



# Hedeflendirilmiş Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçükler ile İlaç Taşınımı ve Kontrollü Lokal İlaç Salınımı ile Kanser Tedavisinde Kullanılması

**Program Kodu: 1003**

**Proje No: 213M668**

Proje Yürütücüsü:  
**Yard. Doç.Dr. Sevgi KILIÇ ÖZDEMİR**

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Ekrem ÖZDEMİR  
Prof. Dr. Mustafa SEÇİL  
Uz.Dr. Mustafa Mahmut BARIŞ  
Prof. Dr. Osman YILMAZ  
Prof. Dr. Şule ALKAN  
Prof. Dr. Safiye AKTAŞ  
Prof. Dr. Zekiye ALTUN  
Dr. Ayfer Asiye AKİT

AĞUSTOS 2017  
İZMİR



## Önsöz

Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen bu proje ile, hedeflendirilebilir özellikte ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklere kemoterapik ilaç yüklenmesi, kanser hücre ve dokusuna hedeflendirilmesi, ilacın hedeflenen bölgeye taşınması, ultrason ile görüntülenmesi, hedef bölgede mikroköpükçüklerin patlatılması, yine ultrason altında terapötik ajanın hedef bölgede kanser hücre ve dokusuna salınımının artırılması, böylece özellikle kanser tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklere kemoterapötik ajanlardan Doksorubisin (DOX) yüklenmiş ve nüde farede 4T1 meme kanser hücreleri ile oluşturulan tümör tedvisinde kullanılmıştır. Tek doz enjeksiyon sonucunda boyutu 8 mm'den büyük tümörlerde tümör boyutunda küçülme ve %40'lara varan nekroz görülmüştür. Sonuçlar umut vericidir.

Bu projenin gerçekleşmesinde mali destek veren TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU (TUBİTAK)'a, deneylerin gerçekleştirildiği İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ (İYTE) ve DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (DEÜ) TIP FAKÜLTESİ Birimlerine'ne, projenin gerçekleştirilmesinde emeği geçen Master ve Doktora öğrencileri İlyas Umur AYZ, Gülşah KÜRKCÜ, Sema COŞKUN, Hatice GÜVEN, Elif Nur HAYTA, Cansu ÖNERCAN, Efe Özgür SERİNAN, Melek AYDIN, Meryem ÇALIŞIR, Deniz KALE, Gizem BATI, teknisyen Adem ULU, Doç. Dr. Devrim PESEN OKVUR, ve adını saymadığımız tüm ekip arkadaşlarımıza ve kurum rektörlerimize teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <u>Sayfa</u> |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----|
| Önsöz.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |              | ii |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | iii          |    |
| TABLO LİSTESİ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | v            |    |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | vii          |    |
| ÖZET.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | xix          |    |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | xx           |    |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1            |    |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 3            |    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 10           |    |
| 3.1. Kimyasallar.....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 10           |    |
| 3.2. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin hazırlanması ve karakterizasyonu.....                                                                                                                                                                                                                   | 10           |    |
| 3.2.1. Lipozomların hazırlanması ve karakterizasyonu.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 10           |    |
| 3.2.2. Lipozomlara Doksorubisin yüklenmesi ve Tayini.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 12           |    |
| 3.2.3. Lipozomlardan Doksorubisin salınımının belirlenmesi.....                                                                                                                                                                                                                                             | 13           |    |
| 3.2.4. Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin farklı MI değerlerinde stabilite ve ekojenitelerinin belirlenmesi.....                                                                                                                                                                                 | 15           |    |
| 3.3. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin <i>in-vitro</i> etkinliğinin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültürü düzeneklerinde belirlenmesi.....                                                                                                                                         | 17           |    |
| 3.3.1. İki boyutlu (2D) hücre kültürü çalışmaları.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 18           |    |
| 3.3.2. Üç boyutlu (3D) hücre kültürü çalışmaları.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 21           |    |
| 3.4. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin biyoyumluluk testlerinin yapılması, ilaç taşıyıcı system olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde kanser teşhis ve tedavisinde kullanılması.....                                                                                                       | 23           |    |
| 3.4.1. İki farklı türde (rodent ve tavşan) hayvan modelinde biyoyumluluk çalışmalarının yapılması.....                                                                                                                                                                                                      | 23           |    |
| 3.4.2. Nude farelerde meme tümörü oluşturulması.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 27           |    |
| 3.4.3. Biyoyumluluğu denenmiş olan ilaç yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin tümör oluşturulmuş farelerde uygulanması, ultrasonografi ile görüntüleme altında mikroköpükçüklerin izlenmesi, mekanik indeks artırılarak patlatılması, ve kanser hücre ve dokusunda ilaç salınımlarının artırılması..... | 27           |    |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 37           |    |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.           | Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin hazırlanması ve karakterizasyonu .....                                                                                                                                                                                                                 | 37  |
| 4.1.1.         | Lipozomların hazırlanması ve karakterizasyonu .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 37  |
| 4.1.2.         | Lipozomlara DOX yüklenmesi ve karakterizasyonları .....                                                                                                                                                                                                                                               | 48  |
| 4.1.3.         | Lipozomların DOX yükleme kapasitelerinin belirlenmesi.....                                                                                                                                                                                                                                            | 73  |
| 4.1.4.         | Lipozomlardan DOX salınımı.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 77  |
| 4.1.5.         | Hedeflenebilir özellikte mikroköpükçüklerin hazırlanması .....                                                                                                                                                                                                                                        | 79  |
| 4.1.6.         | Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin farklı MI değerlerinde stabilite ve ekojenitelerinin belirlenmesi .....                                                                                                                                                                                 | 90  |
| 4.1.7.         | Steril mikroköpükçük Üretimi .....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 101 |
| 4.2.           | Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin <i>in-vitro</i> etkinliğinin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültürü düzeneklerinde belirlenmesi .....                                                                                                                                       | 105 |
| 4.2.1.         | Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin antikanser etkilerinin İki boyutlu (2D) hücre kültüründe incelenmesi.....                                                                                                                                                                              | 105 |
| 4.2.2.         | Üç boyutlu (3D) hücre kültürü çalışmaları .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 116 |
| 4.3.           | Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin biyoyumluluk testlerinin yapılması, ilaç taşıyıcı system olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde kanser teşhis ve tedavisinde kullanılması .....                                                                                                     | 120 |
| 4.3.1.         | İki farklı türde (rodent ve tavşan) hayvan modelinde biyoyumluluk çalışmalarının yapılması .....                                                                                                                                                                                                      | 120 |
| 4.3.2.         | Nude farelerde meme tümörü oluşturulması .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 131 |
| 4.3.3.         | Biyoyumluluğu denenmiş olan ilaç yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin tümör oluşturulmuş farelerde uygulanması, ultrasonografi ile görüntüleme altında mikroköpükçüklerin izlenmesi, mekanik indeks artırılarak patlatılması, ve kanser hücre ve dokusunda ilaç salınımlarının artırılması ..... | 135 |
| 5.             | SONUÇLAR.....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 146 |
| E K L E R..... |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 149 |
|                | İnsan Meme Kanser Hücresi, MDA-MB-231, Ve Normal İnsan Meme Hücresi, MCF10A, Kullanılarak Yapılan İn-Vitro Çalışmalar .....                                                                                                                                                                           | 150 |
| KAYNAKLAR..... |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 187 |



## TABLO LİSTESİ

| <u>Tablo</u>                                                                                                                                                                                                                     | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Tablo 1.</b> Kullanılan mikroköpükçük malzemeleri ve kimyasal yapısı. ....                                                                                                                                                    | 11           |
| <b>Tablo 2.</b> Akut toksisite klinik değerlendirme parametreleri * .....                                                                                                                                                        | 25           |
| <b>Tablo 3.</b> Nekropsi değerlendirme parametreleri .....                                                                                                                                                                       | 26           |
| <b>Tablo 4.</b> Lipid molar kompozisyonları .....                                                                                                                                                                                | 38           |
| <b>Tablo 5.</b> Deney grubu sıçanlarının biyokimyasal parametreleri .....                                                                                                                                                        | 123          |
| <b>Tablo 6.</b> Deney grubu sıçanlarının hematolojik parametreleri. ....                                                                                                                                                         | 124          |
| <b>Tablo 7.</b> Deney grubu sıçanlarının idrar parametreleri. ....                                                                                                                                                               | 124          |
| <b>Tablo 8.</b> Deney grubu sıçanlarının su-yem tüketimi, idrar volümü ve dışkı miktarı.....                                                                                                                                     | 125          |
| <b>Tablo 9.</b> Deney grubu sıçanlarının vücut sıcaklığı .....                                                                                                                                                                   | 125          |
| <b>Tablo 10.</b> Deney grubu tavşanlarının biyokimyasal parametreleri. ....                                                                                                                                                      | 126          |
| <b>Tablo 11.</b> Deney grubu tavşanlarının hematolojik parametreleri. ....                                                                                                                                                       | 127          |
| <b>Tablo 12.</b> Deney grubu tavşanlarının vücut sıcaklığı .....                                                                                                                                                                 | 128          |
| <b>Tablo 13.</b> Tüm gruptaki 35 hayvanın tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık oranlarının ortalamaları.....                                                                                                           | 137          |
| <b>Tablo 14.</b> Kruskal Wallis-H testi sonucu anlamlı çıkan grupların arasında Mann Whitney-U testi uygulanması sonucu tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması ..... | 140          |
| <b>Tablo 15.</b> Tümör boyutu 1 cm altında olan hedeflendirilmiş mikroköpükçük çalışması.....                                                                                                                                    | 143          |
| <b>Tablo 16.</b> SU-8 kalıp hazırlama aşamasında döndürme basamağında uygulanan tarif ve sonucunda elde edilen yükseklik değerleri.....                                                                                          | 152          |
| <b>Tablo 17.</b> Yüzey, hücre sayısı ve kültür süresi optimizasyonu için denenen kombinasyonlar.....                                                                                                                             | 160          |
| <b>Tablo 18.</b> Plazmid yoğunluğunun 40 µl yüksek saflıkta su içinde çözüldükten sonra nano-drop ile ölçümünden elde edilen sonuçlar. ....                                                                                      | 169          |
| <b>Tablo 19.</b> Plazmid yoğunluğunun 100 µl yüksek saflıkta su içinde çözüldükten sonra nano-drop ile ölçümünden elde edilen sonuçlar. ....                                                                                     | 169          |



**Tablo 20.** Lonza Nucleofector 4D cihazında MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarının transfeksiyonu için kullanılan değerler. .... 172

## ŞEKİL LİSTESİ

| <u>Sekil</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Şekil 1.</b> Fare kuyruk veninden verilen radyoaktif olarak işaretlenmiş DOX molekülünün tümör ve diğer organlardaki yüzde biyo dağılım profili (Silva vd. 2016). ....                                                                                                                                                   | 1            |
| <b>Şekil 2.</b> Kemoterapötik ajanlardan Doxorubisin (DOX) molekülü(Fugit vd. 2015). ....                                                                                                                                                                                                                                   | 3            |
| <b>Şekil 3.</b> Lipozom teknolojisi ile ilaç taşınımı ve kontrollü ilaç salınımı için geliştirilen lipozomal yöntemler (A) klasik lipozom tasarımı, (B) PEG’li lipozom tasarımı, (C) Ligandlar yardımıyla hedeflendirilmiş lipozom tasarımı, ve (D) teronostik lipozom tasarımı (Sercombe vd. 2015). ....                   | 4            |
| <b>Şekil 4.</b> Lipozom içerisine hapsedilmiş DOX tedavisi esnasında el-parmak uçları ve ayaklarda oluşan yaralar (“Hand-and-Foot Syndrome”)(Gordon vd. 1995). ....                                                                                                                                                         | 5            |
| <b>Şekil 5.</b> Farklı boyutlarda lipozom tanecikleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 6            |
| <b>Şekil 6.</b> Tümör mikroçevresinin akışkan yapısı(Paliwal vd. 2015). ....                                                                                                                                                                                                                                                | 6            |
| <b>Şekil 7.</b> Lipozom içerisine hapsedilmiş DOX’un membran diyaliz esnasında muhtemel iyonlaşmış molekülleri asosiye olmuş formları. Asosiye olmuş komponentlerin assosiye sabitlerinin tanımları da verilmiştir(Fugit vd. 2015). ....                                                                                    | 7            |
| <b>Şekil 8.</b> Mikroköpükçük-yardımlı ultrasonla kemoterapötik ajanın hücre içine alınımının şematik gösterimi a) Doksorubisin molekülleri plazma membranından difüzyonla geçmektedir. b) Doksorubisin, sonoporasyonla hücre membranında açılan gözeneklerden hücre içine kolaylıkla alınmaktadır.(Escoffre vd. 2011) .... | 8            |
| <b>Şekil 9.</b> Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin akış fantomu ile farklı ultrason güçlerinde kararlılıklarının tespiti içi deney düzeneği.....                                                                                                                                                                           | 15           |
| <b>Şekil 10.</b> Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçük popülasyonlarının ekojenitelerini belirlemek için deney düzeneği. ....                                                                                                                                                                                   | 16           |
| <b>Şekil 11.</b> Yüklü olmayan ve farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçükler için ultrasonik pulslar.....                                                                                                                                                                                                         | 17           |
| <b>Şekil 12.</b> Akış deney düzeneği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 18           |
| <b>Şekil 13.</b> <i>In-vitro</i> çalışmalarda kullanılacak 2D ve 3D akış düzenek tasarımı (a) Taban akış kanalı ve kapak tasarımı, (b) mikroskop altında görüntüleme düzeneği.....                                                                                                                                          | 19           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 14.</b> Sıçan metabolizma kafesi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 24 |
| <b>Şekil 15.</b> Üç boyutlu konumlandırma sistemi ve fare değerlendirme. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 31 |
| <b>Şekil 16.</b> Mikromanüpülatör sistem üzerinde milimetre ve santimetre cinsinden uzunluk birimleri bulunan ve hayvan tablasının x ve y eksenini üzerinde milimetre boyutunda hareket etmesine olanak sağlayan sistemdir. Bu sistem ile tümörün tam orta noktasına konumlandırma yapmak mümkün olmaktadır. ....                                                                    | 31 |
| <b>Şekil 17.</b> PA (bağlanma oranları) değerlerinin hesaplanması. Bu resimde de izlendiği gibi solda yer alan Pre-destruct imajlarda tümör dokusu daha ekojen iken (bağlanan +dolaşımdaki MB lar) post-destruct imajlarda (bağlı MB lar patlatılmış, sadece dolaşan MB lar var) tümör ekojenitesi daha azdır. Yukarıdaki örnekte bağlanma oranı: %94,103-%93,711 = %0,392 dir. .... | 35 |
| <b>Şekil 18.</b> Yukarıdaki örnekte ise Bağlanma oranı: %92,681- %87,312 = % 5,369 dur. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 36 |
| <b>Şekil 19.</b> Lipid ince film tabakası hazırlanması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| <b>Şekil 20.</b> Polikarbonat membranların gözenek büyüklükleri .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 39 |
| <b>Şekil 21.</b> Ekstrüder kurulumu (Avanti Lipids) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 39 |
| <b>Şekil 22.</b> Ekstrüzyon sistemi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 40 |
| <b>Şekil 23.</b> Farklı por çaplarına göre (a) lipozom boyut dağılımları (%Hacim), (b) Ortalama lipozom boyutu .....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 41 |
| <b>Şekil 24.</b> (a) Geçiş sayısının lipozom boyutu üzerine etkisi, (b) Geçiş hızının lipozom boyutu üzerine etkisi, (c) Hidratasyon konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisi, (d) Por çapının lipozom boyutu üzerine etkisi .....                                                                                                                                            | 42 |
| <b>Şekil 25.</b> Lipid türü ve konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisi. A)DSPC:Kol:DSPE-PEG2000, B) DPPC:Kol:DSPE-PEG2000, C) DSPC:Kol:DPPE-PEG2000, D) DPPC:Kol:DPPE-PEG2000 .....                                                                                                                                                                                          | 44 |
| <b>Şekil 26.</b> (a) Geçiş hızının lipozom stabilitesi üzerine etkisi, (b) Por çapının lipozom stabilitesi üzerine etkisi, (c) , (d) 80:15:05 mol oranında farklı lipid türlerinin lipozom stabilitesi üzerine etkisi .....                                                                                                                                                          | 46 |
| <b>Şekil 27.</b> (a) Zamana göre lipozomların boyut dağılımında görülen değişiklik (b) Lipozomların sıcaklık ile ölçülen ortalama boyutları .....                                                                                                                                                                                                                                    | 47 |
| <b>Şekil 28.</b> Çok katmanlı büyük lipozom veziküllerinden (MLV) tek katmanlı vezikül (LUV) oluşturma işlemi sonucu boyut dağılımı (b) lipozom'ların hazırlanması için harcanan lipid miktarına göre absorbans ve floresans değerleri .....                                                                                                                                         | 48 |

|                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 29.</b> İlaç olarak kullanılacak DOX'un farklı pH'larda ve farklı dalga boylarında (a) absorbans ve (b) floresans spektrofotometre değeri .....                                                                           | 48 |
| <b>Şekil 30.</b> DOX için absorbans ve floresans kalibrasyon eğrileri.....                                                                                                                                                         | 49 |
| <b>Şekil 31.</b> DOX için absorbans ve floresan kalibrasyon eğrileri .....                                                                                                                                                         | 50 |
| <b>Şekil 32.</b> Düşük konsantrasyonda DOX için absorbans ve floresan kalibrasyon eğrileri .....                                                                                                                                   | 50 |
| <b>Şekil 33.</b> DOX için doğrusal absorbans ve floresan kalibrasyon eğrileri.....                                                                                                                                                 | 51 |
| <b>Şekil 34.</b> (a) DOX'un lipozoma yüklenmeden önce çekilen resim, (b) lipozamlara yüklenmiş DOX resmi, ve (c) Lipozomlara DOX yüklemeye önce ve DOX yükledikten sonra lipozom boyut dağılımları.....                            | 51 |
| <b>Şekil 35.</b> Moleküler DOX ile Lipo-DOX'ların ayrıştırılmasında (a) Membran diyaliz yöntemi, (b) Sephadex kolon yöntemi.....                                                                                                   | 52 |
| <b>Şekil 36.</b> Serbest DOX ile Lipo-DOX'un farklı yüksekliklerde kolon kromatografisi ile ayrıştırmada sıvı elüsyonlardaki floresan ve DLS foton sayıları.....                                                                   | 54 |
| <b>Şekil 37.</b> Lipozomlara ilave edilen Triton X-100 miktarı ile (a) absorbans değişimi (b) boyutlardaki değişim (c) ortalama boyut ve foton sayılarındaki değişim .....                                                         | 56 |
| <b>Şekil 38.</b> (a) Saf Triton X-100'in farklı konsantrasyonlarında ortamda bulunan misel boyutu ve miktarındaki değişim, (b) lipozomların parçalanması sonucu oluşan misellerin boyut dağılımı .....                             | 57 |
| <b>Şekil 39.</b> Lipozomlara yüklenmiş toplam DOX miktarının farklı numune hacimleri ve bu hacimlerin seyreltilmesi ile tespit edilmesi.....                                                                                       | 58 |
| <b>Şekil 40.</b> Fosfat tampon çözelti konsantrasyonu içerisinde (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml serbest DOX'un absorbans ve floresans değerleri.....                                                                             | 59 |
| <b>Şekil 41.</b> Farklı konsantrasyonlarda Triton X-100'ün iki ayrı konsantrasyonda (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml serbest DOX'un absorbans ve floresans değerlerine etkisi .....                                                | 60 |
| <b>Şekil 42.</b> Farklı lipid (lipozom) konsantrasyonlarında absorbans değerleri.....                                                                                                                                              | 61 |
| <b>Şekil 43.</b> Farklı lipid (lipozom) konsantrasyonlarda iki ayrı konsantrasyonda (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml serbest DOX'un absorbans ve floresans değerlerine etkisi .....                                                | 62 |
| <b>Şekil 44.</b> Farklı konsantrasyonlarda (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> tampon çözelti konsantrasyonlarında (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml miktarlarında serbest DOX'un absorbans ve floresans değerleri..... | 63 |

- Şekil 45.** Farklı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tampon çözelti konsantrasyonlarında  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonları ile  $\text{DOXH}^+$  iyonları arasında oluşacak kompleksin hesaplanan çözünürlük sabiti değerleri..... 64
- Şekil 46.** DOX'un 50 mM fosfat tampon çözelti (PBS) ve 82 mM Triton X-100 detarjan çözeltilerde floresan kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması ..... 64
- Şekil 47.** DOX'un PBS, saf su, ve  $T_{x-100}$  ortamında kalibrasyon eğrileri ..... 65
- Şekil 48.** Izodesmik self-association model'e göre toplam DOX konsantrasyonu içerisinde bulunan monomer DOX konsantrasyonu oranı ..... 66
- Şekil 49.** Toplam ( $D_T$ ) ve Monomer ( $D_m$ ) DOX konsantrasyonlarına göre floresan kalibrasyon eğrileri ..... 67
- Şekil 50.** Monomer ( $D_m$ ) DOX konsantrasyonlarına karşı hesaplanan toplam ( $D_T$ ) DOX konsantrasyonu bağıntısını veren Polinom denklemin elde edilmesi. Denklem ancak monomer konsantrasyonu 0.035 mg/ml değerlerinden küçük ya da toplam DOX konsantrasyonu 0.11 mg/ml değerinden küçük değerler için geçerlidir. .... 68
- Şekil 51.** Seyreltme faktörüne karşı çizilen (a) toplam DOX konsantrasyonuna göre kalibrasyon grafiğinden hesaplanan toplam DOX değerleri, ve (b) Monomer DOX konsantrasyonuna göre kalibrasyon grafiğinden hesaplanan monomer DOX değerleri..... 69
- Şekil 52.** Toplam ( $D_T$ ) ve Monomer ( $D_m$ ) DOX konsantrasyonlarına göre floresan kalibrasyon ..... 70
- Şekil 53.** Farklı Lipo-DOX miktarlarında ölçülen (a) floresan ışık yoğunluk değerleri ve (b) her bir numune için hesaplanan DOX konsantrasyonları..... 71
- Şekil 54.** Farklı konsantrasyonlarda  $T_{x-100}$  ihtiva eden Lipo-DOX numeneler için hesaplanan stok çözelti DOX konsantrasyonu..... 72
- Şekil 55.** Farklı Lipo-DOX konsantrasyonlarında  $T_{x-100}$ /Lipid oranlarında tespit edilen stok DOX konsantrasyonu ..... 72
- Şekil 56.**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tampon çözeltisi ile doldurulmuş lipozomlara  $T_{x-100}$  ilavesi ile gözenek açılması, içlerindeki  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonların ortama salınması ve ortama farklı konsantrasyonlarda DOX ilave edilerek DOX'un floresan yöntemi ile tespit edilmesi ..... 73
- Şekil 57.** Lipozomların DOX yükleme kapasiteleri (a) Yüklenen DOX konsantrasyonuna göre lipozom içerisine yüklenmiş olan DOX miktarı, (b) Langmuir denkleminde verilen maksimum DOX konsantrasyonu,  $n_0$ , ve Langmuir sabiti, K. .... 75

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 58.</b> Lipozomların DOX yükleme kapasiteleri (a) Lipit konsantrasyonuna göre lipozom içerisine yüklenmiş olan DOX miktarı, (b) Langmuir denkleminde verilen maksimum DOX konsantrasyonu, $n_0$ , ve Langmuir sabiti, K. ....                                                                        | 76 |
| <b>Şekil 59.</b> Farklı konsantrasyonlarda DOX yüklü lipozomlardan DOX salınımı esnasında absorbans ve floresan değişimi .....                                                                                                                                                                                | 77 |
| <b>Şekil 60.</b> DOX yüklü lipozomlardan farklı sıcaklıklarda DOX salınımı .....                                                                                                                                                                                                                              | 78 |
| <b>Şekil 61.</b> Artan kolestrol oranlarında ve ortamda BSA varlığında DSPC lipozomlarından DOX salınımı.....                                                                                                                                                                                                 | 78 |
| <b>Şekil 62.</b> (a) içleri gaz dolu, etrafı lipid tabakasından oluşan mikroköpükçüklerin resmi, (b) mikroköpükçüklerin süspansiyeye olarak sıvı içerisinde dağılmış görüntüsü, (c) santrifüj yardımıyla yüzeyde toplanmış mikroköpükçüklerin görüntüsü. ....                                                 | 79 |
| <b>Şekil 63.</b> PE-SAv işaretli MK'lerin akış sitometrisi histogramları .....                                                                                                                                                                                                                                | 80 |
| <b>Şekil 64.</b> Akış sitometrisi ile mikroköpükçük yüzeyindeki avidin/biyotin oranının ölçülmesi. ....                                                                                                                                                                                                       | 81 |
| <b>Şekil 65.</b> Mikroköpükçüklere farklı FITC-DHPE oranlarında mikroköpükçüklerin floresan mikroskop görüntüleri. ....                                                                                                                                                                                       | 82 |
| <b>Şekil 66.</b> SAv'lenmiş %8 biyotin ihtiva eden MK'lere değişik hacimlerde Lipo-DOX eklenmesi ile elde edilen bağlanmaların floresan mikroskop görüntüleri. ....                                                                                                                                           | 84 |
| <b>Şekil 67.</b> Biotinli Lipo-DOX' ların MK arası köprü oluşturarak kümelenmelerinin şematik gösterimi .....                                                                                                                                                                                                 | 84 |
| <b>Şekil 68.</b> İlaç Yüklü MK'lerdeki DOX miktarı .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 85 |
| <b>Şekil 69.</b> Lipo-DOX bağlanmış tek bir MK'ün floresan mikroskop görüntüsü. ....                                                                                                                                                                                                                          | 86 |
| <b>Şekil 70.</b> Farklı straptavidin miktarı ile elde edilen DOX yüklenmiş lipozomların mikroköpükçüklere bağlanması.....                                                                                                                                                                                     | 86 |
| <b>Şekil 71.</b> Mikroköpükçüklerin farklı miktarlarda SAv ile inkübasyonu ile bağlanan DOX yüklü lipozomlar için normalize floresan ışık şiddeti değerleri.....                                                                                                                                              | 87 |
| <b>Şekil 72.</b> Farklı biyotin miktarı ihtiva eden mikroköpükçüklere eklenen avidin miktarlarının mikroköpükçüklere bağlanan lipo-DOX miktarları üzerine etkisi. ....                                                                                                                                        | 88 |
| <b>Şekil 73.</b> Mikroköpükçüklere yüklenecek lipo-DOX miktarlarının artırılabilmesi için parametrik çalışmalar, (a) Mikroköpükçüklere farklı miktarlarda DOX yüklü lipozom eklenmesi, (b) Mikroköpükçük yüzeyinde biyotin miktarının artırılması, (c) lipozom yüzeyinde biyotin miktarının artırılması. .... | 89 |

- Şekil 74.** (a) 96 kuyucuklu plate'de ultrasonografik işlemin uygulanması, (b) kuyucuk içindeki mikroköpükçüklerin ultrason altında patlatılmadan önce ve (c) patlatıldıktan sonraki görüntüleri. .... 90
- Şekil 75.** B-mod'da, %40 ve %100 güçte power Doppler modunda ultrason altında mikroköpükçüklerin zamanla intensitelerindeki değişim..... 92
- Şekil 76.** Farklı ultrason güçlerinde power Doppler penceresi dışı (sadece B-mod görüntüleme) (a) ve power Doppler penceresi içerisinde (yüksek MI değerleri) (b) mikroköpükçüklerin intensitelerinin zamanla değişimi. .... 93
- Şekil 77.** Farklı ultrason güçlerinde 16. saniyedeki fokus bölgesindeki intensitenin fokus dışı bölgedeki intensiteye yüzdelik oranları. .... 93
- Şekil 78.** Düşük MI değerlerinde, mikroköpükçükler sürekli bir şekilde osilasyon hareketi gösterirler (a). Yüksek MI değerlerinde ise mikroköpükçükler bozulmaya ve sonunda parçalanmaya zorlanırlar (b). .... 94
- Şekil 79.** (a)B-mod'da borunun içi hava dolu iken ve içi su ile dolduktan sonraki resim. (b) Mikroköpükçükler enjekte edildikten sonra borunun içisinden geçerkenki B-mod resmi. .... 94
- Şekil 80.** Farklı mikroköpükçük konsantrasyonlarında zaman-intensite eğrileri. .... 95
- Şekil 81.** Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklere ait Eğri Altındaki Alan (AUC)-Konsantrasyon eğrileri. .... 96
- Şekil 82.** Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklerin ekojeniteleri. .... 96
- Şekil 83.** Küvetin arka duvarından geri yansıyan akustik sinyallerin genliklerinin zamanla değişimi. .... 97
- Şekil 84.** Yüksüz ve farklı kütlelerle yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenüasyonundaki değişim..... 99
- Şekil 85.** Farklı kütlelerde yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteleri. .... 100
- Şekil 86.** Ortamda Bovine Serum Albumin (BSA) varlığında ve BSA'sız ortamda farklı PEG<sub>40</sub>St ihtiva eden mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenüasyonundaki değişim ..... 101
- Şekil 87.** Bovine Serum Albumin (BSA) varlığında ve BSA'sız ortamda farklı PEG<sub>40</sub>St ihtiva eden mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteleri..... 101
- Şekil 88.** Üretilen MK'lerin hücre kültürü, TSB, PDB ortamında ekim sonuçları: Herbir resimde soldaki tüp üreme kontrolü; sağdaki tüpler sırasıyla,..... 103
- Şekil 89.** Mikroköpükçüklerin 37 °C'de 15 günlük inkübasyondan sonundaki fotoğrafları ..... 104



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 90.</b> İki boyut (2D) hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX'un yıkanmış ortamda yassı ve yuvarlak hücreler tarafından alınması.....                                                                                                                                                                                                                      | 106 |
| <b>Şekil 91.</b> (a) İki boyutlu (2D) hücre kültüründe Lipo-DOX'ların 4T1 kanser hücrelerine alınması sonrasında hücre canlılıklarının tryphan blue ile görüntülenmesi, (b) Tryphan blue boya ile hücrelerin canlılıklarının görüntülenmesi, ardından lipo-DOX ile inkübasyonu, ve sonrasında tekrar tryphan blue ile hücrelerin canlılıklarının görüntülenmesi. .... | 107 |
| <b>Şekil 92.</b> Yassı ve yuvarlak hücrelerde DOX alım kinetiği, (a) serbest DOX, (b) Lipo-DOX. ....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 108 |
| <b>Şekil 93.</b> Farklı DOX konsantrasyonlarında (a) yuvarlak hücre ve (b) yassı hücreler üzerinde ölçülen normalize floresan intensite değerleri. ....                                                                                                                                                                                                               | 109 |
| <b>Şekil 94.</b> Farklı konsantrasyonlarda (a) DOX ve (b) lipo-DOX'ların yıkama sonrası yassı ve yuvarlak hücrelere alım miktarları. ....                                                                                                                                                                                                                             | 109 |
| <b>Şekil 95.</b> Tasarlanan akış düzeneği için mikroköpükçük çapına göre hesaplanan yükselme hızı ve 0.14 mm yükseklik için yükselme zamanı.....                                                                                                                                                                                                                      | 110 |
| <b>Şekil 96.</b> Tasarlanan akış düzeneği için 5 µm çapa sahip bir mikroköpükçüğü'n yüzey duvara ulaşmadan ulaşabileceği uzunluk .....                                                                                                                                                                                                                                | 111 |
| <b>Şekil 97.</b> Farklı akış hızlarında ve farklı boyutlarda mikroköpükçüklerin 2D akış düzeneğinde görüntülenmesi (a) 5 µm mikroköpükçüklerin akışı (b) 5-50 µm boyut dağılımında mikroköpükçüklerin akışı. İlgili videolar sisteme yüklenmiştir. ....                                                                                                               | 112 |
| <b>Şekil 98.</b> Sade mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 fare meme kanser hücrelerine bağlanma davranışları. ....                                                                                                                                                                                                                               | 113 |
| <b>Şekil 99.</b> Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 fare meme kanser hücrelerine bağlanma davranışları. ....                                                                                                                                                                                                                   | 113 |
| <b>Şekil 100.</b> Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin yuvarlak hücrelere bağlanma davranışları. ....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 114 |
| <b>Şekil 101.</b> Hücresiz ortamda MTT hücre canlılık protokolü ile hücre canlılığı ölçümü çalışması. ....                                                                                                                                                                                                                                                            | 115 |
| <b>Şekil 102.</b> Farklı serbest DOX ve lipo-DOX dozlarında iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 hücre canlılıklarının belirlenmesi, (a) 1.25 µg/ml DOX ve lipo-DOX konsantrasyonunda 1.gün, 2.gün, ve 3.gün hücre canlılıkları, (b) Farklı DOX ve lipo-DOX konsantrasyonları için elde edilen hücre canlılıkları.....                                               | 116 |
| <b>Şekil 103.</b> Matrijel yöntemiyle üretilen üç boyutlu (3D) 4T1 kanser hücre yumaklarının mikroskop görüntüleri. ....                                                                                                                                                                                                                                              | 117 |

- Şekil 104.** Üç boyutlu 4T1 hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX'ların alım hızları ve miktarları, (a) Serbest DOX'un hücreleri alış hızları, (b) Lipo-DOX'un hücrelere alış hızları, (c) 3D hücre kültüründe hücrelere alınan DOX ve Lipo-DOX miktarları. .... 118
- Şekil 105.** Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe farklı akış hızlarında hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin 4T1 hücre yumaklarına bağlanması, (a) 3D hücre yumaklarının matrijel içerisinde mikroskop görüntüsü, (b) matrijel içerisine hapsedilmiş hücre yumaklarının ve akış kanalının temsili görüntüsü. .... 119
- Şekil 106.** Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe farklı konsantrasyonlarda DOX ve lipo-DOX ile hücre yumaklarında hücrelerin canlılıkları (cell viability %)..... 120
- Şekil 107.** (a) Sıçan makroskobik dış görünümü, (b) Sakrifiye edilen hayvanda cavum abdominus organların görünümü, (c) Cavum thoracis organlarının görünümü, (d) Cavum cranii içi beyin ve beyincik görünümü ..... 122
- Şekil 108.** Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte akciğer parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (b) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte karaciğer parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (c) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte böbrek parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (d) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte beyin parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (e) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte kalp kası parankiminin olağan mikroskopik görünümü ..... 129
- Şekil 109.** Nude Fare-1 ve Nude Fare-2'de tümör oluşumunun gözlenmesi ..... 132
- Şekil 110.** Manuel yöntemle nude farenin sırtında bulunan tümör boyutlarının ölçülmesi. .... 133
- Şekil 111.** Sırtında tümör bulunan ve küçük deney hayvanı tablası üzerine konumlandırılmış nude fare..... 133
- Şekil 112.** Ciltaltı yerleşimli tümörlerin iki boyutlu ultrasonografik görüntüsü ile ilk değerlendirme gerçekleştirildikten sonra 3D görüntülemeye geçilmiştir. .... 134
- Şekil 113.** Probu hareket ettiren 3D görüntüleme motoru ve üç boyutlu konumlandırma sistemi ile tümörün değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. .... 134
- Şekil 114.** Cilt altı yerleşimli tümörlerin sınırları otomatik olarak çizilmiş ve bu sayede hacmi hesaplanabilmiştir. .... 135
- Şekil 115.** Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında akciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. Akciğer dokusundan alınan

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 138 |
| <b>Şekil 116.</b> Kontrol (A), DOX (B) , MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü. Böbrek dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.....                                                                                                                                                        | 138 |
| <b>Şekil 117.</b> Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü. Beyin dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi. Karaciğerde ise, DOX ve Lipo-DOX gruplarında, her bir gruptaki 7'şer olgunun parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde dikkati çekmiştir. .... | 139 |
| <b>Şekil 118.</b> Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. Karaciğer dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, Doxorubicin ve Lipozomal Doxorubicin gruplarında karaciğer parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde dikkati çekmiştir. ....                                                             | 139 |
| <b>Şekil 119.</b> Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 140 |
| <b>Şekil 120.</b> (a) MDA M1231 hücreleri %100 +2 ekspresyon; (b) 4T1 hücreleri %30 +1 düzeyde ekspresyon göstermiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 144 |
| <b>Şekil 121.</b> Tabanı (siyah ile gösterilen) ve kanalı (beyaz ile gösterilen) manyetik bez kullanılarak oluşturulmuş kalıp ve akış için boru girişini sağlamak amacıyla kullanılan tel. Kanal genişliği: 1 cm, yüksekliği 1mm. ....                                                                                                                                                                    | 150 |
| <b>Şekil 122. A.</b> İki kanal içeren çip üretimi için manyetik bezden hazırlanan kalıp. Delgeç yarıçapı: 0.7mm, kanal genişliği: 5mm, kanal yüksekliği: 1mm. <b>B.</b> İki kanallı kalıptan üretilen PDMS çip. ....                                                                                                                                                                                      | 151 |
| <b>Şekil 123.</b> Üç boyutlu LOC (Lab on a chip) oluşturma ve kalıp hazırlanma basamakları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 151 |
| <b>Şekil 124.</b> İğne kullanılarak üç boyutlu LOC' ta oluşturulmaya çalışılan akış kanalı görüntüleri. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 152 |
| <b>Şekil 125.</b> UV litografi yöntemi ile kalıp hazırlama. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 153 |
| <b>Şekil 126.</b> Örnek kanal kalınlığı hesaplama.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 155 |
| <b>Şekil 127. A.</b> Litografi tekniğiyle üretilmiş kanal genişliği 0.5, 1, 1.5 cm ve yüksekliği 240 µm olan SU-8 kalıp. <b>B.</b> Oluşturulan SU-8 kalıbın yan akış kanalı için kullanılan tel ile gösterimi.....                                                                                                                                                                                        | 156 |

- Şekil 128.** A. Her bir kanal genişliği 1 cm ve yüksekliği 185 µm olan SU-8 kalıp. B. 2 boyutlu LOC. .... 156
- Şekil 129.** 3 boyutlu LOC üretimi için geliştirilen maske tasarımı. A. Maske tasarımları B. UV litografi basamağı sonrası elde edilen kalıp C. Cam üzerine sabitlenmiş PDMS LOC..... 156
- Şekil 130.** 3 boyutlu ortamda iki farklı hücre hattının birlikte kültürüne ve akışa olanak sağlayan LOC tasarımına hücre yüklenmesi 3 boyutlu LOC'un hazırlanma basamakları..... 157
- Şekil 131.** Hücre sayımı için kullanılan hemositometre. .... 159
- Şekil 132.** PDMS, PLL kaplı PDMS, FN kaplı PDMS, PLL+FN kaplı PDMS yüzeyi üzerinde 4X ve 10X objektifte çekilmiş hücre fotoğrafları. .... 161
- Şekil 133.** PLL ve 0.025 mg/ml konsantrasyonda FN kaplı PDMS yüzey üzerinde, farklı hücre konsantrasyonları ve kültür sürelerinde 4X, 10X, 20X, 40X objektif kullanılarak çekilen hücre fotoğrafları. .... 161
- Şekil 134.** PLL ve 0.0125 mg/ml konsantrasyonda FN kaplı PDMS yüzey üzerinde, farklı hücre konsantrasyonları ve kültür sürelerinde 4X, 10X, 20X, 40X objektif kullanılarak çekilen hücre fotoğrafları. .... 162
- Şekil 135.** PLL+FN kaplanmış PDMS yüzey üzerinde  $3 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyonunda 6 saat kültürlenmiş MDA-MB-231 hücrelerinin farklı günlerde 4X, 10X, 20X, 40X objektifle çekilmiş fotoğrafları..... 163
- Şekil 136.** PLL+FN kaplanmış PDMS yüzey üzerinde  $3 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyonunda 6 saat kültürlenmiş MCF10A hücrelerinin farklı günlerde 4X, 10X, 20X, 40X objektifle çekilmiş fotoğrafları..... 164
- Şekil 137.** MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin MCF10A, MDA-MB-231 kültür ortamlarındaki görüntüleri. .... 165
- Şekil 138.** 3 boyutlu deneylerde kullanılacak olan tasarımda kanalları ayıran sütunların gelişimi. .... 166
- Şekil 139.** Birlikte kültürü yapılan MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin LOC içinde 1-3-8 ve 13. günlerindeki görüntüleri. Hücreler, akış olmayan LOC içinde 3. günde morfolojik olarak sağlıklı gözlemlenirken daha sonraki günlerde hücrelerin akış kanalına doğru geçiş yaptıkları gözlemlendi. .... 167
- Şekil 140:** Tek bakteri kolonisi elde etmek için katı besi yerine ekim. Deneylerde stoktan alınan bakteriler LB-kanamisin katı besi yerine çizikler oluşturularak ekildi. .... 168
- Şekil 141.** İzole edilen plazmidlerin kolay transfekte olduğu bilinen 293T hücrelerde denemesi. Hücreler mRFP, acGFP ve EGFaktin içeren plazmidlerle transfekte edildi ve floresan mikroskopta görüntülendi. .... 170

- Şekil 142.** Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak yapılan transfeksiyon işleminin basamaklarının şematik gösterimi..... 170
- Şekil 143.** MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak MCF10A hücreleri için sırasıyla GFP, AcGFPN1 ve EGFP2-LifeAct-7, MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla GFP, EGFP2-LifeAct-7 ve mcherry ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz kontrast görüntüleri. .... 172
- Şekil 144.** MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak sırasıyla GFP ve RFP ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz kontrast görüntüleri. .... 173
- Şekil 145.** MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin “Fugene” yöntemi kullanılarak sırasıyla mRFP ve GFP ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz kontrast görüntüleri. .... 174
- Şekil 146.** MDA-MB-231 hücrelerinin Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak GFP ve EGFP ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz-kontrast görüntüleri. .... 175
- Şekil 147.** 24 kuyulu sistem içerisindeki *MDA-MB-231* hücrelerine uygulanan farklı ilaç dozları için zamana bağlı faz-kontrast hücre fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir. .... 176
- Şekil 148.** 24 kuyulu sistem içerisindeki *MDA-MB-231* hücrelerinin 2.5µM, 5µM, 10µM ilaç konsantrasyonları için 72 saat sonunda çekilen sırasıyla faz-kontrast, doksorubisin ve birleştirilmiş fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir. .... 177
- Şekil 149.** 24 kuyulu sistem içerisindeki 30000 hücre/ml yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerinin farklı dozların uygulanmasından ardından 24 saat sonunda çekilen faz-kontrast ve doksorubisin fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir. .... 178
- Şekil 150.** 24 kuyulu sistem içerisindeki 200000 hücre/ml yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerine farklı dozların uygulanmasının ardından 24 saat sonunda çekilen faz-kontrast ve doksorubisin fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir. .... 178
- Şekil 151.** 24 kuyulu sistem içerisindeki 200000 hücre/ml yoğunluğundaki *MDA-MB-231* hücrelerinin farklı dozların uygulanmasından ardından 24 saat sonunda çekilen faz-kontrast ve doksorubisin fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir. .... 179
- Şekil 152.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MDA-MB-231* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 24 saat görüntüleri. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir. .... 180

- Şekil 153.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 24 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 180
- Şekil 154.** 2B çiplerde 24 saatte doksorubisin hücre içine alımının sayısal incelenmesi ..... 181
- Şekil 155.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MDA-MB-231* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 48 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 181
- Şekil 156.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 24 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 182
- Şekil 157.** 2B çiplerde 48 saatte doksorubisin hücre içine alımının sayısal incelenmesi ..... 182
- Şekil 158.** 2B çiplerde 24 ve 48 saatte doksorubisin hücre içine alımının karşılaştırmalı sayısal incelenmesi..... 183
- Şekil 159.** 24 kuyulu sistem içerisinde 1:1 oranında *MCF10A*-matrijel karışımı için farklı dozlarda ilaç uygulanarak elde edilen hücrelerin faz-kontrast, doksorubisin ve birleştirilmiş fotoğrafları. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 184
- Şekil 160.** 24 kuyulu sistem içerisinde 1:1 oranında *MDA-MB-231*-matrijel karışımı için farklı dozlarda ilaç uygulanarak elde edilen hücrelerin faz-kontrast, doksorubisin ve birleştirilmiş fotoğrafları. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 184
- Şekil 161.** 3B ortamda 24 saatte doksorubisin hücre içine alımının sayısal incelenmesi. .... 185
- Şekil 162.** Üç boyutlu düzeneklerde *MDA-MB-231* hücrelerinin farklı dozlarda ilaçlar uygulanmasıyla 24, 48, 72 saat faz-kontrast görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 185
- Şekil 163.** Üç boyutlu düzeneklerde *MCF10A* hücrelerinin farklı dozlarda ilaçlar uygulanmasıyla 24, 48, 72 saat faz-kontrast görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 186
- Şekil 164.** Üç boyutlu düzeneklerde *MDA-MB-231*'ne 10 $\mu$ M konsantrasyonda ilaç uygulanması sonucunda elde edilen 72 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir. .... 186



## ÖZET

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar yalnızca hastalıklı hücreleri değil, aynı zamanda vücudun tüm bölgelerine yayılarak sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. İlacın tüm vücuda dağılması yerine doğrudan kanserli bölgeye ulaştırılması ve hedef bölgede hücre içine alımını kolaylaştırıcı alternatif yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada, ilk yerli üretim ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin kanser teşhis ve lokal tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bir kemoterapötik ajan olan Doksorubisin (DOX) lipozomlara yüklenmiş, avidin-biyotin köprüsü ile mikroköpükçüklere konjüge edilmiş, ve meme kanser hücresine spesifik bir belirteç olan EGF ile işaretlenerek hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçükler hazırlanmıştır. Mikroköpükçük başına  $4.5 \cdot 10^{-8}$   $\mu\text{g}$ -DOX yüklenebilmiştir. *In-vitro* ve biyouyumluluk testlerinin ardından, DOX yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçükler nüde farede *in-vivo* tümör modeli üzerinde etkinliği araştırılmıştır. Nüde farede kuyruk veninden verilen ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin tümöre ulaştığı ultrasonografi ile izlenmiş ve yüksek mekanik indeks (MI) değerlerinde mikroköpükçükler patlatılarak ilacın tümör bölgesinde dağılması sağlanmıştır. Boyutu 8 mm'den büyük tümörlerde tümör boyutunda küçülme ve %40'lara varan nekroz gözlenmiştir. Tümör dokusunda nekroz oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanması mikroköpükçüklerin kanser tedavisinde etkinliğini göstermektedir. Sonuçlar hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin kanser teşhis ve tedavisinde kullanılabileceğine dair umut vericidir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, kemoterapi, ultrasonografi, ultrason, kontrast maddesi, mikroköpükçükler, lipozomlar, ilaç taşınımı, moleküler görüntüleme



## ABSTRACT

Chemotherapeutic drugs used in cancer treatment affect not only cancer cells but also healthy cells by spreading to all parts of the body. It is important to deliver the drug directly to the cancerous region rather than to the whole body and to develop alternative methods to facilitate intracellular uptake in the target region. In this study, microbubbles as ultrasound contrast agent, the first national product, was investigated for their usefulness in diagnosis and local cancer treatment. First, Doxorubicin (DOX) as a chemotherapeutic agent was loaded into liposomes, followed by their conjugation to microbubbles via avidin-biotin bridge, then, targeted microbubbles were prepared by labeling with EGF markers specific to breast cancer cells.  $4.5 \cdot 10^{-8}$   $\mu\text{g}$ -DOX could be loaded per microbubble. Following *in-vitro* and biocompatibility tests, the efficacy of the DOX-loaded targeted microbubbles was investigated in *in-vivo* tumor model in nude mice. The ultrasound contrast agents administered via the tail vein in the nude mice were followed by ultrasonography for their reach to the target site and destructed at high mechanical index values to be able to release their drug contents. A decrease in tumor size and up to 40% necrosis were observed in tumors larger than 8 mm in size. Significant difference in tumor necrosis compared to the control group indicates that the microbubbles are effective in cancer treatment. The results are promising such that the targeted drug loaded microbubbles can be used in the diagnosis and cancer treatment.

**Keywords:** Cancer, chemotherapy, ultrasonography, ultrasound, contrast agent, microbubbles, liposomes, drug delivery, molecular imaging

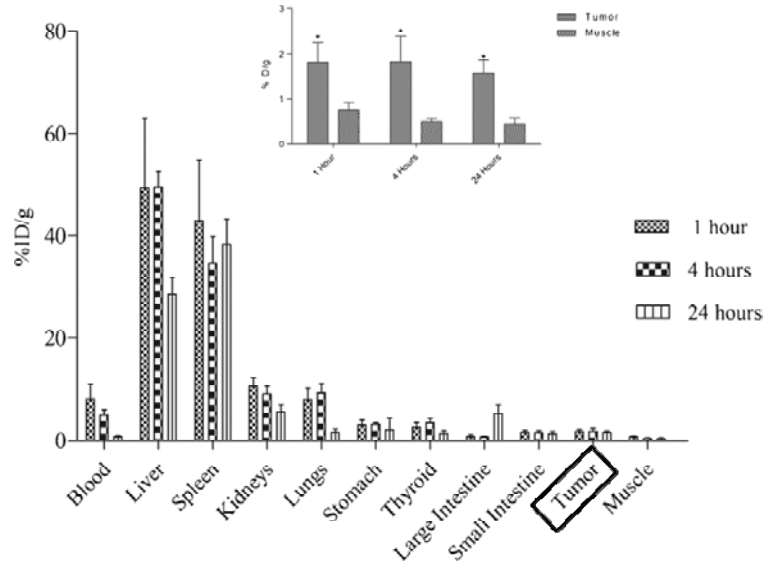




## 1. GİRİŞ

Kanser ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sırada yer almaktadır. Önümüzdeki 10 yıl içerisinde de ölüm nedenleri arasında 1. sırayı alacağı öngörülmektedir. En sık görülen kanser türü ise kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise prostat kanseri olmaktadır(Jemal vd. 2008, Siegel vd. 2012). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçların yalnızca hastalıklı hücreleri değil, aynı zamanda vücudun tüm bölgelerine yayılarak sağlıklı hücreleri de etkilediği, hastada nefrotoksisite ve nötropeni gibi önemli yan etkilere sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ilacın tüm vücuda dağılması yerine doğrudan kanserli bölgeye ulaştırılması ve hedef bölgede hücre içine alımı için alternatif sistemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Damardan (intra venöz, *iv*) verilen Doksorubisin (DOX) gibi antikanser ilaçların ancak max.%2'si tümör'e ulaşabilmektedir(Tinkov vd. 2010, Silva vd. 2016). Vücuda verilen ilaçların %98'i gibi büyük bir kısmı ise diğer sağlıklı organlara ve dokulara dağılmaktadır(Tinkov vd. 2010, Silva vd. 2016). Örnek olarak, fare kuyruk veninden *iv* olarak verilen radyoaktif olarak işaretlenmiş DOX molekülünün tümör ve diğer organlara yüzde dağılım miktarları **Şekil 1**'de gösterilmektedir(Silva vd. 2016). Şekilden görüleceği üzere, tümör'ü iyileştirmek üzere enjekte edilen DOX'un küçük bir kısmı tümör bölgesinde görülürken, büyük bir kısmı ise diğer organlara dağılmaktadır(Tinkov vd. 2010, Silva vd. 2016). Tümörün iyileşmesinde ilacın maksimum oranda tümöre hedeflendirilmesi esastır. Antikanser ilaçların sağlıklı dokulara ulaşması ne yazık ki, kemoterapi seanslarında hastalar acılı bir süreç yaşamaktadırlar.



**Şekil 1.** Fare kuyruk veninden verilen radyoaktif olarak işaretlenmiş DOX molekülünün tümör ve diğer organlardaki yüzde biyo dağılım profili (Silva vd. 2016).



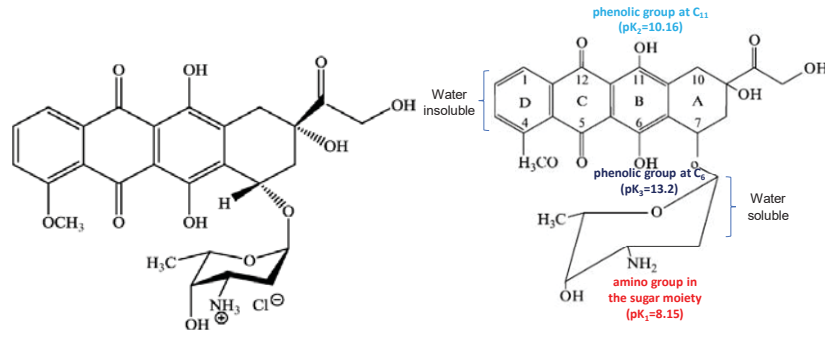
Ultrason kontrast ajanı mikroköpükçükler lokal kanser tedavisinde kullanılabilir. Mikroköpükçükler, mikron boyutlarındaki gaz kabarcıklarının stabilize eden bir zarla enkapsüle edilmiş hali olup, ultrason işlemi sırasında sistemik dolaşıma enjekte edildiklerinde kontrast yaratarak, elde edilen görüntünün netliğini ve çözünürlüğünü artırmaktadır. Böylece daha çok hastalığa doğru ve erken tanının konmasına olanak sağlamaktadır. Ultrasonda görüntü kalitesinin artırılması amacı ile, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA onay almış albümin bazlı Optison®, lipid bazlı Definity®, ve Avrupa'da ilgili ilaç dairesince onaylı lipid bazlı SonoVue® kullanılmaktadır. Ultrason kontrast ajanlarının Türkiye'de üretimleri yoktur. Mevcut ajanlar pahalı olduklarından ülkemizde ne klinik ne de klinik öncesi araştırmalarda kullanımları yoktur ya da yok denecek kadar azdır. Ayrıca, görüntüleme amaçlı kullanılan bu ajanlar hedeflenebilir özellikte değildir, tasarımlarının ayrıca yapılması gerekmektedir.(Mayer ve Grayburn 2001) Bu ajanların stabiliteilerinin de oldukça düşük olduğu görülmektedir.(Moravi vd. 1997, Guiot vd. 2006, Farook vd. 2009, Mulvana vd. 2010, Williams vd. 2011) Bunun yanında, polimerik ve albümin bazlı mikroköpükçüklerin, lipid bazlı olanlara kıyasla, başka dezavantajları da bulunmaktadır.

TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 no'lu proje ile ilk yerli üretim lipid bazlı mikroköpükçüklerin laboratuvarımızda üretimleri başarılmıştır. İkinci aşama olarak, TÜBİTAK tarafından desteklenen 113M270 no'lu proje ile, bu mikroköpükçüklerin ultrason altında *in-vitro* ve *in-vivo* karakterizasyonları yapılmıştır. Üçüncü aşama olan mevcut çalışmada, ilk yerli üretim hedeflendirilebilir özellikte ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklere kemoterapik ilaç yüklenmesi, kanser hücre ve dokusuna hedeflendirilmesi, ilacın hedeflenen bölgeye taşınması, ultrason ile görüntülenmesi, hedef bölgede mikroköpükçüklerin patlatılması, yine ultrason altında terapötik ajanın hedef bölgede kanser hücre ve dokusuna salınımının artırılması, böylece özellikle kanser tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır.

Çalışmalarda, kemoterapötik ajan olarak Doksorubisin (DOX) ve bir kanser türüne örnek olmak üzere meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Doksorubisin lipozomlara yüklenmiş ve meme kanser hücrelerine spesifik belirteçlerle işaretlenerek mikroköpükçüklere bağlanmıştır. Hazırlanan DOX yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçükler *in-vitro* koşullarda iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültüründe ve ultrason altında bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde (nude mice) oluşturulmuş tümör modeli üzerinde etkinlikleri incelenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kanser çağımızın ölümcül hastalıklarından biridir. Kanser tedavisinde, tümörün ameliyatla yerinden çıkartılması, radyoterapi, hedeflendirilmiş terapiler, ve kemoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Kemoterapi için farklı metabolik yolları inhibe eden farklı türden ajanların geliştirilmesi bir çok çalışmaya konu olmaktadır(Hanahan ve Weinberg 2011). Kemoterapötik ajanlardan biri olan doksorubisin (DOX) kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DOX'un kimyasal yapısı **Şekil 2**'de gösterilmekte olup fizyolojik koşullarda (pH=7.2'de) pozitif yüklüdür.

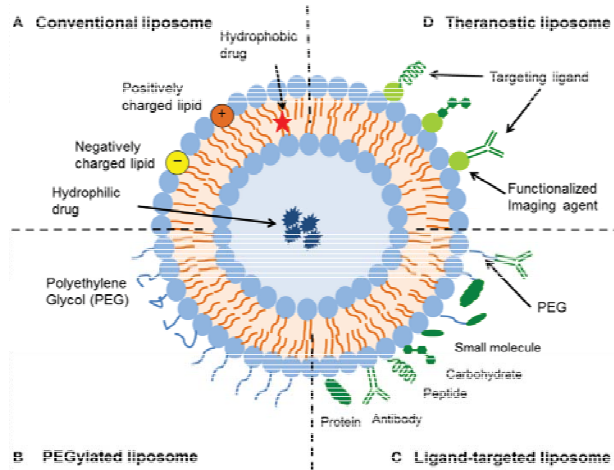


**Şekil 2.** Kemoterapötik ajanlardan Doxorubisin (DOX) molekülü(Fugit vd. 2015).

Doksorubisin, çok geniş bir etki yelpazesine sahip, kendi başına veya diğer ajanlarla kombine halinde reçete edilebilen, antrasiklin sınıfının en güçlü üyelerinden bir antikanser ilaçtır(Escoffre vd. 2011, Escoffre vd. 2013). Geniş aktivite yelpazesi nedeniyle göğüs, prostat, rahim, yumurtalık, karın ve karaciğer tümörleri, çocukluk çağı katı (solid) tümörleri, osterosarkomlar ve yumuşak doku sarkomları ve Kaposi sarkomu gibi katı tümörlerin ve akut miyeloblastik ve Lenfoblastik lösemi gibi hematolojik malignitelerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır(Cutts vd. 1996, Carvalho vd. 2009, Escoffre vd. 2011). Yapılan çeşitli çalışmalarda, DOX'un özellikle erken evre meme kanserinde standart terapi olarak kullanıldığı bilinmektedir(Rivankar 2014). Klinik uygulamada serbest DOX kullanımı, oluşturduğu bir çok ciddi sistemik yan etkiler nedeniyle halen oldukça sınırlıdır(Escoffre vd. 2013). DOX tümörde hasar oluşturmasının yanı sıra yan etki olarak kardiyotoksisiteye ve nefrotoksisiteye neden olmaktadır(Villanueva vd. 2007). Doxorubisin ile ilgili bilinen en önemli yan etkinin kardiyak problemler olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir(Octavia vd. 2012, Rivankar 2014). Rivankar ve arkadaşlarının(Rivankar 2014) yaptığı bir çalışmada, DOX'un kümülatif dozunun 450 mg/m<sup>2</sup>'de kardiyak hasara yol açmazken, 550 mg/m<sup>2</sup>'de kardiyak hasara yol açtığını göstermektedir. Bu durum, yüksek doz DOX kullanılması gereken hastalarda önemli oranda risk teşkil etmektedir. Ek olarak, serbest DOX'un etkinliği, P-

glikoprotein'den ve topoizomerez II direncinden kaynaklanan çoklu ilaç direnci nedeniyle de engellenmektedir(Swift vd. 2006). Doxorubisin'in kullanımını sınırlayıcı etkilerinin, lipozomların terapötik olarak kullanımıyla aşılabileceğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır.

Serbest-DOX tedavisinden doğan dezavantajları gidermek üzere, DOX'un lipozomlara hapsedilerek vucuda gönderilmesi sağlanmıştır(Eliasz ve Szoka 2001, Gorodetsky vd. 2004, Liang ve Kiick 2016). Bu amaçla lipozomal-DOX (lipo-DOX) kanser tedavisinde kullanılmaktadır(Poirier vd. 2002, Zhao vd. 2013). Böylece ilacın vücut içerisinde uzun süre dolaşmasının ve ilacın kontrollü salınımının önü açılmıştır. **Şekil 3**'de lipozom teknolojisi ile ilaç taşınımı ve kontrollü ilaç salınımı için geliştirilen lipozom tasarımları görülmektedir(Sercombe vd. 2015). Klasik lipozom tasarımında, **Şekil 3(A)**, ilaç ya hidrofobik çift katman kabuk içerisinde ya da lipozom yüzeyinde bulunan olası pozitif ve negatif yükler vasıtasıyla lipozom yüzeyine adsorblanarak yapılmaktadır(Yang vd. 2016). Lipozomların vucutta dolaşımı esnasında makrofajlara hedef olmaları lipozomların PEG molekülleri ile kaplanmasını gerektirmiştir, **Şekil 3(B)**(Masaka vd. 2014). Lipozomlara antibadi gibi moleküllerin bağlanması ile, **Şekil 3(C)**'de görüleceği üzere, hedeflendirilmiş (targeted) lipozomların sentezlenmeleri başarılıdır(Li vd. 2009). Yine hedeflendirilmiş moleküller ile lipozomların tanı (teranostik) amaçlı kullanılmasına imkan vermiştir, **Şekil 3(D)**(Lee vd. 2016). Böylece, lipozomlar hedeflendirilebilme, ilaç taşıma, tanı, ve hedef bölgelere tutunarak kontrollü ilaç salınımı amacıyla kullanılabilirler.



**Şekil 3.** Lipozom teknolojisi ile ilaç taşınımı ve kontrollü ilaç salınımı için geliştirilen lipozomal yöntemler (A) klasik lipozom tasarımı, (B) PEG'li lipozom tasarımı, (C) Ligandlar yardımıyla hedeflendirilmiş lipozom tasarımı, ve (D) teronostik lipozom tasarımı (Sercombe vd. 2015).

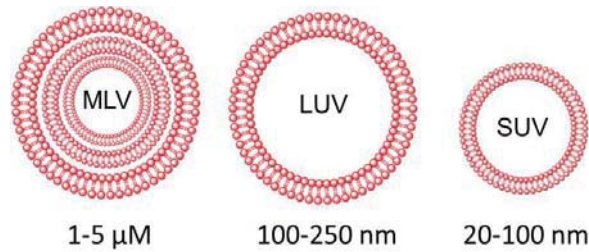
Lipozom kullanmanın başlıca avantajlarından biri, lipozomları (vezikülleri) oluşturan fosfolipidlerin doğal kaynaklardan çıkarılması ve vücut için güvenli olmasıdır. Buna ek olarak,

fosfolipid çift tabakanın doygunluk derecesi, ilaç salınım oranını değiştirmek üzere modifiye edilebilir(Rivankar 2014, Ghannam vd. 2016). Dahası, lipozomlar, retiküloendotelyal sistem tarafından tanınmayı önlemek için yüzeylerinde PEG (polietilen glikol) zincirleri ile modifiye edilebilir(Villanueva vd. 2007). Lipozomların kullanılmasıyla yan etkilerin azalmasının görölmesi üzerine, insanlarda kullanımına yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir(Torchilin 2007). Lu ve arkadaşları(Lu vd. 2011), lipozomal Doksorubisin'in, tedavi ile ilişkili yan etkiler yönetilebilir olduğu için evre 1-3 invaziv meme kanserlerinde kullanılabileceğini göstermiştir. Ghannam ve arkadaşları(Ghannam vd. 2016), DOX yüklü lipozomların, bazı katı tümörlerde, serbest DOX ile karşılaştırdığında daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Halihazırda, 1995 yılında FDA tarafından onaylanmış DOXIL® adıyla bilinen ve lipozom içerisine enkapsüle edilmiş doksorubisin kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, lipozomların ilaç taşıma ve kontrollü salınımı yanında hiç de arzu edilmeyen bazı dezavantajları bulunmaktadır. **şekil 4**'de görüleceği üzere, yapılan klinik çalışmalarda DOX'un daha az kardiyotoksik etki göstermesine rağmen, mukoza iltihabı, el ve ayaklarda şişme, kızarıklık, ağrı gibi yan etkiler görölmüştür.(Lyass vd. 2000, Patil vd. 2008) Bunun, DOXIL®'in hastanın istenmeyen bölgelerde damar endotelinde birikmesinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Yapılan çalışmalar ultrason uygulandığında kemoterapi ilacının tümör dokusuna çok daha kolaylıkla difüze olduğunu göstermektedir.(Gao vd. 2004, Gao vd. 2005) Ancak, DOXIL®, meme kanseri tedavisinde kullanıldığında aynı etki görölememiştir. Beklenmedik bu sonuç, DOXIL®'in tumor dokusuna karşı hedeflendirilmemiş olmasına atfedilmiştir.(Frenkel vd. 2006)



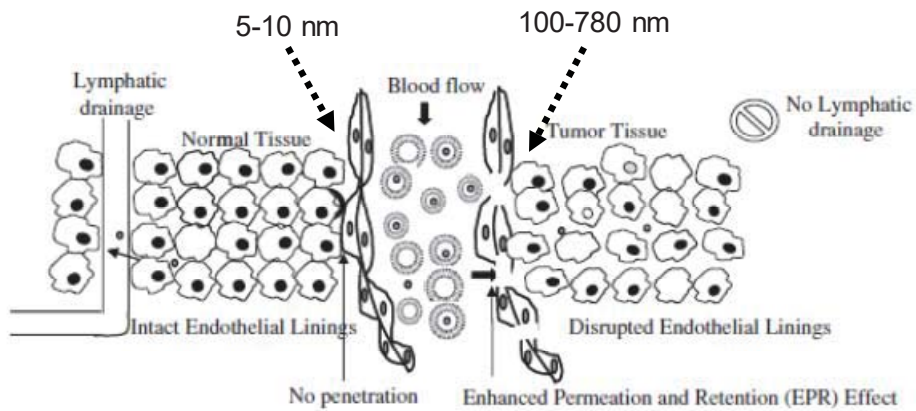
**şekil 4.** Lipozom içerisine hapsedilmiş DOX tedavisi esnasında el-parmak uçları ve ayaklarda oluşan yaralar ("Hand-and-Foot Syndrome")(Gordon vd. 1995).

Lipozomlar, fosfolipidlerin suda kendiliğinden oluşturduğu içi su dolu lipid çift katmanlı (bilayer) kürecikler olarak tanımlanır. Fosfolipidlerin amfilik (hidrofilik ve hidrofobik) yapısı, sulu ortamda çözünmüş bileşenlerin bilayer membran içinde tutuklanmasına imkan sağlar. Lipozomlar biyolojik membran uygulamaları için bir model olarak kullanıldığı gibi ilaç taşıma sistemlerinde de kullanılmaktadır. Hedef dokuya yönlendirilebilmesi, daha yüksek çözünürlük sağlanması, farmakokinetik etkileri artırması, hidrofobik, hidrofilik ve amfipatik ilaçların taşınımına imkan sağlanması ve tutuklanmış ajanın toksisitesini düşürmesi, lipozomların ilaç taşıma için kullanımının avantajları arasındadır. Biyolojik membranlarla büyük ölçüde benzerlik gösterdikleri için biyoyumlu ve biyobozunur olmalarının yanı sıra toksik ve immunojenik değildirler. **Şekil 5**'de farklı boyutlarda hazırlanabilecek lipozom tanecikleri görülmektedir. Çalışmalarda genellikle 60 nm ile 200 nm boyutlarında lipozomlar kullanılmaktadır.



**Şekil 5.** Farklı boyutlarda lipozom tanecikleri

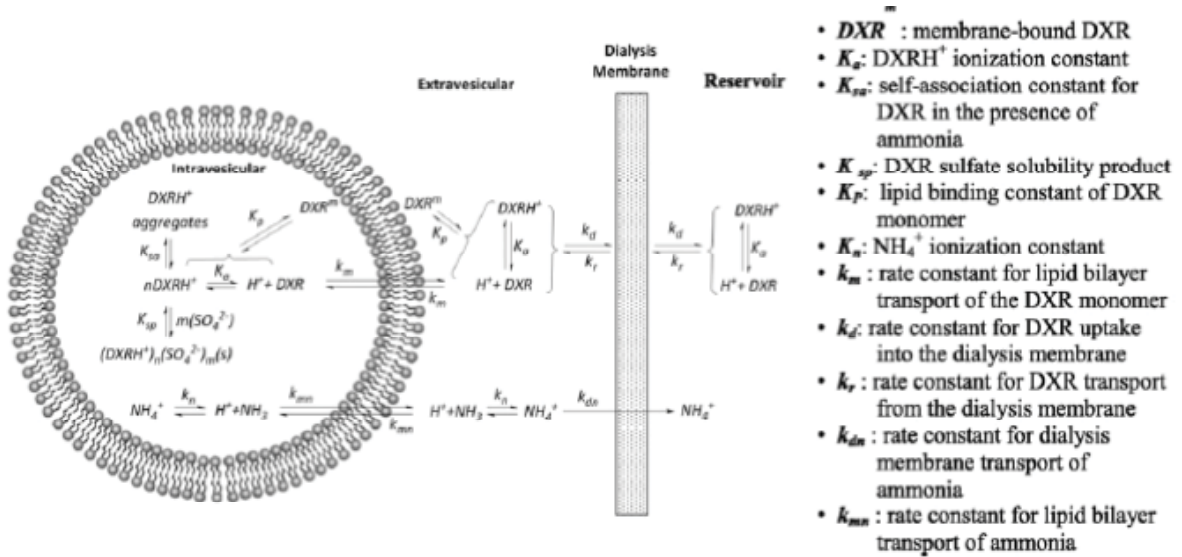
Lipozomların nano boyutlarda sentezlenmesinin amacı, **Şekil 6**'de görüleceği üzere, tümör mikroçevresinin akışkan bir yapıda olması ve sıralanmış epitel hücreler arasındaki boşluğun 100-780 nm civarında gözeneklerden oluşmasıdır(Deshpande vd. 2013). Normal dokularda epitel hücrelerin oluşturduğu boşluk aralıkları ise 5-10 nm civarındadır(Deshpande vd. 2013). Nano-boyutlarda lipozomların tümör mikroçevresine rahatlıkla girebileceği ve bu mikroçevrede hapsedilebileceği değerlendirilmektedir.



**Şekil 6.** Tümör mikroçevresinin akışkan yapısı(Paliwal vd. 2015).



DOX'un lipozomlar içerisine hapsedilmesi ve serbest DOX'un membran diyaliz yöntemi ile ortamdaki uzaklaştırılması işleminde olabilecek muhtemel mekanizmalar **Şekil 7**'de gösterilmektedir(Fugit vd. 2015). Şekilde ayrıca DOX'un muhtemel iyonlaşmış ve asosiyel olmuş formları da görülmektedir. Şekilden görüleceği üzere, DOX pH=8.15'den düşük pH'larda, örneğin pH=7.2'de, daha çok pozitif yüklü iyon ( $DXRH^+$ ) olarak bulunmaktadır. DOX'un ancak %10'u nötral formda ( $DXR^0$ ) bulunur ve membrandan rahatça geçebilen formu da bu yüksüz (protonlanmamış) formudur.  $DXRH^+$  kendi arasında asosiyel olarak topaklaşma (agregat) oluşturduğu rapor edilmektedir(Csuhai vd. 2015, Fugit vd. 2015). Aynı zamanda, ortamda bulunan  $SO_4^-$  iyonları ile birleşerek çökelti (presipitasyon) oluşturmaktadır(Csuhai vd. 2015, Fugit vd. 2015). Hem  $DXRH^+$  ve hem de  $DXR$  lipozomların yapıtaşı olan fosfolipidlere adsorbe olabilmektedirler(Csuhai vd. 2015, Fugit vd. 2015). Lipozomların içerisine yüksüz DOX'un alınması bir pH gradyenti etkisinde yine yüksüz form olan amonyak ( $NH_3$ ) molekülü ile değişim vasıtasıyla olmaktadır(Csuhai vd. 2015, Fugit vd. 2015).

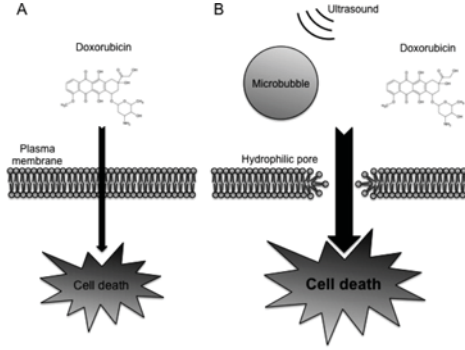


**Şekil 7.** Lipozom içerisine hapsedilmiş DOX'un membran diyaliz esnasında muhtemel iyonlaşmış molekülleri asosiyel olmuş formları. Asosiyel olmuş komponentlerin asosiyel sabitlerinin tanımları da verilmiştir(Fugit vd. 2015).

Hedeflendirilmiş ultrason kontrast ajanların terapötik amaçlı olarak ilaç, gen, siRNA, ya da DNA gibi moleküllerle yüklenerek lokal madde transferinde kullanılabilme potansiyeline sahip olmaları, vücut içinde ilaç/gen/DNA vb. madde salınımı sırasında ultrason ile izleme olanağı sağlamaları, ve gereklilik halinde yine ultrasonografi ile hedef bölgede patlatılması sonucu madde salınımının lokal kontrolüne imkan vermesi, mikroköpükçüklerin önemini artırmaktadır.(Geis vd. 2012, Martin ve Dayton 2013) Üstelik, **Şekil 8**'de görüldüğü gibi, mikroköpükçükler ultrason altında kaviteasyon etkisi ile hücre zarında geçici gözenekler



oluşturarak ilacın veya ilaç yüklü taşıyıcı sistemlerin hücre içine alımını kolaylaştırmaktadır.(Tsunoda vd. 2005, Escoffre vd. 2011, Kooiman vd. 2011, Forbes ve O'brien 2012)



**Şekil 8.** Mikroköpükçük-yardımlı ultrasonla kemoterapötik ajanın hücre içine alımının şematik gösterimi a) Doksorubisin molekülleri plazma membranından difüzyonla geçmektedir. b) Doksorubisin, sonoporasyonla hücre membranında açılan gözeneklerden hücre içine kolaylıkla alınmaktadır.(Escoffre vd. 2011)

Escoffre ve ark. tarafından MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ile yapılan bir seri çalışmada, meme kanser hücre kültürüne DOX eklenerek, yalnızca ultrason veya yalnızca mikroköpükçük varlığında ultrason uygulandığında kanser hücresi ölüm oranları sistematik olarak irdelenmiş ve mikroköpükçük varlığında ultrason uygulandığında DOX'un kanser hücresi içine alımının daha etkin olduğu görülmüştür. Hatta artan ultrason gücü ile DOX difüzyonu daha da artmıştır.(Escoffre vd. 2011) Aynı çalışmada, farklı mikroköpükçük türleri kullanıldığında da etkinin farklı olduğu görülmüştür. Polilaktid-Kabuklu PEG ve Vevo Micromarker mikroköpükçüklerin U-87 MG ve MDA-MB-231 hücrelerinde DOX salınımı için en iyi mikroköpükçükler olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, ticari olarak satılan Albunex®, Optison® ve Levovist® mikroköpükçüklerinde yine statik ortamda gen transferinde etkinliklerinin farklı olduğu görülmüştür.(Li vd. 2003)

Lentacker ve ark. yaptıkları bir çalışmada, DOX yüklü mikroköpükçüklerin DOX yüklü lipozomlardan en az iki kat daha öldürücü olduğunu melanoma hücrelerinde göstermişlerdir.(Lentacker vd. 2010) Bu çalışmada kullanılan ilaç yüklü mikroköpükçükler kanser hücrelerine spesifik belirteçlerle işaretlenmiş değildir. Süspansiyon hücrelerle statik koşullarda yapılmıştır. Korpanty ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmalarda pankreatik adenokarsinovada hedefe yönelik mikroköpükçükler kullanarak damar içerisindeki hareketini izlemişlerdir. Araştırmalarının sonucunda hedefe yönelik mikroköpükçüklerin *in-vivo* ortamda tümöre özgü tedavi yöntemlerini geliştirebilmek için uygun ve özel araçlar olduklarını göstermişlerdir.(Korpanty vd. 2007) Tinkov ve ark. tarafından DOX yüklü mikroköpükçükler



(DOX, mikroköpükçüklerin zar yapısında yer almaktadır) ile yapılan çalışmalarda, DOX yüklü mikroköpükçüklerin serbest DOX ve DOX-lipozom kompleksinden 3 kat daha etkili antiproliferatif (hücre çoğalmasını durdurucu) özellikte olduğu gösterilmiştir(Tinkov vd. 2010). Müteakip bir çalışmada ise, DOX yüklü mikroköpükçüklerin *in-vivo* sıçan pankreas karsinoma uygulamasını yapmış ve DOX konsantrasyonunun tümörlü dokuda ultrason altında 12 kat daha fazla olduğu ve kontrol grubundaki sıçanlara göre tümör gelişiminde belirgin ölçüde azalma olduğu gözlemlenmiştir(Tinkov vd. 2010). Kemoterapi ilaç dirençliliği gösteren MCF-7/ADR hücre hatlarında DOX yüklü mikroköpükçükler ultrason yardımıyla hücre içine yönlendirilerek hücre canlılığında düşme ve apoptotik hücrelerde çoğalma gözlemlenmiştir(Deng vd. 2013 (in print)).

Yukardaki açıklamalar ışığında, ultrasonda kontrast maddesi olarak kullanılan mikroköpükçüklerin aynı zamanda ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılması avantaj teşkil etmektedir. Zira diğer ilaç taşıyıcı sistemlerde ilacın tümör dokusuna ulaşabildiği ve tümör dokusundaki değişimler görüntülenemezken, hedeflendirilmiş mikroköpükçükler ile ilacın hedef dokuya ulaşabildiğinin takibi yapılabilmekte, üstelik istendiğinde cihazın mekanik indeksi artırılarak ilacın salınımı sağlanabilmekte ve yukarda belirtildiği gibi sonoporasyon etkisi ile ilacın tümör içine alımı kolaylaştırılmaktadır. Diğer taşıyıcı sistemlere kıyasla, mikroköpükçüklerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımının diğer bir avantajı ise hedeflendirilebilmeleridir. Her ne kadar ilaç, lipozom, misel, nanoparçacık gibi sistemler içine enkapsüle edilebilirse de, bu sistemler nano boyutlarda olduklarından antikor/ligand ile hedeflendirilmeleri daha zordur. Dolayısıyla, kanser hücresine spesifik belirteçlerle işaretlenmemiş olan (hedeflendirilmemiş) bu ilaç taşıyıcı sistemlerin istenmeyen dokularda akümüle olması kaçınılmaz olmaktadır. Oysaki, mikron boyutlarında olmalarından dolayı mikroköpükçüklerin işaretlenmeleri çok daha kolaydır. Böylece, ilaç hedef dokuya ulaştırılabilir ve çok daha düşük dozlarla tedavi mümkün olabilir. Böylelikle, ilacın yan etkileri de azaltılabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasallar

Projede mikroköpükçük ve lipozom yapımında kullanılan bazı lipidler ve kimyasal yapıları **Tablo 1**'de verilmiştir. Malzemelerden DSPC, DPPC, DSPE-PEG<sub>2000</sub>, DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Biotin, DPPE-PEG<sub>2000</sub>, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)'dan, PEG<sub>40</sub>St, propilen glikol (PG, US Pharmaceutical grade), DOX.HCl, ve çözücü olarak kullanılan kloroform, Amonyum sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)'den, kolesterol Fluka'dan, Dekaflobütan gazı Synquest firmasından, Streptavidin (StAv) Life'dan, Streptavidin PE (PE-StAv) eBioscience (Ireland, UK)'dan; Biotinli-Epidermal Growth Factor (EGF-Biotin) Life Sciences'den, Spectra/Por® Dializ Membranları Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Dominguez, CA)'dan, Sephadex™ G-75 GE Healthcare Life Sciences'dan temin edilmiştir.

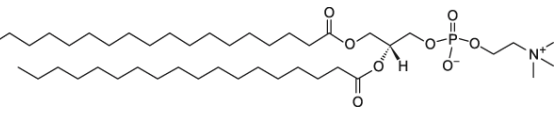
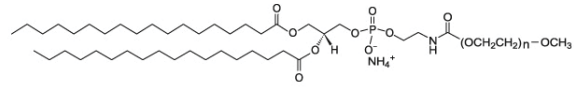
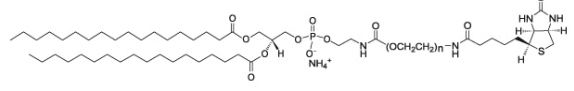
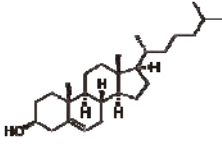
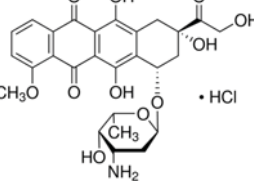
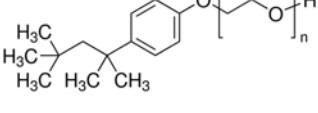
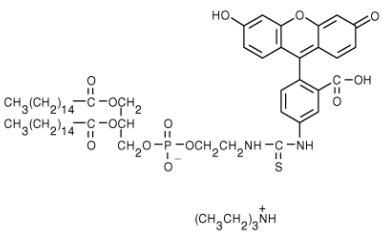
#### 3.2. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin hazırlanması ve karakterizasyonu

Mikroköpükçüklere ilaç yüklenmesi, lipozomlar vasıtasıyla yapılmıştır. Bu nedenle ilk olarak lipozomlar hazırlanmış ve daha sonra mikroköpükçükler sentezlenerek lipozomların mikroköpükçüklere bağlanmaları sağlanmıştır.

##### 3.2.1. Lipozomların hazırlanması ve karakterizasyonu

Lipozomları hazırlamak üzere belirlenen oranlarda DSPC, kolesterol ve DSPE-PEG<sub>2000</sub> cam bir vial içerisinde karıştırıldı. Formülasyonda DSPE-PEG<sub>2000</sub> miktarı %5 mol olarak sabit tutuldu. DSPC, kolesterol molar oranları değiştirilirken toplam miktar 20 µmol olacak şekilde ayarlandı. Biotinli lipozom eldesi için formülasyona değişen molar oranlarda DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Biotin ilave edildi. DSPE-PEG<sub>2000</sub> ve DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Biotin toplam molar yüzdesi %5 mol'de sabit tutuldu. Lipozomun yapısını oluşturacak malzemelerin homojen bir karışımını elde etmek üzere toz halinde bulunan malzemeler kloroform içerisinde çözdürüldü. Kloroform öncelikle azot gazı yardımı ile, daha sonra vakumlu etüv ortamda kurutulmuş ince lipid film tabakası elde edildi. Oluşan film tabakası üzerine amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 mM, pH 5.4) tampon çözeltisi eklenerek 65°C'deki çalkalamalı su banyosuna konularak 1 saat hidrasyona tabi tutuldu. Kullanılan fosfolipit DSPC'nin hal değiştirme ısısının (T<sub>m</sub>) 55°C olması ve tüm fosfolipitlerin homojen bir şekilde çözünebilmesi için ideal sıcaklığın T<sub>m</sub>'in 10°C üstü sıcaklıklar kullanıldı. Lipozomların kararlı olabilmesi için lipidler T<sub>m</sub> sıcaklığının üzerinde

**Tablo 1.** Kullanılan mikroköpükçük malzemeleri ve kimyasal yapısı.

| Kimyasal Adı                     |                                                                                                        | Kimyasal Yapısı                                                                                        |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DSPC                             | 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine                                                             |                      |
| PEG <sub>40</sub> St             | Polietilen glikol-40 Stearat                                                                           | $H_{35}C_{17} \text{---} C(=O) \text{---} O \text{---} CH_2 \text{---} O \text{---} (CH_2CH_2O)_{39}H$ |
| DSPE-PEG <sub>2000</sub>         | 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Methoxy (polyethylene glycol)-2000]                 |                      |
| DSPE-PEG <sub>2000</sub> -Biotin | 1,2-disterol-sn-glisero-3-fosfoethanolamine-N-[biotin(polietilen glikol)-2000](amonyum tuz)            |                     |
| Kolesterol                       | (5-Cholesten-3β-ol)                                                                                    |                    |
| DOX.HCl                          | doksorubisin hidroklorür                                                                               |                    |
| T <sub>X-100</sub>               | Triton X-100                                                                                           |                    |
| FITC-DHPE                        | Florescein-5-Thiocarbamoyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt |                    |

en az 30-60 dakika arasında tutuldu (Elbayoumi vd. 2010, Freeman 2011, Monteiro vd. 2014). Hidratasyon sonrası oluşan multi lameler veziküller (MLV) geniş bir boyut dağılımı gösterdiğinden, solusyon homojen gözenekliliğe sahip polikarbonat membrandan ekstrüde edilerek istenilen büyüklükte ve homojen dağılımda lipozomlar elde edildi. Homojen dağılım aynı zamanda ilaç tasarımı için önemli bir parametredir. Bu çalışmada ilacın ideal büyüklükte ve homojen dağılımda olabilmesi için farklı boyutlarda polikarbonat membranlar denendi ve oluşan lipozomların karakterizasyonları yapıldı. Ekstrüzyon işlemi sonrasında oluşturulan lipozomların boyut analizi dinamik ışık saçılması (DLS) metodu (Zetasizer Nano ZS90, Malvern) ile belirlendi.

### 3.2.2. Lipozomlara Doksorubisin yüklenmesi ve Tayini

Antikanser maddesi olan Doksorubisin (DOX) aktif yükleme metodu ile lipozomlara yüklendi. Aktif yükleme metodu, iyon gradiyenti sayesinde gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla, oluşturulan lipozomlar %0.9'luk NaCl çözeltisiyle veya fosfat tamponlu çözelti ortamında dializ edilerek, lipozom içi pH=5.5 ve lipozom dışı pH=7.2 olmak üzere bir pH farkı (gradienti) oluşturuldu. Daha sonra, farklı konsantrasyonda DOX çözeltisi lipozomlar ile karıştırılarak 4 saat boyunca 65°C'de inkübe edildi. Ortamda yüklenmeden serbest halde kalan DOX moleküllerini DOX yüklü lipozomlardan (Lipo-DOX) ayırmak amacı ile jel filtrasyon kromatografisi ve diyaliz membranı olmak üzere iki metot denendi. Jel kromatografisi için Sephadex™ G-75 (GE Healthcare Life Sciences) kullanıldı. Diyaliz yönteminde ise, diyaliz membran (RC tubing) (MWCO: 10 kD, Spectra/Por® 6) kullanıldı. Yüklenen DOX miktarı floresan spektrophotometre (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, Exc: 485/20, Emis: 590/35) ile tayin edildi. Lipozom içerisine enkapsüle olan DOX miktarını tayin etmek üzere lipozomlara %10'luk Triton X-100 (T<sub>x-100</sub>) ilave edildi. Böylece lipozom içerisindeki DOX moleküllerinin de lipozom dışına çıkması sağlandı. Lipozomların enkapsülasyon verimliliği (EV%) Denklem (1) ile belirlendi.

$$EV\% = \frac{F_{TX}}{F_{TX_0}} \quad (1)$$

Burada, F<sub>TX</sub> : Diyaliz sonrası Triton X-100 ilave edilerek ölçülen floresan, F<sub>TX\_0</sub> : Diyaliz öncesi Triton X-100 ilave edilerek ölçülen floresan değerlerini göstermektedir.

### 3.2.3. Lipozomlardan Doksorubisin salınımının belirlenmesi

DOX yüklü lipozomlardan (lipo-DOX) DOX'un salınımı için farklı sıcaklıklarda DOX salınım çalışmaları yapılmıştır. DOX yüklü lipozomlar belirlenen sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve zamanla floresan değerleri,  $F_t$ , ölçülmüştür. Zamana göre floresan ölçümleri tamamlandığında ortama  $T_{X-100}$  eklenerek lipozomlarda kalan DOX'unda dışarı çıkması sağlanmış ve toplam DOX miktarı için floresan değeri,  $F_{TX}$ , ölçülmüştür. Salınan DOX yüzdesi Denklem (2) ile hesaplanmıştır.

$$\text{İlaç Salınım \%} = \frac{F_t - F_0}{F_{TX} - F_0} \quad (2)$$

Burada,  $F_t$  : t anındaki floresan,  $F_0$  : başlangıç (t=0) anındaki floresan,  $F_{TX}$  : Triton X-100 ilave edilerek lipozomlar parçalandıktan sonra ölçülen floresan değerlerini göstermektedir.

Lipozomların stabilitelerini protein ortamında test etmek üzere, lipozomlar Sığır Serum Albumin (Bovin Serum Albumin) (SSA) içeren (5  $\mu$ M) PBS tampon çözeltisi (pH=7.2) içerisine konularak 37 °C'de 50 rpm karıştırma hızında su banyosunda inkübe edilerek, salınan DOX miktarları zamana karşı floresan spektrophotometre (Exc: 485/20, Emis: 590/35) ile tayin edildi. Salınan ilaç yüzdesi Denklem (2) ile belirlendi.

