

**DEJENERATİF KIKIRDAK HASARLARINA YÖNELİK  
ENJEKTE EDİLEBİLİR HİDROJEL SİSTEMLERİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF INJECTABLE  
HYDROGELS FOR DEGENERATIVE CARTILAGE**

**EKİN ÇELİK**

**PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ  
TEZ DANIŞMANI**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

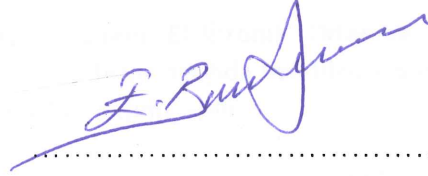
2018

**EKİN ÇELİK**' in hazırladığı "Dejeneratif kıkırdak hasarlarına yönelik enjekte edilebilir hidrojel sistemlerinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**' nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Cengiz Koçum  
Başkan



Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş  
Üye



Doç. Dr. Sedat Odabaş  
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Eda Çelik Akdur  
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Ceren Sucularlı  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA tezi olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin / raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “ Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... Ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

02. / 10. / 18...

( imza)

Ekin Çelik  
Öğrencinin Adı SOYADI

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. Şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir\*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7. 2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

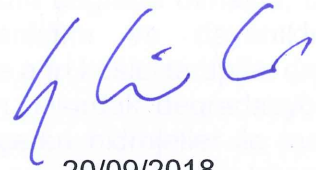
## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.



20/09/2018

EKİN ÇELİK

## ÖZET

# DEJENERATİF KIKIRDAK HASARLARINA YÖNELİK ENJEKTE EDİLEBİLİR HİDROJEL SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

**EKİN ÇELİK**

**Doktora, Biyomühendislik Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ**

**Eylül 2018, 137 Sayfa**

Kıkırdak dejenerasyonu, kıkırdağın önce yumuşamasıyla başlayan, daha sonra tamamen yok olmasıyla sonuçlanan, zamanla gelişen bir rahatsızlıktır. Travmaya bağlı olabileceği gibi, osteoartrit, romatoid artirit, obezite gibi hastalıklar sonucunda da gelişmektedir. Hastalığın tam olarak nasıl başladığı bilinmemekle birlikte, bir çok hastalıkta olduğu gibi genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Dejeneratif kıkırdakta dokunun hücre-dışı matris içeriğinin büyük kısmı degrade olmakta, bu da eklem kıkırdağının elastikliğini, viskozitesini, kayganlığını ve dayanıklılığını kaybetmesine neden olmaktadır. Önerilen tez, hali hazırda ağrı kesici terapiler dışında non-invazif tedavisi olmayan kıkırdak dejenerasyonunun, kıkırdak degradasyonunu engelleyecek mikro RNAlar barındıran nanopartiküller içeren hidrojeller ile tedavisi amaçlanarak tasarlanmıştır. Tezde geliştirilen hidrojeller artiküler kıkırdak hücre-dışı matrisi taklit etmek amacıyla metakrilatlanmış kondroitin sülfat ve jelatinden, mikro RNA 149-5p taşıyan nanopartiküller ise kıkırdak dejenerasyonu tedavilerinde sıkça kullanılan hyaluronik asit ve kitosandan oluşturulmuştur. Yapılan optimizasyonlarla hidrojeller enjekte edilebilir forma kavuşturulmuş, nanopartiküller ve hidrojellerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları tamamlanmıştır. Nanopartiküllerin gen transfeksiyon başarısı ve hidrojel ve nanopartiküllerin kondrosit gelişimine etkisi insan mezenkimal kök hücreleri üzerinde test edilmiş, sitotoksikite, proliferasyon, sitolojik boyamalar ve gen ekspresyon analizleriyle gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** artiküler kıkırdak, kıkırdak dejenerasyonu, mikro RNA, kondroitin sülfat, ,jelatin, hyaluronik asit, kitosan

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF INJECTABLE HYDROGELS FOR DEGENERATIVE CARTILAGE

EKİN ÇELİK

PHD, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

September 2018, 137 pages

Cartilage degeneration is a pathology that develops over time, beginning with the softening of the cartilaginous gland and then completely disappearing. It may be due to trauma, as well as diseases such as osteoarthritis, rheumatoid arthritis and obesity. Although it is not known exactly how the disease has begun, it is thought that genetic factors play a role likewise many diseases. In degenerative cartilage, most of the extracellular matrix content is degraded, which causes the joint cartilage to lose its elasticity, viscosity, lubrication and durability. The proposed thesis is designed for cartilage regeneration with hydrogels containing nanoparticles containing microRNAs that inhibit cartilage degradation. The hydrogels developed in the thesis were formed from methacrylated chondroitin sulphate and gelatin to mimic articular cartilage extracellular matrix and nanoparticles carrying microRNA 149-5p were formed with hyaluronic acid and chitosan, which are commonly used in cartilage degeneration treatments. With the optimizations performed, the hydrogels are formed into the injectable form and the physical and chemical characterization of the nanoparticles and hydrogels is completed. The ability of nanoparticles for gene transfection and the effect of hydrogel and nanoparticles on chondrogenesis were tested on human mesenchymal stem cells and demonstrated by cytotoxicity tests, proliferation analysis, cytological stainings and gene expression analysis.

**Keywords:** articular cartilage, cartilage degeneration, microRNA, chondroitin sulfate, gelatin, hyaluronic acid, chitosan

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, birikim ve tecrübelerinden yararlandığım, her zaman beni destekleyen ve yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve ailesine;

Çalışmalarım süresince sahip olduğu bilgi, deneyim ve imkanları benimle paylaşarak desteğini esirgemeyen, laboratuvar imkanlarını sağlayan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkiran'a,

Tez çalışmam sırasında çok değerli yardım ve desteklerinden dolayı sayın hocam Dr. Cem Bayram'a;

Çalışma sürecinde benden desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Esra Elif Aydın Dede, Neval Dicle Sungur, Serhat Öztürk ve sayın hocam Doç. Dr. Murat Demirbilek'e;

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım çalışma arkadaşlarım, çok sevdiğim Biyopolimerik Araştırma Grubu üyelerine;

Hayatım boyunca her an yanımda olan, her alanda inanç ve sabırla bana olan desteklerini esirgemeyen canım aileme, sevgili büyükanneme ve beni bir yerlerden izlediğini hep bildiğim dedeme ve pamuk dedeme;

Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim..

EKİN ÇELİK

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Enjekte edilebilir hidrojeller .....	3
2.1.1. Enjekte edilebilir hidrojellerde biyobozunur malzemeler .....	5
2.1.1.1. Doğal malzemeler .....	5
2.1.1.2. Sentetik malzemeler .....	7
2.1.2. Enjekte edilebilir hidrojellerin sentez mekanizmaları .....	8
2.1.2.1 Fiziksel çapraz bağlanma mekanizmaları .....	8
2.1.2.2. Kimyasal çapraz bağlanma mekanizmaları.....	10
2.1.3. Enjekte edilebilir hidrojel uygulamaları .....	12
2.1.3.1. Kıkırdak onarımı .....	12
2.1.3.2. Yumuşak doku rejenerasyonu .....	13
2.2. İlaç taşıma sistemleri .....	13
2.2.1. Polisakkaritler .....	14
2.2.2. Polisakkarit nanopartiküllerin sentez mekanizmaları .....	15
2.2.2.1. Polielektrolit kompleksi (PEC) .....	15
2.2.2.2. Kendiliğinden düzenlenme .....	16
2.2.2.3. Kovalent çapraz bağlanma .....	16
2.2.2.4. İyonik çapraz bağlanma .....	17
2.2.3. Polisakkarit bazlı nanopartiküller .....	18
2.2.3.1. Kitosan bazlı nanopartiküller .....	18



2.2.3.2. Heparin bazlı nanopartiküller .....	19
2.2.3.3. Hyaluronik asit bazlı nanopartiküller .....	20
2.2.3.4. Aljinat bazlı nanopartiküller .....	22
2.2.3.5. Kondroitin sülfat bazlı nanopartiküller .....	23
2.3. Artiküler kıkırdak.....	24
2.3.1. Artiküler kıkırdak yapısı ve içeriği.....	24
2.3.2. Kıkırdak dejenerasyonu .....	25
2.3.3. Kıkırdak dejenerasyonu için uygulanan tedaviler .....	25
2.3.3.1. Mikrofraktür.....	25
2.3.3.2. Otolog kondrosit implantasyonu (ACI) .....	26
2.3.3.3. Doku iskelesi bazlı tedaviler.....	27
2.3.3.4. İntra-artiküler enjeksiyonlar.....	28
2.3.3.5. Platelet zengin plazma (PRP) tedavisi .....	33
2.4. Gen terapisi.....	35
2.4.1. Mikro RNA.....	41
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	42
3.1. Kondroitin sülfat metakrilat sentezi .....	42
3.2. Jelatin metakrilat sentezi .....	42
3.3. CSMA ve GELMA hidrojellerinin sentezi .....	42
3.4. CSMA:GELMA hidrojellerinin reoloji deneyleri .....	42
3.5. CSMA:GELMA hidrojellerin şişme deneyleri .....	43
3.6. CSMA:GELMA hidrojellerinin degradasyon deneyleri .....	43
3.7. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin sentezlenmesi .....	43
3.8. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin stabilite deneyleri .....	44
3.9. HA/CS nanopartiküllerin mikro RNA-149-5p enkapsülasyonu.....	44
3.10. Mikro RNA'nın yüklenme etkinliğinin belirlenmesi ve salım deneyleri .....	45
3.11. Jel retardasyon deneyleri .....	45
3.12. Sitotoksosite deneyleri .....	45
3.13. Mikro RNA transfeksiyon deneyleri .....	46
3.13.1. RNA izolasyonu .....	46

3.13.2. cDNA sentezi .....	47
3.13.3. Gerçek zamanlı PCR deneyleri.....	48
3.14. Sitolojik boyamalar (sGAG boyamaları).....	49
3.15. İstatiksel analizler .....	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	51
4.1. CSMA ve GELMA yapılarının karakterizasyonu .....	51
4.2. CSMA:GELMA hidrojellerinin karakterizasyonu .....	63
4.2.1. CSMA:GELMA hidrojellerinin fiziksel karakterizasyonu .....	64
4.2.2. CSMA:GELMA hidrojellerinin reolojik incelemeleri.....	65
4.2.3. CSMA:GELMA hidrojellerinin şişme ve degradasyon davranışlarının analizi .....	68
4.2.4. CSMA:GELMA hidrojellerinin sitotoksisite analizleri.....	71
4.3. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin karakterizasyonları .....	72
4.3.1. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin stabilite testleri .....	75
4.3.2. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin sitotoksisite analizleri ....	76
4.3.3. HA/CS nanopartiküllerinin mikro RNA-149-5p ile etkileştirilme analizleri.....	77
4.3.4. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartiküllerinin mikro RNA salım profillerinin belirlenmesi .....	78
4.3.5. ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin mikro RNA-149-5p ile etkileştirilme analizleri.....	79
4.3.6. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin mikro RNA salım profillerinin belirlenmesi.....	81
4.3.7. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin jel retardasyon analizleri .....	82
4.4. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri katkılı 2:1 CSMA:GELMA hidrojellerinin karakterizasyonları .....	83
4.5. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülleriyle etkileştirilmiş hücrelerin gen ekspresyon analizleri .....	84
4.6. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülleri ile etkileştirilen hücrelerin sGAG boyamaları .....	88
4.7. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri ile bu partiküllerle katılanmış 2:1 CSMA:GELMA hidrojelleriyle etkileştirilen hücrelerin gen ekspresyon analizleri.....	89

4.8. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri ile bu partiküllerle katkılanmış 2:1 CSMA:GELMA hidrojelleriyle etkileştirilen hücrelerin sGAG boyamaları .....	93
4.9. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartikülleri ile etkileştirilmiş hücrelerin proliferasyon analizleri .....	94
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....	96
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ .....	137

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Şekil 2.1.</b> RNA interferans mekanizması .....	41
<b>Şekil 4.1.</b> Metakrilik anhidrit ile kondroitin sülfatın metakrilatlanma mekanizması .....	51
<b>Şekil 4.2.</b> (a) CSMA 1, (b) CSMA 2 hidrojellerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumları .....	52
<b>Şekil 4.3.</b> Metakrilik anhidrit ile jelatinin metakrilatlanma mekanizması .....	53
<b>Şekil 4.4.a</b> GELMA 1 hidrojelinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	54
<b>Şekil 4.4.b</b> GELMA 2 hidrojelinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	55
<b>Şekil 4.4.c</b> GELMA 3 hidrojelinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	55
<b>Şekil 4.5.</b> Enjekte edilebilir (a) CSMA'nın <sup>1</sup> H-NMR grafiği (b) Grafiğin aralıkları açılmış hali .....	60
<b>Şekil 4.6.</b> Enjekte edilebilir GELMA formülasyonun <sup>1</sup> H-NMR grafiği .....	63
<b>Şekil 4.7.</b> CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerin masa üstü reoloji fotoğrafları .....	64
<b>Şekil 4.8.</b> CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerin SEM görüntüleri .....	65
<b>Şekil 4.9.</b> CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin frekans taramaları ...	66
<b>Şekil 4.10.</b> CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin depolama modülüs değerleri .....	67
<b>Şekil 4.11.</b> 2:1 CSMA:GELMA hidrojelinin kayma gerilim analizi .....	68
<b>Şekil 4.12.</b> 2:1 CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojelinin görüntüsü.....	68
<b>Şekil 4.13.</b> CSMA: GELMA hidrojellerinin şişme davranışlarının analizi .....	69
<b>Şekil 4.14.</b> CSMA:GELMA hidrojellerinin degradasyon davranışları .....	70
<b>Şekil 4.15.</b> CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojelinin degradasyon deneyleri sırasında çekilmiş görüntüleri .....	71
<b>Şekil 4.16.</b> CSMA:GELMA hidrojellerinin sitotoksosite grafikleri .....	71
<b>Şekil 4.17.</b> Elde edilen nanopartiküllerin FT-IR grafiği .....	73
<b>Şekil 4.18.</b> HA/CS nanopartiküllerin SEM görüntüleri .....	74
<b>Şekil 4.19.</b> Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş nanopartiküllerin SEM görüntüleri .....	75
<b>Şekil 4.20.</b> Nanopartiküllerin stabilite analizleri .....	75

<b>Şekil 4.21.</b>	Nanopartiküllerin sitotoksosite sonuçları .....	77
<b>Şekil 4.22.</b>	Farklı N:P oranlarıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerin mikro RNA salım profilleri .....	79
<b>Şekil 4.23.</b>	ChoS(HA/CS) nanopartiküllerin mikro RNA salım profilleri .....	81
<b>Şekil 4.24.</b>	Jel retardasyon analizleri sonuçları .....	82
<b>Şekil 4.25.</b>	HA/CS nanopartiküller içeren CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojelinin mikro RNA salım profili.....	84
<b>Şekil 4.26.</b>	ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin FUT-1 ve mikro RNA-149-5p gen ekspresyon analizi sonuçları .....	86
<b>Şekil 4.27.</b>	ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin SOX-9 ve COMP gen ekspresyon analizi sonuçları .....	87
<b>Şekil 4.28.</b>	ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin AGC ve COL2A-1 gen ekspresyon analizi sonuçları .....	88
<b>Şekil 4.29.</b>	ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mezenkimal kök hücrelerin sGAG boyamaları .....	89
<b>Şekil 4.30.</b>	mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri içeren CSMA:GELMA hidrojelinin FUT-1 ve mikro RNA-149-5p gen ekspresyon analizi sonuçları .....	90
<b>Şekil 4.31.</b>	mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri içeren CSMA:GELMA hidrojelinin SOX-9 ve COMP gen ekspresyon analizi sonuçları .....	92
<b>Şekil 4.32.</b>	mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri içeren CSMA:GELMA hidrojelinin AGC ve COL2A-1 gen ekspresyon analizi sonuçları.....	93
<b>Şekil 4.33.</b>	HA/CS nanopartiküller ve CSMA:GELMA hidrojellerle etkileştirilmiş mezenkimal kök hücrelerin sGAG boyamaları .....	94
<b>Şekil 4.34.</b>	Mikro RNA-149-5p taşıyan HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartikülleri uygulanan hücrelerin proliferasyon sonuçları .....	95

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

<b>Çizelge 2.1.</b>	Doğal ve sentetik malzemelerden üretilmiş enjekte edilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir hidrojel sistemleri.....	4
<b>Çizelge 2.2.</b>	Kök hücrelerin transfeksiyonu için kullanılan viral olmayan taşıyıcılar .....	37
<b>Çizelge 3.1.</b>	Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer sekansları...	48
<b>Çizelge 4.1.</b>	CSMA örneklerinin yer değiştirme dereceleri ve metakrilatlanma oranları .....	53
<b>Çizelge 4.2.</b>	GELMA örneklerinin yer değiştirme dereceleri ve metakrilatlanma oranları .....	56
<b>Çizelge 4.3.</b>	CSMA enjekte edilebilir hidrojellerinin optimizasyon sonuçları .....	56
<b>Çizelge 4.4.</b>	GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin optimizasyon sonuçları ..	60
<b>Çizelge 4.5.</b>	Farklı oranlarda karıştırılan CSMA:GELMA yapılarının hidrojel oluşturma optimizasyon sonuçları .....	64
<b>Çizelge 4.6.</b>	Farklı oranlarda hyaluronik asit ve kitosan çözeltisi kullanılarak hazırlanan HA/CS nanopartiküllerin yük/boyut analizleri .....	72
<b>Çizelge 4.7.</b>	Farklı miktarlarda kondroitin sülfat ile etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerin yük/boyut analizleri.....	73
<b>Çizelge 4.8.</b>	Farklı N:P oranlarıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerin boyut/yük analizleri.....	77
<b>Çizelge 4.9.</b>	Farklı N:P oranlarıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerin boyut/yük analizleriyle birlikte enkapsülasyon etkinlik değerleri .....	78
<b>Çizelge 4.10.</b>	Farklı tekniklerle mikro RNA ile etkileştirilen nanopartikül yük/boyut ve etkileşim analizleri sonuçları .....	80
<b>Çizelge 4.11.</b>	Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş olan HA/CS nanopartiküllerin mikro RNAlar ile etkileştirildikten sonraki boyut/yük özellikleri, etkileştirme verimleri.....	81

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalsiyum klorür
<b>Cu</b>	Bakır
<b>G</b>	$\alpha$ -L-gluronik asit
<b>gr</b>	Gram
<b>miRNA</b>	Mikro RNA
<b>M</b>	Mannuronik asit
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mmol</b>	Milimol
<b>Mn</b>	Manganez
<b>mV</b>	Milivolt
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>Pa</b>	Paskal
<b>Sr</b>	Stronsiyum
<b>ug</b>	Mikrogram
<b>ul</b>	Mikrolitre
<b>uM</b>	Mikromolar
<b>V</b>	Volt
<b>Zn</b>	Çinko

## Kısaltmalar

<b>5FU</b>	5-flurourasil
<b>ACA</b>	4,4'-azobis (4-siyanamerik asit)
<b>ACI</b>	Otolog kondrosit implantasyonunun
<b>ACTB</b>	$\beta$ -aktin
<b>AGC</b>	Agrekan
<b>AIBN</b>	2,2-azobisizobutironitril
<b>ALP</b>	Alkale fosfataz
<b>ASC</b>	Adipoz türevi kök hücre
<b>BPO</b>	Benzil peroksit
<b>cDNA</b>	Komplementer DNA
<b>ChoS</b>	Kondroitin sülfat
<b>ChoS (HA/CS)</b>	Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş hyaluronik asit/kitosan
<b>CMCS</b>	Karboksimetil kitosan
<b>COL2A1</b>	Kolajen tip 2
<b>CPP</b>	Hücre Penetran Peptitler
<b>CS</b>	Kitosan
<b>CSC</b>	Kanser kök hücresi
<b>CSMA</b>	Metakrilatlanmış kondroitin sülfat
<b>DDS</b>	İlaç taşıyım sistemleri
<b>DLS</b>	Dinamik ışık saçılımı
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>DOX</b>	Doksorubisin hidroklorür
<b>ECM</b>	Hücre dışı matris
<b>EDC</b>	Karbodiimid hidroklorid
<b>EPR</b>	Retansiyon



<b>FBS</b>	Fetal bovin serumu
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FGF</b>	Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
<b>FT-IR</b>	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
<b>FUT-1</b>	Fukozil transferaz
<b>GAG</b>	Glikozaminoglikan
<b>GalNAc</b>	N-asetilgalaktozamin
<b>GELMA</b>	Metakrilatlanmış jelatin
<b>GFP</b>	Yeşil floresan protein
<b>GlcA</b>	Glukuronik asit
<b>HA</b>	Hyaluronik asit
<b>HA/CS</b>	Hyaluronik asit/kitosan
<b>hBMMSC</b>	İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücresi
<b>hMSC</b>	İnsan mezenkimal kök hücresi
<b>IA</b>	İntra-artiküler
<b>IGF-1</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
<b>IKDC</b>	Uluslararası Diz Dokümantasyon Komitesi
<b>KS</b>	Kortikosteroid
<b>LMWP</b>	Düşük Moleküler Ağırlıklı Protamin
<b>MAAH</b>	Metakrilik anhidrit
<b>MACI</b>	Matriks kaynaklı otolog kondrosit implantasyonu
<b>MBA</b>	N-metilenebisakrilamid
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>MSC</b>	Kemik iliği (mezenkimal) stromal (kök) hücreler
<b>MTT</b>	3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>nHa</b>	Nano-hidroksiapatit parçacıkları

<b>NHS</b>	N-hidroksisülfosüksinimid
<b>NHS</b>	Ulusal Sağlık Servisi
<b>NMR</b>	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
<b>NP</b>	Nanopartikül
<b>PAA</b>	Poliakrilamid
<b>PAMAM</b>	Poliamidoamin
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PCL</b>	Poli kapro lakton
<b>PCLA</b>	Poli kapro lakton ko-laktid
<b>PCN</b>	Polielektrolit kompleks nanopartiküller
<b>pDNA</b>	Plazmid DNA
<b>PEC</b>	Poli elektrolit kompleksi
<b>PEI</b>	Poli (etilen imin)
<b>PEG</b>	Poli etilen glikol
<b>PEGDA</b>	Poli (etilen-glikol) -diakrilat
<b>PEGDMA</b>	Poli (etilen glikol) –dimetiakrilat
<b>PEO</b>	Poli etilen oksit
<b>PGA</b>	Poliglikolik asit
<b>PLLA</b>	Poli laktik asit
<b>PLGA</b>	Poli (laktit-ko-glikolid)
<b>PMMA</b>	Poli (metakrilik asit)
<b>PNIPAAm</b>	Poli (N-izopropilakrilamid)
<b>PPF</b>	Poli propilen fumarat
<b>PPO</b>	Poli fenilen oksit
<b>PRP</b>	Platelet zengin plazma
<b>PVA</b>	Poli vinil alkol

<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SEM</b>	Taramalı elektron mikroskopisi
<b>sGAG</b>	Sülfatlanmış glikozaminoglikan
<b>siRNA</b>	Küçük engelleyici RNA
<b>RNAi</b>	RNA interferansı
<b>TBE</b>	Tris Borik Asit EDTA
<b>TPP</b>	Tri-poli fosfat
<b>OA</b>	Osteoartrit
<b>OARSI</b>	Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği
<b>OPF</b>	Oligo(poli (etilen glikol) fumarat
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörleri

# 1. GİRİŞ

Kıkırdak dejenerasyonu travma, artirit, sporla ilişkili yaralanmalar, yaşlanma gibi çeşitli sebepler sonucu gelişebilmektedir. Özellikle vaskülarizasyon, innervasyon, lenfatik ağlar ve progenitör hücrelerden yoksun olması nedeniyle hasarlı kıkırdağın kendiliğinden iyileşmesi oldukça sınırlı olduğundan, dejenerasyonun tedavisi sağlanamamakta, klinikte daha çok hastaların semptomlarının geçici olarak giderilmesi sağlanmaktadır. Bunun için klinikte en sık kullanılan yöntem, viskosuplementasyon yöntemidir, bu da hyaluronik asit (HA) enjeksiyonları ile yapılmaktadır. Genel anestezi veya cerrahi operasyon gerekmeksizin intra-artiküler olarak uygulanan bu enjeksiyonlarla, subkondral doku ve çevresindeki sürtünmenin azaltılması, kemik-kıkırdak arası kayganlığın artırılması ve dolayısıyla hastaların ağrılarından geçici bir süreliğine de olsa kurtulması hedeflenmektedir.

Artiküler kıkırdak, yüksek miktardaki hyaluronik asit içeriği sayesinde viskozite ve kayganlık sağlamanın yanısıra esas olarak kollajenler ve proteoglikanlardan oluşan yoğun bir hücre dışı matrisine sahiptir. Dejeneratif kıkırdakta, artiküler kıkırdağın üzerinde yer alan sinoviyal sıvı viskozitesi, kıkırdaktaki su içeriği ve hyaluronik asit miktarı azalmaktadır. HA, sinovyal sıvı viskozitesini korumak, proteoglikan sentezine yardımcı olmak, inflamatuvar ve ağrı yanıtlarını modüle etmek ve kıkırdak matrisini korumaktan sorumludur. Bu nedenle, HA sentezini uyararak ve bozunmasını azaltarak dizin normal viskoelastik özelliklerini geri getirme çabasıyla intra-artiküler viskosuplementasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

Artiküler kıkırdak matrisi proteoglikanlardan, spesifik olarak da kondroitin sülfattan oluşmaktadır. Kondroitin sülfat dokuya elastikiyet sağlamakta, aynı zamanda dokunun mekanik direncinden sorumlu kolajenlere yardımcı olmaktadır. Dejeneratif kıkırdakta hem kondroitin sülfat hem de hyaluronik asit içeriğinin oldukça azaldığı bilinmekte, bu da eklem kıkırdağının elastikliğini, viskozitesini ve su içeriğini ve ekstraselüler matriks bozulmasından dolayı mekanik dayanıklılığını da kaybetmesine neden olmaktadır.

Hidrojeller, üç boyutlu (3D) bir yapı sunan, hidrofilik polimerlerden oluşan ve önemli miktarda su tutan bir malzeme sınıfıdır. İyi biyo uyumlulukları, kolay üretilebilirlikleri, değişken kompozisyonları fizyolojik koşullara benzer fiziksel özellikleri nedeniyle, tek başına veya hücrelerle birleştirilen hidrojellerin birçok biyomedikal uygulaması bulunmaktadır. Özellikle enjekte edilebilir hidrojeller, yüksek kalıplanabilirlikleri,

minimal invazif uygulamalara yatkınlıkları ve kolay ve etkili hücre/gen/ilaç enkapsülleme yetenekleri sayesinde tıp, biyomedikal ve farmasötik gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

Karbon, metal, metal oksitler veya organik maddelerden oluşan nanopartiküller, daha yüksek ölçeklerdeki ilgili parçacıklara kıyasla, daha geniş bir yüzey alanı, kimyasal işlemlerde artan reaktivite veya stabilite, arttırılmış mekanik dayanıklılık gibi bir çok benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellik sergilemektedir. Son yıllarda nanopartiküllerin hidrojeller içerisine enkapsüle edildiği hibrid sistemlere literatürde sıkça rastlanmaktadır. Bu hibrid oluşumlar sayesinde, nanopartiküller agregasyondan kurtulmakta, hidrojeller de nanopartikül karakterine göre iyileştirilmiş fiziksel özellikler kazanmaktadır. Ayrıca olası bir tedavi modelinde taşıyıcının toksisitesi düşürülmekte veya ajan salımının kontrollü bir şekilde geciktirilmesi sağlanmaktadır.

Önerilen tezde de, enjekte edilebilir bir hidrojel-nanopartikül hibrid sistemi geliştirilmiştir. Hidrojel formülasyonu olarak metakrilatlanmış kondroitin sülfat (CSMA)-metakrilatlanmış jelatin (GELMA), nanopartikül formülasyonu olarak hyaluronik asit/kitosan (HA/CS) kullanılmıştır. Bu sisteme ek olarak kondroitin sülfatla etkileştirilmiş hyaluronik asit/kitosan (ChoS(HA/CS)) nanopartikülleri, ikinci bir nanopartikül formülasyonu olarak geliştirilmiştir. Ayrıca nanopartiküller mikro RNA 149-5p ile etkileştirilerek hidrojel içerisinde enkapsüle edilmiştir. Sistem, kırık hasarlarında tedavinin yanısıra, kırık sürtünmesinin azaltılması ile hastaların ağrılarından kurtulması hedeflenerek, alternatif bir viskosuplemasyon yöntemi olarak tasarlanmıştır. Geliştirilen bu hibrid nanopartikül-hidrojel sistemi insan mezenkimal kök hücrelerle etkileştirilmiş, gen transfeksiyon başarıları ve kondrogenез varlığı kontrol edilmiştir.

Hidrojel ve nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları tamamlanmış, ayrıca insan mezenkimal kök hücreleri üzerinde sitotoksikite, proliferasyon, boyama testleri ve gen ekspresyon analizleri yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Enjekte edilebilir hidrojeller

Enjekte edilebilir hidrojeller, canlı dokuya benzer yüksek su içerikleri, homojen olarak hücreleri kapsülleme yetenekleri, etkin kütle transfer yetenekleri, kolayca manipüle edilen fiziksel özellikleri ve minimal invaziv olarak dokulara taşınabilir olmaları sebebiyle doku mühendisliği uygulamaları için umut verici malzemelerdir [1-3]. Büyüme faktörleri ve / veya hedeflenmiş hücrelerle yüklü olan hidrojeller sorunlu doku bölgesine direkt enjekte edilebileceği gibi, fiziksel veya kimyasal uyarılara bağlı olarak enjekte edildikten sonra yerinde bir çözelti-jelasyon geçişi (sol-jel) ile jelleşen formları da bulunmaktadır [4-6]. Oldukça yüksek su tutma kapasitesine sahip hidrojeller, hücre dışı matriksin (ECM) kimyasal ve fiziksel ortamlarını çok iyi taklit edebilmektedir ve bu nedenle, hücre çoğalması ve farklılaşması için ideal hücresel mikro ortama sahiptir. En önemlisi, hücre dışı matris (ECM) ile yüksek benzerlikte bir mikroyapıya sahip olan enjekte edilebilir hidrojeller sorunlu doku ile daha iyi fiziksel entegrasyon sağlayarak, açık cerrahi tedavi prosedürlerinin önüne geçilmesi ve materyal ve/veya hücre taşınımı için minimal invaziv yaklaşımların kullanılmasını kolaylaştırma potansiyeline sahiptir [7-8].

Son on yılda, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere enjekte edilebilir hidrojeller oluşturmak için çeşitli doğal ve sentetik materyaller kullanılmıştır [1,2,5]. Doğal ve sentetik malzemelerden üretilmiş enjekte edilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir hidrojel sistemleri Çizelge 2.1'de listelenmiştir.

**Çizelge 2.1:** Doğal ve sentetik malzemelerden üretilmiş enjekte edilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir hidrojel sistemleri

Hidrojeller	Polimer	Jelasyon mekanizması
<b>Doğal hidrojeller</b>	Kolajen/ Jelatin	Termal/kimyasal çapraz bağlanma
	Kitosan	Termal/kimyasal/schiff baz reaksiyonu/serbest radikal çapraz bağlanma
	Hyaluronik asit	Termal/kimyasal/schiff baz reaksiyonu çapraz bağlanma
	Kondroitin sülfat	Serbest radikal çapraz bağlanma
	Aljinat	İyonik/ Serbest radikal çapraz bağlanma
	Agar/Agaroz	Termal çapraz bağlanma
	Fibrin	Termal çapraz bağlanma
<b>Sentetik hidrojeller</b>	PEG/PEO	Kimyasal/ Serbest radikal çapraz bağlanma
	PVA	Kimyasal/ Serbest radikal çapraz bağlanma
	PPF/OPF	Serbest radikal çapraz bağlanma
	PNIPAAm	Termal çapraz bağlanma
	PEO-PPO-PEO PLGA-PEG-PLGA PEG-PLLA-PEG	Termal çapraz bağlanma
	Poli (aldehit guluronat)	Kimyasal çapraz bağlanma
	Polianhidrit	Serbest radikal çapraz bağlanma

Enjekte edilebilir yerinde oluşturulmuş hidrojellerin hazırlanması için termal jelasyon, iyonik etkileşim, fiziksel kendi kendine birleşme, fotopolimerizasyon ve glutaraldehit, genipin, adipik dihidrazid ve bis (sülfosüksinimidil) suberat gibi ajanlar ile kimyasal çapraz bağlanma dahil birçok yöntem kullanılmıştır [5-7]. Enjekte edilebilir hidrojeller, jelasyon mekanizmalarına göre fiziksel ve kimyasal jeller olarak ikiye ayrılmaktadır [9-10]. Polimerik zincirler veya nanopartiküller arasındaki fiziksel bağ ile çapraz bağlanan hidrojel ağı, fiziksel jel olarak adlandırılırken, bir kimyasal jel oluşumu, polimerik zincirler arasındaki kovalent bağlar vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Konvansiyonel hidrojel sentez yöntemleri, operasyonel karmaşıklık, sitotoksik reaktiflerin tutulumu, fonksiyonel grupların istikrarsızlığı, muhtemel yan reaksiyonlar ve düşük bağlanma

etkinliği ile sınırlanmaktadır. Doku mühendisliği için biyoaktif fonksiyonun tamamen korunduğu, biyolojik olarak bozunabilir hidrojellerin geniş bir sınıfına uygulanabilen, basit, spesifik ve yüksek verimli konjügasyon yöntemlerinin geliştirilmesine sürekli bir ihtiyaç bulunmaktadır.

### **2.1.1. Enjekte edilebilir hidrojelerde biyobozunur malzemeler**

Doğal polimerlerden türetilen hidrojel, vücut sıvıları veya ortamı ile temas ettiğinde genellikle hızlı bozunuma uğramaktadır. Doğal hidrojel, bu sınırlamaları, polimerleri değiştirmek için çeşitli sentetik polimerler kullanmak üzerine kurulmuş yaklaşımları doğurmuştur.

#### **2.1.1.1. Doğal malzemeler**

Doğal olarak türetilen hidrojel oluşturabilen polimerler, doğal doku ECM'sinde bulunan veya benzer makromoleküllere sahip olduklarından, doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [11-12]. Doğal olarak türetilen polimerler arasında bulunan kolajen, jelatin, kitosan, hyaluronik asit, kondroitin sülfat, agaroz, aljinat ve fibrin doku mühendisliği yaklaşımlarında en sık kullanılan malzemelerin başında gelmektedir.

Doğal ECM'nin ana bileşeni ve memeli dokularında bulunan en bol protein olduğundan, kolajen, biyomedikal uygulamalar için dikkat çekici bir materyaldir [13-15]. Kolajenin temel yapısı, üç zincirli ip yapısı oluşturmak için birbirlerine sarılmış üç polipeptit zincirinden oluşmaktadır [5,14]. Kolajen doğal olarak metaloproteazlar, özellikle kolajenaz ve serin proteazlar tarafından bozunmaktadır [16-17]. Jelatin, kolajenin doğal tripleheliks yapısının hidrolizi ile tek sarmallı moleküllere bölünmesiyle oluşan kısmi bir türevidir [18]. Jelatin, öncülüne (kolajen) kıyasla daha az immünojeniktir ve RGD sekansı gibi bilgi sinyallerini tutarak hücre yapışması, göç, farklılaşma ve çoğalmayı teşvik etmektedir [19]. Kolajen ve jelatin hidrojel, gerek çıplak halde, gerekse çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcıların (glutaraldehit, genipin ve karbodiimid) varlığında mekanik özellikleri arttırılmış şekilde, doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Kitosan, kısmen deasetillenmiş bir kitin türevidir olan doğrusal bir polisakkarittir. Bu polikationik polisakkarit, glukozamin ve N-asetilglukozamin moleküllerini iğerdiğinden, doğal glikozaminoglikanlara (GAG) yapısal olarak yüksek derecede benzerlik göstermektedir [20-22]. Kitosan yüksek biyoyumluluk ve biyolojik bozunabilirliği,



düşük immünojenisitesi ve katyonik niteliği nedeniyle son yıllarda çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için araştırılmıştır [22-25]. Bununla birlikte, modifiye edilmemiş kitosan, kuvvetli moleküllerarası hidrojen bağları nedeniyle asitli çözeltilerde çözülebilmektedir; bu da, enjekte edilebilir bir hidrojel olarak kullanımını sınırlamaktadır. Kitosan türevleri, glutaraldehid ile çapraz bağlanma, UV ışınlanması ve termal varyasyonlar yoluyla jelleştirilebilmektedir. Son yıllarda kitosan, biyoyumluluk özelliklerinin artırılarak ısıya duyarlı kitosan hidrojeller oluşturmak için poli (N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) ve N-izobütiril grupları ile, ultraviyole (UV) çapraz bağlanabilir kitosan hidrojeller elde etmek için vanilin veya hidroksibenzaldehidler ile graflanmıştır [21-26 ].

Hyaluronik asit (HA), insan ve diğer hayvanlardaki tüm bağ dokularının ECM'sinde geniş çapta dağılmış halde bulunan, doğal olarak oluşan sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır [27-28]. Hyaluronik asit, doku hidrasyonu, besin difüzyonu, proteoglikan organizasyonu ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik işlemde önemli rol oynamaktadır. HA, özellikle yara iyileşmesi sırasında ve eklemlerin sinovyal sıvısında bulunmaktadır. Hyaluronik asit, N-asetil-D-glukozamin ve D-glukuronik asidin birden fazla yinelenen disakkarit biriminden oluşan bir glikozaminoglikandır. Hyaluronik asit hücrelerde ve serumda bulunan hyaluronidaz enzimi tarafından parçalanır [29]. HA ve türevleri, iyi biyoyumluluk, biyolojik bozunabilirlik ve mükemmel jel oluşturma özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hidrojeller olarak geniş çapta araştırılmıştır [30-31]. Hyaluronik asit hidrojelleri, hidrazid türevleri ile kovalent çapraz bağlanma ve esterifikasyon gibi yöntemlerle oluşturulabilmektedir [30-35]. Ek olarak, hyaluronik asidin kompozit hidrojeller oluşturmak için hem kollajen hem de aljinat ile kombine edildiği çalışmalar mevcuttur [33-35].

Aljinat özellikle kahverengi yosun ve bakterilerden türetilen (1-4) -bağlı  $\beta$ -D-mannuronik asit (M) ve  $\alpha$ -L-gluronik asit (G) monomerlerinden oluşan bir hidrofilik ve doğrusal polisakkarittir [1-2 , 36-38].  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  veya  $Sr^{2+}$  gibi iki değerlikli katyonlar iyonik köprüler oluşturmak için G monomer bloklarıyla birlikte etkileşime girdiğinde basit jelleşme oluşabilmektedir [5,39-41]. Aljinat nazik koşullar altında jel oluşturma yeteneği, düşük toksisitesi ve kolaylıkla bulunabilmesi nedeniyle hücre kapsüllemesi, doku mühendisliği ve ilaç taşınımı dahil olmak üzere bir çok tıbbi uygulamada kullanılmıştır [42-46]. Avantajlı özelliklerine rağmen, aljinat tam olarak degrade edilememektedir. İyonik olarak çapraz bağlanmış aljinat hidrojeller, iki

değerlikli iyonların çevre ortam içerisine kaybolmasını içeren bir iyon değiştirme işlemi vasıtasıyla degrade olur ve kontrolsüz bir şekilde çözünmektedir. Aljinat, doku mühendisliği uygulamalarında, özellikle hücreyle etkileşimini arttırmak üzere, lektin ve RGD ile konjuge edilerek kullanılmaktadır [1,5,44-45].

### **2.1.1.2.Sentetik malzemeler**

Sentetik polimerler, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin doğal polimerlere göre daha iyi kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olmaları sebebiyle hidrojel çalışmaları için sıklıkla kullanılan materyallerdir. Sentetik polimerler, belirli blok yapıları, molekül ağırlıkları ve parçalanabilir bağlarla tekrar üretilebilir şekilde geliştirilebilmektedir. Doğal hidrojellerle karşılaştırıldığında, sentetik hidrojeller, ECM kimyasal bileşimi ve mimarisinin kontrolünü daha iyi sağlamakla birlikte, daha düşük biyolojik aktiviteye sahip olma eğilimindedir. Doku mühendisliği uygulamaları için ideal hidrojel yaratmaya yönelik bir yaklaşımla, hücresel biyo-aktivitenin artırılması için sentetik hidrojellere biyoaktif elementlerin eklendiği çalışmaları bulunmaktadır [47]. Enjekte edilebilir hidrojeller geliştirmek için en çok kullanılan sentetik polimerler, poli etilen glikol (PEG), poli vinil alkol (PVA), poli propilen fumarat (PPF), PNIPAAm, pluronik F-127 ve polipeptitler olarak öne çıkmaktadır.

Poli etilen glikol (PEG) birçok tıbbi uygulama için FDA tarafından onaylanmıştır. Her ne kadar birçok sentetik polimer kimyasal çapraz bağlanma yoluyla biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir hidrojeller oluştursa da, PEG en yaygın olarak araştırılan sistemlerden biri olmaya devam etmektedir [47-50]. Biyolojik olarak parçalanabilir PEG hidrojelleri, poli laktik asit, poli glikolik asit ve poli propilen fumarat gibi parçalanabilir polimerler ile kopolimerizasyon yoluyla elde edilebilmektedir [51-53]. Bunun yanı sıra, hyaluronik asit, fibrinojen, kitosan ve heparin gibi doğal olarak oluşan birçok biyopolimer de genel olarak biyolojik olarak parçalanabilir PEG hidrojelleri ile birlikte analiz edilmektedir [54-58]. PEG hidrojelleri, hücre iskeleleri, yapışkan tıbbi uygulamalar taşıyıcı araçlar olarak kullanılmış ve umut vaadeden sonuçlar alınmıştır [59-62]. Özellikle, çapraz bağlanma yoğunluğunu kontrol etme kabiliyeti PEG bazlı hidrojellere hücre etkileşimi ve doku büyümesi için esneklik ve uyarlanabilirlik sağlar. PEG ve kimyasal olarak benzer poli etilen oksit (PEO), iki ucu akrilatlar veya metakrilatlar ile modifiye edilerek foto çapraz bağlanabilen hidrofilik polimerlerdir.

PVA ve PPF de, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan enjekte edilebilir hidrojel için araştırılan sentetik hidrofilik polimerlerdir. PVA, çeşitli malzemelerle türevlendirilebilen asılı hidroksi gruplarının bolluğu sayesinde çok fonksiyonlu makromerlere dönüştürülebilmektedir [5]. Fiziksel ve kimyasal olarak hidrojel oluşturmak üzere çapraz bağlanabilmekte ve diğer suda çözünen polimerler ile harmanlanabilmektedir [2,63-64]. PVA hidrojelleri, tekrarlanan donma/çözme yöntemleriyle fiziksel olarak çapraz bağlanarak veya glutaraldehit veya epiklorohidrin ile kimyasal olarak çapraz bağlanarak oluşturulmaktadır [1,5]. PPF, ester bağlantısının hidroliziyle bozunmaya uğrayan lineer bir poliesterdir. PPF, hidrofilik PEG ile bir blok kopolimer olarak sentezlendiğinde UV yardımıyla veya kimyasal olarak çapraz bağlanarak hidrojel oluşturabilmektedir [1-2].

### **2.1.2. Enjekte edilebilir hidrojellerin sentez mekanizmaları**

Enjekte edilebilir hidrojellerin hazırlanması için birçok yöntem kullanılmıştır. Bu jelleşme yöntemlerinden biri olan termal çapraz bağlanma, fotopolimerizasyon tekniğinde bulunan enjeksiyon derinliği sınırlaması olmadığından nispeten daha kolay gerçekleşmektedir. Kolajen ve fibrin yapıştırıcısı gibi doğal hidrojellerin çoğu, jelin son yapısı ve özelliklerini sınırlayan fiziksel ve iyonik çapraz bağlanma mekanizmaları ile oluşmaktadır, ve bu mekanizmalar kontrol edilememektedir. Bunun aksine, kovalent bağlarla çapraz bağlanan hidrojeller kontrol edilebilir çapraz bağlanma yoğunluğu ve yapı özellikleri gibi birçok avantaj sunmaktadır.

Özellikle, çapraz bağlanma yoğunluğunu kontrol etme yetenekleri hücre bağlanması, doku büyümesi ve iyileşmesi için çeşitli polimerik ağ formlarının tasarlanabilmesine imkan sağlamaktadır.

#### **2.1.2.1. Fiziksel çapraz bağlanma mekanizmaları**

Sıcaklık, pH gibi dış uyaranlara yanıt olarak faz geçişi yapabilen biyolojik olarak bozunabilir hidrojeller, biyomedikal uygulamalar için enjekte edilebilir hidrojellerin hazırlanması için kullanılan yöntemlerden biridir.

2000 yılında, bir poliolsu karşı-iyonik dibaz tuzu olan  $\beta$ -gliserol fosfat disodyum eklenmesiyle pH nötr bir kitosan çözeltisi geliştirilmiştir. Chenite ve arkadaşları, kitosan solüsyonunun,  $\beta$ -gliserol fosfat disodyum formunda in situ jelleşme sistemleri ile nötrleştirildiğini, ve bu jelin oda sıcaklıklarında uzun süre boyunca sıvı halde kaldığını, ancak sıcaklık 37°C'ye yükseltildiğinde makro gözenekli bir jele dönüştüğünü

göstermiştir [65]. Kitosanın sulu çözeltiler içinde çözünürlüğü asidik ortamlarda amin gruplarının protonlanmasıyla elde edilmektedir. Kitosan ve  $\beta$ -gliserol fosfat disodyumun kombinasyonu, hidrojen bağlama, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler de dahil olmak üzere jel oluşumuna elverişli birçok etkileşimden yararlanmaktadır [65]. Bu bağlar, bir çok uygulama için uzun zamandır önemli bir sınırlama olan kitosan çözeltilerinin pH instabilitesini aşmak için yeterlidir. Böylece malzeme enjekte edilebilir forma kavuşmakta ve mümkün olan en az cerrahi müdahale ile in situ bir iskele oluşturabilmektedir [66-67]. Bir fare modelinde kondrositlerle yüklü bu hidrojelin enjeksiyonu ve ekiminin, in vivo olarak proteoglikan açısından zengin bir matris oluşturduğu gösterilmiştir. Bu sistemlerin vücut içinde ve depolama koşullarına bağlı olarak laboratuvar ortamında fiziksel özelliklerini koruduğu ve bir kaç saatten bir kaç güne kadar içerlerine hapsedilen biyomoleküllerin salımlarının devam ettiği gösterilmiştir [67-68].

Termosensitif polimerlerden biri olan PNIPAAm, yaklaşık 32 ° C'lik bir bobin-globül faz geçişine maruz kalan bir polimerdir [69-75]. Hidrojellerin termo duyarlılığı, PNIPAAm'nin biyo-bozunur polimerlerin omurgasına dahil edilmesiyle sağlanabilmektedir. Son yıllarda, PEG, kitosan, jelatin, hyaluronik asit ve PNIPAAm kopolimerlerini içeren çeşitli ısıya duyarlı ve enjekte edilebilir hidrojeller çeşitli ortamlarda geliştirilmiş ve kullanılmıştır [71-84]. PNIPAAm'yi biyo-bozunabilir polimerler ile birleştirmek için kullanılan etkili yöntemlerden biri 2,2-azobisisobutironitril (AIBN), 4,4'-azobis (4-siyanameric asit) (ACA), benzil peroksit (BPO) ve amonyum persülfat kullanılarak serbest radikal polimerizasyonu ile kopolimerizasyondur [76–79]. Bu prosedür, daha sonra biyomakromoleküler veya peptit sekanslarına bağlanan bir karboksil- veya amino-uçlu NIPAAm kopolimerinin sentezini içermektedir.

Triblok kopolimerleri, birçok araştırmacı tarafından, enjekte edilebilir hidrojel sistemlerinde termojelleşebilen bir polimer olarak geniş çapta araştırılmıştır. PEO-PPO-PEO (Pluronic), PLGA-PEG-PLGA, PEG-PLLA-PEG, PCL-PEG-PCL, PCLA-PEG-PCLA ve PEG-PCL-PEG gibi blok kopolimerler, sıcaklık artışı ile su içerisinde sol-jel geçişleri sergileyen tipik ısıya duyarlı biyo-bozunabilir polimerlerdir [85-88]. Amfifilik blok polimer zincirleri ilk olarak düşük sıcaklıklarda misellere ve köprülü misellere birleşmekte, ve sıcaklığın artmasıyla sıralı forma geçerek makroskobik jel oluşturmaktadır [85-86]. Bu termojelleşebilen kopolimer hidrojelleri, biyoyumlulukları

ve in vivo jel formunda uzun süre kalıcılıkları nedeniyle hücre terapisi, doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde başarıyla uygulanmıştır.

Geleneksel hidrojellere ek olarak, pH, sıcaklık, iyon dengesi ve strese karşı akıllı yanıt ile kendiliğinden birleşen peptit hidrojeller de, doğal ECM'ye yapısal benzerlikleri ve kıkırdak ve yumuşak doku rejenerasyonundaki yüksek biyoaktiviteleri açısından doku mühendisliği çalışmalarında ön plana çıkmaktadır [89-90]. Bazı hidrojellerin, kendiliğinden birleşmiş  $\alpha$ -sarmal yapıların arasındaki etkileşimle çapraz bağlanabildikleri, bazılarının da DNA dizileri ve moleküller gibi nanofibröz yapıları oluşturmak için kendi kendine birleşebildikleri bilinmektedir [91].

### **2.1.2.2. Kimyasal çapraz bağlanma mekanizmaları**

#### **Serbest radikal polimerizasyonu ile oluşturulan hidrojeller:**

Fotopolimerizasyon, fizyolojik pH ve sıcaklıkta çapraz bağlanmış ağların in situ oluşumunu sağlayan bir süreçtir [92-93]. Hafif jelasyon koşulları, hücrelerin foto çapraz bağlanmış hidrojellerde canlı halde enkapsüle edilmesine olanak tanımakla birlikte, biyoaktif ajanların da kolaylıkla yüklenmesine izin vermektedir [94-97]. Ayrıca, fotopolimerleştirilmiş hidrojel sistemleri jelleşme prosesi üzerinde zaman ve konum olarak daha iyi kontrol sağlayabilir, doğal olarak enjekte edilebilir formda elde edilebilir ve herhangi bir ekstremitedeki veya vücuttaki kusurları doldurmak için in situ polimerize olabilir.

Pek çok araştırmacı PEG-bazlı makromoleküler monomerlerin foto-modifiye edilmiş polimerizasyonunu, doku rejenerasyonu için hücre taşıyıcı araçlar olarak hidrojeller oluşturmak için kullanmakla ilgilenmektedir [96-99]. Poli (etilen-glikol) -diakrilat (PEGDA) ve poli (etilen glikol) -dimetiakrilat (PEGDMA), doymamış C = C çift bağ grupları ile modifiye edilmiş PEG'lerdir ve bunları UV'ye maruziyet için fotopolimerleştirilebilir hidrojel adayları haline getirmektedir. Önceki çalışmalar, PEGDA ve PEGDMA'nın kondrositleri ve kemik iliği stromal hücrelerini (MSC) foto-kapsüle etmek için kullanılabileceğini göstermiştir [98-101]. PEGDA ve PEGDMA solüsyonundaki hücre süspansiyonları vücuda enjekte edilebilir ve bir doku iskelesi olarak işlev gören çapraz bağlı bir PEG jeli oluşturmak üzere UV'ye maruz bırakılarak polimerize edilebilmektedir. Ayrıca, PEG'nin PVA gibi diğer sentetik makromerler ile kopolimerizasyonu, özellikle doku mühendisliği perspektifinden önemli olan işlevsellik ve özelliklerin ek kontrolünü sağlamaktadır. PEG, aljinat, kitosan, hyaluronik asit ve

kondroitin sülfatın yanı sıra, metakrilatlanmış ve fotopolimerizasyon ve diğer serbest radikal polimerizasyonları ile hidrojeller hazırlanmıştır [98-104].

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere foto-çapraz bağlanabilir poli (propilen fumarat) (PPF) ve oligo (poli (etilen glikol) fumarat) (OPF) hidrojelleri yaygın olarak çalışılmıştır [105-111]. PPF ve OPF hidrojellerinin mekanik özellikleri ve bozunma oranları, her ikisi de biyo-bozunabilir özelliğe sahip oldukları için makromer oluşumunda kontrol edilebilmektedir. PPF ve OPF hidrojellerinin minimum veya ihmal edilebilir sitotoksikite taşıdıkları ve histo-uyumlu oldukları gösterilmiştir.

