

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİNE YÖNELİK DOĞRUDAN UYGULAMAYLA HEDEFLLENEN
NANOPARTİKÜLER KARGO TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Süheyl Furkan Konca

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Asuman Bozkır

Aralık

2023

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Süheyl Furkan Konca

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Asuman Bozkır danışmanlığında Süheyl Furkan Konca tarafından hazırlanan bu çalışma 11/12/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İmran VURAL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Asuman BOZKIR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

İmza:

Üye: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Meme Kanseriine Yönelik Doğrudan Uygulamayla Hedeflenen Nanopartiküler Kargo Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Süheyl Furkan Konca

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Asuman Bozkır

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde cerrahi sonrası adjuvan tedavi kaynaklı yara iyileşmesinin bozulması ve rezidüel kanser hücreleri kaynaklı kanserin nüks etmesi durumu hastanın yaşam kalitesini ciddi biçimde olumsuz etkilemektedir. Kanser tedavisinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler birçok avantajına rağmen sistemik kullanımdan kaynaklanan kısıtlayıcı faktörler çeşitli antikanser uygulamalarda ilaç etkinliğini sınırlandırabilmektedir. Özellikle lokal antikanser tedavilerde hedef bölgeden hızlı bir biçimde elimine olmaları hedef bölgede istenen uzatılmış salım özelliklerinin elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu aşamada hidrojel temelli ilaç taşıyıcı sistemler, yüksek tedavi etkinliğine sahip lokal terapinin sağlanabilmesi için hedef bölgede etkin maddenin kalma süresini uzatması, sistemik yan etkiyi azaltması ve çok yönlü bir tedavi planına olanak sağlaması özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Bu doğrultuda nanopartikül ve hidrojel formülasyonları birlikte kullanılarak elde edilen nanopartiküler kargo taşıyıcı sistemler ile tedavi verimliliği artırılmaktadır. Bu çalışmada rezidüel üçlü negatif meme kanserine yönelik lokal tedavi sağlanmak amacıyla kemoterapötik ajan doksorubisin yüklü Polietilenglikol-blok-polikaprolakton (PEG-b-PCL) nanopartikülleri geliştirilmiş, yüklü nanopartiküller karboksi metil selüloz (CMC), polietilenoksit (PEO) ve hyalüronik asit (HA) içeriğiyle bilgisayar destekli tasarlanan hidrojel formülasyonu içerisinde disperse edilerek formülasyonların in vitro ve in vivo etkinlikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak uzatılmış kontrollü salım ile antikanser etkinliğinin yanı sıra yara iyi edici niteliği ve cerrahi sonrası lokal kullanıma uygun formülasyon geliştirilmiştir.

2023, 199 sayfa

Anahtar kelimeler: Rezidüel meme kanseri, lokal tedavi, ilaç taşıyıcı sistem, hidrojel, nanopartikül

ABSTRACT

PhD Thesis

Development of Cargo Carrier Systems Targeted for Direct Application in Breast Cancer Treatment

Süheyl Furkan Konca

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Asuman Bozkır

Breast cancer ranks among the most common types of cancer worldwide in women. Notably, the impairment of wound healing due to post-surgical adjuvant therapy, and the recurrence of cancer owing to the presence of residual cancer cells, substantially compromise patient quality of life. Nanoparticular drug delivery systems are pivotal in surmounting the limitations inherent in conventional chemotherapy, substantially enhancing therapeutic effectiveness. Despite their numerous advantages, the limitations posed by systemic administration can curtail the efficacy of anticancer agents in various applications. Specifically, in local anticancer treatments, the rapid elimination of therapeutic agents from the target site complicates the achievement of desired sustained release profiles. In this context, hydrogel-based drug delivery systems emerge as a prominent solution, prolonging the residence time of the active agent at the target site, diminishing systemic side effects, and enabling a multifaceted treatment approach. This study thus leverages the synergistic combination of nanoparticle and hydrogel formulations to amplify drug efficacy and improve the efficiency of local treatment modalities. Polyethylene glycol-block-polycaprolactone (PEG-b-PCL) nanoparticles, encapsulating the chemotherapeutic agent doxorubicin, were developed for targeted treatment of residual triple-negative breast cancer. These nanoparticles were dispersed within a hydrogel formulation, computationally designed to incorporate carboxymethyl cellulose (CMC), polyethylene oxide (PEO), and hyaluronic acid (HA), with the aim of investigating the in vitro and in vivo efficacies of these formulations. Consequently, a formulation has been developed that not only exhibits high anticancer efficacy but also possesses wound-healing properties, making it well-suited for local application post-surgery.

2023, 199 pages

Keywords: Residual breast cancer, local treatment, drug carrier system, hydrogel, nanoparticle

TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumun her aşamasında bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan, tezimin fiziksel ve duygusal olarak en zor geçen zamanlarında her zaman bana karşı sabır ve anlayışla yaklaşan, çözüm odaklı pozitif tutumuyla motive ederek maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, paylaştığı deneyimleri ve yaşam bilgisi ile beni sadece akademik olarak değil hayatın kendisiyle daha derinlemesine bir anlayış kurmam konusunda ilham veren, öğrencisi olduğum için onur duyduğum, değerli doktora tez danışmanım, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a

Tez çalışmamda deneyimleriyle bana çok yardımcı olan, deneysel aşamalarda fikir ve çözümleriyle bu çalışmanın gelişimine büyük katkıları bulunan Dr. Öğr. Üyesi Umut Can ÖZ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN'e

In vivo çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde sağladığı imkân ve yol göstericiliği için minnettar olduğum Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'na ve ekibinde emeğini esirgmeden çok özverili bir şekilde çalışmalarına eşlik eden Dr. Sibel GÖKŞEN'e, destekleri için Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarımı yapma fırsatı bulduğum Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki deneysel aşamalarda yardımcı olan ve yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN'e,

Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki öğrencilik sürecim boyunca yardımsever ve hoşgörülü tutumları için tanımaktan mutluluk duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a, Doç. Dr. Arzu ATALAY'a, Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e,

Tez deneylerimde bilgisi ve deneyimlerinden istifade ettiğim hocam Dr. Öğr. Üyesi ÖZGE İNAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA'ya, yardımlarını ve emeğini hiç esirgemeyen Arş.Gör. Selin KURTER'e,

Destekleri ve dostlukları için Arş.Gör. Tuğrul Mert SERİM'e, Dr. Öğr. Üyesi Gizem Rüya TOPAL'a, Uzm.Ecz. Sena AYÇİÇEK'e,

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki değerli mesai arkadaşlarıma,

Tez sürecim boyunca maddi manevi desteğini hep hissettiğim, akademiye ve çalışmaya olan bakış açısını kendime örnek aldığım, bilimsel sohbetlerini her zaman büyük bir heyecanla anlatarak beni de bu heyecana dahil eden, çok kıymetli dostum Onur BENDER'e

Benim bu günlere ulaşmamda sonsuz emekleri olan ve bizi sevgiyle büyüten canım aileme, eğitim yaşantım boyunca beni cesaretlendiren ve teşvik eden babam Yusuf KONCA'ya, annem Fatma KONCA'ya, biricik kardeşlerim Feyza KONCA ve Eymen KONCA'ya,

Sevgi ve muhabbetleriyle en tatlı motivasyon kaynağım olan biricik ailem, canım kızım bal peteğim Zeynep Duru KONCA'ya ve canım eşim Sinem Kübra KONCA'ya sonsuz teşekkürlerimle.

Süheyl Furkan KONCA

Aralık 2023

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. KANSER GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.2. MEME KANSERİ.....	3
2.2.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI.....	3
2.2.1.1. Üçlü-Negatif Meme Kanseri.....	4
2.2.1.2. Rezidüel Meme Kanseri.....	5
2.3. MEME KANSERİNDE TEDAVİ STRATEJİLERİ	6
2.3.1. CERRAHİ UYGULAMALAR.....	6
2.3.2. KEMOTERAPİ.....	7
2.3.3. RADYASYON TEDAVİSİ.....	8
2.3.4. HORMON TEDAVİSİ	8
2.3.5. HEDEFLEYİCİ TEDAVİLER	8

2.3.6. NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER	9
2.3.7. DOKSORUBİSİN.....	10
2.3.8. pEGFP-C1 PLAZMİDİ.....	13
2.3.9. PEG-b-PCL	14
2.3.10. HİDROJEL SİSTEMLER.....	15
2.3.10.1. Enjektabl Hidrojeller.....	16
2.3.11. HYALÜRONİK ASİT	17
2.3.12. KARBOKSİ METİL SELÜLOZ	18
2.3.13. POLİ ETİLEN OKSİT	19
2.3.14. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİNDE YAZILIM DESTEKLİ DENEY TASARIMI	20
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	23
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	24
4.1. MATERYAL	24
4.1.1. HÜCRE HATLARI	24
4.1.2. DENEY HAYVANLARI	24
4.1.3. REAKTİF VE KİMYASALLAR	24
4.1.4. TAMPONLAR.....	25
4.1.5. KİTLER	27
4.1.6. KULLANILAN CİHAZLAR VE SARF MALZEME	27
4.2. YÖNTEM.....	29
4.2.1. DOKSORUBİSİN HCL'İN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	29
4.2.1.1. Doksorubisin HCl'nin Ultra Viyole (UV) Spektrumu.....	29

4.2.1.2.	Doksorubisin HCL'in Analitik Yöntemler ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu...	29
4.2.1.3.	Doksorubisin Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi	29
4.2.1.4.	Analitik Yöntem Validasyonu	30
4.2.1.4.1.	Doğrusallık.....	30
4.2.1.4.2.	Doğruluk	30
4.2.1.4.3.	Kesinlik.....	31
4.2.1.4.4.	Tekrarlanabilirlik	31
4.2.1.4.5.	Duyarlılık	31
4.2.1.4.6.	Özgüllük.....	32
4.2.2.	PLAZMİD DNA ÜRETİMİ	32
4.2.2.1.	Bakteriyel Besiyerinin Hazırlanması	32
4.2.2.2.	Plazmid DNA Transformasyonu	32
4.2.2.3.	Plazmid DNA İzolasyonu	33
4.2.2.4.	Agaroz Jel Elektroforezi	34
4.2.2.5.	Plazmid DNA Miktar Tayini	34
4.2.3.	NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİLMESİ.....	35
4.2.3.1.	Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Çalışmaları ve Hazırlanması.....	35
4.2.3.2.	Doksorubisin Yüklü Nanopartiküllerinin Eldesi	37
4.2.3.3.	pEGFP-C1 Yüklü Nanopartiküllerinin Eldesi	37
4.2.3.4.	PEG-b-PCL Nanopartiküllerinin Sterilizasyonu	37
4.2.4.	NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU	38

4.2.4.1. Zeta Potansiyeli Tayini	38
4.2.4.2. Enkapsülasyonun Etkinliğinin Değerlendirilmesi	38
4.2.4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının DSC Analizi	39
4.2.4.4. Nanopartikül Formülasyonlarının FTIR Analizi	39
4.2.4.5. Nanopartikül Formülasyonları TEM Görüntülemesi.....	39
4.2.4.6. İlaç Yüklü PEG-b-PCL Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilitate Çalışmaları.....	39
4.2.5. HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİMİ VE TASARIMI	40
4.2.5.1. Hidrojel Formülasyonlarının Sentezi.....	40
4.2.5.2. Hidrojel Formülasyonlarının Sterilizasyonu.....	40
4.2.5.3. Hidrojel Ön Formülasyon Çalışmaları ve Hazırlanması.....	40
4.2.5.4. Hidrojel Formülasyon Tasarımı.....	41
4.2.5.5. Hidrojellerin in vitro Yöntemlerle Karakterizasyonu	42
4.2.5.5.1. Hidrojellerde Vizkozite Tayini	42
4.2.5.5.2. Hidrojellerin Tekstür Profil Analizleri	42
4.2.5.5.3. Hidrojellerde Sertlik Tayini	43
4.2.5.5.4. Hidrojellerde Sıkıştırılabilirlik Tayini	44
4.2.5.5.5. Hidrojellerde Adheziflik Tayini.....	44
4.2.5.5.6. Hidrojellerde Koheziflik Tayini.....	44
4.2.5.5.7. Hidrojellerde Elastisite Tayini	44
4.2.5.5.8. Hidrojellerde Mukoadhezyon Tayini.....	45

4.2.5.5.9. Hidrojellerde Şırınga Edilebilirlik Tayini	45
4.2.5.6. Hidrojel Formülasyonlarında Stabilite Tayini	45
4.2.5.7. Etkin madde ve/veya Nanopartikül İçeren Hidrojel Formülasyon Karışımlarının Hazırlanması.....	45
4.2.5.8. İn vitro Salım Çalışmaları.....	46
4.2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	46
4.2.7. TRANSWELL HÜCRE ANALİZİ.....	47
4.2.8. IN VIVO HAYVAN DENEYLERİ	48
4.2.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	49
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	50
5.1. DOKSORUBİSİN HCL’NİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	50
5.1.1. DOKSORUBİSİN HCL’İN ULTRA VİYOLE (UV) SPEKTRUMU	50
5.1.2. DOKSORUBİSİN HCL MİKTAR TAYİNİ VE KALİBRASYONU	50
5.1.3. PLAZMİD DNA ÜRETİMİ VE KANTİTASYONU	53
5.1.4. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU	54
5.1.4.1. Doğrusallık.....	54
5.1.4.2. Doğruluk	54
5.1.4.3. Kesinlik.....	56
5.1.4.4. Tekrarlanabilirlik	58
5.1.4.5. Duyarlılık	59
5.1.4.6. Özgüllük.....	59
5.1.5. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİLMESİ	59

5.1.5.1. Nanopartikül Ön Formülasyon Çalışmaları	59
5.1.5.2. Etkin Madde Yüklü PEG-b-PCL Nanopartiküllerinin Eldesi.....	61
5.1.6. NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU	64
5.1.6.1. Nanopartikül Formülasyon Bileşenleri DSC Analizi	64
5.1.6.2. Nanopartikül Formülasyon Bileşenleri FTIR Analizi.....	65
5.1.6.3. Nanopartikül Formülasyonları TEM Görüntülemesi.....	66
5.1.6.4. Doksorubisin Yüklü PEG-b-PCL Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilite Çalışmaları	68
5.2. HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİMİ VE TASARIMI.....	72
5.2.1. DİZAYN FORMÜLASYONUNUN SEÇİMİ.....	72
5.2.2. DİZAYN YANITLARININ İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ.....	77
5.2.3. DİZAYN YANITLARI İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ	77
5.2.4. HİDROJEL DİZAYN OPTİMİZASYONU	78
5.2.5. DİZAYN ÇÖZÜM YANITLARININ ELDESİ VE DOĞRULANMASI	84
5.3. HİDROJELLERİN İN VİTRO YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR	87
5.3.1. HİDROJEL TEKSTÜR GRAFİKLERİ.....	87
5.3.2. FORMÜLASYON İN VİTRO SALIM BULGULARI	94
5.3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE HAYVAN DENEY BULGULARI	96
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>102</u>
6.1. TARTIŞMA	102
6.1.1. DOKSORUBİSİNİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	102
6.1.2. DOKSORUBİSİN ANALİTİK VALİDASYONU	102

6.1.3. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİLMESİ	103
6.1.4. FORMÜLASYONLARDA DSC ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	105
6.1.5. FORMÜLASYONLARDA FT-IR ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	105
6.1.6. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ TEM GÖRÜNTÜLEMESİ...	106
6.1.7. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ STABİLİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	106
6.1.8. HİDROJEL FORMÜLASYON TASARIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ	107
6.1.9. FORMÜLASYON TASARIMINDA BAĞIMLI PARAMETRELERİN HİDROJEL MEKANİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	109
6.1.10. HİDROJEL FORMÜLASYONU ADHEZİF VE MUKOADHEZİF ÖZELLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	111
6.1.11. HİDROJEL FORMÜLASYONU ŞIRINGA EDİLEBİLİRLİK ÖZELLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	112
6.1.12. FORMÜLASYONLARDA İN VİTRO SALIM DEĞERLENDİRMESİ.....	113
6.1.13. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE HAYVAN DENEYLERİ DEĞERLENDİRMESİ	115
6.1.13.1. Hücre Kültürü Değerlendirmeleri	115
6.1.13.2. Fare Deneyleri.....	116
6.2. SONUÇ.....	117
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>119</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>139</u>
EK 1: 5 RPM VİZKOZİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ.....	139
EK 2: 5 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	140

EK 3: 5 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ	140
EK 4: 10 RPM VİZKOZİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ	141
EK 5: 10 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	142
EK 6: 10 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ	142
EK 7: 20 RPM VİZKOZİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ	143
EK 8: 20 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	144
EK 9: 20 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ	144
EK 10: SERTLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ	145
EK 11: SERTLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	146
EK 12: SERTLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ	146
EK 13: SIKIŞTIRILABİLİRLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ	147
EK 14: SIKIŞTIRILABİLİRLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	148
EK 15: SIKIŞTIRILABİLİRLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ.....	148
EK 16: ADHEZİFLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ.....	149
EK 17: ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	150
EK 18: ADHEZİFLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ	150
EK 19: KOHEZİFLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ.....	151
EK 20: KOHEZİFLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	152
EK 21: KOHEZİFLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ	152

EK 22: ELASTİSİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ	153
EK 23: ELASTİSİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI	154
EK 24: ELASTİSİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ.....	154
EK 25: ETİK KURUL KARARI.....	155
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	156
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	159



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DOX HCl moleküler yapısı.....	11
Şekil 2.2. pEGFP-C1 plazmid haritası.....	14
Şekil 2.3. PEG-b-PCL molekül yapısı.....	15
Şekil 2.4. HA molekül yapısı.....	17
Şekil 2.5. CMC molekül yapısı	19
Şekil 2.6. PEO molekül yapısı.....	20
Şekil 4.1. Nanopartikül üretim şeması.....	36
Şekil 4.2. Hidrojel deney tasarımı akış şeması.....	42
Şekil 4.3. Tekstür profil analizinde birincil tekstür ölçümleri ve türetilen tekstür parametrelerinin orijin belirteçleri.....	43
Şekil 4.4. Etkin madde ve/veya nanopartikül içeren hidrojel formülasyon karışımlarının hazırlanması.....	46
Şekil 4.5. İn vivo hayvan modelinde formülasyonların uygulanması	49
Şekil 5.1. Dokсорubisin HCl ve PEG-b-PCL DMSO UV spektrumu	50
Şekil 5.2. DOX HCl DMSO’da kalibrasyon doğru ve denklemi (n=3)	51
Şekil 5.3. DOX HCl pH 7.4 PB’da kalibrasyon doğru ve denklemi (n=3)	51
Şekil 5.4. DOX HCl pH 5.8 PB’da kalibrasyon doğru ve denklemi (n=3)	52
Şekil 5.5. Agaroz jel görüntülemesi	53
Şekil 5.6. Plazmid bantları piksel yoğunluğu ölçümü (ImageJ).....	53
Şekil 5.7. Optimize nanopartikül formülasyonu üretim şeması	62

Şekil 5.8. Nanopartikül formülasyon bileşenleri DSC analizi; a) Boş NP, b) DOX NP, c) DOX, e) PEG-b-PCL, f) PEG-b-PCL ve DOX Fiziksel Karışım (10:1).....	64
Şekil 5.9. Nanopartikül Formülasyon Bileşenleri FT-IR Analizi.....	65
Şekil 5.10. NP formülasyonları TEM görüntüleri; A,B: Boş NP, C,D: DOX NP	66
Şekil 5.11. PEG-b-PCL/DDAB NP formülasyonları TEM görüntüleri; A-B: pEGFP-C1 NP, C-D: Boş NP.....	67
Şekil 5.12. DOX NP partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafiği	69
Şekil 5.13. +4°C DOX NP partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafiği; A:30 gün, B:60 gün, C:90 gün	70
Şekil 5.14. +25°C DOX NP partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafiği; A:30 gün, B:60 gün, C:90 gün	71
Şekil 5.15. Dizayn grafikleri: A: Ham dizayn iki boyutlu grafiği B: Ham dizayn üç boyutlu grafiği, C: Standart dizilime göre üç boyutlu dizayn.....	75
Şekil 5.16. Numerik optimizasyon kontür grafiği A: Vizkozite 5 rpm B: Vizkozite 10 rpm C: Vizkozite 20 rpm	80
Şekil 5.17. Nümerik optimizasyon kontür grafiği, A: Sertlik, B: Sıkıştırılabilirlik, C: Adheziflik, D: Koheziflik, E: Elastisite.....	81
Şekil 5.18. Numerik optimizasyon 3D yüzey grafiği, A: Vizkozite (5 rpm), B: Vizkozite (10 rpm), C: Vizkozite (20 rpm).....	82
Şekil 5.19. Nümerik opimizasyon 3D yüzey grafiği, A: Sertlik, B: Sıkıştırılabilirlik, C: Adheziflik, D: Koheziflik, E: Elastisite.....	83
Şekil 5.20. Optimize formül tekstür ölçümleri A: Tekstür grafiği, B: Mukoadhezyon	88
Şekil 5.21. Hidrojel formülasyonları (HJ 1-HJ 2-HJ 3) tekstür grafikleri.....	89
Şekil 5.22. Hidrojel formülasyonları (HJ 4-HJ 5-HJ 6) tekstür grafikleri.....	90

Şekil 5.23. Hidrojel formülasyonları (HJ 7-HJ 8-HJ 9) tekstür grafikleri.....	91
Şekil 5.24. Hidrojel formülasyonları (HJ 1-HJ 2-HJ 3) mukoadhezyon grafikleri	92
Şekil 5.25. Hidrojel formülasyonları (HJ 4-HJ 5-HJ 6) mukoadhezyon grafikleri	92
Şekil 5.26. Hidrojel formülasyonları (HJ 7-HJ 8-HJ 9) mukoadhezyon grafikleri	93
Şekil 5.27. DOX NP HJ, NP HJ ve HJ formülasyonlarına ait şırınga edilebilirlik grafiği .	93
Şekil 5.28. Formülasyonların pH 7.4 fosfat tamponunda kümülatif salım profili.....	95
Şekil 5.29. Formülasyonların pH 5.8 fosfat tamponunda kümülatif salım profili.....	95
Şekil 5.30. Formülasyonların NIH/3T3 ve 4T1 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine ...	96
Şekil 5.31. Formülasyon uygulaması sonrası 48 saat transwell assay ortalama floresan yoğunlukları (OFY).....	97
Şekil 5.32. Formülasyonların ön deneme IVIS görüntülemesi	98
Şekil 5.33. A) Tümör bölgesi floresan yoğunluklarının görüntülemesi B) Tümör bölgesi floresan yoğunluk değerleri (FY: Floresan yoğunluğu, OFY: Ortalama floresan yoğunluğu)	100
Şekil 5.34. Yara iyileşmesi görüntüleri (Gün).....	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hücre hatları ve ortam içerikleri	24
Çizelge 5.1. İzole edilen plazmid konsantrasyonları.....	54
Çizelge 5.2. Formülasyon süpernatantlarındaki plazmid konsantrasyonu ve formüllerin enkapsülasyon verimlilikleri.....	54
Çizelge 5.3. Dokсорubisin DMSO tayin yöntemine ait doğruluk bulguları	55
Çizelge 5.4. Dokсорubisin PB tayin yöntemine ait doğruluk bulguları.....	55
Çizelge 5.5. Dokсорubisin DMSO tayin yöntemine ait kesinlik bulguları.....	56
Çizelge 5.6. Dokсорubisin PB tayin yöntemine ait kesinlik bulguları.....	57
Çizelge 5.7. Dokсорubisin DMSO tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları.....	58
Çizelge 5.8. Dokсорubisin DMSO tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları.....	58
Çizelge 5.9. Dokсорubisin tayin yöntemlerine ait duyarlılık bulguları	59
Çizelge 5.10. Nanopartikül ön formülasyonları	60
Çizelge 5.11. Plazmid ve dokсорubisin yüklemesi yapılan nanopartikül formülasyonları .	63
Çizelge 5.12. DOX NP' e ait stabilite örneklerinin partikül boyutu ve zeta potansiyeli.....	68
Çizelge 5.13. İki faktörlü değişkene göre standart değerlerinin gösterimi.....	72
Çizelge 5.14. Hidrojel ön formülasyonlarına ait dizayn aralıkları ve dizayn formülleri.....	73
Çizelge 5.15. Optimize edilmesi için seçilen dizayn aralığındaki jel formülasyonları	74
Çizelge 5.16. Hidrojel formülasyonlarına ait ortalama yanıt değerleri tablosu.....	76
Çizelge 5.17. Kodlanmış faktörler açısından nihai denklem.....	77
Çizelge 5.18. Deney tasarımında dizayn yanıt hedefleri	78

Çizelge 5.19. Nümerik optimizasyon çözümleri	79
Çizelge 5.20. Dizayn çözümünde seçilen optimize formülasyona ait yanıt değerleri.....	84
Çizelge 5.21. Analiz sonrası nokta tahmini ve doğrulama değerleri.....	85
Çizelge 5.22. Analiz sonrası dizayn katsayı tablosu $p < 0.05$ olan değerler	86
Çizelge 5.23. Hidrojel formülasyonlarına ait adhezyon ve mukoadhezyon verileri	87
Çizelge 5.24. Şırınga edilebilirlik kuvvet değerleri (N)	94
Çizelge 5.25. Doksorubisin yüzde kümülatif salımı	94



SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan tıp kültür koleksiyonu)
Bç	Baz çifti
BS	Bağıl sapma
CHCl_3	Kloroform
CMC	Karboksi metil selüloz
ddH_2O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco modifiye eagle besi ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel taramalı kalorimetri)
DOX	Doxorubicin (Doksorubisin)
EGFP-C1	Enhanced Green Fluorescent Protein (Güçlendirilmiş Yeşil Floresan Protein)
EV	Enkapsülasyon verimliliği
FY	Floresan yoğunluğu
GA	Güven aralığı
GK	Geri kazanım
HA	Hyalüronik asit
HJ	Hidrojel
LOD	Limit of detection (Teşhis sınırı)
LOQ	Limit of quantification (Tayin sınırı)
MFI	Mean Fluorescence Intensity (Ortalama floresan yoğunluğu)
ml	Mililitre
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür
MwCO	Molecular weight cut off (Moleküler ağırlı sınırı)
NP	Nanopartikül

OFY	Ortalama floresan yoğunluğu
PDI	Polidispersite indeksi
PEG-b-PCL	Poli(etilen glikol)-blok-poli(ϵ -kaprolakton)
PVA	Poli vinil alkol
pDNA	Plazmid DNA
sn	Saniye
SS	Standart sapma
TA	Tolerans aralığı
TEM	Transmission electron microscopy (Geçirimli elektron mikroskobu)
THA	Tahmin aralığı
TNBC	Triple negative breast cancer (Üçlü negatif meme kanseri)
UV-VIS	Ultraviyole görünür bölge spektroskopisi
VBF	Varyans büyütme faktörü
VK	Varyasyon katsayısı

1. GİRİŞ

Kanser tedavisi modern çağın en büyük sağlık zorluklarından birini temsil etmekte olup küresel ölüm oranlarında ikinci sırada yer almaktadır (2). Bu durumun en önemli etmenleri kemoterapi, radyasyon tedavisi ve cerrahi rezeksiyon gibi geleneksel tedavi yaklaşımlarının sınırlılıkları ve yan etkileridir. Özellikle antikanser bileşenlerin neden olduğu ciddi yan etkiler, tedavi stratejilerinin genel başarısını belirgin ölçüde etkileyebilmektedir (3, 4). Bu durum daha gelişmiş ve daha etkili ilaç taşıyıcı sistemlere yönelik stratejilerin geliştirilmesinin hayati bir öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Nanopartiküler sistemler yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler arasında düşük toksisitesi, etkin ve kontrollü ilaç salımı, hedefleme yeteneği ve ilaç direncine karşı etkinliği nitelikleriyle kanser tedavilerinde kullanımı dikkat çekmektedir (5). Fakat sistemik uygulamalar dolayısıyla nanopartikül temelli tedavilerin hedeflenen ilaç salım profilini bazı durumlarda karşılayamamaları, tümör mikro çevresinde düşük verimlilikte birikim gösterebilmeleri, dokular arası bariyerlerden düşük geçiş özellikleri tedavi sürecinde görülen önemli kısıtlamalardır (6). Özellikle lokal uygulama tercih edilen kanser tedavilerinde nanopartiküllerin küçük boyutları ve vücuttan hızlı eliminasyonu lokal uygulamada uzun süreli terapötik etkinlik sağlama yeteneklerini sınırlamaktadır (7). Bu noktada hidrojel tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler etkin bir yerel tedavi yöntemi olarak belirgin bir avantaj sunmaktadır. Hidrojellerin büyük miktarda su tutabilme kabiliyetleri, biyoyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikleri, üç boyutlu ağ yapıları onları farmasötik uygulamalar için umut verici kılmaktadır (8). Özellikle hidrojellerin temel özelliklerini taşıyan enjektabl hidrojeller, cerrahi uygulamalara gerek kalmaksızın terapötik ajanların kontrollü salımının yanı sıra doğrudan hedef dokuya uygulanmalarını mümkün kılmaktadır (9, 10). Bu nitelikleri dolayısıyla hidrojeller kanser lokal terapilerinde ve cerrahi sonrası nükslerin önlenmesinde işlevsel ve etkili ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır (11).

Bu tez çalışmasında farmasötik ilaç taşıyıcı sistemler olarak hazırlanan doksorubisin enkapsüle edilmiş nanopartikül ve hidrojel formülasyonlarının karakterizasyon ölçümleri, in vitro salım profilleri, stabilite çalışmaları yapılarak hazırlanan formülasyonlarının NIH 3T3-L1 fibroblast hücreleriyle biyoyumlulukları, 4T1 meme kanseri hücrelerinde

antikanser etkinliğin yanı sıra BABL/c farelerde 4T1-Luc hücreleriyle üçlü negatif meme kanseri modeli oluşturularak in vivo tedavi etkinliğinin değeriendirilmesi amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

Rezidüel meme kanserine yönelik tedavide başarılı bir tedavi sürecinin sağlanması için cerrahi sonrası antikanser ajanlar ilaç taşıyıcı sistemler ile verimliliği artırılmakta ve hedeflenen tedaviye yönelik olarak modifiye edilebilmektedir.

2.1. KANSER GENEL ÖZELLİKLERİ

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize kompleks bir hastalıktır ve küresel olarak halk sağlığı açısından büyük bir öneme sahiptir. Kanser oluşumu hücrede, dokuda ve organda meydana gelebilmekte ve bu da çok sayıda kanserle sonuçlanan patolojik değişimlere yol açmaktadır. Kanser hücrelerindeki apoptozdan kaçınma, sınırsız bölünme kapasitesi, gelişmiş anjiyogenez, büyüme karşıtı sinyallere direnç ve kendi büyüme sinyallerinin yanı sıra metastaz yapma özellikleri hastalığın ilerlemesini sağlayan ana mekanizmalar arasında yer almaktadır (12). Başlıca kanser tipleri arasında akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanseri bulunur ve her biri benzersiz patolojik özellikler sergiler. Erken tespit ve tedavideki ilerlemelere rağmen kanserin yüksek morbidite ve mortalite oranları alanda tedaviye yönelik ihtiyaca dikkat çekmektedir (13).

2.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri günümüzde dünya çapında yaklaşık olarak 2,3 milyon yeni vaka sayısıyla en yaygın teşhis edilen kanserlerden biridir ve kansere bağlı ölümlerin önemli bir kısmını meme kanseri vakaları oluşturmaktadır (14). Meme kanserinin gelişiminde yaş ve kan grubu gibi demografik faktörler, hamilelik ve menopoza ilişkin üreme faktörleri, hormonal ve kalıtsal faktörler, sağlıklı yaşam biçimi ve olumsuz çevresel koşullar risk faktörleri oluşturan etkenler arasında yer almaktadır (15).

2.2.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI

Meme kanseri heterojen yapıda olması dolayısıyla çeşitli parametrelere göre sınıflandırılabilir. Meme kanseri biyolojik olarak birkaç farklı kategoriye ayrılır ve bu ayırım genellikle hücrelerin östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 üzerindeki ekspresyonuna dayanır. Buna göre kendi arasında invazif duktal karsinom, invazif lobüler karsinom, duktal karsinom in situ ve lobüler

karsinom in situ olarak alt sınıflara ayrılır (16). Bu sınıflandırma, belirli ilaçların bu reseptörleri hedeflediği için terapötik karar verme sürecini önemli ölçüde etkiler. Moleküler alt tiplere göre sınıflandırıldığında ise luminal A, luminal B, HER2-zengin ve bazal benzeri olarak üç alt türe ayrılır. Bu moleküler sınıflandırma, tedavi stratejilerine rehberlik eder ve prognoza dair yönlendirmeyi sağlar (17, 18).

2.2.1.1. Üçlü-Negatif Meme Kanseri

Üçlü-negatif meme kanseri (TNBC) progesteron reseptörünün, östrojen reseptörünün ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2'nin ifadeninmesinin olmadığı heterojen bir alt meme kanseri türü olarak nitelendirilmektedir. TNBC beşte birlik bir payla meme kanseri vakalarının önemli bir bölümünü oluşturmasıyla dikkat çekmektedir (19). Moleküler alt tip sınıflamasında bazal benzeri özellik gösteren TNBC agresif fenotip ve yüksek metastaz karakteristikleri dolayısıyla meme kanseri türleri arasında tedavisi en zor olandır.

Diğer alt türlerle kıyaslandığında TNBC hastalarının genel sağkalım süreleri daha kısa olup ilk beş yıl içindeki ölüm oranları %40 civarındadır (20). TNBC ile görece artan metastatik oran çoklu tümör baskılayıcı genlerdeki gen değişikliklerine ve genomik instabilite ile ilişkilendirilmektedir (21). TNBC'li hastaların metastaz sonrası yaşam süresi genellikle 13.3 aydır ve hastalığın ameliyat sonrası tekrarlama oranı %25'tir. Metastaz genellikle iç organlara ve beyne yayılır ve uzak metastaz çoğunlukla tanıdan sonraki üçüncü yılda meydana gelir. TNBC'den farklı türde kanser alt tipine sahip olan hastalarda ortalama yeniden nüksetme süresi 35-67 ay iken, TNBC hastalarında bu sadece 19-40 ay olarak seyretmektedir ve TNBC hastalarında nüksetme sonrası ilk üç ay içinde ölüm oranları %75'tir (20, 22).

TNBC diğer meme kanseri türleri ile karşılaştırıldığında sınırlı tedavi seçeneklerine sahip olması, nüks ve metastaza eğilim göstermesi ve daha düşük verimlilikte prognoza sahiptir. ER, PR ve HER2'nin hiçbirini ifade edilmemesi dolayısıyla bu hastalar için özgül endokrin ve hedefli tedaviler genellikle etkili olmamaktadır. Bu durum kemoterapinin TNBC tedavisi için ana tedavi seçeneği haline gelmesine neden olmuştur. Son yıllarda çalışmalarda TNBC tedavisinde tercih edilen neoadjuvan kemoterapi rutinlerinin kullanılmasının hormon reseptörü pozitif meme kanseri türlerine kıyasla daha anlamlı daha

yüksek bir patolojik iyileşme oranlarına sahip olduğunu ve TNBC hasta tedavisinin belirgin düzeyde iyileştirebilme niteliği olduğunu göstermiştir (23).

Kanserin heterojenitesi ve çeşitli patolojik özellikleri dolayısıyla TNBC tedavisine spesifik için özel bir kılavuz bulunmamaktadır. Yüksek riske sahip TNBC tedavilerinde antrasiklin-taksan gibi birden fazla ajanın kombine olarak kullanılabildiği çok sayıda kemoterapötik rejim mevcuttur. Benzer şekilde epirubisin, 5-florourasil (5-FU), siklofosamid (CP) rejimleri ve ardından dosetaksel (DTX) veya paklitaksel (PTX) de orta ila yüksek riskli vakalarda adjuvan kemoterapötik rejimler olarak kullanılır. Platin tabanlı ilaçlar olarak da sisplatin, karboplatin ve antrasiklin bileşikler de dahil olmak üzere neoadjuvan tedavi olarak uygulanabilmektedir (24).

2.2.1.2. Rezidüel Meme Kanseri

Kanserin tedavisi sonrasında genellikle minimal rezidüel hastalık olarak adlandırılan sağ kalan hücreler kanserin yeniden nüks etmesine neden olurlar ve neoadjuvan terapiyi takiben kalıcı hastalığı tanımlamak için kullanılırlar. Genellikle cerrahi öncesi bir uygulama olan neoadjuvan terapi ana tedavinin öncesinde tümör boyutunun küçültülmesi için başvuru bir tedavidir. Kalan kanser hücrelerinin varlığı düşük verimli bir prognozu işaret eder ve ek tedavi stratejilerinin gerekliliğini gösterir. Nüks lokal olarak eradike edilen kanserle aynı yerde, kanser primer bölgeye yakın lenf düğümlerinde veya vücudun tamamen farklı bir bölgesinde meydana gelebilir (25, 26). TNBC’de hedeflenecek reseptörlerin ifadesinin olmaması antikanser tedaviyi özellikle zor bir duruma getirir, çünkü diğer meme kanseri türleri için kullanılan hormonal tedavilere veya hedefli terapilere yanıt vermez (23). Rezidüel hastalık TNBC bağlamında özellikle önemlidir çünkü TNBC'nin agresif doğası, sınırlı tedavi seçenekleri genellikle neoadjuvan tedavi sonrası diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha yüksek bir kalan hastalık insidansına yol açmaktadır. TNBC ayrıca benzersiz bir nüks modeline sahiptir. Tüm meme kanserlerinin nüks etme potansiyeli olmasına rağmen TNBC daha büyük olasılıkla ilk tedaviden sonraki ilk üç ila beş yıl içinde nüks etmekte ve zirve yaklaşık üç yılda bir görülmektedir. Ayrıca özellikle beyin ve akciğerlere daha yüksek düzeyde bir uzak metastaz olasılığı vardır (27). TNBC'deki rezidüel hastalık ve nüksün altında yatan mekanizmaları anlamak, daha etkili tedavilerin geliştirilmesi için hayati öneme sahiptir. Hedeflenen nanopartikül kargo taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, kalıcı ve nükseden TNBC'ye doğrudan müdahale etmek için

umut vaat eden bir yaklaşım sunabilmektedir. Bu nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler ilaçları doğrudan tümör bölgesini hedefleyerek genellikle TNBC'yi karakterize eden terapötik direnci aşabilir ve nüks riskini azaltabilir (28).

2.3. MEME KANSERİNDE TEDAVİ STRATEJİLERİ

Meme kanserinde izlenen tedavi stratejileri adjuvan ve neoadjuvan kemoterapi gibi geleneksel yaklaşımlar, cerrahi, radyasyon tedavisi, hedefe yönelik endokrin/moleküler terapi ve kemoterapiyi içermektedir (29). Hastalığın heterojenliği dolayısıyla tedavi protokolü, hastalığın karakterizasyonuna ve evresine göre bireysel vakalarda rasyonelleştirilmiş tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Geleneksel olarak, radikal mastektomi ve modifiye radikal mastektomi, lokal-bölgesel tedavi için ana akım prosedürlerin yerini ve son zamanlara meme koruyucu cerrahi ve meme radyasyonu tercih edilen protokoller almıştır. Bu tedavi yaklaşımları göz önüne alınarak lokal olarak ilerlemiş ve cerrahiyle çıkarılabilir meme kanseri için neoadjuvan kemoterapi lokal temelli tedaviler için hayati bir strateji haline gelmiştir (30).

2.3.1. CERRAHİ UYGULAMALAR

Cerrahi uygulamalarda meme kanserli dokuların çıkarılmasını sağlayan meme koruyucu cerrahi ve mastektomi olmak üzere iki ana prosedür türü bulunmaktadır. Tümör boyutuna, konumuna ve yayılımına bağlı olarak kısmi/segmental mastektomi, lumpektomi, geniş lokal eksizyon veya kuadrantektomi olarak da adlandırılan meme koruyucu cerrahi genellikle onkoplasti adı verilen plastik cerrahi teknikleriyle birlikte sağlam meme dokusunun eş zamanlı olarak korunmasıyla kanserli dokunun çıkarılmasına olanak sağlar (31). Mastektomi uygulaması memenin tamamen çıkarılma uygulamasını içerir ve genellikle hemen ardından meme yeniden yapılandırması yapılır. Mastektomi sırasında kanserden etkilenen lenf düğümleri çıkarılır, sentinel lenf düğümü biyopsisi yapılır ve ek olarak aksiller lenf düğümü diseksiyonu gerçekleştirilir. Meme koruyucu cerrahi hastalar için görece daha faydalı gibi görünse de bu teknikle tedavi edilen kişiler sıklıkla tam bir mastektomiye daha fazla ihtiyaç duyma eğilimi gösterirler (32).

2.3.2. KEMOTERAPİ

Meme kanseri terapisinde kemoterapi sistemik bir tedavi olarak yer almaktadır. Uygun tedavi türünün seçilmesinde meme tümörünün karakteristikleri göz önünde bulundurulmaktadır. Kemoterapötik ajanların kullanımı genellikle ameliyat öncesi veya sonrası, yani neoadjuvant veya adjuvan terapi olarak planlanır. Öncelikli olarak kanser hücrelerinde proliferasyonu seçici olarak inhibisyonu ve apoptozu aktivasyonu amaçlanır. Kemoterapide ilaç yan etkileri aşılması gereken önemli bir problemdir. Uzun süreli tedavilerde kanser adaptif bir cevap olarak ilaca karşı direnç geliştirme eğilimi gösterirler bunun yanı sıra hasta orta ila şiddetli yan etkilerle karşılaşır (33). Kemoterapiye verilen yanıt meme kanseri alt türlerine bağlı olarak değişebilir. Meme kanseri alt türlerinin genetik, epigenetik ve metabolik özellikleri belirli ilaçlara karşı doğal bir direnç oluşturabilir. Bu nedenle tümör ortamındaki değişiklikler, genlerin metilasyon durumu ve değişen tümör metabolizması, tümörün büyümesini ve yayılmasını sağlayan etmenler tedavi stratejisinin belirlenmesinde anahtar rol oynar (34).

Meme kanserinde neoadjuvant kemoterapi (NAC) öncelikle tümör boyutunu küçülterek ameliyatın uygulanabilirliğini artırır ve bazı durumlarda meme koruyucu cerrahiye olanak sağlar. Özellikle ileri evre lokal kanserlerde ve ameliyatla çıkarılamayacak meme kanserine sahip hastalar için önemlidir. Tedavide erken ve ileri evre meme kanseri türlerinde kanser gelişimini inhibe edebilmek ve lenfödem gibi postoperatif komplikasyonların azaltılması amaçlanır. Bireysel ve tümör türündeki farklılıklar uzun dönem sonuçları etkileyen çeşitli derecelerde kemoterapi duyarlılığı olduğundan, NAC bu tedavilerin etkinliğini test etmek için bir in vivo doğrulama modeli sağlar. Özellikle TNBC ve HER2 pozitif meme kanserlerinde kemoterapiye alınan yanıt nüks riski için güçlü bir öngörü faktörüdür (35). Meme kanserine yönelik neoadjuvan tedaviler karboplatin, siklofosamid, 5-fluorourasil/kapesitabin, taksanlar (paklitaksel, dosetaksel) ve antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin) gibi ajanların tek veya kombine bir biçimde uygulamasını içerir. Farklı moleküler meme kanseri alt tipleri ameliyat öncesi kemoterapiye farklı yanıt verdiği için uygun ilacın seçimi çok önemlidir (36).

2.3.3. RADYASYON TEDAVİSİ

Radyoterapi genellikle cerrahi ve/veya kemoterapi sonrasında uygulanan meme kanseri lokal tedavisidir. Radyasyon uygulamasının biçimi, genellikle gerçekleştirilen cerrahiye veya hasta durumuna bağlı olarak belirlenir. Bu lokal meme kanseri tedavisi çoğunlukla cerrahi veya kemoterapiyi takiben uygulanır. Radyasyon tedavisinde yüksek enerjili x-ışınları veya diğer parçacıklar kullanılarak kanser hücrelerinin öldürülmesi hedeflenmektedir. Genellikle cerrahi sonrası rezidü bırakan kanser hücrelerini öldürmek için kullanılmalarının yanı sıra ileri evre vakalarda metastatik veya rezeke edilemeyen meme kanseri durumunda radyasyon tedavisi uygundur (37).

2.3.4. HORMON TEDAVİSİ

Endokrin tedavi meme kanseri nüksüne veya metastaza karşı etkili olmakla birlikte luminal-moleküler alt tipine sahip meme kanserli hastalarda neoadjuvan veya adjuvan tedavi olarak kullanılabilir. Meme kanseri hastalarında çok sık görülen östrojen reseptörlerinin yüksek ifadenmesinin hormonal tedavi aracılığıyla baskılanması genellikle potansiyel tedavi modellerinden biri olarak kullanılır. Ayrıca endokrin tedavi hedef olarak östrojen seviyelerini azaltmayı veya östrojenin meme kanseri hücrelerini uyarıcı etkisini engellemeyi amaçlar. Östrojen reseptörleri bloke eden ilaçlar arasında seçici östrojen reseptör modulatorleri (tamoksifen, toremifen) ve seçici östrojen reseptör yıkıcıları (fulvestrant) kullanılırken östrojen seviyelerini düşürmeyi amaçlayan tedaviler arasında aromataz inhibitörleri (letrozol, anastrozol, eksemestan) bulunur (38, 39).

2.3.5. HEDEFLEYİCİ TEDAVİLER

Hedefli tedaviler, kemoterapötik ajanların kanser hücrelerine veya kanser büyümesini destekleyen doku ortamına özgü belirli genlere veya proteinlere ulaşmasını sağlar. Hedef kanser bölgesinde terapötik etkinliğin verimliliği artırılırken hedef dışı normal dokulardaki yan etkileri en aza indirilerek tedavi gerçekleşir. Hedefli tedaviler kemoterapötik maddelerin kanser hücrelerinde veya kanser büyümesine katkı sağlayan doku içerisinde belirli genler veya proteinler ile etkileşimini sağlar. Hedefli tedavi yaklaşımı, meme kanseri tedavisinin her aşamasında, yani neoadjuvant veya adjuvan terapi olarak planlanabilir (40).

Hedefe yönelik tedavi meme tedavisinin her aşamasında neoadjuvan tedavi olarak ameliyat öncesi veya adjuvan tedavi olarak ameliyat sonrası sağlanabilir. HER2-pozitif meme kanseri hastalarında monoklonal antibiyotik aracılı biyolojik tedavi oldukça yaygındır. Neratinib, trastuzumab, lapatinib, pertuzumab ajanları hedefleyici tedavilerde kullanılan başlıca ilaçlar arasında yer alırlar (41-44).

2.3.6. NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER

Nanopartiküller küçük boyutları, geniş yüzey alanları, yüksek yüzey aktivitesi, modifiye edilebilir fizikokimyasal özellikleri, yüksek yüzey-hacim oranı ve büyük ölçekli benzerlerine göre üstün tedavi verimliliği göstermesi gibi özelliklere sahiptir. Özellikle kanser hastalıklarında gelişmiş tedavi olanakları sağlayabilmektedirler (45). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler seçici hedefleme, kontrollü ve uzatılmış salım, gelişmiş çözünürlük, azaltılmış toksisite, kombine tedavilere imkân sağlaması, ilaç direncini aşabilmeleri, teşhis amacıyla kullanılabilme özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde umut vadeden araçlar olarak ortaya çıkmaktadır. Nanopartiküller sağlıklı dokulara verilen zararı en aza indirerek özellikle kanser hücrelerini hedeflemek üzere tasarlanabilir. Bu seçici hedefleme, kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen reseptörlere bağlanan spesifik ligandları ekleyerek veya tümörlerin benzersiz fizyolojik özelliklerini, örneğin gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisini, kullanarak elde edilebilir (46). Uygulama sonrasında ilacın belirli bir süre boyunca kontrollü salınmasını sağlayarak ilaç uygulamasının sıklığını azaltmayı ve ilaç konsantrasyonunu daha uzun süre terapötik pencerede tutmayı mümkün kılarlar (47). Birçok anti-kanser ilacı hidrofobiktir ve sulu çözeltilerde düşük çözünürlüğe sahiptir. Nanopartiküler sistemler bu ilaçların çözünürlüğünü artırabilir, biyoyararlanımını ve etkinliğini geliştirir (48). İlaçların nanopartiküler sistemlerde hapsedilmesi sağlıklı dokuların ilaçlara doğrudan maruziyetini en aza indirerek yan etkileri azaltabilir ve hasta uyumunu geliştirebilir (49). Birden fazla ilacın eş zamanlı olarak teslim edilmesi için tasarlanabilmeleri sayesinde iki veya daha fazla ilacın birlikte kullanıldığı kombinasyon terapileri için faydalı olabilirler (50). Kanser tedavisinde büyük bir problem oluşturan çoklu ilaç direncini yenebilmek için eflüks pompalarını aşabilir veya bu pompaları inhibe edebilecek ilaçları taşıyacak biçimde modifiye edilebilirler (51). Bazı nanopartiküller hem terapi hem de teşhis amaçlı kullanılabilirler. Örneğin nanopartiküllere görüntüleme ajanları yüklenebilir ve bu sayede

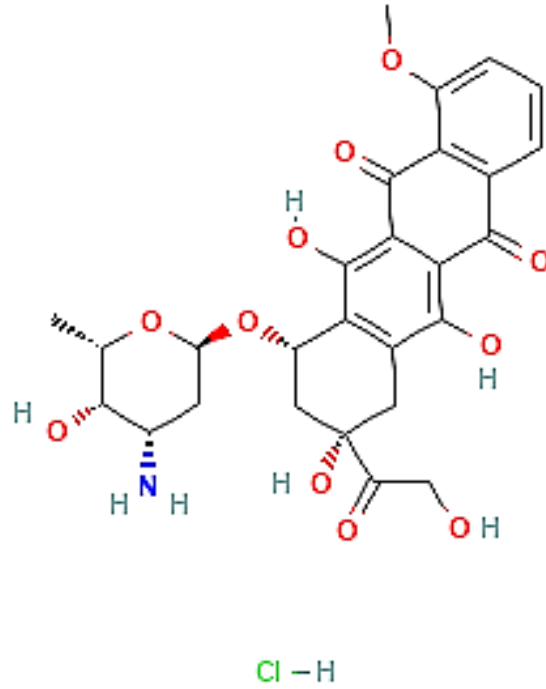
ilaç teslimatının yanı sıra terapötik yanıtın non-invaziv izlenmesine olanak sağlayabilirler (52).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler düşük toksisiteye sahip olmaları, güvenli ve etkili kontrollü salım sağlayabilmeleri, aktif veya pasif hedeflemeye olanak sağlamaları, ilaç direncine karşı tedavi etkinliğini arttırmaları dolayısıyla kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5). Birçok avantajına rağmen sistemik uygulanan nanopartikül temelli kanser tedavilerinde başlangıç patlama salımı, tümör bölgelerinde verimsiz ilaç birikimi, spesifik olmayan etkileşimlere ilaveten tümör heterojenitesi, doku bariyerleri kaynaklı kısıtlamalardan dolayı tedavi etkinliğini sınırlı olabilmektedir. (6) Özellikle lokal kanser tedavileri için düşünüldüğünde küçük boyutlarından dolayı hedef bölgeden hızlı bir şekilde eliminasyona uğramaları, uzatılmış lokal etkiyi sağlamada sınırlı kapasiteye sahip olmaları dezavantaj sağlayabilmektedir (7). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler düşük toksisiteye sahip olmaları, güvenli ve etkili kontrollü salım sağlayabilmeleri, aktif veya pasif hedeflemeye olanak sağlamaları, ilaç direncine karşı tedavi etkinliğini arttırmaları dolayısıyla kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5). Birçok avantajına rağmen sistemik uygulanan nanopartikül temelli kanser tedavilerinde başlangıç patlama salımı, tümör bölgelerinde verimsiz ilaç birikimi, spesifik olmayan etkileşimlere ilaveten tümör heterojenitesi, doku bariyerleri kaynaklı kısıtlamalardan dolayı tedavi etkinliğini sınırlı olabilmektedir (6). Özellikle lokal kanser tedavileri için düşünüldüğünde küçük boyutlarından dolayı hedef bölgeden hızlı bir şekilde eliminasyona uğramaları, uzatılmış lokal etkiyi sağlamada sınırlı kapasiteye sahip olmaları dezavantaj sağlayabilmektedir (7).

2.3.7. DOKSORUBİSİN

Doksorubisin (DOX) diğer adıyla adriamisin suda çözünür, nötr pH'ta turuncudan-kırmızı renkli ışığa duyarlı *Streptomyces peucetius var. caesius*'tan izole edilmiş kemoterapötik bir ilaçtır (53). Doksorubisinin sık kullanılan bir tuz formu doksorubisin hidrokloriddir (Doksorubisin HCl, DOX HCl). Bu form (Şekil 2.1.) hidroklorik asidin eklenmesiyle elde edilir ve genellikle farmasötik preparatlarda yaygın olarak kullanılır. Molekül ağırlığı 579,98 g/mol olan doksorubisinin moleküler formülü $C_{27}H_{29}O_{11}N.HCl$ 'dir. Erime noktası 205°C'dir. Genellikle kristalize bir şekilde bulunur. Katı kristalize haldeyken dayanıklılığı yüksektir ve 22°C'de uzun süre stabil kalabilir. Doksorubisin, kimyasal olarak kararlı bir

bileşiktir. Ancak, ışık ve ısıya maruz kalma gibi faktörler, zamanla bazı kimyasal degradasyonlara neden olabilir. Doksorubisin, su ve diğer çözücülerde çözülebilir. Distile su çözeltisi, yaklaşık 1 ay süresince kararlıdır (54).



Şekil 2.1. DOX HCl moleküler yapısı

DOX, hücre içinde genellikle çekirdekte olmak üzere yaklaşık %80'lik bir oranda dağılım gösterir ve hücre döngüsünün farklı aşamalarında bölünen hücreleri hedefler. Hücrede farklı fazlarda farklı mekanizmalarla etki gösteren doksorubisin, DNA sentezinin inhibisyonu, protein sentezini veya yapısal konfigürasyonu etkileyebilmektedir (55). Bölünmeyen hücrelerde daha az ilaç birikimi olur fakat yine de RNA sentezi inhibisyonu dolayısıyla hücreler ölebilirler. DOX'un hücre içerisinde birden fazla hedefi vardır. DOX sitoplazmada 26S proteazomlarına yüksek afinite ile bağlanır. Proteazomun 20S alt biriminin nükleer translokasyon sinyalleri, antrasiklinin nükleer gözenekler aracılığıyla çekirdeğe girişini sağlar. Fakat DOX'un DNA'ya bağlanma af<initesi daha yüksektir ve bu nedenle çekirdekte DOX 26S proteazomundan ayrılarak DNA'ya bağlanır ve apoptozu indükler (56). DOX nükleer aktivitenin yanı sıra spesifik olarak iç mitokondriyal membran fosfolipidine ve kardiyolipine bağlanarak elektron taşıma zincir komplekslerinden I ve II'yi inhibe ederek reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açar. DOX, sitoplazma içerisinde

elektron alıcı olarak işlev görür ve oksidoredüktaz enzimleri NADH dehidrogenaz, nitrik oksit sentaz ve ksantin oksidaz aracılığıyla dönüşüme uğrar. Bu dönüşüm, doksorubisinin kararsız bir yarı kinon formuna dönüşmesine ve bu formun reaktif oksijen türlerini serbest bırakarak doksorubisinin hücreler üzerinde sitotoksik etkisini artırmasına yol açar (57, 58).

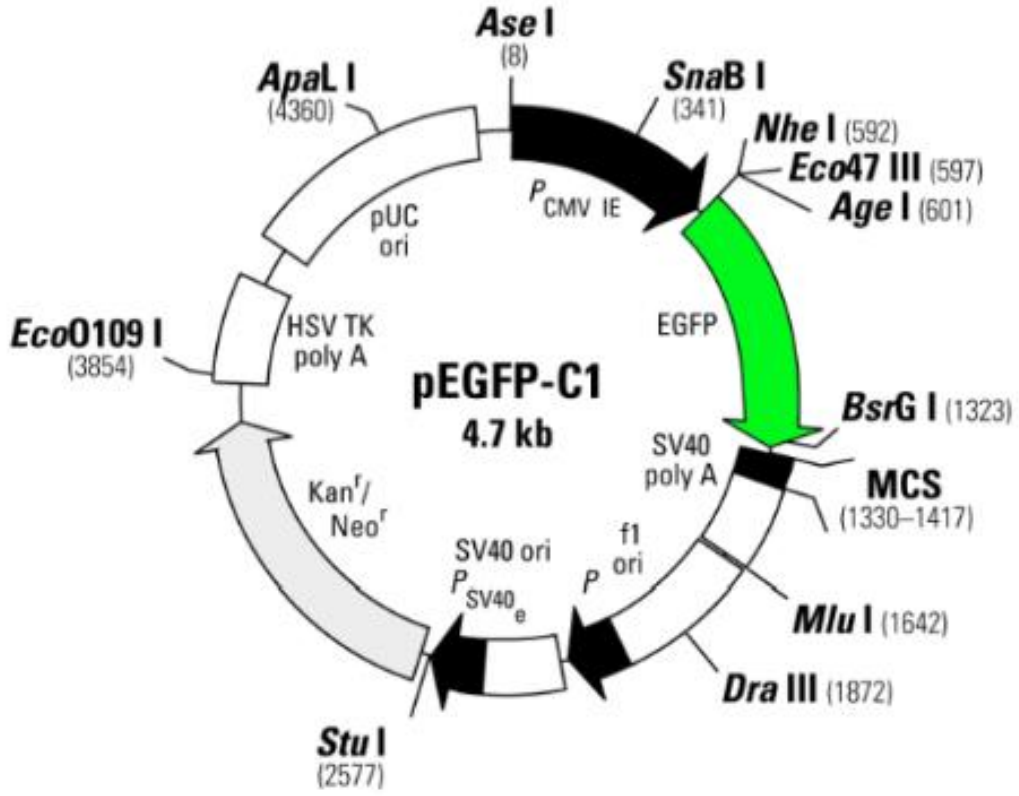
DOX, tek başına veya diğer kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde çok sayıda katı ve metastatik tümör için birinci basamak tedavi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Akut lenfoblastik/miyeloblastik lösemi, nöroblastom, meme, küçük hücreli akciğer, yumurtalık, mesane, mide, tiroid kanserinde doksorubisinin kullanımı mevcuttur (59-66). DOX, çeşitli hematopoietik malignitelerin ve katı tümörlerin tedavisinde oldukça etkili bir ajan olmasına rağmen uygulamada geri dönüşümsüz kardiyotoksisite, tedaviye bağlı maligniteler ve gonadotoksisite dahil olmak üzere ciddi yan etkilere sahiptir (67). Antrasiklinlerin neden olduğu kardiyotoksisite doza bağımlı bir şekilde gelişmekte ve ölümcül olabilmektedir. Tolere edilen maksimum kümülatif doza ulaşıldığında tedavi durdurulmalı ve kalp fonksiyonu zayıf olan hastalar antrasiklin içeren kemoterapi rejimleri dışlanmalıdır (68). Toksik yan etkilere ek olarak ilaç direnci gelişimi de doksorubisin tedavisi ile ilgili problemlerdir. Doksorubisin direncine birçok farklı faktör neden olabilmektedir. Doksorubisin düşük konsantrasyonlarda çoklu hücre içi hedeflere sahip çok yönlü bir ilaçtır ve enfekte olmuş hücrelerin immünojenisitesini artırabilir. Zamanla test edilen ilaç, bugüne kadar çok sayıda kanser için kombinasyon halinde veya tek başına birinci basamak kemoterapötik ilaç olarak tercih edilmektedir. Yan etkiler ve kemodirenç gelişimi en önemli zayıflatıcı faktörlerinden birisidir (69).

