerde her iki hücre hattında 24 saat ve 48 saat sonunda sitotoksik etki göstermemekle birlikte 48 saat sonunda bile %80'den fazla hücre yaşayabilirliği görülmektedir (Şekil 4.25 (c)). Ayrıca LAP kilinin bütün derişimlerde HUVEC hücre hattı ile 24 saat etkileştirilmesi ile hücre yaşayabilirliğinin %100'den fazla olduğu görülmüştür.

Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin ekstraktının HUVEC ve SVCT hücre hatları ile 24 ve 48 saat etkileştirildikten sonra MTT denemesi ile belirlenen sitotoksik sonuçları Şekil 4.26'da verilmektedir. Her iki jelinde HUVEC ve SVCT hücre hatlarına karşı sitotoksik olmadığı görülmektedir. Jelatin ve PEG toksik olmayan polimerler olduğundan dolayı biyomedikal uygulamalar için hidrojellerin sentezinde kullanılmaktadır [183, 184]. LAP kilinin Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline entegre edilmesiyle oluşturulan Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit jelinde hücre yaşayabilirliğinin her iki hücre hattında 24 ve 48 saatte Jel-ADH/diBA-PEG2000 jelinden fazla olduğu görülmektedir. 24 saat sonunda her iki hücre hattında ve 48 saat sonunda SVCT hücre hattında hibrit jelde hücre yaşayabilirliğinin %100'den fazla olduğu görülmektedir. LAP nanokil, hidrojelde mekaniksel mukavemeti artırmanın yanı sıra hücre

çoğalmasını da sağladığı görülmektedir. Bunun sebebi LAP nanokilinin suda dağılması sonucu serbest hale gelen Mg^{2+} , Na^+ , $Si(OH)_4$, Li^+ gibi iyonlar hücre canlılığını sağlamaktadır. Bu iyonlar arasında özellikle Mg^{2+} iyonu hücrelerin nanohibrit jeline yapışmasını sağlayarak hücrelerin canlı kalmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır [158]. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin HUVEC ve SVCT hücrelerine sitotoksitesi ayrıca canlı-ölü deneyi ile belirlenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin ekstraktları hücreler ile 24 saat etkileştirildikten sonra elde edilen floresans mikroskop görüntüleri Resim 4.11’de verilmektedir. Floresan mikroskopu görüntülerinde, hidrojel özütleri ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde ~90% oranında hücrenin yaşayabilirliği görülmektedir. Bu sonuçlar, hidrojellerin mükemmel bir biyouyumluluğa sahip olduğunu açıkça göstermektedir.



Şekil 4.26. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin farklı inkübasyon sürelerinde SVCT ve HUVEC hücre hatlarına karşı *in-vitro* sitotoksiteleri

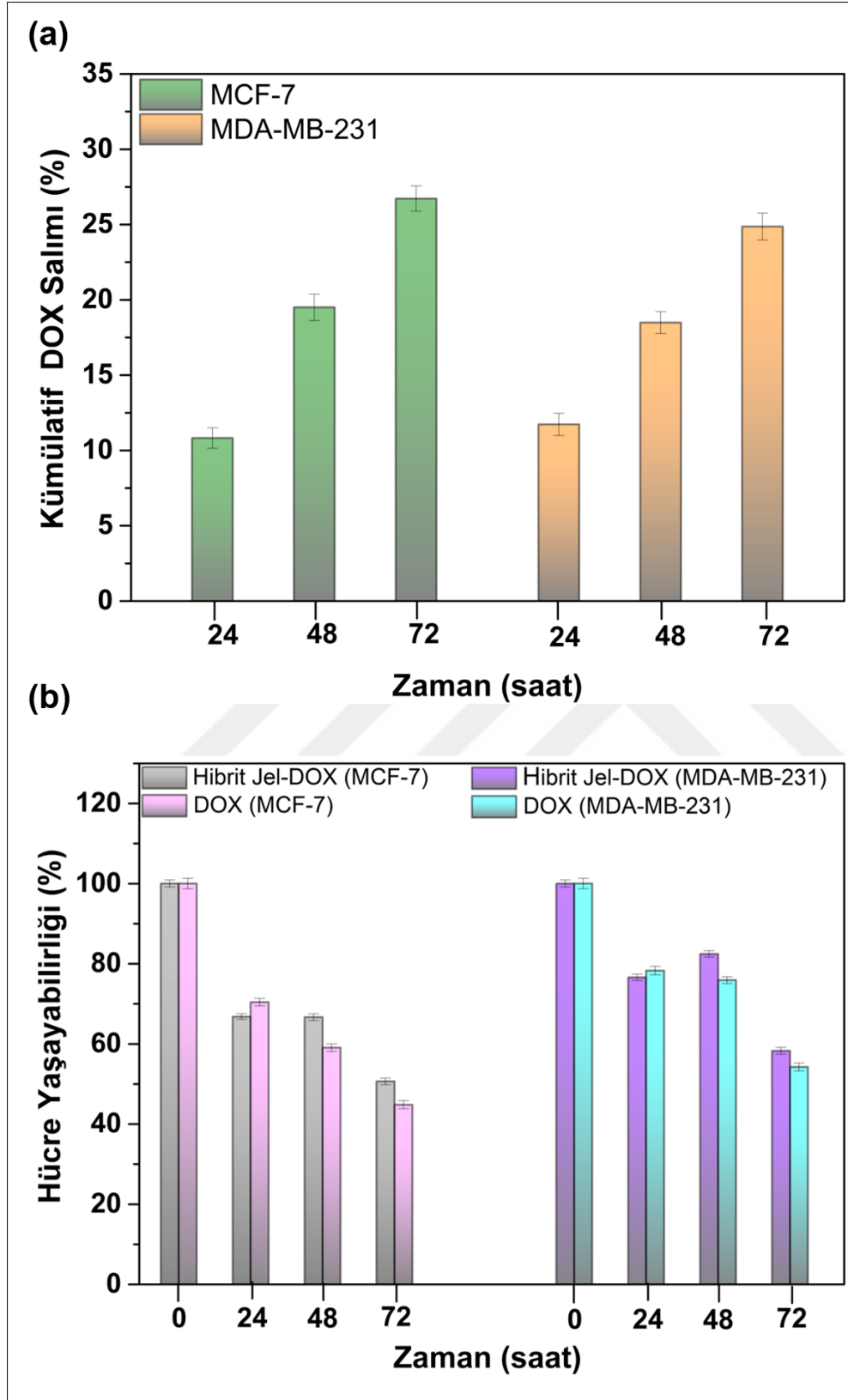


Resim 4.11. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hidrojellerinin canlı-ölü deneyi floresan görüntüleri (analizde canlı ve sağlıklı hücreler yeşil ışığı floresan ederken, ölü ve sağlıklı hücreler turuncu-kırmızı ışığı floresan etmektedir.)