#### Micheal tipi ekleme reaksiyonu ile geliştirilen hidrojeller:

Enjekte edilebilir hidrojellerin jelleşmesi için Michael-tipi konjugat ekleme reaksiyonu kullanılabilir. Örneğin peptitler üzerindeki tiol ve vinilsülfon ya da hyaluronik asit gibi polimerik makromoleküller konjuge olarak doku mühendisliği için hidrojel olarak kullanılmak üzere sentetik hücre dışı matrisler oluşturabilmektedir [112-113]. Düşük molekül ağırlıklı vinilsulfonylların glutatyon ve DNA ile etkileşerek toksisite gösterdikleri bilindiğinden, toksisitelerini önlemek için suda çözünür biyo-makromoleküllerin omurgalarına bağlanarak kullanılmaktadır [114]. Örneğin, tiyol ile modifiye edilmiş hyaluronik asit temelli in situ çapraz bağlanabilir hidrojeller, in vitro ve in vivo doku mühendisliği için birçok tasarım kriterine uymaktadır [114-117]. Hücrelerin hidrojelin polimerizasyon reaksiyonundan etkilenmediği ve kovalent olarak bağlanmış jelatin veya RGD peptitleri içeren hyaluronik asit hidrojellerinde canlılıklarını koruyabildiği gösterilmiştir. Ek olarak, metakrilat HA-bazlı hidrojellere de Michael-tipi konjugat ekleme reaksiyonu uygulanmıştır, ancak metakril grubunun nispeten düşük reaktivitesi nedeniyle hidrojel oluşumu için daha uzun bir jelleşme süresi gerektiği gözlenmiştir. Hidrojelin jelleşmesini hızlandırmak için tiyol ile modifiye edilmiş HA ve PEGDA arasında konjugat ekleme çapraz bağlanma reaksiyonu oluşturularak alternatif bir enjekte edilebilir hidrojel sistemi geliştirilmiştir [115-116]. Micheal tipi ekleme reaksiyonu ile geliştirilen hidrojellerin yanı sıra, literatürde genipinle çapraz bağlanmış hidrojeller hakkında da bir çok çalışma bulunmaktadır, özellikle PEG ile konjugasyonun doku mühendisliği uygulamaları için umut vaadeden enjekte edilebilir hidrojeller oluşturduğu gösterilmiştir [117-127].

### Schiff bazı reaksiyonu ile çapraz bağlanmış hidrojel:

Doku mühendisliği uygulamaları için kullanılmak üzere biyobozunur, enjekte edilebilir ve in-situ biyouyumlu hidrojel geliştirilmesinin bir başka yolu da Schiff bazı reaksiyon mekanizmalarıdır [128-134]. Polisakkarit hidrojel, herhangi bir kimyasal çapraz bağlama maddesi kullanılmadan, ilk olarak suda çözünebilen kitosan ve oksitlenmiş hyaluronik asit jelinden türetilmiştir [128]. Jelleşme, suda çözünebilen N-Süksinil-kitosan ve oksitlenmiş hyaluronik asit aldehit gruplarının amino grupları arasındaki Schiff-baz reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu polisakkarid hidrojel, doku rejenerasyonu için biyo-uyumluluk ve biyo-degradasyon özelliklerinin yanı sıra biyomimetik bir mikro ortam oluşturmaktadır. Dekstran, arap zamkı ve kondroitin sülfat gibi başka birçok polisakkarit, kısmen oksitlenebilir ve Schiff-baz bağı için kullanılabilir [134].

### **2.1.3. Enjekte edilebilir hidrojel uygulamaları**

Enjekte edilebilir biyo-bozunur hidrojel özellikle kemik-kıkırdak hasarları olmak üzere kıkırdak rejenerasyonu, kemik dolgusu veya ameliyat sonrası doku rejenerasyonu gibi bir çok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır. Hidrojelin fiziksel özellikleri, uygulandığı alandaki doğal doku ile eşleşen mekanik özelliklerine kolayca uyacak şekilde tasarlanabilir olmalıdır. Bu hidrojel ayrıca ilaç taşıyıcı sistemler olarak da çalışılmış, bu da uygulama alanlarını oldukça genişletmiştir [135-139]. Hidrojellerin bu uygulamalar için klinik öncesi ve klinik çalışmaları aşağıda açıklanmaktadır.

#### **2.1.3.1. Kıkırdak onarımı**

Doku mühendisliği yardımıyla oluşturulmuş kıkırdak benzeri yapılar büyük bir klinik öneme sahiptir. Eklem kıkırdağının travmatik ve dejeneratif lezyonları, klinik disabilitelerin önde gelen nedenlerindedir [140]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2050 yılında dünya nüfusunun %20'sinden fazlasının osteoartritli olacağı öngörülmektedir [141]. Bu sebeple kıkırdak iyileşmesi ve rejenerasyonu için enjekte edilebilir hidrojel kullanımını yüksek klinik etkiye sahiptir. Kıkırdak onarımı için enjekte edilebilir tedavilerin avantajı, implantın sadece kusur içinde muhafaza edilmesi, neredeyse anında elde edilen ve etkili olan iyileştirici özelliği ve kolay uygulanabilir olmalarıdır. Ek olarak, enjekte edilebilir tedavilerin genel bir avantajı, açık cerrahiye karşılaştırıldığında minimal invaziv cerrahinin kullanılmasıdır. Bu nedenle enjekte edilebilir hidrojel kıkırdak rejenerasyonu alanındaki bir çok çalışmaya konu olmuştur.

### **2.1.3.2. Yumuşak doku rejenerasyonu**

Yumuşak doku rekonstrüksiyonu rekonstrüktif cerrahide önemli bir sorundur. Yumuşak doku yokluğu, örneğin adipoz doku eksikliği, travmatik sebepler veya onkolojik cerrahi sonucu oluşabilmektedir [142,143]. Bu sorun şuan klinikte otolog yağ dokusunun transplantasyonu ile çözülmektedir. Ancak, adipoz doku transplantasyonun klinik sonuçları vaskülerizasyon eksikliğine bağlı olarak değişken greft rezorpsiyonu olduğu için öngörülebilir değildir, bu da önemli bir risk taşımaktadır [144]. Yumuşak dokunun tamir edilmesi için arzu edilen bir strateji, in situdaki adipogenezin indüklenmesidir. Bunun için geliştirilen bir yöntemde adipoz doku oluşturmak için farklılaşabilen hücrelerin bir iskele içine yerleştirilerek adipoz doku oluşumu ile sonuçlanması hedeflenmiştir. Başka bir strateji ise enjektabl sistemlerle doku oluşumunun hızlandırılmasıdır. Bu şekilde, hem sentetik hem de doğal biyomateryallere dayanan birçok enjekte edilebilir hidrojel incelenmiştir. Örneğin, Hemmerich ve diğ. enfekte olmamış adipoz türevi kök hücreler (ASC'ler) ile karıştırılmış enjekte edilebilir hyaluronik asit bazlı jel kullanılarak küçük kusurların rekonstrüksiyonunu bildirmiştir. ASC'ler ve iskele olarak hyaluronik asit kullanılarak yeterli yağ dokusu oluşumu gözlenmiştir [145,146].

Diğer enjekte edilebilir iskele matrisleri arasında biyolojik olarak parçalanabilir polimerik mikroküreler bulunmaktadır. Örneğin, Yüksel ve ark. PLGA'dan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve insülinin salınımını sağlayan mikroküreler ile de novo adipoz doku formasyonunu arttırmıştır [147]. PLGA mikrokürelere ek olarak, enjektabl sistemler olarak hücre dışı matris (ECM) parçacıklarının kullanımı da adipoz doku mühendisliği sistemleri için incelenmiş, jelatin benzeri mikroküreler ile adipoz türevi kök hücrelerin (ASC'ler) proliferasyonu ve farklılaştığı rapor edilmiştir [139,148, 149].

### **2.2. İlaç taşıma sistemleri**

İlaç taşıma sistemleri (DDS), polimer bilimi, biyokonjugat kimyası, farmasötikler ve moleküler biyolojiyi birleştiren disiplinlerarası yaklaşımlara dayanmaktadır [150]. DDS'nin temel amacı, farmakokinetiklerin, farmakodinamiğin, immünojenik olmayan, non-spesifik toksisitenin ve hedef alanın biyo-tanınmasının kontrol altına alınmasına dayanan farmasötik ajanları, istenen farmakolojik etkiyi elde etmek için sistemik dolaşımda taşımaktır [151,152]. DDS'nin geleneksel sistemlere göre başlıca avantajları, farmasötik ajanları belirli bir bölgeye daha seçici bir şekilde vermek, fazla



veya az dozlamayı ortadan kaldırmak (istenilen seviyedeki ilaç seviyelerini korumak), hasta uyumunu artırmak, ilgi hücreleri içinde daha tutarlı emilim sağlamak ve yan etkileri önlemek olarak sıralanmaktadır [153].

Çapı 10 ile 1000 nm arasında değişen boyutlarda olan nanoparçacıklar (NP'ler), büyük yüzey alanı, yüksek adsorpsiyon ve taşıma kabiliyetleri gibi benzersiz özellikleri sebebiyle, ilaç taşıma sistemlerinde yüksek potansiyele sahiptir [154-156]. Nispeten geniş (fonksiyonel) yüzey alanının bir sonucu olarak NP'ler, kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla yüksek miktarda ilaç kapsülleyebilmekte veya sabitleyebilmektedir [157,158]. Bu nedenle, biyo-uyumlu ve biyolojik olarak çözünebilen polimerlerden oluşan NP'ler ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilir [159]. Polimerik nanotaşıyıcılar doğal proteinlerden (albümin, kollajen, jelatin, vb.) veya sentetik polimerlerden (poliakrilamid (PAA), polilaktik asit (PLA), poliglaktolik asit (PGA), poli ( laktit-ko-glikolid) (PLGA), dendrimerler, vs.) sentezlenebilmektedir [160-168].

Günümüzde, biyo-uyumluluk ve biyo-bozunabilirlik gibi fizikokimyasal özelliklerine ek olarak benzersiz çok fonksiyonlu gruplarından dolayı polisakkarit tabanlı nanopartiküller taşıma araçları olarak sıklıkla çalışılmaktadır [156,169,170]. Polisakkarit omurganın çok fonksiyonlu grupları, çeşitli NP'leri sentezlemek için kolay kimyasal modifikasyonlara elverişlidir [171,172]. Bunun yanısıra bazı polisakkaritler, belirli hücre tiplerine spesifiktir, bu da taşıyıcı olarak tasarlanan polisakkaritin hedeflediği hücreyi bularak reseptör aracılı endositoz yoluyla hücreye girmesini mümkün kılmaktadır.

### **2.2.1. Polisakkaritler**

Polisakkaritler, tekrar eden çoklu monosakkaritlerin glikozidik bağlarla oluşturduğu büyük polimerik oligosakkaritlerden oluşan bir karbonhidrat grubudur. Doğada polisakkaritler, bitki (pektin, selüloz, nişasta), hayvan (kitosan, kitin, glikozaminoglikan), mikrobiyal (dekstran, pullulan, ksantan sakızı, gellan sakızı) ve alg (ör., agar, aljinat ve karagenan) kökenli bulunabilmektedir [173,174]. Monosakkarit birimlerinin bileşimine bağlı olarak, polisakkarit homopolimerler (aynı monosakkarit tekrarlarından oluşan glikojen, nişasta, selüloz, pullulan, pektin vb.) veya heteropolimerler ( farklı monosakkarit birimlerinden oluşturulan kitosan, heparin, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat ve dermatan sülfat vb.) olarak sınıflandırılabilirler [175-177]. Polisakkaritler, kolay ulaşılabilir ve modifiye edilebilir, biyo-bozunur ve biyo-uyumlu malzemelerdir. Bunların yanısıra,

toksik karakter göstermemeleri ve biyoaktivitelerinin yüksek olması polisakkaritleri biyomühendislik alanlarında gelecek vaat eden biyomalzemeler haline getirmiştir [178-180]. Ek olarak, polisakkaritlerin reaktif fonksiyonel gruplarının (hidroksil, amino ve karboksilik gibi) sayısı çok fazladır, bu da yapısal ve fonksiyonel bir çok değişikliğe olanak sağlamaktadır [181,182].

Polisakkaritlerin modifikasyonları nükleofiller olarak şeker hidroksil grubu kullanılarak ester ve eter oluşumu, primer alkollerin aldehit ve karboksilik asitlere kimyasal oksidasyonu, primer alkollerin üronik aside enzimsel oksidasyonu, EDC / NHS gibi bağlayıcı ajanlar kullanarak sakkaritlerin karboksil grubu ve heteroatomik nükleofiller arasında amid bağı oluşumu, kitosan benzeri polisakkaridlerin amin gruplarının nükleofilik reaksiyonları gibi metotlarla gerçekleştirilebilmektedir [183]. Biyo-bozunur ve toksik olmayan son ürünler oluşturduklarından, polisakkaritler ve türevlerinin ilaç taşıma sistemi olarak nanopartikül, hidrojel, nanojel vb. potansiyel uygulamaları için çok sayıda çalışma yapılmıştır [184].

### **2.2.2. Polisakkarit nanopartiküllerin sentez mekanizmaları**

Nanopartiküller, polisakkaritlerin yapısal özelliklerine bağlı olarak, polielektrolit kompleksleme, kendi kendine birleşme (self-assembly) , kovalent çapraz bağlama ve iyonik çapraz bağlanma metotları ile sentezlenmektedir [185,186].

#### **2.2.2.1. Polielektrolit kompleksi (PEC)**

Polielektrolit kompleksleri (PEC'ler) en az iki zıt yüklü grup arasında kurulan güçlü elektrostatik etkileşimler ile oluşturulmaktadır [187,188]. PEC oluşumu için özellikle çevreleyen çözültideki iyonların serbest bırakılmasıyla gelişen entropi artışı gereklidir [189]. Kitosan, aljinat, heparin, hyaluronik asit, dekstran sülfat, kondroitin sülfat ve siklodekstrinler gibi katyonik ve anyonik polisakkaritler, moleküller arası elektrostatik etkileşimlerle zıt yüklü polimerler ile PEC oluşturabilmektedir [190,191]. PEC'nin oluşumu ve stabilitesi esas olarak polielektrolitin yapısına, polielektrolitin moleküler ağırlığına, polielektrolitin yüzey yük yoğunluğuna, etkileşimin süresine, polielektrolit kompleksin karışım oranına, çözücünün pH, sıcaklık, iyonik güç vb. özellikleri gibi çevresel faktörlere bağlıdır [192,193]. Boddohi ve diğ. çalışmalarında kitosan-heparin ve kitosan-hyaluronan polikasyon-polianyon çiftleri için farklı yük karıştırma oranlarında polielektrolit kompleks nanopartiküllerin (PCN'ler) oluşumunu göstermiştir [194]. Çalışmada PCN'nin oluşumu için kullanılan polimerazyon ve polianyon çözültülerinin

tek adımlı eklenmesinin, polisakkarit çiftlerinden hem katyonik hem de anyonik nanoparçacıkların oluşumuna olanak tanıdığı rapor edilmiştir.

PEC bazlı nanoparçacıkların avantajları maliyet etkinlikleri, basit uygulanabilir olmaları ve elektrostatik etkileşimlerin uygun koşullar altında tersinir hale getirilebilmesiyle in situ oluşumu mümkün kılmalarıdır [195].

### **2.2.2.2. Kendiliğinden düzenlenme**

Kendiliğinden düzenlenme, doğada sıklıkla görülen yaygın bir süreçtir ve çok çeşitli karmaşık biyolojik yapıların oluşumunu tetiklemektedir [196]. Kendi kendine birleşme sistemlerinde, her bir bileşen (atomlar, moleküller, kolloidler ve polimerler), yüksek sıralı yapılar oluşturacak şekilde önceden tanımlanmış yollarla kendiliğinden organize olmaktadır [197]. Hidrofilik polisakkarit zincirleri (örneğin, heparin, kitosan, dekstran, nişasta ve pullulan) hidrofobik segmentler eklendiğinde amfifilik kopolimerler üretilmektedir [198]. Amfifilik polisakkaritler, sulu ortamda hidrofobik kısımları arasında molekül içi veya moleküller arası etkileşimler kurarak nanopartiküller oluşturma eğilimindedirler [199]. Bu polisakkarit türevli nanoparçacıklar, yüksek mekanik güç, çekirdek-kabuk yapıları küçük parçacık boyutu ve kopolimerlerin hidrofilik / hidrofobik bileşenlerine bağlı olarak yüksek termodinamik stabilite gibi benzersiz özellikler sergilemektedir [200]. Hidrofobik gruplarla türevlendirilen polisakkaritler, hidrofilik dış kabukla çevrelenmiş çekirdek grupları nedeniyle hidrofobik ilaç enkapsülasyonu için ümit vadeden taşıyıcılar olarak kabul edilmektedir [201]. Ayrıca, hidrofilik DDS'ler normal dokular tarafından daha az emildiği ve gelişmiş geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisi ile tümör dokularında birikebildiği için ilaçların toksisitesinin azaltılmasına yardımcı olmaktadır [198]. Ayrıca, F. Alhaique ve diğ. tarafından çeşitli hidrofobikleştirme stratejileri kullanılarak kendiliğinden düzenlenme ile elde edilen pullulan bazlı nanohidrorojeller rapor edilmiştir [202].

### **2.2.2.3. Kovalent çapraz bağlanma**

Polisakkarit nanopartikülleri sentezlemenin diğer yolu, polisakkarit zincirleri arasındaki kovalent bağların dahil edilmesini içeren kovalent çapraz bağlanma mekanizmasıdır [203]. Kovalent çapraz bağlama stratejileri temel olarak radikal polimerizasyonları, Schiff-baz reaksiyonu, tiyol-disülfid değişim reaksiyonu ve fotoreaksiyonları içermektedir [204]. Ek olarak, glutaraldehit gibi farklı türde bir çapraz bağlayıcı, sıklıkla polisakkarit (örneğin kitosan) bazlı NP'leri çapraz bağlamak için kullanılmıştır [205, 206]. Kovalent çapraz bağlanan NP'lerin sentezi, daha stabil NP'lerin oluşmasını

sağlamaktadır, ancak genellikle aktif bileşenle olası istenmeyen yan reaksiyonlar nedeniyle engellenmektedir. Ayrıca bu çapraz bağlayıcıların toksisitesi de kullanımını sınırlandırmaktadır [207]. Bununla birlikte, son zamanlarda biyo-uyumlu çapraz bağlayıcıların farklı formları tanımlanmış ve kovalent çapraz bağlanma yoluyla polisakarit bazlı NP'lerin hazırlanması için kullanılmıştır [208]. Karbodiimid, di- ve trikarboksilik asit (malik asit, tartarik asit, süksinik asit ve trikarboksilik asit gibi) gibi suda çözünebilir yoğunlaştırma ajanları biyo-bozunabilir polisakarit NP'lerin moleküller arası çapraz bağlanmaları için kullanılmıştır [209]. Kovalent çapraz bağlama yöntemi, düşük pH ve nötr koşullarda, hafif alkali sulu ortamda stabil olan polianyonlar, polikasyonlar ve poliampolit NP'lerin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Genel olarak kovalent olarak çapraz bağlanmış polisakarit bazlı NP'ler, çözücü buharlaştırma, emülsiyon çapraz bağlama, sprey kurutma veya termal çapraz bağlama dahil olmak üzere sayısız yöntemle sentezlenebilmektedir [210-212]. Kimyasal çapraz bağlama yoluyla kovalent bağlar yoluyla oluşturulan nanomalzemelerin birincil önemi, in vivo ortamlardaki kolloidal stabilitesidir, bu da jel ağının ayrışması ile tetiklenen ilaç salımı için çok önemlidir [213,214]. J. Berger ve diğ. kovalent ve iyonik olarak çapraz bağlanmış kitosan bazlı hidrojellerin biyomedikal önemini ayrıntılı olarak raporlamışlardır [191].

#### **2.2.2.4. İyonik çapraz bağlanma**

Kovalent çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit ve formaldehit gibi) ile karşılaştırıldığında, iyonik çapraz bağlayıcılar ( magnezyum sülfat, sodyum sülfat ve sodyum tripolifosfat (TPP) gibi), hafif hazırlanma koşulları ve basit deneysel prosedürleri nedeniyle daha avantajlıdır [187, 215]. İyonik çapraz bağlayıcılar, polielektrolit polisakaritleri (hem katyonlar hem de anyonlar) karşı iyonları ile iyonik etkileşim yoluyla jel oluşturma eğilimindedir [216]. Listelenenlere ek olarak, düşük molekül ağırlıklı polianyonlar ve polikasyonlar, polikasyonik ve polianyonik polisakaritler için iyonik çapraz bağlayıcılar olarak hareket edebilmektedir [217]. İyonik çapraz bağlanma yoluyla NP'lerin sentezini etkileyebilen faktörler, polisakaritin türü ve molekül ağırlığı, çözücünün iyonik gücü ve pH'ı, polisakarit konsantrasyonu ve iyonik çapraz bağlayıcının polisakaritlere oranı sıralanmaktadır [218-220]. İyonik çapraz bağlayıcı yoluyla sentezlenen NP'ler, bağlanma kuvvetindeki farklılıklardan dolayı olabilecek kovalent olarak çapraz bağlanmış NP'lerden daha az dayanıklı olarak kabul edilmektedir [185,191].

### **2.2.3. Polisakkarit bazlı nanopartiküller**

Polisakkarit bazlı nanopartiküller, küçük moleküler ağırlıklı ilaçlardan, proteinler, peptidler ve nükleik asitler gibi büyük biyomoleküllere kadar bir çok farmasötik ajanın kontrollü olarak salımı için çalışılmıştır [221]. İlacın fizyokimyasal özelliklerine bağlı olarak enkapsülasyonu için bir çok yöntem geliştirilmiştir ancak en sık kullanılanları aşağıda belirtilmiştir [222,223]:

1. Çapraz bağlayıcı varlığında ilacın nanopartikül solüsyonuna doğrudan eklenmektedir (bu yöntem ilaçların enkapsülasyonu için kullanılmaktadır). Alternatif olarak, farmasötik ajanların çapraz bağlama işleminden sonra solüsyona eklenmektedir.

2. İlacın polimer matrikse kovalent bağlanmaktadır.

Aşağıda en sık çalışılan polisakkarit nanotaşıyıcılar özetlenmiştir.

#### **2.2.3.1. Kitosan bazlı nanopartiküller**

Kitosan, p-1,4'e bağlı glukozamin (2-amino-2-deoksi- $\beta$ -Dglukoz) ve küçük miktarlarda N-asetil glukozamin içeren bir deasetillenmiş kitin (poli-N-asetil glukozamin) türevidir [224]. Kitosan, selülozdan sonra en sık bulunan ikinci polisakkarittir ve reaktif fonksiyonel grupları, biyouyumluluğu, biyo-bozunabilirliği, jel oluşturucu özelliği, toksisite göstermemesi nedeniyle farmasötik uygulamalar için kullanılmaktadır [225]. Kitosan, hidrojen bağlanmasını sağlayan çok fonksiyonlu (polihidroksil ve amino) gruplara sahiptir ve lineer molekül, yeterli bir zincir esnekliği ifade etmektedir [226]. Ayrıca, kitosanın katyonik polielektrolit doğası negatif yüklü mukoza yüzeyi ile güçlü bir elektrostatik etkileşim sağlayarak, hücresel alımı ve hedefe yönelik ilaç salımını arttırmaktadır [227,228]. Kitosan bazlı nanopartikülleri sentezlemek için, iyonik çapraz bağlayıcı (örneğin tripolifosfat (TPP)) veya kimyasal çapraz bağlayıcı (örn., Glutaraldehyd) gerekmektedir [229]. TPP, pozitif yüklü amino grupları olan kitosanla iyonik etkileşim kurabilen, anyonik ve toksik olmayan bir iyonik çapraz bağlayıcıdır [185]. TPP-çapraz bağlı kitosan nanopartiküller ilk kez 1997 yılında Alonso ve arkadaşları tarafından sentezlenmiş ve bildirilmiştir [230]. Halihazırda birtakım kitosan ve kitosan kökenli nanopartiküller farklı protokoller ile sentezlenmiş ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmıştır.

C. Feng ve diğ., kitosan ve karboksimetil kitosandan (CMCS) oluşan doksorubisin hidroklorür (DOX) yüklü muko-yapışkan nanopartiküllerin (DOX: CS / CMCS NP'ler)

formülasyonunu ve karakterizasyonunu bildirmişlerdir [231]. İlaç yüklü nanopartiküller (DOX: CS / CMCS-NP'ler), pozitif yüklü kitosan (CS) ve negatif yüklü karboksimetil kitosan arasında TPP çapraz bağlayıcı varlığında elektrostatik etkileşim yoluyla oluşturulmuştur. CS esaslı nanopartiküllerin düşük DOX yükleme kapasitesi, esas olarak, pozitif yüklü DOX ve negatif yüklü CMCS arasındaki etkileşime bağlı olarak CMCS'nin dahil edilmesinde önemli ölçüde rol oynamıştır [232,233]. Aynı grup, iyonik çapraz bağlayıcı olarak TPP ve CaCl<sub>2</sub> kullanarak CS ve CMCS'ten oluşan DOX yüklü kitosan bazlı nanopartiküller sentezlemiştir [234].

Elektrostatik etkileşime ek olarak, kitosan kendiliğinden düzenlenme yoluyla da nanopartiküller oluşturmaktadır. C. Duan ve diğ. radikal başlatıcı olarak APS ve çapraz bağlayıcı olarak N-N-metilenbisakrilamid (MBA) kullanılarak serbest radikal kopolimerizasyonu yöntemiyle sulu çözelti içinde kitosan aşılınmış poli (N-izopropil akrilamid) (CS-g-PNIPAm) nanopartiküllerini sentezlemiştir. Çalışmada etkili bir anti-kanser ajanı olan Oridonin kendi kendine düzenlenen CS-g-PNIPAm nanopartiküller içerisinde enkapsüle edilmiştir [235].

Ayrıca, kitosan eşzamanlı algılama, görüntüleme teşhisi ve tedavi için duyarlı nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [236-238]. W. Wu ve diğ. kitosan-poli (metakrilik asit) (kitosan-PMAA) içinde CdSe kuantum noktalarının (QDs) in-situ immobilizasyonu ile tümör hücresi görüntüleme ve kontrollü ilaç salımı için yeni bir kitosan bazlı hibrid nanopartikül sentezlemiştir [239]. Kitosan-PMAA nanopartikülleri, MAA monomerlerinin kitosan sulu çözeltisi içinde, N-N-metilenbisakrilamid (MBA) çapraz bağlayıcısının varlığında ve yokluğunda polimerizasyonuyla hazırlanmıştır.

### **2.2.3.2. Heparin bazlı nanopartiküller**

Heparin, 2-O-sülfo-L-iduronik asit, 2-deoksi-2-sülfamino-6-O-sülfo- $\alpha$ -D-glikoz,  $\beta$ -D-glukuronik asit, 2-asetamido-2-deoksi- $\alpha$ -D-glukozun tekrarlayan ana birimleri ile  $\alpha$ -L-iduronik asidin 1  $\rightarrow$  4 glikozidik bağ kurmasıyla oluşturulmuş, yüksek oranda sülfatlanmış, biyoyumlu, biyobozunur, suda çözünür ve doğal bir anyonik polisakkarittir [240]. Heparinin temel olarak antikoagülasyon, anjiyogenez ve tümör büyümesinin inhibisyonunu için kullanılmaktadır [241-243].

Çok sayıda in vivo çalışmada heparinin, kanser metastazında büyük rol oynayan büyüme faktörleri Heparinaz, P- ve L-Selektinler gibi çoklu moleküller ile etkileşime

girme eğilimi olduğu gösterilmiştir [244-246]. Bir dizi çalışma, bir heparan sülfat indirgeyen endoglikosidaz olan heparinazın, kanser patogenezinde nedensel olarak rol oynadığını ve dolayısıyla kanser tedavisi için geçerli bir hedef olduğunu göstermiştir [247]. Kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen heparinaz, hücre dışı matriks degradasyonunu hızlandırarak, metastatik kaskadta kritik olan kanser hücrelerinin ekstravazasyonuna yardımcı olmaktadır [248,249]. Heparin heparinaz ile etkileştiği için, heparinaz aktivitesini inhibe etme eğilimindedir ve bu da kanser metastazını zayıflatmaktadır. Benzer şekilde, heparinin ayrıca hücre-hücre etkileşimleri yoluyla kanser metastazını desteklediği kanıtlanmış P- ve L-Selectins ile etkileşime girerek inhibe etmektedir [250]. Ayrıca, heparin, endotel hücrelerinin proliferasyonunu indükleyebilen fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF) gibi büyüme faktörleri ile bağlanarak anjiyogenezini inhibe edebilir [251]. Buna ek olarak, heparin, kimyasal modifikasyona olanak sağlayan amino, hidroksil ve karboksilik gruplar gibi çok sayıda fonksiyonel gruba sahiptir [252]. En yaygın kullanılan strateji, sırasıyla amidasyon ve esterifikasyon içeren karboksil ve hidroksil grubunun modifiye edilmesidir [253-257]. Tüm bu özellikler dikkate alınarak, heparin bazlı nanomalzemelerin, küçük farmasötik maddelerin ve protein, peptit ve nükleik asit gibi makromoleküllerin taşınımı için uygunluğu araştırılmıştır [254,258]. Heparin, hem fiziksel (iyonik etkileşim, hidrojen bağı ve hidrofobik kuvvet gibi kovalent olmayan çekici kuvvetler aracılığıyla) hem de kimyasal olarak çapraz bağlanmış (amid ve disülfid bağı gibi) nanomalzemeler inşa etmek için kullanılabilir [253].

### **2.2.3.3. Hyaluronik asit bazlı nanopartiküller**

Hyaluronik asit (HA), sinovyal sıvı, camsı sıvı, deri ve göbek kordonu gibi çeşitli yumuşak bağ dokularında yüksek konsantrasyonlarda doğal olarak oluşan sülfatlanmamış bir glikozaminoglikan (GAG) 'dır [259]. HA, alternatif  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarla birbirine bağlanan N-asetil-D-glukozamin ve D-glukuronik asidin tekrarlanan monosakkarit ünitesini oluşturan bir lineer hetero polisakarittir [260]. HA ilk olarak 1934'te Meyer ve Palmer'in çalışmasında sığır gözünden izole edilmiştir [261]. HA, hücreler arası matrisin (ECM) önemli bir parçasıdır. Yapısal stabilizasyon, şok adsorblama, su homeostazisi, eklemlerin kayganlığı ve fizyolojik fonksiyonlarda rol almakta ve sinyalizasyon, yara iyileşmesi, morfojeniz, tümör invazyonu ve matris organizasyonu için yüzey reseptörleri ile etkileşmektedir [262, 263].

Son otuz yıldır, HA ve türevleri klinik olarak tıbbi ürünler olarak kullanılmıştır [264,265] ve HA'nın başlıca terapötik uygulamaları arasında oftalmoloji, cerrahi ve yara iyileşmesi ve ortopedik cerrahi ve romatoloji bulunmaktadır [266-270]. HA, çok fonksiyonlu gruplarından (glukuronik asit, birincil ve ikincil hidroksil grupları ve N-asetil grupları gibi karboksilik asit) dolayı kimyasal olarak modifiye edilebilmekte ve dolayısıyla hidrofobikliği ve biyolojik aktivitesini değiştirebilmektedir [271]. HA'nın en yaygın kimyasal modifikasyon yolları, karboksil gruplarının esterleştirilmesi ve amidasyonu ve HA'nın hidroksil gruplarının eterleştirilmesi ve esterleştirilmesidir [272]. HA'nın bir kısım türevleri, hücrelerin, dokuların ve terapötik ajanların varlığında yeni kovalent bağlar oluşturabilmektedir. Bu türevlerin tersi bir grup olan, monolitik HA türevleri ise, hücrelerin veya dokuların varlığında yeni kimyasal bağlar oluşturamayacak olan "terminal modifiye" HA formlarıdır [273]. Günümüzde çok sayıda araştırmacı tarafından HA bazlı nanopartiküller farmasötik ajanların taşıyıcıları olarak araştırılmıştır. Dirençli tümörler ve kanser kök hücreleri (CSC'ler), hyaluronik aside (HA) bağlanan bir yüzey glikoproteini olan CD44 reseptöründen yüksek miktarda eksprese etmektedir [274]. Bu nedenle, HA'ya konjuge veya HA nanopartikülleri içine kapsüllenmiş farmasötik ajanlar, CD44 reseptörleri yoluyla hücreler tarafından kolaylıkla alınmakta ve aktivite göstermektedir [275]. Marriott C ve diğ. patent çalışmalarında kısaca hyaluronik asit ve lipozom içeren farmasötik bileşimleri tartışmışlardır [276]. HA'nın lipozom stabilitesini arttırdığını ve farmasötik ajanların (örneğin hidrofobik siklosporin A) dermal taşınımını ve ilaç hedefleme kabiliyetini arttırdığını raporlamış, HA-lipozom karışımının, topik ve topikal olmayan şekilde uygulanan farmasötik ajanlar için mükemmel bir taşıyıcı olduğunu göstermişlerdir.

C. Yang ve diğ. tarafından metakrilasyon stratejisi ile DOX taşınımı için enzim duyarlı çapraz bağlama grubu içeren HA nanopartiküller sentezlenmiş ve anti-tümör özellikleri rapor edilmiştir [277]. Wei ve diğ., kanser hücrelerini ve özellikle ilaca dirençli ve CD44 ifade eden kanser hücrelerini etkin bir şekilde tedavi etmek için kolesterol-hiyalüronik asit (CHA) nanopartikül-ilaç konjugatlarını başarılı bir sentezlemiş ve bir çok tümör hücresi üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir [278].

HA, ayrıca, polielektrolitlerin karşı iyonların varlığında çapraz bağlanma yeteneğine dayanan iyonotropik jelasyon yoluyla nanopartiküller oluşturma eğilimine sahiptir [279]. Jain ve diğ., ilacın kolon tümörlerine etkili bir şekilde verilmesi için iyonotropik jelasyon yöntemleri ile 5-flurourasil (5FU) taşıyan HA birleştirilmiş kitosan nanopartiküllerini



(HACTNPs) sentezlemiştir [280]. İyonotropik jelasyon yöntemiyle 5FU yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanmış; Karbodiimid kimyası kullanılarak, kitosan amin grupları ile amid bağı oluşturulmasıyla yüzeyleri HA (1.5 MDa) 'nın karboksilik grubuna birleştirilmiştir.

Hyaluronik asit bazlı nanopartiküller ayrıca kombine terapiler için de kullanılmıştır. Kombine terapiler, ilacın daha düşük dozunun uygulanması yoluyla sistemik toksisitenin azaltılması ve direncin azaltılması ile terapötik etkinliği arttırmayı amaçlayan, kanser tedavisi için ümit verici bir yaklaşım ve bakım standardı olarak ortaya çıkmaktadır [281, 282]. Örneğin, foto ve kemo-terapötik ajanların kombine uygulanması, kanseri tedavi etmede ilaç direncinin üstesinden gelmek için ortaya çıkan bir stratejidir ve kontrollü ışığa duyarlı ilaç salımı, uzun bir süre boyunca sürekli bir terapötik etki elde etmek için kanıtlanmış bir taktiktir [283]. Khatun ve diğ., eşzamanlı ışığa duyarlı kontrollü doksorubisin salınımı ile akciğer kanserinin foto-kemo theranostikleri için HA nanopartiküller sentezlemiştir [284]. Geliştirilen nanopartiküller, disülfid çapraz bağlı hiyalüronik asit ile kaplanmış, ışığa duyarlı, fonksiyonelleştirilmiş grafene kovalent olarak bağlı bir antikanser ilacı (doksorubisin) içermektedir. Bu nanopartiküllerin tümör hücreleri üzerindeki etkisi in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir.

Ayrıca Zhan ve diğ., poli (etilen glikol) -bpoli (2-hidroksietil metakrilat-ko-glisin metakrilamid-DOX) (PEG-b-P (HEMA-co-GMA-DOX)) bazlı yeni bir endozomal pH ile aktive edilebilir DOX ön ilaç nanopartiküllerini bildirmişlerdir [285]. Benzer şekilde H. S. Park ve diğ., HA, pH'ye duyarlı poli ( $\beta$ -amino ester) (PBAE) ve NIR indosiyanin yeşili (ICG) içeren, kanser hücresine spesifik pH ile aktive edilebilir polimer nanopartiküllerini sentezlemiştir [286].

#### **2.2.3.4. Aljinat bazlı nanopartiküller**

Aljinat, hidrojel sentetik ECM'ler olarak yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -D-Mannuronik asit (M birimleri) ve  $\alpha$ -L-Guluronik asit (G birimleri) 'den oluşan, bilinen bir lineer anyon polielektrolit polisakarittir [287]. Aljinatın monosakkarit tekrarları tekrarlanan M birimleri (MM blokları), tekrarlanan G birimleri (GG blokları) veya karışık M ve G birimleri (MG blokları) halinde düzenlenebilmektedir. Aljinatlar daha fazla G blok içeriğiyle, M birimleri bakımından zengin alginatlara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek mukavemete sahip jeller oluşturmaktadır, bunun nedeni G birimlerinin, M birimlerine kıyasla iki değerlikli iyonlar için daha güçlü bir afinite sergilemesidir [288]. Bu nedenle,

monosakkarit tekrarları ve M / G oranı düzenlemesi aljinatın fiziko-kimyasal özelliklerini değiştirmektedir [289].

Diğer polielektrolit polisakkaritleri gibi, aljinat da reaktif olan ve kimyasal modifikasyon (oksidasyon, amidasyon, esterifikasyon, sülfasyon veya konjugasyon gibi) için büyük bir şans sunan, omurga boyunca dağıtılmış polihidroksil ve karboksil grupları gibi çok işlevli gruplara sahiptir [290,291]. Dolayısıyla, çözünürlük ve hidrofobiklik gibi biyolojik ve fizikokimyasal özellikler, modifikasyon tekniğine ve birçok potansiyel uygulama için kanıtlanmış aljinat türevlerine bağlı olarak modifiye edilebilmektedir [292]. Aljinat bazlı nanopartiküller, komşu aljinat zincirlerinin G blokları arasında,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  veya  $Mn^{2+}$  gibi iki değerlikli katyonlar kullanılarak iyonik çapraz bağlanma yoluyla veya anyonik sodyum aljinat çözeltisinin (SA) katyonik ajanlarla elektrostatik etkileşimleri aracılığıyla sentezlenebilmektedir [216,293,294,295].

### **2.2.3.5. Kondroitin sülfat bazlı nanopartiküller**

Kondroitin sülfat (ChoS), bazı bakterilerin yanı sıra hayvanlarda yaygın olarak bulunan lineer, sülfatlanmış bir glikozaminoglikan (GAG), heteropolisakkarittir [296]. Yapısal olarak, ChoS, N-asetilgalaktozamin (GalNAc) ve glukuronik asidin (GlcA)  $\beta$ - (1 → 3) glikozidik bağlar ile bağlanmış alternatif disakkarit ünitelerinden meydana gelmektedir [297]. ChoS, hücre dışı matriksin (ECM) önemli bileşenlerinden biridir ve kemik, kıkırdak, deri, tendon gibi bir çok dokunun bağ dokusunda bulunmaktadır. Anti-enflamasyon, anti-apoptoz, anti-koagülasyon, anti-oksidasyon gibi görevleri bulunmaktadır [298,299]. ChoS, özellikle Osteoartrit (OA) hastalığı için potansiyel bir terapötik ajan olma özelliği taşımaktadır ve Uluslararası Osteoartrit Araştırma Derneği (OARSI) dahil olmak üzere bir çok kuruluşun diz osteoartriti ve romatizması tedavisinde tavsiyeleri arasında önemli yer tutmaktadır [300,301]. Dahası, diğer GAG'lar gibi, ChoS, ilave özellikler elde etmek için türevlendirilebilen çok fonksiyonlu gruplara (hidroksil ve karboksil grupları gibi) sahiptir. Su çözünürlüğü nedeniyle ChoS, sulu çözelti içinde kendi kendine düzenlenen bir nanopartikül içerisine eklenememektedir, bu sebeple nanopartikülleri hazırlamak için çeşitli hidrofobik kısımlar ChoS omurgasına konjuge edilmektedir [302]. W. Park ve diğ. tarafından, ChoS omurgalarına asetilasyon yoluyla hidrofobik gruplar eklenerek tek adımlı bir kimyasal teknikle diyaliz yoluyla ChoS bazlı nanopartiküller sentezlenmiş ve ilaç taşınımındaki kullanılabilirliği rapor edilmiştir [303]. Benzer şekilde, J. Xi ve diğ. başlatıcı olarak potasyum persülfat ve sürfaktan olarak Span-80 kullanılarak ters

mikroemülsiyon polimerizasyonu ile maleoil-asetillenmiş ChoS'den kondroitin sülfat bazlı bir nanopartikülün (NMChS) tasarımını bildirmiştir [304].

### **2.3. Artiküler kıkırdak**

Eklem kıkırdağı, diartrodial eklemlerin oldukça özelleşmiş bağ dokusudur. Başlıca işlevi, artikülasyon için düzgün ve kaygan bir yüzey sağlamak ve düşük sürtünme katsayısı ile yüklerin iletimini kolaylaştırmaktır. Eklem kıkırdağı kan damarlarından, lenfatiklerden ve sinirlerden yoksundur ve sert bir biyomekanik çevreye sahiptir. En önemlisi, eklem kıkırdağı intrinsik iyileşme ve onarım için oldukça sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Bu bağlamda, eklem kıkırdağının korunması ve sağlığı eklem sağlığı için çok önemlidir. Artiküler kıkırdağın yaralanması, önemli kas iskelet morbiditesinin bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Eklem kıkırdağının benzersiz ve karmaşık yapısı eklem problemlerinin tedavisini ve onarımını veya restorasyonunu hasta, cerrah ve fizyoterapist için zorlaştırmaktadır. Eklem kıkırdağının korunması, büyük ölçüde organize mimarisinin korunmasına bağlıdır [305].

#### **2.3.1. Artiküler kıkırdak yapısı ve içeriği**

Eklem kıkırdağı hyalin kıkırdaktır ve 2 ila 4 mm kalınlığındadır. Çoğu dokudan farklı olarak eklem kıkırdağının kan damarları, sinirleri veya lenfatikleri yoktur. Kondrosit adı verilen çok özelleşmiş hücreler ve bu hücrelerin oluşturduğu seyrek dağılımlı yoğun bir hücre dışı matrisinden (ECM) oluşmaktadır. ECM, nonkollagenöz proteinler ve daha az miktarlarda bulunan glikoproteinler ile birlikte, esas olarak su, kollajen ve proteoglikanlardan oluşmaktadır [306,307]. Bu bileşenler ECM içindeki suyu tutmaya yardımcı olmaktadır, ki bu da benzersiz mekanik özelliklerini korumak açısından kritik öneme sahiptir. Kollajen fiber ultrastrüktürü ve ECM ile birlikte, kondrositler çeşitli eklem kıkırdağı bölgelerinde (yüzeysel bölge, orta bölge, derin bölge ve kalsifiye bölge) dağılmış haldedir.

İnce yüzeysel (teğet) bölge, daha derindeki tabakaları stresten korumaktadır ve eklem kıkırdağının kalınlığının yaklaşık % 10 ila % 20'sini oluşturmaktadır. Bu zonun kollajen lifleri (esas olarak tip II ve IX kollajen) sıkı bir şekilde düzenlenmekte ve eklem yüzeyine paralel olarak hizalanmaktadır. Yüzeysel tabaka nispeten yüksek sayıda düzleşmiş kondrosit içerir ve daha derin katmanların korunması ve beslenmesi için bu tabakanın bütünlüğünün korunması gerekmektedir. Bu bölge ayrıca sinoviyal sıvı ile temas halindedir ve kıkırdağın gerilme özelliklerinin çoğundan sorumludur, bu da ekleme uygulanan kayma, gerilme ve sıkıştırma kuvvetlerine direnmesini sağlamaktadır [305].

Yüzeysel zonun hemen altında, yüzeysel ve derin bölgeler arasında anatomik ve fonksiyonel bir köprü görevi gören orta (geçiş) bölgesi bulunmaktadır. Orta bölge, toplam kıkırdak hacminin% 40-60'ını oluşturmaktadır ve proteoglikanlar ile daha kalın kollajen fibrilleri içerir. Bu tabakada, kollajenler eğik olarak düzenlenmektedir ve kondrositler küresel morfolojide ve düşük yoğunlukta. Fonksiyonel olarak orta bölge, kompresif kuvvetlere karşı ilk direnç çizgisidir.

Orta bölgenin altında yer alan derin bölge, radyal bir yerleşimde en yüksek çaplı kollajen fibrilleri, en yüksek proteoglikan içeriği ve en düşük su konsantrasyonunu içermektedir. Kollajen fibrilleri eklem yüzeyine dik olarak düzenlendiği için, derin bölge kompresif kuvvetlere karşı en büyük direnci sağlamakla sorumludur. Bu bölgede kondrositler, kollajen liflerine paralel, eklem hattına dik olarak sütun oryantasyonunda düzenlenmektedir. Derin bölge eklem kıkırdağı hacminin yaklaşık % 30'unu temsil etmektedir [305].

Kalsifiye bölge, kıkırdak katmanlarının en alttaki tabakasıdır. Derin bölgenin kollajen fibrillerini subkondral kemiğe sabitleyerek kıkırdak dokusunun kemiğe sabitlenmesini sağlamaktadır. Bu bölgede, hücre popülasyonu oldukça azdır ve hipertrofik kondrositlerle, tip X kollajenler bulunmaktadır [305].

### **2.3.2. Kıkırdak dejenerasyonu**

Kıkırdak dejenerasyonu osteoartrit gibi hastalıklara bağlı olabileceği gibi, travma kaynaklı olabilmektedir. Sebebi ne olursa olsun, oluşan dejenerasyon her şekilde kıkırdak ECM'sinin bütünlüğünün bozulmasıyla sonuçlanmaktadır ve yukarıda bahsedildiği gibi kıkırdak kan damarı içermediğinden iyileşme yeteneği oldukça kısıtlıdır [308]. Günümüzde son evredeki kıkırdak dejenerasyonu tedavisi için cerrahi girişimlerle eklem alınırken, erken evresi için etkisi kısa süren, geçici tedaviler uygulanmaktadır. Aşağıda erken evre kıkırdak dejenerasyonu için klinikte uygulanan tedaviler açıklanmıştır.

### **2.3.3. Kıkırdak dejenerasyonu için uygulanan tedaviler**

#### **2.3.3.1. Mikrofraktür**

Mikrofraktür, ilk olarak 1980'lerin sonları ve 1990'ların başlarında subkondral kemiğe penetrasyon yöntemi olarak tanıtılmıştır. Bu teknik, mezenkimal kök hücrelerin kemik iliğinden kıkırdak defekti bölgesine göçünü arttırarak defektin tedavisini amaçlamakla birlikte, sıklıkla biyokimyasal ve biyomekanik olarak hiyalin artiküler kıkırdaktan daha

zayıf olan fibrokartilaj oluşumu ile sonuçlanmaktadır [309,310]. Bir vaka serisi çalışmasında, oluşan bu fibrokartilaj dokunun hiyalin doku sağlamlığı olmadan, mekanik eklem kuvvetlerine karşı savunmasız olduğu ve ameliyattan 18-24 ay sonra degrade olduğu gösterilmiştir [310]. Bu bozulmanın özellikle büyük ve patellofemoral eklemden bulunan eklem defektlerinin tedavisinde belirginliği rapor edilmiştir.

Ayrıca, vakaların % 20-50'sinde subkondral kemiğin penetrasyonu nedeniyle, intralezyonel osteofitler gelişmektedir [311]. Bunun yanısıra, bu teknikten sonra uygulanan otolog kondrosit implantasyonunun (ACI) başarı oranının düştüğü belirlenmiştir. Tüm bu sebeplerle kıkırdak lezyonlarında mikrofraktür tekniği uygulaması için spesifik endikasyonlar önerilmiştir. Bu endikasyonlar eklemden lezyonun büyüklüğüne, derinliğine ve lokasyonuna ve hastanın yaşına dayandırılmıştır. Bir çok klinisyen mikrofraktürü hala kıkırdak onarımı için standart olarak kabul etse de, ileriye dönük karşılaştırmalı çalışmalar bu tedavi yönteminin sadece kısa dönemde kıkırdak dejenerasyonunu geciktirebileceğini göstermektedir; ameliyattan 5 yıl sonra, lezyonun büyüklüğüne bakılmaksızın tedavi başarısızlığı beklenilmektedir [312,313].

### **2.3.3.2. Otolog kondrosit implantasyonu (ACI)**

Mikrofraktürün tutarsız sonuçları ACI gelişimini hızlandırmıştır. Bu teknik için, eklemde düşük ağırlık taşıyan bir bölgeden tam kalınlıktaki bir örnek, daha sonra in vitro olarak genişletilen bir kondrosit popülasyonu sağlamak amacıyla artroskopik işlem sırasında biyopsi ile alınmaktadır. Bu işlemle 12-48 milyon kondrosit hücresi elde edilmektedir. Sonrasında yapılan ikinci bir operasyon sırasında alınan bu kondrositler kıkırdak defektine implante edilerek bir membranla örtülmektedir. Böylece, hastanın kendi hücreleri kullanılarak, allojenik hücrelerin veya yabancı maddelerin nakledilmesinden kaynaklanan potansiyel bağışıklık komplikasyonları veya viral enfeksiyonlar önlenmektedir. Bunun yanısıra, otolog osteokondral implantasyonun aksine, küçük biyopsi kondrosit donörü için komplikasyonları en aza indirmektedir [314,315].

ACI'nin pozitif klinik ve fonksiyonel sonuçları 10 yıl üzerindeki takip süreleri ile uzun süreli vaka serileri olan klinik çalışmalarda doğrulanmıştır [316-318]. Diğer klinik çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilse de, ACI'nin düzeltici osteotomi ile birleştirilmesinin öneminden bahsedilmektedir [319-321]. ACI'nin ileriye dönük randomize kontrollü klinik çalışmalarda diğer standart tedavilerden üstün olup olmadığı

tartışmalıdır. ACI ve mikrofraktürün küçük defektler için karşılaştırmalı olarak uygulandığı çalışmalarda ise iki yöntem arasında belirgin bir farklılık belirlenememiş, benzer klinik ve radyografik sonuçlar bulunmuştur [322]. Geniş prospekte sahip karşılaştırmalı çalışmalar yapılarak, ACI'nin az invaziv ve pahalı tekniklere göre daha üstün klinik sonuçlara sahip olduğunun gösterilmesi gerekmektedir.

ACI uygulamasının en önemli dezavantajlarından biri olarak uzun tedavi ve iyileşme süresi ön plana çıkmaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi iki aşamada uygulanan bu tedavinin, işlem prosedürü gereği uygulama süresi zaman almaktadır. Bunun yanısıra defekt bölgesinde oluşan yeni dokunun olgunlaşması ve işlev kazanması için de uzun iyileşme süreleri (6-12 ay) gerekmektedir. Bunun yanısıra, ACI sonrası en sık bildirilen advers olay, kıkırdak defekti içindeki implante hücrelerin kapatılması için kullanılan periosteal flepin hipertrofiye girmesidir. Ayrıca, ön çalışmalar otolog kondrositlerin in vitro kültürde fibrokondrositlere farklılaştığını da göstermiştir [323].

Genel olarak, ACI, kıkırdak kusurlarını tedavi etmek için yararlı bir yöntem olduğunu kanıtlamıştır, ancak yeni dokunun daha hızlı olgunlaşması ve konak doku ile daha iyi entegre olması için, biyomekanik olarak daha stabil matrisler geliştirilmesi gerekmektedir. Dahası, cerrahi operasyon ve ameliyat sonrası fonksiyonel değerlendirmenin bir standardının olmaması, yöntemin etkisinin kesin olarak anlaşılmasında bias oluşturmaktadır.

### **2.3.3.3.Doku-iskelesi bazlı tedaviler**

Matris sentezini ve organizasyonunu yönlendirmek için destekleyici bir iskelenin olmaması, kondrosit implantasyon teknikleriyle tedavi edilen hasta popülasyonlarındaki sonuç değişkenliğinin kısmen de olsa sebebi olarak görülmüştür. Ex vivo çalışmalar, implantasyon sonrası başarılı kıkırdak rejenerasyonunun hem kondrosit proliferasyon oranına hem de hücre karakterinin korunması ve desteklenmesi için hücre taşıyıcısı olarak görev yapan bir 3D matriks içindeki kök hücrelerin farklılaşma kapasitesine bağlı olduğunu göstermiştir [324]. İkinci nesil ACI uygulamaları, kıkırdak defekti bölgesine kondrositlerin implantasyonu için iskele tabanlı yaklaşımların geliştirilmesine odaklanmıştır. İskele temelli yaklaşımlar, iskelesiz uygulan tekniklere göre büyük avantajlara sahiptir. Bu doku iskeleleri; kıkırdak defektinin kontrollü olarak doldurulmasını, daha az bölge komplikasyonunu, daha kolay cerrahi teknik uygulamalarını ve kısa post-operatif iyileşme süresi sağlamaktadır [308].