Meme kanseri tedavisinde doksorubisin uygulamalarında düşük dozda verimli tedaviyi sağlayabilmek, tedavi etkinliğini iyileştirmek ve yan etkileri hafifletmek için hedefe yönelik farklı ilaç formülasyonlarının üretilmesi kemoterapötik direncin aşılabilmesi ve kanser nüksünün önüne geçilebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu amaç doğrultusunda sentezlenen doğal veya sentetik polimerik nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, nanopolimerzomlar, nanotüpler, nanojellerin meme kanserine yönelik yaygın uygulamaları mevcuttur (70-74).

2.3.8. pEGFP-C1 PLAZMİDİ

Yeşil floresan protein (GFP, Green Fluorescent Protein), *Aequorea forskalea* cinsi denizanasına özgü karakteristik yeşil biyoluminesans kaynağı olarak keşfedilmiş bir proteindir (75). Bu proteinin yüksek floresan niteliği proteinin yapısında bulunan ve modifiye edilmiş amino asitlerden oluşan özgün bir kromoforun varlığından kaynaklanmaktadır. Bu floresan kromoforun oluşumu, türe özgü ek faktörlere gerek duymaksızın gerçekleşmektedir. GFP, hücrelerdeki protein ekspresyonunu ve lokalizasyonunu izlemek için kullanılabilmekte ve bu sayede hücre içi süreçlerin görselleştirilmesi mümkün hale gelmektedir. Kromofor yapının şiddetli floresans özelliği dolayısıyla GFP cDNA'sı biyolojik araştırmaların çeşitli alanlarında kullanılan eşsiz bir gösterge sistemine dönüşmüştür (76).

Moleküler biyoloji teknikleriyle hedef bir proteine genetik olarak GFP etiketi eklenerek hibrit proteinler oluşturulabilmekte böylelikle hedef bölgede takibi sağlanabilmektedir. GFP etiketli hibrit protein floresan özelliği sayesinde ışına vererek hücre içi gen aktivitesi ve dağılımı hakkında bilgi verebilmektedir. Işıma şiddeti ifade edilen proteinin miktarına, difüzyon dinamiklerine ve biyokimyasal etkileşimlere göre farklılık gösterebilmektedir (77). GFP'nin yaygın kullanım potansiyeline ilaveten moleküler biyolojide farklı gereksinimlere hizmet etmesi amacıyla farklı GFP mutantları dizayn edilmiştir (78). GFP'deki bir nokta mutasyon sonrasında elde edilen EGFP ile GFP'nin spektral karakteristikleri geliştirilmiştir. Bu mutasyon ile 488 nm'de maksimum eksitasyon, 509 nm'de maksimum emisyon pikleri elde edilmiş, arttırılmış floresan ve fotostabilite özellikleri elde edilmiştir (79).



Şekil 2.2. pEGFP-C1 plazmid haritası

pEGFP-C1, çok sayıda restriksiyon enzim kesim siteleri içeren bir çoklu klonlama bölgesi (MCS, Multiple Cloning Site) barındırır (Şekil 2.2.). Bu özellik, farklı genlerin kolayca klonlanmasını ve ekspresyonunun izlenmesini sağlar. Ayrıca, yüksek düzeyde gen ekspresyonu için güçlü bir viral promotör içerir. pEGFP-C1 plazmidi, kanser araştırmaları, gen tedavisi, hücre biyolojisi ve farmakoloji gibi birçok alanda önemli bir rol oynamaktadır (80).

2.3.9. PEG-b-PCL

Poli(etilen glikol)-blok-poli(ϵ -kaprolakton) (PEG-b-PCL) kopolimeri (Şekil 2.3.) sentez kolaylığı, biyouyumluluk ve biyoparçalanır nitelikleri ve amfifilik yapısı dolayısıyla nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem uygulamalarında tercih edilen çok yönlü bir polimerdir (81). Bu diblok kopolimerde PEG hidrofilik karakteristik gösterirken PCL'nin hidrofobik karakter göstermesi dolayısıyla formülasyonlarda PCL iç kabuğu oluştururken PEG dış

$$\text{HO} \left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O} \right]_m \left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \right]_n \left[\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \right]_m \text{H}$$

Uzatılmış ilaç salım uygulamalarında PCL'nin biyouyumlu ve biyoparçalanır nitelikleri, yüksek stabilitesi, bozunması sonucunda yan ürün oluşturmaması polimerin öne çıkan özellikler arasındadır. Biyodegradasyonun yavaş olması ve yumuşak doku uyum özelliklerinin düşük olması gibi özellikleri PCL polimerinin PEG gibi hidrofilik polimerlerle kopolimerizasyonu ile aşılabilmektedir (83). Kopolimerazsyon sonucunda oluşan blok kopolimerin biyolojik parçalanabilirlik özellikleri artmakta, daha iyi hidrofilik ve mekanik özellik göstermektedir (84).

Üç boyutlu yapıları, yüksek oranda su tutabilmeleri, poröz ve geçirgen özellikleri ile biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir niteliklerinden dolayı, hidrojeller farmasötik uygulamalar için önemli bir potansiyele sahiptir (8). Hidrojellerin karakteristik özellikleri ilaçların sistemik dağılımının oluşturduğu ağır yan etkileri engelleme, terapötik maddelerin kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlama, tümör hücrelerinde daha etkili bir dağılım oluşturma ve tedavi etkinliğini artırma yetenekleri ile tedavi sürecinde büyük avantajlar sunar (85). Hidrojellerin yumuşak ve hidrofil yüzeyleri hedef dokulara kolayca adheze olmalarına imkân sağlarken, vücut dokusu ile olan benzerlikleri de olası immün tepkiyi azaltmaktadır. Hidrojellerin biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu ve hassasiyeti, polimer matris yoğunluğu, moleküler ağırlıkları, çapraz bağlayıcıların iç özellikleri gibi faktörlere bağlı olarak belirlenir (86).

2.3.10.1. Enjektabl Hidrojeller

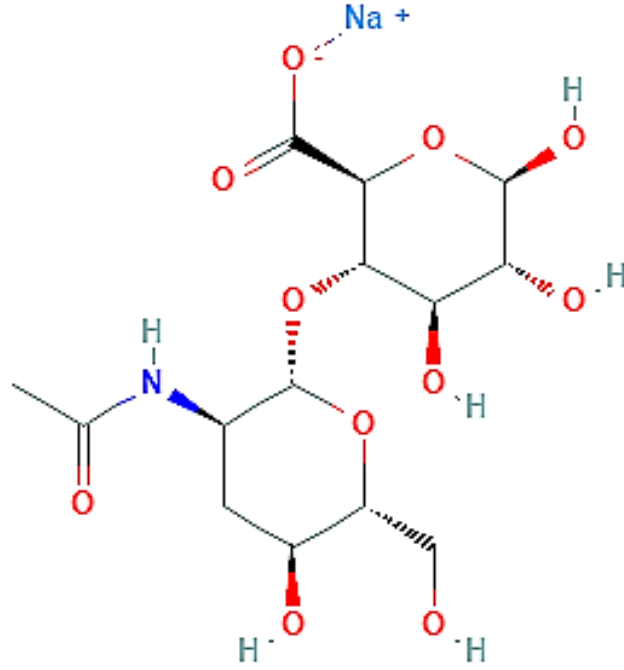
Enjeksiyon yoluyla uygulanan hidrojel bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri formülasyon bileşenlerine göre özelleştirilebilir yapılarına sahiptir. Bu niteliği biyolojik uyumluluğu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Hidrojellerin tasarımında karşılaşılan zorluklar, nanopartiküller ve yardımcı maddelerle entegrasyon yoluyla aşılmakta, bu sayede çok yönlü tedavi seçenekleri sunulmaktadır. Kemoterapötik ilaçların yer aldığı bu enjeksiyonluk hidrojel sistemler, hedeflenen dokularda ilaçların yüksek verimlilikle dağılımın sağlanması, ilk çıkış etkisinin azaltılması, etkin maddenin hızlı sistemik atılımının engellenmesi ve uzatılmış kontrollü salım olarak sağlamaktadır (87).

Hidrojel sistemlerin sinerjistik etkisi, kanser tedavisinde nanopartiküllerin etkinliğini büyük ölçüde iyileştirmektedir. Hidrojeller, yüksek su içerikleri ve biyoyumlulukları sayesinde, ilaç taşıma sistemlerinde ideal bir platform sunar. Nanopartiküllerin bu hidrojel matrislere entegrasyonu ilaçların hedeflenen dokuya daha etkin bir şekilde ulaştırılmasını sağlar ve böylece tedavinin başarısını artırır. Nanopartikül entegrasyonu, hidrojel sistemlerinin fonksiyonelliğini artırır. Nanopartiküller formülasyonda ilaç yükleme etkinliğini artırarak daha yüksek yoğunluktaki tedavi dozlarının uygulanabilmesini mümkün kılar ve aynı zamanda etkin maddenin tümör dokusuna daha derinlemesine nüfuz etmesine yardımcı olur (88). Bu sinerjistik etki post operatif lokal uygulanacak formülasyonlar için önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Hidrojeller ve nanopartiküllerin birlikte kullanımı etkin madde yan etkilerinin azaltılmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Bu sistemler ilacın sağlıklı dokulardaki ilaç maruziyetini azaltarak normal hücrelere üzerindeki istenmeyen etkileri minimize eder. Bu özelliğiyle hidrojel tabanlı nanopartiküler sistemler kanser tedavisinde daha güvenli ve etkili bir alternatif sunmaktadır. Bu yaklaşım kanser tedavisinde mevcut yöntemlerin sınırlamalarını aşarak daha etkili ve yan etkileri azaltılmış tedavi seçenekleri sunmaktadır (89). Tüm bunlar ele alındığında enjekte edilebilir hidrojel ilaç taşıyıcı sistemlerin özellikle lokalize meme kanseri tedavisinde geleneksel yaklaşımlara kıyasla daha etkili ve güvenli bir çözüm olduğu görülmektedir.

2.3.11. HYALÜRONİK ASİT

Hyalüronik asit (HA), glikozaminoglikan ailesine dahil olan bir polisakkarit türüdür ve temel yapısı glukuronik asit ve N-asetil-glukozamin şekerlerinden oluşan doğal, yüksek biyoyumluluğa sahip biyofonksiyonel bir bileşiktir (Şekil 2.4.). Yapı içerisindeki bileşenler birbirine β 1-3 ve β 1-4 bağlarla bağlanmış polianiyonik disakkarit birimlerinden oluşur. Bağ dokusu hücreler arası matriksin, sinoviyal sıvının, embriyonik mezenkimin, cildin ve vücudun birçok diğer organ ve dokusunun lineer bir polisakkaritidir (90).



Şekil 2.4. HA molekül yapısı

Molekülün karboksil grupları nedeniyle HA negatif yüklüdür, yüksek derecede hidrofiliktir ve yüksek moleküler ağırlıklarda viskoz bir ağ oluşturur. Fizikokimyasal özellikleri nedeniyle HA, hücreler arası matriksi hidrate ederek doku homeostazını ve sıkışma kuvvetlerine direncini düzenler. Birçok proteoglikan büyük hacimli molekül kompozitlerini oluşturmak ve matriksin jel durumunu stabilizasyonunu sağlamak için HA ile etkileşime girer. Ayrıca HA hücre yapışmasını, göçünü ve proliferasyonunu düzenleyen bağlayıcı proteinleri ile etkileşime girerek bir sinyal molekülü olarak işlev gören hücrelerin çoğunun etrafında bir perisellüler kaplama oluşturur (91).

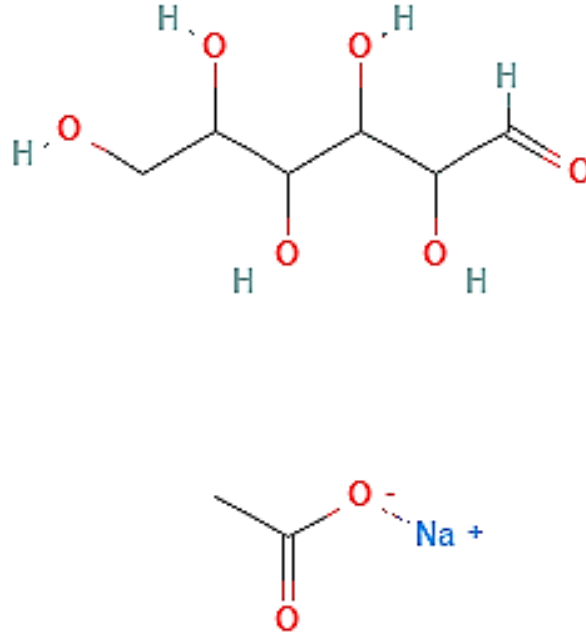
HA iltihaplanma yanıtı, hücre yapışması, göç, proliferasyon, diferansiyasyon, anjiyogenez ve doku yenilenmesi dahil birçok biyolojik süreçte kilit rol oynar. HA anti-inflamatuar özellikleri dolayısıyla inflamasyonu azaltmaya ve hücre hasarını iyileştirmeye yardımcı olur. Özellikle iltihaplı cilt durumlarında veya postoperatif iyileşme süreçlerinde bu özelliklerin faydası görülür. Bu, özellikle yara iyileşmesi ve cilt bakımı uygulamalarında faydalıdır. HA'nın tüm bu özellikleri ve biyolojik fonksiyonları bir arada değerlendirildiğinde yara iyileşmesi amaçlı üretilecek hidrojellerin sentezi için cazip bir materyal yapar (92).

Hidrojel formülasyonlarında HA'nın kullanımının önemli avantajları bulunmaktadır. HA'nın yüksek su tutma kapasitesi, hidrojelin nemli kalmasını sağlar ve hedef dokuyu nemlendirerek bir bariyer oluşturur. Bu, özellikle kurulukla ilişkili durumlarda, ilacın daha iyi nüfuz etmesine ve cilt üzerinde koruyucu bir bariyer oluşturarak dış etkenlerden korumasına yardımcı olur. HA doğal yapışkan özelliklere sahiptir. Formülasyonlarda adhezif niteliklerin iyileştirilmesine önemli katkı sağlar ve hidrojellerin hedef dokuya lokalize olarak daha iyi yapışmasını mümkün kılar. Bu niteliği ile özellikle deri bölgesindeki uygulamalarda, mukozal yüzeylerdeki uygulamalarda hidrojellerde ilacın hedef bölgede daha uzun süre kalmasına ve daha etkin olmasına yardımcı olur (93).

2.3.12. KARBOKSİ METİL SELÜLOZ

Karboksi metil selüloz (CMC) selülozun suda çözünebilen anyonik bir türevi olan polisakkarit yapıda bir maddedir (Şekil 2.5.). Selüloz susuz glukozun lineer polisakkaritlerinden oluşan ve tekrar eden birimleri β -1,4-glikozidik bağlarla birbirine bağlanmaktadır. Moleküler düzeyde CMC ile selüloz arasındaki temel fark CMC'de bazı hidroksil gruplarının yerini alan anyonik karboksimetil gruplarının bulunmasıdır. Bu gruplar, selülozun orijinal yapısında bulunan bazı hidrojen atomlarının yerini alır (94).

İlaç taşıyıcı sistemlerde CMC polimerinin kullanımı formülasyon için birçok avantajı beraberinde getirmektedir. CMC'nin yüksek su tutma kapasitesi, hidrojel yapısının korunmasına ve ilaç moleküllerinin stabil bir şekilde kalmasına olanak tanır. Bu, hidrojelin fiziksel bütünlüğünü ve ilaç salım profilinin tutarlılığını artırır. CMC matriksinde tutulan ilaçlar dış etkenlere karşı koruma sağlar bu da etkin maddenin vücut içi stabilitesinin artmasını sağlar (95).



Şekil 2.5. CMC molekül yapısı

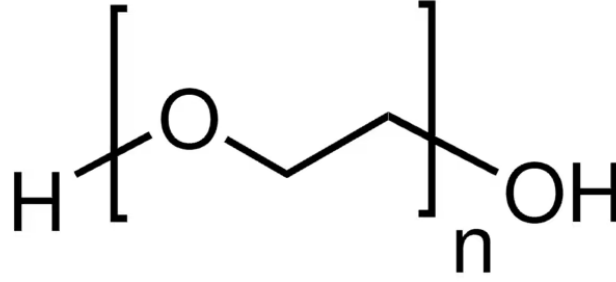
CMC yüksek biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikleri sayesinde vücut tarafında kolayca işlenir ve vücuttan uzaklaştırılabilir. Böylece oluşabilecek yan etkilerin azaltılmasında yardımcı olur. CMC tabanlı hidrojeller hücre uyumluluğunun artırılması ve doku onarımının iyileştirilmesinde etkili bir ajandır. Hücrelerin büyümesi ve farklılaşması için uygun bir ortam sağlar. Bu özellik yara iyileşmesinin hedeflendiği tedavi yaklaşımlarında CMC kullanımını ön plana çıkarmaktadır (96).

2.3.13. POLİ ETİLEN OKSİT

Poli etilen oksit (PEO), etilen oksit monomerlerinin polimerizasyonu ile oluşur ve tekrar eden -CH₂-CH₂-O- birimlerinden oluşan lineer bir polimer zincirine sahiptir (Şekil 2.6.). PEO, su molekülleriyle etkileşime girebilen hidrofilik bir yapıya sahiptir. Bu, su içinde kolayca çözünmesini ve su tutma kapasitesinin yüksek olmasını sağlar (97).

PEO'nun düşük protein adsorpsiyonu özelliği, özellikle biyomedikal uygulamalar ve ilaç taşıyıcı sistemler için önemli bir avantaj sunar. PEO'nun düşük protein adsorpsiyonu biyolojik ortamlarda daha fazla stabilite sağlar. Proteinler ve diğer biyolojik moleküllerin

PEO yüzeyine yapışması engellenir, bu da hidrojelın biyolojik sıvılarda daha stabil olmasını ve istenmeyen biyolojik etkileşimlerin önlenmesini sağlar. Protein adsorpsiyonunun azalması ilaç moleküllerinin hedef dokuya daha etkin bir şekilde ulaşmasını ve stabil kalmasını sağlar. Proteinlerin hidrojel üzerinde birikmesi engellendiğinde, ilaç molekülleri serbestçe hareket edebilir ve hedef dokuya ulaşabilir (98, 99).



Şekil 2.6. PEO molekül yapısı

PEO yüzeyinin proteinler tarafından bloke edilmemesi, konak ve biyomateryal etkileşiminin önlenmesi formülasyonların yüzey özelliklerinin korunmasına katkı sağlar. Bu özellikler PEO'nun ilaç taşıyıcı hidrojel formülasyonlarında geniş bir kullanım alanına sahip olmasını sağlar. PEO'nun belirtilen ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğini ve güvenliğini artırarak daha iyi tedavi sonuçları elde edilmesine katkıda bulunur (100). Cerrahi sonrası hidrojel uygulamalarında da PEO protein etkileşimi için adhezyon bariyer niteliği taşıdığı ve bir dış ortam bariyeri oluşturma niteliği bu amaçla kullanılacak formülasyonlar için önem taşımaktadır (101).

2.3.14. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİNDE YAZILIM DESTEKLİ DENEY TASARIMI

Deney tasarımı (Design of Experiments, DOE), bilimsel ve mühendislik araştırmalarında karmaşık sistemlerin ve süreçlerin analiz edilmesinde kullanılan bir dizi sistemli yöntem ve prensibi ifade eder. Bu metodoloji değişkenler arasındaki ilişkilerin ortaya çıkarılmasında, etkileşimlerin anlaşılmasında ve optimal koşulların belirlenmesinde önemli bir araçtır. DOE, deneysel çalışmaları planlamak, yönetmek ve analiz etmek için matematiksel ve istatistiksel teknikler kullanır. Yanıt değişkenlerine (çıktılara) bir veya birden çok faktörün (girdilerin) etkisini analiz etmeye ve bu etkileri modellemeye olanak tanır. Optimal

sonuçlar elde etmek için gerekli faktör seviyelerini belirleme ve bu faktörlerin yanıt üzerindeki doğrusal olmayan etkileşimlerini değerlendirme yeteneği DOE'yi deney süreci için değerli bir araç haline getirmektedir (102).

DOE'nin kullanımı birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Farklı faktörlerin birbirleriyle nasıl etkileşime girdiğini ve bu etkileşimlerin çıktılar üzerinde ne tür etkiler yarattığını anlamayı sağlar. Geleneksel birer birer değişken değiştirme yöntemlerine kıyasla daha az deney yaparak daha fazla bilgi elde etmeyi sağlar. En uygun sonuçları elde etmek için hangi faktör düzeylerinin kullanılması gerektiğini belirlemeye yardımcı olur. Rastgele veya tahmini değişiklikler yerine, verilere dayalı ve sistematik bir yaklaşıma sunar (103).

Design-Expert, DOE prensiplerini pratik bir uygulamaya dönüştürme konusunda çok yönlü ve etkili bir yazılımdır. Yazılım farklı deneysel tasarımları destekler, bunlar arasında faktöriyel, fraksiyonel faktöriyel ve yanıt yüzeyi metodolojisi gibi tasarımlar oluşturulmasına olanak tanır. Design-Expert yazılımında, model uygunluğunu değerlendirmek için istatistiksel testleri (ANOVA), yanıt yüzeylerini ve etkileşim grafiklerini kullanarak yanıtların optimizasyonunu mümkün kılar. Yazılımın sağladığı grafiksel araçlar, bulguların görselleştirilmesini ve yorumlanmasını basitleştirirken, optimizasyon özelliği araştırmacılara çoklu yanıtların aynı anda maksimize edilmesi veya minimize edilmesi gibi karmaşık hedeflere ulaşıma imknı sunar (103).

Tez çalışmasında uygulanan Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM) içinde kullanılan Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design, CCD), özellikle bir ya da birden fazla yanıt değişkeninin optimize edilmesi gereken durumlarda kullanılan etkili bir deneysel tasarım yaklaşımıdır. CCD, yanıt yüzeyinin eğriliğini (ikinci dereceden etkileri) yakalamak ve modellemek için uygundur. Çalışmadaki yanıtların faktörlerle doğrusal olmayan bir ilişkisi varsa veya faktörler arası etkileşimleri içeriyorsa, CCD bu karmaşıklıkla etkili bir biçimde modelleyebilmektedir. Buna ilaveten yanıtların maksimize veya minimize edilmesi gibi bir optimizasyon hedefi olan durumlar için kullanımı idealdir. Optimum deney koşullarını belirlemeye yardımcı olur. Faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerinin yanı sıra, her bir faktörün yanıt üzerindeki kavisli etkisini değerlendirmek için CCD bu etkileri ayrıntılı bir şekilde incelemeye olanak tanır. CCD, az sayıda deneme

ile çok sayıda faktör ve bunların etkileşimlerini incelemek için verimli bir yol sunar. Geleneksel bir faktöriyel tasarıma kıyasla daha az deney ile daha geniş bir tasarım alanını kapsar. CCD, çalışma alanında merkez noktası etrafında ekstra noktalar (yıldız noktaları veya eksenel noktalar) ekleyerek optimum noktanın daha da dışındaki yanıtları tahmin etmek için genişletilebilmektedir (104). Bu tasarım faktörlerin bir arada nasıl çalıştığını göstermekte ve oluşan yanıtların analiz edilmesinde pratiklik sağlamaktadır.

Çalışmada hedeflenen yanıtları etkileyen iki faktör olarak CMC ve HA maddelerinin formülasyondaki miktarları ve bu faktörlerin vizkozite, sertlik, adhezyon, kohezyon, elastisite gibi mekanik özelliklerini içeren yanıtlar üzerindeki kavisli etkilerini ve etkileşimlerinin incelenmesinde ve değerlendirilmesinde CCD bu ihtiyaçları karşılayan esnek bir deneysel tasarım sağlamıştır. Bu nedenle yanıt yüzeyleri üzerinde derinlemesine optimizasyon ve analiz yapılması gereken deney planlarında bu tasarım modelinin işlevsel ve kullanışlı olduğu gözlemlenmiştir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasında hidrojel ve nanopartiküler ilaç taşıyıcı vektörler ile tasarımı yapılan kargo taşıyıcı sistem aracılığı ile rezidüel meme kanserine karşı lokal tedaviye yönelik ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Meme kanseri tedavisi sürecinde daha etkin bir tedavi için, cerrahi sonrası adjuvan uygulamalarında karşılaşılan hedef bölgede yara iyileşme sürecinin uzaması, antikanser ajanın belirlenen süre stabil olarak etkinlik gösterememesi sorunlarına odaklanılmıştır. Bu doğrultuda etkin maddeye uzatılmış salım özelliklerinin kazandırılması ve uygulama sonrası hedef bölgede stabil olarak tedaviyi sağlayabilecek kargo ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Bu çalışmada adheran olarak büyüyen, NIH/3T3 fare embriyonik fibrablast hücre hattı ve 4T1 üçlü negatif fare meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları ve ortam içerikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hatları ve ortam içerikleri

Hücre Hattı	Hücre Adı	Ortam İçeriği
NIH/3T3	Fare embriyonik fibrablast hücresi	DMEM + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin
4T1	Fare meme kanseri hücresi	RPMI-1640 + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin
4T1-luc	Fare meme kanseri hücresi	RPMI-1640 + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin

4.1.2. DENEY HAYVANLARI

In vivo çalışmalar Kobay DHL AŞ Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 17.03.2023 tarihli 664 protokol numaralı onay dahilinde Hacettepe Üniversitesi HÜDDHAM bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Deney dahilinde 6-8 haftalık 48 adet dişi Balb-c fare ile çalışılmıştır.

4.1.3. REAKTİF VE KİMYASALLAR

3-(4,5-Dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) MTT	Sigma-Almanya
Agaroz	Sigma-Almanya
Agar-agar	Merck-Almanya
Asetik Asit %80	Sigma-Almanya
Dimetil formamid (DMF)	Sigma-Almanya
Dimetil dioktadesil amonyum bromür (DDAB)	Sigma-Almanya

D-luciferin	Sigma-Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Almanya
EDTA	Sigma-Almanya
Fetal bovin serum	Sigma-Almanya
Heksadesiltrimetil-amonyum bromit (HTAB)	Sigma-Almanya
Kalsiyumklorit-2 hidrat	Merck-Almanya
Maya ekstraktı	Merck-Almanya
Müsin %75-95	Carl Roth-Almanya
Penisilin-Streptomisin Çözeltisi	Sigma-Almanya
Polietilen oksit (4000 kDA)	Colorcon-Amerika
Polivinil alkol (%87, M _a 13.000-23.000)	Sigma-Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Fluka-Amerika
Potasyum klorür	Merck-Almanya
RPMI-1640	Sigma-Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Almanya
Sodyum fosfat dibazik	Fluka-Amerika
Sodyum hyaluronat	Merck-Almanya
Sodyum karboksimetilselüloz (High viscosity)	Sigma-Almanya
Sodyum klorür	Sigma-Almanya
Sorbitan seskioleat (Arlacel)	Sigma-Almanya
Tripton	
Trizma baz	Sigma-Almanya
Trizma hidroklorür	Sigma-Almanya
Tween 80®	Merck-Almanya

4.1.4. TAMPONLAR

1 M pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu (PBS)	2,38 g	Disodyum hidrojen fosfat
	0,19 g	Potasyum dihidrojen fosfat
	8 g	Sodyum klorür
	1 lt km	H ₂ O

0,01 M pH 7,4 Fosfat Tamponu (%1 Twin)	1,2 g	Sodyum fosfat monobazik
0,01 M pH 5,8 Fosfat Tamponu (%1 Twin)	1 g	Twin 80
	1 lt km	H ₂ O
0,1 M Trizma Tamponu I (pH 8,5)	1,011 g	Tris HCl
	11,337 g	Tris Baz
	1 lt km	PBS (pH 7.4)
0,1 M Trizma Tamponu II (pH 8,5)	1,011 g	Tris HCl
	11,337 g	Tris Baz
	1 lt km	PVA (%1)
Alkalen Lizis I Tamponu	50 mM	Glukoz
	25 mM	Tris-Cl (pH 8)
	10 mM	EDTA (pH 8)
	25 ml km	H ₂ O
Alkalen Lizis II Tamponu	0.2 N	Sodyum hidroksit
	%1	Sodyum dodesil sülfat
	10 ml km	H ₂ O
Alkalen Lizis III Tamponu	3 M	Potasyum asetat
	2 M	Glasiyel asetik asit

	100 ml km	H ₂ O
Hidrojel Tamponu	%0,43 (a/h)	NaCl
	%0,47 (a/h)	CaCl ₂ .2 H ₂ O
	1 lt km	H ₂ O

Transformasyon tamponu (TSS)	%10	PEG-6k
	%5	DMSO
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	1 ml km	2xYT besiyeri
Tris asetat EDTA tamponu (TAE) 50X	121 g	Trizma baz
	35,69	Asetik asit %80
	50 ml	EDTA
	500 ml km	H ₂ O

4.1.5. KİTLER

Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen-Amerika
-----------------------------	--------------------

4.1.6. KULLANILAN CİHAZLAR VE SARF MALZEME

Canlı hayvan görüntüleme sistemi	Newton 7.0 Vilber-Fransa
Diferansiyel taramalı kalorimetre	Shimadzu-Japonya
Diyaliz membran	Sigma MCWO 14 kDa-Almanya

Floresan görüntüleme	Bio-Rad VersaDoc Imaging System Model 1000-Amerika
Florometre	Qubit 4 Thermo Fischer Scientific- Amerika
Elektroforez tankı	Invitrogen-Amerika
Hassas terazi	Mettler Toledo-İsviçre
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific-Güney Kore
İklim kabini	ID 501 Nüve-Türkiye
İnkübatör çalkalayıcı	Lab Companion SI 300-Güney Kore
Laminar kabin	Thermo Scientific Holten 1.2-Amerika
Liyofilizatör	Christ Gamma 2/16 LSC-Kanada
Mikroplaka spektrofotometre	Spectra Max Molecular Devices-Amerika
Partikül boyutu ölçüm cihazı	Malvern-Zeta Sizer Nano ZS-İngiltere
pH Metre	Mettler Toledo-İsviçre
Spektrofotometre	UV 1601 Shimadzu-Japonya
Tekstür analiz cihazı	TA.XT Plus Stable Micro Systems- İngiltere
Taramalı Elektron Mikroskopu	FEI Tecnai G2-Japonya
Transwell	Transwell 3415 Lot #23014051 Corning Incorporated-Amerika
Ultrasantrifüj	Hitachi CS120FNX,-Japonya

Ultrasonik banyo	Ultrasoni LC30-Almanya
Ultrasonik homojenizatör	Bandelin Sonoplus-Almanya
Viskozimetre	Brookfield DV II-Almanya
Yüksek hızlı karıştırıcı	IKA Eurostar 20-Japonya
Zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern-Zeta Sizer Nano ZS-Almanya

4.2. YÖNTEM

4.2.1. DOKSORUBİSİN HCL'İN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Dokсорubisin ışık maruziyetiyle floresan özelliğini kaybeden fotosensitif bir etkin madde olması dolayısıyla formülasyon hazırlama ve saklama basamaklarında ışıksız olarak çalışılmıştır ve cam malzemeler alüminyum folyo ile kaplanmıştır (105).

4.2.1.1. Dokсорubisin HCl'nin Ultra Viyole (UV) Spektrumu

Dokсорubisin HCl'nin 50 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan DMSO'da çözünmüş olan çözeltisi kuartz küvetler kullanılarak UV spektrumu 200-800 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapılarak elde edilmiştir.

4.2.1.2. Dokсорubisin HCl'in Analitik Yöntemler ile Miktar Tayini ve Kalibrasyonu

Dokсорubisinin, formülasyonlardaki enkapsülasyon ve in vitro salım uygulamalarında ortama salınan miktarlarının tayin edilmesinde UV-vis spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Dokсорubisin DMSO'da çözündürülerek hazırlanan stok çözeltisi belirlenen oranlarda dilüsyonlar kullanılarak 480,0 nm dalga boyunda kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

4.2.1.3. Dokсорubisin Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Dokсорubisinin UV-vis spektrofotometrede miktar tayininin in vitro şartlarda gerçekleştirilmesinde bir seri DOX çözeltisi seri dilüsyonları kullanılarak kalibrasyon

doğrusu çizilmiştir. Bu amaçla 2 mg DOX 10 ml DMSO'da çözündürülerek stok çözelti 500 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Stok çözelti seyreltilerek 0,5-100 µg/ml (0,5-1-3-5-7,5-10-20-25-50-100 µg/ml) aralığında 10 farklı konsantrasyonda dilüantlar elde edilmiştir.

4.2.1.4. Analitik Yöntem Validasyonu

Doksorubisinin miktarını tespit edebilmek için geliştirilen yöntemin validasyon işlemi belirlenen yöntemin hedeflenen terapötik uygulamalara uyumlu olduğunu göstermek amacıyla yapılmıştır. Analitik yöntem validasyonu için doğruluk, doğrusalılık, kesinlik, duyarlılık ve uygulama aralığı parametreleri değerlendirilmiştir (106).

4.2.1.4.1. Doğrusalılık

Bir analitik yöntemde belirlenen ölçüm aralığındaki verilerin örneğin içerisinde bulunan maddenin konsantrasyonu ile orantılı biçimde elde edilebilir olması yöntemin ne kadar doğrusal olduğunu gösteren bir belirteçtir. Doğrusalılık parametresinin geçerli olduğunu göstermek amacıyla standart çözelti konsantrasyon serisi ve seriye ait absorbans değerleri arasında regresyon analizi yapılarak kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. DOX-DMSO stok çözeltisinden (500 µg/ml) konsantrasyonda hazırlanan dilüsyon seri çözeltilerin (0,5-100 µg/ml) 480,0 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve konsantrasyon-absorbans grafiği üzerinden kalibrasyon doğrusu denklemi çıkarılmıştır. Regresyon katsayı (R^2) değerinin 0,999 değerine eşit veya daha büyük olması verilerin kalibrasyon doğrusu ile ne derecede uyum gösterdiğini belirten bir kanıt olarak sayılmaktadır (107). Kalibrasyon doğruları aracılığıyla sağlanan kalibrasyon denklemlerine ait regresyon katsayılarının hesabı yapılarak yöntemin doğrusalılık derecesi değerlendirilmiştir.

4.2.1.4.2. Doğruluk

Doğruluk elde edilen deneysel verilerin gerçek değer ile ne derecede yakın olduğunu gösteren bir ölçüttür. Bir analitik yöntemde doğruluğu belirleyebilmek için miktarı bilinen bir analitin tayini yapılır. Geri kazanım değeri ve gerçek değer ile arasındaki farkın hesaplanması yapılır. Doğruluk tayininin minimum üç konsantrasyonda minimum üç tayin yapılarak ölçülmesi gerekmektedir. Doğruluk değerlendirmesi için çizilen kalibrasyon doğrusunda doksorubisinin üç farklı konsantrasyonunda DMSO için (3, 10 ve 20 µg/ml)

hazırlanan analitler, PB için (5,10 ve 20 µg/ml) üçer tekrar olarak analizi yapılmıştır. Hesaplanan geri kazanım değerlerine ait yüzde varyasyon katsayıları, ortalama değerleri, ve standart sapmaları hesaplanmıştır (108). Geri kazanım hedeflenen doğruluk değeri %97-%103 aralığında bulunmalıdır (109)

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = X/Y \times 100$$

X= Ölçülen konsantrasyon (µg/ml)

Y= Hazırlanan konsantrasyon (µg/ml)

4.2.1.4.3. Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemde aynı örneğe ait seri ölçümler arasındaki yakınlık derecesini temsil etmektedir. Bu yakınlık değeri varyasyon katsayısı ve standart sapmanın hesaplanmasıyla belirlenir. Yöntemin kesinliğini değerlendirmek için birbirinden farklı konsantrasyonlarda gün içerisinde veya farklı günlerde tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmelidir. Kullanılan analitik yöntemin kesinliği temel olarak tekrar edilebilirlik, günler arası farklılık, tekrar elde edilebilirlik parametreleri baz alınarak değerlendirilir. Kesinlik ortalama, bağıl standart sapma, varyasyon katsayıları kullanılarak değerlendirilir. Kesinlik ölçümleri için varyasyon katsayısı %2'den küçük olmalıdır (109).

4.2.1.4.4. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirliğin saptanması için belirlenen konsantrasyonda analit içeren çözeltilerin bir örneği için UV spektrofotometre ile ardışık üç ölçümü yapılarak sonuçların varyasyon katsayıları, ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

4.2.1.4.5. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığı teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) parametreleri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. LOD, analitik metotta numunenin tespit edilebilmesine rağmen kantitasyonu yapılamayan, örnekte sinyali ölçülebilen düzeyde olan en düşük analit konsantrasyonuna karşılık gelmektedir. LOQ ise örnekte bulunan analitin kantitatif biçimde tespit edilebildiği en düşük konsantrasyona karşılık gelmektedir. Duyarlılık tespiti amacıyla mevcut analitik yöntemde doksorubisinin DMSO ve fosfat tamponu stok dilüsyonlarında ölçümler yapılmıştır.

$$LOD = 3,3 \times \sigma/S$$

Eşitlik 1

$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$

Eşitlik 2

σ : Kalibrasyon denkleminde cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

4.2.1.4.6. Özgüllük

Özgüllük uygulaması yapılan metot için belirlenen koşullar altında numune matriksindeki bileşenler varlığında diğer bileşen girişimleri bulunmaksızın özgül ve doğru olarak analiti tayin edebilme kapasitesini gösterir (110). Bu doğrultuda nanopartikül formülasyonda bulunan polimer yapının girişim gösterip göstermediği etkin madde ile aynı analiz şartlarında değerlendirilmiştir. Doksorubisin ve PEG-b-PCL'nin DMSO çözeltilerinde, 200-800 nm dalga boyu aralığında spektrum taramaları yapılmıştır. Analiz dalga boyu olan 480,0 nm'de formülasyon bileşenlerinin girişim durumu incelenmiştir.

4.2.2. PLAZMİD DNA ÜRETİMİ

Optimize nanopartikül formülasyonu ile enkapsüle edilmek üzere temin edilen pEGFP-C1 (Addgene®) plazmidinin *Escherichia coli* (*E.coli*) bakterisi DH5- α suşu kompetan hücrelere transformasyonu ve izolasyonu yapılmıştır.

4.2.2.1. Bakteriyel Besiyerinin Hazırlanması

Tripton (16 g/L), maya ekstraktı (10 g/L), NaCl (86 mM), %15 agar agar ve kâfi miktar ddH₂O hazırlanan 2xYT katı besiyeri 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrasında yaklaşık olarak 50°C'ye soğuması beklenen besiyerine Kanamisin (50 ug/ml) eklenerek karıştırılmıştır. Her bir petriye 20 ml besiyeri eklenmiş, 1 saat süreyle donması beklenmiştir. Besiyerleri +4°C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.2.2. Plazmid DNA Transformasyonu

Transformasyon için *E.coli* DH5 α suşu kullanılmıştır. -80°C stoğundan alınan bakteri kültürü içerisinde 5 ml 2xYT vb. zengin besiyeri bulunan 50 ml'lik falkona aktarılmış ve orbital çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyona bırakılarak başlangıç (starter) kültür elde edilmiştir. Ertesi gün, gece boyu inkübe edilen kültür 1/200 oranda seyreltilerek 2xYT

besiyerinde inkübe edilmesi suretiyle kompetan kültür mikro plaka okuyucuda 600 nm’de ölçülen optik dansitometre (OD) değeri 0.4-0.6 olana kadar 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm hızda inkübe edilmiştir. Kültür örnekleri 1000 G hızda ile 10 dk santrifüjlenmiştir. Devam eden deney basamakları buz üzerinde çalışılmıştır. DMSO eklenmeden hazırlanan steril TSS tamponuna, DMSO PVDF filtreden geçmediği için sonradan eklenmiştir. Her bir örneğin pelleti 500 µl TSS ile süspanse edilir ve 10.000 ng/µl 2,5 µl pEGFP-C1 eklenmiş ve 60 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 42°C’ye su banyosunda 60 sn ısı şoku uygulanmıştır. TSS eklenen bakteri süspansiyonlarının üzerine 2 ml 2xYT eklenmiştir. Süspansiyonlar 15 ml’lik konik tabanlı tüplere aktarılmış ve 37°C’de, 150 rpm’de 20 dk çalkalayarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 10.000 G hızda ile 90 sn santrifüjlenmiştir. Ekim yapılacak her petri plağı için örnekler 200 µl besiyeri ile süspanse edilmiştir. 50 µg/ml konsantrasyonda Kanamisin içeren besiyerlerinin bulunduğu petrilere 100–200 µl hücre süspansiyonu yayma ekim ile ekilmiştir. Kültürler inkübatöre kaldırılarak 37°C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında koloniler plazmid izolasyonu için sıvı kültüre alınmıştır.

4.2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid izolasyonunda, pEGFP-C1 plazmidlerinin antibiyotik direnç kasetinin Kanamisin olması dolayısıyla, sıvı besiyeri olarak 50 ug/ml Kanamisin 2xYT kullanılmıştır. Transform edilen kültür kolonisi öze yardımıyla sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Kültür, 180 rpm’de, 37°C’de çalkalayıcı etüvde, 250 ml erlende gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Kültür 10 ml’lik porsiyonlara ayrılmış ve hücreler 2000 G’de 15 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantlar atılmıştır. Pelletler üzerine önce 20 µl Alkalen Lizis I eklenmiştir ve taze hazırlanmış 400 µl Alkalen Lizis II ile pelletler nazikçe karıştırılmıştır. Devamında 300 µl Alkalen Lizis III ile tüpler 5-6 kere kez tersyüz edilerek nazikçe karıştırılmıştır. Tüpler buz üzerinde 5 dk inkübe edildikten sonra soğutmalı santrifüjde +4°C’de 13000 G’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlardan 600’er µl alınarak eppendorf tüplere aktarılmıştır. Her tüp için 600’er µl kloroform eklenmiş ve vortekslenmiştir. Örnekler tekrardan 13000 G’de, soğutmalı santrifüjde +4°C’de 5 dk santrifüj edilmiştir. 600’er µl süpernatantlar yeniden ayrılarak eppendorf tüplere aktarılmıştır. Ayrılan örnekler üzerine 600’er µl izopropanol eklenerek vortekslenmiştir.

Örnekler -20°C’de gece boyu inkübe edildikten sonra, izopropanolü uzaklaştırmak için soğutmalı santrifüjde +4°C’de 13000 G’de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletler yıkanması 900 µl %99.6 etanol ile yapılmış ve soğutmalı santrifüjde +4°C’de 13000 G’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamı ayrılıp uzaklaştırıldıktan sonra 30 dk süreyle pelletten rezidü alkolün uçması beklenmiş ve pellet halindeki plazmidler %0.2’lik DNase free RNase çözeltisiyle çözülmüş ve -20°C’de muhafaza edilmiştir.

4.2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Plazmid ürünlerinin konsantrasyon ölçümleri için izolasyonu yapılan plazmid ürünleri için 1xTAE ile %1’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz çözeltisi jelleşebilmesi için mikrodalga fırında ısıtıldıktan sonra sıcaklık 60°C’ye düştüğünde etidyum bromür (10 mg/mL) eklenmiştir. Çözelti donması için jel kalıbına dökülerek taraklar yerleştirilmiştir. Kalıp 1 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilerek jelin donması sağlanmış ve taraklar çıkarılmıştır. Jel elektroforez tankına konulmuş ve tanka jel seviyesini geçecek ölçüde 1xTAE eklenmiştir. Her bir pDNA (3 µl), brom fenol mavis (0,5 µl) ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve kuyulara yüklenmiştir. Jele yüklenen örnekler 75 V değerinde 1 saat süreyle oda sıcaklığında elektroforez tankında yürütülmüştür.

4.2.2.5. Plazmid DNA Miktar Tayini

İzolasyonu yapılan plazmidlerin miktar tayini agaroz jel elektroforezi, nanopartikül formülasyonlarındaki enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanmasında Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, ABD) ile belirlenmiştir.

İzole edilen plazmidlerin konsantrasyon ölçümünde, konsantrasyonu bilinen pet28a plazmidi ile konsantrasyonları hesaplanacak olan plazmidlerin Bio-Rad VersaDoc Imaging System Model 1000 (USA) floresan jel görüntülemelerine ait görüntü verileri ImageJ programı yardımıyla hesaplanmıştır.

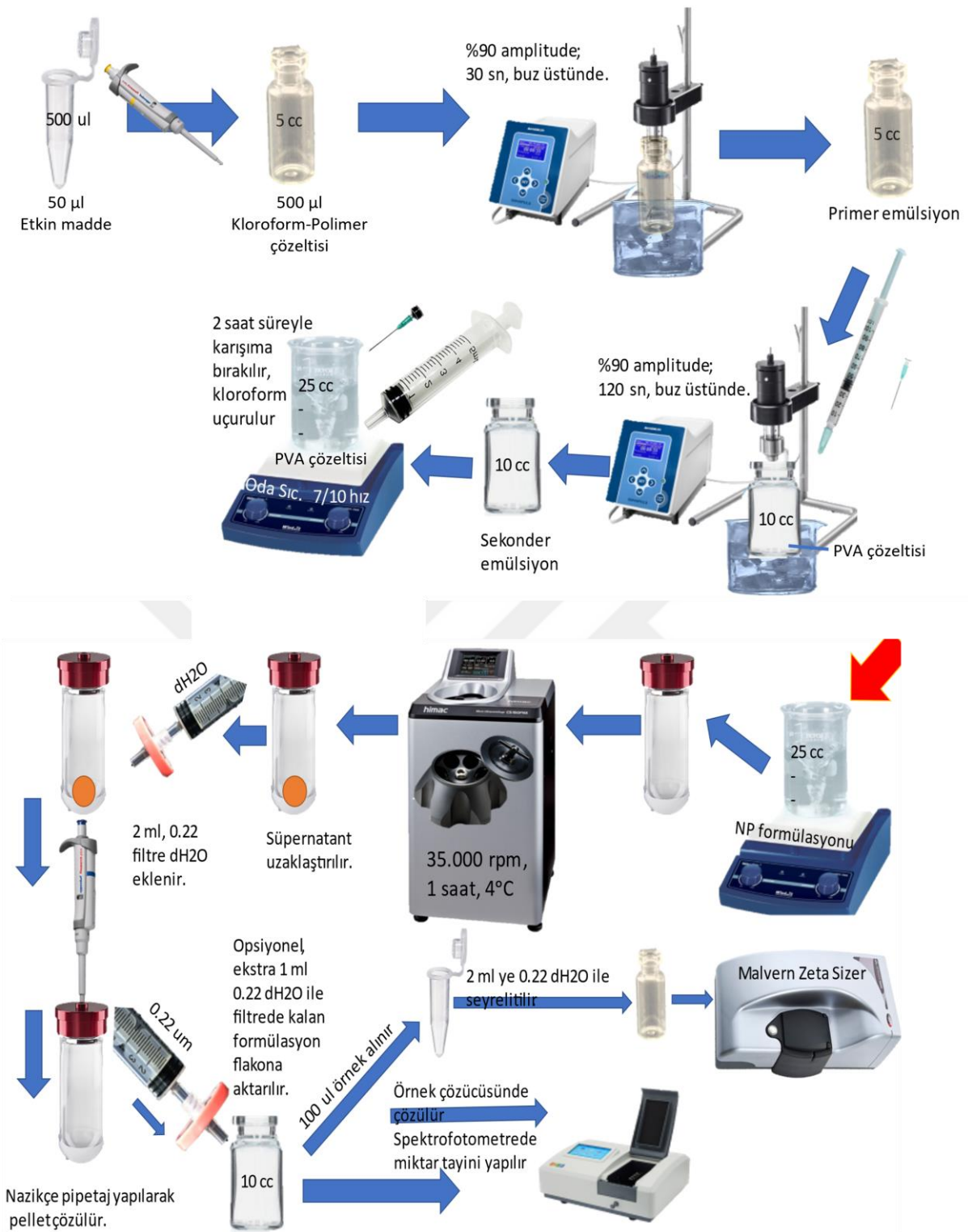
Formülasyon süpernatantlarındaki pDNA kantitasyonu için, Qubit reaktifinin kit tamponu ile 1:200 oranda seyreltilmesiyle Qubit analiz çözeltisi (200 µl) elde edilmiştir. Referans örnek, 190 µl analiz çözeltisi ve 10 µl standart ile hazırlanırken; numuneler 190 µl analiz çözeltisi ve 10 µl plazmid örnekleri (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000 ng/µl) ile

hazırlanmıştır. Numuneler oda sıcaklığında 10 sn vortekslendikten ve 2 dk süreyle inkübe edildikten sonra Qubit Fluorometer 4 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı ile ölçümler yapılmıştır.

4.2.3. NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİLMESİ

4.2.3.1. Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Çalışmaları ve Hazırlanması

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında ikili emülsiyon (su/yağ/su, w/o/w) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Hidrofilik moleküllerin yüklendiği nanopartikül formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan bu teknik ultrasonikasyon destekli olarak kullanılmaktadır (111). Bu yöntemde etkin maddenin sulu çözeltisi polimerin içinde çözünmüş halde bulunduğu organik faz üzerine eklenir. Elde edilen w/o emülsiyonu sulu dış faza eklenerek yeniden bir emülsifikasyon sağlanarak w/o/w ikili emülsiyonu elde edilir. Elde edilen bu emülsiyon, etkin maddeyi içeren polimerik çözelti damlacıklarını oluşturur. Sonraki basamakta polimerin çözücüsü buharlaştırılarak uzaklaştırılır. Böylece etkin maddenin sulu çözeltisinin enkapsüle edildiği nanopartikül süspansiyonu elde edilmiş olur. Bu süspansiyon santrifüjlenir, süpernatant uzaklaştırıldığında kalan pellette nanopartiküller elde edilmiş olur. Elde edilen nanopartiküllerin yıkama işlemi ddH₂O ile yapılır. Yıkama sonrası formülasyon santrifüjlenerek son ürün pellet olarak elde edilir (112, 113).



4.2.3.2. Doksorubisin Yüklü Nanopartiküllerinin Eldesi

İkili emülsiyon metoduyla nanopartikül eldesi için 50 µl ddH₂O suda çözölen doksorubisin, 500 µl kloroformda çözönmüş olan PEG-b-PCL blok kopolimerinin üzerine eklenerek 30 sn süreyle 90 amplitude değeriinde ultrasonikasyon cihaz yardımıyla sonike edilir. Böylece primer emülsiyon elde edilmiş olur. Elde edilen primer emülsiyon, su fazı olarak 2 ml 0.1 M pH 8,5 trizma II çözeltisinin üzerine eklenerek 120 sn süreyle sonike edilir. Elde edilen sekonder emülsiyondaki organik çözöcö olan kloroformun uçurulması için seknoder emülsiyon 5 ml 0.1 M pH 8,5 trizma II çözeltisi üzerine eklenerek manyetik karıştırıcıda üç saat süreyle 7/10 hızda karıştırılır. Bu sürenin sonunda çözölti 35.000 rpm'de +4 derecede bir saat süreyle santriföjlenir. Santriföj sonrasında bir kez su ile yıkama yapılarak aynı santriföjleme işlemini tekrarlanarak nanopartiköller üretilmiş olur (Şekil 4.1.).

4.2.3.3. pEGFP-C1 Yüklö Nanopartiköllerinin Eldesi

İkili emülsiyon metoduyla nanopartikül eldesi için, 10 µg ve 20 µg yüklenecek şekilde, 50 µl DNase RNase free ddH₂O suda çözölen plazmid (0,2 µg/µl ve 0,4 µg/µl) , 500 µl kloroformda çözönmüş olan polimer sürfektan karışımının (PEG-b-PCL:DDAB ve PEG-b-PCL:HTAB; 19:1) üzerine eklenerek 30 sn süreyle 90 amplitude değeriinde ultrasonikasyon cihaz yardımıyla sonike edilir. Böylece primer emülsiyon elde edilmiş olur. Elde edilen primer emülsiyon su fazı olarak 2,5 ml 0.1 M pH 8,5 trizma II tamponu üzerine eklenerek 120 sn süreyle sonike edilir. Elde edilen sekonder emülsiyondaki organik çözöcö olan kloroformun uçurulması için seknoder emülsiyon 5 ml 0.1 M pH 8,5 trizma II tamponu üzerine eklenerek manyetik karıştırıcıda üç saat süreyle 7/10 hızda karıştırılır. Bu sürenin sonunda çözölti 35.000 rpm'de +4°C derecede bir saat süreyle santriföjlenir. Santriföj sonrasında bir kez su ile yıkama yapılarak aynı santriföjleme işlemini tekrarlanarak nanopartiköller üretilmiş olur (Şekil 4.1.).

4.2.3.4. PEG-b-PCL Nanopartiköllerinin Sterilizasyonu

İn vitro ve in vivo uygulamalar için formölasyonların kullanım öncesi steril hale getirilmeleri gerekmektedir. Nanopartikül formölasyonlarının sterilizasyonu final ürün elde edildikten sonra bu formölasyonun steril kabinde 0.22 µm selöloz filtreden süzölmüş su ile

dispersiyonu hemen ardından disperse haldeki nanopartikül çözeltisinin 0.22 µm selüloz filtreden geçirilmesiyle sağlanmıştır.

4.2.4. NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

Üretilen DOX nanopartiküllerinin polidispersite indeksleri (PDI), partikül büyüklüğü ortalaması (OPB) ölçümünde Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılmıştır. Disperse nanopartikül numunesindeki Brown hareketlerinin analizi temel alınarak dinamik ışık saçılımı yöntemiyle oda sıcaklığında ölçümler yapılmıştır. Her bir formülasyon için ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi ölçümleri, 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.1. Zeta Potansiyeli Tayini

Zeta potansiyel (ZP) nanopartiküllerde stabiliteye, hücresel etkileşimlere, fizyolojik ortam davranışına etki eden yüzey yükü gösteren bir ölçü parametresidir. Malvern Zetasizer Nano ZS cihaz yardımıyla ölçümler yapılmıştır. Üç tekrarlı olacak şekilde yapılan ölçümler oda sıcaklığında kapiller kuvvetler yardımıyla ölçülmüştür.

4.2.4.2. Enkapsülasyonun Etkinliğinin Değerlendirilmesi

DOX'un yükleme etkinliği polimerik PEG-b-PCL NP için direkt yöntem kullanılarak valide UV-vis metoduyla tayin edilmiştir. Nanopartikül üretimi sonrasında ortamdaki enkapsüle olmayan DOX'u içeren süpernatantın dökülerek ve sonrasında ddH₂O yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Pelletteki nanopartikül formülasyonları 1'er ml ddH₂O ile sulandırılarak disperse edilmiştir. Enkapsülasyon etkinlik değerlendirmesi için 100 µl örnek alınarak DMSO ile 1:15 oranda seyreltilmiş, UV spektrofotometrik okumaları yapılmış ve yüzde enkapsülasyon verimliliği hesaplanmıştır.

EGFP kodlayan plazmid (p-EGFP) için enkapsülasyon verimliliğinin belirlenmesinde Qubit 4 Florometre kullanılmıştır. Miktar tayini için plazmid yüklenen nanopartiküllerin, nanopartikül üretim basamağındaki santrifüj işlemi sonrasında süpernatant örnekleri alınmış ve Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kit ile konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır. Süpernatantta enkapsüle olmayan total plazmid miktarının florometrik ölçüm

ile belirlenmesini takiben enkapsüle olan pDNA miktarı belirlenerek yüzde enkapsülasyon verimliliği hesaplanmıştır.

% Enkapsülasyon Etkinliği

$$[\text{Enkapsüle ilaç miktarı } (\mu\text{g}) / \text{Kullanılan toplam ilaç miktarı } (\mu\text{g})] \times 100$$

4.2.4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının DSC Analizi

DOX, PEG-b-PCL, DOX NP, DOX/PEG-b-PCL (1:10) fiziksel karışım örneklerinin ölçümleri Shimadzu DSC-60 cihazı ile yapılmıştır. 2 mg tartılan örnekler panlara doldurularak sıkıştırılmıştır. Örnekler 25-350°C ölçüm aralığında, 5°C/dk sıcaklık artış hızında test edilmiştir.

4.2.4.4. Nanopartikül Formülasyonlarının FTIR Analizi

DOX, BOŞ NP, DOX NP numunelerinin FTIR analizi PERKIN ELMER 400 FT-IR/FT-FIR Spectrometer Spotlight 400 Imaging System ile yapılmıştır. Liyofilize örneklerin 4000 – 400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında spektrum ölçümleri yapılmıştır.

4.2.4.5. Nanopartikül Formülasyonları TEM Görüntülemesi

Nanopartikül formülasyonlarına ait yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile bakılmış ve değerlendirilmiştir. (52) Formülasyonların mikroskop görüntüleri, ODTÜ merkez laboratuvarındaki FEI Tecnai G2 cihazı ile alınmıştır. Distile su ile 20 kat oranda seyreltilen numunelerden 10-20 µl alınarak karbon kaplı bakır ızgaralara damlatılarak örneklerin kuruması beklenmiş ve görüntülenmesi yapılmıştır.

4.2.4.6. İlaç Yüklü PEG-b-PCL Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilité Çalışmaları

Nanopartiküller disperse halde +4°C'de buzdolabında ve +25°C'de %60 nem oranına sahip iklim kabininde belirlenen sürelerde (1,2 ve 3 ay) karanlık ortamda saklanmıştır. Bu sürenin sonunda partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli değerleri ölçülmüştür.