DOX yüklü hibrit hidrojellerin (Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX) *in-vitro* sitotoksisiteleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine karşı resazurin boya bazlı alamar mavisi deneyi ile belirlenmiştir. İlk önce, farklı inkübasyon süreleri için hibrit hidrojellerden hücre kültürlerine salınan DOX miktarları belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra hibrit hidrojellerden MCF-7 hücre kültür ortamına salınan DOX miktarının sırasıyla 5,41, 9,75 ve 13,36 µg/mL olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27 (a)). Ayrıca MDA-MB-231 hücre kültür ortamına hibrit hidrojeldan salınan DOX miktarı aynı zaman aralıklarında 5,86, 9,24 ve 12,43 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.27 (a)). Daha sonra, DOX yüklü hibrit hidrojellerin sitotoksitesi, farklı inkübasyon sürelerinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde incelenmiştir (Şekil 4.27 (b)). Şekil 4.27 (b)'de görüldüğü gibi, 72 saatlik inkübasyonun ardından hücre canlılıklarının MCF-7 hücreleri ve MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla %50,6 ve %58,3 olduğu görülmüştür. Öte yandan, DOX yüklü hibrit hidrojellerin sitotoksik etkisi, hidrojeldaki eşdeğer miktarda bulunan serbest DOX (50 µg/mL) ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 72 saatlik inkübasyondan sonra, serbest DOX'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde sırasıyla %55,2 ve %45,79 hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. DOX yüklü hibrit hidrojellerin ve serbest DOX'un sitotoksite

etkileri birbirleriyle karşılaştırıldığında, hibrit hidrojenlerin sürekli DOX salımı ile çok verimli hücre ölümü sağladığını açıkça söyleyebiliriz.





Şekil 4.27. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre ortamlarında farklı zaman aralıklarında kümülatif DOX salımı, (b) Farklı inkübasyon sürelerinde DOX yüklü hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP DOX'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine karşı sitotoksitesi (Karşılaştırma, hidrojellerdeki eşdeğer miktarda serbest DOX ile gerçekleştirilmiştir.)

Sonuç olarak bu tez kapsamında geliştirilen Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX enjekte edilebilir hibrit hidrojelinin uzun süreli, kontrollü ve pH duyarlı salım yeteneği ile lokal kanser tedavisi için büyük bir potansiyele sahip olduğu düşünölmektedir.





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Hidrojel sentezinde kullanılacak olan diBA-PEG2000, diBA-PEG4000 ve Jel-ADH polimerleri sentezlenerek kimyasal yapıları $^1\text{H-NMR}$ ve ATR-FTIR analizleri ile aydınlatılmıştır.
- Jel-ADH/diBA-PEG4000 ve Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojelleri, Jel-ADH polimerindeki hidrazit fonksiyonel grupları ile diBA-PEG polimerindeki aldehit fonksiyonel gruplarının bir tür Schiff bazı reaksiyonu olan hidrazon bağı ile çapraz bağlanması sonucu oluşturulmuştur. Enjekte edilebilir hidrojel sisteminin hazırlanabilmesi için jelleşme süresi optimizasyonu yapılmış ve mekanik dayanımları reolojik olarak belirlenmiştir. 15 (a/v) katı içeriği ve 8/2 hacim oranı (Jel-ADH: diBA-PEG2000) ile hazırlanan Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeli, 137 saniyelik jelleşme süresi ve 6,4 kPa mekanik dayanımı ile en uygun hidrojel sistemi olarak belirlenmiş ve kimyasal yapısı ATR-FTIR analizi ile, morfolojisi ise SEM analizi ile aydınlatılmıştır.
- LAP nanodiske DOX yüklemesi yapılarak yükleme etkinliği $98,5 \pm 0,16$, yükleme kapasitesi ise $24,6 \pm 0,04$ olarak hesaplanmış ve kimyasal yapısı ATR-FTIR spektrumu ile aydınlatılmıştır. LAP kiline DOX yüklemesinden sonra LAP kilinin zeta potansiyel değerinin $-26,5 \pm 1,57$ 'dan $-12,2 \pm 0,95$ mV'a kadar arttığı belirlenmiştir.
- Enjekte edilebilir hibrit hidrojel sisteminin hazırlanması için farklı derişimlerde LAP nanodisk hidrojele entegre edilerek jelleşme süresi optimizasyonu yapılmıştır. Jelleşme süresi 80 saniye olan $0,05$ LAP kompozisyonuna sahip Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojeli enjekte edilebilir hibrit hidrojel sistemi elde etmek için en uygun sistem olarak belirlenmiş ve kimyasal yapısı ATR-FTIR ile karakterize edilerek, morfolojisi SEM analizi ile aydınlatılmıştır.
- Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelinin reolojik ölçümler ile mekanik dayanımları, jelleşme süresi, enjekte edilebilirliği ve kendi kendini iyileştirebilme özellikleri belirlenmiştir.
- Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin 37°C sıcaklıkta farklı pH ortamlarında ($\text{pH}=5,0$ ve $\text{pH}=7,4$) PBS tamponunda *in-vitro* şişme ve degradasyon davranışları incelenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojelleri 37°C 'de pH 5,0'te sırasıyla 1240% and 1130% maksimum şişme oranı gözlemlenmiştir. Hidrojellerin her ikisinin de pH duyarlı şişme davranışı sergilediği ve $\text{pH}=5,0$ ortamında daha fazla şiştikleri belirlenmiştir. Hibrit hidrojelin Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline göre her iki ortamda da ($\text{pH}=5,0$ ve

pH=7,4) daha az şiştiği belirlenmiştir. Hibrit hidrojin pH=5,0 ve pH=7,4'te şişirildikten sonraki morfolojileri de SEM ile analiz edilmiştir. Ayrıca her iki hidrojinde pH duyarlı bir bozunma davranışı sergilediği ve pH=5,0'te pH=7,4'e göre daha geç bozundukları belirlenmiştir. pH=5,0'te 30 gün sonra Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojin de yaklaşık %29 ağırlık kaybı görülürken, hibrit Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojinde %60 ağırlık kaybı görülmüştür.

- Uzun süreli, kontrol edilebilir ve pH duyarlı DOX salım profili sağlamak için ise LAP@DOX hidrojele entegre edilerek 37°C'de farklı pH ortamlarında (pH=5,0; pH, 6,8; pH=7,4) salım profili incelenmiştir. Aynı zamanda LAP@DOX ve Jel-ADH/diBA-PEG2000@DOX hidrojinin de pH duyarlı kontrollü salım etkinlikleri incelenerek DOX yüklü hibrit hidrojin salım profili ile karşılaştırılmıştır. Bütün salım sistemlerinde pH duyarlı bir salım gerçekleşmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojel sisteminden 7 gün içinde pH=5,0; pH=6,8 ve pH=7,4'te sırasıyla yaklaşık %48,40; %43,78 ve %40,27 oranlarında DOX salımının gerçekleştiği belirlenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP Hibrit hidrojel sisteminde ise, 10 gün içinde yaklaşık pH=5,0'de %31,76; pH=6,8'de %28,49 ve pH=7,4'te %25,24 oranında DOX salımı gerçekleştiği belirlenmiştir. Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojinin Jel-ADH/diBA-PEG2000 hidrojeline kıyasla daha yavaş bir salım profili sergilediği görülmüştür. Hibrit hidrojeller, bozunma süreleri ile uyumlu bir şekilde tümör pH ortamında uzun süreli kontrollü bir ilaç salımı profili sergilemiştir.
- Hidrojellerin sitotoksiteleri belirlenmiştir. Hidrojeli oluşturan öncül bileşenler, Jel-ADH/diBA-PEG2000 ve Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hidrojellerinin sitotoksiteleri sağlıklı insan hücre hatları olan SVCT (meme epiteli), HUVEC (endotel hücresi) hücreleri üzerinde 24 ve 48 saat süreyle incelenmiştir. Hem hidrojel öncül bileşenlerinin hem de hidrojellerin iyi bir biyoyumluluğa sahip olduğu ve hücre çoğalmasını sağladığı gözlemlenmiştir. DOX yüklü hibrit hidrojellerin (Jel-ADH/diBA-PEG/LAP@DOX) *in-vitro* sitotoksitesi ise MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılarak resazurin boya bazlı alamar mavisi deneyi ile belirlenmiştir. Yapılan hücre deneyi sonuçlarına göre hibrit hidrojellerin, sürekli DOX salım davranışları ile uzun vadeli sitotoksite için umut verici bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür.
- Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hazırlanan kendi kendini iyileştirebilen, pH duyarlı enjekte edilebilir Jel-ADH/diBA-PEG/LAP hibrit hidrojel sisteminin uzun ve