Ek olarak, kondrositler bir 3D ortamda kültür edildiklerinden, dediferansasyona daha az eğilimlidir ve bu nedenle daha hiyalin benzeri bir kıkırdak oluşturmaktadır [325].

#### Matriks kaynaklı otolog kondrosit implantasyonu (MACI):

Matriks kaynaklı otolog kondrosit implantasyonu (MACI) şu anda klinik pratikte en sık kullanılan iskele-hücre tabanlı kıkırdak onarımı tekniğidir. ACI'ye benzer şekilde, MACI iki cerrahi prosedür gerektirmektedir. İlk ameliyat, hastanın kondrositlerinin izole edildiği otolog dokuların toplanmasını kapsamaktadır. Bir kere izole edildikten sonra hücre popülasyonu in vitro olarak genişletilmekte ve implantasyondan önce kolajen (tip I ve III) membran üzerinde 3 gün boyunca kültür edilmektedir. Bu hücre içeren iskelenin implantasyonu için mini bir artrotomi lezyonu açığa çıkarıldıktan sonra matriks implante edilmekte ve fibrin yapıştırıcı kullanılarak sabitlenmektedir. Hücre barındıran matriks yüzeyi subkondral kemik ile temas edecek şekilde yerleştirilmektedir [326].

Her ne kadar MACI tedavileri umut verici klinik ve histolojik sonuçlara sahip olsa da, MACI'nin mevcut teknikler üzerindeki üstünlüğü kanıtlanmamıştır [326,327]. MACI'yi değerlendirmek için yapılan birkaç prospektif randomize klinik denemeden yalnızca birinde, MACI ve ACI ile tedavi edilen hastalar arasında karşılaştırılabilir klinik, artroskopik ve histolojik sonuçlar bulunmuştur; ancak bu çalışmada da MACI ile tedavi edilen grubun greftinde daha düşük bir hipertrofi gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada ise, MACI veya ACI uygulandıktan 24 ay sonra, Uluslararası Diz Dokümantasyon Komitesi (IKDC) skorları veya Tegner aktivite skorlarında hiçbir farklılık bildirilmemiştir; ancak, Lysholm ve Guillquist diz işlevselliği puanlarına göre ACI tekniğinin MACI'dan daha iyi etkinlik gösterdiği belirlenmiştir [328]. Ayrı bir çalışmada, 4 cm<sup>2</sup>'den büyük kıkırdak defekti bulunan hastalarda MACI tekniğinin mikrofraktürden daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir [308]. Genel olarak, tüm çalışmalar MACI'nın, ≥2 yıl sonra yapılan takiplerinde ACI veya mikrofraktüre göre üstün değil, benzer/ fonksiyonel sonuçlara sahip olduğunu göstermiştir.

#### **2.3.3.4. İntra-artiküler enjeksiyonlar**

Eklem ağrısı, dejeneratif kıkırdağın en önemli semptomudur. Ağrının geçici süreye de olsa dindirilmesi hastanın yaşam kalitesini büyük ölçüde arttırmaktadır. Bu sebeple kullanılan diz boşluğuna uygulanan (intra-artiküler) kortikosteroid, hyaluronik asit ve türevleri vb. enjeksiyonlar, klinikte en sık kullanılan tedavilerdir ve hastaların ağrılarının azaltılmasına operasyon öncesi veya sonrasında yardımcı olmaktadır [329].

Intra-artiküler (IA) kortikosteroid enjeksiyonları dejenerasyonun sebep olduğu ağrıda kısa süreli bir azalma sağlamak ve hastalarda orta ve şiddetli ağrıların giderilmesi için ana tedaviye ek olarak uygulanmaktadır. Hyaluronik asit (HA) enjeksiyonları da etkinlik göstermekte ve dizdeki hafif ağrıda 24 haftaya kadar ağrı azalması sağlayabilmektedir. Ancak HA enjeksiyonları için, bu tedavinin maliyeti hastaların bilgilendirilmeleri gereken önemli bir sorundur. Daha yüksek kalitede kanıtlara ihtiyaç duyulmasına rağmen, son çalışmalar IA platelet zengin plazma enjeksiyonlarının özellikle genç hastalarda ve hafif dejenerasyon vakalarında ağrıyı hafifletmek, diz işlevini ve yaşam kalitesini iyileştirmek için umut verici olduğunu göstermektedir. Güncel literatür ve deneyimlerimiz IA enjeksiyonlarının güvenli ve hasta memnuniyeti için olumlu etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, IA enjeksiyonlarının herhangi birinin kemik ve kıkırdak hasarı olan hastalarda osteofitlerin gerilemesine veya kıkırdak ve menisküs rejenerasyonuna neden olacağına dair hiçbir veri bulunmamaktadır [329].

#### Kortikosteroid enjeksiyonları:

IA enjeksiyonlar için Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) etiketine sahip 5 adet enjekte edilebilir kortikosteroid bulunmaktadır. Bunlar metilprednizolon asetat, triamsinolon asetat, betametazon asetat, betametazon, sodyum fosfat, triamsinolon heksasetonid ve deksametazon içermektedir. Farklı IA kortikosteroid (KS) enjeksiyonlarından sonra fonksiyonel sonuçların karşılaştırıldığı birkaç çalışma yayınlanmış, ancak sonuçlar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir [330-332].

Kortikosteroidler hem anti-inflamatuar hem de immünsüpresif etkiye sahiptir, ancak etki mekanizmaları karmaşıktır. Kortikosteroidler doğrudan nükleer steroid reseptörleri üzerinde etki göstererek çeşitli seviyelerde enflamatuar ve immün kaskadı kesmektedir. Bu sayede vasküler geçirgenliği azaltmakta ve inflamatuar hücrelerin birikmesini, fagositozu, nötrofil süperoksit üretimi, metaloproteaz ve metaloproteaz aktivatörü inhibe etmekte ve prostaglandin ve lökotrienler gibi birçok enflamatuar mediatörün sentezini ve salgılanmasını önlemektedir [333,334]. Bu etkilerin klinik antienflamatuar yansımaları eritem, şişlik, ısı ve iltihaplı eklemlerin hassasiyetinde azalma ve hyaluronik asit (HA) konsantrasyonundaki artış ile göreceli viskozite artışıdır [333,335].



IA kortikosteroid enjeksiyonları, akut ve kronik inflamatuvar durumları tedavi etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. İnflamasyon ve eklem efüzyonu kanıtı olduğunda, kortikosteroid enjeksiyonları ağrının akut ataklarını azaltmakta ve eklem hareketliliğini arttırmaktadır [336]. Ayrıca, kondroliz ile OA arasındaki korelasyon düşünüldüğünde, hastalık alevlenmelerinin kısa süreli tedavisi için IA kortikosteroid enjeksiyonu önerilmektedir [337,338-340]. OA hastalarında randomize kontrollü çalışmalardan IA kortikosteroidlerin etkili olduğuna dair kanıtlar vardır, ancak plaseboya olan faydaları dört haftaya kadar nispeten kısa ömürlü olabilmektedir. Kortikosteroidlerin osteoartiritli hastalar üzerindeki kısa süreli etkinliği doğrulanmıştır ve ayrıca Hepper ve ark. tarafından yapılan sistematik derlemede ve Bannuru ve ark tarafından yapılan analizlerde vurgulanmıştır [341-343]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, IA kortikosteroidlerinin Batı Ontario ve McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi (WOMAC) toplam alt ölçek puanlarında dört haftada plaseboya üstün olduğu gösterilmiştir [344]. Dahası, bazı çalışmalar 26 haftaya kadar olası bir yararı ortaya koymaktadır [345]. Öte yandan, 2006 yılında yapılan Cochrane İncelemesinde, IA KS enjeksiyonları tedavi edilen osteoartirit hastalığında fonksiyonel iyileşme için kanıt olmadığı da belirtilmiştir [341]. IA kortikosteroid enjeksiyon etkinliği için klinik belirteçler de çalışılmıştır. 1995 yılında, Gaffney ve arkadaşları kortikosteroid sırasında sinoviyal sıvının ortak efüzyonu ve başarılı aspirasyonunu bildirmişlerdir [346]. Daha yakın tarihli bir araştırmada, Arden ve arkadaşları da benzer sonuçlar bularak, efüzyon varlığı olduğu ve kortikosteroid enjeksiyonları ile osteoartirit tedavisinin 26 haftaya kadar daha cevaplar verdiği sonucuna varmışlardır [347]. Bununla birlikte, diz OA'sında IA kortikosteroid enjeksiyonuna yanıtın klinik belirleyicileri hakkında bir sistematik derlemede, tutarlı bir yanıt belirteci tanımlanmamıştır [348].

Amerikan Romatoloji Derneği osteoartirit alt komitesi, kortikosteroid enjeksiyonlarının ağrıyı azaltmada etkili bir yöntem olduğunu belirtmektedir [349]. Bununla birlikte, Amerikan Ortopedi Cerrahları Derneği çalışma grubu, kanıtların kortikosteroidlerinin yararı konusunda yetersiz olduğunu ve semptomatik osteoartiritli hastalara yönelik IA kortikosteroidlerin kullanılmasının önerilemediğini yorumlamıştır [350]. Özetle, araştırmalar IA kortikosteroid enjeksiyonlarının önemli bir kırıkta dejeneratif hastalık olan osteoartirit ağrısında kısa süreli bir azalma sağladığını göstermektedir[350].

### Viskozite arttırıcı enjeksiyonlar

HA, hasat edilmiş horoz taraklarından ya da in vitro ortamda bakteriyel fermentasyondan üretilmektedir [351]. FDA tarafından onaylanan enjekte edilebilir hyaluronan ürünleri sodyum hyalüronat, Hylan G-F 20 ve yüksek moleküler ağırlıklı hyalüronan olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon programları 1 ila 5 enjeksiyon arasında değişmektedir ve genellikle hastaların en çok 6 ayda bir enjeksiyonu tekrar almaları gerekmektedir. Her ne kadar temel bilim bulguları düşük molekül ağırlıklı hyaluronik asit ve yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit kullanımının tedavi edici etkilere sahip olduğunu gösterse de, karşılaştırmalı klinik çalışmalar ve meta-analizler diz osteoarititi için yüksek molekül ağırlıklı olanın etkinliğini destekleme eğilimindedir [352-354]. Bununla birlikte, güncel literatür çalışmalarının heterojenliğinden dolayı yetersizdir [352-355].

HA, doğal bir glikozaminoglikan ve sinoviyal sıvı ve kıkırdak matrisinin bir bileşenidir. Sinovyal hücreler, fibroblastlar ve kondrositler HA'yı sentezlemekte ve eklem içine salgılamaktadır. HA, sinoviyal sıvının viskozitesini ve elastik doğasını arttırmaktadır. Normal HA konsantrasyonuna sahip sinoviyal sıvı, yüksek viskozitesi sayesinde yavaş eklem hareketleri sırasında eklemler arası kayganlık sağlayarak eklem hareketlerini kolaylaştırıcı olarak, hızlı eklem hareketleri sırasında ise elastik amortisör gibi görev yapmaktadır [356]. Adaptif yetenek, kıkırdaktaki stres ve sürtünmeyi azaltmaktadır [357]. Ayrıca hücre dışı matriste bulunan proteoglikanlar için omurga oluşturmaktadır. HA antiinflamatuvar, anabolik, analjezik ve kondroprotektif mekanizmalar ile çalışmaktadır [358]. Osteoartrit eklemden, sinoviyal inflamasyon, HA için sinoviyal membranın artan geçirgenliğine yol açmaktadır. Ayrıca, inflamatuvar sitokin ve proteolitik serbest radikallerin yüksek sinoviyal sıvı seviyeleri osteoartrit dizlerdeki HA fonksiyonunu bozmakta ve dejenerasyonun ilerlemesine katkıda bulunmaktadır [359,360]. Bu nedenle osteoarititte hem moleküler ağırlık hem de HA konsantrasyonu azalmaktadır [360,361].

HA enjeksiyonunun, patolojik olarak değişmiş sinoviyal sıvının normal viskoelastik özelliklerini geri döndürdüğü düşünülmektedir [359]. HA'nın sinoviyal sıvının eklemler arası kayganlık sağlama ve şok emici etkilerini geçici olarak onardığı düşünülmektedir. Ayrıca, birkaç çalışma, hyaluronik asit gibi viskozite arttırıcı destekleyici maddelerin, ayrıca sinovyal inflamasyonda azalma, kıkırdak erozyonuna karşı koruma ve HA

üretiminin desteklenmesi gibi hastalık modifiye edici etkilere sahip olduğunu göstermektedir [352,355,362-365].

Bunun yanı sıra, in vivo etki mekanizmaları tam olarak bilinmiyor olmasına rağmen, HA, başka dokularda da dokunun yeniden şekillenmesini teşvik etmektedir. Oftalmoloji ve plastik cerrahide, doku restorasyonunu optimize etmek ve skar doku oluşumunu en aza indirmek için kullanılmaktadır [366,367]. Ayrıca postoperatif peritoneal ve intrauterin adezyonları önlemek için de kullanıldığı bilinmektedir [367]. Son olarak, HA eklemlerde dolaylı ve direkt analjezik aktiviteye sahiptir [364,365].

Viskozite artırıcı destekleyici maddeler, osteoartrit dizin azalan HA'sı ve potansiyel terapötik fizikokimyasal özelliklere dayanan ağrı yönetiminin yerini alarak biyomekanik fonksiyonu iyileştirmek için yaygın olarak uygulanmaktadır [359, 368]. Bununla birlikte, birçok klinik çalışmaya rağmen, HA'nın etkinliği, verilerin belirgin şekilde uyumsuzluğu sebebiyle bir tartışma meselesidir [369]. Yayımlanan metaanalizler arasında, ikisi HA enjeksiyonları için genel bir faydalı etkiyi, dördü küçük bir yararı olduğunu ve ikisi de diz OA için HA enjeksiyon tedavisinin etkili olduğunu destekleyen hiçbir kanıt olmadığını bildirmiştir [329]. Rutjes ve arkadaşları tarafından yapılan incelemede, 12667 hastayı içeren 89 çalışmada, ağrı yoğunluğu veya sıklığı açısından HA'nın klinik açıdan önemli bir yararı bulunmamıştır [370].

Öte yandan, Bannuru ve arkadaşları HA'nın 24 haftaya kadar belirli klinik durumlar için olumlu etki sağladığını, ancak maliyet etkinliğinin yeniden değerlendirilmesinin önerildiğini bildirmiştir [369]. Buna benzer şekilde, İngiltere'deki Ulusal Sağlık Servisi (NHS) de, enjeksiyondan sonra üç aya kadar ağrının azaltılması için 3-5 seri enjeksiyon yapılması gerektiğine dair kanıtlara rağmen, bu tedavinin maliyet etkinliğinin düzenlenmesi gerektiğini OA yönetimine ilişkin kılavuzlarında bildirmiştir [329]. Bireysel olarak incelendiğinde, çoğu çalışma HA'nın pozitif etkilerini bildirmiştir, ancak klinik araştırma metodolojisinde dikkate değer heterojenite vardır [329,371]. Değişken OA şiddeti, değişken dahil etme, dışlama ve değerlendirme kriterleri, HA'nın farklı moleküler ağırlıkları, farklı enjeksiyon çizelgelerine sahip popülasyonlar çalışmalara dahil edilmiştir. Ayrıca, yayın yanlılığı potansiyeli ve gözlenen tedavi etkilerinin klinik öneminin yorumlanması ile ilgili farklılıklar bulunmaktadır [371].

Yakın zamanda yapılan bir incelemede Printz ve arkadaşları diz tedavisi için IA HA enjeksiyonlarının etkilerinin araştırıldığı terapötik çalışmalarla ilgili finansal çıkar

çatışmalarını araştırmışlardır [372]. Sonuçlar, çalışmaların % 63'ünün endüstri tarafından finanse edildiğini göstermiştir. En az bir şirket çalışanın bir yazar olarak yer aldığı çalışmaların hiçbiri diz OA'sının tedavisinde HA enjeksiyonlarının tedavisi için olumsuz herhangi bir yorum bildirmemiştir. Tüm bu datalar sonucunda, güvenilirlik açısından objektif ve finansal çıkar çatışmalarından bağımsız çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Diz osteoartiritine sahip hastalarda intra-artiküler (IA) HA enjeksiyonunun kullanımı güvenlidir [371]. Yöntemin tek olumsuz etkisi % 2 ila % 4 arasında bir oranda görülen enjekte edilen eklemde geçici lokal reaksiyonlar oluşturmasıdır [368,373]. Amerikan Romatoloji Derneği alt komitesi, IA HA enjeksiyonlarının OA tedavisinde kullanımına dair herhangi öneride bulunmamaktadır [338]. Ancak Amerikan Topluluğu Ortopedi Cerrahları semptomatik diz OA'sında IA HA enjeksiyonları kullanılmasını önermemektedir [350].

Özetle, tüm literatür göz önünde alındığında, IA HA enjeksiyonlarının güvenli olduğu ve 24 haftaya kadar dizdeki hafif OA'da ağrı azalması sağlayarak etkinlik gösterebildiği gösterilmiştir. Ancak, maliyet etkinliği önemli bir husustur ve hastaların enjeksiyonun etkinliği hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, hasta beklentilerinin yanında, maliyet etkinliği de göz önünde bulundurularak tedaviye karar verilmelidir.

### **2.3.3.5. Platelet Zengin Plazma (PRP) tedavisi**

Platelet zengin plazma (PRP) otolog olarak kanın santrifüj edilerek trombositlerin konsantre hale getirilmesiyle hazırlanmaktadır. Santrifüj sonrası kanın platelet (trombosit) miktarı normal kana göre 4-5 katına çıkmaktadır [374].

PRP için farklı hazırlama yöntemleri bulunmaktadır. Her yöntem farklı kompozisyona sahiptir ve farklı trombosit oranları gibi farklı özelliklere sahip ürünler vermektedir. Ehrenfest ve arkadaşları çift eğirme ve tek eğirme yöntemleri ve seçici kan filtrasyonu olarak üç yöntem tanımlamışlardır [375].

PRP uygulanırken kalsiyum klorür ilavesiyle aktive edilmektedir ve bu aktivasyon platelet jeli oluşumunu ve büyüme faktörleri ve biyoaktif moleküllerin salınımını tetiklemektedir [376]. Böylece, trombositler yaralanan bölgeye geniş bir spektrumda büyüme faktörleri (insülin benzeri büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü b-l, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve diğerleri) ve diğer aktif moleküller (sitokinler, kemokinler, araşidonik asit metabolitleri gibi) sağlayarak iyileştirme mekanizmasına

aktif olarak katılmaktadır [377]. Bu faktörler, kondrojenez, kemiğin yeniden modellenmesi, proliferasyon, anjiyogenez, antiinflamasyon, pıhtılaşma ve hücre farklılaşması gibi PRP'nin kapsamlı rollerine katkıda bulunmaktadır [378,379].

OA'lı hayvan modelleri üzerine yapılan deneysel çalışmalarda PRP'nin kondrosit apoptozu ve OA ilerlemesini inhibe ettiği ve artiküler kıkırdaktaki proteoglikan miktarını arttırdığı gösterilmiştir [380]. Ancak, PRP formülasyonları karmaşıktır ve etki mekanizmalarının sorularının çoğu henüz belirlenememiştir [381]. Yakın zamanda yapılan bir derlemede, Andia ve ark. PRP'lerin yararlı etkilerine aracılık eden efektörlerin tanımlanmamış olmasına ve trombositlerin 300'den fazla protein içeriklerinden dolayı, araştırmanın karmaşık olmasına rağmen, bu tedavinin, anabolik yanıt oluşturarak endojen bir kıkırdak koruma kaynağı olarak rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır [382].

PRP, birçok büyüme faktörü ve biyoaktif molekülleri konsantre halde elde etmek için uygulanan basit, düşük maliyetli ve minimal invaziv bir yol sağlayan bir kan ürünüdür ve kullanımı inflamasyon ve ağrının azaltılması ile olası kıkırdak rejenerasyonu ile ilişkilidir. En önemli sorun, PRP'nin bu potansiyel terapötik etkisinin altında yatan mekanizmaların yeterince aydınlatılmamış olmasıdır. Ayrıca, OA'nın tanısal özgüllüğünü iyileştirmek için biyokimyasal ve görüntüleme biyobelirteçlerinin olmaması ve hastalığın değişkenliği, PRP terapilerinin etkinliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle, dizde OA hastalığı için PRP tedavisini desteklemek için iyi tasarlanmış klinik çalışmalardan elde edilen güçlü kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır [381]. Sánchez ve arkadaşları ilk olarak bir hastada artiküler kıkırdak avülsiyonunu tedavi etmek için büyüme faktörleri açısından zengin plazma enjeksiyonunu tanımlamışlardır [383]. Daha sonra, retrospektif bir çalışmada, bu yöntemin kullanılabilirliği ve güvenilirliği hakkında olumlu ön sonuçlar bildirilmiştir [384]. Sampson ve arkadaşları diz OA'ından etkilenen 14 hasta için dört hafta aralıklarla üç grup IA PRP enjeksiyonu gerçekleştirmiş ve 12 aylık takipte hastaların çoğunda olumlu bir sonuç bildirmişlerdir [385]. Bir başka çalışmada ise, PRP enjeksiyonlarının medyan etki süresinin 9 ay olduğu ve düşük OA dereceli genç hastalarda daha iyi yanıtlar verdiği gösterilmiştir [386].

Bugüne kadar yapılan klinik çalışmalarda PRP kullanımının güvenli olduğu gösterilmiştir, hiçbir ciddi komplikasyon bildirilmemiştir. Tekrarlayan IA enjeksiyonları ile ilişkili yan etkiler nadiren birkaç gün süren hafif ağrı, şişlik ve hafif efüzyon olmuştur

[329,386]. Bunun yanısıra, tedavi Amerikan Ortopedi Cerrahları Derneği çalışma grubu tarafından incelenmiş ancak kullanımının yararına dair anlamlı bir sonuç belirlenmemiştir [350].

Özetle, çalışmalar PRP'nin ağrıyı hafifletmek, diz işlevini ve yaşam kalitesini iyileştirmek için umut verici olduğunu göstermektedir [381,385, 387]. Ancak, PRP'nin osteofit oluşumunun gerilemesini veya menisküs ve kıkırdak rejenerasyonunu sağlayacağı konusunda hiçbir veri yoktur. Genç hastalarda ve hafif OA vakalarında daha umut verici sonuçlar ortaya çıkmakla birlikte, artan PRP klinik uygulamasına rağmen, tedavinin net bir klinik iyileşmeye sebep olduğu yüksek kaliteli kanıtlar ile desteklenmemektedir [329].

#### **2.4. Gen terapisi**

Genomdaki hemen hemen her dizi ve transkriptomdaki her kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan RNA, eksojen nükleik asitlerin hücreye sokulması yoluyla terapötik amaçlar için gerektiği şekilde değiştirilme potansiyeline sahiptir. Son yıllarda, pek çok çeşitli hastalıkların tedavisi veya önlenmesi için gen bazlı tedavinin klinik uygulaması araştırılmıştır [388]. Bununla birlikte, klinik denemelerde başarı, çeşitli teknik engeller nedeniyle sınırlı kalmıştır. Gen tabanlı terapinin temel mühendislik problemi, güvenli ve etkin taşıma vektörlerinin geliştirilmesidir. Klinik çalışmalarda hem viral vektörler hem de viral olmayan vektörler sistemik uygulama için kullanılmaktadır [389]. Gerçekte, bugüne kadar gerçekleştirilen gen terapisi klinik deneylerinin yaklaşık % 70'i, genleri sunmak için retrovirüsler, lentivirüsler, adenovirüsler ve adeno-ilişkili virüsler (AAV'ler) gibi modifiye virüslerin kullanıldığı viral deneylerden oluşmaktadır. Viral vektörler gen terapisi çalışmalarını oldukça geliştirmiş olsalar da, uygulamalarında karsinogenez, immünojenisite, geniş tropizm, sınırlı DNA paketleme kapasitesi ve vektör üretiminin zorlukları gibi sınırlamaları mevcuttur [390]. Buna alternatif olarak çalışılan viral olmayan gen terapisi, özellikle güvenlik açısından, bu sınırlamaların çoğunu ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Örneğin, sentetik taşıyıcıların viral vektörlere göre daha düşük immünojenisiteye sahip olma eğilimi vardır ve hastalar bazı viral sistemlerde olduğu gibi taşıyıcı için önceden geliştirilmiş bir bağışıklığa sahip değildirler [391]. Aynı zamanda viral vektörlere göre daha fazla miktarda genetik materyal taşıma potansiyeline sahiptirler ve sentezlenmesi çok daha kolaydır [391].

İlk aşamada terapötik nükleik asitleri etkili oldukları alanlarına taşımak için bir çok sentetik vektör geliştirilmiştir. Ancak, virüsler genomlarını memeli hücrelerine verimli

bir şekilde ulaştırmak için evrimleşmişken, geliştirilen sentetik vektörler karşılaştıkları engelleri aşmakta sorun yaşamıştır. Bu dezavantaj, materyal bilimindeki gelişmelere bağlı olarak taşıyıcı vektörler olarak yeni polimerler ve lipidler ortaya çıkardığı gibi, nanoteknolojinin hızlı ilerlemesinden dolayı, gen teslimatı için nano boyutlu malzemelerin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [392,393]. Dahası, nükleik asit kimyasındaki son gelişmeler, RNA moleküllerinin immünojenisitesini azaltırken, daha güçlü bir etki ve stabiliteye sahip olmasını sağlamıştır [394-396].

Gen terapisi (plazmidler, RNA interferansı) için kullanılan stratejiye bağlı olarak taşıyıcının gitmesi hedeflenen kompartman, çekirdek veya sitoplazma, ve taşınma yolu farklılık göstermektedir. Viral olmayan vektörlerin büyük bir çoğunluğu, negatif yüklü fosfat gruplarının kompleksleştirilmesi yoluyla nükleik asit ile etkileşime giren katyonik polimerlerin veya lipidlerin kullanımına dayanmaktadır. Son zamanlarda, yeni taşıyıcı tasarımları için nükleik asitlerin yapısal özellikleri ve bunların hücreye alınma yolları dikkate alınarak bir çok çalışma yapılmıştır [397]. Mezenkimal kök hücre (MSC) gibi birincil hücrelerin transfekte edilmesi zordur [398], bu durum nükleik asitlerin korunması ve taşınması için orijinal, tekrarlanabilir, güvenli ve verimli taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için araştırmaları tetiklemiştir [399-401]. 2006 yılında Mac Mahon ve diğ. sıçan MSC'sinin sadece % 25'inin Lipofectin (ticari taşıyıcı) ile transfekte edildiğini, bu oranın adenovirüs ve lentivirüs için % 95'e kadar çıkabildiğini bildirilmiştir [402]. O zamandan beri, transfeksiyon oranını virüslerdeki gibi yüksek immün yanıt oluşturmadan arttırmak için pek çok çalışma yapılmıştır. Kök hücrelerin transfeksiyonu için kullanılan viral olmayan taşıyıcıların listesi aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir [403] (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2:** Kök hücrelerin transfeksiyonu için kullanılan viral olmayan taşıyıcılar [403]

Vektör Çeşidi	Vektör Adı	Nükleik Asit Türü ve Hedefi	Hücre Türü	Hücre Yüzdesi	Ölüm	Transfeksiyon Verimliliği (Hücrelerin Yüzdesi)	Gen / Protein İfadesine Etkisi
<b>Hücre Penetran Peptitler (CPP)</b>	Düşük Moleküler Ağırlıklı Protamin (LMWP)	miRNA-29b (pozitif osteogenez regülatörü)	hMSC (kaynak kesin değil)	<%5 (4. gün)		%95	COL1A1 dışında osteojenik belirteçlerde (ALP, OPN, TAZ, RunX2 ve OCN) gelişim ve mineralleşme gözlemlenmiştir.
<b>İnorganik</b>	Nano-hidroksiapatit parçacıkları (nHa)	antagomiR-16b	hBMMSC	%20 (3. gün), <%5 (7.gün)		%40	MiR-16 ifadesinin %95'ten fazla yok olduğu gözlemlenmiştir.
<b>İnorganik ve Polimer</b>	PEI ile kaplanmış manyetik NP	miRNA-335 (TNC ve RUNX2)	hBMMSC	%15		%75	MiR-335 seviyesinde 1000 kat artış, TNC'nin %70 inhibisyonu, RUNX2'nin %50 inhibisyonu gözlemlenmiştir.
<b>Silika</b>	PEI ile kaplanmış NP	pDNA GFP	hBMMSC	Data Yok		%95	İn-vitro ve in-vivo olarak indüklenen GFP ifadesi (fare) gözlemlenmiştir.



**Çizelge 2.2:** Kök hücrelerin transfeksiyonu için kullanılan viral olmayan taşıyıcılar [403] (devamı)

Vektör Çeşidi	Vektör Adı	Nükleik Asit Türü ve Hedefi	Hücre Türü	Hücre Yüzdesi	Ölüm	Transfeksiyon Verimliliği (Hücrelerin Yüzdesi)	Gen / Protein İfadesine Etkisi
<b>Lipit</b>	TransIT-TKO®	siRNA GFP, BCL2L2 ve TRIB2	hMSC	%30 GFP, %40 TRIB2 ve %45 BCL2L2	%40	Data Yok	%80 GFP, %50 BCL2L2,%60 TRIB2 ifadesinde azalma gözlemlenmiştir.
	Lipofectamine®2000	siRNA GFP & pDNA GFP	hMSC	pDNA %15, siRNA %6	%15	pDNA %50 siRNA: %92	GFP gen ifadesinde %98 azalma gözlemlenmiştir.
	Lipofectamine®2000	pDNA Lusiferaz	hBMMSC	%25		Data Yok	RLU artışı gözlemlenmiştir.
	Stereozomlar	siRNA Noggin	mADMSC	%10		%96	%45 Noggin inhibisyonu gösterilmiştir.
	Lipofectamine®RNAiMAX	antagomiR-221	hBMMSC	Data Yok		Data Yok	%95 miR-221 inhibisyonu gösterilmiştir.
<b>Polimer</b>	PEI kaplı PLGA NP'ler	pDNA SOX9/siRNA Cbfa	hBMMSC	%25		%51	SOX9'un indüklenmiş ifadesi ve Cbfa-1 mRNA ortak taşınımının yokluk seviyesi gösterilmiştir.
	PAMAM dendrimer	pDNA BMP2	rBMMSC	%30		Data Yok	Artmış ALP ve osteokalsin, düşük BMP2 seviyesi gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2:** Kök hücrelerin transfeksiyonu için kullanılan viral olmayan taşıyıcılar [403] (devamı)

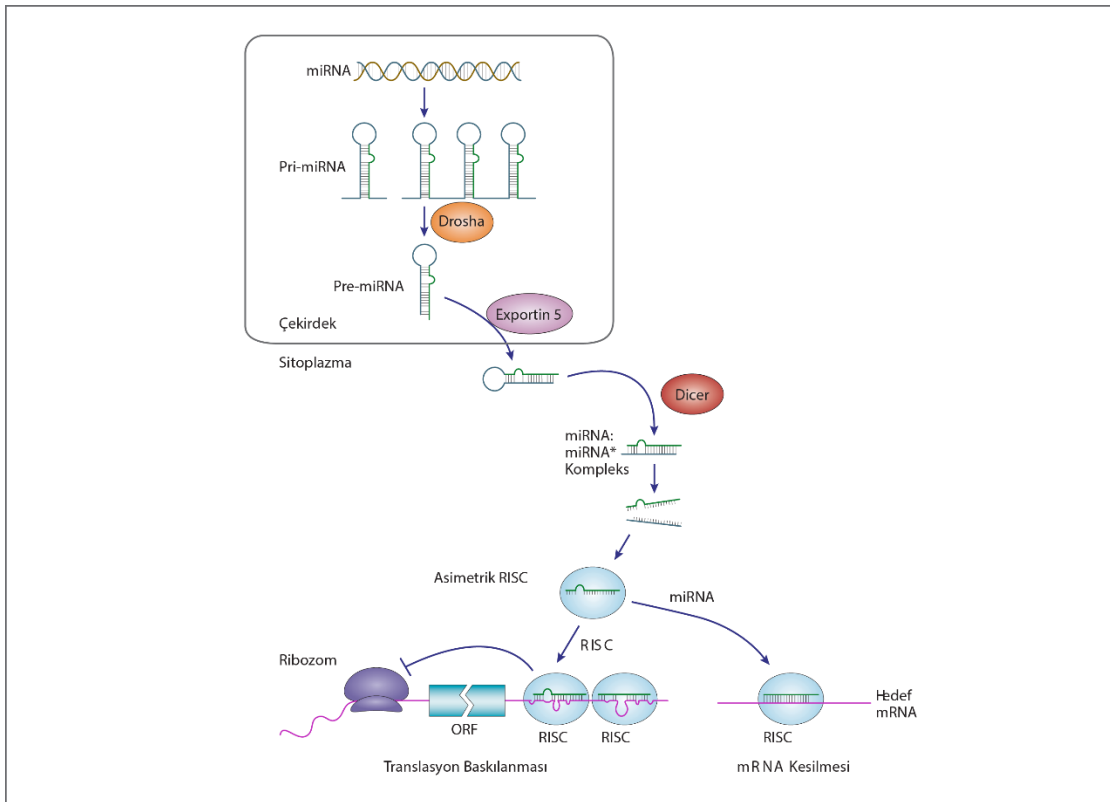
Vektör Çeşidi	Vektör Adı	Nükleik Asit Türü ve Hedefi	Hücre Türü	Hücre Yüzdesi	Ölüm	Transfeksiyon Verimliliği (Hücrelerin Yüzdesi)	Gen / Protein İfadesine Etkisi
<b>Polimer</b>	pH'a duyarlı miseller	siRNA GFP	hBMMSC	<%5		%100	%75 GFP azalması gösterilmiştir.
	pH'a duyarlı miseller	siRNA Lusiferaz ePalmitik Asit (PA)	mBMMSC	<%20		Data Yok	siRNA NP ile gen ifadesinde %10, 10 nM siRNA-PA konjugatları NP ile %70 azalma gösterilmiştir.
	PEI-Hyaluronik Asit	pDNA GFP	hMSC	%15		%33,60	Data Yok
	Poli-b aminoesterler	siRNA GFP & BCL2L2	hMSC (kaynak kesin değil)	%10		Data Yok	%60 GFP yok oluşu gözlemlenmiştir. BCL2L2'nin inhibisyonu artmış kalsiyum içeriği ile sonuçlanmıştır.
	Siklodekstrin modifiye dendritik poliamin	siRNA GFP	Kaynak Belirli Değil	<%5		Data Yok	%80 oranında GFP gen ifadesi azalmıştır.
	Spermin-Polisakkarit (Pullulan, dekstran, mannan)	pDNA Lusiferaz	rBMMSC	%30 Pullulan %72, dextrans %47, mannan		%36	Lipofektamin yerine pullulan ile daha yüksek lusiferaz, dekstran için 2 kat daha yüksek gen ekspresyonu gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2:** Kök hücrelerin transfeksiyonu için kullanılan viral olmayan taşıyıcılar [403] (devamı)

Vektör Çeşidi	Vektör Adı	Nükleik Asit Türü ve Hedefi	Hücre Türü	Hücre Ölüm Yüzdesi	Transfeksiyon Verimliliği (Hücrelerin Yüzdesi)	Gen / Protein İfadesine Etkisi
<b>Polimer</b>	Etilendiamin-modifiye Polisakkarit	pDNA TGF-b1	rBMMSC	<%5 Konfokal mikroskopi ile değerlendirilmiştir (nükleer kollokasyon).	100 kat daha yüksek	Serbest pDNA'ya kıyasla TGF-b1 ifadesi gösterilmiştir.
	PLL Kitosan / Tripolifosfat / Hyaluronik Asit (CTH) NP	Palmitik Asit pDNA GFP	rBMMSC	Data Yok	%76	%22,70 değişim gösterilmiştir.
<b>Polimer ve Peptit</b>	AntimiRNA-138	rBMMSC	<%20	%70	%60	miR-138 inhibisyonu gösterilmiştir.
	RGD peptidi ile PAMAM dendrimerler	pDNA GFP ve BMP2	rBMMSC	<%5	%30. Konfokal mikroskopi ile değerlendirildi (nükleer kollokasyon)	Gen ekspresyonu, fonksiyonel olmayan PAMAM ile karşılaştırıldığında RGD sayesinde önemli ölçüde artmıştır.

### 2.4.1. Mikro RNA:

Kodlayıcı olmayan RNA'lar, bakterilerde kopya sayısı kontrolünden memelilerdeki X kromozomunun inaktivasyonundan kadar düzenleyici olayların şaşırtıcı şekilde pek çoğuna katılmaktadır [404,405]. Mikro RNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyen 21–25 nükleotit uzunluğunda kısa zincirli bir RNA ailesidir [406-408]. MiRNA ailesinin üyeleri başlangıçta *Caenorhabditis elegans*'da gelişimsel geçişleri düzenleyen kısa temporal RNA'lar (stRNA'lar) olarak keşfedilmiştir. Geçtiğimiz yıllarda, stRNA'ların mikro RNAların prototipleri olduğu anlaşılmış ve solucan, sinek, bitki ve memelilerde yüzlerce mikro RNA keşfedilmiştir. MiRNA'ların işlevleri, gelişimsel düzenlenmeyle sınırlı değildir. Farklı ifade kalıplarına sahip oldukları ve hücre farklılaşması, metabolizma, proliferasyon, apoptoz gibi gelişim ve fizyolojinin birçok yönünü düzenledikleri bilinmektedir [406,407,409,410]. MiRNA'ların hedef genleri düzenledikleri mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, miRNA'ların RNA interferansı (RNAi) yolağına girdikleri kesin olarak bilinmektedir. Aşağıdaki şekilde RNA interferans mekanizması açıklanmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: RNA interferans mekanizması [411].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kondroitin sülfat metakrilat sentezi:

Ağırlıkça %10- %25 kondroitin sülfat (C9819, Sigma-Aldrich, Almanya) PBS içinde çözüldükten sonra 0,55 – 4,4 mL hacim aralığında metakrilik anhidrit (MAAH) (64100, Sigma-Aldrich, Almanya) damla damla çözeltiye eklenmiş ve reaksiyon pH'sı 5N sodyum hidroksitle 8.0 dolayında sabit tutulmuştur. Oda sıcaklığında 3 saat süren reaksiyon sonrasında +4°C'de 24 saat bekletilen çözelti sonrasında PBS ile 2 kat seyreltilmiş ve 12-14 kDa gözenek çaplı diyaliz membranında 40°C sıcaklıkta 4 gün boyunca distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Çözelti sonrasında 5 gün boyunca da liyofilize edilerek hidrojel sentez ve karakterizasyon basamaklarına hazır hale getirilmiştir [412].

#### 3.2. Jelatin metakrilat sentezi:

Tip A jelatinin (G2500, Sigma-Aldrich, Almanya) fosfat tamponu (PBS) içindeki ağırlıkça farklı çözeltileri 20 mL hacimde 60°C'de tamamen çözüldükten sonra 2-10 mL metakrilik anhidrit (MAAH) damla damla çözeltiye eklenmiş (100µL / dakika) ve çözelti sıcaklığının 60°C'yi geçmemesine dikkat edilerek 4 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. 12-14 kDa gözenek çaplı diyaliz membranında 40°C sıcaklıkta 4 gün boyunca distile suya karşı bekletilen çözelti 5 gün boyunca liyofilize edilmiş ve elde edilen beyaz köpük şeklindeki ürün dondurucuda saklanarak karakterizasyon ve hidrojel sentez işlemlerinde kullanılmıştır [413].

#### 3.3. CSMA ve GELMA hidrojellerinin sentezi:

Ağırlıkça %5 -%35 liyofilize formdaki GelMA ve CSMA, ağırlıkça %0.5 fotobaşlatıcı (2-hidroksi-1(4-(hidroksietoksi)fenil)-2-metil-1-propanon, Igracure 2959) içeren PBS içerisinde 60°C'de çözülmüştür. Çözeltilerden uygun hacimde alınan örnekler 24 kuyucuklu doku kültür kapları içinde 365 nm dalga boyunda ultraviyole radyasyona maruz bırakılmış ve çapraz bağlanma sonrası da PBS içinde muhafaza edilmiştir.

#### 3.4. CSMA:GELMA hidrojellerinin reoloji deneyleri:

Reolojik analizler jellerin viskoelastik ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. Tüm formülasyonların %1 uzama değerinde frekans taraması gerçekleştirilmiş ve G', G'' modülüs değerleri belirlenmiştir (Malvern Kinexus Pro Reometre, İngiltere) [414]. Bu analizde ayrıca hazırlanan jelin enjekte edilebilirliği de 3 basamaklı kayma hızı prosedürü ile test edilmiştir. Hazırlanan jellere öncelikle 30 saniye boyunca %1 kayma

hızı uygulanmış ve viskozite grafiği çizilmiş sonrasında ise 5 saniye boyunca %200 kayma hızına maruz tutularak bir enjektörden geçirilmesi simüle edilmiş, basınç altındaki viskozitesi belirlenmiştir.

### **3.5. CSMA:GELMA hidrojellerin şişme deneyleri:**

Hidrojel tabakalarının şişme davranışları jellerin liyofilize formlarının ağırlıklarının ( $W_k$ ), PBS ortamında pH 7.4'te, 37°C'de 6 saat inkübasyonları sonrasında elde edilen ıslak ağırlıklarına ( $W_y$ ) oranı ile, aşağıdaki eşitliğe (eşitlik 1) göre belirlenmiştir:

$$\text{Şişme oranı} = (W_y - W_k) / W_k$$

### **3.6. CSMA:GELMA hidrojellerinin degradasyon deneyleri:**

Degradasyon deneyleri için hidrojeller PBS ortamında pH 7.4'te, 37°C'de hafif çalkalamada, çalkalamalı su banyosu içerisinde gözlemlenmiştir. Her günün sonunda hidrojeller liyofilize edilerek tartılmış ( $W_g$ ) ve ilk günkü ağırlıklarına ( $W_0$ ) göre degradasyon yüzdeleri, aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Degradasyon yüzdesi} = (W_0 - W_g) / W_0 \times 100$$

### **3.7. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin sentezlenmesi:**

0.6125 mg / mL (3.8 uM) kitosan (50494, Sigma-Aldrich, Almanya) ve 1.25 mg / mL (0.83uM) hyaluronik asit (251770010, Acros Organics, ABD) nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüştür. Boş HA/CS nanopartikülleri, HA çözeltisinin kütlece farklı oranlarda kitosan çözeltisi üzerine eklenmesiyle, iyonotropik jelleştirme teknikleri kullanılarak elde edilmiştir [415]. Nanopartikül çözeltileri kütlece 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 6, 1: 10 HA: CS oranları ile hazırlanmıştır. Özetle, 50 ul TPP (çapraz bağlayıcı) (328503, Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonu ilk olarak 0.83M HA çözeltisi ile karıştırılmış ve elde edilen HA-TPP çözeltisi, farklı hacimlerde kitosan çözeltilerine manyetik karıştırıcı üzerinde yüksek hızda karıştırılırken damla damla ilave edilmiştir. Solüsyonlar 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra nanopartikülleri stabilize etmek için oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Nanopartiküller daha sonra 3500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatantlar toplanmıştır. Nanopartiküllerin boyut-yük analizleri Zeta-sizer cihazında yapılmıştır (NanoZSP, Malvern, ABD).

Boş ChoS (HA/CS) nanopartiküller iyonik etkileşim yoluyla HA/CS nanopartiküller oluşturulduktan sonra üzerlerine farklı miktarlarda kondroitin sülfat çözeltisinin, manyetik karıştırıcı üzerinde damla damla eklenmesiyle oluşturulmuştur. HA/CS nanopartiküller 2,29 uM (1mg ChoS), 3,44 uM (1,5 mg ChoS), 4,59 uM (2 mg ChoS),

5,73 uM (2,5 mg ChoS), 6,88 uM (3 mg ChoS), 8,03 uM (3,5 mg ChoS), 9,17 uM (4 mg ChoS), 10,32 uM (4,5 mg ChoS), 11,47 uM (5 mg ChoS), 13,76 uM (6 mg ChoS) miktarlarıyla etkileştirilmiştir. Kondroitin sülfat çözeltilerinin damla damla eklenmesinden sonra çözeltiler 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak nanopartikülleri stabilize etmek için oda sıcaklığında 20 dakika daha inkübe edilmiştir. Nanopartiküller daha sonra 3500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatantlar toplanmıştır. Nanopartiküllerin boyut-yük analizleri Zeta-sizer cihazında yapılmıştır (NanoZSP, Malvern, ABD).

### **3.8. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin stabilite deneyleri:**

Nanopartiküller mikro RNA ile etkileştirilmeden önce deiyonize su, PBS ve % 10 serum içeren DMEM içerisinde 37°C'de hafif karıştırma altında süspanse edilmiştir. Nanopartiküllerin bozunma profilleri, dinamik ışık saçılımı (DLS) metodu kullanılarak boyutlarının 1., 2. ve 3. günler analiz edilmesi yoluyla belirlenmiştir (Nano ZSP, Malvern, ABD).

### **3.9. HA/CS nanopartiküllerin mikro RNA-149-5p enkapsülasyonu:**

Deneyler sentetik mikro RNA-149-5p (MicroRNA mimic, Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Mikro RNA'nın kapsüllenmesi için, 0.1 mM mikro RNA çözeltileri ilk olarak 1 mL TPP-HA çözeltisi ile karıştırılmış, daha sonra 1: 1, 5: 1, 10: 1, 15: 1, 20: 1, 25: 1, 30: 1 N:P oranları ile kitosan çözeltisine yavaş yavaş eklenmiştir. Reaksiyon 38°C'de gerçekleştirilmiştir. N:P oranı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır [416]:

$$m (\text{polimer}) = n (\text{mikro RNA}) \times \text{fosfat grubu sayısı} \times \text{MW (protonlanabilir birim)} \times (\text{N:P})$$

m, gerekli polimer kütlesini, n ise gerekli mikro RNA'nın mol sayısını temsil etmektedir. Kitosanın protonlanabilir biriminin molekül ağırlığı aynı ticari ürünün kullanıldığı yayınlar referans alınarak 165 Da olarak kabul edilmiştir [417]. Bu tez çalışmasında kullanılan mikro RNA 149-5p 23 nükleottiten ve tek zincirden oluştuğu için fosfat grup sayısı sayısı 23 olarak alınmıştır.

ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle mikro RNA etkileştirilme deneylerinde ise, Chos (HA/CS) nanopartiküller yukarıdaki metotla sentezlendikten sonra üzerlerine 0.1 mM mikro RNA çözeltisi eklenmiş ve 38°C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yapıdaki tek amin kaynağı kitosan olduğundan, N:P oranı için HA/CS nanopartikül için yapılan optimizasyonlarla devam edilmiştir.

### **3.10. Mikro RNA'nın yüklenme etkinliğinin belirlenmesi ve salım deneyleri:**

İki partikül için de bağlanmayan mikro RNAların uzaklaştırılması ve yüklenme yüzdelerinin hesaplanması için partikül çözeltileri geçirgenlik sınırı 20000Da olan diyaliz membranı kullanılarak diyaliz edilmiştir. Yüklenme veriminin belirlenmesi için diyalizle elde edilen çözelti Qubit 3.0 floresan okuyucuda (Thermo Fischer Scientific, ABD) mikro RNA kiti (Thermo Fischer Scientific, ABD) kullanılarak okutularak, boşta kalan RNA miktarı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Yüklenme verimi (\%)} = (A - B) / A \times 100.$$

A, eklenen mikro RNA'nın toplam miktarı ve B, diyalizden sonra elde edilen mikro RNA miktarıdır. Salım deneyleri için diyaliz işlemine devam edilmiş, belirlenen saat aralıklarında çözeltiden 20ul örnek alınarak Qubit cihazı yardımıyla okunarak salınan mikro RNA yüzdesi belirlenmiştir.

### **3.11. Jel retardasyon deneyleri:**

Nanopartiküller ile mikro RNA moleküllerinin etkileşimi %2 jel elektroforezi ile kanıtlanmıştır. Jeller, 0,2 ug/mL etidium bromür içeren 1x TBE tamponu içinde %2 agaroz ile hazırlanmıştır. Elektroforez 15 dakika boyunca 80V'de gerçekleştirilmiş ve jel daha sonra jel görüntüleme sisteminde (ChemiDoc-It Imager, UVP) fotoğraflanmıştır. Partikülün degradasyonu için partikül-mikro RNA kompleksi %2 konsantrasyonunda SDS (H5113, Promega, ABD) içerisinde 20 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir [418].

### **3.12. Sitotoksikite deneyleri:**

MTT (3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (211091, Abcam, İngiltere) testi, hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan testlerden biridir. Hücre canlılığının değerlendirilmesi için hücreler 96 kuyucuklu plaklarda kültür edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin tüm deney grupları ile 48 saat inkübe edilmesinden sonra hücreler MTT ile muamele edilerek formazan kristalleri oluşturmaları sağlanmıştır. Oluşan formazan ürünü uygun bir çözücü ile çözüldükten sonra bu mor renkli çözeltinin absorbans değeri, 500-600 nm aralığındaki bir dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak okunmuştur. MTT testi her deney grubu ve kontrol grubu için 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.



### **3.13. Mikro RNA transfeksiyon deneyleri:**

İnsan mezenkimal kök hücreleri ,% 10 FBS (Gibco, ABD) ile takviye edilmiş DMEM (Life Sciences, ABD) ortamında kültür edilmiş ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37 ° C'de inkübe edilmiştir. Transfeksiyon deneyleri için, hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarında kuyucuk başına 3x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekilmiş ve 12 saat kültür edilmiştir. Sonrasında besi yeri alınarak, hücreler üzerine 100nM mikro RNA konsantrasyonu olacak şekilde deney grupları, 1 mL serumsuz DMEM besi yeri içerisinde seyreltilerek eklenmiştir. Hücreler bu şekilde 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hücreler üzerine 1 mL %10 FBS içeren besi yeri eklendikten sonra 48 saat süreyle kültür edilmiştir. Gerekli görülen durumlarda 24 saat sonrasında 500ul daha besi yeri eklenmiştir. 48 saat sonrasında hücreler gen ekspresyon analizi ve boyamalar için toplanmıştır.

#### **3.13.1. RNA izolasyonu:**

RNA izolasyonu Zymo Research Quick-RNA Mini Prep kiti ( Zymo Research, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

- Örnekler üzerine 300 ul lizis tamponu eklenerek hücrelerin plakadan kaldırılması için vortexlenmiş, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Çözelti RNA izolasyon kolonuna aktarılmış ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece hücre debrisı uzaklaştırılmıştır.
- Lizat çözeltileri atılmayarak üzerine 300 ul etanol eklenmiş ve pipetaj yöntemiyle iyice karıştırılmıştır.
- Alınan çözelti ikinci bir RNA izolasyon kolonuna aktarılarak 30 saniye santirfüj edilmiş ve tüp altında biriken çözelti uzaklaştırılmıştır.
- RNA ile birlikte DNA da izole edilmiş olma ihtimaline karşı, DNA kontaminasyonundan kurtulmak ve cDNA'ların saflığını arttırmak amacıyla DNase I kolon üzerine eklenerek DNAlar degrade edilmiştir. Bunun için kolonlar üzerine 80ul DNase I çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında kolonlar üzerine 400 ul RNA hazırlama tamponu eklenmiş ve 30 saniye 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- Kolonlar üzerine yıkama tamponları sırasıyla 400 ul ve 700 ul eklenerek izole edilen RNA'lar yıkanmıştır.
- Sonrasında 2 dakika 14000rpm'de santifüj yapılarak fazla etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır.

- RNA izolasyonu gerçekleştirilen tüpler RNA/DNA içermeyen tüpler içerisine yerleştirilerek 100 ul elüsyon tamponu eklenmiş ve 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 14000 rpm'de 1 dakika santifüj edilerek RNAların tüpte birikmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen RNAların konsantrasyonları Nanodrop cihazında kontrol edilmiş, 350-850 ng/ul olarak bulunan konsantrasyonlar, gerçek zamanlı PCR deneylerinde fazla miktarda DNA miktarını engellemek amacıyla her örnekte 100 ng/ul olacak şekilde seyreltilmiştir.

### 3.13.2. cDNA sentezi:

İzole edilen RNAlardan, konvansiyonel PCR cihazı (Veriti, Applied Biosystems, ABD) kullanılarak Script cDNA Syntesis Kit (Jena Bioscience, Almanya) yardımıyla komplementer DNA sentezlenmiştir. Yapılan optimizasyonlar sonrasında, her tüpün hacmi 20 ul olacak şekilde, aşağıdaki gibi cDNA solüsyonları hazırlanmıştır:

- 2 ul RNA örneği
- 10 ul su
- 0,5 ul primer
- 4 ul 5X cDNA tampon çözeltisi
- 1 ul dNTP çözeltisi
- 1 ul DTT çözeltisi
- 1 ul RNase inhibitörü
- 0,5 ul reverse transkriptaz enzimi

cDNA sentezinde mikro RNA-149-5p dışındaki genler için spesifik primerler kullanılmamıştır. Mikro RNA için kullanılan spesifik primer aşağıda belirtilmiştir: ,

GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGGGAGT

Yukarıdaki gibi hazırlanan tüpler, aşağıda belirtilen reaksiyon koşullarında konvansiyonel PCR cihazında reaksiyona sokulmuştur:

- 42°C'de 10 dakika,
- 53°C'de 60 dakika,
- 70°C'de 10 dakika

Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PCR uygulamasından önce elektroforez yöntemiyle jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve gerçek zamanlı PCR deneylerine kadar -80°C'de saklanmıştır.

