

# Enjekte Edilebilir ve Doğ al Humik Asit/Agaroz Hibrit Hidrojel Lokalize Işıkla Çalışan Fototermal Ablasyon ve Kanser Kemoterapisi

Mengmeng Hou,<sup>†,‡</sup> Ruihao Yang,<sup>†,‡</sup> Lei Zhang,<sup>§</sup> Leiyang Zhang,<sup>†</sup> Gang Liu,<sup>†</sup> Zhigang Xu,<sup>†,‡</sup> Yuejun Kang,<sup>\*,†,‡,§</sup> ve Peng Xue<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>†</sup> Temiz Enerji ve Gelişmiş Malzemeler Enstitüsü Malzeme ve Enerji Fakültesi, Southwest Üniversitesi, Chongqing 400715, Çin

<sup>‡</sup> Chongqing Mikro-Nano Biyomedikal Malzemeler ve Cihazlar için Mühendislik Araştırma Merkezi, Chongqing 400715, Çin

<sup>§</sup> İ pekboceği Genom Biyolojisi Eyalet Anahtar Laboratuvarı, Southwest Üniversitesi, Chongqing 400716, Çin

## Destekleyici Bilgiler

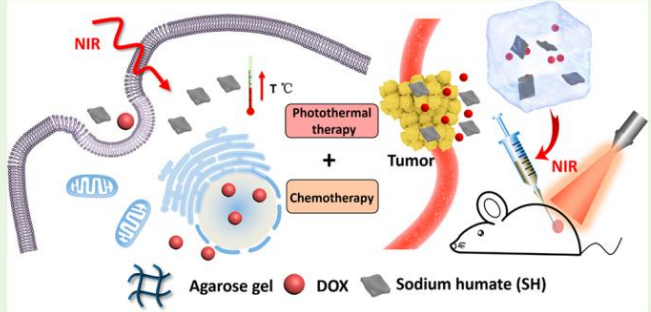
**ÖZET:** Teranostik ilaç yüklühidrojellerin deri altı tümörlere enjeksiyonunun kesin lokal tümör eradikasyonu sağ lamak için umut verici bir strateji olduğu u kanıtlanmıştır. Hayvan ve bitki kalıntılarının biyokimyasal ayrışmasının doğ al bir ürünolan humik asit, toprakta, turbalarda, okyanuslarda vb. bol miktarda bulunur. Bu çalışmada, sodyum humat (SH) ve doksorubisin (DOX) içeren sağ lam, enjekte edilebilir, ısıya duyarlı bir agaroz hidrojel inşa edildi. birleşik kemo-foto termal terapötik etkiye dayalı tümör yönetimi için benzersiz bir ajan. Yakın kızılötesi (NIR) ışığı ı güç lübir şekilde emen SH, ışık enerjisini verimli bir şekilde termal enerjiye dönüştürebilir, yerel hipertermiyi indükleyebilir ve ardından tipik bir jel-sol geç işi yoluyla SH/DOX@hidrojel kompleksinden sürekli ilaç salımını tetikleyebilir; terapötik ilaç ların gelişmiş hücresel alımı. Ayrıca SH/DOX@hidrojelin intratümöral enjeksiyonu, NIR lazer ışınması altında katı tümörlere karşı eş zamanlı bir kemo-fototermal terapötik etki ile sonuçlanmıştır, bu da tümörün tekrarını topluca önleyebilir. Ek olarak SH/DOX@hidrojel, bir hayvan modeli kullanılarak gösterildiği gibi ultra düşük sistemik toksisite sergiledi. Bu çalışma, kanser veya diğ er kritik hastalıkların tedavisi için gelişmiş bir platform olarak ekstra teranostik modülleri de içerebilen, kesin tümör tedavisi için düşük maliyetli, ışığı a duyarlı bir hidrojel geliştirmek için umut verici bir girişim sağ lar.

**ANAHTAR KELİ MELER:** humik asit, agaroz hidrojel, doksorubisin, fototermal terapi, kemoterapi

## GİRİŞ

Kanser şu anda küresel olarak birincil sağ lık sorunudur ve insan sağ lığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.<sup>1</sup> Cerrahi eksizyon genellikle kanama, potansiyel enfeksiyonlar ve ameliyattan sonra yüksek nüks oranının eşlik ettiği katı tümörlerin geleneksel tedavisi için standardize edilmiştir.<sup>2</sup> Alternatif olarak, yaygın kemoterapi ve radyoterapi modaliteleri, özellikle orta ve geç dönemler için düşük terapötik etkinlikten muzdariptir. katı tümörlerin tam olarak yok edilememesi nedeniyle evre tümörler.<sup>3</sup> Ayrıca, kemoterapötik ilaç ların veya radyoaktif maruziyetlerin zayıf seçiciliği i nedeniyle bu tedaviler sırasında istenmeyen komplikasyonlar ve yan etkiler ortaya çıkabilir.<sup>4</sup> Bu nedenle, tümör özgüllüğü yüksek etkinlik, ve minimal olumsuz etkiler, klinik uygulama için acil talep görmektedir.

İ ntravenöz (iv) enjeksiyon gibi sistemik yöntemlerle karşılaştırıldığı nda, lokalize terapötik yaklaşımlar, yukarıda belirtilen zorlukların üstesinden gelmek için çekicidir.



sürekli ilaç salımını kontrol eder, ancak aynı zamanda normal dokulara sistematik toksisiteyi azaltmak için dolaşım sisteminden de kaçınır.<sup>5,6</sup> Polimerlerin parçalanmasıyla tetiklenebilecek, tümörlere lokalize ilaç salımını sağ lamak için polimer bazlı kemoterapötik platformların tasarlanması için önemli ç abalar sarf edilmiştir. <sup>7-10</sup> Fiziyojik doku ortamlarını taklit eden oldukça organize üç boyutlu ağ lara sahip enjekte edilebilir hidrojeller, terapötik maddelerin yerinde verilmesi gibi rejeneratif tıp alanında artan uygulamalar bulmuştur.<sup>11,12</sup> Yüksek su içeriği i, esneklik, biyolojik olarak parçalanabilirlik ile polimerik hidrojeller ve biyoyumluluk, ilaç ların farmasötik aktivitesinin korunmasına yardımcı olur ve ilaç salımını kolaylaştırır. Önceki raporlar, canlı <sup>13-15</sup> kemoterapötik ilaç ların, fonksiyonel proteinlerin kapsülmesini göstermiştir.

Geliş tarihi: 20 Eylül 2018  
Kabul tarihi: 8 Ekim 2018  
Yayın tarihi: 8 Ekim 2018

ve nükleik asitleri tümör büyümesini bastırmak, metastazı önlemek ve kanserin tekrarlama oranını azaltmak için enjekte edilebilir hidrojellere dönüştürülmüştür.16-18 Bununla birlikte, bu terapötik ajanların hidrojellerden salınma oranı etkili bir şekilde kontrol edilememekte ve bu da nükleik asitlerin yetersiz biyoyararlanımı nedeniyle tedavi etkinliğinin azalmasına yol açmaktadır. ilaçlar ve kanser hücrelerinin ilaç direncini indüklemeye.19 Bu nedenle, işlevselleştirilmiş hidrojel sistemlerinin geliştirilmesi, tek adımlı lokal enjeksiyona dayalı ilaçların kontrollü salımını sağlamak ve böylece kanser tedavisinde terapötik etkiyi ve hasta uyumunu iyileştirmek için rasyonel bir stratejidir.

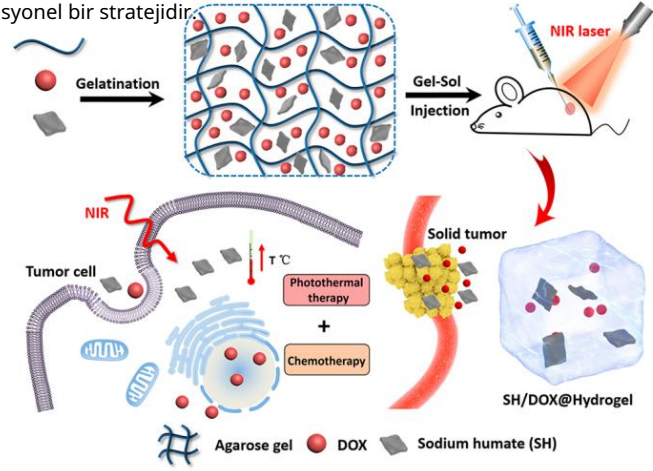
ışığa duyarlı hidrojeller, geniş çapta mevcudiyetleri ve optik uyarıların invazif olmaması nedeniyle kontrollü ilaç salımı için umut vaat eden adaylardır.20,21 Hidrojellerin ışıkla indüklenen faz geçişi genellikle sıcaklık değişimini altında tersine çevrilebilir; sadece ışık uyarısını ayarlamak. Örneğin, ilaç salım hızı, lazer dalga boyu, güç yoğunluğu ve maruz kalma süresi dahil olmak üzere birden çok optik parametreyi uzaktan kontrol ederek ayarlanabilir. MoS<sub>2</sub>'nin inorganik nanoyapıları, altın ve bakır kalkojenid<sup>22-24</sup> ve polianilin, polipirol, karbon nanotüpler ve grafen analoglarının organik nanokompozitleri<sup>25-28</sup> gibi birçok fototermal dönüştürücü ajan (PTA) yaygın olarak kullanılmış ve etkileyici ışık-yüksek fototermal dönüşüm verimliliği nedeniyle duyarlı özellikler. Bununla birlikte, bu ajanların çoğu, zayıf biyoyumluluk, bozunmazlık veya istenmeyen sitotoksites nedeniyle klinik uygulamalar için hala optimal özelliklere sahip değildir.29,30 Ayrıca, birçok nanomaterial, hidrojellerde kapsülendiğinde topaklaşmaya eğilimlidir, bu da ışık saçılmasına ve dolayısıyla olumsuz olarak indirgenmeye neden olabilir. fototermal dönüşüm verimliliği.31 Bu nedenle, yeni hidrojel dostu PTA'ların geliştirilmesi, hidrojel bazlı lokalize tümör tedavisinden tam olarak yararlanmak için çok önemlidir.

Hayvan ve bitki kalıntılarının mikrobiyolojik bozunmasından elde edilen doğal bir organik karbon kaynağı olan humik asit (HA), yakın kızılötesi (NIR) dönüştürme konusundaki olağanüstü yeteneğinden yararlanarak fototermal terapi (PTT) ve fotoakustik görüntüleme için teranostik uygulamalar bulmuştur. Işık enerjisi.32 HA, dünyadaki tüm karbon kaynaklarının neredeyse yarısını oluşturur ve çevre, tarım, ilaç ve enerji uygulamaları için yaygın olarak kullanılmaktadır.33-36 Daha da önemlisi, HA, çok çeşitli canlı organizmalar için minimum düzeyde biyolojik tehlike arz eder.32 HA ayrıca, fototermal dönüşüm verimliliğini koruyan ve lazer ışınması ile tetiklenen tutarlı bir fototermal etki oluşturan mükemmel dağılıma sahip küçük moleküller biçiminde de bulunur. HA'nın başlıca avantajları arasında bolluk, düşük maliyet ve yüksek biyoyumluluk yer alır ve bu da onu sağlıklı uygulamaları için çok yönlü bir malzeme haline getirir. Bununla birlikte, eşsiz boyut aralığı nedeniyle artan geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisiyle HA, tümör bölgesinde kendiliğinden zenginleştirilemez. Bu nedenle, HA'nın teranostik uygulamaları, tümör içi enjeksiyon ile lokal tedavi için daha uygun olabilir.

HA'nın bir tuz türevi olan sodyum humat (SH), benzer fototermal özelliklerini korurken HA'dan çok daha yüksek çözünürlük sergiler. Bununla birlikte, bildiğimiz kadarıyla, NIR ışıkla indüklenen ilaç dağıtım platformlarının inşası için SH kapsülhidrojeller hakkında araştırma eksikliği vardır.

FDA onaylı biyoyumlu bir polisakarit olarak agaroz, deniz yosunları gibi bol miktarda agar kaynaklarından saflaştırılmış lineer galaktanın bir hidrokolloididir.37 Düşük erime noktalı agaroz 65,5 °C'de erir ve 25 °C'nin altına soğutulduğunda jelleşir.