kontrollü salım yeteneği ile lokal kanser tedavisi için potansiyel bir biyomalzeme seti olabileceği gösterilmiştir.





KAYNAKLAR

1. Pandit, A. H., Mazumdar, N., Imtiyaz, K., Alam Rizvi, M. M., and Ahmad, S. (2020). Self-Healing and Injectable Hydrogels for Anticancer Drug Delivery: A Study with Multialdehyde Gum Arabic and Succinic Anhydride Chitosan. *ACS Applied Bio Materials*, 3(12), 8460-8470.
2. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
3. Gil, M. S., Thambi, T., Phan, V. G., Kim, S. H., and Lee, D. S. (2017). Injectable hydrogel-incorporated cancer cell-specific cisplatin releasing nanogels for targeted drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(34), 7140-7152.
4. Wang, C., Zhao, N., and Yuan, W. (2020). NIR/Thermoresponsive Injectable Self-Healing Hydrogels Containing Polydopamine Nanoparticles for Efficient Synergistic Cancer Thermochemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(8), 9118-9131.
5. Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., and Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 1-19.
6. Sun, Z., Song, C., Wang, C., Hu, Y., and Wu, J. (2020). Hydrogel-based controlled drug delivery for cancer treatment: a review. *Molecular Pharmaceutics*, 17(2), 373-391.
7. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., and Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20-37.
8. Rizzo, F., and Kehr, N. S. (2021). Recent Advances in Injectable Hydrogels for Controlled and Local Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 10(1), 2001341.
9. Li, Y., Rodrigues, J., and Tomas, H. (2012). Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2193-2221.
10. De France, K. J., Cranston, E. D., and Hoare, T. (2020). Mechanically reinforced injectable hydrogels. *ACS Applied Polymer Materials*, 2(3), 1016-1030.
11. You, J., Cao, J., Zhao, Y., Zhang, L., Zhou, J., and Chen, Y. (2016). Improved mechanical properties and sustained release behavior of cationic cellulose nanocrystals reinforced cationic cellulose injectable hydrogels. *Biomacromolecules*, 17(9), 2839-2848.

12. Ma, H., He, C., Cheng, Y., Yang, Z., Zang, J., Liu, J., and Chen, X. (2015). Localized co-delivery of doxorubicin, cisplatin, and methotrexate by thermosensitive hydrogels for enhanced osteosarcoma treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(49), 27040-27048.
13. Sharma, P. K., Taneja, S., and Singh, Y. (2018). Hydrazone-linkage-based self-healing and injectable xanthan–poly (ethylene glycol) hydrogels for controlled drug release and 3D cell culture. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(37), 30936-30945.
14. Teng, L., Chen, Y., Jia, Y. G., and Ren, L. (2019). Supramolecular and dynamic covalent hydrogel scaffolds: from gelation chemistry to enhanced cell retention and cartilage regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(43), 6705-6736.
15. Wu, M., Chen, J., Huang, W., Yan, B., Peng, Q., Liu, J., Chen, L., and Zeng, H. (2020). Injectable and self-healing nanocomposite hydrogels with ultrasensitive ph-responsiveness and tunable mechanical properties: implications for controlled drug delivery. *Biomacromolecules*, 21(6), 2409-2420.
16. Li, J., Weber, E., Guth-Gundel, S., Schuleit, M., Kuttler, A., Halleux, C., Accart, N., Doelemeyer, A., Basler, A., Tigani, B., Wuersch, K., Fornaro, M., Kneissel, M., Stafford, A. M., Freedman, B. R., and Mooney, D. J. (2018). Tough composite hydrogels with high loading and local release of biological drugs. *Advanced Healthcare Materials*, 7(9), 1701393.
17. Xu, X., Huang, Z., Huang, Z., Zhang, X., He, S., Sun, X., Shen, Y., Yan, M., and Zhao, C. (2017). Injectable, NIR/pH-responsive nanocomposite hydrogel as long-acting implant for chemophotothermal synergistic cancer therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(24), 20361-20375.
18. Zhang, Y., Dosta, P., Conde, J., Oliva, N., Wang, M., and Artzi, N. (2020). Prolonged Local In Vivo Delivery of Stimuli-Responsive Nanogels That Rapidly Release Doxorubicin in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Advanced Healthcare Materials*, 9(4), 1901101.
19. Xing, R., Liu, K., Jiao, T., Zhang, N., Ma, K., Zhang, R., Zou, Q., Ma, G., and Yan, X. (2016). An injectable self-assembling collagen–gold hybrid hydrogel for combinatorial antitumor photothermal/photodynamic therapy. *Advanced Materials*, 28(19), 3669-3676.
20. Gaharwar, A. K., Cross, L. M., Peak, C. W., Gold, K., Carrow, J. K., Brokesh, A., and Singh, K. A. (2019). 2D nanoclay for biomedical applications: regenerative medicine, therapeutic delivery, and additive manufacturing. *Advanced Materials*, 31(23), 1900332.
21. Gonçalves, M., Figueira, P., Maciel, D., Rodrigues, J., Shi, X., Tomás, H., and Li, Y. (2014). Antitumor Efficacy of Doxorubicin-L loaded Laponite/A lginate Hybrid Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, 14(1), 110-120.
22. Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7-30.