### 3.13.3. Gerçek zamanlı PCR deneyleri:

Gen analizlerine geçmeden önce kullanılan primerlerin 10mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Primer sekansları tabloda gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1:** Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer sekansları

	İleri primer	Geri primer
<b>ACTB</b>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<b>FUT-1</b>	CCTGGCATCTTCTGGAGAAGCT	TTCTAGAACTGCCTGCCAGCCAT
<b>MiRNA-149-5p</b>	GTTTCTGGCTCCGTGTCTT	GTGCAGGGTCCGAGGT
<b>SOX-9</b>	GTACCCGCACTTGCACAAC	TCTCGCTCTCGTTCAGAAGTC
<b>COMP</b>	AACTCAGGGCAGGAGGATGT	TGTCCTTTTGGTCGTCGTTT
<b>COL2A1</b>	AAAAGAGGTGCCCGTGGAGAA	TTGCCTTGAGGACCAGCATCA
<b>AGC</b>	GGGGACCTTAGTGGACTTCCTT CTG	AGGTCCACCCCAGAATACTCACC

Primer optimizasyonları yapılarak; sekans uzunlukları, GC oranları ve molekül ağırlıkları dikkate alınarak uygun PCR koşulları belirlenmiştir. Primerlerin data klavuzunda belirtildiği üzere reaksiyon etkinliği 1 olarak kabul edilmiştir. Deneyler Vii7 gerçek zamanlı PCR cihazında (Applied Biosystems, ABD) PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan optimizasyonlar sonucunda, reaksiyon hacmi her tüpte 20 ul olacak şekilde, aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

- 10 ul qPCR master mix
- 0,6 ul F primer
- 0,6 ul R primer
- 2 ul örnek
- 6,8 ul su

Reaksiyon aşağıdaki koşullarda, 43 döngü olarak gerçekleştirilmiştir:

- 50°C 2 dakika
- 95°C 2 dakika
- 95°C 15 saniye
- 60°C 1 dakika

Tüm örnekler aynı reaksiyon içerisinde, 3 tekrarlı olarak çalışılmış, sonuçlar QuantStudio Real Time PCR Software Version 1.2. (Applied Biosystems, ABD) yazılımı kullanarak analiz edilmiştir. Genlerin relatif ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için “*comparative Ct*” metodu kullanılmıştır. Bu metod genlerin kontrol grubuna göre relatif sonuçlarını göstermekte, karşılaştırmalı genetik analizlerde kullanılmaktadır [419]. Bu metoda göre hesaplanan  $2^{-ddCt}$  değerleri relatif gen ekspresyon seviyelerini göstermektedir.  $2^{-ddCt}$  değerleri, her örneğin analiz edilen her bir geni için aşağıdaki eşitliklere göre elde edilen  $-ddCT$  değerlerinden hesaplanmaktadır:

$$dCTE = TE - HE$$

$$dCTC = TC - HC$$

$$ddCT = dCTE - dCTC,$$

(TE: deney grubunun test edilen geninin ekspresyon seviyesi, TC: kontrol grubunun test edilen geninin ekspresyon seviyesi, HE: deney grubunun referans kabul edilen geninin ekspresyon seviyesi, HC: kontrol grubunun test edilen geninin ekspresyon seviyesi)

### **3.14. Sitolojik boyamalar (sGAG boyamaları):**

Hücrelerin glikozaminoglukan sentezleri Safranin Orange-Fast Green (Sciencell, ABD) boyaları ile boyamalarla belirlenmiştir. Fast Green arka planın boyaması için kullanılmakta, Safranin Orange ise glikozaminoglukanları boyamaktadır. Hücreler lam üzerine yayıldıktan sonra soğuk %100 asetonla sabitlenmiştir. Sonrasında sırayla aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- Sırasıyla %100 etanolle 2 sefer 2 dakika, %95 etanolle 2 sefer 2 dakika, %70 etanolle 2 dakika, %50 etanolle 15 dakika yıkanmıştır.
- 5 dakika suyla yıkanmıştır.
- %0,1 Fast Green boyasıyla 5 dakika boyanmıştır.

- 10-15 saniye %100 asetik asit çözeltilisinde bekletilmiştir.
- %0,1 Safranin Orange boyasıyla 25 dakika boyanmıştır.
- Sırasıyla %95 etanolde 2 sefer 2 dakika, %100 etanolde 2 sefer 2 dakika yıkanmıştır.
- Xylene eklenerek ışık mikroskopunda (B201, Olympus, Japonya) görüntü alınmıştır.

### **3.15. İstatiksel analizler:**

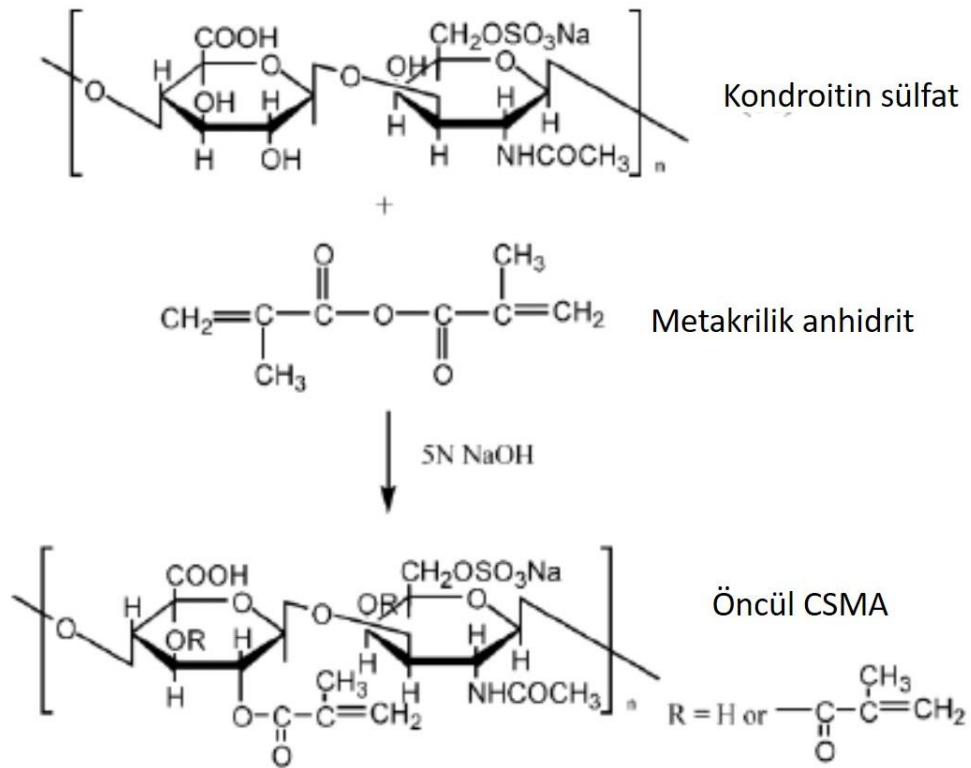
Deneyler, üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Software v.6, La Jolla, ABD) kullanılarak istatistiksel analiz için T testi ve ANOVA testleri uygulanmıştır. En az 0,05 olan p değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

Anlamlılık düzeyleri ;  $p > 0,05$  anlamlı değil,  $p \leq 0,05$  \*,  $p \leq 0,01$  \*\*,  $p \leq 0,001$  \*\*\*,  $p \leq 0,0001$  \*\*\*\* şeklinde ifade edilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. CSMA ve GELMA yapılarının karakterizasyonu

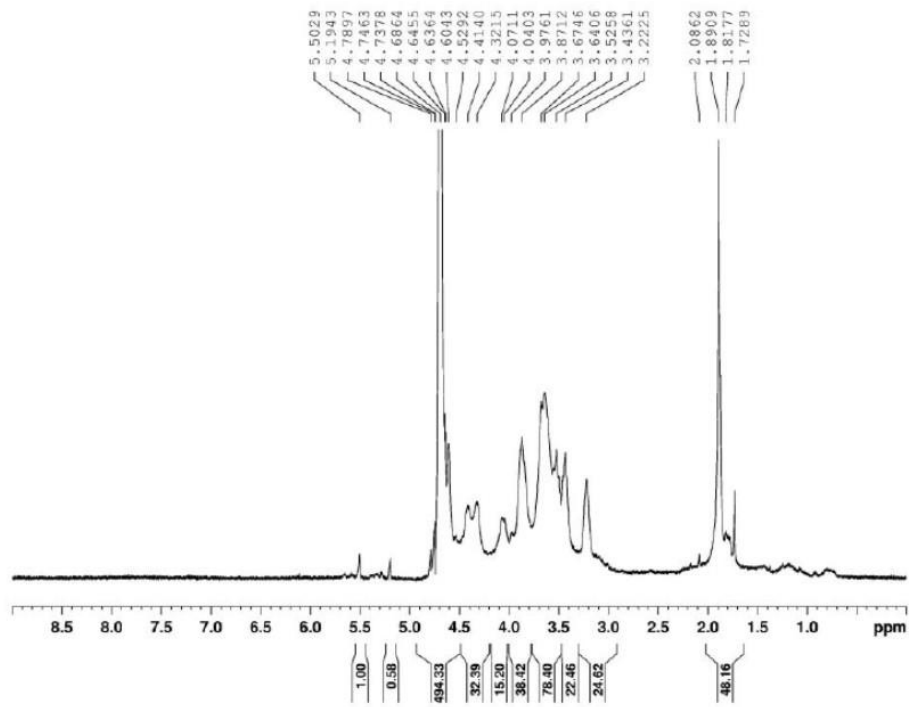
Sunulan tez çalışmasının ilk aşamasında enjekte edilebilir hidrojeller üzerinde çalışılmıştır. Bu sebeple önerildiği üzere, jelatin ve kondroitin sülfat farklı oranlarda metakrilit anhidrit kullanılarak metakrilatlanmıştır. İlk etapta, kondroitin sülfat 2 farklı metakrilat oranıyla; CSMA 1 7.5 mmol MAAH, CSMA 2 ise 30 mmol MAAH kullanılarak metakrilatlanmıştır. Kondroitin sülfatın metakrilatlanma mekanizması Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



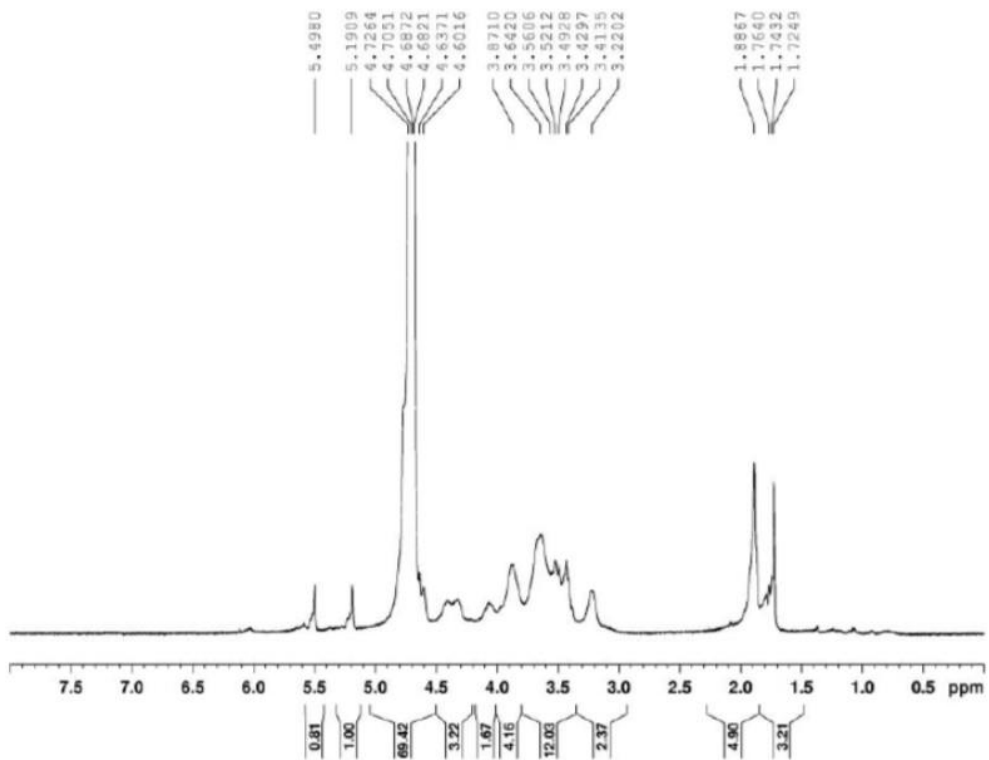
**Şekil 4.1:** Metakrilik anhidrit ile kondroitin sülfatın metakrilatlanma mekanizması

Örneklerin NMR spektrumları çekilerek metakrilatlanma ve yer değiştirme dereceleri TopSpin Programı (Bruker, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır. CSMA için elde edilen NMR spektrumları Şekil 4.2 'de gösterilmiştir.

**a**



**b**



**Şekil 4.2:** (a) CSMA 1, (b) CSMA 2 hidrojenlerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları

Metakrilatlanmış kondroitin sülfat örneklerinin proton NMR spektrumlarında 5.5 – 6.0 ppm'de gözlemlenen piklerin metakrilat grubunda bulunan çift bağın içerdiği H atomlarını temsil ettiği bilinmektedir [420]. Söz konusu pikler düşük konsantrasyonda metakrilik anhidrit kullanılan CSMA1 örneğinde düşük şiddette iken, CSMA2 örneğinde bu piklerin şiddetlendiği gözlemlenmiştir.

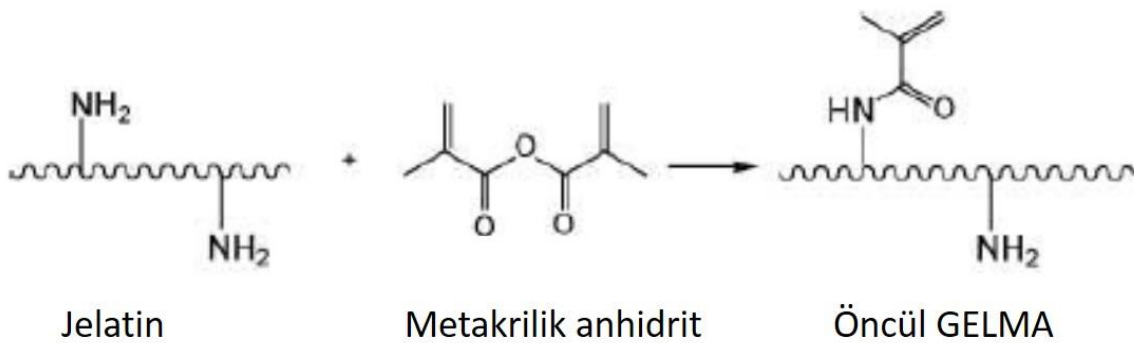
Program yardımıyla hesaplanan yer değişime dereceleri ve metakrilatlanma yüzdeleri aşağıdaki Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1:** CSMA örneklerinin yer değişirme dereceleri ve metakrilatlanma oranları

Hidrojel türü	Kullanılan MAAH (mmol)	Yer değişirme derecesi	Metakrilatlanma oranı (%)
CSMA1	7,5	0,81	22
CSMA2	30	1,89	63

Elde edilen 2 farklı formülasyondaki CSMA'lar ağırlıkça %0.5 fotobaşlatıcı (2-hidroksi-1(4- (hidroksietoksi)fenil)-2-metil-1-propanon, Igracure 2959) çözeltisi içerisinde %5, %10, %15, %20 ve %25 konsantrasyonunda 40°C'de çözüldükten sonra, UV ışık altında bekletilerek jel haline getirilmiştir. Denenen tüm formülasyonların katı hidrojeller oluşturduğu gözlemlenmiştir.

İlk etapta denenen bu CSMA formülasyonlarının katı jel formunda olduğu gözlemlendiğinden, jelatin metakrilatin (GELMA) farklı formülasyonları enjekte edilebilir jel formu için denenmiştir. GELMA 1, 2,5 mmol MAAH kullanılarak, GELMA 2 7.5 mmol MAAH, GELMA 3 ise 12,5 mmol MAAH kullanılarak metakrilatlanmıştır. Jelatinin metakrilatlanma mekanizması Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

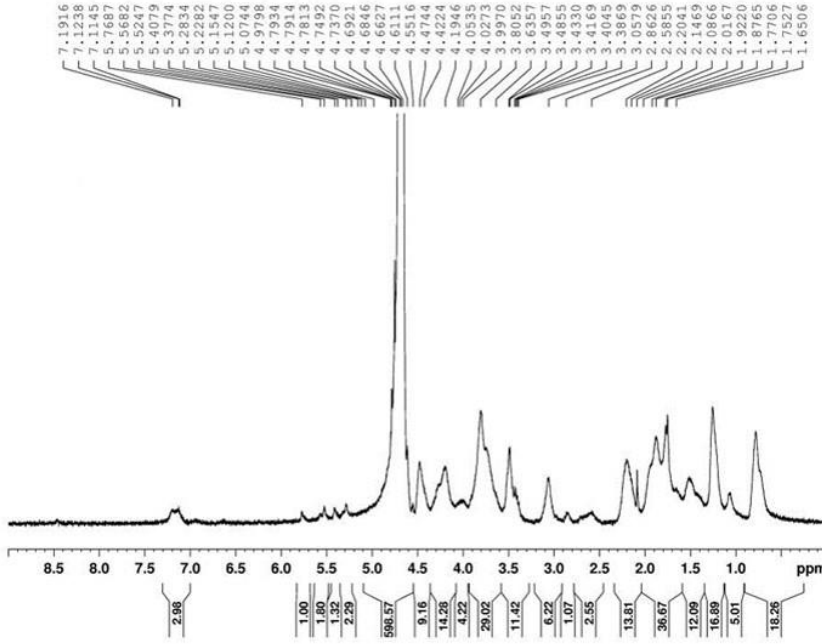


**Şekil 4.3:** Metakrilik anhidrit ile jelatinin metakrilatlanma mekanizması



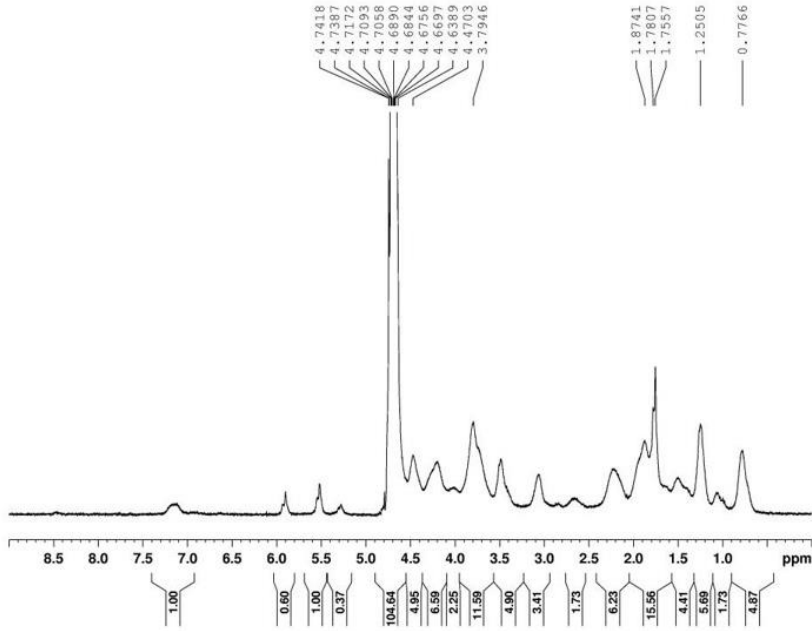
Örneklerin NMR spektrumları çekilerek metakrilatlanma ve yer değiştirme dereceleri hesaplanmıştır. Elde edilen NMR spektrumları Şekil 4.4'te, yer değiştirme dereceleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Örneklerin proton NMR'larında görülen 2,8 – 2,95 ppm'de gözlemlenen pikler jelatinin metakrilatlanan metilen gruplarını temsil etmektedir [421].

a



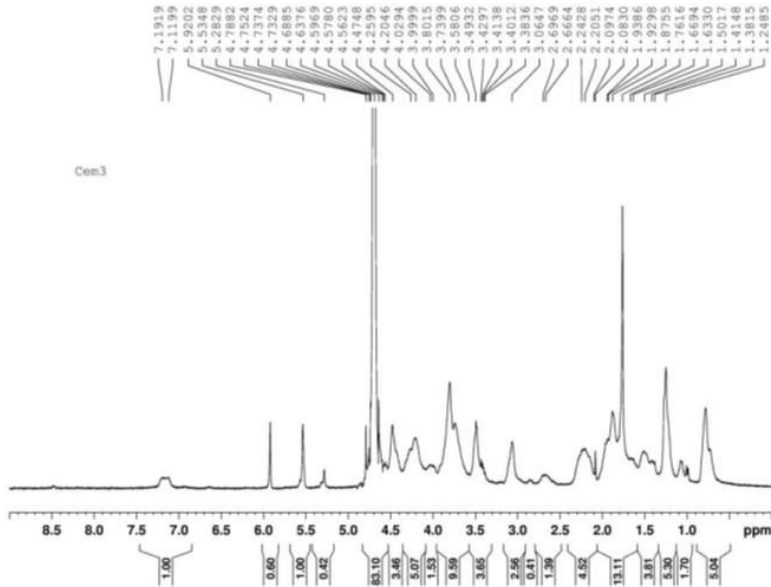
Şekil 4.4a: GELMA 1 hidrojelinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

**b**



**Şekil 4.4b:** GELMA 2 hidrojelinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

**c**



**Şekil 4.4c:** GELMA 3 hidrojelinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

**Çizelge 4.2:** GELMA örneklerinin yer değiştirme dereceleri ve metakrilatlanma oranları

Hidrojel türü	Kullanılan (mmol)	MAAH	Metakrilatlanma oranı (%)
GELMA1	2,5		41
GELMA2	7,5		59
GELMA3	12,5		88

Elde edilen 3 farklı formülasyondaki GELMA, ağırlıkça %0,5 fotobaşlatıcı (2-hidroksi-1(4- (hidroksietoksi)fenil)-2-metil-1-propanon, Igracure 2959) çözeltisi içerisinde %5, %10, %15, %20 ve %25 konsantrasyonunda 40°C'de çözüldükten sonra, UV ışık altında bekletilerek jel haline getirilmiştir. Bu hidrojellerin de katı hidrojeller oluşturduğunun gözlemlenmesi üzerine, enjekte edilebilir hidrojeller elde etmek için metakrilat oranları düşürülerek formülasyonlar tekrarlanmıştır.

CSMA için farklı metakrilatlanma oranları denenmiş, sentezlenen CSMA'ların farklı UV sürelerinde jelleşebilirlikleri optimize edilmiştir (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3:** CSMA enjekte edilebilir hidrojellerin optimizasyon sonuçları

ChoS (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	CSMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı
1.25	1,32	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		
		5	10	
		10		
		15		
		5	20	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		Ağımsı yapı
		15		Enjekte edilebilir hidrojel
		5	25	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.

**Çizelge 4.3:** CSMA enjekte edilebilir hidrojellerin optimizasyon sonuçları (devamı)

CS (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	CSMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı
1,25	1,32	10	25	Ağımsı yapı
		15		Enjekte edilebilir hidrojel
		10	30	Enjekte edilebilir hidrojel
		15		
		25	%25/ %30	Enjekte edilebilir hidrojel
0.75		5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15	5	Ağımsı yapı
		5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15	10	Ağımsı yapı
		5	20	Ağımsı yapı
10				
15		20	Enjekte edilebilir hidrojel	
1		5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
	10			
	15			
	5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.	
	10			
	15	10	Ağımsı yapı	
	5	20	Ağımsı yapı	

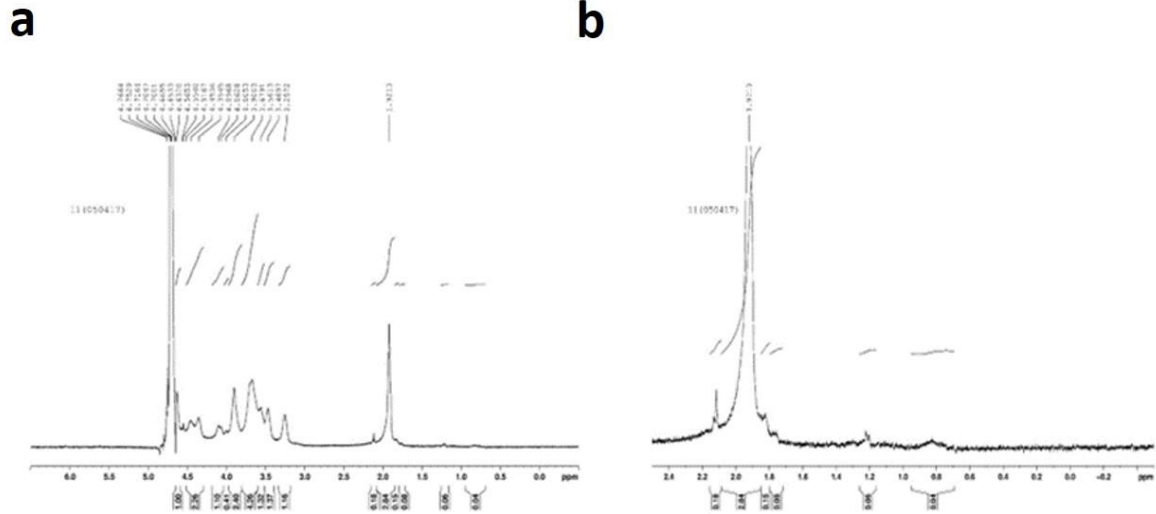
**Çizelge 4.3:** CSMA enjekte edilebilir hidrojellerin optimizasyon sonuçları (devamı)

ChoS (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	CSMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı
1	1,32	10	20	Ağımsı yapı
		15		
		25	20	Enjekte edilebilir hidrojel
1.25	1	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		
		5	10	
		10		
		15		
		5	20	
		10		
		15		
	2	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		
		5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		
		5	20	Ağımsı yapı
		10		
		15		
20	20	5	Enjekte edilebilir hidrojel	
		10		
		15		

**Çizelge 4.3:** CSMA enjekte edilebilir hidrojellerin optimizasyon sonuçları (devamı)

ChoS (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	CSMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı
1,25	2	25	20	Enjekte edilebilir hidrojel
1		5/10/15	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10	10	Katı hidrojel
1.25	2,64	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		Ağımsı yapı
		5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		Ağımsı yapı
		5	20	Ağımsı yapı
		10		Enjekte edilebilir hidrojel
		15		

Yapılan optimizasyonlar sonucu en uygun formülasyonun 1.25 g ChoS ve 1,32 mmol MAAH kullanılarak hazırlanan CSMA'nın %20'lik çözeltisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Sentezlenen metakrilatlı yapının NMR ölçümü alınmış ve yukarıda belirtilen şekilde metakrilatlanma derecesi hesaplanmıştır. Sentezlenen CSMA'nın metakrilatlanma derecesi 1.7 olarak belirlenmiş, NMR grafiği Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.5:** Enjekte edilebilir (a) CSMA'nın  $^1\text{H-NMR}$  grafiği (b) Grafiğin aralıkları açılmış hali

Elde edilen hidrojinin stabilitesi  $37^\circ\text{C}$ 'de hafif çalkalamada su içerisinde inkübasyona bırakılarak test edilmiştir. Fakat %20'lik çözeltiyle hazırlanan bu jelin stabilitesini 4 saatten uzun süre sağlayamadığı gözlenmiştir. Jelin farklı yüzdelerdeki çözeltilerdeki formülasyonlarında da stabilitenin değişmediği belirlenmiştir. Bu sebeple daha stabil enjekte edilebilir hidrojel oluşturmak amacıyla GELMA'nın da daha düşük oranda metakrilatlanmış farklı formülasyonları denenmiştir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4:** GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin optimizasyon sonuçları

Jelatin (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	GELMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı
1.25	3,96	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		Katı hidrojel
		5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		Katı hidrojel
		15		
		5	20	Katı hidrojel
1	3,96	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.

**Çizelge 4.4:** GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin optimizasyon sonuçları (devamı)

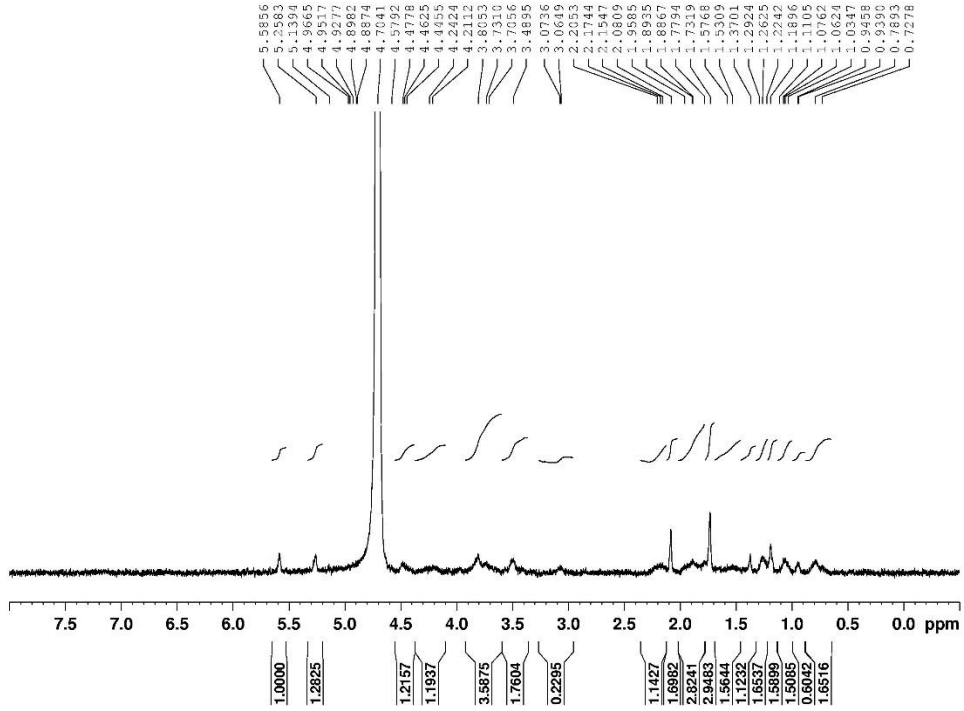
Jelatin (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	GELMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı	
1	3,96	10	5	Ağımsı yapı	
		5		Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.	
		10			
		15			
		20			
		25			
	2,64	5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.	
		10		Enjekte edilebilir hidrojel	
		15			
		20			
		5			Ağımsı yapı
		10			
	15				
	1,32	5	5	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.	
		10			
		15			
		5		Ağımsı yapı	
		10			Katkı hidrojel
		15			



**Çizelge 4.4:** GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin optimizasyon sonuçları (devamı)

Jelatin (g)	MAAH (mmol)	UV süresi (dakika)	GELMA Konsantrasyonu (%)	Hidrojel yapısı
1	1,32	5	10	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		
		15		Ağımsı yapı
		20		Enjekte edilebilir hidrojel
		5	20	Hidrojel yapısı gözlemlenmemiştir.
		10		Ağımsı yapı
		15		Enjekte edilebilir hidrojel
		20		

Yapılan optimizasyonlar sonrasında, 3,96 mmol MAAH ile metakrilatlanmış GELMA kullanılarak oluşturulan hidrojellerin UV süresi ve çözelti yüzdesinden bağımsız bir şekilde enjekte edilebilir hidrojeller oluşturamadığı gözlemlenmiştir. 2,96 mmol MAAH ve 1,32 mmol MAAH ile metakrilatlanmış GELMA kullanılarak oluşturulan hidrojellerin formülasyonlarının enjekte edilebilir hidrojeller oluşturduğu gözlemlense de, bu formülasyonların da stabilitelerini 37°C'de 6 saatten uzun süre sağlayamadıkları görülmüştür. 1,32 mmol MAAH ile metakrilatlanmış GELMA kullanılarak oluşturulan hidrojellerin daha kontrollü jelleştirildiği gözlemlendiğinden sonraki deneylere bu formülasyonla devam edilmesine karar verilmiştir. Aşağıda 1,32 mmol MAAH ile metakrilatlanmış GELMA formülasyonunun NMR grafiği gösterilmiştir (Şekil 4.6). Sentezlenen metakrilatlı yapının yukarıda belirtilen şekilde hesaplanan metakrilatlanma derecesi de yaklaşık %20 olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.6:** Enjekte edilebilir GELMA formülasyonunun  $^1\text{H-NMR}$  grafiği

#### 4.2. CSMA:GELMA hidrojellerinin karakterizasyonu

Geliştirilen CSMA ve GELMA yapılarının enjekte edilebilir formları ve stabiliteleri göz önüne alınarak seçilen 1 gr Jelatin ve 1,32 mmol MAAH kullanılarak sentezlenen GELMA ile 1,25 gr ChoS ve 1,32 mmol MAAH kullanılarak sentezlenen CSMA yapıları kütlice farklı oranlarda karıştırılarak daha stabil hidrojeller elde edilmeye çalışılmıştır (Çizelge 4.5).

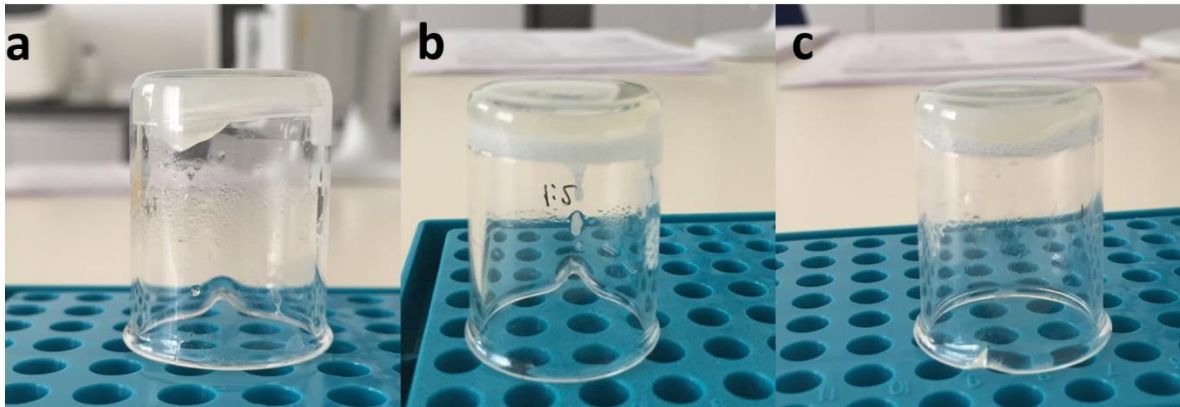
**Çizelge 4.5:** Farklı oranlarda karıştırılan CSMA:GELMA yapılarının hidrojel oluşturma optimizasyon sonuçları

CSMA:GELMA (m:m)	UV süresi (dakika)	Hidrojel yapısı
1:1	5	Ağımsı yapı
	10	Enjekte edilebilir jel
	15	
1:2	5	Kıta jel
	10	
	15	
1:3	5	Kıta jel
	10	
	15	
2:1	5	Enjekte edilebilir jel
	10	Kıta jel
	15	
3:1	5	Enjekte edilebilir jel
	10	Kıta jel
	15	

1:1, 2:1 ve 3:1 CSMA:GELMA oranlarıyla hazırlanan hidrojellerin enjekte edilebilir, stabil hidrojel yapıları oluşturduğu gösterilmiştir. Hazırlanan hidrojellerin kısa süreli stabiliteleri 37°C'de hafif çalkalamalı su banyosu içerisinde inkübasyona bırakılarak kontrol edilmiş, 24 saat sonra da stabilitelerini korudukları gözlemlenmiştir. Bu sebeple sonraki deneylere bu 3 formülasyonla devam edilmiştir.

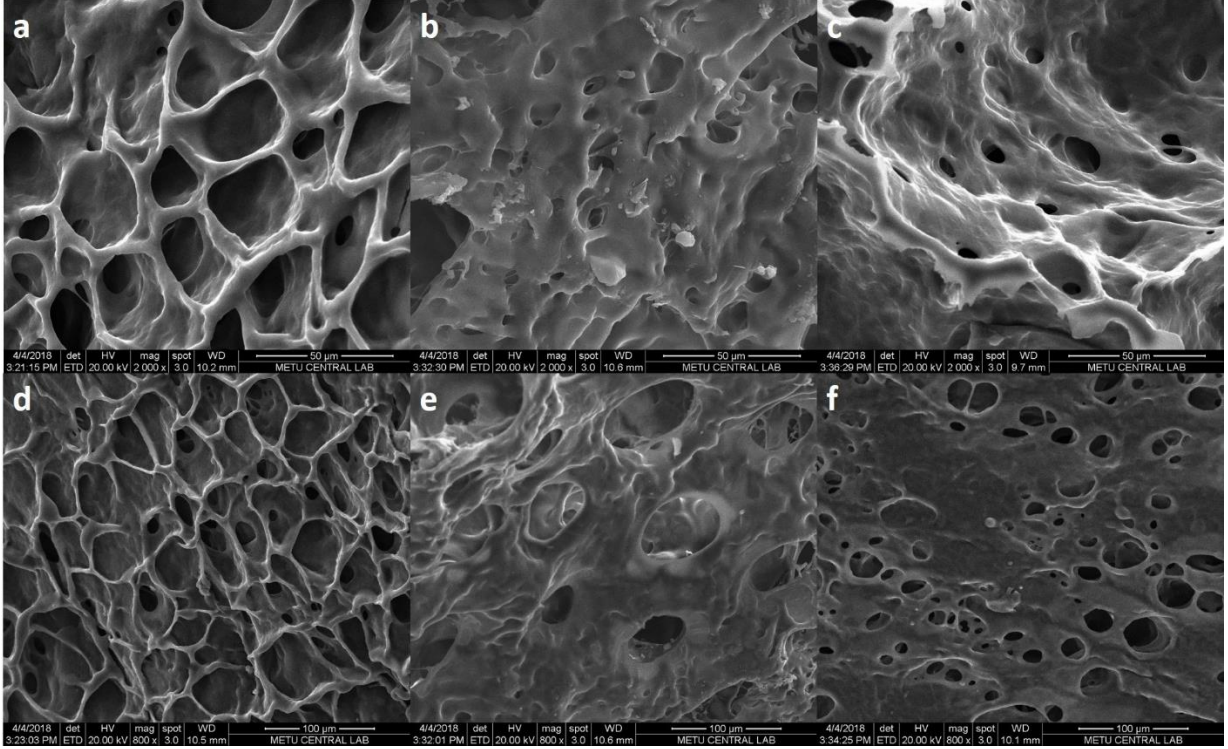
#### 4.2.1. CSMA:GELMA hidrojellerinin fiziksel karakterizasyonu

Enjekte edilebilirlikleri belirlenen hidrojellerin masa üstü reoloji görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.7) [422].



**Şekil 4.7:** CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerin masa üstü reoloji fotoğrafları (a) 1:1 CSMA:GELMA, (b) 2:1 CSMA:GELMA (c) 3:1 CSMA:GELMA hidrojelleri

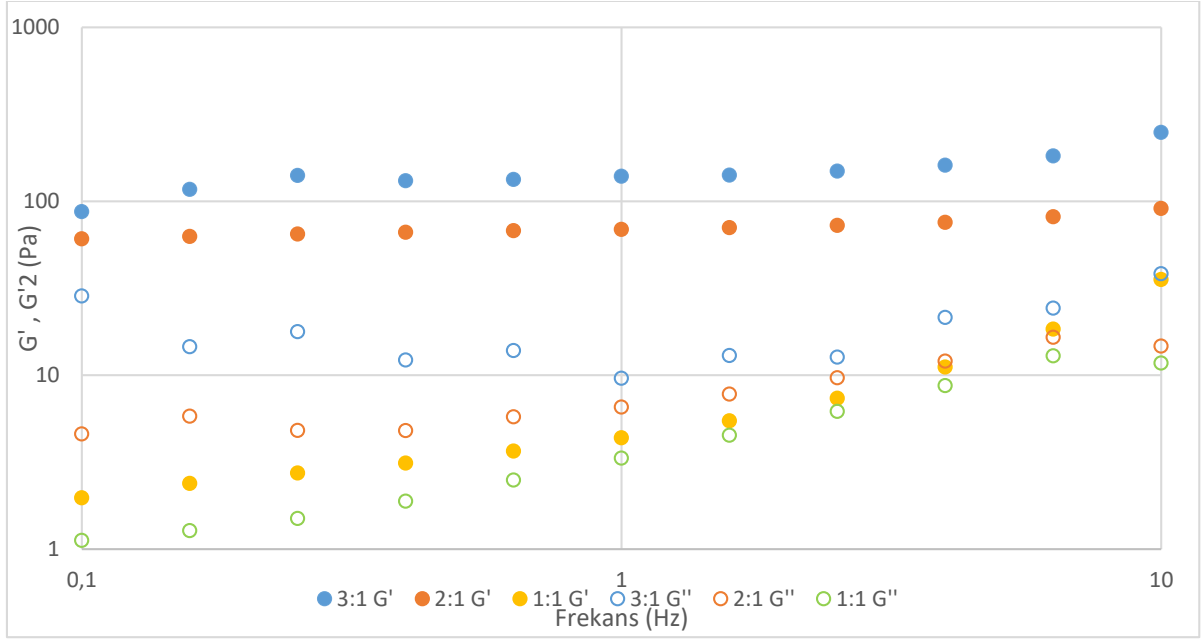
Hazırlanan hidrojenlerin morfolojik incelemeleri çekilen SEM görüntüleriyle yapılmıştır. Görüntüler tüm formülasyonların jel yapısında olduğunu ve porozlu yapısını göstermiştir. 2000X ve 800X büyütmede çekilen görüntülerde gözenek boyutunun metakrilatlı bileşik oranı arttıkça azaldığı gözlemlenmiştir. 1:1 CSMA:GELMA hidrojeninin diğer iki hidrojen formülasyonuna göre daha büyük porlara sahip olduğu gözlemlenmektedir. SEM fotoğrafları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8:** CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojenlerin SEM görüntüleri; Hazırlanan (a) 1:1 CSMA:GELMA, (b) 2:1 CSMA:GELMA ve (c) 3:1 CSMA:GELMA formülasyonundaki hidrojenlerin 2000X büyütmede SEM görüntüleri, (d) 1:1 CSMA:GELMA, (e) 2:1 CSMA:GELMA ve (f) 3:1 CSMA:GELMA formülasyonundaki hidrojenlerin 800X büyütmede SEM görüntüleri

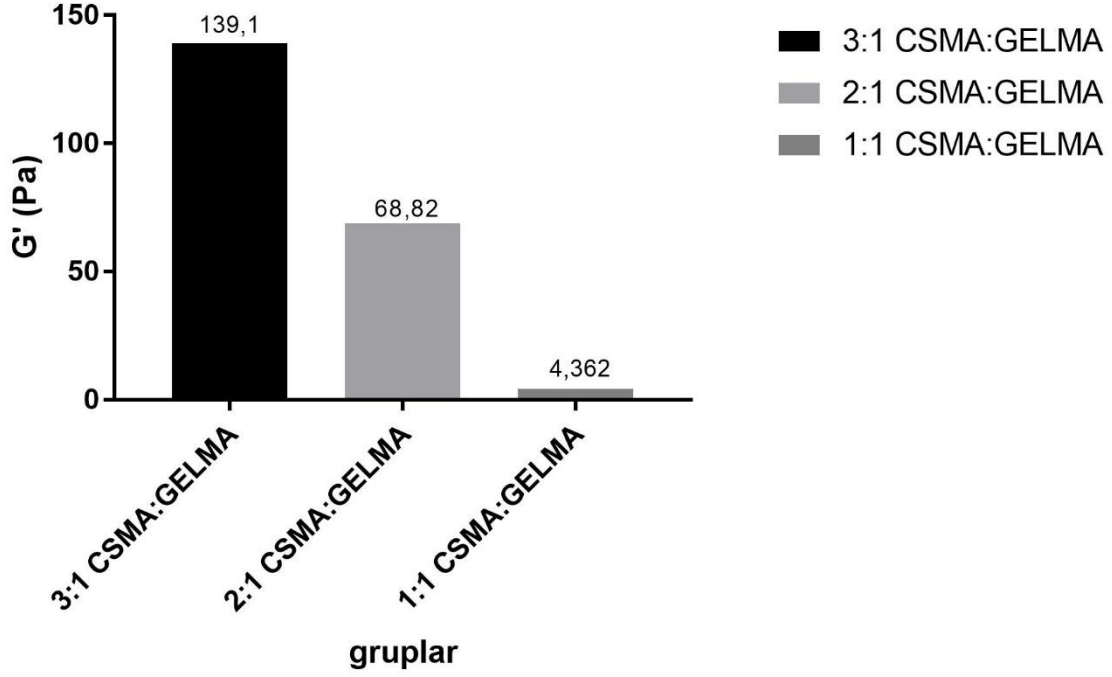
#### 4.2.2. CSMA:GELMA hidrojenlerin reolojik incelemeleri

Enjekte edilebilir formda kaldıkları belirlenen CSMA:GELMA 1:1, 2:1, 3:1 jel formülasyonlarının mekanik özelliklerinin belirlenmesi için reolojik incelemeler yapılmıştır.



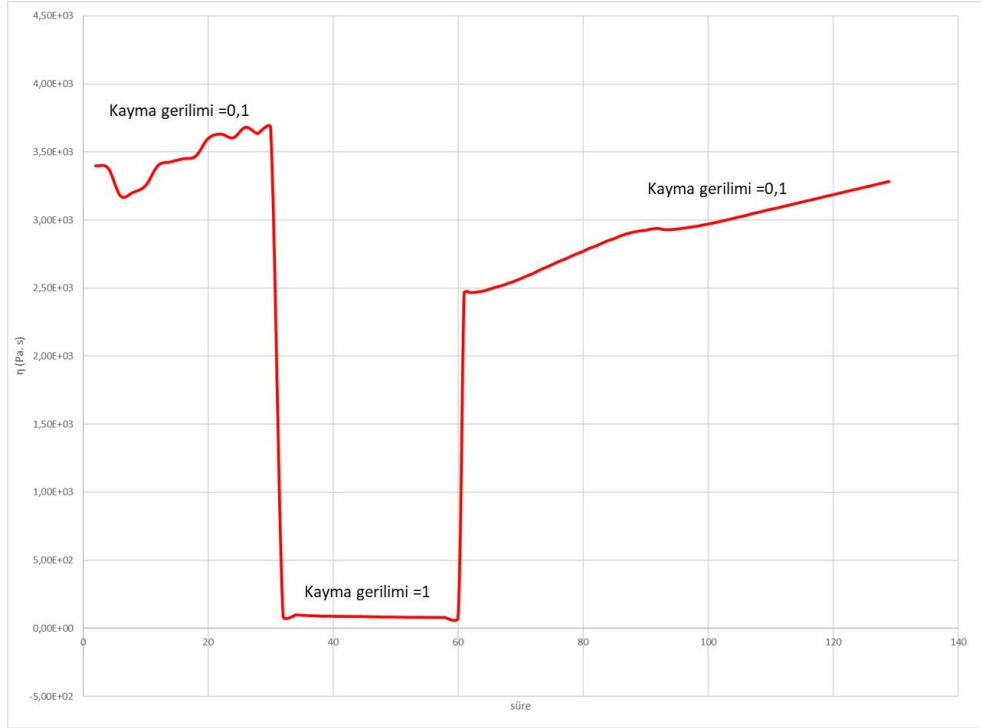
**Şekil 4.9 :** CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojenlerin frekans taramaları, 1:1; 1:1 CSMA:GELMA, 2:1; 2:1 CSMA:GELMA, ve 3:1; 3:1 CSMA:GELMA

Reolojik analizler jellerin viskoelastik ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. Her üç formülasyonun da %1 uzama değerinde frekans taraması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9).  $G'$  değerleri elastik (depolama) modülüsü,  $G''$  değerleri ise viskoz (kayıp) modülüs değerlerini göstermektedir.  $G'$  değerlerinin  $G''$  değerlerinden yüksek olması, analiz edilen örneklerin hidrojel formunda olduğunu göstermektedir. Örnekler kendi aralarında değerlendirildiğinde ise  $G'$  değerinin yüksek olması hidrojenlerin katı forma,  $G''$  değerlerinin yüksek olması ise sıvı karaktere daha yakın olduğunu kanıtlar. Bu bilgiler ışığında tüm örneklerin hidrojel yapısında olduğu ve 1:1 CSMA:GELMA hidrojeninin en yüksek kayıp modülüsü ve faz açısıyla sıvı karaktere en yakın hidrojel formülasyonu olduğu gösterilmiştir. 2:1 ve 3:1 CSMA:GELMA hidrojenlerinde ise  $G'$  değerleri tarama frekans aralığında doğrusallık göstermiş ve 1 Hz medyan değerinde hesaplanan depolama modulusunun arttığı gösterilmiştir.  $G'$  değerleri CSMA konsantrasyonu arttıkça artmış, en yüksek elastik modülüs ise 3:1 CSMA:GELMA hidrojeninde belirlenmiştir (Şekil 4.10).



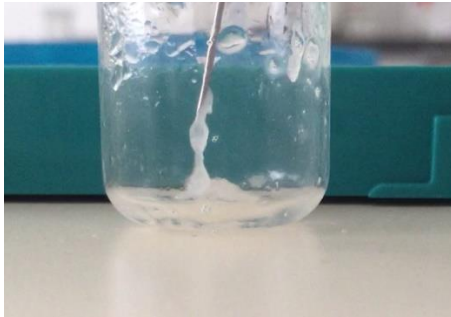
**Şekil 4.10:** CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin depolama modülüs değerleri

Hidrojellerin enjekte edildikten sonra tekrar birleşebilme yetenekleri kayma gerilimlerinin belirlenmesiyle analiz edilmiştir. Bu analizlerde 1:1 CSMA:GELMA ve 3:1 CSMA:GELMA hidrojellerinin mekanik özelliklerini koruyamadıkları belirlenmiştir. 2:1 CSMA:GELMA hidrojellerinin ise enjekte edilirken basınç altında artan gerilimlerinin, enjeksiyon sonrası tekrar eski haline döndüğü, hidrojellerin viskozitelerini tekrar kazandığı gösterilmiştir. Sonuç, şekil 4.11'de çizilen grafikte gösterilmiştir.