4.2.5. HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİMİ VE TASARIMI

4.2.5.1. Hidrojel Formülasyonlarının Sentezi

Hidrojel ağ yapısını oluşturabilmek için karboksi metil selüloz, hyalüronik asit ve poli etilen oksit polimerleri kullanılmıştır. Jel tampon çözeltisi %0,43 (w/v) NaCl, %0,47 (w/v) CaCl₂. 2H₂O oranlarında hazırlanarak 0,45 µm'lik filtreden süzölmüştür. Her bir jel formölasyonu 25 ml hacimde 100 ml beherler içerisinde hazırlanmıştır. Hacim ve cam malzeme seçiminde IKA EUROSTAR 20 mekanik karıştırıcı üç bıçaklı pervane (R 1381) çapı (45 mm) göz önünde bulundurulmuştur. Polimerler deney tasarımı belirlenen miktarlarda tartılarak fiziksel karışım oluşturulmuştur. Polimer karışımı, oda sıcaklığında mekanik karıştırıcıda 1000 rpm'de karışmakta olan 100 ml'lik beher içerisindeki 25 ml tampon çözeltisine spatöl aracılığı ile yavaşça eklenmiştir. Mekanik karıştırıcı 15 dakika 1000 rpm hızda çalıştıktan sonra 3 saat 150 rpm'de karıştırılarak jel formölasyonu elde edilmiştir. Hidrojel formölasyonları, şişmesi için bir gün süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve sonrasında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.5.2. Hidrojel Formölasyonlarının Sterilizasyonu

Hidrojel formölasyonları 100 ml'lik borosilikat cam şişelere aktarılmış, 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Steril jel formölasyonları +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.5.3. Hidrojel Ön Formölasyon Çalışmaları ve Hazırlanması

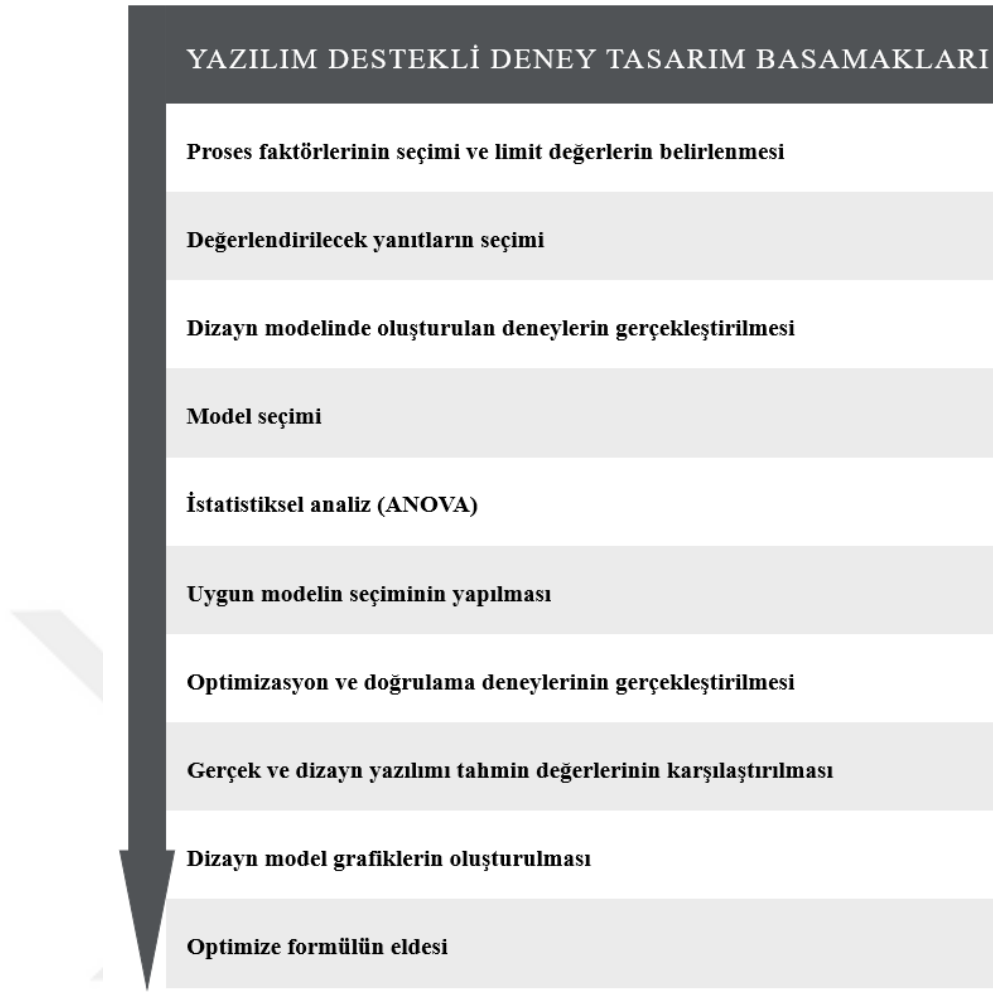
Bu çalışmada literatürde yer alan post operatif uygulamaları bulunan hidrojel formölasyonları değerlendirilerek tez çalışması kapsamında yara iyileştirici ve kontrollü ilaç salımı yapabilecek nitelikte formölasyon tasarımı yapılmıştır (101, 114, 115). Literatürdeki tampon içeriği temel alınarak (101) tez çalışmasında hedeflenen yara iyileştirici etkinlik için formölasyona hyalüronik asit bileşeni eklenmiş hedeflenen kullanım doğrultusunda formölasyon tasarımı yapılmıştır. Formöl için gereken bileşenlerin miktarlarının belirlenmesi aşamasında yazılım temelli deney tasarımı yapılmıştır. Tasarım için ön deney aralıkları belirlenmiş, jele ait mekanik özelliklerin ölçümü yapılmış ve belirlenen tasarım aralığında analizler gerçekleştirilmiştir.

4.2.5.4. Hidrojel Formülasyon Tasarımı

Deney tasarımı ve analizi için Design-Expert yazılımının 13.0.5.0 sürümü kullanılmıştır. Yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Method) kullanılarak, deneyler merkezi bileşik tasarım (Central Composite Design, CCD) ile planlanmıştır (Şekil 4.2.). Deney tasarımı kübik bir model kullanılarak oluşturulmuştur. Bu model, bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisini belirlemektedir ve bu değişkenlerin doğrusal, kare ve çapraz terimlerini içermektedir (116).

Deney planı, iki bağımlı değişken faktör, sekiz yanıt türüne karşılık yazılım tarafından oluşturulan on üç farklı formül koşulu ve rastgele sıralama ile gerçekleştirilmiştir. Hidrojel formülasyonunda CMC ve HA değişken parametreler olarak belirlenmiştir. Vizkozite (5-10-15 rpm), sertlik, sıkıştırılabilirlik, adhezyon, kohezyon ve elastisite olmak üzere hidrojin mekanik özelliklerini tanımlayan sekiz farklı yanıt türü ile tasarım oluşturulmuştur. CMC ve HA için ön formülasyon dizayn aralıkları içerisinde mekanik özellikler ölçülmüş ve belirlenen cihaz parametrelerinde, yazılımın oluşturduğu formül standartlarının tamamının tekstür cihaz ölçüm aralığında kalması ve şırınga edilebilirlik niteliklerini koruması dikkate alınmıştır. Rezidüel meme kanserine sahip fareler için yapılacak uygulamada formülasyonun 1 cc'lik insülin enjektörleri (21 gauge) ile tümör rezidüsü bölgesine uygulanmasının planlanmasını takiben jelin vizkoz özellikleri şırıngadan geçebilmesi, homojen bir formülasyon görüntüsünün elde edilebilmesi göz önünde bulundurulmuştur.

Elde edilen veriler, yanıt yüzey analizleri kullanılarak değerlendirilmiş ve modelin uygunluğu, istatistiksel testler (ANOVA) ile doğrulanmıştır. Modelin anlamlılığını belirlemek için belirlilik katsayısı (R^2), ayarlanmış R^2 ve tahmin edilen R^2 değerleri incelenmiştir. Model terimlerinin anlamlılığı, p-değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Hedef jel özellikleri için tayin edilen sınır aralığında tasarım planlanmıştır. Yazılım tarafından oluşturulan optimal koşullar incelenmiş ve arzu edilebilirlik (desirability) skoru en yüksek çözüm seçilerek optimal formül ile canlılık ve hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. Hidrojel deney tasarımı akış şeması

4.2.5.5. Hidrojellerin in vitro Yöntemlerle Karakterizasyonu

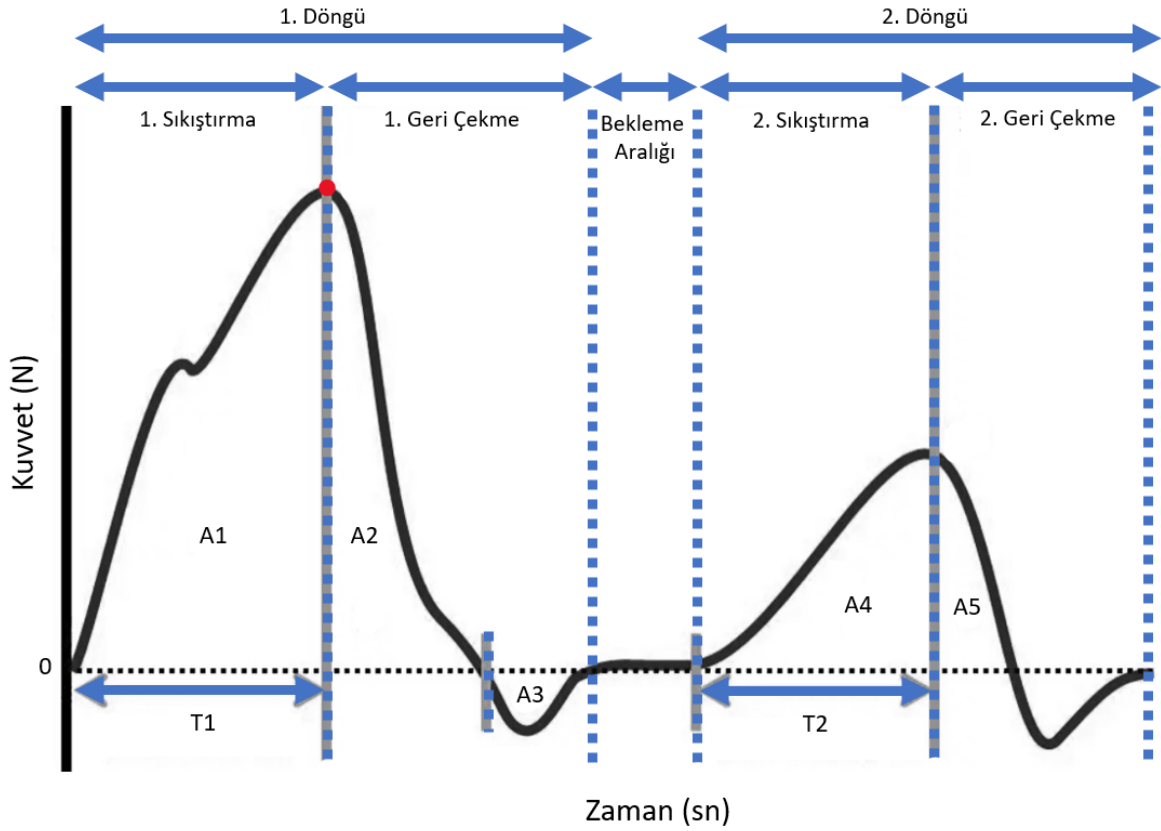
4.2.5.5.1. Hidrojellerde Vizkozite Tayini

Vizkozimetre ölçümleri Brookfield DV cihazı ve cihaza ait No:96 mil ile gerçekleştirilmiştir. Rotor hızları için 5, 10 ve 15 rpm değerleri baz alınarak ölçümler yapılmıştır.

4.2.5.5.2. Hidrojellerin Tekstür Profil Analizleri

Hidrojellerin tekstür profil analizleri oda sıcaklığında TA.XT Plus Texture Analyzer cihazıyla yapılmıştır (Şekil 4.3.). Sertlik, sıkıştırılabilirlik, adheziflik, koheziflik ve elastisite ölçümlerinde 10 mm Ø Delrin SMS P/10 radyal silindir probu kullanılmıştır. 2

mm/sn prob test hızı, 10 mm temas derinliği, döngüler arası 15 sn bekleme süresi, 0,1 N tetikleme kuvveti, 0,1 N kırılma hassasiyeti parametreleri ile çalışılmıştır. 50 ml'lik beherlerde 25 ml hidrojel numuneleri ölçümler yapılmıştır.



Şekil 4.3. Tekstür profil analizinde birincil tekstür ölçümleri ve türetilen tekstür parametrelerinin orijin belirteçleri (1)

4.2.5.5.3. Hidrojellerde Sertlik Tayini

Sertlik, malzemeye uygulanan kuvvetin arttığı ilk noktada ölçülen maksimum kuvvet ile ifade edilir. Malzemenin direncini ve deformasyona karşı gösterdiği ilk tepkiyi yansıtır. Probun ilk batma periyodunda ölçülen maksimum güç değeri sertlik kuvvetini (F) vermektedir. Sertlik değeri Newton cinsinden ölçülmektedir. Şekil 4.3'te kırmızı nokta ile işaretlenen kısım sertlik değerini göstermektedir (117).

4.2.5.5.4. Hidrojellerde Sıkıştırılabilirlik Tayini

Sıkıştırılabilirlik, sertlikten sonra kuvvetin düşüş eğilimini ve malzemenin sıkıştırma sonrası ne kadarının orijinal boyutuna dönebildiğini gösterir. Malzemenin sıkıştırma altında ne kadar hacim kaybettiğini ve bu değişikliğin büyüklüğünü gösterir. Şekil 4.3'te gösterilen A1 ve A2 alanlarının toplamıyla ifade edilir (117).

4.2.5.5.5. Hidrojellerde Adheziflik Tayini

Cihaz probu yüzeyi ile jel yüzey arasındaki çekme kuvvetini yenebilmek için gereken enerjiyi tanımlamaktadır. Probun ilk batma periyodu sonrası birinci geri çekme periyodu süresince gözlenen eğri altı alan değeri adheziflik değerini verir. Negatif kuvvet alanı, malzemenin test aparatına yapışkanlığını gösterir. Şekil 4.3'te gösterilen A3 alanı ile ifade edilir (117).

4.2.5.5.6. Hidrojellerde Koheziflik Tayini

Koheziflik, malzemenin iç yapısının ne kadar bir arada tutulduğunu gösteren ve genellikle tekrarlanan sıkıştırma döngülerinden sonra malzemenin yapısal bütünlüğünün ne kadar korunduğunu gösteren bir ölçüttür. İkinci sıkıştırma periyodu ile sağlanan eğri altındaki alanın, birinci sıkıştırma periyodunda sağlanan eğrinin altta kalan kısmına oranı koheziflik değerini verir. Şekil 4.3'te gösterilen alanlara göre $(A4 + A5) / (A1 + A2)$ oranıyla ifade edilir (117).

4.2.5.5.7. Hidrojellerde Elastisite Tayini

Elastisite, malzemenin sıkıştırma kuvveti kaldırıldıktan sonra orijinal boyutuna dönme kabiliyetidir. Malzemenin hemen orijinal boyutuna dönmesi yüksek elastisiteyi gösterirken, yavaş veya tam olmayan bir dönüş düşük elastisiteyi ifade eder. Hidrojellerde probun ikinci batma işleminde maksimum deformasyonu sağlaması için geçen sürenin, birinci batma işlemindeki maksimum deformasyonu sağlaması için geçen süreye oranı elastisiteyi gösterir. Şekil 4.3'e göre $T2 / T1$ oranıyla ifade edilir (117).

4.2.5.5.8. Hidrojellerde Mukoadhezyon Tayini

Hidrojellerin mukoadhezyon analizleri oda sıcaklığında TA.XT Plus Texture Analyzer cihazıyla yapılmıştır. Mukoadhezyon ölçümlerinde 1/2" Ø Delrin P/0.5 radyal silindir probu kullanılmıştır. 0,5 mm/sn test hızı, 100 g uygulama kuvveti, 10 mm geri dönüş mesafesi, 30 sn temas süresi parametreleri ile çalışılmıştır. pH 6.5 tamponu ile %10'luk hazırlanan müsin çözeltisi, Stable Micro Systems A/MUC mukoadhezyon aparatında sabitlenen ve her test öncesi her numune için ayrıca hazırlanan 2 cm² Whatman No 4 filtre kağıtlarına 100 µl emdirilerek, 100 µl hidrojel örneği uygulanmış prob ile analizler yapılmıştır.

4.2.5.5.9. Hidrojellerde Şırınga Edilebilirlik Tayini

Hidrojellerin şırınga edilebilirlik analizleri oda sıcaklığında TA.XT Plus Texture Analyzer cihazıyla yapılmıştır. Ölçümlerde 10 mm Ø Delrin SMS P/10 radyal silindir probu ve 21 gauge iğne uçlu 2 ml'lik enjektörler kullanılmıştır. Sıkıştırma test modunda, 5 mm/sn ön test hızı, 1 mm/sn test hızı, 0,05 N tetikleme kuvveti parametreleri ile çalışılmıştır.

4.2.5.6. Hidrojel Formülasyonlarında Stabilitate Tayini

Deney tasarımı ile elde edilen final hidrojel formülasyonuna ait numuneler 1, 3 ve 6 ay süreyle +4 °C saklama koşullarında tutulmuştur. Numunelere ait pH, vizkozite ve tekstür ölçümleri yapılarak karşılaştırma yapılmıştır.

4.2.5.7. Etkin madde ve/veya Nanopartikül İçeren Hidrojel Formülasyon Karışımlarının Hazırlanması

Hidrojel doksorubisin, hidrojel boş nanopartikül, hidrojel DOX nanopartikül karışımları BD Luer Lock kilitli şırıngaları ve konnektör aparat yardımıyla fiziksel olarak iki şırınga arasında karıştırılarak hazırlanmıştır (Şekil 4.4.). Deney tasarımı sonucu elde edilen optimum hidrojel formülasyonu ile DOX ve nanopartikül formülasyonları 1 mg/ml DOX konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Hidrojel formülasyonunun seyreلمemesi için DOX liyofilize olarak hidrojel ile karıştırılırken, Boş NP ve DOX NP içeren formülasyonlar doz ayarı yapıldıktan sonra 35.000 rpm'de +4°C'de santrifüjlenerek bu formüllerin pelletleri hidrojel ile karıştırılarak final formüller elde edildi.



Şekil 4.4. Etkin madde ve/veya nanopartikül içeren hidrojel formülasyon karışımlarının hazırlanması (Biorender®)

4.2.5.8. İn vitro Salım Çalışmaları

Üretilen DOX yüklü nanopartiküllerden ve hidrojel formülasyonlarından DOX'un salım profilini aydınlatmak amacıyla in vitro salım deneyleri 37°C'de, orbital çalkalayıcı inkübatörde 50 rpm hızda çalkalanarak yapılmıştır. Salım, MwCO: 12.000 Da diyaliz membran yardımıyla, DOX için sink koşullarının (salım süresince ortamda bulunan DOX'un, medyada çözünebilecek DOX miktarının %10'unu geçmemesi) sağlandığı ortamda gerçekleştirilmiştir (118). Fizyolojik koşulların sağlanabilmesi amacıyla fizyolojik pH için 0.01 M pH 7.4 fosfat tamponu, tümör mikro çevresindeki pH koşulları için 0.01 M pH 5.8 fosfat tamponu kullanılmıştır (119). Tamponlar %0.1 oranında Tween 80 eklenerek kullanılmıştır (120). Fosfat tamponları 37°C'de dengeye geldikten sonra salım başlatılmıştır. 21 günlük süreyle formülasyonlardan dış ortama salınan etkin maddenin miktar tayini yapılmıştır. Belirli zaman aralıklarında tüm medya değiştirilmiş, ortamdan eksilen tamponlar aynı koşullarda bulunan stok tamponlar ile tamamlanmıştır. Salım için belirlenen tamponlarda doksorubisin nanopartikül, doksorubisin hidrojel, doksorubisin nanopartikül hidrojel formülasyonlarının, 1 mg/ml doksorubisin konsantrasyonlarda, 20 ml'lik deney tüplerinde, 10 ml salım medyumunda, 1 ml numune yüklü Mwco 14 kDa diyaliz membranlar ile, 37°C çalkalayıcı etüvde, 50 rpm çalkalama hızında salımı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında örneklerdeki doksorubisin miktarı UV spektrofotometre ile tayin edilerek hesaplanmıştır.

4.2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Bu çalışmada hücre kültürü çalışmalarında fare hücre hatları kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak NIH/3T3 embriyonik fibroblast hücre hattı, kanser hücre hattı olarak da 4T1 meme kanseri kullanılmıştır. Hücre hatlarında besiyeri olarak NIH/3T3 için DMEM (%10 FBS, %1 penisilium/streptomycin), 4T1 için RPMI-1640 (%10 FBS, %1 penisilium/streptomycin) kullanılmıştır. Hücreler inkübatörde %5 CO₂, 37°C koşullarda muhafaza edilmiştir.

Hücre yoğunluğu yaklaşık %80 olduğunda hücre pasajlamaları yapılmıştır. Hücre pasajı için besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Flasklara 10x Tripsin/EDTA eklenmiş (T25 için 300 µL, T75 için 600 µL) ve 2 dk süreyle inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin flask tabanından ayrıldığını gözlemlemek için mikroskop görüntüsü incelenmiştir. Hücreler için belirlenen besiyerleri eklenerek tripsinizasyon işlemi sonlandırılmıştır. NIH/3T3 hücresi 1:8 oranda besiyeri, 4T1 hücresi 1:10 oranda besiyeri ile seyreltilerek pasaj işlemi yapılmıştır. Pasajlanan hücreler için flasklara yeterli miktarda besiyerleri eklenerek inkübatöre kaldırılmış ve haftada iki kez pasaj yapılmıştır.

Hücreler her kuyu için 5×10^3 hücre olacak biçimde 50 µL besiyeri içerisinde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Bir gece süreyle inkübe edilerek hücrelerin flask tabanına yapışması beklenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda (0-50-100-200-400-800 nM) DOX besiyeri içinde üç tekrar olacak biçimde kuyulara eklenmiştir. 24-48-72 saat inkübasyon sürelerini takiben her kuyuya 25 µl MTT (5 mg/mL) eklenmiş ve 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyuya 80 µL SDS/DMF çözeltisi eklenmiştir. Kör olarak SDS/DMF kullanılmıştır. Yaklaşık olarak 16 saat inkübe edilen 96 kuyucuklu plakalardaki her kuyunun absorbans değeri, mikro plaka spektrofotometre yardımıyla (Spectra Max Molecular Devices, ABD) 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bütün koşullar için üçlü okumalara ait ortalama optik yoğunluk değerleri (Optical Density, OD) hesaplanmış ve körden elde edilen OD değerleri, hücrelerin ölçülen OD değerlerinden çıkartılmış ve arka plan normalizasyonu yapılmıştır. Kontrol kültür ortamında bulunan hücrelerin OD değerleri baz alınarak formülasyonların uygulandığı hücrelerin OD değerlerinin % değişimi aşağıdaki hesaplanmıştır. (Canlı hücre miktarı % = Madde uygulanmış koşul OD / Kontrol koşul OD x 1) Gruplar kontrol, DOX, Boş NP, Dox NP, HA'sız HJ, Kontrol HJ, DOX HJ, Boş NP HJ, DOX NP HJ olarak ayrılarak uygulama yapılmıştır.

4.2.7. TRANSWELL HÜCRE ANALİZİ

Transwell membranına ekimi (5×10^4) yapılan 4T1-luc hücreleri 16 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Plakaların (24 kuyulu) tabanına, final DOX konsantrasyonu 200 nM (IC50) olacak biçimde formülasyonlar eklenmiştir. 48 saat inkübasyon sonrasında canlı hücre yoğunluğunun ölçümü için transwell yıkandıktan sonra (1X PBS), kuyular üzerine 100'er µl Luciferin (30 mg/ml) eklenmiş ve hücrelerin ortalama floresan yoğunlukları IVIS

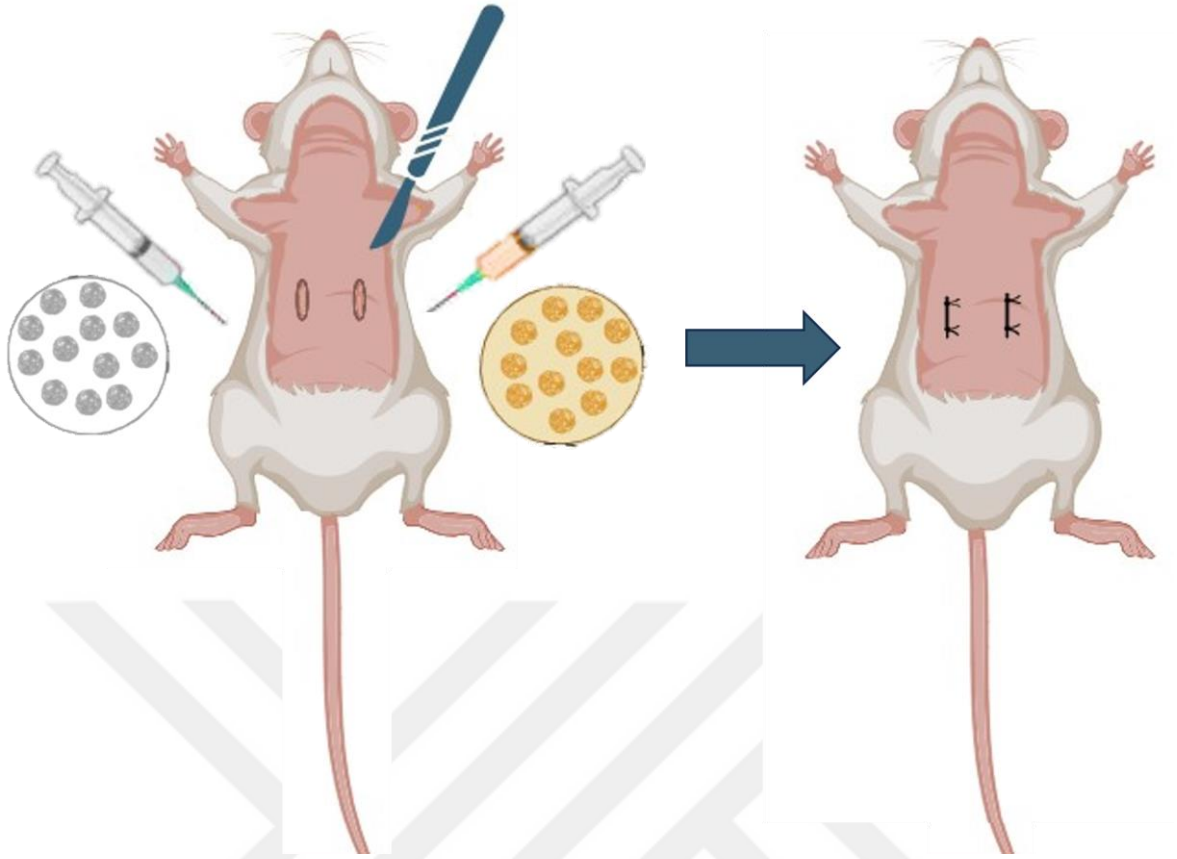
görüntüleme sistemi ile analiz edilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde Transwell (Corning Incorporated, USA, 3415, 6.5 mm diameter inserts, 3 µm pore size, steril, LOT# 23014051) kullanılmıştır.

4.2.8. IN VIVO HAYVAN DENEYLERİ

Rezidüel meme kanseri modeli oluşturmak için 6-8 haftalık Balb-c dişi farelere 10^5 4T1-luc meme kanseri hücresi (1:10 oranda seyreltilmiş matrijel içerisinde) subkütan olarak meme dokusuna enjekte edilmiştir. Hücre enjeksiyonundan 24 saat sonra her iki meme için meme dokusunun orta hattında 1 cm'lik eksizyonel kesi yarası oluşturularak meme dokusu odaklı lokal tedavi uygulamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5.). Aynı hayvan üzerinde sağ kadrındaki memelere DOX içermeyen formülasyonlar uygulanırken sol kadrındaki memelere DOX içeren formülasyonlar uygulanmıştır. (DOX-PBS, DOX NP-NP, DOX HJ-HJ, DOX NP HJ-NP HJ) Tedavi uygulamasının ardından eksizyonel yara alanı sütür atılarak kapatılmıştır. Tedavi sonrası hayvanların tümör gelişimi 1 hafta boyunca takip edilmiştir. Tümör formasyonunun gelişimini takip etmek üzere hayvanlara 2 günde bir intravenöz enjeksiyonla D-luciferin uygulaması yapılarak canlı hayvan görüntüleme sistemi (NEWTON 7.0; Vilber, Fransa) ile görüntülenmiştir. Cerrahi işlem sonrasında ve her görüntüleme gününde yara alanının fotoğrafı çekilerek yara kapanma oranları ImageJ programı ile analiz edilmiştir. Cerrahi işlem ve görüntülemeler öncesinde ketamin/ksilazin intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi yapılmıştır.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT): MTT tozundan 5 mg tartılarak 1 ml PBS ile çözülmüş ve 4°C'de saklanmıştır.

SDS/DMF çözeltisi: SDS/DMF çözeltisini hazırlamak için 25 ml DMF, 25 ml distile su ile karıştırılmış ve 10 gr SDS yavaşça eklenmiştir. Ardından 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH ile pH 4,7'ye ayarlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.



Şekil 4.5. İn vivo hayvan modelinde formülasyonların uygulanması (Biorender®)

4.2.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

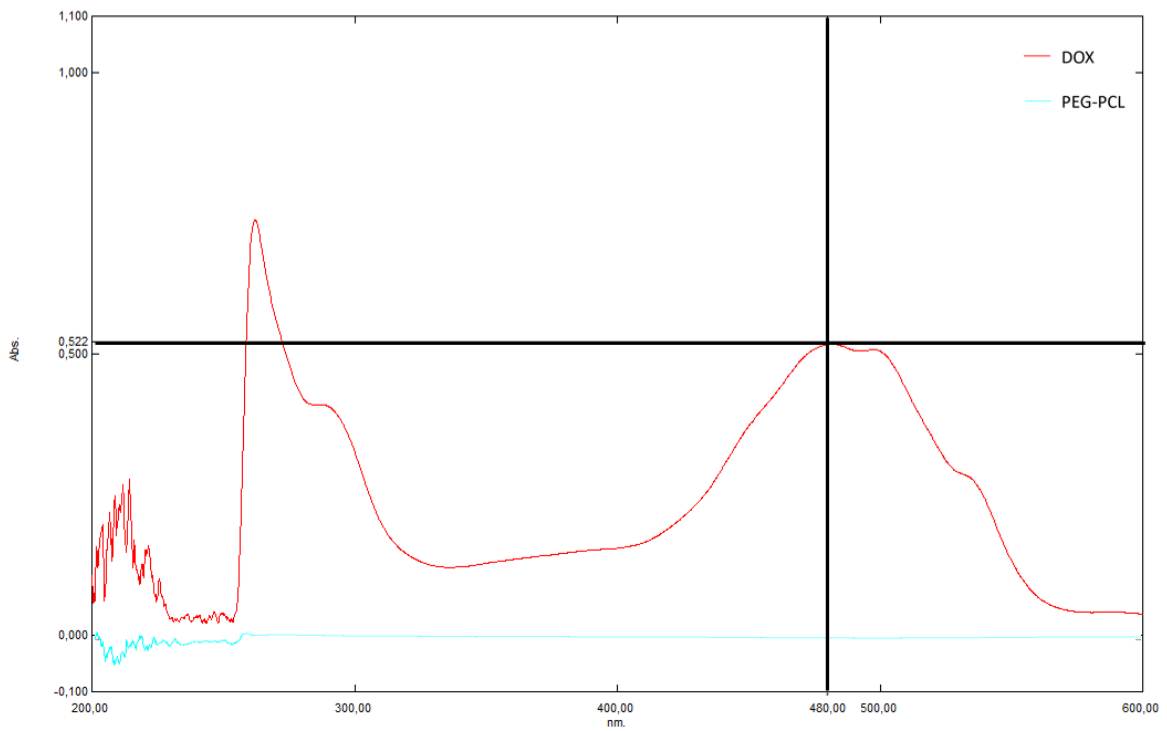
Deney sonuçları, en az üç bağımsız çalışmadan elde edilmiştir. İstatistiksel farklılık analizi için Kruksal-Wallis testi ve ANOVA testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p \leq 0,05$ koşulunun sağlanması değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde standart hata (SE) ve ortalama değerler standart sapma (SD) değerleri ile grafikler hazırlanmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DOKSORUBİSİN HCL’İN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

5.1.1. DOKSORUBİSİN HCL’İN ULTRA VİOLE (UV) SPEKTRUMU

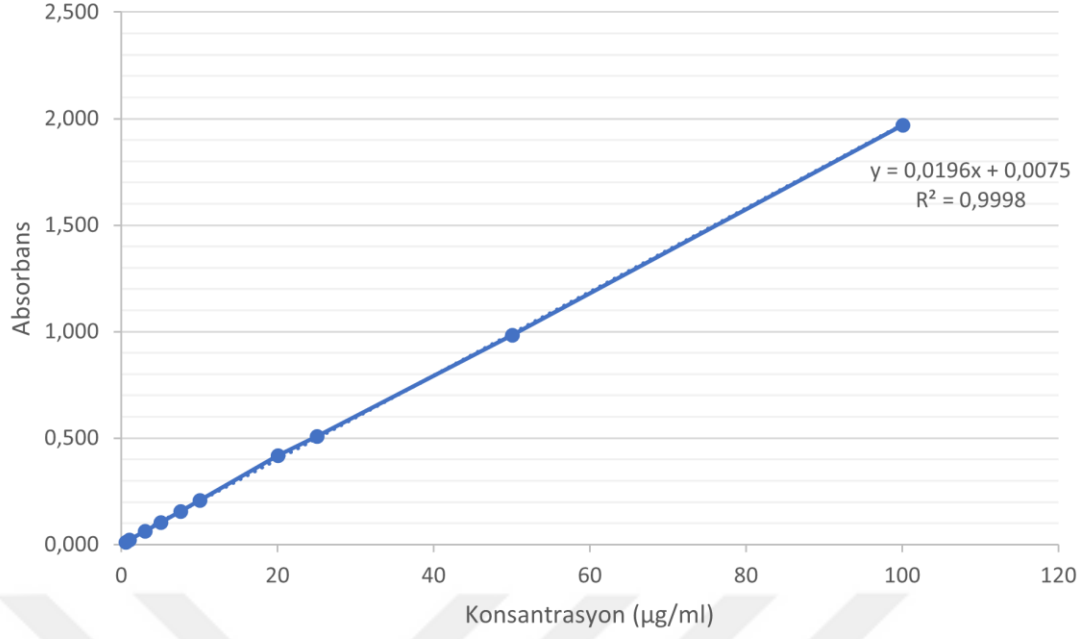
Doksorubisin hidroklorürün DMSO’daki 25 µg/ml çözeltisi Şekil 5.1.’de verilmiştir. Spektrum verisine göre maksimum absorbands değeri 480 nm olarak belirlenmiş ve sonraki ölçümler bu dalga boyunda yapılmıştır.



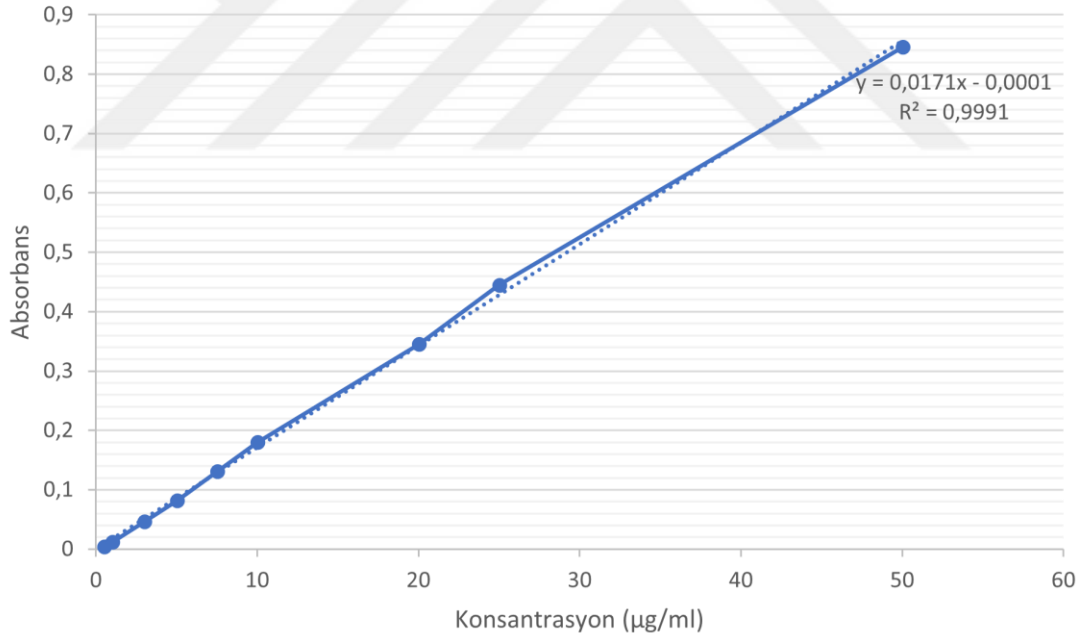
Şekil 5.1. Doksorubisin HCl ve PEG-b-PCL DMSO UV spektrumu

5.1.2. DOKSORUBİSİN HCL MİKTAR TAYİNİ VE KALİBRASYONU

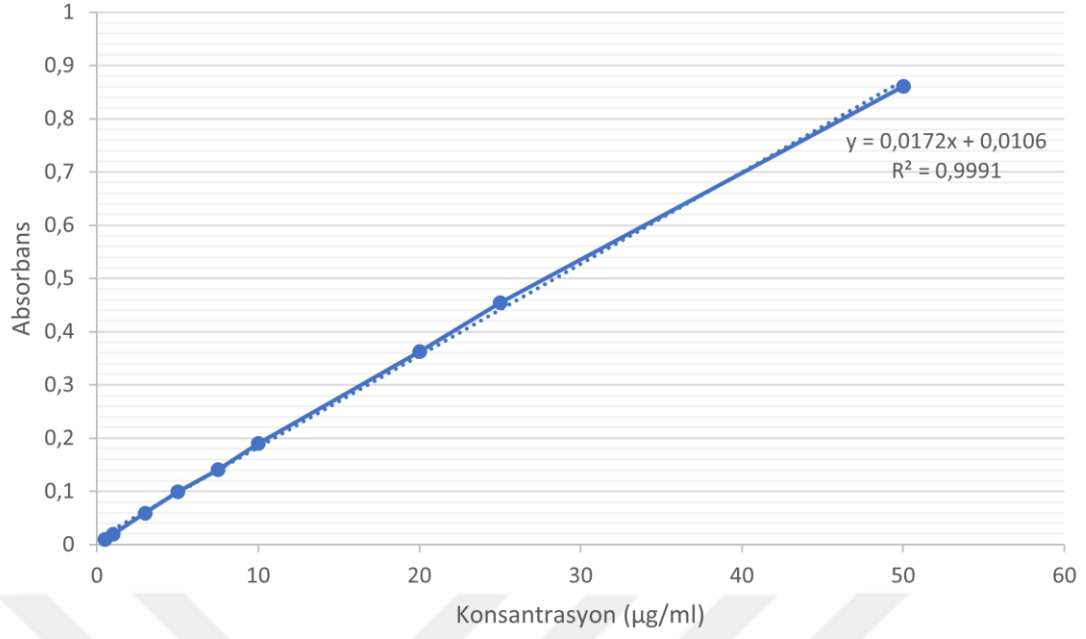
Doksorubisin HCl 0,5-1-3-5-7,5-10-20-25-50-100 µg/ml konsantrasyonlarda DMSO’da çözülerek kalibrasyon doğrusu (Şekil 5.2.) çizilmiştir. Yine aynı konsantrasyon değerlerinde salım ortamı tamponları olan 0.01 M pH 5.8 ve pH 7.4 fosfat tamponlarında da kalibrasyon doğruları (Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.) çizilmiştir.



Şekil 5.2. DOX HCl DMSO’da kalibrasyon doğru ve denklemi (n=3)

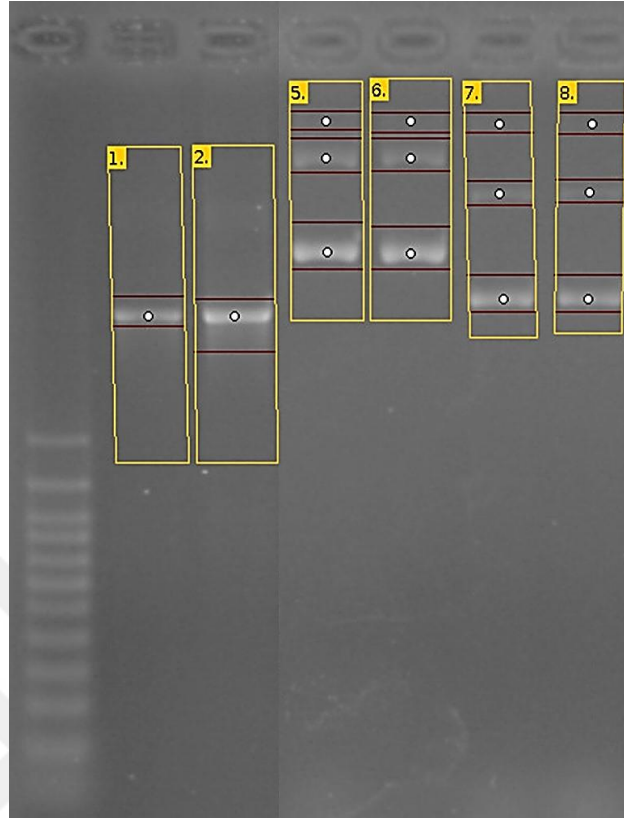


Şekil 5.3. DOX HCl pH 7.4 PB’da kalibrasyon doğru ve denklemi (n=3)

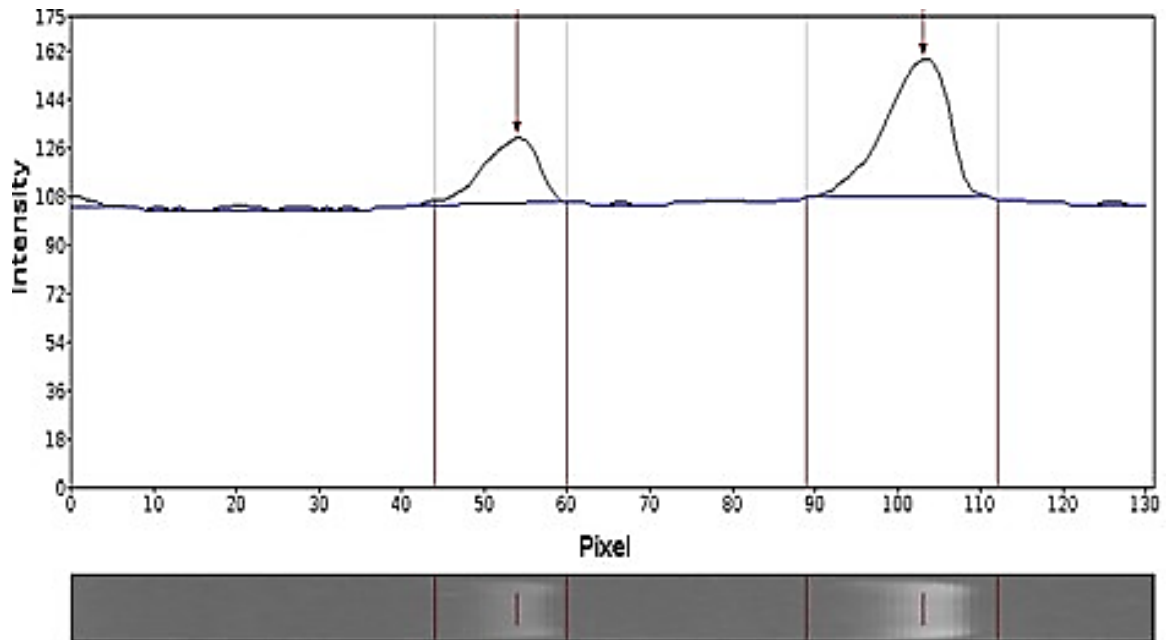


Şekil 5.4. DOX HCl pH 5.8 PB’da kalibrasyon doğru ve denklemleri (n=3)

5.1.3. PLAZMİD DNA ÜRETİMİ VE KANTİTASYONU



Şekil 5.5. Agaroz jel görüntülemesi



Şekil 5.6. Plazmid bantları piksel yoğunluğu ölçümü (ImageJ)

Çizelge 5.1. İzole edilen plazmid konsantrasyonları

Plazmid	Plazmid Konsantrasyonu (ng/μl)
P5	789,84
P6	891,96
P7	841,51
P8	837,82

Çizelge 5.2. Formülasyon süpernatantlarındaki plazmid konsantrasyonu ve formüllerin enkapsülasyon verimlilikleri

Formülasyon	Formülasyon supernatant plazmid konsantrasyonu (ng/μl)	Enkapsülasyon Verimliliği (%)
F7	1,29	9,7
F8	1,32	8,3
F9	2,52	8,6
F10	2,68	6,2

5.1.4. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

5.1.4.1. Doğrusallık

DOX HCl'nin DMSO ve 0.01 M pH 5.8 ve pH 7.4 fosfat tamponları içerisinde hazırlanan çözeltilerin ölçümü maksimum absorbansın alındığı 480 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Absorbans ve konsantrasyon değerleri arası ilişkinin 0,5-100 μg/ml aralığında doğrusal oldukları gösterilmiştir. ($R^2=0.999$)

5.1.4.2. Doğruluk

Yöntemlerin doğruluk değerlendirilmeleri için elde edilen sonuçlar Çizelge 5.3. ve Çizelge 5.4'de verilmiştir. DMSO için 3-10-20 μg/ml, fosfat tamponu için 5-10-20 μg/ml konsantrasyon değerleri seçilmiştir.

Çizelge 5.3. Dokсорubisin DMSO tayin yöntemine ait doğruluk bulguları

3 µg/mL		10 µg/mL		20 µg/mL	
Kons. (µg/mL)	% GK	Kons. (µg/mL)	% GK	Kons. (µg/mL)	% GK
3,087	102,891	10,077	100,765	20,128	100,638
3,087	102,891	10,179	101,786	20,077	100,383
3,036	101,190	10,128	101,276	19,974	99,872
2,985	99,490	10,077	100,765	20,281	101,403
3,036	101,190	10,128	101,276	20,179	100,893
3,036	101,190	10,128	101,276	20,026	100,128
Ort. % GK	101,474	101,190		100,553	
SS	1,280	0,384		0,551	
% BS	1,262	0,380		0,548	

Çizelge 5.4. Dokсорubisin PB tayin yöntemine ait doğruluk bulguları

5 µg/mL		10 µg/mL		20 µg/mL	
Kons. (µg/mL)	% GK	Kons. (µg/mL)	% GK	Kons. (µg/mL)	% GK
4,878	97,556	9,767	97,667	19,989	99,944
4,933	98,667	9,767	97,667	20,100	100,500
4,878	97,556	9,878	98,778	20,044	100,222
4,878	97,556	9,767	97,667	20,100	100,500
4,989	99,778	9,933	99,333	20,044	100,222
4,878	97,556	9,767	97,667	20,100	100,500
Ort. % GK	98,111	98,130		100,315	
SS	0,930	0,738		0,227	
% BS	0,948	0,752		0,226	

5.1.4.3. Kesinlik

Yöntemlerin kesinlik değerlendirilmeleri için elde edilen sonuçlar Çizelge 5.5. ve Çizelge 5.6.'de verilmiştir. DMSO için 3-10-20 µg/ml, fosfat tamponu (PB) için 5-10-20 µg/ml konsantrasyon değerleri seçilmiştir.

Çizelge 5.5. Dokсорubisin DMSO tayin yöntemine ait kesinlik bulguları

3 µg/mL			10 µg/mL			20 µg/mL		
Gün	Absorbans	Kons. (µg/mL)	Gün	Absorbans	Kons. (µg/mL)	Gün	Absorbans	Kons. (µg/mL)
1	0,061	2,729592	1	0,202	9,923469	1	0,407	20,38265
1	0,06	2,678571	1	0,202	9,923469	1	0,407	20,38265
1	0,061	2,729592	1	0,203	9,97449	1	0,407	20,38265
1	0,059	2,627551	1	0,203	9,97449	1	0,408	20,43367
1	0,061	2,729592	1	0,204	10,02551	1	0,409	20,48469
1	0,06	2,678571	1	0,204	10,02551	1	0,411	20,58673
2	0,061	2,729592	2	0,197	9,668367	2	0,403	20,17857
2	0,061	2,729592	2	0,199	9,770408	2	0,404	20,22959
2	0,061	2,729592	2	0,194	9,515306	2	0,405	20,28061
2	0,059	2,627551	2	0,201	9,872449	2	0,405	20,28061
2	0,061	2,729592	2	0,199	9,770408	2	0,403	20,17857
2	0,059	2,627551	2	0,2	9,821429	2	0,403	20,17857
3	0,06	2,678571	3	0,198	9,719388	3	0,405	20,28061
3	0,059	2,627551	3	0,199	9,770408	3	0,405	20,28061
3	0,06	2,678571	3	0,199	9,770408	3	0,406	20,33163
3	0,061	2,729592	3	0,198	9,719388	3	0,404	20,22959
3	0,058	2,576531	3	0,203	9,97449	3	0,402	20,12755
3	0,059	2,627551	3	0,2	9,821429	3	0,401	20,07653
Ortalama		2,681406			9,835601			20,29478
Standart Sapma		0,050937			0,137578			0,130729
% Bağıl Sapma		1,899637			1,398773			0,644153

Çizelge 5.6. Dokсорubisin PB tayin yöntemine ait kesinlik bulguları

5 µg/mL			10 µg/mL			20 µg/mL		
Gün	Absorbans	Kons. (µg/mL)	Gün	Absorbans	Kons. (µg/mL)	Gün	Absorbans	Kons. (µg/mL)
1	0,093	4,655556	1	0,183	9,655556	1	0,369	19,98889
1	0,094	4,711111	1	0,180	9,488889	1	0,369	19,98889
1	0,094	4,711111	1	0,181	9,544444	1	0,370	20,04444
1	0,094	4,711111	1	0,181	9,544444	1	0,370	20,04444
1	0,096	4,822222	1	0,180	9,488889	1	0,371	20,10001
1	0,096	4,822222	1	0,181	9,544444	1	0,371	20,10001
2	0,095	4,766667	2	0,181	9,544444	2	0,366	19,82222
2	0,095	4,766667	2	0,182	9,600001	2	0,369	19,98889
2	0,095	4,766667	2	0,181	9,544444	2	0,369	19,98889
2	0,096	4,822222	2	0,180	9,488889	2	0,369	19,98889
2	0,096	4,822222	2	0,180	9,488889	2	0,366	19,82222
2	0,096	4,822222	2	0,183	9,655556	2	0,367	19,87778
3	0,095	4,766667	3	0,180	9,488889	3	0,361	19,54444
3	0,095	4,766667	3	0,182	9,600001	3	0,360	19,48889
3	0,095	4,766667	3	0,182	9,600001	3	0,360	19,48889
3	0,096	4,822222	3	0,180	9,488889	3	0,359	19,43333
3	0,096	4,822222	3	0,181	9,544444	3	0,361	19,54444
3	0,097	4,877778	3	0,179	9,433333	3	0,359	19,43333
Ortalama		4,779012			9,541358			19,81605
Standart Sapma		0,055737			0,061665			0,251278
% Bağlı Sapma		1,166283			0,64629			1,268051

5.1.4.4. Tekrarlanabilirlik

Yöntemlerin tekrarlanabilirlik değerlendirilmeleri için elde edilen sonuçlar Çizelge 5.7. ve Çizelge 5.8.'de verilmiştir. Tekrarlanabilirlik için DMSO için 3-10-20 µg/ml, fosfat tamponu için 5-10-20 µg/ml konsantrasyon değerleri seçilmiştir.

Çizelge 5.7. Doksorubisin DMSO tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları

3 µg/mL		10 µg/mL		20 µg/mL	
Kons. (µg/mL)	Abs.	Kons. (µg/mL)	Abs.	Kons. (µg/mL)	Abs.
3,087	0,068	10,077	0,205	20,128	0,402
3,087	0,068	10,179	0,207	20,077	0,401
3,036	0,067	10,128	0,206	19,974	0,399
2,985	0,066	10,077	0,205	20,281	0,405
3,036	0,067	10,128	0,206	20,179	0,403
3,036	0,067	10,128	0,206	20,026	0,400
Ortalama	3,044	10,119	0,206	20,111	0,402
Standart Sapma	0,038	0,038	0,001	0,110	0,002
% Bağlı Sapma	1,262	0,380	0,366	0,548	0,538

Çizelge 5.8. Doksorubisin DMSO tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları

5 µg/mL		10 µg/mL		20 µg/mL	
Kons. (µg/mL)	Abs.	Kons. (µg/mL)	Abs.	Kons. (µg/mL)	Abs.
4,878	0,097	9,767	0,185	19,989	0,369
4,933	0,098	9,767	0,185	20,100	0,371
4,878	0,097	9,878	0,187	20,044	0,370
4,878	0,097	9,767	0,185	20,100	0,371
4,989	0,099	9,933	0,188	20,044	0,370
4,878	0,097	9,767	0,185	20,100	0,371
Ortalama	4,906	9,813	0,186	20,063	0,370
Standart Sapma	0,046	0,074	0,001	0,045	0,001
% Bağlı Sapma	0,948	0,752	0,715	0,226	0,220

5.1.4.5. Duyarlılık

Yöntemlerin duyarlılık değerlendirilmeleri için elde edilen sonuçlar Çizelge 5.9.'da verilmiştir. Doksorubisin için ölçülen teşhis ve tayin değerleri göz önünde bulundurularak doğruluk, kesinlik, tekrar edilebilirlik analizleri için tayin limitinin üstünde kalan en düşük konsantrasyon ile başlayarak DMSO için 3-10-20 µg/ml, fosfat tamponu için 5-10-20 µg/ml konsantrasyon değerleri ile çalışılmıştır. LOD ve LOQ değerleri Bölüm 4.2.1.4.5. teki Eşitlik 1 ve Eşitlik 2 ye göre hesaplanmıştır.

Çizelge 5.9. Doksorubisin tayin yöntemlerine ait duyarlılık bulguları

Çözücü ortamı	LOQ (µg/ml)	LOD (µg/ml)
DMSO	1,5811	0,52177
PB 5.8	3,354	0,943
PB 7.4	4,832	1,5946

5.1.4.6. Özgüllük

Doksorubisin HCl ve PEG-b-PCL DMSO UV spektrumunda (Şekil 5.1.) DMSO'da çözülen doksorubisin ve PEG-b-PCL polimerine ait ölçüm de alınmıştır. Nanopartikül üretimlerinde kullanılan polimerin, doksorubisinin ölçüm aralığında 480 nm'de pik vermediği ve sıfır değerini gösterdiği saptanmıştır.

5.1.5. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİLMESİ

5.1.5.1. Nanopartikül Ön Formülasyon Çalışmaları

Çizelge 5.10.'da etkin madde yüklenmeden boş nanopartikül formülasyonları üretilmiş, buradan alınan veriler değerlendirilerek ön formülasyonlardan formülasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Çizelge 5.10. Nanopartikül ön formülasyonları

Formül No	Etkin madde miktarı (mg)	Polimer	Polimer miktarı (mg)	% Sürfektan (Arlacel)	PVA tamponu	%PV A 1	PVA 1 Hacim (ml)	%PVA 2	PVA 2 Hacı m (ml)	Sonikasyon 1		Sonikasyon 2		0,22 µm filtreden geçiş	Partikül Boyutu (nm ± SS)	PDI (ort ± SS)
										Süre (dk)	Amp .	Süre (dk)	Amp .			
ÖF 1	0	PLGA	10	0	dH ₂ O	0,5	2,5	0,25	10	3	80	4	80	-	-	-
ÖF 2	0	PLGA	10	0	dH ₂ O	0,5	2,5	0,5	10	3	80	4	80	-	-	-
ÖF 3	0	PLGA	10	0	dH ₂ O	0,5	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 4	0	PLGA	10	5	dH ₂ O	1	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 5	0	PLGA	10	0	PBS	0,5	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 6	0	PLGA	10	5	(pH 7,4) PBS	1	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 7	0	PEG-b-PCL	10	0	dH ₂ O	1	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 8	0	PEG-b-PCL	10	5	dH ₂ O	1	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 9	0	PEG-b-PCL	10	0	PBS	1	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 10	0	PEG-b-PCL	10	0	(pH 7,4) PBS	1	2,5	0,5	5	0,5	90	2	90	-	-	-
ÖF 11	0	PEG-b-PCL	10	5	(pH 7,4) PBS	1	2,5	0,5	5	0,5	90	2	90	+	183,5±2,419	0,158±0,008
ÖF 12	0	PEG-b-PCL	20	5	(pH 7,4) PBS	1	2,5	0,5	5	0,5	90	2	90	+	176,7±02656	0,159±0,023
ÖF 13	0	PEG-b-PCL	20	5	(pH 7,4) PBS	1	2,5	0,5	10	0,5	90	2	90	+	175,9±2,862	0,168±0,012

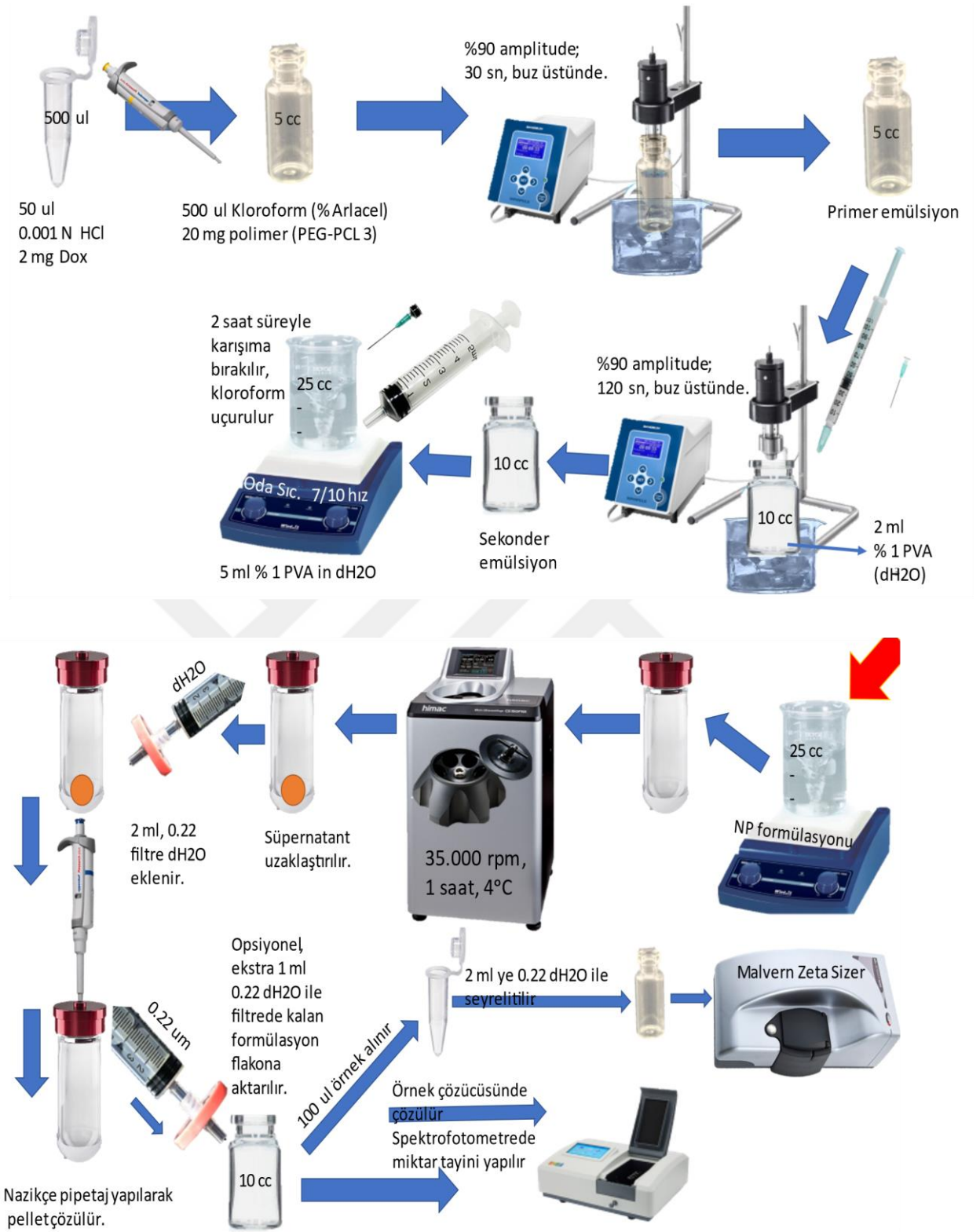
5.1.5.2. Etkin Madde Yüklü PEG-b-PCL Nanopartiküllerinin Eldesi

Ön formülasyon sonuçlarına göre PLGA polimerinin kullanıldığı formülasyonların partikül büyüklüğü hedeflenen boyutun üzerinde olduğu için polimerin değiştirilmesine karar verilmiştir. Ön formülasyon çalışmalarında çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilen nanopartiküllerde, PLGA ile üretilen nanopartiküllerin hiçbirisi filtreden geçmemesi nedeniyle polimer değiştirilerek PEG-b-PCL blok kopolimeri kullanılmıştır.

Polimerin sentezi TÜBİTAK-MAM laboratuvarlarında sentezlenmiş olup tarafımıza teslim edilmiş olan %20 PEG oranı ile Poli(etilen glikol)-blok-poli(ϵ -kaprolakton) polimeri ile formül optimizasyonuna devam edilmiş olup, bu formüllere ait partikül boyutu enkapsülasyon verimliliklerinin ölçümleri yapılmıştır. Etkin madde yükleme etkinlikleri değerlendirilmiş olup bu doğrultuda formülasyon değişikliğine gidilmiştir.