Doksorubisin (DOX), bir Gıda ve İlaç Kurumu- (FDA) onaylı antitümör ilacı, metastatik yumuşak doku sarkomu için altın standart birinci basamak kemoterapi olarak hizmet eder.38 Agarozun sıcaklığa duyarlı faz geçişinin bir benzersiz özelliği olarak dayanarak, SH ve agaroz jeli içeren ve fototermal ablasyon ve kanser kemoterapisi için DOX ile yüklenebilir SH/DOX@hidrojel adlı bir kompozit sistemi rapor ediyoruz (Şekil 1). Bu enjekte edilebilir ve faz



Şekil 1. Kemoterapötiklerin kontrollü salımına ve NIR lazer ışınmasıyla tetiklenen lokal fototermal ablasyona dayalı olarak SH/DOX@hidrojelin tümör baskılama için çalışma mekanizmasının şematik gösterimi.

değiştirilebilir hidrojel, NIR ışığına maruz kalma altında antikanser ilaçların salım kinetiklerini modüle etmek için kullanılabilir. Bir PTA olan SH, hidrojel matrisinin yerel sıcaklığını yükseltmek için ışık enerjisini termal enerjiye dönüştürebilir. Daha sonra, agaroz hidrojel yumuşar ve geri dönüşümlü hidrolize uğrar, bu da matristen çevreye kontrol edilebilir ilaç nüfuzu ile sonuçlanır. Bu talep üzerine ilaç salım mekanizması, ilacın doruk miktarının terapötik pencere içinde salınmasını sağlamak için doğru rusal olmayan farmakokinetiği olan ilaçların yönetimi için kritik öneme sahiptir. Bu arada, tümör ablasyonu, ışıkla indüklenen fototermal etkilerle lokal olarak geliştirilebilir. DOX ve SH'nin potansiyel yan etkileri, hidrojelin doğru ruda dolaşım sistemine girmeden tümör bölgesinde tutulmasıyla en aza indirilir.

Daha da önemlisi, hidrojel, lazer ışınması altında hidrolizden sonra üriner sistem yoluyla atılabilen oligomerlere dönüşebilir. Genel olarak, bu çalışma, in situ kanserin birleşik kemo-fototermal tedavisi için biyoyumlu bir hidrojel ve bir kemoterapötik ilaçla birleştirilmiş bir humik asit türevinin antikanser uygulamasını göstermektedir.

## DENEYSEL BÖLÜM

Malzemeler. Humik asit, sodyum tuzu (sodyum humat, SH), düşük erime noktalı agaroz tozu, dimetil sülfoksit (DMSO) ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT, %98, Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology'den (Çin) temin edildi. Fosfat tamponlu salin (PBS), penisilin/streptomisin karışımı, Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (DMEM), fetal sıçır serumu (FBS), TrypLE Express enzimi, Calcein AM, 4',6-diamidino 2-Phenylindol (DAPI) ve propidyum iyodür (PI) Thermo Fisher Scientific'ten (ABD) elde edildi. Doksorubisin hidroklorür (DOX-HCl), Hua Feng United Technology Reagent'tan (Çin) satın alındı. One Step TUNEL Apoptosis Assay

Beoytime Biotechnology'den (Çin) satın alınmıştır. Deiyonize (DI) su (18.2 MΩ·cm), Milli-Q Synthesis A10 su arıtma sistemi (Molsheim, Fransa) kullanılarak saflaştırıldı.

SH/DOX@hidrojel hazırlanması. Kısaca, 500 mg SH, 60 mL DI su içinde çözündürüldü çözünmeyen kalıntıları çıkarmak için 12 000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. SH içeren süpernatant, küçük molekülleri uzaklaştırmak için DI su içinde 3 gün diyaliz edildi. Daha sonra saflaştırılan SH solüsyonu, sıvı nitrojen içinde hızla donduruldu ve tekrar tekrar kurutulmuş siyah SH tozları elde edildi. SH/DOX işlevselleştirilmiş hidrojel hazırlamak için, önce 100 mg düşük erime noktalı agaroz, 10 mg saflaştırılmış SH tozu ve 5 mg DOX'un DI su (10 mL) içinde çözülmesiyle heterojen bir karışım hazırlandı. Agaroz karışımı daha sonra homojen bir çözümlü oluşturmak için bir mikrodalgada fırında eritildi. SH/DOX@hidrojel, önceki çözümlü oda sıcaklığına soğutulmasından sonra nihayet elde edildi. SH/DOX@hidrojeldeki her bir bileşenin içeriği, özel olarak belirtilmedikçe sonraki çalışmalar için sabit kaldı.

SH ve SH/DOX@hidrojelin karakterizasyonu. SH ve SH/DOX@hidrojellerin varlığı, bir Nikon D810 dijital kamera kullanılarak görüntüledi. SH'nin elementleri ve mikro yapısı, enerji dağılımlı spektroskopisi (EDS) spektrum haritalaması ve alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu (FESEM, JSM-7800F, ZEISS, Almanya) kullanılarak analiz edildi. SH'nin mikro yapısını analiz etmek için numune tutucuya damla damla 10 µL SH dispersiyonu (etanol içinde 500 µg mL<sup>-1</sup>) eklendi, havayla kurutuldu ve 90 s platinle piskürtüldü SH'nin X-ışını kırınım (XRD) paterni elde edildi ve bir X-ışını kırınım ölçeri (XRD-7000, Shimadzu, Japonya) kullanılarak analiz edildi. SH'nin UV-vis-NIR absorpsiyon spektrumu, bir UV-vis spektrofotometre (UV-1800, Shimadzu, Japonya) ile karakterize edildi. SH/DOX@hidrojellerin (%0,5, %1 veya %2 agarozdan hazırlanmış) dinamik reolojik testi, bir DHR-1 sıcaklık kontrollü reometre (TA Instruments, ABD) kullanılarak 1 Hz frekansta gerçekleştirildi. Numuneler, 40 mm paralel plakalar arasında 1 mm'lik bir boşluğa yerleştirildi ve sıfır normal kuvvet olana kadar gevşetildi. Dinamik sıcaklık taramaları, SH ve SH/DOX@hidrojelin Fototermal Özellikleri min-1 3 °C'lik bir artış oranıyla 30 ila 60 °C arasında değerlendirildi.

SH'nin fototermal özelliklerini değerlendirmek için, çeşitli konsantrasyonlarda 3 mL SH sulu dispersiyonu içeren bir kuvars tüp, 10 dakika boyunca NIR lazer ışınımına (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) tabi tutuldu.

Lazer ışınlanması sırasında, yerel sıcaklık ve gerçek zamanlı termal görüntüler, bir kızılötesi görüntüleme kamerası (TiS55, Fluke) kullanılarak dinamik olarak izlendi. Hazırlanmış şekliyle SH/DOX@hidrojelin in vitro performansı, aynı NIR lazeri ile 10 dakika süreyle sürekli ışınlama yoluyla analiz edildi. Sıcaklık değeri ve karşılık gelen termal görüntüler, aynı kızılötesi görüntüleme kamerası tarafından izlendi.

NIR Işık Kontrollü DOX In Vitro Sürümü Kuvars küvete 1 mililitre SH/DOX/ agaroz karışımı eklendi. Ardından, bölüm 2.2'de açıklanan jelatinleştirme tekniğiyle yerinde küvetin dibinde SH/DOX oluşturuldu. SH/DOX@hidrojel oluşumu üzerine kuvars tüpe 1 mL DI su ilave edildi. Ardından, SH/DOX@hidrojel belirlenmiş bir süre boyunca NIR lazer ışınlamasına (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) tabi tutuldu ve bu sırada salınan DOX, floresan spektroskopisi kullanılarak ölçüldü Spesifik olarak, periyodik lazer ışınması 50 dakika boyunca 5 dakika maruz kalma (AÇIK) ve ardından 5 dakika herhangi bir aydınlatma olmadan (KAPALI) gerçekleştirildi. Her 5 dakikada bir, salınan ortamından 200 µL örnek alındı ve eşdeğer hacimde taze ortam ile dolduruldu. Serbest bırakılan DOX, bir mikropilaka okuyucu (uyarma, 485 nm; emisyon, 525 nm; SPARK 10M, TECAN) kullanılarak bir konsantrasyon-floresan standart eğrisine göre hesaplandı. SH/DOX@hidrojelin sıcaklık yükselmesi, bir kızılötesi termal görüntüleme kamerası kullanılarak sürekli olarak kaydedildi.

Bozulma Davranışı. SH/DOX@hidrojelin şişme davranışı ve ağırlık kaybı, kuru SH/DOX@hidrojelin 37 veya 60 °C'de PBS'ye (pH 7.4 veya 5.0) daldırılmasıyla incelenmiştir. Şişmiş hidrojelilerin ağırlığı zamanla izlendi. Daha sonra hidrojel şişme oranı, hidratlı hidrojel ağırlığının kuru hidrojel ağırlığına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Kilo kaybını belirlemek için,

hidrojel önceden belirlenen zamanda toplandı ve ardından dondurularak kurutuldu. Ağırlık kaybı, dondurularak kurutulmuş hidrojel ağırlığının hidrojel başlangıçtaki kuru ağırlığıyla karşılaştırılmasıyla ölçüldü.

In Vitro Hüresel Alım. DOX'un hüresel alım etkinliği, akış sitometrisi ve konfokal lazer tarama mikroskopu (CLSM) kullanılarak analiz edildi. HeLa veya 4T1 hücreleri, oyuk başına 1 x 10<sup>5</sup> hücre yoğunluğunda 12 oyuklu plakalarda kültürlendi. On iki saat sonra, hücreler 100 µL SH/DOX@hidrojel ile inkübe edildi ve daha sonra 5 dakika boyunca NIR lazer ışınlamasına (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) tabi tutuldu. 0.5 veya 2 saat daha inkübasyondan sonra hücreler, 20 dakika süreyle %4 paraformaldehit ile sabitlendi. Hücre zarının geçirgenliğini arttırmak için hücreler, 5 dakika boyunca Triton X-100 (1 x PBS içinde %0.1, v/v) ile muamele edildi. Daha sonra, hücreleri 30 dakika bloke etmek için 400 µL BSA (1 x PBS içinde %1, w/v) kullanıldı. Floresan boyama için hücreler, sırasıyla filamentli aktin (F-aktin) ve çekirdekleri boyamak için 1 saat Alexa Fluor 633 phalloidin (20 nM) ve 5 dakika DAPI (1 µg mL<sup>-1</sup>) ile muamele edildi, ardından konfokal mikroskop görüntüleme (LSM 800, Carl Zeiss, Almanya).

DOX'un hüresel alımı, akış sitometrisi kullanılarak ayrıca araştırıldı. Kısaca, genişletilmiş 4T1 veya HeLa hücreleri, 100 µL SH/DOX@hidrojel ile işlendi ve 5 dakika boyunca NIR lazer ışınlamasına (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) tabi tutuldu. 0.5 veya 2 saat daha inkübasyondan sonra, hücreler tripsinize edildi, santrifüjlendi ve 1x PBS içinde yeniden süspansiyon edildi. DOX'un tek tek hücrelerden floresan emisyonunun yoğunluğu, bir akış sitometrisi (NovoCyte, ACEA Biosciences, ABD) kullanılarak kaydedildi ve elde edilen veriler, FlowJo v10 kullanılarak analiz edildi.

In Vitro Biyouyumluluk ve Hemouyumluluk. SH ve SH/DOX'un biyouyumluluğunu değerlendirmek için L929 fibroblastları veya insan göbük damarı endotel hücreleri (HUVEC'ler), gece boyunca 96 oyuklu plakalarda (oyuk başına 1 x 10<sup>4</sup>) kültürlendi. Ortam daha sonra SH (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg mL<sup>-1</sup>) veya 50 µL SH@hidrojel (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg mL<sup>-1</sup>) içeren 200 µL taze kültür ortamı ile değiştirildi (-1). 24 saat daha kültürlendikten sonra, SH veya SH@hidrojel içeren eski ortam atıldı ve hücreler, 1 x PBS ile iyice durulandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 0,5 mg mL<sup>-1</sup> MTT ajanı içeren 200 µL solüsyon eklendi. 4 saatlik inkübasyondan sonra süpernatant çıkarıldı ve her bir oyukta 200 µL DMSO ilave edildi. Her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD), bir mikropilaka okuyucusunda (SPARK 10M, TECAN) 490 ve 630 nm'de belirlendi. Her oyuktaki hücre canlılığı, aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$\text{hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{OD}_{490\text{nm}}^{\text{deney}} - \text{OD}_{490\text{nm}}^{\text{kontrol}}}{\text{OD}_{490\text{nm}}^{\text{deney}} - \text{OD}_{490\text{nm}}^{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (1)$$

SH ve SH@hidrojellerin hemouyumluluğunu değerlendirmek için bir hemoliz deneyi yapıldı. Eritrositler önce tam fare kanından 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjleme ile izole edildi ve PBS ile daha da saflaştırıldı. Daha sonra 0,5 mL eritrosit (%4, v/v), çeşitli konsantrasyonlarda (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 ve 2 mg mL<sup>-1</sup>) 1 x PBS içinde dağıtılmış 0,5 mL SH ile karıştırıldı.