**Şekil 4.11:** 2:1 CSMA:GELMA hidrojelinin kayma gerilim analizi

2:1 CSMA:GELMA hidrojelinin enjekte edilirken çekilen görüntüsü Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.12:** 2:1 CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojelinin görüntüsü

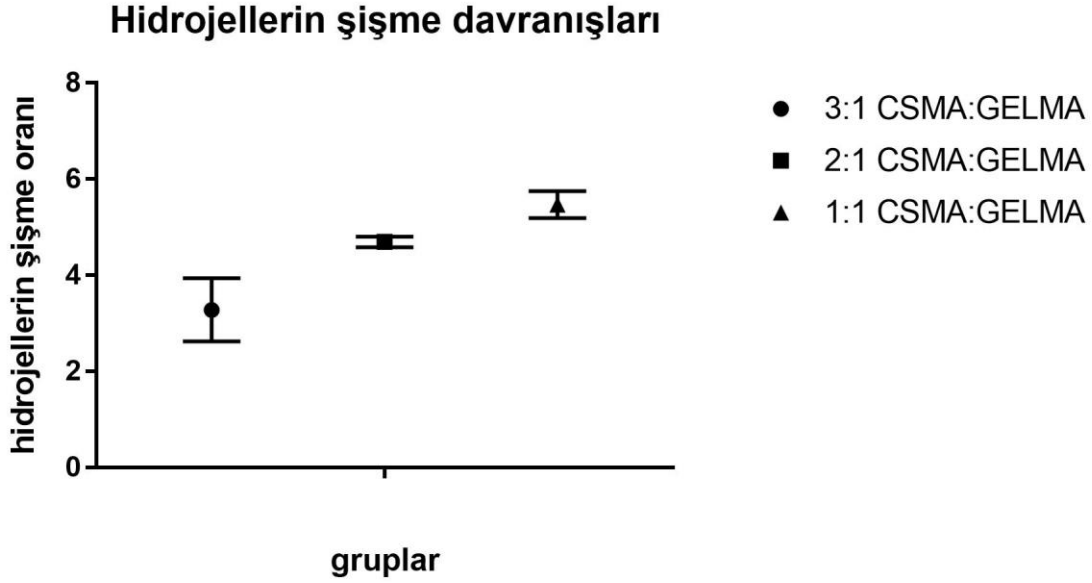
#### 4.2.3. CSMA:GELMA hidrojellerin şişme ve degradasyon davranışlarının analizi

1:1, 2:1 ve 3:1 CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojellerinin su içerisindeki şişme davranışı belirlenerek su tutma kapasiteleri ölçülmüştür (Şekil 4.13). Bu ölçüm için hidrojel 37°C’de saf su içerisinde 6 saat inkübe edilmiştir. Şişme oranları metot kısmında belirtilen eşitlik 1’e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı} = (W_y - W_k) / W_k$$

$W_y$  hidrojel su içerisinde 6 saat bekletildikten sonraki yaş ağırlığını,  $W_k$  ise liyofilize edildikten sonraki kuru ağırlığını temsil etmektedir. Formüle göre hesaplanan şişme

oranları, 1:1 CSMA:GELMA hidrojeli için 5.4, 2:1 CSMA:GELMA hidrojeli için 4.6, 3:1 CSMA:GELMA hidrojeli için 3.2 olarak bulunmuştur. Sonuçlar istatistik olarak değerlendirildiğinde 1:1 CSMA:GELMA hidrojeli ile 2:1 CSMA:GELMA hidrojeli arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $p= 0,0381$ ). 3:1 CSMA:GELMA hidrojeli ve 2:1 CSMA:GELMA hidrojelinin şişme davranışları arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

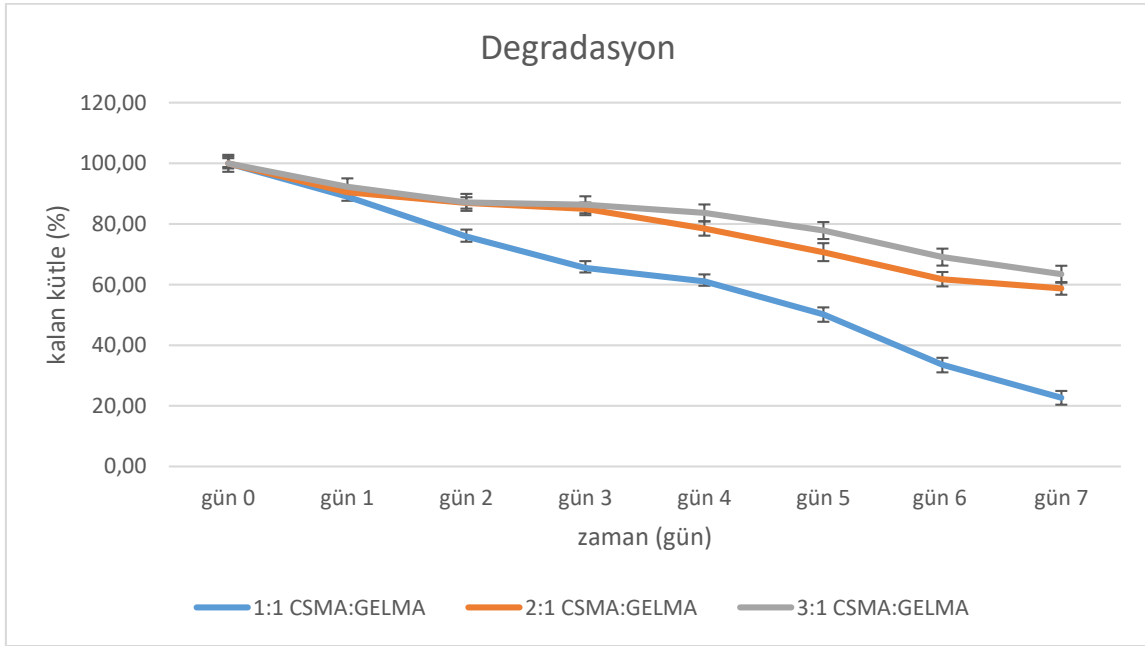


**Şekil 4.13:** CSMA: GELMA hidrojellerinin şişme davranışlarının analizi, 3:1 CSMA:GELMA hidrojeli, 2:1 CSMA:GELMA hidrojeli ve 1:1 CSMA:GELMA hidrojellerinin şişme oranları

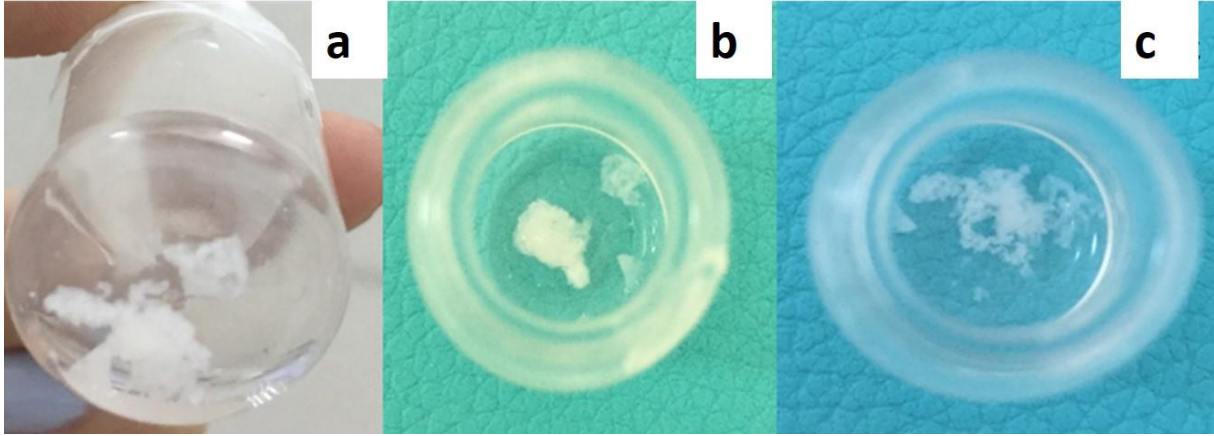
Hidrojellerin degradasyonu 37°C'de hafif çalkalama koşulları altında çalkalamalı su banyosu kullanılarak belirlenmiştir. Hidrojeller saf su içerisinde 1 hafta bu koşullarda inkübe edilerek degradasyon profilleri belirlenmiştir (Şekil 4.14). Degradasyonlar hidrojellerin her 24 saatte bir kuru ağırlıkları ölçülerek belirlenmiştir. Degradasyon miktarları yüzde kütle kaybı olarak hesaplanmıştır. 3 hidrojel formülasyonunun da ilk 24 saat içerisinde stabilitelerini büyük ölçüde koruduğu gösterilmiştir. 24 saatten sonra başlayan degradasyon 2:1 CSMA:GELMA ve 3:1 CSMA:GELMA hidrojelleri için istatistiki açıdan anlamlı bir fark oluşturmasa da, 1:1 CSMA:GELMA hidrojelinin kütle kaybının diğer hidrojellere göre önemli ölçüde arttığı hesaplanmıştır ( $p \leq 0,001$ ). 2.günden itibaren 1:1 CSMA:GELMA hidrojelinin diğer hidrojel formülasyonlarına kıyasla çok daha hızlı, fazla miktarda ve istatikselsel olarak önemli kütle kaybına uğradığı gözlemlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ). 2:1 CSMA:GELMA hidrojeli ile 3:1 CSMA:GELMA hidrojeli



arasında degradasyon oranları açısından önemli bir fark görülememiştir. 7 günün sonunda 1:1 CSMA:GELMA hidrojelinin %77,3 , 2:1 CSMA:GELMA hidrojelinin %41,20, 3:1 CSMA:GELMA hidrojelinin ise %36,50 kütle kaybına uğradığı gösterilmiştir. 2:1 CSMA:GELMA hidrojelindeki kütle kaybı ile 3:1 CSMA:GELMA hidrojelinin kütle kaybının istatistiksel olarak anlamlı bir farkı olmadığı, 1:1 CSMA:GELMA hidrojelinin kütle azalmanın ise anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,0001$ ).



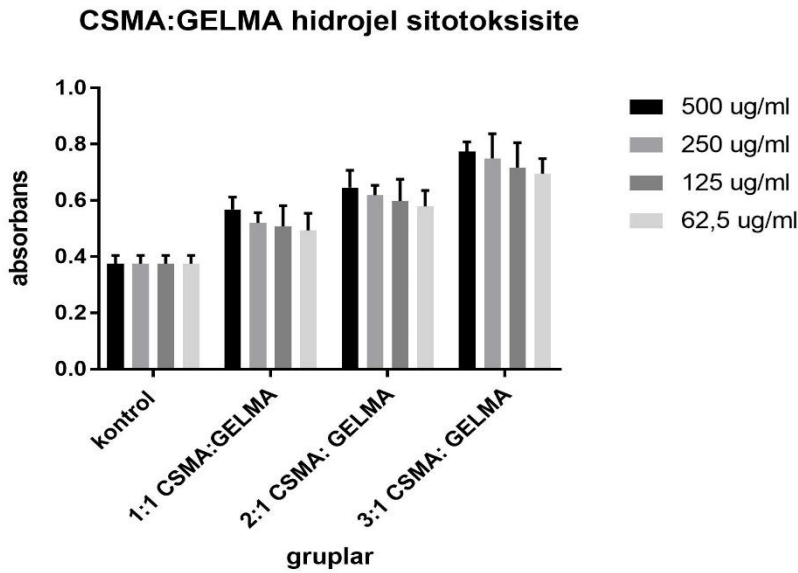
**Şekil 4.14:** CSMA:GELMA hidrojellerinin degradasyon davranışları, 1:1, 2:1 ve 3:1 CSMA:GELMA formülasyonundaki hidrojellerin 7 gün sonundaki degradasyon profilleri Hidrojeller degradasyon deneyleri sırasında da görüntülenmiş, fotoğraflar şekil 4.15'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.15:** CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojelinin degradasyon deneyleri sırasında çekilmiş görüntüleri, (a) 3:1 CSMA:GELMA (b) 2:1 CSMA:GELMA (c) 3:1 CSMA:GELMA fotoğrafları

#### 4.2.4. CSMA:GELMA hidrojellerinin sitotoksosite analizleri

Hidrojeller nanopartiküller ile birleştirilmeden önce sitotoksiteleri MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Sitotoksosite 4 farklı konsantrasyonda (500 ug/mL, 250 ug/mL, 125 ug/mL ve 62,5 ug/mL) 3 hidrojel formülasyonu için çalışılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.16:** CSMA:GELMA hidrojellerinin sitotoksosite grafikleri

Tüm hidrojel formülasyonlarının hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür. Hazırlanan hidrojeller polisakkarit yapısında olduklarından hücrelere ek besin kaynağı olarak görev yaptıkları sonucuna varılmıştır. Hidrojel formülasyonları arasında 62,5 ug/mL,

125 ug/mL ve 250 ug/mL konsantrasyonlarında anlamlı bir absorbands farkı görülememektedir. 500 ug/mL konsantrasyonunda ise 1:1 CSMA:GELMA hidrojel ile 2:1 CSMA:GELMA hidrojel arasında ( $p \leq 0,01$ ) ve 2:1 CSMA:GELMA hidrojel ile 3:1 CSMA:GELMA hidrojel arasında ( $p \leq 0,05$ ) anlamlı fark bulunmuştur.

#### 4.3. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin karakterizasyonları

Tez kapsamında sentezlenen nanopartiküller gen taşınımı için kullanılacağı için partiküller öncelikle pozitif yük-boyut özelliklerine göre optimize edilmiştir. Kitosanın yüksek pozitif yükü göz önünde bulundurularak kütle:kütle oranları olarak, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 ve 1:10 HA:CS nanopartiküller metotta bahsedildiği şekilde sentezlenerek tane büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazında boyut ve yük olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6:** Farklı oranlarda hyaluronik asit ve kitosan çözeltisi kullanılarak hazırlanan HA/CS nanopartiküllerin yük/boyut analizleri

	Yük	Boyut	PDI
<b>1:1 HA:CS</b>	+13,5 mV $\pm$ 0.5	141.7 nm $\pm$ 12.1	0.71
<b>1:2 HA:CS</b>	+17.1 mV $\pm$ 0.2	290.6 nm $\pm$ 10.6	0.55
<b>1:4 HA:CS</b>	+27.4 mV $\pm$ 0.4	419.2 nm $\pm$ 9.4	0.32
<b>1:6 HA:CS</b>	+27.5 mV $\pm$ 0.6	450.5 nm $\pm$ 4.3	0.41
<b>1:10 HA:CS</b>	+27.8 mV $\pm$ 0.5	718.7 nm $\pm$ 8.0	0.62

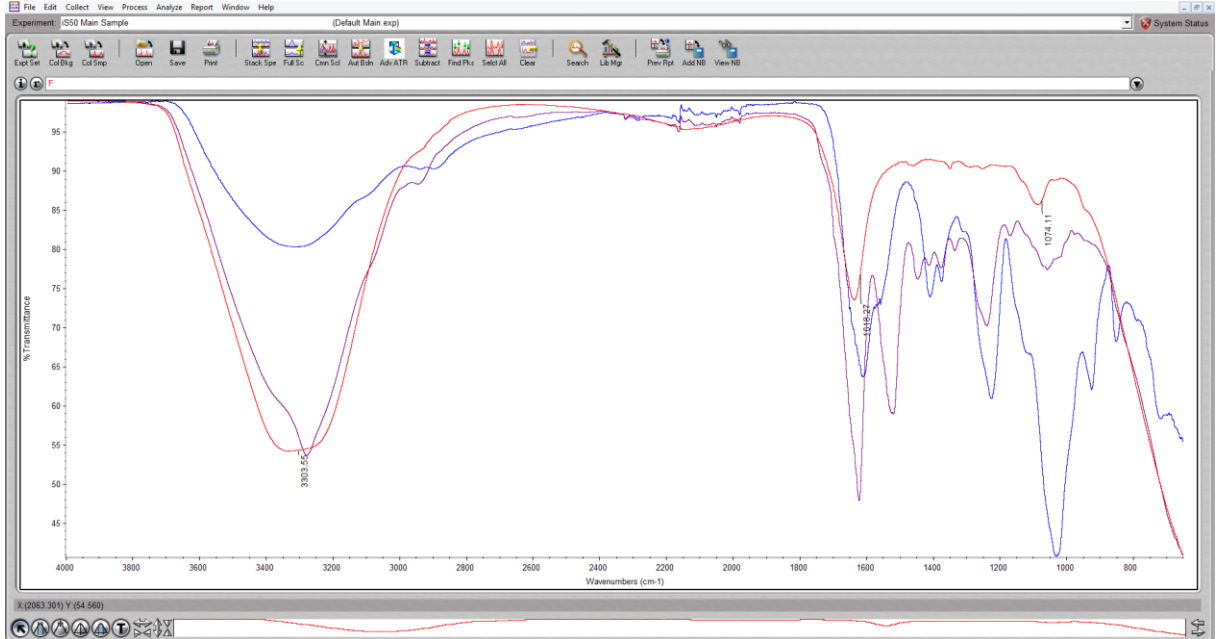
Elde edilen nanopartiküllerin daha sonra mikro RNA taşıyıcısı olarak kullanılacağı göz önüne alınarak 1:1 HA:CS nanopartiküllerin pozitif yükünün mikro RNA ile verimli etkileşim için yeterli olmayacağı sonucuna varılmıştır. 1:6 HA:CS ve 1:10 HA:CS nanopartiküllerin ise boyut olarak daha büyük olması ve 1:4 HA:CS oranından sonra yükün önemli ölçüde değişmediği göz önüne alınarak, 1:4 oranında HA:CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerle kalan deneylere devam edilmesine karar verilmiştir.

İkinci bir nanopartikül formülasyonu olarak nanopartiküllerin yüzeyleri kondroitin sülfat ile etkileştirilmiştir. Kondroitin sülfat miktarı optimizasyonu yapılmış, elde edilen nanopartiküller tane büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazı kullanılarak boyut ve yük olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7:** Farklı miktarlarda kondroitin sülfat ile etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerin yük/boyut analizleri

	yük	boyut	PDI
<b>2,29 uM (1mg ChoS)</b>	28.90 mV ± 1,17	450.8 nm ± 10,1	0.63
<b>3,44 uM (1,5 mg ChoS)</b>	27.82 mV ± 1,29	403.9 nm ± 10,6	0.51
<b>4,59 uM (2 mg ChoS)</b>	26.33 mV ± 2,02	383.6 nm ± 11,5	0.42
<b>5,73 uM (2,5 mg ChoS)</b>	25.01 mV ± 1,26	375.0 nm ± 13,8	0.40
<b>6,88 uM (3 mg ChoS)</b>	24.13 mV ± 1,58	357.8 nm ± 12,0	0.33
<b>8,03 uM (3,5 mg ChoS)</b>	16.75 mV ± 2,14	315.4 nm ± 11,2	0.29
<b>9,17 uM (4 mg ChoS)</b>	12.44 mV ± 1,41	320.2 nm ± 11,3	0.20
<b>10,32 uM (4,5 mg ChoS)</b>	7.04 mV ± 1,68	362.6 nm ± 18,9	0.34
<b>11,47 uM (5 mg ChoS)</b>	5,68 mV ± 2,50	425.1 nm ± 20,1	0.56
<b>13,76 uM (6 mg ChoS)</b>	-1.55 mV ± 4,09	467.7 nm ± 32,9	0.80

1:4 HA:CS oranı kullanılarak yapılan HA/CS ve 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş HA/CS nanopartiküllerin kimyasal yapılarının analizleri için FT-IR ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.17).

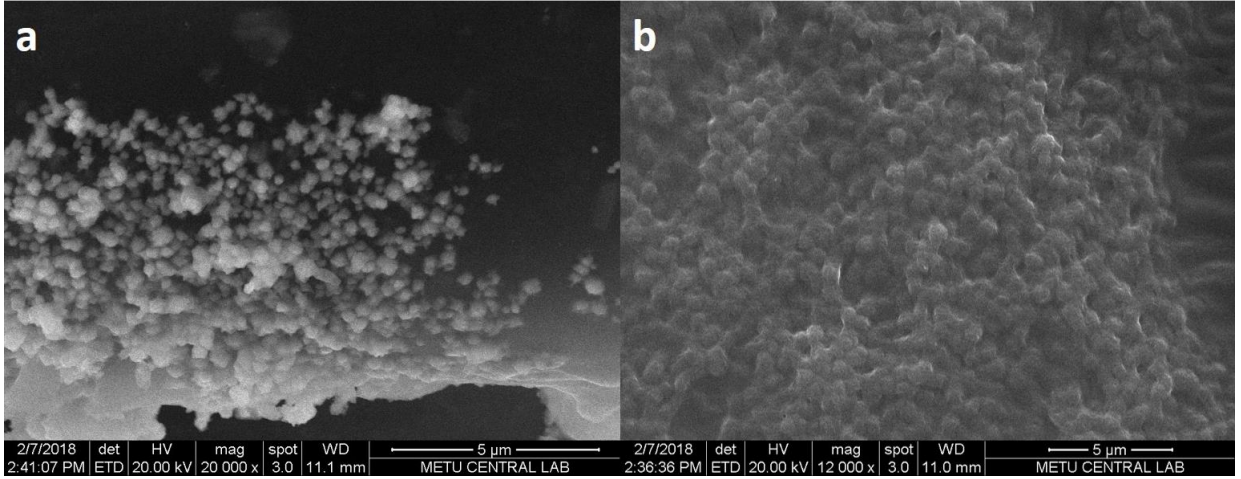


**Şekil 4.17:** Elde edilen nanopartiküllerin FT-IR grafiği, mavi; kondroitin sülfat, kırmızı: HA/CS nanopartikül; mor: 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri temsil etmektedir.

Kondroitin sülfat, hyaluronik asit ve kitosana ait infrared spektrumları polisakkarit yapısı gereği oldukça örtüşen pikler sergilese de birkaç noktadaki değişim göze çarpmaktadır. Kondroitin sülfat kaplaması yapıldıktan sonra 1050 – 1200 cm<sup>-1</sup>

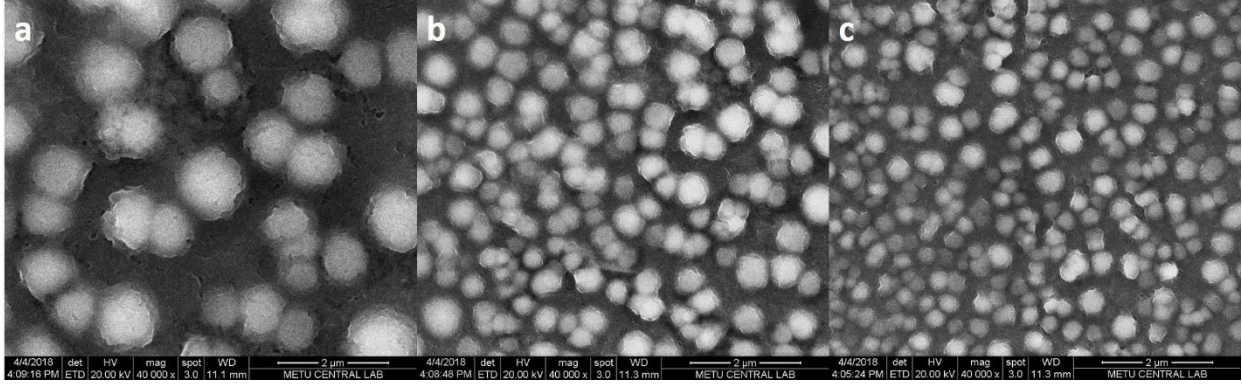
arasında gözlemlenen çoklu pikler sülfat varlığına işaret etmektedir. Ayrıca kitosan varlığında gözlemlenen N-H gerilimleri, kondroitin sülfatin tek başına sahip olduğu geniş O-H pikine katkıda bulunmuş ve nanopartiküllere eklendikten sonra üst üste örtüşen iki pik olarak gözlenmiştir. 1350-1400  $\text{cm}^{-1}$ 'de de güçlü sülfat piki kaplamanın varlığını doğrulamaktadır.

1:4 oranıyla hazırlanan HA/CS nanopartiküllerin morfolojik özellikleri alınan SEM görüntüleriyle karakterize edilmiştir (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18:** HA/CS nanopartiküllerin SEM görüntüleri, (a) 1:4 HA/CS nanopartiküllerin 20.000X büyütmede görüntüsü, (b) 1:4 HA/CS nanopartiküllerin 12.000X büyütmede görüntüsü

Alınan SEM görüntüleriyle partiküllerin küre formunda olduğu ve morfolojilerini korudukları gözlemlenmiştir. Etkileşime girmeyen polisakkaritlerin fotoğraflarda görünür olmasına rağmen, partikül morfolojisini bozmadıkları görülmektedir. Kondroitin sülfatla etkileştirilen nanopartiküllerin görüntüleri de alınmış, Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

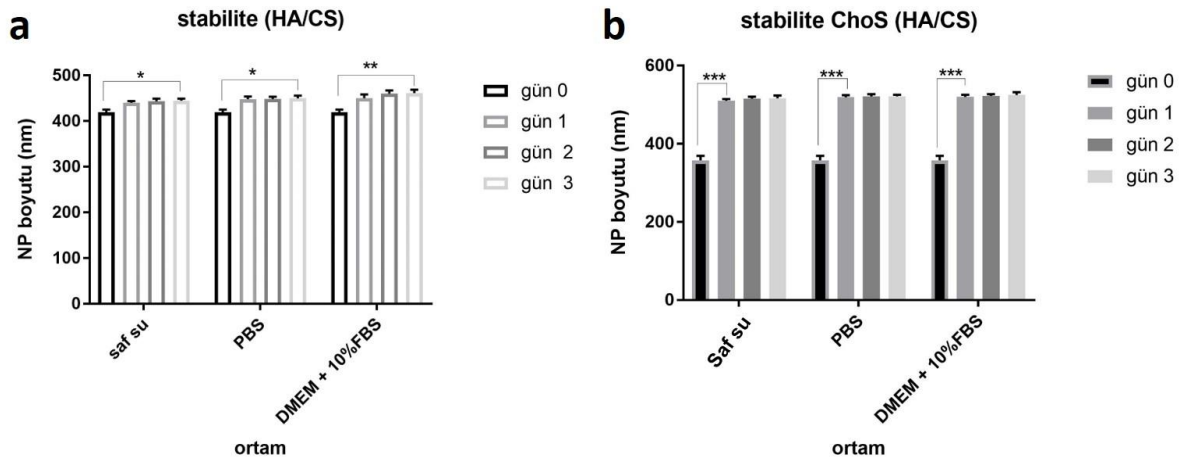


**Şekil 4.19:** Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş nanopartiküllerin SEM görüntüleri (a) 4,59 uM, (b) 6,88 uM ve (c) 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş olan HA/CS nanopartiküllerin 40.000X büyütmede çekilmiş SEM görüntüleri

SEM görüntülerinde kondroitin sülfat miktarındaki arttıkça nanopartiküllerin boyutlarının küçüldüğü belirlenmiştir. Sonuçlar boyut/yük analizleriyle uyum göstermektedir.

#### 4.3.1. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin stabilite testleri

Nanopartiküllerin stabilite testleri FBS içeren hücre kültür besiyeri, PBS ve saf suda 37°C'de inkübe edilerek yapılmıştır. Testlere 3 gün devam edilmiştir. 3 gün boyunca alınan örneklerin tane büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazında boyut analizi gerçekleştirilmiştir, sonuçlar Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.20:** Nanopartiküllerin stabilite analizleri, (a) HA/CS ve (b) 6,88 uM kondroitin sülfat ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartiküllerin stabilite sonuçları

Yapılan degradasyon analizleri, nanopartiküllerin DMEM, PBS ve saf su içerisinde 3 gün stabiliteyi koruduğu, hatta nanopartiküllerin şiştiğini göstermiştir. HA/CS

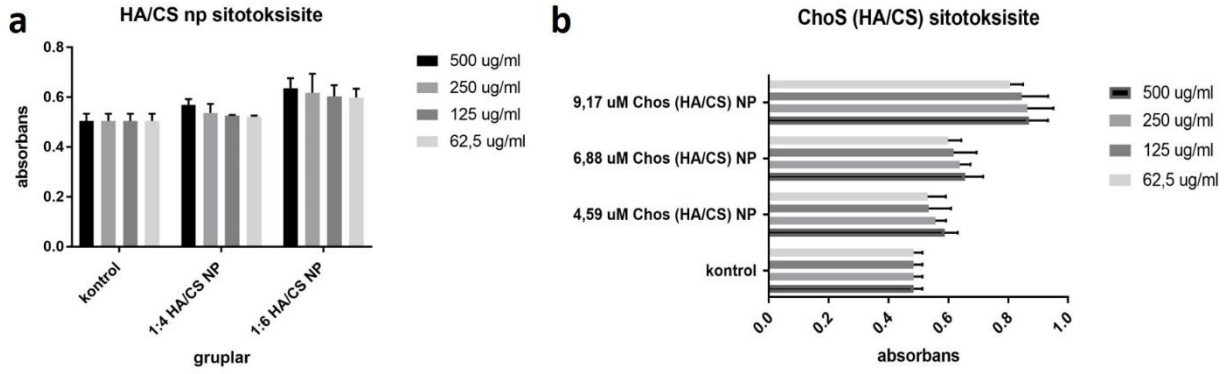
nanopartiküllerin 3.günün sonunda boyutlarını saf suda %6,81, PBS'te %7,39, DMEM+%10 FBS ortamında ise %9,09 oranında arttırdığı gösterilmiştir. Saf su ve PBS'teki artışın anlamlılık derecesi  $p \leq 0,05$ , DMEM + %10 FBS ortamında ise  $p \leq 0,01$  olarak belirlenmiştir. Partikül boyutlarında su, PBS ve DMEM + %10 FBS ortamlarında 1.gün sonunda da anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ).

Kondroitin sülfat kaplı nanopartiküllerin stabilite deneyleri için 6,88 uM kondroitin sülfatla kaplı olan HA/CS nanopartikül formülasyonu kullanılmıştır. Kondroitin sülfat kaplı olan partiküllerin boyutlarının HA/CS nanopartiküllere göre daha fazla arttığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Bu partiküller ilk gün sonunda boyutlarını saf suda %42,66, PBS'te %45,14, DMEM + %10 FBS ortamında ise %45,30 arttırmışlardır ( $p \leq 0,001$ ). Partiküllerin sonraki günlerde boyutlarında anlamlı bir fark belirlenememiştir.

#### **4.3.2. HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin sitotoksosite analizleri**

HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküller mikro RNA ile etkileştirilmeden önce MTT metodu kullanılarak sitotoksiteleri belirlenmiştir (Şekil 4.21). Hidrojel sonuçlarına benzer olarak nanopartiküllerin proliferasyonu uyardığı gözlemlenmiştir. HA/CS nanopartiküllerinin 1:4 HA:CS ve 1:6 HA:CS formülasyonları 500 ug/mL, 250 ug/mL, 125 ug/mL ve 62,5 ug/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. 1:4 HA/CS formülasyonunun 500 ug/mL konsantrasyonunda kontrol grubuna göre %12,77 artışla anlamlı bir fark oluşturduğu gösterilmiştir ( $p \leq 0,05$ ), diğer konsantrasyonlarda anlamlı farklılık gözlenmemiştir. 1:6 HA:CS formülasyonunun ise 125 ug/mL ve 62,5 ug/mL konsantrasyonu dışındaki tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir fark gösterdiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ).

Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş nanopartiküllerin sitotoksosite analizleri için 4,59 uM, 6,88 uM ve 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller 500 ug/mL, 250 ug/mL, 125 ug/mL ve 62,5 ug/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu artmış, kontrol grubu ile 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller ve 6,58 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller ile 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller arasında anlamlı fark belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ). 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin 500 ng/mL konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunun neredeyse iki kat arttığı gözlemlenmiştir ( $p \leq 0,0001$ ). Bunun yanısıra tüm gruplarda, grup içerisinde konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir.



**Şekil 4.21:** Nanopartiküllerin sitotoksosite sonuçları (a) HA/CS (b) ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin sitotoksosite grafikleri

#### 4.3.3. HA/CS nanopartiküllerinin mikro RNA-149-5p ile etkileştirilme analizleri

İkinci aşamada partiküllerin mikro RNA enkapsülasyonları optimize edilmiştir. Mikro RNA'lar N:P oranına göre hesaplanarak partiküllerle etkileştirilmiştir. N:P oranı polimer yapıdaki pozitif aminlerin oligonükleotitteki negatif yüklü fosfat gruplarına oranını göstermektedir. N:P oranları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [416].

$$m (\text{polimer}) = n (\text{mikro RNA}) \times \text{fosfat grubu sayısı} \times \text{MW (protonlanabilir birim)} \times (\text{N:P})$$

m, gerekli polimer kütlelerini, n ise gerekli mikro RNA'nın mol sayısını temsil etmektedir. Kitosanın protonlanabilir biriminin molekül ağırlığı aynı ticari ürünün kullanıldığı yayınlar referans alınarak 165 Da olarak kabul edilmiştir [417]. Bu tez çalışmasında kullanılan mikro RNA 149-5p 23 nükleotitten ve tek zincirden oluştuğu için fosfat grup sayısı sayısı 23 olarak alınmıştır. Buna göre hesaplanan N:P oranlarına göre hazırlanan HA:CS nanopartiküllerin tane büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazında gerçekleştirilen boyut ve yük analizleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.8:** Farklı N:P oranlarıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerin boyut/yük analizleri

	Boyut	Yük
<b>1:1 N:P</b>	303,2 nm ± 18,1	15,2 mV ± 2,21
<b>5:1 N:P</b>	355,8 nm± 12,9	18,4 mV ± 1,22
<b>10:1 N:P</b>	384,1 nm± 15,1	19,1 mV ± 1,60
<b>15:1 N:P</b>	410,3 nm± 13,6	19,8 mV ± 1,58
<b>20:1 N:P</b>	425,8 nm± 11,3	20,1 mV ± 1,42
<b>25:1 N:P</b>	443,7 nm± 13,8	25,6 mV ± 1,71
<b>30:1 N:P</b>	450,8 nm± 10,7	31,8 mV ± 1,24
<b>35:1 N:P</b>	542,3 nm± 22,4	32,3mV ± 2,03



Sonrasında partiküller, 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra enkapsüle edilemeyen RNAların belirlenmesi amacıyla Qubit 3.0 floresan okuyucu (Thermo Fisher Scientific) ile ölçülmüştür. Ölçüm için Qubit microRNA assay kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Kit protokolü takip edilerek, 1:200 oranında Qubit boyası içeren çalışma solüsyonu hazırlanmış ve 20ul partikül solüsyonu ile karıştırılarak ölçüm alınmıştır. Hesaplanan yüklenme verimleri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

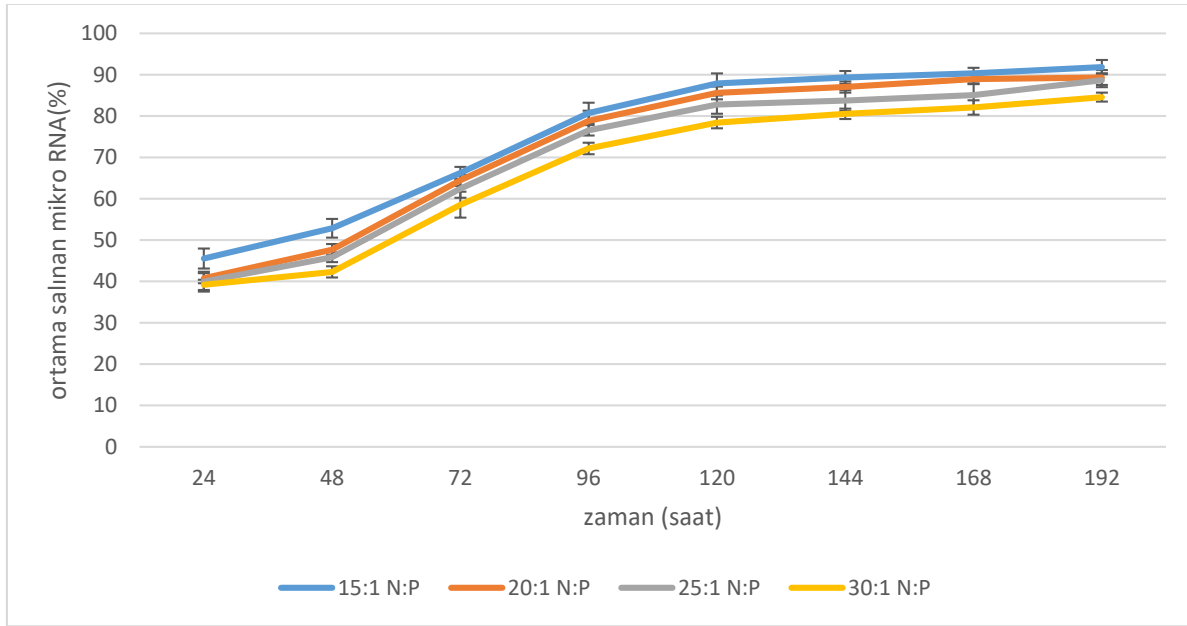
**Çizelge 4.9:** Farklı N:P oranlarıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerin boyut/yük analizleriyle birlikte RNA yüklenme verimleri

	Boyut	Yük	Yüklenme verimi (%)
<b>1:1 N:P</b>	303,2 nm ± 18,1	15,2 mV ± 2,21	68,26%
<b>5:1 N:P</b>	355,8 nm± 12,9	18,4 mV ± 1,22	78,80%
<b>10:1 N:P</b>	384,1 nm± 15,1	19,1 mV ± 1,60	82,88%
<b>15:1 N:P</b>	410,3 nm± 13,6	19,8 mV ± 1,58	87,34%
<b>20:1 N:P</b>	425,8 nm± 11,3	20,1 mV ± 1,42	91,02%
<b>25:1 N:P</b>	436,7 nm± 13,8	25,6 mV ± 1,71	92,75%
<b>30:1 N:P</b>	440,8 nm± 10,7	31,8 mV ± 1,24	94,53%
<b>35:1 N:P</b>	542,3 nm± 22,4	32,3mV ± 2,03	95,10%

Beklenildiği üzere pozitif yükün artışıyla enkapsülasyon yüzdelerinin doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür. Yüklenme verimleri (enkapsülasyon değerleri) arttıkça nanopartikül boyutlarının da arttığı gösterilmiştir. 35:1 N:P oranıyla hazırlanan nanopartiküllerde gözle görülür boyut artışına rağmen, yüklenme verimleri ve yüzey yükünde önemli bir değişiklik görülmediğinden, 30:1 N:P oranıyla hazırlanan nanopartiküllerle deneylere devam edilmiştir.

#### **4.3.4. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartiküllerinin mikro RNA salım profillerinin belirlenmesi**

Oluşturulan mikro RNA enkapsüle edilmiş nanopartiküller 37°C'de hafif karıştırmada diyaliz edilmiştir. Her gün 20ul alınarak yukarıda belirtildiği şekliyle Qubit floresan okuyucu ile ölçüm alınarak, ortama salınan mikro RNA miktarı ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.22:** Farklı N:P oranlarıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerin mikro RNA salım profilleri

Salımın ilk 7 saatinde gruplar arasında herhangi anlamlı bir fark belirlenememiştir. 24.saatte 15:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin etkileştikleri mikro RNA'nın %45,53'ünü saldıkları gözlemlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ). 48.saatte tüm gruplar arasında anlamlı fark oluşmaya başlamış, 15:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin etkileştikleri mikro RNA'nın %52,84'ünü, 20:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin %48,28'ini, 25:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin %45,85'ini, 30:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin ise etkileştikleri mikro RNA'nın %41,29'unu serbest bıraktıkları gösterilmiştir ( $p \leq 0,05$ ). 192 saatin sonunda da, 25:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin mikro RNA salımı (%88,65) ile 30:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin mikro RNA salımı (%84,57) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.5. ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin mikro RNA-149-5p ile etkileştirilme analizleri

Elde edilen partiküller ile mikro RNA etkileşimi, yüzey elektrostatik etkileşimi ve enkapsülasyon olmak üzere iki farklı metotla denenmiştir. İlk metotta 6.88 uM kondroitin sülfat ile kaplanmış HA/CS nanopartiküllerine 30:1 N:P oranına uyacak şekilde mikro RNA molekülleri karıştırılarak 37°C'de 4 saat inkübe edilmiş, böylece mikro RNAların yüzeye bağlanması sağlanmıştır. Enkapsülasyon metoduyla ise

yukarıda belirtildiği şekilde mikro RNA molekülleri 30:1 N:P HA/CS partiküller içerisine hapsedilmiş, sonrasında 6.88 uM kondroitin sülfat ile etkileştirilmiştir. Partiküller Zeta Sizer cihazında DLS tekniğiyle boyut/yük olarak karşılaştırılmış ve 24 saat sonunda salımları kontrol edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.10:** Farklı tekniklerle mikro RNA ile etkileştirilen nanopartikül yük/boyut ve etkileşim analizleri

Metot	Boyut	Yük	24 saat sonundaki ortamdaki serbest RNA
<b>Enkapsülasyon</b>	580,7 nm $\pm$ 20.3	21,32 mV $\pm$ 1.7	% 44,3
<b>Yüzeyle etkileştirme</b>	259,45 nm $\pm$ 11.42	15,76 mV $\pm$ 0.8	% 31,8

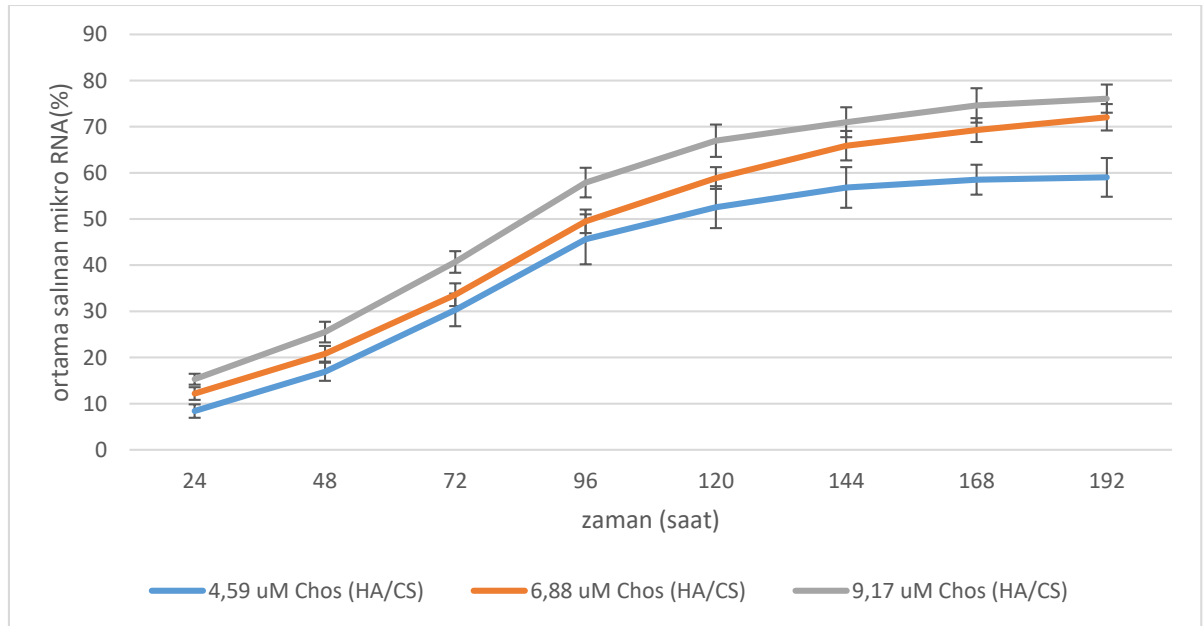
Sonuçlarda görüldüğü üzere mikro RNA'ların yüzeyle etkileştirilmesi sonucu partikül boyutu %44.6 oranında küçülmüştür. Bunun sebebinin elektrostatik etkileşimler olduğu düşünülmektedir. Yine bu kuvvetler sayesinde, yüzeyle tutturulan mikro RNA'ların daha stabil olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin hücreye girmesi için pozitif yüklü olmaları gerekirken birlikte, yüksek pozitif yükün toksisiteye sebep olduğu bilinmektedir. Yüzeyle mikro RNA etkileştirilen nanopartiküllerin yüklerinin mikro RNA enkapsüle edilmiş partiküllerden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bütün bu sebepler göz önüne alınarak diğer deneylere yüzeyle etkileştirme metodu ile devam edilmesine karar verilmiştir. Boyut/yük analizleri yapılan kondroitin sülfat kaplı HA/CS nanopartiküllerden 4,59 uM, 6,88 uM ve 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş olan nanopartiküller 30:1 N:P oranında olacak şekilde mikro RNA'lar ile etkileştirilmiş, boyut/yük özellikleri, etkileştirme verimleri (yüklenme verimleri) ve salımları yukarıda belirtilen metotlarla belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.11'de ve Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.11:** Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş olan HA/CS nanopartiküllerin mikro RNAlar ile etkileştirildikten sonraki boyut/yük özellikleri, yüklenme verimleri

	Yük	Boyut	+RNA (Yük)	+RNA (Boyut)	Yük.ver.
<b>4,59 uM ChoS</b>	26,33 mV ± 2,02	388,6 nm ± 11,5	17,51 mV ± 2,15	412,26 nm ± 21,18 (PDI 0.4)	84,13%
<b>6,88 uM ChoS</b>	24,13 mV ± 1,58	357,8 nm ± 12,0	15,76 mV ± 1,59	259,45 nm ± 13,89 (PDI 0.24)	73,87%
<b>9,17 uM ChoS</b>	12,44 mV ± 1,41	323,2 nm ± 11,3	9,23 mV ± 1,38	180,2 nm ± 10,23 (PDI 0.19)	60,97%

#### 4.3.6. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin mikro RNA salım profillerinin belirlenmesi

Oluşturulan mikro RNA enkapsüle edilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller 37°C'de hafif karıştırmada diyaliz edilmiştir. Her gün 20ul alınarak yukarıda belirtildiği şekliyle Qubit floresan okuyucu ile ölçüm alınarak, ortama salınan mikro RNA miktarı ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 24'te gösterilmiştir.



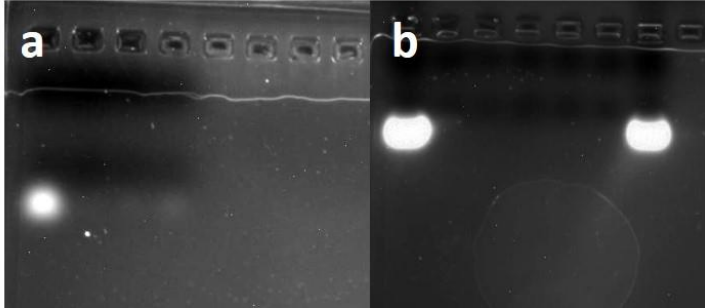
**Şekil 4.23:** ChoS(HA/CS) nanopartiküllerin mikro RNA salım profilleri, 4,59 uM, 6,88 uM ve 9,17 uM ChoS (HA/CS)

Salımın ilk 24 saati nanopartiküllerin salım davranışları arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir. 24 saat sonrasında 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS

(HA/CS) nanopartikülün etkileştiği mikro RNA'nın %8,4'ünü, 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülün etkileştiği mikro RNA'nın %12,2'sini, 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülün etkileştiği mikro RNA'nın %15,3'ünü serbest bıraktığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Salım profilleri 48.saatten sonra tekrar benzeşmeye başlamış, salım deneyi sonuna kadar gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenememiştir. 192 saatin sonunda enzimsiz ortamda 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülün etkileştiği mikro RNA'nın %59,03'ünü, 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülün etkileştiği mikro RNA'nın %72,14'ünü, 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülün etkileştiği mikro RNA'nın %76,27'sini serbest bıraktığı belirlenmiştir.

#### 4.3.7. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin jel retardasyon analizleri

HA/CS ve Kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin mikro RNA-149-5p ile etkileşimleri elektroforez yöntemi ile de kanıtlanmıştır. Elektroforez, örneklerin %2'lik agaroz jelde 80V'de 15dakika yürütülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Alınan jel görüntüsü Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.24:** Jel retardasyon analizleri sonuçları (a)Sırasıyla 1nmol mikro RNA, 1:30, 1:25 ve 1:20 N:P oranlarıyla 1 nmol mikro RNA enkapsüle edilmiş 1:4 oranında hazırlanmış HA/CS nanopartiküller , (b) Sırasıyla 2 nmol kontrol mikro RNA, 1:30 oranında 2 nmol mikro RNA ile etkileştirilmiş 4,59 um, 5,73 um, 6,88 um, 8,03 um, 9,17 um kondroitin sülfat kaplı HA/CS nanopartiküller, enzimle degrade edilmiş 9,17 um kondroitin sülfat kaplı mikro RNA içeren HA/CS nanopartiküllerin jel görüntüsü

Elektroforez deneylerinde mikro RNA başarılı bir şekilde taşıyıcı ile etkileştiğinde jelde mikro RNA'nın görülmemesi veya etkileşme derecesine göre mikro RNA ışımalarının azalması beklenilmektedir. Bu şekilde bakıldığında HA/CS nanopartiküllerinde etkileştirilen partikül oranı arttıkça, yani N:P oranları azaldıkça jelde mikro RNA

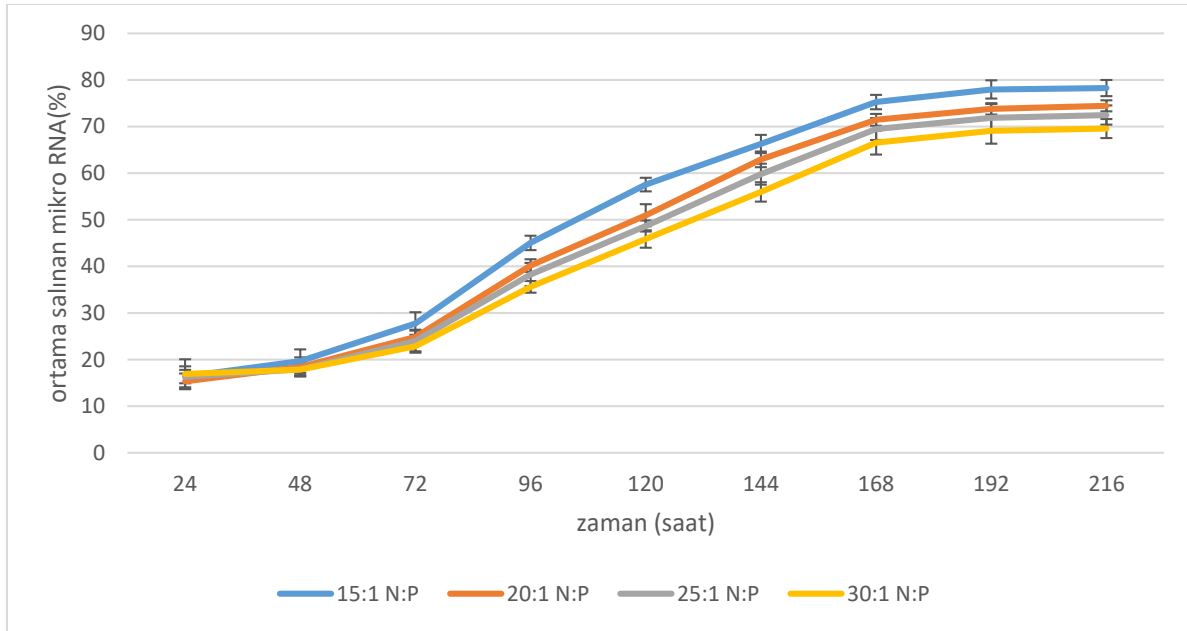
ışımasında azalma görülmektedir. En yüksek N:P oranı olan 1:20 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilen 1:4 HA/CS nanopartiküllerin jelde ışıması az da olsa görünmektedir, yani etkileşememiş mikro RNA miktarı diğer gruplardan fazladır. Genel itibariyle hiçbir grupta kontrol mikro RNA'ya benzer bir ışımaya görülmemesi, nanopartiküllerin mikro RNA ile başarılı bir şekilde etkileşimini göstermektedir.

Benzer bir durum Chos (HA/CS) nanopartiküllerinde de görülmektedir. Bu partiküllerin yapı olarak HA/CS nanopartiküllerine göre daha kompakt olması sebebiyle jelde zayıf da olsa ışımaya bile görülememektedir, bu da nanopartiküllerin mikro RNA-149-5p ile başarılı bir şekilde etkileştirildiğinin kanıtıdır. İlk sırada gösterilen kontrol mikro RNA ile deterjanla parçalandıktan sonra elde edilen mikro RNA ışımasının benzerliği de başarılı partikül-mikro RNA etkileşimini göstermektedir.

#### **4.4. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri katkılı 2:1 CSMA:GELMA hidrojellerinin karakterizasyonları**

Yukarıda belirtilen metotlarla hazırlanmış nanopartiküller enjekte edilebilir CSMA-GELMA hidrojeller (2:1 CSMA:GELMA) içerisine enkapsüle edilmiş ve mikro RNA salım profilleri yukarıda belirlenen metotlarla belirlenmiştir. Hidrojel enkapsülasyonunun mikro RNA salımını önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Salım grafiği Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

İlk 96 saatte gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte, salımın 96.saatinden sonra 15:1 N:P oranıyla mikro RNA ile etkileştirilen HA/CS nanopartikülleri ile 20:1 N:P oranıyla mikro RNA ile etkileştirilen HA/CS nanopartikülleri arasında anlamlı bir fark belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ). 216 saatin sonunda partiküller arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 15:1 N:P oranıyla mikro RNA ile etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerinin etkileştikleri mikro RNA'nın %78,26'sını, 20:1 N:P oranıyla mikro RNA ile etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerinin %74,25'ini, 25:1 N:P oranıyla mikro RNA ile etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerinin %72,12'sini, 30:1 N:P oranıyla mikro RNA ile etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerinin ise %69,56'sını ortama bıraktıkları gösterilmiştir.