#### Mikroköpükçüklerin Hazırlanışı:

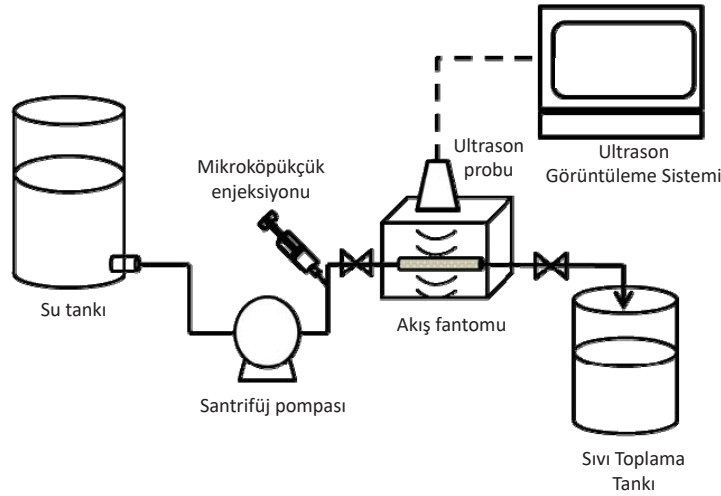
Mikroköpükçüklerin üretimi, 2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 no'lu projede geliştirilen yöntem ve formülasyonlar kullanılarak gerçekleştirildi. Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin hazırlanmasında, temel komponentlerden olan distearol glisero fosfokolin (DSPC), polietilen glikol stearat (PEG40St), biyotinlenmiş distearol glisero fosfoethanol amine-polietilen glikol (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Biotin) kullanıldı. Karışım kloroform içinde çözülerek homojen bir çözelti elde edildi. Daha sonra, çözücü önce azot gazı ile uzaklaştırılacak ve daha sonra vakumlu etüvde mutlak kuruluk elde edinceye kadar cam yüzeyinde ince bir tabaka halinde kurutuldu. Elde edilen film tabakası, 60 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 60 dakika hidrasyona tabi tutuldu. Su banyosundan çıkarılan örnekler problu sonikatör (Misonix S4000) yardımı ile homojen hale getirildi ve daha sonra perflorakarbon gaz atmosferi ortamında yine sonikatör vasıtasıyla mikroköpükçükler elde edildi. Ortamda serbest halde kalmış olan komponentler mikrosantrifüj ve flotasyon yöntemleri kullanılarak mikroköpükçüklerden ayrıldı. Bu mikroköpükçükler daha sonra küçük flakonlarda kapalı olarak perflorakarbon gazı altında depolanarak 4 °C'de buzdolabında saklandı.

## **DOX yüklü lipozomların mikroköpükçüklere bağlanması:**

Bu projede, avidin-biotin köprüsü ile DOX içeren lipozomların (Lipo-DOX) mikroköpükçüklerle konjuge edilmesi sonucu ilaç yüklü mikroköpükçükler hazırlandı. Önceden hazırlanan biyotinli mikroköpükçükler PBS içerisinde çözdürülmüş olan streptavidin ile yaklaşık 10 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonucu mikroköpükçüklerin üzerindeki biyotin ile streptavidin konjuge edilmiş oldu. İnkübasyon sonrası, avidin bağlı mikroköpükçükler 1000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Böylece ortamdaki bağlanmamış olan serbest avidinler uzaklaştırılmış oldu. Yukarıda asıltı halinde bulunan avidin bağlı mikroköpükçükler ise PBS ile yeniden süspense edildi. Daha sonra, önceden üretilmiş olan Lipo-DOX'lar avidin bağlı mikroköpükçüklerin olduğu süspansiyona eklendi ve 10 dakika boyunca inkübe edildi. Mikroköpükçüklerin üzerinde bulunan streptavidinin boşta kalan kısmı ile lipozomların üzerinde bulunan biyotin böylelikle konjuge edilmiş oldu. Üretilen Lipo-DOX yüklü mikroköpükçükler 1000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Ortamdaki bağlanmamış olan serbest Lipo-DOX'lar uzaklaştırılmış oldu. Yukarıda asıltı halinde bulunan Lipo-DOX yüklü mikroköpükçükler ise PBS ile yeniden süspense edildi. Daha sonra, PBS içinde çözdürülmüş olan streptavidin Lipo-DOX yüklü mikroköpükçük süspansiyonuna eklendi. 10 dakika boyunca inkübasyon yapıldı ve Lipo-DOX üzerinde bağlanmamış halde bulunan biyotinler ile ortama eklenen avidinler konjuge edilmiş oldu. Oluşturulan yeni kompleks 1000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek serbest haldeki bağlanmamış avidinler uzaklaştırıldı. Yukarıda asıltı halinde bulunan mikroköpükçükler ise PBS ile yeniden süspense edildi. Son olarak hedeflendirilmiş mikroköpükçük elde etmek için bu kompleks süspansiyona saf su içerisinde çözdürülmüş epidermal büyüme faktörü (EGF) denilen protein maddesi eklendi. 10 dakikalık inkübasyon uygulandı ve böylece Lipo-DOX'ların üzerinde bulunan avidinlere EGF bağlanarak konjugasyon gerçekleştirildi. Mikroköpükçük solüsyonu 1000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek serbest haldeki bağlanmamış EGF molekülleri ortamdaki uzaklaştırıldı. Yukarıda asıltı halinde bulunan mikroköpükçükler ise PBS ile yeniden süspense edildi ve +4°C'de buzdolabına kaldırıldı. Böylece hedeflendirilmiş mikroköpükçükler sentezlenmiş oldu. Elde edilen hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçükler boyut ve konsantrasyon analizleri Beckman Coulter Counter cihazı ile, yüklenen DOX miktarları ise floresan spektrofotometre (Exc: 485/20, Emis: 590/35) ile tayin edildi.

### 3.2.4. Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin farklı MI değerlerinde stabilite ve ekojenitelerinin belirlenmesi

Ultrason kontrast ajanlarının stabilitelerini ölçmek üzere **Şekil 9**'de gösterilen akış fantomu deney düzeneği kullanılmıştır. Ultrason probu akış fantomu üzerine yerleştirilmiş ve bir santrifüj pompası vasıtasıyla sabit hızda akan sıvıya mikroköpükçükleri belli bir bolus hacimde enjekte edilmiştir. Akış fantomunda akustik bölgeden mikroköpükçükler geçerken, boru içerisinde yayılması sonucu geriye yansıyan ultrason sinyaller belirli bir süre içerisinde B-mod'da kaydedilmiştir. Akış daha sonra bir toplama kabında toplanmıştır. Değişik ultrason güçlerinde (%1, %5, %20, %40, %60, %80, %90 ve %100) mikroköpükçükler ultrasonik yayılıma yaklaşık 25 saniye maruz bırakıldı. Her bir denemede 30 µl hacimde enjeksiyonlar yapıldı ve akış hızı 3000 rpm'e sabitlendi. Mikroköpükçükler borunun içerisinde geçerken pompa durduruldu ve akışın olmadığı dolayısıyla statik bir ortamda mikroköpükçükler ultrasona maruz bırakıldı. Ultrason görüntüleme cihazında elde edilen değişik ultrason güçlerine ait videolar daha sonra saniye düzeyinde resimlere dönüştürüldü ve elde edilen her bir resimdeki mikroköpükçük popülasyonlarının ortamala intensitesi ImageJ programında hesaplandı.



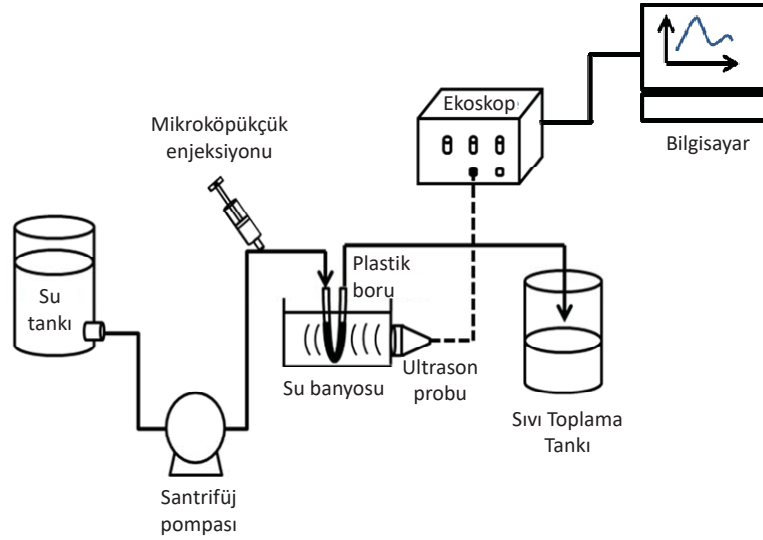
**Şekil 9.** Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin akış fantomu ile farklı ultrason güçlerinde kararlılıklarının tespiti için deney düzeneği.

### Farklı Kütlelerde Yüklemelere Sahip Mikroköpükçüklerin Ekojenitelerinin Belirlenmesi:

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin üretiminin her bir aşamasında farklı kütlelerde yükle yüklenen mikroköpükçük popülasyonlarının (MB-Biyotin, MB-Biyotin-Avidin, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX-Avidin, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX-



Avidin-EGF) her birisinin ekojenitesini belirlemek üzere bir deney düzeneği oluşturuldu (**Şekil 10**). Ekoskopa bağlı ultrason probu içi saf su dolu su banyosuna yanal yüzeyinden yerleştirildi. Çapı yaklaşık 2 mm olan bir plastik boru su banyosunun içine ultrason probunun tam karşısına gelecek şekilde yerleştirildi ve bir santrifüj pompası vasıtasıyla sabit hızda akan sıvıya mikroköpükçükleri belli bir bolus hacimde (100 µl) enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası akustik bölgeden geçen mikroköpükçüklerin boru içerisinde yayılması sonucu geriye yansıyan ultrason sinyaller belirli bir süre içerisinde B-mod'da kaydedildi. Tüm denemelerde, ultrasonun çıkış gücü 10 dB ve frekansı 2 MHz, boru içerisinde akan sıvının akış hızı 0.7 l/min olarak ayarlandı. Her bir mikroköpükçük tipi için enjeksiyonlar farklı mikroköpükçük konsantrasyonlarında yapıldı. B-mod'da elde edilen resimler daha sonra ImageJ ve SigmaPlot programları kullanılarak ekojenite hesaplamaları için analiz edildi.

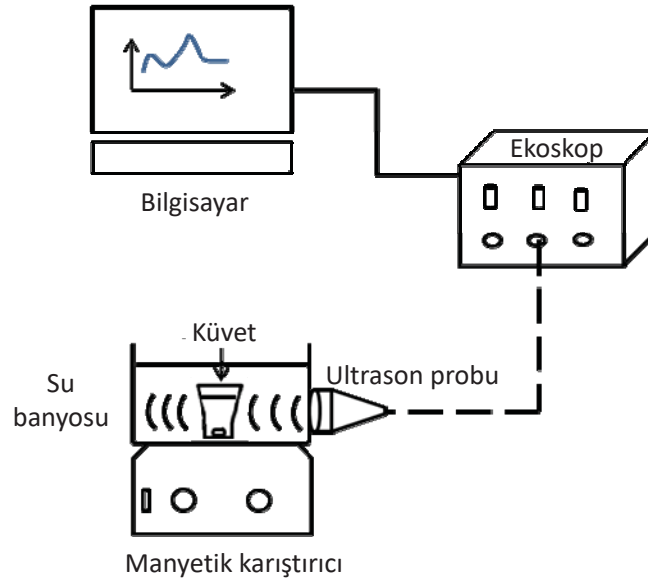


**Şekil 10.** Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçük popülasyonlarının ekojenitelerini belirlemek için deney düzeneği.

### **Farklı Kütlelerde Yüklemelere Sahip Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Kararlılıklarının İncelenmesi:**

Mikroköpükçüklerin kararlılığı, atenüasyon ve konsantrasyondaki değişim açısından incelendi. Yüklü olmayan ve farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklerin ultrason altında kararlılıklarının incelenmesi için bir deney düzeneği oluşturuldu (**Şekil 11**). Burada, içerisine mikroköpükçük solüsyonunun konacağı 20 ml'lik bir mini küvet su banyosunun alt tabanına konularak yapıştırıcı ile sabitlendi. Mikroköpükçüklerin tampon çözelti içerisinde homojen bir şekilde dağılması için su banyosunun altına da manyetik karıştırıcı konuldu. Ekoskoba bağlı olan 4 MHz'lik ultrason probu küvetin içini tam olarak göreceği şekilde su banyosunun yanal yüzeyine yerleştirildi. Küvet ile prob arasındaki mesafe yaklaşık 14.4 cm

idi. Farklı tipteki mikroköpükçük popülasyonlarının başlangıç konsantrasyonları deneye başlamadan önce Multisizer cihazı ile ölçüldü. Buna göre, deneyin başlangıç konsantrasyonu tüm denemelerde  $1E+07$  #/ml olacak şekilde seyreltildi. Böylelikle, ilk konsantrasyon tüm mikroköpükçük tipleri için aynı oldu. Küvetin içerisine ilk önce 17 ml PBS konuldu ve içerisinde mikroköpükçükler yokken A-mod'da küvetin arka duvarından geri yansıyan ses dalgasının verdiği pik sinyalin genliği ölçüldü. Daha sonra mikroköpükçük popülasyonu küvete eklendi ve 30 dB'lik maksimum ultrason çıkış gücünde her 5-10 dakikada bir hem pik sinyalin genliği hem de konsantrasyon ölçüldü.



**Şekil 11.** Yüklü olmayan ve farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçükler için ultrasonik pulslar

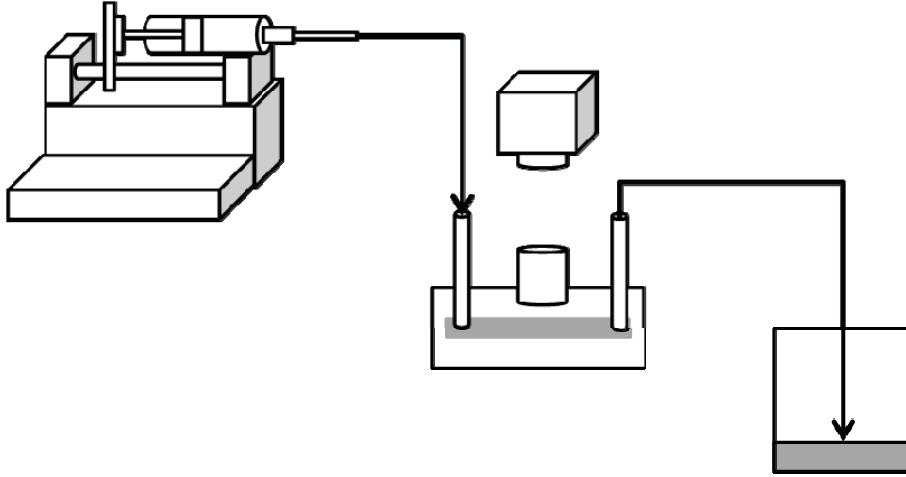
### 3.3. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin *in-vitro* etkinliğinin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültürü düzeneklerinde belirlenmesi

Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin insan meme kanser hücresi, MDA-MB-231, ve normal meme hücreleri, MCF10, kullanılarak iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) düzeneklerde çalışmalar yapılmıştır. Gerekli 2D ve 3D düzenekler tasarlanmış ve hücrelerin üremeleri başarılmıştır. MDA-MB-231 ve MCF10 hücrelerinin DOX ile etkileşimleri araştırılmıştır. Sonuçlar EKLER'de verilmiştir. Ancak, denemelerde MDA-MB-231 insan kanser hücreleri ile nude farede tümör oluşturulamamıştır. Tümör oluşumu fare kanser hücresi olan 4T1 hücreleri ile başarılabilmştir. Burada, hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin *in-vitro* 2D ve 3D hücre kültürü düzeneklerinde 4T1 fare kanser hücreleri üzerine etkileri incelenmiş ve yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

### 3.3.1. İki boyutlu (2D) hücre kültürü çalışmaları

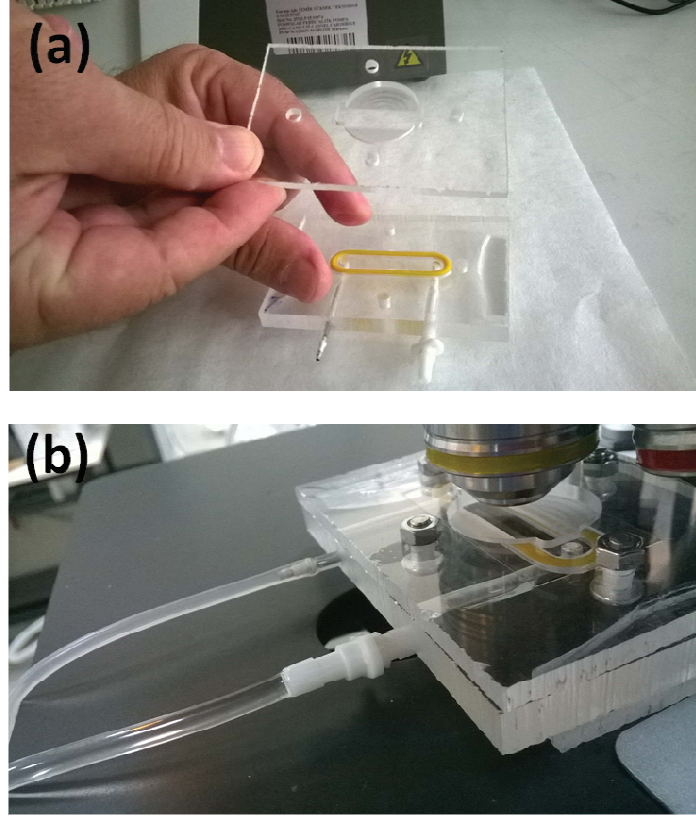
#### Deney düzeneği tasarımı:

*In-vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) deney düzenekleri tasarlanmış ve üretimleri gerçekleştirilmiştir. Farklı kayma gerilimi altında mikroköpükçük ve hücre etkileşimlerini incelemek üzere **Şekil 12**'de gösterilen akış düzeneği kullanılmıştır. Akış düzeneğinde akışın sağlandığı bir şırınga pompası, kamera ataçmanı ile birlikte bir mikroskop, gözlem hücresi (view cell), ve toplama kabından oluşmaktadır. Şırınga pompası yerine peristaltik pompa da kullanılabilir. Sistemde kullanılan gözlem hücresi laboratuvarımızda tasarlanmış olup, in-vitro ortamda hücrelerin yüklenmesi ve sistemden çıkartılmasında büyük kolaylık sağlamaktadır.



**Şekil 12.** Akış deney düzeneği

Tasarlanan 2D ve 3D akış kanalları **Şekil 13**'de gösterilmektedir. **Şekil 13(a)**'da gösterilen düzenekte, akışın yapılacağı 8 mm genişliğinde ve 0.28 mm yüksekliğinde bir akış kanalı görülmektedir. Hücreler bir mikroskop lamı ya da daha ince olan mikroskop lameli üzerinde yetiştirildikten sonra akış kanalına yerleştirilmektedir. Böylece 2D deneyler için uygulama kolaylığı sağlanmaktadır. Akış, **Şekil 13(b)**'de görüleceği üzere mikroskop altında rahatlıkla gözlenebilmektedir. Uygun bir kamera sistemi ile akış video ile kayıt altına alınabilmekte ve mikroköpükçüklerin hücrelerle etkileşimleri, hücrelere bağlanma eğilimleri, kayma gerilimi altında hücre davranışları incelenilmektedir.



**Şekil 13.** *In-vitro* çalışmalarda kullanılacak 2D ve 3D akış düzenek tasarımı (a) Taban akış kanalı ve kapak tasarımı, (b) mikroskop altında görüntüleme düzeneği

#### **4T1 Hücrelerin mikroskop lamı üzerine 2D bağlanması:**

4T1 hücreler laboratuvar koşullarında 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde yetiştirilmişlerdir. İki boyutlu hücre kültürü için bir petri kabı kullanılmıştır. Petri kabında hücre üreme ortamı içerisine bir mikroskop lamı yerleştirilmiş ve hücrelerin 2D olarak lam üzerinde üremeleri sağlanmıştır. 2D deneyler esnasında üzerinde 2D hücre kültürü olan lam **Şekil 13**'de gösterilen laboratuvarımızda tasarlanmış olduğumuz kartuş üzerine yerleştirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

#### **İki boyutlu (2D) deney düzeneğinde hücrelere DOX yüklemesi:**

Peristaltik pompa yardımıyla bir beher içerisinde DOX ya da lipo-DOX solüsyonları belirli bir akış hızında sisteme verildi ve 2D hücre görüntüleme düzeneğinde mikroskop altında görüntülendi. Solüsyon hücrelerin bulunduğu görüntüleme düzeneğine geldiğinde akış durduruldu ve floresan mikroskopta 63x objektif ile belirli zaman aralıklarında resimler çekildi ve kaydedildi. Serbest DOX ya da Lipo-DOX'un hücrelere alımı yaklaşık 5 dakika

izlendi. Ardından PBS tampon çözelti sisteme beslendi ve ortamdaki serbest DOX ya da Lipo-DOX yıkandı. Böylelikle serbest DOX ya da Lipo-DOX'un hücrelere girişi kinetik olarak incelendi. Ayrıca, yıkama sonrası hücreler tarafından alınan serbest DOX ve Lipo-DOX miktarları da tespit edildi..

Doksorubisin floresan özelliği olması sebebi ile, hücre içine giren DOX miktarının tayini için kamera ataçmanlı (Carl Zeiss AxioCam 506 mono) yukardan aydınlatmalı floresan mikroskobu (Carl Zeiss AxioImager M2 model) kullanıldı. Floresan mikroskobu ile nicel floresan yoğunluk ölçümleri için 63x (Carl Zeiss N-Achroplan) objektif kullanılarak görüntüler alındı. Hücrelere giren doksorubisinin floresan yoğunluğu, Normalize floresan yoğunluk formülü, Denklem 3, kullanılarak hesaplandı(Pang Z 2012). Böylelikle fokusa bağlı farklılıklar elimine edilmiş oldu.

$$\text{Normalize FL.Yoğ} = \frac{(\text{Hücre FL.Yoğ}) - (\text{Arkaplan FL.Yoğ})}{\text{Kamera Pozlama Süresi}} \quad (3)$$

Floresan mikroskobunda, zamanla hücrelere giren DOX'un kinetiğini ortaya çıkarabilmek için hücreler üzerindeki floresan yoğunluğu ile hücre çevresindeki boşluk intensiteleri ölçüldü. Hücre içi ve hücre dışı intensiteler birbirlerinden çıkarıldı ve ışığa maruz kalma sürelerine bölünerek normalize ortalama intensiteler hesaplanmış oldu. Zamanla intensitedeki değişim her bir DOX konsantrasyonu için grafiğe geçirildi. Aynı metot Lipo-DOX'lar için de uygulandı.

### **İki boyutlu (2D) deney düzeneğinde mikroköpükçüklerin hücrelere bağlanması:**

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin hücrelere farklı akış hızlarında ya da farklı kayma gerilimlerinde bağlanmaları incelendi. Bu amaçla, lam üzerine 2D bağlanmış hücrelerin bulunduğu kanala bolus enjeksiyon ile hedeflendirilmiş mikroköpükçükler gönderildi. İlk önce 30 rpm'de peristaltik pompa ile sistemin tamamı PBS tampon çözelti ile dolduruldu. Daha sonra, pompa çalışırken hücre görüntüleme kanalına yakın bir noktadan şırınga ile belirli konsantrasyonda örnek bolus olarak enjekte edildi ve kanaldan geçen örnekler video ile kaydedildi. Hücrelere bağlanmayan mikroköpükçükleri ortamdaki uzaklaştırmak için sistem yüksek hızda yıkandı.

Deney sırasında DOX verilmeden önce ya da DOX verildikten sonra ölü hücreleri tespit edebilmek üzere trypan blue çözeltisi kullanıldı. Trypan blue çözeltisi, membranı zayıflamış ölü hücrelere girerek ortamdaki ölü hücreleri saptayabilmemizi sağladı. Böylece serbest DOX ve lipo-DOX'un canlı kanser hücreler üzerindeki etkisi gözlemlenmiş oldu.

### **MTT ile hücre proliferasyonu (cell viability %) tayini:**

Uygun serbest DOX ve Lipo-DOX dozlarını bulabilmek amacıyla doz denemeleri yapılmıştır. Bu amaçla 75 cm<sup>2</sup>'lik flasktaki hücreler 96 kuyucuklu plate'e, kuyucuk başına 10<sup>4</sup> hücre/200 mL olacak şekilde ekilmiştir. 96 kuyucuğa ekilen hücreler 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 1 gün tutulmuş, ertesi gün hücreler tutunduktan sonra ise hücre besiyeri çekilip DOX ve Lipo-DOX'lu hazırlanmış besiyerler eklenmiştir.

Hücrelerin farklı konsantrasyonlarda serbest DOX ve Lipo-DOX ile inkübasyonları sonucu canlılıklarına MTT ve WST-1 hücre canlılık protoköleriyle (cell viability assays) bakıldı. Hücreler farklı koşullarda üreme ortamlarından alınarak 96 kuyucuklu plate içine 100 µl/kuyucuk hücre olacak şekilde alınmıştır. Her bir kuyucuğa 10µl/kuyucuk MTT hücre proliferasyon reaktifi eklenerek (1:10 dilüsyon) hücreler 35°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Boş kuyucuklara da sadece ortam koyularak kör ölçümler yapılmıştır. Plate çalkalayıcıda 1 dk çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 450 nm'de okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 600 nm'den fazlası (630 nm) seçilmiştir. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edilerek diğer absorbanslar karşılaştırılarak hücre canlılık yüzdeleri tayin edilmiştir.

### **3.3.2. Üç boyutlu (3D) hücre kültürü çalışmaları**

#### **Üç boyutlu (3D) Hücre kültürü hazırlama:**

Akış kanalında kullanılmak üzere üç boyutlu hücre kültürü Lee vd. tarafından verilen yöntem ile hazırlanmıştır. Kısaca, +4 °C'da matrigel bir damla olarak mikroskop lamı üzerine akıtılmış ve 37 °C'da etüvde 30 dak. jelleşmesi beklenmiştir. Buzdalabında +4 °C'da bekletilmiş bir ependorf tüp içerisine, son hacim %10 olacak şekilde +4 °C'da matrijel konulmuş ve üzerine üreme ortamı içerisinde suspansiyon edilen hücreler ile karıştırılarak, jelleşmiş lam üzerine yine damla olarak konulmuştur. Daha sonra, matrijel içerisinde hücreler 37 °C'da etüve konularak 30 dak jelleşmesi beklenmiştir. Jelleşme işleminin ardından, petri kabına hücre üreme ortamı konularak hücreler büyümeye bırakılmıştır. Üreme işlemi 8 gün boyunca takip edilmiştir.

#### **Üç boyutlu (3D) deney düzeneği:**

Üç boyutlu hücre kültürü için farklı kayma gerilimlerinde akış ortamında mikroköpükçükler ile hücrelerin etkileşimlerini incelemek üzere **Şekil 12**'de gösterilen

labaratuvarımızda tasarladığımız akış düzeneği kullanılmıştır. Mikroskop lamı üzerinde 3D olarak hazırlanan hücreler **Şekil 13**'de gösterilen labaratuvarımızda tasarlanmış olduğumuz kartuş üzerine yerleştirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

### **Üç boyutlu (3D) deney düzeneğinde hücelere DOX yüklemesi:**

Mikroskop lamı üzerinde hazırlanan 3D hücre kültürü **Şekil 13**'de gösterilen labaratuvarımızda tasarlanmış olduğumuz kartuş üzerine yerleştirilerek üç boyutlu hücrelerin serbest DOX ve lipo-DOX alım hızları ve miktarları ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan serbest DOX ve lipo-DOX peristaltik pompa yardımıyla hücrelerin bulunduğu görüntüleme düzeneğine gönderildi. Burada durgun ortamda serbest DOX ve lipo-DOX'ların zamanla hücre içerisine alınmaları floresan mikroskopta 63x objektif ile görüntülendi. Belli zaman aralıklarında resimler çekildi ve kaydedildi. Serbest DOX ya da Lipo-DOX'un 3D hücre kültürü tarafından alınmaları yaklaşık 5 dakika izlendi. Ardından PBS tampon çözelti sisteme gönderildi ve ortamdaki serbest DOX ya da Lipo-DOX yıkandı. Böylelikle serbest DOX ya da Lipo-DOX'un hücelere girişi kinetik olarak incelendi. Ayrıca, yıkama sonrası hücreler tarafından alınan serbest DOX ve Lipo-DOX miktarları tespit edildi..

### **Hücre proliferasyonu (cell viability %) tayini:**

Üç boyutlu (3D) hücre kültürü ile serbest DOX ve lipo-DOX'un etkileşimlerini incelemek üzere 96'lık kuyucuklarda 3D hücre kültürü hazırlanmıştır. Bu amaçla, +4 °C'da bekletilen 96'lık plaka bir duz kabının üzerine yerleştirilmiştir. Bir gece buz içerisinde +4 °C'da buzdolabında bekletilmiş matrijel'den her bir kuyucuğa 5 µl matrijel konulmuştur. Matrijel'lerin jelleşmesi için 96'lık plaka 37 °C'da 30 dakika etüvde bekletilmiştir. Her bir kuyucuk üzerine, konsantrasyonu 10<sup>4</sup> hücre/ml olan hücre kültürü süspansiyonundan 50 µl eklenmiştir. Ardından, buzdolabında +4 °C'da bekletilmiş bir ependorf tüp içerisine, son hacim %10 olacak şekilde +4 °C'da matrijel konulmuş ve üzerine üreme ortamı konularak karıştırılarak her bir kuyucuğa eklenmiştir. Daha sonra, hücreler 37 °C'da etüve konularak büyümeye bırakılmıştır. Üreme işlemi 8 gün boyunca takip edilmiştir. Her iki gün sonunda kuyucuntaki üreme ortamı atılmış, yerine farklı konsantrasyonlarda serbest DOX ve lipo-DOX ihtiva eden üreme ortamları ilave edilmiştir. Hücrelerin farklı konsantrasyonlarda serbest DOX ve lipo-DOX altında canlılıklarına Trypan blue protokolü ile bakılmıştır.



### **3.4. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin biyoyumluluk testlerinin yapılması, ilaç taşıyıcı system olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde kanser teşhis ve tedavisinde kullanılması**

#### **3.4.1. İki farklı türde (rodent ve tavşan) hayvan modelinde biyoyumluluk çalışmalarının yapılması**

Bu çalışmada iki farklı tür kullanılmıştır. Bunlar ağırlıkları 250-340 g arasında değişen 15 adet Wistar Albino Hannover soyu erkek sıçan ile ağırlıkları 2-3 kg arasında olan 10 adet erkek Yeni Zelanda tavşanıdır. Hayvanlar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilmiş, çalışma süresince aynı laboratuvarda standart sıçan ve tavşan kafeslerinde barındırılmış ve 12 saat gece / 12 saat gündüz olacak şekilde aydınlatma yapılmıştır. Hayvanların yem ve su ihtiyaçları *ad libitum* olarak karşılanmıştır. Deneysel çalışmalar için Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmış ( Protokol no: 94/2013 ) ve Yerel Etik Kurulun belirlediği kurallara uygun olarak bakım ve beslenmeleri yapılmıştır.

#### **Çalışma Grupları :**

**1.Grup:** Sıçan kontrol n=5 hayvan (SF)

**2. Grup:** Tavşan kontrol n=5 hayvan (SF)

**3. Grup:** Sıçan toksisite n=10 hayvan (22,6 µg/ml-1 ml)

**4. Grup:** Tavşan toksisite n=5 hayvan (22,6 µg/ml-5 ml)

**Hayvanların kafeslenmesi ve etiketleme:** Sıçanlar yeni ortamlarına alışmaları için deneye başlamadan iki gün önce kafeslenmiş ve kuyruk işaretleme yöntemi ile etiketlenmiştir. Tavşanların kulaklarına renkli kalemle işaretleme yapılmış ve her kafeste iki hayvan olacak şekilde barındırılmıştır.

**Hayvanların bazal kan ve idrarlarının alınması:** Hayvanların enjeksiyonları yapılmadan önce, bazal kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Sıçanlardan anestezi altında kuyruk veninden 2'şer ml kan alınarak biyokimya laboratuvarına gönderilmiştir. Kan alım işlemi bittikten sonra anestezinin etkisinden uyanan hayvanlar, tükettikleri su ve yem miktarı ile yaptıkları idrar ve dışkı miktarını ölçmek amacıyla **Şekil 14**'de gösterilen metabolizma kafeslerine alınarak, burada 24 saat boyunca tutulmuşlardır. Hayvanların yediği yem, içtiği su miktarı ile dışkı ve idrarları kontrol edilmiş ve ölçülmüştür. Yirmi dört saatin sonunda hayvanların idrarları toplanarak analiz için biyokimya laboratuvarına gönderilmiştir.





**Şekil 14.** Sıçan metabolizma kafesi

Tavşanların kulak veninden 4'er ml kan alınarak biyokimya ve hemogram testlerinin analizi için biyokimya laboratuvarına gönderilmiştir. Tavşanlar için metabolizma kafesi olmadığından idrar ve dışkı ölçümleri yapılamamıştır.

#### **Enjeksiyonların yapılması:**

Bu çalışmanın temel amacı doksorubisin yüklü mikroköpükçüğün (D-MK) *in vivo* tek doz toksisite (uzatılmış) çalışmalarının yapılmasıdır. Deney grupları OECD 425'e göre planlanmıştır.

**1.Grup: Sıçan kontrol (n=5):** Bazal kan ve idrarları alınan ve 24 saat metabolizma kafesinde tutulan kontrol sıçanlarına, 24 saatin sonunda 35 mg/kg Ketamin HCl + 5 mg/ kg ksilazin kombinasyonu intraperitoneal uygulanarak anestezisi altında kuyruk venlerinden 1 ml serum fizyolojik çözeltisi (deney gruplarına eşit hacimde) enjekte edilmiştir.

**2.Grup: Tavşan kontrol (n=5):** Bazal kanları alınan tavşanlara kulak venlerinden 5 ml serum fizyolojik çözeltisi (deney gruplarına eşit hacimde) enjekte edilmiştir.

**3. Grup: Sıçan toksisite (n=10) (22,6 µg/ml-1 ml):** Bazal kan ve idrarları alınan ve 24 saat metabolizma kafesinde tutulan kontrol sıçanlara, 24 saatin sonunda 35 mg/kg Ketamin HCl + 5 mg/ kg ksilazin kombinasyonu intraperitoneal uygulanarak anestezisi altında lateral kuyruk venlerinden  $5 \times 10^8$  mikroköpükçük içine yüklenmiş 22,6 µg/ml dozda doksorubisinden 1 ml (D-MK) enjekte edilmiştir. Bu hayvanlardan beşi 24. saatin sonunda sakrifiye edilmişlerdir. Kan ve dokular aynı şekilde alınmıştır.

**4. Grup: Tavşan toksisite (n=5) (22,6 µg/ml-5 ml):** Bazal kanları alınan tavşanlara marjinal kulak venlerinden  $5 \times 10^8$  mikroköpükçük içine yüklenmiş 22,6 µg/ml dozda doksorubisinden 5 ml (D-MK) enjekte edilmiştir.

Enjeksiyon saatleri not edilmiş olup, denekler enjeksiyonu takiben 30.dakika, 1saat, 4.saat ve 24. saat ile 7.gün ve 14. günlerde **Tablo 2**'de gösterilen parametreler ve **Tablo 3**'de gösterilen nekropsi parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

**Tablo 2.** Akut toksisite klinik değerlendirme parametreleri \*

| Par. no | Parametreler                                  | 30. dk |        | 1. saat |        | 4. saat |        | 24. saat |        | 7. gün |        | 14. gün |        |
|---------|-----------------------------------------------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|----------|--------|--------|--------|---------|--------|
|         |                                               | Var(1) | yok(0) | Var(1)  | yok(0) | Var(1)  | yok(0) | Var(1)   | yok(0) | Var(1) | yok(0) | Var(1)  | yok(0) |
| 1.      | Ağırlık (değişiklik)                          |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 2.      | Vücut sıcaklığı                               |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 3.      | Anormal ses                                   |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 4.      | Sese duyarlılık                               |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 5.      | Ağrıya duyarlılık                             |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 6.      | Dokunmaya duyarlılık                          |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 7.      | Sosyal etkileşim                              |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 8.      | Anormal kuyruk pozisyonu                      |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 9.      | Saldırgan davranış                            |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 10.     | Konvülsiyon                                   |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 11.     | Titreme (Tremor)                              |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 12.     | Kas tonusu                                    |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 13.     | Felç - paraliz                                |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 14.     | Postürel değişiklik                           |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 15.     | Göz yaşarması                                 |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 16.     | Kornea refleksi                               |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 17.     | Nistagmus                                     |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 18.     | Pupil genişliği                               |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 19.     | Defekasyon                                    |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 20.     | Ürinyasyon                                    |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 21.     | İshal                                         |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 22.     | Solunum patern değişikliği                    |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 23.     | Sekresyon artışı<br>(tükürük, burun akıntısı) |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 24.     | Siyanoz                                       |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 25.     | Piloereksiyon                                 |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |
| 26.     | Ölüm                                          |        |        |         |        |         |        |          |        |        |        |         |        |

\*Parametrelerin Değerlendirilme şekilleri:Sese karşı duyarlılık: 70 DB sese verdiği tepki- Ağrıya karşı duyarlılık: Kulak kısırmaya verdiği tepki (örneğin kısırınca ses çıkarması)- Dokunmaya karşı duyarlılık: Sirtına hafifçe dokunulduğunda verdiği tepki; Kafayı çevirme tepki yok(0), kaçma ya da uzaklaşma tepki var(1)- Sosyal etkileşim: Kafes içindeki konum; grup içinde ise tepki yok(0), tek başına ise tepki var(1)-Anormal kuyruk pozisyonu: Kuyruk normal yana yatırsa tepki yok(0), dikse tepki var(1)-Saldırgan davranış: saldırgan davranış yoksa yok(0), varsa var(1)- Konvülsiyon: yoksa yok(0), varsa var(1)- Titreme- tremor: yoksa yok(0), varsa var(1)- Kas tonusu: normal yok(0), azalmış var(1)- Felç- paraliz: yoksa yok(0), varsa var(1)- Postürel değişiklik: yoksa yok(0), varsa var(1)- Göz yaşarması: yoksa yok(0), varsa var(1)- Kornea refleksi: yoksa yok(0), varsa var(1)- Nistagmus: yoksa yok(0), varsa var(1)- Pupil genişliği: normal yok(0), büyümüşse var(1)- Defekasyon: yoksa yok(0), varsa var(1)- İshal: yoksa yok(0), varsa var(1)- Ürinyasyon: yoksa yok(0), varsa var(1)- Solunum paterni değişikliği: yoksa yok(0), varsa var(1)- Sekresyon artışı(tükürük, burun akıntısı): yoksa yok(0), varsa var(1)- Siyanoz: yoksa yok(0), varsa var(1)- Piloereksiyon: yoksa yok(0), varsa var(1)- Ölüm: yoksa yok(0), varsa var(1).

**Tablo 3.** Nekropsi değerlendirme parametreleri

| Par. no                | Parametreler          | 1. hayvan |        | 2. hayvan |        | 3.hayvan |        | 4.hayvan |        | 5.hayvan |        | 6.hayvan |        | 7. hayvan |        |
|------------------------|-----------------------|-----------|--------|-----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|-----------|--------|
|                        |                       | Var(1)    | yok(0) | Var(1)    | yok(0) | Var(1)   | yok(0) | Var(1)   | yok(0) | Var(1)   | yok(0) | Var(1)   | yok(0) | Var(1)    | yok(0) |
| DIŞ BAKI               |                       |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 1.                     | Tüyler                |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 2.                     | İshal                 |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 3.                     | Gözler                |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 4.                     | Deri                  |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 5.                     | Ağız                  |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 6.                     | Genital boşluk        |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| İÇ BAKI- Göğüs boşluğu |                       |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 1.                     | Asites                |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 2.                     | Kalp                  |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 3.                     | Akciğer               |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| İÇ BAKI- Karın boşluğu |                       |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 1.                     | Asites                |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 2.                     | Yapışıklık            |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 3.                     | Mide                  |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 4.                     | Dalak                 |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 5.                     | Pankreas              |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 6.                     | Gis –intestinal sist. |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 7.                     | Karaciğer             |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 8.                     | Böbrek                |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |
| 9.                     | Periton               |           |        |           |        |          |        |          |        |          |        |          |        |           |        |

**Biyokimya ve Hemogram Sonuçlarının Değerlendirilmesi:** Çalışmaya alınan hayvanların bazal kan ve idrar incelemesi için çalışma öncesi kan ve idrar toplanmıştır. Bunun yanında çalışmanın başlangıcında 24 saat sonra ve 14 günde kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Örneklerinde idrarda kreatinin, protein ve mikroalbumin parametrelerine bakılmıştır. Kan örneklerinde ölçülen biyokimya parametreleri: kreatinin, kan şekeri, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), LDH, CK, CK-MB'dir. Kanda ölçülen hemogram parametreleri alyuvar sayısı (RBC), hemoglobin, hematokrit, ortalama alyuvar hacmi (MCV), MCH, ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), alyuvar dağılım genişliği (RDW), trombosit, ortalama trombosit hacmi (MPV), PCT, PDW, akyuvar (lökosit), nötrofil, lenfosit, monosit, bazofil ve eozinofildir.

**İstatistiksel analiz:** Veriler ortalama±standart hata şeklinde gösterildi. Grup içi karşılaştırmada tekrarlayan ölçümlerde varyans Analizi (Freidman), bağımsız iki grup arasındaki farkın karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi, bağımlı iki grup arasındaki farkın karşılaştırılmasında Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.4.2. Nude farelerde meme tümörü oluşturulması

Deney için 2 adet 24 gr ağırlığında dişi nude fare kullanılmıştır. Atimik nude fareler, steril kafeslerde steril talaş altlıklarda, steril su ve yem ile beslenmiş, idame ettirilmişlerdir. İki hayvan için %80 konfluent 4T1 hücre hatlarından bir 75 cm<sup>2</sup>'lik flask kullanılmıştır.

4T1 meme kanseri hücreleri %10 fetal bovin serum içeren RPMI 1640 ortamında (%1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin'li) 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde kültüre edilmiştir. Atimik nude fareler steril kafeslerde steril talaş altlıklarda; steril su ve yem ile beslenerek deney gerçekleştirilmiştir. Tümör hücreleri 24 gram dişi nude fareye insülin iğnesi ile subkütan olarak enjekte edilmiştir. İki hayvan için %80 konfluent 4T1 hücrelerinden bir 75 cm<sup>2</sup>'lik flask kullanılmıştır. Üstündeki medium çekilip atıldıktan sonra cell scrubber ile hücreler kaldırılmıştır. 0.4 ml incomplete RPMI 1640 ortamı eklenmiş ve hücreler bu ortam içinde homojenize edilmiştir. İnsülin enjektörü ile toplanan hücreler, her bir hayvana 0.2 ml olacak şekilde subkütan olarak enjekte edilmiştir. Bu aşamada anestezi uygulanmamıştır. Hepafiltreli ortamda hayvanlar elle sabitlenerek kafa üstü derisinden kavranıp enjeksiyon yapılmıştır.

### 3.4.3. Biyoyumluluğu denenmiş olan ilaç yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin tümör oluşturulmuş farelerde uygulanması, ultrasonografi ile görüntüleme altında mikroköpükçüklerin izlenmesi, mekanik indeks artırılarak patlatılması, ve kanser hücre ve dokusunda ilaç salınımlarının artırılması

Mikroköpükçüklerin (MB) *in-vitro* koşullarda ultrason altında patlatılabildiğinin gösterilmesini takiben doksorubisin yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçükler ile tümör tedavisi uygulaması amacı ile *in-vivo* çalışmalar planlanmıştır. Bu amaçla doksorubisin yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçükler metastatik 4T1 hücre hattı ile meme kanseri geliştirilmiş atimik dişi nude farelere uygulanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, doksorubisin (DOX) yüklenmiş ilk yerli üretim hedeflendirilebilir özellikte ultrason kontrast ajanı MB'lerin, *in-vivo* deney hayvanı modelinde, hedeflenen bölgeye ulaştırılması, ultrason altında görüntülenmesi, hedef bölgede MB'lerin patlatılması ve bu sayede ilacın hedef bölgede kontrollü salınımı, buna bağlı olarak özellikle kanser tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağının belirlenmesidir.

## Deney gruplarının Belirlenmesi

Tümör oluşumundan sonra, hayvanlara manuel ve ultrasonografik tümör boyut ölçümü yapılmasını takiben ajan uygulamaları yapılmıştır.

Ajan uygulamaları için 5 grup oluşturulmuştur.

- 1) Kontrol Grubu:** 0,5 ml hacimde serum fizyolojik intraperitoneal şekilde enjekte edilmiştir.
- 2) Doxorubicin (DOX) Grubu**→ 0,5 ml hacimde, literatür bilgisi ile de konfirme edilmiş olan 5 mg/Kg DOX intraperitoneal şekilde enjekte edilmiştir. Serbest DOX, kuyruktan enjekte edildiğinde damarlarda nekroza yol açtığından ve bu nedenden ötürü farelerde acıya yol açmasından dolayı uygulama intraperitoneal yapılmıştır.
- 3) Lipozomal Doxorubicin (Lipo-DOX) Grubu**→ 0,3 ml hacimde 5 mg/kg olacak şekilde Lipo-DOX kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edilmiştir.
- 4) Mikroköpükçük (MB) Grubu**→ Mikroköpükçüklerin tek başına biyokimyasal veya immunohistokimyasal bir sorun oluşturmadığını göstermek amacıyla oluşturulan bu grupta 0,3 ml hacimde  $3 \times 10^8$  konsantrasyonda MB kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sırasında aynı zamanda tümör dokusundan ultrasonografi eşliğinde ekojenite ölçümleri yapılmış ve kontrast maddenin tümör dokusuna ulaşımı gözlenmiştir.
- 5) Doxorubicin Yüklü Mikroköpükçük (MB-DOX) Grubu**→0,3 ml hacimde 22,7 µg/ml DOX olacak şekilde  $3 \times 10^8$  konsantrasyonda mikroköpükçük kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edilmiştir.

Bu gruplarda ön deneylerde de uygulandığı gibi manuel ve ultrasonografik olarak hacim ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak MB ve DOX-MB gruplarında enjeksiyon sırasında US görüntülemesi yapılmıştır.

Bu gruplara ek olarak 3 adet daha nude farede farklı bir dönemde DOX-MB enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Nude farelerden bir tanesi ex olmuş ve çalışma dışı kalmıştır. Ek olarak düzenlenen bu deneyde yüksek doz DOX yüklemeye çalışılmıştır. Ancak dozların önceki DOX-MB grubu ile aynı düzeyde kaldığı daha fazla yüklenemediği anlaşılmıştır.

Belirlenen deney gruplarında deneyler gerçekleştirilerek veri toplanmıştır. Tümör boyutları 1 cm'ye ulaştığında değerlendirme planlanmıştır. Ancak bu grupta 14 hayvandan 6'sında enjeksiyon gününde boyut 1 cm düzeyinde iken, 7'sinde boyut 1 cm'nin üstüne çıkmıştır. Sadece 1 hayvanda boyut 1 cm'nin altında iken değerlendirme mümkün olmuştur.

Deney gruplarının 1 cm ve üzeri olarak belirlenmesi görüntüleme kolaylığı sağlanması sebebiyle tercih edilmiştir. Ancak bu grup deneyleri tamamlandıktan sonra artan deneyimiz ile 1 cm'den daha küçük tümörlerin de görüntülenebilmesi mümkün olmuştur. Literatürde tümör boyutunun 1 cm'yi geçtiğinde hipoksik faz oluştuğuna yönelik bulunan veriler de göz

önüne alınarak ek bir deney daha planlanmıştır. Bu ek deney grubunda yine 7 hayvanda aynı şekilde tümör geliştirilerek DOX-MB enjeksiyonu amaçlanmış ancak bu grupta enjeksiyon tümör boyutları 1 cm'nin altında iken gerçekleştirilecek şekilde planlama yapılmıştır.

### **Manuel Tümör Boyut Ölçümünün Yapılması**

Metastatik 4T1 meme kanseri hücre hattı uygun koşullarda çoğaltıldıktan sonra farelere 0,5 ml hacimde subkütan olarak enjekte edilmiştir. Bu hayvanların tümör oluşana kadar her gün görsel izlemleri gerçekleştirilmiştir. 1 cm ve üzeri tümör boyutu hedeflenen grupta tümör çapı 1 cm'ye ulaşan farelerde, 1 cm'nin altında değerlendirme planlanan grupta ise tümör boyutu 5 mm'ye ulaşan farelerde enjeksiyonun yapıldığı 1. günden, sakrifikasyonun yapıldığı 4. güne kadar her gün manuel tümör boyutu ölçümü yapılmıştır.

1 cm'nin üzerinde tümör boyutu olan gruplar için tüm grupların tümör boyut farkı, gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ( $p=0,145$ ). 1 cm'nin altında tümör boyutu hedeflenen grup ise sadece DOX-MB enjeksiyonu uygulanan grup olup tümör boyutu enjeksiyon öncesi ve sonrası olarak karşılaştırılmıştır.

### **Ultrasonografik Olarak Tümör Hacminin Ölçülmesi**

Ultrasonografik olarak tümör hacimleri yukarıda ön çalışmada da tanımlandığı ve uygulandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Özetlenecek olursa cihazın 3D görüntüleme yazılımı ve 3D görüntüleme motoru yardımı ile elde olunan 3D hacim görüntülerinin 3D değerlendirme yazılımında açılması ardından ölçüm yöntemi olarak paralel ve rotasyonel metodlar opsiyonunun seçilmesi ile tümör orta hattından her iki yöne olacak şekilde en az 10 ila 12 kesitte tümör sınırları manuel olarak çizilerek gerçekleştirilmiştir. Bu manuel çizimde her bir kesitte çizilen ROI (Region of interest)'ler tümör boyutu yüksek olan farelerde doğal olarak daha çok sayıda çizilmektedirler. ROI'ler arasındaki boşluğu cihazın yazılımı otomatik olarak doldurmaktadır.

### **Ultrasonografik Değerlendirme**

Ultrasonografik değerlendirme Visual Sonics Vevo 2100 model hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. 3D tümör hacim ölçümü tümör boyutları küçük olan farelerde MS 550 yüksek çözünürlüklü prob (22-55 MHz), tümör boyutu büyük olan farelerde ise MS 200 yüksek çözünürlüklü prob (9-18 MHz) ile yapılmıştır. MB enjeksiyonlarının olduğu dinamik görüntülerin hepsi ise "non-linear contrast mode" özelliği sebebiyle sadece MS 200 prob ile yapılmıştır.

Tümör geliştirilmiş nude fareler küçük hayvan tablasında tümörün görüntülenebileceği uygun pozisyonunda stabilize edilmiştir. Bu tabla sayesinde nude farelerin solunum ve kalp

atışları ultrasonografi ekranında izlenebilmekte, görüntü kaydı sırasında eş zamanlı olarak kayıt altına alınabilmektedir. Tanımlanan şekilde hazırlanan ve stabilize edilen nude farenin kuyruk veninden iğne ile kataterizasyon gerçekleştirilmiştir.

Cilt altı tümöre dik olarak konumlandırılan prob sabitlemiştir. Konumlandırma ve sabitleme için Vevo 2100 model hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazının komponenti olan üç boyutlu konumlandırma sistemi kullanılmıştır (**Şekil 15**). Tümörün uzun aksta orta noktası mikromanüpülatör (**Şekil 16**) ile bulunarak prob bu düzeye konumlandırılmıştır.

Cihazın 3D görüntüleme yazılımı sayesinde istenilen uzunlukta ve istenilen kesit sıklığı seçilerek üç boyutlu tarama gerçekleştirilmiştir. Bu sayede tümörün tamamı görüntülenerek kayıt altına alınmıştır. Bu işlem B-mod görüntülemeye ek olarak kontrast görüntüleme penceresi de açılarak tekrarlanmıştır. Elde olunan kontrast görüntüleme modu açıkken 3D görüntüler de kaydedilmiştir. Ardından farenin kuyruk veninden, hazırlanan mikroköpükçük solüsyonu (sadece MB veya DOX-MB) 0,3 ml hacimde uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak ultrasonografi görüntüleri kaydedilmiştir (**Video 4**).

Her bir enjeksiyonda 0. Dakikadan başlanarak 4. dakikaya dek aralıklı olarak yaklaşık 30-40 sn'lik görüntüler alınmıştır. Bu görüntüler enjeksiyon anında, 1.dk, 2. dk, ve 3. dk başlarında elde olunmuştur. Efektif bağlanma olabilmesi için eşdeğer ürün olan hedeflendirilmiş Vevomarker'da tavsiye edildiği gibi 4 dk boyunca beklenmiştir. 4. dakikanın sonunda 3D motor yardımıyla tüm tümör yine kontrast modu açık olarak baştan başa görüntülenmiş ve görüntüler "pre-destruct" patlatma öncesi görüntüler olarak kayıt edilmiştir. Bu görüntülerde tümör dokusu MB'lara sekonder ekojen olarak izlenmektedir. Hemen ardından cihazın 3D görüntüleme yazılımının bir fonksiyonu olan 3D patlatma özelliği ile tüm tümör boyunca prob otomatik olarak hareket ederek ve yüksek MI uygulayarak tüm tümör boyunca DOX-MB'lar patlatılmıştır. Bunun ardından "post-destruct" patlatma sonrası 3D görüntüler elde olunmuştur. Bu son görüntüleme sekansı ile işlem bitirilmiş ve prob uzaklaştırılarak nude fare sabitlemeleri kaldırılmıştır. Görüntülemesi biten deney hayvanı kafesine alınmıştır.



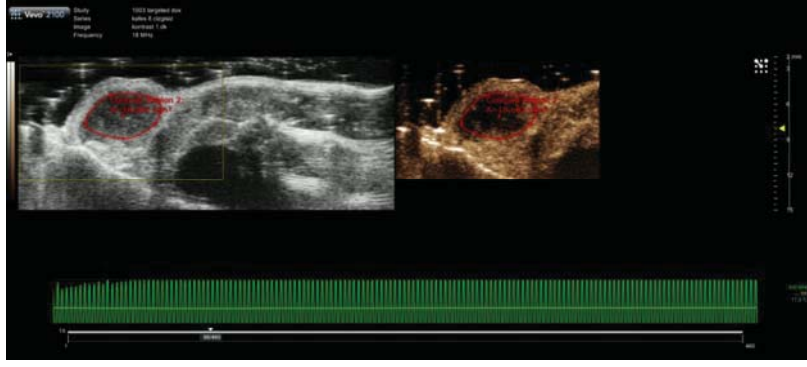


**Şekil 15.** Üç boyutlu konumlandırma sistemi ve fare değerlendirme.



**Şekil 16.** Mikromanüpülör sistem üzerinde milimetre ve santimetre cinsinden uzunluk birimleri bulunan ve hayvan tablasının x ve y ekseninde milimetre boyutunda hareket etmesine olanak sağlayan sistemdir. Bu sistem ile tümörün tam orta noktasına konumlandırma yapmak mümkün olmaktadır.





**video 4-kontrast 1.dk kafes 8 çizgisiz.avi**

**Video 4:** DOX yüklü hedeflendirilmiş MB'lar ile tümör kontrastlanması (Kafes 8 çizgisiz nude fare 1. Dk imajı)

Ultrasonografik değerlendirme işlemi sırasında yukarıda tanımlanan görüntüleme protokolünü oluşturan basamaklar aşağıda madde madde ne amaçla uygulandıkları belirtilerek tanımlanmıştır.

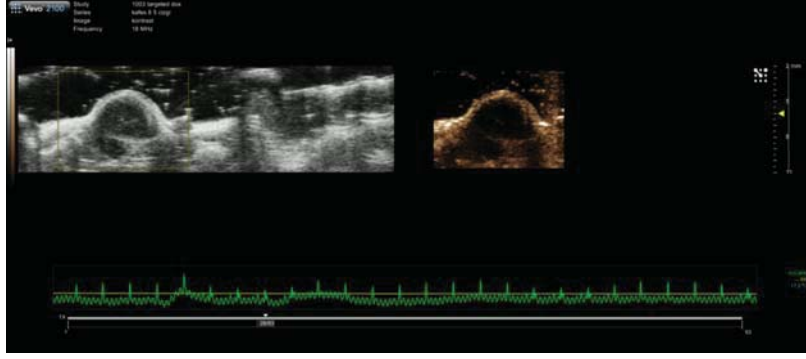
- 1) 3D B mod hacim görüntüleme: Bu görüntüleme ile işlem öncesinde tümör volümünün B mod ultrasonografi ile tüm trasesi boyunca yukarıda volüm tarama işleminde ayrıntıları belirtildiği gibi görüntüsü elde olunmuştur. Bu görüntüler kontrast modunda 3D volüm görüntülerinde tümör sınırlarının ve dolayısıyla tümör hacim değerlendirmesinin net olarak yapılamadığı farelerde tümör volümü ölçülmesi için kullanılmıştır.



**Video 5-3D b mode volüm görüntüleme Kafes 8 çizgi 5.avi**

**Video 5:** Cilt altı yerleşimli tümörün tüm volümü boyunca 3D taraması ile elde olunan görüntülerden tümör volümü hesaplanması mümkün olmaktadır (Kafes 8 çizgi 5 nude fare).

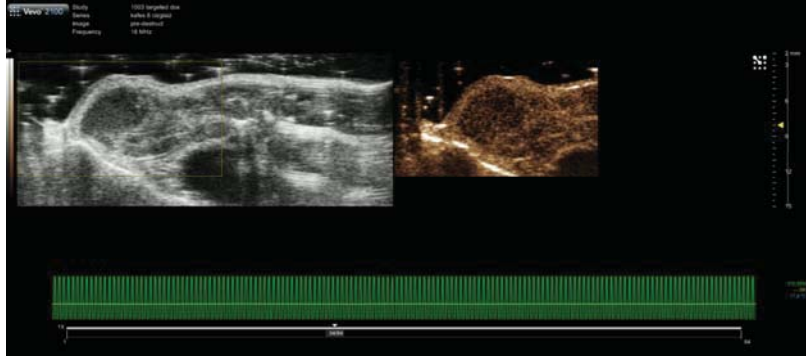
- 2) Kontrast 3D volüm görüntüleme: Bu görüntüleme sekansı 3D B mode görüntüleme işlemi üzerine kontrast görüntüleme fonksiyonu bindirilerek gerçekleştirilmiştir. Bu sekans kontrast fonksiyonu açık iken bazal görüntü elde etmek amacı ile alınmıştır. Ancak ölçümler sırasında bağlanma oranı hesaplarken cihaz baz görüntülere hiç bir faredede ihtiyaç duymadan sonuç verebilmiştir.



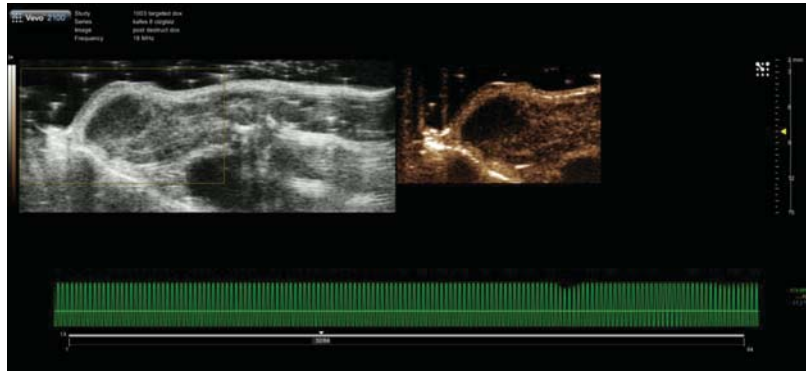
**Video 6-kontrast 3D volüm görüntüleme kafes 8 çizgi 5.avi**

**Video 6:** Birinci basamakta gerçekleştirilen 3D görüntüleme kontrast fonksiyonu açık iken ancak kontrast madde uygulanmadan önce bazal imaj olarak elde olunmaktadır. (Kafes 8 çizgi 5 nude fare)

- 3) MB 0. Dakika 2D görüntüleme: Bu görüntüleme sekansı kontrast fonksiyonu açık iken ilk perfüzyon ile tümörün dinamik kontrastlanma eğrisinin değerlendirilebilmesi için kullanılmıştır.
- 4) MB 1., 2., 3. Dakika 2D görüntüleme: Bu görüntüleme sekansları kontrast fonksiyonu açık iken DOX-MB'ların tümör dokusunda oluşturdukları ekojenite değişikliğinin değerlendirilebilmesi için uygulanmıştır.
- 5) Pre-destruct 3D hacim görüntüleme: Bu görüntüleme sekansı ile 4. dakikanın sonunda tümör dokusuna bağlı bulunan ve ek olarak doku içerisinde kan akımı ile sirküle olan tüm DOX-MB'ların patlatma öncesinde tüm tümör dokusu boyunca görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu görüntülen hedeflenmiş MB'ların bağlanma oranlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.



**Video 7-pre-destruct kafes 8 çizgisiz.avi**



**Video 8 -post destruct kafes 8 çizgisiz.avi**

**Video 7 ve Video 8:** Pre-destruct ve post-destruct görüntülerde patlatma ile tümörde oluşan ekojenite farkı görsel olarak da seçilebilmektedir. (Kafes 8 çizgisiz nude fare görüntüleri)

6) Post-destruct 3D volüm görüntüleme: Bu görüntüleme sekansı ile tüm tümör boyunca patlatma uygulandıktan sonra tüm tümör dokusunun kontrast fonksiyonu açık iken görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu görüntüler hedeflenmiş MB'ların bağlanma oranlarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

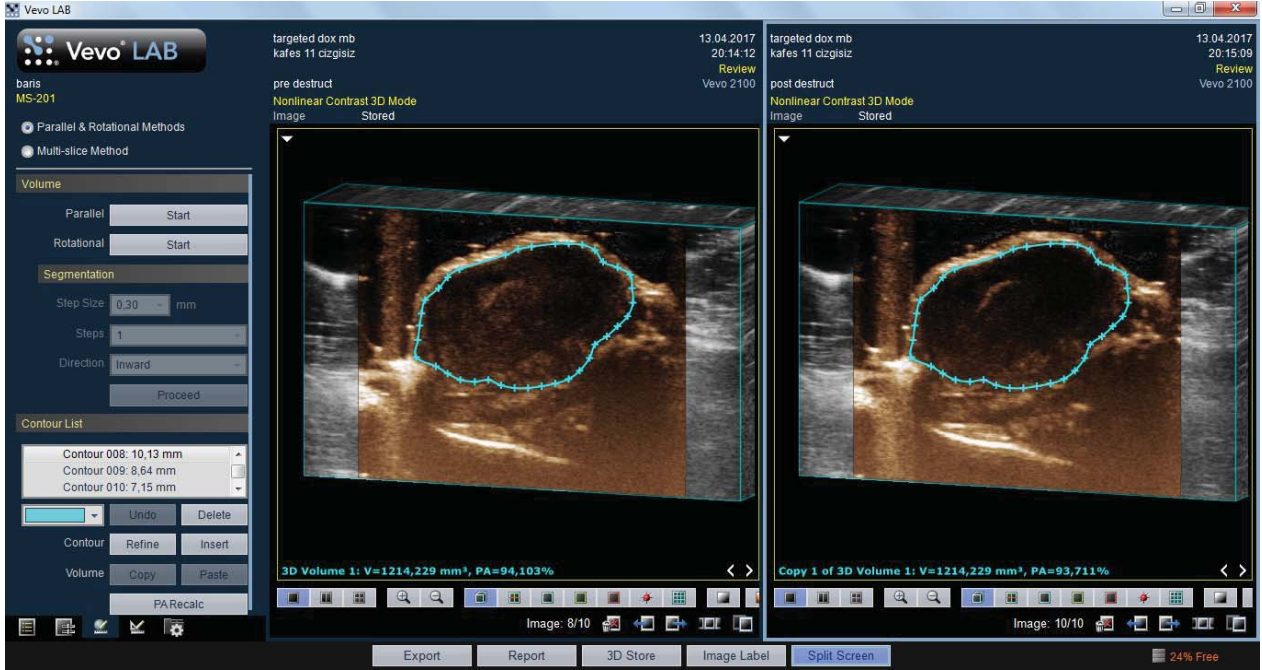
Yukarıdaki görüntüleme basamakları tamamlandıktan sonra ultrasonografik değerlendirme seansı sona ermiştir.

### **Görüntülerin Değerlendirilmesi ve Ölçümler**

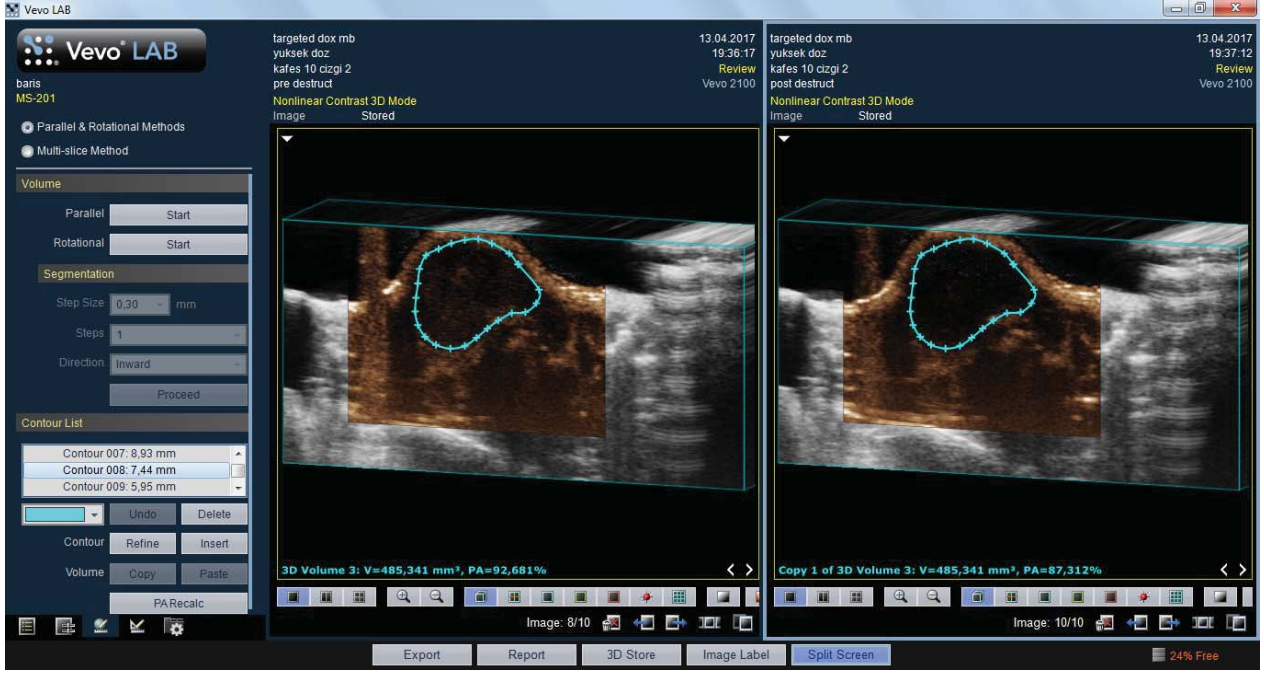
Tanımlanan görüntüleme protokolü ile elde olunan görüntülerden 3D tümör volümü, ilk geçiş "peak enhancement" değerleri ve bağlanma oranları ölçülmüştür.

3D hacim ölçümü yukarıda tanımlandığı gibi gerçekleştirilmiş olup 0. Gün olan enjeksiyon gününde ve 4. gün olan sakrifikasyon gününde uygulanmıştır. Bu sayede tümör volümündeki değişim takip edilmiştir.

Bağlanma oranı hedeflenmiş olarak uygulanan MB'lerden ne kadarının tümör dokusundaki antijen hedefine bağlanarak hedef alanda akümüle olduğunun belirlenmesidir. Bu amaçla Vevo 2100 yüksek çözünürlüklü ultrason cihazının 3D değerlendirme yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım sayesinde pre-destruct ve post-destruct görüntülerde yukarıda tanımlanan 3D volüm hesaplama yöntemi ile ROI'lerin çizilmesi ve volümün hesaplanması ardından yazılımın "PA percentage" ve "PA recalculation" tuşları kullanılarak sekanslara ait bağlanma oranları yüzde olarak hesaplanabilmektedir. Pre-destruct sekansında hesaplanan PA (Percent Agent) değerleri tümörde bağlı bulunan + dolaşımda olup görüntüden o sırada geçen MB'ları içermektedir. Post-destruct sekansındaki PA değerleri ise sadece dolaşımda olup görüntüden o sırada geçen MB'ları içermektedir. PA (Pre-destruct) – PA (Post-destruct) çıkarma işlemi uygulandığında elde olunan PA değerleri yüzde olarak bağlanma oranını vermektedir (**Şekil 17**, **Şekil 18**).



**Şekil 17.** PA (bağlanma oranları) değerlerinin hesaplanması. Bu resimde de izlendiği gibi solda yer alan Pre-destruct imajlarda tümör dokusu daha ekojen iken (bağlanan +dolaşımdaki MB lar) post-destruct imajlarda (bağlı MB lar patlatılmış, sadece dolaşan MB lar var) tümör ekojenitesi daha azdır. Yukarıdaki örnekte bağlanma oranı: %94,103-%93,711 = %0,392 dir.



**Şekil 18.** Yukarıdaki örnekte ise Bağlanma oranı: %92,681- %87,312 = % 5,369 dur.

Hesaplama işlemi sırasında çizilen ROI'ler pre-destruct yada post-destruct sekansından birinde gerçekleştirilerek diğerine kopyalanmakta böylece tam olarak her iki sekansta da aynı ROI'lerin yerleştirilmesi mümkün olmaktadır. Hareket ya da görüntü tekrarı gibi bire bir eş görüntülerin alınmadığı deneklerde ise kopyalanan ROI'lerin yerleri yeniden pozisyonlandırılarak ya da yeni ROI'ler çizilmesine rağmen önceki sekans ile aynı volümde ve şekilde olmalarına dikkat edilerek karşılaşılan sorunun üstesinden gelinmiştir. Bu tip hareketli deneklerde yineleyen ölçümler uygulanmış aynı ya da çok yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu sayede ölçümün doğru olarak uygulandığını kanıtlamıştır.

İlk geçiş PE değerleri ve dört dakikalık dönemde ekojenite değişim eğrileri beklenen hemodinamik değişim açısından değerlendirilmiştir.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin hazırlanması ve karakterizasyonu

Mikroköpükçüklere ilaç yüklenmesi, lipozomlar vasıtasıyla yapılmaktadır. Lipozomlar, fosfolipidlerin suda kendiliğinden oluşturduğu içi su dolu lipid çift tabaka (bilayer) kürecikler olarak tanımlanır. Fosfolipidlerin amfifilik (hidrofilik ve hidrofobik) yapısı, sulu ortamda çözünmüş bileşenlerin bilayer membran içinde tutuklanmasına imkan sağlar. Lipozomlar biyolojik membran uygulamaları için bir model olarak kullanıldığı gibi ilaç taşıma sistemlerinde de kullanılmaktadır. Hedef dokuya yönlendirilebilmesi, daha yüksek çözünürlük sağlaması, farmakokinetik etkileri artırması, hidrofobik, hidrofilik ve amfipatik ilaçların taşınımına imkan sağlaması ve tutuklanmış ajanın toksisitesini düşürmesi, lipozomların ilaç taşıma için kullanımının avantajları arasındadır. Biyolojik membranlarla büyük ölçüde benzerlik gösterdikleri için biyoyumlu ve biyobozunur olmalarının yanı sıra toksik ve immunojenik değildirler. Bunun yanı sıra lipozomların ilaç taşıma sistemlerinde kullanımının bazı dezavantajları da vardır. Örneğin, PEG-lipozomların boyutları 150 nm'nin üzerinde olması dolayısıyla tümör dokusuna penetrasyonu kısıtlanmaktadır ve diğer ilaç taşıma sistemlerine kıyasla tümöre ulaşabilirlikleri daha düşüktür. Ayrıca lipozomların topaklaşma oluşturan hidrofobik ilaçlarla kullanımında zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu çalışmada, membran por boyutunun lipozom boyutu, lipid kompozisyonu, hidrasyon konsantrasyonu, ekstrüzyon sırasındaki geçiş sayısı, ve geçiş hızı'nın lipozom boyutu ve lipozom stabilitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

#### 4.1.1. Lipozomların hazırlanması ve karakterizasyonu

**Lipid Film Üretimi ve Hidrasyon:** Lipid ince filmler DSPC, DPPC, Kolesterol, DPPE-PEG<sub>2000</sub> ve DSPE-PEG<sub>2000</sub> lipidleri kullanılarak hazırlanmıştır. Bu lipidler ile 4 farklı kombinasyonda lipid:Kolesterol:lipopolimer karışımları oluşturulmuş ve farklı kompozisyonlarda denenmiştir. Ayrıca, lipid türünün etkisinin incelendiği deneyler de yapılmıştır. Bu kombinasyonlara ek olarak, lipidler farklı molar oranlarda karıştırılmıştır. Tüm kompozisyonlarda PEG'lenmiş lipid (lipopolimer) oranı %5 (molar) olarak sabit tutulmuştur. Deneylerde kullanılan lipozom kompozisyonları **Tablo 4**'de verilmiştir. Lipozom kompozisyonunun lipozom boyutu üzerine etkisinin incelendiği deneyler dışındaki tüm deneylerde lipozom kompozisyonu 57:38:5 olarak sabit tutulmuştur.

**Tablo 4.** Lipid molar kompozisyonları

| Molar Oranlar                            |
|------------------------------------------|
| DSPC:Kolesterol:DSPE-PEG <sub>2000</sub> |
| 80:15:05                                 |
| 75:20:05                                 |
| 67:28:05                                 |
| 57:38:05                                 |

**Tablo 4**'de belirtilen türde ve kompozisyonda lipidler karıştırılarak kloroformda çözdürülmüştür. Ardından kloroform Azot gazı yardımıyla uçurulmuştur. Kalan kloroformun uzaklaştırılması için lipid ince filmler bir gece vakum altında bekletilmiştir. Hazırlanan filmler - 20 °C dondurucuda saklanmıştır. **Şekil 19**' de lipid ince film tabakası gösterilmiştir.

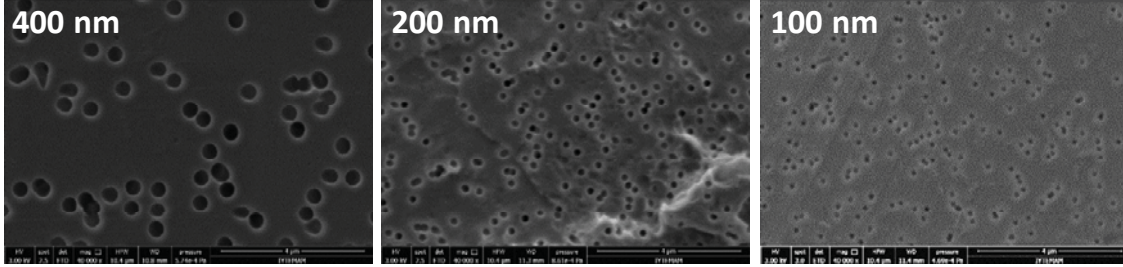


**Şekil 19.** Lipid ince film tabakası hazırlanması

Lipid ince filmlerden multilamelar veziküllerin oluşturulması için 0.25 M Amonyum Sülfat (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) tampon çözeltisi (pH 5.4) ile 60°C'de 30 dakika boyunca hidrasyon gerçekleştirilmiştir. Hidrasyon konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisinin incelendiği deneyler dışındaki tüm deneylerde, hidrasyon konsantrasyonu 20 µM olarak sabit tutulmuştur. Ayrıca 10 ve 40 µM konsantrasyonlarda deneyler gerçekleştirilerek hidrasyon konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisi gösterilmiştir.

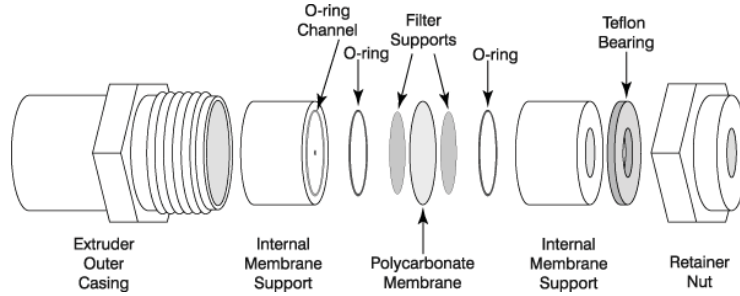
**Ekstrüzyon:** Genel olarak, 57:38:5 oranında DSPC:Kolesterol:DSPE-PEG<sub>2000</sub> lipid filmleri 20 µM konsantrasyon olacak şekilde hidrasyon edilerek üretilen çok katmanlı (multilamelar) veziküller, farklı koşullarda membranlardan ekstrüde edilerek boyutları küçültülmüş ve tek katmanlı iki tabaka (unilamelar bilayer) yapıda lipozomlar üretilmiştir. Membran olarak **Şekil 20**'de gösterilen polikarbonat membranlar kullanılmıştır. Daha küçük boyutlarda lipozomlar elde edebilmek üzere 200 nm ve 100 nm gözenek büyüklüğüne sahip

membranlar kullanılmıştır. Bu durumda uygulanan basınç göreceli olarak arttığı gözlenmiştir(Sood 1999).



**Şekil 20.** Polikarbonat membranların gözenek büyüklükleri

İlk olarak laboratuvar ölçekli mini-ekstrüder **Şekil 21**'deki gibi düzenlenerek ısıtıcının üzerine yerleştirilmiştir. Yaklaşık 30 dakika sistemin ısıl dengeye gelmesi için beklenmiş, sıcaklık 73 °C' de sabit kaldıktan sonra 1 ml' lik hamilton şırıngalar ekstrüdere yerleştirilerek içerisinde Amonyum Sülfat tampon çözeltisi geçirilmiştir. Böylece sistem içindeki boş hacimden kaynaklanan kayıpların minimize edilmesi amaçlanmıştır.



**Şekil 21.** Ekstrüder kurulumu (Avanti Lipids)

Daha sonra hidrasyona tabi tutulmuş lipid çözeltisi **Şekil 22**'te gösterildiği gibi ekstrüdere yerleştirilerek yaklaşık 10 dakika ısıl dengeye ulaşmak için beklenmiştir. Sistem ısıl dengeye ulaştıktan sonra şırınga pompası yardımıyla lipid çözeltisi ekstrüderden geçirilmiş ve böylece homojen boyut dağılımına sahip lipozomlar elde edilmiştir. İlk olarak homojen bir boyut dağılımına sahip olmak için gerekli geçiş sayısı belirlenmiştir. Ardından geçiş hızı, por çapı, lipid türü, lipid kompozisyonu ve hidrasyon konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisi incelenmiştir.



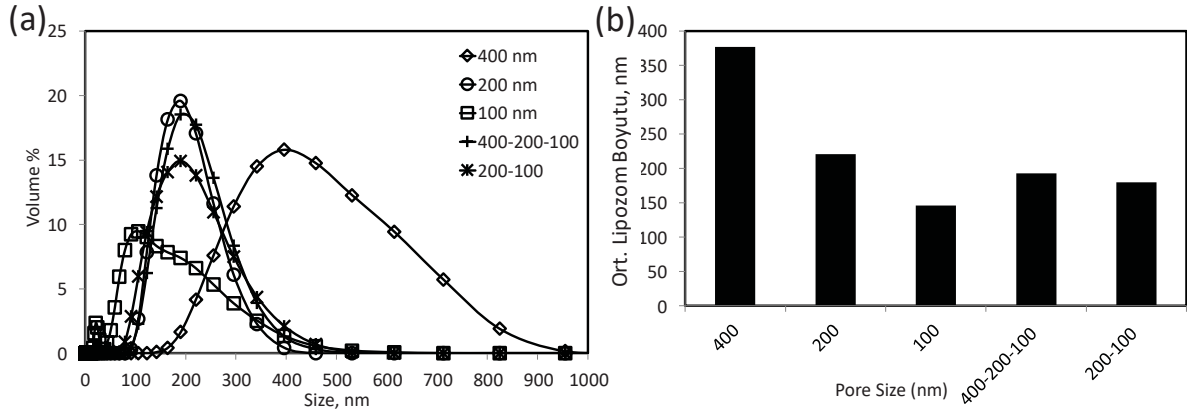


**Şekil 22.** Ekstrüzyon sistemi

**Karakterizasyon:** Lipozomların karakterizasyonu boyut dağılımının belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, dinamik ışık saçılması (Malvern Zetasizer) kullanılmıştır. 3 ölçüm yapılarak ortalama lipozom boyutu belirlenmiştir.

#### **Lipozom Boyutunu Etkileyen Parametreler:**

**Por Çapı:** Por çapının lipozom boyutu üzerine etkisini incelemek amacıyla lipid çözeltisi 400 nm, 200, ve 100 çaplı membranlardan 2 ml/dk hızla 10'ar kez geçirilmiştir. Ayrıca 400-200-100 ve 200-100 olacak şekilde her membrandan 5'er kez geçirilerek lipozom üretilmiştir. **Şekil 23(a)**'da farklı por çaplarında membranlardan geçirilerek elde edilen lipozomların hacimce boyut dağılımları gösterilmektedir. 400 nm'lik membrandan geçirilen lipozomların boyut dağılımı oldukça geniş bir aralıktadır. Bu nedenle 400 nm çaplı membranlar ile homojen boyut dağılımına sahip lipozom üretmenin mümkün olmadığı görülmüştür. 200 ile 200-100 sistemleri kıyaslandığında 200 nm membranla elde edilen lipozomların daha dar bir boyut dağılıma sahip olduğu, bu nedenle ekstrüzyon için daha uygun olduğu anlaşılmıştır. **Şekil 23(b)**'de por çapına bağlı olarak ortalama lipozom boyutları karşılaştırılmıştır. 200 nm ve 200-100 nm çaplı polikarbonat membranlarla yapılan deneylerde elde edilen lipozomların boyutları istenilen aralıklardadır. 400-200-100 ile 200-100 arasında önemli fark olmadığı için 3 kademeli ekstrüzyona gerek duyulmamıştır. 200 ile 200-100 arasında boyut farkı olsa da 200 nm çaplı membranlarla elde edilen lipozomların boyutu istenilen ortalama boyutlarda olduğu görülmüştür. İleriki aşamalarda, gerek duyulduğu takdirde, daha küçük boyutlu lipozomlar üretmek için 200-100 ekstrüzyon sisteminin kullanılabilir.



**Şekil 23.** Farklı por çaplarına göre (a) lipozom boyut dağılımları (%Hacim), (b) Ortalama lipozom boyutu

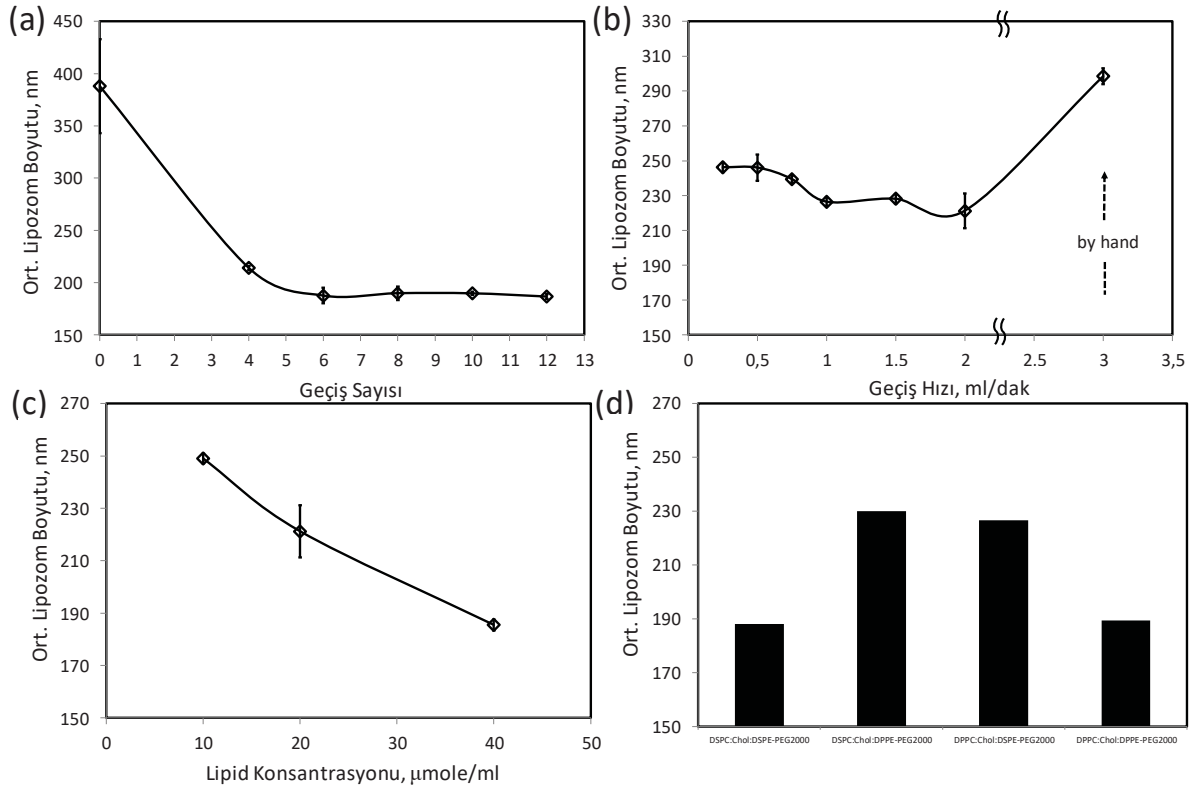
**Geçiş Sayısı:** Homojen boyut dağılımına sahip olmak için gerekli geçiş sayısını belirlemek amacıyla 20  $\mu\text{M}$ 'lık DSPC:Kolesterol:DSPE-PEG<sub>2000</sub> (57:38:5) lipid çözeltisi 200 nm'lik membranlardan 0,75 ml/dk hızla geçirilmiş, 4, 6, 8, 10 ve 12. geçişlerden sonra örnek alınarak boyut analizi yapılmıştır. Sonuçlar **Şekil 24(a)**'da özetlenmiştir. Şekilden görüleceği üzere, 6 geçişten sonra ortalama boyut dağılımında önemli fark görülmemektedir. 8. ve 10. geçişlerin ortalaması birbirine çok yakın olsa da 10. geçişte standart sapma daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, lipozomların steril olabilmeleri için, iyi üretim kuralları (Good Manufacturing Practice, GMP) gözönünde bulundurularak, ekstrüzyon sıvısının membran sonrasında toplanmasına karar verilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda membranlardan 11'er kez geçirilmesine karar verilmiştir. İsaiović ve arkadaşlarının çalışmasında membranlardan 11 kez geçişin yeterli olduğu gösterilmiştir. Yine Avanti Lipids firması tarafından en az 10 geçiş yapılması gerektiği bildirilmiştir.

**Geçiş Hızı:** Geçiş sayısı belirlendikten sonra geçiş hızının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla şırınga pompası yardımıyla hızın sabit tutulduğu sistemde 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5 ve 2,0 ml/dk hızla lipid çözeltisi ekstrüzyona tabi tutulmuştur. Ayrıca şırınga pompası kullanılmadan elle ekstrüzyon da gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar **Şekil 24(b)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, membrandan geçiş hızı arttıkça ortalama lipozom boyutunda azalma olmaktadır. Ancak manüel yapılan daha yüksek geçişlerde, muhtemelen membranda meydana gelen bozulma ve patlamadan dolayı, ortalama lipozom boyutlu yüksek çıkmıştır. Patty ve Frisken (Patty ve Frisken 2005) çalışmalarında lipozom boyutunun basınçla değişimini incelemişler ve basınç belli bir değere kadar yükseldiğinde lipozom boyutunun azaldığını ancak belli bir noktadan sonra artan basıncın boyutu etkilemediğini göstermişlerdir. Bernoulli Denklemi'ne göre sıvıların hızı basınçla ilişkilidir. Bu nedenle, geçiş hızının boyut üzerine etkili bir parametre olduğu düşünülmüştür. Bu bulgu, Patty ve Frisken' in ortaya koyduğu sonuçlarla uyumludur.

Deneylerde kullanılan şırınga pompası en fazla 2 ml/dk' ya çıkabildiği için ancak bu değere kadar çalışılabilmektedir. Şırınga pompası kullanılmadan manüel yapılan deneylerde sabit bir geçiş hızı sağlanamaması dolayısıyla geniş bir boyut dağılımı gözlenmiştir. Bu nedenle manüel geçişin homojen boyut dağılımına sahip lipozomlar elde etmek için uygun olmadığına karar verilmiştir. En küçük lipozom boyutuna ulaşabilmek amacıyla 2 ml/dk ekstrüzyon hızı olarak seçilmiştir.