Doksorubisin enkapsülasyon verimliliğinin en yüksek olduğu formülün Çizelge 5.11.'da F3 formülasyonunun olduğu saptanmıştır. Yüksek enkapsülasyon etkinliğine ulaşıldıktan sonra optimize nanopartikül formülasyonu olarak F3 formülü ile devam edilmesine karar verilmiştir (Şekil 5.7.).

pEGFP-C1 plazmidi için optimize F3 formülü için formülasyonda organik fazda PEG-b-PCL polimerine ilaveten DDAB ve HTAB sürfektanları ile formülasyonlar üretilerek enkapsülasyon etkinlikleri Çizelge 5.2.'de hesaplanmıştır.



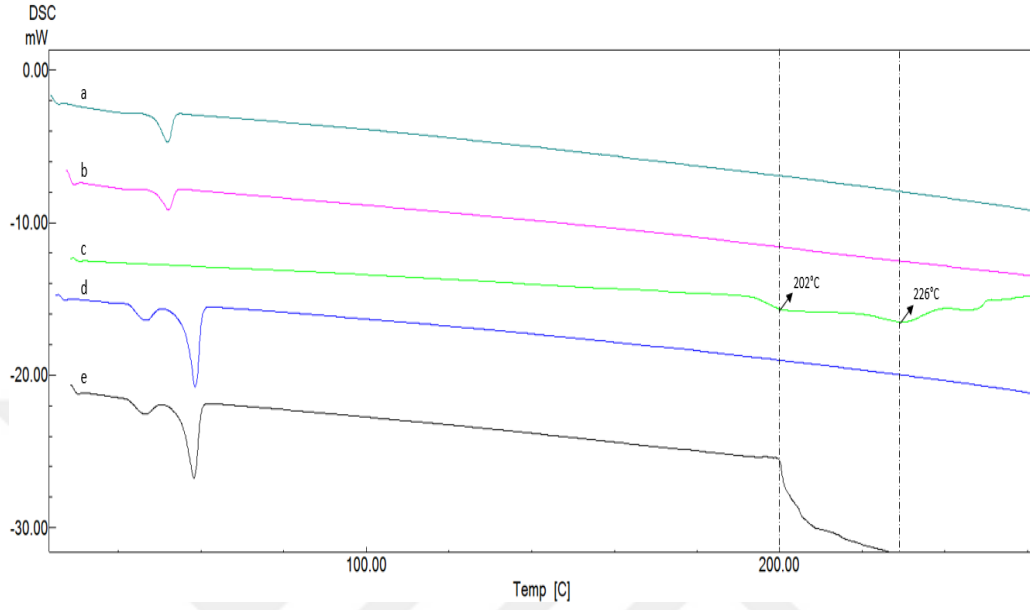
Şekil 5.7. Optimize nanopartikül formülasyonu üretim şeması

Çizelge 5.11. Plazmid ve doksorubisin yüklemesi yapılan nanopartikül formülasyonları

Formül No	Etkin madde	Polimer	Polimer miktarı (mg)	% Sürfektan (Arlacel)	PVA tamponu	PVA 1 Hacim (ml)	% PVA 1	PVA 2 Hacim (ml)	% PVA 2	Sonikasyon 1		Sonikasyon 2		Partikül Boyutu (nm ± SS)	PDI (ort ± SS)	ZP (mv ± SS)	EV (%)
										Süre (sn)	Amp.	Süre (sn)	Amp.				
F1	1 mg DOX	PEG-b-PCL	10	5	PBS (pH 7,4)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	187,9±1,652	0,111±0,011	-14,7±0,85	32,01
F2	2 mg DOX	PEG-b-PCL	20	5	PBS (pH 7,4)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	182,1±1,153	0,149±0,012	-5,67±0,13	38,78
F3	2 mg DOX	PEG-b-PCL	20	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	193,6±3,557	0,126±0,021	-19,4±0,436	83,21
F4	2 mg DOX	PEG-b-PCL	20	5	Trizma (pH 9,2)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	161,1±3,905	0,114±0,015	-21,7±0,586	74,34
F5	-	PEG-b-PCL + DDAB	19+1	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	207,4±0,2517	0,133±0,003	-19,9±0,751	-
F6	-	PEG-b-PCL + HTAB	19+1	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	194,7±2,303	0,100±0,012	-12,0±0,451	-
F7	10 µg pEGFP	PEG-b-PCL + DDAB	19+1	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	221,9±0,9292	0,123±0,022	-17,2±0,611	9,7
F8	10 µg pEGFP	PEG-b-PCL + HTAB	19+1	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	224,5±3,958	0,155±0,016	-11,9±0,603	8,3
F9	20 µg pEGFP	PEG-b-PCL + DDAB	19+1	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	198,8±1,976	0,102±0,012	-21,6±0,551	8,6
F10	20 µg pEGFP	PEG-b-PCL + HTAB	19+1	5	Trizma (pH 8.5)	1	2,5	1	5	0,5	90	0,5	90	199,6±2,524	0,103±0,012	-16,91±0,435	6,2

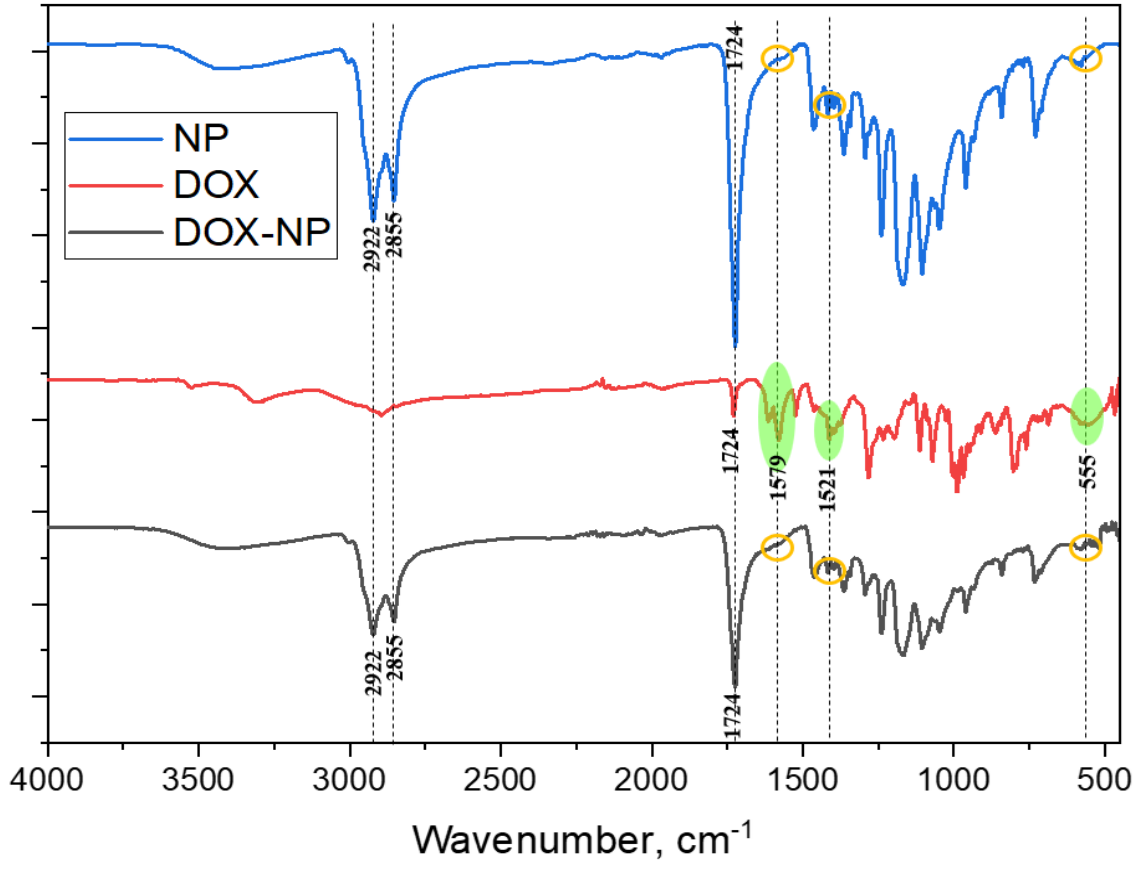
5.1.6. NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

5.1.6.1. Nanopartikül Formülasyon Bileşenleri DSC Analizi



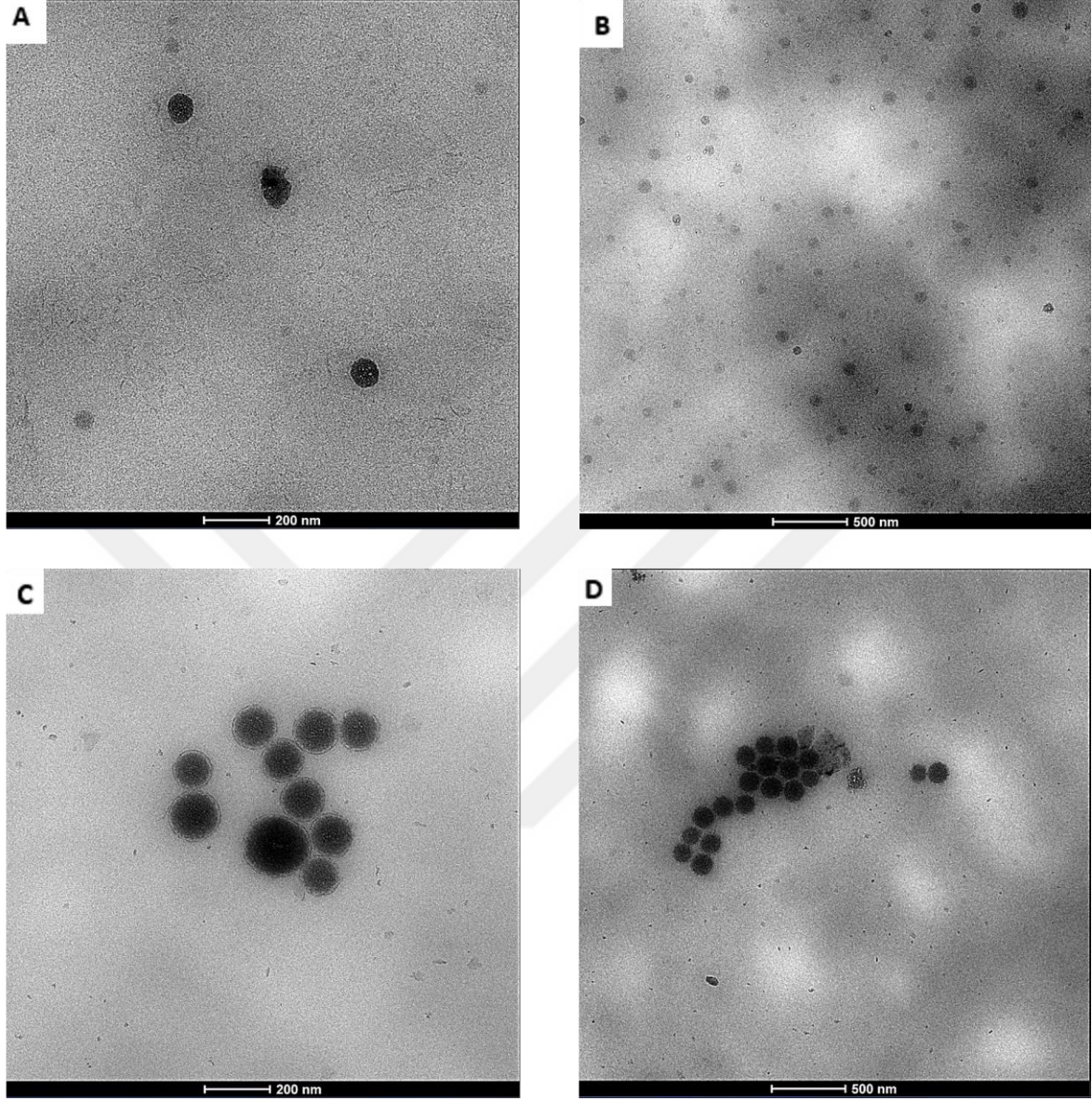
Şekil 5.8. Nanopartikül formülasyon bileşenleri DSC analizi; a) Boş NP, b) DOX NP, c) DOX, e) PEG-b-PCL, f) PEG-b-PCL ve DOX Fiziksel Karışım (10:1)

5.1.6.2. Nanopartikül Formülasyon Bileşenleri FTIR Analizi

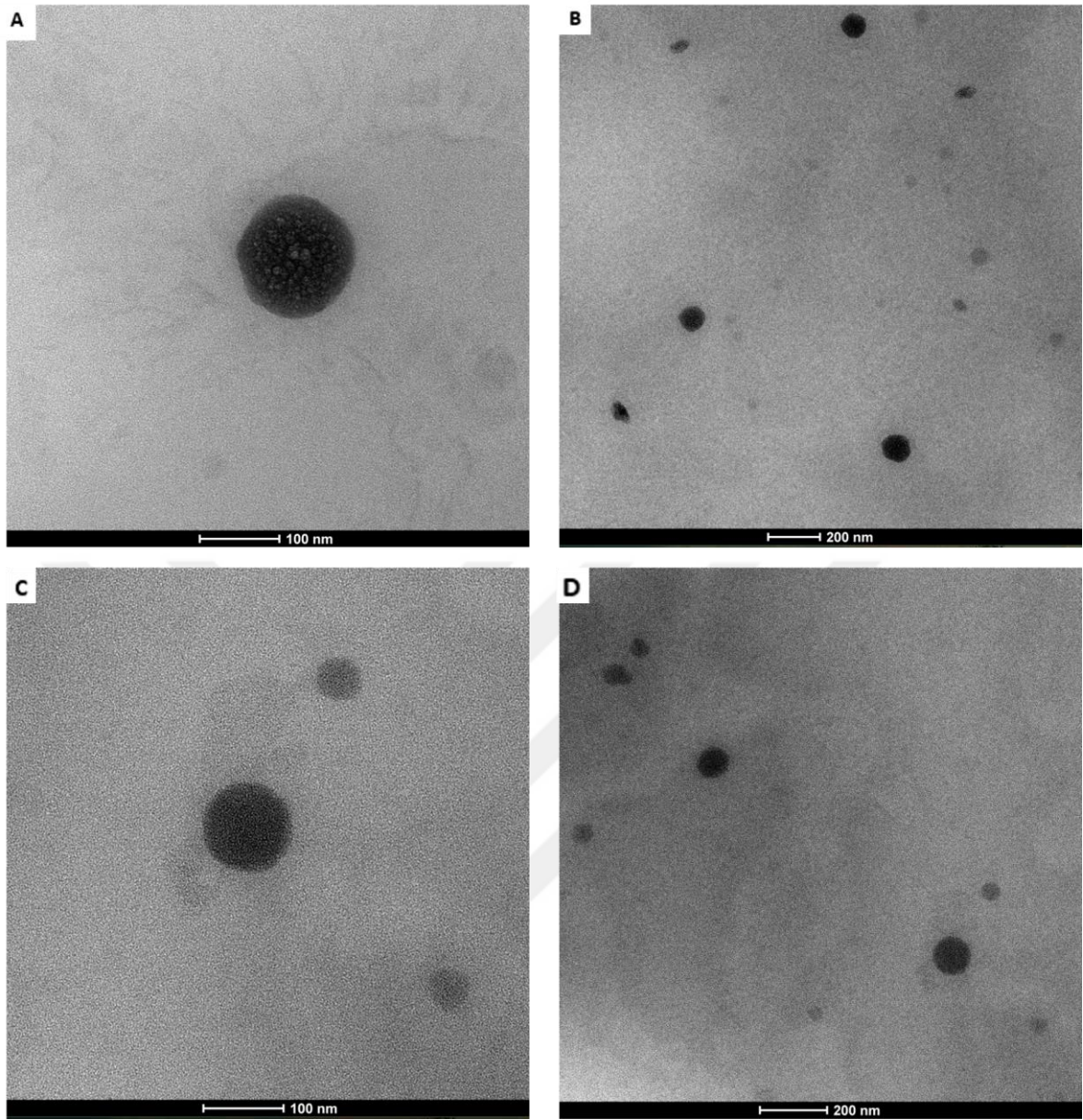


Şekil 5.9. Nanopartikül Formülasyon Bileşenleri FT-IR Analizi

5.1.6.3. Nanopartikül Formülasyonları TEM Görüntülemesi



Şekil 5.10. NP formülasyonları TEM görüntüleri; A,B: Boş NP, C,D: DOX NP

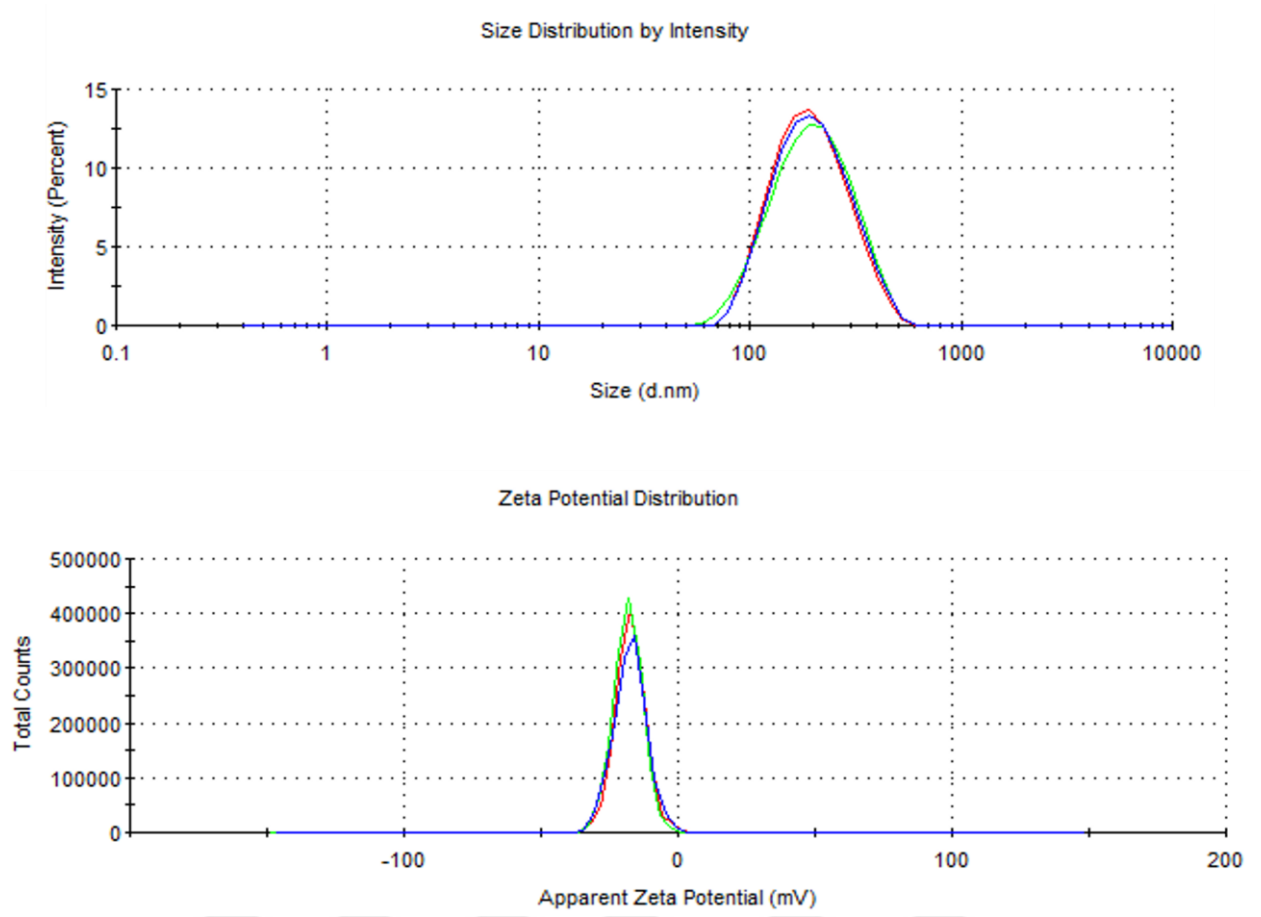


Şekil 5.11. PEG-b-PCL/DDAB NP formülasyonları TEM görüntüleri; A-B: pEGFP-C1 NP, C-D: Boş NP

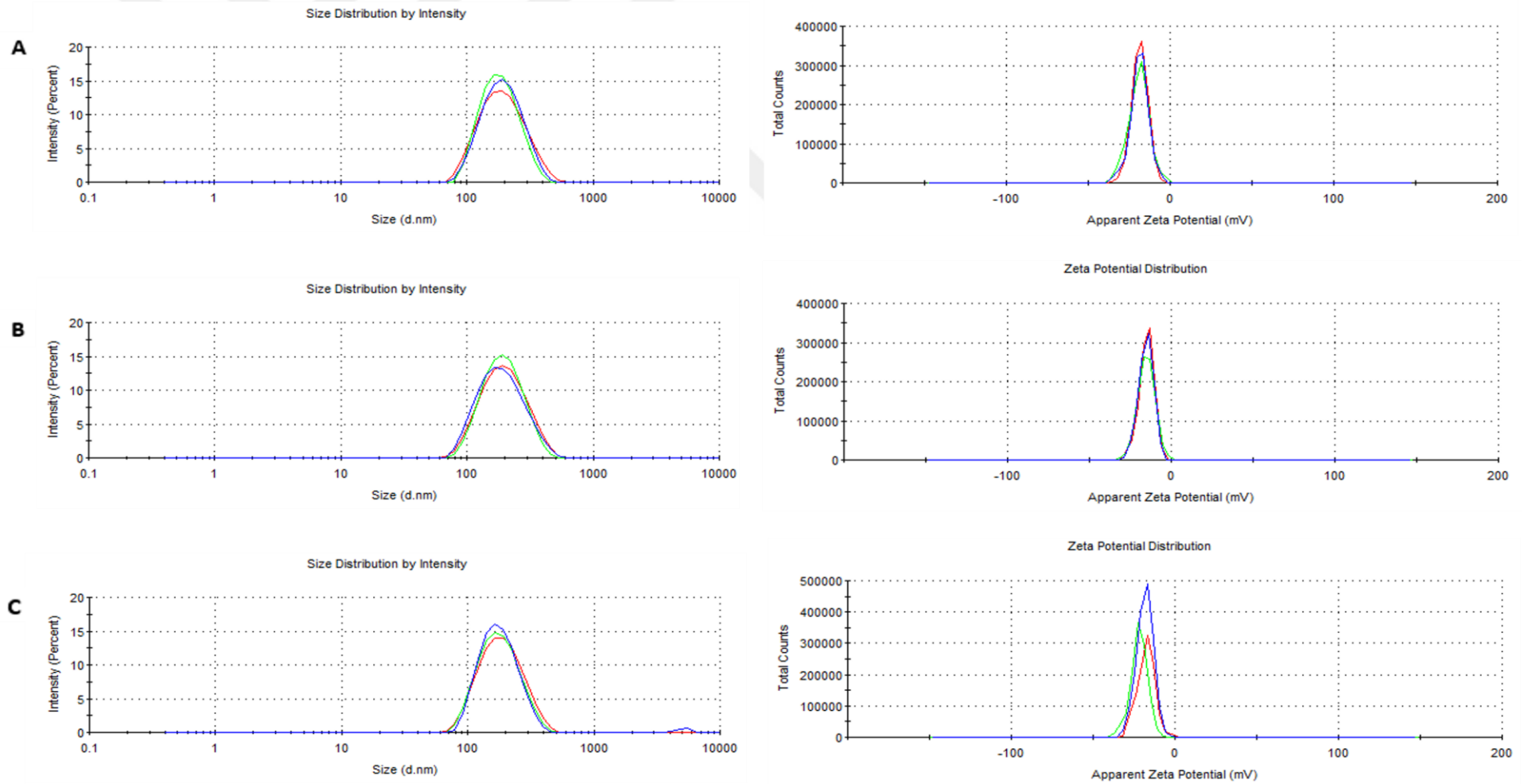
5.1.6.4. Dokсорubisin Yüklü PEG-b-PCL Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Çizelge 5.12. DOX NP' e ait stabilite örneklerinin partikül boyutu ve zeta potansiyeli

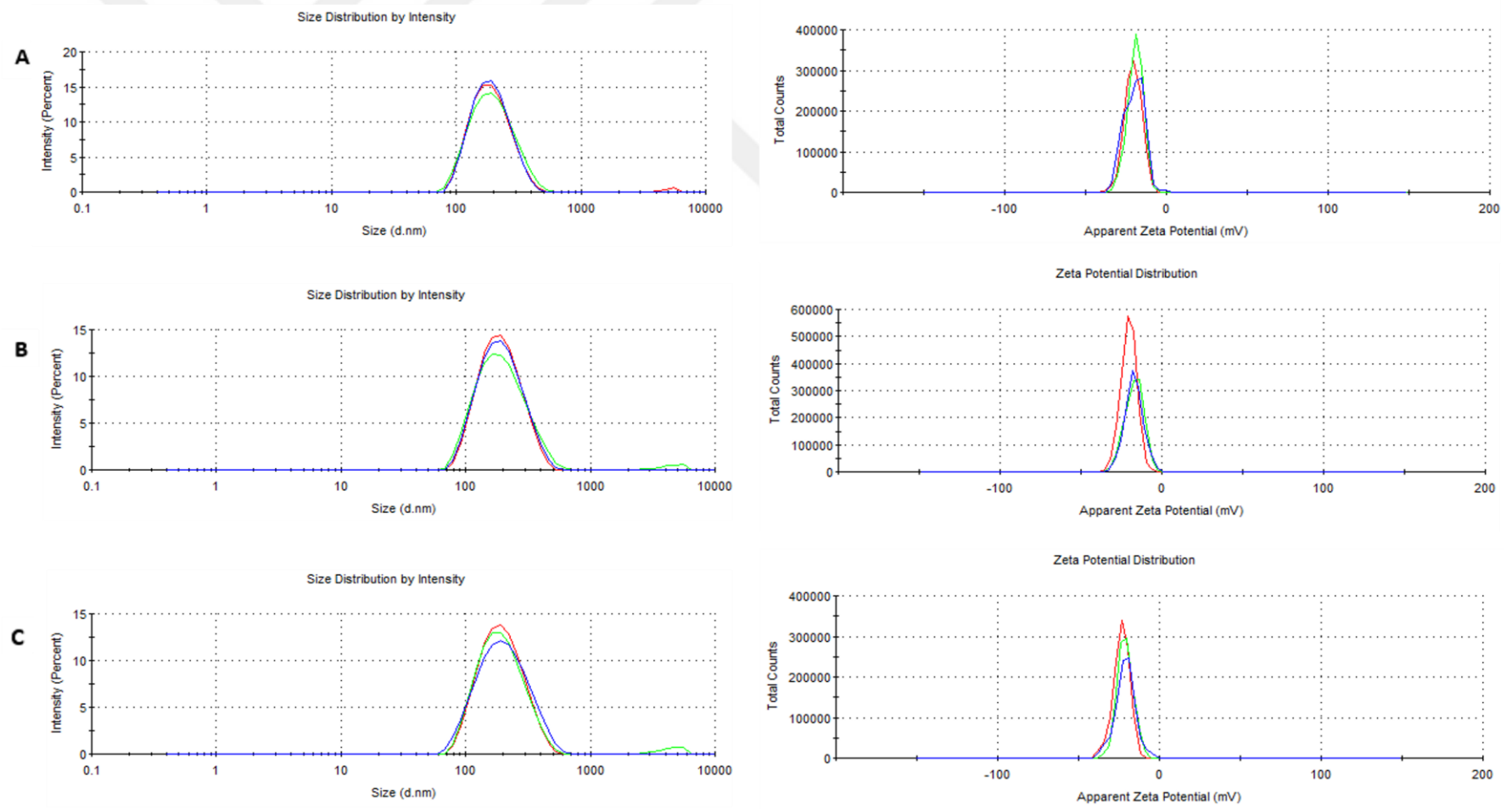
Zaman (Gün)	Partikül Boyutu (nm ± SS)		PDI (ort ± SS)		ZP (mv ± SS)	
	+4°C	25°C	+4°C	25°C	+4°C	25°C
0	179,6±1,277	179,6±1,277	0,113±0,013	0,113±0,013	-18,1±0,493	-18,8±0,493
30	175,3±2,079	178,1±0,115	0,128±0,018	0,140±0,014	-18,8±0,300	-20,0±0,751
60	172,2±2,193	177,3±0,550	0,135±0,015	0,170±0,017	-18,9±0,265	-18,3±1,882
90	174,1±0,288	179,9±0,7506	0,144±0,025	0,174±0,018	-19,3±2,401	-21,9±1,361



Şekil 5.12. DOX NP partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafiği



Şekil 5.13. +4°C DOX NP partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafiği; A:30 gün, B:60 gün, C:90 gün



Şekil 5.14. +25°C DOX NP partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafiği; A:30 gün, B:60 gün, C:90 gün

5.2. HİDROJEL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİMİ VE TASARIMI

5.2.1. DİZAYN FORMÜLASYONUNUN SEÇİMİ

Hidrojel formülasyonlarının üretilmesi aşamasında deney tasarımı (DOE; Design of Experiment), Design Expert yazılımı aracılığı ile yapılmıştır (Çizelge 5.13.). Tasarım için literatürdeki hidrojel formülasyondan yola çıkılarak dizayn programına girilmek üzere hidrojel yapı bileşenlerine yönelik limit değerler belirlenmiştir (Çizelge 5.14.). Bu limit değerler yanıt yüzey metodolojisi merkezi birleşik tasarım oluşturulmak üzere programa giriş yapıldığında, program tarafından türetilen hidrojel formülasyonları üretilmiş (Çizelge 5.15.) ve belirtilen parametrelere uygunluğu kontrol edilerek dizayna devam edilecek aralığa karar verilmiştir.

Design Expert programında, deneysel tasarımın bir parçası olarak alfa değeri, faktöriyel tasarımın merkez noktasından yıldız noktalarına (star points) olan mesafeyi ifade eder. Bu, merkezi kompozit tasarımlarda (central composite designs - CCD) kullanılır Şekil (5.15.). Deneyin axial noktalarının (yıldız noktalarının), faktör seviyelerinin merkezine olan uzaklığını ayarlamak için kullanılır (116).

Çizelge 5.13. İki faktörlü değişkene göre standart değerlerinin gösterimi

Standart no	CMC (g)	HA (g)
1	min	min
2	max	min
3	min	max
4	max	min
5	medyan	min - α
6	medyan	max + α
7	min - α	medyan
8	min + α	medyan
9	medyan	medyan
10	medyan	medyan
11	medyan	medyan
12	medyan	medyan
13	medyan	medyan

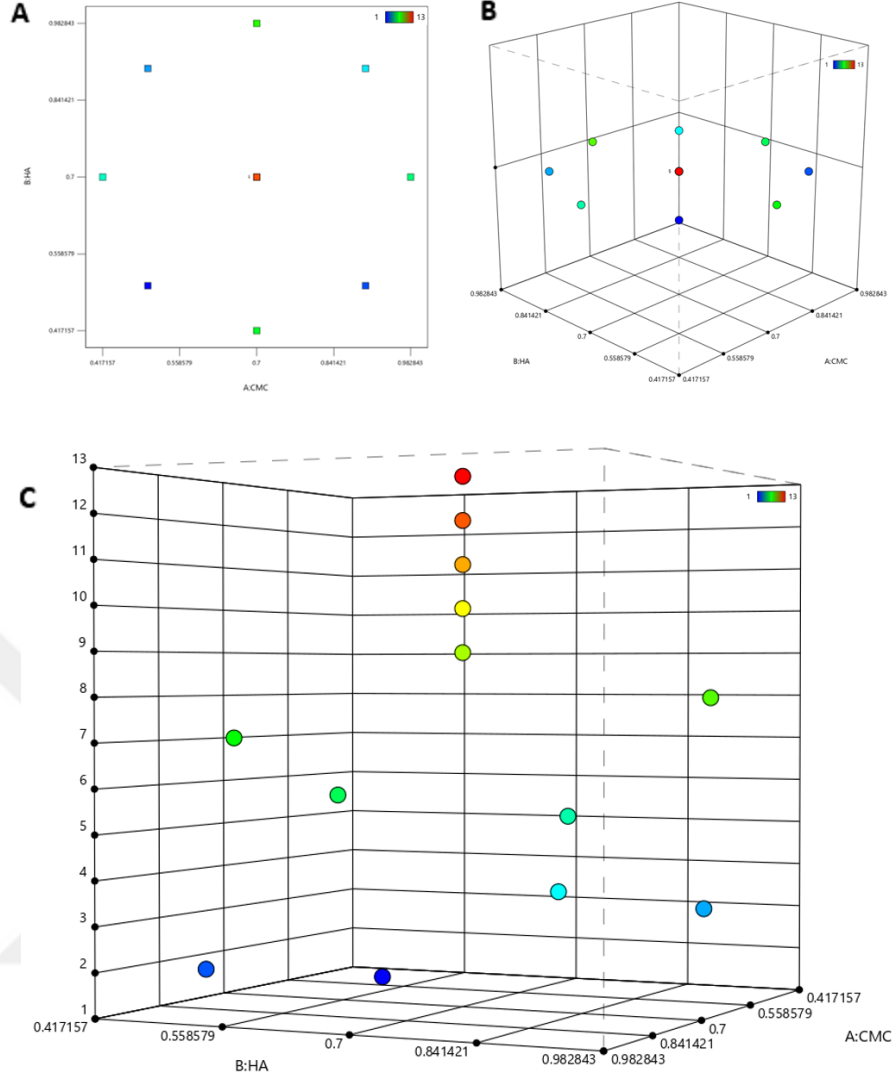
Çizelge 5.14. Hidrojel ön formülasyonlarına ait dizayn aralıkları ve dizayn formülleri

St. no	Dizayn aralığı (0.4-0.9)		Dizayn aralığı (0.5-0.9)		Dizayn aralığı (0.5-1.0)		Dizayn aralığı (0.6-0.9)	
	CMC (g)	HA (g)	CMC (g)	HA (g)	CMC (g)	HA (g)	CMC (g)	HA (g)
1	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
2	0,9	0,4	0,9	0,5	1	0,5	0,9	0,6
3	0,4	0,9	0,5	0,9	0,5	1	0,6	0,9
4	0,9	0,9	0,9	0,9	1	1	0,9	0,9
5	0,29645	0,65	0,41716	0,7	0,39645	0,75	0,537868	0,75
6	1,00355	0,65	0,98284	0,7	1,10355	0,75	0,962132	0,75
7	0,65	0,29645	0,7	0,41716	0,75	0,39645	0,75	0,53787
8	0,65	1,00355	0,7	0,98284	0,75	1,10355	0,75	0,96213
9	0,65	0,65	0,7	0,7	0,75	0,75	0,75	0,75
10	0,65	0,65	0,7	0,7	0,75	0,75	0,75	0,75
11	0,65	0,65	0,7	0,7	0,75	0,75	0,75	0,75
12	0,65	0,65	0,7	0,7	0,75	0,75	0,75	0,75
13	0,65	0,65	0,7	0,7	0,75	0,75	0,75	0,75

Hidrojel önformülasyon dizayn aralıklarındaki formülasyonların tamamı üretilmiş olup Bölüm 4.2.4.4.'te belirtilen parametrelere uygunluğu 0.5-0.9 limit değer aralığına sahip tasarım sağlamış ve bu tasarım ile oluşturulan formülasyonlar ile analizlere devam edilmiştir.

Çizelge 5.15. Optimize edilmesi için seçilen dizayn aralığındaki jel formülasyonları

Design of Experiment Tasarımı $\alpha = 0.083$			Jel Formülasyonundaki Bileşenlerin Miktarları		
CMC (g)	HA (g)	Standart no	CMC (g)	HA (g)	PEO (mg)
min	min	HJ 1	0,5	0,5	25
min	max	HJ 2	0,5	0,9	25
max	max	HJ 3	0,9	0,5	25
max	min	HJ 4	0,9	0,9	25
medyan	min - α	HJ 5	0,7	0,417	25
medyan	max + α	HJ 6	0,7	0,983	25
min - α	medyan	HJ 7	0,417	0,7	25
min + α	medyan	HJ 8	0,983	0,7	25
medyan	medyan	HJ 9	0,7	0,7	25
medyan	medyan	HJ 10	0,7	0,7	25
medyan	medyan	HJ 11	0,7	0,7	25
medyan	medyan	HJ 12	0,7	0,7	25
medyan	medyan	HJ 13	0,7	0,7	25



Şekil 5.15. Dizayn grafikleri: A: Ham dizayn iki boyutlu grafiği B: Ham dizayn üç boyutlu grafiği, C: Standart dizilime göre üç boyutlu dizayn

Hidrojel karakterizasyonu için vizkozite (5-10-15 rpm), sertlik, sıkıştırılabilirlik, adhezyon, kohezyon ve elastisite olmak üzere hidrojin mekanik özelliklerini tanımlayan sekiz farklı yanıt türü ile tasarım oluşturulmuştur. Deney tasarımında oluşturulan formülasyonların her biri için yanıt cevapları ölçülmüş ve her bir yanıtla ilişkin ortalama değerlerin programa girişi yapılmıştır (Çizelge 5.16.). (n=6)

Çizelge 5.16. Hidrojel formülasyonlarına ait ortalama yanıt değerleri tablosu

Faktörler			Ortalama Yanıt Değerleri							
Standart No	A: CMC	B: HA	Vizkozite (5 rpm)	Vizkozite (10 rpm)	Vizkozite (20 rpm)	Sertlik	Sıkıştırılabilirlik	Adheziylik	Koheziylik	Elastisite
1	0,5	0,5	253	171	113	0.189333	0.75917	0.141506	1.15837	1.000400
2	0,9	0,5	717	471	294	0.541467	1.41887	0.363805	0.919051	0.997001
3	0,5	0,9	562	386	257	0.372021	1.09451	0.647667	0.973111	0.998669
4	0,9	0,9	1220	783	491	0.524851	1.53402	0.803283	0.975965	0.996803
5	0,41716	0,7	339	259	159	0.194521	0.77052	0.318502	1.032060	0.999758
6	0,98284	0,7	1100	700	437	0.570117	1.56768	0.606233	0.940416	0.998002
7	0,7	0,41716	355	231	149	0.239667	0.93033	0.141736	0.959072	0.999001
8	0,7	0,98284	907	604	391	0.433367	1.26527	0.780102	0.995614	0.995804
9	0,7	0,7	580	380	246	0.581654	1.29665	0.610354	0.919468	0.999001
10	0,7	0,7	600	394	256	0.493641	1.23667	0.570385	0.919385	0.998004
11	0,7	0,7	606	387	249	0.476619	1.21185	0.496416	0.894215	0.998003
12	0,7	0,7	604	400	260	0.532654	1.21836	0.510254	0.894911	0.998002
13	0,7	0,7	594	390	253	0.542668	1.28248	0.599285	0.921864	0.999002

5.2.2. DİZAYN YANITLARININ İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ

Dizayn optimizasyonu için vizkozite (5-10-15 rpm), sertlik, sıkıştırılabilirlik, adhezyon, kohezyon ve elastisite yanıtlarının her birinin istatistiksel analizi (ANOVA) yapılmıştır (Çizelge 5.17.). Oluşturulan analizler için modelin F ve p değerlerinin anlamlı, model uyumsuzluk değerinin (lack of fit) anlamlı olmaması gerekmektedir (121). Uyum istatistiklerinde tahmin edilen R^2 değeri ile düzenlenmiş R^2 değer farklarının 0.2'den küçük olması, yeterli kesinlik değerinin 4'ten büyük olması gerekmektedir. Kodlanmış faktörler açısından da katsayıların güven aralıkları içerisinde olması beklenmektedir. Oluşturulan kübik modele göre her bir yanıtın istenen nitelikte ve istatistiksel olarak uyumlu olduğu görülmektedir. Çizelgelerde anlamlı ifadesi için “*”, anlamlı değil ifadesi için “***” simgeleri kullanılmıştır.

5.2.3. DİZAYN YANITLARI İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ

Çizelge 5.17. Kodlanmış faktörler açısından nihai denklem

Vizkozite (5 rpm)	Vizkozite (10 rpm)	Vizkozite (20 rpm)	Sertlik	Sıkıştırılabilirlik	Adheziflik	Koheziflik	Elastisite	=
+596.80	+390.20	+252.80	+0.5254	+1.25	+0.5573	+0.9100	+0.9984	
+269.05	+155.92	+98.29	+0.1328	+0.2818	+0.1017	-0.0324	-0.0006	A
+195.16	+131.88	+85.56	+0.0685	+0.1184	+0.2257	+0.0129	-0.0011	B
+48.50	+24.25	+13.25	-0.0498	-0.0550	-0.0167	+0.0605	+0.0004	AB
+64.54	+45.71	+23.79	-0.0597	-0.0230	-0.0406	+0.0443	+0.0003	A ²
+20.29	+14.71	+9.79	-0.0826	-0.0587	-0.0414	+0.0399	-0.0005	B ²
+7.84	-0.1254	-0.3099	-0.0270	-0.0058	+0.0107	-0.0450	+0.0006	A ² B
+11.45	+18.33	+5.46	-0.0066	-0.0070	-0.0072	-0.0267	-0.0007	AB ²
+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	A ³
+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	+0.0000	B ³

5.2.4. HİDROJEL DİZAYN OPTİMİZASYONU

Yanıtlardan elde edilen veriler dahilinde bu verilerin nümerik optimizasyonu için işlenebilmesinde (Çizelge 5.18) dizayn hedefleri belirlenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda Design Expert yazılımı (Çizelge 4.41.) çözüm tablosu oluşturmuştur.

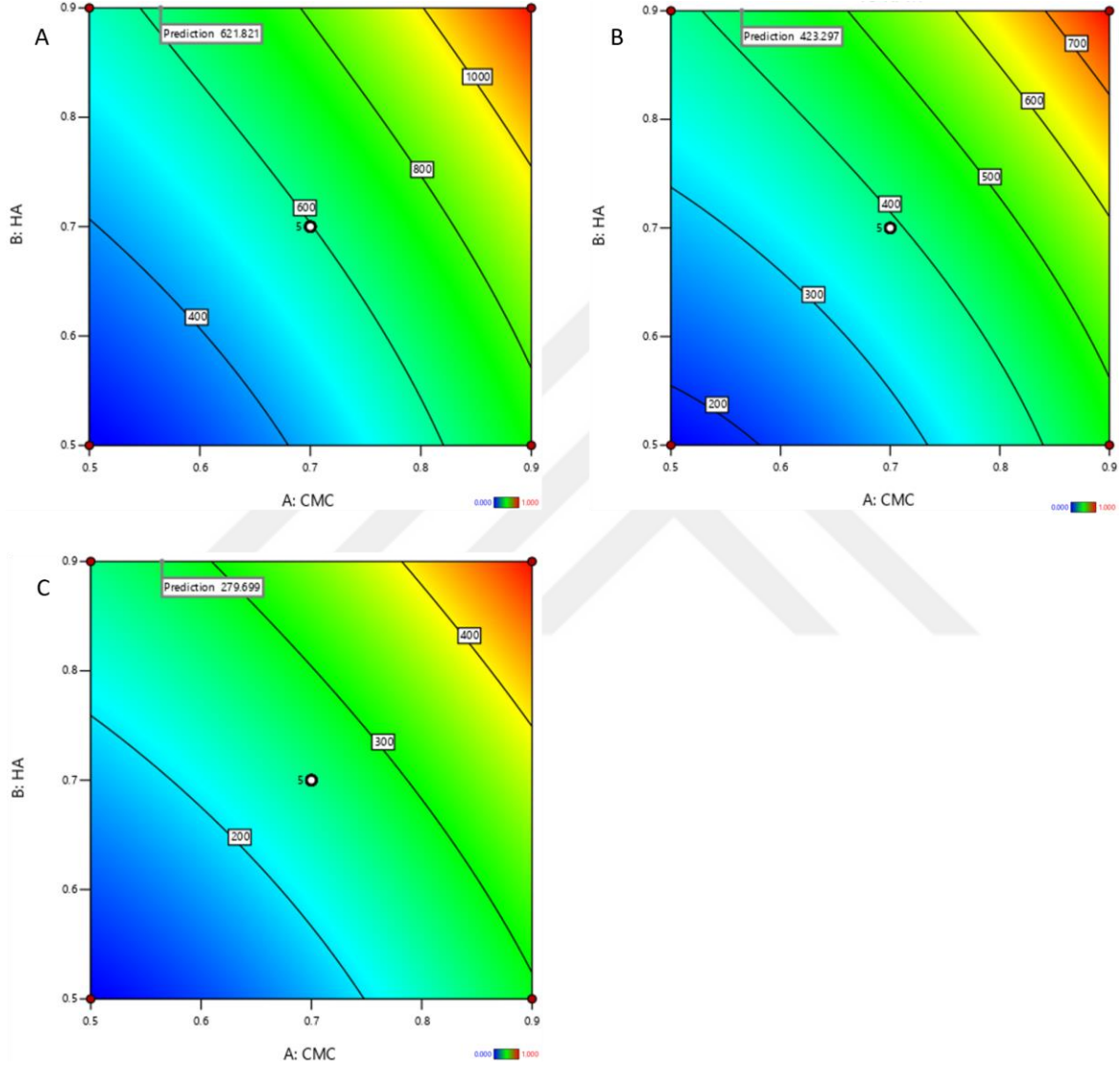
Çizelge 5.18. Deney tasarımında dizayn yanıt hedefleri

Dizayn Bileşenleri	Dizayn Hedefi	Alt Limit	Üst Limit
Faktör A: CMC	Hedef aralıkta	0.5	0.9
Faktör B: HA	Hedef aralıkta	0.5	0.9
Vizkozite (5 rpm)	Maksimize	253	1220
Vizkozite (10 rpm)	Maksimize	171	783
Vizkozite (20 rpm)	Maksimize	113	491
Sertlik	Minimize	0.189333	0.581654
Sıkıştırılabilirlik	Minimize	0.75917	1.56768
Adheziflik	Maksimize	0.141506	0.803283
Koheziflik	Maksimize	0.894215	1.15837
Elastisite	Minimize	0.995804	1.0004

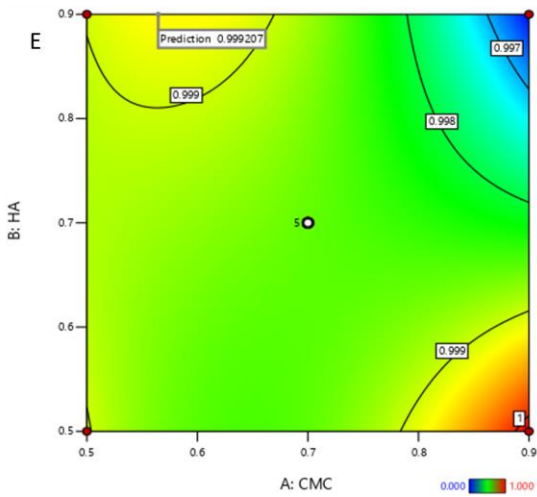
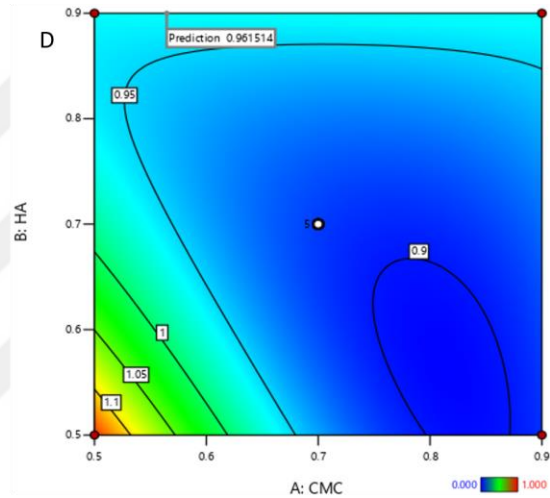
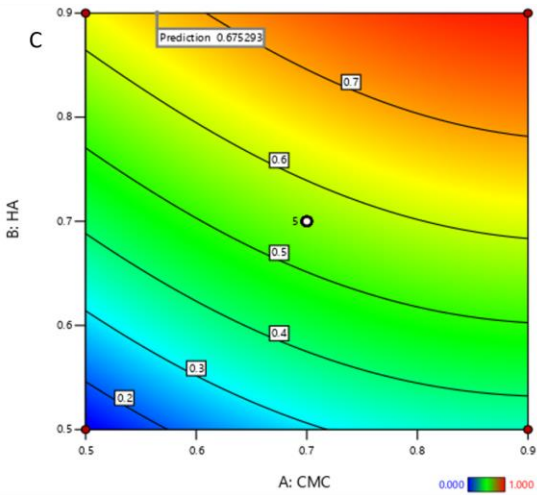
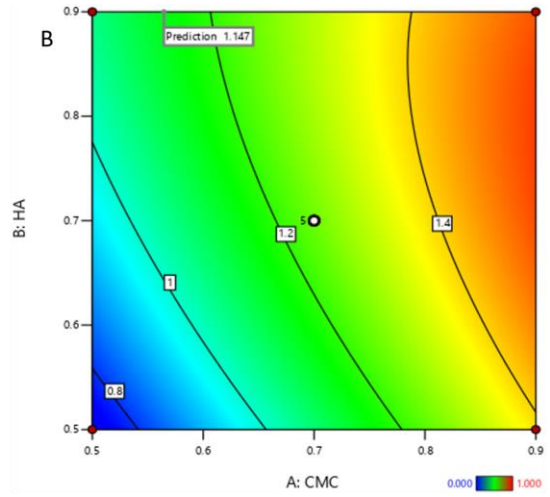
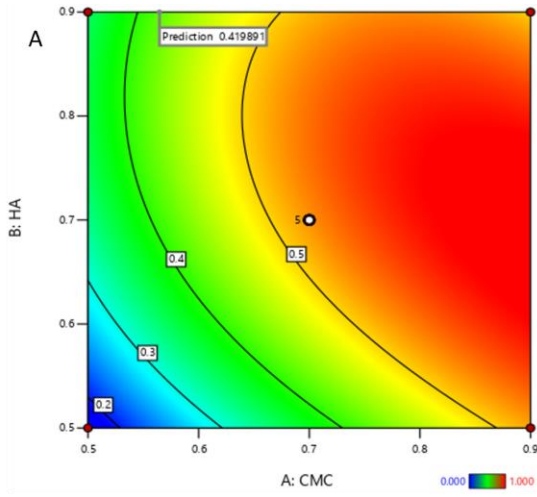
Çizelge 5.19. Nümerik optimizasyon çözümleri

Çözüm No	CMC	HA	Vizkozite (5 rpm)	Vizkozite (10 rpm)	Vizkozite (20 rpm)	Sertlik	Sıkıştırılabilirlik	Adheziyik	Koheziyik	Elastisite	Arzu Edilebilirlik
1	<u>0.595</u>	<u>0.900</u>	<u>658.911</u>	<u>444.806</u>	<u>292.988</u>	<u>0.447</u>	<u>1.185</u>	<u>0.692</u>	<u>0.962</u>	<u>0.998</u>	<u>0.460*</u>
2	0.601	0.900	666.599	449.385	295.792	0.452	1.193	0.696	0.962	0.997	0.460
3	0.587	0.900	649.899	439.444	289.695	0.441	1.176	0.688	0.962	0.998	0.460
4	0.584	0.900	646.325	437.319	288.386	0.438	1.172	0.687	0.962	0.998	0.460
5	0.605	0.900	672.816	453.091	298.056	0.456	1.199	0.698	0.962	0.997	0.460
6	0.614	0.900	684.753	460.215	302.393	0.463	1.210	0.703	0.962	0.997	0.459
7	0.574	0.900	633.581	429.753	283.710	0.429	1.159	0.681	0.962	0.998	0.459
8	0.619	0.900	690.577	463.694	304.505	0.466	1.215	0.705	0.962	0.997	0.459
9	0.570	0.900	628.787	426.910	281.946	0.425	1.154	0.678	0.962	0.998	0.459
10	0.561	0.900	618.166	420.621	278.029	0.416	1.142	0.673	0.961	0.998	0.458
11	0.547	0.900	602.630	411.443	272.274	0.402	1.124	0.664	0.961	0.998	0.456
12	0.512	0.900	567.350	390.718	259.067	0.363	1.078	0.642	0.961	0.998	0.448

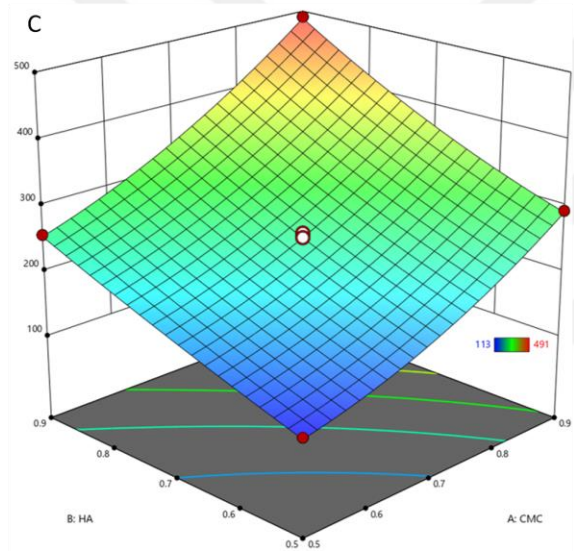
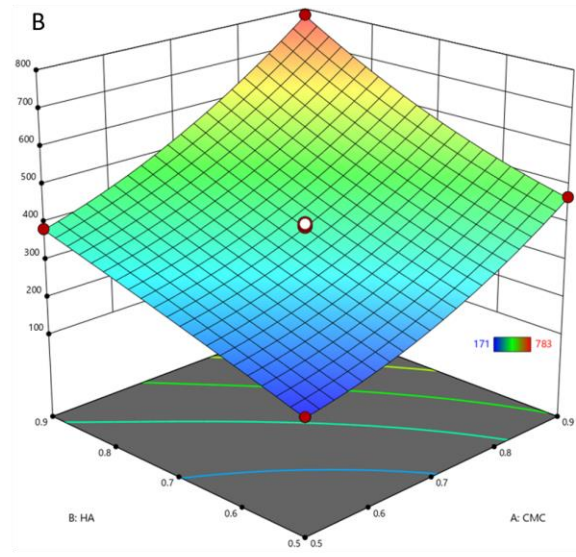
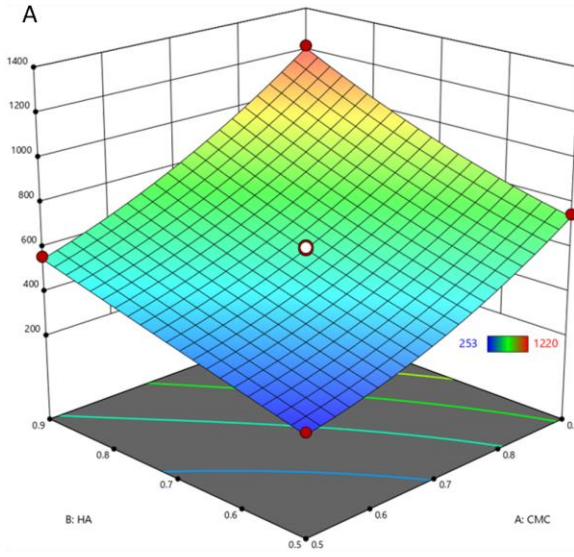
Çizelge 5.19.'daki çözümler içerisinde içerisinde arzu edilebilirlik değeri en yüksek olan formülasyon (Çözüm No 1: CMC:595 mg, HA: 900mg) seçilmiş ve optimizasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18., Şekil 5.19.).



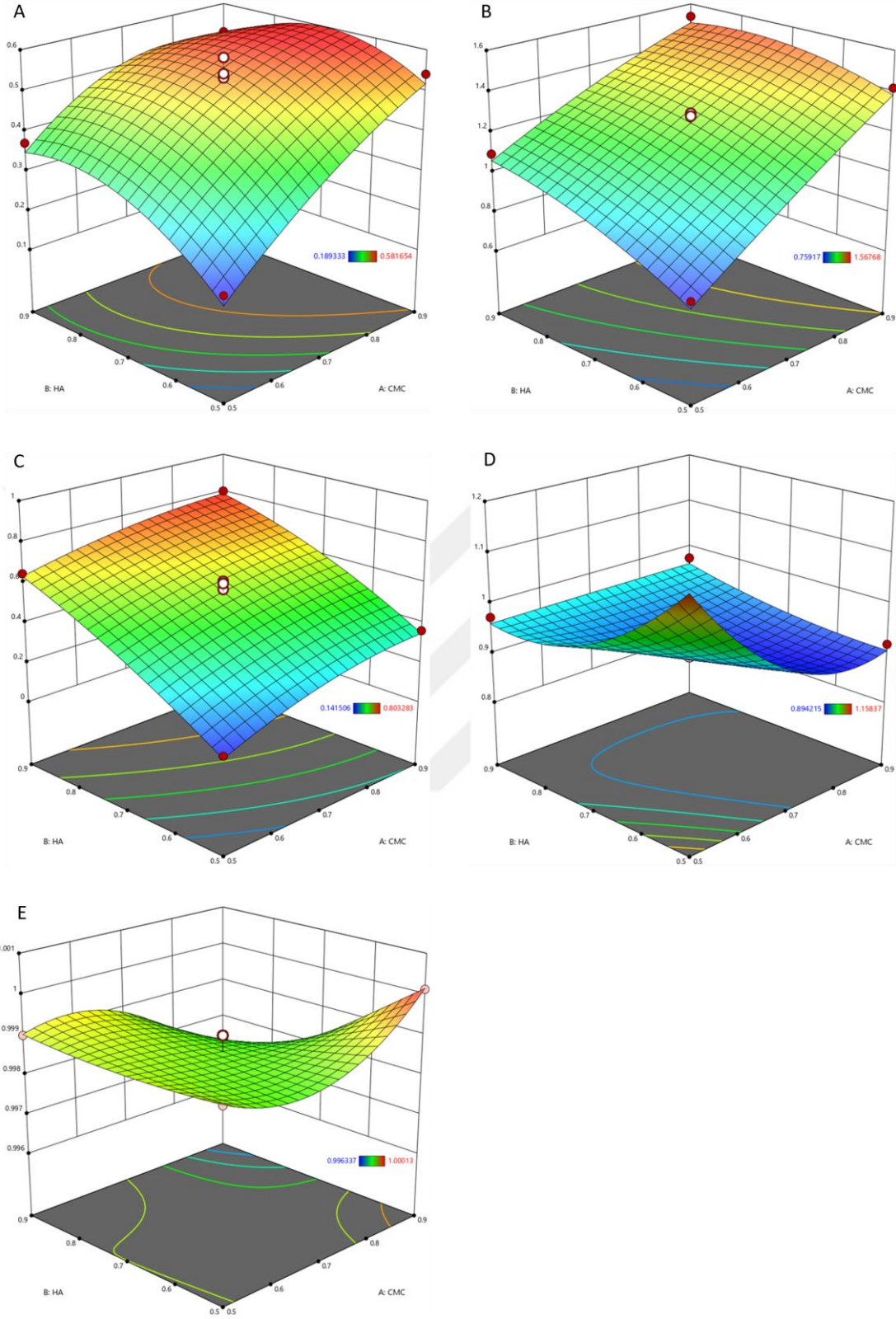
Şekil 5.16. Numerik optimizasyon kontür grafiği A: Viskozite 5 rpm B: Viskozite 10 rpm C: Viskozite 20 rpm



Şekil 5.17. Nümerik optimizasyon kontür grafiği, A: Sertlik, B: Sıkıştırılabilirlik, C: Adheziflik, D: Koheziflik, E: Elastisite



Şekil 5.18. Numerik optimizasyon 3D yüzey grafiği, A: Viskozite (5 rpm), B: Viskozite (10 rpm), C: Viskozite (20 rpm)



Şekil 5.19. Nümerik opimizasyon 3D yüzey grafiği, A: Sertlik, B: Sıkıştırılabilirlik, C: Adheziflik, D: Koheziflik, E: Elastisite

5.2.5. DİZAYN ÇÖZÜM YANITLARININ ELDESİ VE DOĞRULANMASI

Hidrojel nümerik optimizasyon çözümlerinde arzu edilebilirlik değeri en yüksek olan Çizelge 5.20.'de gösterildiği şekilde optimal formülasyon (Çözüm No:1) için yanıt değer parametreleri olarak tekstür ve vizkozite ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin tasarıma uygunluğunun değerlendirilebilmesi için Design Expert yazılımından nokta tahmin tabloları çıkartılmıştır. Bu doğrultuda Çizelge 5.21.'deki nokta tahmini ve doğrulama ile Çizelge 5.22.'deki dizayn katsayı tablosu tablosu elde edilmiştir.