**Şekil 4.25:** HA/CS nanopartiküller içeren CSMA:GELMA enjekte edilebilir hidrojelinin mikro RNA salım profili, Mikro RNA-149-5p ile 15:1, 20:1, 25:1 ve 30:1 N:P oranlarıyla etkileştirilmiş HA/CS nanopartiküller enkapsüle edilmiş enjekte edilebilir 2:1 CSMA:GELMA hidrojelilerin mikro RNA salım profilleri

#### 4.5. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülleriyle etkileştirilmiş hücrelerin gen ekspresyon analizleri

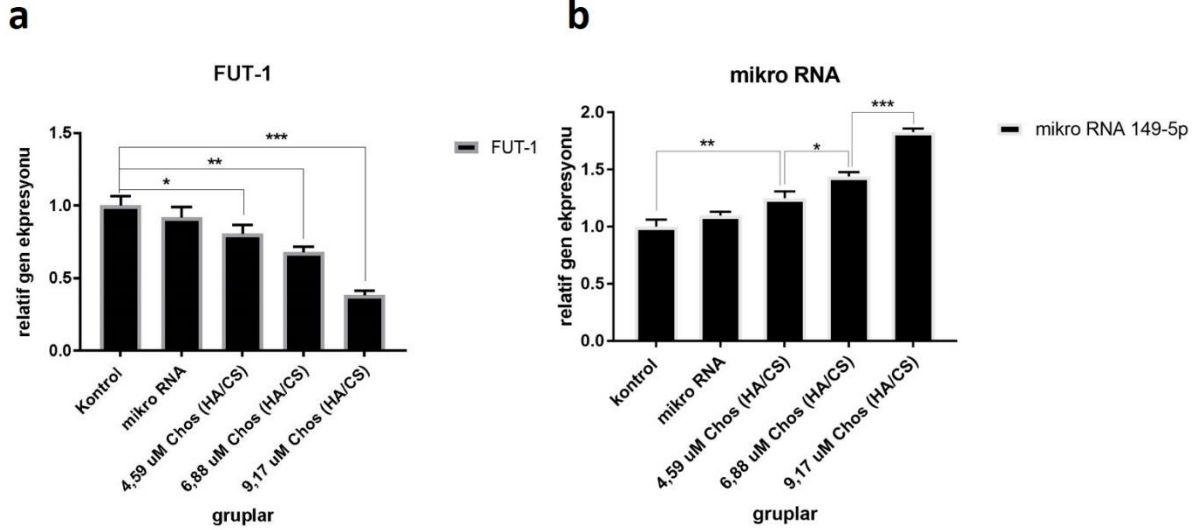
Mikro RNA-149-5p'nin kıkırdak dejenerasyonun en önemli sebeplerinden biri olan osteoartrit hastalığında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Mikro RNA-149-5p'nin hedef geni olan FUT-1 geni, mikro RNA-149-5p varlığında tam etkinlik gösterememekte, bu da hücre canlılığını arttırmaktadır [423]. Gen ekspresyonları FUT-1, erken dönem gen ekspresyon analizleri ve geç dönem gen ekspresyon analizleri olarak 3 kısımda incelenmiştir. FUT-1, mikro RNA-149-5p'nin hedef geni olarak taşıyıcının başarısını göstermektedir. Erken dönem gen ekspresyonları, SOX-9 ve COMP genlerini kapsamaktadır, mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasını göstermektedir [424]. Geç dönem gen ekspresyonları ise COL-2A1 ve AGC genlerini kapsamaktadır, kondrosit farklılaşmasında geç dönem belirteçleri olarak kabul görmektedir [425].

Tranfeksiyon deneylerinde ilk olarak mikro RNA-149-5p incelenmiştir. Başarılı bir transfeksiyon olması durumunda mikro RNA-149-5p miktarının artması beklenmektedir. Sonuçlar incelendiğinde, hücre içine giren mikro RNA miktarının nanopartiküllerle etkileştirilen kondroitin sülfat miktarı arttıkça arttığı görülmektedir.

En yüksek mikro RNA miktarı 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartikülü ile etkileştirilen hücrelerde görülmüş, kontrol grubuna göre %82,98 belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Deney grupları arasında hücre içerisine girmiş en az mikro RNA miktarı 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartikülleriyle görülmüştür, bu nanopartiküllerle etkileştirilen hücrelerde mikro RNA-149-5p miktarları kontrol grubuna göre %24,88 artmıştır ( $p < 0,01$ ). Kontrol grubu ile taşıyıcı olmadan mikro RNA verilen mezenkimal kök hücrelerin mikro RNA-149-5p seviyeleri arasında ufak bir değişiklik olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.26b).

Başarılı bir transfeksiyon olması durumunda, FUT-1 geninin ekspresyon seviyelerinin düşmesi beklenmektedir. Kontrol grubu ile taşıyıcı olmadan mikro RNA verilen mezenkimal kök hücrelerin FUT-1 gen ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen grubun FUT-1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %19,35 azalmıştır ( $p \leq 0,05$ ). 6,88 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen grubun FUT-1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %32,04 ( $p \leq 0,01$ ), 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen grubun FUT-1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %61,57 ( $p \leq 0,001$ ) azalmıştır. Sonuçlar taşıyıcının başarısını göstermektedir, mikro RNA yüklü ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin hepsi FUT-1 genini inhibe etmiştir (Şekil 4.26a).

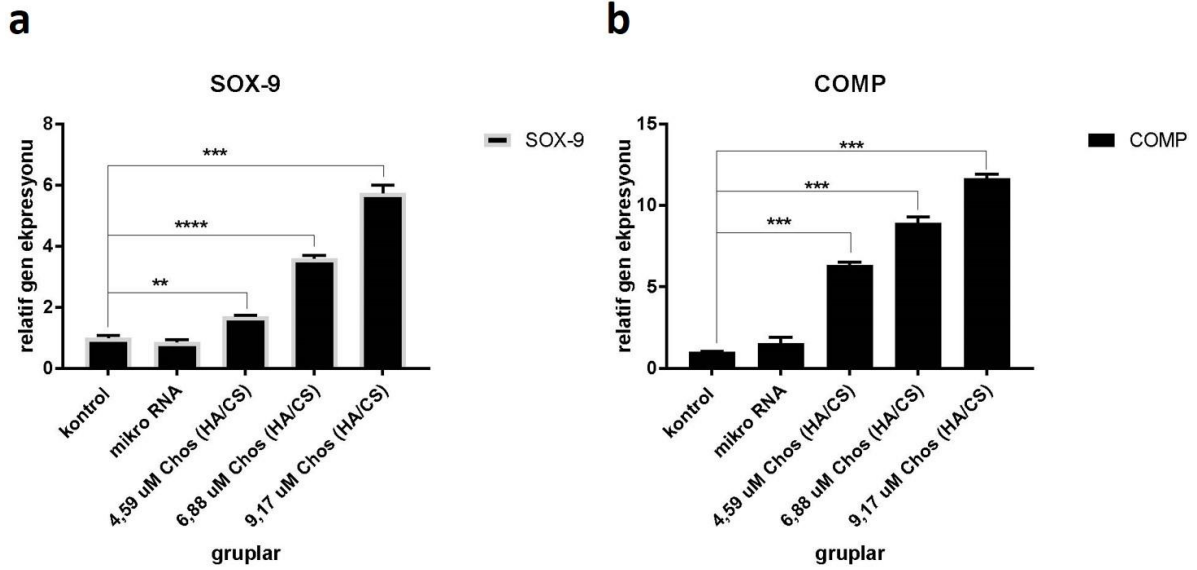




**Şekil 4.26:** ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin (a) FUT-1 (b) mikro RNA-149-5p gen ekspresyon analizi sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 4,59 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 6,88 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 9,17 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu

Gen ekspresyon analizinin ikinci aşamasında erken dönem kondrosit farklılaşma genleri olan SOX-9 ve COMP incelenmiştir. Kontrol grubu ile partikülsüz mikro RNA verilen hücre grubu arasında iki gen için de anlamlı bir farklılık belirlenememiştir. SOX-9 geni için; 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %69,94 artmıştır ( $p \leq 0,01$ ). 6,88 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun SOX-9 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre 2 katına, 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun ise kontrole göre 5 katına çıktığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,001$ ). COMP geni içinse, 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonu kontrol grubuna göre 6 katına, 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun 8 katına, 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen

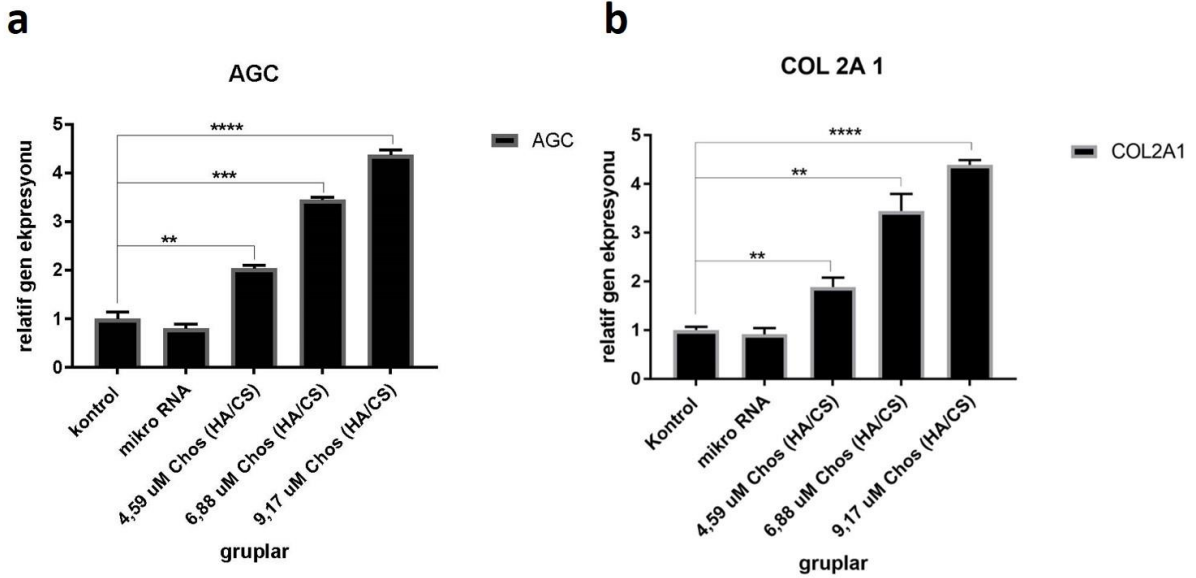
ekspresyonunun kontrol grubuna göre 10 katına çıktığı gösterilmiştir (  $p \leq 0,001$ ) (Şekil 4.27).



**Şekil 4.27:** ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin (a) SOX-9 (b) COMP gen ekspresyon analizi sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 4,59 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 6,88 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 9,17 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu

Erken dönem genlerindeki yüksek ekspresyon seviyeleri sebebiyle geç dönem kondrosit belirteçleri olan COL 2A-1 ve AGC genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol edilmiştir. Kontrol grubu ile partikülsüz mikro RNA verilen hücre grubu arasında iki gen için de anlamlı bir farklılık belirlenememiştir. AGC geni için; 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %98,93 artmıştır ( $p \leq 0,01$ ). 6,88 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre neredeyse 2 katına, 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun ise 3 katına çıktığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,01$ ). COL 2A-1 geni içinse; 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle

etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %88,64 artmıştır ( $p \leq 0,01$ ). 6,88 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonu kontrol grubuna göre %244,76 ( $p \leq 0,01$ ), 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunun gen ekspresyonunun ise %339,56 arttığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,001$ ) (Şekil 4.28).

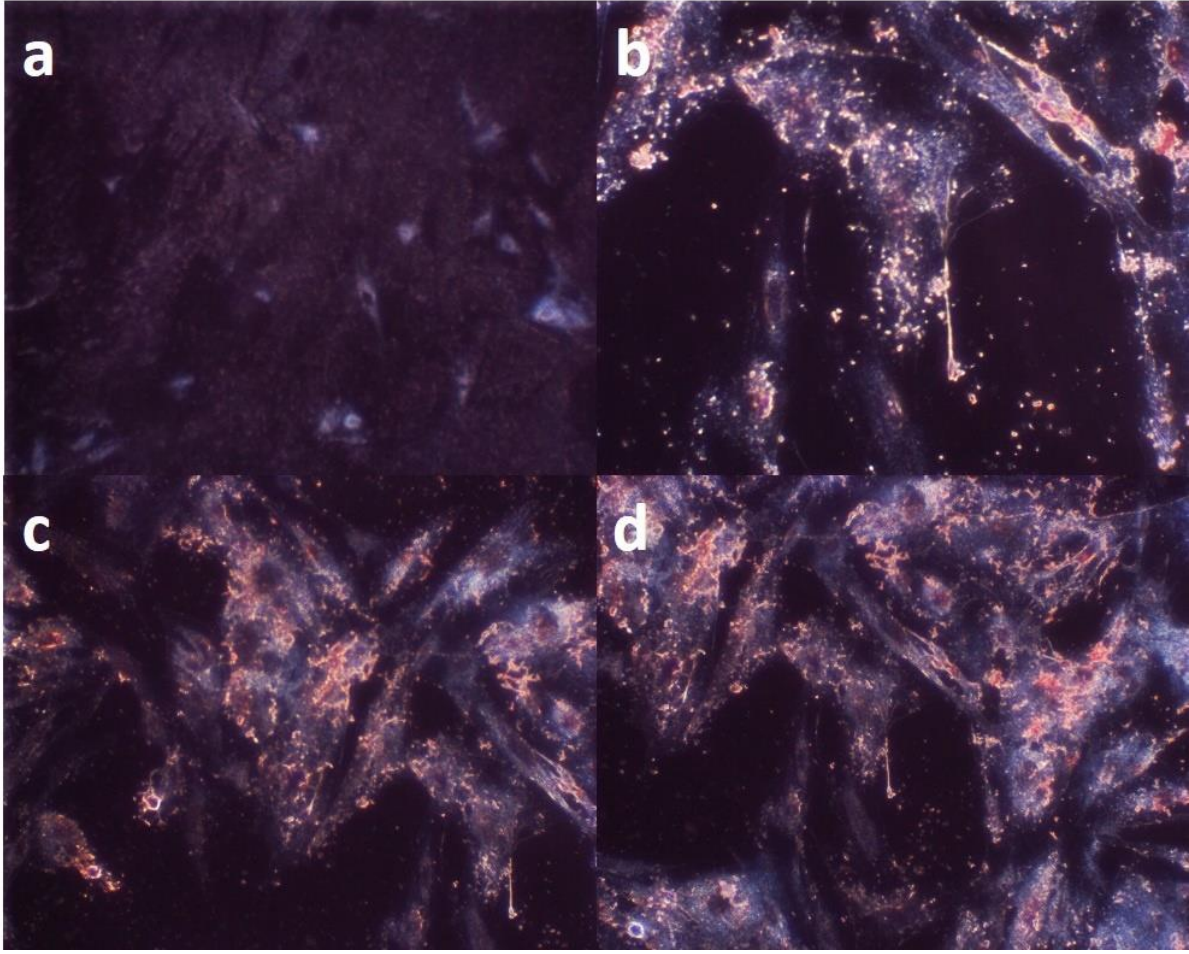


**Şekil 4.28:** ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin (a) AGC (b) COL2A1 gen ekspresyon analizi sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 4,59 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 6,88 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 9,17 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu

#### 4.6. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartikülleri ile etkileştirilen hücrelerin sGAG boyamaları

Nanopartiküllerin kondrogenez üzerindeki etkisi sGAG boyaması ile valide edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla nanopartiküllerle inkübe edilen hücrelerin kondrosit belirteçlerinden biri olan glikozaminoglikan sentezine başladıkları belirlenmiştir. Hücreler arkaplanın belirlenmesi için Fast Green boyası, sülfatlanmış

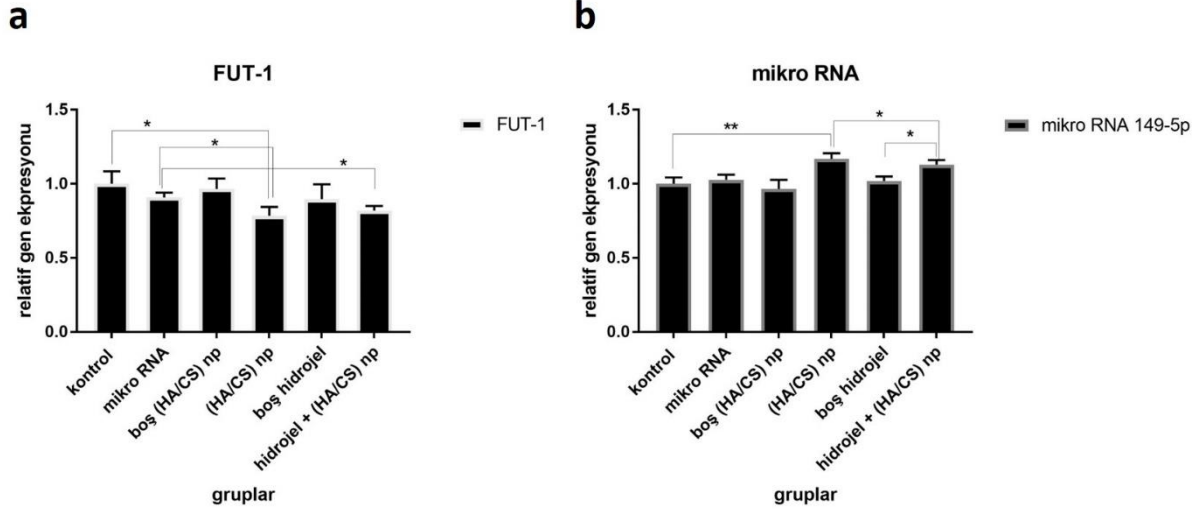
glikozaminoglikanların boyanması için de Safranin O boyasıyla boyandıktan sonra mikroskopta görüntülenmiş, fotoğraflar Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.29:** ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mezenkimal kök hücrelerin sGAG boyamaları (a) kontrol, (b) 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; (c) 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; (d) 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu

#### **4.7. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri ile bu partiküllerle katkılanmış 2:1 CSMA:GELMA hidrojelleriyle etkileştirilen hücrelerin gen ekspresyon analizleri**

Sunulan tez çalışmasının son aşamasında mikro RNA-149-5p enkapsüle edilmiş HA/CS nanopartikülleri taşıyan CSMA:GELMA hidrojellerinin seçilen RNA'nın hedef geni olan FUT-1 geni ve kondrosit farklılaşma belirteçleri olan SOX-9, COMP, AGC ve COL2A1 genleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.



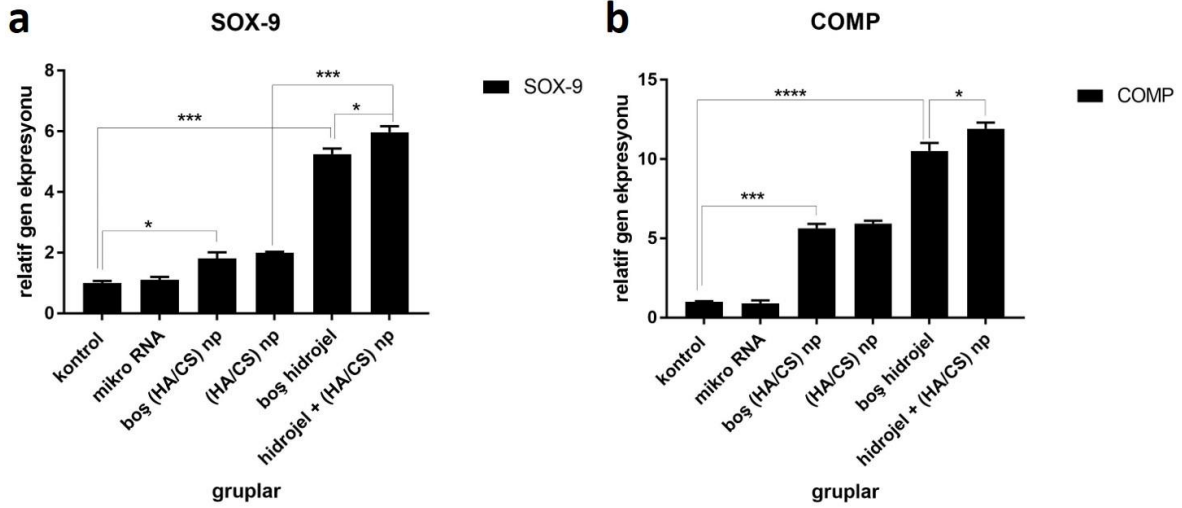
Şekil 4.30: mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri içeren CSMA:GELMA hidrojelinin (a) FUT-1 (b) mikro RNA-149-5p gen ekspresyon analizi sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; boş (HA/CS) np: mikro RNA ile etkileştirilmemiş 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, (HA/CS) np: mikro RNA ile etkileştirilmiş 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, boş hidrojel: Nanopartikül içermeyen CSMA:GELMA hidrojel uygulanan hücre grubu, hidrojel + (HA/CS) np: mikro RNA taşıyan nanopartiküllerin hapsedildiği CSMA:GELMA hidrojel uygulanan hücre grubu

Hücre transfeksiyonun başarısının belirlenmesi açısından hücre içindeki mikro RNA 149-5p miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar, mikro RNA taşımayan HA/CS ya da CSMA:GELMA hidrojellerin hücrelerin mikro RNA-149-5p sentezine anlamlı bir etkisi olmadığını göstermektedir. Aynı şekilde taşıyıcısız hücrelerle etkileştirilen mikro RNA'nın hücre içine verimli bir şekilde alınmadığı görülmektedir. Mikro RNA taşıyan HA/CS nanopartiküller ile etkileştirilen hücrelerin mikro RNA-149-5p miktarlarının kontrol grubuna göre %16,97 arttığı belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Mikro RNA taşıyan HA/CS nanopartiküllerin hapsedildiği hidrojellerle inkübe edilen hücrelerin ise mikro RNA 149-5p miktarlarının ise kontrol grubuna göre %12,96 arttığı hesaplanmıştır ( $p < 0,01$ ). Mikro RNA miktarındaki bu azalma istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte, hidrojel mikro RNA salımını geciktirmesine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.30b).

Kontrol grubu ile partikülsüz mikro RNA verilen hücre grubu, veya boş partikül ya da boş hidrojel verilen hücre grupları arasında FUT-1 geni için anlamlı bir farklılık

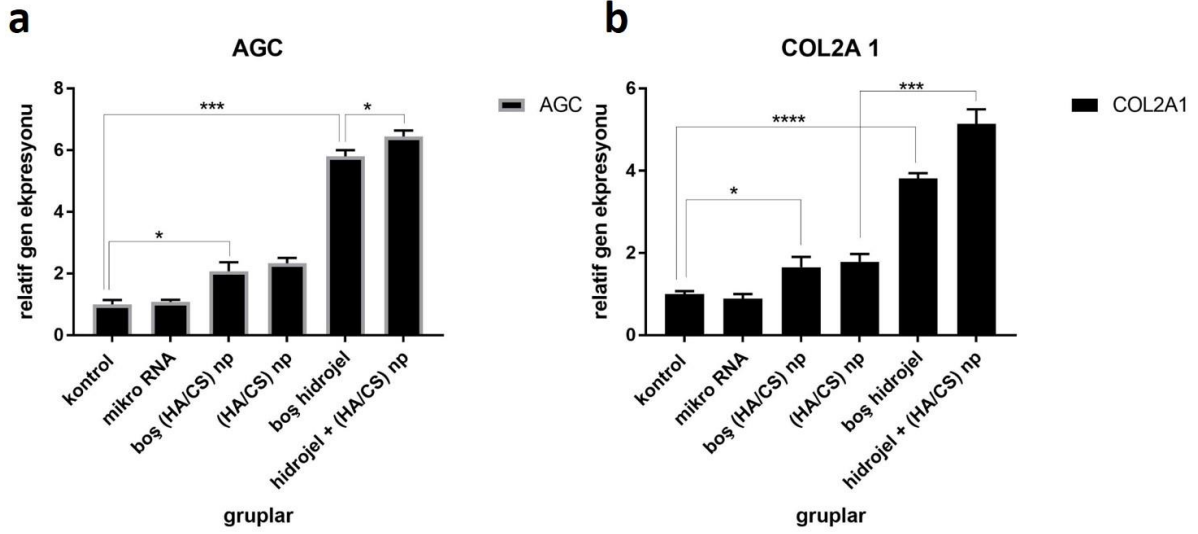
belirlenememiştir. Mikro RNA'lı HA/CS nanopartikül FUT-1 gen ekspresyonu seviyesini kontrol grubuna göre %21,16 azaltmıştır (  $p \leq 0,05$ ). Nanopartiküllerin hidrojel içerisinde hapsedildiği formülasyon hücrelerin FUT-1 gen ekspresyonunu %18,04 oranında azaltmış, ancak mikro RNA'lı nanopartiküllerin sebep olduğu FUT-1 gen ekspresyon seviyesiyle arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.30a).

İkinci aşamada, partikül ve hidrojelin mezenkimal kök hücre farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi amacıyla erken dönem kondrosit gen belirteçleri analiz edilmiştir. SOX-9 geni için, boş HA/CS nanopartikülü verilen hücrelerin gen ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %81,45 arttığı gösterilmiştir (  $p \leq 0,05$ ). Boş CSMA:GELMA hidrojelinin uygulandığı hücrelerde SOX-9 ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 4 katına çıkmış (  $p \leq 0,001$ ), nanopartikül içeren hidrojelin uygulandığı hücrelerde ise ekspresyonun yaklaşık 5 kat arttığı gösterilmiştir (  $p \leq 0,0001$ ). COMP geni içinse, boş HA/CS nanopartikülü verilen hücrelerin gen ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %464,30 arttığı belirlenmiştir (  $p \leq 0,001$ ). Boş CSMA:GELMA hidrojelinin uygulandığı hücrelerde COMP ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 9 katına çıkmış (  $p \leq 0,001$ ), nanopartikül içeren hidrojelin uygulandığı hücrelerde ise ekspresyonun neredeyse 10 kat arttığı hesaplanmıştır (  $p \leq 0,0001$ ) (Şekil 4.31).



**Şekil 4.31:** mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri içeren CSMA:GELMA hidrojelinin (a) SOX-9 ve (b) COMP gen ekspresyon analizi sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; boş (HA/CS) np: mikro RNA ile etkileştirilmemiş 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, (HA/CS) np: mikro RNA ile etkileştirilmiş 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, boş hidrojel: Nanopartikül içermeyen CSMA:GELMA hidrojelini uygulanan hücre grubu, hidrojel + (HA/CS) np: mikro RNA taşıyan nanopartiküllerin hapsedildiği CSMA:GELMA hidrojelini uygulanan hücre grubu

Geç dönem kondrosit belirteçleri olarak AGC ve COL2A1 incelenmiştir. İki gen için de, boş HA/CS nanopartikülü verilen hücrelerin gen ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Boş CSMA:GELMA hidrojelinin uygulandığı hücrelerde AGC ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat, COL2A1 ekspresyonu ise neredeyse 5 kat artmıştır ( $p \leq 0,0001$ ). Nanopartikül içeren hidrojelini uygulandığı hücrelerde ise AGC ekspresyonu boş hidrojelini uygulandığı hücrelere göre %11,11 ( $p \leq 0,05$ ) artsa da, COL2A1 gen ekspresyonunda anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.32).

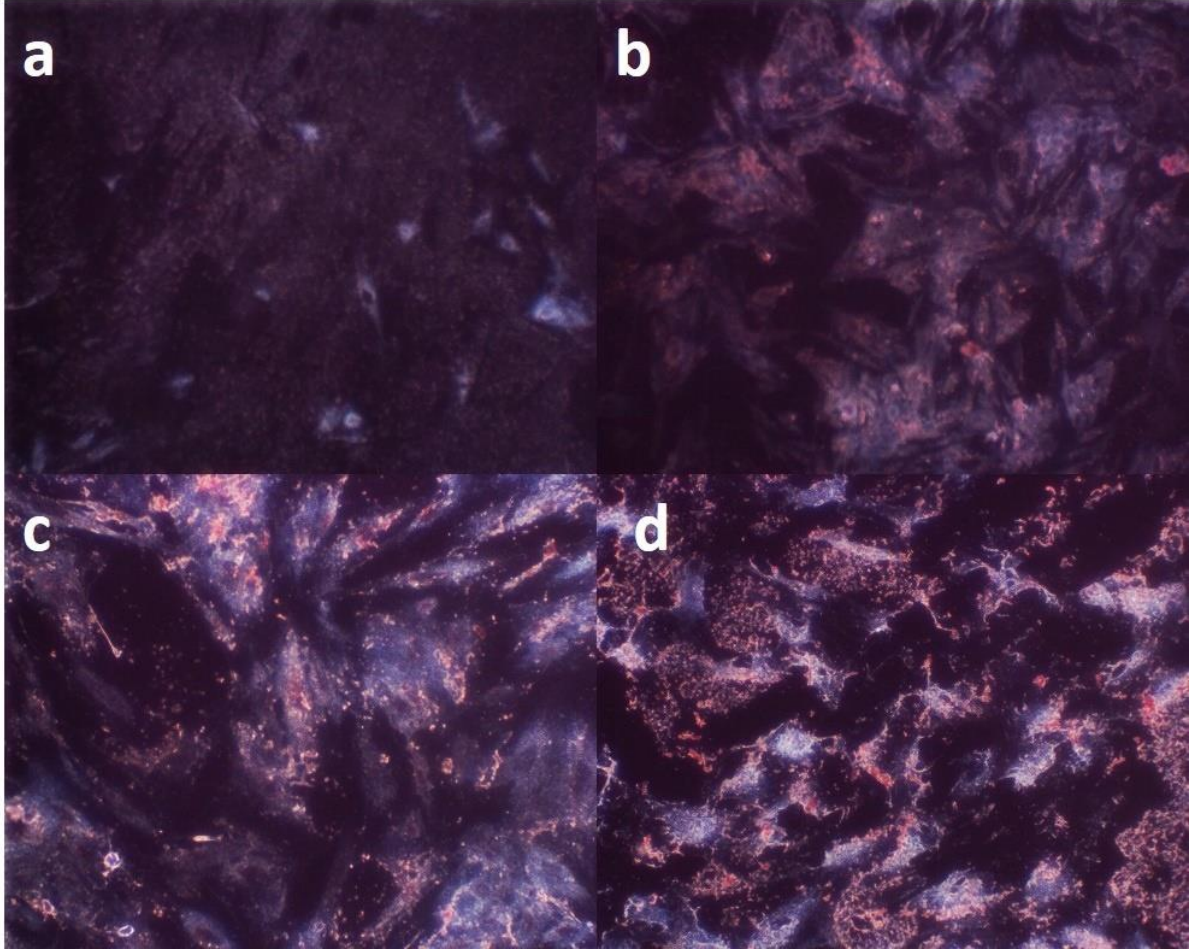


**Şekil 4.32:** mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri içeren CSMA:GELMA hidrojelinin (a) AGC ve (b) COL2A1 gen ekspresyon analizi sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; boş (HA/CS) np: mikro RNA ile etkileştirilmemiş 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, (HA/CS) np: mikro RNA ile etkileştirilmiş 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, boş hidrojel: Nanopartikül içermeyen CSMA:GELMA hidrojel uygulanan hücre grubu, hidrojel + (HA/CS) np: mikro RNA taşıyan nanopartiküllerin hapsedildiği CSMA:GELMA hidrojel uygulanan hücre grubu

#### 4.8. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartikülleri ile bu partiküllerle katılanmış 2:1 CSMA:GELMA hidrojelleriyle etkileştirilen hücrelerin sGAG boyamaları

Hidrojel ve nanopartiküllerin kondrogenез üzerindeki etkisi sGAG boyaması ile valide edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla hidrojel ve nanopartiküllerle inkübe edilen hücrelerin kondrosit belirteçlerinden biri olan glikozaminoglikan sentezine başladıkları belirlenmiştir. Nanopartiküller ve hidrojel ile birlikte kültür edilen hücrelerin glikozaminoglikan sentezinin, sadece hidrojel ve sadece nanopartiküllerle kültür edilen hücrelere göre daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir. Hücreler arkaplanın belirlenmesi için Fast Green boyası, sülfatlanmış glikozaminoglikanların boyanması için de Safranin O boyasıyla boyandıktan sonra mikroskopta görüntülenmiş, fotoğraflar Şekil 4.33'te gösterilmiştir.





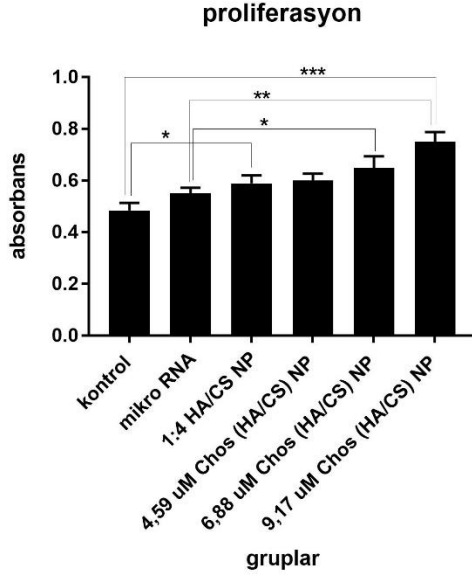
**Şekil 4.33:** HA/CS nanopartiküller ve CSMA:GELMA hidrojellerle etkileştirilmiş mezenkimal kök hücrelerin sGAG boyamaları (a) kontrol (b) 1:4 HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, (c) Nanopartikül içermeyen CSMA:GELMA hidrojeli uygulanan hücre grubu, (d) mikro RNA taşıyan nanopartiküllerin hapsedildiği CSMA:GELMA hidrojeli uygulanan hücre grubu

#### **4.9. Mikro RNA-149-5p ile etkileştirilmiş HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartikülleri ile etkileştirilmiş hücrelerin proliferasyon analizleri**

Mikro RNA-149-5p'nin proliferasyona pozitif etkisi bilinmektedir. FUT-1 geninin inhibisyonunun apoptozu engelleyerek hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir [423]. Bu sebeple mikro RNA ile etkileştirilen nanopartiküllerin hücre proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.34). Deney yukarıda belirtilen şekilde MTT yöntemiyle yapılmıştır.

Hücrelere taşıyıcısız verilen mikro-RNA-149-5p'nin hücre proliferasyonunu uyardığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak bir anlam taşımadığı gösterilmiştir. Mikro RNA-149-5p taşıyan HA/CS nanopartikülleri uygulanan hücrelerin proliferasyonlarını kontrol

grubuna göre %21,80 arttırdığı gözlemlenmiştir (  $p \leq 0,05$ ). 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen grupta hücre proliferasyonunun % 24,19 ( $p \leq 0,01$ ), 6,88 uM ChoS (HA/CS) grubunda %34 ( $p \leq 0,01$ ), 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerle etkileştirilmiş mikro RNA verilen hücre grubunda ise %51,49 ( $p \leq 0,001$ ) arttığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.34:** Mikro RNA-149-5p taşıyan HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartikülleri uygulanan hücrelerin proliferasyon sonuçları, kontrol: hiçbir taşıyıcı ya da gen içermeyen, yalnızca mezenkimal kök hücre grubu; mikro RNA: taşıyıcı içermeyen boş mikro RNA verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 1:4 HA/CS NP: mikro RNA ile etkileştirilmiş HA/CS nanopartiküllerinin verildiği kök hücre grubu, ; 4,59 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 4,59 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 6,88 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 6,88 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu; 9,17 uM ChoS (HA/CS): mikro RNA yüklü 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilmiş ChoS (HA/CS) nanopartiküller verilmiş mezenkimal kök hücre grubu

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sunulan tez çalışması kapsamında dejeneratif kıkırdak hasarlarının tedavisine yönelik enjekte edilebilir hidrojel sistemlerinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle enjekte edilebilir hidrojel formülasyonu optimize edilmiştir. Enjekte edilebilir doku iskelesi malzemesi olarak kıkırdak dokusunun hücrelerarası matrisinde çokca bulunan kondroitin sülfat ve kolajenden elde edilen jelatin kullanılmıştır. Polimerler stabilitelerinin artırılması ve çapraz bağlanabilmeleri amacıyla metakrilatlanarak kullanılmıştır [426]. Optimizasyon çalışmalarında kullanılan metakrilatlama ajanı ( MAAH ) miktarının hidrojellerin fiziksel özelliklerini önemli ölçüde belirlediği görülmüştür. CSMA için denenen 7,5 ve 30 mmol MAAH ve GELMA için denenen 2,5, 7,5 ve 12,5 mmol MAAH oranlarının hepsi katı hidrojel oluşmasına sebep olmuştur. Bu sebeple metakrilatlama ajanı olarak kullanılan MAAH oranı azaltılarak optimizasyonlara devam edilmiş, CSMA için 1 mmol, 1,32 mmol, 2 mmol ve 2,64 mmol oranında MAAH, GELMA içinse 3,96 mmol, 2,64 mmol ve 1,32 mmol oranında MAAH ile farklı miktarlarda kondroitin sülfat ve jelatin, farklı yüzdelerde ve farklı UV süreleriyle denenmiştir. MAAH ve UV süresi arttıkça daha kararlı hidrojeller oluştuğu, madde miktarının artmasının jel oluşumunda pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir. Genel olarak GELMA'nın CSMA'dan daha kolay jelleştiği gösterilmiştir, bu durum molekül yapılarıyla ilişkilidir. Elde edilen hidrojeller tek başlarına stabil bir yapı oluşturamadıklarından, hem stabilizeyi arttırmak hem de tezde planlanan kondrogenezi arttırmak amacıyla iki yapı fiziksel olarak karıştırılarak enjekte edilebilir jeller oluşturulmuştur. Yapılan optimizasyonlarla yukarıdaki belirtilen sebeplerle, GELMA miktarındaki artışın hidrojellerin gerekenden fazla çapraz bağlanmasına sebep olarak katılaşmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple CSMA oranı artırılmış, sonraki karakterizasyonlar 1:1 CSMA:GELMA, 2:1 CSMA:GELMA, 3:1 CSMA:GELMA formülasyonları için gerçekleştirilmiştir.

Yapılan fiziksel karakterizasyonlar üç jelin de fiziksel olarak literatürde bulunan diğer enjekte edilebilir hidrojellere benzerliğini göstermiştir [427-429]. Hidrojellerin biyolojik ajan taşınımına uygun, por boyutlarının kontrollü salıma uygun olduğu belirlenmiştir.

Tez kapsamında tasarlanan enjekte edilebilir hidrojeller kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlandığından hidrojellerin mekanik özellikleri karakterize edilmiştir. Kıkırdak doku için tasarlanan enjekte edilebilir jellerin regüler ya

da irregüler şekle sahip tüm kırıldak defektlerini doldurabilir yapıda ve enjekte edildikten sonra şeklini koruyor olması gerekmektedir [430]. Bu sebeple kayma testi uygulanmış, 2:1 CSMA:GELMA hidrojenlerinin enjekte edildikten sonra mekanik özelliklerini yeniden kazandıkları gösterilmiştir. 2:1 oranında katılan CSMA hidrojenin stabilitesini arttırırken 3:1 oranındaki CSMA'nın hidrojenin yeniden birleşebilme yeteneğini yok ettiği belirlenmiştir. Bunun sebebinin yukarıda bahsedildiği üzere CSMA ve GELMA'nın yapısal farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Jellerin ayrıca viskoelastik ölçümleri gerçekleştirilerek jel karakterleri analiz edilmiştir. 3 hidrojel formülasyonun da G' değerlerinin G'' değerlerinden yüksek olduğu, yani hidrojel yapısında oldukları belirlenmiştir [431]. 2:1 ve 3:1 CSMA:GELMA hidrojenlerinde G'/G'' oranlarının eklemler arası kayganlığı sağlayacak ideal mekanik karaktere sahip olduğu belirlenmiştir [432]. G'' değerleri (viskoz modülüs) incelendiğinde en yüksek değerlerin 1:1 CSMA:GELMA hidrojenlerinde olduğu belirlenmiştir, bu da düşük çapraz bağlanma oranları göz önüne alındığında beklenen bir sonuçtur.

Hidrojenlerin şişme ve degradasyon deneyleri benzer sonuçlar vermiştir. Hidrojenlerin yüksek şişme oranları, hidrojenlerin enkapsüle ettikleri biyolojik ajanları kolayca ortama salabildiklerine dair kanıt oluşturmaktadır [433]. 1:1 CSMA:GELMA oranıyla hazırlanan hidrojel en yüksek şişme oranına sahip ve en çabuk degradasyona uğrayan hidrojel formülasyonu olmuştur. Sonuçlar literatürle de uyumludur [434,435]. Hidrojenlerin su tutma kapasiteleri ve stabiliteleri arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır. Şişme oranları arttıkça hidrojenlerin stabiliteleri azalmakta ve hidrolitik degradasyona daha yatkın olmaktadır [436]. Ayrıca hidrojenlerin şişme oranları çapraz bağlanma dereceleriyle de ters orantılıdır. Çapraz bağlanma oranlarının da madde miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı bilinmektedir [437, 438]. Bu bilgiler ışığında en yüksek polimer konsantrasyonuna sahip 3:1 CSMA:GELMA hidrojenlerinin şişme oranlarının diğer iki hidrojel formülasyonundan daha az olması literatür bilgisiyle uyum göstermektedir.

Hidrojenlerin sitotoksiteleri yapılan MTT analizleriyle kontrol edilmiştir. Hidrojenlerin hücreler üzerinde herhangi bir toksisite yaratmadığı ve biyoyumlu malzemeler oldukları gösterilmiştir. Literatürde CSMA ve GELMA hidrojenler ayrı ayrı pek çok çalışmada kullanılmış ve benzer sonuçlar bulunmuştur [439,440].

Sunulan tezin hedefi dejeneratif kıkırdak hasarlarına yönelik çoklu tedavi sağlanmasıdır. Bu bağlamda seçilen enjekte edilebilir hidrojel formülasyonu içerisinde genetik materyal taşıyan nanopartiküller enkapsüle edilmesi planlanmıştır. Oluşturulan nanopartiküller kıkırdak hücreler arası matrisinin önemli bileşenlerinden olan hyaluronik asit ve kitosandan elde edilmiştir. Hyaluronik asit sinoviyal sıvı ve artiküler kıkırdağın önemli bir bileşeni olduğundan, kitosan ise pozitif yüklü bir polisakkarit olduğundan, gen taşınımındaki etkisi göz önüne alınarak seçilmiştir. Hücrelerle etkileştirilmek üzere nanopartiküller optimize edilirken öncelikle yüzey yükleri, sonrasında boyutları göz önüne alınmıştır [441]. Yüksek yüzey yükünün hücrelerde toksisite yarattığı bilinmekle birlikte düşük pozitif yüküne sahip nanopartiküllerin hücre içerisinde degradasyona uğradığı bilinmektedir [442]. Nanopartiküller hücre içerisine endositoz yoluyla, endozom adı verilen kesecikler içerisinde alınmaktadır. Normalde endozom içerisinde alınan kargolar, lizozomda degrades edilerek sindirilmektedir. Fakat nanopartiküllerin içerisindeki mikro RNA'nın aktivite gösterebilmesi için lizozoma gitmeden sitoplazma içerisinde salınması gerekmektedir, bu da ancak endozomal kaçış mekanizmalarıyla mümkündür. Birden fazla endozomal kaçış mekanizması bulunmaktadır, ancak bu tez kapsamında çalışılan nanopartiküller proton sponge efektine göre kaçacak şekilde tasarlanmıştır. Proton sponge efekti, yüksek tamponlanma kapasitesine sahip ajanların protonlanması sonucu endozomun şişerek kargoyu serbest bırakması üzerine kuruludur. Protonlanma endozom içerisine yüksek miktarda iyon ve su akışı sağlamakta, bu da ozmotik basıncın artması ve endozomal zarın esneyerek kopmasına ve sonuçta endozom içerisinde tutulan bileşiklerin serbest bırakılmasına sebep olmaktadır [443]. Tez kapsamında kullanılan nanopartiküllerde, kitosanın yüksek miktardaki amin sayısının proton sponge efekti yarattığı göz önüne alınarak, partiküller bu şekilde tasarlanmıştır [444].

Nanopartiküller öncelikle hyaluronik asit:kitosan oranı bakımından optimize edilmiştir. Yüksek miktarda genetik materyal taşımak için kitosan oranı yüksek tutularak yapılan çalışmalarda, pozitif yükün 1:4 HA/CS oranından sonra daha fazla artmadığı görülmüştür. Boyut ve yük özelliklerinin HA/CS kütle oranına bağlı olduğu ve kitosan miktarındaki artışın kitosan fazlalık amin grupları nedeniyle daha büyük nanopartiküller ve daha yüksek pozitif yüzey potansiyeli ile sonuçlandığı gösterilmiştir [415]. En küçük ve en yüksek pozitif yüke sahip 1:4 HA/CS nanopartikülleriyle sonraki deneylere devam edilmiştir.

1:4 HA/CS nanopartiküllerle farklı N:P (kitosandaki azot: RNA'daki fosfat) oranlarında mikro RNA etkileştirilmiştir. 1:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1 and 35:1 N:P oranları denenmiştir. Sonuçlar, yüzey yükünün N: P oranına orantılı olarak arttığını ve 35: 1 N: P oranına sahip nanopartiküllerin, kitosanın pozitif yüklü NH<sub>2</sub> grupları arttıkça en yüksek yüzey yükünü taşıdığını göstermiştir. Nanopartiküllerin büyüklüğünün, artan NH<sub>2</sub> grupları ile genel olarak bir artış gösterdiği fakat 10: 1 ve 30: 1 N: P oranlarıyla nanopartiküller arasında önemli bir boyut farkı belirlenemediği görülmüştür. Bunun yanısıra, mikro RNA kapsüllenmiş 35: 1 N: P oranlı HA/CS nanopartiküllerinin yarıçapında önemli bir artış belirlenmiştir (p<0,01). Pozitif yüklü NH<sub>2</sub> grupları nedeniyle HA: CS nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği N: P oranlarıyla doğru orantılı olarak artmıştır. Enkapsülasyon oranı 30:1 N:P oranı ile doyumluğa ulaştığı ve daha yüksek N:P oranlarının enkapsülasyon etkinliği üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

İkinci bir nanopartikül formülasyonu olarak, kondroitin sülfat ile kaplı HA/CS nanopartiküller tasarlanmıştır. Bu nanopartiküller yüksek pozitif yüklü 1:4 HA/CS nanopartiküllerle negatif yüklü kondroitin sülfatın etkileşimiyle oluşturulmuştur. 1: 4 HA/CS nanopartiküller 2,29 uM, 3,44 uM, 4,59 uM, 5,73 uM, 6,88 uM, 8,03 uM, 9,17 uM, 10, 32 uM, 11,47 uM ve 13,76 uM ChoS ile elektrostatik olarak etkileştirilmiştir. Negatif yüklü kondroitin sülfat miktarının 9,17 uM kondroitin sülfat miktarına kadar partikül boyutunu küçülttüğü, 9,17 uM'den fazlasının ise partikül boyutunu arttırdığı gösterilmiştir. 9,17 uM'ye kadar negatif yüklü kondroitin sülfat ile kitosanın pozitif yüklü amin gruplarının birbirini çekerek partikül çapının azalmasına neden olduğu, daha fazla negatif yükün etkileşecek pozitif yük kalmadığından partikül yüzeyine tutunarak nanopartikül boyutunu arttırdığı sonucuna varılmıştır. Yük-boyut ilişkisi göz önüne alınarak, RNA ile etkileştirmek üzere 4,59 uM, 6,88 uM ve 9,17 uM kondroitin sülfatla etkileştirilen HA/CS nanopartiküllerle sonraki deneylere devam edilmiştir.

Nanopartiküllerin fiziksel özellikleri SEM görüntüleriyle belirlenmiştir [445]. Polisakkarit nanopartiküller nanopartikül oluşumuna katılmayan polisakkaritlerin ortamdaki uzaklaştırılması zor olduğu için net görüntü alınması zor partiküllerdir. Tez kapsamında diyaliz edildikten ve filtreden geçirildikten sonra görüntülenmiş olmasına karşın, yine de analiz sırasında partiküller üzerinde polisakkarit birikimi gözlemlenmiştir. Buna karşın, alınan görüntüler nanopartiküllerin şişmiş morfolojisini gözler önüne sermektedir.

RNA ile etkileşim deneylerinde RNA'nın enkapsüle edildiği ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin yüzeyi ile etkileştirildiği iki yöntem denenmiştir. RNA'nın enkapsüle edildiği yöntemde nanopartikül boyutunun önemli derecede arttığı, nanopartiküllerin mikro RNA'dan sonra ortama eklenen kondroitin sülfatla çok iyi etkileşemedikleri görülmüştür. Artan kondroitin sülfat miktarının, kitosanın protonlanmış aminleri için RNA ve kondroitin sülfat arasında rekabet yaratarak itici kuvvetlerin ortaya çıkmasına, böylece nanopartiküllerin boyutlarının büyümesine sebep olduğu sonucuna varılmıştır [446]. Bu sebeple öncelikle ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin oluşturularak sonrasında RNA ile etkileştirildiği, yüzeyle etkileştirme metodu kullanılarak ChoS (HA/CS) nanopartikülleri mikro RNA ile etkileştirilmiştir.

Nanopartiküllerin mikro RNA salım profilleri belirlenmeden önce, suda, PBS'te ve serum içeren FBS içerisinde stabiliteleri kontrol edilmiştir. Stabilitate deney sonuçlarına göre partiküllerin tüm sıvılar içerisinde bozunmadan kaldığı, hatta boyutlarının artarak şiştikleri gözlemlenmiştir. Bu durum, nanopartiküllerin jel yapısıyla açıklanmaktadır. Hatta son yıllarda ortaya atılan "nanojel" terimiyle büyük ölçüde benzerlik taşımaktadır. Nanojeller, hidrojel nanopartiküllerin polimerik ağlardan oluşan dağılımları olarak tanımlanmıştır ve düşük toksisite ve kullanım kolaylığı açısından avantajlarıyla öne çıkmaktadır [447]. Nochi ve arkadaşları, adjuvan içermeyen burun içi aşılama için, Li ve arkadaşları da yakın zamanda siRNA uygulaması için bir polimer nanojel sistemi bildirmiştir [448]. Tez kapsamında geliştirilen nanopartiküller nanojel özelliğine sahiptir ve şişme davranışları da nanojellerle benzerlik göstermektedir [448,449]. Nanopartiküllerin, hyaluronik asit ve kondroitin sülfatın yüksek hidrofilik yapısı ve gevşek bir ağ oluşturan karboksil gruplarının su tutma kabiliyeti nedeniyle, boyutlarını arttırdığı görülmüştür [450]. Ayrıca nötral pH, kitosanın omurgasını kısmen nötrleştirerek anyonik gruplarla daha zayıf etkileşmesine sebep olmakta, bu da daha zayıf bağlar kurmasına dolayısıyla nanopartiküllerin boyutunun artmasına sebep olmaktadır [451]. Sonuç itibariyle stabilite deneyleri ile HA/CS ve Chos (HA/CS) nanopartiküllerin kararlı nanopartiküller olduğu ve daha fazla uygulama için kullanılabilir olduğu kanıtlanmıştır.

Salım deneyleri HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküller için ayrı ayrı belirlenmiştir. HA/CS nanopartiküllerine mikro RNA, enkapsülasyon yöntemi ile hapsedilmiştir. Nanopartiküllerin mikro RNA salımlarında 7. saat sonuna kadar anlamlı bir fark belirlenememekle birlikte; 30:1 ve 25:1 N:P oranıyla hazırlanan nanopartiküllerin ilk 7

saat diğer partiküllere göre daha hızlı bir salım gerçekleştirdiği, salımın sonrasında yavaşladığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin, enkapsüle edilemeyerek zayıf bağlarla yüzeye tutunan RNA'lar olabileceği sonucuna varılmıştır. Genel olarak 15:1 N:P oranıyla hazırlanmış HA/CS nanopartiküllerde diğer formülasyonlara göre daha zayıf bir elektrostatik etkileşim olduğundan, daha hızlı salım gerçekleştiği görülmektedir. 20:1, 25:1 ve 30:1 N:P oranıyla hazırlanmış partiküllerin ise salım karakterleri arasında önemli bir fark belirlenememiştir.

Kondroitin sülfat kaplı HA/CS nanopartiküllerin salım deneyleri ise 30:1 N:P oranında mikro RNA ile etkileştirilmiş 4,59 uM, 6,88 uM ve 9,17 uM ChoS(HA/CS) nanopartiküller ile gerçekleştirilmiştir. İlk 24 saat partiküller arasında anlamlı bir fark belirlenememekle birlikte, en yüksek kondroitin sülfat miktarına, dolayısıyla daha düşük pozitif yüke sahip nanopartiküller olan 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin RNA ile daha zayıf bağlar kurması sebebiyle, diğer formülasyonlara göre daha hızlı mikro RNA saldığı gözlemlenmiştir. Mikro RNA enkapsüle edilmiş partiküllerin mikro RNA'yı kondroitin sülfat kaplı partiküllere göre daha hızlı saldığı gözlemlense de, iki grup arasında anlamlı fark gösterilememiştir. Bu durumun, fazla miktarda kondroitin sülfatın bol zincirli moleküler yapısından ya da enkapsülasyon sırasında RNA eklenmesinden sonra çapraz bağlanmanın yetersiz gerçekleşmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünölmektedir. Farklı miktarlarda kullanılacak kondroitin sülfat veya TPP'nin farklı sonuçlar doğuracağı öngörölmüştür.

Mikro RNA yüklü HA/CS nanopartikülleri 2:1 CSMA:GELMA hidrojelii içerisinde hapsedildikten sonra da salım profilleri belirlenmiştir. Beklenildiği üzere hidrojin HA/CS nanopartiküllerden mikro RNA salımını yavaşlattığı gösterilmiştir ancak, mikro RNA salımı Chos (HA/CS) nanopartiküller ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir [452]. İki sistemin de polisakkaritlerden oluşması ve yüksek şişme oranlarıyla geniş gözenekler oluşturması mikro RNA salımını kolaylaştırmaktadır [440].