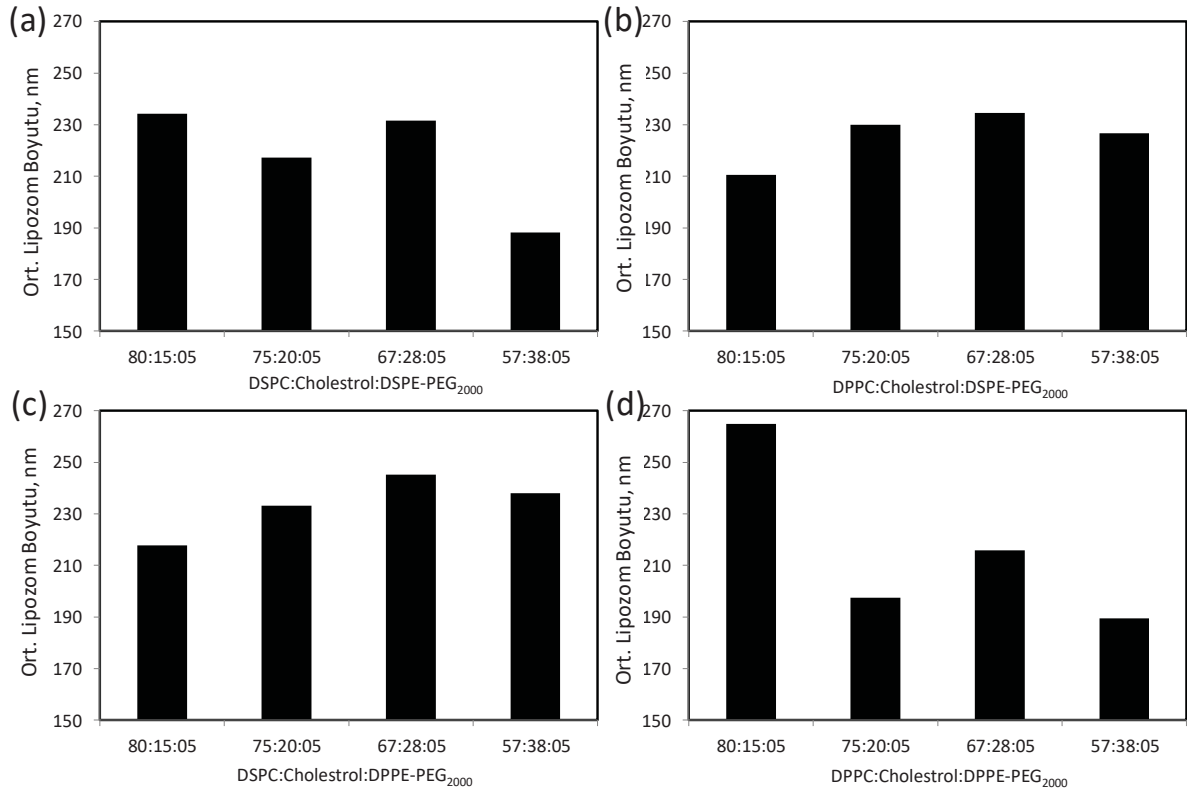
**Hidratasyon Konsantrasyonu:** Hidratasyon konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisini incelemek amacıyla 10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$ ' lık lipid çözeltileri 200 nm por çaplı membranlardan 2 ml/dk hızla 10 kez geçirilmiştir. **Şekil 24(c)**'de görüldüğü gibi hidratasyon konsantrasyonu arttıkça daha düşük boyutlarda lipozomlar elde edilebilmektedir.

**Lipid ve Emülsifier Türünün Etkisi:** Lipid ve lipopolimer türünün ortalama lipozom boyutu üzerine etkisi incelenmiştir. Aynı molar oranlarda farklı türde lipid ve lipopolimer ile hazırlanan lipozomların ortalama boyutları ölçülmüştür. Sonuçlar **Şekil 24(d)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ortalama çapları 200 nm olan lipozomlar lipidlerin ve lipopolimer moleküllerin türüne bağlı olmaksızın üretilmektedir.



**Şekil 24.** (a) Geçiş sayısının lipozom boyutu üzerine etkisi, (b) Geçiş hızının lipozom boyutu üzerine etkisi, (c) Hidratasyon konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisi, (d) Por çapının lipozom boyutu üzerine etkisi

**Lipid Türü ve Kompozisyonlarının Etkisi:** Lipid türü ve kompozisyonlarının lipozom yapısını, hareketliliğini ve stabilitesini etkilediği bilinmektedir. Ancak, lipozom boyutu üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. **Tablo 4**'de verilen lipid türleri ve molar oranlarda hazırlanan lipozomların boyut analizi sonuçları **Şekil 25**'de verilmiştir. Tüm deneylerde, bilayer yapının monolayere dönmesini önlemek amacıyla, PEG'lenmiş lipid oranı %5'te sabit tutulmuştur. **Şekil 25(a)**'da görüldüğü gibi DSPC:Kol:DSPE-PEG<sub>2000</sub> lipidleri 57:38:05 oranında karıştırıldığında, tüm deneylerdeki en küçük lipozom boyutu 188 nm olarak elde edilmiştir. **Şekil 25(b)**'de ise DPPC:Kol:DSPE-PEG<sub>2000</sub> karışımının molar oranı 80:15:05 olduğunda en düşük lipozom boyutuna (210 nm) ulaşılmıştır. DSPC:Kol:DPPE-PEG<sub>2000</sub>'nin 80:15:05'lik karışımının boyutu 217 nm' dir. **Şekil 25(c)**'de en küçük lipozomların bu lipid karışımından elde edildiği görülmüştür. **Şekil 25(d)**'de DPPC:Kol:DPPE-PEG<sub>2000</sub>'nin 57:38:05 oranında karıştırıldığında lipozom boyutunun 189 nm olduğu görülmüştür. Bu deneylerin sonucunda molar oran ve lipid türlerinin boyut üzerinde tek başına etkili olmadıkları ama birlikte lipozom boyutunu etkiledikleri görülmüştür. DSPC-DSPE-PEG<sub>2000</sub> ve DPPC-DPPE-PEG<sub>2000</sub> karışımları 57:38:05 molar oranında en küçük lipozomları oluştururken, DSPC-DPPE-PEG<sub>2000</sub> ve DPPC-DSPE-PEG<sub>2000</sub> karışımları 80:15:05 oranında karıştırıldığında en küçük boyutlu lipozomlar oluşmuştur. Lipid kompozisyonunun lipozom yapısını etkilediği, membranın akışkanlığı, geçirgenliği ve stabilitesi üzerine etkisi olduğu bilindiği halde lipozom boyutu üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. 200nm polikarbonat membran kullanıldığında, lipid ve lipopolimer türüne bağlı olmaksızın ortalama çapları yaklaşık 190-200 nm olan lipozomlar üretilbileceği anlaşılmıştır.



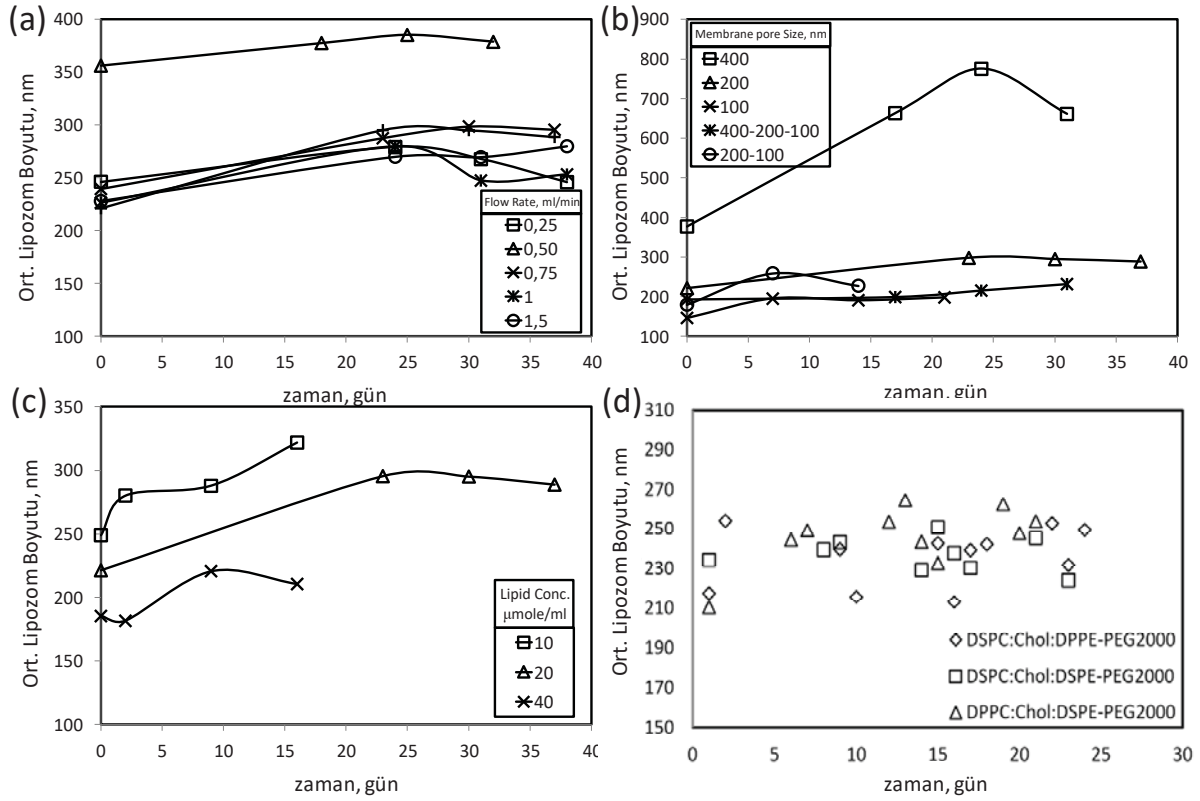
**Şekil 25.** Lipid türü ve konsantrasyonunun lipozom boyutu üzerine etkisi. A)DSPC:Kol:DSPE-PEG2000, B) DPPC:Kol:DSPE-PEG2000, C) DSPC:Kol:DPPE-PEG2000, D) DPPC:Kol:DPPE-PEG2000

### Lipozom Stabilitesi:

Lipozom stabilitesi, ilaç taşıma sistemi tasarımında önemli bir kriterdir. Lipozomların içerisine hapsettiği ilacı mümkün olduğunca uzun süre kaybetmemesi ve vücutta hedef dokuya kadar ilacı taşıyabilmesi istenmektedir. Bu çalışmada lipozomların stabilitesini belirlemek amacıyla yaklaşık 30 gün boyunca belirli aralıklarla boyut analizi yapılmıştır. Farklı por çapı ve geçiş hızında üretilen lipozomların stabilite ve lipid kompozisyonunun lipozom stabilitesi üzerine etkisi incelenmiştir. DSPC:Kol:DSPE-PEG<sub>2000</sub> (57:38:05) lipid karışımının 200 nm çaplı membranlardan farklı hızlarda geçirilmesiyle üretilen lipozomların zamana bağlı boyut değişimi **Şekil 26(a)**'da verilmiştir. Bu grafiğe göre, geçiş hızı fark etmeksizin, üretilen tüm lipozomlar bir aydan uzun süre stabil kalmış, lipozom boyutu 220-250 nm iken en fazla 290 nm'ye kadar yükselmiştir. 0.5 ml/dk için başlangıçtaki lipozom boyutunun diğerlerinden yüksek olduğu daha önce belirtilmiş idi. Ancak bu lipozomların da boyutunda büyük oranda değişme görülmemiştir. Bu nedenle, geçiş hızının lipozom stabilitesini belirleyen bir faktör olmadığı söylenebilir.

DSPC:Kol.:DSPE-PEG2000 (57:38:05) lipid karışımının 2 ml/dk hızla farklı çaplara sahip membranlardan geçirilmesiyle üretilen lipozomların zamana bağlı boyut değişimi **Şekil 26(b)**'de verilmiştir. Bu grafiğe göre, 400 nm dışındaki por çapları için lipozom boyutunun bir aydan uzun süre stabil kaldığı görülmüştür. 400 nm por çaplı membranlar ile üretilen lipozomların başlangıçta da boyut dağılımının oldukça geniş olduğu ve ortalama lipozom boyutunun yüksek olduğu yukarıda belirtilmiştir. Bu lipozomların boyutları zamanla artmıştır. Bunun dışındaki tüm por çaplarında üretilen lipozomlar istenilen stabiliteye sahiptir. Farklı mol oranlarındaki DSPC:Kol.:DPPE-PEG<sub>2000</sub> lipid karışımlarının 2 ml/dk hızla 200 nm por çaplı membranlardan geçirilmesiyle elde edilen lipozomların zamana bağlı boyut değişimi **Şekil 26(c)**'de verilmiştir. 80:15:05, 75:20:05, 67:28:05 mol oranlarındaki lipozomların boyutlarının 24 gün boyunca büyük ölçüde aynı kaldığı, 300 nm' yi aşmadığı görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda DSPC:Kol.:DSPE-PEG<sub>2000</sub> lipid karışımlarının 2 ml/dk hızla 200 nm por çaplı membranlardan geçirilmesiyle elde edilen lipozomların boyutları 40 gün boyunca belirli aralıklarla ölçülmüş ve sonuçlar **Şekil 26(c)**'de verilmiştir. Lipozomların boyutlarının büyük ölçüde aynı kaldığı görülmüştür. 80:15:05 oranındaki DSPC:Kol.:DPPE-PEG<sub>2000</sub>, DSPC:Kol.:DSPE-PEG<sub>2000</sub> ve DPPC:Kol.:DSPE-PEG<sub>2000</sub> lipid karışımlarının 2 ml/dk hızla 200 nm por çaplı membranlardan geçirilmesiyle elde edilen lipozomların zamana bağlı boyut değişimini gösteren grafik **Şekil 26(d)**'de verilmiştir. Burada görüldüğü gibi lipozomlarının boyutu nispeten daha az değiştiğinden stabil oldukları söylenebilir.

Genel olarak ilk gün ölçüm sonrasında lipozomların boyutlarının birbirine benzer oldukları bulunmuştur. İlk gün alınan ölçümler, lipozomlar sentezlendikten sonra ve sıcaklık değerleri ortam sıcaklığında ya da göreceli olarak daha yüksek sıcaklıkta ölçülen değerlerdir. Daha sonraki günlerde ise buzdolabından alınan lipozomlar ölçülmüştür. Yani, sıcaklıkları 4 °C civarındadır. 4 °C'da ölçülen lipozomların boyutları büyük olmakla birlikte, birbirini takip eden ölçümlerde farklılık olmaması, sıcaklığın lipozom boyutu üzerine etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Sonraki çalışmalarda bu düşünce doğrulanmıştır. Lipozom boyutunun sıcaklıkla daha çok değiştiği ve genel olarak lipozomların stabil olarak kaldıkları kanaatine varılmıştır.

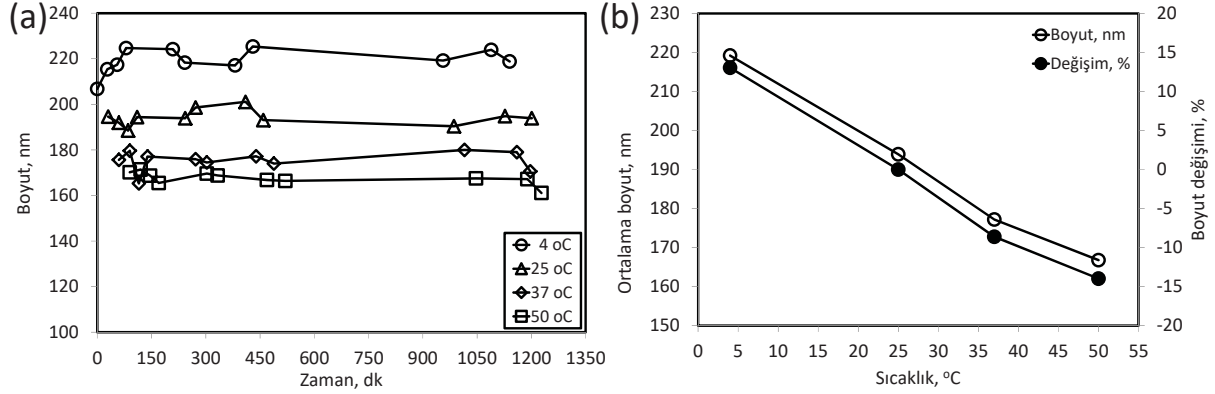


**Şekil 26.** (a) Geçiş hızının lipozom stabilitesi üzerine etkisi, (b) Por çapının lipozom stabilitesi üzerine etkisi, (c) , (d) 80:15:05 mol oranında farklı lipid türlerinin lipozom stabilitesi üzerine etkisi

### Sıcaklığın Lipozom Boyutu Üzerine Etkisi:

Lipozomların saklama koşullarında, oda sıcaklığında ve vücut içerisinde sıcaklığa bağlı olarak boyut hacimlerinde görülebilecek değişiklikler incelendi. Bunun için DLS yöntemi (Malvern Zetasizer Nano Series) kullanılarak zamana göre belirli sıcaklıklarda bekletilmiş olan lipozomların boyut dağılımlarına bakıldı. Lipozomlar su banyosunda 4°C, 25°C, 37°C ve 50°C sıcaklıklarda bekletildi ve belirli aralıklarda örnekler alınarak DLS ile ölçümleri yapıldı. Amonyum sülfat (250 mM, pH=5,4) tampon çözeltisi ile hazırlanan lipozomlar yine aynı tampon çözelti içerisinde seyreltilti. **Şekil 27(a)**'da görüleceği üzere, ilk yarım saatte farklı sıcaklıklarda farklı boyutlara ulaşan lipozomların zamanla boyutlarında değişme olmadan kaldığı görülmektedir. **Şekil 27(b)**'de lipozomların sıcaklık ile ortalama boyutları gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, sıcaklık azaldıkça lipozomların ortalama boyutlarında bir büyüme, ve sıcaklık arttıkça boyutlarında bir küçülme olduğu görülmektedir. Oda sıcaklığına göre vücut sıcaklığında lipozomların boyutlarında yaklaşık %10 oranında bir küçülme olacağı düşünülmektedir. Öte yandan, buzdolabında saklanacak lipozomların boyutlarında %15 oranında bir büyüme olacağı anlaşılmaktadır. Buzdolabında +4°C

sıcaklıkta saklanan lipozomların vücut sıcaklığına geldiğinde boyutlarında yaklaşık %25 oranında bir küçülme olacağı beklenmektedir. Sıcaklık etkisi, ilaç yüklemeye de anahtar parametrelerden biri olacaktır.

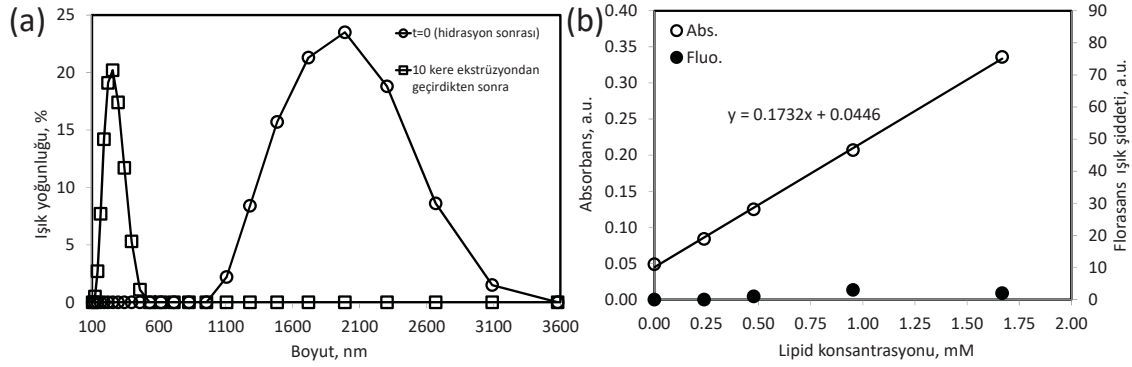


**Şekil 27.** (a) Zamana göre lipozomların boyut dağılımında görülen değişiklik (b) Lipozomların sıcaklık ile ölçülen ortalama boyutları

### Lipozomların UV Absorblama ve Floresan Özellikleri:

Lipozomların absorblama ve floresan özellikleri ölçülmüştür. Lipozom yapmak üzere hidratasyona tabi tutulan lipidlerden alınan numunelerden ortamda çok büyük (giant) lipozomların olduğu ve **Şekil 28(a)**'da görüleceği üzere boyut dağılımlarının 1-4  $\mu\text{m}$  olduğu görülmüştür. Hidratasyon sonrası lipidler 200 nm polikarbonat filtre ile ekstrüzyona tabi tutulduğunda 100-500 nm gibi dar bir boyut aralığında ve 190 nm ortalama çapta lipozomlar üretilmiştir. İlaç yükleme ve daha sonra hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerde kullanılacak bu lipozomların kullanılacak dalga boylarında ışık absorblama ve floresan özellikleri ölçülmüştür. Lipozomların hazırlanması esnasında kullanılan lipid miktarı baz alınarak farklı seyreltmelerde hazırlanan lipozom örneklerinin absorbans ve floresans değerleri **Şekil 28(b)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ortamda lipozom varlığında, ışık saçılmasından dolayı, absorbans değerlerinde artış olduğu görülmektedir. Absorbans değerlerindeki bu artış lipozom konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ölçülen absorbans değerlerinin lipozom sayısı ile doğru orantılı olduğu anlaşılmaktadır. Öte yandan, ortamda lipozom varlığında floresans değerlerin bir artış neredeyse yoktur. Lipozomlara ilaç yüklemesi durumunda, gerekli ölçümlerin absorbans yöntemi ile değil, floresan ölçüm yöntemiyle yapılması kanaatine varılmıştır.



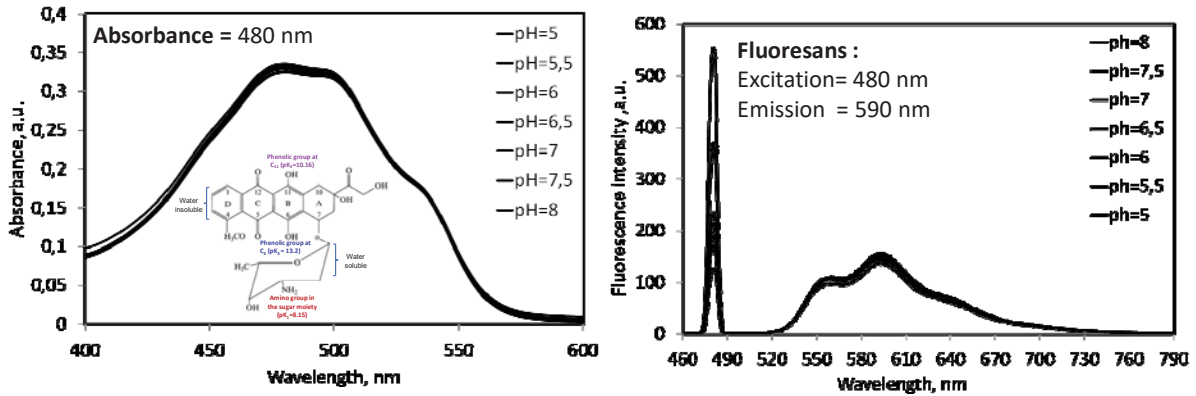


**Şekil 28.** Çok katmanlı büyük lipozom veziküllerinden (MLV) tek katmanlı vezikül (LUV) oluşturma işlemi sonucu boyut dağılımı (b) lipozom'ların hazırlanması için harcanan lipid miktarına göre absorbans ve floresans değerleri

#### 4.1.2. Lipozomlara DOX yüklenmesi ve karakterizasyonları

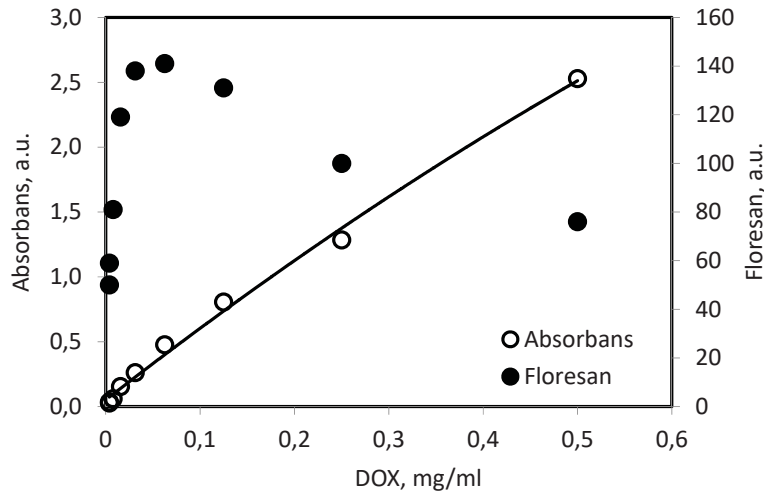
##### Doksorubisin (DOX) karakterizasyonu:

Lipozomlara ilaç olarak Doksorubisin Hidroklorit (DOX) yüklenmiştir. Yüklenen DOX miktarının tayini için yöntem geliştirilmesi gerekmektedir. İlk olarak DOX'un absorbans ve floresan özellikleri tespit edilmiştir. Bu amaçla, pH=8.0'e kadar farklı pH'larda DOX'un farklı dalga boylarında absorbans ve floresans scan değerlerine bakılmıştır. **Şekil 29'**de DOX'un farklı dalga boylarında absorbans ve floresans değerleri gösterilmektedir. Buna göre, DOX'un absorbans değeri 480 nm, floresan değeri ise eksitasyon 480 ve emisyon 590 nm olduğu anlaşılmıştır. Literatürde ise absorbans değerinin 480 nm ve floresan değerinin eksitasyon 480 emisyon 560-590 nm arasında değiştiği belirtilmiştir (De Lange vd. 1992). Ayrıca, bu sonuçlara göre, pH=8 değerinden küçük değerlerde absorbans ve floresans değerlerinin pH'dan etkilenmediği anlaşılmıştır.



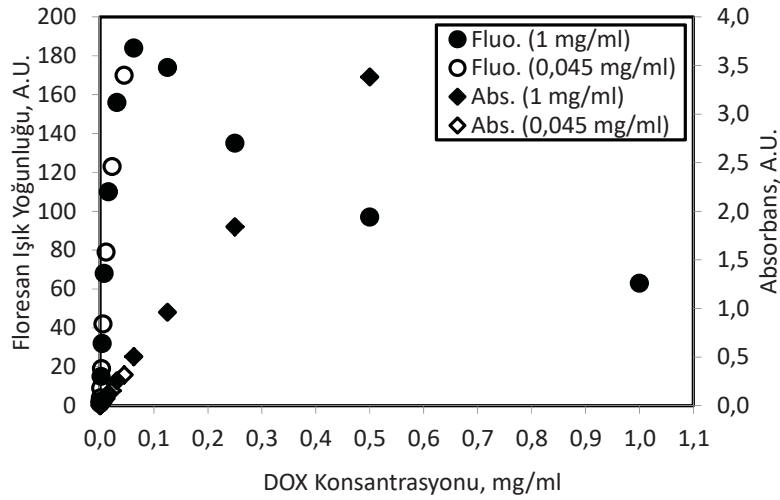
**Şekil 29.** İlaç olarak kullanılacak DOX'un farklı pH'larda ve farklı dalga boylarında (a) absorbans ve (b) floresans spektrofotometre değeri

Absorbans ölçümleri esnasında ortamda bulunacak lipozomlardan absorbans değerleri etkileneceğinden, DOX tayininde floresan ölçüm yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir. PBS tampon çözeltisi ile pH=7.05'de farklı konsantrasyonlara seyreltilen DOX'un absorbans ve floresan kalibrasyonu yapıldı. DOX çözeltisinin floresan ve absorbans kalibrasyon eğrisi **Şekil 30'**de gösterilmektedir. DOX konsantrasyonu 15.62 µg/ml'a kadar olan konsantrasyonlarda doğrusal bir eğri elde edilirken, bu değerlerin üzerindeki DOX konsantrasyonlarında absorbans değerlerinde doğrusallıktan sapma, ve floresan değerlerinde ise, ışığın birbirine yakın moleküller tarafından soğurulması nedeniyle (quenching effect), floresan değerlerinde önemli bir azalmaya gittiği görülmektedir.



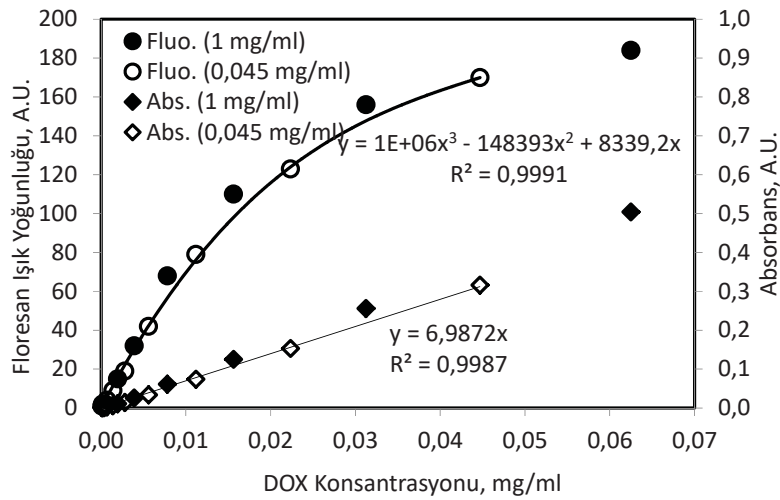
**Şekil 30.** DOX için absorbans ve floresans kalibrasyon eğrileri

Serbest DOX molekülleri için saf su içerisinde absorbans ve floresan değerleri ölçülmüştür. Katı formda toz DOX saklama kabından alınarak darası alınmış vial şişelere konularak tartım yapılmış ve ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Stok çözeltiden alınan 1 mg/ml DOX ultra saf su ile farklı konsantrasyonlara seyreltilerek absorbans ve floresan değerleri tespit edilmiştir. **Şekil 31'**da DOX için floresan ve absorbans kalibrasyon eğrileri verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, absorbans değerleri saf DOX çözeltisi için doğrusal (doğrusal) bir değişim gösterirken, floresan ışık şiddeti değerleri belli bir konsantrasyona kadar artmakta, ve daha sonra da azalma göstermektedir. DOX konsantrasyonu ile floresan miktarındaki azalmanın, floresandaki sönüm (quenching) etkisiyle olduğu değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal bölgede ölçebilmek için, tartım ile alınan toz DOX ultra saf su ile çözümlenerek daha düşük bir konsantrasyonda hazırlanmıştır. Şekilde görüleceği üzere, her iki çözeltinin de absorbans ve floresan değerleri benzer olduğu görülmüştür.



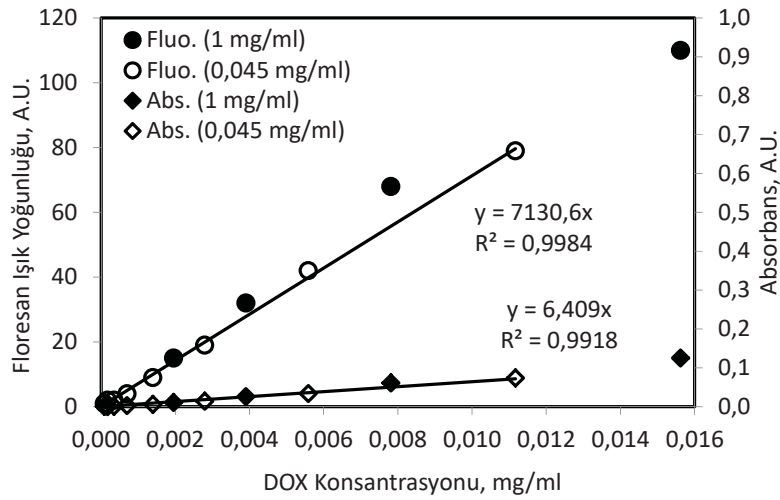
**Şekil 31.** DOX için absorbans ve floresan kalibrasyon eğrileri

Daha düşük konsantrasyonlarda DOX çözeltileri için kalibrasyon eğrileri **Şekil 32**'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, absorbans değerleri doğrusal değişim gösterirken, floresan değerlerinde ancak 3.ncü derece bir polinom denklem ile korelasyon eğrisi (curve-fit) elde edilebilmiştir. Söz konusu korelasyon eğrisi, floresan değeri 180'den küçük değerlerde ve DOX miktarının 40 µg/ml değerlerinden küçük değerlerde kullanılabileceği değerlendirilmiştir.



**Şekil 32.** Düşük konsantrasyonda DOX için absorbans ve floresan kalibrasyon eğrileri

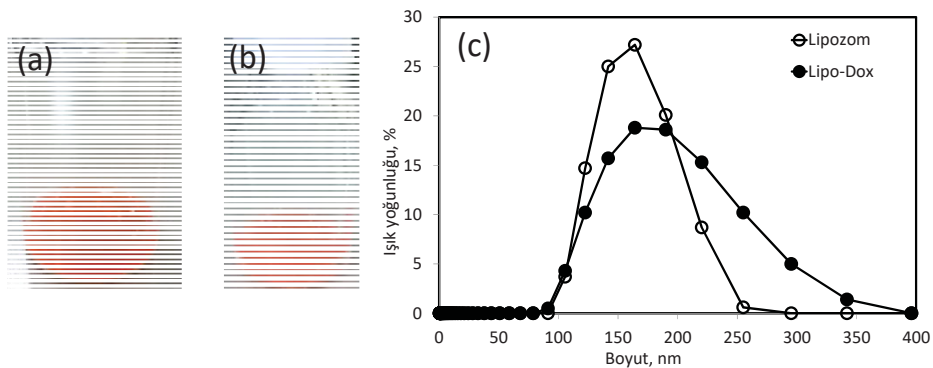
DOX konsantrasyonunun 12 µg/ml ve Floresan miktarının 80 değerinden küçük olduğu değerlerde, **Şekil 33**'de görüleceği üzere, floresan ışık şiddeti ile DOX konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür. Çalışmalarımızda farklı DOX konsantrasyonlarında ürünler elde etmekle birlikte, numunelerin seyreltilerek düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapılması kararlaştırılmıştır.



**Şekil 33.** DOX için doğrusal absorbans ve floresan kalibrasyon eğrileri

### Lipozomlara Doxorubisin (DOX) yüklenmesi:

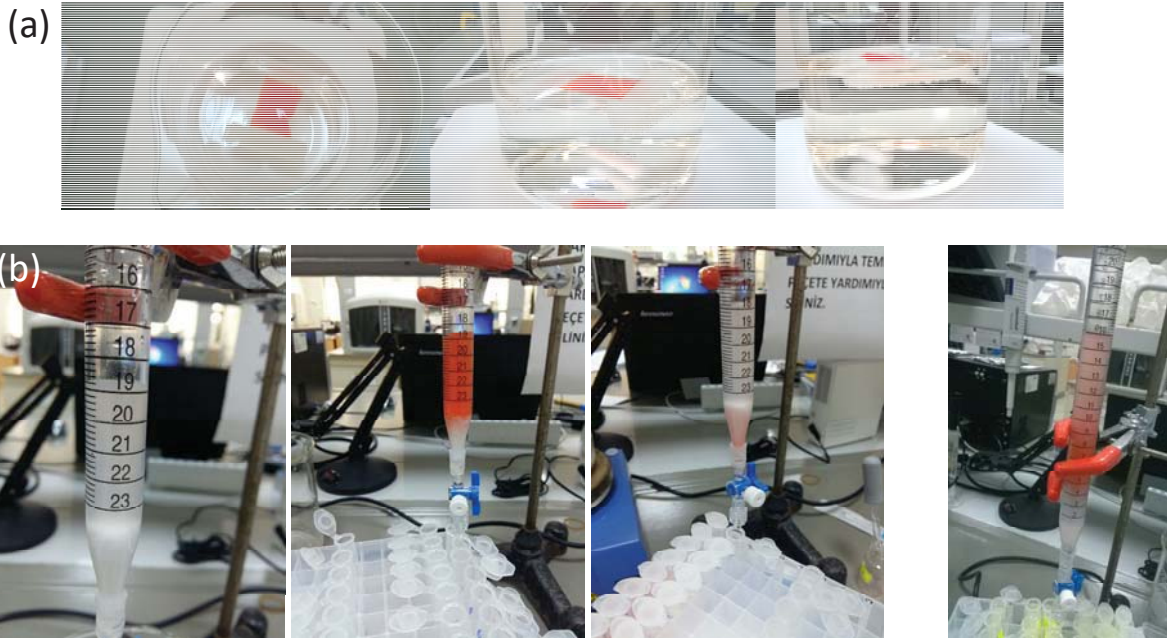
Lipozomlara DOX yüklemek üzere, öncelikle lipozom oluşumu esnasında ortamda bulunan amonyum sülfatı ortamdaki uzaklaştırmak üzere diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz pH=7,2 olan PBS tampon çözeltisine karşı yapılmıştır. Lipozomlara DOX yüklemesi, 0.5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan 1 ml DOX çözeltisi ile 1 ml hacimde diyalize edilmiş lipozom karıştırılarak, bir alkalı malı su banyosunda 65°C sıcaklıkta 4 saat inkübasyona tabi tutuldu. DOX'un lipozoma yüklenmeden önce ve lipozoma yüklenmiş DOX sırayla **Şekil 34(a)** ve **Şekil 34(b)**'de gösterilmektedir. Üretilen lipozom ve lipo-DOX'un DLS ile boyutları ölçülmüştür. **Şekil 34(c)**'de görüleceği üzere, lipozomlara DOX yükleme ile birlikte küreciklerin ortalama boyutunda bir artma meydana gelmektedir.



**Şekil 34.** (a) DOX'un lipozoma yüklenmeden önce çekilen resim, (b) lipozomlara yüklenmiş DOX resmi, ve (c) Lipozomlara DOX yüklenmeden önce ve DOX yükledikten sonra lipozom boyut dağılımları

### Serbest DOX'un Lipo-DOX'dan ayrıştırılması:

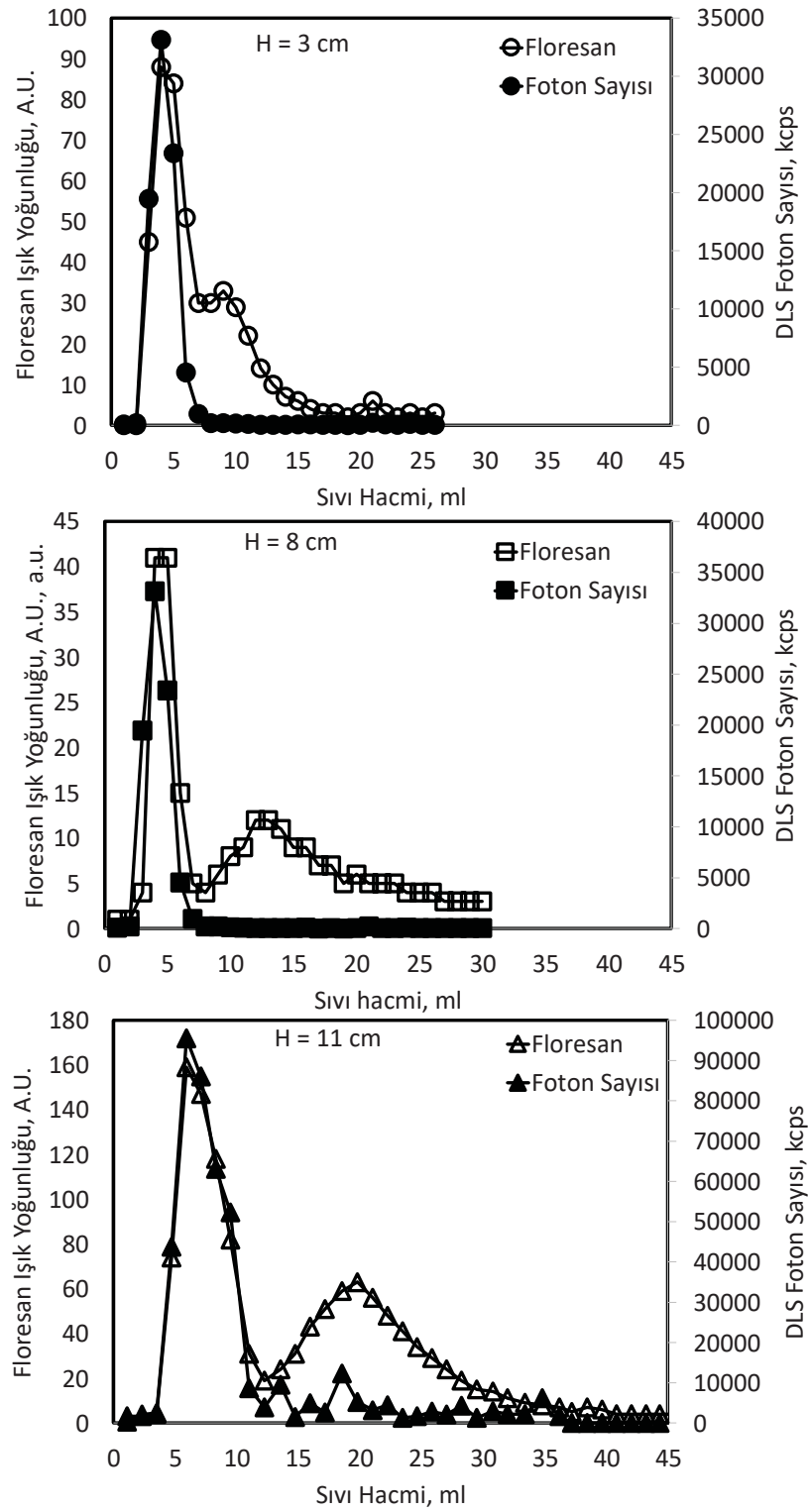
Lipozomlara DOX yükledikten sonra, lipozomların içerisine girmemiş serbest DOX moleküllerinin ortamdan ayrıştırılması gerekmektedir. Serbest DOX moleküllerinin lipo-DOX'lardan ayrıştırılması için temelde iki teknik bulunmaktadır. Birinci teknikte **Şekil 35** (a)'da görüldüğü üzere lipo-DOX tanecikleri sınır molekül ağırlığı (molecular weight cut-off) değerleri ölçüsünde verilen membran ile diyaliz yöntemidir. Diyaliz esnasında, membrandan serbest DOX molekülleri sonsuz dilüsyondaki sıvı içerisine çıkarken, lipo-DOX tanecikleri membran tarafından hapsedilmektedir. İkinci yöntem ise, kromatografi yöntemidir. Kromatografi yönteminde delikli bir yapıya sahip polimerik Sephadex tanecikleri içeren kolon kullanılmıştır. DOX gibi küçük moleküller polimerik taneciklerin gözenekli yapısı içerisine difüzyonlanırken, gözenek çapına sığmayan lipozom tanecikleri polimerik dolgu malzemesi boşluklarından akarak kolon boyunca yoluna devam etmektedir. Böylece, serbest moleküller DOX ile lipozomlar birbirinden ayrılabilir. Ancak, kaç cm yüksekliğinde bir kolon tasarımının yapılması soru işaretidir. Laboratuvarımızda **Şekil 35**(b)'de görüldüğü üzere farklı yüksekliklerde tasarladığımız sephadex kolon ile lipo-DOX'ların ayrıştırılması çalışması yapılmıştır.



**Şekil 35.** Moleküler DOX ile Lipo-DOX'ların ayrıştırılmasında (a) Membran diyaliz yöntemi, (b) Sephadex kolon yöntemi



Farklı DOX miktarlarında yüklenmiş Lipo-DOX numuneler, farklı kolon yüksekliklerinden geçirilerek yaklaşık 1 ml sıvı elüsyon hacimleri toplanmış ve hem floresan ışık yoğunları hem de DLS yöntemi ile foton sayıları saptanmıştır. **Şekil 36**'de görüldüğü üzere, elde edilen kromatografik elüsyon hacim eğrilerinden ayırmanın en iyi olduğu kolon yüksekliğinin 11 cm'den büyük yükseklik değerleri olduğu kanaatine varılmıştır. Ancak, kromatografi yöntemi ile lipo-DOX'ların fazla sıvı miktarı ile seyrelmesi nedeniyle, kromatografi yöntemi tarafımızca tercih edilmemiştir. Lipo-DOX'ların ayrıştırılması için membran diyaliz yöntemi kullanılmıştır.

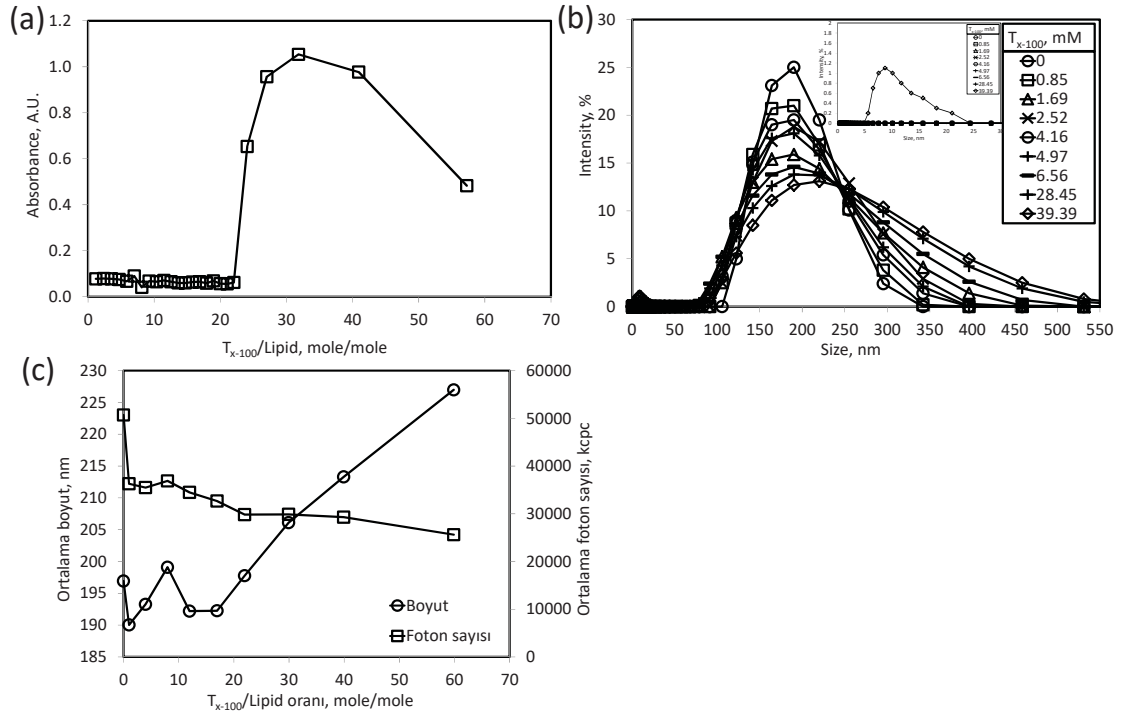


**Şekil 36.** Serbest DOX ile Lipo-DOX'un farklı yüksekliklerde kolon kromatografisi ile ayırtırmada sıvı elüsyonlardaki floresan ve DLS foton sayıları



### Lipozomların Triton X-100 ( $T_{x-100}$ ) deterjan ile parçalanması:

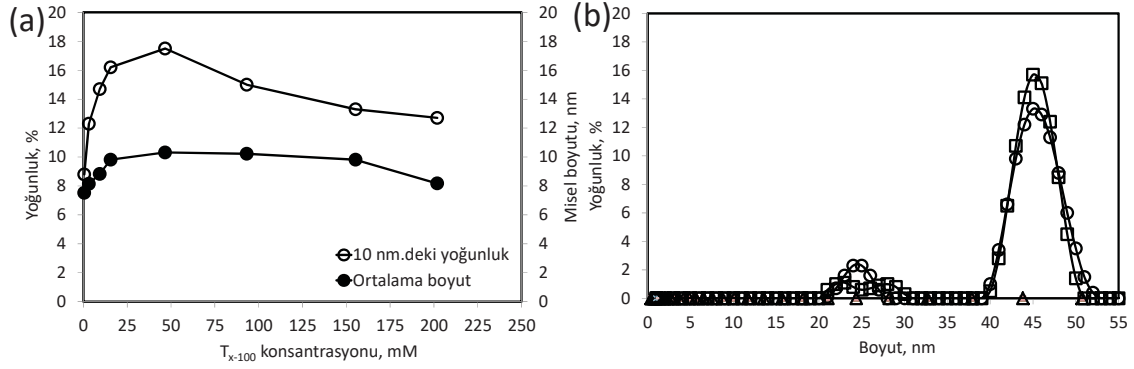
Lipozomlara hapsedilen DOX miktarını tayin edebilmek üzere lipozomların parçalanması ya da hapsettiği DOX'u ortama salması gerekmektedir. Lipid membranların parçalanmasında deterjanlar kullanılmaktadır. Bu deterjanlardan bir tanesi Triton X-100 ( $T_{x-100}$ )'dir. DOX'un miktarının ölçülmesi ve lipozomlardan DOX salınım çalışmalarları öncesi  $T_{x-100}$ 'ün lipozomları parçalama miktarı ve mekanizması üzerinde araştırmalarda bulunulmuştur. İlk olarak, aynı lipozom miktarlarına sahip numunelere  $T_{x-100}$  çözeltilisinden farklı hacimler eklenmiş ve bu esnada UV ile absorbans ve DLS ile boyutlarda meydana gelen değişimlere bakılmıştır. **Şekil 37(a)**'da lipid başına eklenen  $T_{x-100}$  miktarlarında elde edilen absorbans değerleri verilmektedir. Yaklaşık  $T_{x-100}$ /Lipid oranı 23 değerine kadar absorbansda herhangi bir değişim izlenmemiştir. Bu değerden sonra,  $T_{x-100}$ /Lipid oranı 30 değerine kadar absorbans değerinde bir artma, ve bu değerden sonra absorbans değerinde bir azalma görülmektedir. Absorbans değerindeki artma,  $T_{x-100}$ 'in lipozom membranını oluşturan lipidlerin arasına girerek lipozomun boyutlarını büyütmesinden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Aynı örneklerin DLS ile boyut analizleri yapılmıştır. **Şekil 37(b)**'de görüleceği üzere, yaklaşık 190 nm ortalama çapa sahip olan lipozomlar, ortama  $T_{x-100}$  ilavesi ile boyutlarında bir artış olduğu gözlenmiştir.  $T_{x-100}$  miktarı 40 mM olduğunda, ya da  $T_{x-100}$ /Lipid oranı 54 mole/mole olduğunda, ilk misel oluşumu gözlenmiştir. Miselin ortalama boyutunun 10 nm olduğu anlaşılmaktadır (iç grafik). Lipozomlara Triton X-100 ilavesi ile boyut ve foton sayılarındaki değişim **Şekil 37(c)**'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, boyutlarda  $T_{x-100}$ /Lipid oranı 23 değerine kadar belirgin bir fark görülmez iken, bu değerden sonra boyutlarda bir artış ve foton sayılarında da bir azalma dikkati çekmektedir. Yapılan ölçümlerde foton sayısının ortamda bulunan lipozom sayısı ile orantılı olduğu anlaşılmıştır.



**Şekil 37.** Lipozomlara ilave edilen Triton X-100 miktarı ile (a) absorbans değişimi (b) boyutlardaki değişim (c) ortalama boyut ve foton sayılarındaki değişim

Triton X-100'in kendi başına davranışını anlamak üzere çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, %20'lik sulu çözeltisi hazırlanan  $T_{x-100}$ 'den alınarak PBS tampon çözelti içerisinde farklı konsantrasyonları hazırlanmış ve DLS ile analizleri yapılmıştır.  $T_{x-100}$  için kritik misel konsantrasyonu (CMC) 0.24 mM olduğu literatürde verilmektedir. Bu konsantrasyonun altında  $T_{x-100}$  molekülleri ortamda çözelti halinde bulunmaktadır. CMC konsantrasyonun üzerinde ise moleküller misel ve lipozom formunda bulunabilmektedirler. **Şekil 38(a)**'da farklı  $T_{x-100}$  konsantrasyonlarında ortamda bulunan misel boyutu ve miktarındaki değişimler verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, misel boyut düşük  $T_{x-100}$  konsantrasyonlarında ortalama 7.5 nm iken, yüksek  $T_{x-100}$  konsantrasyonlarında ortalama 10 nm olmaktadır.

Lipozomların parçalanması için ortama  $T_{x-100}$  eklendiğinde farklı boyutlarda miseller oluşmaktadır. **Şekil 38(b)**'de görüleceği üzere, lipozomların parçalanmasından oluşan misellerin 25 nm ve 45 nm boyutlarında oldukları anlaşılmaktadır. Bu lipozomların parçalanma mekanizması konusunda ipuçları vermektedir.

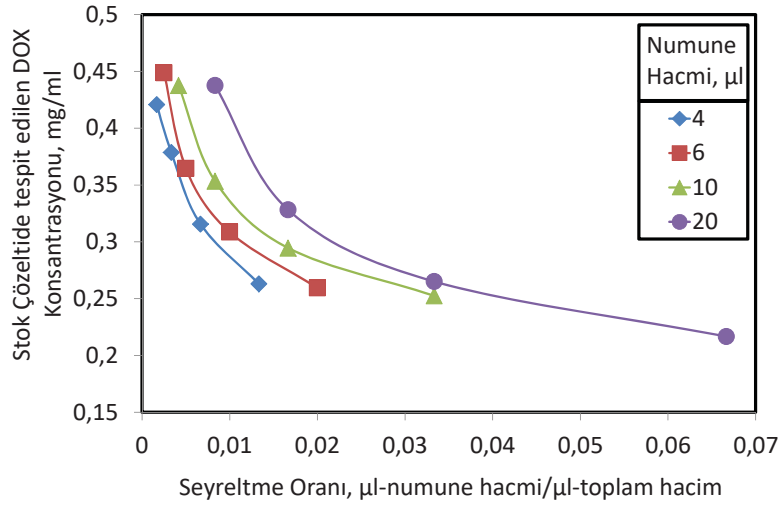


**Şekil 38.** (a) Saf Triton X-100'in farklı konsantrasyonlarında ortamda bulunan misel boyutu ve miktarındaki değişme, (b) lipozomların parçalanması sonucu oluşan misellerin boyut dağılımı

### Lipozomlara yüklenen DOX miktarının tayini:

Yapılan bir çalışmada, lipozomlara DOX yüklenmiş, serbest kalan DOX molekülleri membran ile diyaliz yöntemi ile lipo-DOX'lardan ayrıştırılmış ve lipozomlara yüklenmiş toplam DOX miktarı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, DOX yüklenmiş lipozom stok çözeltisinden farklı hacimlerde numuneler alınarak seyreltilmiştir. Stok çözeltinin DOX konsantrasyonu  $C_T$ , alınan numune hacmi  $V_i$ , seyreltme ortamı toplam hacmi  $V_1$  olduğu durumda, ölçülen floresan miktarından **Şekil 33**'de verilen kalibrasyon eğrisi ile seyreltik çözeltideki konsantrasyon,  $C_1$ , tespit edildiğinde, stok çözeltideki toplam DOX miktarı basitçe  $C_T=(V_1/V_i)C_1$  formülü, ya da  $C_T=(DF_i)C_1$  formülü ile hesaplanabilir. Burada,  $DF_i$  seyreltme faktörü olarak tanımlanabilir ve değeri  $DF_i=(V_1/V_i)$ 'dir. Ayrıca, her bir seyreltik çözelti, ilave olarak seyreltilebilir ve neticede stok çözeltideki DOX konsantrasyonu benzer şekilde  $C_T=(DF_n)C_n$  olarak hesaplanabilir. Burada,  $DF_n = \prod_{i=1}^n DF_i$  olarak tanımlanabilir.

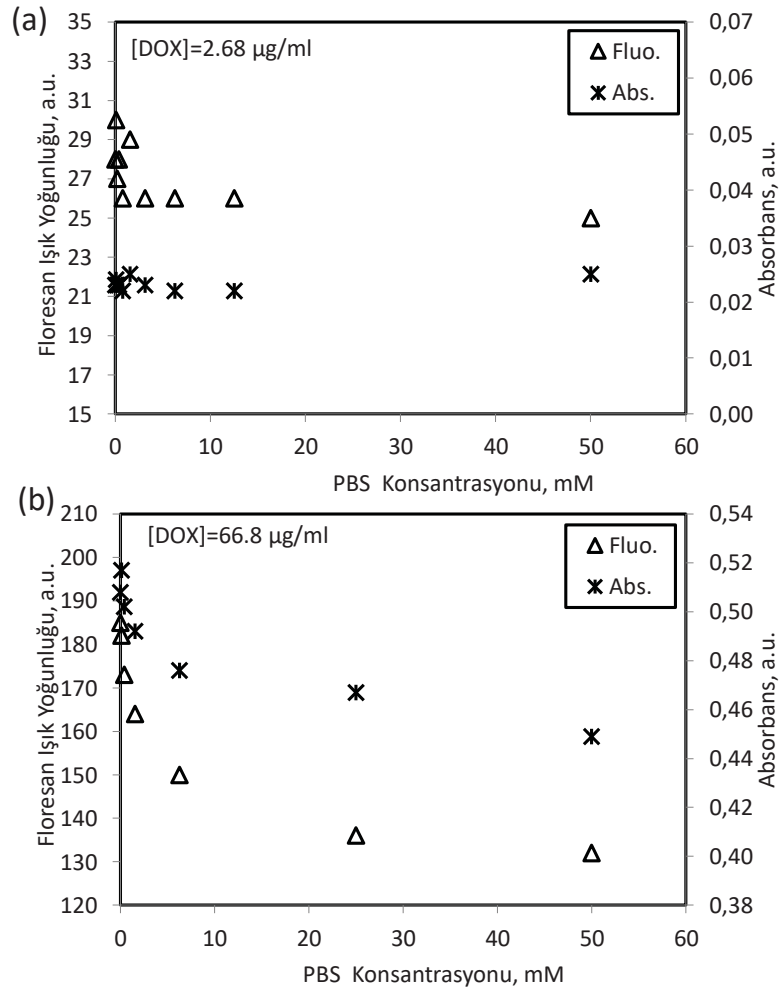
Farklı numune hacimleri ve bu hacimlerin seyreltilmesi ile tespit edilen lipozomlara yüklenmiş hesaplanan toplam DOX miktarı **Şekil 39** 'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, her bir nume için tespit edilen toplam DOX miktarı birbirinden farklıdır. Her bir numunen seyreltilmesinden hesaplanacak toplam DOX miktarı da seyreltme oranına göre üstel (exponensiyel) olarak artmaktadır. Stok çözeltideki DOX miktarı sabit olduğu bilindiğinden, her bir seyreltmede için artan değerlerde DOX miktarı tespit edilmesi bir problem olarak karşımıza çıkmış ve bu durumun araştırılması gerekmiştir.



**Şekil 39.** Lipzomlara yüklenmiş toplam DOX miktarının farklı numune hacimleri ve bu hacimlerin seyreltilmesi ile tespit edilmesi

Problemin çözümü için bir sistem yaklaşımı içinde ölçümler yapılmıştır. Lipzomlara yüklenmiş DOX'un tayini esnasında ortamda bulunan bileşenler analiz edilmiştir. Lipozomlar fosfat tampon çözeltisi içerisinde dağıtıldıkları için PBS bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Lipozomların parçalanması esnasında Triton X-100 detarjan kullanıldığından, farklı konsantrasyonlarda Tx-100 diğer bir parametre olarak belirlenmiştir. Yine lipozomları ve mikroköpükçükleri oluşturan mikro yapının lipidlerden oluşması nedeniyle farklı konsantrasyonlarda lipozom çözeltisi diğer bir parametre olarak belirlenmiştir. Ayrıca, lipozomlara DOX yükleme esnasında 250 mM amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) tampon çözeltisi kullanıldığından, farklı konsantrasyonlarda (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> başka bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

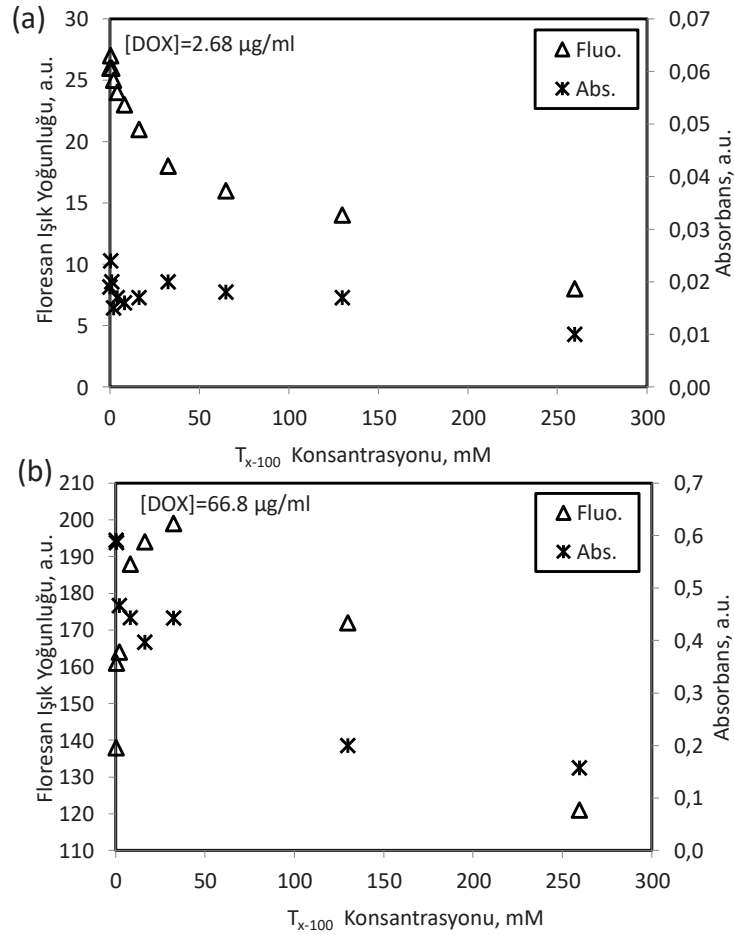
Serbest DOX'un farklı konsantrasyonlarda fosfat tampon çözeltisi içerisinde davranışını anlamak üzere 50 mM PBS çözeltisi ultra saf su ile seyreltilerek PBS'in farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki PBS çözeltisi içerisinde iki farklı dozda DOX çözeltisi ileve edilmiştir. Serbest DOX'un PBS çözeltisi içerisindeki davranışının **Şekil 40**'de görüleceği üzere konsantrasyona bağlı olduğu analiz edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda absorban ve floresan değerleri PBS konsantrasyonu ile kayda değer bir değişim göstermemektedir. Ancak, yüksek konsantrasyondaki DOX, PBS konsantrasyonu arttıkça hem absorban değerlerinde hem de floresan değerlerinde bir azalma olduğu görülmektedir. DOX'un absorban değerleri konsantrasyon ile doğru orantılı olduğu değerlendirildiğinde, floresan değerlerindeki azalış PBS'in yüksek konsantrasyonda DOX ile etkileştiği izlenimi vermektedir. Bu etkileşme, bir değerlikli ve iki değerlikli HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> ve PO<sub>4</sub><sup>=</sup> iyonlarının pozitif değerlikli DOXH<sup>+</sup> iyonları ile etkileşmesi neticesinde olabileceği değerlendirilmiştir.



**Şekil 40.** Fosfat tampon çözelti konsantrasyonu içerisinde (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml serbest DOX'un absorbans ve floresans değerleri

Serbest DOX'un farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 çözeltisi içerisinde davranışını anlamak üzere, 259 mM  $T_{x-100}$  çözeltisi ultra saf su ile seyreltilerek  $T_{x-100}$ 'in farklı konsantrasyonları hazırlanmış ve içerisine iki ayrı konsantrasyonda DOX çözeltisi konularak absorbans ve floresan değerleri ölçülmüştür. **Şekil 41**'da görüleceği üzere  $T_{x-100}$ 'in serbest DOX üzerine bir etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. **Şekil 41(a)**'da görüleceği üzere, DOX'un düşük konsantrasyonda  $T_{x-100}$  içerisinde absorbans değerleri değişmezken, floresan değerlerinde bir azalma olduğu görülmektedir.  $T_{x-100}$  için kritik misel konsantrasyonu 0.24 mM olarak verilmektedir. Bu konsantrasyonlarda  $T_{x-100}$  ortamda genel olarak misel formunda bulunmaktadır. Bu durumda DOX'un miseller içerisinde konsantrasyon olarak floresan değerinde bir sönüm (quenching) olduğu ve bu değerlerin azaldığı kanaatine varılmıştır. Serbest DOX'un yüksek konsantrasyonlarında  $T_{x-100}$  miktarı arttıkça, **Şekil 41(b)**'de görüldüğü üzere yaklaşık 40 mM  $T_{x-100}$  konsantrasyonuna kadar absorbans değerlerinde önemli bir değişim olmadığı, floresan değerlerinde ise bir artma olduğu, bu değerden sonra hem absorbans

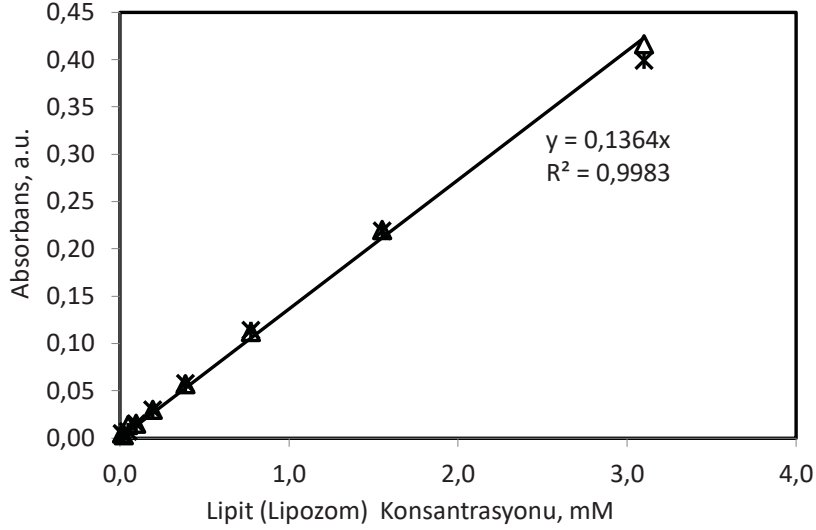
değerlerinde hem de floresan değerlerinde bir azalma olduğu görülmektedir. 66.8 µg/ml DOX konsantrasyonunda DOX'un floresan ışık yoğunluğunda bir sönümlenme etkisi olduğu kalibrasyon grafiğinde görülmektedir. DOX'un  $T_{x-100}$  misellerinin içerisine girmesi ile ortamda bir miktar DOX konsantrasyonu azalacağından, bunun floresan yoğunluğu değerlerinde olumlu bir etki yaratacağı düşünülmektedir. Bu nedenle,  $T_{x-100}$ 'ün konsantrasyonun 40 mM'dan düşük olması durumunda, DOX'un absorbans değerlerinde bir değişim gözlenmemesine rağmen, floresan değerlerinde bir artış olmasının nedeninin DOX'un  $T_{x-100}$  tarafından kapsülleme edilmesinden dolayı olabileceği değerlendirilmiştir. Yüksek  $T_{x-100}$  konsantrasyonlarında, DOX'un hem absorbans hem de floresan özelliklerinde bir azalma olmaktadır. Absorbansdaki azalmanın DOX üzerindeki kimyasal grupların  $T_{x-100}$  ile etkileşimi sonucu olabileceği değerlendirilmektedir. Buna bağlı olarak floresan değerlerinde de azalma olduğu görülmektedir.



**Şekil 41.** Farklı konsantrasyonlarda Triton X-100'ün iki ayrı konsantrasyonda (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml serbest DOX'un absorbans ve floresans değerlerine etkisi

Serbest DOX'un farklı konsantrasyonlarda lipit ya da lipozom içerisinde absorbans ve floresan değerlerine bakılmıştır. Bu amaçla, konsantrasyonu bilinen lipidlerden  $(NH_4)_2SO_4$  tampon çözelti ihtiva eden lipozomlar hazırlanmış, oda sıcaklığında farklı konsantrasyonlara

seyreltilmişlerdir. Seyreltilen lipozomların absorban değerleri **Şekil 42**'de verilmiştir. Şekilden görüleceği üzere absorban değerleri lipozom konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır. Şekil aynı zamanda lipozomların uygun bir şekilde seyreltilmelerinin yapılabilirdiğini de göstermektedir.

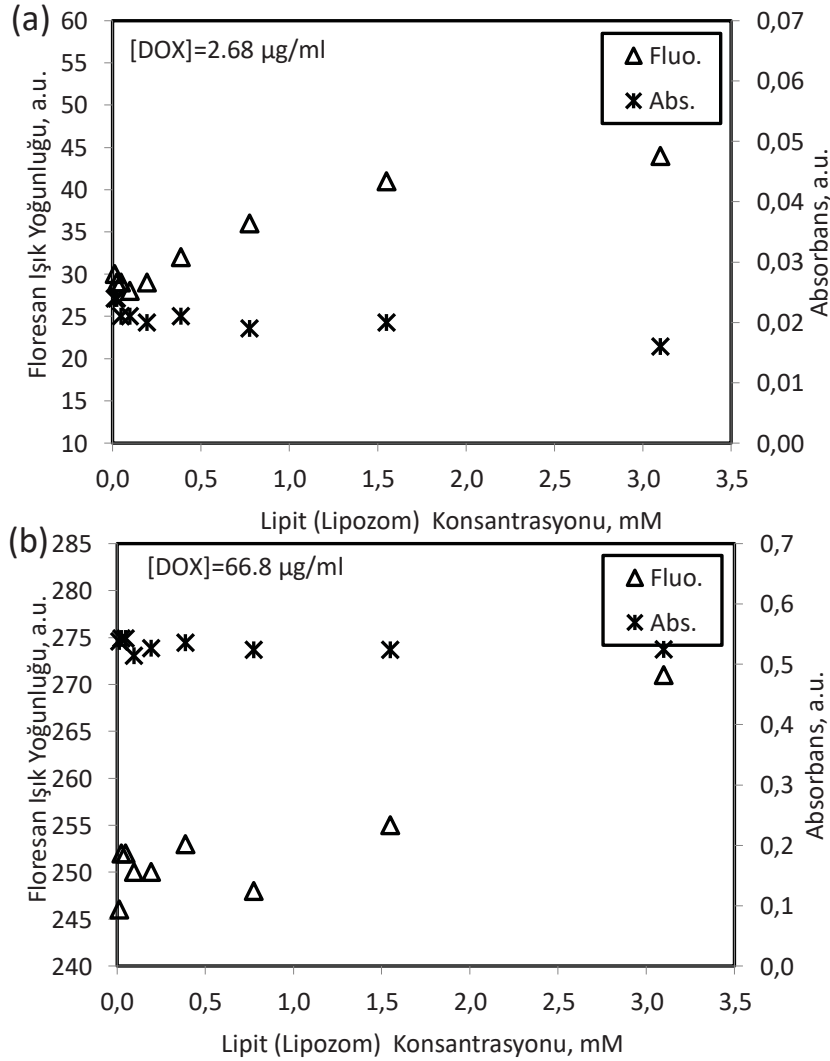


**Şekil 42.** Farklı lipit (lipozom) konsantrasyonlarında absorban değerleri

Her bir lipozom çözeltisine sabit miktarda düşük konsantrasyon (2.68 µg/ml) ve yüksek konsantrasyon (66.8 µg/ml) olmak üzere DOX ilave edilmiştir. Lipozom varlığında DOX ihtiva eden küvetlerde absorban değerlerini hesaplayabilmek için, ölçülen absorban değerlerinden lipozomlar için ölçülen absorban değerleri çıkartılmıştır. Tasarlanan deneyde, her bir absorban küveti yalnızca bilinen miktarda lipozom içerdiğinden absorban çıkarma işlemi yapılabilmiştir. Herhangi bir Lipo-DOX çözeltisi için benzer durum söz konusu olamamaktadır; çünkü arka plan absorban değerinin çıkarılabilmesi için ortamda bulunan lipozom miktarı tam olarak bilinmesi gerekir ve bilinmemektedir. Bu nedenle, lipozom varlığında floresan ölçümleri önem kazanmaktadır; çünkü lipozomlar floresan arka plan sinyale sahip değildir. Farklı iki DOX konsantrasyonları için farklı lipozom konsantrasyonlarında ölçülen absorban ve floresan değerleri **Şekil 43**'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, her iki DOX konsantrasyonlarında ölçülen absorban değerleri sabit denecek düzeydedir. Buna rağmen, düşük DOX konsantrasyonunda lipid miktarındaki artış ile floresan değerlerinde bir artma görülmektedir. Bu artışın, DOX moleküllerinin lipozom yüzeylerine adsorbe olması, böylece DOX moleküllerinin floresan verimliliğindeki artma olarak değerlendirilmiştir. Başka bir ifade ile, lipozom yüzeyine adsorbe olan DOX molekülleri absorbladığı ışığı floresan sinyal olarak dedektöre ulaştırabilmektedir. Benzer olarak, yüksek konsantrasyondaki DOX moleküllerinin yine lipozom yüzeylerine adsorplanması ile floresan ışık yoğunluğunda 250 gibi yüksek değerler elde edildiği



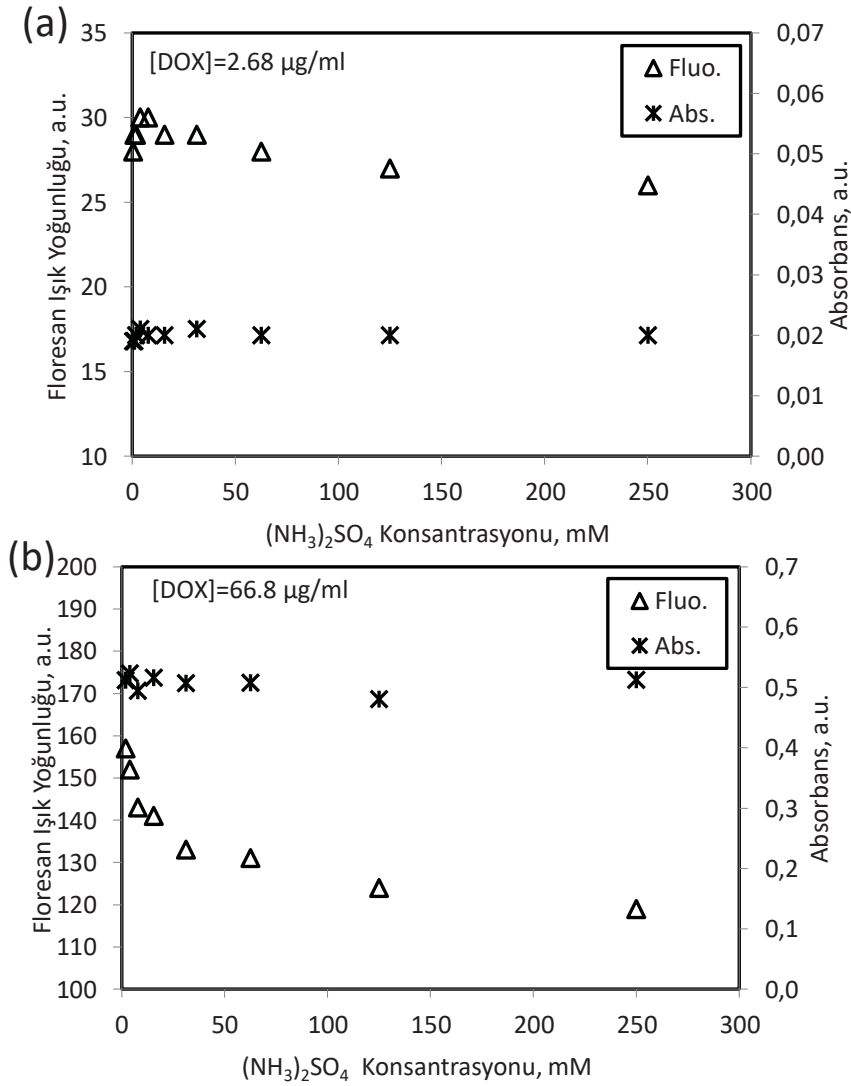
görülmektedir. Lipozom miktarı arttığında, yüksek DOX konsantrasyonlarında floresan değerlerinde bir miktar daha artış olduğu görülmektedir.



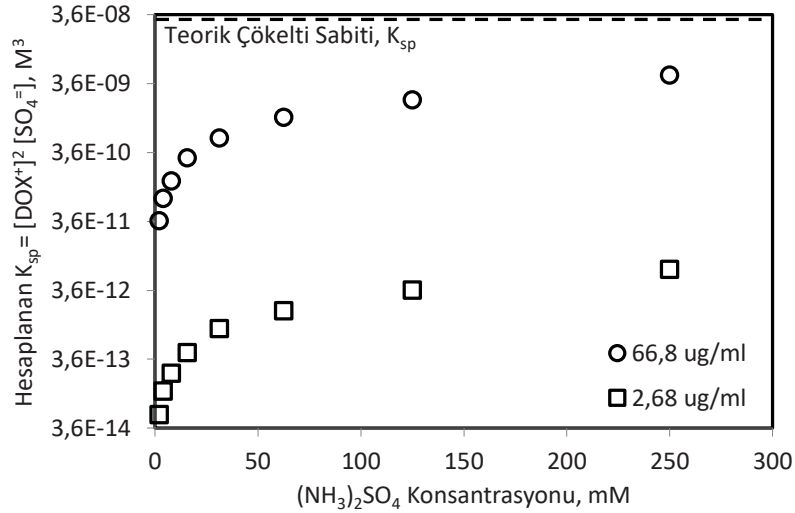
**Şekil 43.** Farklı lipid (lipozom) konsantrasyonlarda iki ayrı konsantrasyonda (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml serbest DOX'un absorbans ve floresans değerlerine etkisi

Amonyum sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) tampon çözeltisi lipozom sentezi esnasında lipozomların içerisindeki sıvı olarak yerini almaktadır. Daha sonra, yüksek sıcaklıklarda lipozomun içerisine difüzleneren DOX molekülleri SO<sub>4</sub><sup>-</sup> grupları ile jelimsi çökelti vererek DOX'un lipozom içerisinde hapsedilmesini sağlarlar. SO<sub>4</sub><sup>-</sup> iyonlarının DOX absorbans ve floresan değerlerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, 250 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi ultra saf su ile farklı konsantrasyonlara seyreltilmiş ve her birinin üzerine ifi farklı konsantrasyonda DOX ilave edilerek absorbans ve floresans değerleri ölçülmüştür. **Şekil 44**'da görüleceği üzere, 2.68 µg/ml DOX konsantrasyonlarında ne absorbans ne de floresan değerlerinde önemli bir değişme olmadığı görülmektedir. Öte yandan, 66.8 µg/ml DOX konsantrasyonlarda (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarı ile absorbans değerlerinde bir değişme

gözlenmezken, floresan değerlerinde  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konsantrasyonu ile bir azalma olduğu görülmektedir. Bunun,  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonları ile  $\text{DOXH}^+$  iyonları arasında etkileşimlerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Nitekim,  $\text{SO}_4^{2-}$  ile  $\text{DOXH}^+$  kompleks yapıyor ise bu beklenebilir. Ancak, **Şekil 45**'de görüleceği üzere,  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonları ile  $\text{DOXH}^+$  iyonları arasında oluşacak kompleksin hesaplanan çözünürlük sabiti değerleri teorik çözünürlük sabiti değerinin altındadır. Bu durumda, ortamda bir çökeltme beklenmemektedir.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konsantrasyonu ile floresan değerlerindeki azalma DOX molekülleri ile  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonları etkileşiminden dolayı floresan sönmüleme (quenching) doalyı olabileceği değerlendirilmektedir.

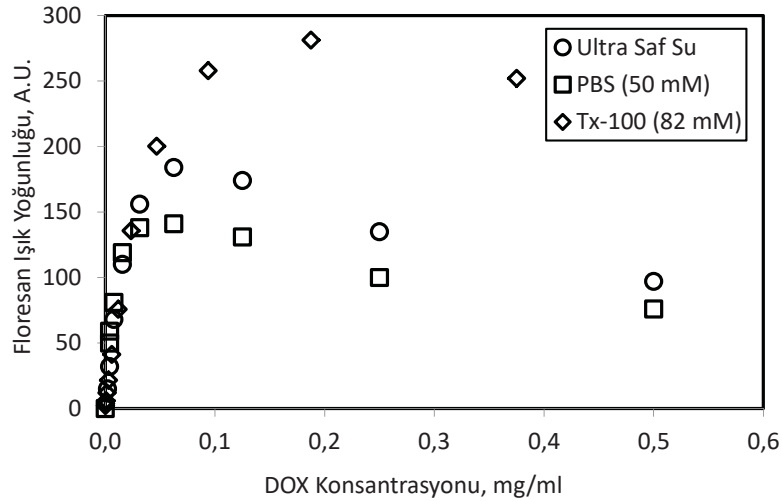


**Şekil 44.** Farklı konsantrasyonlarda  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tampon çözelti konsantrasyonlarında (a) 2.68 µg/ml ve (b) 66.8 µg/ml miktarlarında serbest DOX'un absorbans ve floresans değerleri



**Şekil 45.** Farklı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözelti konsantrasyonlarında SO<sub>4</sub><sup>=</sup> iyonları ile DOXH<sup>+</sup> iyonları arasında oluşacak kompleksin hesaplanan çözünürlük sabiti değerleri

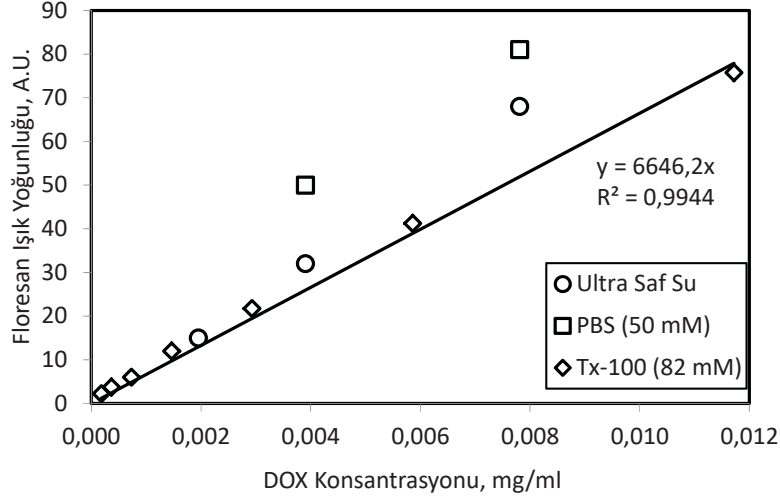
Bu bilgiler ışığında DOX'un ultra saf su, 50 mM PBS, ve 82 mM T<sub>x-100</sub> çözeltileri içerisinde kalibrasyon eğrileri tekrar çıkarılmıştır. **Şekil 46**'de görüleceği üzere, DOX konsantrasyonunun 0.01 mg/ml üzerindeki değerlerde floresan miktarında önemli ölçüde farklılıklar olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda T<sub>x-100</sub> ortamında floresan miktarında su'ya göre bir artış olurken, PBS ortamında bir azalma olduğu görülmektedir. Bu farklılıklardan dolayı literatürde önemli ölçüde farklı raporlamaların bulunması belki bu yüzdendir.



**Şekil 46.** DOX'un 50 mM fosfat tampon çözelti (PBS) ve 82 mM Triton X-100 detarjan çözeltilerde floresan kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması

Öte yandan, DOX konsantrasyonu 0.01 mg/ml'in altındaki değerlerde, **Şekil 47**'de görüleceği üzere, doğrusal'a yakın bir kalibrasyon eğrisi olduğu görülmektedir. Her ne kadar, farklı ortamların DOX kalibrasyon eğrisini doğrusal bölgede önemli ölçüde etkilemediği

görülsede de, yine de farklılıklar olabileceği ve bunun deneysel tasarımlarda DOX miktarının tayininde tekrarlanabilir veriler alınamamasında problemler olabileceği değerlendirilmektedir. Ayrıca, DOX çözeltisinin çok düşük değerlere seyreltilmesinde, cihaz hassasiyeti, seyreltme faktörü, ve hesaplama hataları gibi başkaca dezavantajları olabilir.



**Şekil 47.** DOX'un PBS, saf su, ve T<sub>x-100</sub> ortamında kalibrasyon eğrileri

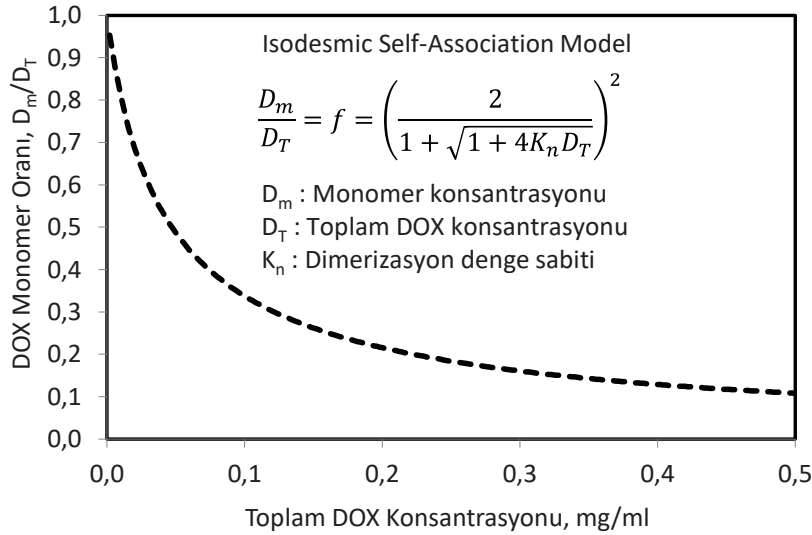
Literatür incelendiğinde, Daunomycine ya da Daunodoxorubicin gibi moleküller için verilen kendi kendine birleşme (self-association) özelliklerini gösteren modeller mevcuttur. DOX için de benzer bir self-association olabileceği değerlendirilmiş ve 1982 yılında Daunomycin için geliştirilen self-association modeli (Chaires, 1982) 2015 yılında DOX için verilmiştir (Cshai ve ark., 2015). Isodesmic self-association model olarak bilinen bu modelde, monomer DOX molekülleri konsantrasyona bağlı olarak kendi kendi ile fiziksel bir bağlanmaya gitmekte ve dimerler oluşmaktadır. Yine monomerle dimerler ile birleşmeye giderek trimerler, trimerler tetramerlere dönüşmektedirler.



Denklem (3)'den Denklem (6)'e kadar verilen denge sabitleri birbirine eşit olduğu kabul edilir  $K_1 = K_2 = K_3 = \dots = K_n$ . İzodesmik modele göre, monomer konsantrasyonu,  $D_m$ , toplam DOX konsantrasyonuna göre,  $D_T$ , Denklem (7) ile verilmektedir.

$$\frac{D_m}{D_T} = f = \left( \frac{2}{1 + \sqrt{1 + 4K_n D_T}} \right)^2 \quad (7)$$

Burada,  $K_n$  denge sabiti DOX için  $7030 \pm 920 \text{ M}^{-1}$  olarak verilmektedir. Buna göre, bir DOX çözeltisinde toplam DOX konsantrasyonu içerisinde monomer konsantrasyonu oranı,  $f$ , **Şekil 48**'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, monomer DOX miktarı ortamda bulunan toplam DOX miktarı ile doğrusal olmayan bir ilişki göstermektedir. Floresan ışık yoğunluğu monomer DOX moleküllerinden geldiği belirtilmektedir. Dimer ve daha yüksek yapıdaki agregatların floresan vermediği değerlendirilmektedir. Bu nedenle, ölçülen floresan ışık yoğunluğu ile monomer DOX konsantrasyonu doğru orantılı olduğu söylenebilir.