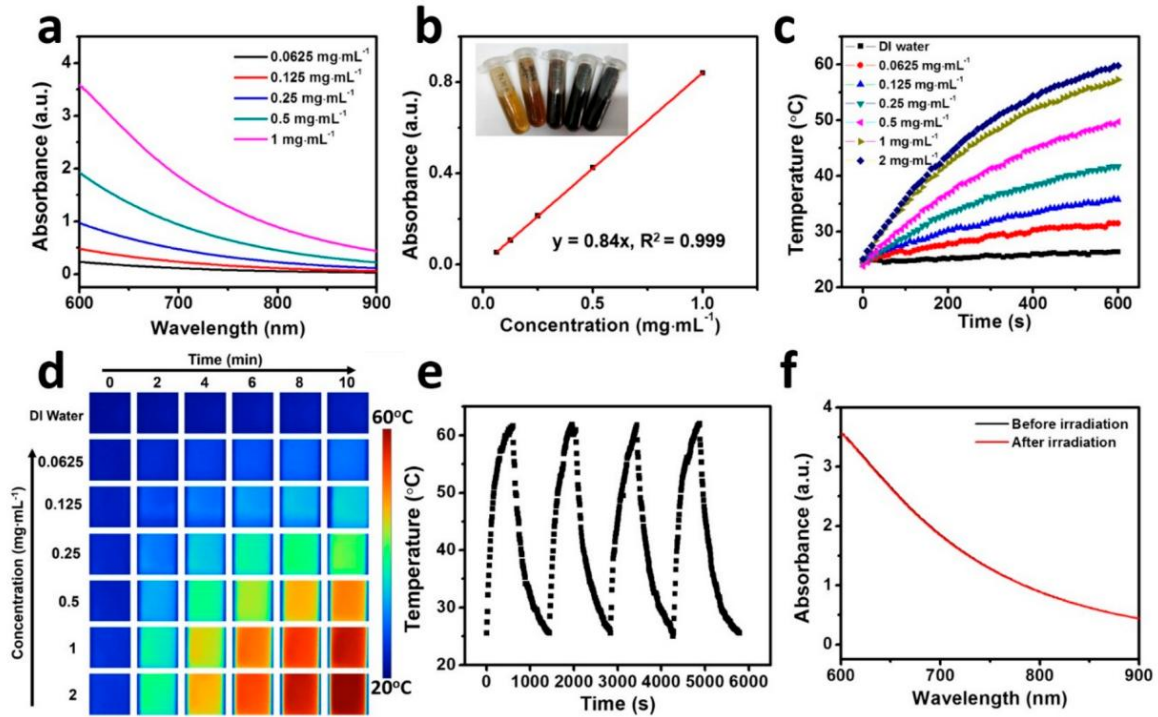
DI su ve 1 x PBS içinde inkübe edilen eritrositler, sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak çalıştı. 37 °C'de 4 saatlik inkübasyonun ardından karışım, 10 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant daha sonra toplandı ve ardından 570 nm'de optik absorbans yoğunluğu ölçüldü Hemoliz oranı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$\text{hemoliz (\%)} = \frac{\text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{deney}} - \text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{negatif}}}{\text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{deney}} - \text{Abs}_{570\text{nm}}^{\text{negatif}}} \times 100 \quad (2)$$

Abssample, Abspozitif ve Absnegatif, sırasıyla numunenin, pozitif kontrolün ve negatif kontrolün optik absorbanslarıdır.

In Vitro Sitotoksitesite. 4T1 murin meme kansinomu hücreleri ve HeLa insan epiteloid serviks kansinomu hücreleri, in vitro sitotoksitesite çalışması için seçildi. SH/DOX@hidrojelin lokalize ışıkla indüklenen toksitesitesini araştırmak için, 50 µL SH@hidrojel ve 50 µL SH/DOX@hidrojel, önce daha önce belirtilenlere dayalı olarak 96 oyuklu bir hücre kültürü plakasında hazırlandı. Jelatinleştirme yaklaşımı. 4T1 veya HeLa hücreleri (oyuk başına 1 x 10<sup>5</sup> hücre) ekilmiştir.





Şekil 2. (a) Çeşitli konsantrasyonlarda SH çözeltilerinin Vis-NIR spektrumları; (b) SH konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak 808 nm'de SH çözeltilerinin absorptans yoğunluğunun uydurma eğrisi; (c) 10 dakika boyunca NIR lazer (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) ışınlaması altında SH çözeltilerinin sıcaklık yükselmesi; (d) 0-10 dakika boyunca NIR lazer ışınlamasından sonra SH çözeltileri içeren küvetlerin kızılötesi termografik haritaları; (e) periyodik lazer ışınlaması altında bir SH çözeltilisinin (2 mg mL<sup>-1</sup>) sıcaklık değişimi (lazer açık: her döngü için 10 dakika); ve (f) bir SH çözeltilisinin (1 mg mL<sup>-1</sup>) vis-NIR spektrumu, dört döngü için lazer ışınımından önce ve sonra.

12 oyuklu bir plakaya ve 24 saat kütrlendi. Daha sonra, hazırlanan hidrojel veya serbest DOX (25 µg), 4T1 veya HeLa hücreleri ile yüklenen oyuklara aktarıldı. Fonksiyonel ile kaplı hücreler

hidrojel çeşitli işlemlere tabi tutuldu (grup 1: tedavi yok; grup 2: lazer açık; grup 3: SH@hidrojel; grup 4: SH@hidrojel artı lazer; grup 5: DOX; grup 6: DOX artı lazer; grup 7: SH/DOX@hidrojel; grup 8: SH/DOX@hidrojel artı lazer), ardından 4 saat daha inkübasyon. Grup 2, 4, 6 ve 8'de 5 dakika NIR lazer ışınlaması yapıldı. Daha sonra jel çıkarıldı ve hücreler 1x PBS ile nazikçe yıkandı.

Canlı/ölüyaşayabilirlik/sitotoksitesite kitiyle floresan boyamadan sonra, hücreler bir floresan mikroskopu (IX73, Olympus, Japonya) kullanılarak gözlemlendi. Hücre canlılığı, bir MTT canlılık tahlili kullanılarak hesaplandı. İlk olarak, 96 oyuklu bir plaka içinde kütrlenen hücreler (oyuk başına 1 x 10<sup>4</sup> hücre) aynı işlemlere tabi tutuldu. Daha sonra eski besiyeri, DMEM'de 200 µL MTT solüsyonu (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) ile değiştirildi. 4 saat sonra, süpernatant aspire edildi ve her oyukta 200 µL DMSO ilave edildi. Kütr, 490 ve 630 nm'de bir mikropilaka okuyucu (SPARK 10 M, TECAN) kullanılarak optik absorptans kaydedilmeden önce 15 dakika hafifçe çalkalandı. Hücre canlılığı, eq 1'e göre belirlendi.

Apoptoz Tahlili. Hiperterminin neden olduğu 4T1 ve HeLa hücrelerinin apoptozisi, annexin V Alexa Fluor 488 ve PI içeren bir ölü hücre apoptoz kiti kullanılarak değerlendirildi. İlk olarak, hücreler 96 oyuklu bir plaka içinde kütrlendi (oyuk başına 1 x 10<sup>4</sup> hücre). 12 saatlik kütrden sonra hücreler, NIR lazer ışınlaması olsun ya da olmasın 1 x PBS ve SH@hidrojel (200 µL, 1 mg mL<sup>-1</sup>) ile muamele edildi. 12 saat sonra hücreler, tripsinize edildi ve 1 x PBS içerisinde yeniden süspansiyon edildi. Son olarak hücreler, 15 dakika boyunca Alexa Fluor 488 annexin V-FITC ve PI ile birlikte boyandı. Akış sitometrisi analizinden önce tedarikçinin protokolünü takip ederek.

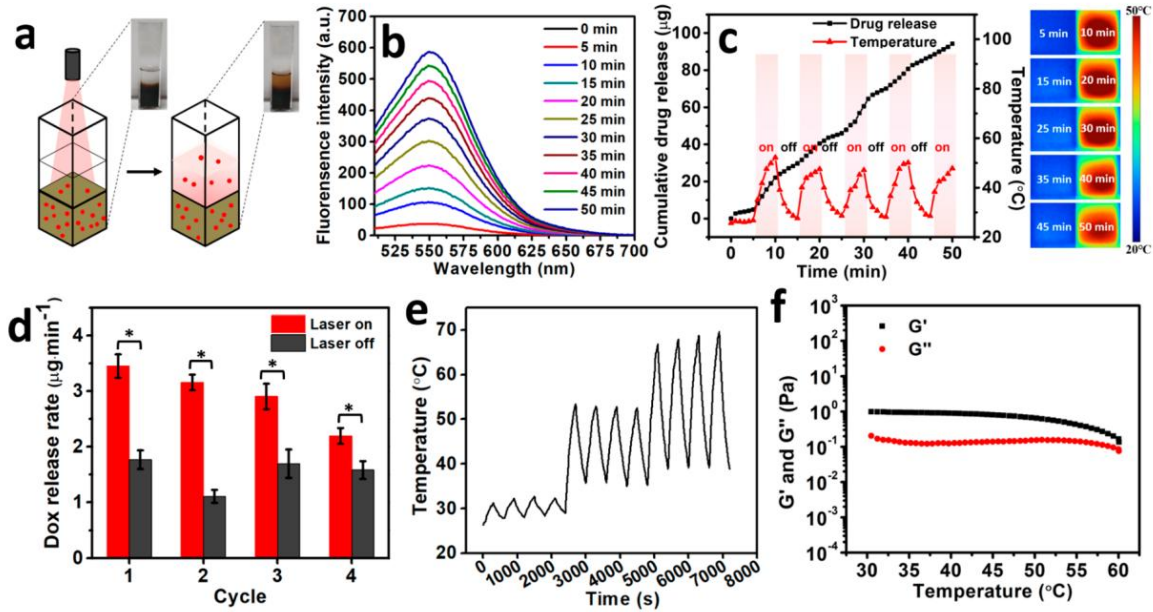
In Vivo Tümör Modeli. BALB/c fareleri (5 haftalık dişi, her biri 18-20 g) Chengdu Dossy Deney Hayvanları (Çin) tarafından sağlandı. Tüm hayvan çalışmaları, Southwest Üniversitesi Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi (IACUC) tarafından onaylandı ve

Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için Ulusal Kılavuza uygunluk. İn vivo tümör modelini oluşturmak için, 100 µL 1 x PBS içinde süspansiyon edilmiş 1 x 10<sup>6</sup> 4T1 hücresi, izofluran ile anestezi uygulandıktan sonra her BALB/c farenin arkasındaki yan bölgeye deri altından aşılandı. Daha sonra tüm fareler, tümör boyutu yaklaşık 80-100 mm<sup>3</sup>'e ulaşana kadar bir hayvan tesisinde barındırıldı. Tümör boyutu, intratumoral enjeksiyondan sonra yaklaşık 10 gün boyunca ölçüldü ve tümör hacmi, eq 3

$$\text{tümör hacmi (tümör uzunluğu)} \times (\text{tümör genişliği})^2 / 0.5 \quad (3)$$

burada uzunluk ve genişlik sırasıyla tümörün en uzun ve en kısa eksenlerini temsil eder.