Çizelge 5.20. Dizayn çözümünde seçilen optimize formülasyona ait yanıt değerleri

Dizayn Yanıtları	Optimize Çözüm Ölçüm Değerleri
Vizkozite (5 rpm)	667
Vizkozite (10 rpm)	443
Vizkozite (20 rpm)	291
Sertlik	0,516000
Sıkıştırılabilirlik	1,161000
Adheziflik	0,663000
Koheziflik	0,941430
Elastisite	0,998004

Çizelge 5.21. Analiz sonrası nokta tahmini ve doğrulama değerleri

Seçilen Dizayn Çözümü Yanıtları	Analiz Sonrası Nokta Tahmini								Analiz Sonrası Doğrulama		
	Tahmin	Tahmin	Standart	Ortalama	Ortalamada	Ortalamada	%95 TA	%95 TA	Tahmin	%95	%95
	Edilen	Edilen	Sapma	Standart	% 95 GA	% 95 GA	Alt Limit	Üst	Edilen	THA	THA
	Ortalama	Medyan		Hata	Alt Limit	Üst Limit		Limit	Standart	Alt	Üst
									Hata	Limit	Limit
Vizkozite (5 rpm)	658.911	658.911	12.3444	7.79089	638.884	678.938	576.779	741.042	14.5974	621.387	696.434
Vizkozite (10 rpm)	444.806	444.806	7.22392	4.5592	433.086	456.526	396.743	492.869	8.54232	422.847	466.765
Vizkozite (20 rpm)	292.988	292.988	5.79526	3.65753	283.586	302.39	254.431	331.546	6.85292	275.372	310.604
Sertlik	0.446966	0.446966	0.0477831	0.0301571	0.369444	0.524487	0.12905	0.764882	0.0565380	0.30172	0.59221
Sıkıştırılabilirlik	1.1851	1.1851	0.055067	0.0347542	1.09577	1.27444	0.818726	1.55148	0.0651170	101.772	135.249
Adheziflik	0.692343	0.692343	0.0493413	0.0311405	0.612294	0.772392	0.36406	1.02063	0.0583463	0.542360	0.84233
Koheziflik	0.961847	0.961847	0.0201431	0.0127128	0.929168	0.994527	0.827829	1.09587	0.0238193	0.900618	102.308
Elastisite	0.997535	0.997535	0.000491613	0.00031027	0.996738	0.998333	0.994264	1.00081	0.0005813	0.996041	0.99903

Çizelge 5.22. Analiz sonrası dizayn katsayı tablosu $p < 0.05$ olan değerler

	Sabit	A	B	AB	A ²	B ²	A ² B	AB ²
Vizkozite (5 rpm)	596.8	269.054	195.161	48.5	64.5375	20.2875	7.83853	11.4459
p-değerleri		< 0.0001	< 0.0001	0.0005	< 0.0001	0.0075	0.4103	0.2468
Vizkozite (10 rpm)	390.2	155.917	131.875	24.25	45.7125	14.7125	-0.125415	18.333
p-değerleri		< 0.0001	< 0.0001	0.0011	< 0.0001	0.0030	0.9814	0.0157
Vizkozite (20 rpm)	252.8	98.2878	85.5599	13.25	23.7875	9.7875	-0.309921	5.46216
p-değerleri		< 0.0001	< 0.0001	0.0060	0.0001	0.0067	0.9426	0.2401
Sertlik	0.525447	0.132793	0.0684833	-0.0498259	-0.0596891	-0.0825902	-0.0269653	-0.00655215
p-değerleri		0.0026	0.0351	0.0914	0.0216	0.0061	0.4610	0.8539
Sıkıştırılabilirlik	1.2492	0.28184	0.11842	-0.0550465	-0.023003	-0.058653	-0.00579673	-0.0070378
p-değerleri		0.0002	0.0077	0.1020	0.3208	0.0376	0.8875	0.8637
Adheziflik	0.557339	0.101728	0.225696	-0.0166707	-0.0406302	-0.0413544	0.0107133	-0.00724959
p-değerleri		0.0091	0.0003	0.5292	0.0819	0.0780	0.7712	0.8436
Koheziflik	0.909969	-0.0324017	0.0129193	0.0605434	0.0443436	0.0398956	-0.0450057	-0.026715
p-değerleri		0.0235	0.2558	0.0018	0.0021	0.0034	0.0251	0.1195
Elastisite	0.998402	-0.00062084	-0.00113031	0.00038425	0.000258175	-0.000480575	0.00064756	-0.00069641
p-değerleri		0.0528	0.0058	0.1788	0.2246	0.0495	0.1215	0.1015

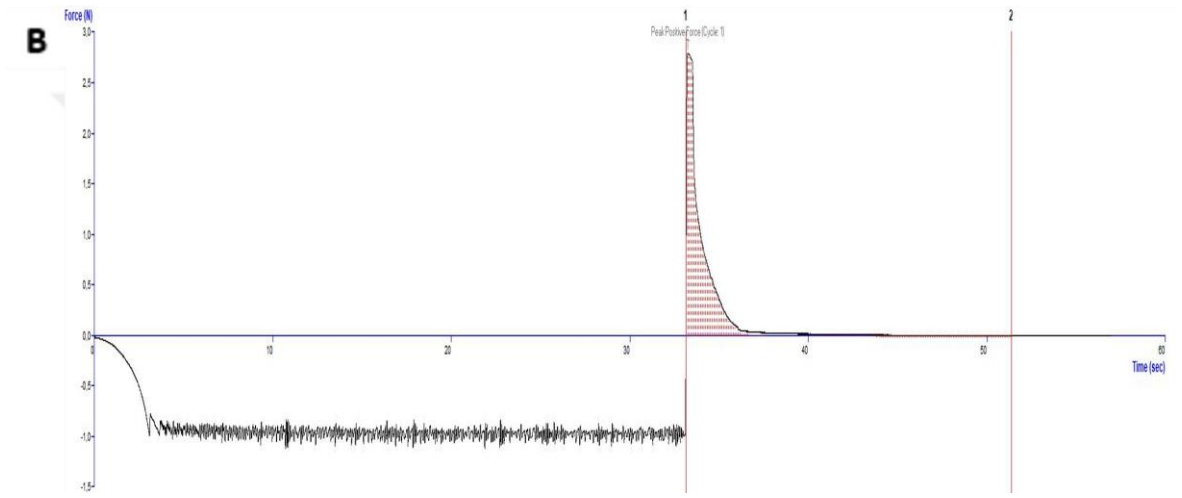
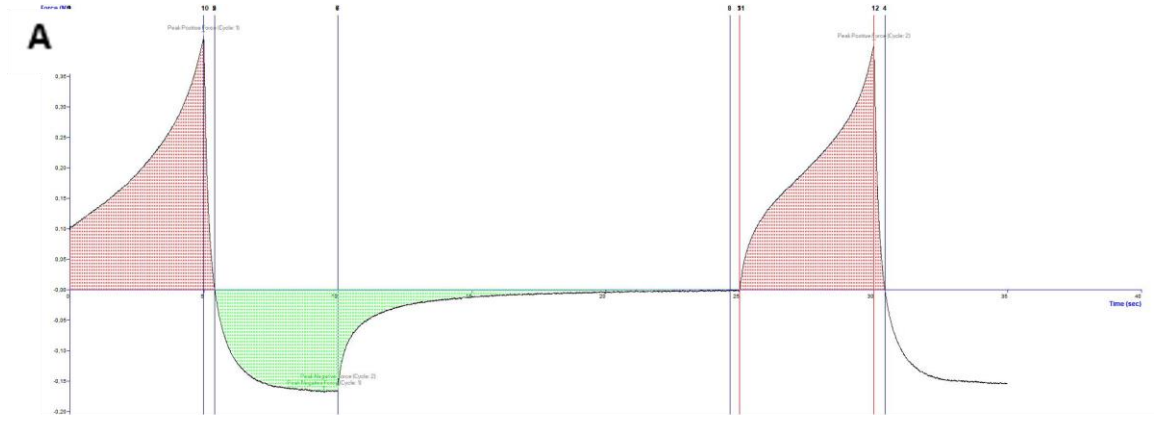
5.3. HİDROJELLERİN İN VİTRO YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR

5.3.1. HİDROJEL TEKSTÜR GRAFİKLERİ

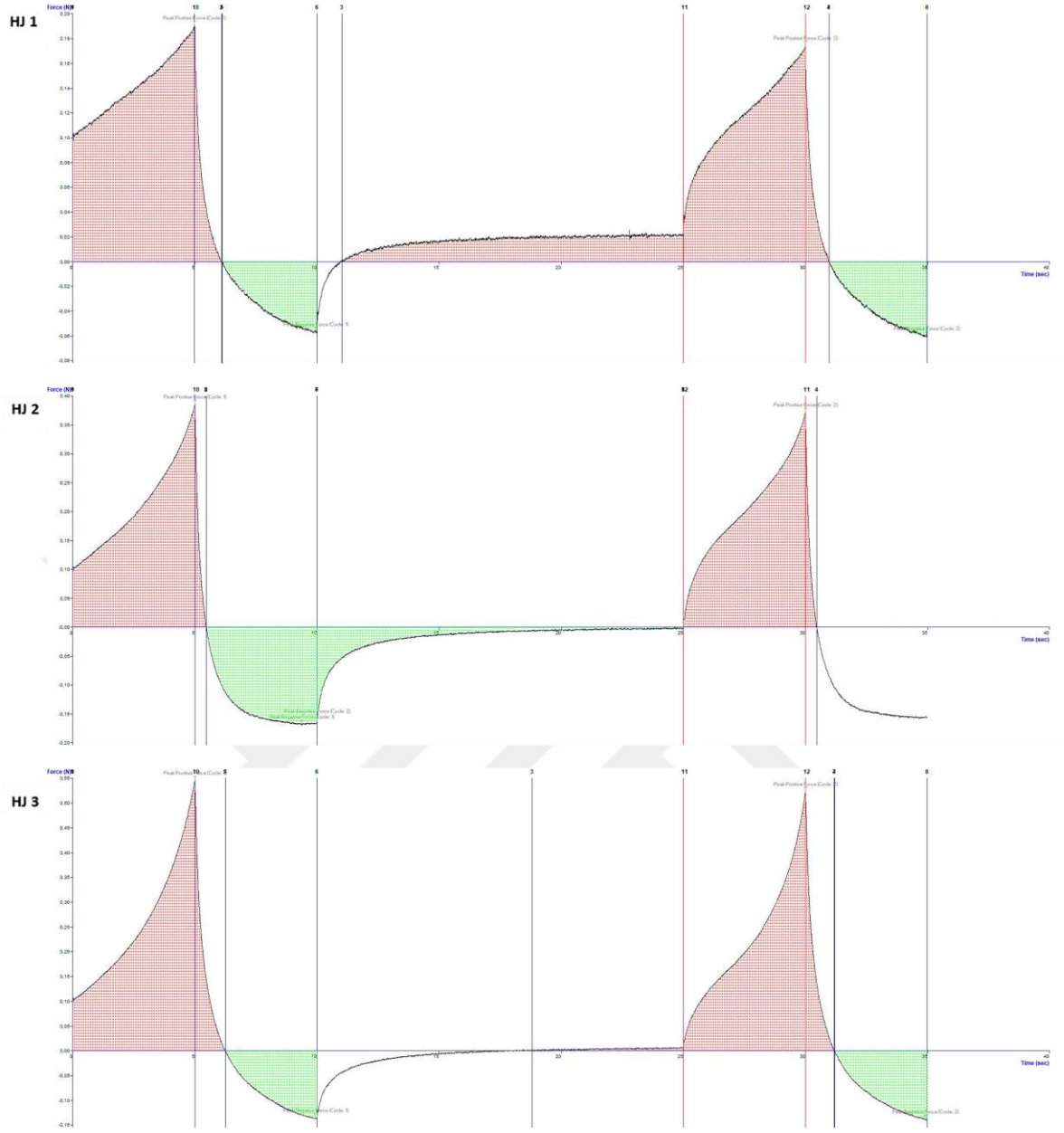
Çizelge 5.3. te yer alan formülasyonları tekstür grafikleri Texture Analyser cihazıyla elde edilmiştir. Optimize formül Çizelge 5.42. deki tekstür sayısal sonuçlarını vermiştir.

Çizelge 5.23. Hidrojel formülasyonlarına ait adhezyon ve mukoadhezyon verileri

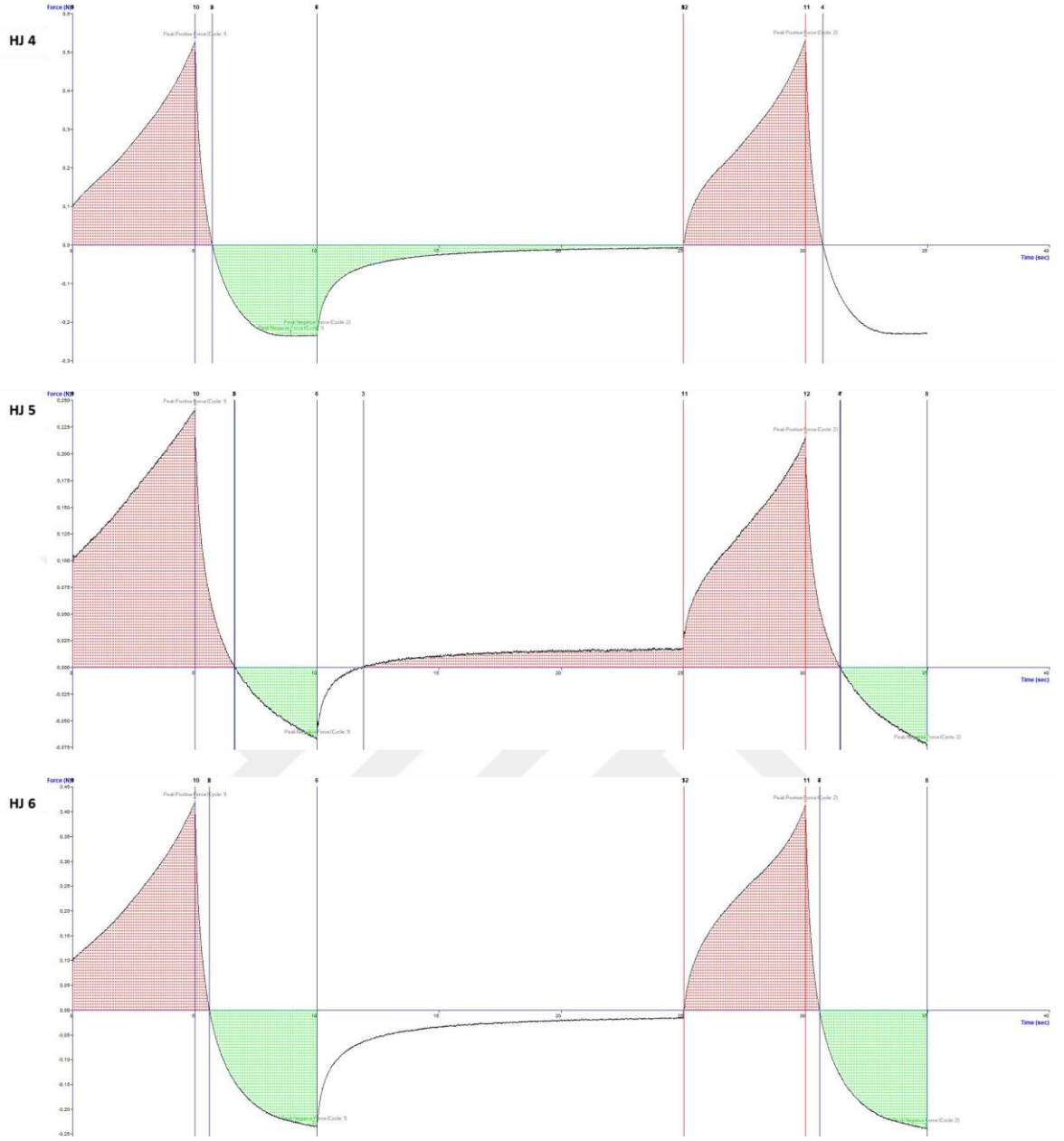
Jel Formülasyonundaki Bileşenlerin Miktarları					
Standart no	CMC (g)	HA (g)	PEO (mg)	Adhezyon Verileri	Mukozadezyon Verileri
HJ 1	0,5	0,5	25	0.141506	1,283
HJ 2	0,5	0,9	25	0.363805	2,777
HJ 3	0,9	0,5	25	0.647667	1,704
HJ 4	0,9	0,9	25	0.803283	3,179
HJ 5	0,7	0,417	25	0.318502	0,971
HJ 6	0,7	0,983	25	0.606233	3,067
HJ 7	0,417	0,7	25	0.141736	1,497
HJ 8	0,983	0,7	25	0.780102	2,587
HJ 9	0,7	0,7	25	0.610354	2,316



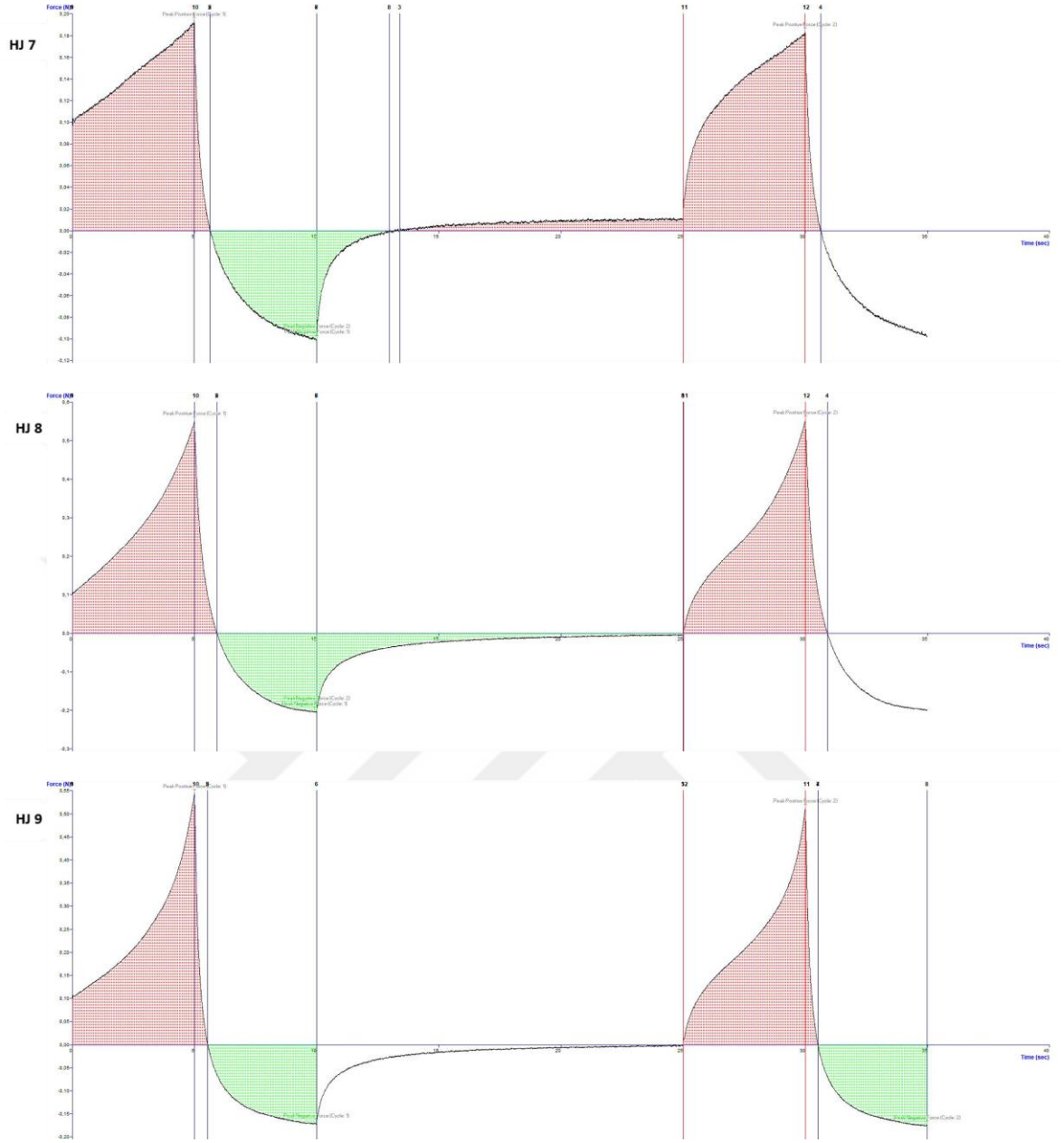
Şekil 5.20. Optimize formül tekstür ölçümleri A: Tekstür grafiği, B: Mukoadhezyon



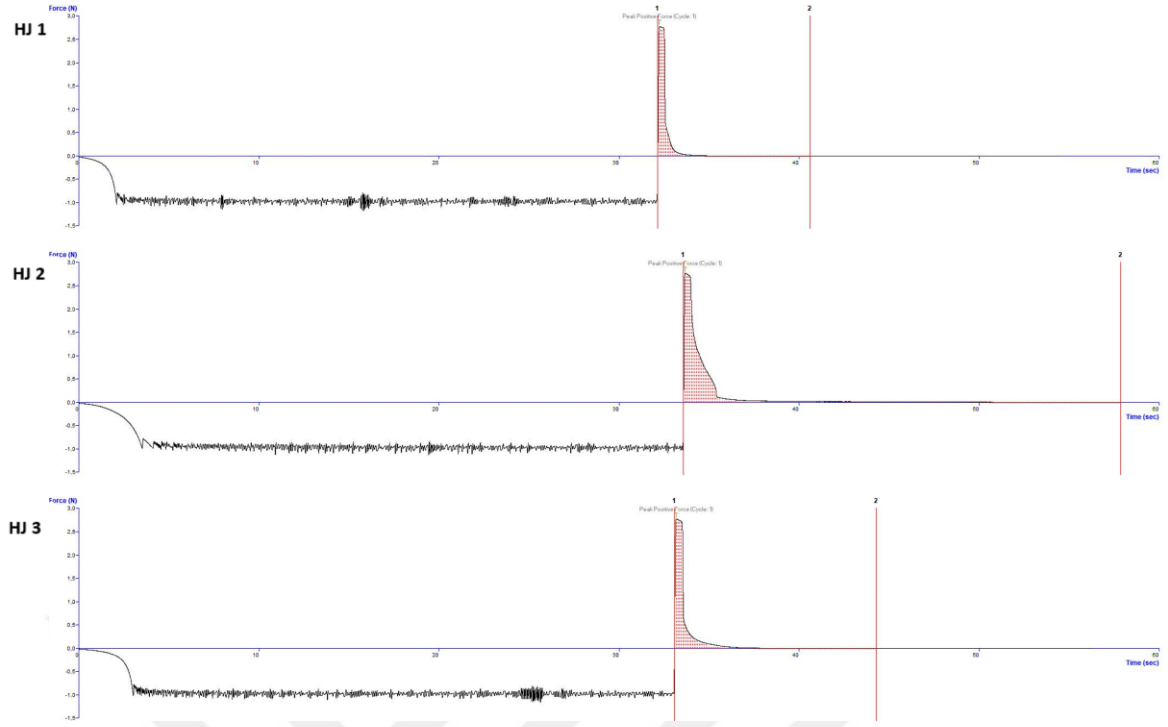
Şekil 5.21. Hidrojel formülasyonları (HJ 1-HJ 2-HJ 3) tekstür grafikleri



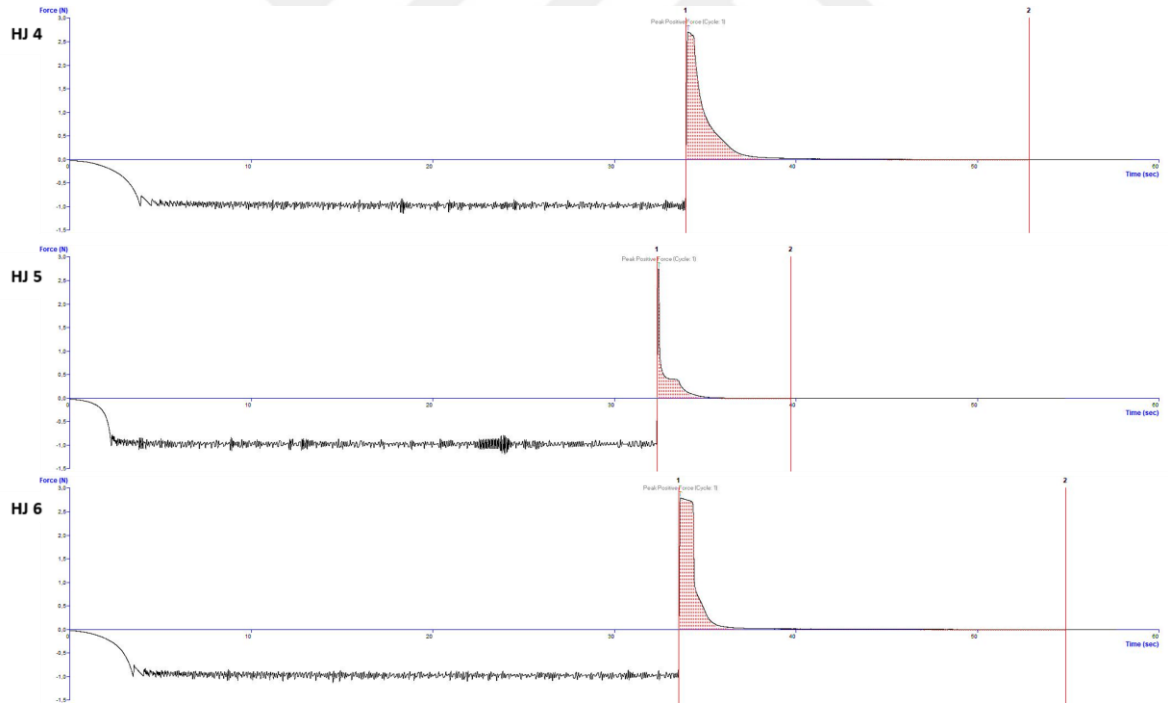
Şekil 5.22. Hidrojel formülasyonları (HJ 4-HJ 5-HJ 6) tekstür grafikleri



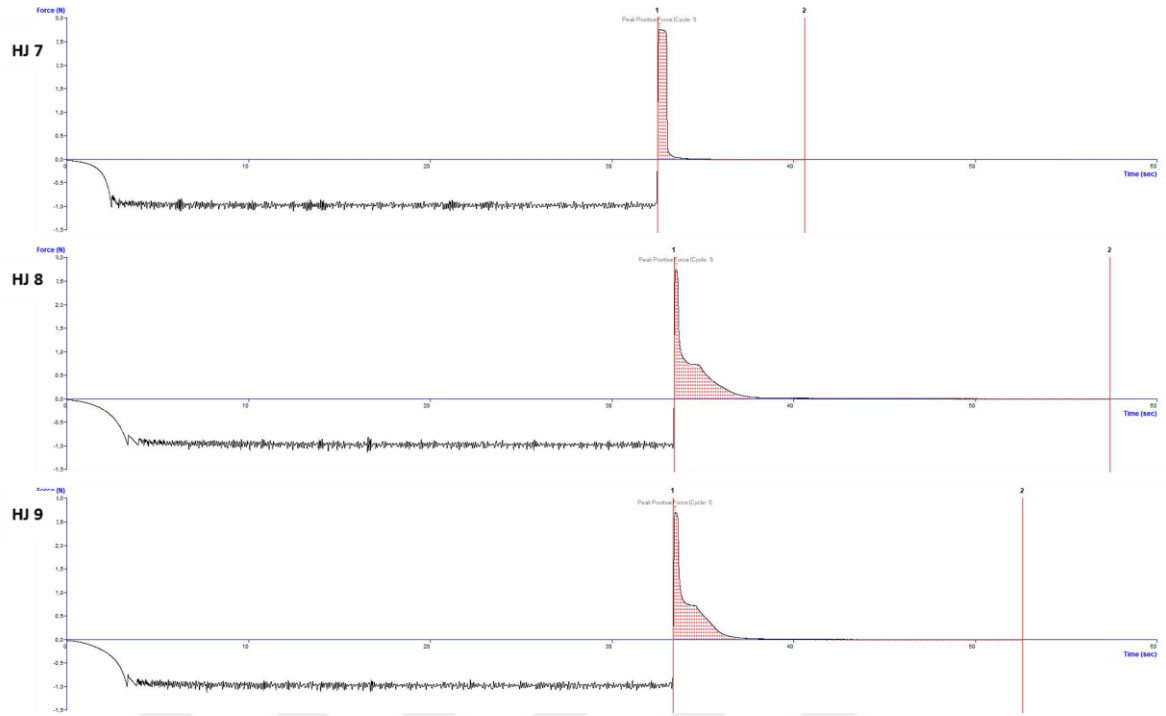
Şekil 5.23. Hidrojel formülasyonları (HJ 7-HJ 8-HJ 9) tekstür grafikleri



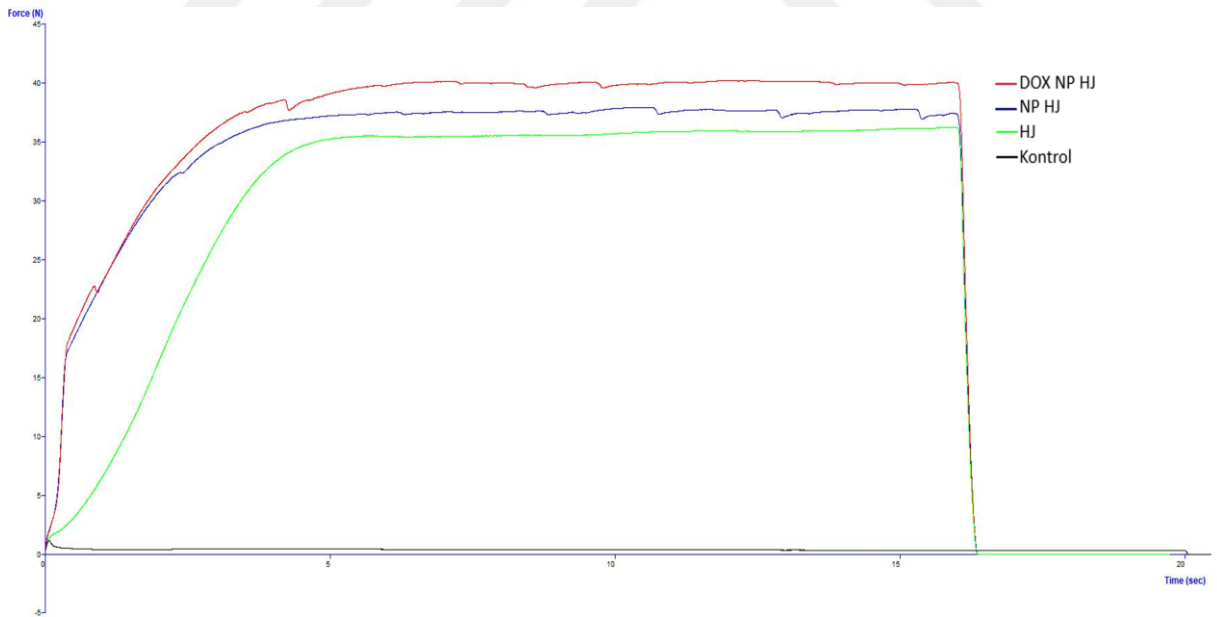
Şekil 5.24. Hidrojel formülasyonları (HJ 1-HJ 2-HJ 3) mukoadhezyon grafikleri



Şekil 5.25. Hidrojel formülasyonları (HJ 4-HJ 5-HJ 6) mukoadhezyon grafikleri



Şekil 5.26. Hidrojel formülasyonları (HJ 7-HJ 8-HJ 9) mukoadhezyon grafikleri



Şekil 5.27. DOX NP HJ, NP HJ ve HJ formülasyonlarına ait şırınga edilebilirlik grafiği

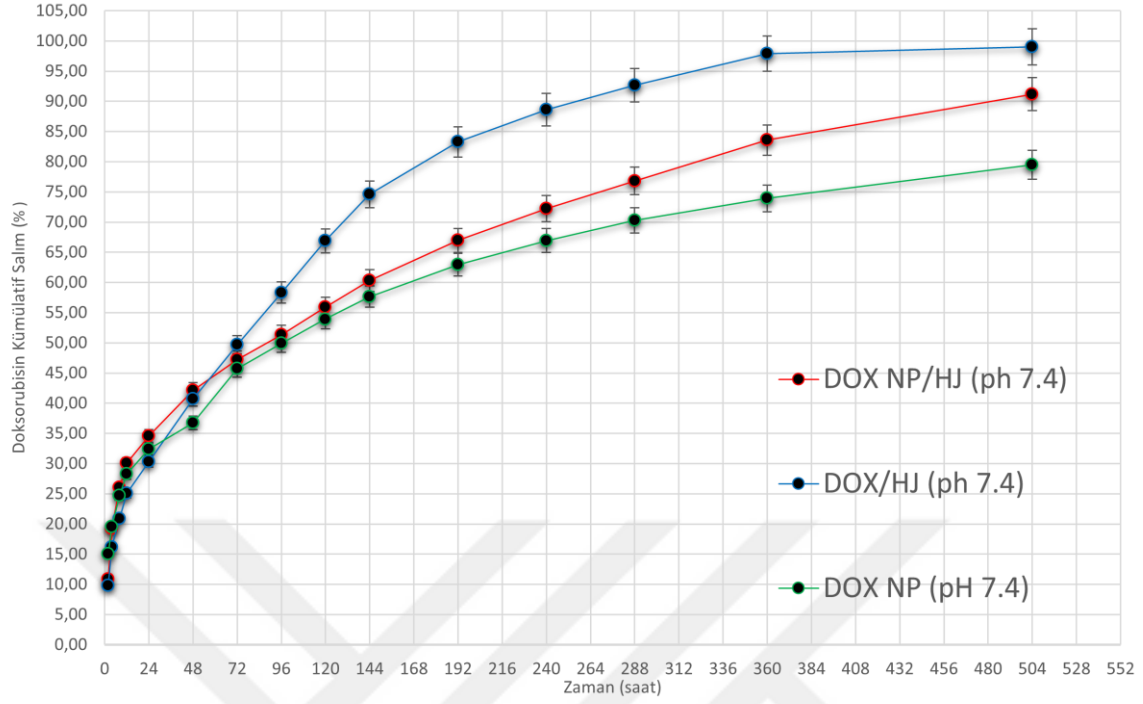
Çizelge 5.24. Şırınga edilebilirlik kuvvet değerleri (N)

Formülasyon	DOX NP HJ	NP HJ	HJ	Kontrol
Kuvvet (N)	40,002 ± 0,153	37,4357 ± 0,415	35,733 ± 0,484	0,45± 0,05

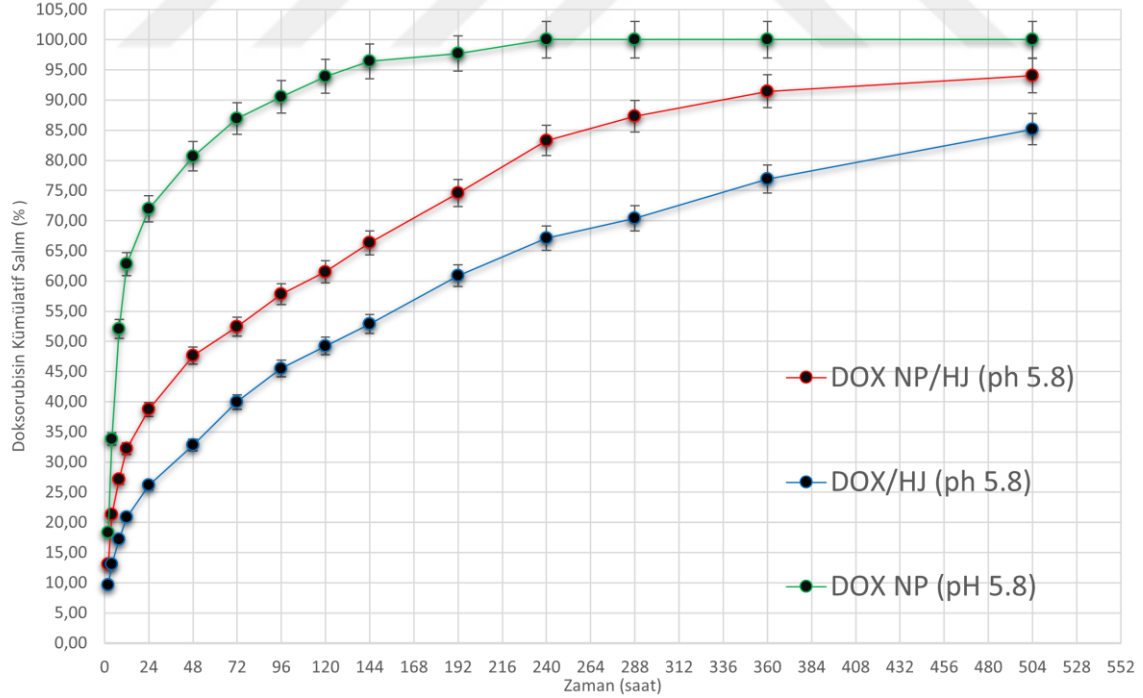
5.3.2. FORMÜLASYON İN VİTRO SALIM BULGULARI

Çizelge 5.25. Dokсорubisin yüzde kümülatif salımı

Saat	pH 7.4			pH 5.8		
	DOX NP/HJ	DOX/HJ	DOX NP	DOX NP/HJ	DOX/HJ	DOX NP
2	10,85 ± 0,54	9,79 ± 0,49	15,01 ± 0,75	13,03 ± 0,65	9,62 ± 0,48	18,28 ± 0,91
4	19,20 ± 0,96	16,19 ± 0,81	19,52 ± 0,98	21,31 ± 1,07	13,07 ± 0,65	33,80 ± 1,69
8	26,01 ± 1,30	20,90 ± 1,05	24,67 ± 1,23	27,14 ± 1,36	17,14 ± 0,86	52,08 ± 2,60
12	30,07 ± 1,50	25,09 ± 1,25	28,25 ± 1,41	32,21 ± 1,61	20,85 ± 1,04	62,80 ± 3,14
24	34,59 ± 1,73	30,32 ± 1,52	32,38 ± 1,62	38,70 ± 1,94	26,13 ± 1,31	71,98 ± 3,60
48	42,10 ± 2,11	40,73 ± 2,04	36,75 ± 1,84	47,62 ± 2,38	32,81 ± 1,64	80,66 ± 4,03
72	47,20 ± 2,36	49,68 ± 2,48	45,70 ± 2,28	52,41 ± 2,62	39,97 ± 2,00	86,94 ± 4,35
96	51,35 ± 2,57	58,31 ± 2,92	49,91 ± 2,50	57,82 ± 2,89	45,50 ± 2,28	90,52 ± 4,53
120	55,90 ± 2,79	66,88 ± 3,34	53,92 ± 2,70	61,52 ± 3,08	49,24 ± 2,46	93,93 ± 4,70
144	60,29 ± 3,01	74,58 ± 3,73	57,66 ± 2,88	66,32 ± 3,32	52,90 ± 2,65	96,42 ± 4,82
192	66,94 ± 3,35	83,27 ± 4,16	62,94 ± 3,15	74,56 ± 3,73	60,89 ± 3,04	97,70 ± 4,89
240	72,20 ± 3,61	88,61 ± 4,43	66,93 ± 3,35	83,29 ± 4,16	67,13 ± 3,36	100,00 ± 5,00
288	76,81 ± 3,84	92,63 ± 4,63	70,28 ± 3,51	87,28 ± 4,36	70,40 ± 3,52	
360	83,59 ± 4,18	97,90 ± 4,90	73,91 ± 3,70	91,44 ± 4,57	76,90 ± 3,84	
504	91,17 ± 4,56	99,00 ± 4,95	79,48 ± 3,97	94,05 ± 4,70	85,18 ± 4,26	

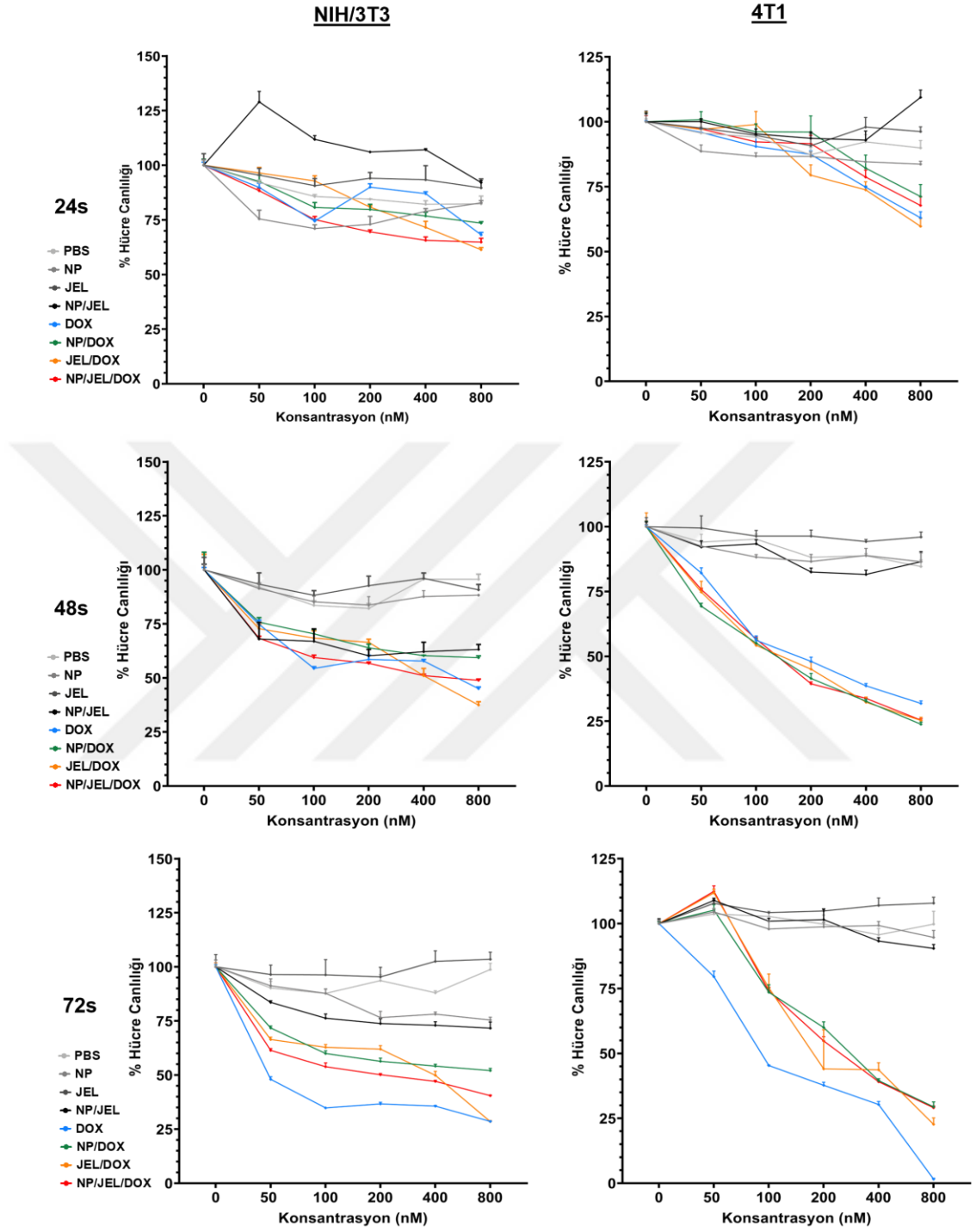


Şekil 5.28. Formülasyonların pH 7.4 fosfat tamponunda kümülatif salım profili

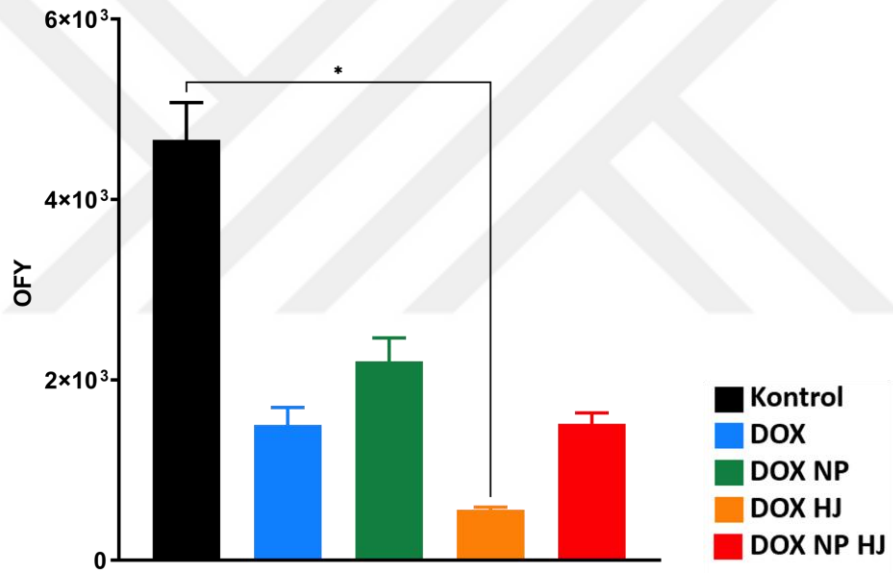
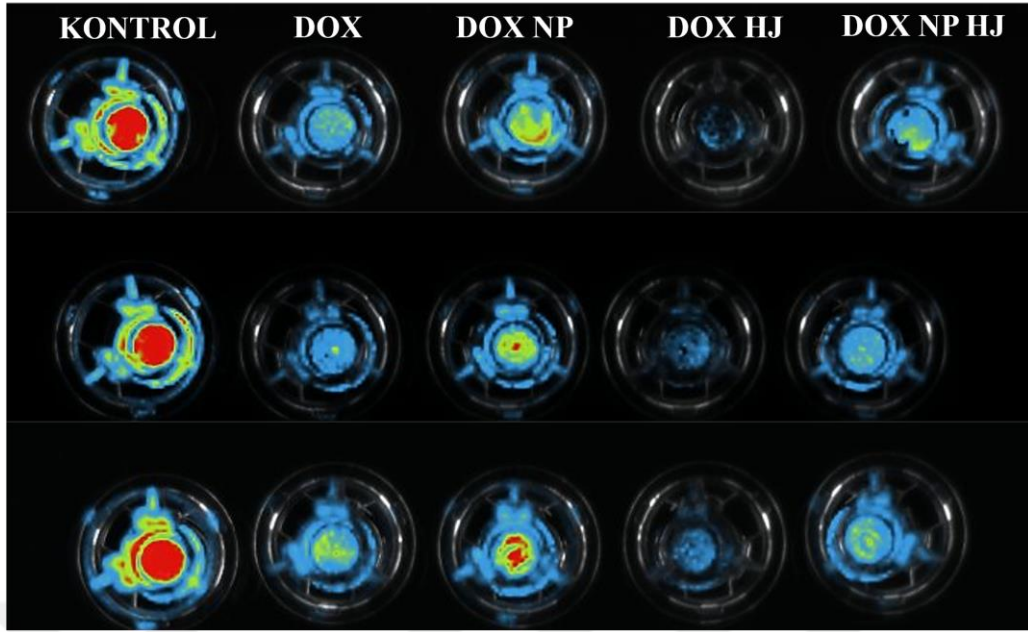


Şekil 5.29. Formülasyonların pH 5.8 fosfat tamponunda kümülatif salım profili

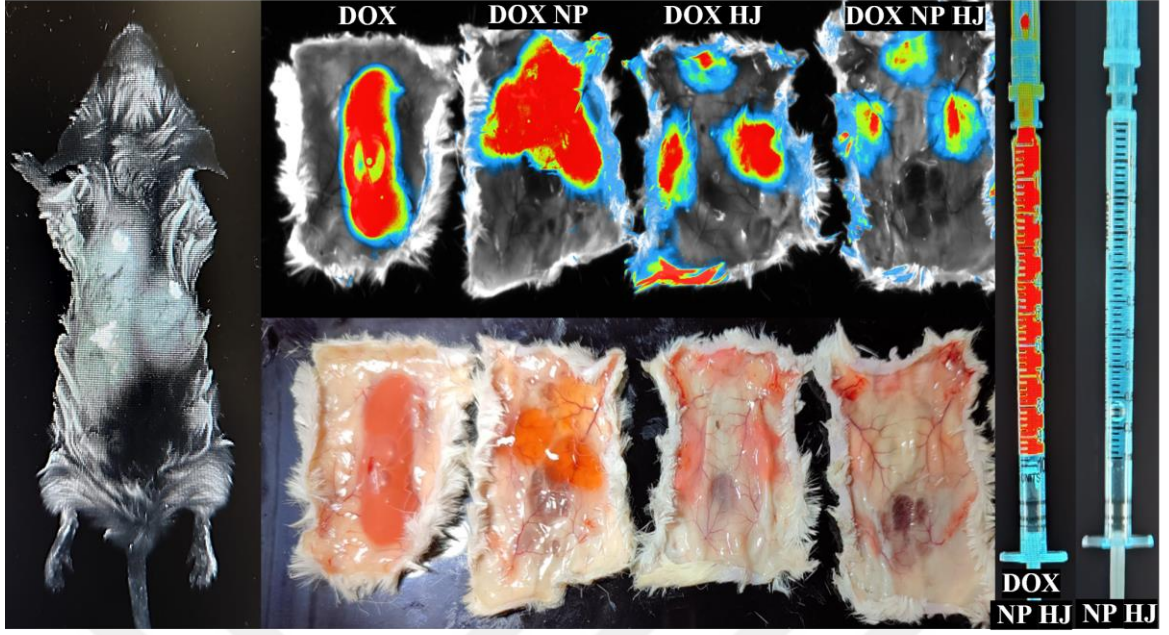
5.3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE HAYVAN DENEY BULGULARI



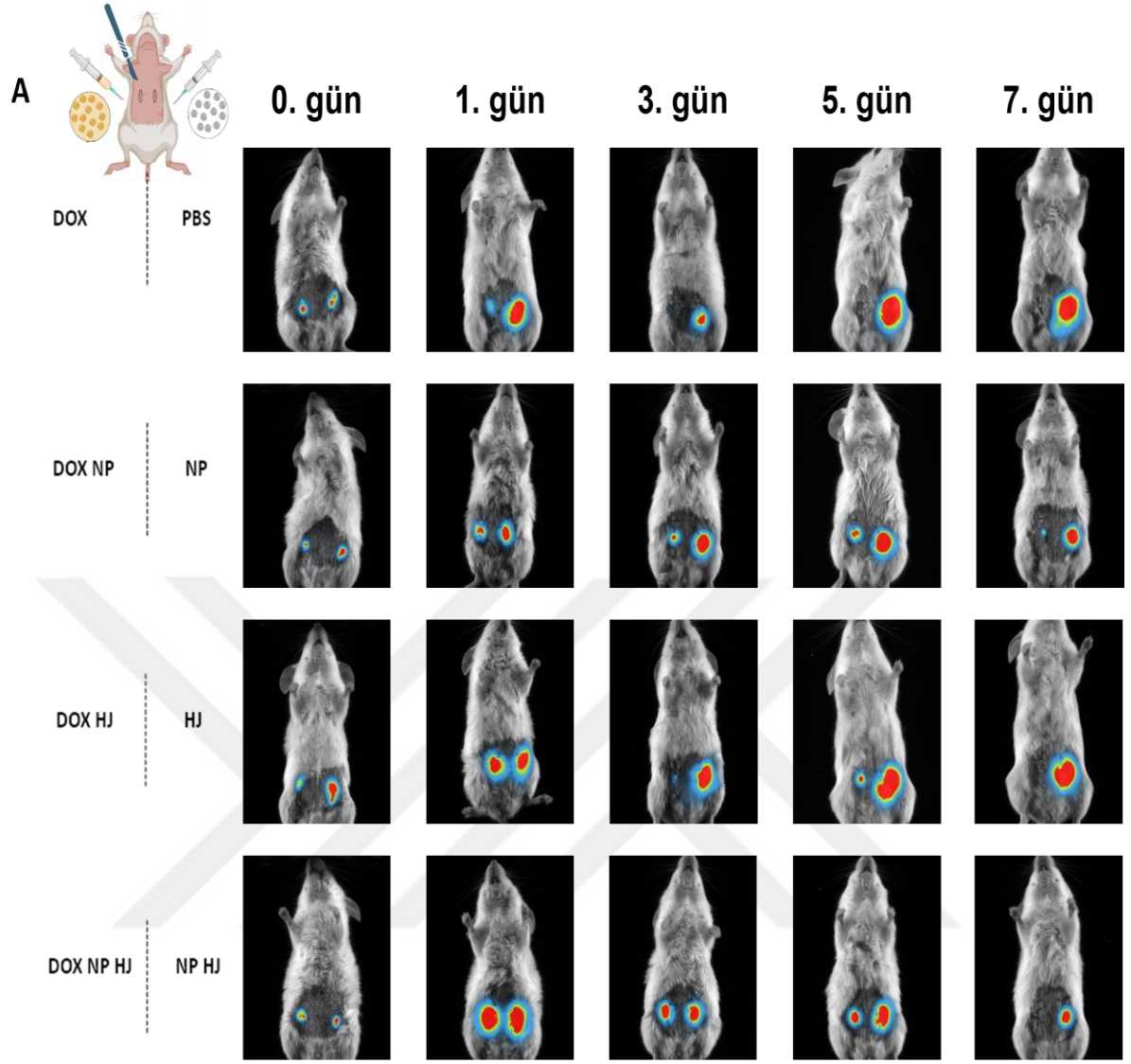
Şekil 5.30. Formülasyonların NIH/3T3 ve 4T1 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine 24, 48, ve 72 saatlik etkileri ($X \pm SH$, $n=3$).



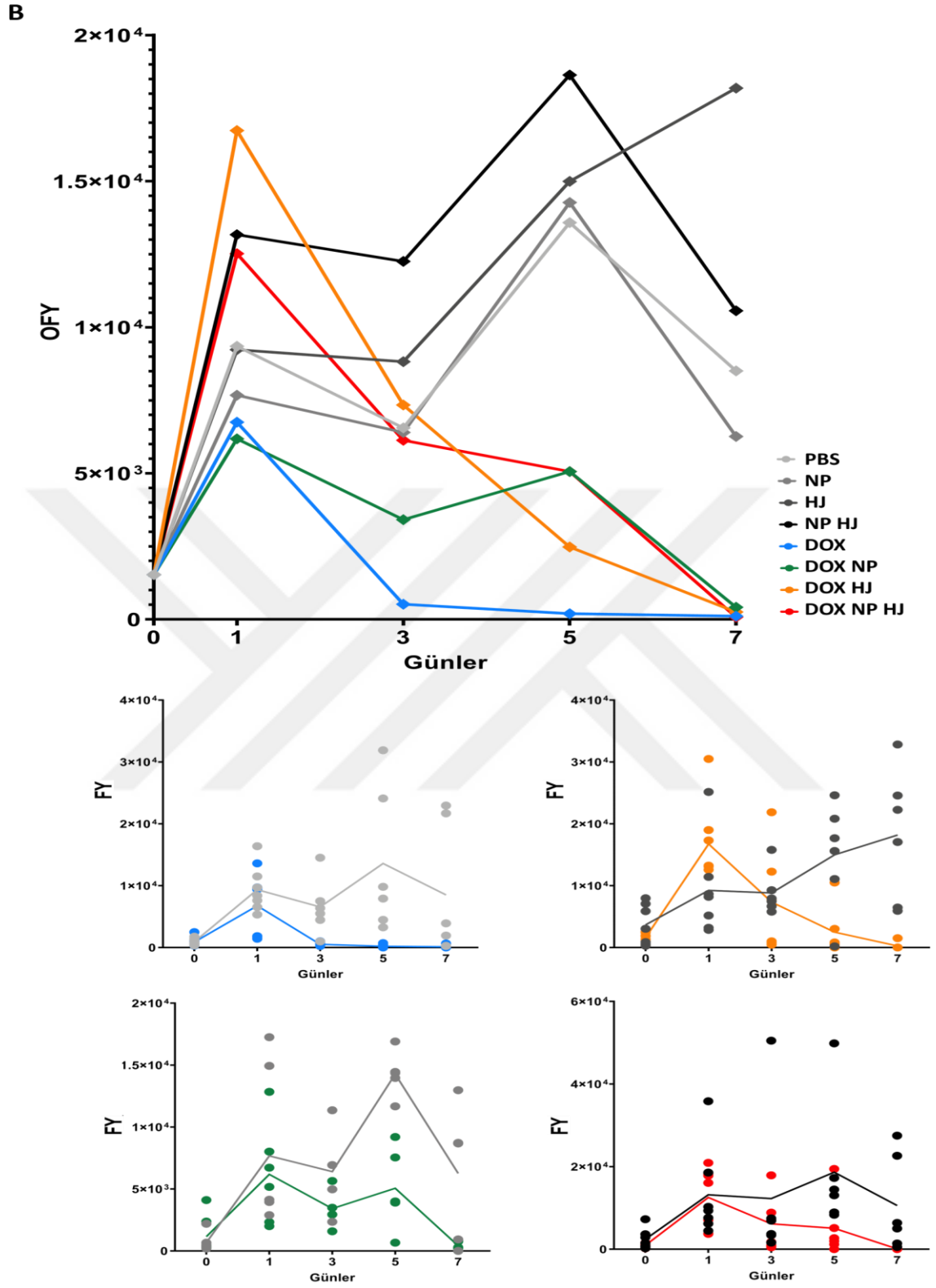
Şekil 5.31. Formülasyon uygulaması sonrası 48 saat transwell assay ortalama floresan yoğunlukları (OFY)



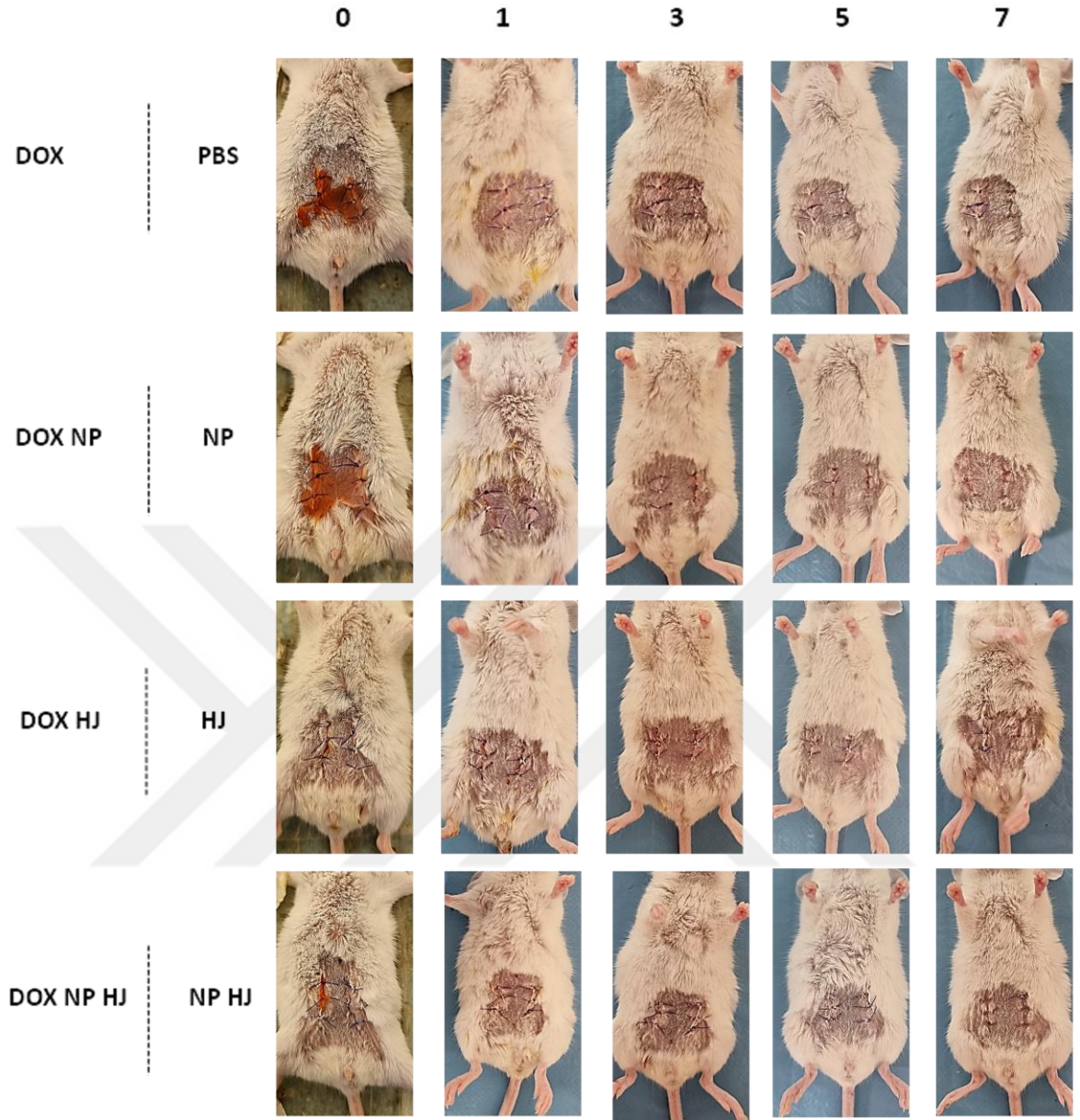
Şekil 5.32. Formülasyonların ön deneme IVIS görüntülemesi



Şekil. 5.33. A) Tümör bölgesi floresan yoğunluk görüntülemesi B) Tümör bölgesi floresan yoğunluk değerleri (FY: Floresan yoğunluğu, OFY: Ortalama floresan yoğunluğu)



Şekil 5.33. A) Tümör bölgesi floresan yoğunluklarının görüntülemesi B) Tümör bölgesi floresan yoğunluk değerleri (FY: Floresan yoğunluğu, OFY: Ortalama floresan yoğunluğu)



Şekil 5.34. Yara iyileşmesi görüntüleri (Gün)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

6.1.1. DOKSORUBİSİNİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Dokсорubisin, formülasyon üretimlerinin öncesinde fizikokimyasal niteliklerine ait bulgular literatür ile karşılaştırma yapılmış ve literatür uygunluğu gösterilmiştir. Bu doğrultuda dokсорubisin UV spektrum taraması, FT-IR spektrum taraması ve DSC analizi yapılmıştır.