23. Ahmad, A., Khan, F., Mishra, R. K., and Khan, R. (2019). Precision cancer nanotherapy: evolving role of multifunctional nanoparticles for cancer active targeting. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(23), 10475-10496.
24. Ediriwickrema, A., and Saltzman, W. M. (2015). Nanotherapy for cancer: targeting and multifunctionality in the future of cancer therapies. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1(2), 64-78.
25. Thakkar, S., Sharma, D., Kalia, K., and Tekade, R. K. (2020). Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. *Acta Biomaterialia*, 101, 43-68.
26. Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., Song, S., Jiang, Y., Xia, Q., Swinnen, J. V., Bormans, G., Himmelreich, U., Oyen, R., and Ni, Y. (2015). Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 5(5), 708.
27. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., and Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 200, 138-157.
28. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., and Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751-760.
29. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., and Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714-726.
30. Lu, Z. R., and Qiao, P. (2018). Drug delivery in cancer therapy, quo vadis?. *Molecular Pharmaceutics*, 15(9), 3603-3616.
31. Jin, Q., Deng, Y., Chen, X., and Ji, J. (2019). Rational design of cancer nanomedicine for simultaneous stealth surface and enhanced cellular uptake. *Acs Nano*, 13(2), 954-977.
32. Huai, Y., Hossen, M. N., Wilhelm, S., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2019). Nanoparticle interactions with the tumor microenvironment. *Bioconjugate Chemistry*, 30(9), 2247-2263.
33. Lin, G., Zhang, H., and Huang, L. (2015). Smart polymeric nanoparticles for cancer gene delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 12(2), 314-321.
34. Hartshorn, C. M., Bradbury, M. S., Lanza, G. M., Nel, A. E., Rao, J., Wang, A. Z., Weisner, U. B., Yang, L., and Grodzinski, P. (2018). Nanotechnology strategies to advance outcomes in clinical cancer care. *ACS Nano*, 12(1), 24-43.
35. Li, M., Luo, Z., and Zhao, Y. (2018). Self-assembled hybrid nanostructures: versatile multifunctional nanoplatforms for cancer diagnosis and therapy. *Chemistry of Materials*, 30(1), 25-53.

36. Pearce, A. K., and O'Reilly, R. K. (2019). Insights into active targeting of nanoparticles in drug delivery: advances in clinical studies and design considerations for cancer nanomedicine. *Bioconjugate Chemistry*, 30(9), 2300-2311.
37. Nakamura, Y., Mochida, A., Choyke, P. L., and Kobayashi, H. (2016). Nanodrug delivery: is the enhanced permeability and retention effect sufficient for curing cancer?. *Bioconjugate Chemistry*, 27(10), 2225-2238.
38. Fang, X., Cao, J., and Shen, A. (2020). Advances in anti-breast cancer drugs and the application of nano-drug delivery systems in breast cancer therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101662.
39. Ulbrich, K., Hola, K., Subr, V., Bakandritsos, A., Tucek, J., and Zboril, R. (2016). Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chemical Reviews*, 116(9), 5338-5431.
40. Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., and Uddin, M. J. (2019). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of Advanced Research*, 15, 1-18.
41. Wang, W., Xiang, L., Gong, L., Hu, W., Huang, W., Chen, Y., Asha, A. B., Srinivas, S., Chen, L., Narain, R., and Zeng, H. (2019). Injectable, self-healing hydrogel with tunable optical, mechanical, and antimicrobial properties. *Chemistry of Materials*, 31(7), 2366-2376.
42. Karimi, M., Sahandi Zangabad, P., Ghasemi, A., Amiri, M., Bahrami, M., Malekzad, H., Asl, H. G., Mahdih, Z., Bozorgomid, M., Ghasemi, A., Boyuk, M. R. R. T., and Hamblin, M. R. (2016). Temperature-responsive smart nanocarriers for delivery of therapeutic agents: applications and recent advances. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(33), 21107-21133.
43. Muhamad, N., Plengsuriyakarn, T., and Na-Bangchang, K. (2018). Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 3921-3935.
44. Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., and Chan, W. C. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1(5), 1-12.
45. Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E., and Langer, R. (2016). Emerging frontiers in drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 704-717.
46. Kumar, S., and Bajaj, A. (2020). Advances in self-assembled injectable hydrogels for cancer therapy. *Biomaterials Science*, 8(8), 2055-2073.
47. Cao, X., Liu, H., Yang, X., Tian, J., Luo, B., and Liu, M. (2020). Halloysite nanotubes@ polydopamine reinforced polyacrylamide-gelatin hydrogels with NIR light triggered shape memory and self-healing capability. *Composites Science and Technology*, 191, 108071.

48. Mathew, A. P., Uthaman, S., Cho, K. H., Cho, C. S., and Park, I. K. (2018). Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 17-29.
49. Mavlyanova, R., Yang, R., Tao, T., Aquib, M., Kesse, S., Maviah, M. B. J., Boakye-Yiadom, K. O., Farooq, M. A., and Wang, B. (2020). Injectable hydrogels for targeted delivering of therapeutic molecules for tissue engineering and disease treatment. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(2), 192-203.
50. Zhang, Z., He, C., and Chen, X. (2018). Hydrogels based on pH-responsive reversible carbon–nitrogen double-bond linkages for biomedical applications. *Materials Chemistry Frontiers*, 2(10), 1765-1778.
51. Chao, Y., Chen, Q., and Liu, Z. (2020). Smart injectable hydrogels for cancer immunotherapy. *Advanced Functional Materials*, 30(2), 1902785.
52. Garg, D., Matai, I., and Sachdev, A. (2021). Toward Designing of Anti-infective Hydrogels for Orthopedic Implants: From Lab to Clinic. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(6), 1933-1961.
53. Hoare, T. R., and Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993-2007.
54. Chen, J., Peng, Q., Peng, X., Han, L., Wang, X., Wang, J., and Zeng, H. (2020). Recent advances in mechano-responsive hydrogels for biomedical applications. *ACS Applied Polymer Materials*, 2(3), 1092-1107.
55. Internet: Muir, V. G., and Burdick, J. A. (2020). Chemically modified biopolymers for the formation of biomedical hydrogels. *Chemical Reviews*. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/12/1392>, Son Erişim Tarihi: 17.03.2021.
56. Rafieian, S., Mirzadeh, H., Mahdavi, H., and Masoumi, M. E. (2019). A review on nanocomposite hydrogels and their biomedical applications. *Science and Engineering of Composite Materials*, 26(1), 154-174.
57. Wang, F., Chen, J., Liu, J., and Zeng, H. (2021). Cancer theranostic platforms based on injectable polymer hydrogels. *Biomaterials Science*, 9(10), 3543-3575.
58. Li, J., and Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 1-17.
59. Yan, C., Altunbas, A., Yucel, T., Nagarkar, R. P., Schneider, J. P., and Pochan, D. J. (2010). Injectable solid hydrogel: mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels. *Soft Matter*, 6(20), 5143-5156.
60. Cao, H., Duan, Y., Lin, Q., Yang, Y., Gong, Z., Zhong, Y., Chen, X., and Shao, Z. (2019). Dual-loaded, long-term sustained drug releasing and thixotropic hydrogel for localized chemotherapy of cancer. *Biomaterials Science*, 7(7), 2975-2985.
61. Uman, S., Dhand, A., and Burdick, J. A. (2020). Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(25), 48668.