Vivo'da Tümör Bastırma. Tümör baskılama etkisini in vivo araştırmak için, tüm fareler çeşitli tedavilerle rastgele altı gruba ayrıldı (her grupta n = 5): grup 1 (tuzlu su), grup 2 (DOX), grup 3 (SH@hidrojel), grup 4 (SH@hidrojel artı NIR lazer ışınlaması), grup 5 (SH/DOX@hidrojel) ve grup 6 (SH/DOX@hidrojel artı NIR lazer ışınlaması). Tüm 4T1 tümör taşıyan farelere, 50 µL reaktif solüsyonu intratumoral olarak enjekte edildi, ardından herhangi bir rahatsızlık olmaksızın 1 saat jelatinizasyon yapıldı. Tümör bölgelerindeki fototermal tepkiyi araştırmak için, farelere anestezi uygulandı ve 150 saniye boyunca NIR lazer ışınlamasına (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) tabi tutuldu; bu sırada fare sıcaklıklarının kızılötesi termografik haritaları bir termal görüntüleme kamerası (Ti55) kullanılarak alındı. Şans. Antitümör etkisini araştırmak için, grup 4 ve 6'daki fareler, tümör bölgesinde 10 dakikalık NIR lazer ışınlamasına tabi tutuldu. Tedavilerden sonra, her gün fare tümör hacimleri ve vücut ağırlıkları kaydedildi. 14. günde farelere ötenazi uygulandı ve tümörler ve ana organlar çıkarıldı, tartıldı ve üç kez salin solüsyonu ile yıkandı. Bu dokular daha sonra %10 formalin ile sabitlendi, ardından hematoksilin ve eozin (H&E) boyaması için 3 mm'lik bölümlere ayrıldı. Tümör apoptoz durumunu analiz etmek için, standart protokolüzlleyen bir TUNEL tahlil kiti kullanarak TUNEL (TdT aracılı dUTP-X nick end etiketleme) boyaması yapıldı. Histolojik kesitler patolojik olarak



Şekil 3. SH/DOX@hidrojelin karakterizasyonu. (a) NIR ışıkla etkinleştirilen termal yanıtı ve ilaç dağıtımını araştırmak için kullanılan kurulumun şematik gösterimi; (b) DOX içeren süpernatanın görsel ışık absorpsiyon spektrumları; (c) periyodik NIR lazer ışınımı altında fototermal olarak başlatılan sıcaklık artışı ve DOX salımı (termografik görüntüler, 5 döngüde karşılık gelen sıcaklık değ işimini göstermektedir); (d) lazer ışınımı olan veya olmayan DOX salım oranı (n = 4, \*p < 0.05, iki grup arasında); (e) artan güç yoğunluğ u altında ON/OFF NIR lazer ışınımı sırasındaki sıcaklık değ işimi ( 0 40 dk için 1 W cm<sup>2</sup>, 40 80 dk için 2 W cm<sup>2</sup> ve 80 için 3 W cm<sup>2</sup> 120 dk); ve (f) farklı sıcaklıklarda SH/DOX@hidrojelin (%1 agaroz) salımlı kayma reolojisi (G' ve G'').

bir floresan mikroskopu (Olympus, IX73, Japonya) kullanılarak incelendi. Tümör büyümesini önleme (TGI) oranı, aşağı idaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$TGI (\%) = \frac{VT - VC}{VT} \times 100 = VT \quad (4)$$

burada VC, salın grubundaki tümör hacmini, VT ise tedavilerden sonraki tümör hacmini belirtir. Potansiyel inflamasyon intratümöral olarak enjekte edilen SH/DOX@hidrojelle (her biri için 50 µL) yanıt, 1. gün, 3. gün ve 7. gün. Tam kan, süpernatandaki kan serumunu toplamak için 10 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi, ardından bir TNF-a ELISA Kiti kullanılarak TNF-a seviyesi belirlendi.

İstatistiksel analiz. İstatistiksel analiz, OriginPro yazılımı (OriginLab, MA, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) dayanıyordu. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. 0,05'ten küçük bir p değ eri (\*p < 0,05, n = 4), karşılaştırılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gösterdi.

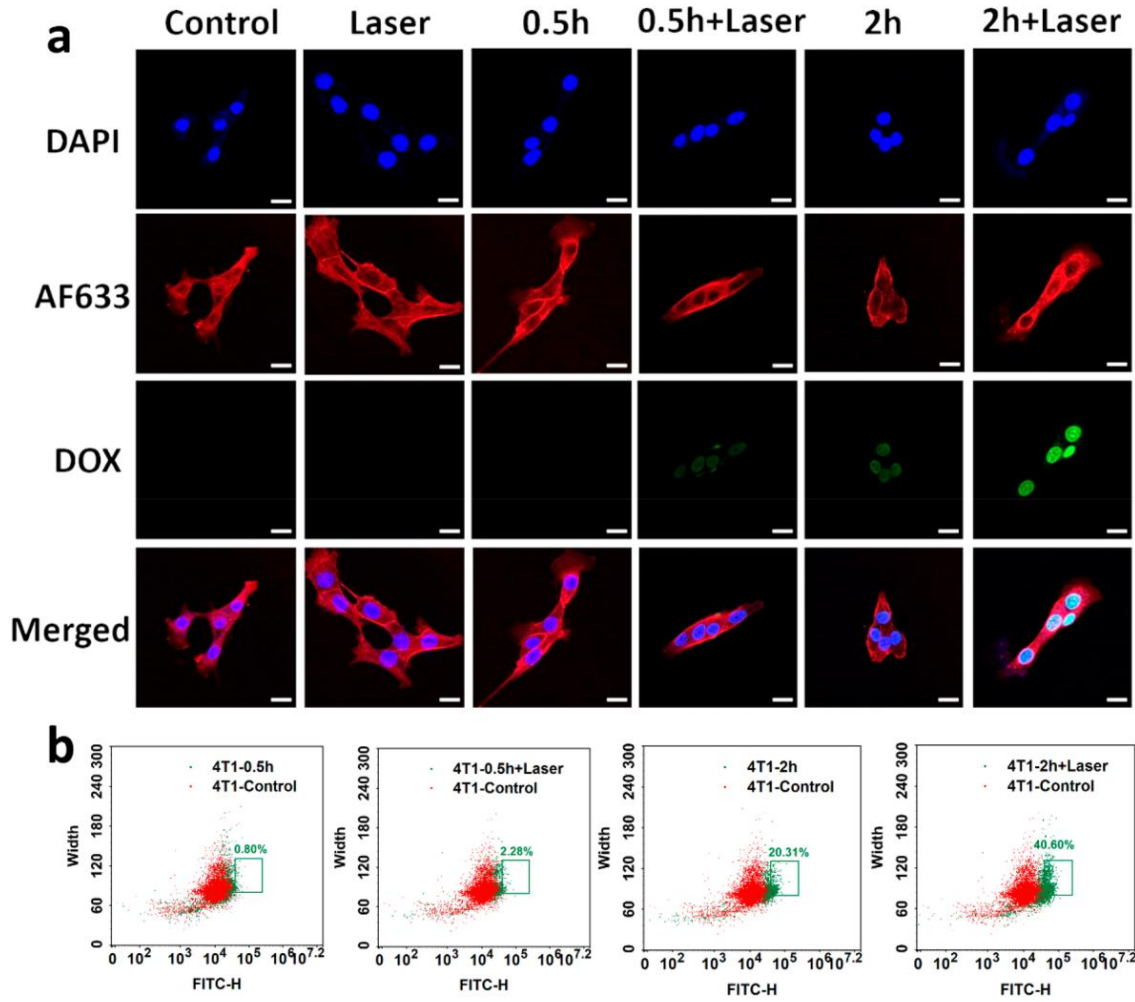
## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

SH'nin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Ticari sodyum humat, sırasıyla çözünmeyen safsızlıkları ve küçük molekülleri ortadan kaldırmak için tekrarlayan santrifüleme ve diyaliz yoluyla saflaştırıldı. Hümk asidinin sulu koşullarda çözünürlüğü ü zayıf olduğu undan, bu çalışmada ikame olarak sodyum humat (SH) seçilmiştir. Dondurarak kurutma işleminden sonra saflaştırılmış siyah SH tozu, gözenekli bir morfoloji sergiledi ve DI su, 1x PBS veya DMEM kültür ortamı içinde kolayca yeniden dağıtılabilir. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu (FESEM), SH'nin ince tabakalarla açılabilir blok dokusunu gösterdi. Benzer kristal kafes yapısı, sodyum humat arasındaki zayıf ve kararsız etkileşimlere atfedilebilir.

su buharlaşması sırasında moleküller (Şekil S1a, B). Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) element haritalaması, C, N, O ve Na'nin varlığını gösterdi.

SH'nin temel bileşimi ile tutarlı (Şekil S1c, D). SH'nin FT-IR spektrumu ayrıca -OH, -COOH ve -CH gibi karakteristik kimyasal grupların varlığını doğruladı (Şekil S2). SH'nin X ışını kırınım (XRD) modelleri, -26 °C'de güçlü (0 0 2) kırınım tepe noktası sergiledi, bu da grafit karbonun π-π istiflendiğini gösterir (Şekil S3). 39 çeşitli konsantrasyonlarda SH sulu dispersiyonlarının viskozite NIR absorpsiyon spektrumları Şekil 2a, b'de gösterilmektedir. 600 ve 900 nm aralığında geniş bir optik soğurma gözlemlendi, bu da SH'nin dikkate değer fototermal kapasitesini gösterir. Bu belirgin optik absorpsiyon, yakındaki elektron donörleri (polihidroksillenmiş aromatikler ve fenoller gibi) ile elektron kabul eden orlar (kinon gibi) arasındaki etkileşime atfedilebilir. Ayrıca, 808 nm'deki optik absorpsiyon yoğunluğ u artan SH konsantrasyonu ile birlikte arttı, iyi sulu dağılımı gösterir.

SH'nin fototermal performansı, çeşitli konsantrasyonlarda (0, 0,125, 0,25, 0,5, 1 ve 2 mg · mL<sup>-1</sup>) sulu SH dispersiyonları içeren küvetlerin bir NIR lazer (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) ile ışınlanmasıyla değerlendirildi. Sıcaklık yükselmesi, SH'nin ışık enerjisini yüksek verimlilikle hızla termal enerjiye dönüştürebileceğini gösteren, konsantrasyona ve ışınlama süresine bağlı bir profil sergiledi (Şekil 2c ve Şekil 2c ve Şekil 2c ve Şekil 2c ve Şekil 2c ve Şekil S4). Spesifik olarak, 1 mg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonundaki SH solüsyonunun sıcaklığı, 10 dakikalık ışınlama içinde 57,3 °C'ye yükseldi; bu, hücre içi proteinleri denatüre etmek ve hücrelerdeki materyale zarar vermek için yeterince yüksek bir termal şoktur. Kızılötesi NIR lazer ışınlanması sırasında gerçek zamanlı sıcaklık değ işliklerini izlemek için SH solüsyonlarının termal görüntüleri de yakalandı ve sonuçlar önceki verilerle tutarlıydı (Şekil 2d). SH'nin fototermal verimi %65,6 olarak bulundu. Özellikle, SH'nin fototermal etkinliği, altın nanokubuklar (%13,0), 43 altın nanoçubuklar (%21,0), 44 bakır süfit nanoçubukları gibi yaygın kullanılan PTT ajanlarından daha yüksektir.



Şekil 4. NIR lazer ışınlaması olan veya olmayan DOX'un hüresel alımı. (a) CLSM görüntüleme ve (b) 4T1 tümör hücrelerinin çeşitli koşullar altında SH/DOX@hidrojel ile inkübe edilmesinden sonra DOX'un hüresel alımının akış sitometri analizi (ölçek çubukları: 5  $\mu$ m).

partiküller (%16,3)45 ve molibden disülfür (%24,4) .46 SH'nin fototerma stabilitesi, dört döngütekranlanan NIR lazer ışınlaması sonrasında değ erlendirildi. Şekil 2e, f'de gösterildi ğ i gibi , her döngüdeki tepe sıcaklı ğ ın varyansı ihmal edilebilir düzeydeydi ve optik absorbands, SH'nin dikkate değ er fototerma stabilitesini gösteren lazer ışınlamadan önce ve sonra aynı kaldı. Fototerma kararlılık ve dönüşüm verimlili ğ i, ışık kaynaklı PTT'ye yönelik uygulamalar için bir PTA olarak SH'nin kritik özellikleridir.