Dokсорubisinin DMSO çözeltisindeki UV spektrumu (Şekil 5.1.) incelendiğinde maksimum absorbands veren dalga boyunun literatürde de gösterildiği üzere 480 nm olduğu saptanmıştır (122).

DSC termal analizinde dokсорubisine ait erime noktasının tayin edilerek maddenin saf olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Şekil 5.8.'de gösterildiği şekilde literatürle örtüşecek şekilde yaklaşık olarak 202°C'de erimeye başlayıp 226 °C'de pik vermiştir. (123)

Dokсорubisin için 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında fonksiyonel grupların aydınlatılabilmesi için FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler ile Dokсорubisin etken türünün karakteristik pikler Şekil 5.9.'da gösterildiği üzere belirlenmiştir. Dokсорubisine ait karakteristik pikler ise sırasıyla 1579, 1521 ve 555 cm⁻¹ dalga boylarında açıkça görülmektedir. Analiz edilen piklerin literatürdeki verilerle uygunluk göstermektedir (124).

6.1.2. DOKSORUBİSİN ANALİTİK VALİDASYONU

Dokсорubisinin miktar tayininde UV-Vis spektroskopisi kullanılmış olup doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tekrar edilebilirlik, duyarlılık ve özgüllük parametreleri incelenmiştir.

Şekil 5.2, Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.' te gösterildiği üzere 0,2-100 µg/ml konsantrasyon aralığında R² değerleri 0,999'dan büyük olduğu görülmektedir. Bu durum etkin madde konsantrasyon ile absorbands değerleri ilişkisinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

Korelasyon katsayı değerinin 0,999 değerinden büyük olması doğrusallığın elde edildiğini göstermektedir (110).

Doğruluk parametresi yöntemi, hesaplanan değerler ile gerçek değerler arasındaki yakınlığı belirlemek için kullanılmaktadır. Geri kazanım hesaplaması ile gösterilmektedir. Geri kazanım değerlerinin %97-103 aralığında olması, doğruluk parametreleri için yöntemin uygun olduğunu göstermektedir (110). Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2’de gösterilen değerler literatürde belirtilen değer aralığındadır ve yöntemin yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir.

Keskinlik parametresi ile farklı koşullarda tekrarlanan deneyde aynı örneğe ilişkin alınan ölçümler arasındaki yakınlık gösterilmektedir. Bağlı standart sapma değerlerinin %2’den düşük olması, yöntemin yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir (110). Çizelge 5.3 ve 5.4.’te %BS değerlerinin %2 değerinin altında olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.5. ve Çizelge 5.6.’da yer alan PB ve DMSO tayin yöntemlerinde belirlenen konsantrasyonlarda tekrarlanabilir değerlerin bağlı standart sapmasının %2’nin altında olduğu ve yöntemlerin tekrarlanabilir olduğu görülmektedir.

Özgüllük parametresini göstermek için UV spektrum taramasında PEG-b-PCL polimer çözeltisinin de spektrum taraması yapılmış ve etkin madde tayin bölgesindeki dalga boyunda (480 nm) doksorubisin ile girişim yapmadığı Şekil 5.1.’de gösterilmiştir.

6.1.3. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ ÜRETİLMESİ

Nanopartikül üretiminde polimer seçimi için Çizelge 5.10.’daki ön formülasyonlar üretilmiştir. Çözücü buharlaştırma yönteminde yer alan sonikasyon süreleri, PVA yüzde konsantrasyonu ve hacmi, PVA’nın hazırlama tampon türü, sürfektan (Arlacel) etkisinin anlaşılması için ön formülasyon çalışması yapılmıştır. Canlılık deneylerinde kullanılacak olan nanomalzemenin steril olması gerekliliği dolayısıyla sterilizasyon işlemleri nanopartikül formülasyonlarının steril kabinde 0.22 µm selüloz Millipore filtrelerden geçirilerek yapılmıştır. Bu nedenle üretilen formüllerin öncelikli olarak filtreden geçme durumları incelenmiştir. Filtreden geçen formüller ile optimizasyon sağlanmış ve bu formüller için etkin madde yüklemesi yapılmıştır. Ön formülasyonlar seçilirken literatürde

çözücü buharlaştırma yöntemlerinin kullanıldığı, stabilizan olarak PVA'nın kullanıldığı formüller incelenmiştir (125-127).

Literatürde PVA'nın satabilizan etkisinin moleküler ağırlığı ve hidroliz derecesine göre değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarında düşük molekül ağırlıklı PVA çözeltilerinin kullanılmasının daha verimli olduğu bildirilmiştir (128). Buna ilaveten PVA hidroliz derecesinin de nanopartikül oluşumunda önemli oranda rol aldığı, %90 hidroliz derecesinden daha düşük hidroliz derecesine sahip PVA'ların stabilizan etkilerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (129). Buna dayanarak nanopartikül formülasyonlarının üretiminde düşük molekül ağırlıklı ve düşük hidroliz derecesine sahip PVA (%87 Hidrolize Mw:13000-23000) kullanılmıştır. Literatürde dış faz olarak kullanılan PVA çözeltisinin, su yerine PBS ile hazırlanmasıyla üretilen nanopartiküllerde enkapsülasyon verimliliklerinin arttığı bildirilmiştir (130). Çizelge 5.11.'de bu doğrultuda formülasyonlar üretilmiştir. Karşılaştırma yapabilmek için Çizelge 5.11.'deki formülasyonlarda doksorubisin yükleme etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çizelge 5.10.'da sürfektan olarak Arlacel'in kullanıldığı ÖF11 formülasyonunda, ÖF10 formülasyonuna kıyasla partikül boyutunun düştüğü gözlenmiştir. Çizelge 5.11'da PBS tamponu kullanılan PVA çözeltilerinde enkapsülasyon verimliliğinin düşük olması dolayısıyla formülasyonun değiştirilmiştir. Literatürde %1 PVA PBS pH 8 bir tamponda enkapsülasyon verimliliğinin arttığı bildirilmiştir (131). Buradan hareketle PVA'nın daha bazik pH'da bir tamponla beraber hazırlanmasına karar verilmiştir. Önceki formüllerde PBS pH 7.4 ile hazırlanan %1 PVA, distile su ile %1 oranında hazırlanmıştır. Bazik bir tampon olarak kullanılması hedeflenen pH 8.5 trizma tamponunda, çözelti %1 PVA kullanılarak hazırlanmıştır (132). Değiştirilen tamponla birlikte enkapsülasyon verimliliği ortalama %30'dan %80 değerine çıkmıştır. Nanopartikül üretimi hazırlanan formüller arasında en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olan Çizelge 5.11.'deki F3 kodlu formül ile gerçekleştirilmiştir.

Hesaplanan verim oranları nanopartikül sistemlerin sterilizasyon işlemleri steril kabinde 0,22 µm Millipore filtrelerden süzülerek yapıldığı aşamada 0,22 µm'nin üzerindeki boyuttaki nanopartiküller filtrede tutulduğu için hesaplanan verim ile filtrasyon sonrası verim farklı bulunmuştur. Doksorubisin için ortalama %80±6 aralığında bulunan enkapsülasyon verimlilikleri %56±5 değerlerine düşmüştür.

pEGFP-C1 plazmid nanopartikül formülasyonları da F3 formülü ile üretilmiş olup sürfekten olarak DDAB ve HTAB kullanılmıştır. 10 µg ve 20 µg pDNA ile üretilen formülasyonlarda F7 ve F9 DDAB, F8 ve F10 HTAB ile hazırlanmıştır. Çizelge 5.11.'de gösterildiği üzere DDAB içeren formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri HTAB ile hazırlanan formüllere kıyasla daha yüksek gözlenmiştir. Ayrıca 20 µg pDNA ile hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğinin düştüğü gözlenmiştir.

6.1.4. FORMÜLASYONLARDA DSC ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 5.8.'te gösterilen termogramda boş NP, DOX NP, DOX, PEG-b-PCL polimeri ve PEG-b-PCL:DOX (10:1) fiziksel karışımının analiz değerleri gösterilmiştir.

DSC termal analizinde doksorubisine ait erime noktasının tayin edilerek maddenin saf olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Şekil 5.5.'te gösterildiği şekilde literatürle örtüşecek şekilde yaklaşık olarak 202°C'de erimeye başlayıp 226 °C'de pik vermiştir. (123)

Formülasyon termogramlarına göre doksorubisin yüklü formülasyonlarda doksorubisine ait karakteristik pikler kaybolmuş olup, PEG-b-PCL polimerinin pikine benzer bir pik gözlenmiştir. Bu durum doksorubisinin amorf halde nanopartiküle yüklendiğini ve nanopartikül içerisinde homojen olarak disperse edildiğini göstermektedir (133).

6.1.5. FORMÜLASYONLARDA FT-IR ANALİZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 5.9.'da gösterildiği üzere örnekler için 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında fonksiyonel grupların aydınlatılabilmesi için FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler ile doksorubisin karakteristik piklerinin ve sentez ürünü nanopartiküle ait karakteristik piklerinin belirlenmesi sonrasında, sentezlenen nanopartikülün içerisine doksorubisinin enkapsüle edildiği açıkça görülmektedir. Boş nanopartikül için gerçekleştirilen FT-IR analizi sonrasında en baskın karakteristik pikler sırasıyla 2922, 2855, 1724, 1168, 1102 ve 732 cm⁻¹ dalga sayısında açıkça görülmektedir. 2922 cm⁻¹ dalga boyunda görülen pikler C-H simetrik, 2855 cm⁻¹'deki gerilmeler ise C-H asimetrik gerilmelere atfedilen karakteristik piklerdendir. Yapıdaki en keskin ve güçlü pik olarak gözlenebilen 1724 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik C=O absorpsiyon gerilim bandından

kaynaklanmaktadır. Bu pik, yapıdaki karbonil grubunun varlığının kanıtı olarak görülmektedir. Karakteristik 1168 cm^{-1} piki genellikle yapıdaki ester kaynaklı C-O eğilme titreşimlerinden kaynaklanırken, 1102 cm^{-1} 'deki keskin pik C-O-C eğilme titreşim bandına atfedilmektedir. Doksorubisine ait karakteristik pikler ise sırasıyla 1579 , 1521 ve 555 cm^{-1} dalga sayılarında açıkça görülmektedir. Bu piklerin literatüre uygunluk gösterdiği ilgili çalışmadaki veriler ile kanıtlanmıştır (124). Doksorubisinin nanopartikül formuyla beraber etkileşimi incelendiğinde, FT-IR analizinde etkin maddeye ait karakteristik piklerin ikili formda baskılandığı ve doksorubisine ait baskın piklerinde herhangi bir değişiklik olmadığı açıkça görülmektedir. Buradan hareketle üretilen nanopartikül formülasyonlarında doksorubisinin nanopartikül içerisine enkapsüle edildiği gözlenmiştir.

6.1.6. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ TEM GÖRÜNTÜLEMESİ

Optimize nanopartikül formülasyonuna (F3) ait boş nanopartikül ve doksorubisin yüklü nanopartiküle ait görüntüler Şekil 5.10.'de gösterilmiştir. Şekil 5.11'de ise aynı optimize F3 nanopartiküllere pEGFP-C1 plazmid yüklenmiştir. Küresel şekilde gözlenen mikroskop görüntülerinde doksorubisin yüklü nanopartiküllere ait matriks ve membran yapısı görüntüde ayırt edilebilmektedir (134, 135). Formüllerde TEM ile gözlenen boyut küçülmesinin numuneleri TEM gridi üzerinde kuruması dolayısıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.

6.1.7. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ STABİLİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Polimerik nanopartikül formülasyonlarında partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri nanopartiküllerin etkinliklerini ve verimliliklerini belirleyen karakteristik özelliklerdir (136). Polidispersite indeksi (PDI), homojen bir boyut dağılımını temsil etmekte ve biyolojik ortamlarda nanopartikülün davranış ve stabilitesini belirleyen önemli bir parametredir. Partikül boyutu, özellikle tümör hücrelerinde hücresel tutulumu ve permeabilite niteliğini belirleyerek formülasyonların hücresel alım verimliliğine etki etmektedir. Zeta potansiyeli ise hücresel alım özelliklerinin yanı sıra fizyolojik koşullarda nanopartikül stabilitesine ve agregasyon davranışına etki eden bir faktördür. Nanopartikül formülasyonlarında etkin bir tedavi için düşük PDI değerleri ($PDI < 0.3$), 200 nm altında

partikül boyutu değerleri, -30 ile +30 aralığında zeta potansiyeli değerlerinin tercih edildiği belirtilmektedir (136-139).

Stabilite çalışmalarında doksorubisin yüklü optimize nanopartikül formülasyonlarda deney başlangıcında (0. Gün) (Şekil 5.12.), +4°C (Şekil 5.13.) ve +25°C'de (Şekil 5.14) muhafaza edilmiş ve 30,60 ve 90 gün saklama süresi sonrasında partikül boyutları ve zeta potansiyel değerleri korunmuştur. Agregasyon kaynaklı olarak partiküllere ait PDI değerleri görece artış göstermiştir. Elde edilen ölçüm değerleri üretilen nanopartikül formülasyonlarının yüksek stabilite özelliğine sahip olduğunu göstermektedir.

6.1.8. HİDROJEL FORMÜLASYON TASARIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Hidrojel formülasyonları, kullanım amaçları ve hedeflenen parametreler göz önünde bulundurularak tekstür özelliklerinin optimize edilmesiyle üretilebilmektedir. Böylece tedaviye ilişkin verimlilik artırılabilir. Vizkozite, sertlik, sıkıştırılabilirlik, adheziflik, koheziflik ve elastisite değerleri tekstür ölçümünde ele alınan önemli karakteristik belirteçlerdir (140, 141). Bu amaç doğrultusunda, deney tasarımı için yazılım destekli metotların kullanılmasıyla birlikte hedeflenen karakteristik özelliklere sahip formülasyonlar elde edilebilmekte ve optimizasyonları sağlanabilmektedir (142-144). Şekil 5.21., Şekil 5.22. ve Şekil 5.23. ortalama değerleri temsil eden tekstür grafikleri bulunmaktadır.

Değişken parametrelere ilişkin limit değerler (Çizelge 5.14.) hidrojel ön formülasyon çalışmaları ile elde edilmiştir. Dizayn aralığı belirlendikten sonra tasarımın optimizasyon yapılabilmesi için yazılımın oluşturduğu formüller üretilmiştir (Çizelge 5.15.). Hidrojel tekstür karakteristiklerini yansıtan 5,10 ve 20 rpm'de vizkozite değerleri, sertlik, sıkıştırılabilirlik, adheziflik, koheziflik ve elastisite olmak üzere sekiz farklı yanıtın (Çizelge 5.16.) ölçümleri yapılmış ve program üzerinden ANOVA istatistiksel analizler yapılmıştır (Çizelge 5.17). Her bir yanıtla ilişkin oluşturulan yanıt değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (EK 1: Dizayn yanıtları istatistiksel analiz verileri). Deney tasarımı yapılması aşamasında, ön formülasyonda dizayn aralığına karar verilmesini takiben en önemli basamağı dizayn bileşenlerine yönelik dizayn hedeflerinin belirlenmesi oluşturmaktadır (Çizelge 5.18.). Hedefler belirlenirken tezde çalışılacak olan hidrojel malzemenin, post operatif müdahale ile hedef bölgede hem kanser hücrelerine karşı

antikanser ajan ile sitotoksik etkinin sağlanmasına imkân tanınması ve bunu uzatılmış kontrollü bir salımla sağlayabilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra hedef bölgedeki yara iyileşme sürecinin hızlandırılması, antikanser ajanın yara iyileşme sürecini bozacak yan etkilerinin tamponlanması hedeflenmiştir. Verilen hedef değerler doğrultusunda yazılım tarafından sunulan nümerik optimizasyon çözümleri içerisinde (Çizelge 5.19.) en yüksek arzu edilebilirliğe sahip çözüm (No:1) ile devam edilmiştir. Buna göre üretilen optimum formülasyonun değişken yanıtlarının da analiz sonrası nokta tahmininde, her bir değer için %95 güven aralığını sağlayacak şekilde olmasına dikkat edilmiştir (Çizelge 5.21., Çizelge 5.22.).

Yara bölgesine uygulanmak için tasarlanan bir hidrojel viskozitesi, uygulama kolaylığı, jelin yerinde kalma yeteneği ve yara ortamıyla etkileşimi açısından kritik bir parametredir. Hidrojel kolayca yaraya uygulanabilmeli ve aynı zamanda yara bölgesinde yerinde kalarak ilaç salımını devam ettirebilecek bir viskoziteye sahip olmalıdır. Bu, genellikle jelin yaranın düzensiz yüzeyine yayılacak kadar akışkan, uygulama sırasında enjektörle ve sürülebilir olma nitelikleri uygulamada zorluk oluşturmayacak biçimde olmalıdır. Uygulandıktan sonra, hidrojel yaranın yüzeyine ve konturlarına uyum sağlayacak yeterli viskozitede olmalıdır. Çok viskoz bir jel yayılmakta zorlanabilirken, çok akışkan bir jel formülasyonu da lokal olarak düşük tutunma özelliği gösterebilmektedir. Viskozite, hidrojel yara sekresyonunu etkili bir şekilde emmesine ve yapısını korumasına izin verecek şekilde dengelenmelidir. Bu emilim, iyileşme için kritik olan yara neminin yönetilmesi açısından önemlidir. Yara iyileşmesi için hidrojellerin viskozitesi spesifik formülasyona ve amaçlanan kullanıma bağlı olarak değişebilir. Bazı hidrojeller daha kolay uygulama için daha az viskoz olarak tasarlanırken, diğerleri daha uzun süreli kullanım veya spesifik yara türleri için daha viskoz olabilir. Optimal viskozitenin spesifik uygulamaya ve yara tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Açık yaralar için jelin uygulama bölgesinde kalabilmesi ve fazla sıvıyı absorplayabilmesi için daha yüksek bir viskozite tercih edilmektedir (145).

Lokal uygulama için hidrojel tasarlama aşamasında viskozitenin yanı sıra optimal performansı sağlamak için sertlik, sıkıştırılabilirlik, adhezyon, kohezyon ve elastisite gibi mekanik özelliklerin dengelenmesi gerekmektedir (146-148). Dizayn hedefi oluşturulurken

bu parametrelerin hedef limitleri için lokal uygulama için en etkili olacak şekilde bir formülasyonun eldesi amaçlanmıştır.

Lokal uygulamalar için tasarlanan hidrojel formülasyonlar, yara yüzeyine uyum sağlayacak yapısal özelliklerde olmalı, hedef bölgeye tutunma sağlayabilmeli, stabil yapısını tedavi süresince koruyabilmeli ve hedeflenen ilaç etkinliğini sağlayabilmelidir (149, 150). Yaranın üzerine baskı yapmamak veya tahrişe neden olmamak için genellikle düşük sertlik değerleri tercih edilmektedir. Hidrojel formülasyonu en fazla yara alanını etkili bir şekilde dolduracak derecede sıkıştırılabilir olmalıdır. Sıkıştırılabilir niteliklerinin düşük olmasıyla nemli bir iyileşme ortamının sağlanması ve gaz alışverişini kolaylaştıran belirli bir yapıyı koruması sağlanabilmektedir (151, 152). Hidrojin yara bölgesinde stabil şekilde kalarak ilaç salımını sağlayabilmesi için adhezif özelliklerinin yüksek olması gerekmektedir (153). Hidrojin uygulama ve kullanım sırasında formül bütünlüğünü korumasını sağlamak için yüksek kohezyon kritik öneme sahiptir. Koheziflik artışı polimerik matrikste fiziksel çapraz bağlayıcı gibi davranış özelliği ile polimerik matriksi stabilize eder. Yüksek koheziflik niteliği sağlanarak formülasyonun parçalanmasının veya fragmente olmasının önüne geçilir (154). Hidrojin vücudun hareketlerine ve yara alanının değişen şekline uyum sağlamasını ve esnemesini sağlamak için elastisite esastır. Bu özellik, yara yüzeyiyle sürekli teması sürdürmeye yardımcı olarak iyileşme ve korumaya katkıda bulunur (155). Kantitatif olarak düşük elastisite değerleri, yüksek elastisite özellik göstergesidir (152).

Hidrojel dizayn parametreleri ve literatürde lokal uygulamaya yönelik formül hedefleri göz önünde bulundurulmuştur. Buna göre yüksek vizkozite, adheziflik ve koheziflik değerleri ile düşük sertlik, sıkıştırılabilirlik ve elastiklik değerlerini bir arada bulunduran bir tasarım yapılmıştır.

6.1.9. FORMÜLASYON TASARIMINDA BAĞIMLI PARAMETRELERİN HİDROJEL MEKANİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yara iyileşmesi için tasarlanan bir hidrojin viskozitesi, uygulama kolaylığı, jelin yerinde kalma yeteneği ve yara ortamıyla etkileşimi açısından kritik bir parametredir. Hidrojel, rahatsızlık yaratmadan kolayca yaraya uygulanabilecek bir viskoziteye sahip olmalıdır. Bu, genellikle jelin yaranın düzensiz yüzeyine yayılacak kadar akışkan ancak uygulama

sırasında kontrol etmek zor olmayacak kadar akışkan olmaması anlamına gelir. Uygulama sonrasında hidrojel yaranın yüzeyine ve konturlarına uyum sağlayacak yeterli viskozitede olmalıdır. Çok viskoz bir jel yayılmakta zorlanabilirken, çok akışkan bir jel ihtiyaç duyulan yerde kalmayabilmektedir (156). Viskozite, hidrojin yara sekresyonunu etkili bir şekilde emmesine ve yapısını korumasına izin verecek şekilde dengelenmelidir. Bu emilim, iyileşme için kritik olan yara neminin yönetilmesi açısından önemlidir (157). Yara iyileşmesi için hidrojinlerin viskozitesi formülasyona ve amaçlanan kullanıma bağlı olarak değişebilmektedir. Bazı hidrojinler daha kolay uygulama için daha az viskoz olarak tasarlanırken, diğerleri daha uzun süreli kullanım veya spesifik yara türleri için daha viskoz olabilmektedir. Optimal viskozitenin enjekte edilebilirlik gibi spesifik uygulamaya ve yara tipine bağlı olarak değişebilmektedir (147, 158-160). Yara iyileşmesinin hedeflendiği lokal tedavilerde de hidrojel formülasyonlarının adhezif, elastik ve dayanıklı olması beklenmektedir (140, 161). Bunun yanı sıra hidrojel formülasyonundaki tekstür özelliklerinin dengeli olması gerekmektedir. Sertlik, sıkıştırılabilirlik, adheziflik, koheziflik ve elastisite gibi nitelikler tedavi verimliliğine doğrudan etki eden parametrelerdir (140).

Faktör A'nın (CMC) ve Faktör B (HA) bağımlı parametrelerin kodlanmış eşitlik değerlerine göre formülasyonda alınan mekanik yanıtlara olan etkisi gözlenebilmektedir. CMC katsayılarına bakıldığında, bu faktörün özellikle vizkozite yanıtlarına büyük etkisi olduğu görülmektedir. Bu durum CMC'nin konsantrasyonunun artmasıyla bu viskozite değerlerinin önemli ölçüde arttığını göstermektedir (162). HA'nın da vizkozite üzerinde anlamlı pozitif etkileri olduğu görülmektedir. Bu durum HA'nın konsantrasyon artışının viskoziteyi artırıcı etkisi olduğunu işaret etmektedir (163). Ancak CMC'ye kıyasla bu etkiler görece daha düşük görünmektedir. Çizelge 5.39.'a göre vizkozite yanıtları, CMC ve HA'nın formülasyondaki miktar değişimlerinden önemli ölçüde etkilenen özelliklerdir. Vizkozite yanıtları her iki faktörün artışıyla birlikte en büyük artışı gösteren yanıtlardır.

CMC ve HA bağımlı parametrelerin, tekstür cihazından elde edilen sertlik, sıkıştırılabilirlik, adhezyon, kohezyon ve elastisite verilerinde önemli ölçüde etki gösterdiği gözlenmiştir. Sertlik için CMC ve HA'nın sertlik üzerindeki doğrudan etkileri sırasıyla pozitif ve daha düşük pozitif olarak görünmektedir (164, 165). Bu durum CMC'nin artışıyla sertliğin arttığını, HA'nın etkisinin ise daha az olduğunu göstermektedir. AB etkileşimi sertlik üzerinde negatif bir etki göstermektedir, bu da iki faktörün birlikte

kullanıldığında sertliği azaltabileceğini işaret etmektedir. Sıkıştırılabilirlik için hem CMC hem de HA yanıt üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir, her iki faktörün artışı da bu özelliği arttırmaktadır. Bununla birlikte, AB etkileşiminin sıkıştırılabilirlik üzerinde negatif bir etkisi vardır, bu da faktörlerin birleşik etkisinin farklı olduğunu göstermektedir. Adheziflik için CMC'nin adheziflik üzerinde pozitif bir etkisi olsa da HA'nın daha yüksek bir pozitif etkiye sahip olduğu görünmektedir (166, 167). Bu durum özellikle HA'nın konsantrasyon artışının adhezifliği artırıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Koheziflik değerleri CMC faktörüyle artarken HA faktörüyle azalmaktadır (165, 168). Koheziflik için CMC ve HA faktörlerinin etkileri görece düşüktür. AB etkileşimi koheziflik üzerinde pozitif bir etki gösterirken, karesel ve üçlü etkileşimlerin etkileri daha az belirgindir. Elastisite için faktörlerinin her ikisinin de etkileri düşüktür. Bu durum elastisite özelliğinin CMC ve HA'nın konsantrasyon değişikliklerine karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir (164).

6.1.10. HİDROJEL FORMÜLASYONU ADHEZİF VE MUKOADHEZİF ÖZELLİKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çizelge 5.23.'te belirtilen jel formülasyonlarda tekstür verilerinden elde edilen adhezyon verileri ve mukozadhezyon verileri (Şekil 5.24, Şekil 5.25, Şekil 5.26) göz önüne alındığında, bu iki ölçüm arasında bir paralellik gözlemlenmektedir. Adhezyon ve mukozadhezyon ölçümleri, mantıken benzer fenomenleri değerlendirmektedirler. Her ikisi de jel formülasyonunun hedef yüzeye yapışma kabiliyetini ölçer. Ancak, her ölçüm farklı teknikler kullanarak bu yapışmayı değerlendirir. Adhezyon, genellikle malzemenin başka bir yüzeye yapışma gücünü ifade eder. Bu ölçüm, formülasyonun hedef yüzeye olan fiziksel etkileşimini ve bu etkileşimin gücünü ölçer. Mukozadezyon ise özellikle mukoza yüzeylerine yapışma kabiliyetini ifade eder ve mukoza gibi özel yüzeylerle etkileşim için özel olarak değerlendirilir (169).

Çizelge 5.23.'e göre bileşen miktarları arttığında veya azaldığında her iki değer de benzer şekilde değiştiği görülmektedir. HJ 4 formülasyonunda hem adhezyon hem de mukozadezyon değerleri en yüksektir. Bu durum bileşenlerin miktarının artışının, hem genel yapışma gücünü olan adhezyonu hem de mukoza yüzeylerine özgü yapışma kabiliyetini mukozadezyonu artırdığını göstermektedir. Hidrojel formülasyonlarındaki

bileşenler arasında, yapışma gücünü en çok etkileyen temel bileşenin hyalüronik asit olduğuna işaret etmektedir. HA, moleküler yapısı ve biyolojik uyumluluğu nedeniyle hem adhezyon hem de mukozadezyon özelliklerini önemli ölçüde artırabilen bir polimerdir. HJ 2 (CMC: 0.5 g, HA: 0.9 g) ve HJ 6 (CMC: 0.7 g, HA: 0.983 g) formülasyonlarında, HA miktarının artışıyla birlikte hem adhezyon hem de mukozadezyon değerlerinin önemli ölçüde yükseldiği görülmektedir. Bu durum, HA'nın yapışma gücü üzerindeki belirleyici rolünü vurgulamaktadır. Diğer taraftan, HA miktarının azaldığı durumlarda, HJ 5'te (CMC: 0.7 g, HA: 0.417 g), her iki yapışma değeri de önemli ölçüde düşmektedir. Bu da HA'nın azalmasının formülasyonun adhezif kabiliyetini negatif yönde etkilediğini göstermektedir. HA'nın bu etkisi onun yüksek hidrasyon kapasitesi ve biyolojik yüzeylerle etkileşim kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (170). Sonuç olarak, HA'nın jel formülasyonlarındaki miktarı, adhezyon ve mukozadezyon değerleri üzerinde belirleyici bir etkiye sahip görünmektedir. Bu durum HA'nın formülasyonların genel adhezif özelliklerini önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir. Bu bulgulara göre özellikle lokal uygulamalar için HA'nın, jel formülasyonlarının geliştirilmesi ve optimizasyonunda kritik bir bileşen olduğunu vurgulamaktadır.

6.1.11. HİDROJEL FORMÜLASYONU ŞİRINGA EDİLEBİLİRLİK ÖZELLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 5.27. ve Çizelge 5.24.'te gösterildiği üzere DOX NP HJ, NP HJ ve HJ formülasyonlarının şırınga edilebilirlik değerleri ölçülmüştür. Nanopartikül içeren hidrojel formülasyonlarının kuvvet (N) değerleri artış göstermiştir (171). DOX içeren formül en yüksek kuvvet değerini göstermiştir. Karboksi metil selüloz, hyalüronik asit ve poli etilen oksit hidrojel bileşenleri doğası gereği su tutma eğilimi gösteren hidrofilik yapılardır. Boş nanopartikül ve doksorubisin yüklü nanopartikül yapılarının eklenmesiyle meydana gelen fiziksel etkileşimler hidrojin akış özelliklerinde değişikliğe sebep olmuştur. PEG-b-PCL polimeri hidrofilik özellikteki PEG'in yanında hidrofobik özellikteki PCL'yi yapısında bulundurmaktadır. Tuz formdaki doksorubisin HCl ise temel formuna kıyasla daha iyonik ve daha hidrofilik bir yapıya sahiptir. Polimerde ve etkin maddede yer alan hidrofilik bileşenlerin, jel matriksinde yer alan hidrofil gruplarla ve hidrojel matriksi ile etkileşimde bulunmaları dolayısıyla bu akış özellikleri arasındaki farkın oluştuğu düşünülmektedir.

6.1.12. FORMÜLASYONLARDA İN VİTRO SALIM DEĞERLENDİRMESİ

Tümör bölgelerindeki pH disregülasyonu, tümör ilerlemesini ve invazyonunu arttıran bir takım hücresel fonksiyonlar tetiklemektedir. Tümör mikro çevresinde, kanser hücrelerinin aktif metabolik aktiviteleri sonucu artan asitlik dolayısıyla pH düşmektedir (172). Tümör çevresinde gözlenen pH düşüşü antikanser tedavide kullanılan ilaçların dağılımını, salım profilini ve hücre içine alımını önemli ölçüde etkilemektedir (173). Ayrıca doksorubisin gibi iyonize antikanser ajanlarında sitotoksik etkinliği pH değişiminden önemli ölçüde etkilenmektedir (174). Tüm bunlar ele alındığında kanser tedavisi için geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin ve salım özelliklerinin değerlendirilmesinde pH kaynaklı oluşan fizyolojik değişiklikler mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada elde edilen formülasyonların doksorubisin salımı üzerindeki etkinliği, salım profilinin belirlenmesi için Çizelge 5.25.'te belirtildiği şekilde DOX NP, DOX HJ ve DOX NP HJ olmak üzere doksorubisin içeren formülasyonlar kullanılmıştır. Nötral pH (pH 7,4) ve tümör mikro çevresindeki asidik pH koşullarını (pH 5,8) (Şekil 5.29.) modelleyebilecek şekilde hazırlanan fosfat tamponlarında salım deneyleri gerçekleştirilmiştir (175). Fosfat salin (PBS) tamponlarında gerçekleştirilen doksorubisin salım deneylerinde çökme problemiyle karşılaşıldığı için fosfat tamponu ile salım deneyleri gerçekleştirilmiştir (176). Fosfat tamponunun tamponlama aralığı pH 5,8-7,4 olması dolayısıyla salım deneylerinde pH 5,8 ve pH 7,4 tamponları kullanılmıştır. DOX yüklü formülasyonların in vitro salım deneyleri diyaliz membran ile yapılmıştır (177). Ön salım çalışmalarında belirli zaman aralıklarında medyum ortamından örnek alınması ve eksilen medyum miktarının tamamlanması ile gerçekleştirilen çalışmalarda 12-24 saat sonrasında salım profilinde plato gözlenmesi, elde edilen ölçüm değerlerine göre salımın durduğunun gözlenmesini takiben devam eden örnek alma saatlerinde DOX'un turuncu agregatlar olarak medyum ortamında bulunduğu, salım ortamındaki cam yüzeye ve ve diyaliz membran bileşenlerine adheze olduğu görülmüştür. Bundan dolayı her örnek alma vaktinde tüm medya değiştirilecek şekilde salım deneyi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.' da görüldüğü üzere 21 günlük salım profiline bakılarak formülasyonlar ile doksorubisinin uzatılmış kontrollü salımının sağlandığı görülmektedir. Nanopartikül formülasyonlarında pH 5.8'de pH 7.4 göre kıyasla yüksek bir ilk çıkış etkisi

görülmektedir. pH 7.4'te nanopartikülün hidrofobik çekirdek yapısının daha yüksek oranda korunduğu bu nedenle asidik pH'ya kıyasla düşük miktarda salımın gerçekleştiği görülmektedir. Doksorubisinin pH bağımlı salımı, DOX'un amino gruplarının asidik pH'da protonasyonu sonucu çözünürlüğünün artmasından kaynaklanabilmektedir. Buna ilaveten pozitif yüklü DOX moleküllerinin negatif yüklü PEG-b-PCL nanopartikülleri ile etkileşiminin, asidik pH değerlerinde DOX'un protonasyon nedeniyle PCL çekirdek yapıyı zayıflatması sebep olabilmektedir. Bu yüzden literatürde de belirtildiği üzere PCL çekirdek yapılarının asidik pH'da parçalanma hızının artışı, DOX'un ortama salım hızını da etkilemiştir (178, 179). Bunlara bağlı olarak kanserli dokuların mikro çevresinin genellikle daha asidik olması dolayısıyla, pH bağımlı DOX salım davranışının kanser tedavisinde seçici ve pasif hedefleme avantajlar sağlanacağı düşünülmektedir. Bu nitelikleri ile formülasyonların, sağlıklı dokulara zarar vermeden tümör dokusuna daha fazla ilaç ulaştırması, kontrollü ve etkili bir ilaç salımı sağlayabilmesi öngörülmektedir.

DOX NP formülasyonu ilk saatlerde görece yüksek ilk çıkış etkinliği sergilerken, DOX NP HJ ve DOX HJ formülasyonları daha yavaş ve sürekli bir salım profili göstermiştir. DOX NP formülasyonu, özellikle ilk 2 saatte yüksek salım oranlarına ulaşırken, DOX NP/HJ formülasyonu daha kontrollü bir salım profili sergilemiştir. Özellikle pH 5.8'de, DOX NP formülasyonunun 10 günlük bir salım süresiyle en hızlı salım elde edilirken, DOX HJ formülasyonunun 21 günlük sürede en yavaş salımı gerçekleştirdiği görülmektedir. DOX NP HJ de içeriğindeki jel formülasyonu ile DOX NP'ye kıyasla 21 günlük salımı sağlayabilmiş ve önemli ölçüde salım süresi uzamıştır. Bu durum nanopartiküllerin kontrollü ve uzatılmış salım için hidrojel matrisin gerekliliğini göstermektedir. DOX NP HJ formülasyonundaki nanopartikül ve hidrojin formülasyonlarının bir arada bulunması doksorubisinin kontrollü ve uzatılmış salım etkinliğini sağlamada öne çıkmaktadır. Bu, ilacın salım hızının daha iyi kontrol edilmesini sağlamak ve hedeflenen tedaviye daha etkin ulaşım sunmaktadır. DOX NP/HJ formülasyonu, bu uzun süreli salımı nanopartiküllerin ve hidrojin sinerjisi sayesinde daha etkin bir şekilde gerçekleştirebilecek potansiyele sahiptir.

Hidrojel formülasyonlarında (DOX NP/HJ ve DOX/HJ) formülasyonlarından ilaç salımı, 504 saat (21 gün) boyunca devam etmektedir. Bu, özellikle kronik yaraların tedavisinde ve uzun süreli kanser tedavilerinde önemlidir.

Sonuç olarak DOX NP/HJ formülasyonunun, doksorubisinin asidik ortamlarda kontrollü salımını sağlaması, uzun süreli etkinliği ve hedeflenen bölgeye dengeli ulaşımı sayesinde özellikle kanser tedavisi ve kronik yara iyileşmesinde önemli avantajlar sunacağı ön görülmektedir.

6.1.13. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE HAYVAN DENEYLERİ DEĞERLENDİRMESİ

6.1.13.1. Hücre Kültürü Değerlendirmeleri

Hücre canlılık testleri Şekil 5.30.'da gösterildiği üzere formülasyonların hem sağlıklı hücreler (NIH/3T3) hem de kanser hücreleri (4T1) üzerindeki etkileri incelenmiştir. MTT hücre canlılık testi kullanılarak gerçekleştirilen deneyde canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Grafikte genel olarak gözlenen 4T1 meme kanseri hücreleri üzerinde doksorubisin içeren tüm formülasyonların (DOX, NP/DOX, JEL/DOX ve NP/JEL/DOX) belirgin sitotoksik etkiler gösterdiği ve hücre canlılığını düşürdüğü ile gözlenmiştir. NP/DOX ve NP/JEL/DOX formülasyonları, 4T1 hücreleri üzerinde özellikle etkili olmuştur. JEL/DOX formülasyonu da etkili olsa da nanopartikül bazlı formülasyonlarla karşılaştırıldığında daha düşük etkinlik göstermiştir. Bu durum, nanopartiküllerin ilacın hücre içine girişini daha etkin bir şekilde artırabileceğini öne sürmektedir. Sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde ise, yüksek konsantrasyonlarda DOX içeren formülasyonların toksik etkileri belirginleşmiştir. Ancak sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etki kanser hücrelerine göre göreceli olarak daha az olup bu da formülasyonların terapötik seçiciliğinin bir göstergesi olabileceğini ön görülmektedir.

Şekil 5.31.'de transwell analizi yapılan 4T1 hücrelerinde 48 saatlik süre sonrasında ölçülen floresan değerler görülmektedir. Burada iki günlük sürenin sonunda MTT testlerine kıyasla farklı bir sonuç elde edilmiş, deney sonunda doksorubisin yüklü hidrojel formülasyonunun en fazla etkinlik gösteren formülasyon olduğu gözlenmektedir. DOX/JEL formülasyonunun doksorubisin çözeltisinin uygulandığı örnekten daha yüksek etkinlik göstermesi dikkat çekmektedir. İlaç salım profili ve MTT sonuçlarından farklı olan bu sonucu jelin davranışı ile açıklamak mümkündür. Transwell kuyu tabanlarına bırakılan formülasyonlar hücre medyumuna ile taşınarak membran filtredeki hücrelere ulaşmakta ve etki göstermektedir. Bu süreçte degrade olan ve medyuma karışan jel formülasyonu bir süre sonra membran filtreye adheze olarak bu bölgede tutunma göstermektedir. Tutunmayı

takiben doksorubisin çözeltisinin bulunduğu örneğe kıyasla daha yüksek konsantrasyonda bir etkin madde varlığı göstermektedir.

Hyalüronik asit hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu teşvik eden ve doku onarımını destekleyen doğal bir polisakkarittir. Bunun yanı sıra yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu sürecinde olumlu etkinlik gösteren bir maddedir (180). Jel formülasyonu içeren gruplar hem sağlıklı NIH/3T3 hücrelerinde hem de 4T1 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığında bir artış görülmektedir. Bu durumun yara iyileşmesi sürecinde jel formülasyonunun içeriğindeki hyalüronik asitin hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerinde olumlu etkisi olacağını göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, doksorubisin yüklü nanopartikül ve jel formülasyonlarının, kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerinin etkinliğini artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Formülasyonları hedef hücrelere daha etkin bir şekilde ulaşmasını sağlayarak tedavinin etkinliğini artırabileceği ve sağlıklı hücrelere zarar verme potansiyelini azaltabileceği sonucuna varılmıştır. Jel formülasyonunun hyalüronik asit içermesi, sağlıklı ve kanserli hücre hatlarında hücre canlılığını ve proliferasyonunu artırmada olumlu bir faktör olarak değerlendirilmiştir.

6.1.13.2. Fare Deneyleri

Fare deneylerinin öncesinde farelerin sırt kısmında belirlenen bölgelerde üç noktaya enjeksiyon yapılarak ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu ön denemelerde DOX ve DOX NP formülasyonları sıvı olduğu için enjeksiyon bölgesinde lokalize olamazken, DOX HJ ve DOX NP HJ hidrojel formülasyonlarının Şekil 5.32.'de görüldüğü üzere enjeksiyon bölgesine tutunarak lokalize olduğu görülmektedir. Şekil 5.33.'de elde edilen görüntüler farelerin meme bölgesinde ışıma veren kanser hücrelerinin canlı görüntüleme sistemleri kullanılarak izlenmesi çalışmasını göstermektedir. Floresan ışıma, kanser hücrelerinin aktivitesini ve/veya varlığını gösteren bir işaretçi olarak kullanılmaktadır. Çalışmada formülasyonların karşılaştırılmalı etkinliği, bu floresan yoğunluğu üzerinden ölçülmekte ve karşılaştırılmaktadır. Grafik tedavi edilen her grup için zamanla ölçülen ortalama floresan yoğunluğunu göstermektedir. Bu veriler her bir formülasyonun tedavi etkinliğinin yanı sıra, ilacın hedef dokuda ne kadar süreyle aktif kaldığını anlamak için önemlidir. Daha yüksek floresan yoğunluğu, genellikle daha yüksek kanser hücresi popülasyonunu

göstermektedir. Görüntülere göre uzatılmış salım etkinliğinin en yüksek olduğu formülasyon DOX NP HJ formülasyonudur. Doksorubisin salımının yüksek olduğu, floresan yoğunluğun hızlıca düştüğü farelerde her ne kadar kanser hücresi yoğunluğu düşmüş olsa da Şekil 5.39.'da görüldüğü üzere yara kapanmaları gecikmiş ve yara iyileşmesi sekteye uğramıştır. Yara iyi edici etken varlığında uzatılmış kontrollü salım sağlanmasının tedavi sürecinde daha başarılı sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Şekil 5.34.'te farelerde cerrahi uygulama sonrası yara iyileşme takibi için yedi gün boyunca yara bölgesinin görüntüleri alınarak değerlendirme yapılmıştır. Yara iyileşmesi sürecinde, cerrahi işlem yapılan bölgedeki dikişlerin atılması, sütur atılan bölgenin kapanması göz önüne alınmıştır. Antikanser ajan olarak ortamda bulunan doksorubisin yara iyileşmesini engellemekte yara kapanmasını geciktirmektedir (181). Yara bölgesinde bu etkin maddeye olan akut maruziyet süreci olumsuz etkilemektedir. Hidrojel içeren formülasyonlarla birlikte hem yapıdaki hyalüronik asit sayesinde hem de sağlanan uzatılmış salım sayesinde farelerde yara kapanma sürecinin daha hızlı olduğu gözlenmiştir.

6.2. SONUÇ

Meme kanserine karşı etkili olduğu bilinen Doksorubisin HCl'nin kargo taşıyıcı sistem içerisindeki formülasyonlarının geliştirilmesi, karşılaştırmalı çalışmalarla birlikte lokal olarak hedeflendirilme yapılarak rezidüel meme kanserine yönelik post operatif kullanımıyla tümör nüksünün önlenerek hem kanser tedavisinin sağlanması hem de yara iyileşme sürecinin hızlandırılması amacıyla yürütülen bu tez çalışmasından şu çıkarımlar elde edilmiştir;

Doksorubisin için yüksek enkapsülasyon verimliliğine sahip nanopartiküler formülasyon geliştirilmiştir. Yazılım destekli deney tasarımı ile cerrahi sonrası lokal tedavide kullanılmak üzere birçok parametre değerlendirilerek bu kullanıma yönelik optimize bir hidrojel formülasyonu dizayn edilmiş ve üretilmiştir.

Üretilen optimize hidrojel formülasyonunun karakterizasyonları yapılmış optimize nanopartikül formülasyonu ile kullanımıyla hedeflenen tedaviye uygun kargo taşıyıcı sistem niteliklerini taşıyan bir sistem elde edilmiştir.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında çözücü buharlaştırma metodu kullanılmıştır. Birçok formülasyon parametresinin karşılaştırılması yapılmıştır. Doksorubisin etkin maddesi için enkapsülasyon etkinliği yüksek, boyutu 200 nm'nin altında steril olarak elde edilen formüller üretilmiştir.

Formülasyon karakterizasyon değerlendirmeleri sonucunda F3 kodlu formül optimal nanopartikül formülasyonu olarak seçilerek ileri deney basamaklarına bu formül ile devam edilmiştir.

Doksorubisinin yanı sıra pEGFP-C1 plazmidi üretilerek saflaştırılmış, optimize formülün katyonik sürfektan modifikasyonu ile enkapsülasyonu sağlanmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının 1,2 ve 3 aylık sürede +4°C ve 25 °C'de stabilite testleri yapılmış formülasyonlar elde edilen karakterizasyonlar stabilitelerinin korunduğunu göstermiştir.

Optimize formüller ile elde edilen sistemlerde nihai nanopartikül jel formülasyonlarında 21 günlük salım testlerinde uzatılmış ve kontrollü bir salım elde edildiği ortaya konulmuştur.

Fare deneylerinde oluşturulan cerrahi model üzerinde formülasyon etkinlikleri gözlenmiş, uzatılmış salım niteliklerinin yanı sıra hidrojel içeren formülasyonlarda yara iyi edici etkinliğin arttığı görülmüştür.

Hazırlanan nanopartikül ve hidrojel formülasyonları ile gerçekleştirilen hücre canlılığı ve fare modeli çalışmalarında elde edilen formülasyonları ile bu tez çalışmasında tez için belirlenen hedeflere yönelik başarılı sonuçlara ulaşılmıştır.

Tez çalışması sonrasında gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalar ise şu şekildedir;

Tezde çalışılan pEGFP-C1 ile üretilen nanopartiküler sistemin hücresel ölçekte transfeksiyon verimliliği değerlendirilecek ve ticari ürün Lipofectamine ile etkinlik karşılaştırması yapılacaktır. Buradan elde edilecek veriler doğrultusunda model plazmid yerine terapötik etkinliğe sahip meme kanserine yönelik plazmid taşıyıcı sistemler ile çalışmaların devam ettirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Epstein J, Morris C, Huber K. Instrumental texture of white salted noodles prepared from recombinant inbred lines of wheat differing in the three granule bound starch synthase (waxy) genes. *Journal of Cereal Science*. 2002;35(1):51-63.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;149(4):778-89. Epub 20210405. doi: 10.1002/ijc.33588. PubMed PMID: 33818764.
3. Sulman EP, Ismaila N, Armstrong TS, Tsien C, Batchelor TT, Cloughesy T, et al. Radiation Therapy for Glioblastoma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Guideline. *Journal of Oncol. Practice* 2017;35(3):361-9. Epub 20161128. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7562. PubMed PMID: 27893327.
4. Carr C, Ng J, Wigmore T. The side effects of chemotherapeutic agents. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2008;19(2):70-9.
5. Zamboni WC. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(23):8230-4.
6. Sepantafar M, Maheronnaghsh R, Mohammadi H, Radmanesh F, Hasani-Sadrabadi MM, Ebrahimi M, Baharvand H. Engineered hydrogels in cancer therapy and diagnosis. *Trends in Biotechnology*. 2017;35(11):1074-87.
7. Nguyen K, Dang PN, Alsberg E. Functionalized, biodegradable hydrogels for control over sustained and localized siRNA delivery to incorporated and surrounding cells. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(1):4487-95.
8. Wang W, Narain R, Zeng H. *Hydrogels. Polymer Science and Nanotechnology: Elsevier*; 2020. p. 203-44.
9. Nguyen MK, Lee DS. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromol Biosci*. 2010;10(6):563-79. doi: 10.1002/mabi.200900402. PubMed PMID: 20196065.

10. Xie Z, Shen J, Sun H, Li J, Wang X. Polymer-based hydrogels with local drug release for cancer immunotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2021;137:111333. Epub 20210208. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111333. PubMed PMID: 33571834.
11. Liu H, Shi X, Wu D, Kahsay Khshen F, Deng L, Dong A, et al. Injectable, Biodegradable, Thermosensitive Nanoparticles-Aggregated Hydrogel with Tumor-Specific Targeting, Penetration, and Release for Efficient Postsurgical Prevention of Tumor Recurrence. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(22):19700-11. Epub 20190522. doi: 10.1021/acsami.9b01987. PubMed PMID: 31070356.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
13. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J-WW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer.* 2013;49(6):1374-403.
14. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021;71(3):209-49.
15. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy.* 2019:151-64.
16. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy.* 2010;10(10):955-60.
17. Hon JDC, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, et al. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *American Journal of Cancer Research.* 2016;6(9):1864.
18. Lester SC, Bose S, Chen Y-Y, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2009;133(10):1515-38.

19. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortés J, et al. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(8):dju152.
20. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer research*. 2007;13(15):4429-34.
21. Berrada N, Delaloge S, Andre F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Annals of Oncology*. 2010;21:vii30-vii5.
22. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer current status and future directions. *Annals of Oncology*. 2009;20(12):1913-27.
23. Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S-c. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020;22:1-13.
24. Stover DG, Bell CF, Tolaney SM. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy considerations for triple-negative breast cancer. *AJHO*. 2016;12:6-12.
25. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(11):834-46.
26. Hartkopf AD, Taran F-A, Wallwiener M, Hagenbeck C, Melcher C, Krawczyk N, et al. The presence and prognostic impact of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research*. 2013;15:1-10.
27. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical breast cancer*. 2009;9:S73-S81.
28. Miller-Kleinhenz JM, Bozeman EN, Yang L. Targeted nanoparticles for image-guided treatment of triple-negative breast cancer: clinical significance and technological

advances. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2015;7(6):797-816.

29. Geay J-F. Physiopathology, diagnosis and treatment of breast cancer. Soins; la Revue de Reference Infirmiere. 2013(776):25-9.

30. Fahad Ullah M. Breast cancer: current perspectives on the disease status. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress. 2019:51-64.

31. Morrow M, White J, Moughan J, Owen J, Pajack T, Sylvester J, et al. Factors predicting the use of breast-conserving therapy in stage I and II breast carcinoma. Journal of Clinical Oncology. 2001;19(8):2254-62.

32. Lim DW, Metcalfe KA, Narod SA. Bilateral mastectomy in women with unilateral breast cancer: a review. JAMA Surgery. 2021;156(6):569-76.

33. DeMichele A, Yee D, Esserman L. Mechanisms of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. New England Journal of Medicine. 2017;377(23):2287-9.

34. Calaf GM, Zepeda AB, Castillo RL, Figueroa CA, Arias C, Figueroa E, Farias JG. Molecular aspects of breast cancer resistance to drugs. International Journal of Oncology. 2015;47(2):437-45.

35. Asaoka M, Gandhi S, Ishikawa T, Takabe K. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: past, present, and future. Breast cancer: Basic and Clinical Research. 2020;14:1178223420980377.

36. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clinical Cancer Research. 2005;11(16):5678-85.

37. Yang TJ, Ho AY. Radiation therapy in the management of breast cancer. Surgical Clinics. 2013;93(2):455-71.

38. Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine therapy for early breast cancer: updated review. Ochsner Journal. 2017;17(4):405-11.

39. Haque MM, Desai KV. Pathways to endocrine therapy resistance in breast cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10:573.
40. Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician*. 2008;77(3):311-9.
41. Maximiano S, Magalhaes P, Guerreiro MP, Morgado M. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *BioDrugs*. 2016;30:75-86.
42. Capelan M, Pugliano L, De Azambuja E, Bozovic I, Saini K, Sotiriou C, et al. Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer. *Annals of Oncology*. 2013;24(2):273-82.
43. Higa GM, Abraham J. Lapatinib in the treatment of breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2007;7(9):1183-92.
44. Feldinger K, Kong A. Profile of neratinib and its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2015;7:147.
45. Indira K, Mudali UK, Nishimura T, Rajendran N. A review on TiO₂ nanotubes: influence of anodization parameters, formation mechanism, properties, corrosion behavior, and biomedical applications. *Journal of Bio-and Tribo-corrosion*. 2015;1:1-22.
46. Liyanage PY, Hettiarachchi SD, Zhou Y, Ouhtit A, Seven ES, Oztan CY, et al. Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2019;1871(2):419-33.
47. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(1):36-48.
48. Sabnis N, Nair M, Israel M, McConathy WJ, Lacko AG. Enhanced solubility and functionality of valrubicin (AD-32) against cancer cells upon encapsulation into biocompatible nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012:975-83.

49. Lim S, Park J, Shim MK, Um W, Yoon HY, Ryu JH, et al. Recent advances and challenges of repurposing nanoparticle-based drug delivery systems to enhance cancer immunotherapy. *Theranostics*. 2019;9(25):7906.
50. Behl A, Solanki S, Paswan SK, Datta TK, Saini AK, Saini RV, et al. Biodegradable PEG-PCL nanoparticles for co-delivery of MUC1 inhibitor and doxorubicin for the confinement of triple-negative breast cancer. *Journal of Polymers and the Environment*. 2023;31(3):999-1018.
51. Liu M, Fu M, Yang X, Jia G, Shi X, Ji J, et al. Paclitaxel and quercetin co-loaded functional mesoporous silica nanoparticles overcoming multidrug resistance in breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;196:111284.
52. Nikdouz A, Namarvari N, Shayan RG, Hosseini A. Comprehensive comparison of theranostic nanoparticles in breast cancer. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*. 2022;11(1):1.
53. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1969;11(6):1101-10.
54. Arcamone F, Cassinelli G, Franceschi G, Penco S, Pol C, Redaelli S, Selva A. Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin). *International Symposium on Adriamycin: Milan, 9th-10th September, 1971; 1972: Springer*.
55. Barranco S, Gerner E, Burk K, Humphrey R. Survival and cell kinetics effects of adriamycin on mammalian cells. *Cancer Research*. 1973;33(1):11-6.
56. Kiyomiya K-i, Matsuo S, Kurebe M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Research*. 2001;61(6):2467-71.
57. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(12):4514-8.

58. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2011;21(7):440.
59. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, Gelber RD, Colan SD. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(12):2629-36.
60. Sagnella SM, Trieu J, Brahmabhatt H, MacDiarmid JA, MacMillan A, Whan RM, et al. Targeted doxorubicin-loaded bacterially derived nano-cells for the treatment of neuroblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2018;17(5):1012-23.
61. O'Shaughnessy JA. Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2003;4(5):318-28.
62. Srivastava A, Amreddy N, Babu A, Panneerselvam J, Mehta M, Muralidharan R, et al. Nanosomes carrying doxorubicin exhibit potent anticancer activity against human lung cancer cells. *Scientific Reports*. 2016;6(1):38541.
63. Thigpen JT, Aghajanian CA, Alberts DS, Campos SM, Gordon AN, Markman M, et al. Role of pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2005;96(1):10-8.
64. Plimack ER, Hoffman-Censits JH, Viterbo R, Trabulsi EJ, Ross EA, Greenberg RE, et al. Accelerated methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin is safe, effective, and efficient neoadjuvant treatment for muscle-invasive bladder cancer: results of a multicenter phase II study with molecular correlates of response and toxicity. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(18):1895.
65. Zhang X, Peng X, Yu W, Hou S, Zhao Y, Zhang Z, et al. Alpha-tocopheryl succinate enhances doxorubicin-induced apoptosis in human gastric cancer cells via promotion of doxorubicin influx and suppression of doxorubicin efflux. *Cancer Letters*. 2011;307(2):174-81.