**Şekil 48.** İzodesmik self-association model'e göre toplam DOX konsantrasyonu içerisinde bulunan monomer DOX konsantrasyonu oranı

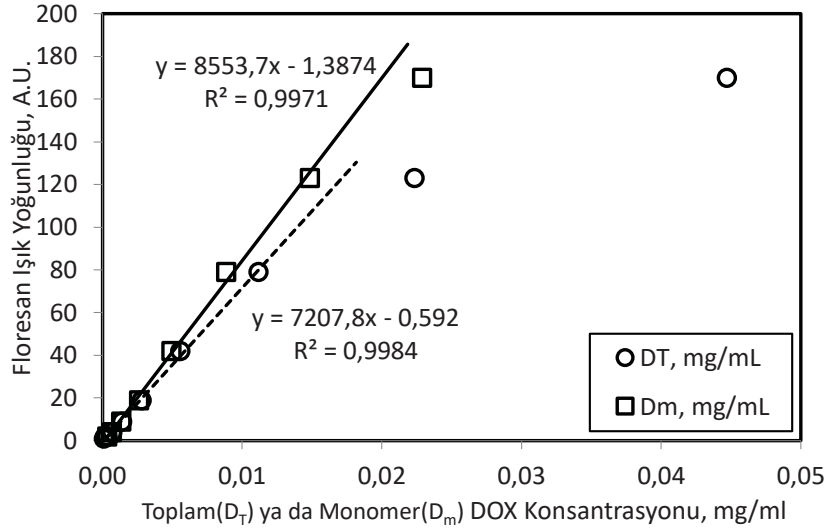
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış DOX çözeltilerinin floresan değerleri ölçülmüştür. Tartım yoluyla ölçülen toz DOX bilinen su hacminde seyreltilmiş ve toplam DOX konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu konsantrasyondan farklı seyreltmeler ile diğer konsantrasyonlar hazırlanmış ve **Şekil 49**'de (○) sembol ile gösterilen floresan değerleri ölçülmüştür. Floresan değeri monomer konsantrasyonu ile orantılı ise, bu oranı Denklem (8) ile verilebilir. Öte yandan, monomer konsantrasyonu yukarıda özetlendiği üzere toplam DOX konsantrasyonu ile Denklem (10) ile verilen doğrusal olmayan bir formda birbiriyle ilişkilidir. Bu durumda, floresan ışık yoğunluğu Denklem (10) ile verilen toplam DOX konsantrasyonu ile doğrusal olmayan bir formda birbiriyle ilişkili olacaktır. Şekilde görüleceği üzere, toplam DOX konsantrasyonuna göre floresan değerleri doğrusal olmayan bir formda artmaktadır. Ancak

çok küçük konsantrasyonlarda toplam DOX miktarı ile floresan ışık yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki varmış gibi görülmektedir. Öte yandan, ( $\square$ ) sembol ile gösterilen monomer DOX konsantrasyonu ile floresan değerleri doğrusal olarak değişmektedir. Toplam DOX konsantrasyonu ile floresan arasında 0.01 mg/ml değerlerine kadar doğrusal bir değişim görüldüğü ve bu aralıkta ancak 80 floresan değerine kadar ölçüm yapılabileceği anlaşılmaktadır. Öte yandan, monomer DOX konsantrasyonuna göre 0.018 mg/ml  $D_m$  değerlerine kadar şekilde düz çizgi ile verilen lineer floresan değerleri okunabilmektedir. Bu aralıkta 150 floresan değerine kadar ölçüm alınabilmektedir. Bu durumun ölçüm esnekliği de sağlayacağı açıktır. Söylenildiği üzere, literatürde raporlanan verilerin farklı olmasının nedeni, doğrusalmış gibi alınan floresan-toplam DOX konsantrasyonu bağıntısıyla alakalı olabilir.

$$F = \alpha \cdot [D_m] \quad (8)$$

$$[D_m] = f \cdot [D_T] \quad (9)$$

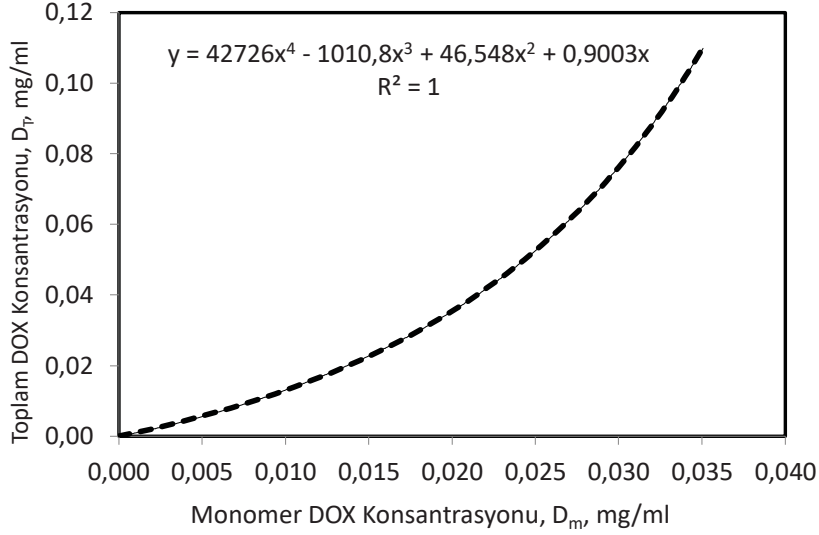
$$F = (\alpha \cdot f) \cdot [D_T] \quad (10)$$



**Şekil 49.** Toplam ( $D_T$ ) ve Monomer ( $D_m$ ) DOX konsantrasyonlarına göre floresan kalibrasyon eğrileri

Bir ölçüm esnasında, ölçülen floresan değerlerinden DOX'un monomer formu hesaplandığında, bunun toplam DOX miktarına dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla, Denklem (5) ile verilen eşitlikten elde edilen monomer DOX miktarları ve toplam DOX miktarları basitçe grafiğe geçirildiğinde bulunacak polinom denklemden toplam DOX miktarı hesaplanabilir. **Şekil 50'**de monomer DOX ( $D_m$ ) konsantrasyonlarına karşı hesaplanan toplam DOX ( $D_T$ ) konsantrasyonu bağıntısını veren polinom denklem verilmektedir. Bu denklem ancak monomer konsantrasyonu 0.035 mg/ml değerlerinden küçük ya da toplam

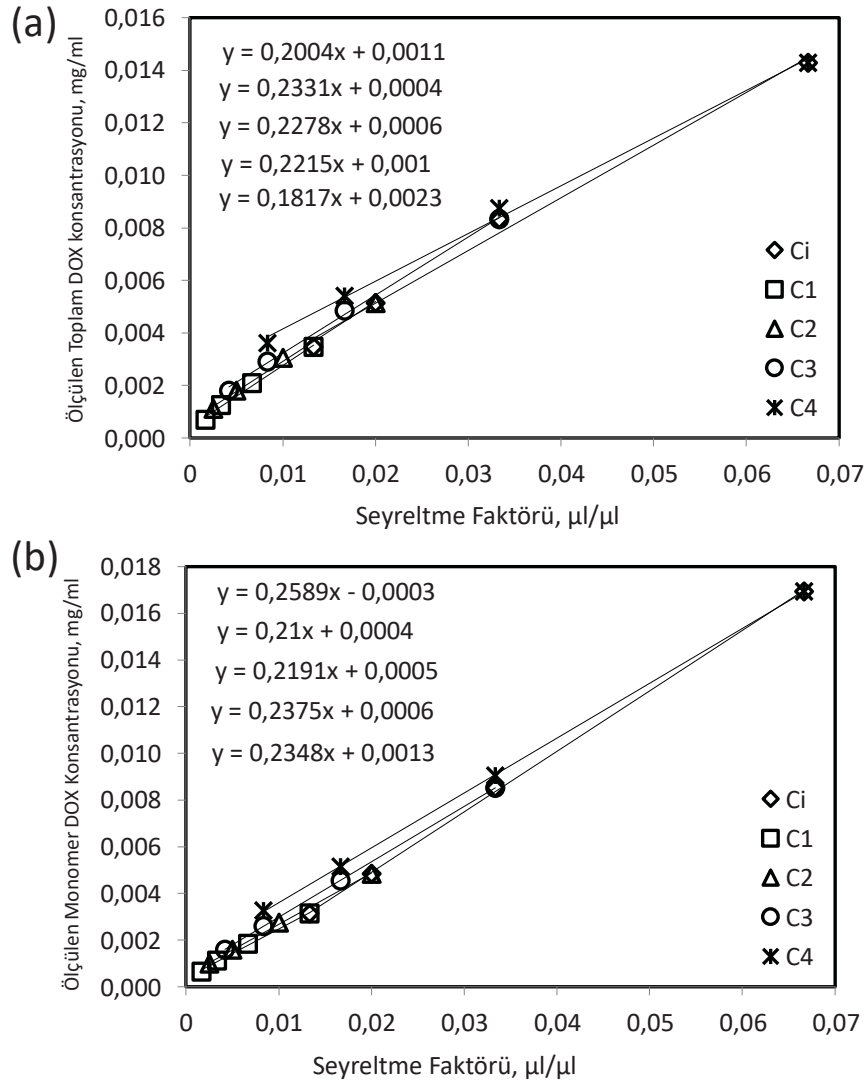
DOX konsantrasyonu 0.11 mg/ml değerinden küçük değerler için geçerlidir. Böylece, küvetteki DOX numunesi için ölçülen floresan değerlerinden monomer DOX konsantrasyonu ve buradan da toplam DOX konsantrasyonu tespit edilebilir.



**Şekil 50.** Monomer ( $D_m$ ) DOX konsantrasyonlarına karşı hesaplanan toplam ( $D_T$ ) DOX konsantrasyonu bağıntısını veren Polinom denklemin elde edilmesi. Denklem ancak monomer konsantrasyonu 0.035 mg/ml değerlerinden küçük ya da toplam DOX konsantrasyonu 0.11 mg/ml değerinden küçük değerler için geçerlidir.

Bu bilgiler ışığında, **Şekil 39'**de tarif edilen DOX yüklenmiş lipozom örneğinde ne kadar DOX miktarı olduğunun saptanması için, her iki kalibrasyon grafiği de karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Hesaplamalarda her bir seyreltme faktörü için Lipo-DOX örneğinin stok çözeltisindeki konsantrasyonlarını hesaplamak yerine her bir küvette ölçülen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Deneyde stok çözeltiden alınan  $V_i$  hacminde örnek,  $V_T$  hacmine seyreltilmekte ve floresan değeri ölçülerek kalibrasyon grafiğinden küvetteki konsantrasyon hesaplanmaktadır. Yapılacak kütle denkleğinden,  $C_o.V_i = C_1.V_T$  olmalıdır. Burada,  $C_1 = (V_i/V_T).C_o$  olur ki, her bir seyreltme faktörüne ( $V_i/V_T$ ) karşı ölçülen konsantrasyon değerleri grafiğe geçirildiğinde doğrusal bir eğri vermesi beklenir. Doğruların eğiminden stok çözeltinin konsantrasyonu tespit edilebilir. Seyreltme faktörüne karşı çizilen toplam ve monomer DOX konsantrasyon değerleri **Şekil 51'**de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, her iki hesaplama yönteminde seyreltmeler için hesaplanan DOX konsantrasyonları ölçülen toplam DOX konsantrasyonu için (**Şekil 51(a)**) bir miktar eğrisel olurken, ölçülen monomer konsantrasyonu için (**Şekil 51(b)**) daha çok lineer olduğu görülmektedir.

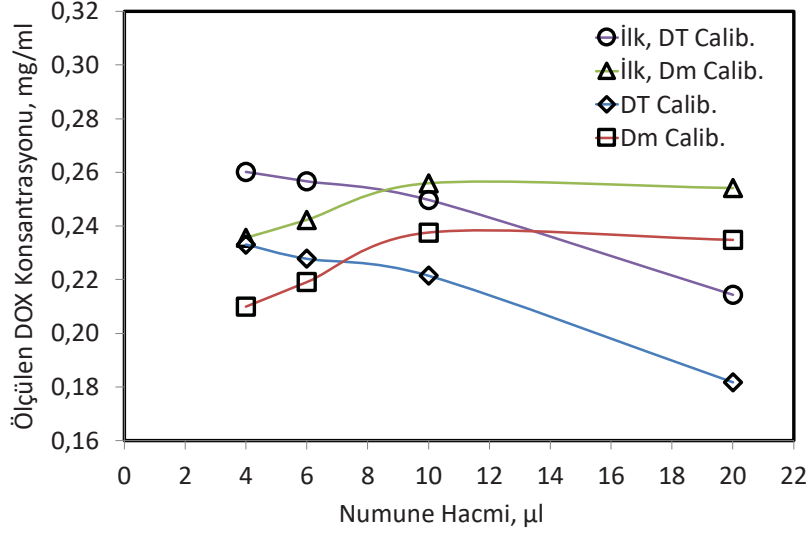




**Şekil 51.** Seyreltme faktörüne karşı çizilen (a) toplam DOX konsantrasyonuna göre kalibrasyon grafiğinden hesaplanan toplam DOX değerleri, ve (b) Monomer DOX konsantrasyonuna göre kalibrasyon grafiğinden hesaplanan monomer DOX değerleri

Doğruların eğimlerinden elde edilen toplam DOX miktarları tespit edilmiş olup **Şekil 52**'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, her iki ölçüm yöntemi için tespit edilen stok çözelti DOX miktarları kabul edilebilir sınırlar içerisinde ölçülebilmektedir. Farklı numune örneklerinin ilk seyreltmelerinden elde edilen stok çözelti DOX miktarları toplam DOX miktarı kalibrasyonuna göre yaklaşık 0.26 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Her bir numunenin ilave seyreltilmelerinden elde edilen stok DOX çözeltisi konsantrasyonu 0,23 mg/ml civarı ölçülmüştür. Bu değerler yüksek konsantrasyonlarda azalma göstermiş, düşük konsantrasyonlara doğru ise artış kaydedilmiştir. Öte yandan, monomer konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinden hesaplanan stok DOX miktarları ilk seyreltilen numuneler için yaklaşık 0.26 mg/ml olarak ölçülmüş, bu numunelerin ilave seyreltilmeleri neticesinde stok

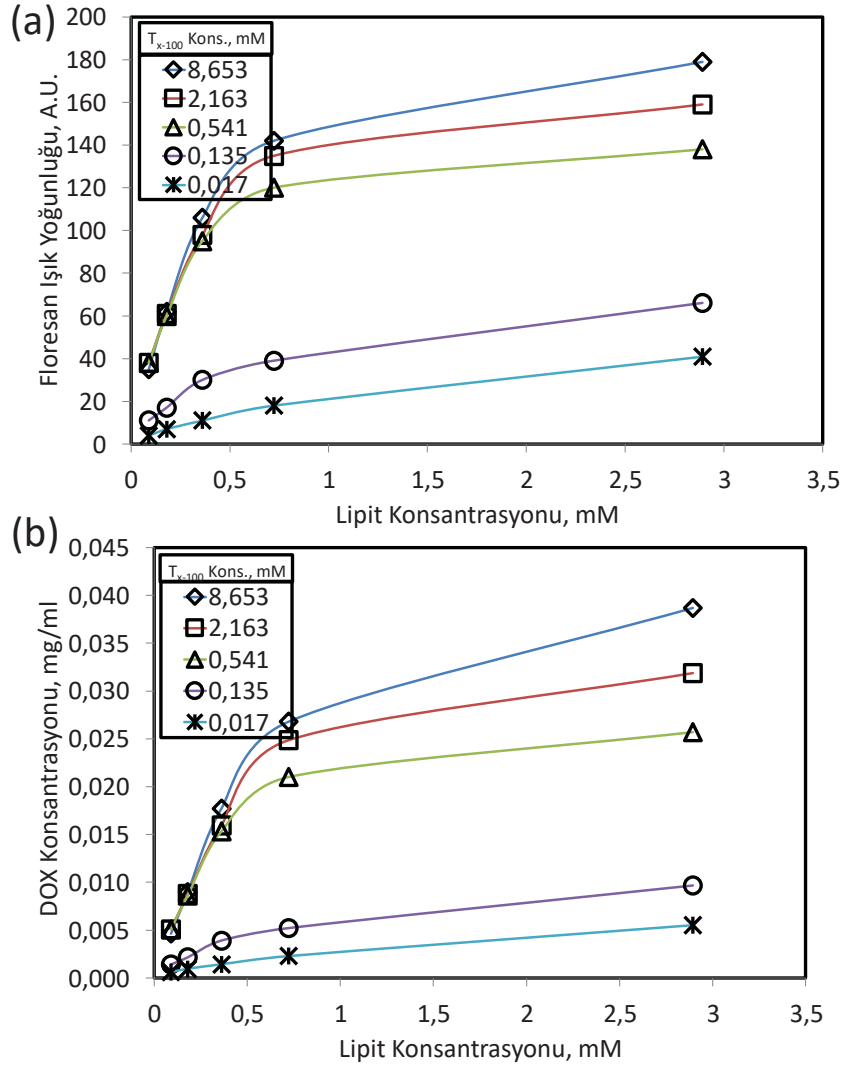
çözültideki DOX miktarı 0.24 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu ölçüm yönteminde düşük numune hacimlerinde daha az miktarda DOX tespit edilirken, yüksek numune hacimlerinde tersi bir durum görülmektedir.



**Şekil 52.** Toplam ( $D_T$ ) ve Monomer ( $D_m$ ) DOX konsantrasyonlarına göre floresan kalibrasyon

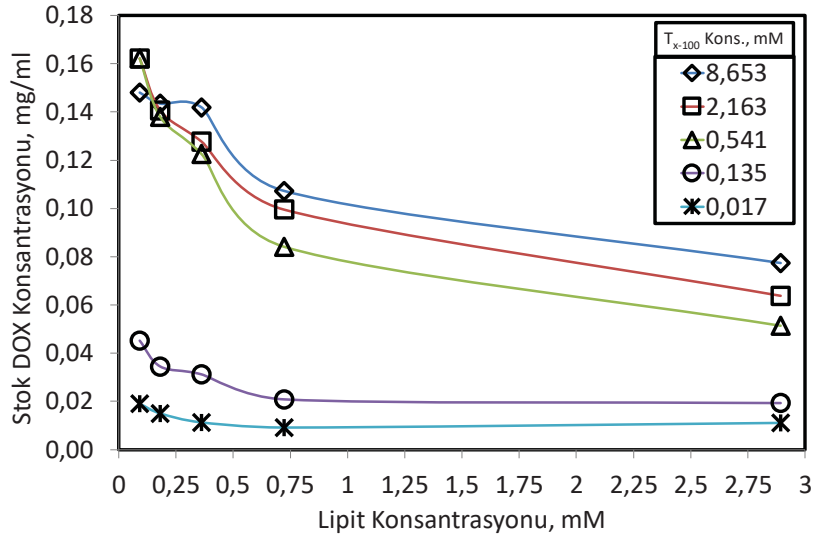
Başka bir çalışmada, DOX yüklenmiş lipozomlar (Lipo-DOX) kullanılarak farklı Lipo-DOX ve  $T_{x-100}$  konsantrasyonlarda numuneler hazırlanarak her bir küvetteki DOX miktarları ve stok çözültideki DOX miktarı tespit edilmeye çalışılmıştır. Farklı Lipo-DOX miktarlarında ölçülen floresan ışık yoğunluk değerleri ve her bir numune için hesaplanan DOX konsantrasyonları farklı  $T_{x-100}$  konsantrasyonları için **Şekil 53**'de gösterilmektedir. **Şekil 53(a)**'da görüleceği üzere, yüksek Lipo-DOX konsantrasyonlarında ölçülen floresan değerleri, **Şekil 50**'de gösterilen toplam DOX miktarına ( $D_T$ ) göre kalibrasyon eğrisi olan 80 değerinden ve monomer DOX konsantrasyonuna ( $D_m$ ) göre kalibrasyon eğrisi olan 150 değerinden yüksek değerlerde floresan elde edilmiştir. Bu durumda, ölçülen floresan değerleri monomer DOX konsantrasyon ( $D_m$ ) kalibrasyon grafiğine göre değerlendirilmiş ve sonuçlar neticelendirilmiştir. Buna göre, her bir numune için hesaplanan DOX konsantrasyonları **Şekil 53(b)**'de verilmektedir. Burada iki önemli bulgu göze çarpmaktadır: Bunlardan birincisi, şekilde görüleceği üzere,  $T_{x-100}$  konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonu (CMC) olan 0,24 mM değerinin altındaki değerlerde ölçülen DOX konsantrasyonu beklenenin altında değerler vermektedir. Bu durumda, lipozomlar tam parçalanmamış; lipozomların parçalanması için  $T_{x-100}$ 'ün CMC'un üzerinde değerler olması gerektiği anlaşılmaktadır. İkinci sonuç ise, şekilden görüleceği üzere, ölçülen DOX konsantrasyonu y-ekseni ile verilen 18 µg/ml'nin altındaki değerlerde lineer olarak artmaktadır. Ancak, bu konsantrasyonların üzerindeki değerlerde, beklenen doğrusal artış kaydedilememiştir. Bu durumda, yüksek DOX miktarında floresan sönümlenme (quenching)

etkisiyle ölçülen floresan değerlerinde ve hesaplanan DOX konsantrasyonlarında önemli ölçüde kayıplar söz konusudur.



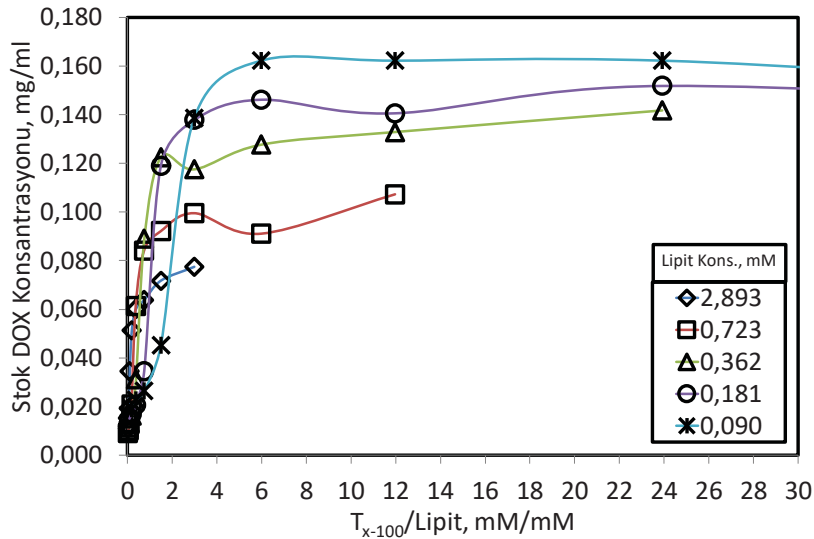
**Şekil 53.** Farklı Lipo-DOX miktarlarında ölçülen (a) floresan ışık yoğunluk değerleri ve (b) her bir numune için hesaplanan DOX konsantrasyonları

Farklı konsantrasyonlarda  $T_{x-100}$  ihtiva eden Lipo-DOX numuneler için hesaplanan stok çözelti DOX konsantrasyonu **Şekil 54**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, daha önce söylendiği gibi, DOX konsantrasyon ölçümlerinin  $T_{x-100}$ 'in CMC değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlarda yapılması gerekir. İkinci önemli bir bulgu, Lipo-DOX numunelerinin konsantrasyonlarının mümkün olduğunca düşük miktarlarda tutulması önem arz etmektedir. Şekilden görüleceği üzere, Lipo-DOX konsantrasyonu azaldıkça, tespit edilen stok çözelti konsantrasyonu artmaktadır. Düşük konsantrasyondaki Lipo-DOX numunelerinin ölçümlerde kullanılması hedeflenmektedir.



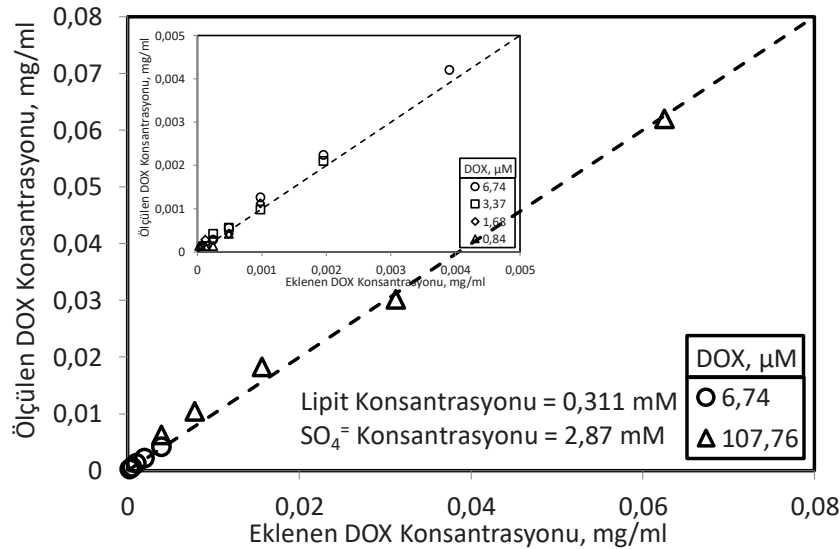
**Şekil 54.** Farklı konsantrasyonlarda  $T_{x-100}$  ihtiva eden Lipo-DOX numeneler için hesaplanan stok çözelti DOX konsantrasyonu

Farklı Lipo-DOX konsantrasyonlarında  $T_{x-100}$ /Lipid oranlarında tespit edilen stok DOX konsantrasyonu **Şekil 55**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ancak belli bir  $T_x$ /lipid oranının üzerinde tekrar edebilen değerler elde edilebilmektedir. Şekil'den DOX konsantrasyonunun tespiti için  $T_x$ /lipid oranının 6 mol/mol değerinin üzerinde olması gerektiği anlaşılmaktadır. Bu değer altındaki değerlerde  $T_x$ 'in lipozomlarda delik/gözenek açması tehlikeye girmekte ve yeterince DOX'un lipozom içerisinden ortama salınımını gerçekleştirememektedir.



**Şekil 55.** Farklı Lipo-DOX konsantrasyonlarında  $T_{x-100}$ /Lipid oranlarında tespit edilen stok DOX konsantrasyonu

Lipozomlara yüklenmiş DOX'un tespitinde, ortama konulacak  $T_{x-100}$  ile açılan gözeneklerden ortama  $SO_4^-$  iyonları da çıkacağından, DOX miktarının tespit edilmesinde  $SO_4^-$  iyonlarının etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.  $(NH_4)_2SO_4$  tampon çözeltisi ile doldurulmuş lipozomlardan 0.311 mM olacak şekilde numuneler hazırlanmış, bunlara  $T_{x-100}$  ilavesi ile gözenekler açılmış ve içlerindeki  $SO_4^-$  iyonların ortama salınması sağlanmıştır. Ortamda bulunan  $SO_4^-$  iyonları miktarının 2,87 mM olacağı hesaplanmıştır. Ortama farklı konsantrasyonlarda DOX çözelti ilave edilerek floresan değerleri ölçülmüş ve DOX miktarları tespit edilmiştir. Ortama eklenen DOX çözeltisi ile floresan yöntemi ile ortamdaki ölçülen DOX miktarları **Şekil 56**'da gösterilmektedir. Burada Lipo-DOX içerisindeki lipozomların tespit edilmesinde kullanılan tüm süreçler takip edilmiş, DOX'un lipozomlardan salınması yerine, ortama bilinen miktarlarda DOX dışarıdan ilave edilmiştir. Şekilde görüleceği üzere, 0.1 mg/ml DOX konsantrasyonu değerlerine kadar ortama eklenen DOX miktarları çözeltide ölçülebilmektedir. Ölçme ortamında seyreltme ile düşük konsantrasyonlarda olabilecek  $SO_4^-$  iyonları ve  $T_x$  konsantrasyonu DOX miktarının tayininde önemli bir parametre teşkil etmediği anlaşılmaktadır. Böylece, lipozomlara ve mikroköpükçüklere DOX yüklenmesi ve yüklenmiş DOX miktarlarının tespit edilmesi için yöntemler geliştirilmiş bulunmaktadır.



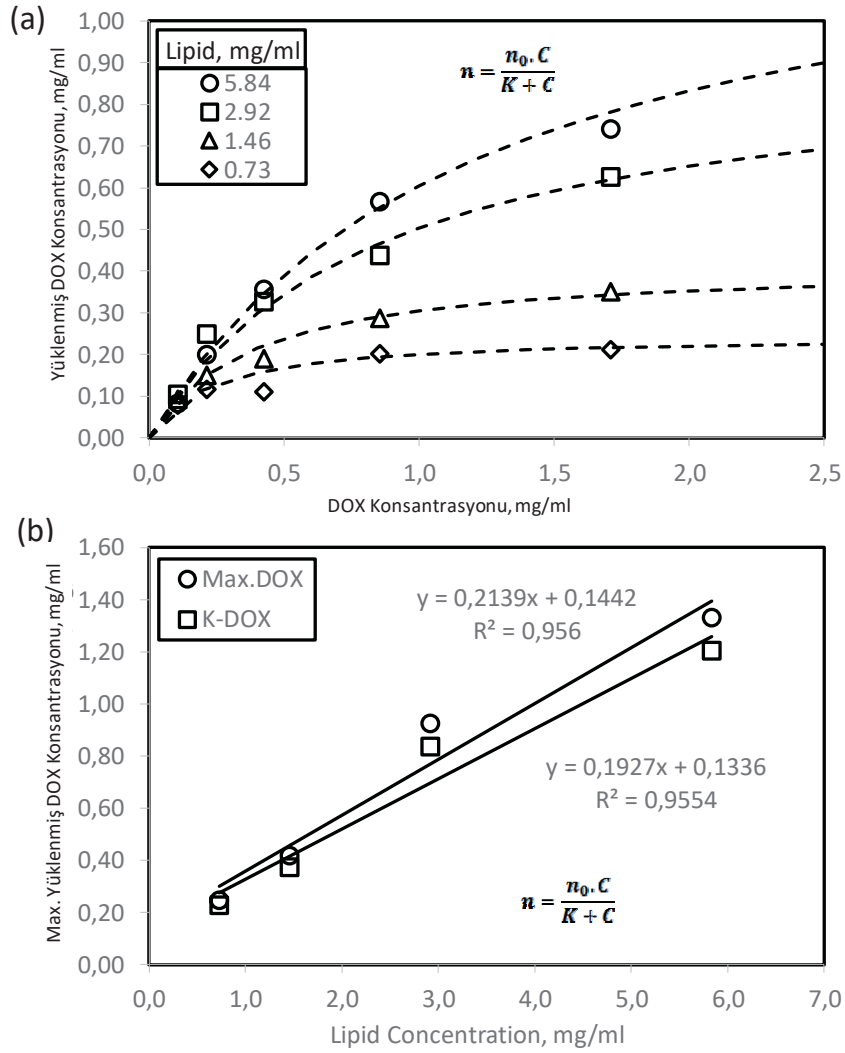
**Şekil 56.**  $(NH_4)_2SO_4$  tampon çözeltisi ile doldurulmuş lipozomlara  $T_{x-100}$  ilavesi ile gözenek açılması, içlerindeki  $SO_4^-$  iyonların ortama salınması ve ortama farklı konsantrasyonlarda DOX ilave edilerek DOX'un floresan yöntemi ile tespit edilmesi

#### 4.1.3. Lipozomların DOX yükleme kapasitelerinin belirlenmesi

Kompozisyonu DSPC:DSPEPEG<sub>2000</sub>:Kolesterol içeren 57:5:38 mol oranlarında lipozomlar hazırlandı. Farklı üretimlerde hazırlanan lipozomlar aynı kaptaki birleştirildi. Oluşturulan lipozom stok süspansiyonundan alınan lipozomlardan su ile seyreltilerek farklı

konsantrasyonlarda lipozom numuneler hazırlandı. Ayrı bir kapta DOX çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden ayrı viallere su ile seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda DOX çözeltileri oluşturuldu. Böylece, farklı DOX:Lipid oranlarında DOX yüklemeleri gerçekleştirildi.

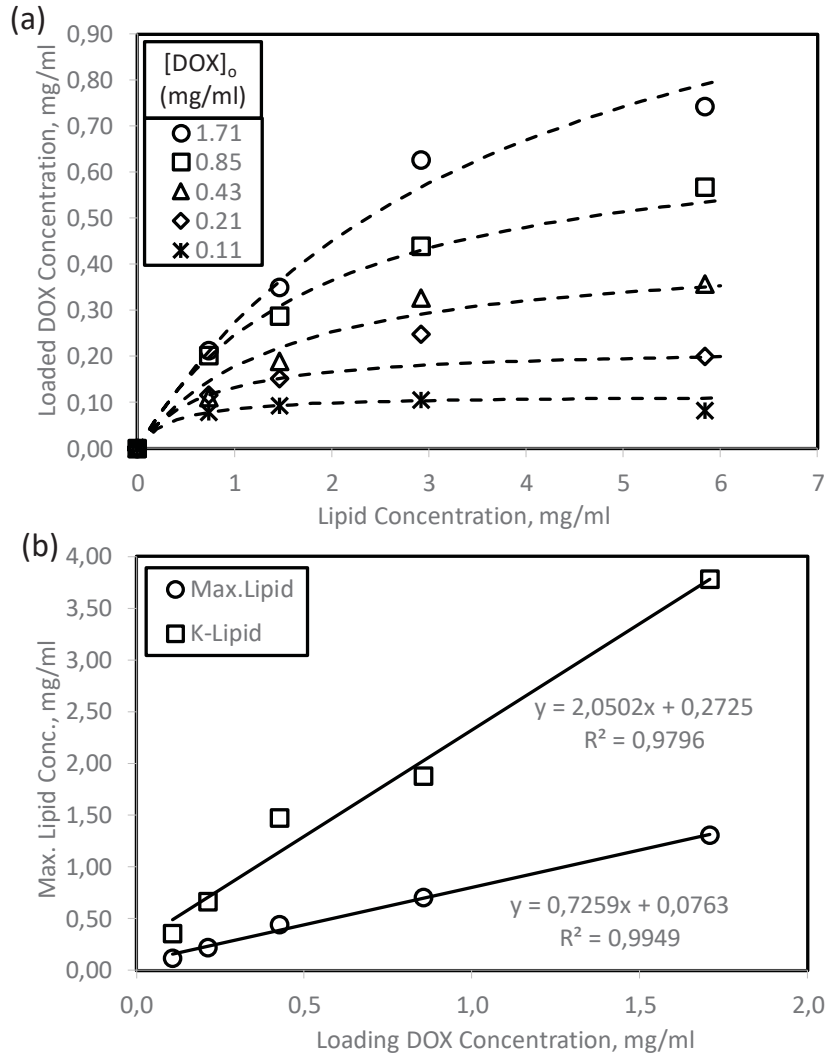
Farklı lipid miktarlarında, ortama eklenen DOX konsantrasyonlarına bağlı olarak lipozomlara yüklenen DOX miktarları **Şekil 57(a)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, farklı lipid miktarlarında lipozomlara DOX yüklemesi yüklenen DOX miktarları ile doğrusal olarak artmamaktadır. Bu durumda, yüklenen DOX miktarlarının belli bir doygunluğa ulaştığı anlaşılmaktadır. Ölçülen deneysel veriler, şekil üzerinde verilen, Langmuir adsorpsiyon izoterm denklemine benzer bir değişim göstermektedir. Langmuir denkleminde gösterilen  $n$  değeri adsorbent adsorpsiyon kapasitesini,  $n_0$  değeri adsorbent maksimum adsorpsiyon kapasitesini,  $C$  değeri konsantrasyonu ve  $K$  değeri Langmuir adsorpsiyon sabitini tanımlamaktadır. Gerçekte, Langmuir denklemi ile eğri uydurma gerçekleştirildiğinde deneysel veriler ile model denklemin çok iyi bir uyum içinde oldukları görülmektedir. **Şekil 57(b)**'de Langmuir izoterm eğri uydurma sabitleri verilmektedir. Burada, maksimum DOX yükleme miktarı lipid miktarı ile artmakta olup, istenen miktarlarda DOX yükleyebilmek için lipid miktarlarının artması gerektiği anlaşılmaktadır. Benzer olarak, Langmuir izoterm sabiti değerlerinin de lipid miktarına bağlı olarak arttığı görülmektedir.



**Şekil 57.** Lipozomların DOX yükleme kapasiteleri (a) Yüklenen DOX konsantrasyonuna göre lipozom içerisine yüklenmiş olan DOX miktarı, (b) Langmuir denkleminde verilen maksimum DOX konsantrasyonu,  $n_0$ , ve Langmuir sabiti,  $K$ .

Benzer olarak, sabit DOX konsantrasyonlarında lipid konsantrasyonuna karşı lipozomlara yüklenmiş DOX miktarları değerlendirilmiştir. Kullanılan lipid miktarına göre lipozom içerisine yüklenmiş olan DOX miktarı **Şekil 58(a)**'da verilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, lipid konsantrasyonuna göre lipozom içerisine yüklenmiş olan DOX miktarları, **Şekil 57**'da olduğu gibi, Langmuir türü bir değişim göstermektedir. Şekil üzerinde gösterilen Langmuir izoterm denklemi ile ölçülen veriler çok güzel bir uyum içerisinde. Sabit DOX yükleme konsantrasyonlarında lipid konsantrasyonuna karşı lipozomlara yüklenen DOX miktarı için Langmuir sabitleri hesaplanmış ve **Şekil 37(b)**'de gösterilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, lipozomlara yüklenen max. DOX miktarı,  $n_0$ , ve Langmuir sabiti,  $K$ , DOX konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



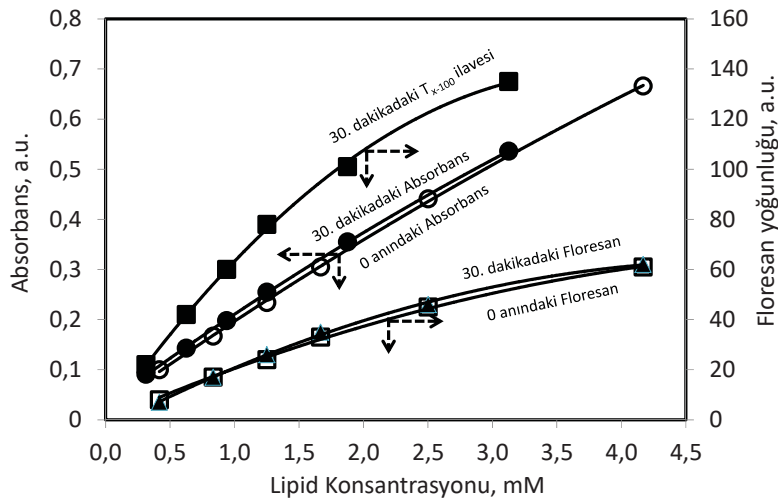


**Şekil 58.** Lipozomların DOX yükleme kapasiteleri (a) Lipit konsantrasyonuna göre lipozom içerisine yüklenmiş olan DOX miktarı, (b) Langmuir denkleminde verilen maksimum DOX konsantrasyonu,  $n_0$ , ve Langmuir sabiti,  $K$ .

Özet olarak, izodesmik modele göre lipozomlara yüklenmesi gereken DOX miktarı için yöntem geliştirilmiştir. Literatürde maksimum yükleme elde edebilmek için düşük miktarda DOX kullanmak gerektiği söylenmektedir. DOX'un lipit yüzeylere bağlandığı ve  $(NH_4)_2SO_4$  ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Bu yüzden elde edilen DOX miktarı, yüklenen DOX miktarına göre daha düşük bulunmuştur. Lipozom içerisine yüklenmiş olan maksimum DOX konsantrasyonunu bulabilmek için Langmuir denklemi kullanılması ile gerekli planlamalar yapılabilmektedir. Burada, Langmuir denkleminde kullanılması gereken  $n_0$  ve  $K$  sabitleri grafiklerdeki eğimlerden kolayca hesaplanabilmektedir.

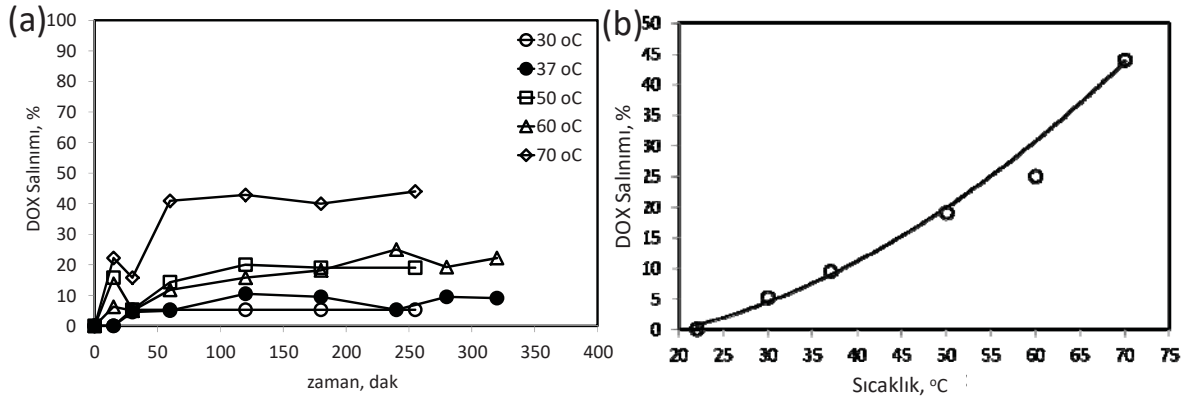
#### 4.1.4. Lipozomlardan DOX salınımı

DOX yüklü lipozomlardan (lipo-DOX) DOX'un salınımı için çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak, oda sıcaklığında, lipo-DOX'lardan farklı konsantrasyonlar hazırlanmış ve absorbans ve floresan değerleri ölçülmüştür. **Şekil 59**'da hesaplanan lipid miktarlarına göre ilk ve 30 dakika sonrasında absorbans ve floresan değerleri ile numunelerin üzerlerine  $T_{X-100}$  eklendikten sonra 30 dakika sonra elde edilen absorbans ve floresans değerleri verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ilk 30 dakika içerisinde lipo-DOX'lardan DOX salınımı görülmemiştir. Ortama  $T_{X-100}$  eklenmesiyle absorbans ve floresan değerlerindeki azalma, konsantrasyondaki azalmadan dolayıdır ve hesaplamaları etkilememektedir.



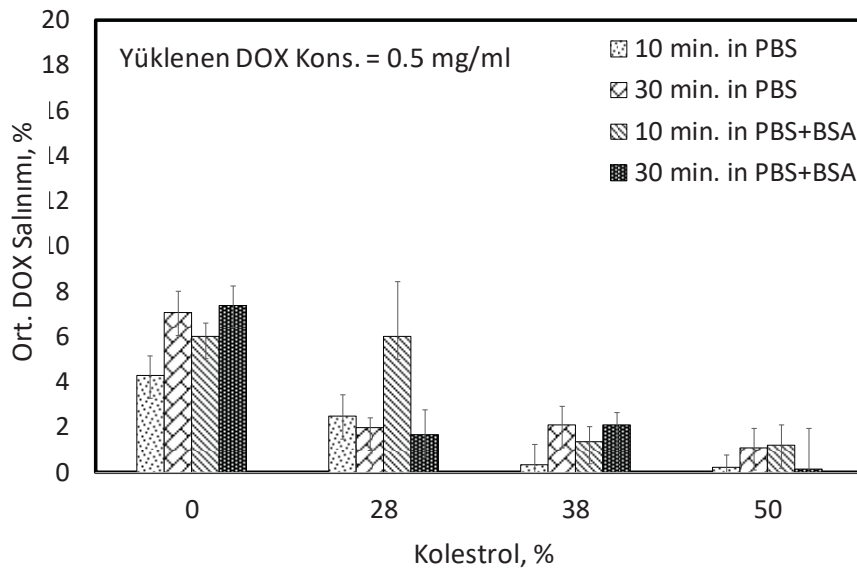
**Şekil 59.** Farklı konsantrasyonlarda DOX yüklü lipozomlardan DOX salınımı esnasında absorbans ve floresan değişimi

Farklı sıcaklıklarda lipo-DOX'lardan DOX salınımı çalışmaları yapılmıştır. Lipozomları oluşturan lipid DSPC'nin katı-sıvı geçiş sıcaklığı ( $T_m$ ) 55 °C'dır ve yüksek sıcaklıklarda membranı oluşturan DSPC lipidlerin daha oynak yapısından dolayı DOX salınım miktarında artma olması beklenmektedir. Bu nedenle,  $T_m$  sıcaklığından düşük ve  $T_m$  sıcaklığından yüksek sıcaklıklarda DOX salınımları çalışılmıştır. **Şekil 60**'da görüleceği üzere, oda sıcaklığında DOX salınımı neredeyse yok denecek kadardır. Vücut sıcaklığı ancak %10 kadar bir DOX salınımı gözlenmiştir.  $T_m$  sıcaklığında %25 kadar bir DOX salınımı elde edilmiştir.  $T_m$  sıcaklığından yüksek sıcaklıklarda ise ancak %40 kadar bir DOX salınımı ölçülmüştür. Anlaşılan o ki,  $T_m$  sıcaklığı yüksek olan DSPC lipozomlarında, özellikle vücut sıcaklığında, DOX salınımı oldukça düşüktür.



**Şekil 60.** DOX yüklü lipozomlardan farklı sıcaklıklarda DOX salınımı

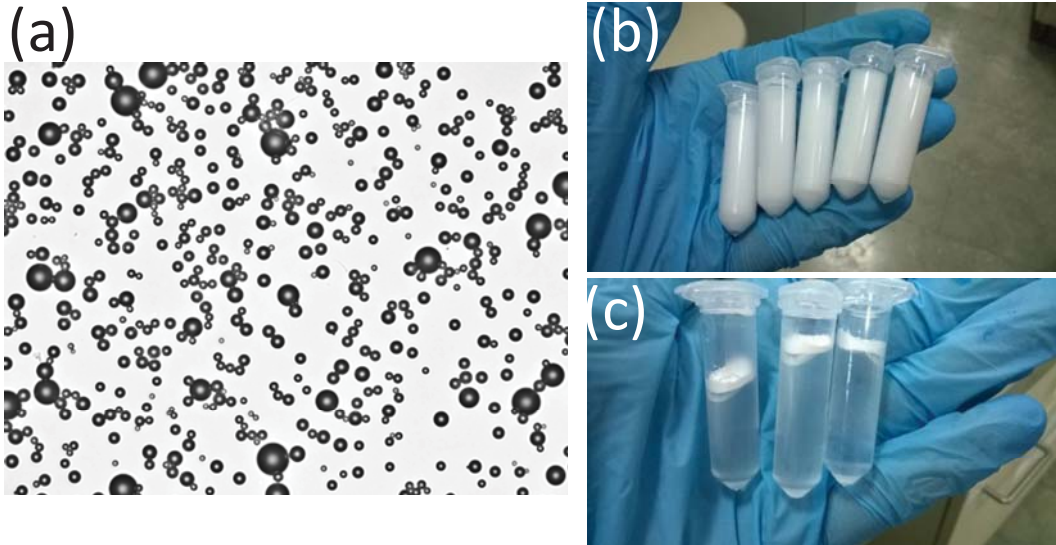
DSPC lipozomlardan DOX salımının çok düşük olması ve ilk 60 dakika sonrasında herhangi bir salım olmaması çalışmalarda yeni arayışlara gitmemize neden olmuştur. DSPC lipozomlardan salım hızını artırmak üzere farklı kolesterol oranlarında lipozomlar hazırlanmış ve **Şekil 61**'de görüleceği üzere DOX salım hızına etkisi incelenmiştir. Ayrıca, DOX salım hızına Bovine Serum Albumin (BSA) protein varlığının etkisi de araştırılmıştır. Şekilden görüleceği üzere, DSPC lipozomları yapı olarak oldukça rigid membrane yapısına sahip oldukları ve DOX salınımı yapmadıkları görülmektedir. Lipozom karışımına konulan artan kolesterol miktarları DOX salınım oranını artırmamış, aksine azaltmıştır. Ortama eklenen BSA protein etkisi de benzer sonuçlar vermiştir. Ne Kolesterol miktarının ne de ortamda BSA varlığının DOX salım hızı üzerine bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır.



**Şekil 61.** Artan kolesterol oranlarında ve ortamda BSA varlığında DSPC lipozomlarından DOX salınımı

#### 4.1.5. Hedeflenebilir özellikte mikroköpükçüklerin hazırlanması

Mikroköpükçükler bir sıvı içerisinde süspansiyeye olmuş, içleri gaz dolu, yüzeyi farklı kompozisyonlarda lipid ve emülsifiyer ihtiva eden mikro boyutlarda taneciklerdir. **Şekil 62(a)**'da ortalama çapı 5  $\mu\text{m}$  olan farklı boyut dağılımında mikroköpükçükler görülmektedir. Mikroköpükçükler ilk sentezlendiklerinde yada süspansiyeye edildiklerinde, **Şekil 62(b)**'de görüldüğü üzere, sıvı içerisinde dağılmış olarak bulunmaktadır. İçleri gaz dolu olmasından dolayı yoğunlukları sıvı yoğunluğundan düşüktür ve sıvı yüzeyine yükselme eğilimindedirler. **Şekil 62(c)**'de santrifüj etkisinde yüzeyde toplanmış mikroköpükçükler görülmektedir. Mikroköpükçüklerin zar yapısını biyolojik hücre membranında bulunan lipidlerden DSPC ve benzerleri oluşturmaktadır. Ancak lipidler tek başlarına monotabaka yapısı oluşturmadıklarından ortama mutlaka bir emülsifiyer eklenmesi gerekir. Literatürde DSPC ve PEG<sub>40</sub>St komponentlerden 9:1 oranında karıştırılarak mikroköpükçükler oluşturulmaktadır (Borden ve Longo 2002, Cox ve Thomas 2010, Kwan ve Borden 2010, Swanson vd. 2010).



**Şekil 62.** (a) içleri gaz dolu, etrafı lipid tabakasından oluşan mikroköpükçüklerin resmi, (b) mikroköpükçüklerin süspansiyeye olarak sıvı içerisinde dağılmış görüntüsü, (c) santrifüj yardımıyla yüzeyde toplanmış mikroköpükçüklerin görüntüsü.

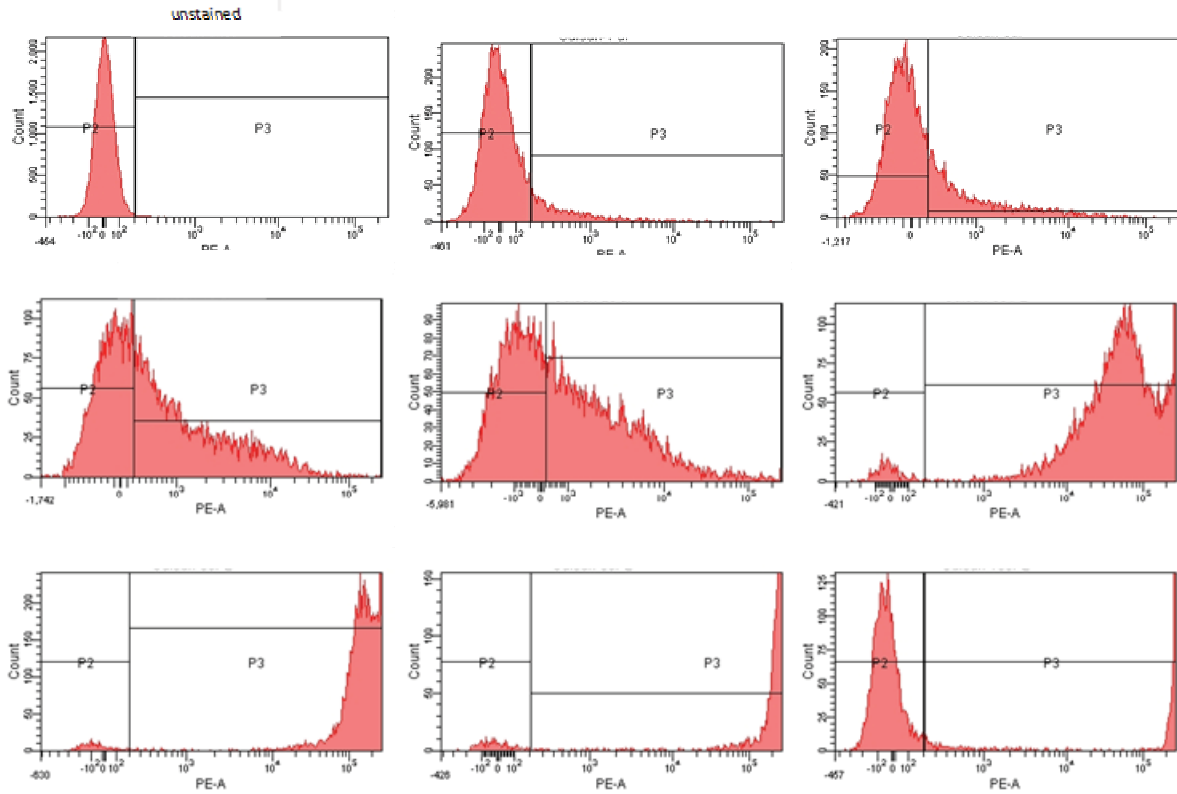
Mikroköpükçüklere ilaç yüklenmiş lipozomların bağlanabilmesi avidin-biyotin kimyası sayesinde yapılabilmektedir. Bunun için hem mikroköpükçüklerin sentezi hem de lipozomların sentezi esnasında lipid kompozisyonuna belli oranlarda biyotinli lipidler katılmaktadır. Böylece, hem mikroköpükçüklerin hem de lipozomların yüzeylerinde biyotin bulunmaktadır. Mikroköpükçüklere lipozom bağlanabilmesi için bileşenlerden birine avidin eklenip diğer bileşen ile karıştırılır. Ancak, hem mikroköpükçük, hem de lipozomlar üzerindeki biyotin miktarının optimize edilmesi gerekmektedir. Bunun için iki yöntem kullanılmıştır.

Birincisi floresan işaretli avidin ile mikroköpükçük yüzeyindeki biyotinlerin akış sitometrisinde ölçülmüş, diğer yöntem de ise mikroköpükçüklerin yapısına floresanlı lipid katılarak mikroköpükçük yüzeyinin aydınlatılması sağlanmıştır.

### Biotinli mikroköpükçük'lerin yüzeyindeki streptavidin (SAv) yoğunluğunun akış sitometrisi ile belirlenmesi:

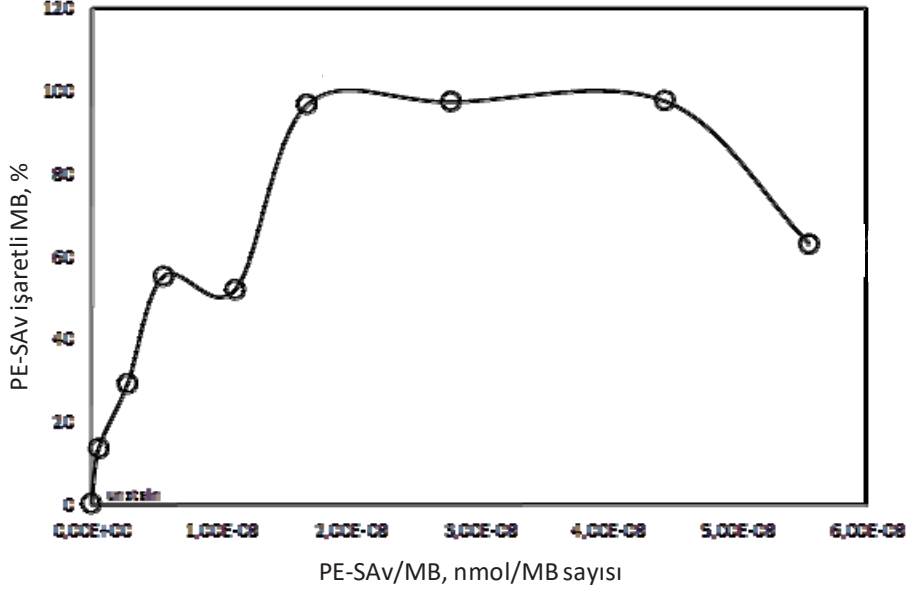
Biotinli mikroköpükçük'lerin yüzeyindeki streptavidin (SAv) yoğunluğunun akış sitometrisi ile belirlenmesi amacıyla biyotinli mikroköpükçükler hazırlandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün  $1 \times 10^6$  konsantrasyonundaki mikroköpükçükler, stok konsantrasyonu 0.2 mg/ml olan streptavidin-PE (PE-SAv)'den farklı miktarda eklenerek 30 dakika inkübe edildi. Akış sitometrisi (Flowcytometri) ile floresan yoğunluklarına bakıldı.

Akış Sitometri grafikleri **Şekil 63**'de gösterilmektedir. PE-SAv eklenmemiş biyotinli mikroköpükçüklerin grafiği boyasız grup (unstain) olarak alanı belirlendi ve histogramın P2 bölümü olarak seçildi. Eklenen PE-SAv oranına bağlı olarak floresan ışımaya yoğunluğuna göre grafik histogramın P2 alanından P3 alanına doğru kaydı. PE-SAv miktarı  $1,67 \times 10^{-11}$  mol (0,006 mg) ve üzeri değerlerde PE-SAv eklenmemiş biyotinli mikroköpükçüklerin hepsinin floresan ışımaya verdiği histogramda gösterildi.



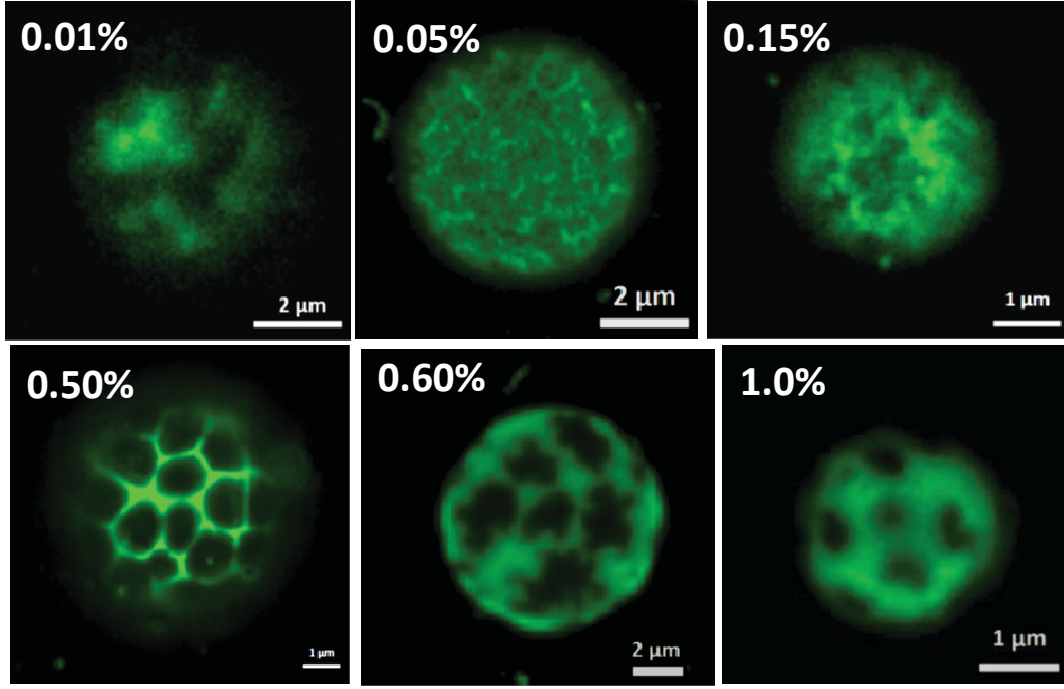
**Şekil 63.** PE-SAv işaretli MK'lerin akış sitometrisi histogramları

Akış sitometrisi ile mikroköpükçük yüzeyindeki avidin/biyotin oranını **Şekil 64**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, 100% PE-Sav işaretli mikroköpükçük ölçüldüğü Mikroköpükçük başına PE-Sav oranı (PE-SAv/MB)  $2.10^{-8}$  nmole/MB olarak bulunmuştur. Böylece, mikroköpükçük kompozisyonunda biyotin mol oranı yaklaşık %0.1'den küçük değerlerde olacağı hesaplanmıştır.



**Şekil 64.** Akış sitometrisi ile mikroköpükçük yüzeyindeki avidin/biyotin oranının ölçülmesi.

Mikroköpükçük yüzeyinde bulunabilecek biyotin/avidin miktarı hakkında bilgi edinebilmek üzere, mikroköpükçük formülasyonuna floresanlı lipid (FITC-DHPE) eklenmiştir. Her bir FITC-DHPE miktarı ihtiva eden mikroköpükçüklerin bir arada bulunduğu floresan mikroskop görüntüleri alınmıştır. **Şekil 65**'de farklı floresan boya konsantrasyonlarında mikroköpükçükler gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin yüzeyinde oluşan karanlık ve aydınlık bölgeler oluşmaktadır. Borden ve ark.(Borden vd. 2004, Borden vd. 2005, Borden vd. 2006), karanlık ve aydınlık bölge oluşumlarını, mikroköpükçüklerin sentezlenmesinden sonra soğuma esnasında boyutlarının küçülmesi, bunun sonucu olarak lipid moleküllerinin yüzeyde sıkışması, bu esnada DSPC lipidlerin kondens faz oluşturması, PEG<sub>40</sub>St moleküllerinin ise expand fazda kalması, bu esnada FITC-DHPE boya moleküllerin expand faz olan PEG<sub>40</sub>St ile karıştığı, dolayısı ile aydınlık bölgeler olarak görünen bu bölgelerin boya ihtiva eden PEG<sub>40</sub>St oldukları ifade edilmektedirler. Ancak, burada karanlık ve aydınlık bölgeler yüksek boya konsantrasyonu ihtiva eden mikroköpükçükler için daha belirgin, düşük boya konsantrasyonu ihtiva eden mikroköpükçükler için ise daha az belirgin hatta hiç yokmuş gibi karşımıza çıkmaktadır. Şekilde yüksek boya konsantrasyonu ihtiva eden mikroköpükçüklerde çokkenar bölgeler oluşurken, düşük boya konsantrasyonlarında yüzeyde daha homojen bir dağılım olduğu görülmektedir.



**Şekil 65.** Mikroköpükçüklere farklı FITC-DHPE oranlarında mikroköpükçüklerin floresan mikroskop görüntüleri.

Mikroköpükçük yüzeyinde lipidler difüzyon yoluyla çok çabuk yer değiştirebilmektedirler. Aynı tür lipidlerin bir araya gelerek faz oluşturdukları anlaşılmaktadır. Bu fazlar, mikroköpükçük yüzeyinde monotabaka olabileceği gibi, dimerler, polimerler ve topaklaşmalar şeklinde de olabilir. Nitekim, floresan ışık yoğunluğu artışından bu oluşumların meydana geldiği şekilde izlenebilmektedir. Öte yandan, mikroköpükçük yüzeyinde karanlık bölge ve aydınlık bölgenin homojen olduğu floresan boya karışımının oranı 0.05% ve bu oranın altında olduğu görülmektedir.

Floresan boya denemsinden elde edilen bilgiler ışığında, mikroköpükçük ve lipozom formulasyonlarına %0.05 oranının altında biyotin katılması gerekeceği düşünülmektedir. Formülasyonlara yüksek konsantrasyonlarda biyotin konulmasıyla yüzeyde faz ayrımı olacak ve sonradan eklenen avidin molekülleri yüzeye oturamayacaktır. Bu da bağlanma verimini düşüreceği değerlendirilmektedir. Yüzeyde biyotin konsantrasyonu düşük olması durumunda biyotin yüzeye daha homojen dağılacığından ortama eklenecek avidin yüzeye oturma şansı elde edecek ve bağlanma oranı artacaktır. Böylelikle, hem mikroköpükçüklere hem de lipozomlara %0.1'in altında biyotin eklenmesi kararlaştırılmıştır.



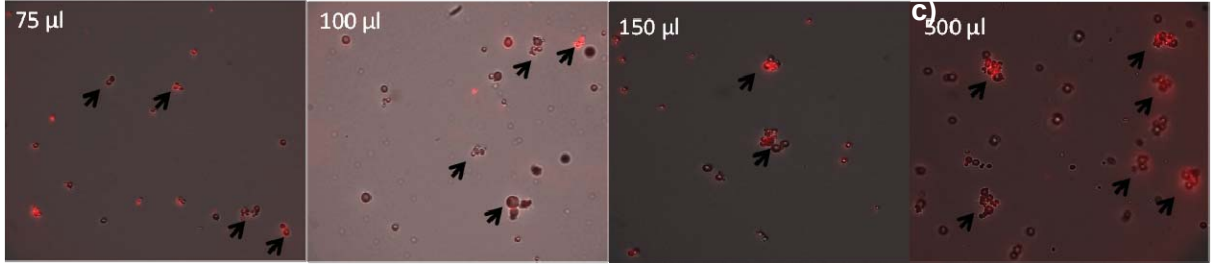
## DOX Yüklü Hedeflendirilebilir Mikroköpükçük Hazırlanması:

Doxorubisin mikroköpükçüklere lipozomlara hapsedilmek suretiyle yüklenmişlerdir. Bu amaçla, biyotinli lipozomlara hapsedilmiş DOX avidin-biyotin bağı ile mikroköpükçüklere bağlanmışlardır. Mikroköpükçüklerin hedeflendirilebilmeleri için, biyotinli-EGF kullanılmıştır. Bu amaçla, Lipo-DOX bağlanmış mikroköpükçükler önce avidin ile inkübe edilmiş ve daha sonra ortama biyotin-EGF ilave edilerek avidin-biyotin bağı ile mikroköpükçüklere bağlanmışlardır.

Mikroköpükçüklere en yüksek oranda DOX yükleyebilmek için iki yaklaşım denenmiştir. Bunlardan ilki, biyotinli DOX yüklü lipozom ortamına farklı konsantrasyonlarda avidin eklenmiş, ve daha sonra biyotili mikroköpükçükler ile birleştirilmişlerdir. İkinci yaklaşımda, avidin biyotinli mikroköpükçüklere farklı oranlarda eklenmiş ve daha sonra DOX yüklü biyotinli lipozomlarla birleştirilmiştir. Yüksek biyotin oranlarında yapılan konjügasyonlarda agregasyonlar gözlenmiştir.

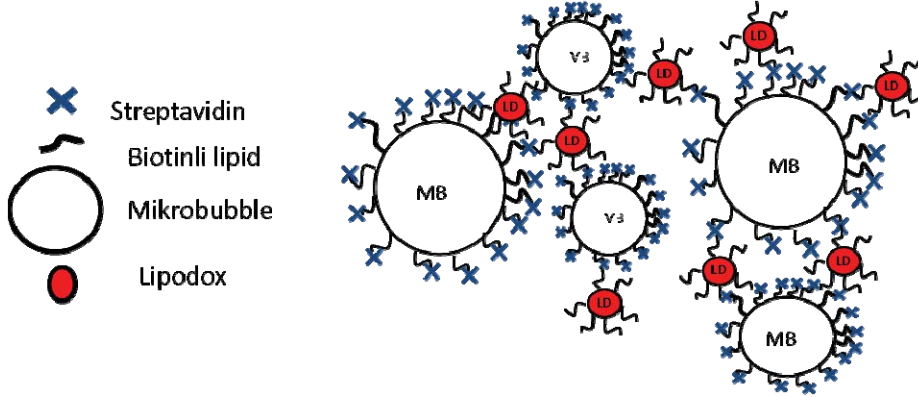
Yüksek konsantrasyonda biyotin ihtiva eden formülasyonlar çalışılmıştır. İlk olarak, %8 biotin içeren MK'ler kullanılarak, 30 µM Streptavidin çözeltisinden 960 uL alınarak  $1 \times 10^9$  MK ile 1 mL içinde 30 dakika inkübe edildi. MK'lerin sıcaklıktan etkilenmemeleri için inkübasyon +4 °C de yapıldı. İnkübasyon sonunda MK'ler 3 kez 1200 rpm'de 2 dak. santrifüj edilerek altfaz atıldı. Böylelikle serbest halde kalan SAV'ler ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen streptavidin bağlanmış MK'lerden  $1 \times 10^8$  MK/mL ve 1 mL olacak şekilde 7 tüp hazırlandı. Alt fazı çekildikten sonra, farklı hacimlerde DOX yüklü %5 biotinli lipozomlar (Lipo-DOX) MK tüplerine eklendi ve PBS:PG (4:1) solusyonu, son hacim 1 ml olacak şekilde eklendi. MK'lere bağlanmamış olan Lipo-DOX'lar santrifüj kullanılarak uzaklaştırıldı. Yüklenen DOX miktarı lipozom hacmi ile doğrusal bir artış gösterdi.

Lipo-DOX yüklenmiş MK'lerin floresan mikroskop görüntüsü **Şekil 66**'de verilmektedir. Biotin-SAV arasındaki düşük  $K_d=10^{-15}$  değeri nedeni ile bağlanma çok hızlı bir şekilde ve tersinmez olarak gerçekleşmektedir. Şekilde görüleceği üzere, değişik lipozom hacimlerinin yapılan yüklemelerin genel görüntüsüne bakıldığında, biyotinli Lipo-DOX'ların MK'ler ile köprü oluşturarak agregasyon yaptığı görüldü. Alınan görüntülerde seyreltme faktörü sabit tutulmasına rağmen, artan Lipo-DOX hacmi ile agregasyonun arttığı ve bu nedenle görüntü alanında MK sayısının arttığı görülmektedir.



**Şekil 66.** SAV'lenmiş %8 biyotin ihtiva eden MK'lere değişik hacimlerde Lipo-DOX eklenmesi ile elde edilen bağlanmaların floresan mikroskop görüntüleri.

Yüksek oranda Biotinli Lipo-DOX'ların Streptavidinlenmiş MK'ler arasında oluşan köprüler şematik olarak **Şekil 67**'de gösterilmektedir. Bu bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Problemin çözümü için deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

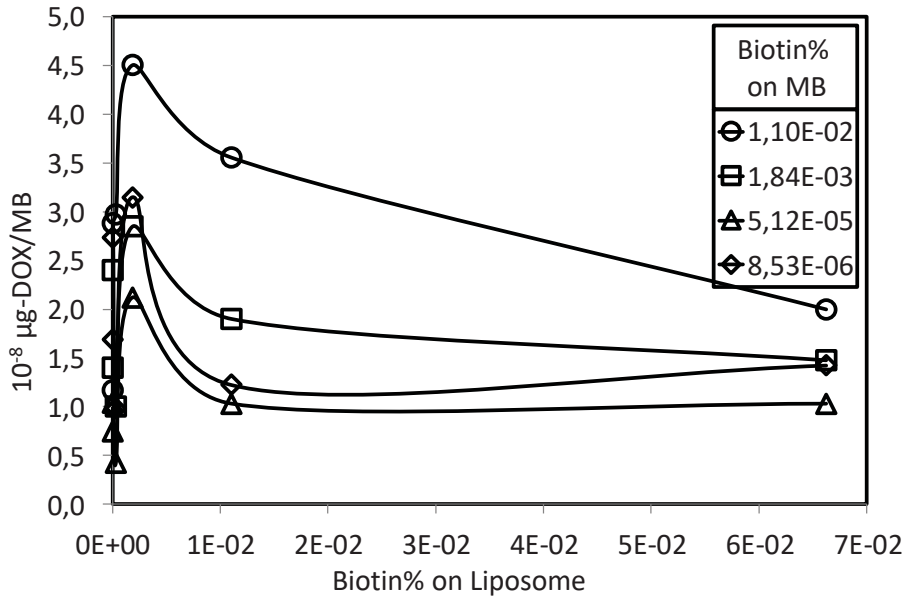


**Şekil 67.** Biotinli Lipo-DOX'ların MK arası köprü oluşturarak kümelenmelerinin şematik gösterimi

İkinci yaklaşımda, %0.1 % ve 0.05% oranında biyotinli Lipo-DOX'lar değişik SAV/Biotin oranlarında SAV ile inkübe edildi ve  $2.5 \times 10^8$  MK/ml konsantrasyonundaki %8 biyotin içeren MK'lere yüklemeleri yapıldı. 20 dakika inkübe edilen karışım sonunda bağlanmayan lipozomları ve ortamdaki serbest halde bulunan SAV molekülleri MK-lipozom kompleksinden ayırmak için 1200 rpm'de üç kez PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra floresan mikroskop görüntüleri alındı. Bu yöntemde agregasyon bir miktar önlenmiş olsa da, ortamda eklenen lipozom miktarına bağlı olarak hala topaklaşmaların olduğu görüldü.

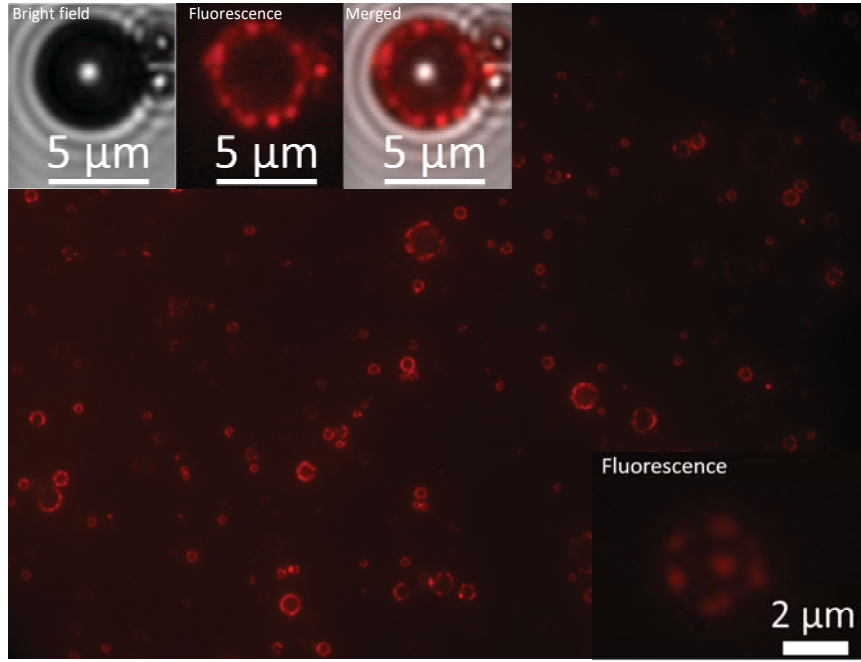
Topaklaşma probleminin çözümü için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Farklı oranlarda biyotin ihtiva eden mikroköpükçüklere farklı oranlarda biyotin ihtiva eden lipozomlar eklendiğinde elde edilecek mikroköpükçüklere DOX yükleme miktarları **Şekil 68**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, farklı biyotin ihtiva eden mikroköpükçüklere eklenen lipozom miktarları arttıkça mikroköpükçüklere bağlanan lipozom sayısı ve dolayısı ile

mikroköpükçüklere yüklenen DOX miktarları artmaktadır. Ancak, belli bir biyotin yüzdesinin üzerinde lipozom bağlanma miktarlarında ve DOX yükleme oranlarında azalma olmaktadır. Böylece, formülasyonlara eklenmesi gereken biyotin miktarları konusunda bilgi sahibi olunmuştur. Hem lipozom hem de mikroköpükçük formülasyonlarına katılacak biyotin oranları düşürülmüştür. Bu aynı zamanda biyotinleri doyumak üzere otama eklenecek straptavidin miktarının azaltılmasını ve ekonomik olarak tasarruf edilmesini de sağlamıştır. Ayrıca, straptavidin'lerin mikroköpükçükler ile birleştirilmesi ve ortamda kalan fazla straptavidinlerin santrifüj ile ayrılarak topraklaşmaları önlemek konusunda yöntem geliştirilmiştir.



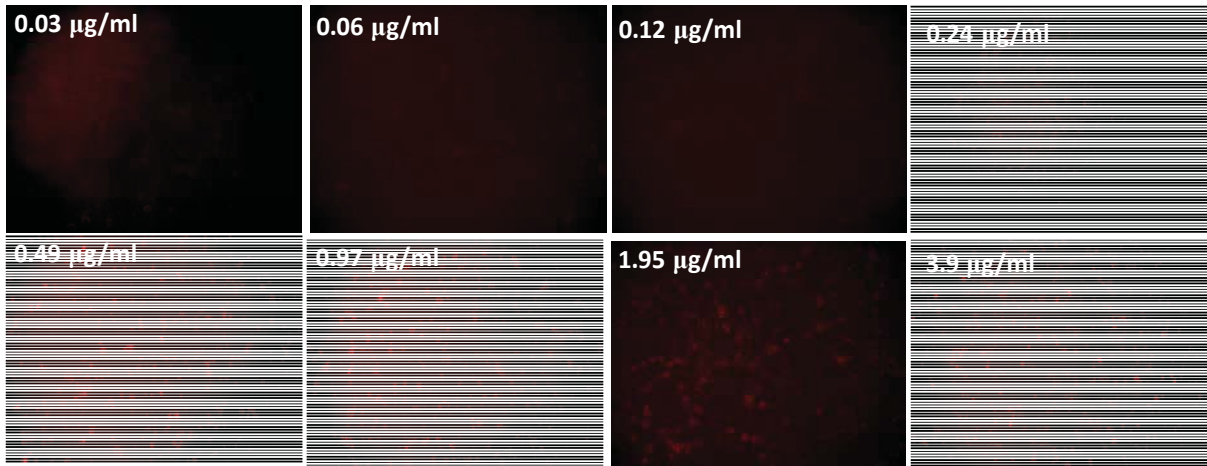
**Şekil 68.** İlaç Yüklü MK'lerdeki DOX miktarı

Yeni geliştirilen yöntem ile elde edilen lipo-DOX mikroköpükçükler **Şekil 69'**de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, DOX yüklü lipozomlar mikroköpükçüklerin yüzeyine bağlanmış olarak ışık ve floresan mikroskopu ile görüntülenmektedirler. Lipo-DOX'lar mikroköpükçüklerin üzerinde noktacıklar olarak görünmektedirler. Bu noktacıkların sayılması sonucu bir mikroköpükçük üzerinde yaklaşık ortalama 8 ile 14 adet arasında lipozom olabileceği değerlendirilmektedir.



**Şekil 69.** Lipo-DOX bağlanmış tek bir MK'ün floresan mikroskop görüntüsü.

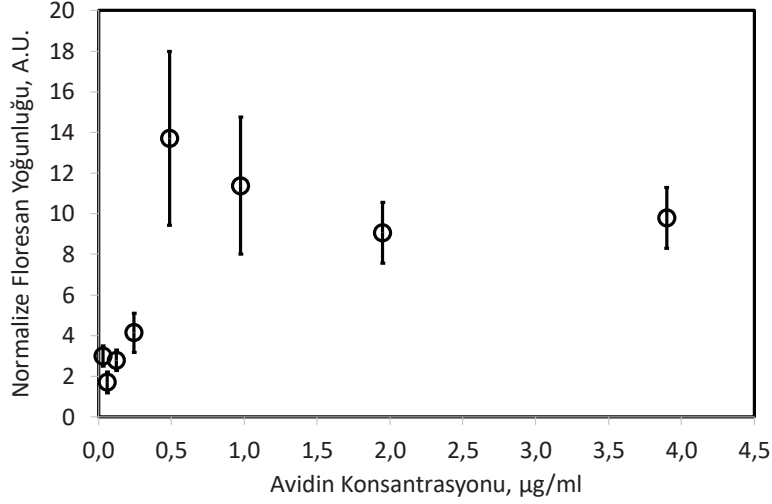
Benzer konsantrasyonda mikroköpükçüklere farklı miktarlarda straptavidin (SAv) ile inkübasyonu sonucu bağlanan DOX yüklü lipozomlar **Şekil 70'**da gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, düşük konsantrasyonlarda SAv ile mikroköpükçüklere bağlanma neredeyse yok denecek seviyededir. SAv miktarı artırıldığında DOX yüklü lipozomların mikroköpükçüklere bağlanması artmıştır.



**Şekil 70.** Farklı straptavidin miktarı ile elde edilen DOX yüklenmiş lipozomların mikroköpükçüklere bağlanması.

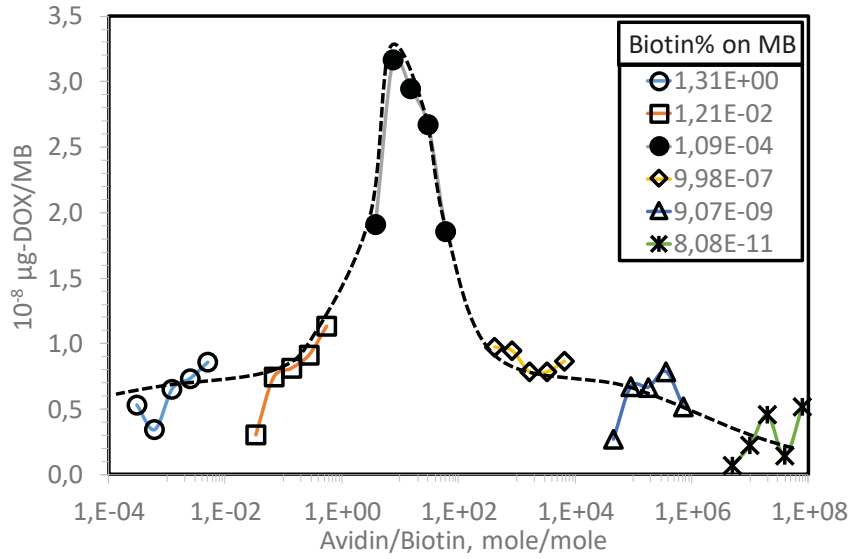
Ancak, **Şekil 71'**de görüleceği üzere, Mikroköpükçüklere DOX yüklü lipozomların bağlanmasında bir optimum olduğu anlaşılmaktadır. Şekilden görüleceği üzere, düşük

konsantrasyonlarda SAV ile mikroköpükçüklere bağlanma neredeyse yok denecek kadardır. Belli bir SAV miktarının üzerinde mikroköpükçüklere bağlanan Lipo-DOX miktarında belli bir maksimumdan sonra azalma olmaktadır. Mikroköpükçüklerin yüzeyinde bulunan biyotin miktarı ile ortama eklenecek SAV miktarları arasında bir optimumun olduğu anlaşılmaktadır.



**Şekil 71.** Mikroköpükçüklerin farklı miktarlarda SAV ile inkübasyonu ile bağlanan DOX yüklü lipozomlar için normalize floresan ışık şiddeti değerleri

Konjügasyon için optimum avidin miktarını belirlemek üzere mikroköpükçük formulasyonuna katılan biyotin miktarı ile ortama eklenmesi gereken avidin miktarları arasında parametrik bir çalışma yapılmıştır. Farklı biyotin miktarlarında hazırlanmış her bir mikroköpükçük kompozisyonuna farklı miktarlarda SAV eklenmiş ve elde edilen üründe DOX miktarları tayin edilmiştir. Böylece, her bir mikroköpükçük için avidin/biyotin oranına karşı, mikroköpükçük başına ölçülen DOX miktarları **Şekil 72**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, farklı biyotin miktarına sahip her bir mikroköpükçük için ortama eklenen avidin miktarı arttıkça mikroköpükçüklere bağlanma artmaktadır. SAV/Biotin oranı 7 olduğunda bağlanmanın maksimum olduğu ölçülmüştür. SAV/Biotin oranı düşük olduğunda ya da bu oran yüksek değerlerde olduğunda mikroköpükçüklere Lipo-DOX bağlanma oranı azalmaktadır. Özellikle düşük biyotin oranı ihtiva eden mikroköpükçüklerde SAV miktarı ile mikroköpükçüklere bağlanamadaki artış görülebilmektedir (grafik sol taraf). Öte yandan, yüksek biyotin ihtiva eden mikroköpükçüklerde SAV miktarı arttıkça mikroköpükçüklere bağlanma ya değişmemekte ya da azalma olmaktadır (grafik sağ taraf). SAV/Biotin oranı 7'de mikroköpükçüklere mikroköpükçük başına  $3 \cdot 10^{-8}$  µg-DOX yüklenebildiği ölçülmüştür.



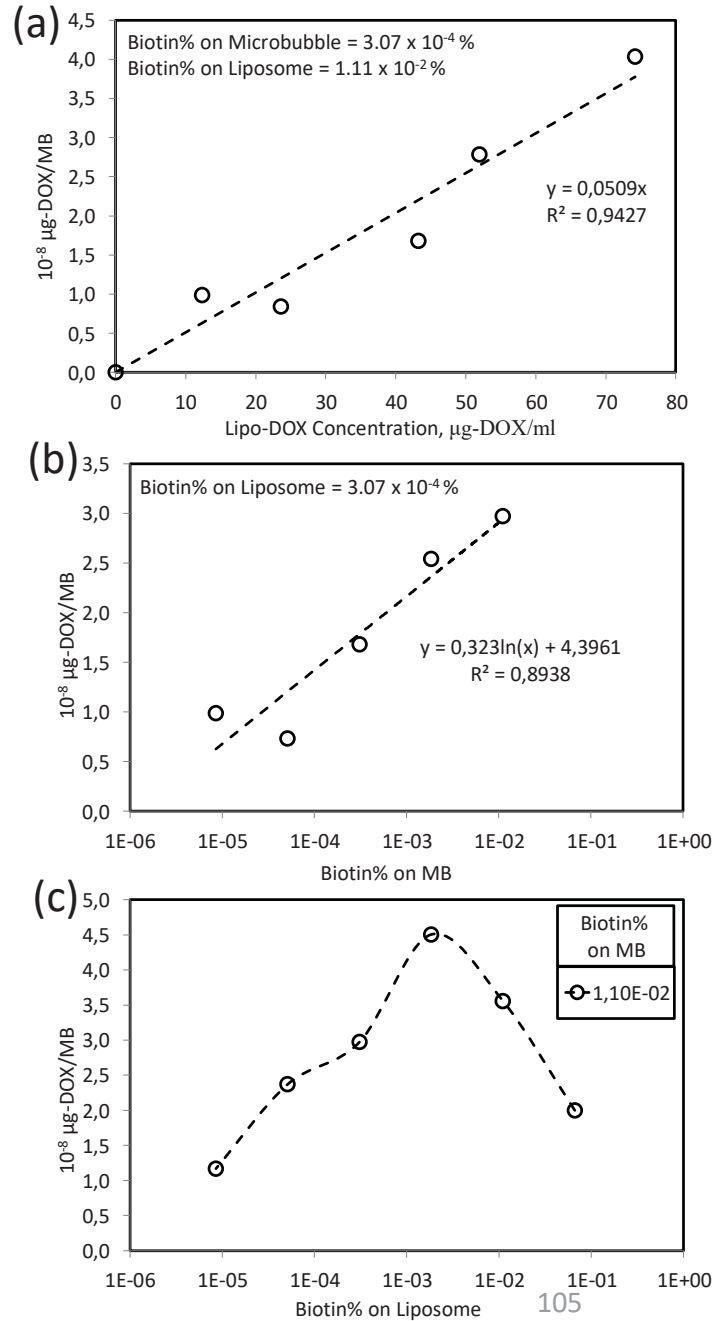
**Şekil 72.** Farklı biyotin miktarı ihtiva eden mikroköpükçüklere eklenen avidin miktarlarının mikroköpükçüklere bağlanan lipo-DOX miktarları üzerine etkisi.

Mikroköpükçüklere yüklenecek lipo-DOX miktarlarının artırılabilmesi için parametrik çalışmalar yapılmıştır.  $3.07.10^{-4}\%$  biyotin ihtiva eden mikroköpükçüklere, SA<sub>v</sub>/Biotin oranı 7 olacak şekilde avidin eklenmiş, fazla avidin ortamdaki santrifüj ile yıkanarak atılmış, ve farklı miktarlarda DOX yüklü lipozomlar mikroköpükçüklere eklenmiştir. Mikroköpükçük başına bağlanan DOX miktarları **Şekil 73(a)** da gösterilemektedir. Şekilden görüleceği üzere, ortama eklenen lipo-DOX miktarı ile mikroköpükçüklere bağlanan lipo-DOX miktarı artmaktadır. Ancak, elde edilen üründe, bir mikroköpükçük için yalnızca  $4.5.10^{-8}$  µg-DOX bağlanabildiği ölçülmüştür.

Mikroköpükçük üzerindeki biyotin yüzdesi 0.1%'e kadar artırılmış ve mikroköpükçüklere **Şekil 73(b)**'de gösterilen bağlanmalar elde edilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçük formülasyonuna katılan biyotin miktarı artırıldığında mikroköpükçük başına bağlanan lipo-DOX miktarı artmaktadır. Ancak, bu artış beklendiği üzere çok yüksek değerlerde olamamıştır. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçük üzerindeki biyotin miktarını artırmakla bir mikroköpükçük başına ancak  $3.10^{-8}$  µg-DOX bağlanabilmiştir.

Lipozomlar üzerinde bulunan biyotin miktarını artırmak suretiyle mikroköpükçüklere lipo-DOX bağlanma miktarları araştırılmıştır. Mikroköpükçük formülasyonuna  $1.1.10^{-2}\%$  biyotin eklenerek üretilen mikroköpükçüklere, farklı yüzdelerde biyotin ihtiva eden lipozomlar katılmış ve mikroköpükçüklere **Şekil 73(c)**'de gösterilen bağlanmalar elde edilmiştir. Şekilde görüleceği üzere, lipozomlara eklenen biyotin ile mikroköpükçüklere bağlanan lipo-DOX miktarında bir artış olmaktadır. Ancak, yüksek biyotin miktarlarında, mikroköpükçüklere bağlanma oranlarında bir azalma olmaktadır. Bu azalmanın, lipozom yüzeyinde biyotinli

lipidlerin faz oluşturdukları ve biyotinli lipidlerin yüzeyde belli bölgelerde topaklaşmalar yaparak Avidinler ile bire bir bağ yapamadıkları olarak değerlendirilmiştir. Tüm bu parametrik denemeler sonunda, mikroköpükçüklere yüklenebilecek DOX miktarının, mikroköpükçük başına  $4.5 \cdot 10^{-8}$   $\mu\text{g-DOX}$  olabileceği anlaşılmıştır. Böylece, tümör tedavisinde farelere verilebilecek toplam DOX miktarları kullanılacak mikroköpükçük konsantrasyonuna bağlı olarak hesaplanabilecektir.