62. Yu, S., He, C., and Chen, X. (2018). Injectable Hydrogels as Unique Platforms for Local Chemotherapeutics- Based Combination Antitumor Therapy. *Macromolecular Bioscience*, 18(12), 1800240.
63. Yan, S., Wang, T., Li, X., Jian, Y., Zhang, K., Li, G., and Yin, J. (2017). Fabrication of injectable hydrogels based on poly (L-glutamic acid) and chitosan. *RSC Advances*, 7(28), 17005-17019.
64. Guo, Z., Ma, W., Gu, H., Feng, Y., He, Z., Chen, Q., Mao, X., Zhanga, J., and Zheng, L. (2017). pH-Switchable and self-healable hydrogels based on ketone type acylhydrazone dynamic covalent bonds. *Soft Matter*, 13(40), 7371-7380.
65. Xu, J., Liu, Y., and Hsu, S. H. (2019). Hydrogels based on Schiff base linkages for biomedical applications. *Molecules*, 24(16), 3005.
66. Perera, M. M., and Ayres, N. (2020). Dynamic covalent bonds in self-healing, shape memory, and controllable stiffness hydrogels. *Polymer Chemistry*, 11(8), 1410-1423.
67. Sharma, P. K., and Singh, Y. (2019). Glyoxylic hydrazone linkage-based PEG hydrogels for covalent entrapment and controlled delivery of doxorubicin. *Biomacromolecules*, 20(6), 2174-2184.
68. Kharkar, P. M., Kiick, K. L., and Kloxin, A. M. (2013). Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. *Chemical Society Reviews*, 42(17), 7335-7372.
69. Sun, Y., Nan, D., Jin, H., and Qu, X. (2020). Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polymer Testing*, 81, 106283.
70. Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., and Wang, J. (2019). Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials Science*, 7(3), 843-855.
71. Huynh, C. T., Nguyen, M. K., and Lee, D. S. (2011). Injectable block copolymer hydrogels: achievements and future challenges for biomedical applications. *Macromolecules*, 44(17), 6629-6636.
72. Fliervoet, L. A., Engbersen, J. F., Schiffelers, R. M., Hennink, W. E., and Vermonden, T. (2018). Polymers and hydrogels for local nucleic acid delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(36), 5651-5670.
73. Hunt, J. A., Chen, R., van Veen, T., and Bryan, N. (2014). Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(33), 5319-5338.
74. Jonker, A. M., Löwik, D. W., and Van Hest, J. C. (2012). Peptide-and protein-based hydrogels. *Chemistry of Materials*, 24(5), 759-773.
75. İnternet: Kirillova, A., Yeazel, T. R., Asheghali, D., Petersen, S. R., Dort, S., Gall, K., and Becker, M. L. (2021). Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers. *Chemical Reviews*, URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.0c01200>, Son Erişim Tarihi: 25.03.2021.

76. Liang, K., Bae, K. H., and Kurisawa, M. (2019). Recent advances in the design of injectable hydrogels for stem cell-based therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(24), 3775-3791.
77. Salahuddin, B., Wang, S., Sangian, D., Aziz, S., and Gu, Q. (2021). Hybrid Gelatin Hydrogels in Nanomedicine Applications. *ACS Applied Bio Materials*, 4(4), 2886-2906.
78. Xing, Q., Yates, K., Vogt, C., Qian, Z., Frost, M. C., and Zhao, F. (2014). Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. *Scientific Reports*, 4(1), 1-10.
79. Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J., Malda, J., and Melchels, F. P. (2016). Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair. *Trends in Biotechnology*, 34(5), 394-407.
80. Hozumi, T., Kageyama, T., Ohta, S., Fukuda, J., and Ito, T. (2018). Injectable hydrogel with slow degradability composed of gelatin and hyaluronic acid cross-linked by schiff's base formation. *Biomacromolecules*, 19(2), 288-297.
81. Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., and He, N. (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research*, 5(1), 1-20.
82. Smeets, N. M., Bakaic, E., Patenaude, M., and Hoare, T. (2014). Injectable poly (oligoethylene glycol methacrylate)-based hydrogels with tunable phase transition behaviours: Physicochemical and biological responses. *Acta Biomaterialia*, 10(10), 4143-4155.
83. D'souza, A. A., and Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(9), 1257-1275.
84. Bakaic, E., Smeets, N. M., and Hoare, T. (2015). Injectable hydrogels based on poly (ethylene glycol) and derivatives as functional biomaterials. *RSC Advances*, 5(45), 35469-35486.
85. Li, L., Gu, J., Zhang, J., Xie, Z., Lu, Y., Shen, L., Dong, Q., and Wang, Y. (2015). Injectable and biodegradable pH-responsive hydrogels for localized and sustained treatment of human fibrosarcoma. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(15), 8033-8040.
86. Zhang, X., Jiang, S., Yan, T., Fan, X., Li, F., Yang, X., Ren, B., Xu, J., and Liu, J. (2019). Injectable and fast self-healing protein hydrogels. *Soft Matter*, 15(38), 7583-7589.
87. Zhu, Y., Luo, Q., Zhang, H., Cai, Q., Li, X., Shen, Z., and Zhu, W. (2020). A shear-thinning electrostatic hydrogel with antibacterial activity by nanoengineering of polyelectrolytes. *Biomaterials Science*, 8(5), 1394-1404.

88. Tu, Y., Chen, N., Li, C., Liu, H., Zhu, R., Chen, S., Xiao, Q., Liu, J., Ramakrishna, S., and He, L. (2019). Advances in injectable self-healing biomedical hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 90, 1-20.
89. Chen, M. H., Wang, L. L., Chung, J. J., Kim, Y. H., Atluri, P., and Burdick, J. A. (2017). Methods to assess shear-thinning hydrogels for application as injectable biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(12), 3146-3160.
90. George, S. K., (2017). *Injectable shear-thinning hydrogel composed of silicate nanoplatelets and gelatin with growth factor encapsulated polycaprolactone particles and cells*. Master's Thesis, University of Applied Sciences Technikum Wien, Cambridge, 13.
91. Dreiss, C. A. (2020). Hydrogel design strategies for drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48, 1-17.
92. Mahanta, A. K., and Maiti, P. (2019). Injectable hydrogel through hydrophobic grafting on chitosan for controlled drug delivery. *ACS Applied Bio Materials*, 2(12), 5415-5426.
93. Overstreet, D. J., Dutta, D., Stabenfeldt, S. E., and Vernon, B. L. (2012). Injectable hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50(13), 881-903.
94. Hou, M., Yang, R., Zhang, L., Zhang, L., Liu, G., Xu, Z., Kang, Y., and Xue, P. (2018). Injectable and natural humic acid/agarose hybrid hydrogel for localized light-driven photothermal ablation and chemotherapy of cancer. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(12), 4266-4277.
95. Narayanaswamy, R., and Torchilin, V. P. (2019). Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. *Molecules*, 24(3), 603.
96. Martín del Valle, E. M., Galan, M. A., and Carbonell, R. G. (2009). Drug delivery technologies: the way forward in the new decade. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(5), 2475-2486.
97. Sim, S., Figueiras, A., and Veiga, F. (2012). Modular hydrogels for drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, 185.
98. Knipe, J. M., and Peppas, N. A. (2014). Multi-responsive hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Regenerative Biomaterials*, 1(1), 57-65.
99. Bayat, M., and Nasri, S. (2019). Injectable microgel–hydrogel composites “plum pudding gels”: New system for prolonged drug delivery. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. Amsterdam: Elsevier, 343-372.
100. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., and Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 149-173.
101. Oliva, N., Conde, J., Wang, K., and Artzi, N. (2017). Designing hydrogels for on-demand therapy. *Accounts of Chemical Research*, 50(4), 669-679.