66. Sherman EJ, Lim SH, Ho AL, Ghossein RA, Fury MG, Shaha AR, et al. Concurrent doxorubicin and radiotherapy for anaplastic thyroid cancer: a critical re-evaluation including uniform pathologic review. *Radiotherapy and Oncology*. 2011;101(3):425-30.
67. van der Zanden SY, Qiao X, Neefjes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The FEBS Journal*. 2021;288(21):6095-111.
68. Lotrionte M, Biondi-Zoccai G, Abbate A, Lanzetta G, D'Ascenzo F, Malavasi V, et al. Review and meta-analysis of incidence and clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity. *The American Journal of Cardiology*. 2013;112(12):1980-4.
69. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1-11.
70. Soe ZC, Kwon JB, Thapa RK, Ou W, Nguyen HT, Gautam M, et al. Transferrin-conjugated polymeric nanoparticle for receptor-mediated delivery of doxorubicin in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Pharmaceutics*. 2019;11(2):63.
71. Alkhatib MH, AlBishi HM. In vitro evaluation of antitumor activity of doxorubicin-loaded nanoemulsion in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2013;15:1-15.
72. Alibolandi M, Sadeghi F, Abnous K, Atyabi F, Ramezani M, Hadizadeh F. The chemotherapeutic potential of doxorubicin-loaded PEG-b-PLGA nanopolymersomes in mouse breast cancer model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;94:521-31.
73. Yang J, Wu Y, Shen Y, Zhou C, Li Y-F, He R-R, Liu M. Enhanced therapeutic efficacy of doxorubicin for breast cancer using chitosan oligosaccharide-modified halloysite nanotubes. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(40):26578-90.
74. Duro-Castano A, Sousa-Herves A, Armiñán A, Charbonnier D, Arroyo-Crespo JJ, Wedepohl S, et al. Polyglutamic acid-based crosslinked doxorubicin nanogels as an anti-metastatic treatment for triple negative breast cancer. *Journal of Controlled Release*. 2021;332:10-20.

75. Prendergast FG, Mann KG. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry*. 1978;17(17):3448-53.
76. Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*. 1995;11(8):320-3.
77. Chen Y, Müller JD, Ruan Q, Gratton E. Molecular brightness characterization of EGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2002;82(1):133-44.
78. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*. 2005;2(12):905-9.
79. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 1996;173(1):33-8.
80. Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;227(3):707-11.
81. Wang Y, Gou M, Gong C, Wang C, Qian Z, Feng Lin Y, Luo F. Pharmacokinetics and disposition of nanomedicine using biodegradable PEG/PCL polymers as drug carriers. *Current Drug Metabolism*. 2012;13(4):338-53.
82. Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly (lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*. 1997;35(4):513-23.
83. Burke PA, Klumb LA, Herberger JD, Nguyen XC, Harrell RA, Zordich M. Poly (lactide-co-glycolide) microsphere formulations of darbepoetin alfa: spray drying is an alternative to encapsulation by spray-freeze drying. *Pharmaceutical Research*. 2004;21:500-6.

84. Huang MH, Li S, Hutmacher DW, Schantz JT, Vacanti CA, Braud C, Vert M. Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of ϵ -caprolactone in the presence of poly (ethylene glycol). *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2004;69(3):417-27.
85. Wu W, Chen H, Shan F, Zhou J, Sun X, Zhang L, Gong T. A novel doxorubicin-loaded in situ forming gel based high concentration of phospholipid for intratumoral drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 2014;11(10):3378-85.
86. Ahmad Z, Salman S, Khan SA, Amin A, Rahman ZU, Al-Ghamdi YO, et al. Versatility of hydrogels: from synthetic strategies, classification, and properties to biomedical applications. *Gels*. 2022;8(3):167.
87. Nguyen MK, Lee DS. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromolecular Bioscience*. 2010;10(6):563-79.
88. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008;49(8):1993-2007.
89. Chabria Y, Duffy GP, Lowery AJ, Dwyer RM. Hydrogels: 3D drug delivery systems for nanoparticles and extracellular vesicles. *Biomedicines*. 2021;9(11):1694.
90. Ialenti A, Di Rosa M. Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. *Agents and Actions*. 1994;43:44-7.
91. Laurent TC, Fraser JRE. Hyaluronan 1. *The FASEB Journal*. 1992;6(7):2397-404.
92. Ding Y-W, Wang Z-Y, Ren Z-W, Zhang X-W, Wei D-X. Advances in modified hyaluronic acid-based hydrogels for skin wound healing. *Biomaterials Science*. 2022.
93. Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;151:1012-29.

94. Heinze T, Pfeiffer K. Studies on the synthesis and characterization of carboxymethylcellulose. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 1999;266(1):37-45.
95. Salama A, El-Sakhawy M, Kamel S. Carboxymethyl cellulose based hybrid material for sustained release of protein drugs. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;93:1647-52.
96. Kanikireddy V, Varaprasad K, Jayaramudu T, Karthikeyan C, Sadiku R. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:963-75.
97. Alexandridis P. Poly (ethylene oxide)/poly (propylene oxide) block copolymer surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 1997;2(5):478-89.
98. Harris JM, Sedaghat-Herati M, Sather P, Brooks DE, Fyles T. Synthesis of new poly (ethylene glycol) derivatives. *Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. 1992:371-81.
99. Liu VA, Jastromb WE, Bhatia SN. Engineering protein and cell adhesivity using PEO-terminated triblock polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;60(1):126-34.
100. Beyer D, Knoll W, Ringsdorf H, Wang JH, Timmons RB, Sluka P. Reduced protein adsorption on plastics via direct plasma deposition of triethylene glycol monoallyl ether. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;36(2):181-9.
101. Liu LS, Berg RA. Adhesion barriers of carboxymethylcellulose and polyethylene oxide composite gels. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;63(3):326-32.
102. Telford JK. A brief introduction to design of experiments. *Johns Hopkins apl technical digest*. 2007;27(3):224-32.
103. Wahdame B, Candusso D, François X, Harel F, Kauffmann J-M, Coquery G. Design of experiment techniques for fuel cell characterisation and development. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2009;34(2):967-80.

104. Uy M, Telford JK. Optimization by design of experiment techniques. 2009 IEEE Aerospace conference; 2009: IEEE.
105. Wood M, Irwin W, Scott D. Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 1990;15(4):291-300.
106. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1): 2005. Access date 02.01.2023 02.01.2023. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
107. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 2003;987(1-2):57-66.
108. Li L, Scheiger JM, Levkin PA. Design and applications of photoresponsive hydrogels. *Advanced Materials*. 2019;31(26):1807333.
109. González AG, Herrador MÁ. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007;26(3):227-38.
110. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
111. Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;496(2):173-90.
112. Julienne M, Alonso M, Gomez Amoz J, Benoit J. Preparation of poly (D, L-lactide/glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: application of experimental designs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1992;18(10):1063-77.

113. Yoo HS, Oh JE, Lee KH, Park TG. Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharmaceutical Research*. 1999;16:1114-8.
114. Corduneanu-Luca AM, Pasca SA, Tamas C, Moraru DC, Ciuntu B, Stanescu C, et al. Improving flexor tendon gliding by using the combination of carboxymethylcellulose-polyethylene oxide on murine model. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022;23(1):1-7.
115. Vonwiller SC, Heber GK. Cross-linked polysaccharide composition patent US 8,877,243 B2. November 4, 2014.
116. Bhattacharya S. Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy. *Response Surface Methodology in Engineering Science: IntechOpen*; 2021.
117. Bourne M. Food texture and viscosity: concept and measurement: Elsevier; 2002.
118. Ahnfelt E, Sjögren E, Hansson P, Lennernäs H. In vitro release mechanisms of doxorubicin from a clinical bead drug-delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(11):3387-98.
119. Ozturk N, Kara A, Gulyuz S, Ozkose UU, Tasdelen MA, Bozkir A, et al. Exploiting ionisable nature of PEO-co-PEI to prepare pH sensitive, doxorubicin-loaded micelles. *Journal of Microencapsulation*. 2020;37(7):467-80.
120. Kim J, Choi Y, Yang S, Lee J, Choi J, Moon Y, et al. Sustained and long-term release of doxorubicin from PLGA nanoparticles for eliciting anti-tumor immune responses. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):474.
121. Koç B, Kaymak-Ertekin F. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *Gıda*. 2010;35(1):1-8.
122. Jaiswal S, Dutta SB, Nayak D, Gupta S. Effect of doxorubicin on the near-infrared optical properties of indocyanine green. *ACS Omega*. 2021;6(50):34842-9.

123. Kalaria D, Sharma G, Beniwal V, Ravi Kumar M. Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. *Pharmaceutical Research*. 2009;26:492-501.
124. Yang Y, Li J, Chen F, Qiao S, Li Y, Pan W. Synthesis, formulation, and characterization of doxorubicin-loaded laponite/oligomeric hyaluronic acid-aminophenylboronic acid nanohybrids and cytological evaluation against MCF-7 breast cancer cells. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21:1-10.
125. Pieper S, Langer K. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles-a systematic evaluation of preparation techniques and parameters*. *Materials Today: Proceedings*. 2017;4:S188-S92.
126. Ebrahimian M, Taghavi S, Mokhtarzadeh A, Ramezani M, Hashemi M. Co-delivery of doxorubicin encapsulated PLGA nanoparticles and Bcl-xL shRNA using alkyl-modified PEI into breast cancer cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017;183:126-36.
127. Jaimes-Aguirre L, Morales-Avila E, Ocampo-García BE, Medina LA, López-Téllez G, Gibbens-Bandala BV, Izquierdo-Sánchez V. Biodegradable poly (D, L-lactide-co-glycolide)/poly (L- γ -glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;76:743-51.
128. Liu M, Zheng Y, Li J, Chen S, Liu Y, Li J, et al. Effects of molecular weight of PVA on formation, stability and deformation of compound droplets for ICF polymer shells. *Nuclear Fusion*. 2016;57(1):016018.
129. Murakami H, Kawashima Y, Niwa T, Hino T, Takeuchi H, Kobayashi M. Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly (vinylalcohol) on the preparation and properties of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997;149(1):43-9.
130. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D, et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;572:118733.

131. Tewes F, Munnier E, Antoon B, Okassa LN, Cohen-Jonathan S, Marchais H, et al. Comparative study of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66(3):488-92.
132. Heslinga MJ, Mastria EM, Eniola-Adefeso O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. 2009;138(3):235-42.
133. Subedi RK, Kang KW, Choi H-K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;37(3-4):508-13.
134. Wu B, Lu S-T, Zhang L-J, Zhuo R-X, Xu H-B, Huang S-W. Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for in vitro and in vivo synergistic cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;1853-62.
135. Chai F, Sun L, He X, Li J, Liu Y, Xiong F, et al. Doxorubicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;1791-802.
136. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):265-73.
137. Gou M, Zheng L, Peng X, Men K, Zheng X, Zeng S, et al. Poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone)(PCL-PEG-PCL) nanoparticles for honokiol delivery in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;375(1-2):170-6.
138. Zhang L, Chen Z, Wang H, Wu S, Zhao K, Sun H, et al. Preparation and evaluation of PCL-PEG-PCL polymeric nanoparticles for doxorubicin delivery against breast cancer. *RSC Advances*. 2016;6(60):54727-37.
139. Manjili HK, Sharafi A, Danafar H, Hosseini M, Ramazani A, Ghasemi MH. Poly (caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (caprolactone)(PCL-PEG-PCL) nanoparticles:

a valuable and efficient system for in vitro and in vivo delivery of curcumin. *RSC Advances*. 2016;6(17):14403-15.

140. Hurler J, Engesland A, Poorahmary Kermany B, Škalko-Basnet N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: Gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;125(1):180-8.

141. Carvalho FC, Calixto G, Hatakeyama IN, Luz GM, Gremião MPD, Chorilli M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;39(11):1750-7.

142. Laha B, Goswami R, Maiti S, Sen KK. Smart karaya-locust bean gum hydrogel particles for the treatment of hypertension: optimization by factorial design and pre-clinical evaluation. *Carbohydrate Polymers*. 2019;210:274-88.

143. Caccavo D, Cascone S, Lamberti G, Barba AA. Controlled drug release from hydrogel-based matrices: Experiments and modeling. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;486(1-2):144-52.

144. Özgüney I, Kardhiqi A. Properties of bioadhesive ketoprofen liquid suppositories: Preparation, determination of gelation temperature, viscosity studies and evaluation of mechanical properties using texture analyzer by 4× 4 factorial design. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2014;19(8):968-75.

145. Jumelle C, Yung A, Sani ES, Taketani Y, Gantin F, Bourel L, et al. Development and characterization of a hydrogel-based adhesive patch for sealing open-globe injuries. *Acta Biomaterialia*. 2022;137:53-63.

146. Hu H, Xu F-J. Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing. *Biomaterials Science*. 2020;8(8):2084-101.

147. Verma J, Kanoujia J, Parashar P, Tripathi CB, Saraf SA. Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel. *Drug Delivery and Translational Research*. 2017;7:77-88.

148. Algin Yapar E, Inal Ö, Tuncay Tanriverdi S, Karavana SY. Transdermal delivery of meloxicam proniosomes from hydrogels. *Latin American Journal of Pharmacy* 2014; 33.3: 476-82.
149. Cascone S, Lamberti G. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;573:118803.
150. Liang Y, He J, Guo B. Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing. *ACS Nano*. 2021;15(8):12687-722.
151. Inal O. Comparison of sodium alginate versus hydroxypropyl methylcellulose as adhesive polymers on poloxamer based meloxicam gel. *Adv J Pharm Life Sci Res*. 2014;2(4):9-16.
152. Amasya G, Inal O, Sengel-Turk CT. SLN enriched hydrogels for dermal application: Full factorial design study to estimate the relationship between composition and mechanical properties. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2020;228:104889.
153. Ghobril C, Grinstaff M. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(7):1820-35.
154. Pinkas O, Goder D, Noyvirt R, Peleg S, Kahlon M, Zilberman M. Structuring of composite hydrogel bioadhesives and its effect on properties and bonding mechanism. *Acta Biomaterialia*. 2017;51:125-37.
155. Yang Z, Huang R, Zheng B, Guo W, Li C, He W, et al. Highly stretchable, adhesive, biocompatible, and antibacterial hydrogel dressings for wound healing. *Advanced Science*. 2021;8(8):2003627.
156. Chanaj-Kaczmarek J, Paczkowska M, Osmalek T, Kaproń B, Plech T, Szymanowska D, et al. Hydrogel delivery system containing Calendulae flos lyophilized extract with chitosan as a supporting strategy for wound healing applications. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):634.

157. Egorikhina MN, Kobyakova II, Charykova IN, Linkova DD, Rubtsova YP, Farafontova EA, Aleynik DY. Application of hydrogel wound dressings in cell therapy-approaches to assessment in vitro. *Int J Burn Trauma*. 2023;13(2):13-32.
158. Stojkov G, Niyazov Z, Picchioni F, Bose RK. Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. *Gels*. 2021;7(4):255.
159. Shefa AA, Sultana T, Park MK, Lee SY, Gwon J-G, Lee B-T. Curcumin incorporation into an oxidized cellulose nanofiber-polyvinyl alcohol hydrogel system promotes wound healing. *Materials & Design*. 2020;186:108313.
160. Nike DU, Katas H, Mohd NF, Hiraoka Y, Tabata Y, Idrus RBH, Fauzi MB. Characterisation of rapid in situ forming gelipin hydrogel for future use in irregular deep cutaneous wound healing. *Polymers*. 2021;13(18):3152.
161. Ternullo S, Schulte Werning LV, Holsæter AM, Škalko-Basnet N. Curcumin-in-deformable liposomes-in-chitosan-hydrogel as a novel wound dressing. *Pharmaceutics*. 2019;12(1):8.
162. Zhao G, Kapur N, Carlin B, Selinger E, Guthrie J. Characterisation of the interactive properties of microcrystalline cellulose–carboxymethyl cellulose hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;415(1-2):95-101.
163. Nadernezhad A, Forster L, Netti F, Adler-Abramovich L, Teßmar J, Groll J. Rheological analysis of the interplay between the molecular weight and concentration of hyaluronic acid in formulations of supramolecular HA/FmocFF hybrid hydrogels. *Polymer Journal*. 2020;52(8):1007-12.
164. Zhang C, He Y, Zheng Y, Ai C, Cao H, Xiao J, et al. Effect of carboxymethyl cellulose (CMC) on some physico-chemical and mechanical properties of unrinsed surimi gels. *LWT*. 2023;180:114653.
165. Chen YH, Li J, Hao YB, Qi JX, Dong NG, Wu CL, Wang Q. Preparation and characterization of composite hydrogels based on crosslinked hyaluronic acid and sodium alginate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(19).

166. Kwon SS, Kong BJ, Park SN. Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose–hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;92:146-54.
167. Dong S, Feng S, Liu F, Li R, Li W, Liu F, et al. Factors influencing the adhesive behavior of carboxymethyl cellulose-based hydrogel for food applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;179:398-406.
168. Park SH, Shin HS, Park SN. A novel pH-responsive hydrogel based on carboxymethyl cellulose/2-hydroxyethyl acrylate for transdermal delivery of naringenin. *Carbohydrate Polymers*. 2018;200:341-52.
169. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(11):1556-68.
170. Chen J, Yang J, Wang L, Zhang X, Heng BC, Wang D-A, Ge Z. Modified hyaluronic acid hydrogels with chemical groups that facilitate adhesion to host tissues enhance cartilage regeneration. *Bioactive Materials*. 2021;6(6):1689-98.
171. El Kechai N, Bochot A, Huang N, Nguyen Y, Ferrary E, Agnely F. Effect of liposomes on rheological and syringeability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;487(1-2):187-96.
172. Barar J, Omid Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy. *BioImpacts: BI*. 2013;3(4):149.
173. Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Molecular Pharmaceutics*. 2011;8(6):2032-8.
174. Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;5(5):1275-9.

175. Gou M, Zheng X, Men K, Zhang J, Zheng L, Wang X, et al. Poly (ϵ -caprolactone)/poly (ethylene glycol)/poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles: preparation, characterization, and application in doxorubicin delivery. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113(39):12928-33.
176. Yamada Y. Dimerization of doxorubicin causes its precipitation. *ACS Omega*. 2020;5(51):33235-41.
177. Diao Y-Y, Li H-Y, Fu Y-H, Han M, Hu Y-L, Jiang H-L, et al. Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2011:1955-62.
178. Shuai X, Ai H, Nasongkla N, Kim S, Gao J. Micellar carriers based on block copolymers of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004;98(3):415-26.
179. Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, et al. Doxorubicin-loaded poly (ethylene glycol)-poly (β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *Journal of Controlled Release*. 2000;64(1-3):143-53.
180. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sánchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2015;18(1):53-60.
181. Lawrence WT, Norton JA, Harvey AK, Gorschboth CM, Talbot TL, Grotendorst GR. Doxorubicin-induced impairment of wound healing in rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 1986;76(1):119-26.

EKLER

EK 1: 5 RPM VİZKOZİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	9.609E+05	7	1.373E+05	900.77	< 0.0001*
A-CMC	2.896E+05	1	2.896E+05	1900.19	< 0.0001
B-HA	1.524E+05	1	1.524E+05	999.78	< 0.0001
AB	9409.00	1	9409.00	61.74	0.0005
A ²	28974.53	1	28974.53	190.14	< 0.0001
B ²	2863.18	1	2863.18	18.79	0.0075
A ² B	122.89	1	122.89	0.8064	0.4103
AB ²	262.02	1	262.02	1.72	0.2468
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	761.93	5	152.39		
Uyumsuzluk	325.13	1	325.13	2.98	0.1595**
Saf Hata	436.80	4	109.20		
Düzeltilmiş Toplam	9.616E+05	12			

*: anlamlı, **: anlamlı değil.

EK 2: 5 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı Tahmini	Serbestlik Derecesi	Standart Hata	%95 GA Alt limit	%95 GA Üst limit	VBF
Sabit	596.80	1	5.52	582.61	610.99	
A-CMC	269.05	1	6.17	253.19	284.92	2.00
B-HA	195.16	1	6.17	179.30	211.03	2.00
AB	48.50	1	6.17	32.63	64.37	1.0000
A ²	64.54	1	4.68	52.51	76.57	1.02
B ²	20.29	1	4.68	8.26	32.32	1.02
A ² B	7.84	1	8.73	-14.60	30.28	2.00
AB ²	11.45	1	8.73	-10.99	33.88	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 3: 5 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart Sapma	Ortalama	% VK	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmin Edilen R ²	Yeterli Kesinlik
12.34	649.00	1.90	0.9992	0.9981	0.9777	99.8578

EK 4: 10 RPM VİZKOZİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	3.751E+05	7	53588.59	1026.90	< 0.0001*
A-CMC	97240.50	1	97240.50	1863.38	< 0.0001
B-HA	69564.50	1	69564.50	1333.04	< 0.0001
AB	2352.25	1	2352.25	45.08	0.0011
A ²	14536.58	1	14536.58	278.56	< 0.0001
B ²	1505.79	1	1505.79	28.85	0.0030
A ² B	0.0315	1	0.0315	0.0006	0.9814
AB ²	672.19	1	672.19	12.88	0.0157
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	260.93	5	52.19		
Uyumsuzluk	36.13	1	36.13	0.6428	0.4676**
Saf Hata	224.80	4	56.20		
Düzeltilmiş Toplam	3.754E+05	12			

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 5: 10 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı	Serbestlik	Standart	%95 GA	%95 GA	VBF
	Tahmini	Derecesi	Hata	Alt limit	Üst limit	
Sabit	390.20	1	3.23	381.90	398.50	
A-CMC	155.92	1	3.61	146.63	165.20	2.00
B-HA	131.88	1	3.61	122.59	141.16	2.00
AB	24.25	1	3.61	14.97	33.53	1.0000
A ²	45.71	1	2.74	38.67	52.75	1.02
B ²	14.71	1	2.74	7.67	21.75	1.02
A ² B	-0.1254	1	5.11	-13.26	13.01	2.00
AB ²	18.33	1	5.11	5.20	31.46	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 6: 10 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart	Ortalama	%	R²	Düzeltilmiş	Tahmin	Yeterli
Sapma		VK		R²	Edilen R²	Kesinlik
7.22	427.38	1.69	0.9993	0.9983	0.9929	107.9954

EK 7: 20 RPM VİZKOZİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	1.450E+05	7	20715.04	616.79	< 0.0001*
A-CMC	38642.00	1	38642.00	1150.57	< 0.0001
B-HA	29282.00	1	29282.00	871.88	< 0.0001
AB	702.25	1	702.25	20.91	0.0060
A ²	3936.31	1	3936.31	117.20	0.0001
B ²	666.40	1	666.40	19.84	0.0067
A ² B	0.1921	1	0.1921	0.0057	0.9426
AB ²	59.67	1	59.67	1.78	0.2401
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	167.93	5	33.59		
Uyumsuzluk	45.13	1	45.13	1.47	0.2921**
Saf Hata	122.80	4	30.70		
Düzeltilmiş Toplam	1.452E+05	12			

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 8: 20 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı Tahmini	Serbestlik Derecesi	Standart Hata	%95 GA Alt limit	%95 GA Üst limit	VBF
Sabit	252.80	1	2.59	246.14	259.46	
A-CMC	98.29	1	2.90	90.84	105.74	2.00
B-HA	85.56	1	2.90	78.11	93.01	2.00
AB	13.25	1	2.90	5.80	20.70	1.0000
A ²	23.79	1	2.20	18.14	29.44	1.02
B ²	9.79	1	2.20	4.14	15.44	1.02
A ² B	-0.3099	1	4.10	-10.84	10.22	2.00
AB ²	5.46	1	4.10	-5.07	16.00	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 9: 20 RPM VİZKOZİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart Sapma	Ortalama	% VK	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmin Edilen R ²	Yeterli Kesinlik
5.80	273.46	2.12	0.9988	0.9972	0.9788	83.1469

EK 10: SERTLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	0.2343	7	0.0335	14.66	0.0046*
A-CMC	0.0705	1	0.0705	30.89	0.0026
B-HA	0.0188	1	0.0188	8.22	0.0351
AB	0.0099	1	0.0099	4.35	0.0914
A ²	0.0248	1	0.0248	10.86	0.0216
B ²	0.0475	1	0.0475	20.78	0.0061
A ² B	0.0015	1	0.0015	0.6369	0.4610
AB ²	0.0001	1	0.0001	0.0376	0.8539
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	0.0114	5	0.0023		
Uyumsuzluk	0.0045	1	0.0045	2.61	0.1812**
Saf Hata	0.0069	4	0.0017		
Düzeltilmiş	0.2457	12			
Toplam					

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 11: SERTLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı	Serbestlik	Standart	%95 GA	%95 GA	VBF
	Tahmini	Derecesi	Hata	Alt limit	Üst limit	
Sabit	0.5254	1	0.0214	0.4705	0.5804	
A-CMC	0.1328	1	0.0239	0.0714	0.1942	2.00
B-HA	0.0685	1	0.0239	0.0071	0.1299	2.00
AB	-0.0498	1	0.0239	-0.1112	0.0116	1.0000
A ²	-0.0597	1	0.0181	-0.1063	-0.0131	1.02
B ²	-0.0826	1	0.0181	-0.1292	-0.0360	1.02
A ² B	-0.0270	1	0.0338	-0.1138	0.0599	2.00
AB ²	-0.0066	1	0.0338	-0.0934	0.0803	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 12: SERTLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart	Ortalama	% VK	R²	Düzeltilmiş	Tahmin	Yeterli
Sapma				R²	Edilen R²	Kesinlik
0.0478	0.4379	10.91	0.9535	0.8885	-0.2195	11.4257

EK 13: SIKIŞTIRILABİLİRLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	0.7643	7	0.1092	36.01	0.0006*
A-CMC	0.3177	1	0.3177	104.78	0.0002
B-HA	0.0561	1	0.0561	18.50	0.0077
AB	0.0121	1	0.0121	4.00	0.1020
A ²	0.0037	1	0.0037	1.21	0.3208
B ²	0.0239	1	0.0239	7.89	0.0376
A ² B	0.0001	1	0.0001	0.0222	0.8875
AB ²	0.0001	1	0.0001	0.0327	0.8637
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	0.0152	5	0.0030		
Uyumsuzluk	0.0093	1	0.0093	6.35	0.0654**
Saf Hata	0.0059	4	0.0015		
Düzeltilmiş	0.7795	12			
Toplam					

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 14: SIKIŞTIRILABİLİRLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı Tahmini	Serbestlik Derecesi	Standart Hata	%95 GA Alt limit	%95 GA Üst limit	VBF
Sabit	1.25	1	0.0246	1.19	1.31	
A-CMC	0.2818	1	0.0275	0.2111	0.3526	2.00
B-HA	0.1184	1	0.0275	0.0476	0.1892	2.00
AB	-0.0550	1	0.0275	-0.1258	0.0157	1.0000
A ²	-0.0230	1	0.0209	-0.0767	0.0307	1.02
B ²	-0.0587	1	0.0209	-0.1123	-0.0050	1.02
A ² B	-0.0058	1	0.0389	-0.1059	0.0943	2.00
AB ²	-0.0070	1	0.0389	-0.1071	0.0931	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 15: SIKIŞTIRILABİLİRLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart Sapma	Ortalama	% VK	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmin Edilen R ²	Yeterli Kesinlik
0.0551	1.20	4.59	0.9805	0.9533	0.2247	20.2950

EK 16: ADHEZİFLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	0.5262	7	0.0752	30.88	0.0008*
A-CMC	0.0414	1	0.0414	17.00	0.0091
B-HA	0.2038	1	0.2038	83.69	0.0003
AB	0.0011	1	0.0011	0.4566	0.5292
A ²	0.0115	1	0.0115	4.72	0.0819
B ²	0.0119	1	0.0119	4.89	0.0780
A ² B	0.0002	1	0.0002	0.0943	0.7712
AB ²	0.0001	1	0.0001	0.0432	0.8436
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	0.0122	5	0.0024		
Uyumsuzluk	0.0015	1	0.0015	0.5639	0.4945**
Saf Hata	0.0107	4	0.0027		
Düzeltilmiş	0.5384	12			
Toplam					

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 17: ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı	Serbestlik	Standart	%95 GA	%95 GA	VBF
	Tahmini	Derecesi	Hata	Alt limit	Üst limit	
Sabit	0.5573	1	0.0221	0.5006	0.6141	
A-CMC	0.1017	1	0.0247	0.0383	0.1651	2.00
B-HA	0.2257	1	0.0247	0.1623	0.2891	2.00
AB	-0.0167	1	0.0247	-0.0801	0.0467	1.0000
A ²	-0.0406	1	0.0187	-0.0887	0.0075	1.02
B ²	-0.0414	1	0.0187	-0.0894	0.0067	1.02
A ² B	0.0107	1	0.0349	-0.0790	0.1004	2.00
AB ²	-0.0072	1	0.0349	-0.0969	0.0824	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 18: ADHEZİFLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart	Ortalama	%	R²	Düzeltilmiş R²	Tahmin	Yeterli
Sapma		VK			Edilen R²	Kesinlik
0.0493	0.5069	9.73	0.9774	0.9457	0.7903	17.2069

EK 19: KOHEZİFLİK İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	0.0595	7	0.0085	20.96	0.0020*
A-CMC	0.0042	1	0.0042	10.35	0.0235
B-HA	0.0007	1	0.0007	1.65	0.2558
AB	0.0147	1	0.0147	36.14	0.0018
A ²	0.0137	1	0.0137	33.71	0.0021
B ²	0.0111	1	0.0111	27.29	0.0034
A ² B	0.0041	1	0.0041	9.98	0.0251
AB ²	0.0014	1	0.0014	3.52	0.1195
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	0.0020	5	0.0004		
Uyumsuzluk	0.0012	1	0.0012	6.20	0.0674**
Saf Hata	0.0008	4	0.0002		
Düzeltilmiş	0.0616	12			
Toplam					

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 20: KOHEZİFLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı	Serbestlik	Standart	%95 GA	%95 GA	VBF
	Tahmini	Derecesi	Hata	Alt limit	Üst limit	
Sabit	0.9100	1	0.0090	0.8868	0.9331	
A-CMC	-0.0324	1	0.0101	-0.0583	-0.0065	2.00
B-HA	0.0129	1	0.0101	-0.0130	0.0388	2.00
AB	0.0605	1	0.0101	0.0347	0.0864	1.0000
A ²	0.0443	1	0.0076	0.0247	0.0640	1.02
B ²	0.0399	1	0.0076	0.0203	0.0595	1.02
A ² B	-0.0450	1	0.0142	-0.0816	-0.0084	2.00
AB ²	-0.0267	1	0.0142	-0.0633	0.0099	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 21: KOHEZİFLİK İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart	Ortalama	%	R²	Düzeltilmiş R²	Tahmin	Yeterli
Sapma		VK			Edilen R²	Kesinlik
0.0201	0.9618	2.09	0.9670	0.9209	-0.3023	15.1454

EK 22: ELASTİSİTE İÇİN KÜBİK MODELDE ANOVA ANALİZİ

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F-değeri	p-değeri
Model	0.0000	7	2.493E-06	10.31	0.0103*
A-CMC	1.542E-06	1	1.542E-06	6.38	0.0528
B-HA	5.110E-06	1	5.110E-06	21.15	0.0058
AB	5.906E-07	1	5.906E-07	2.44	0.1788
A ²	4.637E-07	1	4.637E-07	1.92	0.2246
B ²	1.607E-06	1	1.607E-06	6.65	0.0495
A ² B	8.387E-07	1	8.387E-07	3.47	0.1215
AB ²	9.700E-07	1	9.700E-07	4.01	0.1015
A ³	0.0000	0			
B ³	0.0000	0			
Kalıntı	1.208E-06	5	2.417E-07		
Uyumsuzluk	1.201E-08	1	1.201E-08	0.0402	0.8509**
Saf Hata	1.196E-06	4	2.991E-07		
Düzeltilmiş Toplam	0.0000	12			

***: anlamlı, **: anlamlı değil.**

EK 23: ELASTİSİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE KODLANMIŞ FAKTÖR KATSAYILARI

Faktör	Katsayı Tahmini	Serbestlik Derecesi	Standart Hata	%95 GA Alt limit	%95 GA Üst limit	VBF
Sabit	0.9984	1	0.0002	0.9978	0.9990	
A-CMC	-0.0006	1	0.0002	-0.0013	0.0000	2.00
B-HA	-0.0011	1	0.0002	-0.0018	-0.0005	2.00
AB	0.0004	1	0.0002	-0.0002	0.0010	1.0000
A ²	0.0003	1	0.0002	-0.0002	0.0007	1.02
B ²	-0.0005	1	0.0002	-0.0010	-1.439E-06	1.02
A ² B	0.0006	1	0.0003	-0.0002	0.0015	2.00
AB ²	-0.0007	1	0.0003	-0.0016	0.0002	2.00
A ³	-					
B ³	-					

EK 24: ELASTİSİTE İÇİN ANOVA ANALİZİNDE UYUM İSTATİSTİKLERİ

Standart Sapma	Ortalama	% VK	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmin Edilen R ²	Yeterli Kesinlik
0.0005	0.9983	0.0492	0.9352	0.8446	0.8586	11.7243

EK 25: ETİK KURUL KARARI



4KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI (KOBAY DHL A.S. LOCAL ETHICS COMMITTEE APPLICATION APPROVAL)		
BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	Protokol Numarası (Protocol number)	664
	Protokol Adı (Protocol Name)	Meme Kanseri Yönelik Doğrudan Uygulamayla Hedeflenen Nanopartiküler Kargo Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi Development of Targeted Nanoparticulate Cargo Carrier Systems with Direct Application to Breast Cancer
	Başvuru Tarihi (Application date)	17.03.2023
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı (Principal Investigator Name-Title)	Prof. Dr. Asuman BOZKIR
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum (Principal Investigator Institution)	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farnasotik Teknoloji Bölümü Ankara University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology
	Yardımcı Araştırmacılar (Associate Researchers)	Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI Uzm. Biol. Sibel GÖKŞEN Dr. Öğr. Üyesi Umut Can ÖZ Arş. Gör. Süheyl Furkan KONCA
KARAR BİLGİLERİ (DECISION INFORMATION)	Onay Numarası (Confirmation number)	664
	Onay Tarihi (Approval date)	11.04.2023
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı (Approved Animal Type and Number)	48 adet dişi Balb-c fare 48 pcs, female, Balb-c mice
	Onay Bilgileri (Confirmation Information)	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir. The project was examined in terms of purpose, justification, approach and method, and it was decided that there was no ethical objection to the realization of the study.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı (Ethics Committee Chairman) A. Begüm BUGDAYCI AÇIKKOL	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı (Ethics Committee Vice President) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	-
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ	e- imzalı/ e-signed
	Sorumlu Veteriner Hekim (Responsible Veterinarian) Orkun TARKUN	-

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI (KOBAY DHL A.S. LOCAL ETHICS COMMITTEE APPLICATION APPROVAL)		
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ (KOBAY DHL, Inc. LOCAL ETHICS COMMITTEE MEMBERS)	Etik Kurul Üyesi Biyolog (Ethics Committee Member Biologist) Fatma Nur İNCEH	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi Veteriner (Ethics Committee Member Veterinarian) Murat Okan HATİPOĞLU	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Zeynep AYDIN TARAĞCI	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Adil KIŞ	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Uzman/Expert Doç. Dr. YÖYEN ERMİŞ	e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Ali VAROL	e- imzalı/ e-signed

Etikimza Belge No : wnkj333nmvc1774c4960 Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Süheyl Furkan KONCA

Eğitim Durumu

Lise: İzmir Atatürk Lisesi 2005-2009

Lisans: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2009-2014

Yayınlar ve Bildiriler

SCI, SSCI VE AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

Çelik İ, Çevik UA, Karayel A, Işık A, Kayış U, Gül ÜD, Konca SF, et al. Synthesis, molecular docking, dynamics, quantum-chemical computation, and antimicrobial activity studies of some new benzimidazole-thiadiazole hybrids. ACS Omega. 2022;7(50):47015-30.

DİĞER DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

Tekiner H, Konca SF. Eczacı ressamı: Spitzweg, White ve Recouvreur. Lokman Hekim Dergisi. 2017;7:21-27.

Tekiner H, Konca SF. Eczacı ressamı: Spitzweg, White ve Recouvreur. Lokman Hekim J. 2017;7(1):20-27.

HAKEMLİ KONGRE / SEMPOZYUM BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

Konca SF, Öz UC, Bozkır A. Design and optimization of hydrogel as a drug delivery system. In: Materials Science and Nanotechnology for Next Generation; 2023 Sep 27-29; Kayseri, Turkey.

Konca SF, Taşdemir D, Aydoğdu G, Yılmaz E, Bozkır A, Öçsoy İ. Synthesis of anthocyanin-rich red cabbage nanoflowers and their antimicrobial and cytotoxic properties.

In: Proceedings of the 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy; 2017 Nov 8-11.

Konca SF, Onbaşlı D, Yuvalı Çelik G, Öçsoy İ. Green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extracts and its major components, caffeine and catechin, guided formation of Ag NPs and their enhanced antimicrobial activities. In: Proceedings of the 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress; 2017 Oct 25-27; Adana, Turkey.

Konca SF, Onbaşlı D, Yuvalı Çelik G, Öçsoy İ. Synthesis of hybrid Ag/Au NPs using green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) plant leaf extract with their antimicrobial activities. In: Proceedings of the International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017); 2017 Sep 25-27.

Konca SF, Öz UC, Bozkır A. Development of HPLC method for thymoquinone quantification and pre-eliminary investigation on nanoparticle production. In: Proceedings of the 22nd International Biomedical Science and Technology Symposium; 2017 May 12-14.

Özbahar Ö, Yuvalı Çelik G, Onbaşlı D, Öçsoy İ, Konca SF. *Pisolithus arrhizus* extract used in the synthesis of titanium nanoparticles and their antimicrobial effect. In: Proceedings of the 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies; 2017 Apr 26-29.

Tekiner H, Konca SF. The Ottoman Physician Nidai's Work 'Vasiyyetname' (The Will) (1566) on medical ethics revisited. In: Proceedings of the 2nd International Congress of Interdisciplinary History of Health; 2016 Jul 12-15; Coimbra, Portugal.

Konca SF, Tekiner H. Pharmacists as painters: Spitzweg, White and Recouvreur. In: Proceedings of the XII. Turkish Pharmacy History Meeting (TETT); 2016 Jun 1-3; Eskişehir, Turkey.

Tekiner H, Konca SF. A study on Turkish medical manuscripts registered at the Rasit Efendi Manuscript Library in Kayseri, Turkey. In: Proceedings of the XII. Turkish Pharmacy History Congress; 2016 Jun 1-3; Eskişehir, Turkey.

İş Tecrübesi

Kurumu: 2015- Araştırma Görevlisi; Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD



TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Konca, S. F., Öz, U. C. & Bozkır, A. (2023). Lokalize Meme Kanseri Tedavilerinde Efektif İlaç Taşıyıcı Sistemler: Enjektebl Hidrojeller. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 48 (1), 3-3. DOI: 10.33483/jfpau.1348607

Konca SF, Öz UC, Bozkır A. Design and optimization of hydrogel as a drug delivery system. In: Materials Science and Nanotechnology for Next Generation; 2023 Sep 27-29; Kayseri, Turkey.





MSNG-2023

OP-77

10th International Conference on Materials Science and Nanotechnology For Next Generation (MSNG-2023)
27-29 September 2023 / TÜRKİYE

Design and Optimization of Hydrogel as a Drug Delivery System

S. Furkan KONCA^{1,2}, Umut Can ÖZ³, Asuman BOZKIR^{3*}

Design of Experiment (DOE) is a critical tool used in the design and optimization of drug delivery systems. DOE offers a wide array of significant advantages by providing a comprehensive toolkit encompassing experimental design, data analysis, modeling, and simulation. Creating comprehensive experimental plans for optimizing the active components and production conditions of drug delivery systems is more efficient than costly trial-and-error methods in terms of time and resources. DOE also provides the ability to simultaneously statistically analyze experimental results, enabling a better understanding of data, assessing potential effects, and interpreting results reliably. Through graphical visualization capabilities, enables better data visualization and easier trend observation. Additionally, it offers specialized tools for multi-response optimization, allowing for the simultaneous optimization of multiple response variables. This study aimed to design and optimize a hydrogel formulation incorporating hyaluronic acid for local application with the intention of facilitating rapid wound healing and drug release. The results revealed that formulation parameters significantly impacted the viscosity, hardness, adhesiveness, cohesiveness and elasticity of the formulations. The developed design model demonstrated a high correlation between predicted responses and evaluated parameters.



☆ LOKALİZE MEME KANSERİ TEDAVİLERİNDE EFEKTİF İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: ENJEKTABL HİDROJELLER

Yıl 2024, Cilt: 48 Sayı: 1, 3 - 3

Süheyl Furkan KONCA * Umut Can ÖZ Asuman BOZKIR

<https://doi.org/10.33483/jfpau.1348607>

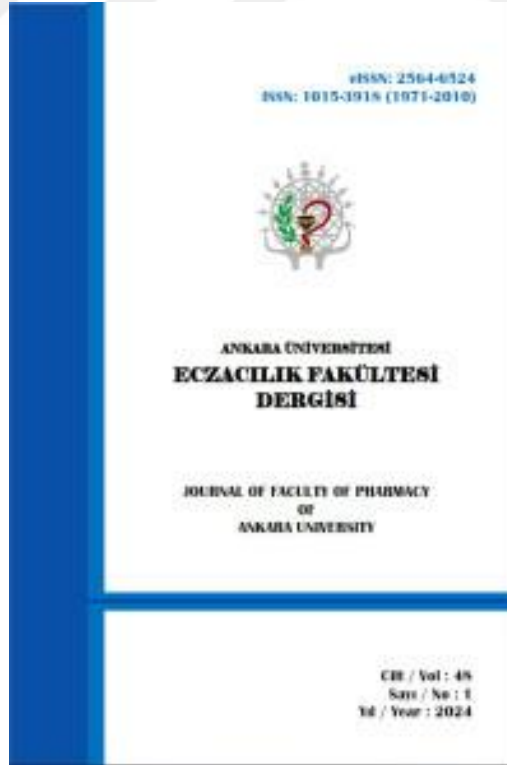
Öz

Amaç: Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık gözlenen kanser türü olup, erken teşhis ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için sürekli araştırmaların yapılmasını gerektiren kritik bir sağlık sorunudur. Geleneksel kemoterapi uygulamalarındaki spesifik olmayan hedefleme, sistemik toksisite, ilaç direnci, kısıtlı ilaç penetrasyonu gibi sınırlamaların aşılmasında yenilikçi tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler olarak enjektabl hidrojeller biyoparçalanır, biyouyumlu, tasarıma yönelik ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra etkin maddenin yüksek verimlilikle yüklenmesini ve salımını sağlayabilmesi dolayısıyla lokal kanser tedavilerinde ön plana çıkmaktadır. Enjektabl biyoparçalanır hidrojeller özellikle cerrahi sonrası tedavi sürecinde tümör nüksünü ve metastazını önlemede kritik öneme sahiptir. Bu derlemede enjektabl hidrojellerin yapıları, türleri, kanser tedavilerine ilişkin uygulamaları ve antikanser tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Bu derlemede farmasötik ilaç taşıyıcı sistemler olarak enjektabl hidrojel yapıları, meme kanseri tedavilerine ilişkin uygulamaları ve meme kanserine yönelik antikanser tedavi etkinlikleri ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler

Enjektabl hidrojel, ilaç taşıyıcı sistem, lokal tedavi, meme kanseri





LOKALİZE MEME KANSERİ TEDAVİLERİNDE EFEKTİF İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: ENJEKTABL HİDROJELLER

EFFECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEMS IN LOCALIZED BREAST CANCER THERAPIES: INJECTABLE HYDROGELS

Süheyl Furkan KONCA^{1,2} , Umut Can ÖZ³ , Asuman BOZKIR^{3*} 

ÖZ

Amaç: Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık gözlenen kanser türü olup, erken teşhis ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için sürekli araştırmaların yapılmasını gerektiren kritik bir sağlık sorunudur. Geleneksel kemoterapi uygulamalarındaki spesifik olmayan hedefleme, sistemik toksisite, ilaç direnci, kısıtlı ilaç penetrasyonu gibi sınırlamaların aşılmasında yenilikçi tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler olarak enjektabl hidrojeller biyoparçalanır, biyouyumlu, tasarıma yönelik ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra etkin maddenin yüksek verimlilikle yüklenmesini ve salınımını sağlayabilmesi dolayısıyla lokal kanser tedavilerinde ön plana çıkmaktadır. Enjektabl biyoparçalanır hidrojeller özellikle cerrahi sonrası tedavi sürecinde tümör nüksünü ve metastazını önlemede kritik öneme sahiptir. Bu derlemede enjektabl hidrojellerin yapıları, türleri, kanser tedavilerine ilişkin uygulamaları ve antikanser tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Bu derlemede farmasötik ilaç taşıyıcı sistemler olarak enjektabl hidrojel yapıları, meme kanseri tedavilerine ilişkin uygulamaları ve meme kanserine yönelik antikanser tedavi etkinlikleri ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enjektabl hidrojel, ilaç taşıyıcı sistem, lokal tedavi, meme kanseri

ABSTRACT

Objective: Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and is a critical health problem that requires continuous research for early detection and development of effective treatment strategies. There is a need to develop innovative treatment modalities to overcome the limitations of conventional chemotherapy such as non-specific targeting, systemic toxicity, drug resistance and limited drug penetration. As drug delivery systems, injectable hydrogels have come to the forefront in local cancer treatments due to their biodegradable, biocompatible, design-adjustable physicochemical properties as well as their ability to provide highly efficient loading and release of the active substance. Injectable biodegradable hydrogels are critical in preventing cancer recurrence and metastasis, especially in the post surgical treatment process. In this review, we aimed to evaluate the structures, types, cancer treatment applications and anticancer therapeutic efficacy of injectable hydrogels.

Result and Discussion: In this review, the structures of injectable hydrogels as pharmaceutical drug delivery systems, their applications in breast cancer treatments and their anticancer

therapeutic efficacy for breast cancer were discussed.

Keywords: Breast cancer, drug delivery system, injectable hydrogel, local therapy

GİRİŞ

Kanser günümüzde en yüksek mortalite oranına sahip hastalıkların başında gelen dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Meme kanseri, kanser türleri arasında global onkoloji alanında karşılaşılan en yaygın malignitelerden biri olup kadınlar arasında kanser ilişkili mortalite oranlarını gösteren belirleyici bir faktördür. Demografik parametreler olarak kan grubu ve yaş aralığı, hamilelik ve menopoz gibi üreme ile alakalı faktörler, endokrin ve genetik belirteçler, yaşam tarzıyla ilişkili unsurlar ve advers çevresel faktörler bu patojenezde önemli risk unsurları olarak değerlendirilmektedir [1].

Meme kanseri tedavisinde kullanılan yöntemler arasında adjuvan ve neoadjuvan kemoterapi gibi konvansiyonel stratejilerin yanı sıra cerrahi müdahaleler, radyoterapi, hormon duyarlılığı olan kanser türlerinde hedefleyici uygulamalar ve moleküler tedavi yaklaşımları yer almaktadır [2]. Meme kanserine yönelik tedavilerde, erken teşhisin sağlanması ve yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi kanserin yol açtığı sağlık yükünü önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahiptir [3]. Hastalığın özgül yapısı ve çeşitliliği nedeniyle, hastaların kanser karakteristikleri ve kanser evreleri göz önünde bulundurularak mevcut tedavi yaklaşımları kişiye özgü olarak optimize edilmelidir. Geleneksel yöntemler olarak radikal mastektomi ve modifiye radikal mastektomi gibi cerrahi yaklaşımlar, lokal tedaviler için esas teşkil ederken günümüzde meme koruyucu cerrahi prosedürler ve buna eşlik eden radyoterapi de daha yaygın bir tercih haline gelmiştir. Bu tedavi yaklaşımlarına göre lokal olarak ileri evre ve cerrahi müdahaleye uygun meme kanseri vakalarında neoadjuvan kemoterapi kritik bir rol oynamaktadır [4]. Cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi meme kanseri tedavilerinde kullanılan başlıca yöntemlerdir [5]. Özellikle cerrahi rezeksiyon uygulamaları, kanser vakalarında hastalığın tekrarlanmasını önlemek amacıyla geleneksel kemoterapi tedavileriyle desteklenebilmektedir [6]. Fakat geleneksel neoadjuvan kemoterapi uygulamalarında, antikanser ajanlardan kaynaklanan şiddetli yan etkiler tedavi etkinliğini düşüren önemli bir kısıtlayıcı faktördür [7]. Kansere yönelik uygulamalarda, karşılaşılan mevcut sorunların aşılması, daha verimli ve etkili bir tedavinin sağlanması için bu amaç doğrultusunda yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve uygulanması önem arz etmektedir.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, düşük toksisiteye sahip olmaları, güvenli ve etkili kontrollü salım sağlayabilmeleri, aktif veya pasif hedeflemeye olanak tanımaları, ilaç direncine karşı tedavi etkinliğini arttırabilmeleri dolayısıyla kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [8]. Birçok avantajına rağmen, nanopartikül temelli antikanser tedavilerdeki sistemik uygulamalar da sınırlı tedavi etkinliğine sahip olabilmektedir. Bu sınırlılıklar, ilaç taşıyıcı sistemlerde karşılaşılabilen ilk çıkış etkisi ve spesifik olmayan etkileşimlerin yanı sıra tümör heterojenitesi ve doku bariyerleri kaynaklı kısıtlamalardan kaynaklanabilmektedir [9]. Özellikle lokal kanser tedavileri için düşünüldüğünde, kemoterapötik ajanların küçük boyutlarından dolayı hedef bölgeden hızlı bir şekilde eliminasyona uğramaları, uzatılmış lokal etkiyi sağlamada sınırlı kapasiteye sahip olmaları dezavantaj oluşturabilmektedir [10]. Bu aşamada hidrojel temelli ilaç taşıyıcı sistemler, etkili bir lokal tedavinin gerçekleştirilmesinde ön plana çıkmaktadır. Üç boyutlu ağ yapıları, yüksek su tutma kapasiteleri, gözenekli ve geçirgen yapıları, biyouyumlu ve biyoparçalanır özellikleriyle farmasötik uygulamalarda umut vadetmektedirler [11]. Hidrojeller, etkin maddenin sistemik dağılımdan kaynaklı oluşabilecek ciddi yan etkileri önlemesi, hedef bölgede kalma süresini uzatması, tümör dokusunda etkili bir dağılımını sağlaması dolayısıyla terapötik verimliliği yükseltmesi bakımından önemli avantajlar sağlamaktadır [12]. Hidrojellerin bütün temel karakteristik avantajlarına sahip olan enjektabl hidrojeller, birçok farklı terapötik uygulamada kullanılabildiği gibi [13-16] özellikle kemoterapötik ajanların cerrahi ve implantasyon işlemleri olmaksızın, enjeksiyon yoluyla hedef bölgeye lokal olarak doğrudan uygulanmasını sağlayarak kontrollü salımı mümkün kılmaktadır [17,18]. Enjektabl hidrojeller, sağladığı avantajlar dolayısıyla lokal kanser tedavilerinde ve cerrahi sonrası tümör nükslerinin önüne geçilmesinde önemli ve işlevsel taşıyıcı sistemlerdir [19].

Bu derlemede farmasötik ilaç taşıyıcı sistemler olarak enjektabl hidrojellerin yapıları, meme kanseri tedavilerine ilişkin uygulamaları ve meme kanserine yönelik antikanser tedavi etkinliklerinin

değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Hidrojellerin Sınıflandırılması

Kanser tedavisine yönelik uygulamalar için yüksek terapötik etkinliğe ve verimliliğe sahip enjektabl hidrojel sistemlerinin eldesinde, biyoyumluluk, şişme oranı, geçirgenlik, mekanik dayanıklılık ve salım profili gibi karakteristik özellikler göz önünde bulundurulmalıdır. Biyoyumlu özellikteki hidrojel yapılarının, uygulama bölgesindeki parçalanma ve dağılımı sonrasında, herhangi bir akut veya kronik fizyolojik tepki ve toksisite oluşturmaması hedeflenmelidir [20]. Birçok farklı yöntem ve malzeme ile elde edilebilen hidrojeller, hammadde tipine, bileşen yapılarına, çapraz bağ türüne, elektrik yüküne, boyutlarına, şişme özelliklerine, mekanik özelliklerine, uyaran duyarlılıklarına göre sınıflandırılabilir [21,22]. Bu derlemede hidrojel türleri, Şekil 1’de belirtildiği üzere bileşenlerine ve uyaran duyarlılıklarına göre incelenmiştir.



Şekil 1. Hidrojellerin bileşen yapılarına ve uyaran duyarlılığına göre sınıflandırılması

Bileşenlerine Göre Hidrojel Türleri

Doğal Polisakkarit Polimer Hidrojeller

Doğal polisakkarit polimerler, bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan olmak üzere çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Ekstraselüler matriks ile benzer yapıda olmaları, yüksek biyoyumluluk özellikleri ve yüksek su tutma kapasitelerinin yanı sıra hedeflenen mekanik parametrelere göre modifiye edilebilme özelliklerine sahiptirler [23]. Doğal polisakkarit polimer hidrojeller, aljinat, dekstran, gellan, hyalüronik asit, kitozan, nişasta ve selüloz yapılarıyla elde edilebilmektedir [21-30]. Lokalize kanser tedavisinin amaçlandığı bir çalışmada, immünojenik hücre ölümünü indükleyen kemoterapötik ajan oksaliptatin ve doksorubisin (DOX) etkin madde olarak kullanılmış, immün adjuvan R837 ile "kokteyl" kemoimmünoterapötik bileşikler tasarlanarak aljinat ile formüle edilmiştir. Kokteyl terapötik solüsyon, lokal tümör enjeksiyonunu takiben endojen kalsiyum iyonlarının varlığında Aljinat-Ca²⁺ hidrojelleri oluşturarak, terapötik bileşenlerin tümör içinde tutulmasını ve kontrollü salınımını sağlamıştır. Çalışmada lokalize kemoimmünoterapinin primer tümörleri ortadan kaldırabildiği, çevre dokularda tümör oluşumunu inhibe edebildiği ve ayrıca CT26 kolon kanser tümör modelinde tümör nüksünü önleyebildiği gösterilmiştir [28]. Oksaliptatin konjuge G5 poliamidoamin ve oksitlenmiş dekstrandan oluşan nanopartikül-hidrojel yapıdaki nanokompozit enjektabl hidrojel formülasyonun, *in vivo* modellerde üç haftadan daha uzun süre hedef bölgede kalabildiği, 4T1 meme kanseri ortotopik primer tümörlerine karşı yüksek inhibisyon etkisi sağladığı,

lenf düğümlerine ve akciğerlere metastazı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [24]. Doğal hidrojel, birçok avantajına rağmen zayıf mekanik özelliklere sahip olması, düşük fiziksel ve kimyasal stabiliteye sahip olmaları dezavantaj oluşturmaktadır. Bu olumsuz özelliklerini geliştirmek amacıyla doğal polimerler modifiye edilerek veya sentetik polimerlerle beraber kullanılabilir [31]. Bu türden iyileştirmenin yapıldığı bir çalışmada PCL-PEG-PCL (PCEC) nanopartikülleri ile enkapsüle edilen paklitaksel (PTX), epirubisin-hyalüronik asit hidrojel karıştırılarak formülasyon (PPNPs/EPB-HA Jel) elde edilmiştir. Bu enjektabl hidrojel formülasyonunda, 4T1 meme kanseri modelinde sistemik toksisite olmaksızın her iki terapötik ajanın da kontrollü salımı sağlanmış ve sinerjistik etki sonucunda tümör nüksünün ve akciğer metastazının etkili bir şekilde önlediği bildirilmiştir [27].

Sentetik Polimer Hidrojeller

Sentetik polimerler, yüksek mekanik stabiliteye sahip modifiye edilebilir mikro yapıları, ayarlanabilir kimyasal bileşimleri ve biyoparçalanabilir özellikleriyle hidrojel formülasyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır [32,33]. Poli(etilen glikol) (PEG), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli(etilen oksit) (PEO), poli(laktik ko-glikolik asit) (PLGA), poli(vinil alkol) (PVA), poliakrilamid (PAM) ve poli(2-hidroksi metakrilat) (PHEMA) polimerleri hidrojel formülasyonlarında farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan polimerlerdir [34-39]. Lei ve arkadaşları PTX yüklü poli(etilen glikol)-poli(ϵ -kaprolakton)-poli(etilen glikol) (PECE) enjektabl hidrojel uygulanan 4T1 meme kanseri modelinde, primer tümör rezeksiyonunu takiben yara iyileşme süresinin kısaldığını, tümör proliferasyonunun inhibe olduğunu ve tümör nüksünün önlendiğini bildirmişlerdir [40]. Glioblastoma lokal tedavisinde, salinomisin yüklü poli(etilen oksit)/poli(propilen oksit)/poli(etilen oksit) (PEO-PPO-PEO) ve Pluronic F127 ile hazırlanan hidrojellerin etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, 7 gün süreli kontrollü salım elde edilmiş, glioblastoma hücrelerinde hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile birlikte apoptoz sağlanmış ve subkütan U251 zenograft nude farelerde tümör büyümesinin 4-6 kat azaldığı gösterilmiştir [41].

Protein Temelli Hidrojeller

Protein polipeptid temelli hidrojel, fonksiyonel üniteleri dolayısıyla yüzey modifikasyonlarına imkân sağlaması, dış uyarılara hızlı yanıt vermesi, biyoparçalanır yapıda olması, kolay sentezlenebilir olması, düşük immünojenisite ve toksisiteye sahip olması gibi özellikleriyle öne çıkmaktadır [42]. Protein temelli sentezlenen hidrojel, hücre ekstraselüler matrikse benzerlikleri dolayısıyla, sentetik polimerlere kıyasla daha yüksek biyoyoumlu özellikler gösterirler [43]. Farmasötik alanda, kollajen, elastin, fibrin, ipek fibroin ve jelatin protein temelli hidrojellerin eldesinde yaygın olarak kullanılan bileşenlerdir [44-48]. Yu ve arkadaşları, metoksi poli(etilen glikol)-b-poli(γ -etil-L-glutamat) diblok kopolimeriyle (mPEG-b-PELG) C26 kolon kanserine yönelik *in situ* termo jelleştirici hidrojel sentezlemişlerdir. Kombretastatin A4 disodyum fosfat (CA4P) ve sisplatin (CDDP) etkin maddelerinin kombine tedavisini sağlayan hidrojel formülasyonu, lokal uygulamada yüksek antitümör etkinlik göstermiştir [49]. Nie ve arkadaşları, DOX'un kontrollü salımı ve filamentler arasında güçlü π - π bağ etkileşiminin sürdürülmesi için heksapeptid hidrojelatör (FEF3K) kullanarak, DOX yüklü antiparalel β -tabaka yapıda enjektabl hidrojel elde etmişlerdir. Meme kanseri fare modelinde, cerrahi sonrası tümör nüksüne karşı yüksek terapötik etki ve hızlı yara iyileşme etkilerinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir [50]. Ayrıca protein temelli hidrojellerin kemoterapi, immünoterapi, fototermaal terapi uygulamalarında da etkinliğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [51-53].