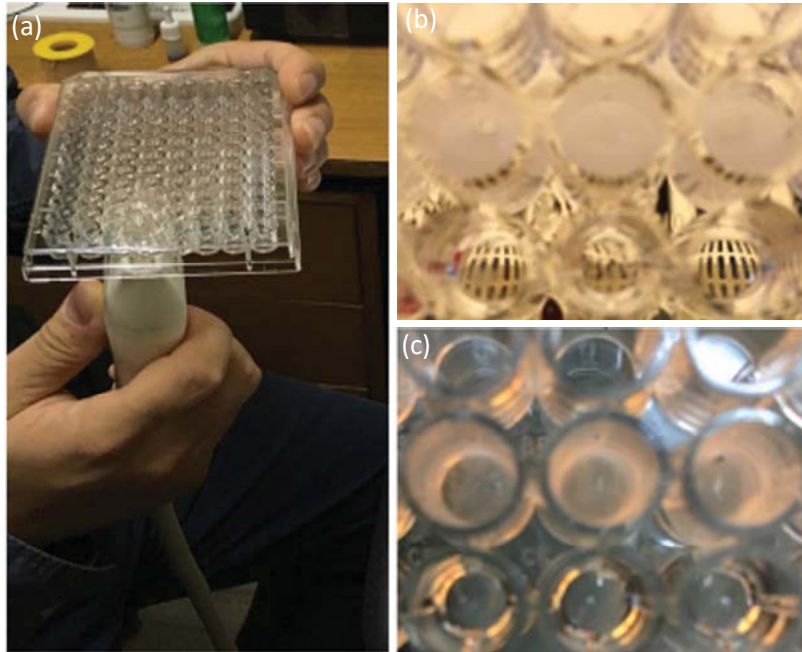
**Şekil 73.** Mikroköpükçüklere yüklenecek lipo-DOX miktarlarının artırılabilmesi için parametrik çalışmalar, (a) Mikroköpükçüklere farklı miktarlarda DOX yüklü lipozom eklenmesi, (b)



Mikroköpükçük yüzeyinde biyotin miktarının artırılması, (c) lipozom yüzeyinde biyotin miktarının artırılması.

#### 4.1.6. Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin farklı MI değerlerinde stabilite ve ekojenitelerinin belirlenmesi

Mikroköpükçüklerin farelere verilmeden önce, ultrason altında patlatılabildiğinin gösterilmesi amacıyla 96 kuyucuk well platelere hücre ekimi yapılmış ve *in vitro* olarak etkinliği belirlenmiştir. Hücre ihtiva eden her bir kuyucuk içerisine belli konsantrasyonda mikroköpükçük eklenmiş ve ultrason altında davranışları incelenmiştir. **Şekil 74(a)**'da görüleceği üzere, plate alt kesimine değişik frekanslardaki ultrasonografi problemleri yerleştirilerek ayrı ayrı görüntülemeler gerçekleştirilmiş ve yüksek mekanik indeks (MI) değerleri uygulanarak mikroköpükçükler patlatılmaya çalışılmıştır. **Şekil 74(b)**'de mikroköpükçüklerin patlatılmadan önce ve **Şekil 74(c)**'de mikroköpükçüklerin patlatıldıktan sonraki resimleri görülmektedir. Yapılan bu çalışma sonucunda mikroköpükçüklerin ultrason altında, cihazın mekanik indeksi artırılarak kontrollü bir biçimde patlatılabildiği gösterilmiştir.



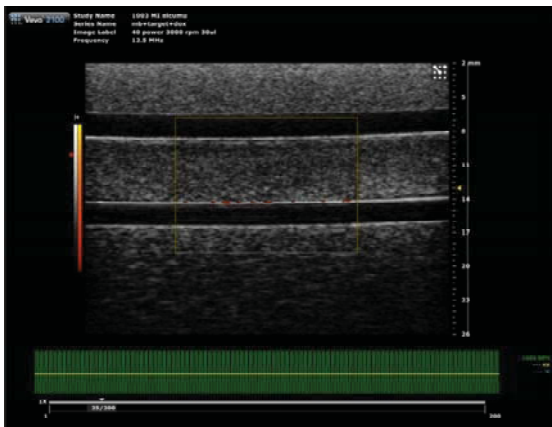
**Şekil 74.** (a) 96 kuyucuklu plate'de ultrasonografik işlemin uygulanması, (b) kuyucuk içindeki mikroköpükçüklerin ultrason altında patlatılmadan önce ve (c) patlatıldıktan sonraki görüntüleri.

## Hedeflendirilmiş Mikroköpükçüklerin Farklı Ultrason Güçlerinde Stabilitelerinin Belirlenmesi:

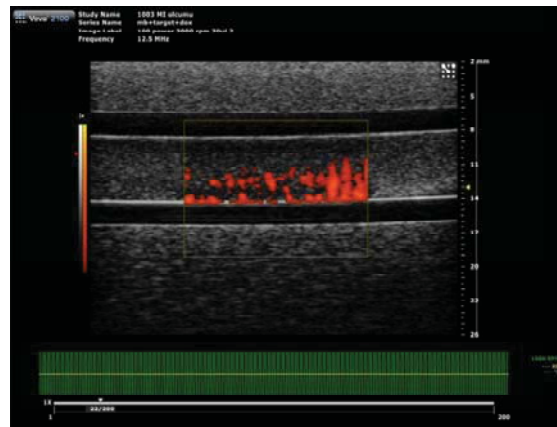
Ultrason altında mikroköpükçüklerin kararlılığının istenen düzeyde olmadığı ve kararlılığını arttırmaya dönük çalışmaların yapıldığı bilinmektedir. Proje kapsamında alınmış olan Vevo marka ultrason görüntüleme sistemimizi kullanarak belirli MI değerlerine karşılık gelen farklı akustik güçlerde hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin statik koşullarda kararlılığını araştırılmıştır. Ultrason kontrast ajanlarının stabilitelerini ölçmek üzere **Şekil 9**'de gösterilen akış fantomu deney düzeneği kullanılmıştır. Ultrason probu akış fantomu üzerine yerleştirilmiş ve bir santrifüj pompası vasıtasıyla sabit hızda akan sıvıya mikroköpükçükler yaklaşık 30 $\mu$ l bolus hacimde enjekte edilmiştir. Mikroköpükçükler borunun içerisinden geçerken pompa durdurulmuş ve statik koşullarda mikroköpükçükler ultrasona maruz bırakılmıştır. Farklı ultrason güçleri altında zamanla alınan resimlerden mikroköpükçük popülasyonlarının ortamala intensitesi ImageJ programı ile ölçülmüştür.

Ultrason sisteminde akustik güç, ultrason dalgasının puls basıncının genlik değerini gösterir. Mekanik indeks (MI) ise bir ultrason dalgasının gücünün ölçüsüdür. MI, pik negatif basıncın merkez frekansın kareköküne bölümüyle tanımlanır. MI değeri, inceleme sırasında hastaya verilen enerjinin büyüklüğü hakkında bilgi verir.

**Video 1(a) ve Video 1(b)**'de, akış fantomunda enjeksiyon sonrası boru içerisindeki mikroköpükçüklerin power Doppler %40 ve %100 güçleri altında osilasyonları ve buna bağlı olarak ekojenite değişimleri ve stabilitelerindeki azalma izlenebilmektedir.



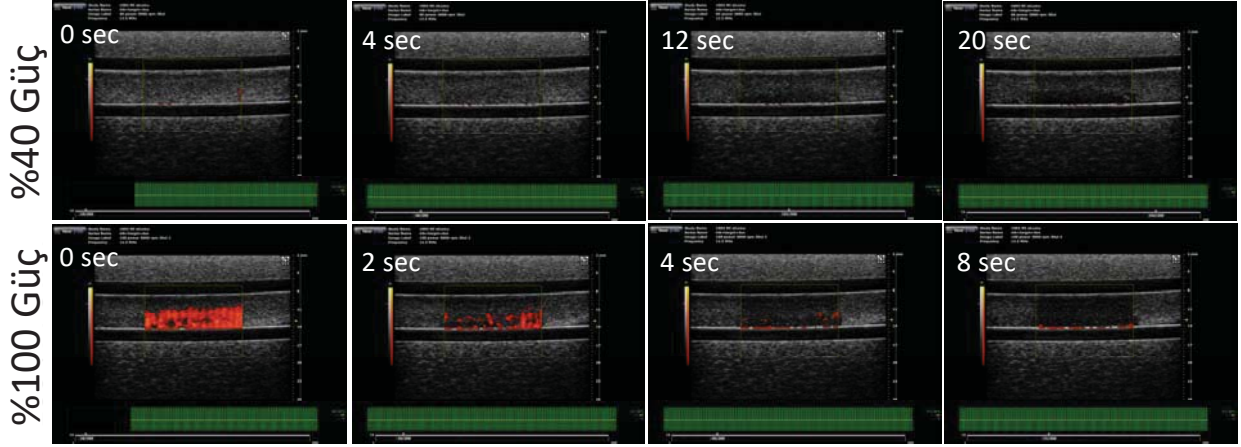
**Video 1a** 2017-07-06-12-59-01\_40 power 3000 rpm 30ul-2017-06-13-17-41-31\_1.avi



**Video 1b** 2017-07-06-12-59-01\_100 power 3000 rpm 30ul 2-2017-06-13-17-30-38\_1.avi

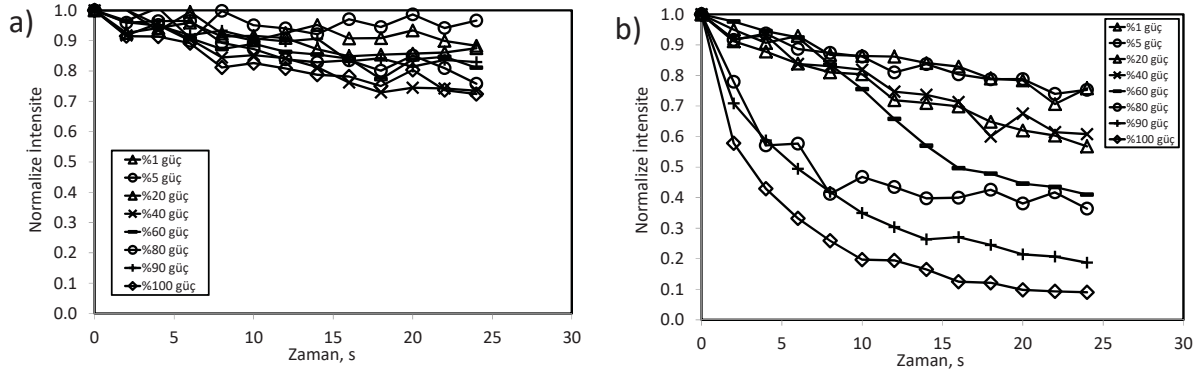
**Video 1:** Akış fantomunda enjeksiyon sonrası boru içerisindeki mikroköpükçüklerin (a) %40 ve (b) %100 power Doppler güçleri altında ekojenite değişimleri izlenebilmektedir.

B-mod'da, %40 ve %100 güçte power Doppler modunda ultrason altında mikroköpükçüklerin zamanla intensitelerindeki değişim **Şekil 75**'de görülmektedir. %40 power Doppler gücünde, resimdeki power Doppler pencere bölgesinde mikroköpükçüklerin intensitesi 20 saniye içerisinde az da olsa azalmaktadır. %100 power Doppler gücünde ise fokus bölgesindeki intensite daha kısa sürede hızlıca bir düşüş göstermektedir. Sonuç olarak mikroköpükçükler, yüksek MI gücünde çok daha hızlı bir şekilde yıkıma uğramaktadır.



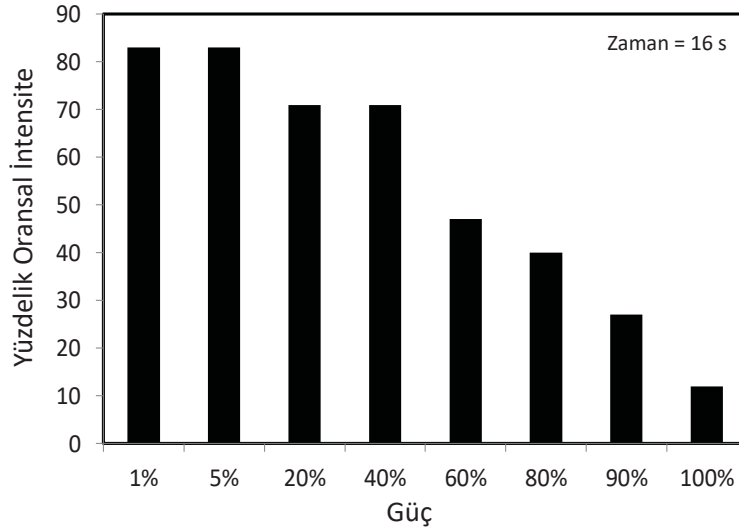
**Şekil 75.** B-mod'da, %40 ve %100 güçte power Doppler modunda ultrason altında mikroköpükçüklerin zamanla intensitelerindeki değişim.

Resimlerdeki intensiteler ImageJ programında ölçerken, power Doppler penceresi içerisindeki ve pencere dışındaki bölge olarak iki kısım birlikte değerlendirilmiştir. Bu iki farklı bölgede her bir farklı power Doppler gücünde (%40, %60...%100 gibi) ölçüldü intensiteler zamana bağlı olarak **Şekil 76**'da grafiksel olarak gösterilmiştir. **Şekil 76(a)**'da görüldüğü üzere, pencere dışı bölgede mikroköpükçükler B-mod görüntüleme ultrason dalgalarından az miktarda da olsa etkilenmektedir. Örneğin, %100 power Doppler gücünde mikroköpükçük popülasyonunun yaklaşık %24'ü yıkıma uğramaktadır. **Şekil 76(b)** incelediğinde ise, mikroköpükçükler pencere bölgesinde power Dopplere ait yüksek MI değerlerine maruz kaldıklarından mikroköpükçükler üzerindeki ultrason etkisi çok daha büyük olmaktadır. Power Doppler gücü arttırıldıkça mikroköpükçüklerin yıkılma hızının daha da arttığı görülmektedir. %50 güce kadar intensitede daha az bir düşüş var iken, bu seviyenin üzerinde intensite zamanla keskin bir şekilde düşüşe geçmektedir. %100 power Doppler gücünde, mikroköpükçüklerin 25 saniye içerisinde %90 oranında toplam intensitesini kaybettiği saptanmaktadır. Geriye kalan %10'luk intensite ise yıkım sonrası ortamda oluşan daha küçük mikroköpükçüklerin osile ettiğini, dolayısıyla ortamda hala çok düşük de olsa mikroköpükçüklerin var olduğunu düşündürmektedir.



**Şekil 76.** Farklı ultrason güçlerinde power Doppler penceresi dışı (sadece B-mod görüntüleme) (a) ve power Doppler penceresi içerisinde (yüksek MI değerleri) (b) mikroköpükçüklerin intensitelerinin zamanla değişimi.

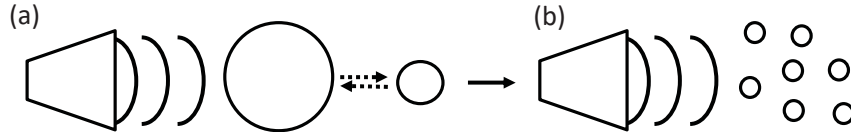
**Şekil 77**'de farklı ultrason güçlerinde 16. saniyedeki power Doppler penceresi içerisindeki intensitenin pencere dışı bölgedeki intensiteye oranı yüzdesini vermektedir. Grafiği incelediğimizde, %40 ultrason gücüne kadar mikroköpükçüklerde yumuşak osilasyon görülürken, bu gücün üzerindeki güçlerde yüzdelik intensite oranının ciddi bir şekilde düştüğü görülmektedir. %100 ultrason gücünde bu oran %10'a kadar düşmektedir.



**Şekil 77.** Farklı ultrason güçlerinde 16. saniyedeki fokus bölgesindeki intensitenin fokus dışı bölgedeki intensiteye yüzdelik oranları.

Mikroköpükçükler bir akustik alana maruz kaldıklarında, akustik basınca cevap olarak hacimsel düzeyde değişime uğrarlar. **Şekil 78(a)**'da gösterildiği üzere, düşük MI değerlerinde, mikroköpükçükler osilasyon hareketine yani büyüyüp küçülmeye ve titreşmeye başlarlar. Dolayısıyla bu durumdan kaynaklı olarak ultrason görüntülemelerde sinyaller oluşur. Tersine, bu mikroköpükçükler daha yüksek MI değerlerinde ise, **Şekil 78(b)**'de gösterildiği

üzere, parçalanmaya uğrarlar. Mikroköpükçüklerin yıkıma uğraması sonucu daha küçük yavru mikroköpükçükler meydana geldiği değerlendirilmiştir.

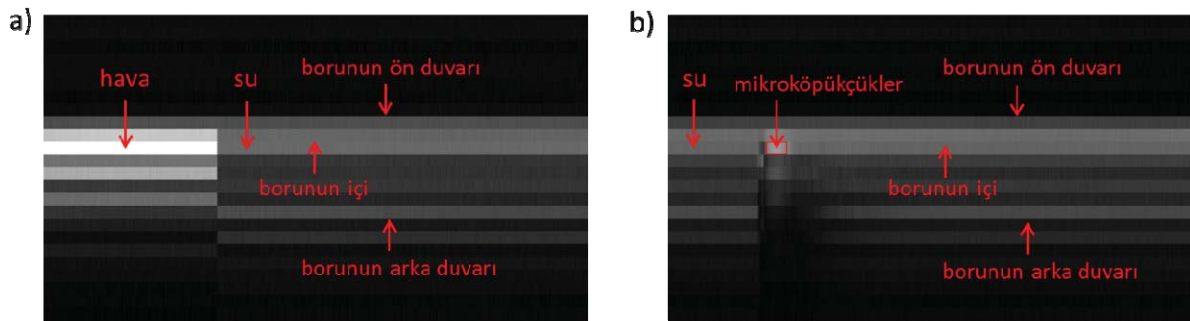


**Şekil 78.** Düşük MI değerlerinde, mikroköpükçükler sürekli bir şekilde osilasyon hareketi gösterirler (a). Yüksek MI değerlerinde ise mikroköpükçükler bozulmaya ve sonunda parçalanmaya zorlanırlar (b).

Sonuç olarak, üretilen hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin değişik MI değerlerindeki davranışları karakterize edilmiştir. Bizim mikroköpükçüklerimiz için %60 ve üzeri power Doppler güçlerinde stabilite, hızla ve büyük oranda bozulmaktadır. Bozulma %100 güçte maksimum seviyede ve oldukça yüksek hızda gerçekleşmektedir. Bu bilginin *in-vivo* hayvan modelinde görüntülemelerde kullanılacağı düşünülmektedir.

#### Farklı Kütlelerde Yüklemelere Sahip Mikroköpükçüklerin Ekojenitelerinin Belirlenmesi:

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin her bir üretim aşamasında farklı mikroköpükçüklere yüklenen MB-Biyotin, MB-Biyotin-Avidin, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX-Avidin, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX-Avidin-EGF gibi farklı kütlelerin mikroköpükçüklerin ekojenitesine etkisini belirlemek üzere **Şekil 10**'de gösterilen deney düzeneği oluşturuldu. Sistem karakterize edildi. Plastik boru içerisinde sadece saf su varken B-mod'daki görüntüsü **Şekil 79(a)**'da görülmektedir. Borunun içi su gelmeden önce hava ile dolu olduğundan parlaklık yüksek iken borunun içine su dolunca parlaklık düşmektedir. Mikroköpükçükler enjekte edildikten sonra ise, **Şekil 79(b)**'de görüldüğü üzere, mikroköpükçüklerden yansıyan ses dalgasından dolayı konsantrasyona bağlı olarak parlaklık artmaktadır.

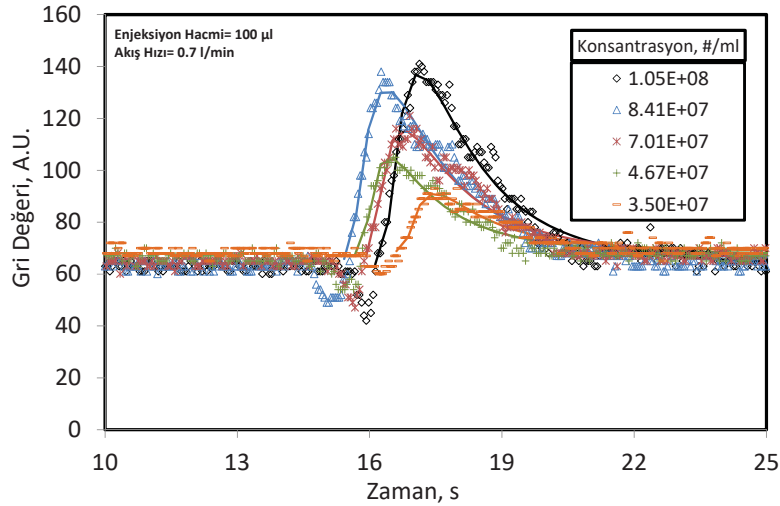


**Şekil 79.** (a) B-mod'da borunun içi hava dolu iken ve içi su ile dolduktan sonraki resim. (b) Mikroköpükçükler enjekte edildikten sonra borunun içerisinden geçerkenki B-mod resmi.

Farklı konsantrasyonlarda mikroköpükçük süspansiyonları enjekte edildikten sonra B-mod'da elde edilen her bir resim daha sonra ImageJ programında analiz edildi. Burada gri değer denilen resimdeki piksellerin intensitesi zamana karşılık grafiğe geçirildi. Böylelikle, mikroköpükçüklerin geçtiği ilgili bölgede intensite artışına bağlı olarak zaman-intensite eğrileri oluşturuldu. **Şekil 80**, farklı mikroköpükçük konsantrasyonlarında zaman-intensite eğrilerini göstermektedir. Buradaki gri değerleri, B-mod'daki resimlerin piksel intensitesine karşılık gelmektedir. SigmaPlot programında, farklı tipteki mikroköpükçükler için her bir konsantrasyona ait intensite değerleri İlk Geçiş Zamanı modeline fit edildi (Strouthos vd. 2010). Şekilden deney verilerinin modeldenkleme iyi bir şekilde fit ettiği görülmektedir. Deneysel verilere fit parametrelerinden eğri altında kalan alan (AUC) değerleri daha sonraki hesaplamamızda kullanıldı. AUC için genel formül şu şekildedir:

$$AUC = (\alpha * C_0) \left( \frac{V}{Q} \right) + \varphi_0 \quad (11)$$

Denklemden verilen  $\alpha$  değeri mikroköpükçüklerin ekojenite değerlerini vermektedir. Denklemden görüleceği üzere, AUC aynı zamanda mikroköpükçük konsantrasyonu,  $C_0$ , bolus hacmi,  $V$ , ve sıvı akış hızına,  $Q$ , bağlıdır. Bolus hacmi ve sıvı akış hızı bilindiğinden farklı mikroköpükçük konsantrasyonlarında ölçülen AUC değerlerinden elde edilecek doğrunun eğiminden mikroköpükçüklerin ekojenite değerleri,  $\alpha$ , hesaplanabilir.

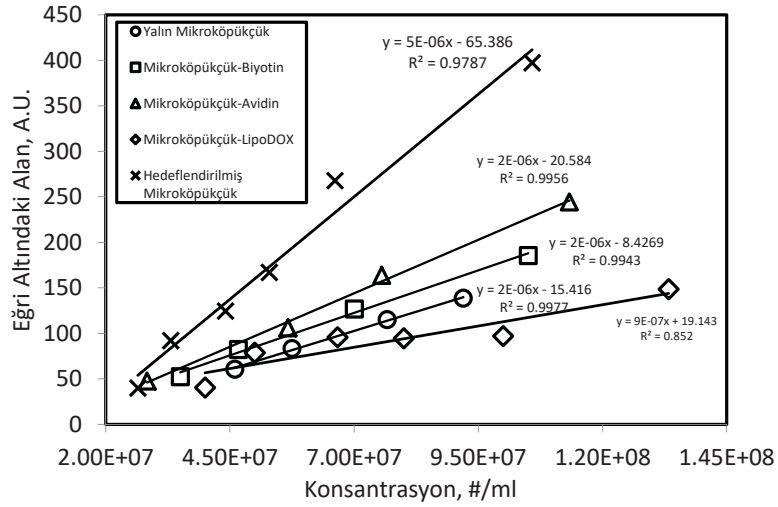


**Şekil 80.** Farklı mikroköpükçük konsantrasyonlarında zaman-intensite eğrileri.

Farklı kütlelerde yüklenmiş mikroköpükçükler için mikroköpükçük konsantrasyonu ile AUC değerleri arasında oluşturulan doğrusal denklemler ve eğim değerleri **Şekil 81**'de gösterilmektedir. Şekilde, belirli bir konsantrasyon aralığında AUC ile konsantrasyon

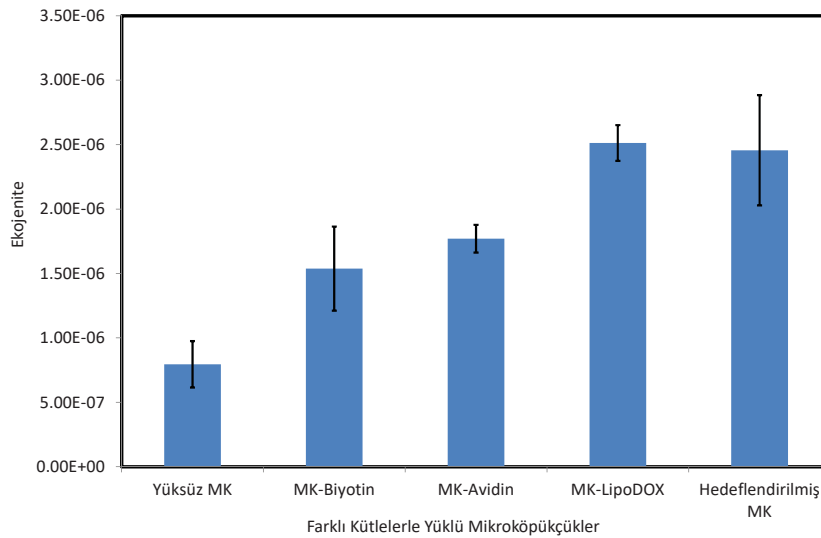


arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir. Eğrilerin eğimlerinden, farklı tipteki mikroköpükçüklerin ekojeniteleri hesaplanabilmektedir.



**Şekil 81.** Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklere ait Eğri Altındaki Alan (AUC)-Konsantrasyon eğrileri.

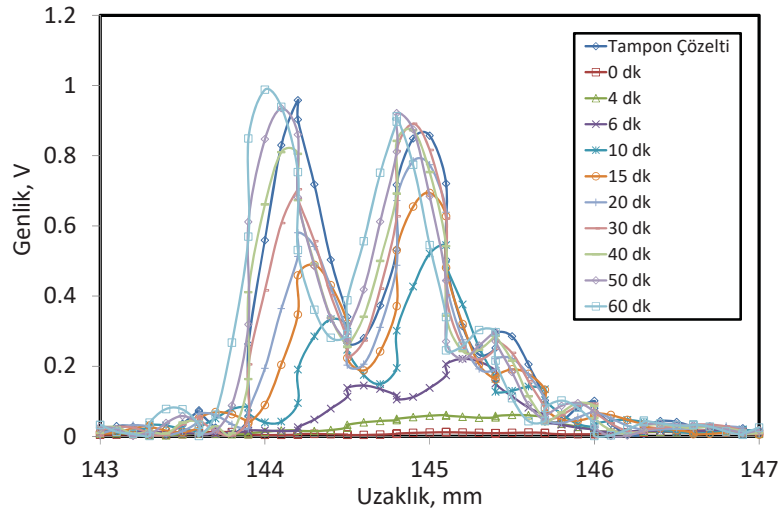
Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklerin ekojeniteleri **Şekil 82**'de verilmektedir. Deneyler 3'er kez tekrarlanmıştır. Buna göre, mikroköpükçük üzerindeki yük arttıkça ekojenitesinin de arttığı görülmektedir. Bu sonuç gösteriyor ki, mikroköpükçüklerin üzerlerindeki yük arttıkça mikroköpükçüklerin osilasyonu da artmaktadır. Bu sonuç büyük olasılıkla, mikroköpükçüklerin üzerindeki kütle tarafından yaratılan itici osilasyon kuvveti sonucu mikroköpükçüklerin daha fazla büyüüp küçülmesinden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.



**Şekil 82.** Farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklerin ekojeniteleri.

## Farklı Kütlelerde Yüklemelere Sahip Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Kararlılıkları:

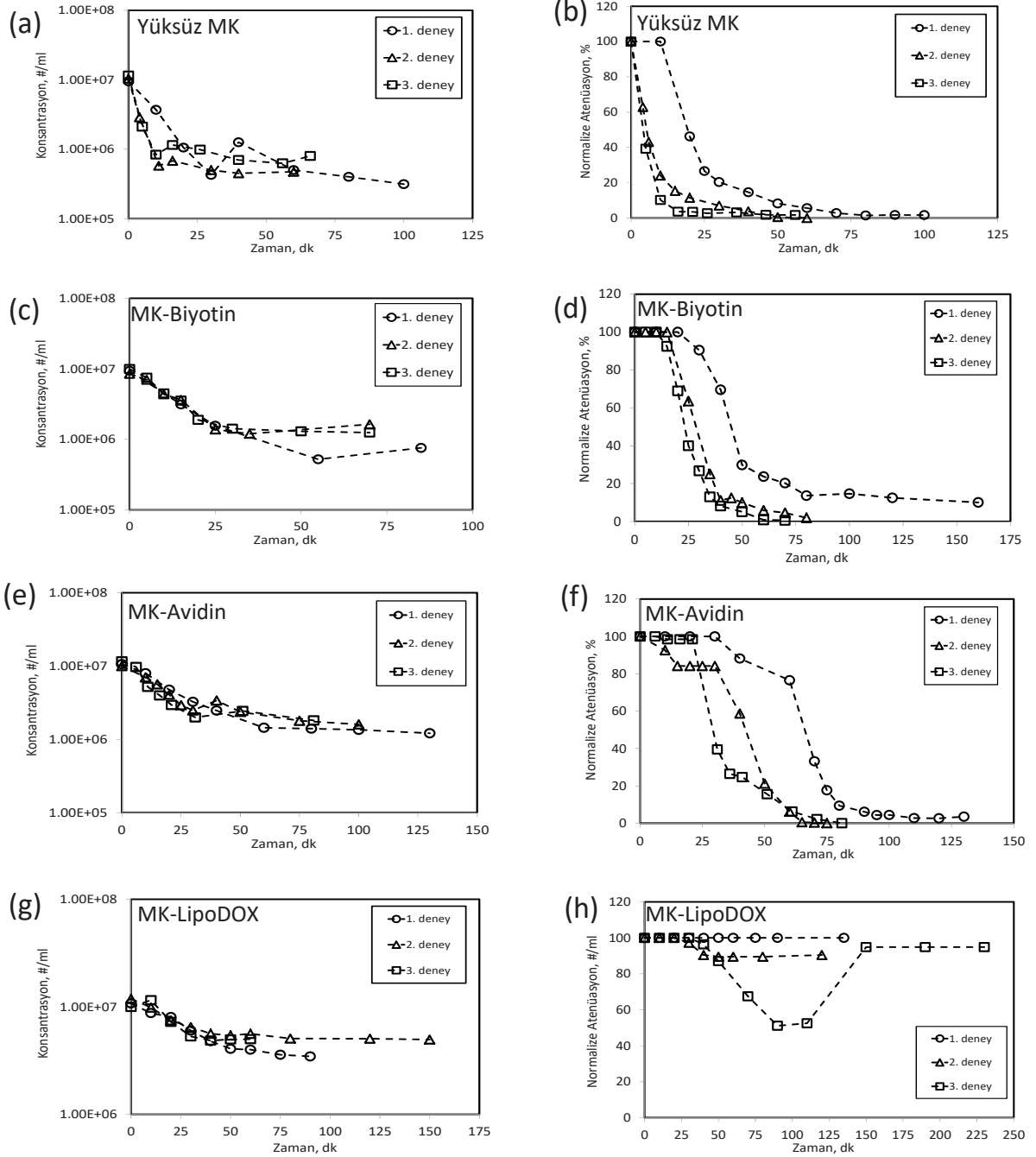
MB-Biyotin, MB-Biyotin-Avidin, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX-Avidin, MB-Biyotin-Avidin-Lipo-DOX-Avidin-EGF gibi farklı kütlelerde yüklemelere sahip mikroköpükçüklerin ultrason altında kararlılıklarının incelenmesi için **Şekil 11**'de gösterilen deney düzeneği oluşturuldu. Farklı kütlelerde yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında kararlılıkları ölçüldü. Yüksek frekans (4 MHz) ve çıkış gücünde (30 dB) her bir mikroköpükçük türü aynı koşullar altında ultrasona tabi tutuldu. **Şekil 11**'de gösterilen deney düzeneğinde, mikroköpükçüklerin içine konulduğu küvetin arka duvarından geri yansıyan akustik sinyallerinin genlik değerleri **Şekil 83**'de gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü üzere, arka duvardan geri yansıyan iki adet sinyal piki oluşmaktadır. Ultrason probundan yaklaşık 144 mm uzaklıkta olan ilk sinyal arka duvarın ön yüzeyinden gelmekte, 145 mm uzaklıktaki ikinci sinyal ise duvarın arka yüzeyinden gelmektedir. Doalyısıyla, ön yüzey ile arka yüzey arasında yaklaşık 1 mm'lik bir mesafe bulunmaktadır. Analiz için ön yüzeyden gelen sinyalin genliği değerlendirildi. Mikroköpükçük süspansiyonunu tampon çözelti içerisine koymadan önce, tampon çözeltisini içeren küvetin arka duvarından maksimum pik genliğini elde edecek şekilde su banyosunun içine yerleştirildi. **Şekil 83**'de de görüldüğü üzere, mikroköpükçük süspansiyonu ortama koyulduktan sonra, 0. dakikada, ortamdaki mikroköpükçüklerden dolayı ses dalgası arka duvara ulaşamadığından akustik sinyal tamamen kayboldu. Yüksek çıkış gücünde mikroköpükçükler yıkıma uğradıkça, ultrasonik dalgalar küvetin arka duvarına ulaşmaya başladı. Dolayısıyla, akustik sinyal zamanla arttı ve tampon çözeltiliye denk gelen maksimum değerine ulaştı.



**Şekil 83.** Küvetin arka duvarından geri yansıyan akustik sinyallerin genliklerinin zamanla değişimi.



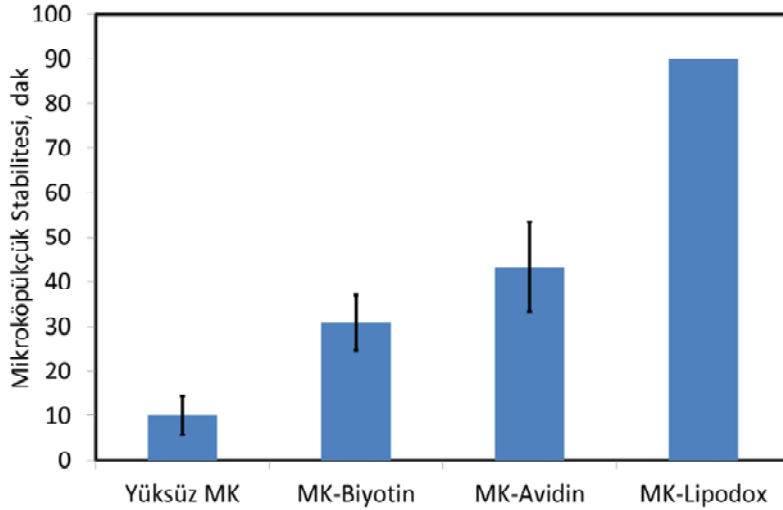
Farklı kütlelerde yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla atenüasyon ve konsantrasyondaki değişim **Şekil 84**'de gösterilmektedir. Aynı başlangıç konsantrasyonları ile her bir mikroköpükçük tipi için deneyler 3'er kez tekrarlandı. Yüksüz mikroköpükçük için atenüasyon grafiklerini incelediğimizde, yüksüz mikroköpükçüklerin ilk 10 dakika içerisinde atenüasyonlarında düşüş başladı ve 15 dakika sonunda atenüasyonun %50'si azaldı. Konsantrasyondaki zamanla değişime baktığımızda ise 30 dakika içerisinde yüksüz mikroköpükçüklerin tamamen kararlılıklarını kayb ettikleri görülmektedir. Biotin bağlı mikroköpükçükler ve avidin bağlı mikroköpükçüklerin sırasıyla ilk 20 ve 30 dakikadan sonra atenüasyonlarında düşüş başladığı görüldü. Atenüasyonlarındaki %50'lik kaybın ise biyotinli bağlı mikroköpükçüklerde ortalama 25-30 dakika sonunda, avidinli bağlı mikroköpükçüklerde ise ortalama 50 dakika sonunda olduğu görüldü. Lipo-DOX'lu mikroköpükçüklerde ise atenüasyon değerlerinin düşmediği ve hemen hemen sabit kaldığı görülmektedir. Bunun nedeni, mikroköpükçük-Lipo-DOX kompleksinin ultrason altında parçalanması esnasında diğer yüklü mikroköpükçüklere nazaran ortamda daha çok sayıda serbest kalmış misel, lipozom ya da lipid topakları gibi taneciklerin oluşmasından dolayı olabileceği değerlendirildi. Ortamda oluşan bu yapıların küvet içerisinde ses dalgalarının arka duvara geçmeden geri saçılmasına ve dolayısıyla arka duvardan herhangi bir sinyalin alınamamasına yol açtığı görüldü. Dolayısıyla, Lipo-DOX'lu mikroköpükçükler söz konusu olduğunda atenüasyonda değişimin gözlenememesi, kararlılıklarını koruduklarını göstermemektedir. Çünkü, konsantrasyonlarında zamanla düşüş olduğu görülmüştür. Yüklü mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarındaki zamanla değişime baktığımızda, biyotinli mikroköpükçüklerin yaklaşık ilk 25 dakika, avidinli ve Lipo-DOX'lu mikroköpükçüklerin ikisinin de yaklaşık 50 dakika içerisinde tamamen kararlılıklarını kayb ettikleri görüldü. Toplam olarak tüm bu bulguları değerlendirdiğimizde, mikroköpükçüklerin üzerindeki yüklemeler arttıkça ultrason altında daha uzun süre kararlılıklarını korudukları sonucu çıkartılabilir.



**Şekil 84.** Yüksüz ve farklı kütlelerle yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenuasyonundaki değişim.

Farklı kütlelerde yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında stabilitesi **Şekil 85'**de karşılaştırılmıştır. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçük üzerindeki yüklere bağlı olarak, ultrason altında mikroköpükçük stabilitesinde bir iyileşme olmaktadır. Literatürü incelediğimizde, yüksüz mikroköpükçükler ile lipozom yüklü mikroköpükçükleri kararlılık açısından karşılaştıran araştırmalar mevcuttur. McLaughlan vd. ultrason altında 2 MHz'te 0-0.4 arası MI (mekanik indeks) değerlerinde her iki tip mikroköpükçük popülasyonlarının

yıkımlarını araştırmışlardır. Mikroköpükçükler üzerine lipozomların yüklenmesinin yıkım eşik değerine etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu anlaşılmıştır. Buldukları sonuca göre, 0.4'ten büyük MI değerlerinde her iki tip popülasyonun da %80'inin yıkıldığı rapor etmektedirler(Mclaughlan vd. 2017). Peyman vd. ultrason ortamı olmadan lipozom yüklü mikroköpükçüklerin oda sıcaklığında yaşam sürelerini araştırmışlardır. Yüksüz mikroköpükçüklere nazaran, lipozom yüklü mikroköpükçüklerin daha uzun sürede ilk konsantrasyonlarını korudukları ve 3 saati aşkın bir sürede lipozom yüklü mikroköpükçüklerin ilk konsantrasyonu sadece %37'lik bir azalış gösterirken, yüksüz mikroköpükçükler %95'lik bir azalma göstermektedirler. Bu sonuç, bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir. Burada yalnızca ultrason altındaki kararlılığa bakılmıştır. Yine de elde edilen bu sonuçlar bize bir fikir vermektedir. Peyman vd., kararlılıktaki bu farklılığının sebebini mikroköpükçüklerin üzerindeki ekstra lipozom tabakasının gaz geçişini engelleyerek mikroköpükçüklerin ortamda daha geç çözünmesine bağlamaktadırlar (Peyman vd. 2012).

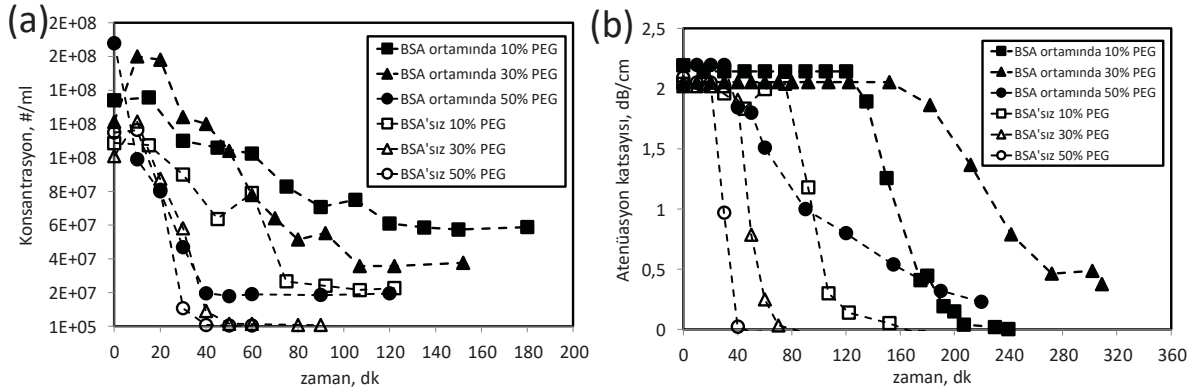


**Şekil 85.** Farklı kütlelerde yüklü mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteyi.

#### **Mikroköpükçüklerin serum stabiliteyi:**

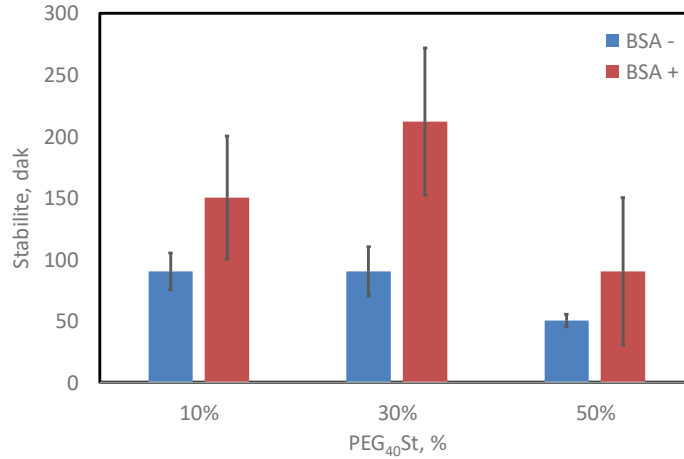
Mikroköpükçüklerin (MK) serum stabiliteyi araştırmak üzere **Şekil 11**'de gösterilen deney düzeneği kullanıldı. MK'lerin kan plazmasında en yaygın bir şekilde bulunan albumin proteininin içerisindeki stabiliteyi ultrason altında incelendi. Kan serumunda albumin en düşük 30 mg/ml ve en yüksek 50 mg/ml olarak bulunmaktadır. Kan serumu proteini olarak sığır serum albumini (BSA) seçildi. MK'lerin bileşimindeki PEG'in serum stabiliteyiindeki rolünü anlamak üzere, 3 farklı oranda emülsifier (PEG<sub>40</sub>St) içeren MK'ler test edildi. Mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla atenuasyon ve konsantrasyondaki değişimleri **Şekil 86**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, BSA'sız ortamda mikroköpükçükler

daha erken yıkıma giderken, BSA varlığında mikroköpükçüklerin stabilitelerinde artma olduğu görülmektedir.



**Şekil 86.** Ortamda Bovine Serum Albumin (BSA) varlığında ve BSA'sız ortamda farklı PEG<sub>40</sub>St ihtiva eden mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenüasyonundaki değişim

Bovine Serum Albumin (BSA) varlığında ve BSA'sız ortamda farklı PEG<sub>40</sub>St ihtiva eden mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteeler **Şekil 87**'de gösterilemektedir. Şekilden görüleceği üzere, ortamda BSA proteinlerinin olması mikroköpükçüklerin stabiliteelerini olumlu yönde etkilemektedir.



**Şekil 87.** Bovine Serum Albumin (BSA) varlığında ve BSA'sız ortamda farklı PEG<sub>40</sub>St ihtiva eden mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteeleri.

#### 4.1.7. Steril mikroköpükçük Üretimi

*In-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda kullanılacak mikroköpükçükleri steril olarak üretebilmek üzere, mikroköpükçük (MK) karışımları hazırlandıktan sonra PBS:PG (4:1) karışımı ilave edilerek 60°C'de 90 dak. hidrasyon edildi ve sonikatör ile üretimleri yapıldı.



Mikroköpükçükleri steril olarak üretebilmek için, yapılan değerlendirmelerin ardından, U.V. sterilizasyon ve ekstrüzyon olmak üzere iki farklı yöntem uygulandı. Kullanılan cam malzemeler otoklav (120 °C, 45 dakika) ile steril edildi. Kullanılan solusyonlar 0.22 mikron şırınga filtresinden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. Steril mikroköpükçük üretimi için aşağıda detayları verilen yöntemler uygulandıktan sonra, mikroköpükçükler sonikasyon yöntemi ile üretildi. Kullanılan sonikatör probu öncesinde geniş spectrumlu antibiyotik ile sterilize edilerek dış ortama karşı izole edildi.

- a) U.V. sterilizasyonu: Mikroköpükçük filmleri U.V ile 30 dakika boyunca muamele edildi.
- b) Ekstrüzyon yöntemi: Mikroköpükçük filmi hidrasyon edildikten sonra önce 400 nm sonrasında 200 nm polikarbonat membrandan ekstrüde edildi.

Normal laboratuvar koşullarında üretilmiş (Sterilizasyon işlemi uygulanmamış) ve yukardaki sterilizasyon yöntemleri uygulanarak üretilen MK'ler, TSA (trypticase soy broth agar), NA (nutrient agar), EMB (Eosin Methylen-blue agar) ve BA (Koyun kanlı agar) ve bunlara ek olarak Potato Dextrose Broth (PDB), Tryptic Soy Broth (TSB) ve hücre kültür (%10 inactivated bovine serum albumine eklenmiş steril EMEM medium) ortamlarında ekimleri yapılarak sterilizasyonları test edildi. Ortamların kullanım amaçları kısaca aşağıda sıralanmıştır.

TSA (trypticase soy broth agar): Gram + bakteri tek koloni üremesi

BA (Koyun kanlı agar): Gram + bakteri tek koloni üremesi

NA (nutrient agar): Gram - bakteri tek koloni üremesi

EMB (Eosin Methylen-blue agar) : Gram - bakteri tek koloni üremesi

Potato Dextrose Broth (PDB): Maya ve küf kontaminasyonu

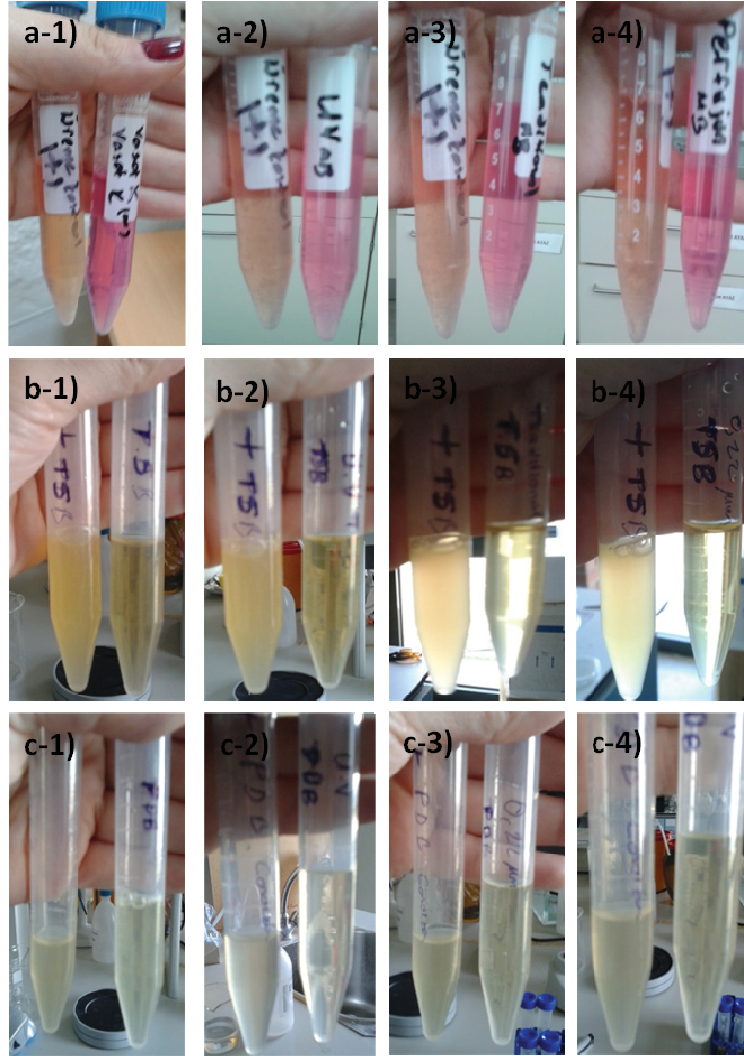
Tryptic Soy Broth (TSB): Bakteri üreme

EMEM medium: 37°C' de herhangi bir üreme olup olmadığının kontrolü

MB sterilizasyon kontrolü için 5 grup oluşturuldu.

1. Grup: (+) Kontrol bakteri ekimi yapıldı
2. Grup: (-) Herhangi bir ekim yapılmamış ortamın kontrolü
3. Grup: UV sterilizasyon yöntemi ile üretilen MK
4. Grup: Ekstrüzyon yöntemi ile üretilen MK
5. Grup: Normal laboratuvar koşullarında üretilmiş (Sterilizasyon işlemi uygulanmamış) MK

5 grupta hücre kültür ortamında 48 saat, hücre kültür ortamı, TSB ve PDB' de 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bakteri ve küf ekiminin yapıldığı + kontrol grubunda **Şekil 88**'de soldaki tüplerin hepsinde üreme gözlemlenmiştir. Herhangi bir ekim yapılmamış ortamın kontrol grubunda (negatif kontrol) üremenin olmaması test için kullanılacak olan ortamın steril olduğunu göstermektedir. **Şekil 88**'deki diğer grupların sonuçlarından da uygulanan sterilizasyon yöntemleri ile steril MK'ler üretildiği gözlenmektedir.



**Şekil 88.** Üretilen MK'lerin hücre kültürü, TSB, PDB ortamında ekim sonuçları: Herbir resimde soldaki tüp üreme kontrolü; sağdaki tüpler sırasıyla,

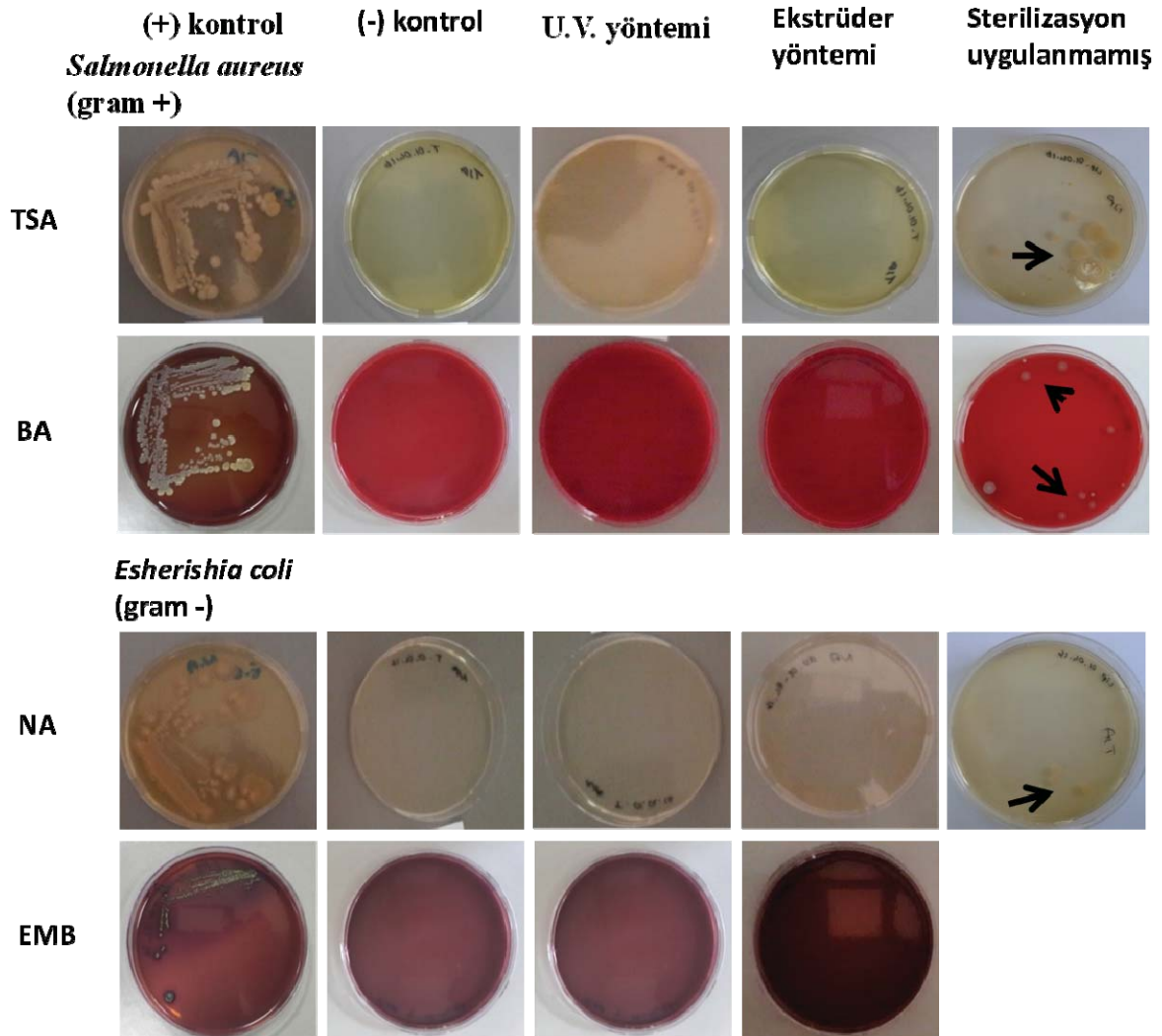
**a:** MK'lerin EMEM medium ekim sonuçları; a-1) Negatif kontrol: Sadece hücre kültür ortamı, a-2) UV sterilizasyonu ile sterilize edilmiş MK'ler a-3) Ekstrüder yöntemi ile sterilize edilmiş MK'ler a-4) Normal laboratuvar koşullarında üretilmiş (Sterilizasyon uygulanmamış) MK'ler

**b:** MK'lerin TSB ekim sonuçları; b-1) Negatif kontrol: Sadece TSB ortamı, b-2) UV sterilizasyonu ile sterilize edilmiş MK'ler b-3) Ekstrüder yöntem ile sterilize edilmiş MK'ler b-4) Normal laboratuvar koşullarında üretilmiş (Sterilizasyon uygulanmamış) MK'ler

**c:** MK'lerin PDB ekim sonuçları c-1) Negatif kontrol: Sadece PDB ortamı, c-2) UV sterilizasyonu ile sterilize edilmiş MK'ler c-3) Ekstrüder yöntem ile sterilize edilmiş MK'ler c-4) Normal laboratuvar koşullarında üretilmiş (Sterilizasyon uygulanmamış) MK'ler.



Sterilizasyon değerlendirmesi için TSB, PDB ve hücre kültür ortamına yapılan ekimlerin yeterli olamayabileceği düşünülerek, ortamda olası bakteri varlığını araştırmak üzere agara tek koloni ekimleri yapıldı. Tek koloni ekimleri 37 °C 'de 15 gün inkübe edildikten sonra **Şekil 89**'de görüleceği üzere sonuçları alındı. Tek koloni ekimlerinde de pozitif kontrol grubunda üreme varken, negatif kontrol grubunda üreme gözlemlenmemiştir. Normal laboratuvar koşullarında üretilmiş (Sterilizasyon uygulanmamış) MK'de bakteri ve küf üremesi gözlemlenmiştir. UV ve ekstrüzyon yöntemi ile üretilen MK'de tek koloni ekiminde de herhangi bir üreme gözlemlenmemiştir.



**Şekil 89.** Mikroköpükçüklerin 37 °C'de 15 günlük inkübasyondan sonundaki fotoğrafları

Hem tek koloni hem de Broth ve hücre kültür ortamı ekimlerinin sonuçlarına göre steril MK üretmek için U.V. ve ekstrüzyon yöntemi kullanılabilir yöntemlerdir. Ancak, U.V.

sterilizasyon yönteminde, U.V. ışığı ortamda bulunan bakteri veya küfün membranını parçalayarak yok ettiğinden ortamdaki bakteri kalıntıları uzaklaştırılmamaktadır. Özellikle, U.V. ile parçalama sonucu ortamdaki kalan DNA ve diğer biyolojik moleküller canlıda immünolojik etki yapabileceğinden bu teknik tercih edilmemesi kararlaştırılmıştır. Bu nedenle sterilizasyon yöntemi olarak ekstrüzyon yöntemi tercih edilmiştir.

#### **4.2. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin *in-vitro* etkinliğinin iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) hücre kültürü düzeneklerinde belirlenmesi**

Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin insan meme kanser hücresi, MDA-MB-231, ve normal meme hücreleri, MCF10, kullanılarak iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) düzeneklerde çalışmalar yapılmıştır. Sonuçlar APPENDİX’de raporlanmıştır. Bağışıklık sistemi baskılanmış fare’de (nude mice) ilk denemelerde MDA-MB-231 insan kanser meme hücreleri ile tümör oluşturulamamıştır. Tümör oluşumu fare meme kanser hücresi olan 4T1 hücreleri ile başarılabilmiştir. Hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin 4T1 fare meme kanser hücreleri üzerine etkisi 2D ve 3D hücre kültüründe *in-vitro* koşullarda araştırılmıştır.

##### **4.2.1. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin antikanser etkilerinin İki boyutlu (2D) hücre kültüründe incelenmesi**

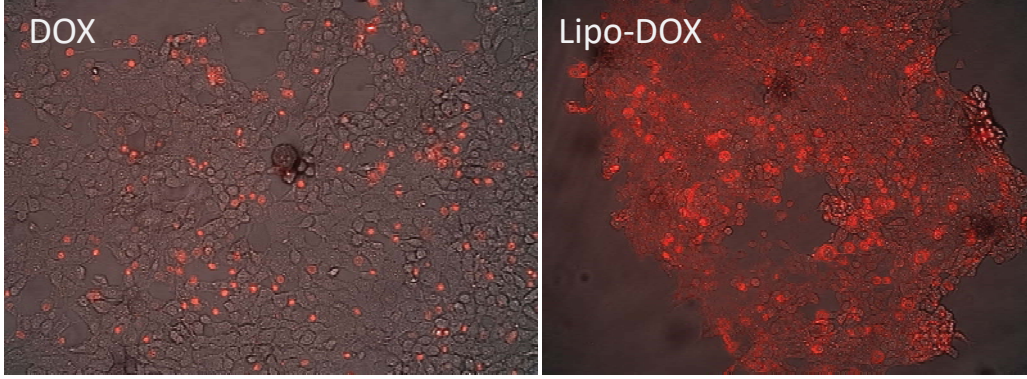
Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Laboratuvarımızda tasarlanan akış düzeneği üzerinde bulunan kartuşa mikroskop lamı üzerinde 2D boyutlarda yetiştirilen hücreler yerleştirilmiş ve akış ortamında mikroköpükçüklerin hücrelerle etkileşimleri incelenmiştir. İlk olarak serbest DOX’un hücre içerisine alım kinetiği incelenmiştir.

##### **İki boyutlu (2D) deney düzeneğinde hücrelere DOX yüklemesi:**

İki boyutlu hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX’ların hücre içerisine alınması floresan mikroskop altında görüntülerin sürekli moda kaydedilmesiyle ölçülmüştür. DOX ve lipo-DOX yükleme işlemi yaklaşık 5 dakika sürmüştür. Ardından, PBS tampon çözelti sistemine beslenmiş ve ortamdaki serbest DOX ve Lipo-DOX’lar yıkanmıştır. İki boyut (2D) hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX’un yıkanmış ortamda hücreler tarafından alınması **Şekil 90**’de gösterilmektedir. Şekilde hücrelerin bir kısmının daha yassı bir kısmının ise daha yuvarlak olduğunu görülmektedir. **Şekil 90**(DOX)’da görüleceği üzere, bazı hücrelere DOX



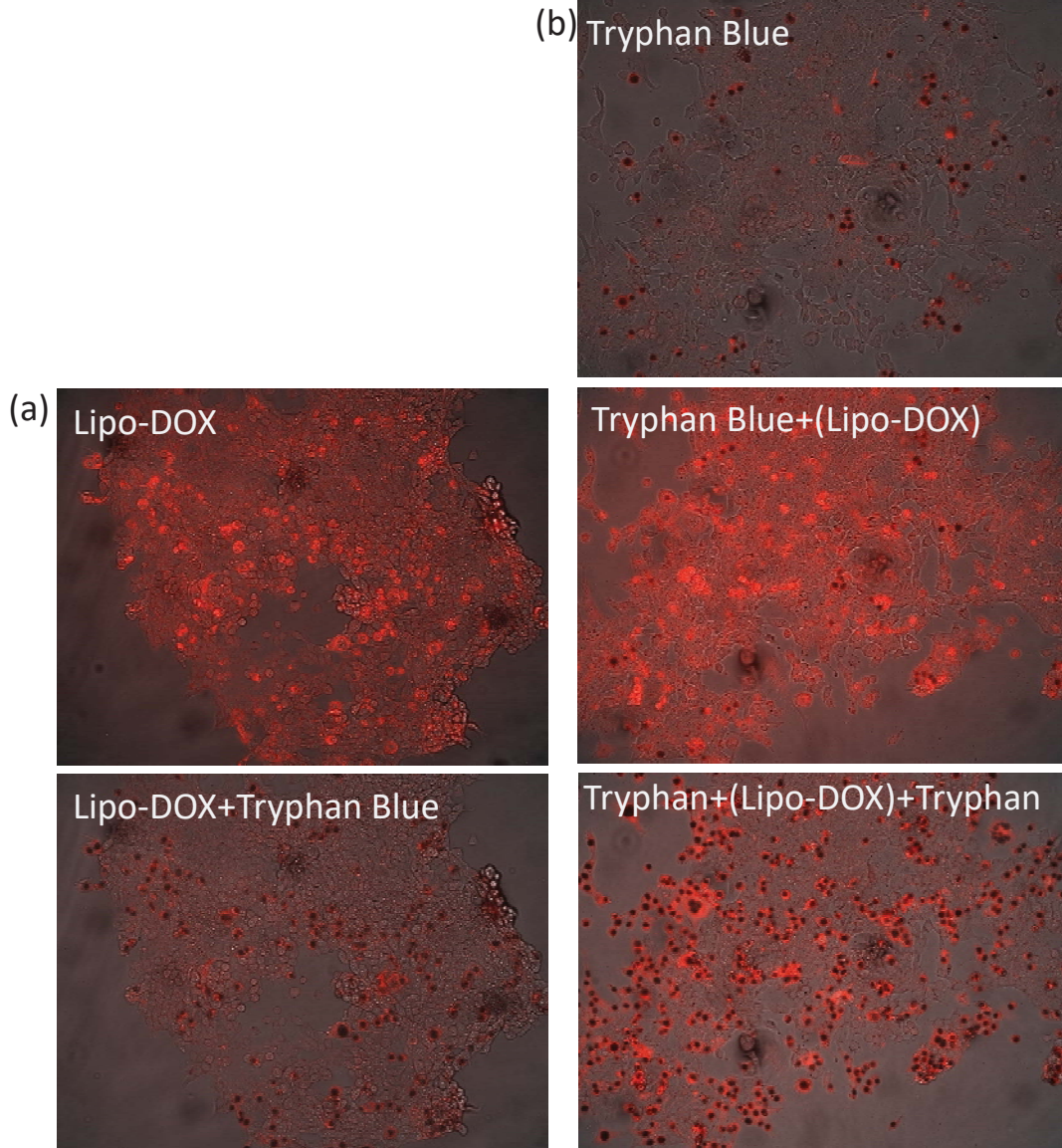
gözle görülür oranda alınırken, bazı hücelere ise sanki hiç alınmamaktadır. Benzer şekilde, **Şekil 90**(Lipo-DOX)'da görüleceği üzere, bazı hücelere lipo-DOX yoğun bir şekilde alınırken, bazı hücelere ise yalnızca hücre duvarına adsorplanmış oldukları görülmektedir. DOX ve lipo-DOX'ların en çok alındığı hücelere genel olarak yuvarlak hücelere olmaktadır. DOX ve Lipo-DOX'un en az girdiği ya da hücre içine alınmadığı hücelere ise daha çok yassı (elongated) hücelere olduğu görülmektedir. Değerlendirmelerimizde, her iki hücre türü göz önüne alınarak yapılmıştır.



**Şekil 90.** İki boyut (2D) hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX'un yıkanmış ortamda yassı ve yuvarlak hücelere tarafından alınması.

İki boyutlu (2D) hücre kültüründe Lipo-DOX'ların 4T1 kanser hücelere alınması sonrasında hücre canlılıklarının trypan blue ile görüntülenmesi, ve Trypan blue boya ile hücelere canlılıklarının görüntülenmesi, ardından lipo-DOX ile inkübasyonu, ve sonrasında tekrar trypan blue ile hücelere canlılıklarının görüntülenmesi **Şekil 91**'daki resimlerde gösterilmektedir. **Şekil 91(a)**'da görüleceği üzere, özellikle yuvarlak hücelere lipo-DOX yüksek oranda alınmaktadır. Hücelere yıkandıktan sonra trypan blue ile boyandığında bu hücelere trypan blue ile işaretlendikleri görülmektedir. Başka bir deneyde, **Şekil 91(b)**'de görüleceği üzere, hücelere canlılıkları önce trypan blue ile işaretlenmiş, ardından hücelere lipo-DOX ile 4 dakika inkübe edilmişlerdir. Yıkama sonrasında hücelere canlılıkları trypan blue ile belirlendiğinde lipo-DOX ile işaretli hücelere tamamının trypan blue tarafından işaretlendikleri görülmektedir. Resimlerden, lipo-DOX'ların hücre membranı yüzeyine adsorplandığı ve hücre membranında hasırlara yol açtığı anlaşılmaktadır. **Şekil 91(a)**'da hücelere büyük bir kısmının lipo-DOX'lardan etkilendiği görülmektedir. Trypan blue ile işaretlenmiş hücelere lipo-DOX ile boyanmış hücelere oranıdır. **Şekil 91(b)**'de ölü hücelere trypan blue ile işaretlenmiştir ve sayıca az oldukları görülmektedir. Hücelere lipo-DOX ile inkübasyonundan, yalnızca trypan blue ile işaretli hücelere değil, aynı zamanda başka diğer hücelere de lipo-DOX tarafından boyandıkları görülmektedir. Hücelere tekrar trypan blue ile boyandıklarında, lipo-DOX etkisinden dolayı başlangıçtan daha fazla hücre ölümleri olduğu resimlerden görülmektedir. Bu deney ile, DOX ve lipo-DOX'ların hücre membranı yüzeyine

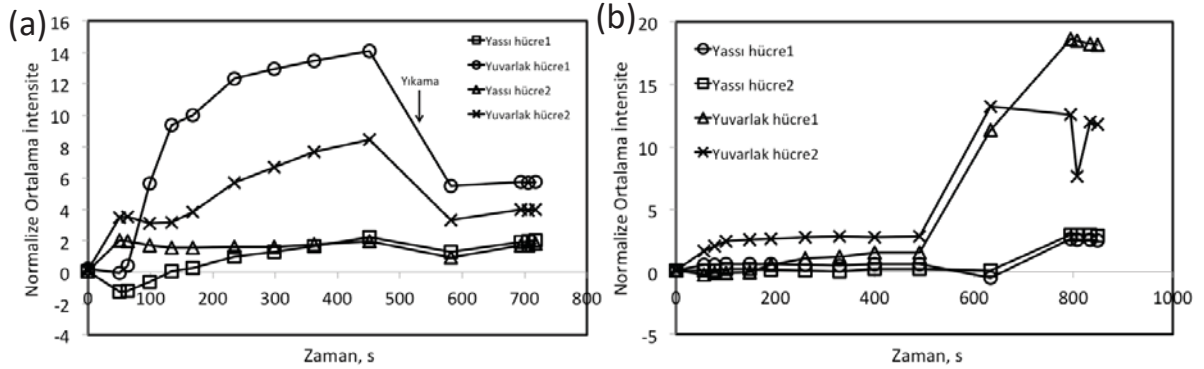
adsorplandığı ve hücre membranında hasarlara yol açtığı anlaşılmaktadır. Başka bir sonuç ise, DOX ve Lipo-DOX ile hücrelerin inkubasyonunda, ortamda bulunan hücre popülasyonunun ancak belli bir kısmı etkilenmektedir. Hücrelerin ortamda bulunan büyük bir kısmı ise DOX ve Lipo-DOX'lardan etkilenmeden yapılarını koruyabilmektedirler. Bunun hücre canlılıklarında önemli olabileceği değerlendirilmektedir.



**Şekil 91.** (a) İki boyutlu (2D) hücre kültüründe Lipo-DOX'ların 4T1 kanser hücrelerine alınması sonrasında hücre canlılıklarının tryphan blue ile görüntülenmesi, (b) Tryphan blue boya ile hücrelerin canlılıklarının görüntülenmesi, ardından lipo-DOX ile inkübasyonu, ve sonrasında tekrar tryphan blue ile hücrelerin canlılıklarının görüntülenmesi.

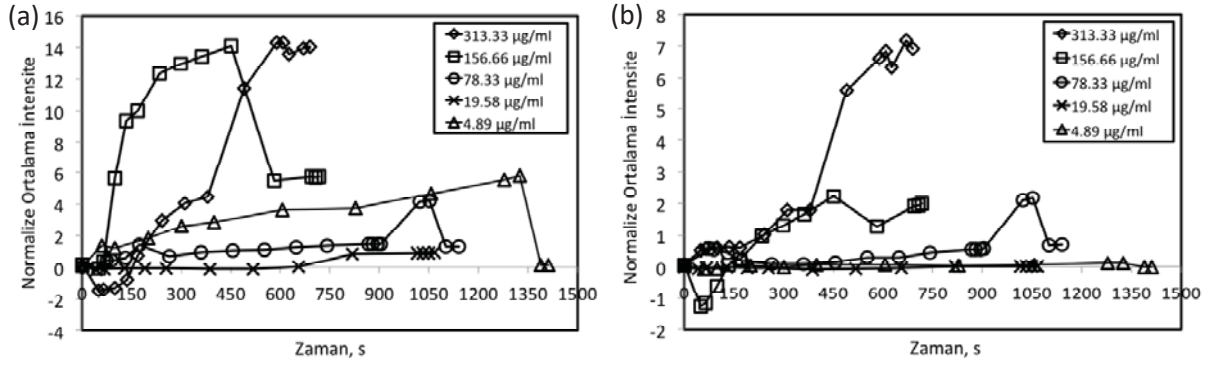
Serbest DOX ve Lipo-DOX'un hücrelere girişini kinetik olarak incelenmek üzere, floresan mikroskobu ile hücreler üzerindeki floresan yoğunluğu ile hücre çevresindeki boşluk için floresan intensiteleri Zeise mikroskop ile verilen zen programı sayesinde resimlerden

belirlenmiştir. Hücre içi ve hücre dışı intensiteler birbirlerinden çıkarılmış ve ışığa maruz kalma sürelerine (exposure time) bölünerek normalize ortalama intensiteler hesaplanmıştır. Normalize floresan intensitesi DOX konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olduğundan, hesaplanan normalize floresan intensitelerinden hücreler tarafından alınan DOX ve lipo-DOX miktarları hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Resimlerde farklı bölgelerde bulunan yassı ve yuvarlak hücreler için ölçülen normalize floresan intensiteleri serbest DOX ve lipo-DOX için **Şekil 92**'da gösterilmektedir. **Şekil 92(a)**'da görüleceği üzere, hücreler DOX ile inkübe edildiklerinde üzerlerindeki normalize intensite zamanla artmaktadır. Lipo-DOX ile hücrelerin birlikte inkübasyonundan doğan normalize intensite değerleri **Şekil 92(b)**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, hücrelere DOX alımı için hesaplanan normalize intensite değerleri lipo-DOX'lar için de benzer olarak hesaplanmaktadır. Hücreler yıkandığında normalize intensite değerleri düşmektedir. Bazen hücre çevresindeki boşlıklardan alınan (background) floresan değerleri gerçek değerlerinden farklı ölçülebildiğinden, normalize intensite değerleri farklı hesaplanabilmektedir. Hesaplama hataları göz önüne alınarak, resimlerden hesaplanan normalize intensite değerlerinden, serbest DOX ve lipo-DOX'un hem hücre duvarına adsorplandığı hem de hücre içerisine alındığı anlaşılmaktadır. Yuvarlak hücrelere alınan DOX ve lipo-DOX miktarı yassı hücreler tarafından alınan DOX ve lipo-DOX miktarından yüksektir. Böylece, yuvarlak hücreler daha çok membranı zayıf ve ölü hücreler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yassı (elongated) hücreler ise ilacın alınmasında daha dirençli, canlı ve sağlıklı hücreler oldukları anlaşılmaktadır.



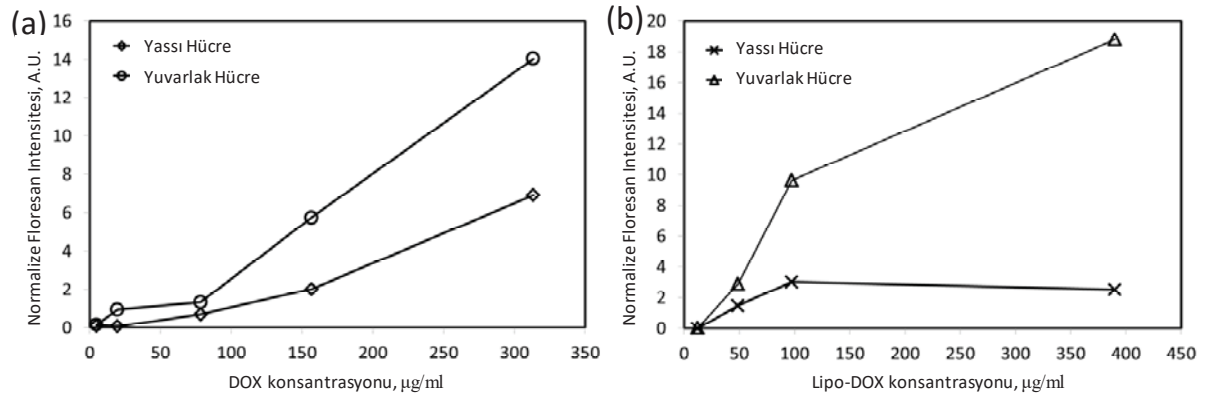
**Şekil 92.** Yassı ve yuvarlak hücrelerde DOX alım kinetiği, (a) serbest DOX, (b) Lipo-DOX.

Farklı konsantrasyonlarda DOX ihtiva eden çözelti ile inkübe edilen 2D hücre kültüründe yuvarlak hücreler ve yassı hücreler üzerinde ölçülen normalize floresan intensite değerleri **Şekil 93**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, hücrelere verilen DOX miktarı arttıkça hücre içinde intensite değerleri zamanla artmaktadır. Hücreler tarafından alınan DOX miktarı ortamda bulunan DOX konsantrasyonu ile orantılı olduğu anlaşılmaktadır. Yuvarlak hücrelerde DOX girişi yassı hücrelere göre daha fazla olduğu görülmektedir.



**Şekil 93.** Farklı DOX konsantrasyonlarında (a) yuvarlak hücre ve (b) yassı hücreler üzerinde ölçülen normalize floresan intensite değerleri.

Farklı konsantrasyonlarda DOX ve lipo-DOX'ların yıkama sonrası yassı ve yuvarlak hücrelere alım miktarları **Şekil 94**'de verilmiştir. Şekilde yassı ve yuvarlak hücrelere ait ortamdaki DOX ve lipo-DOX konsantrasyonuna bağlı olarak hücre üzerinde ölçülen intensite değerleri görülmektedir. DOX ve Lipo-DOX konsantrasyonları arttıkça, intensite değerleri de artmaktadır. Genel olarak, yuvarlak hücrelerde normalize intensite değerleri her iki DOX ve lipo-DOX için yassı hücrelere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Buna karşın, DOX ve Lipo-DOX ile elde edilen normalize intensite değerleri birbirine paralellik göstermektedir. Bunun nedeni, 2D hücre kültüründe DOX ve lipo-DOX'lar ile hücrelerin doğrudan kantakt halde olmaları ve DOX ve lipo-DOX'un doğrudan hücrelerle temas halinde olmasından kaynaklanabilir. Sonuç olarak, serbest DOX ve lipo-DOX'un hücre içine alımları DOX ve lipo-DOX'un ortamda bulunan konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak arttığı anlaşılmıştır.



**Şekil 94.** Farklı konsantrasyonlarda (a) DOX ve (b) lipo-DOX'ların yıkama sonrası yassı ve yuvarlak hücrelere alım miktarları.

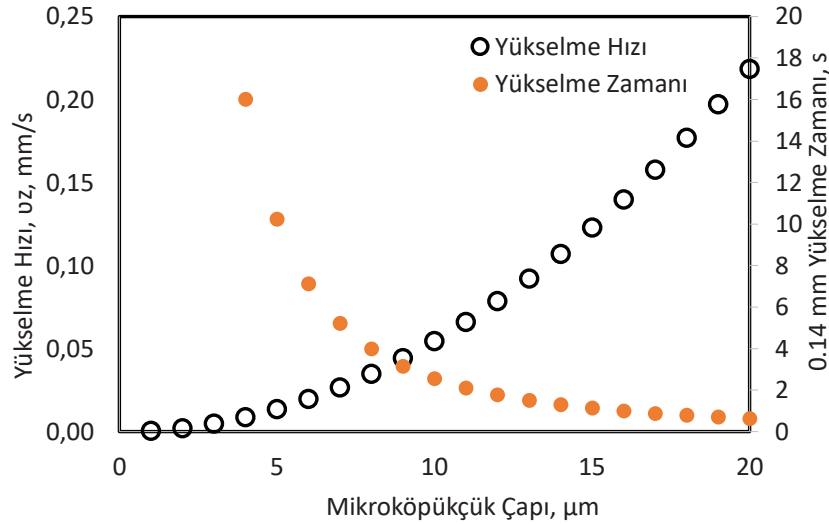


## Mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) deney düzeneğinde hücrelere bağlanması:

Öncelikle, akış ortamında mikroköpükçüklerin yükselmeleri ve akış hızı ile yükselme yüksekliği arasındaki bağıntılar kurulmuş ve hesaplamalar yapılmıştır. Durgun bir ortamda mikroköpükçüklerin sıvı içerisinde yükselme hızı ( $u_z$ ) Denklem (12) ile hesaplanmıştır.

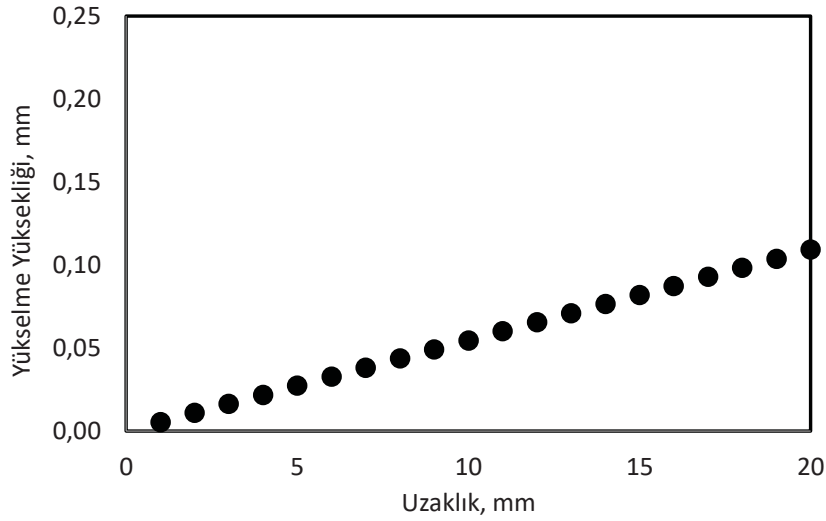
$$u_z = \frac{d^2}{18 \cdot \mu} (\rho_l - \rho_g) \cdot g \quad (12)$$

Burada,  $d$  mikroköpükçük çapı,  $\mu$  sıvı viskozitesi,  $\rho_l$  ve  $\rho_g$  sırayla sıvı ve mikroköpükçük yoğunlukları,  $g$  yer çekimi ivmesidir. **Şekil 95**'de görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin yükselme hızı çap ile orantılıdır ve çap arttıkça yükselme hızı ivmelenecek artmaktadır. Kanal yüksekliğinin 0.28 mm olduğu durumda, merkezden akmakta olan 5  $\mu$ m çapa sahip bir mikroköpükçük, yaklaşık 10 sn'de yükselerek yüzey duvara ulaşabilir. Bu süre mikroköpükçük çapı arttıkça hızlı bir şekilde düşmektedir.



**Şekil 95.** Tasarlanan akış düzeneği için mikroköpükçük çapına göre hesaplanan yükselme hızı ve 0.14 mm yükseklik için yükselme zamanı.

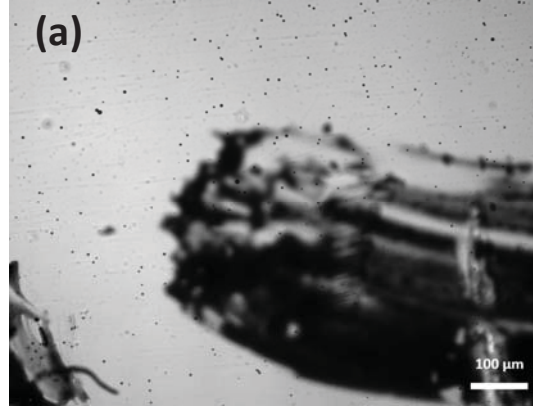
Bu süre zarfında, 5  $\mu$ m çapa sahip bir mikroköpükçük **Şekil 96**'de görüleceği üzere,  $u_x = x/t$  bağıntısı ile verilebilen ifade ile, 26 mm uzunluğunda bir yolu yüzey duvara ulaşmadan tamamlayabilir. Ancak, daha büyük çapa sahip mikroköpükçükler, yüzey duvara ulaşarak yüzeye yapışacaklardır.



**Şekil 96.** Tasarlanan akış düzeneği için 5  $\mu\text{m}$  çapa sahip bir mikroköpükçü'ğün yüzey duvara ulaşmadan ulaşabileceği uzunluk

Model hesaplamaları test etmek için, 5  $\mu\text{m}$  boyutlarda homojen boyut dağılımına sahip mikroköpükçükler ve 5-50  $\mu\text{m}$  boyut dağılımına sahip mikroköpükçükler ile akış deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kanal içerisinde oluşturulan bir arka plan görüntü ile mikroköpükçüklerin ortamdan akışları üç boyutluymuş gibi daha net bir şekilde görüntülenmiştir. **Şekil 97(a)**'de gösterilen resim ve Ek'de verilen "**3 RPM-1.avi**" video ile yaklaşık 5  $\mu\text{m}$  boyutlarda mikroköpükçüklerin tasarlanan kanaldan akışları görülmektedir. **Şekil 97(b)**'de gösterilen resim ve Ek'de verilen "**1 RPM-1.avi**" video ile ise farklı boyut dağılımda mikroköpükçüklerin kanaldan akışları görülmektedir. Videolardan görüleceği üzere, küçük boyutlardaki mikroköpükçükler yüzeye yapışmadan akmalarına devam ederken, büyük mikroköpükçüklerin yüzeye yükseldikleri, yer yer yüzeye tutundukları, ve akış ile tekrar yüzeyden koparak ortamdan uzaklaştıkları görülmektedir.

Mikroköpükçüklerin büyüklüklerine bağlı olarak akış kanalında yüzeyden çok uzak seyretmeleri, yüzeye yapışmış hücreler ile mikroköpükçükler arasında temas sağlanamamasından dolayı sağlıklı bilgi elde edilememektedir. Bu çalışma sonucunda, mikroköpükçüklerin öncelikle yüzeye yükselmeleri, ardından farklı kayma gerilimlerinde akışa maruz bırakılarak hücrelere yapışma davranışlarının araştırılması amaçlanmıştır.



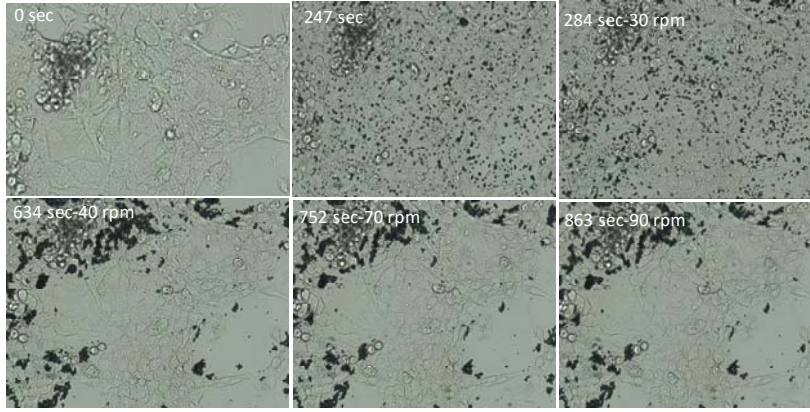
Video: [3 RPM-1.avi](#)



Video: [1 RPM-1.avi](#)

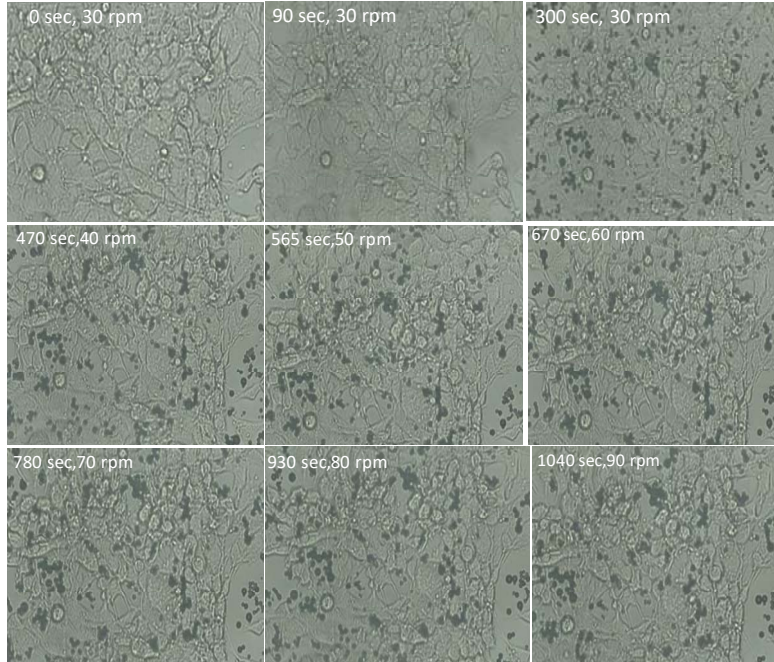
**Şekil 97.** Farklı akış hızlarında ve farklı boyutlarda mikroköpükçüklerin 2D akış düzeneğinde görüntülenmesi (a) 5 µm mikroköpükçüklerin akışı (b) 5-50 µm boyut dağılımında mikroköpükçüklerin akışı. İlgili videolar sisteme yüklenmiştir.