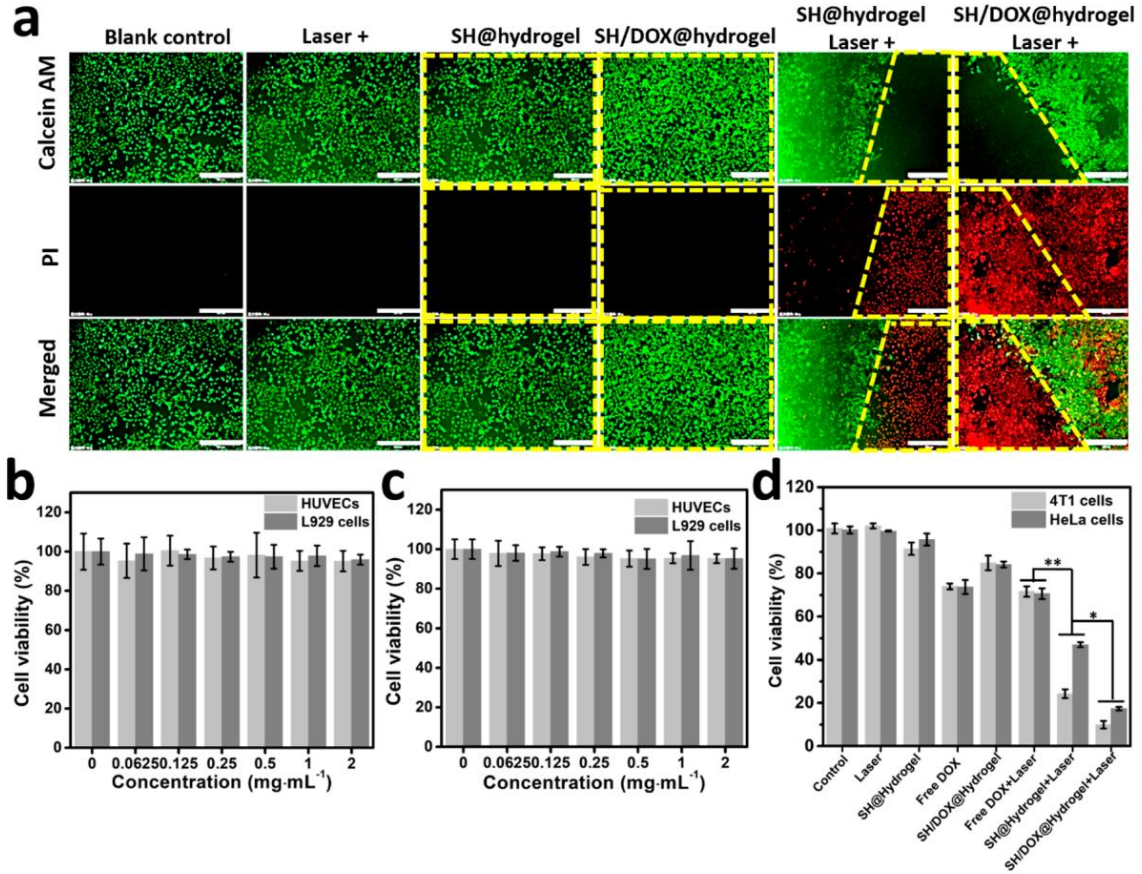
SH/DOX@ hidrojelinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. SH/DOX@hidrojel, düşük erime noktalı agarozun SH ile yaklaşık 60 °C'de karıştırılması, ardından belirli bir miktarda DOX eklenmesi ve oda sıcaklı ğ ına hızlı soğ utma ile hazırlandı. SH/DOX@hidrojel yaklaşık 40 °C'de yumuşadı ve yaklaşık 50 °C'de erimiş hale geldi. SH/DOX@hidrojel, öncü özeltisine benzer şekilde siyah bir renk sergiledi (Şekil S6). NIR ışığı ıyla etkinleştirilen terma yanıtı ve ilaç dağı tımını araştırmaya yönelik cihaz kurulumu, Şekil 3a'da gösterilmektedir. 4 mL'lik bir küvete bir mililitre sıvı hidrojel ilave edildi ve daha sonra katılaşı n jel, küvetin dibinde oluştu. Daha sonra küvet, 50 dakika boyunca sürekli olarak NIR lazer ışınımına (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) maruz bırakıldı . Serbest kalan DOX, her bir küvette şipernatanın floresans spektrumu kullanılarak ölç üldü Şekil 3b'de gösterildi ğ i gibi ,

flüoresan emisyon yoğunlu ğ u, ışınlama süresi ile pozitif olarak ilişkilirdi ve bu, NIR lazer ışınlaması altında sürekli ilaç salımına işaret ediyordu. NIR ile tetiklenen ilaç salım davranışını ve terma tepkiyi daha fazla değ erlendirmek için SH/DOX@hidrojeli 5 dakikalık aralıklarla bir NIR lazere maruz bıraktık. SH/DOX@hidrojelin sıcaklı ğ ının, SH'nin yüksek fototerma dönüşüm verimlili ğ ine atfedilen 5 dakikalık lazer ışınlaması (808 nm, 2 W cm<sup>-2</sup>) içinde hızla yaklaşık 50 °C'ye yükseldi ğ ini gözlemledik (Şekil 3c) .

Sıcaklık değ işimi, hidrojelin çeşitli lazer gücüyo ğ unlukları (1, 2 ve 3 W cm<sup>-2</sup>) altında periyodik olarak ışınlanmasıyla da izlendi . SH/DOX@hidrojelin fototerma stabilitesini gösteren, herhangi bir özel lazer güç yoğunlu ğ u altında dört döngülazer ışınması sırasında çok küçük bir tepe sıcaklık değ işimi gözlemlendi. Artan lazer güç yoğunlu ğ u ile artan tepe sıcaklı ğ ı, lazer ışınmasının gücünü ayarlayarak foto terma etkiyi kontrol etmek için çekici bir potansiyel anlamına gelir (Şekil 3e). Ayrıca ilaç salımı, NIR ışığı ı olmayan benzer koşullara kıyasla ışınlama altında önemli ölç üde hızlandı (Şekil 3c, Şekil S7). Spesifik olarak, ardışık dört AÇIK/KAPALI NIR ışık ışınlama döngüsüsirasında ilaç salım oranı (rON ve rOFF,  $\mu$ g min<sup>-1</sup> olarak raporlanmıştır ) Şekil 3d'de hesaplanmıştır.

Tüm ışınlama döngüeri için rON, rOFF'tan çok daha yüksekti ; bu, NIR ışığı ının etkili bir şekilde hızlı ilaç salımını indükledi ğ ini gösterir.





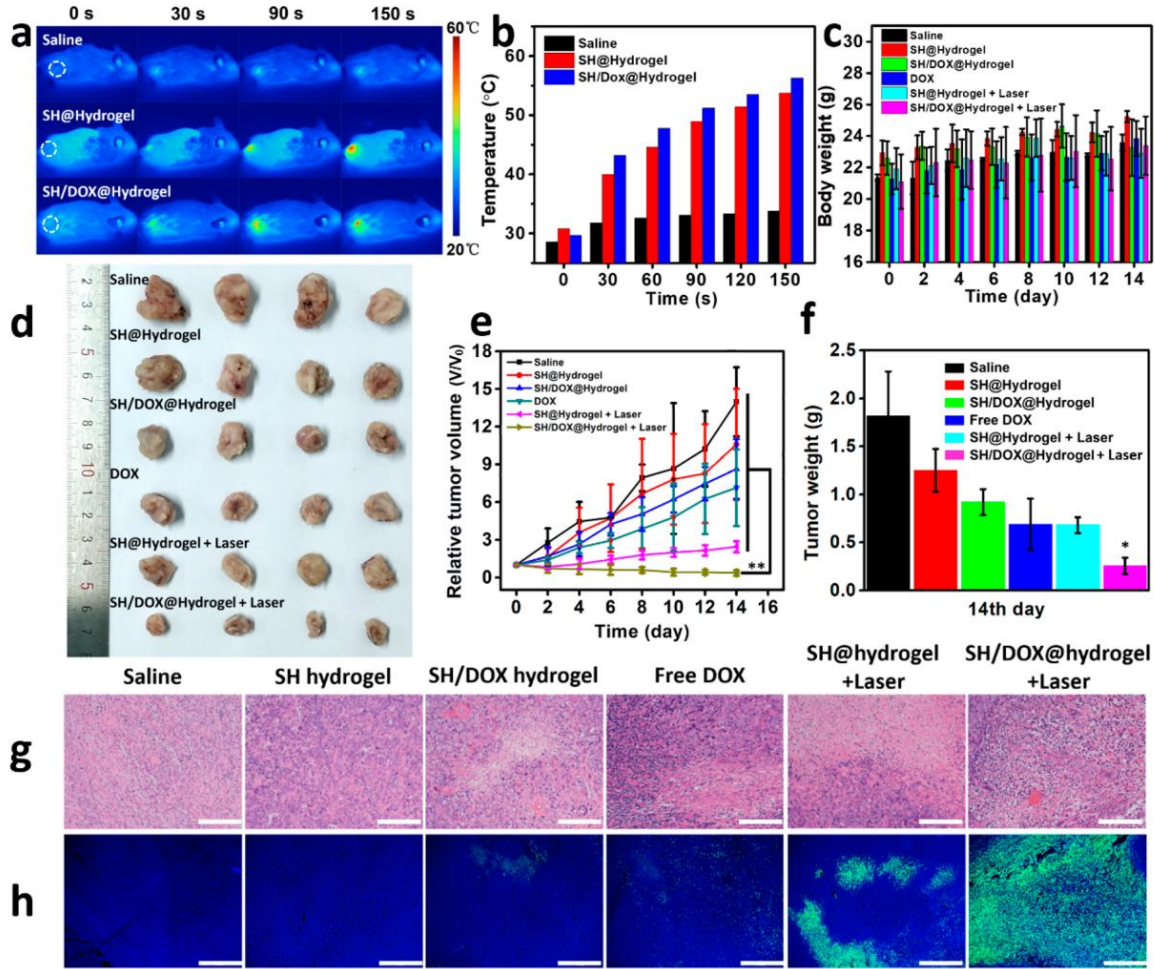
Şekil 5. In vitro biyouyumluluk ve sitotoksizite deneyleri. (a) Çeşitli tedavilerden sonra Calcein AM ve PI ile birlikte boyanmış 4T1 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri (sarı kesikli çizgi hidrojel tarafından kaplanan alanı temsil eder, ölççek çubukları: 100 µm); 24 saat boyunca (b) SH veya (c) SH@hidrojel (50 µL) ile muameleden sonra HUVEC'lerin ve L929 hücrelerinin yaşayabilirliği; ve (d) 4T1 veya HeLa hücrelerinin uygulanabilir olduğu u durumlarda 5 dakika NIR lazer ışınlamasına tabi SH@hidrojel (50 µL), serbest DOX (25 µg) veya SH/DOX@hidrojel (50 µL) ile tedaviden sonra yaşayabilirliği (n = 4, \*\*p < 0.01 ve \*p < 0.05 iki grup arasında).

SH/DOX@hidrojelden. Daha önceki lazer ışınlama döngülerinde nispeten daha yüksek ilaç salım oranı, yüze veya dış hidrojel tabakasına yüklenen DOX'un çözünmesine bağlanabilir.

Bununla birlikte, hidrojinin içinden ilaç salımı, daha sonraki ışınlama döngüleri sırasında önemli ölçüde yavaşladı. Öte yandan, hidrojel, lazer ışınlamasını kapattıktan sonra hızla jellendi ve böylece verimli salım ilerlemesini engelledi. Ayrıca, pH 7.4 ve 5.0'da SH/DOX@hidrojelden ilaç salımı 37 °C ve 60 °C'de araştırılmıştır (Şekil S8). İlaç salımının genellikle daha asidik ortamda veya fizyolojik durumun üzerindeki daha yüksek sıcaklıkta (~60 °C) daha hızlı olduğunu bulduk, bunun nedeni DOX'un daha düşük pH koşullarında çözünürlüğünün artması ve hipertermi sırasında hidrojel hidrolizi ve yumuşaması olabilir.