DNA Hidrojeller

DNA hidrojel, üç boyutlu yapıya sahip dallanmış DNA zincirlerinin, sulu çözeltide çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda elde edilirler. DNA hidrojel, kolay modifiye edilebilen, biyoyoumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve ekonomik olarak üretilebilen yapılardır [54]. DNA hidrojel sentezinde çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. En sık kullanılan yöntemlerden biri olarak DNA dizilerinin kullanıldığı yöntemde, DNA'nın tamamlayıcı zincirleri ile bağlayıcı gruplar kullanılır. DNA primerleri, DNA'nın hibridizasyonunda tamamlayıcı zincirle etkileşime girerek üç boyutlu DNA ağ yapısı oluşturulur. Enzimatik ligasyon tekniğinde, enzimatik polimeraz amplifikasyon reaksiyonlarından faydalanılarak DNA zincirleri birleştirilir. DNA'nın sarmal yapı oluşturmada temelli yöntemde, birleşik dairesel amplifikasyon ve çoklu primer zincir amplifikasyonunun uygulanmasıyla

uzun DNA zincirlerinin sentezlenmesini sağlar [55]. Tamamı DNA bazlı yapıtaşlarından oluşan hidrojelde, birçok avantaja rağmen uygulamada bazı dezavantajlar da bulunmaktadır. DNA'da fonksiyonel grup sayısının az olması, ileri kimyasal modifikasyonları oldukça zorlaştırır ve hidrojin fonksiyonel özelliklerinin ayarlanabilmesini kısıtlar. Bunun yanı sıra DNA'nın negatif yüklü olması ve stabilize sorunları da dezavantajlar arasındadır [55]. DNA ve RNA zinciri içeren hidrojel, kanser tedavilerinde ve gen terapilerinde efektif olarak kullanılabilir. Kanser metastaz faktörü kemokin reseptörü CXCR4'ün, tümör baskılayıcı ve inhibitör siRNA duplekslerinin sentetik polikasyonik reaktifler eklenmeden elde edilen RNA-üçlü sarmal hidrojel ile gen terapisinin yapıldığı bir çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* modellerde MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri modelinde miRNA ifadenmesi baskılanarak yüksek gen susturma etkinliği sağlanmıştır [56]. Zhang ve arkadaşları lokal kanser tedavisine yönelik cerrahi sonrası uygulama için geliştirdikleri kamptotesin yüklü nükleaz ve glutasyon duyarlı enjektör DNA hidrojel ile HCT 116 kolon kanserinde tümör nüksüne karşı yüksek terapötik etkinlik sağladıklarını bildirmişlerdir [57].

Hibrit Hidrojeller

Hibrit hidrojel, çeşitli polimerlerin, nanopartiküllerin, karbonhidratların, peptid ve proteinlerin farklı çapraz bağlama yöntemleri uygulanarak, tedavide hedeflenen karakteristiklere uygun olarak üretilen hidrojel [58]. Cimen ve arkadaşları lokal meme kanseri modeline yönelik olarak geliştirdikleri formülasyonda, hidrazid fonksiyonelleştirilmiş jelatin (Gel-ADH) ve aldehit fonksiyonelleştirilmiş PEG (diBA-PEG) polimerleri arasında hidrazon bağı oluşturarak, kendini onarabilen, enjektör, pH duyarlı özellikte elde ettikleri hidrojel ile DOX yüklü laponit (LAP) nanodisklerini entegre ederek Gel-ADH/diBA-PEG/LAP-DOX enjektör hidrojel sistemini üretmişlerdir. Bu hibrit hidrojel formülasyonunda, LAP-DOX elektrostatik etkileşimi sonucunda DOX etkin maddesinin 10 günlük sürede pH 5.0'de % 31.76, pH 7.4'te % 25.24 salım değerleri ile pH duyarlı uzatılmış salım profili elde ettiklerini, 30 günlük süre sonrasında hidrojin % 40 rezidüel ağırlık ile tümör pH ortamında yüksek jel stabilitesi ve uzun biyoparçalanma ömrü gösterdiğini bildirmişlerdir. [59]. Başka bir çalışmada, üçlü meme kanseri modeline yönelik lokal tedavide, kationik/nötral DOX yüklü lipid nanopartiküller, bakteriyel selüloz matriksi ile kombine edilerek (BC-NLCs-NH) hidrojel formülasyonu elde edilmiştir. Taşıyıcı sistemin tümör içi uygulamasında, kontrol DOX'a kıyasla ödem, nekroz, inflamasyon gibi yan etkiler gözlenmezken ve daha yüksek antikanser etkinlik gözlenmiştir [60].

Uyaran Duyarlılığına Göre Hidrojeller

Hidrojel sistemlerde, hidrojinlerin büzülmesi veya şişmesi sonucunda etkin madde difüzyon yoluyla polimer ağı üzerinden taşınarak yer değiştirir. Buradaki jel karakteristikleri kontrollü salım dinamiklerini belirler. Hidrojellerdeki şişme davranışı, mekanik dayanıklılık veya geçirgenlik gibi nitelikler, endojen veya eksojen uyaran maruziyeti ile değişebiliyorsa bu taşıyıcı sistemler, uyarıya yanıt veren hidrojel, akıllı hidrojel veya uyaran duyarlı hidrojel olarak adlandırılabilir. Bu sistemlerde, uyaran duyarlı polimerler yapıya katılarak hidrojel özelleştirilmektedir [43]. Uyarılar türüne göre temel olarak endojen ve eksojen uyaran olarak ayrılabilir. Enzimler, pH, ATP, hidrojen peroksit, redoks potansiyeli, hipoksi koşulları endojen uyaranlar arasında yer alırken, manyetik alan, sıcaklık, ultrason, ışık ve elektrik alan değişimleri eksojen uyaranlar arasında yer almaktadır [61-63]. Endojen uyarılara kıyasla eksojen uyarılarla elde edilen manipülasyonlar daha etkili olmaktadır [63]. Bu kısımda uyaran türüne göre hidrojel sınıflandırılarak yapısal özelliklerine ve kanser alanında kullanımlarına yer verilmiştir.

Sıcaklık Duyarlı Hidrojeller

Sıcaklık gradyanına göre şişme ve faz değişim özellikleri gösteren hidrojel, sıcaklık duyarlı hidrojel olarak adlandırılmaktadır. Sıcaklık uyarısına duyarlı polimer çözeltilerde, sıcaklık değişimi sol-jel faz geçişini sağlar. Polimer çözeltisinin tek fazdan ikili faza (sulu polimer zengin faz) geçtiği sıcaklık, kritik çözelti sıcaklığıdır [64]. Çoğu ısıya duyarlı polimerin, su içinde ilgili hidrojin hacim faz geçiş sıcaklığına benzer bir alt kritik çözelti sıcaklığı (LCST) vardır. Bu polimerler, LCST'nin altındaki sıcaklıklarda su ile karışabilir ancak sıcaklık LCST'nin üstüne çıktığında çözünürlüğün

düşmesiyle çözeltiden ayrılır ve jel yapının oluşumunu sağlar. Isıya duyarlı polimerlerin, üst kritik çözelti sıcaklığı (UCST) gösterdiği durumlarda ise ortamı UCST'den daha yüksek sıcaklığa ısıtmak, polimer zincirlerinin çözünmesini sağlar. Faz geçiş sıcaklığı vücut sıcaklığına yakın olan ısıya duyarlı polimerler, genellikle LCST tipi polimerlerdir [65]. Seçilen polimer yapısı ve konsantrasyon ile ayarlanabilen hidrofilik-hidrofobik denge, jelleşme sıcaklığını belirleyen önemli bir faktördür. Farmasötik uygulamalarda genellikle sol-jel geçiş sıcaklığı için fizyolojik sıcaklık olan 37°C hedeflenmektedir [65]. Sıcaklık duyarlı hidrojel tasarımı kitozan, selüloz türevleri gibi doğal polimerler kullanılabilirken, sentetik kaynaklı olarak da poli N-izopropilakrilamid (pNiPAm), poli (etilen oksit)-b-poli (propilen oksit)-b-poli (etilen oksit) (PEO-PPO-PEO; Poloksamer), PEG-b-PCL, PEG-b-PLGA ve PEG-b-PLA gibi polimerler kullanılabilir [66-73]. Lokal kanser uygulamalarında, *in situ* jel formülasyonlarında etkin maddenin çözelti formda çözünmüş olması, formülasyonun enjeksiyon sonrasında vücut sıcaklığındaki uygulama bölgesinde jel hale geçmesi, uzun süre stabilitesini koruyabilmesi ve enjektabl özelliğini koruması hedeflenmektedir [74]. Zhao ve arkadaşları, dissolüsyon yöntemiyle hazırladıkları PLGA-PEG-PLGA ısı duyarlı hidrojele, PTX nanokristalleri ve niklosamid nanokristallerini kombine şekilde yükleyerek, üçlü negatif meme kanserine karşı tümör içi uygulamada tek dozda antiproliferatif ve anti kanser etki elde etmişlerdir [70]. PDLA-PEG-PDLA polimerlerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada, stabilitenin artırılması için üçlü blok kopolimerin fonksiyonel grupları modifiye edilerek uzatılmış salım nitelikleri geliştirilmiştir. DOX yüklü DMXAA konjuge mPEG-PLGA miseller (DOX-mPPD), PDLA-PEG-PDLA polimerleriyle hazırlanan sıcaklık duyarlı hidrojel ile karıştırılmış, 40 günlük sürede % 60.27 DOX, % 44.55 DMXAA oranlarda etkin maddelerin kümülatif salımı elde edilmiş, hayvan modelinde tekli doz uygulamasıyla yüksek anti vasküler ve anti kanser etki elde edildiği bildirilmiştir [75]. Fan ve arkadaşları tümör rezeksiyonu sonrasında cerrahi sonrası uygulama için tasarladıkları Poloksamer 407, Poloksamer 188, Karbomer 974P bazlı ısı duyarlı hidrojel formülasyonunu, PTX nanokristalleri karıştırılarak (PTX-NCS-Gel) cerrahi kavitedeki yara bölgesine sürerek doğrudan uygulama sağlamışlardır. 4T1-Luc üçlü negatif meme kanseri modelinde, rezidüye uygulanan PTX-NCS-Gel formülasyonunun efektif şekilde tümör nüksünü ve akciğer metastazını önlediğini bildirmişlerdir [76].

pH Duyarlı Hidrojeller

Kanser hücresi ortamı ve mikro çevresi, hücrede sitoplazmanın artan alkalileşme göstermesi ve hücre dışı ortamın asitlenmesi ile karakterize edilmektedir. Alkali sitoplazmadaki pH artışı, hücrede glikolizi indükleyebilmekte ve hücrelerin hipoksiye adaptasyonunu sağlayarak kanser hücre proliferasyonunu artırmaktadır [77]. Kanser tedavisi uygulamalarında, etkin maddenin kanser hücreleri üzerinde etkinlik gösterirken aynı zamanda sağlıklı dokularda olumsuz yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır. Özellikle lokal kanser tedavilerinde, tümör mikro çevresindeki pH değişiminden faydalanılarak, etkin maddenin kanser hücrelerinin bulunduğu bölgede salımına olanak sağlayan pH duyarlı hidrojellerin kullanımı önem arz etmektedir [78]. pH duyarlı hidrojellerin üretiminde, zayıf asidik veya bazik fonksiyonel gruplara sahip polimerler tercih edilmektedir. Bu fonksiyonel gruplar, asidik pH koşullarda proton kabul ederken, bazik pH koşullarda protonları serbest bırakma eğilimindedir. Polielektrolitlerin oluşumu, elektrostatik etkileşimlere ve pKa değerlerine dayalı yük değişimlerinden kaynaklanır. Elektrolitler, hidrofobik/hidrofilik geçişler aracılığıyla hidrojinin çözünürlük özelliklerini değiştirir. Dolayısıyla hidrojelde şişme/büzülme davranışı değişir ve farklı pH değerlerinde farklı etkin madde salım profilleri elde edilmiş olur [79].

Lokal ilaç uygulamalarında, pH duyarlı hidrojellerin tasarımı için tümör dokularının asidozu temel alınarak iki ana yönteme başvurulmaktadır. İlk yaklaşımda, katyonik yapıdaki polibazlar olarak kabul edilen, hidrofobik omurgaya bağlı, çok sayıda zayıf baz (amin vb.) grubu içeren pH duyarlı polimerler seçilir. Katyonik bir polimerin pKa değeri, görece asidik bir ortamda bulunduğu, dolayısıyla ortamın pH'ından daha yüksek olduğunda, amin grupları protonlanarak pozitif bir yük (NH^3+) kazanır. Böylece bu yükler arasındaki elektrostatik itme ile polimer zincirinin genişlemesi ve hidrojinin şişmesi tetiklenir [80]. İkinci yaklaşımda, polimer matrisinde veya polimer ile etkin madde arasında, pH duyarlı bağlar oluşturmak için kararsız asit bağlarının eklenmesi gereklidir. Bu tür bağlar, enzimatik reaksiyonların etkisiyle ekstraselüler sıvıda, tümör hücresinin endozom veya lizozomlarında endositoz sonucunda parçalanır. Hidrazon gibi dinamik kovalent bağlar, fizyolojik pH seviyesinde (pH

7.4) hidrolize karşı stabil iken, hafif asidik bir pH ortamında hızla parçalanma eğilimi gösterirler [80]. Bu iki stratejide de bağların kırılması sonucunda enkapsüle veya konjuge etkin maddenin ortama salımı hedeflenir. Liu ve arkadaşları, lokal meme kanseri tedavisinde gemitabin ve PTX antikanser ajanlarının eş zamanlı salımını sağlayan, tasarım ve sentezini yaptıkları OE (VKVKVOVK-VDPPT-KVEVKVKV-NH2) peptidi ile pH duyarlı enjektabl hidrojel elde etmişlerdir. Formülasyonda, pH değişimine bağlı olarak nötral koşullardaki β -levha ikincil yapılarının protonasyonu ile salım kinetikleri de değişiklik göstermiştir. OE hidrojelinden hidrofobik karakterdeki PTX'in pH 5.8 ve pH 7.4 ortamında salımı sırasıyla 7 gün içinde % 96.90 ve % 38.98 iken, hidrofilik karakterdeki gemitabinin sırasıyla pH 5.8 ve pH 7.4 olan ortamlarda 3 gün içinde % 99.99 ve % 99.63 olarak salındığını bildirmişlerdir [81]. Sharma ve arkadaşları, glikosilik hidrazon bağları aracılığıyla 8-kol PEG glikosilik aldehit çapraz bağlanması sonucu elde ettikleri hidrojelde, kovalent olarak PEG-DOX konjugatını polimer matriksine enkapsüle etmişlerdir. Nötral pH'da yüksek hidrolitik stabilite gösteren hidrazon bağları dolayısıyla, hidrojinin şişme davranışı ve konjugatların matriksten ayrılma hızı düşük pH'ya kıyasla daha yavaş olmuştur. 40 günlük salım sonrasında DOX'un tümör koşullarında (pH 6.4) % 81.33, fizyolojik koşullarda (pH 7.4) % 42.87 kümülatif salımı sağlanmış, A549 akciğer kanseri hücrelerine karşı lokal uygulamada uzun süreli uzatılmış salım elde edilmiştir [82].

Işık Duyarlı Hidrojeller

Işık, uyarıcı yoğunluğu, dalga boyu, maruziyet süresi ve ışın çapı gibi parametreler ile kolaylıkla manipüle edilebilen, güvenli, hızlı etkili ve invazif olmayan bir dış uyarıcı olarak değerlendirilir [83]. Işığa duyarlı hidrojellerde, ışık duyarlı kimyasal grupların polimerik yapıya dahil edilmesiyle formülasyona ışıkla uyarılabilme özelliği kazandırılır. Bu taşıyıcı sistemler, optik bir uyarana yanıt olarak fiziksel veya kimyasal değişim gösterebilir. Işık uyarıcı, hidrojellerdeki ışık duyarlı grupların kırılmasına, izomerizasyonuna ve dimerizasyonuna neden olabilir. Böylece hidrojel yapıdaki kısmi veya tam çapraz bağların çözülmesine, bozunmasına, şişmesine veya büzülmesine yol açar. Işık duyarlı sistemlerde, fotoizomerizasyon, fotokimyasal reaksiyon ve fototermal reaksiyon olmak üzere üç temel yanıt mekanizması bulunmaktadır [84]. Fotoizomerizasyonda, hidrojel yapısında yer alan belirli motiflerin foto-indüklenmiş izomerizasyonu, hidrojele ait çapraz bağ yoğunluğu, yük durumu veya hidrofilik yapı özellikleri değiştirilir. Genellikle ışıkla uyarılan hidrojellerde, trans konformasyondan cis konformasyona geçiş gerçekleşir. Bu süreçte hidrojellerin gözenek boyutları büyür ve etkin maddelerin difüzyonla matriks dışına çıkışı sağlanır. Bu uygulama, hidrojel kimyasal bağlarını koparılmaksızın ve yan ürün oluşturmaksızın gerçekleştirilen, genellikle geri dönüşümlü ve tekrarlanabilir bir yöntemdir [85]. Foto kimyasal reaksiyonlarda, hidrojel yapıda meydana gelen bağ parçalanması, bağ oluşumu, bağ değişimi ile hidrojelde ağ yapıda ve konfigürasyonda değişiklikler sağlanır. Böylelikle etkin madde salımı tetiklenir. Tüm foto kimyasal reaksiyonlar arasında foto parçalanma, etkin maddenin kontrollü salımı için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde, foto parçalanabilir bağlayıcılar hidrojel yapısına dahil edilir ve ışıkla maruziyeti ile parçalanabilen yapılar oluşturulur [86]. Fototermal bir reaksiyonda, hedef yapıda bulunan ışığa duyarlı bileşenler, ışık enerjisini termal enerjiye çevirerek malzemenin sıcaklığını artırır. Jelin iç sıcaklığı, faz geçiş koşulunu sağladığında jel uyarana tepki gösterir ve jelin mekanik özelliklerinde modifikasyon sağlanmış olur [87]. Mi ve arkadaşları, üçlü negatif rezidüel meme kanserine yönelik lokal tedavide kullanılmak üzere fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezledikleri PEG dimetakrilat (PEG-DMA) ve serisin metakrilat (SER-MA) bazlı enjektabl hidrojele, DNA metilasyon inhibitörü desitabin (DEC) ve gambojik asitin PLGA enkapsülasyonu ile elde edilmiş nanopartiküller (GA-NP) yükleyerek, meme kanserinde tümör nüksünün önlenmesini, cerrahi operasyon sonrası yara iyileşmesinin ve doku yenilenmesinin artırılmasını amaçlamışlardır. PEG-DMA/SER-MA hidrojel yapısında, DEC'in yaklaşık olarak tamamının salımı 2 saatlik sürede gerçekleşirken, GA-NP sayesinde gambojik asitin 48 saatlik süre ile % 60 uzatılmış salımı sağlanmıştır. Çalışma ekibi, hidrojel formülasyonlarının 4T1 hücre modelinde ve ortopedik 4T1 BALB/c fare modelinde, tümör hücrelerinde piroptozla indüklenen immün cevabı artırarak yüksek terapötik etkinlikle akciğer metastazı ve lokal tümör nüksünün inhibasyonunun sağladığını bildirmişlerdir [88].

Redoks Duyarlı Hidrojeller

Redoks duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler, tümör mikro çevresi ile sağlıklı dokular arasındaki

redüksiyon potansiyeli farkını baz alarak tasarlanmış sistemlerdir. Hayvan hücrelerinde en bol miktarda bulunan redoks ikilisi Glutasyon (GSH)-Glutasyon disülfid (GSSG) çiftidir. GSH değerleri, sağlıklı hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde çok daha yüksek seviyededir [89]. Redoks duyarlı hidrojel, GSH'deki tiyol gruplarından elektron alabilen, GSH'yi indirgeyebilen reaktif grupların (disülfid vb.) yapıya eklenmesiyle elde edilirler. Temel olarak redoks duyarlı hidrojellerin eldesinde, disülfid bağlarının hidrojel oluşturarak polimer yapıya doğrudan bağlanması veya disülfid içeren çapraz bağlayıcılar aracılığıyla bağlanarak polimer yapıya dahil edilmesi yer almaktadır [90]. Disülfid bağları, GSH gibi bir indirgeyici ajan varlığında elektron verici olarak işlev görür ve GSSG'ye oksitlenir. Oksidasyon duyarlı hidrojellerde ise hidrojin bozunması ve etkin madde salımının sağlanabilmesi reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlıdır. Bu oksidatif türler, endojen olarak mitokondride veya eksojen olarak bir fotosensitizör aracılığı ile üretilmektedir [91]. β -siklodekstrin konjuge dekstran polimerinin (β CD-Dex) ve disülfid içeren bis-adamantan-tetraetilen glikol (bis-Ada-TEG-SS) çapraz bağlayıcısının sulu çözelti ortamında kendiliğinden birleşmesiyle hidrojin elde edildiği bir çalışmada, çapraz bağlayıcılar sayesinde hidrojele endojen indirgeyici ajan olan GSH ile etkileştiğinde parçalanabilme özelliği kazandırılmıştır. Buna ilaveten kovalent olmayan etkileşimlerle, DOX yüklü hidrojellerin, siklik peptid bazlı hedefleyici yapı olan adamantan konjuge cRGDfK (Ada-cRGD) ile tümör spesifik hedeflenmesi sağlanmıştır. Hidrojelden DOX salımının, 72 saat sonrasında ekstraselüler ortam pH 7.4'te % 20 iken, tümör mikro çevresi modellemesinin pH 5.4 ve GSH ile sağlandığı salım ortamında % 86 olduğu gösterilmiştir. Yüklü olmayan hidrojel, kontrol hücrelerde sitotoksikite göstermezken, DOX yüklü hidrojellerin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanserine karşı sitotoksik etkinlik sağladığı ve en yüksek etkinliğin RGD- β CD-DOX hidrojel formülasyonlarında olduğu bildirilmiştir [92].

Manyetik Duyarlı Hidrojeller

Manyetik duyarlı hidrojel, genellikle paramanyetik özellikli materyallerin hidrojel yapıyla birleştirilmesiyle elde edilmektedirler. Bu materyaller, manyetik alana maruz bırakıldıklarında titreşerek bulundukları bölgede lokal olarak sıcaklığı artırır ve termal ablasyon mekanizmaları aracılığıyla terapötik etkinliğin artırılmasını sağlarlar. Sıcaklık artışının ortamdaki etkin madde salımını tetiklediği ilaç taşıyıcı sistemlerde, kullanılan ajanın yanı sıra termal olarak da terapötik etki desteklenmiş olur [93]. Genellikle yapısında demir oksit (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) [94,95], geçiş metal ferritleri (CoFe_2O_4 , MnFe_2O_4 vb.) [96, 97] gibi çeşitli nanomateryallerin, manyetik duyarlı malzemeler olarak hidrojellerin yapısına katılmasıyla manyetik duyarlı hidrojel formülasyonları elde edilmektedir. Özellikle yapısında γ - Fe_2O_3 , Fe_3O_4 içeren nanopartiküller, yüksek biyouyumluluk ve manyetizasyon özellikleri dolayısıyla manyetik duyarlı hidrojellerde terapötik amaçlı olarak sıklıkla tercih edilmektedir [98]. Enjektabl ve kendi kendini tamir eden kompozit hidrojel formülasyonunun, oksitlenmiş pektin, kitozan ve nano γ - Fe_2O_3 ile elde edildiği bir çalışmada, 0.25 μm boyutlu nano γ - Fe_2O_3 yapıları, hidrojel yüzeyine yüklenerek ilaç taşıyıcı sisteme manyetik özellik kazandırılmıştır. Çalışmada 5-florourasilin (5-FU) 12 saat süreli kontrollü salım profili elde edilmiş, MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı yüksek sitotoksik etki sağlanmış ve γ - Fe_2O_3 yapılarının hedefleme dışında da formülasyonun antikanser özelliklerini de iyileştirdiği belirtilmiştir [99]. Gao ve arkadaşları, rezidüel meme kanserine yönelik ferro manyetik vorteks alt birim demir oksiti, kitozan bazlı dinamik hidrojele greft metoduyla birleştirerek enjektabl manyetik hidrojel elde etmişlerdir. Manyetik alanda, süpermanyetik demir oksitle fonksiyonelleştirilen hidrojelere kıyasla çok daha yüksek verimlilikte hipertermi koşullarını elde ettiklerini, manyetik hipertermi tedavisinde yardımcı ajan olarak DOX'un uzatılmış salımı sağladıklarını, hem kemoterapi hem de termal tedavinin aynı anda sağlanmasıyla tümör nüksünü önlemede *in vitro* ve *in vivo* olarak yüksek terapötik etkinlik elde ettiklerini bildirmişlerdir [100].

Ultrason Duyarlı Hidrojeller

Ultrason duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler, düşük maliyetli olması, derin dokulara penetre olabilmesi ve invazif olmaması dolayısıyla tercih edilebilmektedirler. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerde, yapıya eklenen stres duyarlı moleküller olan mekanoforlar aracılığıyla ultrason uyarımına karşı duyarlılık kazandırılmaktadır. Mekanofor moleküllere stres uygulanması sonucunda, moleküllerin özellikle bağ yapılarında ve fiziksel özelliklerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle, tasarlanan ilaç

taşıyıcı sisteme uygun mekanofor moleküllerin seçilmesi gerekmektedir [101]. Klinik olarak valide ve invazif olmayan bir yöntem olan yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU), polimerik materyallerde kavite etkisi olmaksızın mekanofor molekülleri aktive eder ve bu yapıların klinik kullanımlarına olanak sağlar [102]. Kim ve arkadaşları, mekanokimyasal dinamik terapi olarak isimlendirdikleri yöntemde, meme kanserine karşı HIFU ile tetiklendiğinde ortama reaktif oksijen türleri ve serbest radikal salımını sağlayan mekanoforları terapötik ajan olarak kullanmışlardır. Azo temelli mekanoforları, çapraz bağlanmış biyoyumlu PEG hidrojellerine kovalent olarak birleştirerek elde ettikleri formülasyonun etkinlik değerlendirmelerinde, 72 saat uygulama sonrası HIFU tetiklemesi yapılmayan, dolayısıyla azo mekanoforlarının aktifleşmediği kontrol hücrelerinde sitotoksik etki gözlenmezken, HIFU tetiklenmesi yapılan melanom hücrelerinin neredeyse tamamında sitotoksik etki elde ettiklerini bildirmişlerdir [103].

Çoklu Duyarlı Hidrojeller

Birden fazla uyarana duyarlı olan hidrojeller, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı çeşitli faktörlere yanıt oluşturabilmektedir. Çoklu yanıt veren malzemeler kullanılarak elde edilen hidrojel formülasyonları, sadece tek bir uyarana yanıt veren malzemelerle hazırlanan hidrojeller ile karşılaştırıldığında, terapötik etkinlik için hedeflenen bölgede daha gelişmiş bir kontrol sağlar ve tümör bölgesi lokal ilaç uygulamalarında potansiyel olarak daha etkili ve uyarlanabilir şartlar sunar [104]. Meme kanseri lokal tedavisi için tasarlanan pH ve NIR duyarlı PEI-AuNR/DOX/HCT/ALG formülasyonunda, poli(etilen imin) (PEI) modifiye altın nano çubuklar (PEI-AuNR), sodyum aljinat (ALG), DOX ve herseptini birleştiren hibrit *in situ* hidrojel yapısı oluşturulmuştur. Etkin madde salımı, fototermal ablasyon ve sinerjistik ilaç-antikor etkileşimi ile sağlanmıştır. Formülasyondaki pH duyarlılığı sayesinde, tümör mikro çevresinde düşen pH'la birlikte etkin madde salımının arttığı, altın nano çubuklar sayesinde de 808 nm lazer ışın (1.0 W/cm²) maruziyeti sonucunda % 70 verimlilikte fototermal çevirim ile yakın kızılötesi ışığının absorpsiyonuyla ısı açığa çıkartılarak etkin madde salımının tetiklendiği gösterilmiştir [105]. Zhu ve arkadaşları, pH ve redoks duyarlı IC1-R (CKIKIKIK-I³PPT-KIOIKIK-NH₂) peptid ile hazırladıkları enjektabl hidrojel ile PTX'in 7 gün süreli *in vitro* salımda; % 89.63 kümülatif salım ile en yüksek salım hızının pH 5.8 GSH içeren medyada elde edilirken, % 8.02 kümülatif salım ile en düşük salım hızının pH 7.4 GSH içermeyen medyada elde edildiğini göstermişlerdir. PTX yüklü hidrojel formülasyonunun, düşük pH ortam şartlarında ve indirgeyici varlığında etkin maddenin salım hızını önemli derecede arttırdığını, *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda da üçlü negatif meme kanserine karşı yüksek terapötik etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir [106].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu derlemede, enjektabl ilaç taşıyıcı sistemler yapılarına ve uyarıcı duyarlılık özelliklerine göre incelenmiş, lokal uygulamadaki ve özellikle meme kanserindeki terapötik etkinlikleri değerlendirilmiştir. Hidrojel uygulamalarında sıcaklıkla indüklenen çözelti-jel-çözelti dönüşümlerine, pH aracılı ilaç salım mekanizmalarına, ışıkla aktive edilen kombinasyon tedavilere, manyetik ve termal olarak duyarlı sistemler dahil olmak üzere çeşitli yanıt mekanizmalarına yer verilmiştir. Enjektabl hidrojel ilaç taşıyıcı sistemlerde, yapıyı oluşturan polimer veya bileşen türüne göre formülasyon davranışları modifiye edilebilmekte, jelin biyoparçalanır ve biyoyumluluk özellikleri de bu doğrultuda değişiklik göstermektedir. Hidrojel sistem tasarımında hedeflenen karakteristiklerin sağlanmasındaki çeşitli zorluklar, nanopartikül yapılarının ve yardımcı grupların hidrojel yapılarıyla birleştirilmesi ile aşılabilmekte ve çok fonksiyonlu tedavilere olanak sağlayabilmektedir. Kemoterapötik ajanların kullanıldığı enjektabl hidrojel ilaç taşıyıcı sistemlerin, etkin maddelerin hedef dokuda yüksek düzeyde ve verimli dağılımını sağlayabilmeleri, ilk çıkış etkisinin ve hızlı sistemik eliminasyonun önüne geçerek terapötik pencere içinde uzatılmış salımı mümkün kılmaları, uyarıcı duyarlılığına göre cevap oluşturabilmeleri özellikle lokal meme kanseri tedavilerinde yüksek avantaj sağlamaktadır. Lokal antikanser ajan uygulamalarında eş zamanlı olarak yardımcı uyarıcılarla sağlanan terapi desteği, tümör dokusunun kazanması ve yeniden tümör nüksünün önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Sonuç olarak enjektabl hidrojel bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, kontrollü ve uzun süreli etkin madde salımını,

etkinliği artırılmış hedefleyici tedaviyi mümkün kılarak geleneksel sistemik kemoterapiye kıyasla önemli iyileştirmeler sunmaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: S.F.K., U.C.Ö., A.B.; Tasarım: S.F.K., U.C.Ö., A.B.; Denetim: U.C.Ö., A.B.; Kaynaklar: S.F.K.; Malzemeler: S.F.K.; Veri Toplama ve/veya İşleme: S.F.K.; Analiz ve/veya Yorumlama: S.F.K.; Literatür Taraması: S.F.K.; Makalenin Yazılması: S.F.K.; Kritik İnceleme: U.C.Ö., A.B.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Momenimovahed, Z., Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11, 151-164. [\[CrossRef\]](#)
2. Shien, T., Iwata, H. (2020). Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 50(3), 225-229. [\[CrossRef\]](#)
3. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Pineros, M., Znaor, A., Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789. [\[CrossRef\]](#)
4. Fahad Ullah, M. (2019). Breast cancer: Current perspectives on the disease status. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*, Advances in Experimental Medicine, Springer, Cham, 1152, 51-64. [\[CrossRef\]](#)
5. Sulman, E.P., Ismaila, N., Armstrong, T.S., Tsien, C., Batchelor, T.T., Cloughesy, T., Galanis, E., Gilbert, M., Gondi, V., Lovely, M., Mehta, M., Mumber, M.P., Sloan, A., Chang, S.M. (2017). Radiation therapy for glioblastoma: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of the american society for radiation oncology guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 35(3), 361-369. [\[CrossRef\]](#)
6. Springfield, C., Jäger, D., Büchler, M.W., Strobel, O., Hackert, T., Palmer, D.H., Neoptolemos, J.P. (2019). Chemotherapy for pancreatic cancer. *La Presse Medicale*, 48(3), 159-174. [\[CrossRef\]](#)
7. Carr, C., Ng, J., Wigmore, T. (2008). The side effects of chemotherapeutic agents. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 19(2), 70-79. [\[CrossRef\]](#)
8. Zamboni, W.C. (2005). Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. *Clinical Cancer Research*, 11(23), 8230-8234. [\[CrossRef\]](#)
9. Sepantafar, M., Maheronnaghsh, R., Mohammadi, H., Radmanesh, F., Hasani-Sadrabadi, M.M., Ebrahimi, M., Baharvand, H. (2017). Engineered hydrogels in cancer therapy and diagnosis. *Trends in Biotechnology*, 35(11), 1074-1087. [\[CrossRef\]](#)
10. Nguyen, K., Dang, P.N., Alsberg, E. (2013). Functionalized, biodegradable hydrogels for control over sustained and localized siRNA delivery to incorporated and surrounding cells. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4487-4495. [\[CrossRef\]](#)
11. Wang, W., Narain, R., Zeng, H. (2020). Hydrogels. In *Polymer Science and Nanotechnology*, Elsevier, Canada, p.203-244. [\[CrossRef\]](#)
12. Wu, W., Chen, H., Shan, F., Zhou, J., Sun, X., Zhang, L., Gong, T. (2014). A novel doxorubicin-loaded *in situ* forming gel based high concentration of phospholipid for intratumoral drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 11(10), 3378-3385. [\[CrossRef\]](#)
13. Basaran, B., Bozkir, A. (2012). Thermosensitive and pH induced *in situ* ophthalmic gelling system for ciprofloxacin hydrochloride: Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(6), 1137-1147.
14. Oz, U.C., Toptas, M., Kucuk Turkmen, B., Devrim, B., Saka, O.M., Deveci, M.S., Bilgili, H., Unsal, E., Bozkir, A. (2020). Guided bone regeneration by the development of alendronate sodium loaded *in-situ* gel and membrane formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 155, 105561. [\[CrossRef\]](#)
15. Kucuk Turkmen, B., Oz, U.C., Bozkir, A. (2017). *In situ* hydrogel formulation for intra-articular application of diclofenac sodium-loaded polymeric nanoparticles. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 56-64. [\[CrossRef\]](#)
16. Ozbilgin, N.D., Saka, O.M., Bozkir, A. (2014). Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of mucosal

- adjuvant *in situ* forming gels with diphtheria toxoid. Drug Delivery, 21(2), 140-147. [\[CrossRef\]](#)
17. Nguyen, M.K., Lee, D.S. (2010). Injectable biodegradable hydrogels. Macromolecular Bioscience, 10(6), 563-579. [\[CrossRef\]](#)
 18. Xie, Z., Shen, J., Sun, H., Li, J., Wang, X. (2021). Polymer-based hydrogels with local drug release for cancer immunotherapy. Biomedicine & Pharmacotherapy, 137, 111333. [\[CrossRef\]](#)
 19. Liu, H., Shi, X., Wu, D., Kahsay Khshen, F., Deng, L., Dong, A., Wang, W., 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. [\[CrossRef\]](#)
 20. Cirillo, G., Spizzirri, U.G., Curcio, M., Nicoletta, F.P., Iemma, F. (2019). Injectable hydrogels for cancer therapy over the last decade. Pharmaceutics, 11(9), 486. [\[CrossRef\]](#)
 21. Ahmad, Z., Salman, S., Khan, S.A., Amin, A., Rahman, Z.U., Al-Ghamdi, Y.O., Akhtar, K., Bakhsh, E.M., Khan, S.B. (2022). Versatility of hydrogels: From synthetic strategies, classification, and properties to biomedical applications. Gels, 8(3), 167. [\[CrossRef\]](#)
 22. Catoira, M.C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., Boccafroschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 30(10), 115. [\[CrossRef\]](#)
 23. Radhakrishnan, J., Subramanian, A., Krishnan, U.M., Sethuraman, S. (2017). Injectable and 3D bioprinted polysaccharide hydrogels: From cartilage to osteochondral tissue engineering. Biomacromolecules, 18(1), 1-26. [\[CrossRef\]](#)
 24. Luo, F.Q., Xu, W., Zhang, J.Y., Liu, R., Huang, Y.C., Xiao, C., Du, J.Z. (2022). An injectable nanocomposite hydrogel improves tumor penetration and cancer treatment efficacy. Acta Biomaterialia, 147, 235-244. [\[CrossRef\]](#)
 25. Cacedo, M.L., Islan, G.A., Leon, I.E., Alvarez, V.A., Chourpa, I., Allard-Vannier, E., Garcia-Aranda, N., Diaz-Rascos, Z.V., Fernandez, Y., Schwartz, S., Jr., Abasolo, I., Castro, G.R. (2018). Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment. Colloids Surf B Biointerfaces, 170, 596-608. [\[CrossRef\]](#)
 26. Nieto, C., Vega, M.A., Rodriguez, V., Perez-Esteban, P., Martin Del Valle, E.M. (2022). Biodegradable gellan gum hydrogels loaded with paclitaxel for HER2+ breast cancer local therapy. Carbohydrate Polymers, 294, 119732. [\[CrossRef\]](#)
 27. Leng, Q., Li, Y., Zhou, P., Xiong, K., Lu, Y., Cui, Y., Wang, B., Wu, Z., Zhao, L., Fu, S. (2021). Injectable hydrogel loaded with paclitaxel and epirubicin to prevent postoperative recurrence and metastasis of breast cancer. Materials Science and Engineering: C, 129, 112390. [\[CrossRef\]](#)
 28. Chao, Y., Liang, C., Tao, H., Du, Y., Wu, D., Dong, Z., Jin, Q., Chen, G., Xu, J., Xiao, Z., Chen, Q., Wang, C., Chen, J., Liu, Z. (2020). Localized cocktail chemimmunotherapy after *in situ* gelation to trigger robust systemic antitumor immune responses. Science Advances, 6(10), eaaz4204. [\[CrossRef\]](#)
 29. Abdellatif, A.A.H., Mohammed, A.M., Saleem, I., Alsharidah, M., Al Rugaie, O., Ahmed, F., Osman, S.K. (2022). Smart injectable chitosan hydrogels loaded with 5-fluorouracil for the treatment of breast cancer. Pharmaceutics, 14(3), 661. [\[CrossRef\]](#)
 30. Davoodi-Monfared, P., Akbari-Birgani, S., Mohammadi, S., Kazemi, F., Nikfarjam, N., Nikbakht, M., Mousavi, S.A. (2021). Synthesis, characterization, and *in vitro* evaluation of the starch-based alpha-amylase responsive hydrogels. Journal of Cellular Physiology, 236(5), 4066-4075. [\[CrossRef\]](#)
 31. Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P., Hamidi, M., Valentine Okoro, O., Eskandani, M., Jaymand, M. (2022). Polysaccharide-based hydrogels: Properties, advantages, challenges, and optimization methods for applications in regenerative medicine. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 71(17), 1319-1333. [\[CrossRef\]](#)
 32. Madduma-Bandarage, U.S., Madhally, S.V. (2021). Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. Journal of Applied Polymer Science, 138(19), 50376. [\[CrossRef\]](#)
 33. Liu, F., Wang, X. (2020). Synthetic polymers for organ 3D printing. Polymers, 12(8), 1765. [\[CrossRef\]](#)
 34. Dong, X., Wei, C., Liang, J., Liu, T., Kong, D., Lv, F. (2017). Thermosensitive hydrogel loaded with chitosan-carbon nanotubes for near infrared light triggered drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 154, 253-262. [\[CrossRef\]](#)
 35. Chen, M., Tan, Y., Hu, J., Jiang, Y., Wang, Z., Liu, Z., Chen, Q. (2021). Injectable immunotherapeutic thermogel for enhanced immunotherapy post tumor radiofrequency ablation. Small, 17(52), 2104773. [\[CrossRef\]](#)
 36. Li, S., Zhou, D., Pei, M., Zhou, Y., Xu, W., Xiao, P. (2020). Fast gelling and non-swelling photopolymerized poly (vinyl alcohol) hydrogels with high strength. European Polymer Journal, 134, 109854. [\[CrossRef\]](#)

37. Ji, H., Song, X., Cheng, H., Luo, L., Huang, J., He, C., Yin, J., Zhao, W., Qiu, L., Zhao, C. (2020). Biocompatible *in situ* polymerization of multipurpose polyacrylamide-based hydrogels on skin via silver ion catalyzation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(28), 31079-31089. [\[CrossRef\]](#)
38. Cocarta, A.I., Hobzova, R., Trchova, M., Svojgr, K., Kodetova, M., Pochop, P., Uhlik, J., Sirc, J. (2021). 2-Hydroxyethyl methacrylate hydrogels for local drug delivery: Study of topotecan and vincristine sorption/desorption kinetics and polymer-drug interaction by ATR-FTIR spectroscopy. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 222(13), 2100086. [\[CrossRef\]](#)
39. Yu, J., Qiu, H., Yin, S., Wang, H., Li, Y. (2021). Polymeric drug delivery system based on pluronics for cancer treatment. *Molecules*, 26(12), 3610. [\[CrossRef\]](#)
40. Lei, N., Gong, C., Qian, Z., Luo, F., Wang, C., Wang, H., Wei, Y. (2012). Therapeutic application of injectable thermosensitive hydrogel in preventing local breast cancer recurrence and improving incision wound healing in a mouse model. *Nanoscale*, 4(18), 5686-5693. [\[CrossRef\]](#)
41. Norouzi, M., Firouzi, J., Sodeifi, N., Ebrahimi, M., Miller, D.W. (2021). Salinomycin-loaded injectable thermosensitive hydrogels for glioblastoma therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 598, 120316. [\[CrossRef\]](#)
42. Wang, Y., Zhang, W., Gong, C., Liu, B., Li, Y., Wang, L., Su, Z., Wei, G. (2020). Recent advances in the fabrication, functionalization, and bioapplications of peptide hydrogels. *Soft Matter*, 16(44), 10029-10045. [\[CrossRef\]](#)
43. Mathew, A.P., Uthaman, S., Cho, K.-H., Cho, C.-S., Park, I.K. (2018). Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 17-29. [\[CrossRef\]](#)
44. Li, Y., Liu, Y., Guo, Q. (2021). Silk fibroin hydrogel scaffolds incorporated with chitosan nanoparticles repair articular cartilage defects by regulating TGF- β 1 and BMP-2. *Arthritis Research & Therapy*, 23(1), 1-11. [\[CrossRef\]](#)
45. Zhao, N., Suzuki, A., Zhang, X., Shi, P., Abune, L., Coyne, J., Jia, H., Xiong, N., Zhang, G., Wang, Y. (2019). Dual aptamer-functionalized *in situ* injectable fibrin hydrogel for promotion of angiogenesis via codelivery of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor-BB. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(20), 18123-18132. [\[CrossRef\]](#)
46. Lu, Y., Zhao, M., Peng, Y., He, S., Zhu, X., Hu, C., Xia, G., Zuo, T., Zhang, X., Yun, Y. (2022). A physicochemical double-cross-linked gelatin hydrogel with enhanced antibacterial and anti-inflammatory capabilities for improving wound healing. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1-26. [\[CrossRef\]](#)
47. Lin, K., Zhang, D., Macedo, M.H., Cui, W., Sarmento, B., Shen, G. (2019). Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine. *Advanced Functional Materials*, 29(3), 1804943. [\[CrossRef\]](#)
48. Dufour, A., Mallein-Gerin, F., Perrier-Groult, E. (2021). Direct perfusion improves redifferentiation of human chondrocytes in fibrin hydrogel with the deposition of cartilage pericellular matrix. *Applied Sciences*, 11(19), 8923. [\[CrossRef\]](#)
49. Yu, S., Wei, S., Liu, L., Qi, D., Wang, J., Chen, G., He, W., He, C., Chen, X., Gu, Z. (2019). Enhanced local cancer therapy using a CA4P and CDDP co-loaded polypeptide gel depot. *Biomaterials Science*, 7(3), 860-866. [\[CrossRef\]](#)
50. Qi, Y., Min, H., Mujeeb, A., Zhang, Y., Han, X., Zhao, X., Anderson, G.J., Zhao, Y., Nie, G. (2018). Injectable hexapeptide hydrogel for localized chemotherapy prevents breast cancer recurrence. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(8), 6972-6981. [\[CrossRef\]](#)
51. Hou, X.L., Dai, X., Yang, J., Zhang, B., Zhao, D.H., Li, C.Q., Yin, Z.Y., Liu, B. (2020). Injectable polypeptide-engineered hydrogel depot for amplifying the anti-tumor immune effect induced by chemophotothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(37), 8623-8633. [\[CrossRef\]](#)
52. Franks, S.J., Firipis, K., Ferreira, R., Hannan, K.M., Williams, R.J., Hannan, R.D., Nisbet, D.R. (2020). Harnessing the self-assembly of peptides for the targeted delivery of anti-cancer agents. *Materials Horizons*, 7(8), 1996-2010. [\[CrossRef\]](#)
53. Leach, D.G., Dharmaraj, N., Lopez-Silva, T.L., Venzor, J.R., Pogostin, B.H., Sikora, A.G., Hartgerink, J.D., Young, S. (2021). Biomaterial-facilitated immunotherapy for established oral cancers. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(2), 415-421. [\[CrossRef\]](#)
54. Um, S.H., Lee, J.B., Park, N., Kwon, S.Y., Umbach, C.C., Luo, D. (2006). Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. *Nature Materials*, 5(10), 797-801. [\[CrossRef\]](#)
55. Gačanić, J., Synatschke, C.V., Weil, T. (2020). Biomedical applications of DNA-based hydrogels. *Advanced Functional Materials*, 30(4), 1906253. [\[CrossRef\]](#)
56. Ding, L., Li, J., Wu, C., Yan, F., Li, X., Zhang, S. (2020). A self-assembled RNA-triple helix hydrogel drug delivery system targeting triple-negative breast cancer. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(16), 3527-3533. [\[CrossRef\]](#)
57. Zhang, J., Guo, Y., Pan, G., Wang, P., Li, Y., Zhu, X., Zhang, C. (2020). Injectable drug-conjugated DNA

- hydrogel for local chemotherapy to prevent tumor recurrence. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(19), 21441-21449. [\[CrossRef\]](#)
58. Mohammadi, M., Karimi, M., Malaekhe-Nikouei, B., Torkashvand, M., Alibolandi, M. (2022). Hybrid *in situ*-forming injectable hydrogels for local cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 616, 121534. [\[CrossRef\]](#)
 59. Cimen, Z., Babadag, S., Odabas, S., Altuntas, S., Demirel, G., Demirel, G.B. (2021). Injectable and self-healable pH-responsive gelatin-PEG/laponite hybrid hydrogels as long-acting implants for local cancer treatment. *ACS Applied Polymer Materials*, 3(7), 3504-3518. [\[CrossRef\]](#)
 60. Cacicedo, M.L., Islan, G.A., León, I.E., Alvarez, V.A., Chourpa, I., Allard-Vannier, E., García-Aranda, N., Díaz-Riscos, Z., Fernández, Y., Schwartz Jr, S. (2018). Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 596-608. [\[CrossRef\]](#)
 61. Wang, C.Y., Sun, M., Fan, Z., Du, J.Z. (2022). Intestine enzyme-responsive polysaccharide-based hydrogel to open epithelial tight junctions for oral delivery of imatinib against colon cancer. *Chinese Journal of Polymer Science*, 40(10), 1154-1164. [\[CrossRef\]](#)
 62. Koetting, M.C., Peters, J.T., Steichen, S.D., Peppas, N.A. (2015). Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 93, 1-49. [\[CrossRef\]](#)
 63. Xu, J., Yin, Z., Zhang, L., Dong, Q., Cai, X., Li, S., Chen, Q., Keoingthong, P., Li, Z., Chen, L. (2022). Hydrogen-bonding-induced H-aggregation of charge-transfer complexes for ultra-efficient second near-infrared region photothermal conversion. *CCS Chemistry*, 4(7), 2333-2343. [\[CrossRef\]](#)
 64. Chakraborty, D.D., Nath, L., Chakraborty, P. (2018). Recent progress in smart polymers: Behavior, mechanistic understanding and application. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 57(10), 945-957. [\[CrossRef\]](#)
 65. Klouda, L. (2015). Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 338-349. [\[CrossRef\]](#)
 66. Zhang, L., Guan, X., Xiao, X., Chai, Y., Chen, Z., Zhou, G., Fan, Y. (2022). Near-infrared triggered injectable ferrimagnetic chitosan thermosensitive hydrogel for photo hyperthermia and precisely controlled drug release in tumor ablation. *European Polymer Journal*, 162, 110879. [\[CrossRef\]](#)
 67. Shokri, R., Fuentes-Chandia, M., Ai, J., Roudkenar, M.H., Mahboubian, A.R., Malekshahi, M.R., Ostad, S.N. (2022). A thermo-sensitive hydrogel composed of methylcellulose/hyaluronic acid/silk fibrin as a biomimetic extracellular matrix to simulate breast cancer malignancy. *European Polymer Journal*, 176, 111421. [\[CrossRef\]](#)
 68. Kotta, S., Aldawsari, H.M., Badr-Eldin, S.M., Nair, A.B., Kaleem, M., Dalhat, M.H. (2022). Thermosensitive hydrogels loaded with resveratrol nanoemulsion: Formulation optimization by central composite design and evaluation in MCF-7 human breast cancer cell lines. *Gels*, 8(7), 450. [\[CrossRef\]](#)
 69. Guo, J., Feng, Z., Liu, X., Wang, C., Huang, P., Zhang, J., Deng, L., Wang, W., Dong, A. (2020). An injectable thermosensitive hydrogel self-supported by nanoparticles of PEGylated amino-modified PCL for enhanced local tumor chemotherapy. *Soft Matter*, 16(24), 5750-5758. [\[CrossRef\]](#)
 70. Zhao, D., Hu, C., Fu, Q., Lv, H. (2021). Combined chemotherapy for triple negative breast cancer treatment by paclitaxel and niclosamide nanocrystals loaded thermosensitive hydrogel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 167, 105992. [\[CrossRef\]](#)
 71. Liu, Y., Ma, W., Zhou, P., Wen, Q., Wen, Q., Lu, Y., Zhao, L., Shi, H., Dai, J., Li, J. (2023). *In situ* administration of temperature-sensitive hydrogel composite loading paclitaxel microspheres and cisplatin for the treatment of melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160, 114380. [\[CrossRef\]](#)
 72. Liu, Y., Luo, Y.N., Zhang, P., Yang, W.F., Zhang, C.-Y., Yin, Y.L. (2022). The preparation of novel P (OEGMA-co-MEO2MA) microgels-based thermosensitive hydrogel and its application in three-dimensional cell scaffold. *Gels*, 8(5), 313. [\[CrossRef\]](#)
 73. Dalwadi, C., Patel, G. (2018). Thermosensitive nanohydrogel of 5-fluorouracil for head and neck cancer: Preparation, characterization and cytotoxicity assay. *International Journal of Nanomedicine*, 13(sup1), 31-33. [\[CrossRef\]](#)
 74. Darge, H.F., Andrgie, A.T., Tsai, H.C., Lai, J.Y. (2019). Polysaccharide and polypeptide based injectable thermo-sensitive hydrogels for local biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 545-563. [\[CrossRef\]](#)
 75. Darge, H.F., Hanurry, E.Y., Birhan, Y.S., Mekonnen, T.W., Andrgie, A.T., Chou, H.Y., Lai, J.Y., Tsai, H.C. (2021). Multifunctional drug-loaded micelles encapsulated in thermo-sensitive hydrogel for *in vivo* local cancer treatment: Synergistic effects of anti-vascular and immuno-chemotherapy. *Chemical Engineering Journal*, 406, 126879. [\[CrossRef\]](#)

76. Fan, R., Sun, W., Zhang, T., Wang, R., Tian, Y., Zhang, H., Li, J., Zheng, A., Song, S. (2022). Paclitaxel-nanocrystals-loaded network thermosensitive hydrogel for localised postsurgical recurrent of breast cancer after surgical resection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113017. [\[CrossRef\]](#)
77. Persi, E., Duran-Frigola, M., Damaghi, M., Roush, W.R., Aloy, P., Cleveland, J.L., Gillies, R.J., Rupp, E. (2018). Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nature Communications*, 9(1), 2997. [\[CrossRef\]](#)
78. Hendi, A., Umair Hassan, M., Elsherif, M., Alqattan, B., Park, S., Yetisen, A.K., Butt, H. (2020). Healthcare applications of pH-Sensitive hydrogel-based devices: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 3887-3901. [\[CrossRef\]](#)
79. Kocak, G., Tuncer, C., Bütün, V. (2017). pH-Responsive polymers. *Polymer Chemistry*, 8(1), 144-176. [\[CrossRef\]](#)
80. Rizwan, M., Yahya, R., Hassan, A., Yar, M., Azzahari, A.D., Selvanathan, V., Sonsudin, F., Abouloula, C.N. (2017). pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. *Polymers*, 9(4), 137. [\[CrossRef\]](#)
81. Liu, Y., Ran, Y., Ge, Y., Raza, F., Li, S., Zafar, H., Wu, Y., Paiva-Santos, A.C., Yu, C., Sun, M. (2022). pH-sensitive peptide hydrogels as a combination drug delivery system for cancer treatment. *Pharmaceutics*, 14(3), 652. [\[CrossRef\]](#)
82. Sharma, P.K., Singh, Y. (2019). Glyoxylic hydrazone linkage-based PEG hydrogels for covalent entrapment and controlled delivery of doxorubicin. *Biomacromolecules*, 20(6), 2174-2184. [\[CrossRef\]](#)
83. Li, L., Scheiger, J.M., Levkin, P.A. (2019). Design and applications of photoresponsive hydrogels. *Advanced Materials*, 31(26), 1807333. [\[CrossRef\]](#)
84. Bustamante-Torres, M., Romero-Fierro, D., Arcentales-Vera, B., Palomino, K., Magaña, H., Bucio, E. (2021). Hydrogels classification according to the physical or chemical interactions and as stimuli-sensitive materials. *Gels*, 7(4), 182. [\[CrossRef\]](#)
85. Ji, W., Wu, Q., Han, X., Zhang, W., Wei, W., Chen, L., Li, L., Huang, W. (2020). Photosensitive hydrogels: From structure, mechanisms, design to bioapplications. *Science China Life Sciences*, 63, 1813-1828. [\[CrossRef\]](#)
86. Peng, K., Zheng, L., Zhou, T., Zhang, C., Li, H. (2022). Light manipulation for fabrication of hydrogels and their biological applications. *Acta Biomaterialia*, 137, 20-43. [\[CrossRef\]](#)
87. Phan, L.M.T., Vo, T.A.T., Hoang, T.X., Cho, S. (2021). Graphene integrated hydrogels based biomaterials in photothermal biomedicine. *Nanomaterials*, 11(4), 906. [\[CrossRef\]](#)
88. Mi, D., Li, J., Wang, R., Li, Y., Zou, L., Sun, C., Yan, S., Yang, H., Zhao, M., Shi, S. (2023). Postsurgical wound management and prevention of triple-negative breast cancer recurrence with a pyroptosis-inducing, photopolymerizable hydrogel. *Journal of Controlled Release*, 356, 205-218. [\[CrossRef\]](#)
89. Kuppusamy, P., Li, H., Ilango, G., Cardounel, A.J., Zweier, J.L., Yamada, K., Krishna, M.C., Mitchell, J.B. (2002). Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Research*, 62(1), 307-312.
90. Quinn, J.F., Whittaker, M.R., Davis, T.P. (2017). Glutathione responsive polymers and their application in drug delivery systems. *Polymer Chemistry*, 8(1), 97-126. [\[CrossRef\]](#)
91. Ye, H., Zhou, Y., Liu, X., Chen, Y., Duan, S., Zhu, R., Liu, Y., Yin, L. (2019). Recent advances on reactive oxygen species-responsive delivery and diagnosis system. *Biomacromolecules*, 20(7), 2441-2463. [\[CrossRef\]](#)
92. Degirmenci, A., Ipek, H., Sanyal, R., Sanyal, A. (2022). Cyclodextrin-containing redox-responsive nanogels: Fabrication of a modular targeted drug delivery system. *European Polymer Journal*, 181, 111645. [\[CrossRef\]](#)
93. Kasiński, A., Zielińska-Pisklak, M., Oledzka, E., Sobczak, M. (2020). Smart hydrogels-synthetic stimuli-responsive antitumor drug release systems. *International Journal of Nanomedicine*, 4541-4572. [\[CrossRef\]](#)
94. Gerami, S.E., Pourmadadi, M., Fatoorehchi, H., Yazdian, F., Rashedi, H., Nigjeh, M.N. (2021). Preparation of pH-sensitive chitosan/polyvinylpyrrolidone/ α -Fe₂O₃ nanocomposite for drug delivery application: Emphasis on ameliorating restrictions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 409-420. [\[CrossRef\]](#)
95. Mahdi Eshaghi, M., Pourmadadi, M., Rahdar, A., Díez-Pascual, A.M. (2022). Novel carboxymethyl cellulose-based hydrogel with core-shell Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles for quercetin delivery. *Materials*, 15(24), 8711. [\[CrossRef\]](#)
96. Barani, M., Rahdar, A., Mukhtar, M., Razzaq, S., Qindeel, M., Olam, S.A.H., Paiva-Santos, A.C., Ajalli, N., Sargazi, S., Balakrishnan, D. (2022). Recent application of cobalt ferrite nanoparticles as a theranostic agent. *Materials Today Chemistry*, 26, 101131. [\[CrossRef\]](#)

97. Veloso, S.R., Magalhães, C.A., Rodrigues, A.R.O., Vilaça, H., Queiroz, M.J.R., Martins, J., Coutinho, P.J., Ferreira, P.M., Castanheira, E.M. (2019). Novel dehydropeptide-based magnetogels containing manganese ferrite nanoparticles as antitumor drug nanocarriers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(20), 10377-10390. [\[CrossRef\]](#)
98. Veloso, S.R., Ferreira, P.M., Martins, J.A., Coutinho, P.J., Castanheira, E.M. (2018). Magnetogels: Prospects and main challenges in biomedical applications. *Pharmaceutics*, 10(3), 145. [\[CrossRef\]](#)
99. Li, D.Q., Wang, S.Y., Meng, Y.J., Li, J.F., Li, J. (2020). An injectable, self-healing hydrogel system from oxidized pectin/chitosan/ γ -Fe₂O₃. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4566-4574. [\[CrossRef\]](#)
100. Gao, F., Xie, W., Miao, Y., Wang, D., Guo, Z., Ghosal, A., Li, Y., Wei, Y., Feng, S.S., Zhao, L. (2019). Magnetic hydrogel with optimally adaptive functions for breast cancer recurrence prevention. *Advanced Healthcare Materials*, 8(14), 1900203. [\[CrossRef\]](#)
101. Versaw, B.A., Zeng, T., Hu, X., Robb, M.J. (2021). Harnessing the power of force: Development of mechanophores for molecular release. *Journal of the American Chemical Society*, 143(51), 21461-21473. [\[CrossRef\]](#)
102. Kim, G., Lau, V.M., Halmes, A.J., Oelze, M.L., Moore, J.S., Li, K.C. (2019). High-intensity focused ultrasound-induced mechanochemical transduction in synthetic elastomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10214-10222. [\[CrossRef\]](#)
103. Kim, G., Wu, Q., Chu, J.L., Smith, E.J., Oelze, M.L., Moore, J.S., Li, K.C. (2022). Ultrasound controlled mechanophore activation in hydrogels for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(4), e2109791119. [\[CrossRef\]](#)
104. Jo, Y.J., Gulfam, M., Jo, S.H., Gal, Y.S., Oh, C.W., Park, S.H., Lim, K.T. (2022). Multi-stimuli responsive hydrogels derived from hyaluronic acid for cancer therapy application. *Carbohydrate Polymers*, 286, 119303. [\[CrossRef\]](#)
105. Zhao, L., Xu, J., Tong, Y., Gong, P., Gao, F., Li, H., Jiang, Y. (2022). Injectable "cocktail" hydrogel with dual-stimuli-responsive drug release, photothermal ablation, and drug-antibody synergistic effect. *SmartMat*, 1-11 (*Early view*). [\[CrossRef\]](#)
106. Zhu, Y., Wang, L., Li, Y., Huang, Z., Luo, S., He, Y., Han, H., Raza, F., Wu, J., Ge, L. (2020). Injectable pH and redox dual responsive hydrogels based on self-assembled peptides for anti-tumor drug delivery. *Biomaterials Science*, 8(19), 5415-5426. [\[CrossRef\]](#)