Hidrojelerde olduğu gibi HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinde de herhangi bir sitotoksisiteye rastlanmamıştır. Nanopartiküllerin test edilen en yüksek nanopartikül konsantrasyonuna kadar toksisite göstermediği, aksine hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Hücrelerin polisakkaritleri besin olarak gören doğasından ötürü, artan polisakkarit miktarlarının hücre çoğalmasını uyardığı belirlenmiştir [453]. Sitotoksisite deneyleri Chos (HA/CS) nanopartiküllerin toksik olmayan, biyouyumlu



nanopartiküller olduğunu ve herhangi bir alt uygulama için kullanılabileceğini göstermiştir.

Mikro RNA-149-5p taşıyan nanopartiküllerin etkinliği gerçek zamanlı PCR deneyleriyle test edilmiştir. Mikro RNA-149-5p'nin hedef geni olan FUT-1 geni, erken dönem kondrogenz belirteçleri SOX-9 ve COMP genleri ve geç dönem kondrogenz belirteçleri olan COL2A1 ve AGC genleri kontrol edilmiştir [454, 455]. Kondroitin sülfat kaplı nanopartiküller göz önüne alındığında, tüm partiküllerde FUT-1 gen ekspresyonunun azaldığı, dolayısıyla partiküllerin gen transfeksiyonunun başarılı olduğu gösterilmiştir. Nanopartikül boyutu azaldıkça gen ekspresyon seviyesinin azalması, hücrelerin partiküllerin polisakkarit yapısını besin olarak görüp, kolay internalize etmesinin yanısıra, nanopartiküllerin hücre içine alınmasında boyutun önemi de göstermiştir [441]. Deneyler mezenkimal kök hücreler üzerinde yapıldığı için nanopartiküllerin kondrosit farklılaşmasına etkisi de kontrol edilmiştir. SOX-9, COMP, COL2A1 ve AGC gen ekspresyon seviyelerinin partikül boyutu azaldıkça ve polisakkarit (kondroitin sülfat) miktarı arttıkça, orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar mezenkimal kök hücreler için literatürle uyum göstermektedir [456-458]. COMP gen ekspresyonu seviyelerinin SOX-9 genine göre daha çok daha yüksek miktarlarda sentezlendiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde geç dönem kondrogenz belirteçleri olan COL2A1 ve AGC'nin, erken dönem belirteçleri olan SOX-9 ve COMP'a göre daha az miktarlarda sentezlendiği gösterilmiştir. Ayrıca AGC'nin ilişkili olduğu genlerden biri olan MMP7 de analiz edilmiş ancak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (data gösterilmemiştir). Bu durum mezenkimal kök hücrelerin erken evre farklılaşmayı tamamladığı ve ileri evre farklılaşmaya başladığı şeklinde yorumlanmıştır [459]. Hücreler mikro RNA içermeyen nanopartiküllerle de etkileştirilmiş, fakat kondrogenz belirteç genlerinin ekspresyon seviyelerinde mikro RNA taşıyan nanopartiküllerle etkileştirilmiş hücrelere göre anlamlı bir fark bulunamamıştır (data gösterilmemiştir). Yapılan deneylerde mikro RNA 149-5p'nin kondrogenz belirteç genleri üzerinde anlamlı bir etkisine rastlanamamıştır. Sonuç itibarıyla mezenkimal kök hücrelerin belirlenen kondrosit belirteç genlerini sentezledikleri, uygulanan ChoS (HA/CS) nanopartiküllerin mezenkimal kök hücrelerin kondrosit farklılaşmasında etkili oldukları gösterilmiştir.

HA/CS nanopartiküller ve hidrojel yapıları değerlendirildiğinde, mikro RNA taşıyan HA/CS nanopartiküllerin ve bu nanopartiküllerin olduğu hidrojellerin FUT-1 gen

ekspresyonu seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca HA/CS nanopartiküller ile hidrojel içerisine hapsedilmiş HA/CS nanopartiküller arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç, taşıyıcıların başarısı ile birlikte, hidrojin mikro RNA etkinliğinde önemli bir etkisi olmadığını göstermektedir. Hidrojellerin hücre kültür ortamında bulunan enzimler dolayısıyla daha çabuk degradasyona başladığı sonucuna varılmıştır [460]. Sonuçlar sonrasında kondroitin sülfat kaplı nanopartiküller ile de kıyaslanmış, 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller ile etkileştirilen hücrelerin FUT-1 mRNA seviyeleri arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. 6,88 uM ChoS (HA/CS) ve 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller ile karşılaştırıldığında ise, kondroitin sülfat kaplı nanopartiküllerin daha başarılı taşıyıcılar olduğu sonucuna varılmıştır ( $p < 0,05$ ). SOX-9 ve COMP genleri incelendiğinde, CSMA:GELMA'dan oluşan hidrojjelerin ve HA/CS nanopartiküllerin gen ekspresyonlarını önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. Nanopartikülsüz olarak hücrelerle etkileştirilen hidrojjelerin gen ekspresyon seviyelerini, sadece HA/CS nanopartiküllerle etkileştirilen hücrelere göre çok daha fazla arttırmış olması sebebiyle, hidrojjelerin kondrosit farklılaşmasını daha fazla etkilediği anlaşılmaktadır. Bu sonuç, hidrojjeler için kullanılan polisakkarit miktarının daha fazla olmasıyla açıklanabileceği gibi, hidrojjelerin ortamda oluşturduğu kıkırdak benzeri hücre dışı matris sebebiyle de olabileceği sonucuna varılmıştır. Sonuçlar kondroitin sülfat kaplı partiküller ile kıyaslandığında mRNA seviyeleri arasında anlamlı bir farklılığa rastlanamamıştır. Bu durum, mezenkimal kök hücrelerin nanopartikül ve ya hidrojel olmasından bağımsız, kondroitin sülfat varlığında kondrosit farklılaşmasını başlattığını göstermektedir [461]. Bununla birlikte, tez kapsamında yapılan deneylerde hücreler hidrojel içerisinde hapsedilmemiş, söz konusu hidrojjeler besi yeri içerisine enjekte edilmiştir. Bu sebeple, hücrelerin hidrojjelerin içerisinde enkapsüle edilerek üç boyutlu kültür edildiği durumda, kıkırdak erken belirteç genlerinin ekspresyonlarının partiküllere göre önemli ölçüde artacağı öngörülmektedir [462, 463]. COL2A1 ve AGC genleri incelendiğinde ise, erken dönem kondrogenez belirteç genlerine benzer şekilde, nanopartikül ve hidrojjelerin birlikte etkileştirildiği hücrelerin gen ekspresyonlarının en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Nanopartikül içermeyen hidrojjeler ile nanopartikül hapsedilmiş hidrojjeler arasındaki önemli fark, AGC geninin ekspresyonunda HA/CS nanopartiküllerin önemini de göstermekteyken, COL2A1 geni için iki grup arasında anlamlı fark belirlenmemiştir. Bu deney grubundaki hücrelerde de AGC'nin ilişkili olduğu genlerden biri olan MMP7 analiz

edilmiş ancak yine kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (data gösterilmemiştir). Sonuçlar kondroitin sülfat kaplı partiküller ile kıyaslandığında hem hidrojel oluşturulurken daha fazla kondroitin sülfat kullanıldığından hem de yukarıda bahsedildiği gibi kıkırdak hücre dışı matris koşullarına benzerlik sağlandığından, hidrojel gruplarının gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak tüm gen ekspresyonlarında, çıplak mikro RNA'nın az da olsa etkili olduğu görülmüş, ancak istatistiksel olarak kontrol grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Bu durum, transfeksiyon deneylerinin metoduyla açıklanabilmektedir. Transfeksiyon deneyleri hücrelerin deney gruplarıyla FBS içermeyen kültür ortamında en az 4 saat kültür edilmesi ile yapılmaktadır [464]. Kapalı ve kontrollü bir sistem olan in vitro hücre kültür deneylerinde, FBS olmayan ortamda yeni ekilen hücreler hücre plakasına yapışmak ve yaşamlarını idame ettirmek için, stres mekanizmalarını devreye sokarak, hücre içi-dışı trafiklerini attırmaktadırlar [465]. Bu durum endositozu ve dolayısıyla genetik materyalin hücre içerisine alımını hızlandırmakta ve arttırmaktadır [466, 467]. Bu sebeple genetik materyal taşıyan taşıyıcılarla birlikte taşıyıcı olmadan hücrelerle etkileştirilen genetik materyal de hücre içine girmektedir, ancak negatif yüklerinden dolayı büyük çoğunluğu yukarıda bahsedilen endozomal yollarla degrade olmaktadır. Taşıyıcı olmadan hücrelerle etkileştirilen genetik materyallerin küçük bir kısmı hücrede etkinlik göstermeyi başarmış olsa da, etkinlikleri istatistiksel olarak anlamlı bir ifadeden uzak kalmaktadır. Sonuç itibarıyla mezenkimal kök hücrelerin belirlenen kondrosit belirteç genlerini sentezledikleri, uygulanan HA/CS nanopartikülleri ile CSMA:GELMA hidrojellerinin mezenkimal kök hücrelerin kondrosit farklılaşmasında etkili oldukları gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelere gerçekleştirilen mikro RNA-149-5p transfeksiyonunun başarısı, hücre proliferasyonuna olan etkisiyle de ölçülmüştür. Mikro RNA-149-5p'nin hedef geni olan FUT-1 geninin hücrelerde apoptoz baskılayıcı ve proliferasyonu artırıcı bir etkisi bulunmaktadır [423]. Mikro RNA taşıyan tüm nanopartiküllerin hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiş, hücre çoğalmasının mikro RNA'nın taşıyıcı ile etkileştirilerek hücrelere verildiği zaman arttığı belirlenmiştir. Artan kondroitin sülfat miktarı ve azalan nanopartikül çapının proliferasyonu arttırdığı belirlenirken, 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküller ile HA/CS nanopartiküller anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. 4,59 uM ChoS (HA/CS) nanopartikülün  $412,26 \pm 21,18$  nm boyutuyla, HA/CS nanopartiküllerin  $440,2 \pm 9,4$  nm olan boyutu arasında anlamlı fark

olmaması, sonucu beklenir kılmaktadır. En yüksek proliferasyon oranının 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartiküllerde olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, en küçük boyuttaki partikülün hücrelere daha fazla girebilmesi ve dolayısıyla FUT-1 gen etkinliğinin daha belirgin azalması anlamına gelmektedir. FUT-1 gen ekspresyon sonuçları ile de korelasyon gösteren proliferasyon sonuçları, en başarılı transfeksiyonun 9,17 uM ChoS (HA/CS) nanopartikülleri ile sağlandığını göstermektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin kondrosit farklılaşmaları glikozaminoglikan sentezlerini belirleyen sGAG boyamaları ile de gösterilmiştir. Boyamalarda kontrol grubu ile partikül/ hidrojel ile etkileştirilen hücreler arasında önemli farklılıklar görülmektedir. Sonuçlar gen ekspresyonu sonuçları ile korele edilmiştir. Hem hidrojellerde hem partiküllerde görülen SOX-9 ve COMP genlerinin ekspresyonlarındaki artış hücrelerin glikozaminoglikan sentezlerindeki artışı açıklamaktadır. SOX-9 gen ekspresyonundaki artışın glikozaminoglikan sentezini arttırdığı, COMP geninin ise hücrelerde sGAG sentezini düzenlediği bilinmektedir [468, 469]. Sonraki çalışmalarda sGAG sentezinin kantifiye edilmesi ile daha kesin sonuçlar elde edilmesi planlanmıştır.

Yapılmış olan bu yenilikçi çalışma sonucu, enjekte edilebilir hibrid CSMA:GELMA hidrojelleri, HA/CS ve ChoS (HA/CS) nanopartiküller geliştirilmiş, bu malzemelerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları yapılmış ve biyouyumlu oldukları gösterilmiştir. Sonrasında nanopartiküller başarılı bir şekilde mikro RNA 149-5p ile etkileştirilmiş, HA/CS nanopartikülleri de CSMA:GELMA hidrojeller içerisinde enkapsüle edilmiştir. Mikro RNA-149-5p taşıyan HA/CS nanopartikül enkapsüle edilmiş enjekte edilebilir CSMA:GELMA hidrojellerinin ve ChoS (HA/CS) nanopartiküllerinin insan mezenkimal kök hücreleri üzerinde yapılan deneylerinde kondrojenesi başlattığı ve başarılı bir mikro RNA transfeksiyonu sağladığı gerçek zamanlı PCR deneyleri ve sGAG boyamaları ile gösterilmiştir. Kondrojeniz varlığının validasyonu için, sGAG sentezinin kantifikasyonu ile kolajen tip 1 ve SOX-4 gibi diğer kondrojeniz belirteç genlerinin kontrol edilmesi önerilmektedir. Ayrıca, geliştirilen hidrojel ve nanopartiküllerin farklı enzimler içeren ortamlarda yapılacak degradasyon ve salım testleri bu materyallerin olası in vivo uygulamaları için önemli bir altyapı oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Lee, K.Y., Mooney, D.J., Hydrogels for tissue engineering, *Chemical Reviews*, 101, 1869–1879, **2001**.
- [2] Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., He, N., Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Research*, 5, 17014- 17034, **2017**.
- [3] Tememoff, J.S., Mikos, A.G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering, *Biomaterials*, 21, 2405–2412, **2000**.
- [4] Hou, Q.P., De Bank, P.A., Shakesheff, K.M., Injectable scaffolds for tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 1915–1923, **2004**.
- [5] Drury, J.L., Mooney, D.J., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials*, 24, 4337–4351, **2003**.
- [6] Nuttelman, C.R., Rice, M.A., Rydholm, A.E., Salinas, C.N., Shah, D.N., Anseth, K.S., Macromolecular monomers for the synthesis of hydrogel niches and their application in cell encapsulation and tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 33, 167–179, **2008**.
- [7] Brandl, F., Sommer, F., Goepferich, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior, *Biomaterials*, 28, 134–146, **2007**.
- [8] Rehfeldt, R., Engler, A.J., Eckhardt, A., Ahmed, F., Discher, D.E., Cell responses to the mechanochemical microenvironment--implications for regenerative medicine and drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1329–1339, **2007**.
- [9] Nicodemus, G.D., Bryant, S.J., Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Tissue Engineering*, 14, 149–165, **2008**.
- [10] Yu, L., Ding, J., Injectable hydrogels as unique biomedical materials, *Chemical Society Reviews*, 37, 1473–1481, **2008**.
- [11] Tan, H., Gong, Y., Lao, L., Mao, Z., Gao, C. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering, *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1961–1968, **2007**.
- [12] Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., Guilak, F., Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds, *Biomaterials*, 25, 3211–3222, **2004**.
- [13] Tan, H., Wan, L., Wu, J., Gao, C., Microscale control over collagen gradient on poly(L-lactide) membrane surface for manipulating chondrocyte distribution, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 67, 210–215, **2008**.
- [14] Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y., Biomedical applications of collagen, *International Journal of Pharmacy*, 221, 1–22, **2001**.
- [15] Furthmayr, H., Timol, R., Immunochemistry of collagens and procollagens, *International Review of Connective Tissue Research*, 7, 61–99, **1976**.
- [16] Yannas, I.V., Burke, J.F., Design of an artificial skin I. Basic design principles, *Journal of Biomedical Materials Research*, 14, 65–81, **1980**.
- [17] Stefan, M.M., Shortkroff, S., Schneider, T.O., Breinan, H.A., Yannas, I.V., Spector, M., Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro, *Biomaterials*, 20, 701–709, **1999**.

- [18] Tan, H., Huang, D., Lao, L., Gao, C., RGD modified PLGA/gelatin microspheres as microcarriers for chondrocyte delivery, *Journal of Biomedical Materials Research*, 91B, 228–238, **2009**.
- [19] Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., Madihally, S.V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 7616–7627, **2005**.
- [20] Tan, H., Lao, L., Wu, J., Gong, Y., Gao, C., Biomimetic modification of chitosan with covalently grafted lactose and blended heparin for improvement of in vitro cellular interaction, *Polymers for Advanced Technologies*, 19, 15–23, **2008**.
- [21] Hsieh, W.C., Chang, C.P., Lin, S.M., Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 57, 250–255, **2007**.
- [22] Yuan, Y., Chesnutt, B.M., Utturkar, G., Haggard, W.O., Yang, Y., Ong, J.L., Bumgardner, J.D., The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release, *Carbohydrate Polymers*, 68, 561–567, **2007**.
- [23] Arakawa, C., Ng, R., Tan, S., Kim, S., Wu, B., Lee, M., Photopolymerizable chitosan–collagen hydrogels for bone tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11: 164–174, **2017**.
- [24] Mao, J., Zhao, L., Yao, K., Shang, Q., Yang, G., Cao, Y., Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research*, 64A, 301–308, **2003**.
- [25] Ma, J., Wang, H., He, B., Chen, J., A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts, *Biomaterials*, 22, 331–337, **2001**.
- [26] Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 2001, 22, 261–268, **2001**.
- [27] Goa, K.L., Benfield, P., Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing, *Drugs*, 47, 536–566, **1994**.
- [28] Toole, B.P. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Current Opinion in Cell Biology*, 2, 839–844, **1990**.
- [29] Tan, H., Wu, J., Lao, L., Gao, C., Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterials*, 5, 328–337, **2009**.
- [30] Fraser, J.R., Laurent, T.C., Laurent, U.B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and Turnover, *Journal of International Medicine*, 242, 27–33, **1997**.
- [31] Dowthwaite, G.P., Edwards, J.C., Pitsillides, A.A., An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46, 6, 41–651, **1998**.
- [32] Cheung, W.F., Crue, T.F., Turley, E.A. Receptor for hyaluronan mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors, *Biochemical Society Transactions*, 27, 135–142, **1999**.
- [33] Entwistle, J., Hall, C.L., Turley, EA., Hyaluronan receptors: regulators of signalling to the Cytoskeleton, *Journal of Cellular Biochemistry*, 61, 569–577, **1996**.

- [34] Liu, L.S., Thompson, A.Y., Heidarani, M.A., Poser, J.W., Spiro, R.C. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*, 20, 1097–1108, **1999**.
- [35] Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G., Williams, D.F. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 23, 2101–2127, **1998**.
- [36] Rowley, J.A., Madlambayan, G., Mooney, D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20, 45–53, **1999**.
- [37] Lee, K.Y., Kong, H.J., Larson, R.G., Mooney, D.J. Hydrogel formation via cell crosslinking, *Advanced Materials*, 15, 1828–1832, **2003**.
- [38] Cao, Y., Shen, X.C., Chen, Y., Guo, J., Chen, Q., Jiang, X.Q., pH-Induced self-assembly and capsules of sodium alginate, *Biomacromolecules*, 6, 2189–2196, **2005**.
- [39] Paige, K.T., Cima, L.G., Yaremchuk, M.J., Vacanti, J.P., Vacanti, C.A. Injectable cartilage, *Plastic Reconstructive Surgery*, 96, 1390–1400, **1995**.
- [40] Paige, K.T., Cima, L.G., Yaremchuk, M.J., Schloo, B.L., Vacanti, J.P., Vacanti, C.A. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plastic Reconstructive Surgery*, 97, 168–180, **1996**.
- [41] Skjak-Braerk, G., Grasdalen, H., Smidsrod, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels, *Carbohydrate Polymers*, 10, 31–54, **1989**.
- [42] Stevens, M.M., Qanadilo, H.F., Langer, R., Shastri, V.P. A rapid-curing alginate gel system: Utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 887–894, **2004**.
- [43] S. Ansari, I. M. Diniz, C. Chen, P. Sarrion, A. Tamayol, B. M. Wu, A. Moshaverinia, Human Periodontal Ligament- and Gingiva-derived Mesenchymal Stem Cells Promote Nerve Regeneration When Encapsulated in Alginate/Hyaluronic Acid 3D Scaffold., *Advanced Healthcare Materials*, 6, 1700670, **2017**.
- [44] Bouhadir, K.H., Lee, K.Y., Alsberg, E., Damm, K.L., Anderson, K.W., Mooney, D.J., Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering, *Biotechnological Progress*, 17, 945–950, **2001**.
- [45] Kong, H.J., Alsberg, E., Kaigler, D., Lee, K.Y., Mooney, D.J. Controlling degradation of hydrogel via the size of cross-linked junctions, *Advanced Materials*, 16, 1917–1921, **2004**.
- [46] Balakrishnan, B., Jayakrishnan, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds, *Biomaterials*, 26, 3941–3951, **2005**.
- [47] Behraves, E., Sikavitsas, V.I., Mikos, A.G., Quantification of ligand surface concentration of bulk-modified biomimetic hydrogels, *Biomaterials*, 24, 4365–4374, **2003**.
- [48] Anseth, K.S., Metters, A.T., Bryant, S.J., Martens, P.J., Elisseeff, J.H., Bowman, C.N., In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 78, 199–209, **2002**.
- [49] Guillaudeu, S.J., Fox, M.E., Haidar, Y.M., Dy, E.E., Szoka, F.C., Fréchet, J.M.J., PEGylated dendrimers with core functionality for biological applications, *Bioconjugate Chemistry*, 19, 461–469, **2008**.

- [50] Feng, X., Taton, D., Chaikof, E.L., Gnanou, Y., Bouquet-type dendrimer-like poly(ethylene Oxide)s with a focal aldehyde and peripheral hydroxyls, *Biomacromolecules*, 8, 2374–2378, **2007**.
- [51] Hiemstra, C., Zhong, Z., Li, L., Dijkstra, P.J., Feijen, J. In-situ formation of biodegradable hydrogels by stereocomplexation of PEG-(PLLA)8 and PEG-(PDLA)8 star block copolymers, *Biomacromolecules*, 7, 2790–2795, **2006**.
- [52] Hiemstra, C., Zhong, Z., van Tomme, S.R., van Steenberg, M.J., Jacobs, J.J.L., Otter, W.D., Hennink, W.E., Feijen, J. In vitro and in vivo protein delivery from in situ forming poly(ethylene glycol)–poly(lactide) hydrogels, *Journal of Controlled Release*, 119, 320–327, **2007**.
- [53] Chen D., Tang Q., Zou J., Yang X., Huang W., Zhang Q., Shao J., Dong X., pH-Responsive PEG–Doxorubicin-Encapsulated Aza-BODIPY Nanotheranostic Agent for Imaging-Guided Synergistic Cancer Therapy, *Advanced Healthcare Materials*, 7, 1701272, **2018**.
- [54] Wieland, J.A., Houchin-Ray, T.L., Shea, L.D., Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels, *Journal of Controlled Release*, 120, 233–241, **2007**.
- [55] Stidl, R., Fuchs, S., Bossard, M., Siekmann, J., Turecek, P. L., Putz, M., Safety of PEGylated recombinant human full-length coagulation factor VIII (BAX 855) in the overall context of PEG and PEG conjugates, *Haemophilia*, 22, 54-64, **2016**.
- [56] Almany, L., Seliktar, D., Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures, *Biomaterials*, 26, 2467–2477, **2005**.
- [57] Bhattarai, N., Ramay, H.R., Gunn, J., Matsen, F.A., Zhang, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release, *Journal of Controlled Release*, 2005, 103, 609–624, **2005**.
- [58] Yamaguchi, N., Chae, B.S., Zhang, L., Kiick, K.L., Furst, E.M. Rheological characterization of polysaccharide-poly(ethylene glycol) star copolymer hydrogels, *Biomacromolecules*, 6, 1931–1940, **2005**.
- [59] Nicodemus, G.D., Villanueva, I., Bryant, S.J. Mechanical stimulation of TMJ condylar chondrocytes encapsulated in PEG hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research*, 83A, 323–331, **2007**.
- [60] Hudalla, G.A., Eng, T.S., Murphy, W.L. An approach to modulate degradation and mesenchymal stem cell behavior in poly(ethylene glycol) networks, *Biomacromolecules*, 9, 842–849, **2008**.
- [61] Weber, L.M., Cheung, C.Y., Anseth, K.S. Multifunctional pancreatic islet encapsulation barriers achieved via multilayer PEG hydrogels, *Cell Transplantation*, 16, 1049–1057, **2008**.
- [62] Brown, C.D., Stayton, P.S., Hoffman, A.S. Semi-interpenetrating network of poly(ethylene glycol) and poly(D,L-lactide) for the controlled delivery of protein drugs, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16, 189–201, **2005**.
- [63] Cascone, M.G., Laus, M., Ricci, D., Sbarbati Del Guerra, R., Evaluation of poly(vinyl alcohol) hydrogels as a component of hybrid artificial tissues, *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6, 71–75, **1995**.
- [64] Nuttelman, C.R., Mortisen, D.J., Henry, S.M., Anseth, K.S., Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration, *Journal of Biomedical Materials Research*, 57, 217–223, **2001**.



- [65] Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M.D., Hoemann, C.D., Leroux, J.C., Atkinson, B.L., Binette, F., Selmani, A., Novel injectable neutral solutions of chitosan from biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21, 2155–2161, **2000**.
- [66] Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., Kandani, N., Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydrate Polymers*, 46, 39–46, **2001**.
- [67] Crompton, K.E., Prankerd, R.J., Paganin, D.M., Scott, T.F., Horne, M.K., Finkelstein, D.I., Gross, K.A., Forsythe, J.S., Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels, *Biophysical Chemistry*, 117, 47–53, **2005**.
- [68] Hoemann, C.D., Sun, J., Legare, A., McKee, M.D., Buschmann, M.D., Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle, *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 318–329, **2005**.
- [69] Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezu, M., Okano, T., Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces, *Circulation Research*, 90, 40–48, **2002**.
- [70] Gan, T., Zhang, Y., Guan, Y., In situ gelation of P(NIPAM-HEMA) microgel dispersion and its applications as injectable 3D cell scaffold. *Biomacromolecules*, 10, 1410–1415, **2009**.
- [71] Kim, J.H., Lee, S.S., Kim, S.J., Lee, Y.M. Rapid temperature/pH response of porous alginate-gpoly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Polymer*, 43, 7549–7558, **2002**.
- [72] Wang, L.Q., Tu, K., Li, Y., Zhang, J., Jiang, L., Zhang, Z. Synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly(N-isopropylacrylamide), *Reactive and Functional Polymers*, 53, 19–27, **2002**.
- [73] Lin, H.H., Cheng, Y.L., In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) of varying architectures, *Macromolecules*, 34, 3710–3715, **2001**.
- [74] Stile, R.A., Burghardt, W.R., Healy, K.E. Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide)- based hydrogels that support tissue formation in vitro, *Macromolecules*, 32, 7370–7379, **1999**.
- [75] Lee, S.B., Ha, D.I., Cho, S.K., Kim, S.J., Lee, Y.M., Temperature/pH-sensitive comb-type graft hydrogels composed of chitosan and poly(N-isopropylacrylamide), *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 2612–2620, **2004**.
- [76] Lee, J.W., Jung, M.C., Park, H.D., Park, K.D., Ryu, G.H., Synthesis and characterization of thermosensitive chitosan copolymer as a novel biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Science*, 15, 1065–1079, **2004**.
- [77] Wang, J., Chen, L., Zhao, Y., Guo, G., Zhang, R. Cell adhesion and accelerated detachment on the surface of temperature-sensitive chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 583–590, **2009**.
- [78] Chen, J.P., Cheng, T.H. Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromolecular Bioscience*, 6, 1026–1039, **2006**.
- [79] Tan, H., Ramirez, C.M., Miljkovic, N., Li, H., Rubin, J.P., Marra, K.G., Thermosensitive Injectable Hyaluronic Acid Hydrogel for Adipose Tissue Engineering, *Biomaterials*, 30, 6844–6853, **2009**.

- [80] Cho, J.H., Kim, S.H., Park, K.D., Jung, M.C., Yang, W.I., Han, S.W., Noh, J.Y., Jin, J.W., Lee, W., Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer, *Biomaterials*, 25, 5743–5751, **2004**.
- [81] Ha, D.I., Lee, S.B., Chong, M.S., Lee, Y.M., Kim, S.Y., Park, Y.H., Preparation of thermoresponsive and injectable hydrogels based on hyaluronic acid and poly(N-isopropylacrylamide) and their drug release behaviors, *Macromolecular Research*, 14, 87–93, **2006**.
- [82] Guan, J., Hong, Y., Ma, Z., Wagner, W. Protein-reactive, thermoresponsive copolymers with high flexibility and biodegradability. *Biomacromolecules*, 9, 1283–1292, **2008**.
- [83] Ohya, S., Nakayama, Y., Matsuda, T., Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts, *Biomacromolecules*, 2, 856–863, **2001**.
- [84] Ibusuki, S., Fujii, Y., Iwamoto, Y., Matsuda, T. Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin: fabrication and in vitro performance, *Tissue Engineering*, 9, 371–384, **2003**.
- [85] Bogdanov, B., Vidts, A., Bulcke, A., Verbeeck, R., Schacht, E. Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymers, *Polymer*, 39, 1631–1636, **1998**.
- [86] Shim, W.S., Kim, J.-H., Park, H., Kim, K., Kwon, I.C., Lee, D.S. Biodegradability and biocompatibility of a pH- and thermo-sensitive hydrogel formed from a sulfonamide-modified poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactide)–poly(ethylene glycol)–poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactide) block copolymer, *Biomaterials*, 27, 5178–5185, **2006**.
- [87] Cellesi, F., Tirelli, N., Hubbell, J.A. Materials for cell encapsulation via a new tandem approach combining reverse thermal gelation and covalent crosslinking, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203, 1466–1472, **2002**.
- [88] Jeong, B., Bae, Y.H., Kim, S.W. In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *Journal of Biomedical Materials Science*, 50, 171–177, **2000**.
- [89] Sieminski, A.L., Semino, C.E., Gong, H., Kamm, R.D. Primary sequence of ionic self-assembling peptide gels affects endothelial cell adhesion and capillary morphogenesis, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 87, 494–504, **2008**.
- [90] Paramonov, S.E., Jun, H.W., Hartgerink, J.D. Modulation of peptide-amphiphile nanofibers via phospholipid inclusions, *Biomacromolecules*, 7, 24–6, **2006**.
- [91] Murakami, Y., Maeda, M., DNA-responsive hydrogels that can shrink or swell, *Biomacromolecules*, 6, 2927–2929, **2005**.
- [92] Elisseff, J., McIntosh, W., Anseth, K., Riley, S., Ragan, P., Langer, R., Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks, *Journal of Biomedical Materials Research*, 51, 164–171, **2000**.
- [93] Varghese, S., Hwang, N.S., Canver, A.C., Theprungsirikul, P., Lin, D.W., Elisseff, J., Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Matrix Biology*, 2008, 27, 12–21, **2008**.
- [94] Park, Y.D., Tirelli, N., Hubbell, J.A., Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, *Biomaterials*, 24, 893–900, **2003**.

- [95] Masters, K.S., Shah, D.N., Walker, G., Leinwand, L.A., Anseth, K.S., Designing scaffolds for valvular interstitial cells: cell adhesion and function on naturally derived materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 71A, 172–180, **2004**.
- [96] Leach, J.B., Bivens, K.A., Collins, C.N., Schmidt, C.E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 70A, 74–82, **2004**.
- [97] Jongpaiboonkit, L., King, W.J., Lyons, G.E., Paguirigan, A.L., Warrick, J.W., Beebe, D.J., Murphy, W.L., An adaptable hydrogel array format for 3-dimensional cell culture and analysis, *Biomaterials*, 29, 3346–3356, **2008**.
- [98] DeLong, S.A., Gobin, A.S., West, J.L., Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration, *Journal of Controlled Release*, 109, 139–148, **2005**.
- [99] Garagorri, N., Fermanian, S., Thibault, R., Ambrose, W.M., Schein, O.D., Chakravarti, S., Elisseeff, J., Keratocyte behavior in three-dimensional photopolymerizable poly(ethylene glycol) Hydrogels, *Acta Biomaterials*, 4, 1139–1147, **2008**.
- [100] Bryant, S.J., Anseth, K.S., Lee, D.A., Bader, D.L. Crosslinking density influences the morphology of chondrocytes photoencapsulated in PEG hydrogels during the application of compressive strain, *Journal of Orthopedic Research*, 22, 1143–1149, **2004**.
- [101] Rice, M.A., Anseth, K.S. Encapsulating chondrocytes in copolymer gels: Bimodal degradation kinetics influence cell phenotype and extracellular matrix development, *Journal of Biomedical Materials Science*, 70A, 560–568, **2004**.
- [102] Bryant, S.J., Bender, R., Durand, K.L., Anseth, K.S., Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production, *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 747–755, **2004**.
- [103] Hu, X., Gao, C., Photoinitiating polymerization to prepare biocompatible chitosan hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 1059–1067, **2008**.
- [104] Hong, Y., Mao, Z., Wang, H., Gao, C., Shen, J., Covalently crosslinked chitosan hydrogel formed at neutral pH and body Temperature., *Journal of Biomedical Materials Science*, 79A, 913–922, **2006**.
- [105] Peter, S.J., Yaszemski, M.J., Suggs, L.J., Payne, R.G., Hayes, W.C., Langer, R., Unroe, M., Alemany, L.B., Engel, P.S., Mikos, A.G., Characterization of partially saturated poly(propylene fumarate) for orthopaedic application, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 8, 893–904, **1997**.
- [106] Peter, S.J., Lu, L.C., Mikos, A.G., Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite, *Biomaterials*, 21, 1207–1213, **2000**.
- [107] He, S.L., Yaszemski, M.J., Yasko, A.W., Engel, P.S., Mikos, A.G., Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)- dimethacrylate, *Biomaterials*, 21, 2389–2394, **2000**.
- [108] Peter, S.J., Miller, S.T., Zhu, G.M., Yasko, A.W., Mikos, A.G., In vivo degradation of a poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate injectable composite scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research*, 41, 1–7, **1998**.

- [109] Shin, H., Ruhé, P.Q., Mikos, A.G., Jansen, J.A., In vivo bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels, *Biomaterials*, 24, 3201–3211, **2003**.
- [110] Jo, S., Shin, H., Shung, A.K., Fisher, J.P., Mikos, A.G. Synthesis and characterization of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) macromer, *Macromolecules*, 34, 2839–2844, **2001**.
- [111] Temenoff, J.S., Park, H., Jabbari, E., Sheffield, T.L., LeBaron, R.G., Ambrose, C.G., Mikos, A.G., In vitro osteogenic differentiation of marrow stromal cells encapsulated in biodegradable Hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Science*, 70A, 235–244, **2004**.
- [112] Lutolf, M.P., Tirelli, N., Cerritelli, S., Cavalli, L., Hubbell, J.A., Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino acids, *Bioconjugate Chemistry*, 12, 1051–1056, **2001**.
- [113] Park, Y.D., Tirelli, N., Hubbell, J.A., Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, *Biomaterials*, 24, 893–900, **2003**.
- [114] Pratt, A.B., Weber, F.E., Schmoekel, H.G., Müller, R., Hubbell, J.A. Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering, *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 27–36, **2004**.
- [115] Vernon, B., Tirelli, N., Bächli, T., Haldimann, D., Hubbell, J.A. Waterborne, in situ crosslinked *Biomaterials* from phase-segregated precursors, *Journal of Biomedical Materials Science*, 64A, 447–456, **2003**.
- [116] Lutolf, M.P., Hubbell, J.A., Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition, *Biomacromolecules*, 4, 713–722, **2003**.
- [117] Lutolf, M.P., Raeber, G.P., Zisch, A.H., Nicola, T., Hubbell J.A., Cell-responsive synthetic Hydrogels, *Advanced Materials*, 15, 888–892, **2003**.
- [118] Sung, H.W., Huang, R.N., Huang, L.L.H., Tsai, C.C., Chiu, C.T., Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomedical Materials Science*, 42, 560–567, **1998**.
- [119] Chang, Y., Tsai, C.C., Liang, H.C., Sung, H.W., In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin), *Biomaterials*, 23, 2447–2457, **2002**.
- [120] Tsai, C.C., Huang, R.N., Sung, H.W., Liang, H.C., In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 58–65, **2000**.
- [121] Liu, B.S., Yao, C.H., Chen, Y.S., Hsu, S.H., In vitro evaluation of degradation and cytotoxicity of a novel composite as a bone substitute, *Journal of Biomedical Materials Science*, 67A, 1163–1169, **2003**.
- [122] Mi, F.L., Tan, Y.C., Liang, H.C., Huang, R.N., Sung, H.W., In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12, 835–850, **2001**.
- [123] Butler, M.F., Yiu-Fai, N.G., Pudney, D.A., Mechanism and kinetics of crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, *Journal of Polymer Science A*, 41, 3941–3953, **2003**.
- [124] Moffat, K.L., Marra, K.G., Biodegradable poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked with genipin for tissue engineering applications, *Journal of Biomedical Materials Science*, 71B, 181–187, **2004**.
- [125] Zhou X, Tao Y, Chen E, Wang J, Fang W, Zhao T, Liang C, Li F, Chen Q., Genipin-cross-linked type II collagen scaffold promotes the differentiation of

- adipose-derived stem cells into nucleus pulposus-like cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106A:1258–1268, **2018**.
- [126] DeFail, A.J., Chu, C.R., Izzo, N., Marra, K.G., Controlled release of bioactive TGF- $\beta$ 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels, *Biomaterials*, 27, 1579–1585, **2006**.
- [127] Tan, H., DeFail, A.J., Rubin, J.P., Chu, C.R., Marra, K.G. Novel multi-arm PEG-based hydrogels for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Science*, 92A, 979–987, **2010**.
- [128] Tan, H., Chu, C.R., Payne, K.A., Marra, K.G., Injectable in situ forming biodegradable chitosan hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30, 2499–2506, **2009**.
- [129] Maia, J., Ferreira, L., Carvalho, R., Ramos, M.A., Gil, M.H., Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels, *Polymer*, 46, 9604–9614, **2005**.
- [130] Nishi, K.K., Jayakrishnan, A., Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres, *Biomacromolecules*, 5, 1489–1495, **2004**.
- [131] Wang, D.A., Varghese, S., Sharma, B., Strehin, I., Fermanian, S., Gorham, J., Fairbrother, D.H., Cascio, B., Elisseeff, J.H., Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue–biomaterial integration, *Nature Materials*, 6, 385–392, **2007**.
- [132] Ruhela, D., Riviere, K., Szoka, F.C., Efficient synthesis of an aldehyde functionalized hyaluronic acid and its application in the preparation of hyaluronan-lipid conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 17, 1360–1363, **2006**.
- [133] Ito, T., Yeo, Y., Highley, C.B., Bellas, E., Benitez, C.A., Kohane, D.S., The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives, *Biomaterials*, 28, 975–983, **2007**.
- [134] Jia, X., Yeo, Y., Clifton, R.J., Jiao, T., Kohane, D.S., Kobler, J.B., Zeitels, S.M., Langer, R., Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration, *Biomacromolecules*, 7, 3336–3344, **2006**.
- [135] Holland, T.A., Tessmar, J.K., Tabata, Y., Mikos, A.G., Transforming growth factor-beta 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment, *Journal of Controlled Release*, 94, 101–114, **2004**.
- [136] Ferretti, M., Marra, K.G., Kobayashi, K., DeFail, A.J., Chu, C.R., Controlled in vivo degradation of genipin crosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels within osteochondral defects, *Tissue Engineering*, 12, 2657–2663, **2006**.
- [137] Hu, Y., Hollinger, J.O., Marra, K.G., Controlled release from coated polymer microparticles embedded in tissue-engineered scaffolds, *Journal of Drug Targeting*, 9, 431–438, **2001**.
- [138] Marra, K.G., Defail, A.J., Clavijo-Alvarez, J.A., Badylak, S.F., Taieb, A., Schipper, B., Bennett, J., Rubin, J.P., FGF-2 enhances vascularization for adipose tissue engineering, *Plastic Reconstructive Surgery*, 121, 1153–1164, **2008**.
- [139] Rubin, J.P., Bennett, J.M., Doctor, J.S., Tebbets, B.M., Marra, K.G., Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells, *Plastic Reconstructive Surgery*, 120, 414–424, **2007**.

- [140] Cooper, C., Snow, S., McAlindon, T.E., Kellingray, S., Stuart, B., Coggon, D., Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis, *Arthritis & Rheumatology*, 43, 995–1000, **2000**.
- [141] Lawrence, R., Helmick, C., Arnett, F., Deyo, R., Felson, D., Giannini, E., Heyse, S., Hirsch, R., Hochberg, M., Hunder, G., Liang, M., Pillemer, S., Steen, V., Wolfe, F., Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States, *Arthritis & Rheumatology*, 41, 778–799, **1998**.
- [142] Finch, G.D., Dawe, C.J., Hemiatrophy, *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 23, 99–101, **2003**.
- [143] Fokin, A.A., Robicsek, F. Poland's syndrome revisited, *The Annals of Thoracic Surgery*, 74, 2218–2225, **2002**.
- [144] Peer, L.A., The neglected free fat graft, *Plastic Reconstructive Surgery*, 18, 233–250, **1956**.
- [145] Hemmrich, K., Van de Sijpe, K., Rhodes, N.P., Hunt, J.A., Di Bartolo, C., Pallua, N., Blondeel, P., von Heimburg, D., Autologous in vivo adipose tissue engineering in hyaluronan—based gels—a pilot study, *Journal of Surgical Research*, 144, 82–88, **2008**.
- [146] West, D.C., Kumar, S., Hyaluronan and angiogenesis, *Ciba Foundation symposium*, 143, 187–201, **1989**.
- [147] Yuksel, E., Weinfeld, A.B., Cleek, R., Wamsley, S., Jensen, J., Boutros, S., Waugh, J.M., Shenaq, S.M., Spira, M., Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-i, and basic fibroblast growth factor by plga/peg microspheres, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 105, 1712–1720, **2000**.
- [148] Kimura, Y., Ozeki, M., Inamoto, T., Tabata, Y., Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor, *Biomaterials*, 2324, 2513–2521, **2003**.
- [149] Tan H., Marra K., Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Materials*, 3, 1746-1767, **2010**.
- [150] Devi, V.K., Jain, N., Valli K.S., Importance of novel drug delivery systems in herbal medicines, *Pharmacognosy Reviews*, 4, 27–31, **2010**.
- [151] Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S.K., Drug delivery systems: an updated review, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2, 2–11, **2012**.
- [152] Paolino, D. , Sinha, P. , Fresta, M. and Ferrari, M., Drug Delivery Systems. In Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, J. G. Webster (Ed.), *Wiley*, **2006**.
- [153] Robinson, D.H., Mauger, J.W., Drug delivery systems, *American journal of hospital pharmacy*, 48, 14–23, **1991**.
- [154] Sharman, W., Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 53–76, **2004**.
- [155] Kozłowska, D., Foran, P., MacMahon, P., Shelly, M.J., Eustace, S., O'Kennedy, R., Molecular and magnetic resonance imaging: the value of immunoliposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1402–1411, **2009**.
- [156] Jong, W., Borm, P., Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *International Journal of Nanomedicine*, 3, 133 – 149, **2008**.

- [157] Luo, C., Sun, J., Sun, B., He, Z., Prodrug-based nanoparticulate drug delivery strategies for cancer therapy, *Trends in Pharmacological Sciences*, 35, 556–566, **2014**.
- [158] Florence, A.T., Hussain, N., Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 (Suppl. 1), 69–89, **2001**.
- [159] Chakravarthi, S.S., Robinson, D.H., De, S., Nanoparticles Prepared Using Natural and Synthetic Polymers, Nanoparticulate Drug Delivery Systems, Thassu, D., Deleers, M., Pathak, Y.V., *Taylor & Francis*, **2007**.
- [160] Elzoghby, A.O., Samy, W.M., Elgindy, N.A., Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 157, 168–182, **2012**.
- [161] Choi, K.Y., Chung H., Min, K.H., Yoon, H.Y., Kim, K., Park, J.H., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., Self assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting, *Biomaterials*, 31, 106–114, **2010**.
- [162] Sailaja, A., Amareshwar, P., Chakravarty, P., Different Techniques Used for the Preparation of Nanoparticles Using Natural Polymers and Their Application, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3, 2, 45-50, **2011**.
- [163] Panyam, J., Labhasetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 329–347, **2003**.
- [164] Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M.D., Heifets, L., The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172, 1487–1490, **2005**.
- [165] Wang, J., Xu, W., Ding, J., Lu, S., Wang, X., Wang, C., Chen, X., Cholesterol-enhanced polylactide-based stereocomplex micelle for effective delivery of doxorubicin, *Materials*, 8, 216–230, **2015**.
- [166] Li, D., Ding, J.X., Tang, Z.H., Sun, H., Zhuang, X.L., Xu, J.Z., Chen, X.S., In vitro evaluation of anticancer nanomedicines based on doxorubicin and amphiphilic Y-shaped copolymers, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2687–2697, **2012**.
- [167] Li, D., Sun, H., Ding, J., Tang, Z., Zhang, Y., Xu, W., Zhuang, X., Chen, X., Polymeric topology and composition constrained polyether–polyester micelles for directional antitumor drug delivery, *Acta Biomaterials*, 9, 8875–8884, **2013**.
- [168] Ding, J., Li, D., Zhuang, X., Chen, X., Self-assemblies of pH-activatable PEGylated multiarm poly(lactic acid-co-glycolic acid)-doxorubicin prodrugs with improved long-term antitumor efficacies, *Macromolecular Bioscience*, 13, 1300–1307, **2013**.
- [169] Kang, B., Opatz, T., Landfester, K., Wurm, F.R., Carbohydrate nanocarriers in biomedical applications: functionalization and construction, *Chemical Society Reviews*, 44, 8301–8325, **2015**.
- [170] Joung, Y.K., Jang, J.Y., Choi, J.H., Han, D.K., Park, K.D., Heparin-conjugated pluronic nanogels as multi-drug nanocarriers for combination chemotherapy, *Molecular Pharmaceutics*, 10, 685–693, **2013**.
- [171] Saravanakumar, G., Jo, D.G., Park, J.H., Polysaccharide-based nanoparticles: a versatile platform for drug delivery and biomedical imaging, *Current Medicinal Chemistry*, 19, 3212–3229, **2012**.

- [172] Zhu, J., Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials*, 31, 4639–4656, **2010**.
- [173] Zhang, N., Wardwell, P.R., Bader, R.A., Polysaccharide-based micelles for drug delivery, *Pharmaceutics*, 5, 329–352, **2013**.
- [174] Leung, M.Y.K., Liu, C., Koon, J.C.M., Fung, K.P., Polysaccharide biological response modifiers, *Immunology Letters*, 105, 101–114, **2006**.
- [175] Miller, T., Goude, M.C., McDevitt, T.C., Temenoff, J.S., Molecular engineering of glycosaminoglycan chemistry for biomolecule delivery, *Acta Biomaterials*, 10, 1705–1719, **2014**.
- [176] Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., Delair, T., Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring, *Langmuir*, 23, 10950–10958, **2007**.
- [177] Posocco, B., Dreussi, E., de Santa, J., Toffoli, G., Abrami, M., Musiani, F., Grassi, M., Farra, R., Tonon, F., Grassi, G., Dapas, B., Polysaccharides for the delivery of antitumor drugs, *Materials*, 8, 2569-2582, **2015**.
- [178] Jian, F., Zhang, Y., Wang, J., Ba, K., Mao, R., Lai, W., Lin, Y., Toxicity of biodegradable nanoscale preparations, *Current Drug Metabolism*, 13, 440–446, **2012**.
- [179] Abed, A. , Assoul, N. , Ba, M. , Derkaoui, S. M., Portes, P. , Louedec, L., Flaud, P. , Bataille, I. , Letourneur, D. and Meddahi-Pellé, A., Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Science Part A* 96, 535–542, **2011**.
- [180] Rodrigues, S., Cardoso, L., da Costa, A.M.R., Grenha, A., Biocompatibility and stability of polysaccharide polyelectrolyte complexes aimed at respiratory delivery, *Materials*, 8, 5647-5670, **2015**.
- [181] Saravanakumar, G., Jo, D.G., Park, J.H., Polysaccharide-based nanoparticles: a versatile platform for drug delivery and biomedical imaging, *Current Medicinal Chemistry*, 19, 3212–3229, **2012**.
- [182] Hafren, J., Zou, W., Córdova, A., Heterogeneous ‘organoclick’ derivatization of polysaccharides, *Macromolecular Rapid Communications*, 27, 1362–1366, **2006**.
- [183] Cumpstey, I., Chemical modification of polysaccharides, *ISRN Organic Chemistry*, 2013, 27, **2013**.
- [184] Li, S. , Xiong, Q. , Lai, X. , Li, X. , Wan, M. , Zhang, J. , Yan, Y. , Cao, M., Lu, L., Guan, J. , Zhang, D. and Lin, Y., Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 237–250, **2016**.
- [185] Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z., Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1650–1662, **2008**.
- [186] Mizrahy, S., Peer, D., Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics, *Chemical Society Reviews*, 41, 2623–2640, **2012**.
- [187] Lu, X., Gao, H., Li, C., Yang, Y.W., Wang, Y., Fan, Y., Wu, G., Ma, J., Polyelectrolyte complex nanoparticles of amino poly(glycerolmethacrylate)s and insulin, *International Journal of Pharmacy*, 423, 195–201, **2012**.
- [188] Sarika, P.R., Pavithran, A., James, N.R., Cationized gelatin/gum arabic polyelectrolyte complex: study of electrostatic interactions, *Food Hydrocolloids*, 49, 176–182, **2015**.
- [189] Rolland, J., Guillet, P., Schumers, J.M., Duhem, N., Préat, V., Gohy, J.F., Polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan and poly(acrylic acid) and



- polystyreneblock- poly(acrylic acid), *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50, 4484–4493, **2012**.
- [190] Fredheim, G.E., Christensen, B.E., Polyelectrolyte complexes: interactions between lignosulfonate and chitosan, *Biomacromolecules*, 4, 232–239, **2003**.
- [191] Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics*, 57, 19–34, **2004**.
- [192] Maciel, V.B.V., Yoshida, C.M.P., Franco, T.T., Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator, *Carbohydrate Polymers*, 132, 537–545, **2015**.
- [193] Etrych, T., Leclercq, L., Boustta, M., Vert, M., Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations in salted media: a model study related to the case of body fluids, *European Journal of Pharmaceutics*, 25, 281–288, **2005**.
- [194] Boddohi, S., Moore, N., Johnson, P.A., Kipper, M.J., Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan, *Biomacromolecules*, 10, 1402–1409, **2009**.
- [195] Hamman, J.H., Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems, *Marine Drugs*, 8, 1305–1322, **2010**.
- [196] Rodell, C.B., Mealy, J.E., Burdick, J.A., Supramolecular guest–host interactions for the preparation of biomedical materials, *Bioconjugate Chemistry*, 26, 2279–2289, **2015**.
- [197] Ozin, G.A., Hou, K., Lotsch, B.V., Cademartiri, L., Puzzo, D.P., Scotognella, F., Ghadimi, A., Thomson, J., Nanofabrication by self-assembly, *Materials Today*, 12, 12–23, **2009**.
- [198] Myrick, J.M., Vendra, V.K., Krishnan, S., Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications, *Nanotechnology Reviews*, 3, 319–346, **2014**.
- [199] Allen, C., Yu, Y., Maysinger, D., Eisenberg, A., Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818, *Bioconjugate Chemistry*, 9, 564–572, **1998**.
- [200] Wen, Y., Oh, J.K., Recent strategies to develop polysaccharide-based nanomaterials for biomedical applications, *Macromolecular Rapid Communications*, 35, 1819–1832, **2014**.
- [201] Mendes, A.C., Baran, E.T., Reis, R.L., Azevedo, H.S., Self-assembly in nature: using the principles of nature to create complex nanoBiomaterials, *Wiley Interdisciplinary Reviews, Nanomedicine Nanobiotechnology*, 5, 582–612, **2013**.
- [202] Alhaique, F., Matricardi, P., Di Meo, C., Coviello, T., Montanari, E., Polysaccharide based self-assembling nanohydrogels: an overview on 25-years research on pullulan, *The Journal of Drug Delivery Science and Technology (Part B)*, 30, 300–309, **2015**.
- [203] Nitta, S.K., Numata, K., Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 1629–1654, **2013**.