102. Norouzi, M., Nazari, B., and Miller, D. W. (2016). Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 21(11), 1835-1849.
103. Yamada, Y., and Schneider, J. P. (2016). Fragmentation of injectable bioadhesive hydrogels affords chemotherapeutic macromolecules. *Biomacromolecules*, 17(8), 2634-2641.
104. Wu, Y., Wang, H., Gao, F., Xu, Z., Dai, F., and Liu, W. (2018). An injectable supramolecular polymer nanocomposite hydrogel for prevention of breast cancer recurrence with theranostic and mammoplastic functions. *Advanced Functional Materials*, 28(21), 1801000.
105. Hu, C., Liu, X., Ran, W., Meng, J., Zhai, Y., Zhang, P., Yin, Q., Yu, H., Zhang, Z., and Li, Y. (2017). Regulating cancer associated fibroblasts with losartan-loaded injectable peptide hydrogel to potentiate chemotherapy in inhibiting growth and lung metastasis of triple negative breast cancer. *Biomaterials*, 144, 60-72.
106. Biswas, A., Ghosh, T., Gavel, P. K., and Das, A. K. (2020). PEG Functionalized Stimuli Responsive Self-Healable Injectable Dynamic Imino-boronate G-quadruplex Hydrogel for the Delivery of Doxorubicin. *ACS Applied Bio Materials*, 3(2), 1052-1060.
107. Buwalda, S. J., Vermonden, T., and Hennink, W. E. (2017). Hydrogels for therapeutic delivery: current developments and future directions. *Biomacromolecules*, 18(2), 316-330.
108. Zhou, J., Wang, M., Han, Y., Lai, J., and Chen, J. (2020). Multistage-targeted gold/mesoporous silica nanocomposite hydrogel as in situ injectable drug release system for chemophotothermal synergistic cancer therapy. *ACS Applied Bio Materials*, 3(1), 421-431.
109. Capanema, N. S., Carvalho, I. C., Mansur, A. A., Carvalho, S. M., Lage, A. P., and Mansur, H. S. (2019). Hybrid hydrogel composed of carboxymethylcellulose–silver nanoparticles–doxorubicin for anticancer and antibacterial therapies against melanoma skin cancer cells. *ACS Applied Nano Materials*, 2(11), 7393-7408.
110. Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., and Khademhosseini, A. (2014). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3), 441-453.
111. Jiang, Y., Krishnan, N., Heo, J., Fang, R. H., and Zhang, L. (2020). Nanoparticle–hydrogel superstructures for biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 324, 505-521.
112. Alvarez, G. S., H  lary, C., Mebert, A. M., Wang, X., Coradin, T., and Desimone, M. F. (2014). Antibiotic-loaded silica nanoparticle–collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(29), 4660-4670.

113. Xia, B., Zhang, W., Shi, J., Li, J., Chen, Z., and Zhang, Q. (2019). NIR light-triggered gelling in situ of porous silicon nanoparticles/PEGDA hybrid hydrogels for localized combinatorial therapy of cancer cells. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(17), 47443.
114. Jeznach, O., Kołbuk, D., and Sajkiewicz, P. (2018). Injectable hydrogels and nanocomposite hydrogels for cartilage regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(10), 2762-2776.
115. Ono, R. J., Lee, A. L. Z., Voo, Z. X., Venkataraman, S., Koh, B. W., Yang, Y. Y., & Hedrick, J. L. (2017). Biodegradable Strain-Promoted Click Hydrogels for Encapsulation of Drug-Loaded Nanoparticles and Sustained Release of Therapeutics. *Biomacromolecules*, 18(8), 2277-2285.
116. Eslahi, N., Simchi, A., Mehrjoo, M., Shokrgozar, M. A., and Bonakdar, S. (2016). Hybrid cross-linked hydrogels based on fibrous protein/block copolymers and layered silicate nanoparticles: tunable thermosensitivity, biodegradability and mechanical durability. *RSC Advances*, 6(67), 62944-62957.
117. Roozbahani, M., Kharaziha, M., and Emadi, R. (2017). pH sensitive dexamethasone encapsulated laponite nanoplatelets: Release mechanism and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 518(1-2), 312-319.
118. Li, K., Zhang, Y., Chen, M., Hu, Y., Jiang, W., Zhou, L., Li, S., Xu, M., Zhao, Q., and Wan, R. (2018). Enhanced antitumor efficacy of doxorubicin-encapsulated halloysite nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 19.
119. Zheng, L., Zhou, B., Qiu, X., Xu, X., Li, G., Lee, W. Y., Jiang, J., and Li, Y. (2019). Direct assembly of anticancer drugs to form Laponite-based nanocomplexes for therapeutic co-delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 1407-1414.
120. Liu, B., Li, J., Lei, X., Miao, S., Zhang, S., Cheng, P., Song, Y., Wu, H., Gao, Y., Bi, L., and Pei, G. (2020). Cell-loaded injectable gelatin/alginate/LAPONITE® nanocomposite hydrogel promotes bone healing in a critical-size rat calvarial defect model. *RSC Advances*, 10(43), 25652-25661.
121. Li, Y., Maciel, D., Tomás, H., Rodrigues, J., Ma, H., and Shi, X. (2011). pH sensitive Laponite/alginate hybrid hydrogels: swelling behaviour and release mechanism. *Soft Matter*, 7(13), 6231-6238.
122. Mondal, M. (2010). *Preparation and characterization of various nanofiller based thermoplastic polyurethane nanocomposites*. Doctoral Dissertation, Indian Institute of Technology, Kharagpur, 22.
123. Nagahama, K., Kawano, D., Oyama, N., Takemoto, A., Kumano, T., and Kawakami, J. (2015). Self-assembling polymer micelle/clay nanodisk/doxorubicin hybrid injectable gels for safe and efficient focal treatment of cancer. *Biomacromolecules*, 16(3), 880-889.
124. Zhang, Y., Tao, L., Li, S., and Wei, Y. (2011). Synthesis of multiresponsive and dynamic chitosan-based hydrogels for controlled release of bioactive molecules. *Biomacromolecules*, 12(8), 2894-2901.