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin hücrelere farklı akış hızlarında ya da farklı kayma gerilimlerinde bağlanmaları 2D deney düzeneği ile araştırılmıştır. Mikroskop lamı üzerine ekilmiş 2D hücrelerin bulunduğu kanala bolus enjeksiyon ile sade ve hedeflendirilmiş mikroköpükçükler gönderilmiştir. Akış kanalında mikroköpükçüklerin mikroskop görüntüleri video olarak kaydedilmiş ve daha sonra görüntü işleme teknikleriyle değerlendirilmiştir. Hücrelere bağlanmayan mikroköpükçükleri ortamdaki uzaklaştırmak için sistem yüksek hızda PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Sade mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 fare meme kanser hücrelerine bağlanma davranışları **Şekil 98**'de farklı zaman aralıklarında alınan video resimlerden gösterilmektedir. Mikroköpükçükler ilk 247 sn içerisinde hücrelerle inkübe edilmiş ve daha sonradan farklı akış hızlarında ve kayma gerilimlerinde yıkanmışlardır. Şekilden görüleceği üzere, sade mikroköpükçükler 4T1 hücrelere bağlanmamaktadırlar. Mikroköpükçükler akış ortamında akış ile birlikte sürüklenmekte ve hücreler arası oluşan boşluklarda meydana gelen durgun bölgelere hapsolmaktadırlar.



**Şekil 98.** Sade mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 fare meme kanser hücrelerine bağlanma davranışları.

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 fare meme kanser hücrelerine bağlanma davranışları **Şekil 99**'de video resimlerinde gösterilmektedir. İlk 300 sn içinde hücrelerle inkübe edilmiş olan hedeflendirilmiş mikroköpükçükler, daha sonradan farklı akış hızlarında ve kayma gerilimlerinde yıkanmışlardır. Şekilden görüleceği üzere, hedeflendirilmiş mikroköpükçükler 4T1 hücrelere ancak az miktarda bağlanmaktadır. Akış ile birlikte sürüklenen mikroköpükçükler hücreler arası oluşan boşluklarda meydana gelen durgun bölgelere hapsolmaktadırlar.



**Şekil 99.** Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 fare meme kanser hücrelerine bağlanma davranışları.



Öte yandan, hedeflendirilmiş mikroköpükçükler yuvarlak hücelere bağlanmaktadır. Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin yuvarlak hücelere bağlanma davranışları **Şekil 100**'deki video resimlerinde gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, hedeflendirilmiş mikroköpükçükler yuvarlak hücelere tersinmez olarak bağlanmışken ve akış ortamında birlikte hareket ederlerken, hedeflenmiş mikroköpükçüklerin diğer hücelere bağlanmadıkları gözlenmiştir. 4T1 fare meme kanser hücresi yüzeyinde yeterince EGFR reseptörü olmadığından şüphelenilmiş ve bu yönde testler yapılmıştır. Yapılan analizlerde, MDA-MB-231 hücrelerinin yüzeyinde %100 EGFR reseptörü tespit edilirken, 4T1 hücrelerde ancak %35 oranında EGFR reseptörü tespit edilmiştir. Hücrelerin yüzeyinde ekspres edilen reseptörün mikroköpükçüklerin bağlanmasında önemli bir rol oynadığı kanaatine varılmıştır.

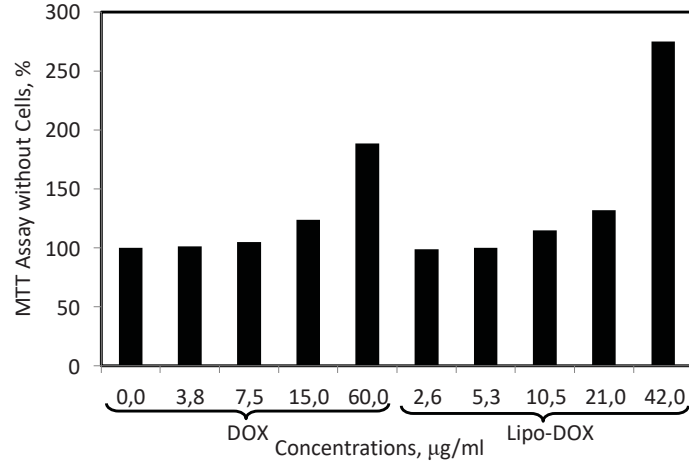


**Şekil 100.** Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin yuvarlak hücelere bağlanma davranışları.

#### **DOX ve lipo-DOX'un hücre proliferasyonu (cell viability %) üzerine etkisi:**

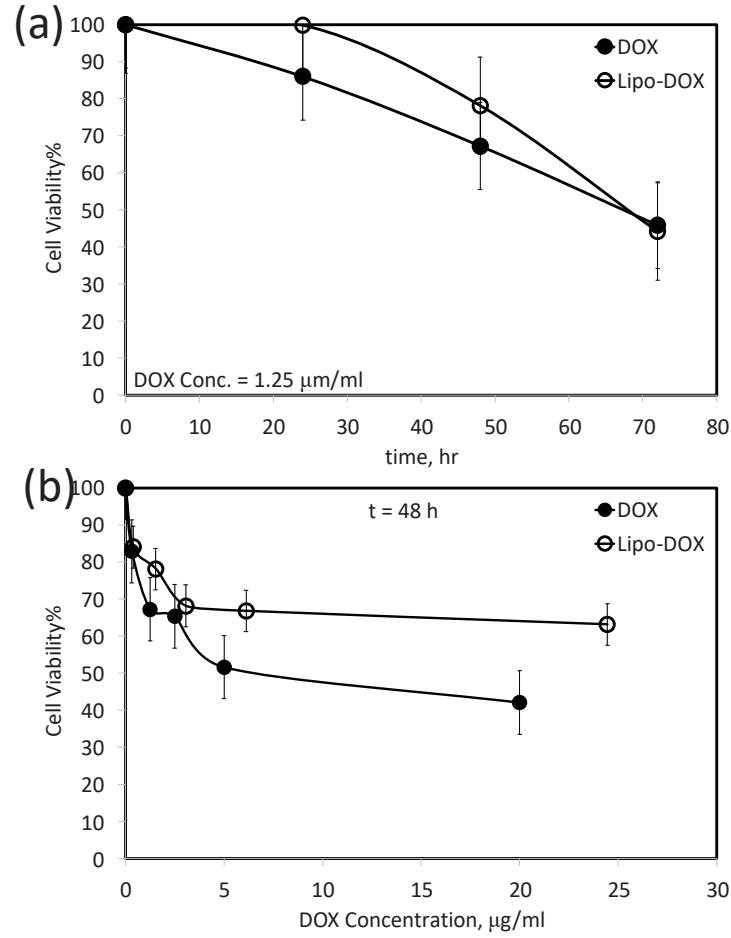
Uygun serbest DOX ve Lipo-DOX dozlarını bulabilmek amacıyla iki boyutlu (2D) hücre kültüründe doz denemeleri yapılmıştır. Bu amaçla 75 cm<sup>2</sup>'lik flastaktaki hücreler 96 kuyucuklu plate'de, kuyucuk başına 10<sup>4</sup> hücre/200 mL olacak şekilde ekilmiştir. 96 kuyucuğa ekilen hücreler 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 1 gün tutulmuş, ertesi gün hücreler tutunduktan sonra ise kuyucuklardan hücre besiyeri çekilip farklı konsantrasyonlarda DOX ve Lipo-DOX'lu hazırlanmış besiyerler eklenmiştir. Hücrelerin canlılıkları 24 saat, 48 saat, ve 72 saat sonunda MTT ve WST-1 hücre canlılık protoköleriyle (cell viability assays) ELISA okuyucuda 450 nm ve 630 nm'de bakılmıştır.

Hücesiz ortamda MTT hücre canlılık protokolü ile hücre canlılığı ölçümü çalışması yapılmış ve sonuçlar **Şekil 101**'de gösterilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, düşük DOX konsantrasyonlarında okunan ışık şiddeti değerleri etkilenmezken, yüksek DOX konsantrasyonlarında ışık şiddeti değerleri olması gerekenin üzerinde okunmaktadır. DOX 480 nm dalga boyunda absorplama özelliği olan ve 590 nm dalga boyunda floresan ışık yayan bir moleküldür. Yüksek konsantrasyonlarda ortamda bulunan DOX'un absorplama özelliğinden dolayı, özellikle yüksek konsantrasyonlarda ölçümlerin dikkatlice okunması gerekmektedir.



**Şekil 101.** Hüresiz ortamda MTT hücre canlılık protokolü ile hücre canlılığı ölçümü çalışması.

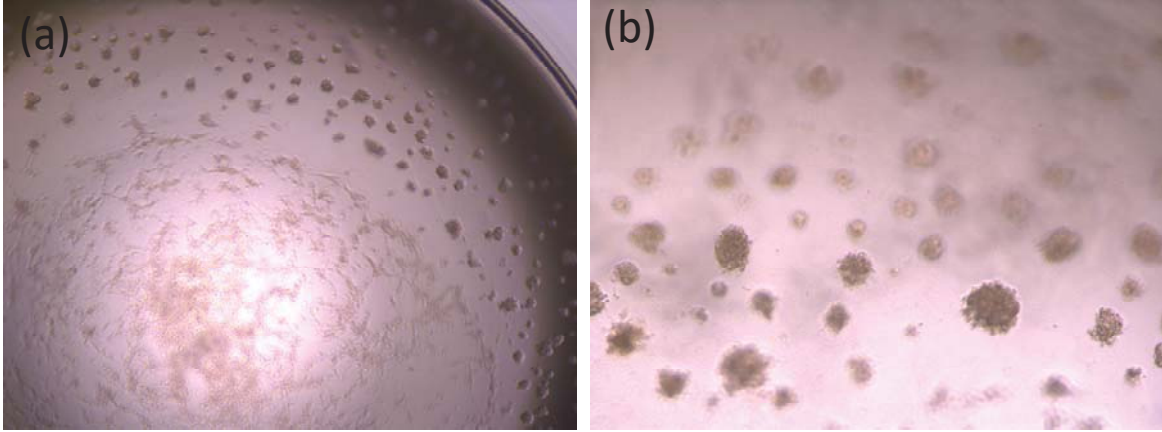
İki boyutlu (2D) hücre kültüründe farklı serbest DOX ve lipo-DOX dozlarında ölçülen 4T1 hücre canlılıkları **Şekil 102**'da verilmektedir. **Şekil 102(a)**'da 1.25  $\mu\text{g/ml}$  DOX ve lipo-DOX konsantrasyonunda 1.gün, 2.gün, ve 3.gün hücre canlılıkları gösterilmektedir. Hücreler ekimlerinden sonra canlılıklarını yitirmektedirler. Üçüncü günün sonunda hücrelerin canlılıkları %45'lere kadar düşmüştür. **Şekil 102(b)**'de farklı DOX ve lipo-DOX konsantrasyonları için elde edilen hücre canlılıkları verilmektedir. Hücre canlılıkları DOX ve lipo-DOX için düşük konsantrasyonlarda hızla düşmüştür. Ancak, DOX'un absorplama özelliğinden dolayı yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının yeterince etkilenmediği gibi bir sonuç elde edilmiştir. Dozları 5  $\mu\text{g/ml}$ 'dan düşük DOX ve lipo-DOX konsantrasyonlarında 4T1 hücre hattının %50'sinden fazlasının etkileneceği değerlendirilmiştir.



**Şekil 102.** Farklı serbest DOX ve lipo-DOX dozlarında iki boyutlu (2D) hücre kültüründe 4T1 hücre canlılıklarının belirlenmesi, (a) 1.25 µg/ml DOX ve lipo-DOX konsantrasyonunda 1.gün, 2.gün, ve 3.gün hücre canlılıkları, (b) Farklı DOX ve lipo-DOX konsantrasyonları için elde edilen hücre canlılıkları.

#### 4.2.2. Üç boyutlu (3D) hücre kültürü çalışmaları

Akış kanalında kullanılmak üzere üç boyutlu hücre kültürü matrijellere hapsedilmiş hücre kültürü yöntemiyle elde edilmiştir. Matrijel yöntemiyle üretilen üç boyutlu (3D) 4T1 kanser hücre yumaklarının mikroskop görüntüleri **Şekil 103**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, hücreler matrijel içerisine ekildiklerinde uygun formda dağılmışlar ve buldukları konumda çoğalarak üremelerini başarmışlardır. Hücrelerin bir birleri ile temas halinde oldukları ve genel olarak, iki boyutlu (2D) deney düzeneğinde yassı (elongated) hücreler yerine, daha çok yuvarlak hücrelerden oluştuğu görülmektedir.

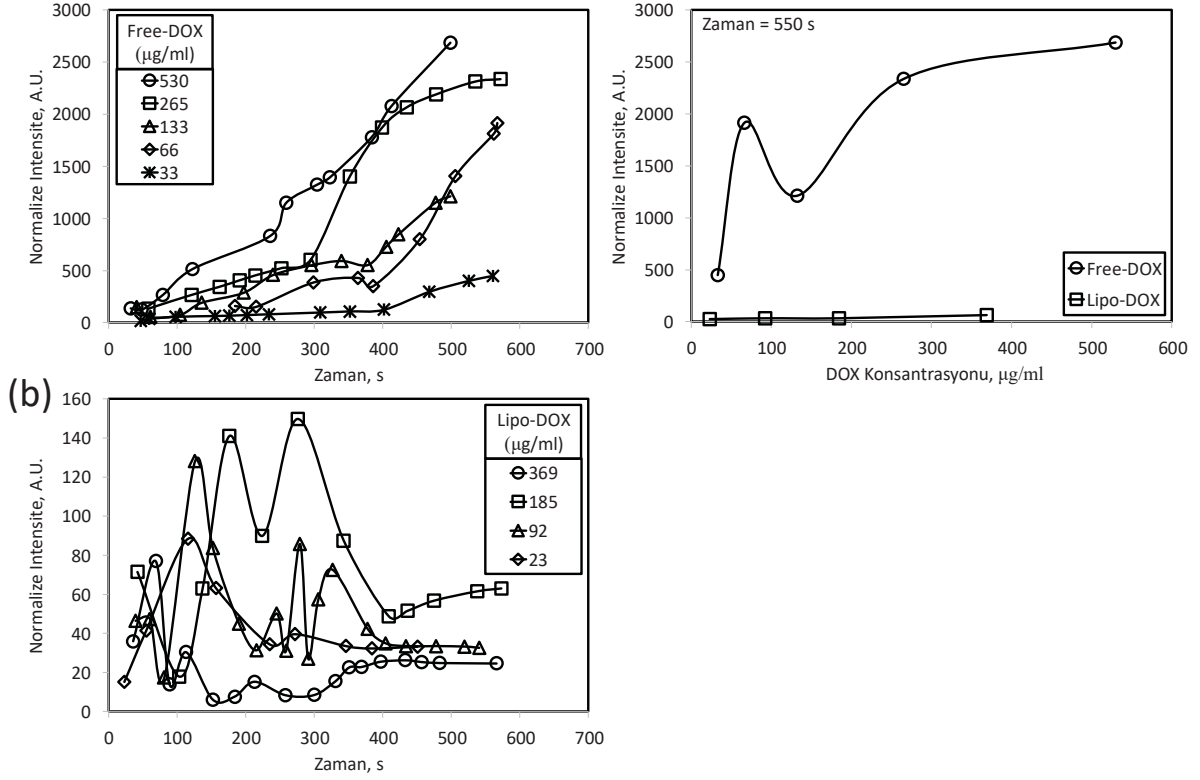


**Şekil 103.** Matrijel yöntemiyle üretilen üç boyutlu (3D) 4T1 kanser hücre yumaklarının mikroskop görüntüleri.

#### **Üç boyutlu (3D) deney düzeneğinde hücrelere DOX yüklemesi:**

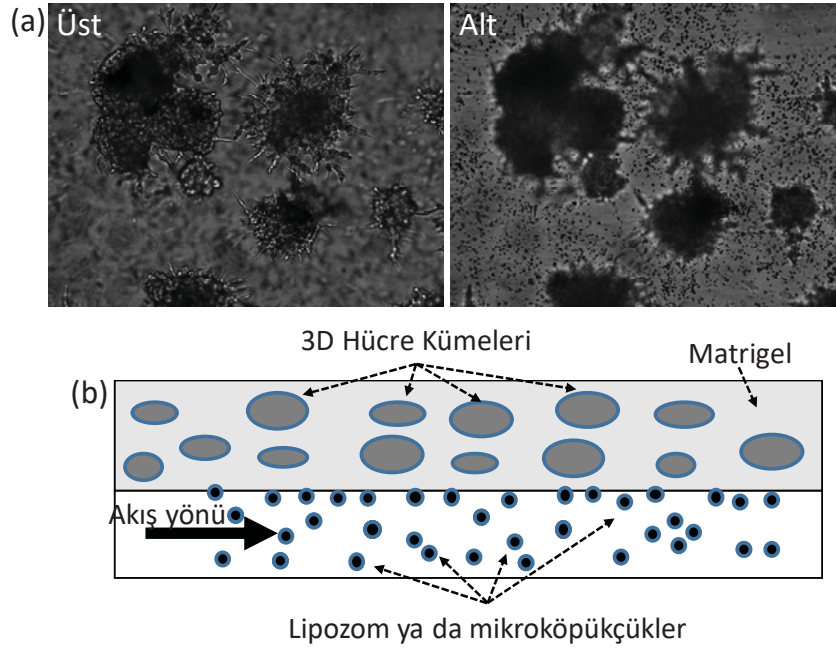
Mikroskop lamı üzerinde hazırlanan 3D hücre kültürü **Şekil 13**'de gösterilen laboratuvarımızda tasarlamış olduğumuz kartuş üzerine yerleştirilerek üç boyutlu hücrelerin serbest DOX ve lipo-DOX alım hızları ve miktarları floresan mikroskop vasıtasıyla ölçülmüştür. Serbest DOX ya da Lipo-DOX'un 3D hücre kültürü tarafından alınmaları yaklaşık 5 dakika kamera ataçmanlı floresan mikroskop ile izlenmiştir. Böylece, serbest DOX ya da Lipo-DOX'un 3D hücre kültüründe hücreler ya da hücre yumakları tarafından alışı kinetik ölçülebilmştir. Ardından PBS tampon çözelti ile ortamdaki serbest DOX ya da Lipo-DOX yıkanmıştır. Yıkama sonrası hücreler tarafından alınan serbest DOX ve Lipo-DOX miktarları tespit edilmiştir. Üç boyutlu 4T1 hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX'ların alım hızları ve miktarları **Şekil 104**'de verilmektedir. **Şekil 104(a)**'da serbest DOX'un 3D hücre yumaklarına (spherule) alış hızı verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, serbest DOX hücreler içerisine zamanla alınmaktadır. Jel'leşmiş matrijel'in yıkama esnasında yüzeyine adsorplanan DOX'lardan kurtulduğu ve arka plan (background) floresan sinyalinin azaldığı ve bu esnada hesaplanan normalize intensite değerlerinde artma olduğu görülmektedir. Yıkama sonunda 3D hücre yumakları tarafından absorplanan DOX miktarları tespit edilebilmiştir. **Şekil 104(b)**'de lipo-DOX'ların 3D hücre kültüründe hücre yumakları tarafından absorplamaları görülmektedir. Ancak, daha sonra bahsedileceği üzere, matrijel'lerin oluşturduğu jel yapısı ne lipozomların ne de mikroköpükçüklerin hücre yumaklarına geçişine izin vermemektedir. Farklı konsantrasyonlarda ortama gönderilen lipozomlar zamanla jel yüzeyine yapışmakta, floresan intensitelerinde bir artış olmakta, ve yıkama ile birlikte yüzeyden ayrılarak uzaklaşmaktadırlar. Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe hücre yumakları tarafından absorplanmış DOX miktarları **Şekil 104(c)**'de gösterilmektedir. Şekilden

görülebileceği üzere, serbest DOX ve lipo-DOX normalize intensite değerleri arasında oldukça büyük bir fark vardır. Serbest DOX matrijel gözenek yapısı içerisinde rahatlıkla geçebilirken, DOX ihtiva eden lipozomlar jel gözeneklerinden geçememekte ve böylelikle hücre yumaklarına ulaşamamaktadırlar.



**Şekil 104.** Üç boyutlu 4T1 hücre kültüründe serbest DOX ve lipo-DOX'ların alım hızları ve miktarları, (a) Serbest DOX'un hücreleri alış hızları, (b) Lipo-DOX'un hücrelere alış hızları, (c) 3D hücre kültüründe hücrelere alınan DOX ve Lipo-DOX miktarları.

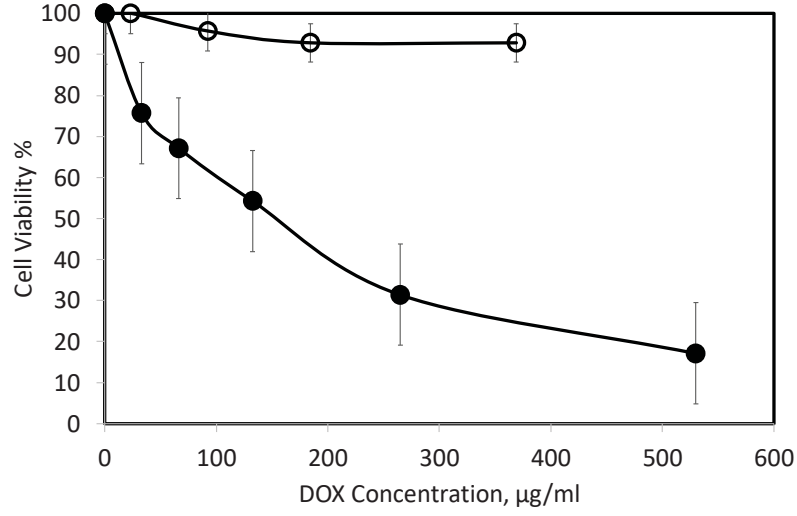
Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe farklı akış hızlarında hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin 4T1 hücre yumaklarına bağlanması matrijel'in jel gözenek yapısının nano boyutlarda olmasından dolayı başarılı olamamıştır. Üç boyutlu (3D) hücre yumaklarının matrijel içerisinde mikroskop görüntüsü ve matrijel içerisine hapsedilmiş hücre yumaklarının ve akış kanalının temsili görüntüsü **Şekil 105'**da gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin 3D hücre kültüründe akış kanalına gönderilmesiyle 3D hücre yumakları floresan mikroskopun üst fokus bölgesinde rahatlıkla görülebilmektedir. Mikroskopun alt fokus bölgesinde geçmekte olan mikroköpükçükler net bir şekilde görülebilmektedir. Bu görüntülerden hareketle, matrijel ortamında 3D hücre yumakları ile akış kanalında ilerleyen mikroköpükçüklerin bir birleri ile temasının bulunmadığı anlaşılmıştır.



**Şekil 105.** Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe farklı akış hızlarında hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin 4T1 hücre yumaklarına bağlanması, (a) 3D hücre yumaklarının matrijel içerisinde mikroskop görüntüsü, (b) matrijel içerisine hapsedilmiş hücre yumaklarının ve akış kanalının temsili görüntüsü.

#### **Hücre proliferasyonu (cell viability %) tayini:**

Üç boyutlu (3D) hücre kültürü ile serbest DOX ve lipo-DOX'un etkileşimlerini incelemek üzere 96'lik kuyucuklarda 3D hücre kültürü hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlarda DOX ve lipo-DOX kullanılarak hücre canlılıklarına bakılmıştır. Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe farklı konsantrasyonlarda DOX ve lipo-DOX ile hücre yumaklarında hücrelerin canlılıkları (cell viability %) **Şekil 106'**de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, artan serbest DOX miktarları ile hücre canlılıklarında bir azalma olmaktadır. Hücre canlılığının %50 seviyesine düşmesi için nano gözenekli matrijel yapısında DOX'un konsantrasyonunun yaklaşık 100 µg/ml civarında olması gerektiği anlaşılmaktadır. Lipo-DOX için hücre canlılık deerlerine bakıldığında, lipozomların matrijelin nano gözenekli yapısından hücrelere ulaşmamasından dolayı hücre canlılıkları %90'ın üzerinde ölçülmüştür ve 3D çalışmalarında anlamlı bulunmamıştır. Mevcut sonuçlar değerlendirildiğinde, hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin in-vivo tümör mikroçevresinde hücrelere yapışma davranışının düşük olacağı ve tümör tedavisinin daha çok mikroköpükçüklerin pompolama ve mikrojet gibi diğer özellikleri dolayısı ile hücrelere ilaç taşınımını kolaylaştıracağı değerlendirilmektedir.



**Şekil 106.** Üç boyutlu (3D) hücre kültüründe farklı konsantrasyonlarda DOX ve lipo-DOX ile hücre yumaklarında hücrelerin canlılıkları (cell viability %).

#### 4.3. Hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin biyoyumluluk testlerinin yapılması, ilaç taşıyıcı system olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde kanser teşhis ve tedavisinde kullanılması

##### 4.3.1. İki farklı türde (rodent ve tavşan) hayvan modelinde biyoyumluluk çalışmalarının yapılması

### 1. Nekropsi Sonuçları

Hedeflendirilmiş mikroköpükçük (D-MK) verilmesinden 24 saat sonra 5 sıçan ve 14.ncü günde çalışmaya alınan diğer hayvanlar 35 mg/kg Ketamin HCl + 5 mg/kg ksilazin kombinasyonu intraperitoneal verilerek genel anesteziye alınmıştır. Daha sonra nekropsi amacı ile hayvanın dış bakısı ve vücut kompartmanları (cavum thoracis, cavum abdominus ve cavum cranii) iç bakı yapılarak nekropsi bulguları değerlendirilmiştir. Değerlendirilen parametreler toplu olarak **Tablo 3**'de verilmiştir. Hayvanların dış bakısında, hayvanların tüyleri, deri, ağız, genital boşlukları ve gözleri incelenmiş ve **Şekil 107(a)**'da görüldüğü üzere herhangi bir patolojik durum gözlenmemiştir.

İç bakı için hayvan supin pozisyonda tespit edildikten sonra, genital çıkıntının hemen önünden başlayarak ağız boşluğuna kadar deri ensizyonu yapılarak deri, deri altı insize



edilerek, deri derialtı ve kaslarda bir patolojik oluşum olup olmadığı incelenmiştir. Daha sonra linea alba çizgisi üstünde karın kasları kesilerek önce cavum abdominus, sternotomi yapılarak cavum thoracis içi organlar daha sonrada craniotomi yapılarak beyin ve beyincik nekropsisi yapılmıştır.

Cavum abdominus açıldıktan sonra hemotolojik ve serum biyokimyası incelemek amacı ile vena cava caudalis'ten 8 ml kan toplanmıştır. Daha sonra cavum abdominus içinde önce periton olmak üzere, karın içi sıvı toplanması (ascites), karaciğer-hepar, mide-gaster, barsaklar-intestin, böbrekler - ren durumu makroskobik olarak incelenmiş ve **Tablo 3**'deki parametreler açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra cavum thoracis içi organlar, pleura başta olmak üzere akciğerler, timus ve kalp değerlendirilmiştir. Cranitomi için kafa derisi üstten açılarak oksipital, parietal ve frontal kemikler kostatom yardımı ile üstten kaldırılarak cavum cranii açılarak beyin zarları (pia mater, arachnoid ve dura mater), beyin ve beyincik değerlendirilmiştir.

Histopatolojik değerlendirme için nekropsi sırasında böbrekler, karaciğerin lobus hepatis sinister, sağ akciğerin lobları, kalp, beyin ve beyincik organları alınarak histopatoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

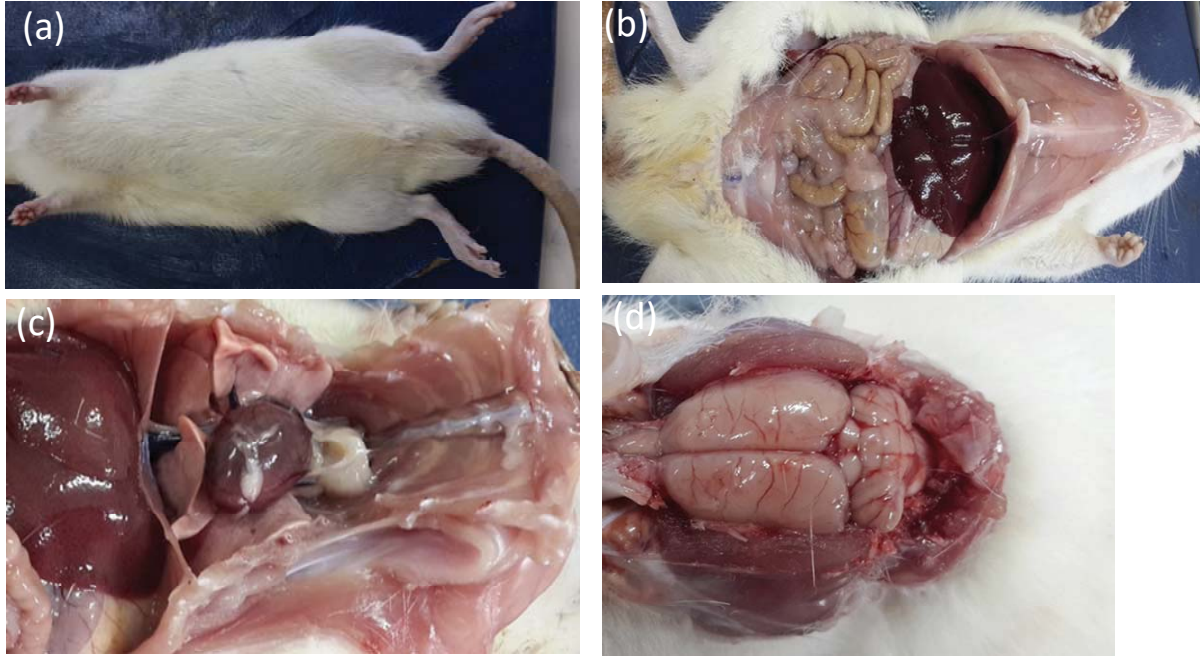
Hayvanların iç organlarının incelenmesinde batın açılarak organların rengi, hemoraji, yapışıklık, organ büyüklüğü ve organ yerleşimleri kontrol edilmiş ve herhangi bir patolojik bir durum görülmemiştir (**Şekil 107(b)**).

Cavum abdominus içinde assite rastlanmamış ve organlar periton, karaciğer, kalın ve ince barsaklar, mezenter, gaster, pankreas ve böbreklerde patolojik bir durum gözlenmemiştir.

Cavum thoracic içi pleura, akciğerler, kalp ve timüs üzerinde yapılan incelemede patolojik bir duruma rastlanmamıştır (**Şekil 107(c)**).

Cavum cranii içinde beyin zarları, beyin ve beyincik incelenmiş olup herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır (**Şekil 107(d)**).





**Şekil 107.** (a) Sıçan makroskopik dış görünümü, (b) Sakrifiye edilen hayvanda cavum abdominus organların görünümü, (c) Cavum thoracis organlarının görünümü, (d) Cavum cranii içi beyin ve beyincik görünümü

## 2. Sıçanlarda Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) biokimyasal parametreler üzerine etkisi:

D-MK grubunda 24.saatte serum glukoz ve kreatinin düzeylerinde, kontrol grubunun başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artma bulundu ( $p<0.01$  ve  $p<0.01$ , sırasıyla). D-MK grubunda 24.saatte AST, LDH ve CK düzeylerinde, kontrol grubunun başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ve  $p<0.01$ , sırasıyla) (Tablo 3.1.3). D-MK grubunda 24. saat ve 14.gün serum glukoz ve kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

Kontrol grubu ve D-MK grubunun 14. gün biyokimyasal parametreleri karşılaştırıldığında; D-MK grubunda CK-MB düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ( $p<0.05$ ). (Tablo 5).

**Tablo 5.** Deney grubu sıçanlarının biyokimyasal parametreleri

| Parametre | Kontrol grubu<br>(Başlangıç) (n=5) | Kontrol grubu<br>(14.gün) (n=5) | D-MK grubu<br>(24.saat) (n=5) | D-MK grubu<br>(14.gün) (n=5) |
|-----------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Glukoz    | 139.00±3.14                        | 222.60± 3.46                    | 455.20±68.93**                | 346.8 ± 31.85                |
| Kreatinin | 0.32±0.02                          | 0.41±0.04                       | 0.59±0.05**                   | 0.5660± 0.03                 |
| AST       | 155.60±8.06                        | 110.40± 4.47                    | 107.60± 3.43**                | 117.2± 2.33                  |
| ALT       | 56.00±4.28                         | 52.20±3.53                      | 54.80±1.36                    | 55.40±3.31                   |
| LDH       | 1910.00±125.40                     | 1049.00±121.60                  | 626.00±154.00**               | 750.0±124.2                  |
| CK        | 1141.00±41.14                      | 596.40±83.43                    | 416.20±92.26**                | 443.6±78.00                  |
| CK-MB     | 529.60±102.20                      | 796.40±103.20                   | 703.20±129.10                 | 362.4±63.00*                 |

\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

### 3. Sıçanlarda Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) hematolojik parametreler üzerine etkisi:

D-MK grubunda 24.saatte PCT ( platelet - trombosit ) düzeylerinde, kontrol grubunun başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artma bulundu ( $p<0.05$ ) (**Tablo 6**).

Kontrol grubu ve D-MK grubunun 14. gün hematolojik parametreleri karşılaştırıldığında; D-MK grubunda MPV (Mean Platelet Volume, ortalama trombosit hacmi), PCT ( (platelet - trombosit ) ve PDW (Platelet Distribution Width, trombosit dağılım genişliği) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ve  $p<0.01$ , sırasıyla) (**Tablo 6**).

**Tablo 6.** Deney grubu sıçanlarının hematolojik parametreleri.

| Parametre   | Kontrol grubu<br>(başlangıç) (n=5) | Kontrol grubu<br>(14.gün) (n=5) | D-MK grubu<br>(24.saat) (n=5) | D-MK grubu<br>(14.gün) (n=5) |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Lökosit     | 13.18±1.36                         |                                 | 9.10±0.97                     | 11.56±0.97                   |
| Eritrosit   | 7.64±0.20                          |                                 | 7.96±0.37                     | 7.64±0.20                    |
| Hemoglobin  | 13.90±0.34                         |                                 | 14.00±0.47                    | 13.90±0.34                   |
| Hematokrit  | 46.52±1.65                         |                                 | 48.96±2.13                    | 49.18±0.46                   |
| MVC         | 60.70±1.23                         |                                 | 61.64±1.81                    | 62.06±0.86                   |
| MCH         | 18.20±0.39                         |                                 | 17.66±0.53                    | 17.94±0.29                   |
| MHCH        | 29.94±0.36                         |                                 | 28.66±0.39                    | 28.96±0.17                   |
| RDW         | 16.08±1.33                         |                                 | 18.58±2.16                    | 15.14±0.55                   |
| Trombosit   | 882.00±47.54                       |                                 | 1021.00±20.52                 | 998.00±34.11                 |
| MPV         | 6.72±0.09                          |                                 | 7.84±0.73                     | 8.82±0.28*                   |
| PCT         | 0.60±0.03                          |                                 | 0.81±0.09*                    | 0.88±0.06*                   |
| PDW         | 14.76±0.09                         |                                 | 14.88±0.16                    | 15.26±0.06*                  |
| Nötrofil %  | 16.38±1.10                         |                                 | 18.40±1.08                    | 21.80±2.08                   |
| Lenfosit %  | 77.30±1.13                         |                                 | 76.50±0.96                    | 71.90±2.21                   |
| Monosit %   | 5.50±0.55                          |                                 | 4.08±0.77                     | 5.30±0.49                    |
| Eosinofil % | 0.70±0.16                          |                                 | 0.90±0.06                     | 0.90±0.21                    |
| Bazofil %   | 0.12±0.02                          |                                 | 0.12±0.02                     | 0.10±0.00                    |

\* $p < 0.01$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

#### 4. Sıçanlarda Dokсорubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) idrar parametreleri üzerine etkisi:

D-MK grubunda 24.saatte ve 14.günde idrar kreatinin düzeylerinde, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artma bulundu ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.05$ , sırasıyla) (Tablo 7).

**Tablo 7.** Deney grubu sıçanlarının idrar parametreleri.

| Parametre    | Kontrol grubu<br>(başlangıç)<br>(n=5) | Kontrol grubu<br>(14.gün)<br>(n=5) | D-MK grubu<br>(24.saat)<br>(n=5) | D-MK grubu<br>(14.gün)<br>(n=5) |
|--------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Protein      | 12.63±1.18                            |                                    | 13.40±1.10                       | 14.47±1.95                      |
| Mikroalbumin | 0.25± 0.06                            |                                    | 0.18±0.04                        | 0.19±0.03                       |
| Kreatinin    | 5.96±0.24                             |                                    | 7.51±0.19**                      | 8.45±0.71*                      |

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

### 5. Sıçanlarda Dokсорubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) su-yem tüketimi, idrar volümü ve dışkı miktarına etkisi:

D-MK grubunda su ve yem tüketimi, idrar volümü ve dışkı miktarında, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 8).

**Tablo 8.** Deney grubu sıçanlarının su-yem tüketimi, idrar volümü ve dışkı miktarı

| Parametre          | Kontrol grubu (başlangıç)<br>(n=5) | D-MK grubu<br>(başlangıç)<br>(n=10) | D-MK grubu<br>(14.gün)<br>(n=5) |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Su tüketimi (mL)   | 38,60±2,60                         | 38,60±1,82                          | 44,40±4,12                      |
| Yem tüketimi (gr)  | 21,80±0,88                         | 22,95±1,74                          | 27,00±1,74                      |
| İdrar miktarı (mL) | 14,00±0,89                         | 12,40±0,72                          | 18,80±2,01                      |
| Dışkı miktarı (gr) | 11,20±0,52                         | 8,50±0,83                           | 13,00±0,99                      |

Deney boyunca gruplar arası ve grup içi sıçan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı ( $p>0.05$ ).

### 6. Sıçanlarda Dokсорubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) vücut sıcaklığına etkisi:

D-MK grubunda 30.dk, 1.saat ve 4.saat vücut sıcaklıklarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$  ve  $p<0.05$ , sırasıyla) (Tablo 9).

**Tablo 9.** Deney grubu sıçanlarının vücut sıcaklığı

| Deney grupları | Vücut sıcaklığı            |                        |                       |                      |                     |                     |
|----------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                | 30.dk                      | 1.saat                 | 4.saat                | 24.saat              | 7.gün               | 14.gün              |
| Kontrol grubu  | 36.36±0.28<br>(n=5)        | 36.70±0.20<br>(n=5)    | 36.10±0.43<br>(n=5)   | 35.56±0.39<br>(n=5)  | 35.54±0.44<br>(n=5) | 34.58±0.62<br>(n=5) |
| D-MK grubu     | 34.26±0.35*<br>*<br>(n=10) | 34.80±0.17**<br>(n=10) | 34.56±0.29*<br>(n=10) | 35.27±0.37<br>(n=10) | 34.28±0.43<br>(n=5) | 34.82±0.26<br>(n=5) |

\* $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

## 7. Tavşanlarda Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) biyokimyasal parametreler üzerine etkisi:

D-MK grubunda 14.günde serum glukoz düzeylerinde, kontrol grubunun başlangıç değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artma bulundu ( $p<0.019$ ) (**Tablo 10**)

**Tablo 10.** Deney grubu tavşanlarının biyokimyasal parametreleri.

| Parametre | Kontrol grubu (başlangıç) | D-MK grubu      |        |
|-----------|---------------------------|-----------------|--------|
|           | (n=5)                     | (14.gün)        | (n=10) |
| Glukoz    | 122.20±4.53               | 657.60±124.80 * |        |
| Kreatinin | 0.79±0.06                 | 1.018±0.05877   |        |
| AST       | 23.80±2.04                | 30.60±5.627     |        |
| ALT       | 44.20±5.66                | 48.40±4.781     |        |
| LDH       | 258.80±45.28              | 144.00±40.24    |        |
| CK        | 1210.00±148.70            | 903.40±186.70   |        |
| CK-MB     | 626.00±26.53              | 409.60±74.24    |        |

\* $p<0.01$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

## 8. Tavşanlarda Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) hematolojik parametreler üzerine etkisi:

D-MK grubunda 14.günde MHCH (Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu ) ve lenfosit (%) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ( $p<0.05$  ve  $p<0.05$ , sırasıyla) (**Tablo 11**).

**Tablo 11.** Deney grubu tavşanlarının hematolojik parametreleri.

| Parametre   | Kontrol grubu<br>(başlangıç)<br>(n=5) | D-MK grubu<br>(14.gün)<br>(n=10) |
|-------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Lökosit     | 9.98±0.59                             | 8.94±0.68                        |
| Eritrosit   | 6.72±0.16                             | 4.42±0.16                        |
| Hemoglobin  | 14.04±0.12                            | 9.00±2.70                        |
| Hematokrit  | 44.30±0.49                            | 32.34±0.49                       |
| MVC         | 66.16±1.98                            | 73.30±2.43                       |
| MCH         | 20.92±0.56                            | 19.26±2.04                       |
| MHCH        | 31.68±0.26                            | 26.10±2.38 *                     |
| RDW         | 14.78±0.45                            | 14.34±0.32                       |
| Trombosit   | 348.80±18.11                          | 294.80±118.30                    |
| MPV         | 7.34±0.42                             | 9.06±0.42                        |
| PCT         | 0.28±0.02                             | 0.26±0.09                        |
| PDW         | 15.04±0.17                            | 15.28±0.15                       |
| Nötrofil %  | 25.38±3.16                            | 32.16±0.95                       |
| Lenfosit %  | 69.46±2.89                            | 59.14±2.01*                      |
| Monosit %   | 3.00±0.49                             | 6.50±1.54                        |
| Eosinofil % | 0.02±0.02                             | 0.14±0.09                        |
| Bazofil %   | 2.14± 0.39                            | 2.260±0.22                       |

\* $p<0.05$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

### 9. Tavşanlarda Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) vücut sıcaklığına etkisi:

D-MK grubunda 1. saat, 4. saat, 24.saat ve 7.gün tavşan vücut sıcaklığının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artma bulundu ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.05$  ve  $p<0.05$ , sırasıyla) (**Tablo 12**).

**Tablo 12.** Deney grubu tavşanlarının vücut sıcaklığı

| Deney grupları      | Vücut sıcaklığı |              |             |             |             |            |
|---------------------|-----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                     | 30.dk           | 1.saat       | 4.saat      | 24.saat     | 7.gün       | 14.gün     |
| Kontrol grubu (n=5) | 38.02±0.09      | 36.52±0.24   | 36.54±0.46  | 37.32±0.32  | 36.98±0.41  | 37.66±0.56 |
| D-MK grubu (n=5)    | 37.7±0.10       | 38.22±0.29** | 38.44±0.45* | 38.24±0.22* | 38.44±0.29* | 37.94±0.14 |

\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$  kontrol grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

Deney boyunca gruplar arası ve grup içi tavşan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı.

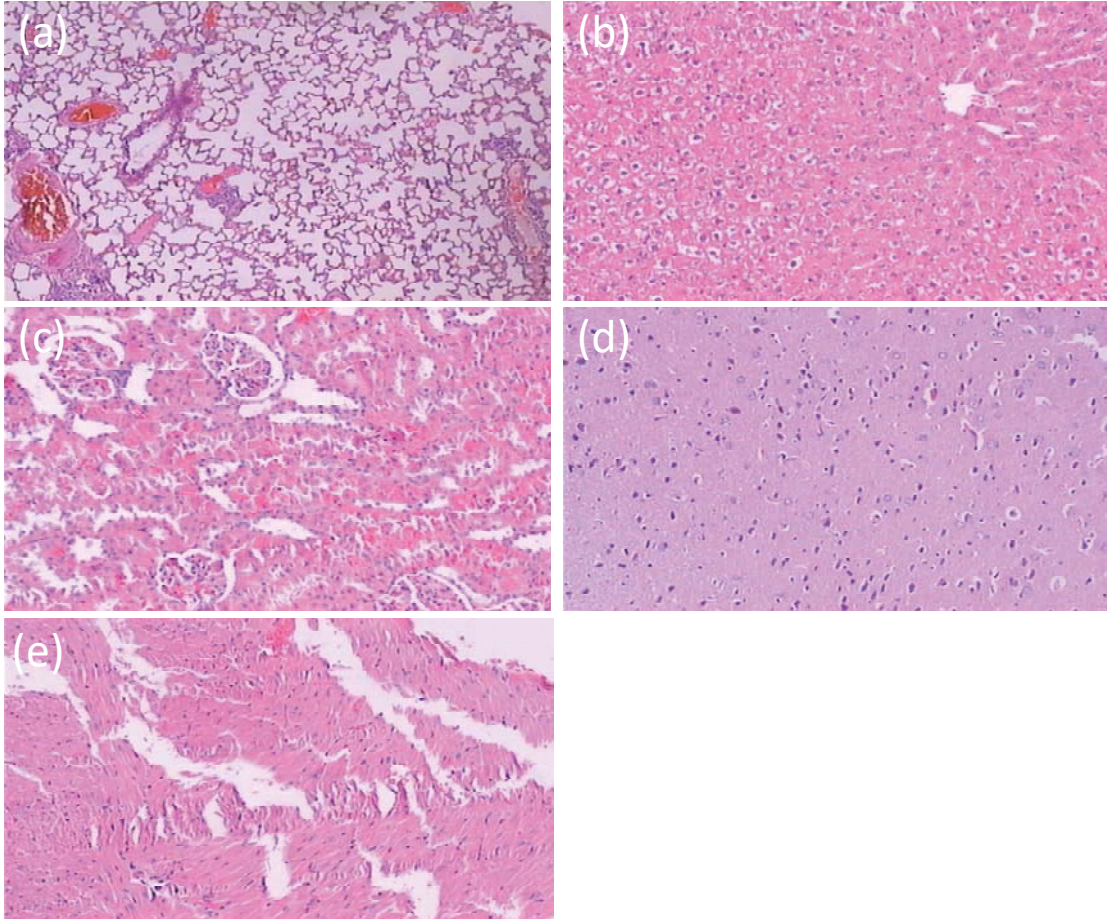
### **Sıçan ve Tavşanlarda Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK) histopatolojik etkisi:**

Sakrifikasyon sonrası organlar çıkarıldıktan sonra 2 gün süre ile tamponlu %10 formaldehit solüsyonu içinde oda sıcaklığında bekleyen dokular fikse olmuştur. Fiksasyon sonrası dokulardan en geniş yüzüne 3mm kalınlıkta seri kesitler atılarak organların kesit yüzleri makroskopik olarak incelenmiştir. İncelenen organlar kalp, akciğer, böbrek, beyin ve karaciğerdir. En demonstratif alanlardan kesitler alınarak kasetlenmiş %10 formaldehit içinde hizmet alımı yapılan laboratuvara ulaştırılmıştır. Bu laboratuvarında uzun doku takip işlemi uygulanmıştır. Dehidrate edilip kurutulup parafin emdirilmiş olan dokular, parafin bloklara gömülmüştür. 5 mikrometrelilik mikrotom ile kesitler alınıp 60 derece su havuzunda kırışıklıkları açılan kesitler lamlar üzerine alınmıştır. Bu lamlar ksilol içinde deparafinize edilip azalan alkol serilerinden geçirilerek, suya getirilip, hematoksilin yıkama eosin yıkama ile boyama yapıp tekrar artan alkol serilerinde dehidrate edilmiştir. Ksilol ile şeffaflandırılıp entelan ve lamelle kapatılmıştır. Olympus eğitim mikroskobunda incelenmiş ve dijital fotoğraflanmıştır. Tüm olgulara ait mikrofotoğraflar ek pdf dosyadadır.

#### **1.Grup: Sıçan kontrol n=5 hayvan (SF) 14 gün sonlandırma**

Temel Onkoloji laboratuvarı patolojik inceleme kayıt numarası 36-40/2017 protokol numara ile incelenmiştir. **Şekil 108**'da görüldüğü üzere, her 5 sıçanın kesitlerinde incelenen tüm organların kesitleri olağan morfolojidedir.





**Şekil 108.** Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte akciğer parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (b) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte karaciğer parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (c) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte böbrek parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (d) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte beyin parankiminin olağan mikroskopik görünümü, (e) Toksikite grubu sıçan AF grubunda 36/17 nolu kesitte kalp kası parankiminin olağan mikroskopik görünümü

## **2.Grup: Tavşan kontrol n=5 hayvan (SF)**

Biyokimyasal analiz vardır. Patoloji yoktur. İlk gün kan alınan tavşanlar grup 4 olarak kullanılmıştır.

## **3.Grup: Sıçan toksisite n=10 hayvan (22,6 µg/ml-1 ml)**

Patoloji no 42-51/2017 kodludur. 42-46/2017 doksorubisin yüklü mikroköpükçük verildikten sonra 14. gün sonlandırılmıştır. 47-51/2017 doksorubisin yüklü mikroköpükçük verildikten sonra 24 saat sonra sonlandırılmıştır.

İncelen dokularda mikroskopik düzeyde patoloji saptanmamıştır. Tüm grupların mikroskopik fotoğrafları ek dosyadadır.

#### 4.Grup: Tavşan toksisite n=5 hayvan (22,6 µg/ml-5 ml)

Patoloji 52-56/2017 kodlu 5 tavşana ait organ kesitleri yer almaktadır. Doksorubisin yüklü mikroköpükçük verildikten 14 gün sonra sonlandırılmıştır. Akciğer ve böbrekte yer yer konjesyon bulgusu dışında patoloji izlenmemiştir. Bu konjesyon ölüm anı dolaşım stazı sonucu olduğu yorumuna varılmıştır.

**PATOLOJİK TANI ve YORUM:** Tek doz doksorubisin yüklü mikroköpükçük uygulanan sıçan ve tavşanlarda 24 saat ve 14. gün sakrifikasyon sonrası kayda değer histopatolojik bulgu izlenmemiştir. İncelenen organlar kalp, beyin, karaciğer, böbrekler ve akciğerlerdir.

#### TARTIŞMA:

Akut tek doz (uzatılmış) toksisite çalışmalarında doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin (D-MK), sıçanlarda 24. saatte serum glukoz ve kreatinin düzeylerini artırdığı ve bu artışın 14. günde de devam ettiği, tavşanlarda da benzer bir şekilde 14.gün serum glukoz düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Sıçanlarda doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin 24. saat ve 14.günde idrar kreatinin düzeylerini artırdığı görüldü. Liposomal doksorubisin formülasyonuna ait prelinik güvenlilik verilerinde farelerde, tavşanlarda ve maymunlarda intravenöz tek doz uygulamanın nefrotoksisite yol açtığı rapor edilmekle birlikte pazarlama sonrası güvenlik çalışmalarında hastalarda önemli bir nefrotoksisite gözlenmediği bildirilmektedir (2). Bu bulgular sonuçlarımız ile uyumlu olup D-MK'nın, sıçan ve tavşanlarda yapılan tek doz (uzatılmış) toksisite çalışmalarında gözlenen serum ve idrar kreatinin düzeylerindeki artma nedeni ile olası nefrotoksisitelerin ve kan glukoz seviyelerindeki değişimin göz ardı edilmemesi gereklidir.

Akut tek doz (uzatılmış) toksisite çalışmamızda D-MK, sıçanlarda hemogram değerlerinden MPV, PCT ve PDW düzeylerini arttırdı, tavşanlarda ise MHCH ve lenfosit (%) düzeylerini azalttı. Tüm diğer hemogram parametreleri üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı için sadece bu parametrelerdeki değişim göz önüne alındığından toksisite açısından anlamlı bir risk oluşturmayacağı kanaatindeyiz.

Akut tek doz (uzatılmış) toksisite çalışmalarında D-MK, sıçanlarda vücut sıcaklığını (30.dk, 1.saat ve 4.saatte) azalttığı, tavşanlarda ise vücut sıcaklığını (1. saat, 4. saat, 24.saat ve 7.günde) arttırdığı gözlemlendi. Vücut sıcaklığında gruplar arasında 14.günde anlamlı fark bulunmaması nedeniyle D-MK'e bağlı bir enfeksiyon riski olmadığı kabul edilebilir.

D-MK'in akut tek doz toksisite çalışmaları boyunca takip edilen her iki türün canlı ağırlık değişimi, su-yem tüketimi, idrar-dışkı miktarı, klinik gözlem ve nekropsi bulguları üzerine olumsuz bir toksik etkileri gözlenmemiştir.

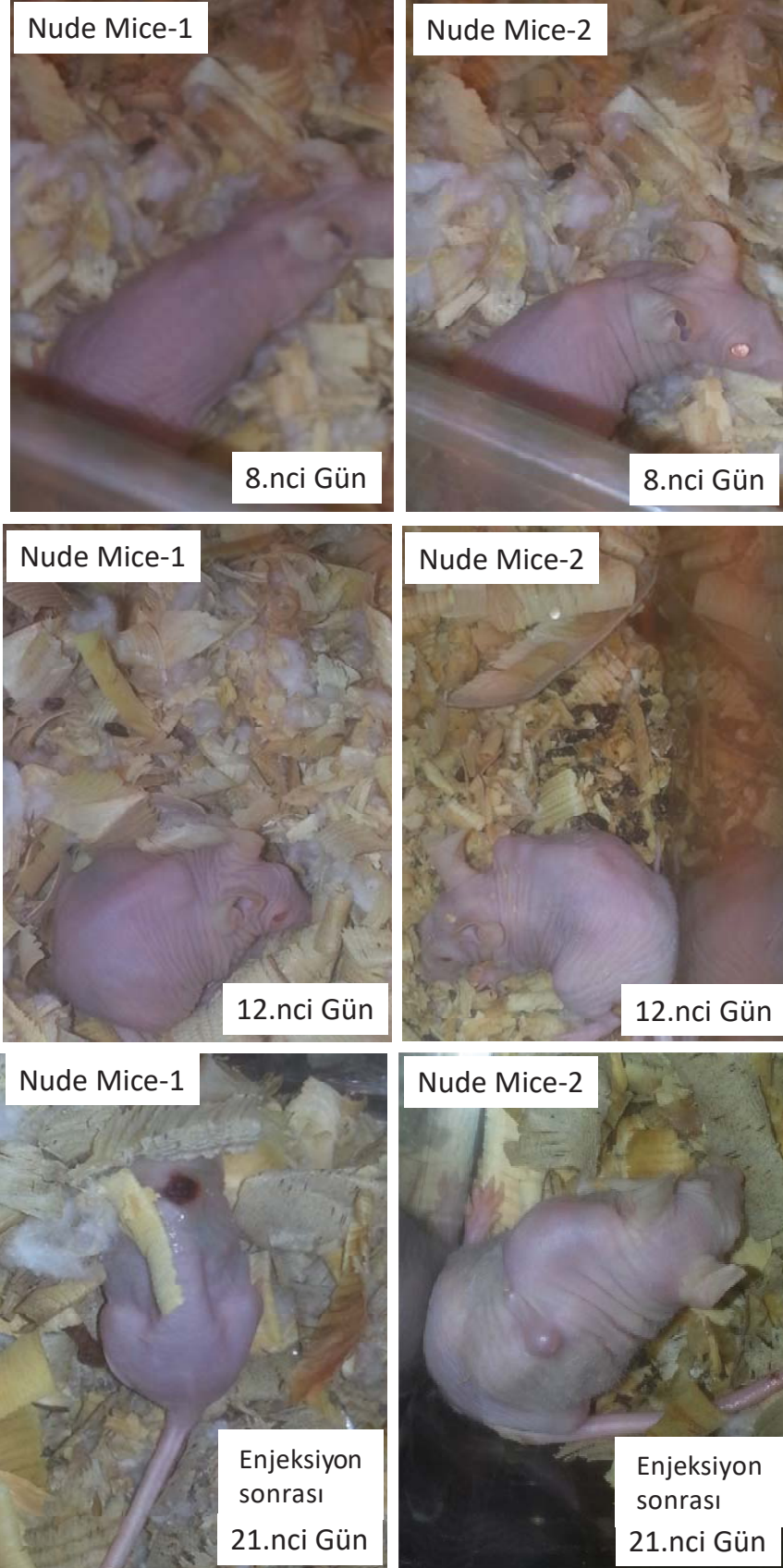
**Sonuç olarak** doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin, sıçan ve tavşanlarda yapılan tek doz (uzatılmış) toksisite çalışmalarında gözlenen serum ve idrar kreatinin düzeylerindeki artma nedeni ile olası nefrotoksisitelerin ve kan glukoz düzeyindeki artışın göz ardı edilmemesi gereklidir. Histopatolojik düzeyde değişiklik saptanmamıştır. İnsan uygulamalarına geçmeden önce tekrarlayan doz toksisite, subkronik ve kronik toksisite çalışmalarının da yapılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

#### 4.3.2. Nude farelerde meme tümörü oluşturulması

Tümör enjeksiyonundan itibaren her gün hayvanlar kontrol edilmiştir. **Şekil 109**de görüldüğü üzere, 8.gündeki kontrolde Nude Mice-1'de tümör oluşumu gözlenmiştir. Nude Mice-2'de ise tümör oluşumu gözlenmemiştir.

Tümör enjeksiyonu sonrası Nude Mice-1'de 8.ci günde tümör 1 cm çapa ulaşmış olup, Nude Mice-2'de tümörün çapı 12.ci günde 1 cm'e ulaşmıştır.

15. günde mikroköpükçük enjeksiyonu yapılmıştır. Mikroköpükçük enjeksiyonunu takiben 18. günde Nude Mice-1'de nekroz görülmüş, Nude Mice-2'de ise tümörün hemen altında tümörün enjeksiyonu sırasında o bölgeye seeding görülmüştür.

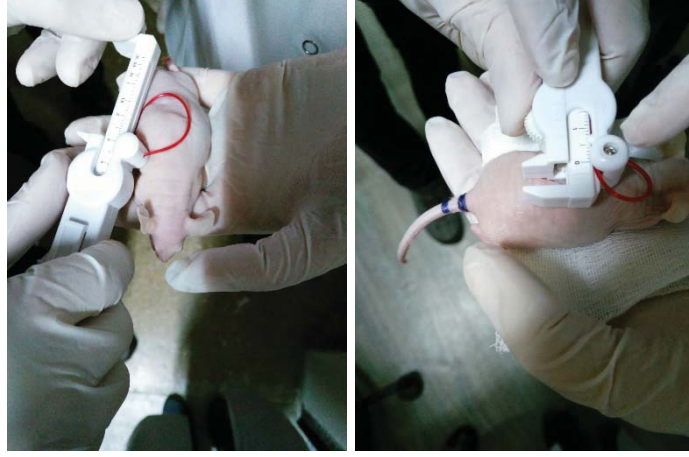


**Şekil 109.** Nude Fare-1 ve Nude Fare-2'de tümör oluşumunun gözlenmesi



## Nude Farede Tümör Hacim Ölçümü

Tümörlerin boyutunun ölçümü iki türlü (1) manuel ve (2) ultrasonografik olarak gerçekleştirilmiştir. Tümör boyutlarının manuel ölçümünde **Şekil 110**'de görülen sürmeli kumpas kullanılmıştır. Tümör boyutu ölçülecek hayvan düz bir şekilde, tümörünün en belirgin olacağı şekilde tutulduktan sonra tümör boyut ölçümü gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 110.** Manuel yöntemle nude farenin sırtında bulunan tümör boyutlarının ölçülmesi.

Ultrasonografik ölçüm ise Visual Sonics Vevo 2100 model hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazının özelliklerinden biri olan 3D görüntüleme ile gerçekleştirilmiştir. Ultrasonografik ölçümde, **Şekil 111**'de görüldüğü üzere, küçük deney hayvanı stabilizasyon tablası üzerine yerleştirilen ve anestezi altında bulunan nude farenin sırtındaki tümör üzerine cihazın MS550 yüksek çözünürlüklü probu (22-55 MHz), üç boyutlu transduser konumlandırma sistemi yardımı ile yerleştirilmiştir.



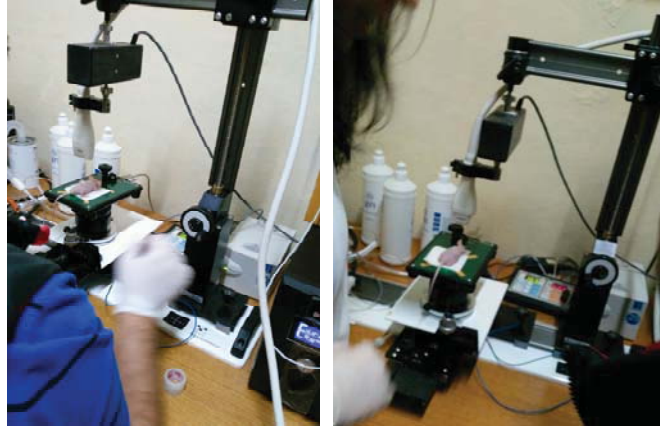
**Şekil 111.** Sırtında tümör bulunan ve küçük deney hayvanı tablası üzerine konumlandırılmış nude fare.

Mikromanipülatör ile stabilizasyon tablası hareket ettirilerek tümör ultrasonografik olarak görüntülenmiştir (**Şekil 112**).



**Şekil 112.** Ciltaltı yerleşimli tümörlerin iki boyutlu ultrasonografik görüntüsü ile ilk değerlendirme gerçekleştirildikten sonra 3D görüntülemeye geçilmiştir.

Mikromanipülatörün cetveli yardımı ile 3D görüntüleme motoruna bağlı olan bu prob, tümörün tam orta noktasına konumlandırılmıştır (**Şekil 113**).



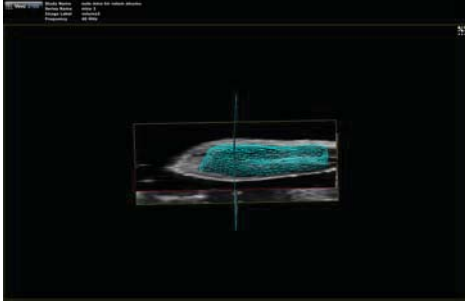
**Şekil 113.** Probu hareket ettiren 3D görüntüleme motoru ve üç boyutlu konumlandırma sistemi ile tümörün değerlendirilmesi mümkün olmaktadır.

Cihazın 3D görüntüleme yazılımı ve 3D görüntüleme motoru yardımı ile nude fare 1'de 2 cm'lik, nude fare 2'de ise 3 cm'lik bir segment 0,5 mm aralıklarla otomatik olarak ultrasonografik kesitler alınarak görüntülenmiştir. Nude Fare 1'de 40 kesit, nude Fare 2'de 60 kesit alınmıştır. Cihazın 3D yazılımı sayesinde tümörlerin üç boyutlu görüntüsü elde olunmuştur. Bu üç boyutlu görüntüler üzerinde yazılım volüm ölçümüne olanak vermektedir.

3D hacim ölçümü, elde olunan görüntülerin 3D değerlendirme yazılımında açılması ardından ölçüm yöntemi olarak paralel ve rotasyonel metodlar opsiyonunun seçilmesi ile tümör orta hattından her iki yöne olacak şekilde en az 10 ila 12 kesitte tümör sınırları manuel olarak çizilerek gerçekleştirilmiştir.

**Şekil 114**'de görüleceği üzere, bu çizimler tamamlandığında yazılım tüm tümörün sınırlarını otomatik olarak belirleyerek tümör volümünü hesaplamaktadır. Nude Fare-1 (**Video**

2) ve Nude Fare-2'ye ait (Video 3) 3D video görüntüleri rapor ekinde verilmiştir. Nude Fare-1'e ait tümör volümü 709 mm<sup>3</sup> (Video 2) ve Nude Fare-2'ye ait tümör volümü 96 mm<sup>3</sup> (Video 3) olarak ölçülmüştür.



Video 2 mice 1 8.gun\_2016-02-18-19-32-1111.avi



Video 3 mice 2. 8. gun.\_2016-02-18-19-51-35.avi

**Şekil 114.** Cilt altı yerleşimli tümörlerin sınırları otomatik olarak çizilmiş ve bu sayede hacmi hesaplanabilmiştir.

#### 4.3.3. Biyouyumluluğu denenmiş olan ilaç yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin tümör oluşturulmuş farelerde uygulanması, ultrasonografi ile görüntüleme altında mikroköpükçüklerin izlenmesi, mekanik indeks artırılarak patlatılması, ve kanser hücre ve dokusunda ilaç salınımlarının artırılması

#### **Bir cm ve Üzeri Tümör Boyutu Olan Grubun Bulguları:**

İlk geçiş PE ve 4 dk'lık süreçte kontrast dağılım eğrileri değerlendirildiğinde MB grubunda 2, DOX-MB grubunda 1 hayvanda eğri dağılımları beklenen hemodinamik yanıtı uymamaktaydı. Diğer 13 farede ise ekojenite dağılım eğrileri beklenen hemodinami ile uyumluydu. Kontrast eğrisi anlamlı olmayan bu 3 hayvanın tümünde (Kafes 7 Çizgi 3, Kafes 9 Çizgi 1, Kafes 9 Çizgi 2) MB enjeksiyonu uygulamada sorunsuz gerçekleştirilmekle birlikte tümör dokusunda ultrasonografik değerlendirmede vizualize edilebilen ekojenite artışı saptanmamıştır. Bu durum kontrast maddenin hedef düzeye istenilen şekilde ulaşmadığını düşündürmekte olup sorun hayvana ait anatomik varyasyonlara ya da MB'ların *in vivo* ortamda öngörülemeyen bir nedenle hızlı yıkımına bağlı olabilir. Bu 3 hayvandan 2'si MB enjeksiyon grubunda olup biri ise DOX-MB enjeksiyon grubundadır. MB grubunda olan 2 hayvanın (Kafes 7 Çizgi 3, Kafes 9 Çizgi 1) tümör nekroz oranları sırası ile %5 ve %10 olup, DOX-MB grubunda olan bir hayvanın (Kafes 9 Çizgi 2) nekroz oranı %80'dir. Bu üç hayvanda nekroz oranlarının buldukları gruplarda beklenen düzeyler ile uyumlu olması



görüntülemeye ekojenite artışı saptanmamasının tedavi üzerine etkisi olmadığını düşündürmektedir. Bu hayvanlarda MB'ların tümörde ekojenite artışı oluşturmamış olmaları ya da hedef düzeye sağlam olarak varamamış olmalarının tedavi etkinliğini değiştirmediği düşünülmüş olup Kafes 9 Çizgi 2 numaralı farenin nekroz oranı olan %80 nekroz oranı çalışmadaki en yüksek nekroz oranıdır.

Hedeflendirilmiş MB bağlanma oranları (PA:Percent Agent) değerlendirildiğinde 2 fare dışında diğer 14 farenin bağlanma oranları oldukça düşük ve anlamsız düzeydedir. 2 farede ise PA yüzdeleri %6 düzeylerinde olup muadil ilaç Vevomarker için belirtilen bağlanma yüzdeleri ile benzer, karşılaştırılabilir düzeydedir. Bu iki fareden biri (Kafes 8 Çizgi 2) MB enjeksiyon grubunda olup tümör nekroz oranı %3 gibi oldukça düşük bir değer olup bulunduğu grup için olağandır. Diğer fare (Kafes 8 Çizgi 5) ise DOX-MB grubunda olup nekroz oranı %50 düzeyindedir. Bu nekroz oranı bulunduğu grup için uygun olmakla birlikte aynı DOX-MB grubunda olan Kafes 7 Çizgi 5 numaralı farede ise nekroz oranı %60 olmasına rağmen bağlanma yüzdesi 0,004 gibi oldukça düşüktür. Bu bulgular bize deney grubumuzda efektif bağlanmanın sağlanamadığını ve efektif bağlanma olabilecek 2 farede ise nekroz oranlarının bağlanma düzeyi ile ilişkisiz olduğunu düşündürmektedir.

PA düzeylerinin düşük çıkması hedeflendirilmiş MB'ların tümör dokusuna bağlanmadığını ve tümör dokusunda akümüle olmadığını düşündürmektedir. Bu durum tümör dokusunda, bağlanmayı sağlayacak EGF ekspresyonunun olmamasına sekonder olabilir. Bu durum tümör oluşturmadaki hücre hatlarında EGFR ekspresyon testindeki düşük bağlanma düzeyi ile paralellik göstermektedir.

### **İki cm'den Küçük Tümör Boyutu Olan Grubun Bulguları:**

Bu grupta 5 farede ilk enjeksiyonda tümör gelişmiş ancak 2 farede tümör gelişimi ilk enjeksiyonlarda sağlanamamıştır. Tümör gelişen 5 nude fareye tümör boyutları 8 mm ve altında iken enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. İlk enjeksiyonda tümör gelişmeyen 2 farede ise tekrar enjeksiyon ile tümör geliştirilmiş ve kontrol grubu olarak ayrılmışlardır.

İlk geçiş PE ve 4 dakikalık süreçte kontrast dağılım eğrileri değerlendirildiğinde bu grupta tüm ekojenite eğrileri anlamlı ve beklenen şekilde gerçekleşmiştir.

PA değerleri 5 farede de oldukça düşük (%0,3 ve altında değerlerde) olup spesifik bağlanmanın olmadığını göstermektedir. Bu durum 1 cm den büyük tümör grubunda da olduğu gibi EGF ekspresyonunun yokluğuna sekonder olabilir.

Enjeksiyon günü ultrasonografik değerlendirme uygulanan tüm hayvanlardan; sadece MB verilen grupta, sadece bir farede (Kafes 7 Çizgi 3) boyutsal büyüme saptanmamış olup tümör hacmi stabil kalmış iken diğer ölçüm yapılan farelerde hacim artışı saptanmıştır.

DOX-MB verilen grupta ise sadece bir farede (Kafes 8 Çizgi 5) tümör hacminde gerileme izlenmiştir. Bu farede enjeksiyon günü hacim 87 mm<sup>3</sup>, sakrifikasyon günü hacim 72 mm<sup>3</sup>tür. Yine bu farede bağlanma oranı %6,39 olup diğer farelerin bağlanma oranlarına göre belirgin yüksektir.

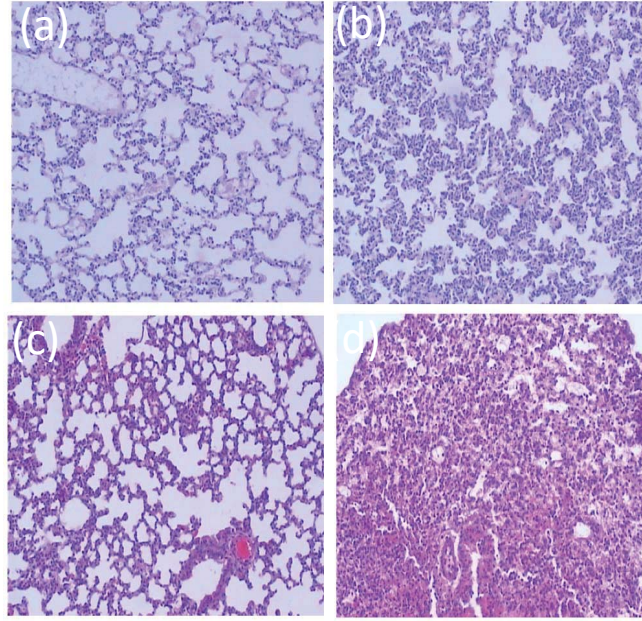
**Tablo 13.** Tüm gruplardaki 35 hayvanın tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık oranlarının ortalamaları

| Parametreler      | Ortalama Değer | p Değeri | İstatistiksel Anlam |
|-------------------|----------------|----------|---------------------|
| Tümör Boyut Farkı | 1,6571         | 0,145    | YOK                 |
| Nekroz            | 35,4           | 0,000    | VAR                 |
| Apoptoz           | 17,2571        | 0,001    | VAR                 |
| Canlılık          | 63,0           | 0,000    | VAR                 |
| Karaciğer Hasarı  | -              | 0,000    | VAR                 |

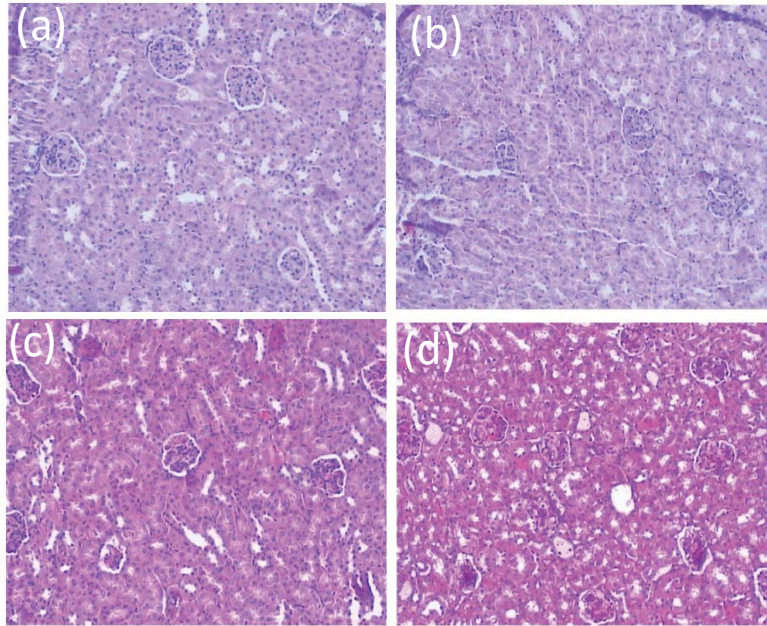
İstatistiksel analiz sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan veriler istatistiksel anlamlı değişiklik göstermiş olarak değerlendirilmiştir.

#### **Histopatolojik Değerlendirmenin Yapılması:**

Atimik nude farelerden sakrifikasyon sırasında alınan dokulardan yapılan histopatolojik değerlendirmede akciğer (**Şekil 115**), böbrek (**Şekil 116**), beyin (**Şekil 117**), karaciğer (**Şekil 118**), ve tümör dokuları (**Şekil 119**) incelendi. Akciğer, böbrek ve beyinde, tüm gruplar için normal histoloji gözlemlendi.

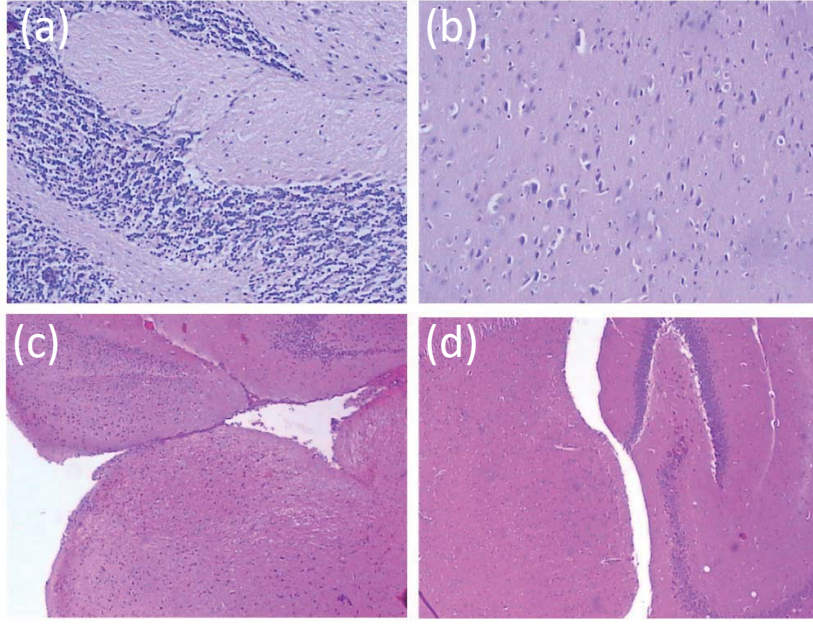


**Şekil 115.** Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında akciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. Akciğer dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.

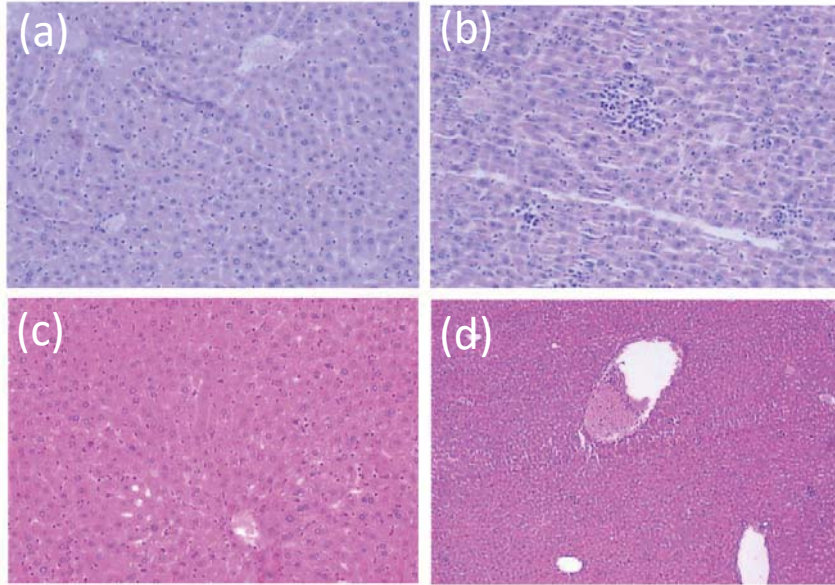


**Şekil 116.** Kontrol (A), DOX (B) , MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü. Böbrek dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.

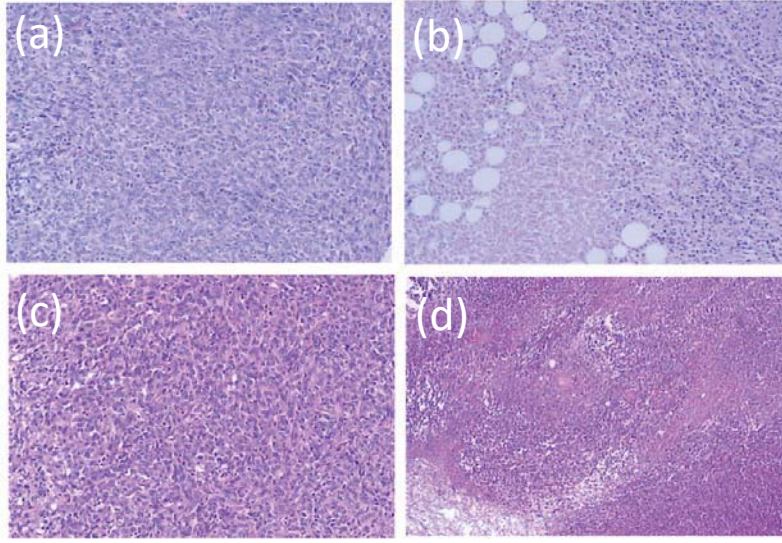




**Şekil 117.** Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü. Beyin dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi. Karaciğerde ise, DOX ve Lipo-DOX gruplarında, her bir gruptaki 7'şer olgunun parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde dikkati çekmiştir.



**Şekil 118.** Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. Karaciğer dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, Doxorubicin ve Lipozomal Doxorubicin gruplarında karaciğer parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde dikkati çekmiştir.



**Şekil 119.** Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü.

Her bir grupta 7 olgu olması nedeniyle non-parametrik test yapılmıştır. 2'den fazla grup olması ve grupların birbirinden bağımsız olmaları nedeniyle, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Bu test ile gruplar arasında tümör boyut farkı, apoptoz, nekroz ve canlılık oranları, karaciğer hasarı değerlendirilmiştir.

5 gruptaki toplam 35 hayvanın tümör boyut farkı, apoptoz, nekroz ve canlılık değerlerinin ortalamalarına bakıldığında, Tümör boyut farkı oranı %1,6, Nekroz oranı %35,4, apoptoz oranı %17,2 ve canlılık oranı %63 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 14.** Kruskal Wallis-H testi sonucu anlamlı çıkan grupların arasında Mann Whitney-U testi uygulanması sonucu tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

| Grup               | Tümör Boyut Farkı<br>p Değeri | Nekroz<br>p Değeri | Apoptoz<br>p Değeri | Canlılık<br>p Değeri | Karaciğer Hasarı<br>p Değeri |
|--------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|------------------------------|
| Kontrol x DOX      | 0,259                         | 0,01               | 0,01                | 0,01                 | 0,026                        |
| DOX x MB-DOX       | 0,71                          | 0,209              | 0,017               | 0,007                | 0,026                        |
| MB x MB-DOX        | 0,011                         | 0,017              | 0,097               | 0,128                | 1                            |
| Kontrol x MB       | 0,456                         | 0,053              | 0,456               | 0,456                | 1                            |
| Kontrol x MB-DOX   | 0,097                         | 0,007              | 0,017               | 0,004                | 1                            |
| Kontrol x Lipo-DOX | 0,902                         | 0,001              | 0,004               | 0,001                | 0,026                        |
| Dox x Lipo-DOX     | 0,535                         | 0,902              | 0,011               | 0,001                | 1                            |

İstatistiksel analiz sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan veriler istatistiksel anlamlı değişiklik göstermiş olarak değerlendirilmiştir.

DOX ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, tümör boyutu farkı için istatistiksel anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ( $p=0,259$ ). İstatistiksel olarak; nekroz ( $p=0,001$ ), apoptoz ( $p=0,001$ ), canlılık ( $p=0,001$ ) ve karaciğer hasarı ( $p=0,026$ ) değerlerinde anlamlı fark gözlenmiştir. Kontrol grubu için tüm %92 hücre canlılığı, %3 apoptoz, %2,3 ise nekroz gözlenmiş olup; DOX grubunda %16 canlılık, %38 apoptoz ve %60 nekroz belirlenmiştir. DOX grubunda hücre canlılığı, kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalış gösterirken, apoptoz ve nekroz oranları kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış göstermiştir.

DOX ve MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, tümör boyutu farkı ( $p=0,710$ ) ve nekroz ( $p=0,209$ ) açısından istatistiksel anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Canlılık ( $p=0,007$ ), apoptoz ( $p=0,017$ ) ve karaciğer hasarı ( $p=0,026$ ) açısından ise istatistiksel anlamlı fark belirlenmiştir. DOX grubu için %16 hücre canlılığı, %38 apoptoz, %60 nekroz gözlenmiş olup; DOX yüklü mikroköpükçük grubunda %58 canlılık, %16 apoptoz ve %44 nekroz saptanmıştır. DOX grubunda, canlılık değeri DOX yüklenmiş mikroköpükçük grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalış gösterirken, apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir.

MB ve MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, tümör boyut farkı ( $p=0,011$ ) ve nekroz ( $p=0,017$ ) açısından istatistiksel anlamlı bir fark gözlenirken, apoptoz ( $p=0,097$ ), canlılık ( $p=0,128$ ) ve karaciğer hasarı ( $p=1,000$ ) açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir. MB grubu için tüm hayvanların ortalamaları alındığında, %2,28 tümör boyut farkı, %80 hücre canlılığı, %9 apoptoz, %6 ise nekroz gözlenmiş olup; MB-DOX grubunda %7,1 tümör boyut farkı, %58 canlılık, %16 apoptoz ve %44 nekroz gözlenmiştir. MB-DOX, MB grubuna göre tümör boyutunda istatistiksel anlamlı bir azalış belirlenmiş, nekroz oranında ise istatistiksel anlamlı bir artış saptanmamıştır. Karaciğer hasarına bakıldığında, her iki grupta da karaciğer hasarı anlamlı düzeyde olmadığından, 2 grup arasında karaciğer hasarı bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Kontrol ve mikroköpükçük grupları karşılaştırıldığında, tümör boyut farkı ( $p=0,456$ ), apoptoz ( $p=0,456$ ), nekroz ( $p=0,53$ ) ve canlılık ( $p=0,456$ ) değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kontrol ve mikroköpükçük grupları karşılaştırıldığında, kontrol grubu için tüm hayvanların ortalamaları alındığında, %92 hücre canlılığı, %3 apoptoz, %2,3 ise nekroz gözlenmiş olup; mikroköpükçük grubunda %80 canlılık, %9 apoptoz ve %6 nekroz izlenmiştir.

Kontrol ve MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, tümör boyutu farkı ( $p=0,097$ ) ve karaciğer hasarı ( $p=1,000$ ) için istatistiksel anlamlı bir değişiklik yoktur. Nekroz ( $p=0,007$ ), apoptoz ( $p=0,017$ ) ve canlılık ( $p=0,004$ ) açısından ise istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmiştir. Kontrol grubu için tüm %92 hücre canlılığı, %3 apoptoz, %2,3 ise nekroz gözlenmiş olup; doxorubicin yüklenmiş mikroköpükçük grubunda kontrol grubuna göre %58



canlılık, %16 apoptoz ve %44 nekroz gözlenmiştir. MB-DOX grubunda, apoptoz ve nekroz oranlarında istatistiksel anlamlı bir artış gözlenirken, canlılık değerinde istatistiksel anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

Kontrol ve Lipo-DOX grupları karşılaştırıldığında, tümör boyutu farkı ( $p=0,902$ ) için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemişken, nekroz ( $p=0,001$ ), apoptoz ( $p=0,004$ ), canlılık ( $p=0,001$ ) ve karaciğer hasarı ( $p=0,026$ ) açısından ise istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Kontrol grubu için %92 hücre canlılığı, %3 apoptoz, %2,3 ise nekroz gözlenmiş olup; Lipo-DOX grubunda %66 canlılık, %18 apoptoz ve %63 nekroz gözlenmiştir. Lipo-DOX grubunda nekroz, apoptoz ve karaciğer hasarı açısından istatistiksel anlamlı bir artış gözlenirken, canlılık oranında istatistiksel anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

DOX ve Lipo-DOX grupları karşılaştırıldığında, göre tümör boyutu farkı ( $p=0,535$ ), nekroz ( $p=0,902$ ) ve karaciğer hasarı ( $p=1,000$ ) için istatistiksel anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Apoptoz ( $p=0,011$ ) ve canlılık ( $p=0,001$ ) açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. DOX grubu için tüm hayvanların ortalamaları alındığında, %16 hücre canlılığı, %38 apoptoz, %60 ise nekroz var olup; Lipo-DOX grubunda %66 canlılık, %18 apoptoz ve %63 nekroz gözlenmiştir. DOX grubunda Lipo-DOX grubuna göre, apoptoz oranı istatistiksel olarak artış gözlenirken, canlılık oranında istatistiksel olarak anlamlı azalış belirlenmiştir.

Lipo-DOX ve MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, MB-DOX grubunda %58 canlılık, %16 apoptoz ve %44 nekroz gözlenmiş olup; Lipo-DOX grubunda %66 canlılık, %18 apoptoz ve %63 nekroz gözlenmiştir. Bu verilere göre sadece karaciğer hasarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmiş olup, tümör boyut farkı, apoptoz, nekroz canlılık açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

### **Hedeflendirilmiş mikroköpükçük verilen tümör boyutu 1 cm altında olan nüde farelerin histopatolojik bulguları**

Bu grupta 7 ek nude fare deney hayvanları etik kurulundan talep edilmiş ve onay alındıktan sonra, bu farelere aynı yöntemle aynı sayıda ve aynı yere 4T1 hücre enjeksiyonu yapılmıştır. 7-10 günde her bir tümör 8-9 mm boyuta ulaştınca, 5 fareye ( $5 \cdot 10^8$  MB/ml .  $4.5 \cdot 10^{-8}$   $\mu$ g-DOX/MB . 0.3 ml =)  $6.7 \mu$ g-DOX/fare hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçük verildi. 2 fare'ye yalnızca SF verilip kontrol olarak değerlendirildi. 4.cü gün sakrifiye edildi. Tümöre ait boyut ve oranlar **Tablo 15'**de yer almaktadır. Tablodan görüleceği üzere, ultrason altında hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin tümör boyutu 8 mm'in üzerinde tümörlerde tümör boyutunda önemli bir küçülme ve %40'lara varan nekroz'a sebebiyet verdiği görülmektedir. Tümör boyutu 8 mm'den küçük olan tümörlerde ise enjekte edilen hedeflendirilmiş mikroköpükçükler tümör boyutunda küçülme yaratırken, nekroz oranlarında bir değişime



sebebiyet olmamıştır. Kontrol grubunda tümör boyutlarında herhangi bir değişim olmazken, nekroz oranlarında herhangi bir etki görülmemiştir. Boyutları 8 mm'den küçük tümörlerde henüz damarlaşıma oluşmadığından dolayı olabileceği değerlendirilmiştir.