- [204] Zhang, X., Malhotra, S., Molina, M., Haag, R., Micro- and nanogels with labile crosslinks — from synthesis to biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 44, 1948–1973, **2015**.
- [205] Jameela, S., Jayakrishnan, A., Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle, *Biomaterials*, 16, 769–775, **1995**.
- [206] Schiffman, J.D., Schauer, C.L., Cross-linking chitosan nanofibers, *Biomacromolecules*, 8, 594–601, **2007**.
- [207] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques*, 37 790–806, **2004**.
- [208] Park, S.-N., Park, J.-C., Kim, H.O., Song, M.J., Suh, H., Characterization of porous collagen/ hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking, *Biomaterials*, 23, 1205–1212, **2002**.
- [209] Bodnar, M., Hartmann, J.F., Borbely, J., Preparation and characterization of chitosan based nanoparticles, *Biomacromolecules*, 6, 2521–2527, **2005**.
- [210] Vauthier, C., Bouchemal, K., Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 26, 1025–1058, **2009**.
- [211] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1–18, **2010**.
- [212] Janes, K., Calvo, P., Alonso, M., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 83–97, **2001**.
- [213] Zhang, X., Malhotra, S., Molina, M., Haag, R., Micro-and nanogels with labile crosslinks—from synthesis to biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 44, 1948–1973, **2015**.
- [214] Matai, I., Gopinath, P., Chemically cross-linked hybrid nanogels of alginate and PAMAM dendrimers as efficient anticancer drug delivery vehicles, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2, 213–223, **2016**.
- [215] Jätariu, A.N., Popa, M., Curteanu, S., Peptu, C.A., Covalent and ionic co-crosslinking— an original way to prepare chitosan–gelatin hydrogels for biomedical applications, *Journal of Biomedical Materials Science Part A*, 98A, 342–350, **2011**.
- [216] Kuo, C.K., Ma, P.X., Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*, 22, 511–521, **2001**.
- [217] Alvarez-Lorenzo, C., Blanco-Fernandez, B., Puga, A.M., Concheiro, A., Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1148–1171, **2013**.
- [218] Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., McCarron, P., Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65–73, **2005**.
- [219] Ma, Z., Yeoh, H.H., Lim, L.Y., Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 1396–1404, **2002**.

- [220] Tsai, M.L., Bai, S.W., Chen, R.H., Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle, *Carbohydrate Polymers*, 71, 448–457, **2008**.
- [221] Lin, N., Huang, J., Dufresne, A., Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: a review, *Nanoscale*, 4, 3274–3294, **2012**.
- [222] Bhattarai, N., Gunn, J., Zhang, M., Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 83–99, **2010**.
- [223] Vinogradov, S.V., Senanayake, T., Nanogel–drug conjugates: a step towards increasing the chemotherapeutic efficacy, *Nanomedicine*, 8, 1229–1232, **2013**.
- [224] Nagpal, K., Singh, S.K., Mishra, D.N., Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58, 1423–1430, **2010**.
- [225] Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *The International Journal of Pharmaceutics*, 274, 1–33, **2004**.
- [226] Grenha, A., Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods, *Journal of Drug Targeting*, 20, 291–300, **2012**.
- [227] He, P., Davis, S.S., Illum, L., In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *The International Journal of Pharmaceutics*, 166, 75–88, **1998**.
- [228] Sogias, I.A., Williams, A.C., Khutoryanskiy, V.V., Why is chitosan mucoadhesive?, *Biomacromolecules*, 9, 1837–1842, **2008**.
- [229] Wang, L.-Y., Ma, G.-H., Su, Z.-G., Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug, *Journal of Controlled Release*, 106, 62–75, **2005**.
- [230] Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharmaceutical Research*, 14, 1431–1436, **1997**.
- [231] Feng, C., Sun, G., Wang, Z., Cheng, X., Park, H., Cha, D., Kong, M., Chen, X., Transport mechanism of doxorubicin loaded chitosan based nanogels across intestinal epithelium, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 5, 197–207, **2014**.
- [232] Gupta, A.K., Gupta, M., Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles, *Biomaterials*, 26, 1565–1573, **2005**.
- [233] Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., Gazeau, F., Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating, *Biomaterials*, 24, 1001–1011, **2003**.
- [234] Feng, C., Li, J., Kong, M., Liu, Y., Cheng, X.J., Li, Y., Park, H.J., Chen, X.G., Surface charge effect on mucoadhesion of chitosan based nanogels for local anti-colorectal cancer drug delivery, *Colloids Surface B: Biointerfaces*, 128, 439–447, **2015**.
- [235] Duan, C., Zhang, D., Wang, F., Zheng, D., Jia, L., Feng, F., Liu, Y., Wang, Y., Tian, K., Wang, F., Zhang, Q., Chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide)

- based nanogels for tumor extracellular targeting, *International Journal of Pharmaceutics*, 409, 252–259, **2011**.
- [236] Amidi, M., Hennink, W.E., Chitosan-based formulations of drugs, imaging agents and biotherapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1–2, **2010**.
- [237] Agrawal, P., Strijkers, G.J., Nicolay, K., Chitosan-based systems formolecular imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 42–58, **2010**.
- [238] Shen, J.-M., Xu, L., Lu, Y., Cao, H.-M., Xu, Z.-G., Chen, T., Zhang, H.-X., Chitosan-based luminescent/magnetic hybrid nanogels for insulin delivery, cell imaging, and antidiabetic research of dietary supplements, *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 400–409, **2012**.
- [239] Wu, W., Shen, J., Banerjee, P., Zhou, S., Chitosan-based responsive hybrid nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging and controlled drug delivery, *Biomaterials*, 31, 8371–8381, **2010**.
- [240] Li, L., Moon, H.T., Park, J.-Y., Heo, Y.J., Choi, Y., Tran, T.H., Lee, Y.K., Kim, S.Y., Huh, K.M., Heparin-based self-assembled nanoparticles for photodynamic therapy, *Macromolecular Research*, 19, 487–494, **2011**.
- [241] Huang, L., Kerns, R.J., Diversity-oriented chemical modification of heparin: identification of charge-reduced N-acyl heparin derivatives having increased selectivity for heparin-binding proteins, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 2300–2313, **2006**.
- [242] Mousa, S.A., Petersen, L.J., Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence, *Thrombosis and Haemostasis*, 102, 258–267, **2009**.
- [243] Norrby, K., Heparin and angiogenesis: a low-molecular-weight fraction inhibits and a high-molecular-weight fraction stimulates angiogenesis systemically, *Pathophysiology of Thrombosis and Haemostasis*, 23, 141–149, **1993**.
- [244] Koenig, A., Norgard-Sumnicht, K., Linhardt, R., Varki, A., Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents, *Journal of Clinical Investigation*, 101, 877–889, **1998**.
- [245] Vlodaysky, I., Ilan, N., Nadir, Y., Brenner, B., Katz, B.-Z., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Sasisekharan, R., Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression, *Thrombosis Research*, 120, Supplement 2, 112–120, **2007**.
- [246] Borsig, L., Wong, R., Feramisco, J., Nadeau, D.R., Varki, N.M., Varki, A., Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3352–3357, **2001**.
- [247] Vlodaysky, I., Beckhove, P., Lerner, I., Pisano, C., Meirovitz, A., Ilan, N., Elkin, M., Significance of heparanase in cancer and inflammation, *Cancer Microenvironment*, 5, 115–132, **2012**.
- [248] Parish, C.R., Freeman, C., Hulett, M.D., Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion, *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews On Cancer*, 1471, 99–108, **2001**.
- [249] Ilan, N., Elkin, M., Vlodaysky, I., Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 2018–2039, **2006**.

- [250] Stevenson, J.L., Varki, A., Borsig, L., Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects, *Thrombosis Research*, 120, Supplement 2, 107–111, **2007**.
- [251] Yagi, H., Miyamoto, S., Tanaka, Y., Sonoda, K., Kobayashi, H., Kishikawa, T., Iwamoto, R., Mekada, E., Nakano, H., Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in peritoneal fluid of ovarian cancer, *British Journal of Cancer*, 9, 2, 1737–1745, **2005**.
- [252] Xu, Z., Shen, G., Xia, X., Zhao, X., Zhang, P., Wu, H., Guo, Q., Qian, Z., Wei, Y., Liang, S., Comparisons of three polyethyleneimine-derived nanoparticles as a gene therapy delivery system for renal cell carcinoma, *Journal of Translational Medicine*, 9, 46, **2011**.
- [253] Yang, X., Du, H., Liu, J., Zhai, G., Advanced nanocarriers based on heparin and its derivatives for cancer management, *Biomacromolecules*, 16, 423–436, **2015**.
- [254] Jee, K.S., Park, H.D., Park, K.D., Kim, Y.H., Shin, J.-W., Heparin conjugated polylactide as a blood compatible material, *Biomacromolecules*, 5, 1877–1881, **2004**.
- [255] Guo, W., Lee, R.J., Receptor-targeted gene delivery via folate-conjugated polyethylenimine, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 1, 20–26, **1999**.
- [256] Weiss, S.I., Sieverling, N., Niclasen, M., Maucksch, C., Thunemann, A.F., Mohwald, H., Reinhardt, D., Rosenecker, J., Rudolph, C., Uronic acids functionalized polyethyleneimine (PEI)-polyethyleneglycol (PEG)-graft-copolymers as novel synthetic gene carriers, *Biomaterials*, 27, 2302–2312, **2006**.
- [257] Jiang, G., Park, K., Kim, J., Kim, K.S., Oh, E.J., Kang, H., Han, S.E., Oh, Y.K., Park, T.G., Hahn S., Hyaluronic acid–polyethyleneimine conjugate for target specific intracellular delivery of siRNA, *Biopolymers*, 89, 635–642, **2008**.
- [258] Park, K., Kim, K., Kwon, I.C., Kim, S.K., Lee, S., Lee, D.Y., Byun, Y., Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of heparin–deoxycholic acid conjugates, *Langmuir*, 20, 11726–11731, **2004**.
- [259] Mero, A., Campisi, M., Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules, *Polymers*, 6, 346–369, **2014**.
- [260] Prestwich, G.D., Hyaluronic acid-based clinical *Biomaterials* derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine, *Journal of Controlled Release*, 155, 193–199, **2011**.
- [261] Laurent, T.C., Fraser, J., Hyaluronan, *FASEB Journal*, 6, 7, 2397–2404, **1992**.
- [262] Liao, Y.-H., Jones, S.A., Forbes, B., Martin, G.P., Brown, M.B., Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery, *Drug Delivery*, 12, 327–342, **2005**.
- [263] Toole, B.P., Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nature Reviews Cancer*, 4, 528–539, **2004**.
- [264] Burdick, J.A., Prestwich, G.D., Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, *Advanced Materials*, 23, 41–56, **2011**.
- [265] Galus, R., Antiszko, M., Włodarski, P., Clinical applications of hyaluronic acid, *Polski Merkuriusz Lekarski*, 20, 606–608, **2006**.

- [266] Williams, D.L., Mann, B.K., Efficacy of a crosslinked hyaluronic acid-based hydrogel as a tear film supplement: a masked controlled study, *PLoS ONE*, 9, 99766, **2014**.
- [267] Evanko, S.P., Parks, W.T., Wight, T.N., Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle, *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 52, 1525–1535, **2004**.
- [268] Chen, S.H., Chen, C.H., Shalumon, K., Chen, J.P., Preparation and characterization of antiadhesion barrier film from hyaluronic acid-grafted electrospun poly(caprolactone) nanofibrous membranes for prevention of flexor tendon postoperative peritendinous adhesion, *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4079–4092, **2014**.
- [269] Moseley, R., Walker, M., Waddington, R., Chen, W., Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials–carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species, *Biomaterials*, 24, 1549–1557, **2003**.
- [270] Evanich, J.D., Evanich, C.J., Wright, M.B., Rydlewicz, J.A., Efficacy of intraarticular hyaluronic acid injections in knee osteoarthritis, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 390, 173–181, **2001**.
- [271] Schanté, C.E., Zuber, G., Herlin, C., Vandamme, T.F., Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydrate Polymers*, 85, 469–489, **2011**.
- [272] Glenn, D.P., Jing-wen, K., Chemically-modified HA for therapy and regenerative medicine, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 242–245, **2008**.
- [273] Burdick, J.A., Prestwich, G.D., Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, *Advanced Materials*, 41–56, **2011**.
- [274] Rachid, M., Pamela, K., Tobias, N., Irina, N., Markus, W.B., Margot, Z., CD44 and EpCAM:cancer-initiating cell markers, *Current Molecular Medicine*, 8, 784–804, **2008**.
- [275] Tripodo, G., Trapani, A., Torre, M.L., Giammona, G., Trapani, G., Mandracchia, D., Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: recent advances and challenges, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 400–416, **2015**.
- [276] Marriott, C., Martin, G.P., Brown, M.B., Hyaluronic Drug Delivery System, *Google Patents*, **2005**.
- [277] Yang, C., Wang, X., Yao, X., Zhang, Y., Wu, W., Jiang, X., Hyaluronic acid nanogels with enzyme-sensitive cross-linking group for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 205, 206–217, **2015**.
- [278] Wei, X., Senanayake, T.H., Warren, G., Vinogradov, S.V., Hyaluronic acid-based nanogel-drug conjugates with enhanced anticancer activity designed for targeting of CD44-positive and drug-resistant tumors, *Bioconjugate Chemistry*, 24, 658–668, **2013**.
- [279] Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M., A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 27–32, **2012**.
- [280] Jain, A., Jain, S.K., In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 404–416, **2008**.

- [281] Kang, L., Gao, Z., Huang, W., Jin, M., Wang, Q., Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5, 169–175, **2015**.
- [282] Pinto, A.C., Moreira, J.N., Simões, S., Combination Chemotherapy in Cancer: Principles, Evaluation and Drug Delivery Strategies, Current Cancer Treatments- Novel Beyond Conventional Approaches, Prof. Oner Ozdemir (Ed.), *INTECH Open Access Publisher*, 9, 694-714, **2011**.
- [283] Chen, H., Di, Y., Chen, D., Madrid, K., Zhang, M., Tian, C., Tang, L., Gu, Y., Combined chemo- and photo-thermal therapy delivered by multifunctional theranostic gold nanorod-loaded microcapsules, *Nanoscale*, 7, 8884–8897, **2015**.
- [284] Khatun, Z., Nurunnabi, M., Nafiujjaman, M., Reeck, G.R., Khan, H.A., Cho, K.J., Lee, Y.-k., A hyaluronic acid nanogel for photo-chemo theranostics of lung cancer with simultaneous light-responsive controlled release of doxorubicin, *Nanoscale*, 7, 10680–10689, **2015**.
- [285] Zhan, F., Chen, W., Wang, Z., Lu, W., Cheng, R., Deng, C., Meng, F., Liu, H., Zhong, Z., Acidactivatable prodrug nanogels for efficient intracellular doxorubicin release, *Biomacromolecules*, 12, 3612–3620, **2011**.
- [286] Park, H.S., Lee, J.E., Cho, M.Y., Hong, J.H., Cho, S.H., Lim, Y.T., Hyaluronic acid/poly( $\beta$ - amino ester) polymer nanogels for cancer-cell-specific NIR fluorescence switch, *Macromolecular Rapid Communications*, 33, 1549–1555, **2012**.
- [287] d'Ayala, G.G., Malinconico, M., Laurienzo, P., Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches, *Molecules*, 13, 2069–2106, **2008**.
- [288] George, M., Abraham, T.E., Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan — a review, *Journal of Controlled Release*, 114, 1–14, **2006**.
- [289] Pawar, S.N., Edgar, K.J., Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications, *Biomaterials*, 33, 3279–3305, **2012**.
- [290] Leonard, M., De Boisseson, M.R., Hubert, P., Dalençon, F., Dellacherie, E., Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties, *Journal of Controlled Release*, 98, 395–405, **2004**.
- [291] Vallée, F., Müller, C., Durand, A., Schimchowitsch, S., Dellacherie, E., Kelche, C., Cassel, J.C., Leonard, M., Synthesis and rheological properties of hydrogels based on amphiphilic alginate-amide derivatives, *Carbohydrate Research*, 344, 223–228, **2009**.
- [292] Lee, K.Y., Mooney, D.J., Alginate: properties and biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 37, 106–126, **2012**.
- [293] Sarika, P.R., Anil Kumar, P.R., Raj, D.K., James, N.R., Nanogels based on alginic aldehyde and gelatin by inverse miniemulsion technique: synthesis and characterization, *Carbohydrate Polymers*, 119, 118–125, **2015**.
- [294] Xue, Y., Xia, X., Yu, B., Luo, X., Cai, N., Long, S., Yu, F., A green and facile method for the preparation of a pH-responsive alginate nanogel for subcellular delivery of doxorubicin, *RSC Advances*, 5, 73416–73423, **2015**.
- [295] Maciel, D., Figueira, P., Xiao, S., Hu, D., Shi, X., Rodrigues, J., Tomás, H., Li, Y., Redox-responsive alginate nanogels with enhanced anticancer cytotoxicity, *Biomacromolecules*, 14, 3140–3146, **2013**.

- [296] Igarashi, N., Takeguchi, A., Sakai, S., Akiyama, H., Higashi, K., Toida, T., Effect of molecular sizes of chondroitin sulfate on interaction with L-selectin, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 9, **2013**.
- [297] Shi, Y., Meng, Y., Li, J., Chen, J., Liu, Y., Bai, X., Chondroitin sulfate: extraction, purification, microbial and chemical synthesis, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89, 24-27, **2010**.
- [298] Campo, G.M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A.M., Calatroni, A., Antioxidant Activity of Chondroitin Sulfate, *Advances in Pharmacology, Academic Press*, 417–431, **2006**.
- [299] Uebelhart, D., Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, Supplement 3, 19–21, **2008**.
- [300] Zhang, W., Nuki, G., Moskowitz, R.W., Abramson, S., Altman, R.D., Arden, N.K., Bierma-Zeinstra, S., Brandt, K.D., Croft, P., Doherty, M., Dougados, M., Hochberg, M., Hunter, D.J., Kwoh, K., Lohmander, L.S., Tugwell, P., OARS recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009, *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, 476–499, **2010**.
- [301] Jordan, K., Arden, N., Doherty, M., Bannwarth, B., Bijlsma, J., Dieppe, P., Dougados, M., EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT), *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(12), 1145–1155, **2003**.
- [302] Huang, S.-J., Sun, S.-L., Feng, T.-H., Sung, K.-H., Lui, W.-L., Wang, L.-F., Folate-mediated chondroitin sulfate-Pluronic® 127 nanogels as a drug carrier, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, 64, 1445–1465, **2009**.
- [303] Park, W., Park, S.-j., Na, K., Potential of self-organizing nanogel with acetylated chondroitin sulfate as an anti-cancer drug carrier, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 501–508, **2010**.
- [304] Xi, J., Zhou, L., Dai, H., Drug-loaded chondroitin sulfate-based nanogels: preparation and characterization, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 100, 107–115, **2012**.
- [305] Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A., The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function, *Sports Health*, 1, 6, 461-468, **2009**.
- [306] Buckwalter, J.A., Hunziker, E., Rosenberg, L., Articular cartilage: composition and structure. In: Woo, S.L.Y., Buckwalter J.A., eds. Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues, *Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 405-425, **1998**.
- [307] Buckwalter, J.A., Mankin, H.J., Articular cartilage, part 1: tissue design and chondrocyte-matrix interaction, *Journal of bone and joint surgery*, 79, 600-611, **1997**.
- [308] Makris, E.A., Gomoll, A.H., Malizos, K.N., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage, *Nature review Rheumatology*, 11, 21–34, **2015**.
- [309] Bae, D.K., Yoon, K.H., Song, S.J., Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees, *Arthroscopy*, 22, 367–374, **2006**.
- [310] Kreuz, P.C., Steinwachs, M.R., Erggelet, C., Krause, S.C., Konrad, G., Uhl, M., Südakikaamp, N., Results after microfracture of full-thickness chondral



- defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 14, 1119–1125, **2006**.
- [311] Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R.J., Kreuz, P.C., Mandelbaum, B.R., Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis, *American Journal of Sports Medicine*, 37, 2053–2063, **2009**.
- [312] Goyal, D., Keyhani, S., Lee, E.H., Hui, J.H., Evidence-based status of microfracture technique: a systematic review of level I and II studies, *Arthroscopy*, 29, 1579–1588, **2013**.
- [313] Gudas, R., Gudaitė, A., Mickevičius, T., Masiulis, N., Simonaitytė, R., Cekanauškas, E., Skurvydas, A., Comparison of osteochondral autologous transplantation, microfracture, or debridement techniques in articular cartilage lesions associated with anterior cruciate ligament injury: a prospective study with a 3-year follow-up, *Arthroscopy*, 29, 89–97, **2013**.
- [314] Saris, D. B., Vanlauwe, J., Victor, J., Almqvist, K.F., Verdonk, R., Bellemans, J., Luyten, F.P., Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture, *American Journal of Sports Medicine* 37, 1, 10–19, **2009**.
- [315] Saris, D.B., Vanlauwe, J., Victor, J., Almqvist, K.F., Verdonk, R., Bellemans, J., Luyten, F.P., Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture, *American Journal of Sports Medicine*, 36, 235–246, **2008**.
- [316] Peterson, L., Vasiliadis, H.S., Brittberg, M., Lindahl, A., Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up, *American Journal of Sports Medicine*, 38, 1117–1124, **2010**.
- [317] Minas, T., Von Keudell, A., Bryant, T., Gomoll, A.H., The John Insall Award: a minimum 10-year outcome study of autologous chondrocyte implantation, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 472, 41–51, **2014**.
- [318] Behery, O.A., Harris, J.D., Karnes, J.M., Siston, R.A., Flanigan, D.C., Factors influencing the outcome of autologous chondrocyte implantation: a systematic review, *Journal of Knee Surgery*, 26, 203–211, **2013**.
- [319] Filardo, G., Kon, E., Di Martino, A., Iacono, F., Marcacci, M., Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation: a prospective 7-year follow-up study, *American Journal of Sports Medicine*, 39, 2153–2160, **2011**.
- [320] Macmull, S., Parratt, M.T., Bentley, G., Skinner, J.A., Carrington, R.W., Morris, T., Briggs, T.W., Autologous chondrocyte implantation in the adolescent knee, *American Journal of Sports Medicine American Journal of Sports Medicine*, 39, 1723–1730, **2011**.
- [321] Trinh, T.Q., Harris, J.D., Siston, R.A., Flanigan, D.C., Improved outcomes with combined autologous chondrocyte implantation and patellofemoral osteotomy versus isolated autologous chondrocyte implantation, *Arthroscopy*, 29, 566–574, **2013**.
- [322] Van Assche, D., Staes, F., Van Caspel, D., Vanlauwe, J., Bellemans, J., Saris, D.B., Luyten, F.P., Autologous chondrocyte implantation versus microfracture for knee cartilage injury: a prospective randomized trial, with 2-year follow-up, *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 18, 486–495, **2010**.

- [323] Darling, E.M., Athanasiou, K.A., Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations, *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 425–432, **2005**.
- [324] Grigolo, B., Lisignoli, G., Piacentini, A., Fiorini, M., Gobbi, P., Mazzotti, G., Duca, M., Pavesio, A., Facchini, A., Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis, *Biomaterials*, 23, 1187–1195, **2002**.
- [325] Caron, M.M., Emans, P.J., Coolson, M.M., Voss, L., Surtel, D.A., Cremers, A., van Rhijn, L.W., Welting, T.J., Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures, *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 1170–1178, **2012**.
- [326] Marlovits, S., Aldrian, S., Wondrasch, B., Zak, L., Albrecht, C., Welsch, G., Trattig, S., Clinical and radiological outcomes 5 years after matrix-induced autologous chondrocyte implantation in patients with symptomatic, traumatic chondral defects, *American Journal of Sports Medicine*, 40, 2273–2280, **2012**.
- [327] Zheng, M.H., Willers, C., Kirilak, L., Yates, P., Xu, J., Wood, D., Shimmin, A., Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment, *Tissue Engineering*, 13, 737–746, **2007**.
- [328] Zeifang, F., Oberle, D., Nierhoff, C., Richter, W., Moradi, B., Schmitt, H., Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial, *American Journal of Sports Medicine* 38, 924–933, **2010**.
- [329] Ayhan, E., Kesmezacar, H., Akgun, I., Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis, *World Journal of Orthopaedics*, 5, 3, 351-36, **2014**.
- [330] Valtonen, E.J., Clinical comparison of triamcinolonehexacetonide and betamethasone in the treatment of osteoarthrosis of the knee-joint, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 41: 1-7, **1981**.
- [331] Pyne, D., Ioannou, Y., Mootoo, R., Bhanji, A., Intra-articular steroids in knee osteoarthritis: a comparative study of triamcinolone hexacetonide and methylprednisolone acetate, *Clinical Rheumatology*, 23, 116-120, **2004**.
- [332] Yavuz, U., Sökücü, S., Albayrak, A., Oztürk, K., Efficacy comparisons of the intraarticular steroidal agents in the patients with knee osteoarthritis, *Rheumatology International*, 32, 3391-3396, **2012**.
- [333] Ostergaard, M., Halberg, P., Intra-articular corticosteroids in arthritic disease: a guide to treatment, *BioDrugs*, 9, 95-103, **1998**.
- [334] Creamer, P., Intra-articular corticosteroid treatment in osteoarthritis, *Current opinion in rheumatology*, 11, 417-421, **1999**.
- [335] Jessar, R.A., Ganzell, M.A., Ragan, C., The action of hydrocortisone in synovial inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 32, 6, 480-482, **1953**.
- [336] Rozental, T.D., Sculco, T.P., Intra-articular corticosteroids: an updated overview, *American journal of orthopedics*, 29, 18-23, **2000**.
- [337] Scanzello, C.R., Goldring, S.R., The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis, *Bone*, 51, 249-257, **2012**.
- [338] Ayral, X., Pickering, E.H., Woodworth, T.G., Mackillop, N., Dougados, M., Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis – results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients, *Osteoarthritis Cartilage*, 13: 361-367, **2005**.

- [339] Roemer, F.W., Guermazi, A., Felson, D.T., Niu, J., Nevitt, M.C., Crema, M.D., Lynch, J.A., Lewis, C.E., Torner, J., Zhang, Y., Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70, 1804-1809, **2011**.
- [340] Conaghan, P.G., D'Agostino, M.A., Le Bars, M., Baron, G., Schmidely, N., Wakefield, R., Ravaud, P., Grassi, W., Martin- Mola, E., So, A., Backhaus, M., Malaise, M., Emery, P., Dougados, M., Clinical and ultrasonographic predictors of joint replacement for knee osteoarthritis: results from a large, 3-year, prospective EULAR study, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69, 644-647, **2010**.
- [341] Bellamy, N., Campbell, J., Robinson, V., Gee, T., Bourne, R., Wells, G., Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee, *Cochrane database of systematic reviews*, 2, CD005328, **2006**.
- [342] Hepper, C.T., Halvorson, J.J., Duncan, S.T., Gregory, A.J., Dunn, W.R., Spindler, K.P., The efficacy and duration of intra-articular corticosteroid injection for knee osteoarthritis: a systematic review of level I studies, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 17, 638-646, **2009**.
- [343] Bannuru, R.R., Natov, N.S., Obadan, I.E., Price, L.L., Schmid, C.H., McAlindon, T.E., Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis, *Arthritis & Rheumatology*, 61, 1704-1711, **2009**.
- [344] Chao, J., Wu, C., Sun, B., Hose, M.K., Quan, A., Hughes, T.H., Boyle, D., Kalunian, K.C., Inflammatory characteristics on ultrasound predict poorer longterm response to intraarticular corticosteroid injections in knee osteoarthritis, *Journal of Rheumatology*, 37, 650-655, **2010**.
- [345] Arroll, B., Goodyear-Smith, F., Corticosteroid injections for osteoarthritis of the knee: meta-analysis, *British Medical Journal*, 328- 869, **2004**.
- [346] Gaffney, K., Ledingham, J., Perry, J.D., Intra-articular triamcinolone hexacetonide in knee osteoarthritis: factors influencing the clinical response, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54, 379-381, **1995**.
- [347] Arden, N.K., Reading, I.C., Jordan, K.M., Thomas, L., Platten, H., Hassan, A., Ledingham, J., A randomised controlled trial of tidal irrigation vs corticosteroid injection in knee osteoarthritis: the KIVIS Study, *Osteoarthritis Cartilage*, 16: 733-739, **2008**.
- [348] Maricar, N., Callaghan, M.J., Felson, D.T., O'Neill, T.W., Predictors of response to intra-articular steroid injections in knee osteoarthritis--a systematic review, *Rheumatology (Oxford)*, 52, 1022-1032, **2013**.
- [349] Hochberg, M.C., Altman, R.D., April, K.T., Benkhalti, M., Guyatt, G., McGowan, J., Towheed, T., Welch, V., Wells, G., Tugwell, P., American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee, *Arthritis Care & Research*, 64, 465-474, **2012**.
- [350] Jevsevar, D.S., Brown, G.A., Jones, D.L., Matzkin, E.G., Manner, P.A., Moorar, P., Schousboe, J.T., Stovitz, S., Sanders, J.O., Bozic, K.J., Goldberg, M.J., Martin, W.R., Cummins, D.S., Donnelly, P., Woznica, A., Gross, L., The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence-based guideline on: treatment of osteoarthritis of the knee, 2nd edition, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 95, 1885-1886, **2013**.

- [351] McArthur, B.A., Dy, C.J., Fabricant, P.D., Valle, A.G., Long term safety, efficacy, and patient acceptability of hyaluronic acid injection in patients with painful osteoarthritis of the knee, *Patient Preference and Adherence*, 6, 905-910, **2012**.
- [352] Goldberg, V.M., Buckwalter, J.A., Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: evidence for diseasemodifying activity, *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 216-224, **2005**.
- [353] Wang, C.T., Lin, J., Chang, C.J., Lin, Y.T., Hou, S.M., Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 86-A, 538-545, **2004**.
- [354] Kotevoglu, N., Iyibozkurt, P.C., Hiz, O., Toktas, H., Kuran, B., A prospective randomised controlled clinical trial comparing the efficacy of different molecular weight hyaluronan solutions in the treatment of knee osteoarthritis, *Rheumatology International*, 26, 325-330, **2006**.
- [355] Maneiro, E., de Andres, M.C., Fernández-Sueiro, J.L., Galdo, F., Blanco, F.J., The biological action of hyaluronan on human osteoarthritic articular chondrocytes: the importance of molecular weight, *Clinical And Experimental Rheumatology*, 22, 307-312, **2004**.
- [356] Brockmeier, S.F., Shaffer, B.S., Viscosupplementation therapy for osteoarthritis, *Sports Medicine and Arthroscopy*, 14, 155-162, **2006**.
- [357] Goa, K.L., Benfield, P., Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing, *Drugs*, 47, 536-566, **1994**.
- [358] Axe, J.M., Snyder-Mackler, L., Axe, M.J., The role of viscosupplementation, *Sports Medicine and Arthroscopy*, 21, 18-22, **2013**.
- [359] Balazs, E.A., Denlinger, J.L., Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis, *Journal of Rheumatology*, 39, 3-9, **1993**.
- [360] Greenwald, R.A., Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 20, 219-240, **1991**.
- [361] Watterson, J.R., Esdaile, J.M., Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 8, 277-284, **2000**.
- [362] Listrat, V., Ayral, X., Patarnello, F., Bonvarlet, J.P., Simonnet, J., Amor, B., Dougados, M., Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan (Hyalgan) in osteoarthritis of the knee, *Osteoarthritis Cartilage*, 5:153-160, **1997**.
- [363] Wenz, W., Breusch, S.J., Graf, J., Stratmann, U., Ultrastructural findings after intraarticular application of hyaluronan in a canine model of arthropathy, *Journal of Orthopaedic Research*, 18, 604-612, **2000**.
- [364] Pozo, M.A., Balazs, E.A., Belmonte, C., Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative, *Experimental Brain Research*, 116, 3-9, **1997**.
- [365] Ghosh, P., The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 12, 75-82, **1994**.
- [366] Chhetri, D.K., Mendelsohn, A.H., Hyaluronic acid for the treatment of vocal fold scars, *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 18, 498-502, **2010**.

- [367] Thirumalai, B., Blamires, T.L., Brooker, L., Deeks, J., Heavier molecular weight ocular viscoelastic devices and timing of post-operative review following cataract surgery, *BMC ophthalmology*, 7, 2, **2007**.
- [368] Peyron, J.G., Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review, *Journal of Rheumatology*, 39, 10-15, **1993**.
- [369] Bannuru, R.R., Natov, N.S., Dasi, U.R., Schmid, C.H., McAlindon, T.E., Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis--meta-analysis, *Osteoarthritis Cartilage*, 19, 611-619, **2011**.
- [370] Rutjes, A.W., Jüni, P., da Costa, B.R., Trelle, S., Nüesch, E., Reichenbach, S., Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis, *Annals of Internal Medicine*, 157, 180-191, **2012**.
- [371] Divine, J.G., Shaffer, M.D., Use of viscosupplementation for knee osteoarthritis: an update, *Current Sports Medicine Reports*, 10, 279-284, **2011**.
- [372] Printz, J.O., Lee, J.J., Knesek, M., Urquhart, A.G., Conflict of interest in the assessment of hyaluronic acid injections for osteoarthritis of the knee: an updated systematic review, *Journal of Arthroplasty*, 28, 30-33.e1, **2013**.
- [373] Adams, M.E., Lussier, A.J., Peyron, J.G., A risk-benefit assessment of injections of hyaluronan and its derivatives in the treatment of osteoarthritis of the knee, *Drug Safety*, 23, 115-130, **2000**.
- [374] Hall, M.P., Band, P.A., Meislin, R.J., Jazrawi, L.M., Cardone, D.A., Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 17, 602-608, **2009**.
- [375] Dohan Ehrenfest, D.M., Rasmusson, L., Albrektsson, T., Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF), *Trends Biotechnology*, 27, 158-167, **2009**.
- [376] Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T., Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration, *Thrombosis and Haemostasis*, 91, 4-15, **2004**.
- [377] Pietrzak, W.S., Eppley, B.L., Platelet rich plasma: biology and new technology, *Journal of Craniofacial Surgery*, 16, 1043-1054, **2005**.
- [378] Woodall, J., Tucci, M., Mishra, A., Benghuzzi, H., Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells, *Biomedical sciences instrumentation*, 43, 266-271, **2007**.
- [379] Drengk, A., Zapf, A., Stürmer, E.K., Stürmer, K.M., Frosch, K.H., Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells, *Cells Tissues Organs*, 189, 317-326, **2009**.
- [380] Wu, W., Chen, F., Liu, Y., Ma, Q., Mao, T., Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model, *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 65, 1951-1957, **2007**.
- [381] Zhu, Y., Yuan, M., Meng, H.Y., Wang, A.Y., Guo, Q.Y., Wang, Y., Peng, J., Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review, *Osteoarthritis Cartilage*, 21: 1627-1637, **2013**.
- [382] Andia, I., Sánchez, M., Maffulli, N., Joint pathology and platelet- rich plasma therapies, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12, 7-22, **2012**.

- [383] Sánchez, M., Azofra, J., Anitua, E., Andía, I., Padilla, S., Santisteban, J., Mujika, I., Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report, *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35: 1648-1652, **2003**.
- [384] Sánchez, M., Anitua, E., Azofra, J., Aguirre, J.J., Andia, I., Intraarticular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 26: 910-913, **2008**.
- [385] Sampson, S., Reed, M., Silvers, H., Meng, M., Mandelbaum, B., Injection of platelet-rich plasma in patients with primary and secondary knee osteoarthritis: a pilot study, *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 89, 961-969, **2010**.
- [386] Kon, E., Mandelbaum, B., Buda, R., Filardo, G., Delcogliano, M., Timoncini, A., Fornasari, P.M., Giannini, S., Marcacci, M., Platelet- rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis, *Arthroscopy*, 27, 1490-1501, **2011**.
- [387] Filardo, G., Kon, E., Di Martino, A., Di Matteo, B., Merli, M.L., Cenacchi, A., Fornasari, P.M., Marcacci, M., Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 13, 229, **2012**.
- [388] Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 — an update, *Journal of Gene Medicine*, 15, 65–77, **2013**.
- [389] Kay, M.A., State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead, *Nature Reviews Genetics*, 12, 316–328, **2011**.
- [390] Bouard, D., Alazard-Dany, D., Cosset, F.L., Viral vectors: from virology to transgene expression, *British Journal of Pharmacology*, 157, 153–165, **2009**.
- [391] Mintzer, M.A., Simanek, E.E., Nonviral vectors for gene delivery, *Chemistry Reviews*, 109, 259–302, **2009**.
- [392] Monopoli, M.P., Aberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials, *Nature Nanotechnology*, 7, 779–786, **2012**.
- [393] Lee, H., Lytton-Jean, A.K., Chen, Y., Love, K.T., Park, A.I., Karagiannis, E.D., Sehgal, A., Querbes, W., Zurenko, C.S., Jayaraman, M., Peng, C.G., Charisse, K., Borodovsky, A., Manoharan, M., Donahoe, J.S., Truelove, J., Nahrendorf, M., Langer, R., Anderson, D.G., Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery, *Nature Nanotechnology*, 7, 389–393, **2012**.
- [394] Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D., Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA, *Immunity*, 23, 165–175, **2005**.
- [395] Anderson, B.R., Muramatsu, H., Jha, B.K., Silverman, R.H., Weissman, D., Karikó, K., Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L, *Nucleic Acids Research*, 39, 9329–9338, **2011**.
- [396] Kariko, K., Muramatsu, H., Keller, J. M., Weissman, D., Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin, *Molecular Therapy*, 20, 948–953, **2012**.

- [397] Scholz, C., Wagner, E., Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: common and different tasks for synthetic carriers, *Journal of Controlled Release*, 161, 2, 554-565, **2012**.
- [398] Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., Bosserhoff, A.K., Efficient transfection method for primary cells, *Tissue Engineering*, 8, 2, 235-245, **2002**.
- [399] Davis, M.E., Non-viral gene delivery systems, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 128- 131, **2002**.
- [400] Jafari, M., Soltani, M., Naahidi, S., Karunaratne, D.N., Chen, P., Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery, *Current Medicinal Chemistry*, 19, 2, 197- 208, **2012**.
- [401] Santos, J.L., Pandita, D., Rodrigues, J., Pego, A.P., Granja, P.L., Tomas, H., Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration, *Current Gene Therapy*, 11, 1, 46-57, **2011**.
- [402] McMahan, J.M., Conroy, S., Lyons, M., Greiser, U., O'shea, C., Strappe, P., Howard, L., Murphy, M., Barry, F., O'Brien, T., Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors, *Stem Cells and Development*, 15, 1, 87-96, **2006**.
- [403] Raisin S., Belamie E., Morille M., Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage, *Biomaterials*, 104, 223- 237, **2016**.
- [404] del Solar, G., Espinosa, M., Plasmid copy number control: an ever-growing story, *Molecular Microbiology*, 37, 492–500, **2000**.
- [405] Mlynarczyk, S.K., Panning, B., X inactivation: Tsix and Xist as yin and yang, *Current Biology*, 10, 899-903, **2000**.
- [406] Ambros, V., MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing, *Cell*, 113, 673–676, **2003**.
- [407] Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116, 281–297, **2004**.
- [408] Lai, E.C., microRNAs: runts of the genome assert themselves, *Current Biology*, 13, 925–936, **2003**.
- [409] McManus, M.T., MicroRNAs and cancer, *Seminars of Cancer Biology*, 13, 253–258, **2003**.
- [410] Carrington, J.C., Ambros, V., Role of microRNAs in plant and animal development, *Science*, 301, 336–338, **2003**.
- [411] He, L., Hannon, G., MicroRNAs: SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION, *Nature Genetics*, 5, 522-531, **2004**.
- [412] Abbadessa, A., Mouser, V.H.M., Blokzijl, M.M., Gawlitta, D., Dhert, W.J.A., Hennink, W.E., Malda, J., Vermonden, T.A., Synthetic Thermosensitive Hydrogel for Cartilage Bioprinting and Its Biofunctionalization with Polysaccharides, *Biomacromolecules*, 17, 6, 2137-2147, **2016**.
- [413] Yue, K., Santiago, G.T., Alvarez, M.M., Tamayol, A., Annabi, N., Khademhosseini A., Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, *Biomaterials*, 73, 254-271, **2015**.
- [414] Koshy, S.T., Desai, R.M., Joly, P. , Li, J. , Bagrodia, R.K., Lewin, S.A., Joshi, N.S., Mooney, D. J., Click-Crosslinked Injectable Gelatin Hydrogels, *Advanced Healthcare Materials*, 5, 541-547, **2016**.
- [415] Deng, X., Cao, M., Zhang, J., Hu, K., Yin, Z., Zhou, Z., Xiao, X., Yang, Y., Sheng, W., Wu, Y., Zeng, Y., Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-

- delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer, *Biomaterials*, 35-14, 4333-4344, **2014**.
- [416] Elsayed, M., Corrand, V., Kolhatkar, V., Xie, Y., Kim, N.H., Kolhatkar, R., Merkel, O.M., Influence of Oligospermines Architecture on Their Suitability for siRNA Delivery, *Biomacromolecules*, 15, 4, 1299-1310, **2014**.
- [417] Howard, K.A., Rahbek, U.L., Liu, X., Damgaard, C.K, Glud, S.Z., Andersen, M., Hovgaard, M.B., Schmitz, A., Nyengaard, J.R., Besenbacher, F., Kjems, J., RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14, 4, 476-84, **2006**.
- [418] Fernandez-Piñeiro, I., Pensado, A., Badiola, I., Sanchez A., Development and characterisation of chondroitin sulfate- and hyaluronic acid-incorporated sorbitan ester nanoparticles as gene delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 125, 85-94, **2018**.
- [419] Livak, K., Schmittgen, T., Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nature Protocols*, 3, 1101–1108, **2008**.
- [420] Bryant, S.J., Davis-Arehart, K.A., Luo, N., Shoemaker, R.K., Arthur, J.A., Anseth, K.S., Synthesis and Characterization of Photopolymerized Multifunctional Hydrogels: Water-Soluble Poly(Vinyl Alcohol) and Chondroitin Sulfate Macromers for Chondrocyte Encapsulation, *Macromolecules*, 37, 6726-6733, **2004**.
- [421] Hoch, E., Hirth, T., Tovar, E.M., Borchers, K., Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 5675- 5685, **2013**.
- [422] Yang, B., Zhang, Y., Zhang, X., Tao, L., Li, S., Wei, Y., Facilely prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier, *Polymer Chemistry*, 12, 3235-3238, **2012**.
- [423] Wang, Z., Hu, J., Pan, Y., Shan, Y., Jiang, L., Qi, X., Jia, L., miR-140-5p/miR-149 Affects Chondrocyte Proliferation, Apoptosis, and Autophagy by Targeting FUT1 in Osteoarthritis, *Inflammation*, 41, 3, 959-971, **2018**.
- [424] Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., Murphy, J.M., Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components, *Experimental Cell Research*, 268, 189-200, **2001**.
- [425] Xu, J., Wang, W., Ludeman, M., Cheng, K., Hayami, T., Lotz, J.C., Kapila S., Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Alginate Gels, *Tissue Engineering Part A*, 14:5, 667-680, **2008**.
- [426] Nichol, J., Koshy, S.T., Bae, H., Hwang, C.H., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels, *Biomaterials*, 31- 21, **2010**.
- [427] Ma, Z, Nelson, D.M, Hong, Y, Wagner, W.R, A thermally responsive injectable hydrogel incorporating methacrylate-poly(lactide) for hydrolytic lability, *Biomacromolecules*, 11, 7, 1873-1881, **2010**.
- [428] Thota, C.K., Yadav, N., Chauhan, V.S., A novel highly stable and injectable hydrogel based on a conformationally restricted ultrashort peptide, *Scientific Reports*, 6:31167, **2016**.
- [429] Yan, S., Wang, T., Li, X., Jian, Y., Zhang, K., Lia, G., Yin, J., Fabrication of injectable hydrogels based on poly(L-glutamic acid) and chitosan, *RSC Advances*, 28 , 7, 17005–17019, **2017**.



- [430] Lum, L., Elisseff, J., Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering, Topics in Tissue Engineering (eds. Ashammakhi N., Ferretti P.), *Oulu University*, 1-25, **2003**.
- [431] Yan, C, Pochan, D.J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society reviews*, 39(9):3528-3540, **2010**.
- [432] Balakrishnan, B., Joshi, N., Jayakrishnan, A., Banerjee, R., Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration, *Acta Biomaterialia*, 10, 8, 3650-3663, **2014**.
- [433] Mandal, B.B., Priya, A.S., Kundu, S.C., Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications, *Acta Biomaterialia*, 5, 8, 3007-3020, **2009**.
- [434] Ulbrich, K., Strohalm, J., and Kopecek, J. Polymers containing enzymatically degradable bonds, *Biomaterials*, 3:150–154, **1982**.
- [435] Mooter, G.V., Samyn, C., Kinglet, R., The relation between swelling properties and enzymatic degradation of azo polymers designed for colon-specific drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Research*, 11:12, 1737–1741, **1994**.
- [436] Mahkam, M., Doostie, L., The Relation Between Swelling Properties and Cross-Linking of Hydrogels Designed for Colon-Specific Drug Delivery, *Drug Delivery*, 12:6, 343-347, **2005**.
- [437] Browning, M.B., Cereceres, S.N., Luong, P.T., Cosgriff-Hernandez, E.M., Determination of the in vivo degradation mechanism of PEGDA hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 102:4244, **2014**.
- [438] Lam, J., Kim, K., Lu, S., Tabata, Y., Scott, D.W., Mikos, A.G., Kasper, F.K., A factorial analysis of the combined effects of hydrogel fabrication parameters on the in vitro swelling and degradation of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 102:3477, **2014**.
- [439] Zhao, X., Lang, Q. Yildirimer, L., Lin, Z.Y., Cui, W., Annabi, N., Dokmeci, M.R., Ghaemmaghami, A.M., Khademhosseini, A., Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*, 5(1):108-118, **2016**.
- [440] Liao, J., Qu, Y., Chu, B., Zhang, X., Qian, Z., Biodegradable CSMA/PECA/ Graphene Porous Hybrid Scaffold for Cartilage Tissue Engineering, *Scientific Reports*, 5:09879, **2015**.
- [441] Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G.U., Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters, *Journal of Nanobiotechnology*, 12,5, **2014**.
- [442] McConnell, K.I., Shamsudeen, S., Meraz, I.M., Summers, H.D., Serda, R.E., Reduced Cationic Nanoparticle Cytotoxicity Based on Serum Masking of Surface Potential, *Journal of biomedical nanotechnology*, 12, 1, 154-164, **2016**.
- [443] Varkouhi, A.M., Scholte, M., Storm, G., Haisma, H.J., Endosomal escape pathways for delivery of biologicals, *Journal of Controlled Release*, 151, 3, 220-228, **2011**.
- [444] Ragelle, H., Vandermeulen, G., Pr at, V., Chitosan-based siRNA delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 172:1, 207-218, **2013**.
- [445] Huang, X., Huang, X., Gong, Y., Xiao, H., McClements, D.J., Hu, K., Enhancement of curcumin water dispersibility and antioxidant activity using

- core–shell protein–polysaccharide nanoparticles, *Food Research International*, 87, 1-9, **2016**.
- [446] Al-Qadi, S., Alatorre-Meda, M., Zaghloul, E.M., Taboada, P., Remunán-López, C., Chitosan–hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: The role of hyaluronic acid on the nanoparticles' formation and activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 615-623, **2013**.
- [447] Debele, T.A., Mekuria, S.L., Tsai, H., Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents, *Materials Science and Engineering: C*, 68, 964-981, **2016**.
- [448] Mohtashamian, S., Boddohi, S., Hosseinkhani, S., Preparation and optimization of self-assembled chondroitin sulfate-nisin nanogel based on quality by design concept, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, Part B, 2730-2739, **2018**.
- [449] Mou, J., Wu, Y., Bi, M., Qi, X., Yang, J., Polyanionic holothurian glycosaminoglycans-doxorubicin nanocomplex as a delivery system for anticancer drugs, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 167, 364-369, **2018**.
- [450] Pitarresi, G., Craparo, E.F., Palumbo, F.S., Carlisi, B., Giammona, G., Composite Nanoparticles Based on Hyaluronic Acid Chemically Cross-Linked with  $\alpha,\beta$ -Polyaspartylhydrazide, *Biomacromolecules*, 8, 6, 1890-1898, **2007**.
- [451] López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-González, D., Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior, *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 2, 344-351, **2005**.
- [452] Radhakrishnan, J., Subramanian, A., Sethuraman, S., Injectable glycosaminoglycan–protein nano-complex in semi-interpenetrating networks: A biphasic hydrogel for hyaline cartilage regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 175, 63-74, **2017**.
- [453] Leong, D.S.Z., Tan, J.G.L., Chin, C.L., Mak, S.Y., Ho, Y.S., Ng, S.K., Evaluation and use of disaccharides as energy source in protein-free mammalian cell cultures, *Scientific Reports*, 7, 45216, **2017**.
- [454] Hamid, A.A., Idrus, R.B.H., Saim, A.B., Sathappan, S., Chua, K.H., Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation, *Clinics*, 67, 2, 99-106, **2012**.
- [455] Garza-Veloz, I., Romero-Diaz, V.J., Martinez-Fierro, M.L., Rojas-Martinez, A., Analyses of chondrogenic induction of adipose mesenchymal stem cells by combined co-stimulation mediated by adenoviral gene transfer, *Arthritis Research & Therapy*, 15, 4, 80, **2013**.
- [456] Park, J.S., Yang, H.J., Woo, D. G., Yang, H. N., Na, K. and Park, K., Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells embedded in a scaffold by long-term release of TGF- $\beta$ 3 complexed with chondroitin sulfate, *Journal of Biomedical Materials Research*, 92A: 806-816, **2010**.
- [457] Somoza, R.A., Welter, J.F., Correa, D., Caplan, A.I., Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations, *Tissue Engineering Part B, Reviews*, 20, 6, 596-608, **2014**.
- [458] Varghese, S., Hwang, N.S., Canver, A.C., Theprungsirikul, P., Lin, D.W., Elisseff, J., Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Matrix Biology*, 27, 1, 11-21, **2008**.

- [459] Takács, R., Matta, C., Somogyi, C., Juhász, T., Zákány, R., Comparative Analysis of Osteogenic /Chondrogenic Differentiation Potential in Primary Limb Bud-Derived and C3H10T1/2 Cell Line-Based Mouse Micromass Cultures, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 8, 16141-16167, **2013**.
- [460] Caliarì, S.R., Burdick, J.A., A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture, *Nature methods*, 13, 5, 405-414, **2016**.
- [461] Jerosch, J., Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids, *International Journal of Rheumatology*, 2011:969012, **2011**.
- [462] Yu, D.A., Han, J., Kim, B.S., Stimulation of Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, *International Journal of Stem Cells*, 5, 1, 16-22, **2012**.
- [463] Estes, B.T., Guilak, F., Three-dimensional Culture Systems to Induce Chondrogenesis of Adipose-Derived Stem Cells, *Methods in molecular biology*, 702:201-217, **2011**.
- [464] Jin, H.Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A.V., Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution, *Frontiers in Genetics*, 6:340, **2015**.
- [465] Vega, V.L., Charles, W., De Maio, A., A new feature of the stress response: increase in endocytosis mediated by Hsp70, *Cell Stress & Chaperones*, 15, 5, 517-527, **2010**.
- [466] Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G., Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database, *Altex*, 27, 53-63, **2010**.
- [467] Doddaballapur, A., Michalik, K.M., Manavski, Y., Lucas, T., Houtkooper, R.H., You, X., Chen, W., Zeiher, A.M., Potente, M., Dimmeler, S., Boon, R.A., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35, 137–145, **2014**.
- [468] Henry, S.P., Liang, S., Akdemir, K.C., de Crombrughe, B., The Postnatal Role of Sox9 in Cartilage, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 27, 12, 2511-2525, **2012**.
- [469] Haleem-Smith, H., Calderon, R., Song, Y., Tuan, R.S., Chen, F.H., Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 1245-1252, **2012**.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Ekin Çelik

Doğum Yeri: Elazığ

Medeni Hali: Bekâr

E-posta: [ekince10@hacettepe.edu.tr](mailto:ekince10@hacettepe.edu.tr)

Adresi: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı

### Eğitim:

**Lisans:** Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2010

**Yüksek Lisans:** Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

### Yabancı Dil ve Düzeyi

**İngilizce:** çok iyi

**YÖKDİL:** 93,75 (2018)

### İş deneyimi

- Araştırma Görevlisi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, görev. Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, 2013-

- Araştırma görevlisi, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, 2015-2018.

### Deneyim Alanları

Yeni Nesil DNA/RNA/kısa zincirli RNA dizileme, PCR teknolojileri, DNA/RNA izolasyonu, doku mühendisliği, nanopartikül sentezi, hidrojel sentezi

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
~~FÜKSEK LİSANS~~/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
...Biyomühendislik.... ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 24/09/2018

Tez Başlığı / Konusu: .....Dejeneratif Kıkırdak Hasarlarına Yönelik Enjekte Edilebilir Hidrojel Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu .....

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam .....109..... sayfalık kısmına ilişkin, ...21.../...09.../...2018..... tarihinde ~~2018~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % ...1.. 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~2018~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

  
2.10.2018  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Ekin Çelik

Öğrenci No: N13146781

Anabilim Dalı: Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı

Programı:

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.



Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

(Unvan, Ad Soyad, İmza)