125. Liu, M., Song, X., Wen, Y., Zhu, J. L., and Li, J. (2017). Injectable thermoresponsive hydrogel formed by alginate-g-poly (N-isopropylacrylamide) that releases doxorubicin-encapsulated micelles as a smart drug delivery system. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(41), 35673-35682.
126. Mo, X., Iwata, H., Matsuda, S., and Ikada, Y. (2000). Soft tissue adhesive composed of modified gelatin and polysaccharides. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(4), 341-351.
127. Wang, S., Wu, Y., Guo, R., Huang, Y., Wen, S., Shen, M., Wang, J., and Shi, X. (2013). Laponite nanodisks as an efficient platform for doxorubicin delivery to cancer cells. *Langmuir*, 29(16), 5030-5036.
128. Birlik Demirel, G., Aygul, E., Dag, A., Atasoy, S., Cimen, Z., and Cetin, B. (2020). Folic acid-conjugated pH and redox-sensitive ellipsoidal hybrid magnetic nanoparticles for dual-triggered drug release. *ACS Applied Bio Materials*, 3(8), 4949-4961.
129. Yan, S., Wang, T., Feng, L., Zhu, J., Zhang, K., Chen, X., Cui, L., and Yin, J. (2014). Injectable in situ self-cross-linking hydrogels based on poly (L-glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*, 15(12), 4495-4508.
130. Heo, D. N., Alioglu, M. A., Wu, Y., Ozbolat, V., Ayan, B., Dey, M., Kang, Y., and Ozbolat, I. T. (2020). 3D bioprinting of carbohydrazide-modified gelatin into microparticle-suspended oxidized alginate for the fabrication of complex-shaped tissue constructs. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(18), 20295-20306.
131. Thomas, J., Sharma, A., Panwar, V., Chopra, V., & Ghosh, D. (2019). Polysaccharide-Based Hybrid Self-Healing Hydrogel Supports the Paracrine Response of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Applied Bio Materials*, 2(5), 2013-2027.
132. Dawlee, S., Sugandhi, A., Balakrishnan, B., Labarre, D., and Jayakrishnan, A. (2005). Oxidized chondroitin sulfate-cross-linked gelatin matrixes: a new class of hydrogels. *Biomacromolecules*, 6(4), 2040-2048.
133. Xu, H., Zhang, L., and Cai, J. (2019). Injectable, Self-Healing, β -chitin-based hydrogels with excellent cytocompatibility, antibacterial activity, and potential as drug/cell carriers. *ACS Applied Bio Materials*, 2(1), 196-204.
134. Lei, J., Li, X., Wang, S., Yuan, L., Ge, L., Li, D., & Mu, C. (2019). Facile Fabrication of Biocompatible Gelatin-Based Self-Healing Hydrogels. *ACS Applied Polymer Materials*, 1(6), 1350-1358.
135. Vahedi, M., Barzin, J., Shokrolahi, F., and Shokrollahi, P. (2018). Self-Healing, Injectable Gelatin Hydrogels Cross-Linked by Dynamic Schiff Base Linkages Support Cell Adhesion and Sustained Release of Antibacterial Drugs. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303(9), 1800200.
136. Lai, J. Y., and Hsieh, A. C. (2012). A gelatin-g-poly (N-isopropylacrylamide) biodegradable in situ gelling delivery system for the intracameral administration of pilocarpine. *Biomaterials*, 33(7), 2372-2387.

137. Kascholke, C., Loth, T., Kohn-Polster, C., Möller, S., Bellstedt, P., Schulz-Siegmund, M., Schnabelrauch, M., and Hacker, M. C. (2017). Dual-Functional Hydrazide-Reactive and Anhydride-Containing Oligomeric Hydrogel Building Blocks. *Biomacromolecules*, 18(3), 683-694.
138. Luo, L. J., and Lai, J. Y. (2019). Amination degree of gelatin is critical for establishing structure-property-function relationships of biodegradable thermogels as intracameral drug delivery systems. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 897-909.
139. Pan, J. F., Yuan, L., Guo, C. A., Geng, X. H., Fei, T., Fan, W. S., Li, S., Yuan, H. F., Yan, Z. G., and Mo, X. M. (2014). Fabrication of modified dextran–gelatin in situ forming hydrogel and application in cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(47), 8346-8360.
140. Yan, S., Zhang, X., Zhang, K., Di, H., Feng, L., Li, G., Fang, J., Cui, L., Chen, X., and Yin, J. (2016). Injectable in situ forming poly (L-glutamic acid) hydrogels for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(5), 947-961.
141. Teixeira, L. S. M., Bijl, S., Pully, V. V., Otto, C., Jin, R., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J., and Karperien, M. (2012). Self-attaching and cell-attracting in-situ forming dextran-tyramine conjugates hydrogels for arthroscopic cartilage repair. *Biomaterials*, 33(11), 3164-3174.
142. Dong, R., Zhao, X., Guo, B., and Ma, P. X. (2016). Self-healing conductive injectable hydrogels with antibacterial activity as cell delivery carrier for cardiac cell therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(27), 17138-17150.
143. Lee, J. H. (2018). Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomaterials Research*, 22(1), 1-14.
144. Li, Y., Tan, Y., Xu, K., Lu, C., Liang, X., and Wang, P. (2015). In situ crosslinkable hydrogels formed from modified starch and O-carboxymethyl chitosan. *RSC Advances*, 5(38), 30303-30309.
145. Fathi, A., Mithieux, S. M., Wei, H., Chrzanowski, W., Valtchev, P., Weiss, A. S., and Dehghani, F. (2014). Elastin based cell-laden injectable hydrogels with tunable gelation, mechanical and biodegradation properties. *Biomaterials*, 35(21), 5425-5435.
146. Jiao, Y., Gyawali, D., Stark, J. M., Akcora, P., Nair, P., Tran, R. T., and Yang, J. (2012). A rheological study of biodegradable injectable PEGMC/HA composite scaffolds. *Soft Matter*, 8(5), 1499-1507.
147. Ma, X., Xu, T., Chen, W., Qin, H., Chi, B., and Ye, Z. (2018). Injectable hydrogels based on the hyaluronic acid and poly (γ -glutamic acid) for controlled protein delivery. *Carbohydrate Polymers*, 179, 100-109.
148. Li, T., Song, X., Weng, C., Wang, X., Sun, L., Gong, X., Yang, L., and Chen, C. (2018). Self-crosslinking and injectable chondroitin sulfate/pullulan hydrogel for cartilage tissue engineering. *Applied Materials Today*, 10, 173-183.

149. Hasan, M. M., Khan, M. N., Haque, P., and Rahman, M. M. (2018). Novel alginate-di-aldehyde cross-linked gelatin/nano-hydroxyapatite bioscaffolds for soft tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 1110-1117.
150. Zhao, X., Wu, H., Guo, B., Dong, R., Qiu, Y., and Ma, P. X. (2017). Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 122, 34-47.
151. Zhao, Q., Mu, S., Long, Y., Zhou, J., Chen, W., Astruc, D., Gaidau, C., and Gu, H. (2019). Tannin-Tethered Gelatin Hydrogels with Considerable Self-Healing and Adhesive Performances. *Macromolecular Materials and Engineering*, 304(4), 1800664.
152. Li, K., Wang, S., Wen, S., Tang, Y., Li, J., Shi, X., and Zhao, Q. (2014). Enhanced in vivo antitumor efficacy of doxorubicin encapsulated within laponite nanodisks. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(15), 12328-12334.
153. Rajabi, N., Kharaziha, M., Emadi, R., Zarrabi, A., Mokhtari, H., and Salehi, S. (2020). An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/gelatin methacrylate/Laponite® as a potential surgical sealant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 564, 155-169.
154. Zhang, X., Fan, J., Lee, C. S., Kim, S., Chen, C., and Lee, M. (2020). Supramolecular hydrogels based on nanoclay and guanidine-rich chitosan: Injectable and moldable osteoinductive carriers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(14), 16088-16096.
155. Tomás, H., Alves, C. S., and Rodrigues, J. (2018). Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications?. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2407-2420.
156. Cai, F. F., Heid, S., and Boccaccini, A. R. (2021). Potential of Laponite® incorporated oxidized alginate–gelatin (ADA-GEL) composite hydrogels for extrusion-based 3D printing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(8), 1090-1104.
157. Liu, B., Li, J., Lei, X., Cheng, P., Song, Y., Gao, Y., Hu, J., Wang, C., Zhang, S., Li, D., Wu, H., Sang, H., Bi, L., and Pei, G. (2020). 3D-bioprinted functional and biomimetic hydrogel scaffolds incorporated with nanosilicates to promote bone healing in rat calvarial defect model. *Materials Science and Engineering: C*, 112, 110905.
158. Golafshan, N., Rezahasani, R., Esfahani, M. T., Kharaziha, M., and Khorasani, S. N. (2017). Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydrate Polymers*, 176, 392-401.
159. Su, D., Jiang, L., Chen, X., Dong, J., and Shao, Z. (2016). Enhancing the gelation and bioactivity of injectable silk fibroin hydrogel with laponite nanoplatelets. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(15), 9619-9628.