İlaç salımının altında yatan mekanizmayı daha fazla aydınlatmak için, kapsülenmiş SH ve DOX miktarının ve agaroz konsantrasyonunun jel oluşumu üzerindeki etkisini araştırdık (Şekil S9). Kümülatif ilaç salımının, hidrojelde yüklü SH ve DOX miktarı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulundu. İn vitro konsantrasyona bağlı fototermal performansın önerdiği gibi (Şekil 2a-d), daha yüksek SH yükleme konsantrasyonu hidrojel içinde daha güçlü fototermal dönüşüme katkıda bulundu ve bu da daha hızlı ilaç salımına olanak sağladı (Şekil S9b). Ayrıca, hidrojelde daha yüksek agaroz konsantrasyonlarına (örn. %2) sahip gruplarda daha düşük ilaç salımı gözlemlendi. Tahmin ettik ki bir

agaroz içeriğinin daha yüksek oranı, daha yoğun bir şekilde çapraz bağlanmış bir yapı ile sonuçlanmış, böylece lazer ışınlaması altında polimer matrisinin hidrolizini ve bozunmasını engellemiştir. Bu nedenle, son derece kompakt polimerik matris içinde daha fazla DOX tutulabilir ve bu, yalnızca tersinir fiziksel çapraz bağları bozmak için fototermal etkinin artırılmasıyla hafifletilebilir. %1 agarozdan hazırlanan SH/DOX@hidrojelin ısıya duyarlı davranışını incelemek için depolama modündeki (G') ve kayıp modündeki (G'') varyasyon 30 ila 60 °C sıcaklık aralığında analiz edildi (Şekil 3f). Hem G' hem de G'' değerleri artan sıcaklıkla birlikte azaldı ve bu, ısıtma işlemi sırasında zayıflamış kovalent olmayan etkileşimler nedeniyle çapraz bağlanma yoğunluğunun tipik bir şekilde azaldığını gösteriyor. G' ve G'' eğrileri yaklaşık 60 °C sıcaklıkta kesişmiştir, bu da jel-sol geçişinin başlama sıcaklığı (%1 agaroz) gösterir. Ayrıca, %0,5 agaroz ile hazırlanan SH/DOX@hidrojelin G''nin G''den çok daha yüksek olduğu bulundu, bu da jelin mutlak sıvı durumunu gösterir. Aynı sıcaklık aralığındaki %2 agaroz hidrojel için, G'', jelatinleşmeden sonra tipik bir katı durumu gösteren, G''den daha düşük bir büyüklük sırasıydı (Şekil S10). Bu nedenle, sonraki intratümöral enjeksiyon ve sürekli ilaç salımı çalışmaları için hidrojel hazırlama için en uygun konsantrasyon olarak %1 agaroz tarandı. Hidrojel parçalanabilirliği, PBS'de (pH 7.4 veya 5.0) SH/DOX@hidrojelin şişme davranışına ve ağırlık kaybına dayalı olarak değerlendirildi. Geliştirilmiş hidrojel şişmesi



Şekil 6. SH/DOX@hidrojelin in vivo antitümör etkisi. (a) termografik görüntüleme (kesikli daireler, katı tümör bölgesini belirtir) ve (b) lazer ışınması altında farelerin karşılık gelen sıcaklık değ işimi; (c) çeşitli tedavilerden sonra zaman içinde fare vücut ağı ırlığ ının değ işimi; (d) çeşitli tedavilerden sonraki 14. günde eksize edilen tümörlerin görüntüleri; (e) normalleştirilmiş tümör hacminin zamanla değ işimi ( $n = 5$ ,  $**p < 0.01$ , iki grup arasında); (f) çeşitli tedavilerden sonra 14. günde eksize edilen tümörlerin ortalama ağı ırlığı (SH/DOX@hidrojel + lazer grubu ve diğ er herhangi bir grup arasında  $n = 5$ ,  $*p < 0.05$ ); ve çeşitli tedavilerden sonra 14. günde (g) H&E boyama ve (h) TUNEL boyama ile eksize edilen tümörlerin histopatolojik analizi (ölçek ç ubukları: 200  $\mu\text{m}$ ).

daha yüksek inkübasyon sıcaklığı nda (60  $^{\circ}\text{C}$ ) gözlemlendi, bu da ağı ırlık kaybıyla kanıtlandı ğ ı gibi daha hızlı hidrojel bozulmasına neden oldu (Şekil S11). Lokal hiperterminin ester bağ lantı bağ lantı segmenti, oligomerler ve monomerlerin hidrolizini hızlandırdığı nı tahmin ettik. Bununla birlikte, hidrojel şişmesi ve ağı ırlık kaybı, pH koşulunun değ işimine duyarlı bulunmuştur.

DOX'un İn Vitro Hüresel Alımı. SH/DOX@hidrojelden salınan DOX'un hücre iç i alımını araştırmak için 4T1 hücre hattı kullanıldı (Şekil 4). DOX'un yeş il flüoresansını izleyerek içselleştirilmiş ilacı değ erlendirmek için CLSM ve akış sitometrisi eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. DOX'un floresans sinyali yoğ unluğ u, lazer ışınlamadan bağ ımsız olarak inkübasyon süresi 0,5'ten 2 saate yükseldiğ inde daha da güç lendi, bu da tipik bir zamana bağ lı hücre alım davranış ını gösteriyordu. Daha da önemlisi, ışınlanmamış kontrol gruplarına kıyasla NIR lazer ışınlamasına maruz kalan gruplarda DOX'un daha güç lübir floresan yoğ unluğ u gözlemlendi (Şekil 4a). Sonuç lar, lazerle indüklenen hiperterminin hidrojelden ilaç salınımını hızlandırdığı nı ve böylece kütür ortamında DOX'un iyileştirilmiş biyoyararlanımı altında hüresel alımı arttırdığı nı gösterdi. Aslında, tek başına hafif lokal hipertermi de DOX veya diğ er küçük maddelerin hüresel alımına katkıda bulunabilir.

molekül ilaç lar, daha önce bildirildiğ i gibi.47,48 Akış sitometrisi sonuç ları, ışınlanmış grupların daha yüksek hücre iç i yeş il flüoresan yoğ unluğ unu gösteren CLSM gözlemleriyle tutarlıydı (Şekil 4b). HeLa hücreleri kullanılarak da benzer bulgular elde edildi (Şekil S12).

SH/DOX@hidrojelin in Vitro Sitotoksitesisi.

Malzeme biyoyumluluğ u, biyomedikal uygulamalar için bir ön koşuldur. SH ve SH@hidrojelin biyoyumluluğ unu değ erlendirmek için L929 fibroblastları ve HUVEC'ler dahil olmak üzere normal somatik hücreler kullandık. 24 saat tedavi edilen hücreler, bir MTT tahlili ile değ erlendirildi. Hem SH hem de SH@hidrojel için reaktif konsantrasyonu 2 mg mL<sup>-1</sup> kadar yüksek olduğ unda bile hücre canlılığı %90'ın üzerinde tutuldu, bu da bu hücre hatlarıyla iyi uyumluluklarının göstergesidir (Şekil 5b, c). SH/DOX@hidrojel kullanılarak fototerml hücre ablasyon etkisini araştırmak için, iş lenmiş 4T1 hücreleri PI ve Calcein AM ile birlikte boyandı. Yeş il floresan canlı hücreleri gösterirken, kırmızı floresan ölü hücreleri gösterdi (Şekil 5a). Tedavi edilmeyen kontrol, NIR lazer ışınması, SH@hidrojel (lazer kapalı) ve SH/DOX@hidrojel (lazer kapalı) gruplarında yalnızca yeş il bir flüoresan sinyali gözlemlendi ve bu dört grupta ihmal edilebilir hücre ölümüne işaret etti. Özellikle, NIR lazer ışınmasına maruz



PI kanalında güçlü bir kırmızı floresan sinyali ile gösterildiği gibi etkili tümör ablasyonu. Ayrıca, SH/DOX@hidrojel ile tedavi edilen hücrelerin kırmızı floresansı, hipertermi altında hidrojelden salınan DOX'un kemotoksitesinden kaynaklanan NIR lazer aydınlatması olmayan alana önemli ölçüde genişledi. Aynı koşullar altında tedavi edilen HeLa hücrelerinde de benzer sonuçlar bulundu (Şekil S13).

SH/DOX@hidrojelin HeLa veya 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksitesi, bir MTT tahlili (Şekil 5d) kullanılarak ayrıca analiz edildi. Kör kontrol, lazer ışınması ve SH@hidrojel gruplarında (lazer kapalı) gözle görülür bir toksisite yoktu. Kemo terapötik ilacın toksisite etkisine atfedilen SH/DOX@hidrojel (lazer kapalı) ve serbest DOX gruplarında hafif toksisite gözlemlendi. Dikkate değer bir kontrast olarak, daha önce belirtilen floresan mikroskopu gözlemleriyle uyumlu olan, NIR lazer ışınması altında SH@hidrojel grubunda önemli bir foto termal tümör ablasyonu etkisi gözlemlendi. Akış sitometrisi analizi ayrıca lokal hipertermi tarafından indüklenen önemli hücre apoptozu ortaya çıkardı (Şekil S14). Daha da önemlisi, SH/DOX@hidrojel grubunda (lazer üzerinde) 4T1 ve HeLa hücrelerinin %80'inden fazlası yok edildi; bu, in vitro kombine kemo-fototerma terapötikler altında gelişmiş bir tümör ablasyon etkisine işaret ediyor.

**Katı Tümörlerin Kemo-fototerma Tedavisi in Vivo.** SH/DOX@hidrojel tarafından in vitro olarak gösterilen biyouyumluluk ve antitümör aktivite ile cesaretlendirilerek, subkutan 4T1 tümör taşıyan BALB/c fareleri kullanarak bunun fototerapötik etkisini in vivo olarak daha da araştırdık. SH/DOX@hidrojelin tümör bölgesi üzerindeki foto termal etkisi, ilk olarak bir termal görüntüleme kamerası kullanılarak termografik görüntüleme ile incelenmiştir. Salinle tedavi edilen tümör bölgesindeki lokal sıcaklık, 150 s lazer ışınımına tabi tutulduğunda hafifçe 33.8 °C'ye yükseldi (Şekil 6a, b). Buna karşılık, aynı koşullar altında SH@hidrojel ve SH/DOX@hidrojel gruplarında sırasıyla 53,5 ve 56,3 °C'ye kadar dramatik bir sıcaklık artışı gözlemlendi. Bu sonuçlar, SH/DOX@hidrojelin emilen NIR ışık enerjisini in vivo olarak yerel hipertermiye verimli bir şekilde dönüştürdüğünü göstermektedir. Her gruptaki tümör hacmindeki değer ışıklık (Şekil 6e), tedaviden sonra antitümör etkinliği ini değerlendirilmek için 14 gün boyunca izlendi. SH/DOX@hidrojel uygulanan ve 10 dakika boyunca NIR lazer ışınımına tabi tutulan grupta, tümör boyutu zamanla kademeli olarak azaldı ve bu, kombine kemo-fototerma terapötikler altında kayda değer tümör inhibisyonuna işaret ediyor. 14 gün içinde tümör nüfusu görülmeyen ve TGI oranı %97,5 gibi yüksek hesaplandı. Buna karşılık, SH@hidrojel aracılığıyla PTT ile tek bir tedavi modalitesi, daha zayıf bir antitümör etkisi ile sonuçlandı. Tümör büyüme hızı, salin kontrolü veya ışınlanmamış SH@hidrojel gruplarındakinden çok daha düşük olmasına rağmen, PTT sırasında tümör boyutu istikrarlı bir şekilde arttı. Başka bir deyişle, sonuçlar DOX aracılığıyla kemoterapinin kombine antitümör tedavisinde kritik bir rol oynadığını gösterdi. Bununla birlikte, serbest DOX'un intratumoral enjeksiyonu, dolaşım sistemi yoluyla hızlı ilaç klirensine bağlı olarak sınırlı bir tümör baskılama etkisi sergiledi. Ayrıca, fototerma aktivasyon olmadan SH/DOX@hidrojelden spontan ilaç difüzyonu, tümör bölgesinde DOX'un yeterli biyoyararlanımını sağlamadı ve serbest DOX uygulamasından daha düşük antitümör etkinliği gösterdi.

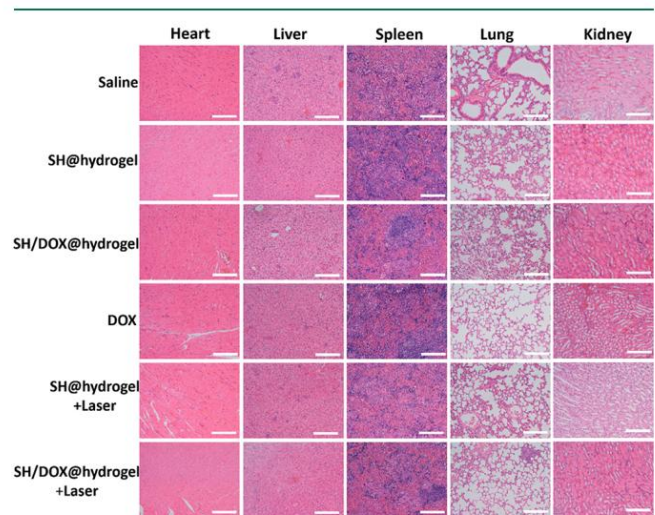
Genel olarak, bu karşılaştırmalı çalışmalar, NIR lazer ışınlamasının sürekli salınımı etkili bir şekilde kontrol edilebileceğini göstermektedir.

SH yüklü hidrojellerden kemoterapötikler. Serbest ilaçların yerel olarak verilmesiyle karşılaştırıldığında bu yöntem, in vivo olarak tümör dokularında antineoplastik etkinliği artırmak için avantajlı bir stratejiyi temsil eder.

14. günde, daha fazla analiz için ötenazi uygulanan farelerden tümörler çıkarıldı (Şekil 6d). SH/DOX@hidrojel grubunda lazer ışınımına maruz kalan ortalama tümör ağırlığı tüm gruplar arasında en düşüktü (Şekil 6f), bu da tümör hacmi sonuçlarıyla tutarlıydı (Şekil 6e). Tümör kesitleri, tedavi etkilerini doku düzeyinde incelemek için H&E ve TUNEL boyama ile işlendi (Şekil 6g, h). Lazer tedavisi uygulanmayan gruplarda tümör kesitlerinde hücre nekrozu veya apoptoz gözlemlenmedi ve hücrelerin tümü ayırt edilebilir hücre zarları ve nükleer yapıları korudu. Buna karşılık, NIR lazer ışınması altında SH@hidrojel ve SH/DOX@hidrojel gruplarında fibroz ile birlikte tümör hücreleri denatürasyonu ve nekroz düzeyi önemli ölçüde arttı. Özellikle, lazer ışınması altında SH/DOX@hidrojel grubunda ciddi tümör hücre tahribatına işaret eden belirgin karyoreksis, piknoz ve karyoliz meydana geldi.

Histolojik analiz, SH/DOX@hidrojelin aracılık ettiği kombine kemo fototerma tedaviler altında olağüstü tümör yok etme etkisine dair daha fazla kanıt sağladı.

SH/DOX@hidrojelin in vivo sistemik toksisitesi, hemouyumluluk analizi, fare vücut ağırlığının izlenmesi ve ana organların histopatolojik analizi ile değerlendirildi. Hemokompatibilite testi, SH, SH@hidrojel veya SH/DOX@hidrojel ile inkübasyondan sonra eritrositlerin minimum hemolizini gösterdi (hepsi %5'in altında hemolitik yüzdeler), bu terapötik hidrojelin uygulanmasının ciddi hemoliz veya kan pıhtılaşmasına neden olmayacağını düşündürür. tedavi (Şekil S15). Şekil 6c'de gösterildiği gibi, uygulanan terapötik dozaj altında SH/DOX@hidrojel ile tedavi edilen farelerde belirgin bir vücut ağırlığı kaybı olmamıştır. Ayrıca, enjeksiyondan sonraki 14. günde tüm gruplarda kalp, karaciğer, dalak, akciğer ve böbrek gibi ana organlarda gözlemlenebilir patolojik anormallikler veya lezyonlar bulunmadı (Şekil 7). Çeşitli tedavilerden sonra farelerden toplanan taze kan üzerinde rutin hematoloji incelemesi yapıldı (Şekil S16). Veriler, listelenen hematolojik özellikler açısından önemsiz farklılıklar gösterdi.



Şekil 7. 14. günde H&E boyamasıyla ana organların histolojik analizi (ölçek çubukları: 200 µm).

genellikle sağ lıklı farelerin referans aralıkları içinde olan, tedavi edilen ve kontrol grupları arasındaki parametreler. SH/DOX@hidrojel tarafından indüklenen potansiyel immünojeniteyi daha fazla değerlendirilmeye, fare periferik kanındaki TNF-a seviyesi bir ELISA tahlili (Şekil S17) kullanılarak belirlendi. TNF-a seviyesi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı anda tümör içi uygulamadan sonra fare modelinde 7 gün içinde önemsiz bir değişiklik gösterdi ve SH/DOX@hidrojel nedeniyle ihmal edilebilir immünojenite gösterdi. Bu sonuçlar, SH/DOX@hidrojel aracılı tümör tedavisinin normal dokularda minimum sistemik toksisiteye veya olumsuz yan etkilere neden olduğunu gösterdi.

Bu çalışmada, doğal hümkik asit tuzu (SH) ile birleştirilmiş düşük erime noktalı agarozdan terapötik bir hidrojel sentezlendi. Hümkik maddeler, canlı organizmaların çürümesi veya biyolojik faaliyetleri sonucu ortaya çıkan ve insan vücudu için gerekli elementler olan C, H, O, N ve S atomlarından oluşan heterojen karışımlardır. Kaynaklarına ve ekstraksiyon yöntemlerine bağlı olarak, hümkik maddelerin moleküler ağırlıkları, 1 nm ila yüzlerce nanometre arasında değişebilir. 49 Ayarlanabilir boyut, farmakokinetik, biyodağılım ve tümör içi biyoyararlanımın kesin olarak düzenlenmesini destekleyebilir. kanser tedavisindeki uygulamalar için. 50 Daha da önemlisi, hümkik malzemelerin uygulanması, son derece düşük maliyetleri göz önüne alındığında oldukça caziptir. Deniz yosunundan elde edilen doğal bir polisakkarit olan agaroz, sağ lık uygulamaları için kullanılan biyolojik olarak iyi huylu bir yapısal bileşendir.

Bu nedenle, sentezlenen SH@hidrojel kompoziti, terapötikler için potansiyel olarak kullanılabilir, biyolojik olarak uyumlu ve sürdürülebilir fonksiyonel bir ilaç taşıyıcısıdır. Hidrojeller, %100'e varan bir kapsülleme verimliliğine sahiptir; bu nedenle ilaç yükleme kapasitesi sınırlı değildir, bu da nanoterapötiklerin kapsülasyonu için bir avantajdır. Ayrıca SH@hidrojelin termal tepkisi, jel hazırlama sırasında agarozun ağırlık oranı değerlendirilerek ayarlanabilir ve ilaç salım kinetiğinin uygun şekilde düzenlenmesine olanak tanır.

SH@hidrojel, geçiş noktasının altındaki fizyolojik vücut sıcaklığında tümöral dokuya enjeksiyondan sonra jel durumuna faz geçişine uğrar. SH@hidrojel bir NIR lazeri ile ışınladığından, SH'nin güçlü fototerma dönüşüm özelliği nedeniyle yerel hipertermi oluşur. Bu işlem sırasında, hidrojel ısıtılır ve daha sonra çapraz bağ lı matrisin hidrolizi nedeniyle yumuşar, bu da hızlı ilaç salımıyla sonuçlanır. Bu nedenle NIR lazer, ilaç salımını hızlandırmak ve kemoterapiyi teşvik etmek için bir anahtar görevi görebilir. Daha da önemlisi, ilaç salım hızı hem iç hem de dış uyaranları kontrol ederek ayarlanabilir. Lazer güçlü ışınları veya ışınlama süresindeki artış, ester bağ lantılarının segmentlere, oligomerlere, monomerlere ve nihayetinde karbon dioksit ve suya yoğun hidrolizine yol açabilir. 51 Bu nedenle, işlemden sonra hidrojelin bozunması beklenir. Hidrojel genellikle katı bir tümörün merkezine enjekte edildiğinden, ablasyon etkisi tümörün içinden dışına doğru meydana gelir ve bu da çevredeki normal dokuların istenmeyen tahribatını önemli ölçüde azaltır. Serbest DOX veya SH@hidrojel ile karşılaştırıldığı anda, DOX yüklü SH/DOX@hidrojel, senkronize PTT ve NIR ışığıyla etkinleştirilen kemoterapi etkilerine dayalı olarak 4T1 katı tümörlere karşı artan tümör yok etme etkinliği ile sonuçlanır. Bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilir ve düşük toksisiteye sahip SH@hidrojel, çok modlu tümör tedavisi için umut verici bir malzeme ve ucuz bir platformdur.

## SONUÇLAR

Özetle, intratümöral olarak enjekte edilebilen doğal SH ve DOX ile birleştirilmiş enjekte edilebilir bir agaroz hidrojeli geliştirdik. Yüksek fototerma dönüşüm verimliliğine sahip SH, NIR lazer ışınları altında bir agaroz hidrojelin faz geçişini indükleyerek, kombine bir kemo-fototerma tedavi için kontrol edilebilir, ışıkla tetiklenen ilaç salımına ve lokal hipertermiye yol açabilir. İlaç salım hızı, malzeme özellikleri (örneğin, agaroz, SH ve DOX konsantrasyonları) ve dış uyaranlar (örneğin, lazer güç yoğunluğu ve ışınlama süresi) değerlendirilerek kontrol edilebilir. In vitro hücre araştırmaları, NIR lazerle indüklenen hiperterminin DOX'un sürekli salınmasını kolaylaştırdığını ve böylece SH/DOX@hidrojelin antitümör ilacın hücre alımını artırdığını göstermiştir. 4T1 tümör taşıyan farelere dayalı hayvan çalışmaları ayrıca, bu ilaç yüklü hidrojel sisteminin, aynı zamanda ana organlara karşı iyi hemo-uyumluluk ve minimum sistemik toksisite sergileyen, dikkate değer tümör inhibisyon etkisini in vivo olarak göstermiştir. Genel olarak, bu enjekte edilebilir SH/DOX dahil agaroz hidrojeli, tümörlerin lokal kemo-fototerma tedavisini gerçekleştirmek için umut verici bir stratejiyi temsil eder.

## İLGİLİ ÇERİK

### Destekleyici Bilgiler

Destekleyici Bilgiler, ACS Publications web sitesinde ücretsiz olarak mevcuttur. DOI'de : 10.1021/acsbio materials.8b01147.

### Şekiller S1 - S17 (PDF)

## YAZAR BİLGİLERİ

Sorumlu Yazarlar \*E-

posta: [xuepeng@swu.edu.cn](mailto:xuepeng@swu.edu.cn). Telefon: +86-23-68253792 (S. X.).

\*E-posta: [yjkang@swu.edu.cn](mailto:yjkang@swu.edu.cn). Telefon: +86-23-68254056 (Y. K.).

orkid 

Zhigang Xu: 0000-0003-1805-5061

Yuejun Kang: 0000-0002-1021-0349

notlar

Yazarlar rakip bir finansal çıkar beyan etmemektedir.

## TEŞEKKÜRLER

PX ve YK, Chongqing'in Teknoloji İnovasyonu ve Uygulama Gösterimi Hibesine (cstc2018jscx-msybX0078), Merkezi Üniversiteler için Temel Araştırma Fonlarının mali desteğine (XDJK2017C001, XDJK2016A010) ve Çin Ulusal Doğal Bilimleri Vakfına (51703186, 31671037) minnettedir.

## REFERANSLAR

(1) Torre, Los Angeles; Siegel, RL; Koğuş, EM; Jemal, A. Küresel Kanser İnsidansı ve Ölüm Oranları ve Eğilimler-Bir Güncelleme. *Kanser Salgını., Biyobelirteçler Önceki.* 2016, 25, 16-27.

(2) Wirtz, D.; Konstantinopoulos, K.; Searson, PC. Kanser fizyolojisi: metastazda fiziksel etkileşimlerin ve mekanik kuvvetlerin rolü. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 11, 512-522.

(3) Miller, KD; Siegel, RL; Lin, CC; Mariotto, AB; Kramer, J. L.; Rowland, JH; Stein, KD; Alteri, R.; Jemal, A. Kanser tedavisi ve hayatta kalma istatistikleri, 2016. *Ca-Cancer J. Clin.* 2016, 66, 271-289.

(4) Yaromina, A.; Krause, M.; Baumann, M. Radyoterapi perspektifinden kanser tedavisinin bireyselleştirilmesi. *Mol. Oncol.* 2012, 6, 211–221.

(5) Badea, I.; Taylor, M.; Rosenberg, A.; Foldvari, M. Lokalize skleroderma ve sistemik sklerozda gelişmiş topikal tedavi için patogeneze ve terapötik yaklaşımlar. *Romatoloji* 2008, 48, 213–221.

(6) De Souza, R.; Zahidi, P.; Allen, C.; Piquette-Miller, M. Lokalize kanser kemoterapisi için polimerik ilaç verme sistemleri. *İlaç Dağıtımı* 2010, 17, 365–375.

(7) Kamali, N.; Yamaen, B.; Wu, J.; Farokhzad, OC Bozunabilir Kontrollü Salımlı Polimerler ve Polimerik Nanopartiküller: İlaç Salımını Kontrol Etme Mekanizmaları. *kimya Rev.* 2016, 116, 2602–2663.

(8) Li, YL; Maciel, D.; Rodrigues, J.; Shi, XY; Thomas, H. İlaç/Nükleik Asit Teslimatı için Biyobozunur Polimer Nanojeller. *kimya Rev.* 2015, 115, 8564–8608.