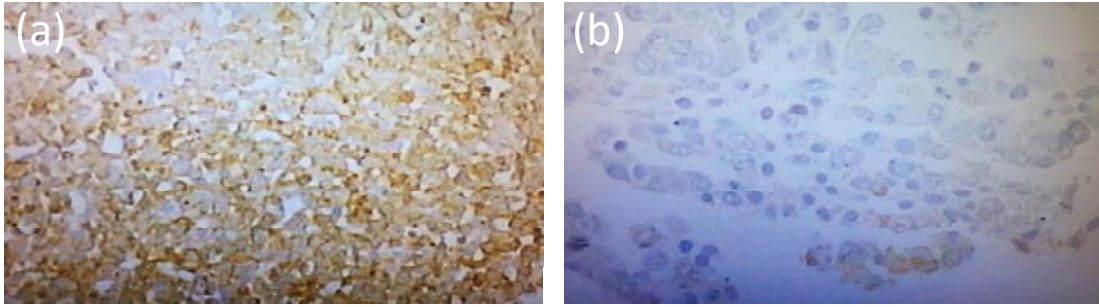
**Tablo 15.** Tümör boyutu 1 cm altında olan hedeflendirilmiş mikroköpükçük çalışması

| No                 | Çizgi No           | Grup    | Enjeksiyon<br>Günü (1.<br>Gün)<br>Tümör<br>Boyutu<br>(mm) | Sakrifikasyon<br>Günü<br>(4.Gün)<br>Tümör<br>Boyutu (mm) | Boyut farkı<br>(mm)                         | Nekroz oranı<br>(%)                                |
|--------------------|--------------------|---------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1                  | 1-ÇİZGİ,<br>92/17  | MB-DOX  | 10                                                        | 6                                                        | -4                                          | 40                                                 |
| 2                  | 2-ÇİZGİ,<br>93/17  | MB-DOX  | 11                                                        | 7                                                        | -4                                          | 35                                                 |
| 3                  | 3-ÇİZGİ,<br>94/17  | MB-DOX  | 9                                                         | 3,5                                                      | -5,5                                        | 30                                                 |
| 4                  | ÇİZGİSİZ,<br>95/17 | MB-DOX  | 8                                                         | 4                                                        | -4                                          | 0                                                  |
| 5                  | 4-ÇİZGİ,<br>96/17  | MB-DOX  | 8                                                         | 4                                                        | -4                                          | 3                                                  |
| 6                  | ÇİZGİSİZ,<br>97/17 | KONTROL | 10                                                        | 12                                                       | +2                                          | 2                                                  |
| 7                  | 1-ÇİZGİ,<br>98/17  | KONTROL | 6                                                         | 6                                                        | 0                                           | 0                                                  |
| <i>p</i><br>Değeri |                    |         | Paired<br>sample T<br>test:                               | <b>0,034</b>                                             | 0,093<br>Ortalamaların<br>karşılaştırılması | <b>0,012</b><br>Ortalamaların<br>karşılaştırılması |

Tüm farelerin kalp, akciğerler, karaciğer, böbrekler ve beyin dokuları histopatolojik incelendi. Yer yer böbreklerde ve akciğerlerde konjesyon gözlemlendi. Bu bulgular ölüm anı bulguları olarak yorumlandı. Histopatolojik bulguya rastlanmadı. 5 farenin tümöründe 2 kontrolle karşılaştırıldığında, boyutta küçülme ve nekroz oranında artma saptandığı için MB+dox'un tümöre etkili olduğu ve yan etki oluşturmadığı yorumuna ulaşıldı. İstatistiksel olarak desteklendi.

## EGFR İmmunhistokimyasal Analiz

Çalışmamızda kullanılan 4T1 hücrelerindeki EGFR reseptörünün protein düzeyinde ekspresyonunu MDA231 hücreleri ile karşılaştırmalı olarak semikantitatif olarak saptamak amacıyla Ventana Discover cihazında otomatik olarak, manuel olarak ve dış laboratuarda DAKO otomatik immunhistokimya boyama cihazları ile 3 kez EGFR antikoru ile boyama yapıldı. Santa Cruz marka EGFR (A-10): sc-373746 kodlu antikor 1:100 dilüsyonda çalışıldı. Primer inkübasyon süresi 1 saatti. Değerlendirmeler arasında fark saptanmadı.



**Şekil 120.** (a) MDA M1231 hücreleri %100 +2 ekspresyon; (b) 4T1 hücreleri %30 +1 düzeyde ekspresyon göstermiştir.

4T1 hücrelerinde ekspresyon daha düşüktür ama vardır. 4T1 hücreleri Her2 negatif (triple negatif) meme kanseridir. EGFR Her1'leri saptamaktadır. 4T1 fare kökenli hücre hattıdır. MDAMB231 nude farelerimizde tümör oluşturmadığı için bu hücre hattına geçilmiştir. Kullandığımız Santa Cruz primer antikor antihuman antirat antimouse özelliindedir. Bu nedenle false negatiflik olmadığı kesinleşmiştir. Test ayrıca farklı laboratuvar, farklı alet, aynı laboratuvar farklı metodlarla gerçekleştirilerek valide edilmiştir. Bu ekspresyon düşüklüğü mikrobubbleların hücrelere tutunmalarındaki azlığı açıklayabilir.

## TARTIŞMA

İstatistiksel analizler incelendiğinde tümör dokusundaki nekroz oranı kontrol grubu ile mikrobubble+doksorubisin grubu arasında istatistiksel anlamlı fark göstermiştir. Bu fark mikrobubble+doksorubisin grubunda nekrozun arttığı yönündedir. Tümör dokusu içinde nekroz kemoterapi etkisinin iyi bir göstergesidir. Hücre ölümünü gösterir. Tümör boyut farkı, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir. Anlamlı fark olmamasının nedeni olarak sakrifasyonların 4. günde yapılması gösterilebilir. Doxorubicin grubundaki tümörlerde nekrotik ve apoptotik etki, kontrol grubuna göre anlamlı artışta iken, Doxorubicin grubundaki tümörlerde resorbsiyon olmayışı, tümör boyutunda fark olmamasının nedeni olarak gösterilebilir. Tümör dokusu içinde kemoterapi etkisi ile nekroz oluştuktan sonra parçalanmış

nekrotik hücreler zaman içinde ortamdan uzaklaştırılır ve tümör boyutunda küçülme belirginleşir. Ancak özellikle son grubumuzda ilaç öncesi ve sonrası boyutlar arasında paired sample T test uyguladığımızda tümör boyutunda değişim saptanmasının istatistiksel olarak anlamlı olması boyut fark değişiminin de 4.cü gün gibi akut etki süresinde bile ilaç etkisini desteklediğini göstermektedir.

Hayvan kullanımını minimum sayıda tutmak amacıyla, tek doz MB-DOX denenmiş olması, hayvanlara ultrason altında görüntüleme işleminin hayvan refahı açısından her gün yapılamıyor oluşu, tümör boyutunda istatistiksel anlamlı azalma olmamasının nedenleri arasında gösterilebilir.

Ghannam ve arkadaşları, Doxorubicin yüklü lipozomların, bazı katı tümörlerde, serbest Doxorubicin ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ilaç enjeksiyonları tümör hacim gelişmesine bakılmaksızın 7.günde yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise tümör enjeksiyonunu takiben tümör hacim kontrolü yapılmış ve ilaç enjeksiyonu, tümör hacmi  $1\text{cm}^3$ 'e ulaştığında yapılmıştır. Çalışmadaki kontrol ve serbest DOX ( $2\mu\text{g}$  Dox/ Hayvan Ağırlığı g) grubu hayvanları 30. güne kadar yaşatılırken, Lipo-DOX grubu hayvanları 60.güne kadar yaşatılmışlardır. Bizim çalışmamızda ise tüm gruplarda ilaç enjeksiyonundan sonraki 4. güne kadar yaşatılmışlar, 4. günde tümör boyut ölçümünü takiben sakrifiye edilmişlerdir. Kontrol grubunda hayvanların sakrifiye edildiği 30. gündeki tümör büyüklüğü  $0,93\text{ cm}^3$  iken serbest DOX grubunda tümör büyüklüğü  $0,85\text{ cm}^3$ 'tür. Lipo-DOX grubunda tümör büyüklüğü, ancak 40. günde kontrol ve serbest DOX içeren grubun tümör büyüklüğüne yaklaşabilmiştir. Ancak 40. günden sonra tümör büyümesi devam etmiştir ve sakrifikasyonun yapıldığı 60. günde tümör büyüklüğü  $1,5\text{ cm}^3$  olarak ölçülmüştür. Çalışmada ilaç yüklü lipozomların, ilacın metabolizma ve bağışıklık tepkilerinden koruyarak daha uzun süre etkili tuttuğunu, bu nedenle sakrifikasyonun kontrole ve serbest DOX'a göre daha ileri bir zamanda yapıldığına dikkat çekilmiştir.

Gao ve arkadaşlarının atimik nude farelerle yaptıkları çalışmada hayvanlarda tümör oluşumu gözlemlendikten sonra tedavi 2 ay boyunca, haftada 1 gün ilaç verimi olacak şekilde sürerken; bizim çalışmamızda tümör çapı  $1\text{ cm}^3$ 'e ulaştığı andan itibaren ilaç uygulaması yapılmış ve ilaç uygulamasını takiben 4 günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Çalışmada hayvanların sağ ve sol arka kısımlarında tümör oluşturulmuştur. Tümörlerin ikisine de  $0,75\text{ mg/ml}$  dozda lipozomal kaplı DOX yüklü mikroköpükçük verilmiştir. Bizim çalışmamızda ise hayvanlara  $0,125\text{ mg/ml}$  olacak şekilde DOX verilmiştir. bu çalışmada, hayvanlardaki tümörlerin bir tanesine ilaç verilmesine rağmen ultrason uygulanmazken diğer tümöre ilaç enjeksiyonundan 4 saat sonra ultrason uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise ilaç uygulaması ile aynı anda ultrason uygulaması da yapılmış, mikroköpükçükler ultrason altında patlatılmıştır. Çalışmada 2 aylık tedavi süresince ultrason

almış tümörün büyümesinin, ultrason almamış olan tümör büyümesine göre anlamlı farklılık gösterdiği belirtilmişse de, her iki uygulamada da tümör boyut küçülmesi gözlenmemiştir.

Lentacker ve çalışma arkadaşlarının melanom hücrelerinde DOX yüklü mikroköpükçüklerin ultrason ile etkileşiminin incelendiği bir çalışmada, DOX yüklü mikroköpükçüklerin, ultrasona maruz bırakıldığında, serbest lipozomal doxorubicinlerden çok daha fazla tümör hücresi öldürüldüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada BLM melanom hücre hattı kullanılmış ve Lipo-DOX, ultrason ile indüklenmiş Lipo-DOX ve Ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin hücre canlılığına etkisi, hücre kültürü düzeyinde incelenmiştir. 30 µg/ml DOX konsantrasyonunda, ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçük %40 canlılık gösterirken, Lipo-DOX ve ultrason ile indüklenmiş Lipo-DOX gruplarında yaklaşık %80 hücre canlılığı göstermiştir. Doz artışı ile beraber ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. Ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçükler 50 µg/ml'lik DOX dozunda %70 canlılık, 100 µg/ml'lik DOX dozunda ise %60 canlılık göstermiştir.

Escoffre ve arkadaşları ise hem glioblastoma hem de meme kanseri hücreleri üzerinde, ultrason altında farklı türlerdeki mikroköpükçüklerin, DOX'un antitümöral etkinliği üzerinde etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada U87-MG glioblastom hücreleri kullanılmış ve serbest DOX ve 200 kPa, 400 kPa, 600 kPa ultrason değerlerinde indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin hücre canlılığına etkisi 48. saatte MTT testi ile değerlendirilmiştir. Buna göre serbest DOX %60 civarında bir canlılık gösterirken, 200 kPa, 400 kPa ve 600 kPa ultrason değerlerinde indüklenmiş serbest DOX'ta canlılık sırasıyla yaklaşık %40, %20 ve %18 bulunmuştur. Bu çalışma ile, ultrason ve mikroköpükçüklerin kullanımı sonucu kanser hücrelerinin ölümünde artış olduğu gösterilmiştir..

## 5. SONUÇLAR

Kanser günümüzde en önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Ne yazık ki, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar yalnızca hastalıklı hücreleri değil, aynı zamanda vücudun tüm bölgelerine yayılarak sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle, ilacın tüm vücuda dağılması yerine doğrudan kanserli bölgeye ulaştırılması ve hedef bölgede hücre içine alımı için alternatif sistemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu projede, bir kanser türü olmak üzere, meme kanserine spesifik belirteçlerle işaretlenmiş ve kemoterapötik ajanla yüklenmiş mikroköpükçüklerin, kanser teşhis ve tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Geliştirilen sistemin en büyük avantajı, ultrasonografi gibi son derece yaygın kullanımda olan, x-ışını içermeyen, güvenli, ucuz bir cihazla kanserli dokunun gerçek

zamanlı görüntülenebilmesi (real-time imaging), ve *non-invaziv* olarak lokal kemoterapi uygulanabilmesine olanak sağlayan bir yöntem oluşudur.

Çalışmalarda, ilk önce değişik oranlarda DSPC, kolesterol ve lipopolimerden içeren lipozomlar hazırlanarak, üretim koşulları ve DOX yükleme parametreleri optimize edilmiştir.

Lipozomlara pH gradiyenti altında aktif yükleme metodu kullanılarak doksorubisin yüklenmiştir. Lipozomlara DOX yüklemenin, sabit lipid miktarlarında DOX konsantrasyonu ile, ya da sabit DOX konsantrasyonunda lipid miktarları ile, Langmuir tipi bir davranış gösterdiği bulunmuştur.

Değişik biyotin yoğunluğuna sahip ilaç yüklü lipozomların mikroköpükçüklere avidin-biotin köprüsü ile bağlanması sağlanmıştır. Mikroköpükçük ve lipozom üzerindeki biyotin yoğunluğunun mikroköpükçüklere DOX yüklemede etkili olduğu saptanmıştır. Ancak, yüksek biyotin konsantrasyonlarında mikroköpükçüklere DOX yüklemesi olumsuz etkilenmiştir.

Mikroköpükçüklere DOX yüklemede hem mikroköpükçük ve hem de lipozom kompozisyonuna %0.05 biyotin yoğunluğunun ideal olduğu saptanmıştır.

Mikroköpükçüklere yüklenebilen DOX miktarı yaklaşık  $4.5 \cdot 10^{-8}$  µg-DOX/MB olarak bulunmuştur.

Doksorubisin yüklenmiş ilk yerli üretim hedeflendirilebilir ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin *in-vitro* deneylerinde %60 ve üzeri power Doppler güçlerinde hızla ve büyük oranda yıkımının sağlandığı saptanmıştır. Bozulma %100 güçte maksimum seviyede ve hızda gerçekleşmektedir.

*In-vivo* deney hayvanı modelinde, hedeflendirilebilir ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin hedeflenen bölgeye ulaştırılması, ultrason altında görüntülenmesi, hedef bölgede patlatılması ve bu sayede ilacın hedef bölgede kontrollü salınımı denenmiş ve sağlanmıştır.

Ultrasonografik değerlendirmeler sonucunda deney grubunda tümör boyut artışının durdurulmadığı, genel olarak efektif bağlanmanın sağlanmadığı belirlenmektedir. Bunun da EGFR ekspresyonunun yetersiz olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür, nitekim bu durum tümör oluşturmadaki hücre hatlarında EGFR ekspresyon testindeki düşük bağlanma düzeyi ile paralellik göstermektedir.

Tümör dokusunda nekroz oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanması doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin tümör boyutunda değişiklik oluşturmamasına karşın nekrozu arttırdığını ortaya koymaktadır. Tedavi etkinliğinde spesifik bağlanma olmaksızın olasılıkla lokal ultrasonografik artmış permeabilite etkisi ile hücre içine geçiş sayesinde lokal tedavi etkinliği artmaktadır.

Doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin, sıçan ve tavşanlarda yapılan tek doz (uzatılmış) toksisite çalışmalarında histopatolojik düzeyde değişiklik saptanmamıştır. Ancak gözlenen serum ve idrar kreatinin düzeylerindeki artma nedeni ile olası nefrotoksisitelerin ve



kan glukoz düzeyindeki artışın göz ardı edilmemesi gereklidir. İnsan uygulamalarına geçmeden önce tekrarlayan doz toksisite, subkronik ve kronik toksisite çalışmalarının da yapılması faydalı olacaktır.

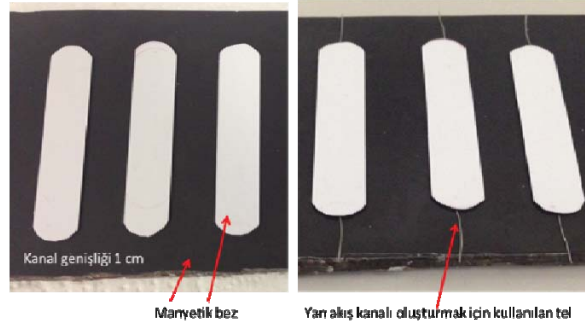


## EKLER

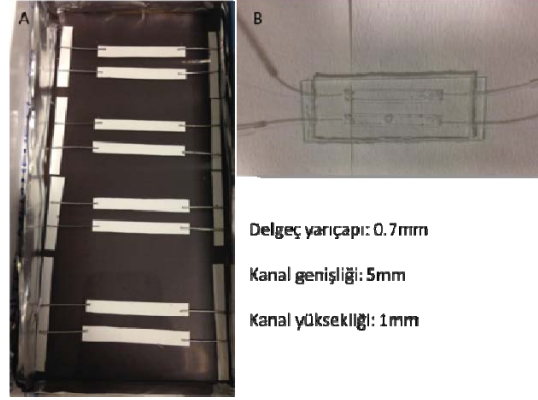


## İnsan Meme Kanseri Hücreleri, MDA-MB-231, Ve Normal İnsan Meme Hücreleri, MCF10A, Kullanılarak Yapılan *In-Vitro* Çalışmalar

**Manyetik bezlerle 2 boyutlu (2D) kalıp oluşturma optimizasyonu ve PDMS kalıp hazırlama:** İki boyutlu kalıp oluşturmak için ilk olarak manyetik bez kullanıldı. Kanal genişliği 1 cm olacak şekilde kesilen manyetik bezlerin uçlarına yan akış kanalı oluşturabilmek için tel yerleştirildi ve PDMS bu kalıbın üzerine döküldü. PDMS'in polimerleşmesi için oda sıcaklığında geçen iki gün bekleme süresinin ardından PDMS kalıp, manyetik bezden etanol yardımıyla ayrıldı, kesildi ve teller çekilerek yan akış kanalı oluşturuldu (Şekil 121). Temizleme protokolünün ardından, PDMS lam ile UV/ozon uygulandıktan sonra yapıştırılıp kanal oluşumu tamamlandı. Görüntülemeye kullanılacak mikroskobun görüntülemeyi üstten sağlayacak olması ve hücrelerin PDMS yüzeye yapışmaması sebebiyle camın üst tarafta olması gerekiyordu. Bu durumda altta olacak olan PDMS üzerinde oluşturulacak delikler ve akış boruları sızıntıya sebep oldu ve kanalın mikroskop üzerine yerleştirilmesinde sorun yarattı. Akış kanallarının yan taraftan olması bu problemin aşılmasına olanak sağladı. Daha sonra bu yöntemle aynı anda tek çip üzerinde iki kanal oluşturmak amacıyla manyetik bezden yapılmış ikinci kalıp hazırlandı (Şekil 122). Böylece zaman ve malzeme kullanımının azaltılması hedeflendi. Ancak manyetik bezlerin elle kesilmesi sebebiyle standart kanallar oluşturmanın güçlüğü litografi tekniğiyle kalıp oluşturmaya karar verilmesine neden oldu.



**Şekil 121.** Tabanı (siyah ile gösterilen) ve kanalı (beyaz ile gösterilen) manyetik bez kullanılarak oluşturulmuş kalıp ve akış için boru girişini sağlamak amacıyla kullanılan tel. Kanal genişliği: 1 cm, yüksekliği 1mm.



**Şekil 122. A.** İki kanal içeren çip üretimi için manyetik bezden hazırlanan kalıp. Delgeç yarıçapı: 0.7mm, kanal genişliği: 5mm, kanal yüksekliği: 1mm. **B.** İki kanallı kalıptan üretilen PDMS çip.

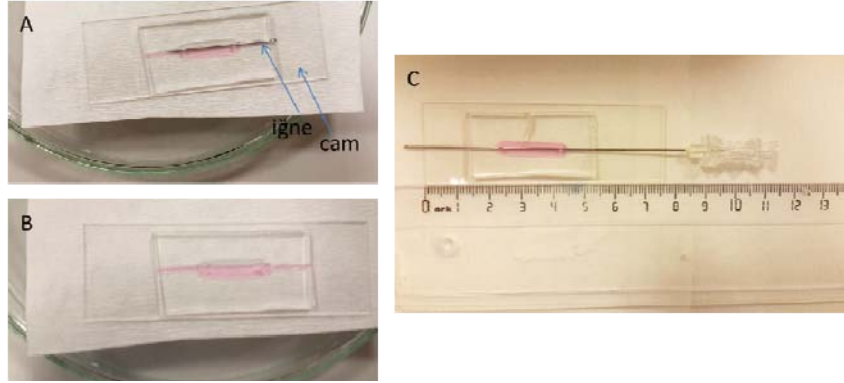
**Manyetik bezlerle 3 boyutlu (3D) kalıp oluşturma optimizasyonu ve PDMS kalıp hazırlama:** Şekil 123A'da manyetik bezler üzerine çizilip kesilen tasarım yine manyetik bez üzerinde sabitlenip üzerine PDMS dökülerek Lab on a Chip (LOC) oluşturuldu. Kanalın iki ucuna yükleme için 1.5 mm'lik delgeçle delikler açıldı. LOC'lar, UV/ozon ile cam üzerinde kalıcı olarak sabitlendi. Sonra Şekil 123B' de yukarıdan aşağıya sırasıyla hamilton şırıngasının kalın ve ince iğnesi, en sonda ise 21 gauge'lık iğne akışın geçeceği kanalın oluşturulması için LOC'lara geçirildi. Matrijel yüklemesi için açılan deliklerden birisi kullanılarak yapıldı diğeri hava çıkışı için açık bırakıldı. Hamilton şırınga iğneleri ile oluşturulmaya çalışılan akış kanallarına, matrijel yüklemesi düzgün bir şekilde gerçekleştirildi. Matrijelin polimerleşmesi için 30 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra iğneler yavaş bir şekilde kanaldan çıkarıldı. Akış kanalının düzgün bir şekilde olup olmadığını gözlemleyebilmek için mavi gıda boyasıyla karıştırılan matrijel, iğneyle oluşturulmuş akış kanalına yüklendi (Şekil 123C).



**Şekil 123.** Üç boyutlu LOC (Lab on a chip) oluşturma ve kalıp hazırlanma basamakları.

Şekil 124A ve Şekil 124B kısmında 21 gauge'lık iğne ile oluşturulmaya çalışılan akış kanalına yüklenen matrijel ve matrijel polimerleştikten sonra iğne çıkarılınca oluşan LOC görülmektedir. Şekil 124A' da iğne yerleştirilip matrijel yüklendi; ancak oluşturulacak akış kanalının dışında kalan kanalın bir tarafına matrijel geçişi sağlanmadığından iğne dışında

kalan kanal kısmı düzgün bir şekilde matrijel ile kaplanamadı. Şekil 124C'de görülen daha kalın olan hamilton şırınga iğnesiyle daha düzgün bir akış kanalı elde edildi. Ancak bu yöntemle tasarlanan üç boyutlu LOC' ların hazırlanması aşamasında her seferinde aynı ve düzgün bir kanal oluşumu matrijelin yüklenmesi ve iğnenin çıkarılması noktalarında sorun yarattığı için UV litografi tekniği ve maske kullanılarak kanal içeren yeni bir tasarımın oluşturma süreci başlatıldı.



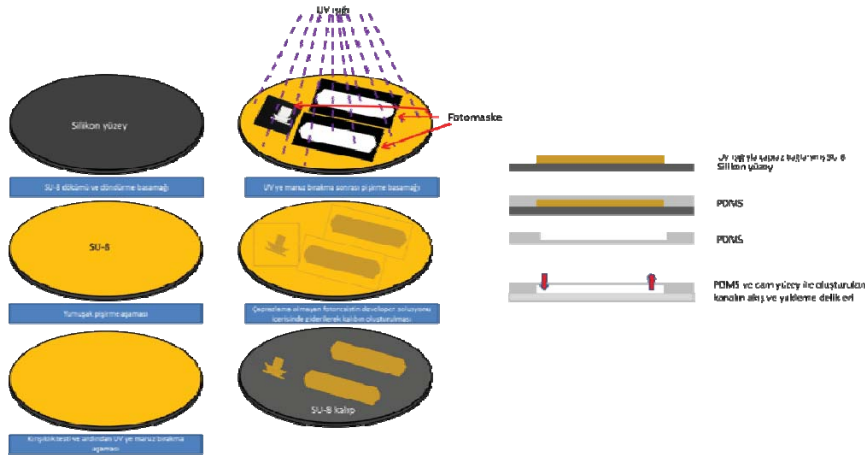
**Şekil 124.** İğne kullanılarak üç boyutlu LOC' ta oluşturulmaya çalışılan akış kanalı görüntüleri.

**UV litografi optimizasyonu:** UV litografi yönteminde kullanılacak yüzey genellikle silikon yüzeydir; çünkü silikon yüzey, SU-8 polimerinin yapışması için cam yüzeye göre daha elverişlidir. Isıtıcı öncelikle 65°C'ye ayarlandı ve silikon tabaka 65°C olan ısıtıcının üzerine konarak yaklaşık 5 dakika bekletildi. Bu bekleme aşaması daha sonra üzerine dökülecek olan SU-8'in daha hızlı yayılmasını sağladı. Yaklaşık 4ml SU-8 ısıtılan silikon tabaka üzerine yavaşça döküldü ve tabaka üzerine yayıldı. Kabaca yayılan SU-8'i eşit olarak yaymak için 'spinner' isimli makine kullanıldı. Bu makineye girilen değerlere göre örneğin dönme aşamasında ne kadar hızda ne kadar sürede yükseleceği, ne kadar süre bu hızda döneceği ve ne kadar sürede duracağı belirlendi. Bu projede uygulanan değerler Tablo 16'de gösterilmiş ve buna göre elde edilen yükseklikler belirtilmiştir. Yükseklik, döndürme işleminin ara basamaklarına bağlı olmakla birlikte SU-8 döküm aşamasında kullanılan SU-8 miktarına da bağlıdır.

**Tablo 16.** SU-8 kalıp hazırlama aşamasında döndürme basamağında uygulanan tarif ve sonucunda elde edilen yükseklik değerleri.

| Yükseklik          | Dönüş hızına ulaşma süresi | Dönüş hızı | Dönüş süresi | Dönüş hızına ulaşma süresi | Dönüş hızı | Dönüş süresi | Dönüş hızına ulaşma süresi | Dönüş hızı |
|--------------------|----------------------------|------------|--------------|----------------------------|------------|--------------|----------------------------|------------|
| 100 mikrometre     | 10 saniye                  | 500 rpm    | 45 saniye    | 5 saniye                   | 1000 rpm   | 30 saniye    | 5 saniye                   | 0 rpm      |
| 185 mikrometre     | 5 saniye                   | 500 rpm    | 10 saniye    | 5 saniye                   | 1000 rpm   | 20 saniye    | 10 saniye                  | 0 rpm      |
| 120-257 mikrometre | 5 saniye                   | 500 rpm    | 45 saniye    | 5 saniye                   | 1000 rpm   | 30 saniye    | 5 saniye                   | 0 rpm      |

UV litografi işleminde birinci gün Silikon yüzeye SU-8 foto-rezistininin dökülmesi, yayılması, yüzeye eşit şekilde yayılması için 'spinner' ile döndürme işlemi, ardından ısıtma basamağını içerir. UV litografi işleminde ikinci gün ilk gün gerçekleştirilen pişirme basamağının yeterliliğini ölçme amaçlı kırışıklık testi ile başlar, daha sonra örnek üzerine belirlenen tasarımı içeren maske yerleştirilir ve örnek UV ışığına belirlenen sürede maruz bırakılır. UV ışığına maruz bırakılma aşamasından sonra örnek ısıtılır ve bir sonraki güne kadar soğumaya bırakılır. Üçüncü gün örnek developer olarak isimlendirilen solüsyona bırakılır ve UV ışığı ile çapraz bağlanma olmayan bölgelerden kurtarılır. SU-8 kalıbı son olarak izopropanol ile yıkanır ve kurulanır, kalıp kullanıma hazır hale getirilir. PDMS kalıp üretimi için UV litografi ile üretilen SU-8 kalıp kullanılır. PDMS karışımı hazırlanarak SU-8 kalıbın üzerine konur ve yaklaşık 2 gün sonra PDMS polimerleşir. Daha sonra PDMS kalıbı SU-8 kalıbından çıkarılır; yükleme deliklerinin oluşturulması ve kalıbın temizlenmesi aşamasından sonra temizlenen lam üzerine UV/ozon ile sabitlenir.



**Şekil 125.** UV litografi yöntemi ile kalıp hazırlama.

Döndürme aşamasından sonra örnek 65°C'ye yerleştirildi ve 5 dakika bekletildikten sonra ısıtıcı 95°C'ye ayarlandı; örnek 30 dakika bu sıcaklıkta bekletildi. Daha sonra ısıtıcı kapatılıp örnek bir gün soğumaya bırakıldı. SU-8 fotorezisti ani sıcaklık değişimlerine duyarlıdır, ani sıcaklık değişimleri kalıpta çatlak ve kırıklara neden olur. UV litografinin ikinci günü örnek, ısıtıcı üzerinden alınıp oda sıcaklığında bekletildi ve bu sırada ısıtıcı 95°C'ye ayarlandı. Isıtıcı istenen sıcaklığa geldiğinde örnek ısıtıcı üzerine konuldu ve SU-8 yüzeyinde kırışıklık olup olmaması durumuna bakıldı. Kırışıklık olan örnekler, 5 dakika daha ısıtılarak oda sıcaklığına alındı. Daha sonra kırışıklık giderilene kadar bu işlem tekrarlandı. Bu aşamadan sonra ısıtıcı 65°C'ye ayarlandı. Örnek oda sıcaklığında bekletildi. UV ışık kaynağına bağlı, tasarlanan deseni istenilen örneğe uygulamak için kullanılan maske hizalama makinesinin örnek yerleştirme bölümü su terazisi yardımı ile düz bir konuma getirildi. Daha sonra örnek yerleştirildi ve ek vakum butonu aktifleştirildi. Tasarlanan maske

örnek üzerine parlak yüzey üst kısma, yazılı kısım alt kısma gelecek şekilde yerleştirildi. UV ışığı belirlenen dozda ve 30 saniye uygulandı. UV ışığına maruz bırakıldıktan sonra örnek daha önceden ayarlanmış ve sıcaklığı dengelenmiş olan 65°C ısıtıcıya yerleştirildi. 5 dakika sonra ısıtıcı 95°C' ye ayarlandı ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletildi. Daha sonra ısıtıcı kapatıldı ve örnek soğuması için bir sonraki güne kadar ısıtıcı üzerinde bekletildi.

UV litografinin üçüncü gününde örnek developer olarak adlandırılan solüsyonda 5 dakika sabit bekletildi. Daha sonra 5 dakika daha aynı solüsyonda çalkalanarak bekletildi. Daha sonra izopropanol ile develop basamağının tamamlanması test edildi. Bunun için örneğin bir köşesine izopropanol damlatıldı. Solüsyon beyaz renk olduğunda develop basamağına devam edildi. Eğer beyaz olmazsa örnek birkaç kez developer solüsyonundan geçirilerek artık SU-8 parçalarından arındırıldı ve developer solüsyonunun etkisini durduran izopropanol solüsyonu ile temizlendi. Örnek, tozsuz peçete ile kurulandı ve PDMS kalıp hazırlanması için kullanıldı.

PDMS kalıp üretimi için üretilen SU-8 kalıplar kullanıldı. SU-8 kalıplar tekrar tekrar kullanılabilir; fakat PDMS kalıplar tek kullanımlıktır. PDMS kalıp hazırlamak için sylingard 184 PDMS elastomer base ve PDMS curing agent ağırlık olarak 10:1 oranında karıştırıldı. Karışım sonucunda bol miktarda oluşan köpükçüklerin giderilmesi için karışım vakum altında tüm köpükçükler giderilinceye kadar bekletildi. PDMS karışımı SU-8 kalıp üzerine döküldü ve iki gün oda sıcaklığında ya da 1 gün 25°C'ye ayarlanmış fırında bekletildi. PDMS polimeri katılaştıktan sonra %70' lik etanol yardımı ile SU-8 kalıbından çıkarıldı. PDMS kalıbı uygun şekilde kesildi ve yükleme yapılabilecek noktalar çeşitli delgeçler ile delindi. Delgeçler farklı çapta yükleme alanları yaratarak yükleme sırasındaki akışı kolaylaştırdı.

PDMS kalıplar, kullanımdan önce temizlik aşamasından geçirildi. Kalıplar yüksek saflıktaki su ile yıkandı ve %70' lik etanolden geçirildi. Etanol kalıntısını gidermek için tekrar yüksek saflıkta sudan geçirildi. Bu ilk temizlik aşamasından sonra kalıplar sırayla etanol ve yüksek saflıkta su içeren kaplara konarak sonikatörde bekletildi, titreşim ile kalıplarda bulunan herhangi bir maddenin veya tozun uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra kalıplar 2 gün oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Hazırlanan PDMS kalıplar daha önceden metanol ve su içinde temizlik için bekletilmiş ve kurutulmuş lam üzerine kalıcı olarak yapıştırılmak için UV/ozona 5 dakika maruz bırakıldı. Bu basamaktan sonra UV/ozon gören PDMS yüzeyi ve cam yüzey birleştirdi ve önceden 100°C' ye ayarlanmış ısıtıcı üzerinde 10 dakika bekletildi. Bu ısıtma işlemi PDMS kalıbın ve cam yüzeyin kalıcı olarak birbirine bağlanmasını sağladı. Aynı zamanda UV/ozon yapılarak yüzeyler organik moleküllerden arındırıldı. UV/ozon gören yüzey hidrofilik özelliğe sahiptir ve hazırlık aşamasında olan çok kanallı LOC de bu özellik yükleme aşamasında negatif bir özelliğe sahiptir. Hidrofilik yapının giderilmesi için LOC ler 24-36 saat süre için 80°C fırında tutuldu ya da 2 saat 120°C' de ısıtıcı üzerinde bekletildi. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan LOC ler laminar kabine yerleştirilerek 30

dakika UV ışığına maruz bırakıldı ve daha sonra oda sıcaklığında kullanıma hazır halde bekletildi.

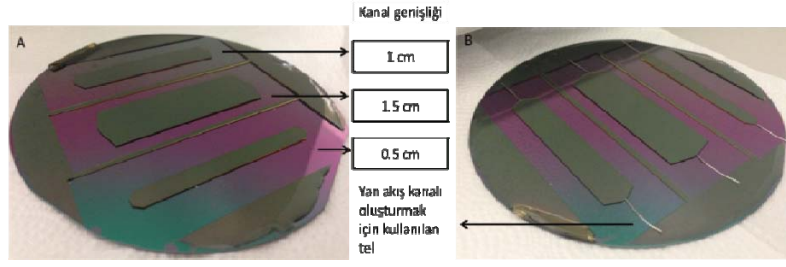
ImageJ programı yardımıyla, oluşturulan kanalın yüksekliği ölçüldü. Bunun için ilk önce SU-8 kalıbına PDMS döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Daha sonra kalıplardan hem kanalın içini hem de dışını kapsayacak şekilde ince bir kesit alındı. Daha sonra bu kalıp faz kontrast mikroskopta 4X objektif ile görüntülendi. Aynı objektifte ölçek olarak kullanılan cetvel de fotoğraflandı. Ölçekte uzun çubuklar 1 mm aralıklı iken, küçük çubuklar 200 mikrometre aralıktır. İki küçük çubuk arası piksel değeri ölçümü, yan kesitten alınan yüksekliğin piksel değeri, mikrometre cinsinden değerine ulaşmamızı sağladı.



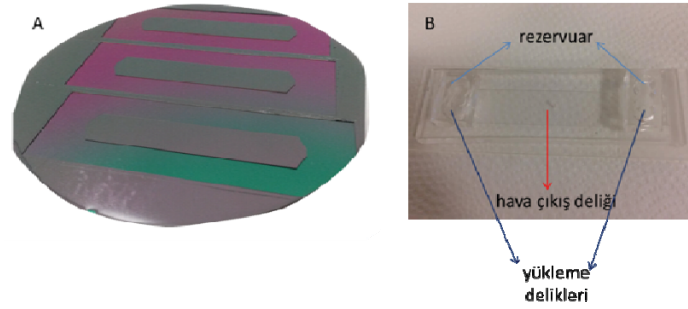
Şekil 126. Örnek kanal kalınlığı hesaplama.

**UV litografi yöntemi ile 2 boyutlu kanal oluşturma:** UV litografi tekniğiyle yüksekliği 240  $\mu\text{m}$ , genişliği 0.5, 1 ve 1.5 cm olan SU-8 kalıp hazırlandı. Yan akış kanalı oluşturmak amacıyla da teller kullanıldı (Şekil 127). Ancak telleri PDMS dökümü sırasında sabit tutmada yaşanan zorluklar ve düz bir şekilde yan kanal oluşturamama akışın yan taraftan değil PDMS üzerinden yapılması zorunluluğunu getirdi. Kanal genişliği 0.5 cm olduğunda görüntülenen alanın küçük olması, 1.5 cm olduğunda ise fazla hücre kullanılması gerektiği için standart kanal genişliği olarak 1 cm'ye karar verildi ve her biri 1 cm genişliğinde olan 3 kanal içeren, yüksekliği 185  $\mu\text{m}$  olan yeni SU-8 kalıp hazırlandı (Şekil 128A). PDMS yüzeyine hücre yapışmasını sağlayabilmek için yeni protokol geliştirildi ve bu sayede akışın üstten yapılabilmesine olanak sağlayan sistem elde edildi. İki boyutlu LOC hazırlamak için kanalın ortasına bir adet hava çıkış deliği kanalın başına ve sonuna birer tane yükleme deliği açıldı. UV/ozona maruz bırakılarak kanalın üstüne ek kültür ortamı sağlayacak olan rezervuar yapıştirildi. Oluşturulan kanal yine UV/ozon ile cam yüzeye sabitlendi(Şekil 128B).



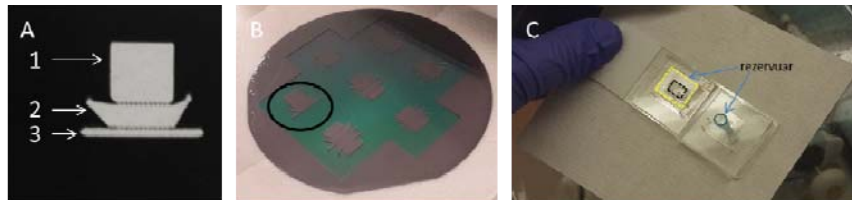


**Şekil 127. A.** Litografi tekniğiyle üretilmiş kanal genişliği 0.5, 1, 1.5 cm ve yüksekliği 240 µm olan SU-8 kalıp. **B.** Oluşturulan SU-8 kalıbın yan akış kanalı için kullanılan tel ile gösterimi.



**Şekil 128. A.** Her bir kanal genişliği 1 cm ve yüksekliği 185 µm olan SU-8 kalıp. **B.** 2 boyutlu LOC.

**UV litografi yöntemi ile 3 boyutlu (3D) kanal oluşturma:** Şekil 129-1 ile gösterilen rezervuar bölgesindeki delikler 2 mm ve 0.75 mm çapında delgeçle kültür ortamının difüzyonunun daha kolay olması için 1. ve 2. bölge arasındaki sütunlara yakın olacak şekilde açıldı. 2. ve 3. bölgede yükleme ve akış için kullanılacak olan ikişer delik 1.5 mm çapındaki delgeçle açıldı. MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri eşit hücre sayısında,  $3 \times 10^6$ /ml, olacak şekilde sayıldıktan sonra matrijel ile 1:1 karıştırıldı. 2. bölgeye sağ ve soldan açılan deliklerden sırayla hücrelerden birinin yüklemesi yapıldıktan sonra LOC üzerinde 2. bölge dışındaki tüm delikler bantla kapatılmak suretiyle diğer hücrenin yüklemesi yapıldı. Matrijel yüklemesi yapılmış LOC'ler hücrelerin cam yüzeye yapışmaması için ters çevrilerek 1 saat süre ile 37°C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırıldı.

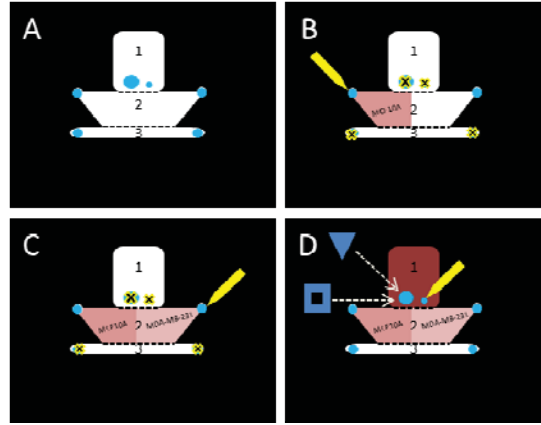


**Şekil 129.** 3 boyutlu LOC üretimi için geliştirilen maske tasarımı. **A.** Maske tasarımları **B.** UV litografi basamağı sonrası elde edilen kalıp **C.** Cam üzerine sabitlenmiş PDMS LOC.

Polimerleşme gerçekleşikten sonra, Şekil 130D' de rezervuar olarak; 100-1000 mikrometrelik pipetlerin uçları kesilerek oluşturulan haznelere ya da kare şeklinde kesilip



ortası delinen PDMS parçaları kalıcı olarak UV/ozon yapılarak LOC üzerine yerleştirilerek kullanıldı. Hücre kültür ortamı olarak daha önce üç boyutlu hücre denemeleri için yapılan kültür ortamı denemelerinin sonuçlarına dayanılarak MCF10A hücre kültür ortamı seçildi. Hücre yüklemesi yapılan LOC' ler, petri kabında hücrelerin nem ortamını sağlamak için kabın içine biraz su ya da ıslatılmış kurutma kağıdı konulup rezervuarlara kültür ortamı eklenerek inkübatöre yerleştirildi. 3 boyutlu LOC için üretilen tasarımda Şekil 130A'da rezervuar 1 ile, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile MCF10A sağlıklı meme epitel hücrelerinin birlikte kültürlerinin yapılacağı kısım 2 ile, akışın yapılacağı kısım 3 ile gösterilmiştir.



**Şekil 130.** 3 boyutlu ortamda iki farklı hücre hattının birlikte kültürüne ve akışa olanak sağlayan LOC tasarımına hücre yüklenmesi 3 boyutlu LOC'un hazırlanma basamakları.

**MDA-MB-231 kültür ortamı hazırlama:** Kültür ortamı hazırlamadan bir gün önce, -20°C' den daha önce alikotu hazırlanmış 50 ml fetal sığır serumu, 5 ml L-glutamin, 5 ml Pen-strep +4 °C' de saklandı. Hazırlık aşaması laminar kabinde gerçekleşti. DMEM yüksek glikoz içeren serumsuz kültür ortamı firmadan 500 ml olarak temin edildi. Serum oranını 1:10 sağlamak için DMEM yüksek glikozdan 50 ml falkona alındı ve +4 °C' de saklandı. DMEM yüksek glikoz şişesine 50 ml fetal sığır serumu, L-glutamine ve Pen-strep eklendi. Şişe içindekilerin karışması için yaklaşık 10 kez döndürüldü ve PES filtre sisteminden geçirildi. Kültür ortamı +4 °C' de saklandı.

**MCF10A kültür ortamı hazırlama:** Kültür ortamı hazırlamadan bir gün önce, -20°C' den daha önce alikotu hazırlanmış 25 ml donor at serumu, 5 ml L-glutamin, 5 ml Pen-strep +4 °C' de saklandı. Hazırlık aşaması laminar kabinde gerçekleşti. DMEM-F12 serumsuz kültür ortamı firmadan 500 ml olarak temin edildi. 25 ml donor at serumu 50 ml' lik falkonlarda alikot halinde daha önceden hazırlandı. Bu 50 ml' lik falkon içine 12-13 ml DMEM-F12, Pen-strep, L-glutamin eklendi. -20 °C de saklanan hidrokortizol (250 µl), insulin (500 µl) ile +4 °C' de saklanan koleratoksin (50 µl) eklendi. Son olarak -80 °C' de saklanan epidermal büyüme faktörü (100 µl) falkon içine eklendi. Daha sonra falkondaki karışım



DMEM-F12 şişesine aktarıldı. Şişe içindekilerin karışması için yaklaşık 10 kez döndürüldü ve PES filtre sisteminden geçirildi. Kültür ortamı +4 °C' de saklandı.

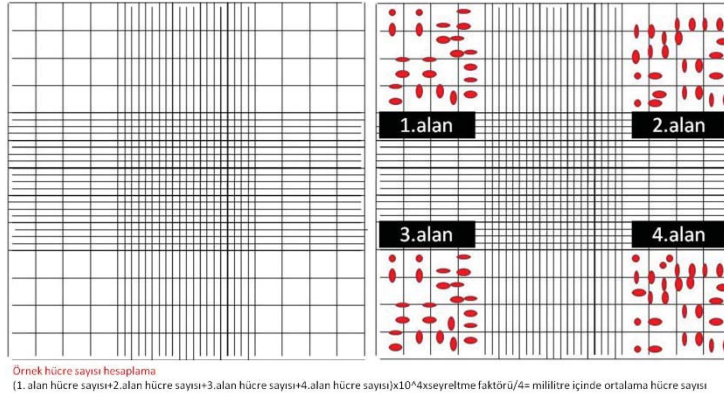
**MDA-MB-231 ve MCF10A hücre pasajı:** Hücre pasajı öncesinde hücreler mikroskop altında kontrol edildi, eğer %80-90 yüzey alanını kaplama varsa pasaj yapıldı. Pasaj öncesi laminar kabin steril hale getirildi. Kabin içine alınan her şey %70' lik etanol ile sterilize edildi. Kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi için tripsin-EDTA solusyonu ve kültür ortamı +4 °C' den oda sıcaklığına alındı. Hücreler 100 mm olan petri üzerinde büyütüldü. Hücrelerin üzerinde bulunan kültür ortamı vakum ile çekildi ve petri kabına 2 ml tripsin-EDTA eklendi. Bu aşamada eski kültür ortamından kurtulmak amaçlandı. Petri kabı içerisindeki tripsin-EDTA vakum ile çekildi ve hücreleri kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin-EDTA eklendi. Petri 37 °C' de MDA-MB-231 için 3 dakika MCF10A için 17 dakika bekletildi. Bekleme aşamasında yeni 100 mm petri kabına 10 ml taze kültür ortamı eklendi ve 37 °C %5 CO<sub>2</sub>' de sabitlenen inkübatöre kaldırıldı. 15 ml' lik falkon çıkarıldı. Bekleme aşamasından sonra petri kabı mikroskop altında incelendi; hücrelerin yaygın halden yuvarlak hale geçtikleri ve bir kısmının yüzdüğü görüldü. Petri kabına çevresinden ve alt tabanından hafifçe vuruldu ve mikroskop altında gözlendi. Hücrelerin büyük bir kısmının yüzdüğü görüldü. Laminar kabine alınan petriye tripsin-EDTA etkisini durdurmak amacıyla serum içeren 1 ml kültür ortamı eklendi. Toplamda 5 ml solüsyon barındıran petride solüsyon pipetle alınıp bırakılmasıyla yüzeyde tutunan hücrelerin ayrılması sağlandı ve solüsyon 15 ml' lik falkona alındı. Petri kabına 5 ml kültür ortamı eklendi ve yine aynı şekilde solüsyon pipetle çekilip bırakıldı, hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı, solüsyon 15 ml' lik falkona eklendi. Petri mikroskop altında gözlendi ve hücre kültürü çöpüne atıldı. 15 ml' lik falkon 1000 rpmde 5 dakika santrifuj edildi. Üst kısım vakum ile çekildi, pellet 1000 µl kültür ortamında çözüldü. Hücre sayımı için tüp içine 90 µl kültür ortamı 10 µl hücre bulunduran solüsyondan konuldu(1:10 seyreltme). Çözülen hücre istenilen oranda daha önce inkübatöre konulan petri içerisine eklendi ve petri X-Y yönlerinde hareket ettirilerek hücrelerin eşit oranda yüzeye yayılması sağlandı. Petri kabı 37 °C %5 CO<sub>2</sub>' de saklandı. Pasaj her 2-3 günde bir yapıldı.

**Hücre Dondurma:** İki günde bir %80-90 oranında yüzey kaplama düzeyine ulaşan 1/2 ve 1/4 pasaj oranıyla sırasıyla MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatları yüzeyden kaldırılıp santrifuj işlemiyle çöktürüldükten sonra 1000 µl kendilerine ait yeni kültür ortamında çözüldüler. Hücrelerin donma sürecinde, su moleküllerinin donarken membrana zarar vermesini önlemek amacıyla kriyo koruyucu olarak DMSO (dimetil sülfoksit) kullanıldı. Toplam hacimde %5 olacak şekilde hazırlanan DMSO ayrı bir falkon tüpünde 1000 µl kültür ortamının içine konuldu. Diğer falkon tüpünde 1000 µl kültür ortamında çözülmüş olan hücrelerin üzerine 1000 µl' lik DMSO'lu kültür ortamı, hücrelerin şoka uğramaması için damla damla yavaş bir şekilde konuldu. 2000 µl' lik toplam hacim her birinde 1000 µl olacak şekilde iki kriyo tüpe konuldu. Hücreler, hücrelerin şoka uğramadan kademeli bir şekilde

dondurulmasını sağlayan izoproponol içeren dondurucu kap içinde  $-80^{\circ}\text{C}$ ' ye konuldu. 24 saat sonra sıvı azota kaldırıldı.

**Hücre Çözme:** Sıcak su banyosu  $37^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlandıktan sonra sıvı azot tankından çıkarılan daha önce dondurulmuş kriyo tüpler içinde bulunan hücreler, tüpün yarısı suyun içine girecek şekilde çözünme işlemi gerçekleştirilene kadar bekletildi. 9 ml kültür ortamının içine 1 ml olan çözünmüş hücreler konularak daha önce dondurma işlemi için kullanılan DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak için santrifüj yapıldı. Hücreler  $1000\ \mu\text{l}$  lik kültür ortamında çözülerek önceden ısınması için inkübatöre konulan 10 ml kültür ortamı içeren petri kabına konuldu. 24 saat sonra hücrelerin kültür ortamı değiştirildi. Hücreler pasaja hazır hale gelip yüzeyi kaplayana kadar hücrelerin kültür ortamı iki günde bir değiştirildi. Yeni açılan hücreler, en az iki pasaj geçtikten sonra deneylerde kullanıldı.

**Hücre Sayımı:** Hücreler pasaj sonrası 1 ml kültür ortamında çözüldü ve sayım için 1:10 oranında seyreltilti. Hücreler, Şekil 131'de gösterilen hemositometreye yüklenmeden önce birbirlerinden ayrılmaları için pipetlendi. Yükleme sonrası faz kontrast mikroskopta gözlem yapıldı. Hemositometre üzerinde var olan 4 alanda bulunan hücre sayısı Şekil 131'de gösterilen ayrı ayrı hücre sayım aleti ile sayıldı ve bu sayılar toplandı. Sayı 4 alanın ortalamasını almak amacıyla dörde bölündü, seyreltme faktörü ile çarpıldı ( $1:10$  seyreltme için 10 ile çarpıldı). Daha sonra düzeltme faktörü ile çarpıldı. MDA-MB-231 hücreleri 100 mm petride yaklaşık 6 milyon hücre/ ml iken MCF10A hücreleri genellikle 10 milyon hücre/ ml hesaplandı.



**Şekil 131.** Hücre sayımı için kullanılan hemositometre.

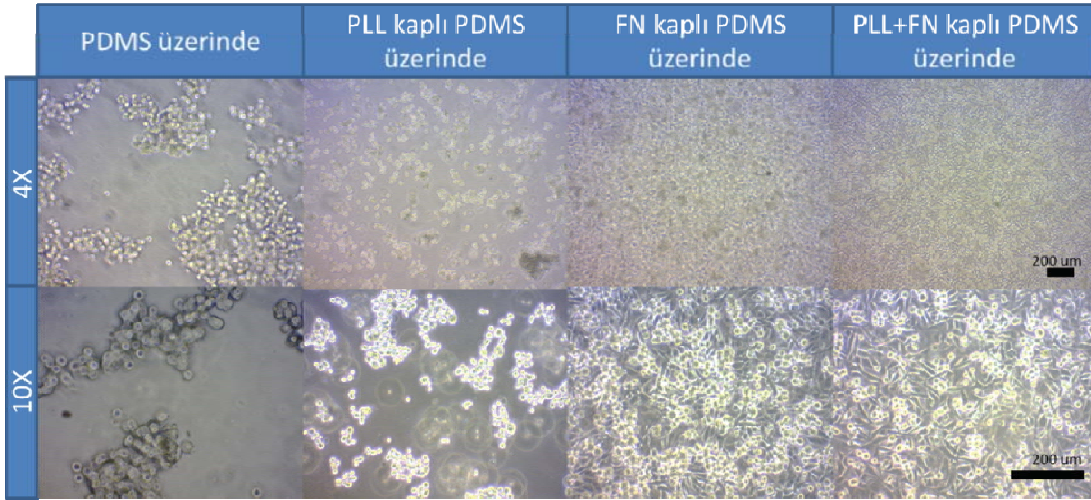
**2 boyutlu LOC sisteminde yüzey modifikasyonu ve hücre kültürü optimizasyonu:** Hücrelerin PDMS yüzeyine yapışmasını sağlayabilmek için PDMS; poli-L-lizin (PLL), fibronektin (FN) ve PLL+FN ile kaplanarak görüntüleme yapıldı. PLL hücrelerin yapışması için kullanılan bir aminoasit olması sebebiyle, FN ise hücrelerarası sıvı içerisinde oldukça çok bulunan bir glikoprotein olduğu için tercih edildi. Kontrol olarak kaplama yapılmamış PDMS yüzeyi kullanıldı. Denemeler sonucunda en iyi yapışmanın PDMS üzerine

PLL+FN kaplanmış olan kanallarda olduğu gözlemlendi (Şekil 132). Bu işlem için camla yapıştırılmış kanallar UV altında 30 dakika bekletildikten sonra PLL kaplanması için 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra PLL vakumla çekilerek FN eklendi ve kaplanması için 1 saat daha inkübe edildi. FN kaplanması işlemi tamamlandıktan sonra kanallardan FN çekilerek yüksek saflıkta su ile yıkama yapıldı ve 2 boyutlu LOC' ler kullanılabildiği kadar vakum altında saklandı. FN için farklı iki konsantrasyon (0.025 mg/ml ve 0.0125mg/ml) denendi ve 0.0125mg/ml konsantrasyonun yeterli olduğu sonucuna varıldı (Şekil 133).

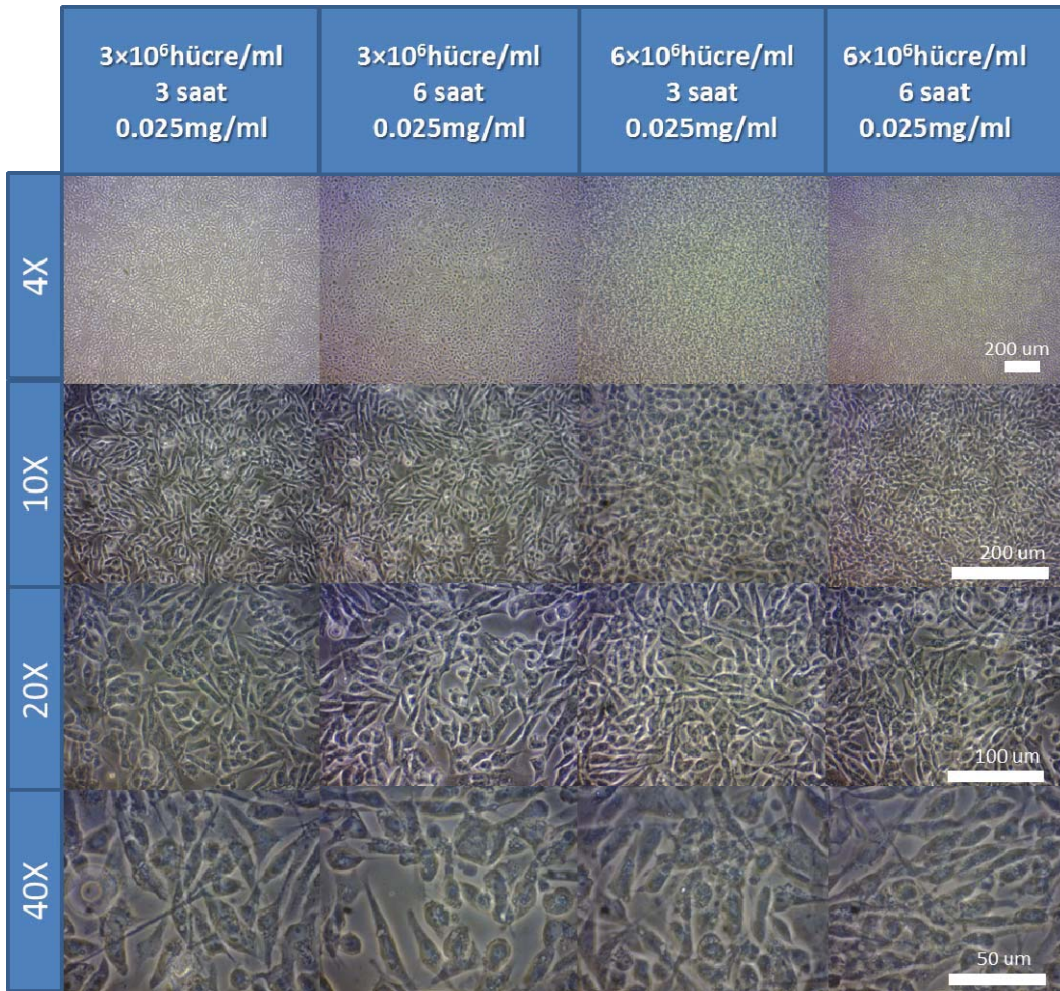
**Tablo 17.** Yüzey, hücre sayısı ve kültür süresi optimizasyonu için denenen kombinasyonlar.

| Yüzey    | Hücre sayısı            | Kültür süresi | Yüzey       | Hücre sayısı            | Kültür süresi |
|----------|-------------------------|---------------|-------------|-------------------------|---------------|
| PDMS     | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 3 saat        | PDMS+FN     | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 3 saat        |
| PDMS     | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 6 saat        | PDMS+FN     | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 6 saat        |
| PDMS     | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        | PDMS+FN     | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        |
| PDMS     | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        | PDMS+FN     | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        |
| PDMS     | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        | PDMS+FN     | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        |
| PDMS     | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        | PDMS+FN     | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        |
| PDMS+PLL | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 3 saat        | PDMS+PLL+FN | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 3 saat        |
| PDMS+PLL | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 6 saat        | PDMS+PLL+FN | 1.5×10 <sup>6</sup> /ml | 6 saat        |
| PDMS+PLL | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        | PDMS+PLL+FN | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        |
| PDMS+PLL | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        | PDMS+PLL+FN | 3×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        |
| PDMS+PLL | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        | PDMS+PLL+FN | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 3 saat        |
| PDMS+PLL | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        | PDMS+PLL+FN | 6×10 <sup>6</sup> /ml   | 6 saat        |



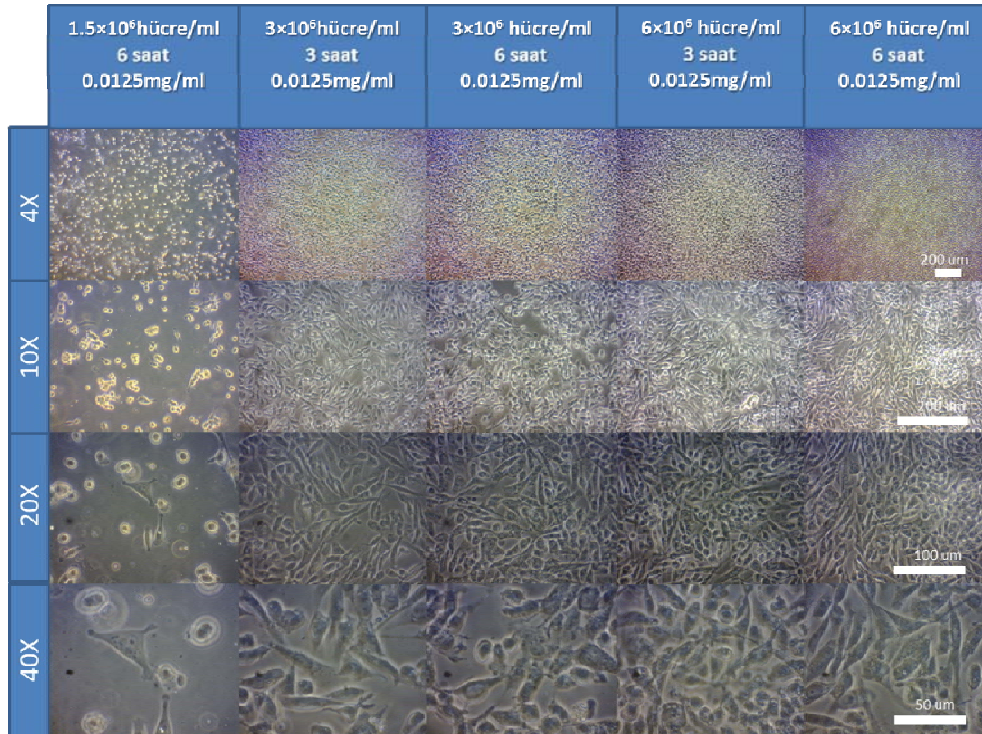


**Şekil 132.** PDMS, PLL kaplı PDMS, FN kaplı PDMS, PLL+FN kaplı PDMS yüzeyi üzerinde 4X ve 10X objektifte çekilmiş hücre fotoğrafları.



**Şekil 133.** PLL ve 0.025 mg/ml konsantrasyonda FN kaplı PDMS yüzey üzerinde, farklı hücre konsantrasyonları ve kültür sürelerinde 4X, 10X, 20X, 40X objektif kullanılarak çekilen hücre fotoğrafları.

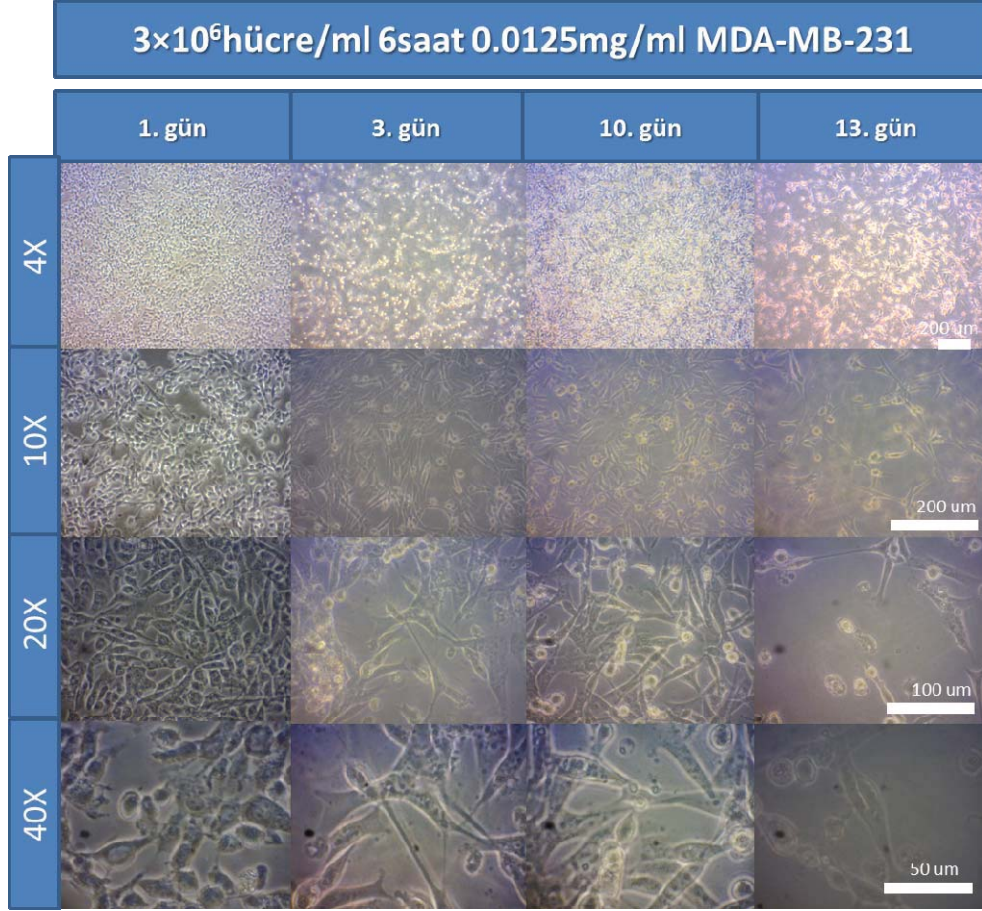
Hücre sayısı optimizasyonu için 3 farklı konsantrasyon ve 2 farklı kültür süresi kullanılarak 6 kombinasyon denendi. Hücre sayısı olarak  $1.5 \times 10^6$  hücre/ml,  $3 \times 10^6$  hücre/ml,  $6 \times 10^6$  hücre/ml kullanıldı, kültür süresi olarak ise 3 saat ve 6 saat denendi.  $1.5 \times 10^6$  hücre/ml kullanımının 3 ve 6 saat sonunda PDMS üzerinde yeterli kaplamayı sağlamadığı gözlemlendi. Kültür süresinin uzatılması kültür ortamının azalmasına sebep olacağından ve kültür süresince rezervuarla ek kültür ortamı sağlanamayacağı için daha uzun kültür süresi denenmedi.  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre konsantrasyonunun 6 saat kültür süresiyle kanalın tamamen hücre ile kaplanması için yeterli olduğu sonucuna varıldı.  $6 \times 10^6$  hücre/ml hücre konsantrasyonu 3 saat ve 6 saatte kaplanmayı sağladı, ancak daha az hücre kullanılması için denemelerde  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre konsantrasyonu kullanılmasına ve 6 saat kültür süresi uygulanmasına karar verildi (Şekil 134).



**Şekil 134.** PLL ve 0.0125 mg/ml konsantrasyonda FN kaplı PDMS yüzey üzerinde, farklı hücre konsantrasyonları ve kültür sürelerinde 4X, 10X, 20X, 40X objektif kullanılarak çekilen hücre fotoğrafları.

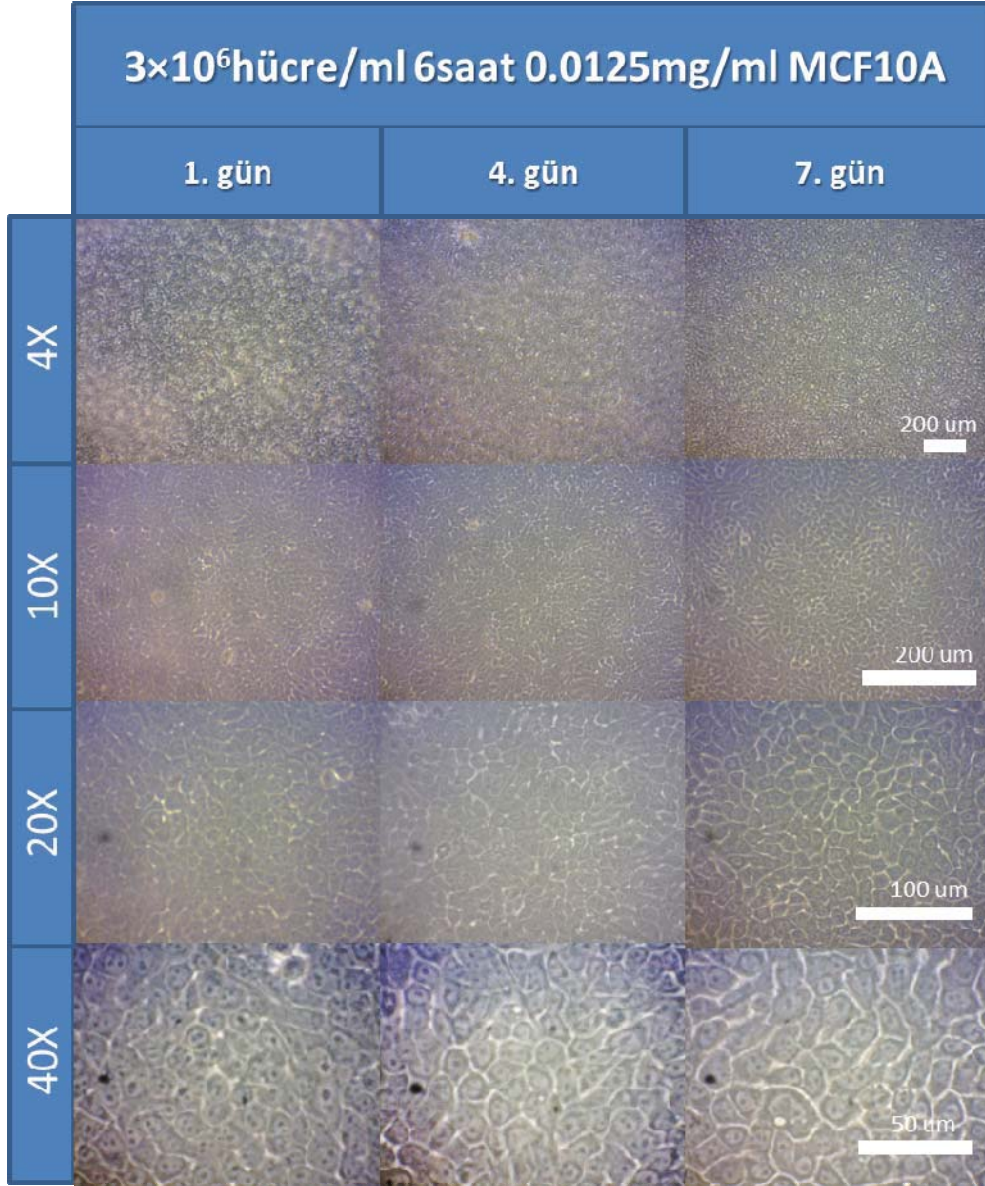
Optimizasyon sonunda karar verilen koşullarda (PLL+FN kaplı PDMS yüzeyinde  $3 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyon ve 6 saat kültür süresi) projede kullanılacak olan MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatları çeşitli günlerde fotoğrafları çekilerek gözlemlendi. Her iki hücre hattının da çip içerisinde uzun süre sağlıklı olarak yaşamaya devam ettikleri görüldü (Şekil 135; Şekil 136).





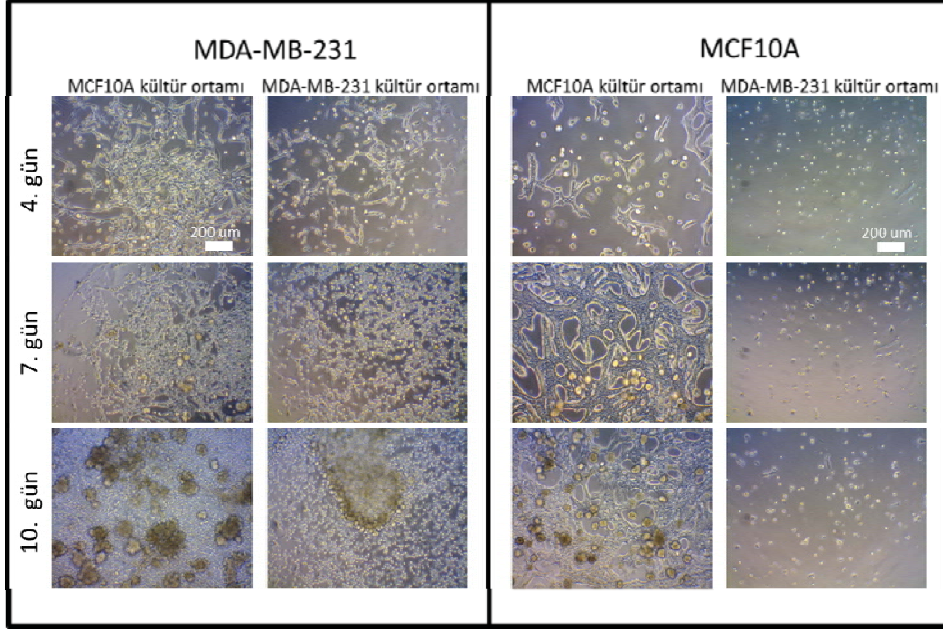
**Şekil 135.** PLL+FN kaplanmış PDMS yüzey üzerinde 3×10<sup>6</sup> hücre/ml konsantrasyonunda 6 saat kültürlenmiş MDA-MB-231 hücrelerinin farklı günlerde 4X, 10X, 20X, 40X objektifle çekilmiş fotoğrafları.





**Şekil 136.** PLL+FN kaplanmış PDMS yüzey üzerinde  $3 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyonunda 6 saat kültürlenmiş MCF10A hücrelerinin farklı günlerde 4X, 10X, 20X, 40X objektifle çekilmiş fotoğrafları.

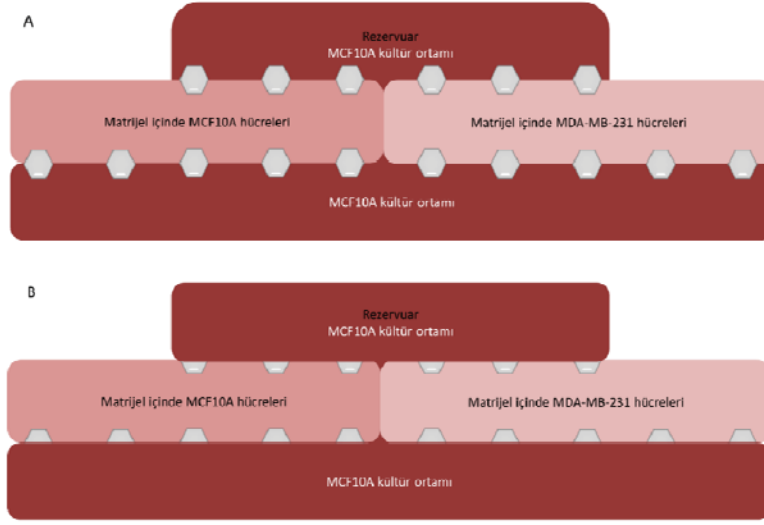
**Deneylerde Kullanılacak Kültür Ortamı Denemeleri:** Deneylerde MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarının kültürü LOC içerisinde birlikte yapılacağından her iki hücre hattının da sağlıklı bir şekilde büyüebileceği kültür ortamını bulabilmek için denemeler yapıldı. Matrijel ve hücreler 1:1 oranında karıştırılarak nokta halinde petri kabına konulan matrijel içindeki hücreler ters çevrilerek matrijelin polimerleşmesi için yarım saat bekletildi. Daha sonra üzerlerine farklı kültür ortamları konularak 10 güne kadar hücrelerin büyümesi ve çoğalması gözlemlenerek fotoğrafları çekildi (Şekil 137).



**Şekil 137.** MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin MCF10A, MDA-MB-231 kültür ortamlarındaki görüntüleri.

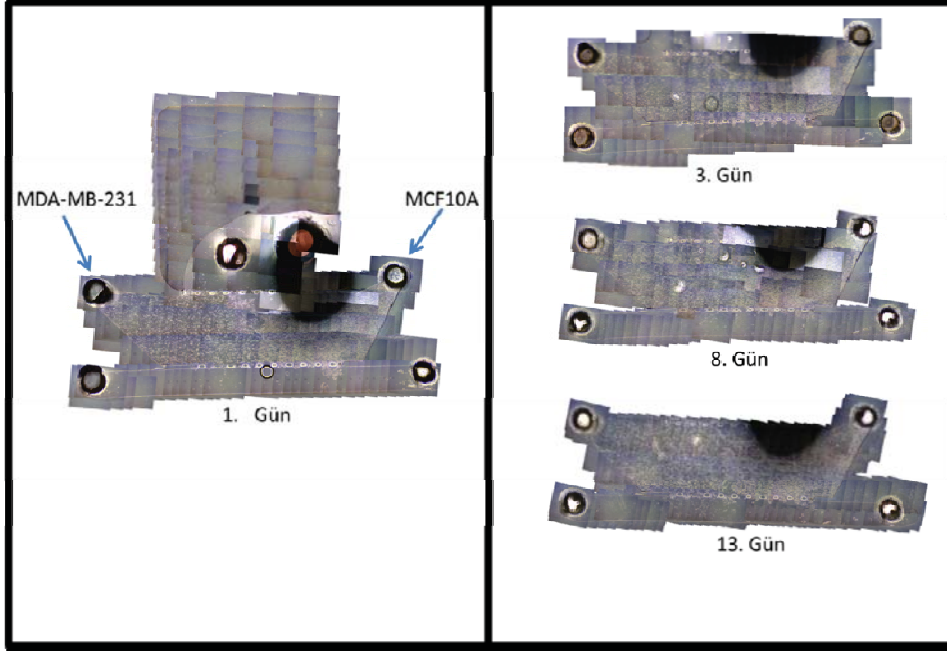
MCF10A hücreleri MDA-MB-231 kültür ortamlarında olağan seyrinde büyüme ve çoğalma gösteremezken MDA-MB-231 hücreleri, MCF10A kültür ortamında olağan seyrinde büyüme ve çoğalma gösterdiler. Bu sonuçlara dayanarak deneylerde iki hücrenin birlikte kültürü için MCF10A kültür ortamının kullanılmasına karar verildi. Görüntüler 4X objektif kullanılarak çekildi.

**3 boyutlu LOC sisteminde sütun tasarımı:** 3 boyutlu hücre kültürü uygulanacak olan LOC sisteminde iki farklı hücre hattı (MCF10A sağlıklı meme epitel hücresi ve MDA-MB-231 meme kanseri hücresi) aynı anda gözlem yapmak ve aynı koşulları sağlamak amacıyla tek LOC içinde kullanıldı. İki hücre hattının da büyümesini sağlayan MCF10A kültür ortamı LOC içinde akış kanalı olacak kanala ve rezervuar alanına yüklendi. Şekil 138A' da kanalları birbirinden ayıran sütun tasarımı bir sonraki iş paketinde olan akış sisteminde problem yaratmaması için altıgen tasarımdan(Carlos P. Huang ve diğerleri, 2009) ikizkenar yamuk (Şekil 138B) olacak şekilde değiştirildi. Böylece akış halinde yüklenen solüsyonun herhangi bir dalgalanma olmaksızın ilerlemesi, solüsyonun sütun ile olan çarpışmasının azalması ve seçici olmayan bağlanma yüzeyinin azaltılması amaçlandı.



**Şekil 138.** 3 boyutlu deneylerde kullanılacak olan tasarımda kanalları ayıran sütunların gelişimi.

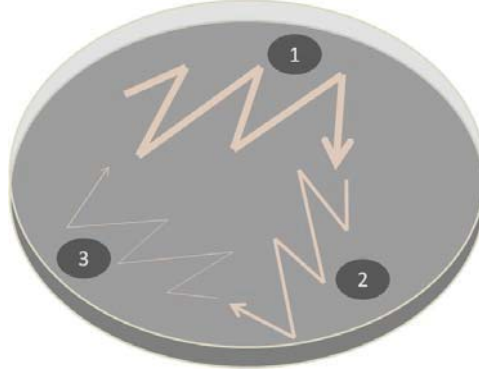
**3 boyutlu LOC içinde iki hücre hattının birlikte kültür denemeleri:** Şekil 139' deki LOC' de sağ tarafa MCF10A hücresi, sol tarafa MDA-MB-231 hücresi yüklemesi yapıldı. Yapılan deneylerde hem MDA-MB-231 hem de MCF10A hücreleri 1. günlerinde yuvarlak olarak gözlemlendi. 3. günlerinde ise hücrelerin yayılarak çoğalmaya başladıkları gözlemlendi. İlerleyen günlerde ise hücrelerin daha çok çoğalarak sayılarını arttırdıkları ve kanal dışına çıktıkları gözlemlendi. 8. günden itibaren tümör yapısını yansıtan morfolojik yapılar gözlemlendi. 3 boyutlu LOC içinde, hücrelerin morfoloji ve bölünme özelliklerini koruyarak canlılıklarını 2 haftadan fazla süre ile devam ettirdikleri gözlemlendi.



**Şekil 139.** Birlikte kültürü yapılan MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin LOC içinde 1-3-8 ve 13. günlerindeki görüntüleri. Hücreler, akış olmayan LOC içinde 3. günde morfolojik olarak sağlıklı gözlemlenirken daha sonraki günlerde hücrelerin akış kanalına doğru geçiş yaptıkları gözlemlendi.

**Transfeksiyon:** Birden fazla hücrenin bir arada bulunacağı LOC sistemlerinde hücrelerin birbirinden ayırt edilebilmesi transfeksiyon yapıldı. Floresan ışık altında hücrelerin farklı renklerde görünebilmesi için hücreler floresan madde sentezleyen plazmidlerle transfekte edildi. Plazmidler firmadan bakteri içinde gönderildi. Bu aşamada plazmidler hücrelere aktarılamadı. Bunun için ilk önce bakteriler gerekli besin ortamında büyütüldü. Bakteri hücreleri seçildi ve plazmid izolasyonu yapıldı. Toplanan plazmidin yoğunluğu tespit edildi ve hem lipozom ile hem de elektroporasyon ile hücrelere aktarım sağlandı. Firmadan alınan plazmidler bakteri içinde bulunmaktaydı, plazmid içerisindeki nükleotid dizileri floresan ışık altında renk veren proteinler sentezlediği için satın alındı. Bu, hücreleri birbirlerinden ayırt etmek için gerekiyordu. Nükleotid dizileri ayrıca bakteri içinde seçilim için gerekli antibiyotik direnç geni ve ökaryotik hücre içinde seçilim için gerekli antibiyotik direnç geni içerir. Elde varolan tüm plazmidler için bakteriyel antibiyotik direnç geni kanamisinini, ökaryotik antibiyotik direnç geni neomisinini içermekteydi. LB-kanamisin besi yeri üzerinde stoktan 20-200 µl' lik tip ucu ile alınan bakteriler, besi yeri üzerinde çizikler oluşturularak bakteri seçilimi gerçekleştirildi. Stoktan alınan tip ucuyla önce yoğun bakteri içeren çizik (Şekil 140 1.çizik), daha sonra başka bir tip ucuyla yoğun çizikten alınan bakteri ile başka bir çizik (Şekil 140 2. Çizik) ve en az konsantrasyon içeren çizik (Şekil 140 3. çizik) oluşturuldu. Farklı konsantrasyondaki bakteri miktarı içeren ekimler tek koloni elde etmek için gerçekleştirildi.





**Şekil 140:** Tek bakteri kolonisi elde etmek için katı besi yerine ekim. Deneysel adımların gösterildiği bir petri kabı. 1. Adım: Katı besiyerine bakterilerin ekilmesi. 2. Adım: Bakterilerin besiyerinde yayılması ve kolonilerin oluşması. 3. Adım: Tek koloninin seçilmesi.

Bakteri ekim aşamasındaki tüm deneyler ateş başında yapıldı, böylece kontaminasyon riski yok edildi. Besi yeri kanamisin antibiyotiği içerdiğinden kanamisin antibiyotiğine dirençli olmayan bakteriler bu ortamda büyüyemedi. Bu deneysel adım bakterilerin büyümesi için gerekliydi, aynı zamanda firma tarafından yapılabilecek olan yanlış etiketleme durumunu değerlendirmek için ilk adımdı. LB-kanamisin besiyeri üzerine ekim genellikle akşamüstü yapıldı ve hücrelerin büyümesi için bir sonraki sabaha kadar sadece bakterilerin konabileceği bir fırında 37°C’ de bekletildi. Hücreler kontrol edildi ve tek koloni seçildi. Katı besiyeri ve sıvı besiyeri arasındaki fark katı besiyeri içeriğinde agar maddesinin bulunmasıdır. Seçilen koloni mini kültür olan 4 ml sıvı LB- kanamisin besiyerine alındı ve seçim yapılan tip ucu da sıvı besiyerinde kalacak şekilde karıştırıcıda 120 rpm 37 °C’ de bir gece bırakıldı. Seçim yapılan katı besiyeri yedek olarak +4 °C’ de saklandı. Midi kültür yapmak üzere 100 ml sıvı LB-kanamisin içerisine bakterilerin büyütüldüğü midi kültür LB-kanamisin besiyerinden 100 µl eklendi ve karıştırıcıda 150 rpm 37 °C’ de bir gece bırakıldı. Mini kültür tüpleri +4 °C’ de saklandı. Midi kültür erlenleri midi prep protokolü bakterilerden plazmid izolasyonu için kullanıldı. Midi prep protokolü için “Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kits” kullanıldı ve ilgili kitin kitapçığında belirtilen şekilde işlemler takip edildi. Öncelikle midi prep sütunlarından 15 ml dengeleme tamponu (EQ1) geçirildi. Bu sırada 100 ml sıvı besiyerinde büyümüş bakteriler ikiye bölünerek 50 ml’ lik falkon tüplere aktarıldı ve 4000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve çökelti RNase A içeren 10 ml yeniden-süspansiyon (resuspension-R3) tamponunda çözüldü. Solüsyon nazikçe tamamen homojen olana kadar çalkalandı. Solüsyon yeni 50 ml’ lik falkona aktarıldı ve içerisine 10 ml liziz tamponu (L7) eklendi ve homojen olana kadar karıştırıldı. Lizata 10 ml çökeltme tamponu eklendi.

Solüsyon daha önceden hazırlanan midi prep sütunlarından geçirildi. Geçirme işlemi için yaklaşık bir saat bekletildi çünkü akış sistemi yerçekimi kuvvetiyle sağlandı. Sütundaki

kalıntılar yıkama tamponundan (W8) geçirildi. Sütun içindeki filtre atıldı ve filtre 20 ml yıkama tamponundan (W8) geçirildi. Bu filtrede de solüsyon akışları yerçekimi ile gerçekleşti. Filtre altına 50 ml' lik falkon tüp yerleştirildi. Sütundan 5 ml elüsyon tamponu geçirildi. Elüsyon tüpüne 3.5 ml izopropanol eklendi ve 2 dakika beklemede bırakıldı. Daha sonra +4°C 12000 g de 30 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Çökelti 3 ml %70' lik etanol ile çözüldü. Tüp +4°C 12000 g de 5 dakika santrifüje bırakıldı. Üst kısım atıldı. Çökelti yaklaşık yarım saat oda sıcaklığında fazla alkolün buharlaşması için bekletildi. Çökelti 40 µl yüksek saflıkta suda çözüldü ve -20°C' de saklandı. Midi prep plazmid izolasyonundan sonra nano-drop ile solüsyon içerisinde bulunan plazmid miktarı belirlendi. Bunun için -20 °C' de saklanan plazmid tüpleri buz banyosu içinde bekletildi. Plazmid miktarı ile DNA/RNA (260/280) ve etanol/protein (260/230) kontaminasyon varlığına bakıldı.

**Tablo 18.** Plazmid yoğunluğunun 40 µl yüksek saflıkta su içinde çözüldükten sonra nano-drop ile ölçümünden elde edilen sonuçlar.

| Plazmid adı                            | Bakteriyel antibiyotik direnç geni | 260/280 | 260/230 | Plazmid miktarı( ng/ul) |
|----------------------------------------|------------------------------------|---------|---------|-------------------------|
| pcDNA3 mCherry LIC cloning vector (6B) | Kanamisin                          | 1.50    | 1.76    | 5326.9                  |
| pcDNA3-mRFP                            | Kanamisin                          | 1.30    | 1.52    | 5489.3                  |

Nano-drop sonucu örneklerin saflık olarak uygun olmadığı ve plazmid miktarının yüksek çıkması ile sonuçlandı; fakat bu durum nano-drop sonucu 5000 ng/ µl üzeri olduğunda makinenin doğru sonuç vermediği ile doğrulandı. Plazmid solüsyonu 100 µl olacak şekilde tamamlandı ve daha sonra tekrar nano-drop ölçümü yapıldı (Tablo 4).

**Tablo 19.** Plazmid yoğunluğunun 100 µl yüksek saflıkta su içinde çözüldükten sonra nano-drop ile ölçümünden elde edilen sonuçlar.