160. Xavier, J. R., Thakur, T., Desai, P., Jaiswal, M. K., Sears, N., Cosgriff-Hernandez, E., Kaunas, R., and Gaharwar, A. K. (2015). Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *ACS Nano*, 9(3), 3109-3118.
161. Ianchis, R., Ninciuleanu, C. M., Gifu, I. C., Alexandrescu, E., Somoghi, R., Gabor, A. R., Preda, S., Nistor, C. L., Nitu, S., Petcu, C., Icriverzi, M., Florian, P. E., and Roseanu, A. M. (2017). Novel hydrogel-advanced modified clay nanocomposites as possible vehicles for drug delivery and controlled release. *Nanomaterials*, 7(12), 443.
162. Li, C., Mu, C., Lin, W., and Ngai, T. (2015). Gelatin Effects on the Physicochemical and hemocompatible properties of gelatin/pAAm/laponite nanocomposite hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(33), 18732-18741.
163. Stylianopoulos, T., Munn, L. L., and Jain, R. K. (2018). Reengineering the physical microenvironment of tumors to improve drug delivery and efficacy: from mathematical modeling to bench to bedside. *Trends in Cancer*, 4(4), 292-319.
164. Su, X., Mahalingam, S., Edirisinghe, M., and Chen, B. (2017). Highly stretchable and highly resilient polymer-clay nanocomposite hydrogels with low hysteresis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(27), 22223-22234.
165. Liu, M., Huang, P., Wang, W., Feng, Z., Zhang, J., Deng, L., and Dong, A. (2019). An injectable nanocomposite hydrogel co-constructed with gold nanorods and paclitaxel-loaded nanoparticles for local chemo-photothermal synergetic cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(16), 2667-2677.
166. Huang, W., Wang, Y., Chen, Y., Zhao, Y., Zhang, Q., Zheng, X., Chen, L., and Zhang, L. (2016). Strong and rapidly self-healing hydrogels: Potential hemostatic materials. *Advanced Healthcare Materials*, 5(21), 2813-2822.
167. Li, R., Lin, Z., Zhang, Q., Zhang, Y., Liu, Y., Lyu, Y., Li, X., Zhou, C., Wu, G., Ao, N., and Li, L. (2020). Injectable and in situ-formable thiolated chitosan-coated liposomal hydrogels as curcumin carriers for prevention of in vivo breast cancer recurrence. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(15), 17936-17948.
168. Stefanescu, E. A., Stefanescu, C., Daly, W. H., Schmidt, G., and Negulescu, I. I. (2008). Hybrid polymer-clay nanocomposites: a mechanical study on gels and multilayered films. *Polymer*, 49(17), 3785-3794.
169. Apostolides, D. E., and Patrickios, C. S. (2018). Dynamic covalent polymer hydrogels and organogels crosslinked through acylhydrazone bonds: Synthesis, characterization and applications. *Polymer International*, 67(6), 627-649.
170. Zhang, Z., Wang, X., Wang, Y., and Hao, J. (2018). Rapid-forming and self-healing agarose-based hydrogels for tissue adhesives and potential wound dressings. *Biomacromolecules*, 19(3), 980-988.
171. Yang, X., Liu, G., Peng, L., Guo, J., Tao, L., Yuan, J., Chang, C., Wei, Y., and Zhang, L. (2017). Highly efficient self-healable and dual responsive cellulose-based hydrogels for controlled release and 3D cell culture. *Advanced Functional Materials*, 27(40), 1703174.

172. Xu, X., Zeng, Z., Huang, Z., Sun, Y., Huang, Y., Chen, J., Ye, J., Yang, H., Yang, C., and Zhao, C. (2020). Near-infrared light-triggered degradable hyaluronic acid hydrogel for on-demand drug release and combined chemo-photodynamic therapy. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115394.
173. Anirudhan, T. S., and Mohan, A. M. (2014). Novel pH switchable gelatin based hydrogel for the controlled delivery of the anti cancer drug 5-fluorouracil. *Rsc Advances*, 4(24), 12109-12118.
174. Yin, O. S., Ahmad, I., and Amin, M. C. I. M. (2014, September). Synthesis of chemical cross-linked gelatin hydrogel reinforced with cellulose nanocrystals (CNC). In *AIP Conference Proceedings*, 1614(1), 375-380.
175. Liang, Y., Zhao, X., Ma, P. X., Guo, B., Du, Y., and Han, X. (2019). pH-responsive injectable hydrogels with mucosal adhesiveness based on chitosan-grafted-dihydrocaffeic acid and oxidized pullulan for localized drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 536, 224-234.
176. Bae, K. H., Wang, L. S., and Kurisawa, M. (2013). Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(40), 5371-5388.
177. Zhang, L., Liu, J., Zheng, X., Zhang, A., Zhang, X., and Tang, K. (2019). Pullulan dialdehyde crosslinked gelatin hydrogels with high strength for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 216, 45-53.
178. Liu, H., Shi, X., Wu, D., Kahsay Khshen, F., Deng, L., Dong, A., Wang, W., and Zhang, J. (2019). Injectable, biodegradable, thermosensitive nanoparticles-aggregated hydrogel with tumor-specific targeting, penetration, and release for efficient postsurgical prevention of tumor recurrence. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(22), 19700-19711.
179. Choi, Y. R., Kim, E. H., Lim, S., and Choi, Y. S. (2018). Efficient preparation of a permanent chitosan/gelatin hydrogel using an acid-tolerant tyrosinase. *Biochemical Engineering Journal*, 129, 50-56.
180. van den Bosch, E., and Gielens, C. (2003). Gelatin degradation at elevated temperature. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3-5), 129-138.
181. Xiao, S., Castro, R., Maciel, D., Gonçalves, M., Shi, X., Rodrigues, J., and Tomás, H. (2016). Fine tuning of the pH-sensitivity of laponite–doxorubicin nanohybrids by polyelectrolyte multilayer coating. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 348-356.
182. Kim, C. W., Kim, C. J., Park, E. H., Ryu, S., Lee, Y., Kim, E., Kang, K., Lee, K. Y., Choo, E. H., Hwang, B. H., Youn, H. J., Park, K. D., and Chang, K. (2020). MSC-Encapsulating in Situ Cross-Linkable Gelatin Hydrogels To Promote Myocardial Repair. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1646-1655.

183. Ewald, J., Blankenburg, J., Worm, M., Besch, L., Unger, R. E., Tremel, W., Frey, H., and Pohlitz, H. (2020). Acid-Cleavable Poly (ethylene glycol) Hydrogels Displaying Protein Release at pH 5. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 26(13), 2947.
184. Luo, J. W., Liu, C., Wu, J. H., Lin, L. X., Fan, H. M., Zhao, D. H., Zhuang, Y. Q., and Sun, Y. L. (2019). In situ injectable hyaluronic acid/gelatin hydrogel for hemorrhage control. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 628-634.





GAZİ GELECEKTİR..