(9) Xie, WS; Gao, S.; Guo, ZH; Wang, D.; Gao, F.; Wang, XM; Wei, Y.; Zhao, LY Üçlü Negatif Meme Kanseri Tedavi Etmek İçin Doksorubisin ve Docetaxel'in Azenkron Kontrol Salımını İçin Enjekte Edilebilir ve Kendi Kendini İyileştiren Isıya Duyarlı Manyetik Hidrojel. *ACS Uygulaması Anne. Arayışlar* 2017, 9, 33660–33673.

(10) Eskandari, S.; Guerin, T.; Toth, I.; Stephenson, RJ Kendiliğinden oluşan peptitlerdeki son gelişmeler: Hedeflenen ilaç dağıtımı ve aşı mühendisliği için çıkarımlar. *Av. Drug Delivery Rev.* 2017, 110, 169–187.

(11) Feng, YX; Li, Q.; Wu, D.; Niu, YM; Yang, C.; Dong, L.; Wang, CM Yerde anjiyogenez için endojen büyüme faktörlerini ayırmak için makrofaj aktive edici, enjekte edilebilir bir hidrojel. *Biyomateryaller* 2017, 134, 128–142.

(12) Nguyen, MK; Jeon, O.; Krebs, MD; Schapira, D.; Alsberg, E. Kök hücre osteojenik farklılaşmasına rehberlik etmek için yerinde hidrojel oluşturan RNA'ya müdahale eden moleküllerin sürekli lokalize sunumu. *Biyomateryaller* 2014, 35, 6278–6286.

(13) Tian, R.; Chen, J.; Niu, RF Kanser tedavisindeki uygulamalar için düşük moleküler ağırlıklı hidrojellerin geliştirilmesi. *Nano Öncek* 2014, 6, 3474–3482.

(14) Du, XW; Zhou, J.; Shi, JF; Xu, B. Supramoleküler Hidrojelatörler ve Hidrojeller: Yumuşak Maddeden Moleküler Biyomalzemelere. *kimya Rev.* 2015, 115, 13165–13307.

(15) Hoare, TR; Kohane, I. İlaç dağıtımında DS Hidrojeller: İlerleme ve zorluklar. *Polimer* 2008, 49, 1993–2007.

(16) Conde, J.; Oliva, N.; Zhang, Y.; Artzi, N. Lokal üçlü kombinasyon tedavisi, bir kolon kanseri modelinde tümör gerilemesi ile sonuçlanır ve nüksütmeyi önler. *Nat. Anne.* 2016, 15, 1128–38.

(17) Vermonden, T.; Censi, R.; Hennink, Protein iletimi için WE Hidrojeller. *kimya Rev.* 2012, 112, 2853–88.

(18) Wang, LL; Burdick, JA, RNA Etkileşim Tedavilerinin Yerel ve Sürekli Teslimi için Tasarlanmış Hidrojeller. *Av. Sağlık Mat.* 2017, 6, 1601041.

(19) Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Kanserde İlaç Direnci: Genel Bir Bakış. *Yengeçler* 2014, 6, 1769–1792.

(20) Kim, H.; Lee, H.; Seong, KY; Lee, E.; Yang, SY; Yoon, J. Hibrit Hidrojellerden Görünür Işıklı Tetiklenen Talep Üzerine İlaç Salımı ve Transdermal Yamalarda Uygulanması. *Av. Sağlık Mat.* 2015, 4, 2071–2077.

(21) Chen, X.; Liu, ZN; Parker, SG; Zhang, XJ; Gooding, JJ; Ru, YY; Liu, YH; Zhou, YS Sürekli Kanser Tedavisi için Teranostik Bir Platform Olarak Tümörü Hedefleyen Mezogözenekli Silika Nanoparçacıklarına Dayalı Işıklı Uyarılan Hidrojel. *ACS Uygulaması Anne. Arayışlar* 2016, 8, 15857–15863.

(22) Abadeer, NS; Murphy, CJ Altın Nanopartiküller Kullanarak Kanser Termal Tedavisinde Son İlerleme. *J. Phys. kimya C* 2016, 120, 4691–4716.

(23) Li, YB; Lu, W.; Huang, QA; Li, C.; Chen, W. Tümör hücrelerinin fototerma ablastasyonu için bakır sülfür nanoparçacıkları. *Nanotip* 2010, 5, 1161–1171.

(24) Liu, T.; Wang, C.; Gu, X.; Gong, H.; Cheng, L.; Shi, X.; Feng, L.; Güneş, B.; Liu, Z. Kombine fototerma ve kanser kemoterapisi için PEGile MoS<sub>2</sub> nano-tabakaları ile ilaç dağıtımı. *Av. Anne.* 2014, 26, 3433–3440.

(25) Chen, M.; Diş, XL; Tang, SH; Zheng, NF Yüksek performanslı in vivo yakın kızılötesi foto termal kanser tedavisi için polipirol nanopartiküller. *kimya komün.* 2012, 48, 8934–8936.

(26) Zhou, J.; Lu, ZG; Zhu, XJ; Wang, XJ; Liao, Y.; Ma, ZF; Li, polianilin nanoparçacıkları kullanan FY NIR fototerma tedavi. *Biyomateryaller* 2013, 34, 9584–9592.

(27) Chen, YW; Su, YL; Hü SH; Chen, SY Tümör tedavisinde fototerma tedaviyi geliştirmek için işlevselleştirilmiş grafen nanokompozitleri. *Drug Delivery Rev.* 2016, 105, 190–204.

(28) Huang, NN; Wang, Genel Merkez; Zhao, JH; Lui, H.; Korbelik, M.; Zeng, HS Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler Yardımlı Fototerma Kanser Tedavisi: Skuamöz Hücreli Karsinomun Fare Modeli İle Hayvan Çalışması. *Lazer Cerrahi Med.* 2010, 42, 798–808.

(29) Khlebtsov, N.; Dykman, L. Tasarlanmış altın nanopartiküllerin biyolojik dağılımı ve toksisitesi: in vitro ve in vivo çalışmaların gözden geçirilmesi. *kimya Sos. Rev.* 2011, 40, 1647–1671.

(30) Yang, K.; Wan, JM; Zhang, SA; Zhang, YJ; Lee ST; Liu, ZA Farelerde PEGlenmiş Grafenin İn Vivo Farmakokinetiği, Uzun Süreli Biyodağılımı ve Toksikolojisi. *ACS Nano* 2011, 5, 516–522.

(31) Qin, ZP; Wang, YR; Randrianalisoa, J.; Raeesi, V.; Chan, W. CW; Lipinski, W.; Bischof, JC Altın Nanoküreler ve Nanoçubuklar Arasında Fototerma Isı Üretiminin Kantitatif Karşılaştırması. *bilim* 2016, 6, 29836.

(32) Miao, ZH; Li, K.; Liu, PY; Li, ZL; Yang, HJ; Zhao, QL; Chang, ML; Agent. *Adv. Healthcare Mater.* 2018, 7, 1701202.

(33) Mandal, DE; McNeill, K. İşinlanmış hümk asit çözeltilerinde tekli oksijen dağılımlarının mikroheterojenliği. *Bilim* 2006, 311, 1743–1747.

(34) de Melo, BAG; Motta, FL; Santana, MHA Hümk asitler: Yeni teknolojik gelişmeler için yapısal özellikler ve çoklu işlevsellikler. *Anne. bilim Müh., C* 2016, 62, 967–974.

(35) Zhu, H.; Yin, J.; Zhao, X.; Wang, CY; Yang, XR Lityum/sodyum iyon piller için gelecek vaat eden organik anotlar olarak hümk asit. *kimya yaygın.* 2015, 51, 14708–14711.

(36) Hu, PF; Wang, H.; Yang, Y.; Yang, J.; Lin, J.; Guo, L. Yenilenebilir Biyomolekül Tabanlı Tam Lityum İyon Piller. *Av. Anne.* 2016, 28, 3486–3492.

(37) Wang, YF; Dong, M.; Guo, AA; Wang, X.; Zhou, J.; Lei, J.; Guo, CH; Qin, CR Agar/jelatin çift katmanlı jel matrisi, basit ısıya duyarlı sol-jel geçiş yöntemiyle imal edilmiştir. *Anne. bilim Müh., C* 2017, 77, 293–299.

(38) Ratan, R.; Patel, Yumuşak Doku Sarkomu için SR Kemoterapisi. *Yengeç* 2016, 122, 2952–2960.

(39) Huang, GX; Kang, WW; Geng, QH; Xing, BL; Liu, Q. R.; Jia, JB; Zhang, CX Hümk Asitten Birkaç Katmanlı Grafen Oksit Tek Adımda Yeşil Hidrotermal Sentezi. *Nanomateryaller* 2018, 8, 215.

(40) Del Vecchio, R.; Blough, NV Hümk maddelerin optik özelliklerinin kökeni üzerine. *çevre. bilim Teknoloji* 2004, 38, 3885–3891.

(41) Yonebayashi, K.; Hattori, T. Çevresel Hümk Asitlere İlişkin Kimyasal ve Biyolojik Çalışmalar: 1. Hümk Asitlerin Elemental ve Fonksiyonel Gruplarının Bileşimi. *Toprak Bilimi Bitki Bes.* 1988, 34, 571–584.

(42) Thompson, SA; Paterson, S.; Azab, MMM; Wark, AW; de la Rica, R. Fototerma Nanoisotoplar ile Enzimlerin Işıklı Tetiklemeli İnkubasyonu. *Küçük* 2017, 13, 1603195.

(43) Chen, HJ; Shao, L.; Ming, TA; Güneş, ZH; Zhao, CM; Yang, M.Ö Wang, JF Altın Nanokristallerin Fototerma Dönüşüm Verimliliğini Anlamak. *Küçük* 2010, 6, 2272–2280.

(44) Almada, M.; Leal-Martinez, BH; Hasan, N.; Kogan, MJ; Burboa, MG; Topete, A.; Valdez MA; Juarez, J. Fototerma



kitosan, aljinat ve poli(vinil alkol) ile stabilize edilmiş altın nanoçubukların dönüşüm verimliliği ve sitotoksik etkisi. *Anne. bilim Müh.*, C 2017, 77, 583-593.

(45) Wang, SH; Riedinger, A.; Li, HB; Fu, CH; Liu, HY; Li, LL; Liu, TL; Tan, LF; Barthel, MJ; Pugliese, G.; De Donato, F.; D'Abbusco, MS; Meng, XW; Manna, L.; Meng, H.; Pellegrino, T. Yakın Kızılötesi Fototermal ve Fotodinamik Terapötik Etkiler Sergileyen Plazmonik Bakır Sülfür Nanokristaller. *ACS Nano* 2015, 9, 1788-1800.

(46) Yin, WY; Yan, L.; Yu, J; Tian, G.; Zhou, LJ; Zheng, XP; Zhang, X.; Yong, Y.; Li, J.; Gu, ZJ; Zhao, Etkili Kanser Tedavisi için Yakın Kızılötesi Fototermal Tetiklemeli İlaç Dağıtımını Olarak Tek Katmanlı MoS<sub>2</sub> Nanosheets'in YL Yüksek Verimli Sentezi. *ACS Nano* 2014, 8, 6922-6933.

(47) Sherlock SP; Tabakman, SM; Xie, L.; Dai, H. Ultra-Küçük Çoğaltılabilir FeCo/Grafit-Kabuk Nanokristalleri ile Fototermal Olarak Geliştirilmiş İlaç Dağıtımını. *ACS Nano* 2011, 5, 1505-1512.

(48) Bao, ZH; Liu, XR; Liu, YD; Liu, HZ; Zhao, K. Fototermal terapi için yakın kızılötesi ışığa duyarlı inorganik nanomalzemeler. *Asya J. Ecz. bilim* 2016, 11, 349-364.

(49) Dudare, D.; Klavins, M. Yükseltilmiş bataklik profillerinden turba hümik asitlerinin kompleks oluşturan özellikleri. *J. Geochem. Keşfet.* 2013, 129, 18-22.

(50) Ernsting, MJ; Murakami, M.; Roy, A.; Li, SD Nanoparçacıkların farmakokinetiklerini, biyolojik dağılımını ve tümör içi penetrasyonunu kontrol eden faktörler. *J. KontrollüYayın* 2013, 172, 782-794.

(51) Pluvinage, B.; Hehemann, JH; Boraston, AB Substrate Recognition and Hydrolysis by a Family 50 exo-beta-Agarase, Aga50D, Marine Bacterium *Saccharophagus degradans*'tan. *J. Biol. kimya* 2013, 288, 28078-28088.