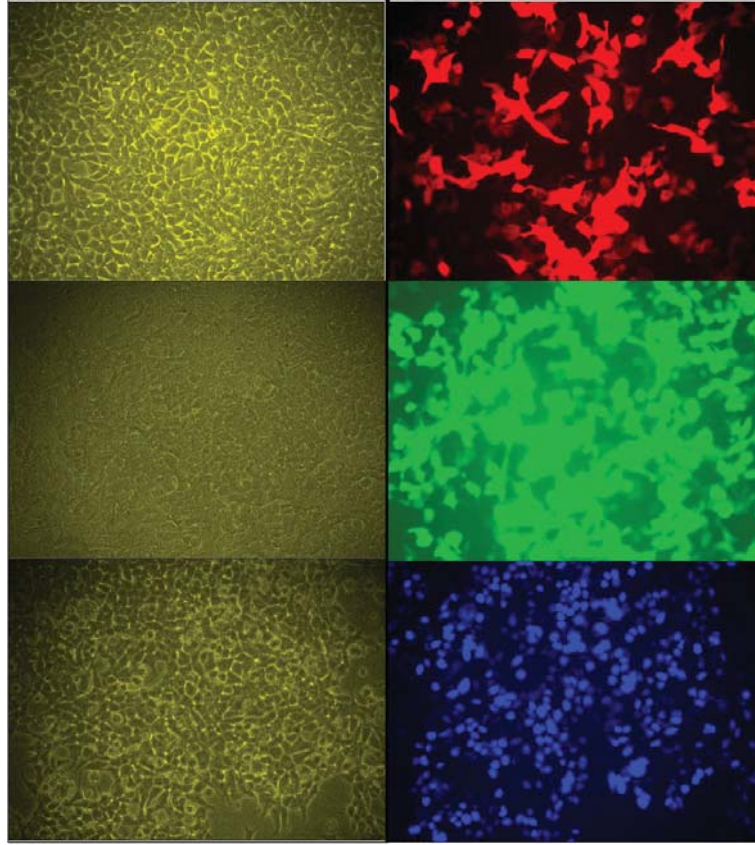
| Plazmid adı                            | Bakteriyel antibiyotik direnç geni | 260/280 | 260/230 | Plazmid miktarı( ng/ul) |
|----------------------------------------|------------------------------------|---------|---------|-------------------------|
| pcDNA3 mCherry LIC cloning vector (6B) | Kanamisin                          | 1.89    | 2.26    | 2512                    |
| pcDNA3-mRFP                            | Kanamisin                          | 1.90    | 2.27    | 2636.1                  |
| AcGFP-N1                               | Kanamisin                          | 1.86    | 2.18    | 3968                    |
| EBFP2-Lifeact-7                        | Kanamisin                          | 1.82    | 2.13    | 4140                    |

İzole edilen plazmid yoğunluğu 5000 ng/µl 'nin altında elde edildi. Saflık değerleri 260/280 ve 260/230 sonuçlarından olması gerektiği gibi sırasıyla 1.8 ve 2.0 çıktı.

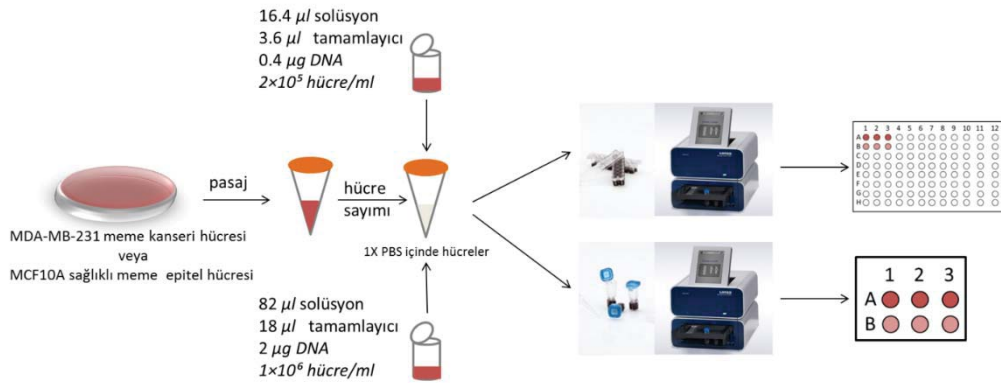
Gliserol bakteri stoğu hazırlamak için midi kültür tüplerinden 850 µl kriyo tüplere eklendi ve üzerlerine 150 µl otoklavlanmış gliserol eklendi. Daha sonra tüpler vorteks ile karıştırıldı ve sıvı azot içinde bir süre bekletildi. Son olarak tüpler -80 °C' de saklandı.

Plazmidler kolay transfekte olan 293T hücrelerinde lipozomal transfeksiyon olan Fugene ile denendi (Şekil 141). Kırmızı, yeşil ve mavi hücreler elde edildi.





**Şekil 141.** İzole edilen plazmidlerin kolay transfekte olduğu bilinen 293T hücrelerde denemesi. Hücreler mRFP, acGFP ve EGFP'nin içeren plazmidlerle transfekte edildi ve floresan mikroskopta görüntülendi.



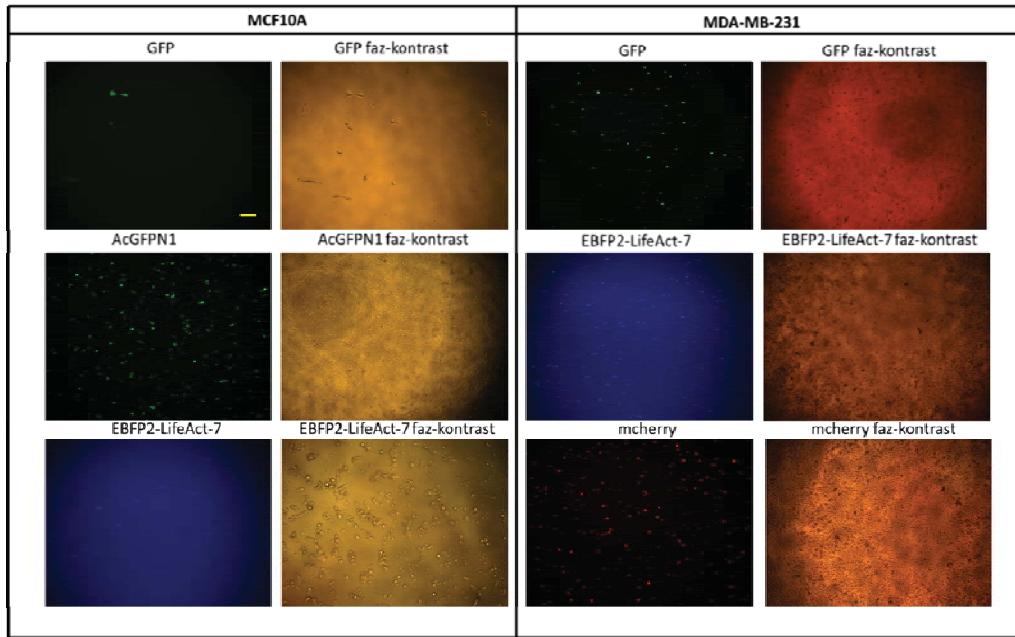
**Şekil 142.** Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak yapılan transfeksiyon işleminin basamaklarının şematik gösterimi.

Sırasıyla 1/2 ve 1/4 pasaj oranıyla büyütülen MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri ekildikleri yüzeyde çoğalıp yüzeyi tamamen kapladıktan sonra pasajlanıp hücreler sayıldı. 96 kuyucuklu plakaya transfeksiyon için kullanılacak her iki hücre hattından her kuyuda ml de

$2 \times 10^5$  olacak şekilde hücrelerin seyreltmesi yapıldı. Transfeksiyon için proje bütçesinden alınan Lonza Nucleofector 4D cihazı ve kitleri kullanıldı. Transfeksiyon yapılacak her kuyucuk için transfeksiyon kitinde bulunan küçük ya da büyük ölçekte yapılacak transfeksiyona göre kullanılacak farklı kuvvetler için 16.4  $\mu$ l / 82  $\mu$ l solüsyondan ve 3.6  $\mu$ l / 18  $\mu$ l tamamlayıcıdan oluşan karışım hazırlandı. 100 mm lik petride yetiştirilip yüzeyden kaldırılıp santrifüj yapılarak çöktürüldü. Hücreler, yeni hücre ortamında 1 ml içinde çözülüp hücrelerin seyreltme işlemi yapıldıktan sonra 1X PBS' te tekrar çözüldü. Santrifüjle çöktürme işlemi yapıldıktan sonra hücreler hazırlanan karışımın içine aktarıldı. Çözülen hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirilecek olan 0.4  $\mu$ g/ 2  $\mu$ g plazmid DNA da eklenip karıştırıldıktan sonra Lonza Nucleofector kitindeki kullanılacak her kuvvete 20  $\mu$ l / 100  $\mu$ l lik karışımlar dikkatli bir şekilde 0.1-20  $\mu$ l / 20-200  $\mu$ l pipet uçları kullanılarak kuvvetlere yükleme yapıldı. Lonza Nucleofector 4D cihazına, yükleme yapılan kuvvetler yerleştirildikten sonra aşağıdaki tabloda belirtilen her hücre hattı için uygun program seçilerek cihaz çalıştırıldı. İşlem gerçekleştirildikten sonra kuyular cihazdan çıkartılarak 10 dakika oda sıcaklığında güvenlik kabininin içinde bekletildi. Bekleme sırasında 96 kuyulu plakaya transfeksiyonu yapılmış hücrelerin eklenmesi için gerekli kuyu sayısı kadar her kuyuya 200  $\mu$ l hücre kültür ortamı eklenerek hücre kültür ortamının ısınması için plaka inkübatöre kaldırıldı. 10 dakikanın sonunda 96 kuyulu plaka inkübatörden çıkarıldı transfeksiyon işlemi gerçekleşmiş hücrelerin bulunduğu kuvvetlerdeki 20  $\mu$ l' lik karışıma 80  $\mu$ l 96 kuyulu plakadaki hücre kültür ortamı eklenerek her kuvvette 100  $\mu$ l olan karışım kuvetten alınarak 96 kuyulu plakaya konularak inkübasyon için inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonra transfeksiyonu gerçekleştiren hücreler ile gerçekleşmeyen hücrelerin seçiliminin yapılabilmesi için transfeksiyon işlemi başarıyla gerçekleşmiş hücrelerde hücre içine alınan DNA da bulunan antibiyotik dirençli genin olmasından yararlanılarak hücrelerin buldukları ortama antibiyotik eklemesi yapıldı. Bu işlem için J847 G418 antibiyotik solüsyonu kullanılarak en uygun dozu bulmak için de denemeler yapıldı. 200, 400 ve 800 dozlar kullanıldı.

**Tablo 20.** Lonza Nucleofector 4D cihazında MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarının transfeksiyonu için kullanılan değerler.

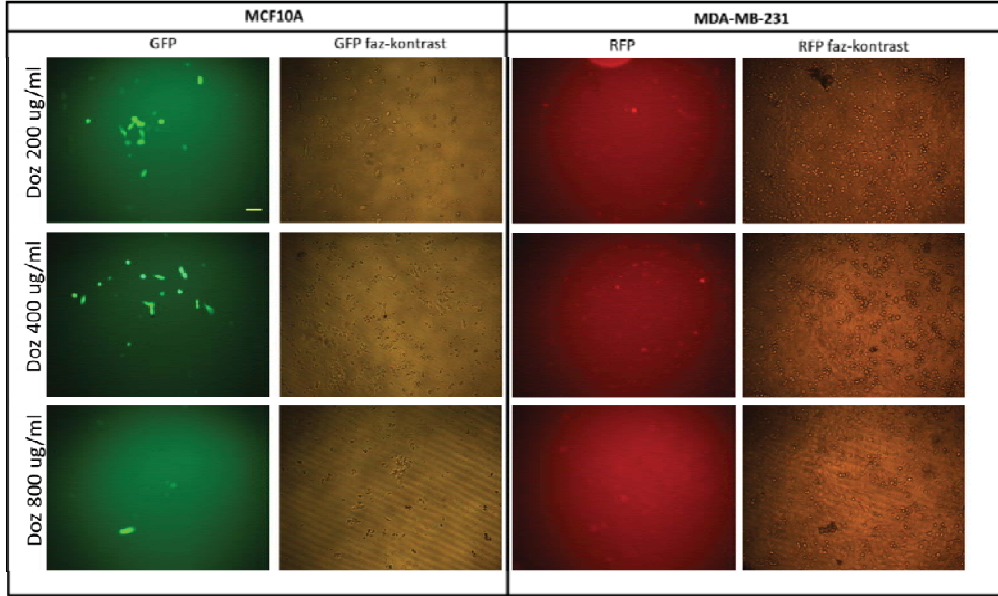
| ID                   | Kit | Program | Substrat | Substrat miktarı | Transfeksiyon platformu | Analiz için gerekli süre | Transfeksiyon Başarısı |
|----------------------|-----|---------|----------|------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| 3175<br>(MDA-MB-231) | SE  | CH-125  | Plazmid  | 0.4 µg           | 4DX                     | 24 saat                  | +                      |
| 2584<br>(MCF10A)     | SE  | EN-130  | Plazmid  | 0.4 µg           | 4DX                     | 24 saat                  | +                      |
| 3054<br>(MCF10A)     | SE  | DS-138  | Plazmid  | 0.4 µg           | 4DX                     | -                        | -                      |



**Şekil 143.** MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak MCF10A hücreleri için sırasıyla GFP, AcGFPN1 ve EGFP2-LifeAct-7, MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla GFP, EGFP2-LifeAct-7 ve mcherry ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz kontrast görüntüleri.

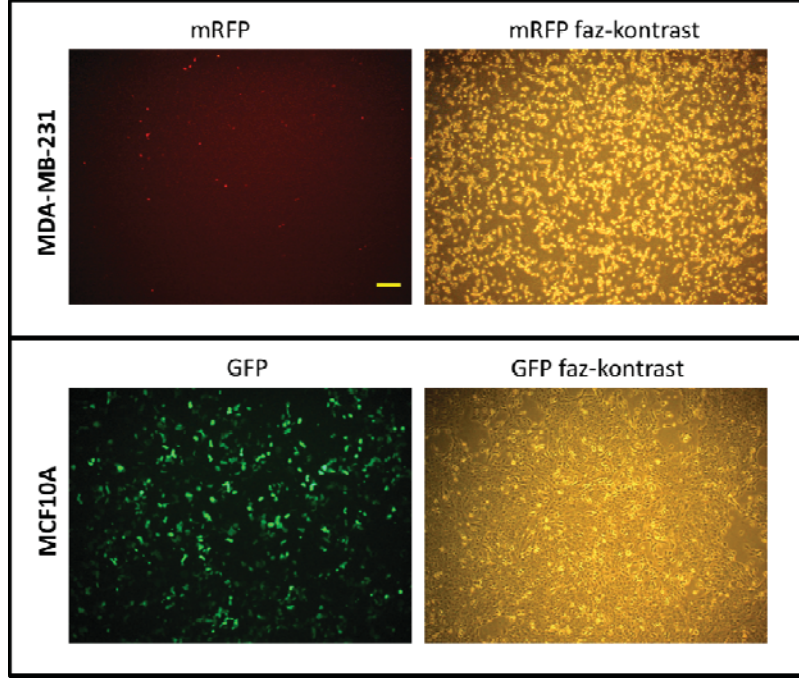
*Transfeksiyon işlemi her iki hücre hattı için Lonza Nucleofector 4D cihazı ile gerçekleştirildikten 24 saat sonra antibiyotik uygulaması yapılmadan 5X objektif kullanılarak floresan ve faz-kontrast görüntüleri çekildi. MCF10A hücreleri için transfeksiyon AcGFPN1 için %70-80 gibi yüksek oranda gerçekleşirken EGFP2-LifeAct-7 ve GFP için düşük oranda*

gözlemlendi. MDA-MB-231 hücreleri için GFP, EGFP2-LifeAct-7ve mcherry ile yapılan transfeksiyon denemeleri %70-80 gibi yüksek oranda gerçekleşti. Bu denemeler sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin farklı floresan renklerinde örnekleri elde edilirken MCF10A hücreleri için yüksek oranda transfekte hücreler elde edebilmek için farklı bir yöntemle “Fugene” transfeksiyon denemeye karar verildi. Görüntüler 4X objektif kullanılarak çekildi. Ölçek 200 µm olarak gösterilmiştir.



**Şekil 144.** MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak sırasıyla GFP ve RFP ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz kontrast görüntüleri.

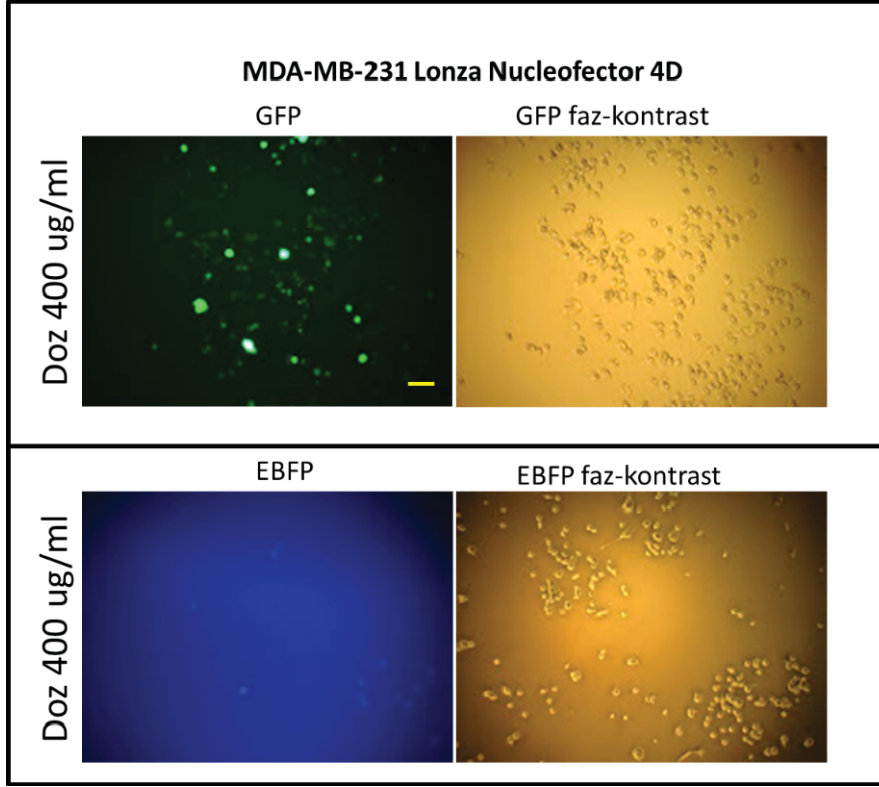
*Transfeksiyon işlemi Lonza Nucleofector 4D cihazı ile gerçekleştirildikten 24 saat sonra şekilde görülen farklı dozlarda G418 antibiyotik uygulaması yapıldı. 48 saat sonra alınan görüntülerde 200 ug/ml dozun transfekte olan hücrelerin seçilimini yapmak için yetersiz kaldığı, 800 ug/ml dozun ise çok fazla gelerek transfekte olan hücrelerin de çoğunu öldürdüğü gözlemlendi. 400 olan doz uygulamasının ise diğer iki doza göre seçim için daha uygun olduğu gözlemlendi. Görüntüler 4X objektif kullanılarak çekildi. Ölçek 200 µm olarak gösterilmiştir.*



**Şekil 145.** MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin “Fugene” yöntemi kullanılarak sırasıyla mRFP ve GFP ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz kontrast görüntüleri.

MDA-MB-231 hücrelerinin bu yöntemle daha düşük oranda transfekte oldukları gözlemlenirken MCF10A hücrelerinin %80-90 oranında transfekte oldukları gözlemlendi. Transfeksiyon için yapılan tüm denemelerin sonuçlarına bakılarak MCF10A hücrelerinin transfeksiyonu için “Fugene” yönteminin, MDA-MB-231 hücrelerinin transfeksiyonu için Lonza Nucleofector 4D cihazının kullanımına karar verildi. Görüntüler 4X objektif kullanılarak çekildi. Ölçek 200 µm olarak gösterilmiştir.





**Şekil 146.** MDA-MB-231 hücrelerinin Lonza Nucleofector 4D cihazı kullanılarak GFP ve EGFP ile transfekte edilmiş hallerinin floresan ve faz-kontrast görüntüleri.

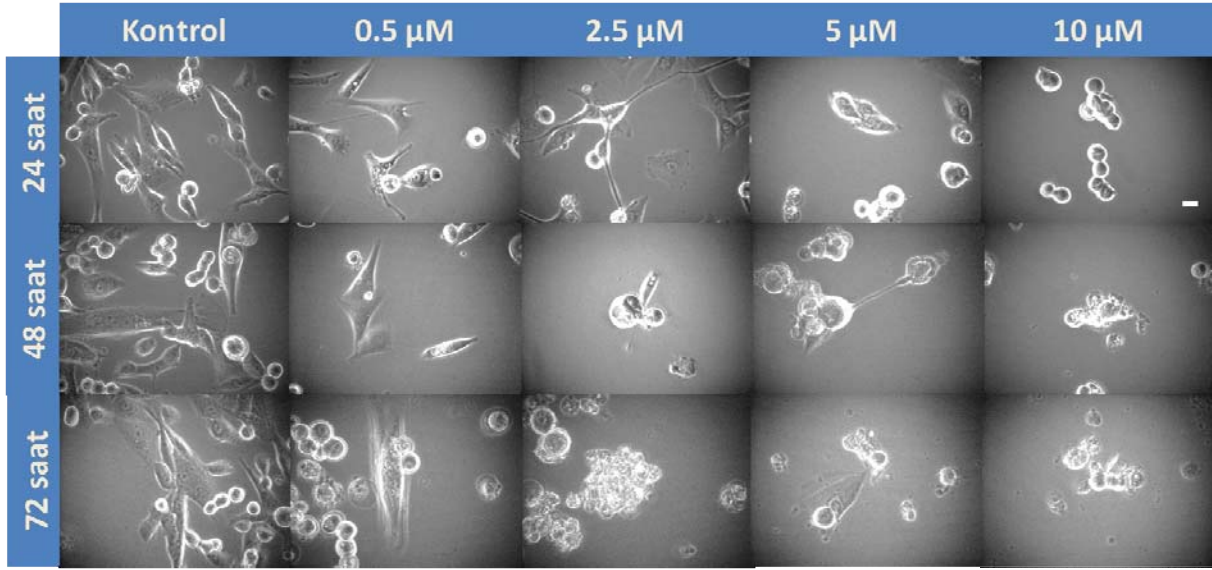
*Transfeksiyon işlemi Lonza Nucleofector 4D cihazı ile gerçekleştirildikten 24 saat sonra 600 ug/ml doz antibiyotik uygulaması yapıldı. 48 saat sonra hücre kültürü ortamı değiştirilerek 400 ug/ml doz antibiyotik uygulaması yapıldı. Aynı uygulama 48 saat sonra yinelenildi ve hücrelerin floresan ve faz-kontrast fotoğrafları çekildi. Görüntüler 4X objektif kullanılarak çekildi. Ölçek 200 µm olarak gösterilmiştir.*

Serbest DOX etkisinin incelenebilmesi için öncelikle doksorubisinin hangi dozlarda hücreye uygulanacağı belirlendi. *MDA-MB-231* metastatik meme kanseri hücreleri için yapılan serbest DOX çalışmalarında,  $IC_{50}$  olarak bilinen, ilacın etkinliğinin ölçümünü göstererek kanserli hücrelerin %50 oranında ölümüne neden olan konsantrasyon  $0.5 \mu M$  seçildi (Neoff ve ark., 2014). Bu değer altında kontrol ve hücrelerin ölümü için son noktayı belirleyebilmek için bu değer üstündeki diğer konsantrasyonlar ile beraber dozlar 0, 0.5, 2.5, 5, 10  $\mu M$  olarak seçildi. 2 boyutlu ve 3 boyutlu düzeneklerde *MDA-MB-231* hücreleri ile birlikte kültürü yapılacak, gözlemlenecek olan *MCF10A* sağlıklı epitel meme hücreleri için de aynı dozlar uygulanarak ilacın farklı dozlarda zamana bağlı hücre içine alınımı bu iki hücre tipinde gözlenerek karşılaştırıldı.



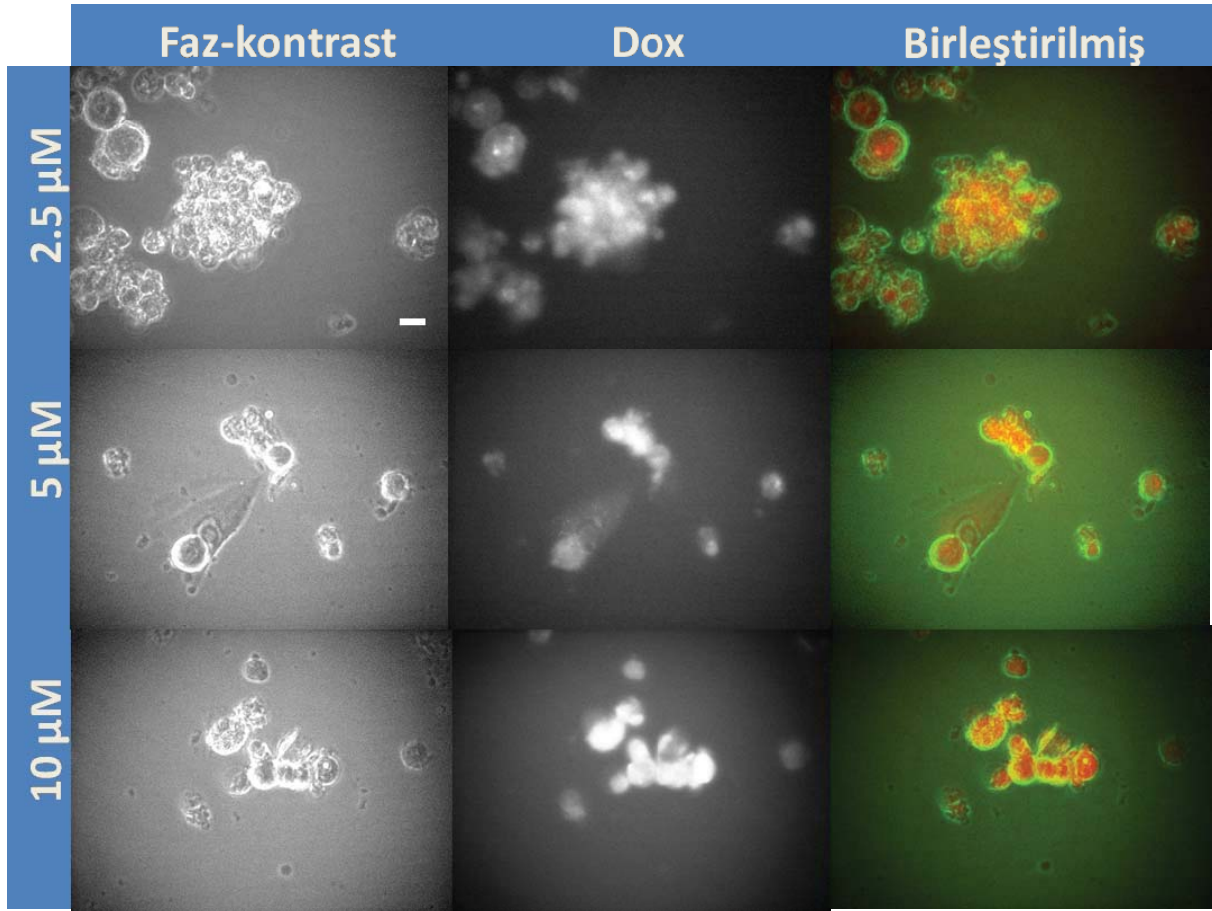
## 24 kuyulu sistemde iki boyutlu kültürdeki hücrelerde serbest DOX etkisinin incelenmesi :

24 kuyulu sistemler ilaç etkilerinin belirlenmesi için yaygın kullanılan materyaller olması sebebiyle serbest DOX etkisini belirlemek üzere denemeler öncelikle bu sistemlerde yapıldı. Bu amaçla proje kapsamında kullanılan metastatik meme kanseri hücresi *MDA-MB-231* ve sağlıklı epitel meme hücresi *MCF10A* 24 kuyulu sistemlere farklı hücre sayılarında ekildi. Hücre sayısı olarak öncelikle *MCF10A* hücreleri için 15000 hücre/ml, *MDA-MB-231* hücreleri için ise 23000 hücre/ml hücre yoğunlukları denendi. Hücreler 24 saat sonunda 24 kuyulu sisteme ekildi ve 48 saat inkübe edildi. Doksorubisin seyreltilmesi için iki hücre tipinin de yaşamasına olanak sağlayan besi karışımı kullanıldı ve inkübasyondan sonra önceden belirlenmiş olan doksorubisin konsantrasyonları olan 0.5  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  ile kontrol olarak doksorubisin içermeyen besi karışımı hücrelere uygulandı. Şekil 147'de görüleceği üzere, *MDA-MB-231* hücreleri 24, 48 ve 72. saatlerde görüntülendi.



**Şekil 147.** 24 kuyulu sistem içerisindeki *MDA-MB-231* hücrelerine uygulanan farklı ilaç dozları için zamana bağlı faz-contrast hücre fotoğrafları. Ölçek 20  $\mu\text{m}$  olarak gösterilmiştir.

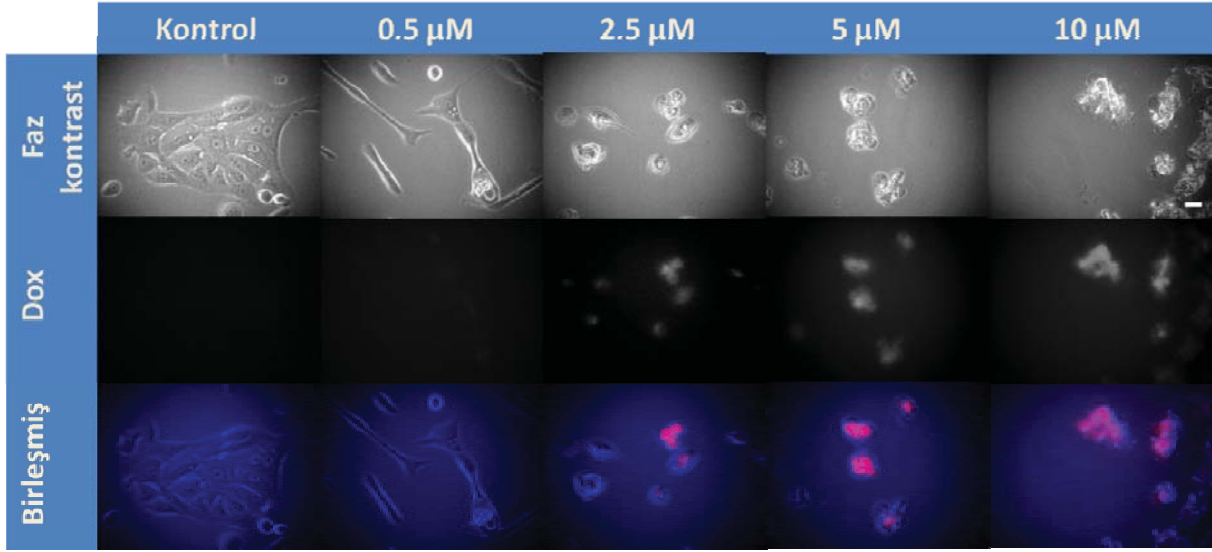
Şekil 148'de görüldüğü üzere, farklı dozlarda uygulanan ilaçların *MDA-MB-231* hücreleri üzerinde morfolojik olarak bozunmaya sebep olduğu ve aynı zamanda ilacın uygulanma süresinin uzamasıyla bu bozunmanın da arttığı gözlemlendi.



**Şekil 148.** 24 kuyulu sistem içerisindeki *MDA-MB-231* hücrelerinin 2.5µM, 5µM, 10µM ilaç konsantrasyonları için 72 saat sonunda çekilen sırasıyla faz-kontrast, doksorubisin ve birleştirilmiş fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.

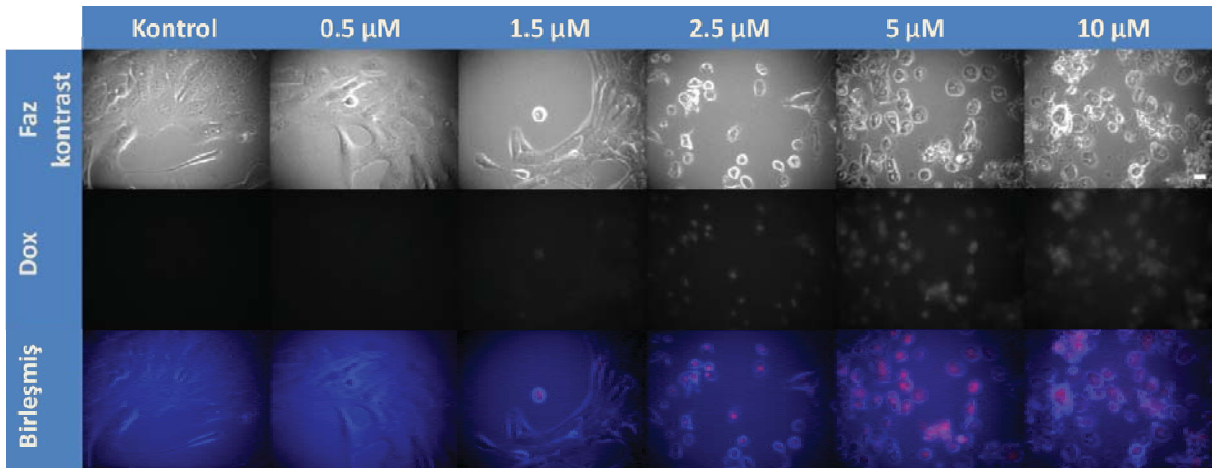
Morfolojik olarak ilaç etkisiyle bozulmuş olan *MDA-MB-231* hücrelerinin 72 saat sonunda çekilen faz-kontrast resimleri ve doksorubisin resimleri birleştirildiğinde doksorubisin hücre içerisine girdiği gözlenerek bozunmanın ilaç etkisi sebebiyle gerçekleşmiş olduğu gösterildi.

*MCF10A* hücreleri için hücre sayısı 30000 hücre/ml'ye çıkarılarak inkübasyon süresi 24 saate indirildi. İnkübasyon süresi sonunda daha önceden belirlenen dozlarda doksorubisin hücrelere uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra hücrelerin faz-kontrast fotoğrafları ve doksorubisinin fotoğrafları çekildi. Yapılan görüntülemelerin sonunda, **Şekil 149**'de görüleceği üzere, yüzeydeki hücre sayısının düşük olduğu gözlemlendi ve 24 kuyulu sistem için hücre sayısının artırılmasının daha uygun olacağına karar verildi.

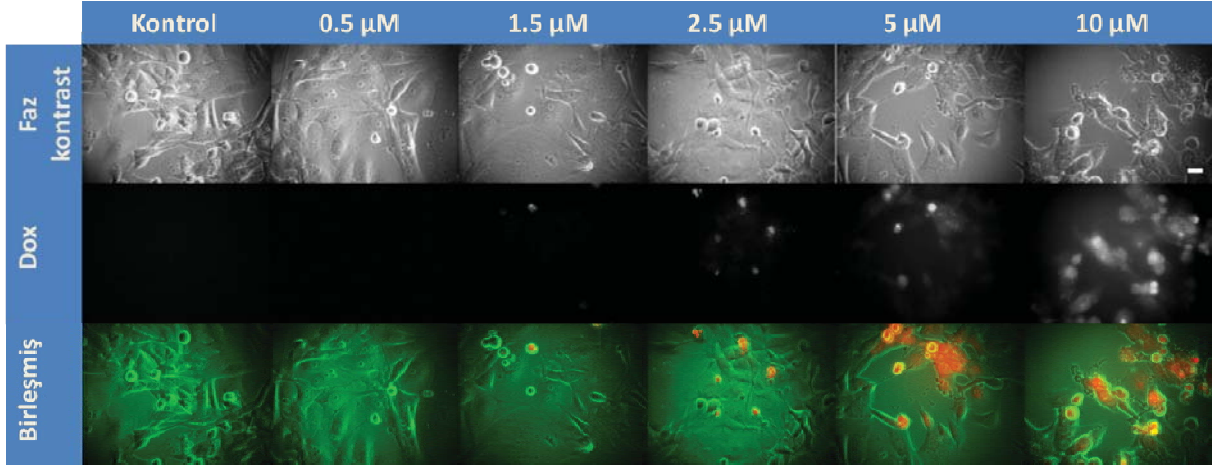


**Şekil 149.** 24 kuyulu sistem içerisindeki 30000 hücre/ml yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerinin farklı dozların uygulanmasından ardından 24 saat sonunda çekilen faz-kontrast ve doksorubisin fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.

Bir önceki iş paketinde iki boyutlu ve üç boyutlu sistemler için optimize edilmiş olan *MCF10A* ve *MDA-MB-231* hücre sayılarından yola çıkarak alan hesaplamasıyla 200000 hücre/ml hücre sayılarının her iki hücre tipi için de 24 kuyulu sistemlere ekilmesinin uygun olduğuna karar verildi. Daha önceki fotoğraflardan yola çıkarak 1.5µM ilaç konsantrasyonu da denendi (**Şekil 150** ve **Şekil 151**).



**Şekil 150.** 24 kuyulu sistem içerisindeki 200000 hücre/ml yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerine farklı dozların uygulanmasının ardından 24 saat sonunda çekilen faz-kontrast ve doksorubisin fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.



**Şekil 151.** 24 kuyulu sistem içerisindeki 200000 hücre/ml yoğunluğundaki *MDA-MB-231* hücrelerinin farklı dozların uygulanmasından ardından 24 saat sonunda çekilen faz-kontrast ve doksorubisin fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.

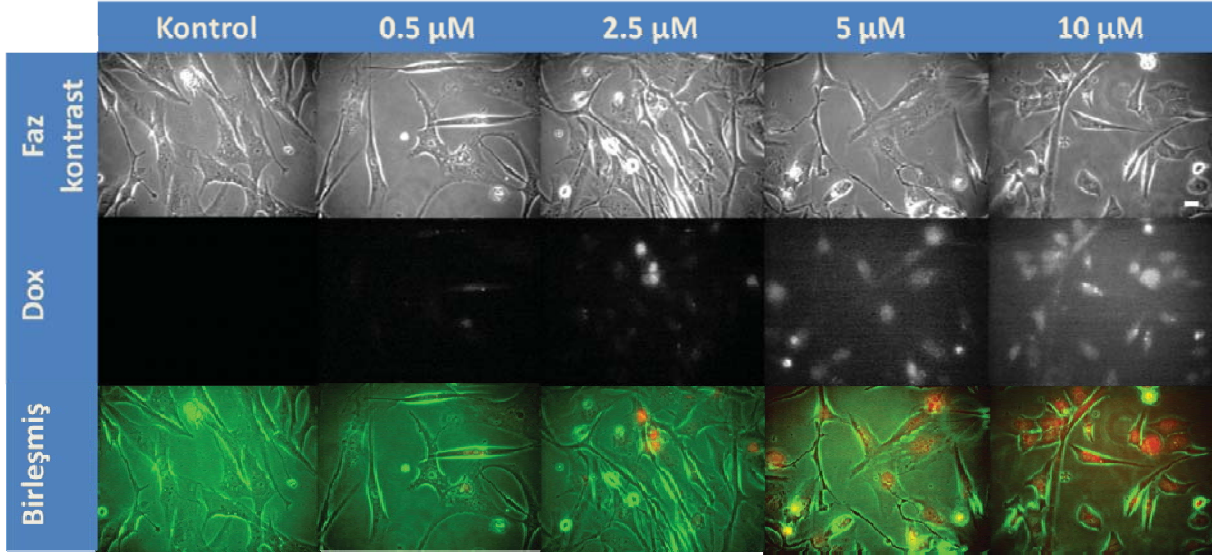
*MCF10A* ve *MDA-MB-231* hücreleri karşılaştırıldığında, *MCF10A* hücrelerinin doksorubisini hücre içine daha kolay aldığı gözlemlendi: *MCF10A* hücrelerinde 1.5 uM doksorubisin için floresan sinyal gözlenirken, *MDA-MB-231* hücrelerinde benzer seviyede sinyal 2.5 uM doksorubisin için gözlemlendi.

#### **Çiplerde iki boyutlu kültürdeki hücrelerde serbest DOX etkisinin incelenmesi :**

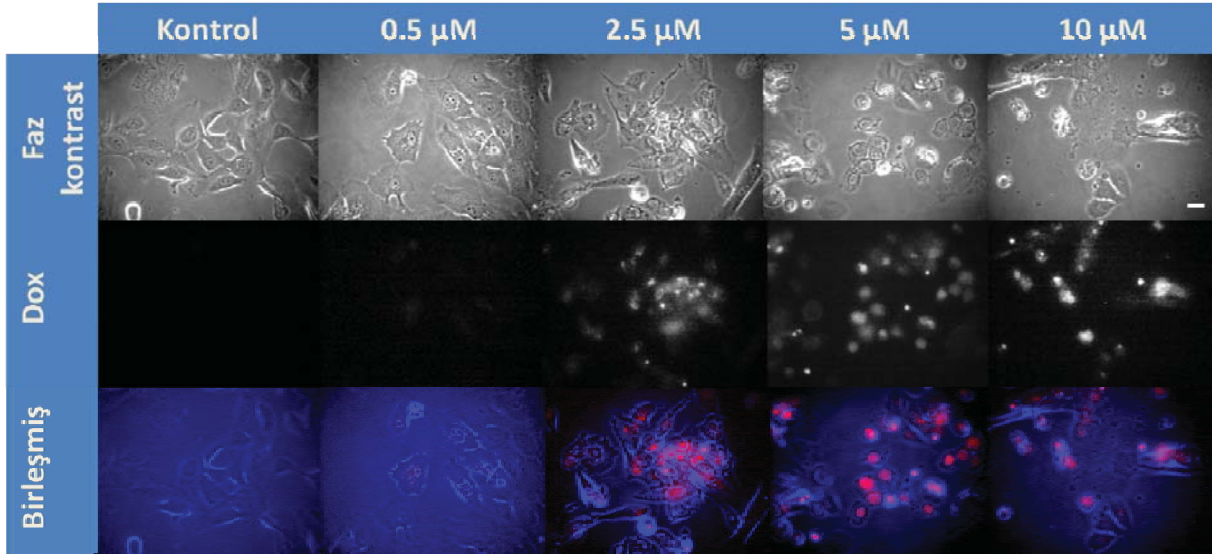
Daha önce optimizasyonu yapılan iki boyutlu çipler kullanılarak ilaç konsantrasyonları tekrar denendi. Çipler PDMS kalıpların hazırlanması, temizlenmesi ve cam kullanılarak kanal oluşturulması işlemlerinden sonra daha sonraki deneylerde kullanılacakları şekilde poli-L-lizin ve fibronektin ile kaplandı. *MDA-MB-231* ve *MCF10A* hücreleri konsantrasyonları  $3 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde çiplere yüklendi. İnkübasyon süresinin ardından farklı doksorubisin konsantrasyonları hücrelere uygulandı. İlaç uygulamasının ardından 24 ve 48. saatlerde fotoğrafları çekilerek analizi yapıldı. Hücrelerin faz-kontrast resimlerinden elde edilen hücre çizimleri doksorubisin fotoğraflarına uygulanarak ilacın hücre içine alınma miktarı değerlendirildi ve farklı dozlar karşılaştırıldı.

Sonuçlar **Şekil 152** ile **Şekil 158** arasında verilen resim ve grafiklerde gösterilmektedir. Bu sonuçlarda, iki boyutlu kültürler için, çiplerde, 24 kuyulu sistemdeki gibi *MCF10A* hücrelerinin doksorubisini daha kolay hücre içine aldıkları gözlemlendi. Doksorubisin konsantrasyonu arttıkça hücre içindeki doksorubisin miktarı da arttı. Doksorubisin uygulama süresi arttıkça, hücre içine alınan ilaç miktarı da arttı.

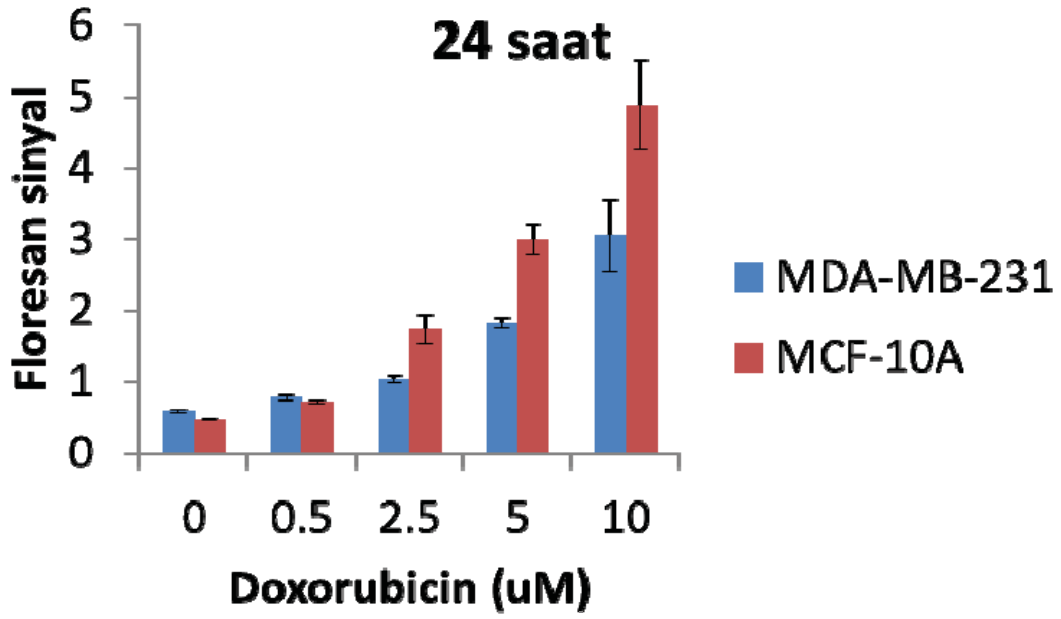




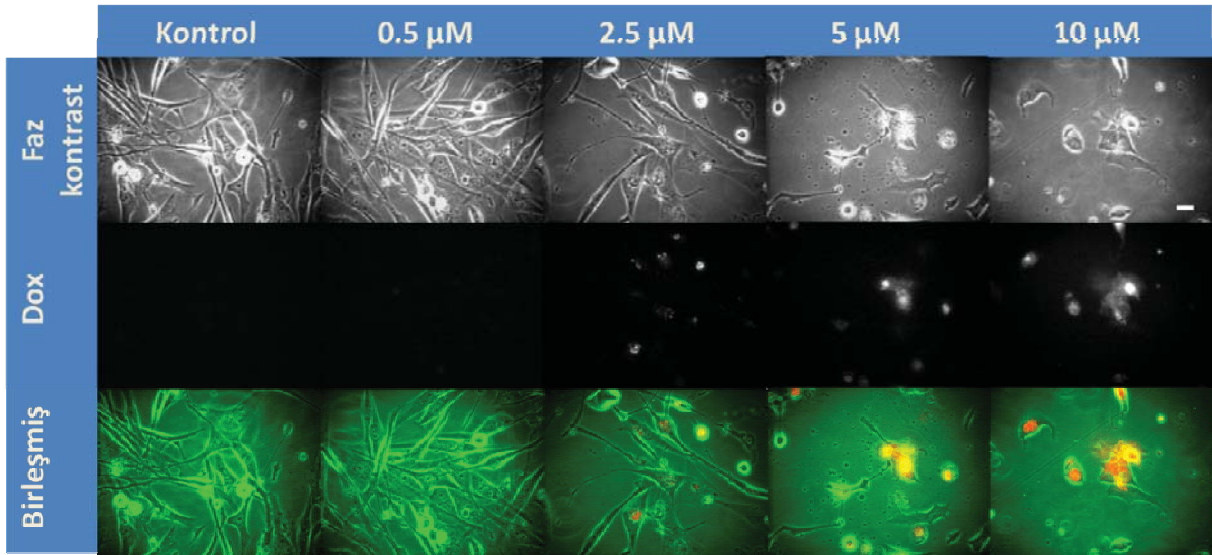
**Şekil 152.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MDA-MB-231* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 24 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir.



**Şekil 153.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 24 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu$ m olarak gösterilmiştir.

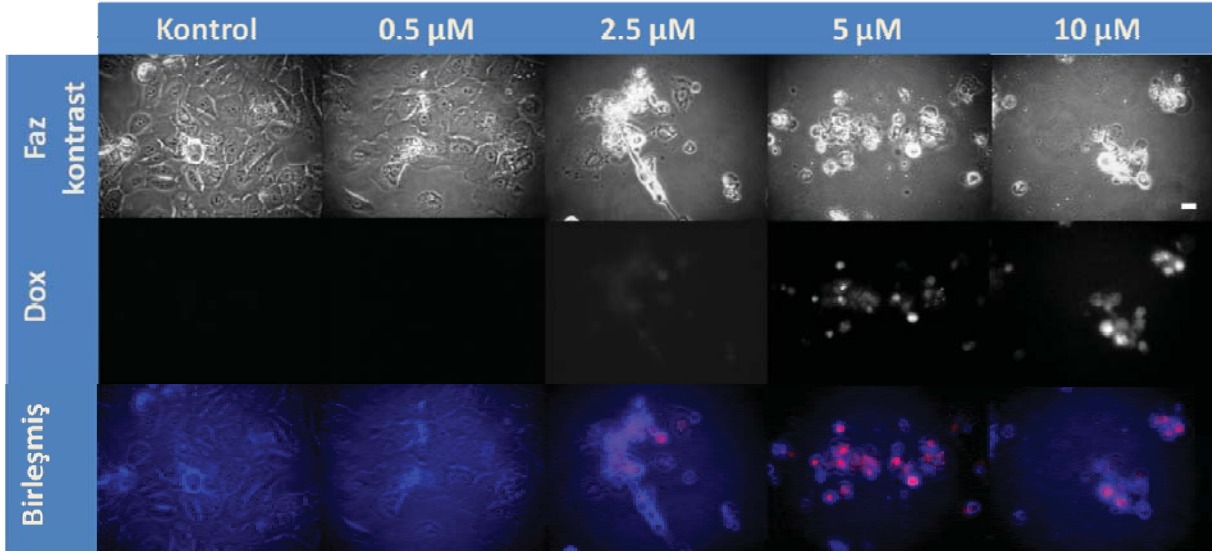


Şekil 154. 2B çiplerde 24 saatte doksorubisin hücre içine alımının sayısal incelenmesi

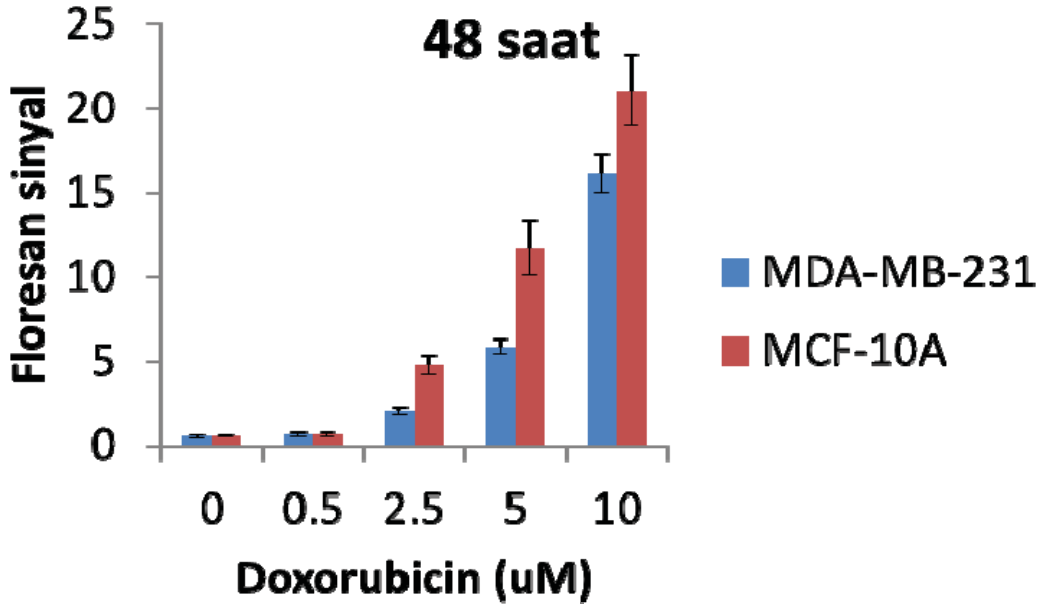


Şekil 155.  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MDA-MB-231* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 48 saat görüntüleri. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.

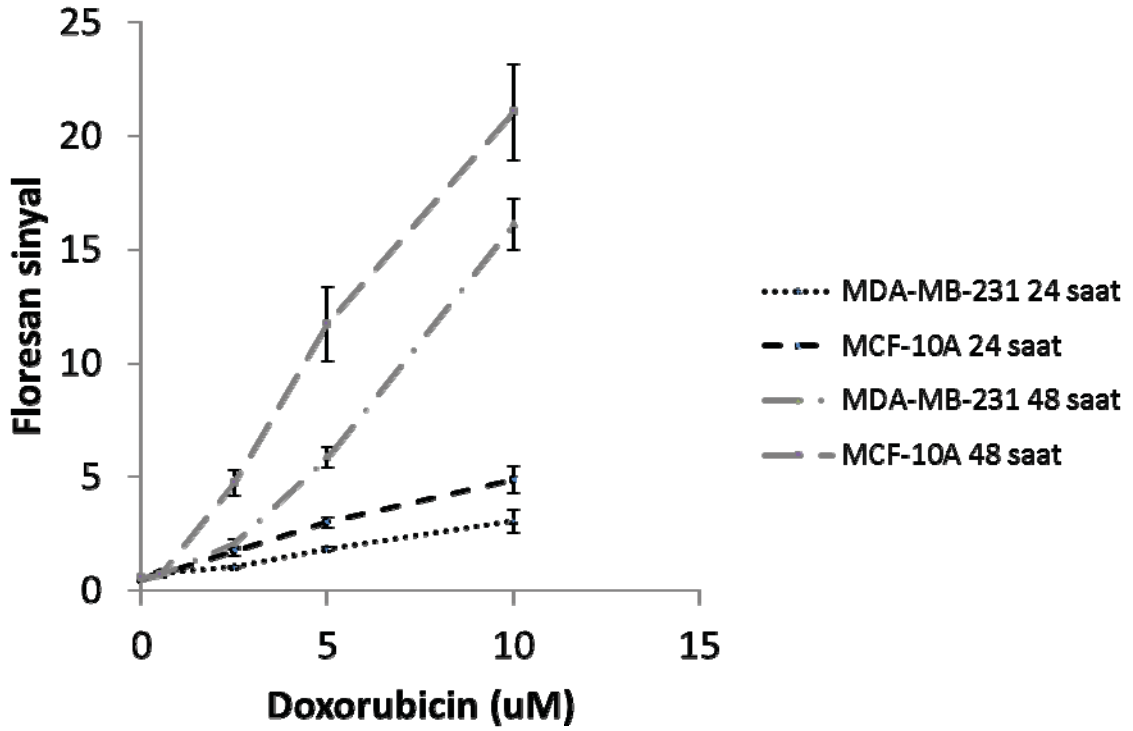




**Şekil 156.**  $3 \times 10^6$  hücre/ml hücre yoğunluğundaki *MCF10A* hücrelerine iki boyutlu çipler içerisinde farklı dozlarda ilaç uygulanması ve 24 saat görüntüleri. Ölçek 20  $\mu\text{m}$  olarak gösterilmiştir.



**Şekil 157.** 2B çiplerde 48 saatte doksorubisin hücre içine alımının sayısal incelenmesi

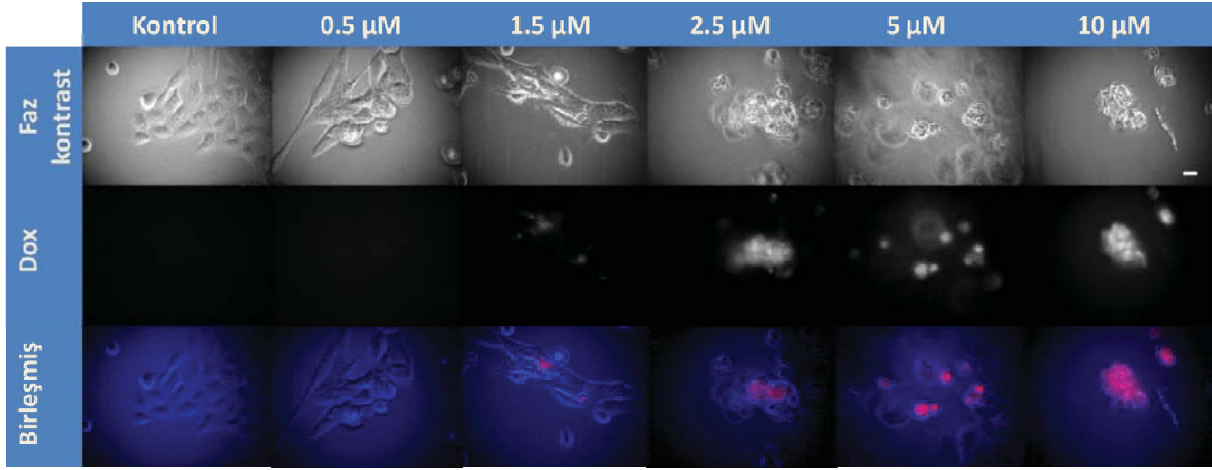


**Şekil 158.** 2B çiplerde 24 ve 48 saatte doksorubisin hücre içine alımının karşılaştırmalı sayısal incelenmesi

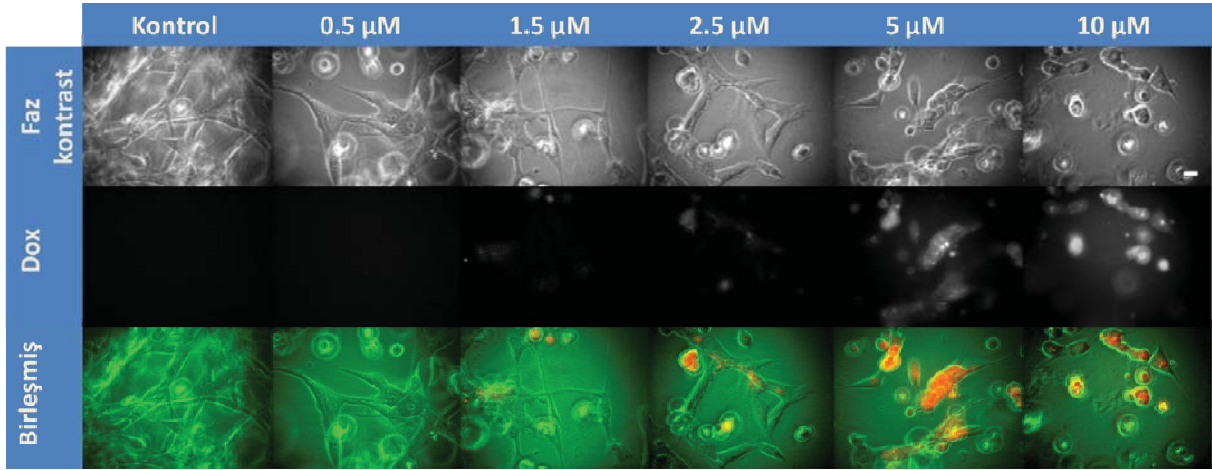
#### **24 kuyulu sistemde üç boyutlu kültürdeki hücrelerde serbest DOX etkisinin incelenmesi :**

Hücreler matrigel ile 1:1 oranında karıştırılarak üç boyutlu ortamı taklit etmesi amacıyla 24 kuyulu sisteme ekildi. Hücre ekimi ve 24 saat inkübasyondan sonra ilaç konsantrasyonları uygulanarak, ilaç uygulamasından 24 saat sonra hücrelerin fotoğrafları çekildi.

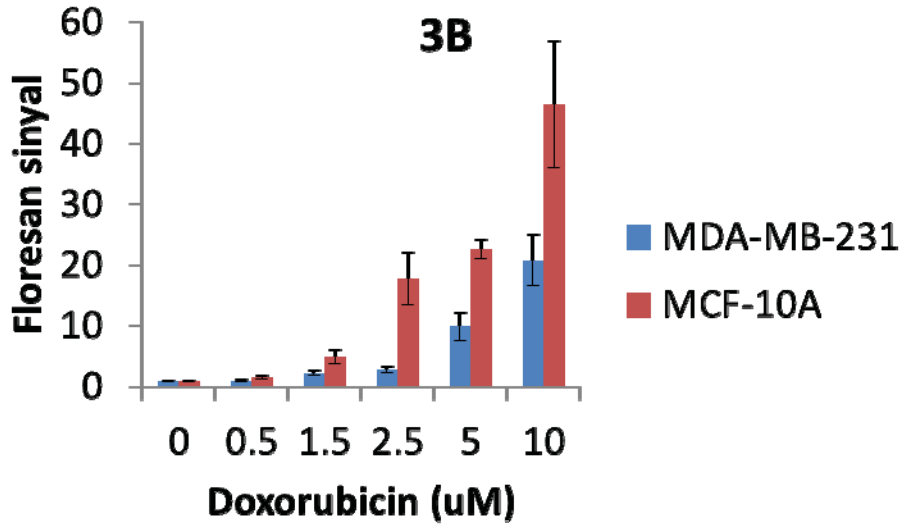
Bu sonuçlardan, 24 kuyulu sistemde üç boyutlu kültürde, 24 kuyulu sistemde iki boyutlu ve çiplerde iki boyutlu kültürlerde olduğu gibi, *MCF10A* hücrelerinin doksorubisini daha kolay hücre içine aldıkları gözlemlendi. Doksorubisin konsantrasyonu arttıkça hücre içindeki doksorubisin miktarı da arttı.



**Şekil 159.** 24 kuyulu sistem içerisinde 1:1 oranında *MCF10A*-matrijel karışımı için farklı dozlarda ilaç uygulanarak elde edilen hücrelerin faz-kontrast, doksorubisin ve birleştirilmiş fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.



**Şekil 160.** 24 kuyulu sistem içerisinde 1:1 oranında *MDA-MB-231*-matrijel karışımı için farklı dozlarda ilaç uygulanarak elde edilen hücrelerin faz-kontrast, doksorubisin ve birleştirilmiş fotoğrafları. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.

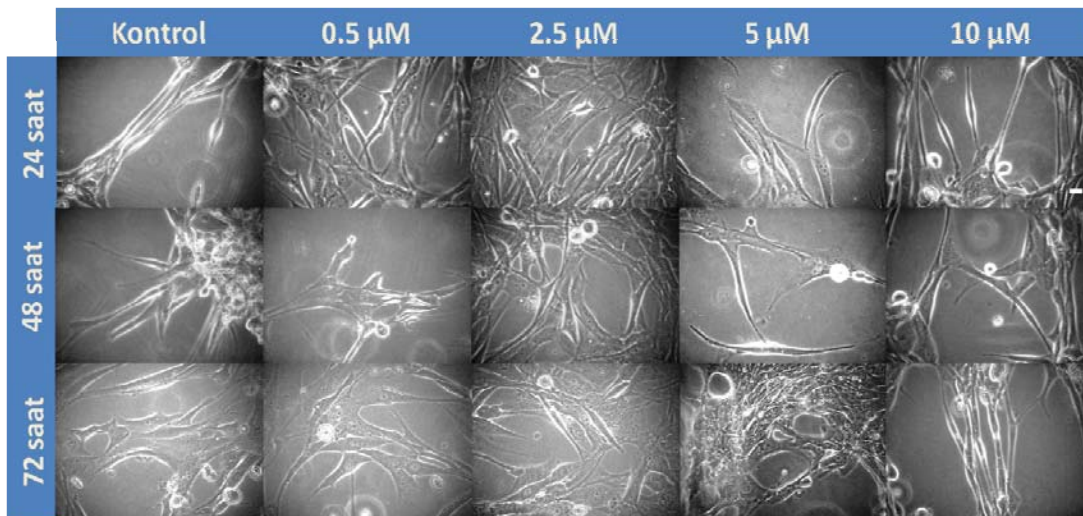


Şekil 161. 3B ortamda 24 saatte doksorubisin hücre içine alımının sayısal incelenmesi.

#### Çiplerde üç boyutlu kültürdeki hücrelerde serbest DOX etkisinin incelenmesi :

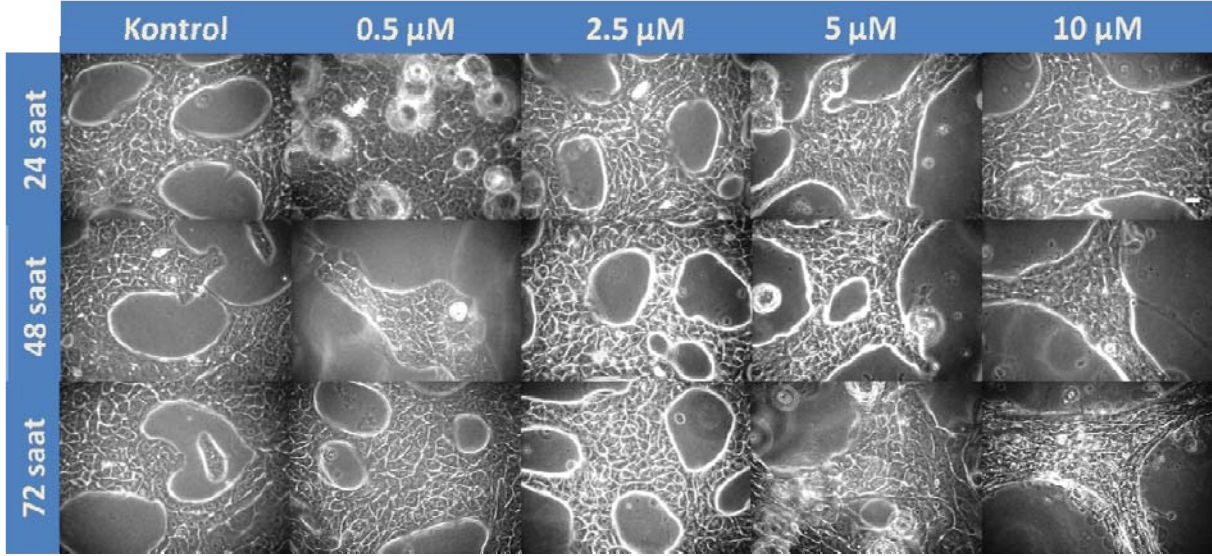
Üç boyutlu çiplere bir önceki gelişme raporunda belirlendiği şekilde 1:1 oranında matrijel-hücre karışımı ekildi. Her çip içerisinde iki tip hücre için de üç boyutlu ortam yaratıldı. Hücrelere inkübasyon süresinin ardından ilaç uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerde görüntüler alındı.

Bu sonuçlardan, çiplerde üç boyutlu kültürdeki hücreler, 24 kuyuda iki boyutlu, çipte iki boyutlu ve 24 kuyuda üç boyutlu kültürdeki hücrelerde gözleendiği gibi, ilaç uygulama süresi arttıkça ve ilaç dozu arttıkça sağlıklı hücre morfolojilerini kaybettiler.

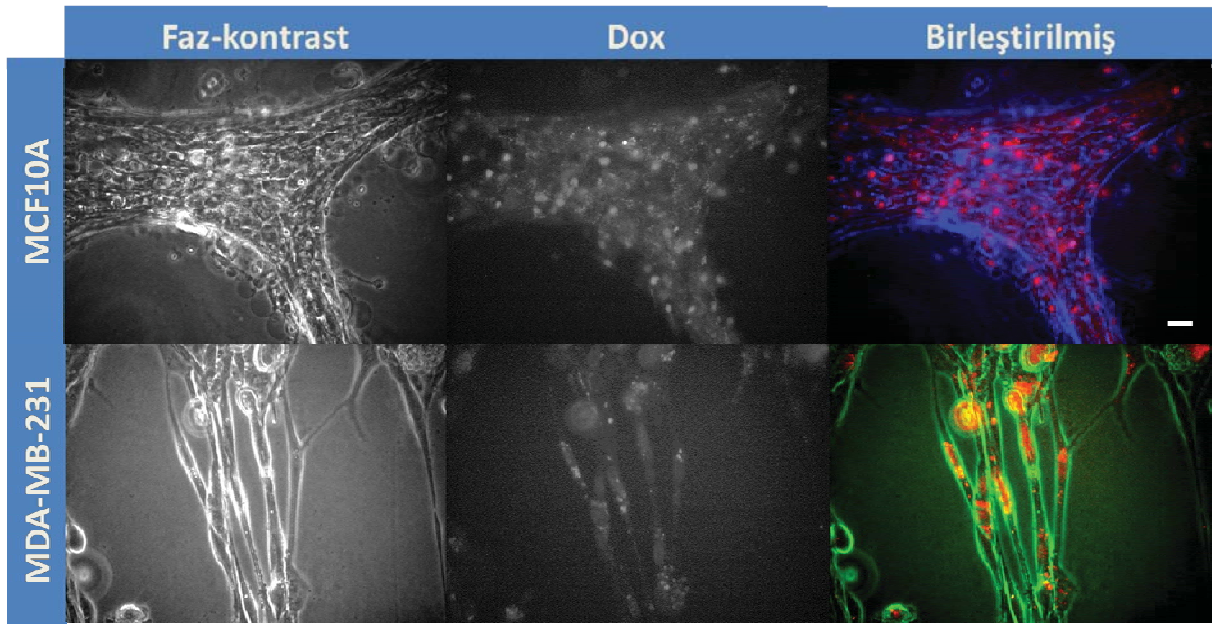


Şekil 162. Üç boyutlu düzeneklerde *MDA-MB-231* hücrelerinin farklı dozlarda ilaçlar uygulanmasıyla 24, 48, 72 saat faz-contrast görüntüleri. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.





**Şekil 163.** Üç boyutlu düzeneklerde *MCF10A* hücrelerinin farklı dozlarda ilaçlar uygulanmasıyla 24, 48, 72 saat faz-kontrast görüntüleri. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.



**Şekil 164.** Üç boyutlu düzeneklerde *MDA-MB-231*'ne 10µM konsantrasyonda ilaç uygulanması sonucunda elde edilen 72 saat görüntüleri. Ölçek 20 µm olarak gösterilmiştir.

Özet olarak, projenin ikinci ara döneminde 2 numaralı iş paketi dahilinde gerçekleştirilen serbest doksorubisin deneyleri gösteriyor ki hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültürde, normal hücreler (*MCF-10A*) serbest doksorubisinden, kanserli hücelere (*MDA-MB-231*) göre çok daha fazla etkilenmektedirler. Bu sonuçlar, projenin uzun dönemli hedefi olan hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin geliştirilmesinin önemini desteklemektedir.



## KAYNAKLAR

- . "DOXIL® (doxorubicin HCl liposome injection) ", from [www.doxil.com](http://www.doxil.com).
- Borden, M. A. ve Longo, M. L. 2002. "Dissolution behavior of lipid monolayer-coated, air-filled microbubbles: Effect of lipid hydrophobic chain length." *Langmuir*\_18(24): 9225-9233.
- Borden, M. A.,Martinez, G. V.,Ricker, J.,Tsvetkova, N.,Longo, M.,Gillies, R. J.,Dayton, P. A. ve Ferrara, K. W. 2006. "Lateral phase separation in lipid-coated microbubbles." *Langmuir*\_22(9): 4291-4297.
- Borden, M. A.,Pu, G.,Longo, M. L.,Dayton, P. A. ve Ferrara, K. W. 2005. "Phase behavior and transport properties of the lipid-monolayer shell of a microbubble." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*\_230: U1072-U1073.
- Borden, M. A.,Pu, G.,Runner, G. J. ve Longo, M. L. 2004. "Surface phase behavior and microstructure of lipid/PEG-emulsifier monolayer-coated microbubbles." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*\_35(3-4): 209-223.
- Carvalho, C.,Santos, R. X.,Cardoso, S.,Correia, S.,Oliveira, P. J.,Santos, M. S. ve Moreira, P. I. 2009. "Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect." *Current Medicinal Chemistry*\_16(25): 3267-3285.
- Cox, D. J. ve Thomas, J. L. 2010. "Ultrasound-Induced Dissolution of Lipid-Coated and Uncoated Gas Bubbles." *Langmuir*\_26(18): 14774-14781.
- Csuhai, E.,Kangarlou, S.,Xiang, T. X.,Ponta, A.,Bummer, P.,Choi, D. H. ve Anderson, B. D. 2015. "Determination of Key Parameters for a Mechanism-Based Model to Predict Doxorubicin Release from Actively Loaded Liposomes." *Journal of Pharmaceutical Sciences*\_104(3): 1087-1098.
- Cutts, S. M.,Parsons, P. G.,Sturm, R. A. ve Phillips, D. R. 1996. "Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase." *Journal of Biological Chemistry*\_271(10): 5422-5429.
- De Lange, J.,Schipper, N.,Schuurhuis, G.,Ten Kate, T.,Van Heijningen, T. H.,Pinedo, H.,Lankelma, J. ve Baak, J. 1992. "Quantification by laser scan microscopy of intracellular doxorubicin distribution." *Cytometry*\_13(6): 571-576.
- Deng, Z.,Yan, F.,Jin, Q. F.,Li, F.,Wu, J.,Liu, X. ve Zheng, H. 2013 (in print). "Reversal of multidrug resistance phenotype in human breast cancer cells using doxorubicin-liposome-microbubble complexes assisted by ultrasound." *J Control Release*.





- Deshpande, P. P., Biswas, S. ve Torchilin, V. P. 2013. "Current trends in the use of liposomes for tumor targeting." *Nanomedicine*\_8(9): 1509-1528.
- ElBayoumi, T. A., Torchilin, V. P. ve Weissig, V. 2010. "Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers."
- Eliaz, R. E. ve Szoka, F. C. 2001. "Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: A strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells." *Cancer Research*\_61(6): 2592-2601.
- Escoffre, J. M., Mannaris, C., Geers, B., Novell, A., Lentacker, I., Averkiou, M. ve Bouakaz, A. 2013. "Doxorubicin Liposome-Loaded Microbubbles for Contrast Imaging and Ultrasound-Triggered Drug Delivery." *Ieee Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control*\_60(1): 78-87.
- Escoffre, J. M., Piron, J., Novell, A. ve Bouakaz, A. 2011. "Doxorubicin Delivery into Tumor Cells with Ultrasound and Microbubbles." *Molecular Pharmaceutics*\_8(3): 799-806.
- Farook, U., Stride, E. ve Edirisinghe, M. J. 2009. "Preparation of suspensions of phospholipid-coated microbubbles by coaxial electrohydrodynamic atomization." *Journal of the Royal Society Interface*\_6(32): 271-277.
- Forbes, M. M. ve O'Brien, W. D. 2012. "Development of a theoretical model describing sonoporation activity of cells exposed to ultrasound in the presence of contrast agents." *Journal of the Acoustical Society of America*\_131(4): 2723-2729.
- Freeman, S. 2011. *Biological Science*, Benjamin Cummings.
- Frenkel, V., Etherington, A., Greene, M., Quijano, J., Xie, J. W., Hunter, F., Dromi, S. ve Li, K. C. P. 2006. "Delivery of liposomal doxorubicin (Doxil) in a breast cancer tumor model: Investigation of potential enhancement by pulsed-high intensity focused ultrasound exposure." *Academic Radiology*\_13(4): 469-479.
- Fugit, K. D., Xiang, T. X., Choi, D. H., Kangarlou, S., Cshai, E., Bummer, P. M. ve Anderson, B. D. 2015. "Mechanistic model and analysis of doxorubicin release from liposomal formulations." *Journal of Controlled Release*\_217: 82-91.
- Gao, Z., Fain, H. D. ve Rapoport, N. 2004. "Ultrasound-enhanced tumor targeting of polymeric micellar drug carriers." *Molecular Pharmaceutics*\_1(4): 317-330.
- Gao, Z. G., Fain, H. D. ve Rapoport, N. 2005. "Controlled and targeted tumor chemotherapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound." *Journal of Controlled Release*\_102(1): 203-222.



- Geis, N. A., Katus, H. A. ve Bekeredjian, R. 2012. "Microbubbles as a Vehicle for Gene and Drug Delivery: Current Clinical Implications and Future Perspectives." *Current Pharmaceutical Design*\_18(15): 2166-2183.
- Ghannam, M. M., El Gebaly, R. ve Fadel, M. 2016. "Targeting doxorubicin encapsulated in stealth liposomes to solid tumors by non thermal diode laser." *Lipids in Health and Disease*\_15.
- Gordon, K. B., Tajuddin, A., Guitart, J., Kuzel, T. M., Eramo, L. R. ve Vonroenn, J. 1995. "Hand-Foot Syndrome-Associated with Liposome-Encapsulated Doxorubicin Therapy." *Cancer*\_75(8): 2169-2173.
- Gorodetsky, R., Levdansky, L., Vexler, A., Shimeliovich, I., Kassis, I., Ben-Moshe, M., Magdassi, S. ve Marx, G. 2004. "Liposome transduction into cells enhanced by haptotactic peptides (Haptides) homologous to fibrinogen C-termini." *Journal of Controlled Release*\_95(3): 477-488.
- Guiot, C., Pastore, G., Napoleone, M., Gabriele, P., Trotta, M. ve Cavalli, R. 2006. "Thermal response of contrast agent microbubbles: Preliminary results from physico-chemical and US-imaging characterization." *Ultrasonics*\_44: E127-E130.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y. P., Xu, J. Q., Murray, T. ve Thun, M. J. 2008. "Cancer statistics, 2008." *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*\_58(2): 71-96.
- Kooiman, K., Foppen-Harteveld, M., van der Steen, A. F. W. ve de Jong, N. 2011. "Sonoporation of endothelial cells by vibrating targeted microbubbles." *Journal of Controlled Release*\_154(1): 35-41.
- Korpany, G., Carbon, J. G., Grayburn, P. A., Fleming, J. B. ve Brekken, R. A. 2007. "Monitoring response to anticancer therapy by targeting microbubbles to tumor vasculature." *Clin Cancer Res*\_13(1): 323-330.
- Kwan, J. J. ve Borden, M. A. 2010. "Microbubble Dissolution in a Multigas Environment." *Langmuir*\_26(9): 6542-6548.
- Lee, M. H., Kim, E. J., Lee, H., Kim, H. M., Chang, M. J., Park, S. Y., Hong, K. S., Kim, J. S. ve Sessler, J. L. 2016. "Liposomal Texaphyrin Theranostics for Metastatic Liver Cancer." *Journal of the American Chemical Society*\_138(50): 16380-16387.
- Lentacker, I., Geers, B., Demeester, J., De Smedt, S. C. ve Sanders, N. N. 2010. "Design and Evaluation of Doxorubicin-containing Microbubbles for Ultrasound-triggered Doxorubicin Delivery: Cytotoxicity and Mechanisms Involved." *Molecular Therapy*\_18(1): 101-108.

- Li, T. L., Tachibana, K., Kuroki, M. ve Kuroki, M. 2003. "Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: Comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice - Initial results." *Radiology*\_229(2): 423-428.
- Li, X. M., Ding, L. Y., Xu, Y. L., Wang, Y. L. ve Ping, Q. N. 2009. "Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin." *International Journal of Pharmaceutics*\_373(1-2): 116-123.
- Liang, Y. K. ve Kiick, K. L. 2016. "Liposome-Cross-Linked Hybrid Hydrogels for Glutathione-Triggered Delivery of Multiple Cargo Molecules." *Biomacromolecules*\_17(2): 601-614.
- Lu, T. L., Ma, Y. F., Hu, H. J., Chen, Y., Zhao, W. ve Chen, T. 2011. "Ethinylestradiol liposome preparation and its effects on ovariectomized rats' osteoporosis." *Drug Delivery* 18(7): 468-477.
- Lyass, O., Uziely, B., Ben-Yosef, R., Tzemach, D., Heshing, N. I., Lotem, M., Brufman, G. ve Gabizon, A. 2000. "Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma." *Cancer*\_89(5): 1037-1047.
- Martin, K. H. ve Dayton, P. A. 2013. "Current status and prospects for microbubbles in ultrasound theranostics." *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*\_5(4): 329-345.
- Masaka, T., Li, Y., Kawatobi, S., Koide, Y., Takami, A., Yano, K., Imai, R., Yagi, N., Suzuki, H., Hikawa, H., Tatsuno, I., Terada, K. ve Yokoyama, Y. 2014. "Liposome Modified with VIP-Lipopeptide as a New Drug Delivery System." *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*\_134(9): 987-995.
- Mayer, S. ve Grayburn, P. A. 2001. "Myocardial contrast agents: Recent advances and future directions." *Progress in Cardiovascular Diseases*\_44(1): 33-44.
- Mclaughlan, J. R., Harput, S., Abou-Saleh, R. H., Peyman, S. A., Evans, S. ve Freear, S. 2017. "Characterisation of Liposome-Loaded Microbubble Populations for Subharmonic Imaging." *Ultrasound in Medicine and Biology*\_43(1): 346-356.
- Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L. ve Neves, N. M. 2014. "Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine." *Journal of The Royal Society Interface*\_11(101): 20140459.
- MorAvi, V., Robinson, K. A., Shroff, S. G. ve Lang, R. M. 1997. "Effects of temperature on Albunex and FS069 echocardiographic contrast agents: In vitro investigation using ultrasonic irradiation." *Echocardiography-a Journal of Cardiovascular Ultrasound and Allied Techniques*\_14(1): 39-49.

- Mulvana, H., Stride, E., Hajnal, J. V. ve Eckersley, R. J. 2010. "Temperature Dependent Behavior of Ultrasound Contrast Agents." *Ultrasound in Medicine and Biology* 36(6): 925-934.
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J. ve Moens, A. L. 2012. "Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52(6): 1213-1225.
- Paliwal, S. R., Paliwal, R. ve Vyas, S. P. 2015. "A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery." *Drug Delivery* 22(3): 231-242.
- Pang Z, L. N., Filkins RJ. 2012. "Dark pixel intensity determination and its applications in normalizing different exposure time and autofluorescence removal." *Journal of Microscopy* 246(1): 1-10.
- Patil, R. R., Guhagarkar, S. A. ve Devarajan, P. V. 2008. "Engineered nanocarriers of doxorubicin: A current update." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 25(1): 1-61.
- Patty, P. J. ve Frisken, B. J. 2005. "The influence of the pore size distribution on vesicles produced by extrusion." *Biophysical Journal* 88(1): 246a-246a.
- Peyman, S. A., Abou-Saleh, R. H., McLaughlan, J. R., Ingram, N., Johnson, B. R. G., Critchley, K., Freear, S., Evans, J. A., Markham, A. F., Coletta, P. L. ve Evans, S. D. 2012. "Expanding 3D geometry for enhanced on-chip microbubble production and single step formation of liposome modified microbubbles." *Lab on a Chip* 12(21): 4544-4552.
- Poirier, V. J., Thamm, D. H., Kurzman, I. D., Jeglum, K. A., Chun, R., Obradovich, J. E., O'Brien, M., Fred, R. M., Phillips, B. S. ve Vail, D. M. 2002. "Liposome-encapsulated doxorubicin (doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16(6): 726-731.
- Rivankar, S. 2014. "An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy." *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10(4): 853-858.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K. ve Hua, S. 2015. "Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery." *Frontiers in Pharmacology* 6.
- Siegel, R., Naishadham, D. ve Jemal, A. 2012. "Cancer Statistics, 2012." *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 62(1): 10-29.

- Silva, J. O.,Fernandes, R. S.,Lopes, S. C. A.,Cardoso, V. N.,Leite, E. A.,Cassali, G. D.,Marzola, M. C.,Rubello, D.,Oliveira, M. C. ve de Barros, A. L. B. 2016. "pH-Sensitive, Long-Circulating Liposomes as an Alternative Tool to Deliver Doxorubicin into Tumors: a Feasibility Animal Study." *Molecular Imaging and Biology*\_18(6): 898-904.
- Sood, S. 1999. "Characterization of liposome manufacturing using extrusion."
- Strouthos, C.,Lampaskis, M.,Sboros, V.,McNeilly, A. ve Averkiou, M. 2010. "Indicator dilution models for the quantification of microvascular blood flow with bolus administration of ultrasound contrast agents." *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*\_57(6).
- Swanson, E. J.,Mohan, V.,Kheir, J. ve Borden, M. A. 2010. "Phospholipid-Stabilized Microbubble Foam for Injectable Oxygen Delivery." *Langmuir*\_26(20): 15726-15729.
- Swift, L. P.,Rephaeli, A.,Nudelman, A.,Phillips, D. R. ve Cutts, S. M. 2006. "Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death." *Cancer Research*\_66(9): 4863-4871.
- Tinkov, S.,Coester, C.,Serba, S.,Geis, N. A.,Katus, H. A.,Winter, G. ve Bekerredjian, R. 2010. "New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: In-vivo characterization." *Journal of Controlled Release*\_148(3): 368-372.
- Tinkov, S.,Winter, G.,Coester, C. ve Bekerredjian, R. 2010. "New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I - Formulation development and in-vitro characterization." *Journal of Controlled Release*\_143(1): 143-150.
- Torchilin, V. P. 2007. "Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and Imaging." *Aaps Journal*\_9(2): E128-E147.
- Tsunoda, S.,Mazda, O.,Oda, Y.,Iida, Y.,Akabame, S.,Kishida, T.,Masaharu, S. Y.,Asada, H.,Gojo, S.,Imanishi, J.,Matsubara, H. ve Yoshikawa, T. 2005. "Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart." *Biochemical and Biophysical Research Communications*\_336(1): 118-127.
- Villanueva, F. S.,Lu, E. X.,Bowry, S.,Kilic, S.,Tom, E.,Wang, J. J.,Gretton, J.,Pacella, J. J. ve Wagner, W. R. 2007. "Myocardial ischemic memory imaging with molecular echocardiography." *Circulation*\_115(3): 345-352.
- Williams, R.,Hudson, J. M.,Lloyd, B. A.,Sureshkumar, A. R.,Lueck, G.,Milot, L.,Atri, M.,Bjarnason, G. A. ve Burns, P. N. 2011. "Dynamic Microbubble Contrast-enhanced US to Measure Tumor Response to Targeted Therapy: A Proposed



Clinical Protocol with Results from Renal Cell Carcinoma Patients Receiving Antiangiogenic Therapy." *Radiology*\_260(2): 581-590.

Yang, X. J.,Pang, J. X.,Shen, N.,Yan, F.,Wu, L. C.,Al-Kali, A.,Litzow, M. R.,Peng, Y.,Lee, R. J. ve Liu, S. J. 2016. "Liposomal bortezomib is active against chronic myeloid leukemia by disrupting the Sp1-BCR/ABL axis." *Oncotarget*\_7(24): 36382-36394.

Zhao, Y.,Alakhova, D. Y.,Kim, J. O.,Bronich, T. K. ve Kabanov, A. V. 2013. "A simple way to enhance Doxil (R) therapy: Drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer." *Journal of Controlled Release*\_168(1): 61-69.



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proje Yürütücüsü:                       | Yrd. Doç. Dr. SEVGİ KILIÇ ÖZDEMİR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Proje No:                               | 213M668                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Proje Başlığı:                          | Hedeflendirilmiş Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçükler İle İlaç Taşınımı Ve Kontrollü Lokal İlaç Salınımı İle Kanser Tedavisinde Kullanılması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Proje Türü:                             | 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Proje Süresi:                           | 36                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Araştırmacılar:                         | EKREM ÖZDEMİR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Danışmanlar:                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:  | 15/08/2014 - 15/08/2017                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Onaylanan Bütçe:                        | 1400579.0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Harcanan Bütçe:                         | 1162392.03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Öz:                                     | <p>Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar yalnızca hastalıklı hücreleri değil, aynı zamanda vücudun tüm bölgelerine yayılarak sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. İlacın tüm vücuda dağılması yerine doğrudan kanserli bölgeye ulaştırılması ve hedef bölgede hücre içine alımını kolaylaştırıcı alternatif yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada, ilk yerli üretim ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin kanser teşhis ve lokal tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bir kemoterapötik ajan olan Dokсорubisin (DOX) lipozomlara yüklenmiş, avidin-biyotin köprüsü ile mikroköpükçüklere konjüge edilmiş, ve meme kanser hücresine spesifik bir belirteç olan EGF ile işaretlenerek hedeflendirilmiş DOX yüklü mikroköpükçükler hazırlanmıştır. Mikroköpükçük başına 4.5.10-8 ?g-DOX yüklenebilmiştir. In-vitro ve biyouyumluluk testlerinin ardından, DOX yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçükler nüde farede in-vivo tümör modeli üzerinde etkinliği araştırılmıştır. Nüde farede kuyruk veninden verilen ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin tümöre ulaştığı ultrasonografi ile izlenmiş ve yüksek mekanik indeks (MI) değerlerinde mikroköpükçükler patlatılarak ilacın tümör bölgesinde dağılması sağlanmıştır. Boyutu 8 mm?den büyük tümörlerde tümör boyutunda küçülme ve %40?lara varan nekroz gözlenmiştir. Tümör dokusunda nekroz oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanması mikroköpükçüklerin kanser tedavisinde etkinliğini göstermektedir. Sonuçlar hedeflendirilmiş ilaç yüklü mikroköpükçüklerin kanser teşhis ve tedavisinde kullanılabileceğine dair umut vericidir.</p> |
| Anahtar Kelimeler:                      | Kanser, kemoterapi, ultrason, kontrast madde, mikroköpükçük, lipozomlar, ilaç taşınımı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:  | Hayır                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |